

Untersuchungen zur Vielfalt und Funktion von Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemikerin

Ilka Schoenian

geboren am 03. März 1983 in Achim

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Boland, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena
2. Prof. Dr. Georg Pohnert, Friedrich-Schiller-Universität Jena (IAAC)
3. Prof. Dr. Witko Francke, Universität Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2011

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menscheist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Was sind Streptomyceten?	2
1.1.1	Lebenszyklus der Actinomyceten	3
1.1.2	Besonderheiten des Genoms der Actinomyceten	4
1.1.3	Antibiotikaproduktion der Actinomyceten	5
1.1.4	Chemische Ökologie der Antibiotika von Actinomyceten	6
1.2	Blattschneiderameisen	8
1.2.1	Beginn der Pilzkultivierung durch Ameisen	9
1.2.2	Das Leben in einer Blattschneiderameisen-Kolonie	10
1.2.3	Wie verteidigen sich die Blattschneiderameisen?	12
2	Zielstellung	15
3	Ergebnisse und Diskussion	17
3.1	Untersuchungen zur Rolle von Streptomyceten im Ökosystem der Blattschneiderameisen	17
3.1.1	Identifizierung von Antibiotika isolierter Streptomyceten von <i>Acromyrmex</i> Blattschneiderameisen	19
3.1.2	Aktivität von identifizierten Antibiotika der Symbionten auf Mikroorganismen des Ökosystems der Blattschneiderameisen	26
3.1.3	Direkter Nachweis der von Actinomyceten-Symbionten identifizierten Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen	33
3.1.4	Antifungale Aktivität im Abfall von Blattschneiderameisen	37
3.1.5	Entwicklung einer Methode für den Nachweis der Aufnahme von Actinomyceten durch Blattschneiderameisen	40
3.2	Untersuchungen zum Antibiotikum Antimycin, das von Blattschneiderameisen-Symbionten produziert wird	45
3.2.1	Produktion von Antimycinen	46
3.2.2	Biosynthese von Antimycinen	48
3.2.3	Stabilität und Wirkungsweise der Antimycine	62
3.2.4	Untersuchungen zur Funktion von Antimycinen und (S)-3-Butyl-5-methylfuran-2(5H)-on (64)	67
3.3	Untersuchungen zu Antibiotika in Tröpfchen auf dem Luftmycel von Streptomyceten	76
4	Zusammenfassung	79
5	Summary	84

6	Experimenteller Teil	89
6.1	Geräte	89
6.2	Materialien	93
6.3	Allgemeine Methoden	96
6.4	Experimente	117
6.4.1	Identifizierung von Antibiotika isolierter Streptomyceten von <i>Acromyrmex</i> Blattschneiderameisen	117
6.4.2	Aktivität von identifizierten Antibiotika der Symbionten auf Mikroorganismen des Ökosystems der Blattschneiderameisen	123
6.4.3	Direkter Nachweis der von Actinomyceten-Symbionten identifizierten Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen	124
6.4.4	Antifungale Aktivität im Abfall von Blattschneiderameisen	125
6.4.5	Entwicklung einer Methode für den Nachweis der Aufnahme von Actinomyceten durch Blattschneiderameisen	126
6.4.6	Produktion von Antimycinen	131
6.4.7	Biosynthese von Antimycinen	132
6.4.8	Stabilität und Wirkungsweise der Antimycine	142
6.4.9	Untersuchungen zur Funktion von Antimycinen und (S)-3-Butyl-5-methylfuran-2(5H)-on (64)	148
6.4.10	Untersuchungen zu Antibiotika in Tröpfchen auf dem Luftmycel von Streptomyceten	155
7	Literaturverzeichnis	157
8	Anhang	169
8.1	Abkürzungsverzeichnis	169
8.2	Tabellen	172
8.3	Graphen	176
8.4	Strukturformeln	184
8.5	SPME-Chromatogramm-Vergleich von <i>S. odorifer</i>	187
8.6	Spektren	188
8.7	DNA Sequenzen	207
8.8	Bilder von fluoreszenzmarkierten Actinomyceten	208
8.9	Veröffentlichungen	210
8.10	Lebenslauf	211
8.11	Danksagung	212
8.12	Selbständigkeitserklärung	214

1 Einleitung

„Understanding the success and failure of antibiotics requires understanding their natural history – the origins, evolution, and functions of the molecular medley that has played such an important role in human health.“ [1]

Bereits 30 Jahre vor der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming [2] reichte der französische Militärarzt Ernest Duchesne 1897 seine Doktorarbeit mit dem Titel „*Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes: antagonisme entre les moisissures et les microbes*“ („Untersuchungen zum Überlebenskampf der Mikroorganismen: Antagonismus zwischen Schimmelpilzen und Mikroben“) ein (Abbildung 1). Diese Arbeit beschreibt die erste Beobachtung der antimikrobiellen Wirkung von Schimmelpilzen. [3]

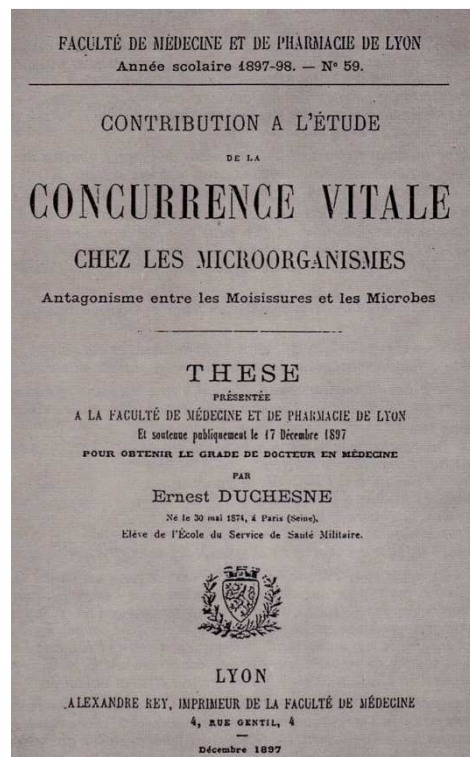


Abbildung 1: Doktorarbeit von Ernest Duchesne über die antimikrobielle Wirkung von Schimmelpilzen. [4]

Den Begriff Antibiotika verwendete Selman Waksman 1941 zum ersten Mal, um kleine Moleküle, die von Mikroben produziert werden und andere Mikroben in ihrem Wachstum hemmen, zu beschreiben. [5] 1944 entdeckten Selman Waksman und Albert Schatz in einer Kultur des Mikroorganismus *Streptomyces*

griseus das Antibiotikum Streptomycin. [6] Damit begann das Zeitalter der Antibiotikaforschung in Streptomycceten-Kulturen. Für die „Entdeckung des Streptomycins, des ersten Antibiotikums gegen Tuberkulose“, erhielt Waksman 1952 den Nobelpreis für Medizin. [7] Bis heute werden mehr als zwei Drittel aller klinisch genutzten Antibiotika natürlichen Ursprungs von Streptomycceten produziert. [8]

1.1 Was sind Streptomycceten?

Streptomycceten, was so viel heißt wie verdrillter oder kettenähnlicher Pilz, sind Gram-positive Actinobacteria, die einen hohen GC-Gehalt, zwischen 61 % und 80 %, in ihrem Genom aufweisen. [9] In den 50er Jahren war der Gedanke weit verbreitet, dass Streptomycceten zwischen Pilzen und Bakterien eingeordnet werden sollten. [10] Im Jahr 1961 zeigten Glauert und Hopwood schließlich, dass die DNA von *Streptomyces coelicolor* nicht von einer Membran umschlossen ist und daher keinen Zellkern, wie bei Eukaryoten, besitzt. [11] Damit war der endgültige Beweis geliefert, dass Streptomycceten zu den Prokaryoten und nicht den Pilzen zählen. Zusammen mit der Gattung der *Kitasatosporia* stammen sie aus der Familie der Streptomyccetaceae, die der Ordnung der Actinomycetales angehören und somit zur Klasse der Actinobacteria¹ zählen. [8]

Streptomycceten sind ubiquitär und leben hauptsächlich im Boden, wo sie organisches Material verwerten. Die rund 900 beschriebenen Spezies zeigen eine Vielzahl morphologischer, physiologischer und metabolischer Charaktereigenschaften, die sie für unterschiedlichste Lebensbedingungen qualifiziert und voneinander differenziert. [12] Im Jahr 1953 veröffentlichten Waksman und Lechevalier einen Leitfaden für die Bestimmung von Actinomycetes². Sie orientierten sich dabei unter anderem an den Tropfen, die einige der Spezies bei der Kultivierung auf festem Medium produzieren und als solche auf dem Luftmycel zu erkennen sind. [13]

¹ Im Folgenden werden die Actinobacteria unter dem Namen Actinomyceten zusammengefasst.

² Actinomycetes = heute Actinobacteria

1.1.1 Lebenszyklus der Actinomyceten

Actinomyceten haben einen komplexen Lebenszyklus bei dem die Zellen verschiedene morphologische Differenzierungen durchlaufen. Aus einer Spore bilden sich zwei bis drei Keimschläuche aus, sobald es günstige Umweltbedingungen erlauben (Abbildung 2, 1). Es entwickelt sich ein Substratmycel, das durch das Ausdehnen der Spitzen und das Formen von Verzweigungen wächst (Abbildung 2, 2). Nach zwei bis drei Tagen bildet sich das Luftmycel, die sogenannten Hyphen (Abbildung 2, 3). Ab einer gewissen Größe bilden die apikalen³ Bereiche des Luftmycels Spiralen aus. Sie bestehen aus einer Zelle, die mehrere Kopien des Genoms beherbergen. Sobald die Hyphen aufhören zu wachsen, werden sie durch das Ausbilden von Septen⁴ in mehrere Kompartimente, sogenannte Presporen geteilt, die nun jeweils nur noch eine Genomkopie enthalten. Diese Kompartimente verändern weiter ihre Form und Wanddicke, um letztendlich die Sporen zu bilden (Abbildung 2, 4). [8] Die Sporen dienen nicht nur dem Überdauern von schlechten Umweltbedingungen, sondern helfen auch bei der Verbreitung der Actinomyceten. So können die, etwa 0,5 µm großen Sporen durch Luftzug, Wasser oder auch Insekten in der Umgebung verteilt werden. [14]

³ Apikal = an der Spitze gelegen

⁴ Septen = Scheidewände in den Hyphen

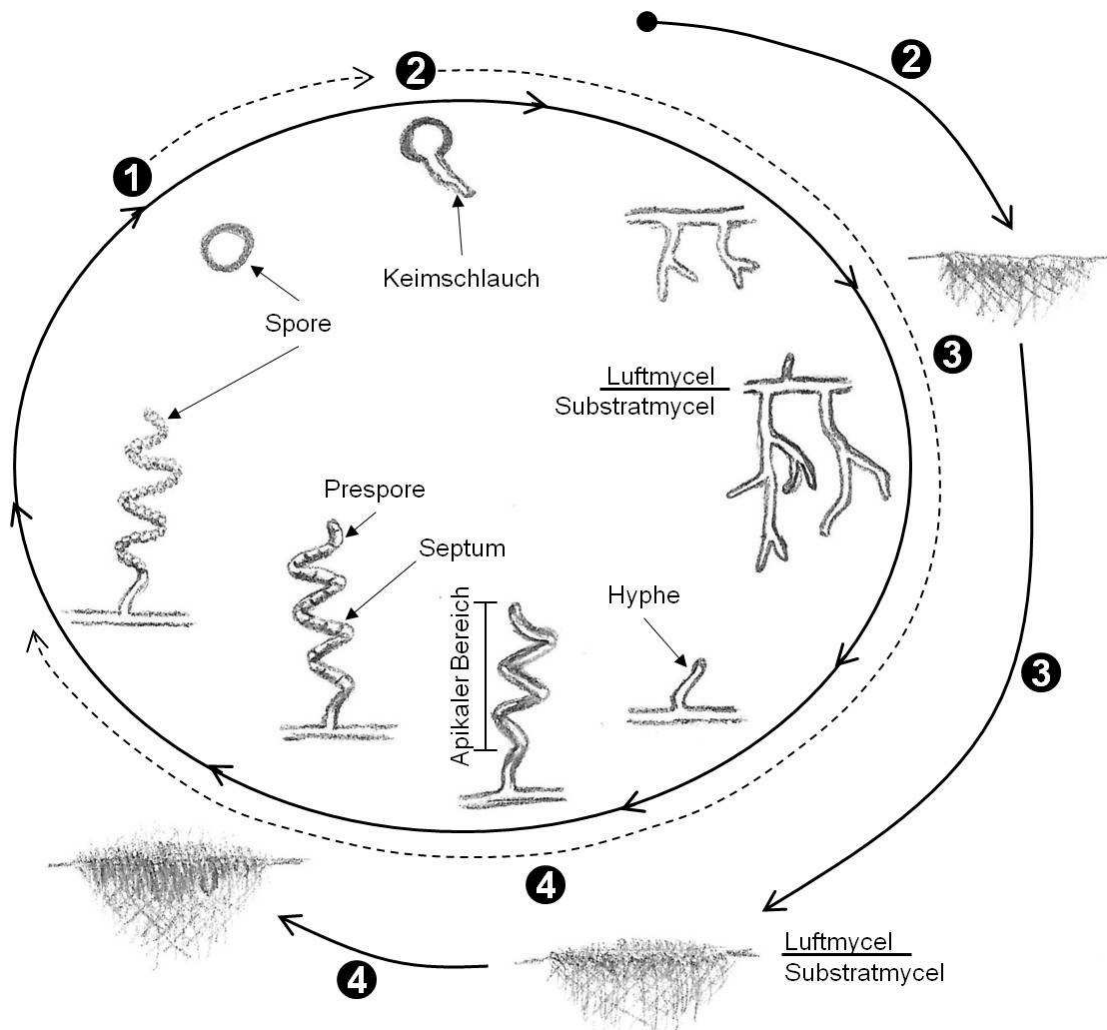


Abbildung 2: Lebenszyklus der Actinomyceten von der Keimung zur Sporenbildung; 1 = Keimung; 2 = Substratmycelbildung, 3 = Luftmycelbildung, 4 = Sporenbildung.

1.1.2 Besonderheiten des Genoms der Actinomyceten

Im Vergleich zu den meisten Bakterien besitzen Streptomyceten ein relativ großes, lineares Genom (ca. 8 – 10 Mb)⁵, das über zwanzig für Sekundärmetabolite codierende Gen-Cluster enthalten kann. [12, 15] Dabei sind die etwa 20 bis 30 Gene, die für die entsprechenden Enzyme codieren, nebeneinander angeordnet. Viele dieser Cluster sind in den Endregionen des Genoms lokalisiert. Es wurde gezeigt, dass genau diese Endstücke sehr instabil sind. Sie beinhalten transposable Elemente⁶, die sich zu bestimmten Zeitpunkten in das Genom integrieren können. [16] Zudem konnten einige Plasmide⁷ und Megaplasmide (10 kb – 1,8 Mb) aus Streptomyceten isoliert werden, die für

⁵ *Escherichia coli*, Gram-negatives Bakterium = ca. 4,65 Mb

⁶ Springende Gene, die ihre Position im Genom spontan verändern können.

⁷ Plasmid = kleine, ringförmige, autonom replizierende, doppelsträngige DNA-Moleküle, nicht zum Bakterienchromosom zählend

Gene der Antibiotikabiosynthese codieren. Diese können zirkulär, aber auch linear vorliegen [17] und besitzen in den meisten Fällen selbstübertragende Fertilitätsfaktoren. Viele der zirkulären Plasmide enthalten Phagenintegrationsstellen (*int*, *att*)⁸, mit denen sie sich nicht-mutagen in hochkonservierte *tRNA*⁹-Gene des Genoms integrieren können. Die Plasmide können so durch Konjugation¹⁰ von einer zur anderen Zelle übermittelt werden. [8] Im Jahr 1993 konnten erstmals Gene, die für einen inter- (*tra*)¹¹ und intramyzelialen Plasmidtransfer (*spdA*, *spdB*)¹² notwendig sind, auf dem Streptomyceten Plasmid pIJ101 identifiziert werden. [15] Damit wurde gezeigt, dass Gene für die Regulation, die Resistenz oder die Synthese von Antibiotika der Actinomyceten mittels horizontalem Gentransfer weitergegeben werden können. [18, 19]

1.1.3 Antibiotikaproduktion der Actinomyceten

Im Jahr 2000 wurden 66 % aller bekannten, von Mikroorganismen produzierten Antibiotika als Naturstoffe von Actinomyceten beschrieben. Die meisten dieser Verbindungen werden von Streptomyceten produziert. [8] In flüssiger Kultur beginnen Streptomyceten meistens Antibiotika zu produzieren, sobald sie in die stationäre Phase übergehen. Auf festem Medium, wie Agarplatten, korreliert die Antibiotikaproduktion meist mit der Ausbildung des Luftmycels. [20]

Die Regulation der Antibiotikaproduktion ist unterschiedlich und komplex: Die Biosynthesewege werden oft spezifisch kontrolliert, wobei sogenannte pleiotropische Faktoren¹³ die Expression von Enzymen aktivieren und deaktivieren können. Stressfaktoren und verschiedene niedermolekulare Signalmoleküle, sogenannte „Autoinducer“, spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Biosynthesewegen. Nährstoffe wie Phosphat, Glukose oder Ammonium können hierbei die Expression von Biosyntheseenzymen in unterschiedlichen Organismen sowohl hemmen als auch aktivieren. [8]

⁸ *int* = „integration protein“; *att* = „attachment site“

⁹ *tRNA* = Transfer-RNA, Transport von Aminosäuren für die Proteinbiosynthese

¹⁰ Konjugation = Übertragung von Teilen des Genoms von einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle

¹¹ *tra* = „transfer“ Gen

¹² *spd* = „intrahyphal spread“ Gen

¹³ Pleiotropie = Veränderung mehrerer phänotypischer Merkmale, die durch ein einzelnes Gen hervorgerufen wird

1.1.4 Chemische Ökologie der Antibiotika von Actinomyceten

Etwa 7900 Antibiotika¹⁴ mit einer Vielzahl verschiedener chemischer Klassen und Funktionen werden von Actinomyceten produziert (Abbildung 3). [8] Zum Beispiel ist die Clavulansäure (1) von *Streptomyces clavuligerus* ein β -Lactam, das die β -Lactamase inhibiert. [21] Kanamycin A (2), von *Streptomyces kanamyceticus*, ist ein Aminoglycosid, welches an den Ribosomen bindet und so die Peptidbiosynthese blockiert. [22] Das Polyketid Monensin (3) von *Streptomyces cinnamomensis*, ein Polyether, wirkt als Ionophor [23] und Thiostrepton (4) von *Streptomyces azureus*, ein Thiopeptid, synthetisiert durch eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase, inhibiert die Peptidbiosynthese. [24] Es wird davon ausgegangen, dass die Antibiotika ihren Produzenten hauptsächlich zur Verteidigung dienen. [25, 26]

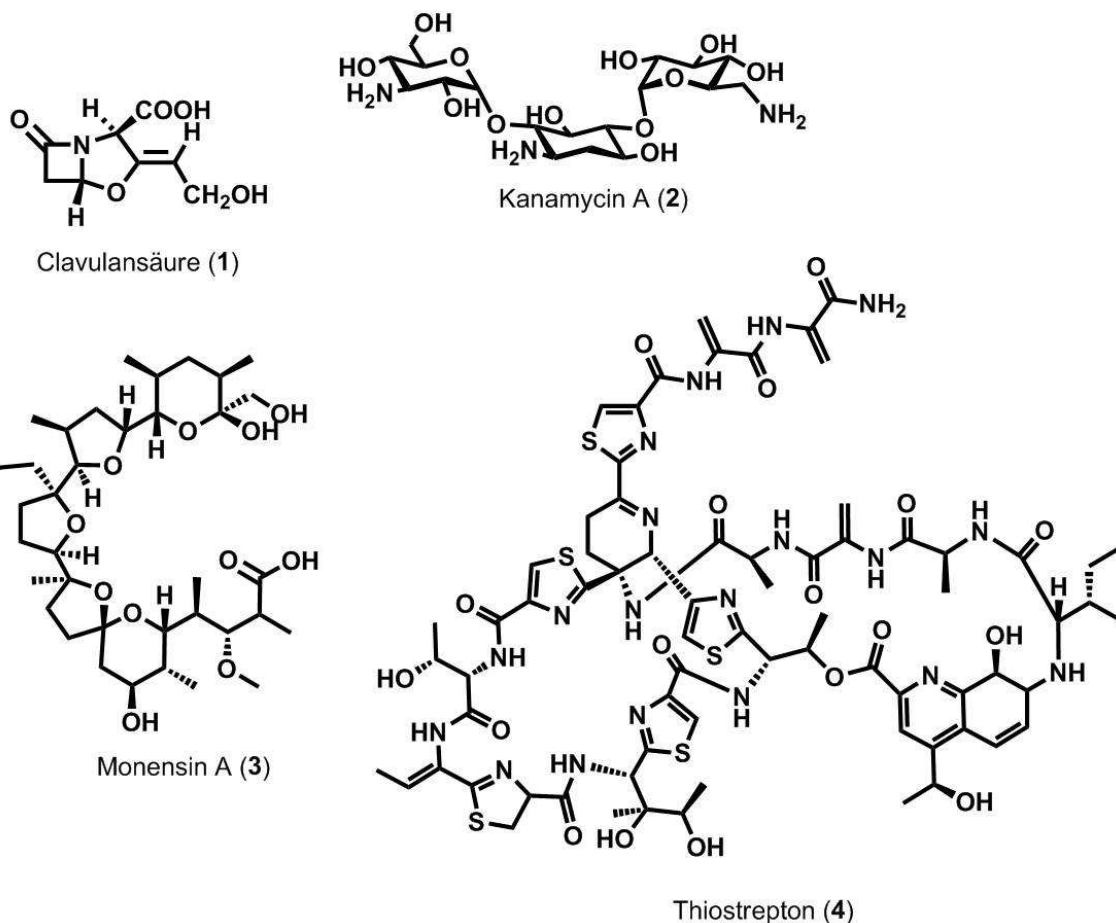


Abbildung 3: Beispiele für die von Actinomyceten produzierte Antibiotika-Vielfalt.

Im Leben der Menschen spielen Antibiotika eine wichtige Rolle, da sie zur Behandlung von Infektionskrankheiten dienen. [27, 28] Sie schützen zudem

¹⁴ Entspricht 66 % aller bekannten Antibiotika

Pflanzen vor Pathogenen, [29] fördern das Wachstum von Tieren und helfen so den hohen Bedarf an Nahrung der Menschheit zu decken. [30, 31] Doch Anfang 1960 wurde in Großbritannien zum ersten Mal der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*¹⁵ (MRSA) beschrieben. [32] Dem „Center for Disease Control“ zufolge starben 2005 mehr als 18.500 Menschen in den USA an MRSA Infektionen. [33] Das MRSA-net berichtete, dass vor einigen Jahren der prozentuale Anteil an MRSA noch bei 2 % lag und inzwischen auf 25 % angestiegen ist. [34] Zudem steigt auch die Anzahl anderer, multiresistenter Mikroorganismen. [32, 35]

Im Vergleich zum Wissen über die Nutzung zum Wohl der Menschheit ist die Aufgabe der Antibiotika für ihre natürlichen Produzenten und deren Ökosystem bisher nur wenig erforscht. [26]

„We know what antibiotics can do for us, but what do they do for the producing organism?“ [1]

Actinomyceten leben hauptsächlich in dem komplexen Ökosystem des Erdbodens. [36] Aber sie kommen auch als Endophyten in Pflanzengewebe [37-39] oder in Symbiosen mit unterschiedlichen Insekten vor. Eine Symbiose bezeichnet das enge Zusammenleben unterschiedlicher Organismen. Diese Lebensform kann zum einen parasitärer Natur sein, indem nur einer von der Gemeinschaft profitiert. Zum anderen gibt es Symbiosen, in denen beide Organismen voneinander abhängig sind und gegenseitig lebenswichtige Aufgaben erfüllen (Mutualismus). Die von den Actinomyceten produzierten Antibiotika könnten in diesem Zusammenhang den unterschiedlichen Wirten bei der Verteidigung gegen Infektionen helfen. So schützt der Bienenwolf *Philanthus triangulum* seine Brut durch das Verteilen seines Symbionten *Candidatus Streptomyces philanthi* auf dem Kokon der Larven. Im Laufe der Verpuppung werden die Actinomyceten in den Kokon integriert und verhindern mit der Produktion von Antibiotika den Befall durch Pathogene. [40, 41] Ein anderes Beispiel ist der Borkenkäfer *Dendroctonus frontalis* („Southern pine beetle“), der mit Hilfe von Streptomycceten die Futterquelle seiner Larven schützt. Der erwachsene Borkenkäfer inokuliert einen mutualistischen Pilz der Spezies *Entomocorticium* in die Rinde seines Wirtsbaumes, von dem sich

¹⁵ MRSA – Heute auch Multi-resistenter *Staphylococcus aureus* genannt

später seine Larven ernähren werden. Ein pathogener Pilz, *Ophiostoma minus*, bedroht diese Brutstätte indem er den Futterpilz verdrängt und somit das Heranwachsen der Larven verhindert. Die Streptomyceten, die der Borkenkäfer mit sich trägt, wirken hemmend auf den pathogenen Pilz und verhindern somit das Verhungern der Larven. [42] Eine ähnliche Symbiose wie die des Borkenkäfers *Dendroctonus frontalis* wurde bei den Blattschneiderameisen beobachtet. [43]

1.2 Blattschneiderameisen

In dem Tribus¹⁶ der Attini, den pilzkultivierenden Ameisen, bilden die Blattschneiderameisen zwei Gattungen, *Atta* und *Acromyrmex*. Thomas Belt, ein englischer Geologe und Naturforscher, beschrieb zum ersten Mal 1874 in seinem Buch „Naturalist in Nicaragua“ den Zusammenhang zwischen dem Schneiden von Blättern und dem Füttern des Nahrungspilzes durch die Blattschneiderameisen (Abbildung 4). [44] Zuvor ging man davon aus, dass die Ameisen die Blätter schneiden, um sich direkt von ihnen zu ernähren. Andere Attini-Gattungen kultivieren ihren Futterpilz auf toten Insekten, Abfallstoffen oder Gräsern und Blätterabfällen. [45]

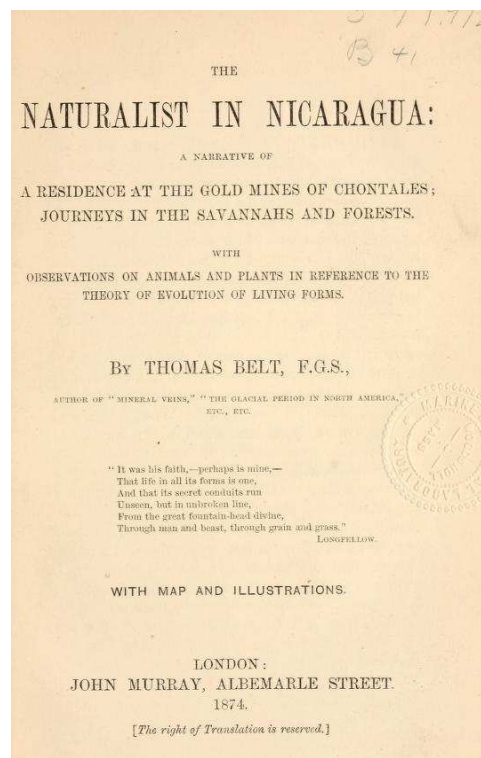


Abbildung 4: Publikation von Thomas Belt zur Pilzkultivierung von Blattschneiderameisen. [46]

¹⁶ Tribus = in der Systematik der Biologie eine Rangstufe zwischen Unterfamilie und Gattung

1.2.1 Beginn der Pilzkultivierung durch Ameisen

Das Nutzen von Pilzen als Nahrungsquelle wird als Mycophagie bezeichnet. Die meisten Pilze, die von den Attini-Ameisen kultiviert werden, stammen aus den Gattungen *Leucoagaricus* und *Leucocoprinus* der Familie Lepiotaceae, einer Gruppe saprotroph¹⁷ lebender Pilze. Man geht davon aus, dass der Ursprung der pilzanbauenden Ameisen in Mittel- und Südamerika¹⁸ liegt. Dort befindet sich die größte Vielfalt und das höchste Vorkommen der Blattschneiderameisen. [47]

Schon vor 45 – 65 Millionen Jahren haben sich die Attini-Ameisen aus der Familie der Formicidae entwickelt und sich das Kultivieren von Pilzen als Futterquelle angeeignet. Sie haben sich im Laufe der Evolution von „Jägern und Sammlern“ zu „Bauern“ entwickelt. [48]

Die Ameisen wandelten sich höchstwahrscheinlich aufgrund eines geologischen Ereignisses zu Pilzfressern. Ein Massenaussterben zum Zeitpunkt der Kreide-Tertiär-Grenze (KT-Grenze), das die Erdneuzeit (das Känozoikum) einleitete, wird als Beginn der Pilzkultivierung vermutet. Da während dieser Katastrophe die typischen Nahrungsquellen der Ameisen, wie Pflanzennektar, Arthropoden und Samen drastisch abnahmen, ist es plausibel, dass eine Veränderung der Nahrungsquelle notwendig war, um zu überleben. So konnten nur solche Organismen diese Katastrophe überdauern, deren Nahrungsquellen nicht von Photosynthese abhängig waren, wie die Pilze. [49] Es gibt verschiedene Hypothesen, die den Beginn der Ameisen-Pilzkultur von unterschiedlichen Substraten ausgehend beschreiben: Pilzbefallene Samen, die von den Ameisen gesammelt wurden, Pilze die in den Wänden der Attini-Nester lebten, verrottetes Holz, das den Ameisen als Behausung diente und Mykorrhiza werden diskutiert. [50] Die Blattschneiderameisen und ihr Futterpilz haben so im Laufe der Zeit einen Mutualismus entwickelt und sind damit voneinander abhängig geworden. [47]

¹⁷ Saprotroph = tote organische Substanz als Nahrung nutzen

¹⁸ In den neotropischen Wäldern

1.2.2 Das Leben in einer Blattschneiderameisen-Kolonie

Atta und *Acromyrmex*-Kolonien sind in ihrer sozialen Struktur hoch entwickelt. Es gibt viele verschiedene Kasten, die jeweils eine bestimmte Aufgabe erfüllen. Die Individuen können meist durch ihre Größe den unterschiedlichen Kasten zugeordnet werden. Zum Beispiel schneiden die sehr großen Ameisen (Maxima, ca. 10 mm) die Blätter und beschützen die Kolonie. Die sehr kleinen Arbeiterinnen (Minima, ca. 2 mm) dagegen sind die eigentlichen „Pilz-Bauern“. Sie kultivieren und pflegen den Pilzgarten. Zudem umsorgen sie die Brut und füttern die Kolonie (Abbildung 5).

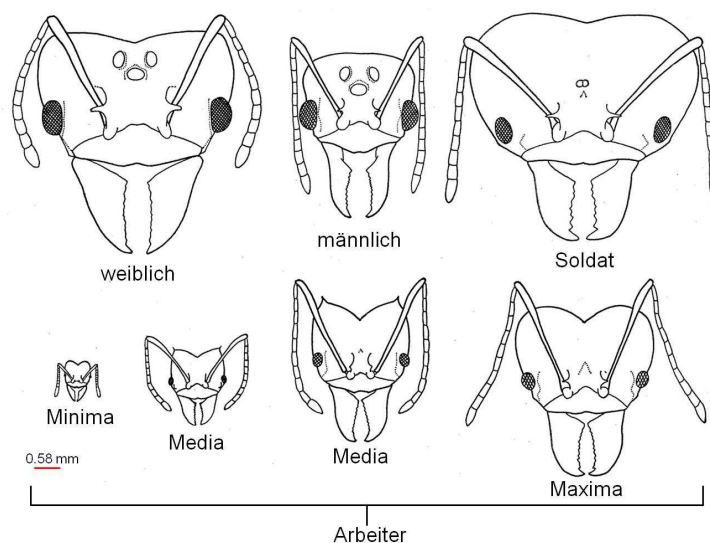


Abbildung 5: Skizze unterschiedlicher Kopfgrößen einiger *Atta cephalotes* Kasten. [45]

Die Blattschneiderameisen leben in Nestern, die sich im Fall der *Atta*-Spezies unter der Erde befinden. Sie sind aus mehreren, durch Gänge miteinander verbundenen Kammern geformt und bilden somit ein komplexes Netzwerk. *Acromyrmex*-Spezies dagegen bauen ihre Nester, die sich häufig unter einem Baum befinden, meistens als Hügel aus Erde, Gras oder Abfall. In beiden Gattungen kultivieren die Minima den Futterpilz in Kammern, die in Anzahl und Größe variieren können. [45]

Das Nest einer ausgereiften *Atta*-Kolonie mit bis zu acht Millionen Arbeiterinnen besteht aus über einhundert Kammern und umfasst ein Volumen von etwa 20 m³ (Abbildung 6). Für das Kultivieren ihres Futterpilzes ernten diese Blattschneiderameisen mehr als 240 kg Trockengewicht an Blattmaterial pro Jahr. [51] Das entspricht bei einem Wassergehalt von etwa 80 % einer Menge

von 1,2 Tonnen frischem Blattmaterial. Aus diesem Grund stellen die Blattschneiderameisen in vielen Regionen eine Bedrohung für die Landwirtschaft dar. [52]



Abbildung 6: Teilweise ausgehobenes Nest einer großen *Atta*-Kolonie. [51]

Die anfallenden Abfälle der Kolonie aus dem Nest zu entfernen, ist eine weitere wichtige Aufgabe der Arbeiterinnen einer Blattschneiderameisen-Kolonie. Sobald viele Individuen auf engem Raum zusammenleben, besteht eine hohe Gefahr der Verbreitung von mikrobiellen Infektionen. Abfälle aus dem Pilzgarten, Exkremete und tote Ameisen stellen eine mögliche Quelle von schädlichen Mikroorganismen dar. Daher werden solche Materialien in Abfallkammern oder außerhalb des Nestes gebracht und gelagert. [53]

Der Futterpilz wird von den Blattschneiderameisen in ihren Nestern kultiviert, indem sie Pilzfäden auf frisches Substrat aus Blattmaterial animpfen. Die Spitzen der Hyphen des Futterpilzes werden von den Arbeiterinnen regelmäßig gestutzt um zu verhindern, dass der Pilz Fruchtkörper ausbildet. Stattdessen entwickeln sich sogenannte Gongylidien, geschwollene Hyphen, die reich an Glykogen und Fetten sind und den Ameisen als Energiequelle dienen (Abbildung 7). [54, 55]

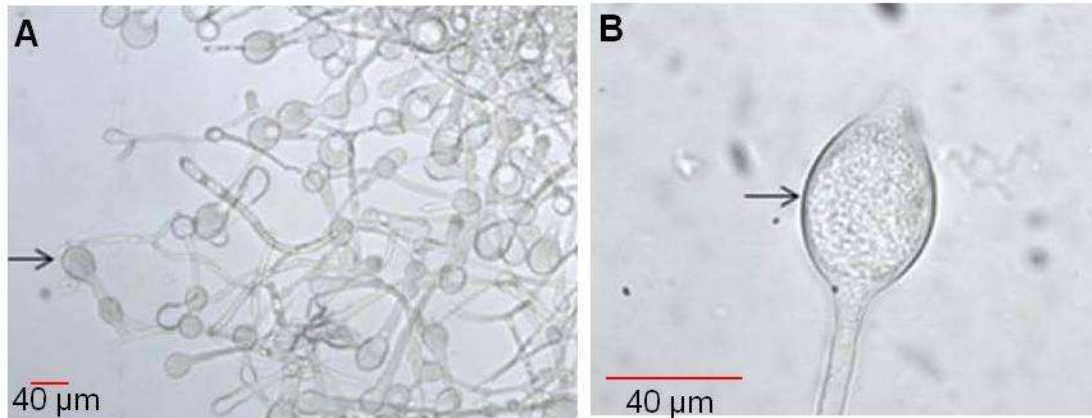


Abbildung 7: A = Mikroskopische Aufnahme des Mycel des Futterpilzes von *Atta sexdens*; B = Vergrößerte mikroskopische Ansicht einer Gongylidia (Pfeil). [54]

1.2.3 Wie verteidigen sich die Blattschneiderameisen?

Die Bedrohungen für Blattschneiderameisen-Kolonien sind vielfältig. So müssen sich die Ameisen gegen andere Blattschneiderameisen-Kolonien, Wanderameisen [56] und parasitäre Fliegen [57, 58] verteidigen. Hierbei helfen den Individuen ihre Mandibeln, die sogar in die menschliche Haut schneiden können. [45]

Ameisen, wie auch alle anderen Insekten sind zudem vielen verschiedenen pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. [59-61] Nicht nur Entomo- sondern auch Phyto- und Mycopathogene¹⁹ stellen potentielle Gefahren für die gesamte Blattschneiderameisen-Kolonie dar. Beispielsweise können die Blätter für das Pilzsubstrat befallen sein, womit sie eine verdorbene Nahrungsquelle bilden, von der sich der Futterpilz nicht ernähren kann. Durch die Zerstörung des Futterpilzes würde die Hauptnahrungsquelle der Ameisen-Kolonie wegfallen. [62] Neben generellen Pathogenen gibt es einen nekrotrophen²⁰ Pilz der Gattung *Escovopsis*, der auf den Gartenpilz der Ameisen spezialisiert ist. Er befällt nicht direkt die Blattschneiderameisen, ist aber ein Parasit des Futterpilzes und bedroht dadurch auch die Ameisen-Kolonie. [61, 63] Mikroorganismen, die in der Erde leben und bei guten Bedingungen das Nest überwachsen könnten, gilt es ebenso in Schach zu halten. Die Blattschneiderameisen teilen anfallende Aufgaben in der Kolonie systematisch auf. So gibt es auch Ameisen, die nur für das Wegschaffen und Umsortieren von Abfällen

¹⁹ Entomopathogen = Insektenpathogen; Phytopathogen = Pflanzenpathogen; Mycopathogen = Pilzpathogen

²⁰ nekrotroph = ein Parasit, der die Zellen seines Wirts tötet und sich dann von ihnen ernährt

zuständig sind. Die Ausbreitung potentieller Pathogene wird dadurch vermindert. Zudem säubern die Minima-Arbeiterinnen den Pilzgarten kontinuierlich von pathogenen Pilzsporen und Hyphen, die sofort entfernt werden. [64] Neben der mechanischen Reinigung ihres Gartenpilzes verwenden Blattschneiderameisen antimikrobielle Verbindungen, um die Ausbreitung von Pathogenen zu verhindern. Diese Substanzen werden von sogenannten metapleurale Drüsen auf das Exoskelett abgegeben. Das Myrmicacin (5) (Abbildung 8) und verschiedene γ -Butyrolaktone sind Beispiele für solche Verbindungen. [65, 66]

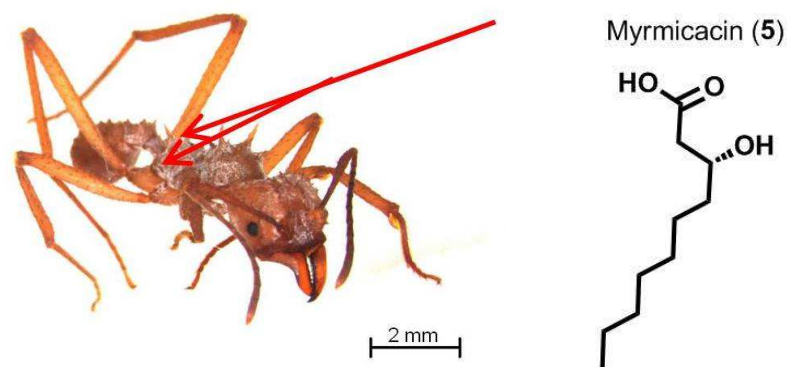


Abbildung 8: *Acromyrmex*-Blattschneiderameise, roter Pfeil markiert die Position der metapleurale Drüsen (Foto: Dieter Spiteller); (R)-3-Hydroxydekansäure, Myrmicacin (5).

1999 wurde eine weitere Möglichkeit der Verteidigung von Blattschneiderameisen gegen pathogene Mikroorganismen erkannt. C. Currie *et al.* [43] zeigten, dass die weiße Substanz, die auf dem Exoskelett mancher Individuen mit bloßem Auge zu erkennen ist, Actinomyceten sind (Abbildung 9). Mittlerweile konnten die Actinomyceten Gattungen *Pseudonocardia*, *Streptomyces* und *Kitasatosporia* von Individuen der Blattschneiderameisen isoliert werden. [67-70] Da diese Actinomyceten für die Produktion von verschiedenen Antibiotika bekannt sind, [8] wurde vermutet, dass diese Verbindungen der Verteidigung der Ameisen-Kolonie dienen.



Abbildung 9: Actinomyceten-Besiedelung auf der Unterseite des Exoskeletts einer *Acromyrmex octospinosus* Blattschneiderameise. (Foto: Dieter Spiteller)

2 Zielstellung

Actinomyceten produzieren eine große Vielfalt an Antibiotika, die von Menschen genutzt werden. [8, 27-31] Immer häufiger werden jedoch Mikroorganismen isoliert, die Resistenzen gegen die gängigen Antibiotika entwickelt haben. [32, 35] Die Untersuchung von Symbiosen zwischen Actinomyceten und anderen Organismen eröffnet in diesem Zusammenhang eine Möglichkeit, die Verhinderung von Resistenzbildung in der Natur zu studieren und neue, aktive Verbindungen zu isolieren. [37-43]

Im Rahmen meiner Dissertation sollte die Funktion von Antibiotika in der Natur näher untersucht werden. Dabei diene hauptsächlich das Ökosystem der Blattschneiderameisen-Gattung *Acromyrmex* als Studienobjekt.

Erst im Jahr 1999 wurde bekannt, dass das Exoskelett der Blattschneiderameisen mit Actinomyceten besiedelt ist. [43] So stellte sich die Frage, welche Rolle die von den Actinomyceten-Symbionten produzierten Antibiotika in dem Ökosystem der Ameisen spielen. Es wurden bereits Untersuchungen zur Wirkung von isolierten Actinomyceten auf das Wachstum verschiedener potentieller Pathogene der Blattschneiderameisen durchgeführt, [43, 71] insbesondere mit dem auf den Gartenpilz der Ameisen spezialisierten Pilz *Escovopsis*. [61] Das Ökosystem der Blattschneiderameisen und die Bedeutung der dort lebenden Mikroorganismen sowie ihre Sekundärmetabolite sind allerdings noch in weiten Teilen unverstanden. Daher sollten die im Folgenden aufgeführten Aspekte in der vorliegenden Dissertation bearbeitet werden:

- Die noch unbekanntes Vielfalt der Sekundärmetabolite, die von Actinomyceten aus dem Ökosystem der Blattschneiderameisen produziert werden, sollte untersucht werden. Dafür sollte eine Methode entwickelt werden, mit der sich effizient das Antibiotikaspektrum möglichst vieler der isolierten Streptomyceten-Symbionten identifizieren lässt. Um die Funktion identifizierter Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen beurteilen zu können, sollte das Wirkspektrum der Verbindungen auf das Wachstum verschiedener Mikroorganismen, die im Ökosystem der Blattschneiderameisen vorkommen, untersucht werden.

- Da es bisher unmöglich war Antibiotika der mikrobiellen Symbionten direkt im Ökosystem der Blattschneiderameisen nachzuweisen, stellte sich die Frage, ob die Antibiotika unter natürlichen Bedingungen gebildet werden und welche Rolle ihnen bei der Verteidigung gegen Infektionen wirklich zukommt. Daher sollte versucht werden, identifizierte Antibiotika direkt im Nest und auf den Blattschneiderameisen nachzuweisen.
- Über den Mechanismus und den Zeitpunkt der Aufnahme der Actinomyceten-Symbionten durch die Blattschneiderameisen gibt es kontroverse Thesen. [67-69, 72-75] Daher sollte eine Strategie entwickelt werden, wie die Aufnahme der Mikroorganismen durch die Blattschneiderameisen studiert werden kann.
- Im Laufe der Studien wurde das Antibiotikum Antimycin in Streptomyces-Kulturen der Blattschneiderameisen identifiziert. So sollten auch Aspekte der noch unbekanntem Biosynthese dieser Verbindungen untersucht werden

Zusammenfassend sollen die in meiner Dissertation gewonnenen Erkenntnisse zum Verständnis der ökologischen Funktion von Antibiotika für ihre Produzenten und die Blattschneiderameisen beitragen sowie nähere Einblicke in die Biosynthese der Antimycine geben.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zur Rolle von Streptomyceten im Ökosystem der Blattschneiderameisen

Currie *et al.* erkannten 1999, dass Bereiche des Exoskeletts der Blattschneiderameisen mit Actinomyceten besiedelt sind. Sie identifizierten diese als *Pseudonocardia*. Da die isolierten Symbionten in einem Bioassay den Pathogen *Escovopsis* hemmten stellten Currie *et al.* die These auf, dass diese Bakterien durch die Produktion von Antibiotika die Blattschneiderameisen und ihren Futterpilz vor pathogenen Mikroorganismen schützen. [43] Mittlerweile ist bekannt, dass die Ameisen neben *Pseudonocardia* auch mit anderen Actinomyceten, insbesondere mit Streptomyceten besiedelt sind. [67, 69, 70, 76] Es wurden bereits Untersuchungen zur Wirkung von isolierten Actinomyceten-Symbionten auf andere Mikroorganismen durchgeführt. [43, 71] Sen *et al.* zeigten, dass von Attini-Arbeiterinnen isolierte *Pseudonocardia* und *Amycolatopsis*, unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Pilze aufweisen. So werden der enthomopathogene Pilz *Acrodontium*, der Saprophyt *Alternaria tenuissima* und der Gartenpilz der Ameisen *Leucocoprinus* stark in ihrem Wachstum gehemmt, sobald sie zusammen mit verschiedenen *Pseudonocardia* oder *Amycolatopsis* Spezies auf einer Agarplatte wachsen. Andere Pilzarten, wie *Fusarium solani*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium leptobactum*, *Syncephalastrum racemosum* und *Cyphellophora* werden nur schwach an ihrem Wachstum gehindert. [71]

Neben der Wirkung von Actinomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen auf andere Mikroorganismen konnten, zehn Jahre nach der Entdeckung von Currie *et al.*, Haeder *et al.* als erste Antibiotika von Streptomyceten-Symbionten der *Acromyrmex*-Blattscheiderameisen (*Acromyrmex volcanus*, *Acromyrmex echinator*, *Acromyrmex octospinosus*) Candicidine isolieren. Diese Antibiotika, wie Candicidin D (**6**) (Abbildung 10), gehören zu der Klasse der Makrolide. [70] Im selben Jahr identifizierten Oh *et al.* Dentigerumycin (**7**). Diese Verbindung wird von einem mit der pilzkultivierenden Ameise *Apterostigma dentigerum* assoziierten *Pseudonocardia* Stamm produziert (Abbildung 10). [77] Barke *et al.* entdeckten 2010 in der Kultur eines *Pseudonocardia* Stammes von *Acromyrmex octospinosus* eine zum Nystatin A₁ (**8**) eng verwandte Verbindung,

Nystatin P1. Der Unterschied der Verbindungen ist eine zusätzliche Glykosylierung von Nystatin P1, die genaue Struktur ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Außerdem konnten sie wie Hader *et al.* Candidicine in den Kulturen ihrer Actinomyceten-Isolate finden. [69, 70]

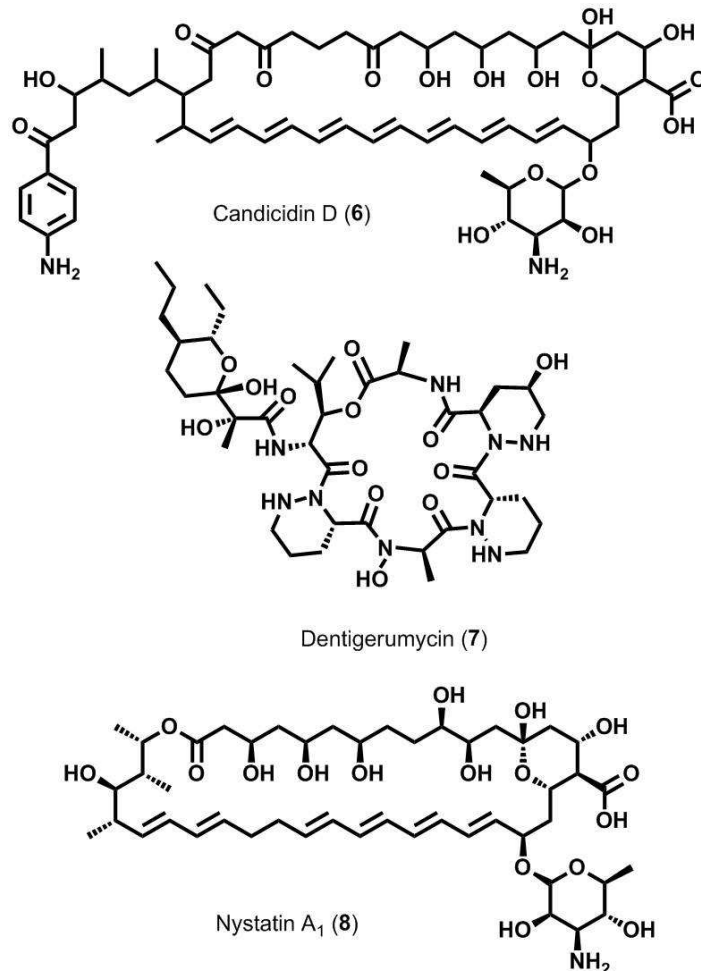


Abbildung 10: Candicidin D (6), produziert von Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen Gattung *Acromyrmex*, [70] Dentigerumycin (7) produziert von *Pseudonocardia* der Ameisen Gattung *Apterostigma* [77] und Nystatin A₁ (8).

Zusätzlich zur Identifikation von Antibiotika wurde die wachstumsinhibierende Wirkung der Verbindungen auf ausgewählte pathogene Pilze untersucht. Candicidinmakrolide wie 6, Dentigerumycin (7) und Nystatin P1 hemmen das Wachstum des Pathogen *Escovopsis*. Alle identifizierten Verbindungen zeigten inhibierende Wirkung gegenüber verschiedener Spezies von *Candida albicans*, einem humanpathogenen Pilz. [69, 70, 77, 78]

3.1.1 Identifizierung von Antibiotika isolierter Streptomycceten von *Acromyrmex* Blattschneiderameisen

Es wurde bereits eine Vielzahl an Actinomyceten-Symbionten von den Blattschneiderameisen isoliert. Einige dieser Symbionten sind in der Lage pathogene Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu inhibieren. [43, 69-71, 77] Daher stellte sich die Frage, wie die Diversität der Antibiotika, die im Ökosystem der Blattschneiderameisen vorhanden sein kann, zu erfassen ist. Eine mögliche Funktion der Verbindungen im Ökosystem der Ameisen könnte anschließend untersucht werden.

Für meine Untersuchungen wurden 14 Streptomycceten verwendet, die durch S. Haeder vom Körper der drei Blattschneiderameisen *Acromyrmex octospinosus* (Ao), *Acromyrmex echinator* (Ae) und *Acromyrmex volcanus* (Av) isoliert wurden (Abbildung 11, Schritt 1). 12 der 14 Stämme wurden bereits von S. Haeder mittels 16S rDNA Sequenzierung charakterisiert. [70] Die Gensequenz, die für die 16S Einheit der Ribosomen von Prokaryoten codiert, ist charakteristisch für die entsprechenden Spezies und wird daher für die Klassifizierung von Bakterien genutzt. [79]

Zusätzlich zu den 12 bereits charakterisierten Streptomycceten wurden die zwei anderen Stämme anhand ihrer 16S rDNA Sequenzen von mir bestimmt. Die Sequenzen wurden in Datenbanken („NCBI“ und „Greengenes“) mit denen anderer Bakterien verglichen. Die so erhaltene prozentuale Übereinstimmung der Basenfolge der Mikroorganismen gab Aufschluss über die Ähnlichkeit der Stämme. Auf diese Weise wurden die nächsten, bekannten Verwandten der 14 isolierten Streptomycceten bestimmt (Abbildung 11, Schritt 2B + 3B). Die Ergebnisse dieser phylogenetischen²¹ Analysen werden häufig für die Untersuchung von stammesgeschichtlichen Entwicklungen verwendet. [80-82] Mit unterschiedlichen Programmen können anhand von 16S rDNA Sequenzen sogenannte phylogenetische Bäume erstellt werden, die die Ähnlichkeit der Mikroorganismen zueinander bildlich wiedergeben.

Ich nutzte die Verwandtschaftsverhältnisse der Streptomycceten der Blattschneiderameisen zu den Streptomycceten aus den Datenbanken, um die

²¹ Phylogenese = stammesgeschichtliche Entwicklung der Gesamtheit aller Lebewesen und bestimmter Verwandtschaftsgruppen auf allen Ebenen der biologischen Systematik

Antibiotika-Profile der Symbionten zu untersuchen. Dafür habe ich die Namen der zu den 14 Streptomycceten am engsten verwandten Stämme in die Datenbanken „SciFinder“ und „Web of Knowledge“ eingegeben, um nach Antibiotika zu suchen, die von den verwandten Stämmen produziert werden (Abbildung 11, Schritt 4B; Kapitel 6.4.1.1, S. 117).

Parallel zur Datenbank-Recherche nach Antibiotika wurden LC-MS-Profile von Methanol-Extrakten der Flüssigkulturen von den isolierten Streptomycceten aufgenommen. Die erhaltenen Chromatogramme wurden selektiv mit Ionen-spursuche nach den Quasimolekülonen der Antibiotika durchsucht, die in den Datenbanken als Produkte eng verwandter Stämme gefunden wurden (Abbildung 11, Schritt 2A + 3A; Kapitel 6.4.1.2, S. 118).

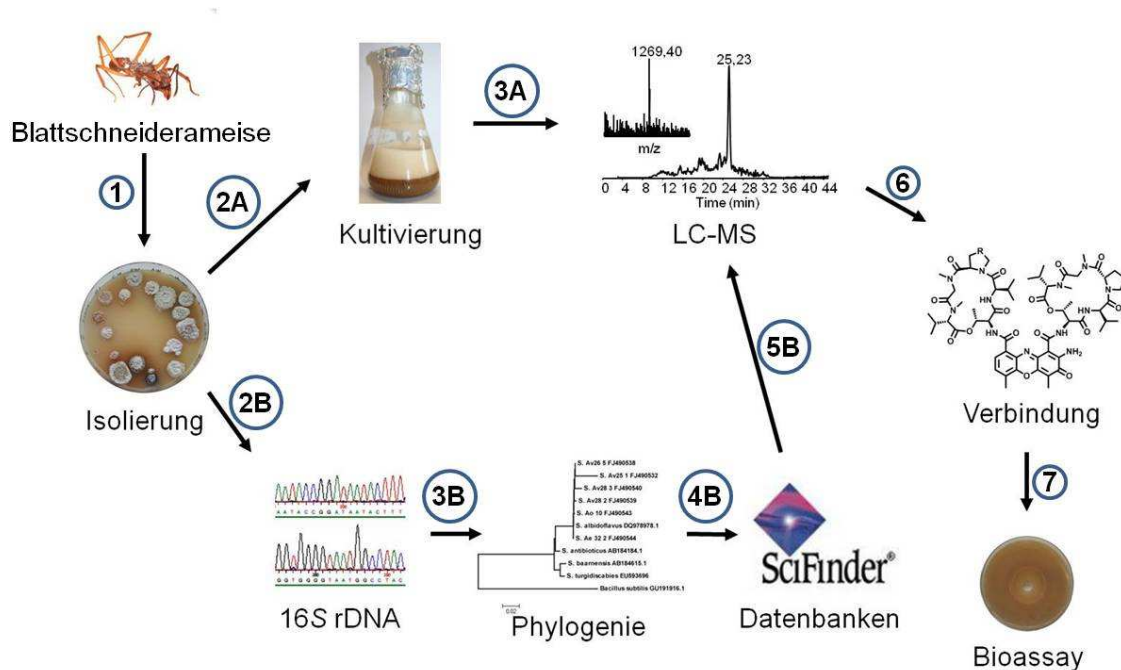


Abbildung 11: Schema für die Identifizierung von Metaboliten, die von isolierten Mikroorganismen produziert werden, durch Kombination von LC-MS, Phylogenie und Datenbank-Recherche.

Es ergaben sich die in Tabelle 5 (S. 172) aufgeführten Verwandtschaften der einzelnen Streptomycceten-Symbionten. Für die 16S rDNA Sequenz von *Streptomycces* Av 25_2 wurde eine Sequenzübereinstimmung von 99,57 % zu *Streptomycces parvus* str. NBRC 14599 gefunden (Tabelle 5, S. 172), dessen Antibiotikaspektrum bisher allerdings noch nicht untersucht wurde. Ein anderer *S. parvus* Stamm, wurde allerdings als Produzent von Actinomycin C beschrieben. [83] Im Methanol-Extrakt von *Streptomycces* Av 25_2 konnte ich anschließend Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) (Abbildung 12, S. 21)

nachweisen (Abbildung 12). [84, 85] Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) zusammen von *Streptomyces* Av 25_2 isoliert und mittels NMR-Spektroskopie (Abbildung 106, S. 189) die Struktur der Moleküle bestätigt. Zudem wurde ein kommerziell erhältlicher Standard zum Vergleich herangezogen.

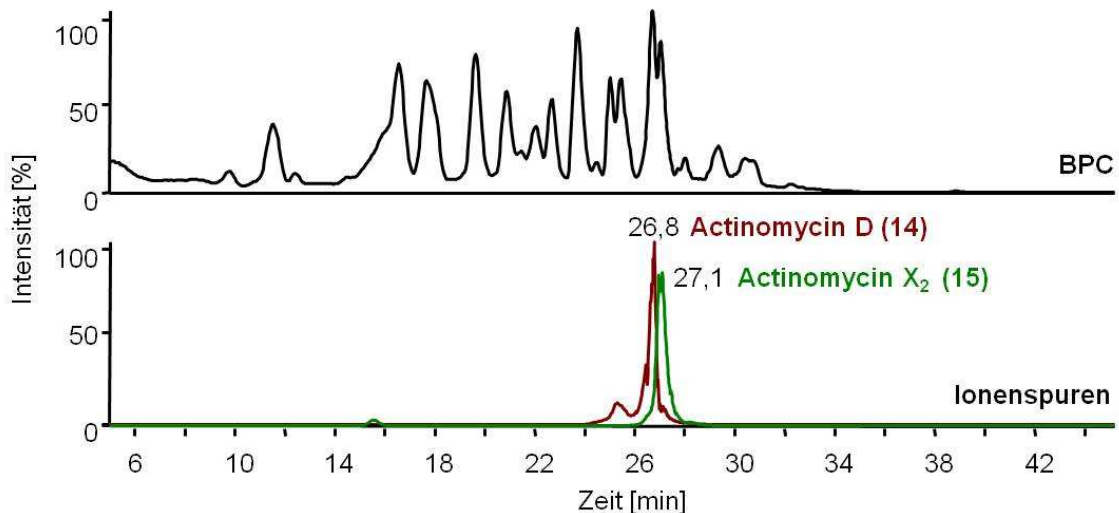


Abbildung 12: Chromatogramm einer HPLC-ESI-MS-Trennung (BPC) des Methanol-Extrakts einer drei Tage alten Kultur von *Streptomyces* Av 25_2; Ionenspursuche nach $[M+H]^+$ 1255,5 von Actinomycin D (**14**) = rot und $[M+H]^+$ 1269,5 von Actinomycin X₂ (**15**) = grün; Methode A Säule 2 (Kapitel 6.1.2, S. 90).

In gleicher Weise konnten Valinomycin (**13**) (Abbildung 13) [86] und Valinomycin-Derivate [87] im Methanol-Extrakt von *Streptomyces* Av 25_3 identifiziert werden (Abbildung 13). Dieser Stamm zeigte eine Sequenz-übereinstimmung von 99,21 % zu *Streptomyces tsusimaensis* (Tabelle 5, S. 172), einem bekannten Valinomycinproduzenten. [88]

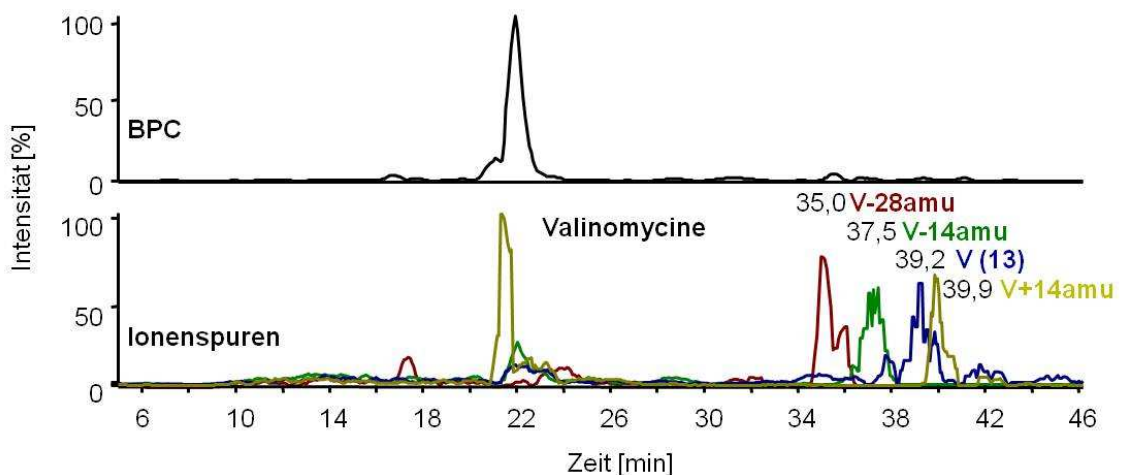


Abbildung 13: Chromatogramm einer HPLC-ESI-MS-Trennung (BPC) des Methanol-Extrakts einer drei Tage alten Kultur von *Streptomyces* Av 25_6; Ionenspursuche nach $[M+NH_4]^+$ 1100,0 von Valinomycin-28amu = rot und $[M+NH_4]^+$ 1114,0 von Valinomycin-14amu = grün und $[M+NH_4]^+$ 1128,0 von Valinomycin (**13**) = blau und $[M+NH_4]^+$ 1142,0 von Valinomycin+14amu = gelb, V = Valinomycin; Methode A Säule 2 (Kapitel 6.1.2, S. 90).

Auch die bekannten Atmungsketteninhibitoren Antimycine A₁ - A₄ (**9** - **12**) (Abbildung 14) [89] konnten durch Sequenz- und LC-MS-Analyse in einigen Extrakten der isolierten Streptomycceten-Symbionten gefunden werden (Abbildung 14). *Streptomyces albidoflavus*, der eine 100,00 %ige Übereinstimmung der 16S rDNA-Sequenz zu *Streptomyces* Ae 32_2 aufwies, produziert Antimycin A₁₈ (**87**) (Tabelle 5, S. 172). [90]

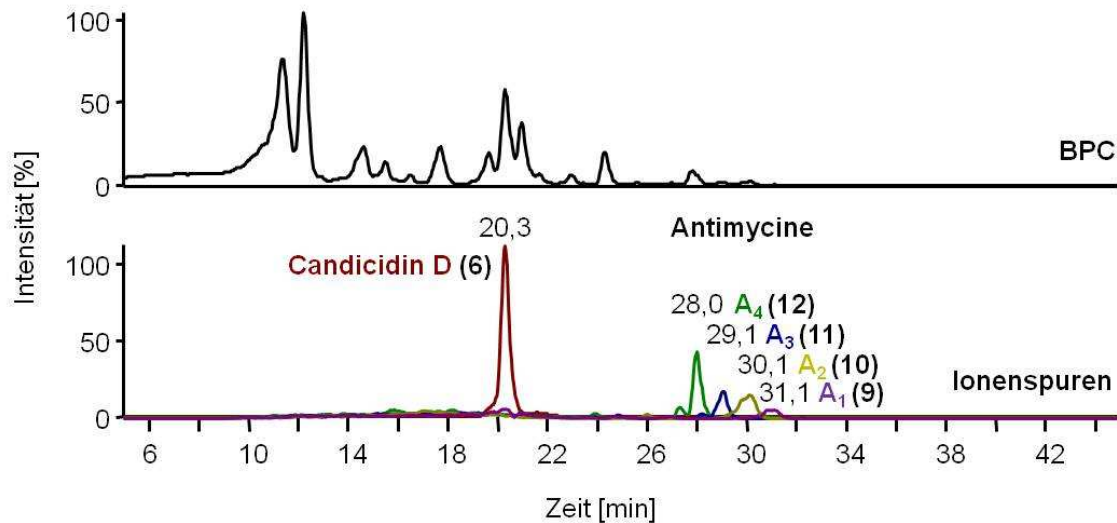


Abbildung 14: Chromatogramm einer HPLC-ESI-MS-Trennung (BPC) des Methanol-Extrakts einer drei Tage alten Kultur von *Streptomyces* Ao 10; Ionenspursuche nach $[M+H]^+$ 1109,5 von Candicidin D (**6**) = rot, $[M+H]^+$ 506,9 von Antimycin A₄ (**12**) = grün, $[M+H]^+$ 520,9 von Antimycin A₃ (**11**) = blau, $[M+H]^+$ 534,9 von Antimycin A₂ (**10**) = gelb, $[M+H]^+$ 549,0 von Antimycin A₁ (**9**) = violett; Methode A Säule 2 (Kapitel 6.1.2, S. 90).

Durch anschließende LC-MS-Messungen der Methanol-Extrakte aller 14 isolierten Streptomycceten, konnte ich Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) als Sekundärmetabolite nur in der Kultur von *Streptomyces* Av 25_2 nachweisen (Abbildung 12). Valinomycin (**13**) wurde in den Extrakten, der Kulturen von *Streptomyces* Av 25_3, Av 25_6 und Av 26_3 gefunden (Abbildung 13). Die Antimycine A₁ – A₄ (**9** - **12**) wurden in 6 Extrakten der 14 analysierten Streptomycceten-Isolate der Blatt Schneiderameisen nachgewiesen (Abbildung 14) (Tabelle 5, S. 172).

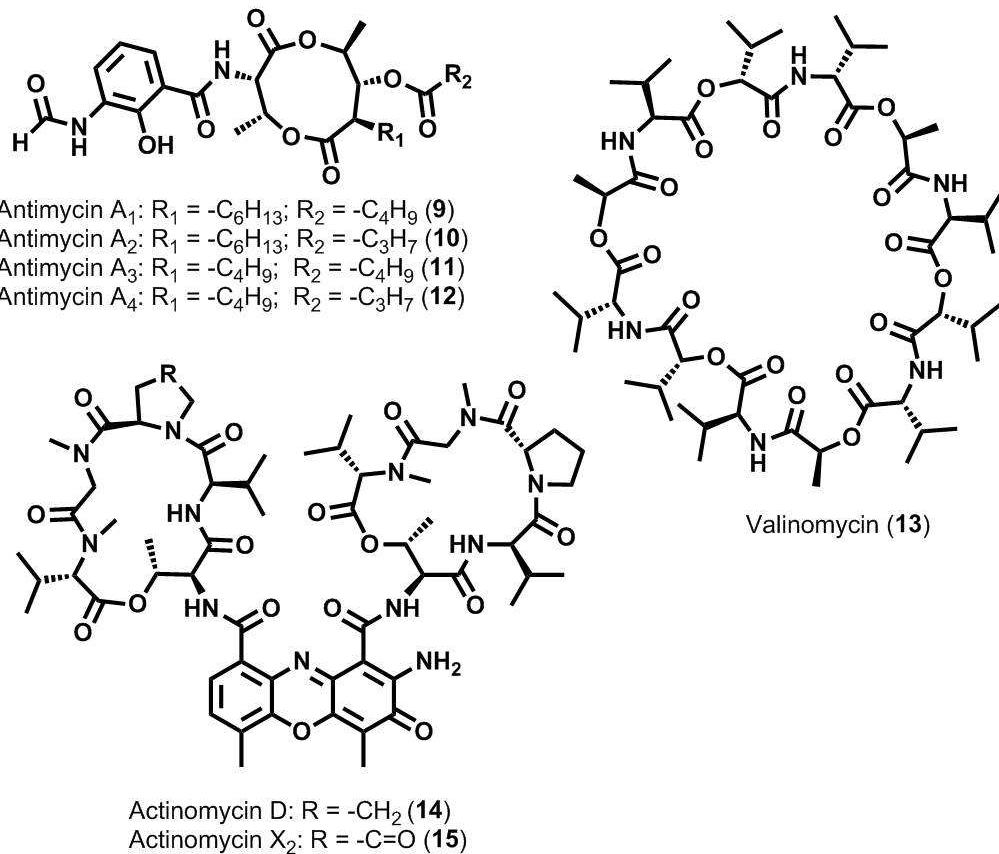


Abbildung 15: Actinomycin D (14), Actinomycin X₂ (15), Valinomycin (13), Antimycin A₁ - A₄ (9 - 12), produziert von Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen-Gattung *Acromyrmex*.

Die 16S rDNA Sequenzen, die für die Suche nach Antibiotika in den Kulturen der Streptomyceten-Symbionten von Blattschneiderameisen dienten, verwendete ich auch für die Erstellung phylogenetischer Bäume. In dem Baum von Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die angegebenen Antibiotika (Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15), Valinomycin (13) und Antimycin A₁ - A₄ (9 - 12)) teilweise gruppiert angeordnet sind. Die nächsten Verwandten der aufgeführten Stämme können demnach die gleichen Antibiotikabiosynthese-Gene besitzen. Die Erkenntnis kann genutzt werden, um zu untersuchen, ob isolierte Actinomyceten die gleichen Verbindungen produzieren. Die 16S rDNA Sequenzen von isolierten Streptomyceten werden dafür in einem geeigneten Programm mit den Sequenzen aus den Datenbanken verglichen und das Verwandtschaftsverhältnis der einzelnen Mikroorganismen graphisch dargestellt. An der Position des Stammes in dem Baum wird der Verwandtschaftsgrad zu den anderen Bakterien ersichtlich.

Es ist aber auch zu erkennen, dass die Antibiotikaproduzenten nicht alle in einer Gruppe vorliegen. Eine mögliche Erklärung dafür ist der horizontale Gentransfer, wodurch Biosynthesegene auch an entfernter verwandte Bakterien

weitergegeben werden können. [91] Die Verwandtschaften der isolierten Streptomycceten untereinander und zu weiteren, bereits bekannten Streptomycceten-Spezies, kann mit dieser Methode illustriert und die Verteilung der Antibiotikaproduktion über die in die Studie einbezogenen Actinomyceten veranschaulicht werden.

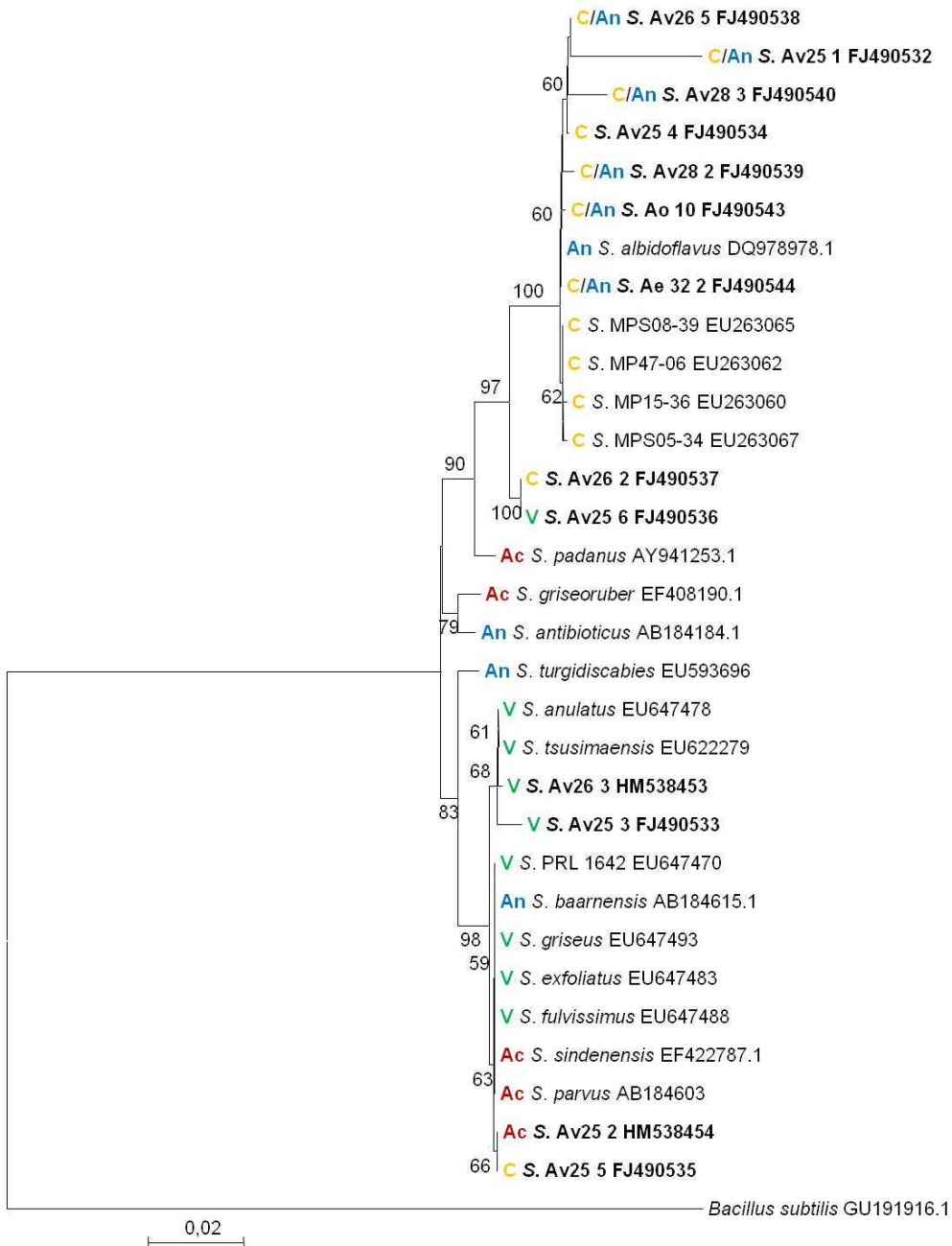


Abbildung 16: Phylogenetische Analyse ausgewählter Streptomycceten, die Antimycine = An, Valinomycine = V, Actinomycine = Ac und Candidicine = C produzieren; „Bootstrap Value“, basierend auf 1000 Neuberechnungen, für einen Wert größer als 50 % angegeben; *Bacillus subtilis* DSM10 dient als Outgroup; der Maßstabsbalken gibt eine Substitution von 0,02 pro Nukleotidposition an; von *A. volcanus* = Av, *A. octosporus* = Ao und *A. echinator* = Ae isolierte Streptomycceten Stämme sind fett dargestellt; Hinter jedem Stamm ist die NCBI²² Zugangsnummer angegeben; der Baum wurde nach dem Neighbor-Joining-Algorithmus mit dem Programm Mega4 erstellt. [92]

²² NCBI = National Center for Biotechnology Information

Die in meiner Dissertation entwickelte Methode kombiniert phylogenetische Analysen, LC-MS und Datenbank-Recherche. Auf diese Weise lassen sich bereits bekannte Sekundärmetabolite, die von noch unerforschten mikrobiellen Symbionten produziert werden, schnell nachweisen. Diese Vorgehensweise erspart die zeitaufwendige Bioassay-geleitete-Fraktionierung von Extrakten für bereits bekannte Sekundärmetabolite. Phylogenetische Informationen können somit bei der Identifikation von Verbindungen in ökologischen Systemen, wie die der Symbiose von Blattschneiderameisen und Actinomyceten, helfen. Auch wenn anhand der beschriebenen Vorgehensweise keine neuen Verbindungen entdeckt werden können, so ist die Kenntnis der Vielfalt mikrobieller Sekundärmetabolite in Symbiosen mit Mikroorganismen sehr wichtig. Die Identifizierung verschiedener Verbindungen, die potentiell im Ökosystem der Blattschneiderameisen vorkommen können, ermöglicht die Untersuchung der ökologischen Funktion der Sekundärmetabolite für die Insekten und andere Mikroorganismen. Nur so kann die Bedeutung der mikrobiellen Symbionten für die Blattschneiderameisen verstanden werden.

Die bisher entdeckten Antibiotika in Insekten-Actinomyceten-Symbiosen sind teilweise von ähnlicher chemischer Natur. Beispielsweise produzieren die Blattschneiderameisen-Symbionten die Polyene Candicidin (vgl. Candicidin D (6)) [70] und Nystatin P1 (vgl. Nystatin A₁ (8)), [69] der Borkenkäfer-Symbiont produziert das Polyen Mycangimycin (16), [42] und der Bienenwolf-Symbiont Piericidine (vgl. Piericidin A₁ (17)), die ebenfalls eine Vielzahl von Doppelbindungen aufweisen (Abbildung 17). [41] Ebenso wurden von unterschiedlichen pilzkultivierenden Ameisen Symbionten isoliert, die die Ionophore Dentigerumycin (7) [77] und Valinomycin (8) produzieren.

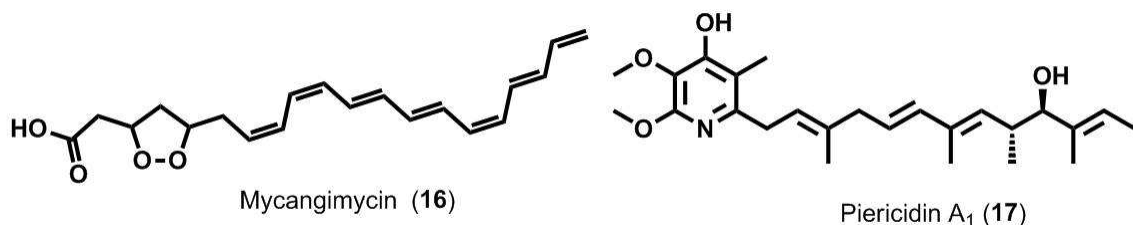


Abbildung 17: Antimikrobielle Verbindungen von Borkenkäfer- und Bienenwolf-Symbionten, Mycangimycin (16) [42] und Piericidin A₁ (17) [41].

Nachdem ich drei Antibiotika von mikrobiellen Symbionten der *Acromyrmex*-Blattschneiderameisen identifizieren konnte, stellte sich die Frage nach der

potentiellen Funktion dieser Verbindungen im Ökosystem der Blattschneiderameisen.

3.1.2 Aktivität von identifizierten Antibiotika der Symbionten auf Mikroorganismen des Ökosystems der Blattschneiderameisen

Um die ökologische Bedeutung der identifizierten Antibiotika von den mikrobiellen Symbionten zu untersuchen, testete ich Actinomycin D (**14**) Actinomycin X₂ (**15**), Antimycine A₁ – A₂ (**9** – **12**) und Valinomycin (**13**) (Kapitel 3.1.1, S. 19) auf ihre Aktivität gegenüber verschiedenen Mikroorganismen, die im Ökosystem der Blattschneiderameisen vorkommen. [59, 60] Neben Pathogenen wurden der Gartenpilz der Ameisen und isolierte Symbionten, die die in den Bioassays verwendeten Antibiotika nicht produzieren, in die Experimente einbezogen. Die in Abbildung 18 bis Abbildung 20 gezeigten Bioassays wurden gewählt, da die verwendeten Konzentrationen der Antibiotika eine deutliche Inhibierung der Mikroorganismen zeigten (Kapitel 6.4.2, S. 123).

3.1.2.1 Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**)

Actinomycine sind sehr toxische Verbindungen, die aus diesem Grund hauptsächlich in der Krebstherapie eingesetzt werden. [93, 94] Die Agardiffusionsassays in denen Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) getestet wurden, zeigten im Vergleich mit den anderen Testorganismen eine stark inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *B. subtilis* (2 nmol) und die isolierten Actinomyceten *Streptomyces* Av 25_4 (12 nmol) sowie *Pseudonocardia* Ao 1 (4 nmol) und *Pseudonocardia* Av 30 (12 nmol). Gegen den *Streptomyces* Ao 10 konnte keine Aktivität gefunden werden. Die im Vergleich zu den anderen Agardiffusionsassays mit Actinomycinen hohe Konzentration des Antibiotikums inhibierte auch das Wachstum der Pilze *Leucoagaricus gongylophorus* (24 nmol), *Fusarium decemcellulare* (239 nmol) und der schwarzen Hefe *Phialophora fastigiata* (239 nmol) (Abbildung 18; Tabelle 6, S. 173).

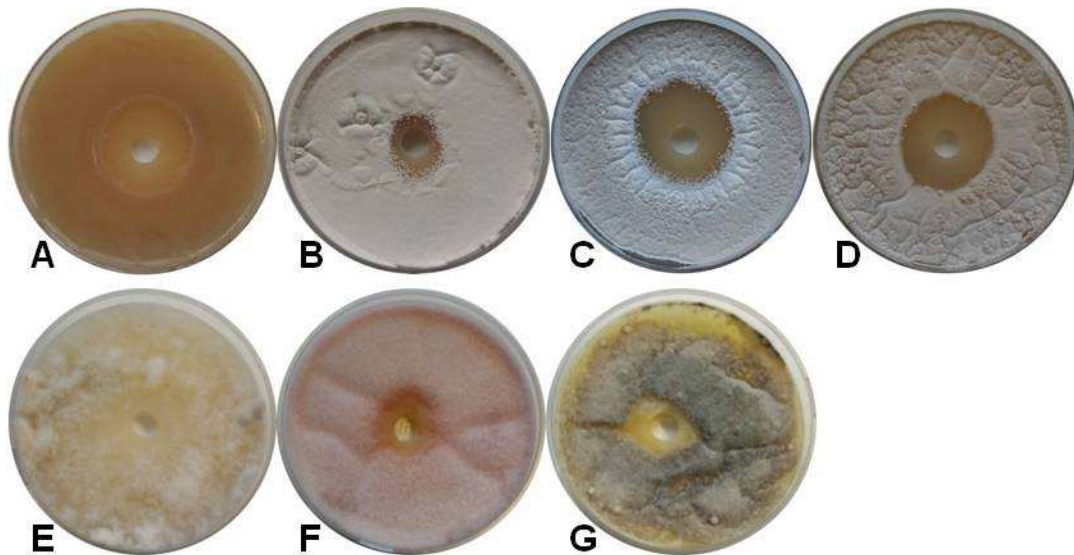


Abbildung 18: Agardiffusionsassays mit hemmender Wirkung durch Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**); A = *B. subtilis*, 2 nmol; B = *Pseudonocardia* Ao 1, 4 nmol; C = *Streptomyces* Av 25_4, 12 nmol; D = *Pseudonocardia* Av 30, 12 nmol; E = *L. gongylophorus*, 24 nmol; F = *F. decemcellulare*, 239 nmol; G = *P. fastigiata*, 239 nmol.

Eine wachstumshemmende Wirkung von Antibiotika isolierter Actinomyceten-Symbionten auf andere, von der gleichen Blattschneiderameisen-Kolonie isolierte *Pseudonocardia* und Streptomyceten konnte ich erstmalig in meiner Dissertation nachweisen. Damit wurde eine chemische Grundlage für die Entdeckung von Sen *et al.* geliefert. Sen *et al.* beschrieben, dass einzelne Actinomyceten-Symbionten eine schädliche Wirkung auf andere Actinomyceten-Symbionten zeigten. [71] Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen liegt in der Art der Symbiose. Die Lebensgemeinschaft der Blattschneiderameisen mit einigen Actinomyceten-Symbionten ist möglicherweise nicht sehr eng. Im Gegensatz zu der sehr engen Bienenwolf-Actinomyceten-Symbiose [40] sind viele Symbionten der Blattschneiderameisen kultivierbar. Dies zeigt die Unabhängigkeit der Bakterien von ihrem Wirt. Die Symbionten der Ameisen müssen sich auch weiterhin gegen Mitstreiter um Lebensraum und Nahrung, wie in jedem anderen Ökosystem, verteidigen. [26] Das hat zur Folge, dass konkurrierende Actinomyceten inhibiert werden.

Currie *et al.* beschreiben allerdings, dass die Symbiose der Blattschneiderameisen mit Actinomyceten weit zurück liegt und bereits mit den Anfängen der Pilzkultivierung begonnen hat. Currie *et al.* zeigten, dass pilzkultivierende Ameisen an solchen Stellen des Exoskeletts, an denen die Symbionten zu finden sind, spezielle exokrine Drüsen besitzen. Das sind Strukturen im

Exoskelett, die sogar die Ameisen-Gattungen besitzen, die an der phylogenetischen Basis der pilzkultivierenden Ameisen zu finden sind. Nahe Verwandte der Blattschneiderameisen, die keinen Pilz kultivieren, besitzen diese Drüsen dagegen nicht. [95] So könnte die Verteidigung der Actinomyceten-Symbionten um Lebensraum und Nahrung für die Ameisen den Vorteil bieten, dass kontinuierlich die Actinomyceten selektiert werden, deren Wirkstoffe sich gut zum Schutz vor Pathogenen eignen. Zudem könnte eine Vielfalt an Antibiotika verhindern, dass Pathogene Resistenzen gegen die antimikrobiellen Verbindungen ausbilden. Das könnte für die Blattschneiderameisen die Gewährleistung eines besseren Schutzes vor Pathogenen bedeuten. [41, 96-99]

Es könnte auch sein, dass die Blattschneiderameisen die Antibiotika-Produktion der Actinomyceten durch die Sekretion bestimmter Verbindungen kontrollieren. Dies könnten beispielsweise von Blattschneiderameisen produzierte Signalverbindungen zur Induktion oder Inhibierung der Antibiotika-Biosynthesewege der Symbionten sein. Die Antibiotika könnten so gezielt zum Einsatz kommen, wenn sie benötigt werden. Weitere Untersuchungen der chemischen Verbindungen, die von den Blattschneiderameisen selbst produziert werden und ihre Wirkung auf Symbionten der Ameisen, sind notwendig. Ebenso ist die Suche nach mikrobiellen Sekundärmetaboliten auch von möglicherweise nicht-kultivierbaren Actinomyceten-Symbionten für das Verständnis dieser und anderer Symbiosen wichtig.

3.1.2.2 Valinomycine

Für das Ionophor Valinomycin (**13**) konnte eine inhibierende Wirkung auf die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt werden (13 nmol). Gegen *B. subtilis* zeigte Valinomycin (**13**) nur eine schwache Aktivität (266 nmol) (Abbildung 19; Tabelle 6, S. 173).

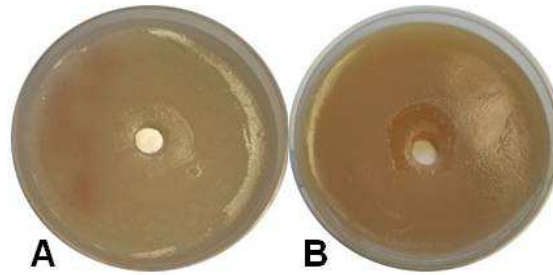


Abbildung 19: Agardiffusionsassays mit hemmender Wirkung durch Valinomycin (**13**); A = *S. cerevisiae*, 13 nmol; B = *B. subtilis*, 266 nmol.

In Assays mit *Candida albicans* stellten Watanabe *et al.* eine inhibierende Wirkung von Valinomycin (**13**) gegen den humanpathogenen Pilz fest. [100] Eine wachstumshemmende Wirkung auf Phytopathogene wie *Botrytis cinerea* durch Valinomycin (**13**) konnte ebenfalls gezeigt werden. [101, 102] Diese Eigenschaft könnte für die Blattschneiderameisen nützlich sein, da sie mit den Blättern die sie in das Nest tragen auch schädliche Pflanzenpathogene mitbringen könnten. Angus, Pansa *et al.* und Heisey *et al.* beschreiben auch eine insektizide, nematizide²³ und akarizide²⁴ Wirkung von Valinomycin (**13**). [103-105] Milben sind Parasiten der Blattschneiderameisen, die auf den Körpern mancher Individuen leben. [106-108] Die akarizide Wirkung von Valinomycin (**13**) könnte daher der unerwünschten Besiedlung durch diese Spinnentiere vorbeugen.

3.1.2.3 Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12)

Die Antimycine A₁ – A₄ (**9 - 12**) konnten das Wachstum des Spezialisten *Escovopsis weberi* (58 nmol), der schwarzen Hefe *P. fastigiata* (115 nmol) und der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (29 nmol), sowie des insektenpathogenen Pilz *Cordyceps militaris* (58 nmol) hemmen. Andere Insektenpathogene konnten nicht an ihrem Wachstum gehindert werden. Allerdings wurde auch der mutualistische Gartenpilz der Blattschneiderameisen, *Leucoagaricus gongylophorus* von nur 5,5 nmol der Antimycine A₁ – A₄ (**9 - 12**) stark inhibiert (Abbildung 20; Tabelle 6, S. 173).

²³ Nematizide = Pestizide gegen Nematoden (Fadenwürmer)

²⁴ Akarizide = Pestizide gegen Milben und Zecken

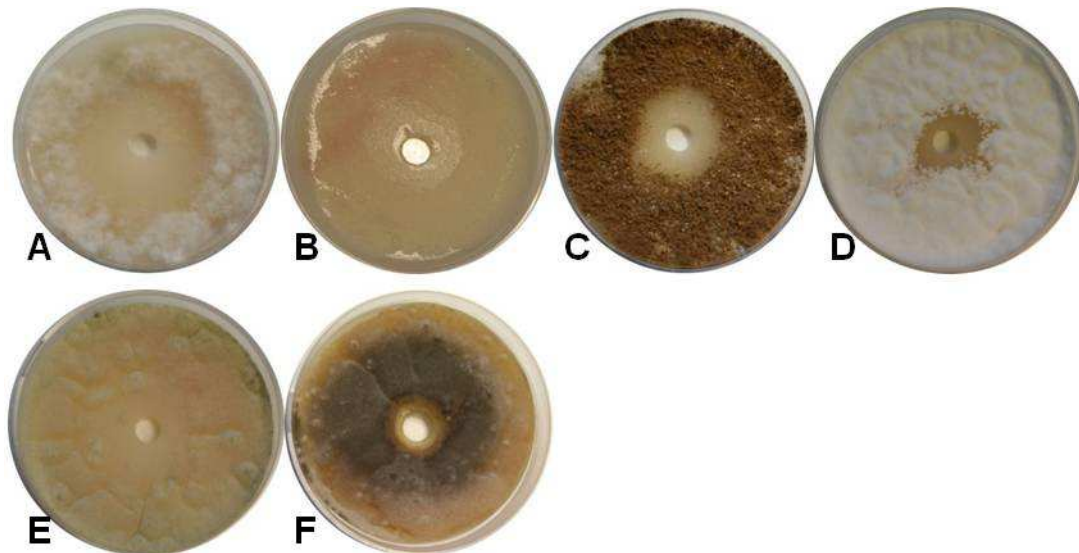


Abbildung 20: Agardiffusionsassays mit hemmender Wirkung durch Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12); A = *L. gongylophorus*, 6 nmol; B = *S. cerevisiae*, 29 nmol; C = *E. weberi*, 58 nmol; D = *C. militaris*, 58 nmol; E = *T. harzianum*, 58 nmol; F = *P. fastigiata*, 115 nmol.

Eine inhibierende Wirkung der Antimycine konnte bereits durch Ueki *et al.* gegen *Mucor mucedo*, *Candida albicans* und *Aspergillus niger* [109], durch Marquis *et al.* gegen *Bacillus megaterium* [110] und durch Kluepfel *et al.* gegen *Saccharomyces cerevisiae* [111] festgestellt werden. Die Ergebnisse der von mir durchgeführten Agardiffusionsassays zeigten, dass neben einigen Pathogenen auch der Gartenpilz der Blattschneiderameisen durch Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12) gehemmt wird. Bereits Sen *et al.* stellten die Hemmung des Gartenpilzes durch die inhibierende Wirkung mikrobieller Symbionten fest, allerdings ohne die chemischen Grundlagen dafür aufzuklären. [71]

Dass die Symbionten das Potential haben, den Futterpilz am Wachsen zu hindern, könnte zu dem Schluss führen, dass die Streptomyceten keine nützlichen Symbionten der Ameisen sind, sondern vielmehr Parasiten, die den wichtigen Gartenpilz zerstören könnten. Andererseits kann es durchaus nützlich sein, einen infizierten Teil des Gartenpilzes zu zerstören, um den restlichen, gesunden Teil vor dem Befall des Pathogens zu bewahren. Das Antibiotikum muss somit nicht zwingend gegen den Pathogen wirken. Es reicht aus, seinen Nährboden zu vernichten, damit er sich nicht weiter in dem Nest der Blattschneiderameisen ausbreiten kann. Mit der Vernichtung der Bedrohung überwiegt der Nutzen gegenüber den Kosten. Die Ameisen überleben, indem sie durch die aktive Kultivierung der gesunden Bereiche des Gartenpilzes ihre Nahrungsquelle sichern.

3.1.2.4 Synergistische Wirkung von Actinomycinen, Antimycinen, Candicidinen und Valinomycinen

Im Ökosystem der Blattschneiderameisen kommt eine Vielzahl an aktiven Verbindungen vor. Da mittlerweile zahlreiche Antibiotika ihrer Symbionten identifiziert wurden deutet sich an, dass die Verbindungen eine Rolle für die Insekten spielen könnten. [69, 77, 112] Die Diversität der chemischen Natur der Verbindungen wirft die Frage nach einer Wirkung in Kombination auf. Kroiss *et al.* zeigten am Beispiel des Bienenwolfes und seinem Streptomyceten-Symbionten, dass die Kombination von Piericidinen (vgl. Piericidin A₁ (**17**)) mit Streptochlorin einen stärkeren Effekt auf pathogene Mikroorganismen hat als die Antibiotika allein. [41] In der Humanmedizin macht man sich diese Eigenschaft in der kombinatorischen Therapie ebenfalls seit langem zu nutze. [113-115] Bolard *et al.* beschreiben, dass die Kombination des Zytostatikums Daunorubin mit verschiedenen Polyenen einen synergistischen Effekt hat. [116] Nystatin A₁ (**8**) zusammen mit Antibiotika wie Actinomycin D (**14**) oder Tetracyclin [117] haben einen potenzierenden Effekt. Die Kombination unterschiedlich aktiver Verbindungen wird auch gegen multiresistente Pathogene in der Medizin eingesetzt. [96-99] Genauso könnte die Antibiotika-Vielfalt von Symbionten der Resistenzbildung von Pathogenen vorbeugen.

Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Antimycine A₁ – A₄ (**9** - **12**), Candicidin D (**6**) und Valinomycin (**13**) wurden zusammen in einem Agardiffusionsassay gegen den Spezialisten *E. weberi* getestet. Durch die Kombination der vier identifizierten Antibiotika konnte eine deutliche Verstärkung der Hemmwirkung gegen *E. weberi* festgestellt werden (Abbildung 21; Tabelle 7, S. 174). [118, 119]

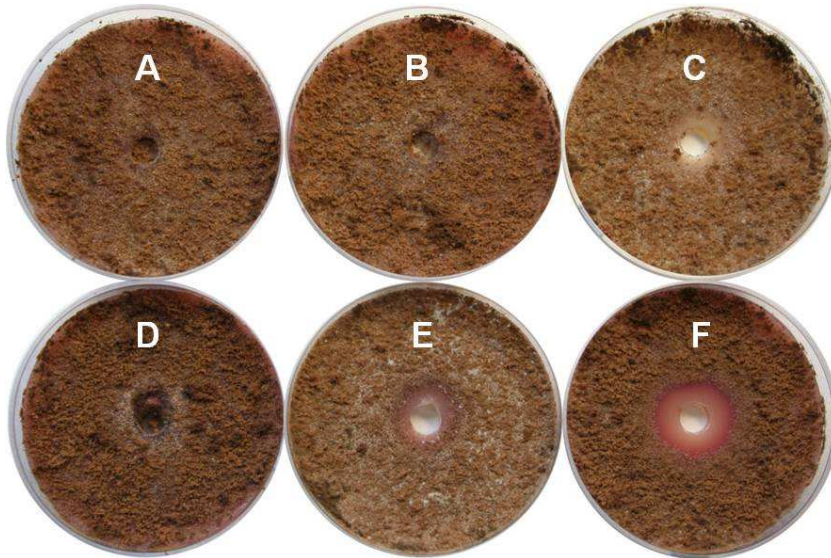


Abbildung 21: Agardiffusionsassay zur synergistischen Wirkung der Antibiotika, die von Streptomycceten-Symbionten der Blattschneiderameisen produziert werden, gegen *E. weberi*; A = Methanol Kontrolle; B = 2,4 nmol Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**); C = 5,8 nmol Antimycin A₁ – A₄ (**9 - 12**); D = 2,4 nmol Valinomycin (**13**); E = 2,4 nmol Candicidin D (**6**); F = 2,4 nmol Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) + 5,8 nmol Antimycin A₁ – A₄ (**9 - 12**) + 2,4 nmol Valinomycin (**13**) + 2,4 nmol Candicidin D (**6**) zusammen.

Candicidinmakrolide wie das Candicidin D (**6**) verursachen durch das Ausbilden von Poren in Zellmembranen einen Kaliumefflux der Zelle und zerstören damit das Membranpotential. [118, 120] Mit einem ähnlichen Mechanismus transportiert Valinomycin (**13**) Kaliumionen selektiv über die Zellmembran und bewirkt so den gleichen Effekt wie die Candicidine: die Zelle stirbt ab. Durch Hyperpolarisation der Zellmembran kann damit eine Triebkraft entstehen, die andere Antibiotika über die Zellmembran bringt. [121] Die Agardiffusionsassays mit Antimycinen A₁ – A₄ (**9 – 12**), Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Valinomycin (**13**) und Candicidin D (**6**) in Kombination und nahe ihrer subinhibitorischen Konzentrationen zeigten, dass das synergistische Zusammenwirken unterschiedlicher Antibiotika auch im Ökosystem der Blattschneiderameisen von großer Bedeutung sein könnte. Durch die Kombination verschiedener chemischer Verbindungen könnte so effektiv gegen pathogene Mikroorganismen vorgegangen werden, ohne dass große Mengen eines einzelnen Antibiotikums nötig sind. Allerdings zeigt dieses Ergebnis, dass der direkte Nachweis der identifizierten Verbindungen im Ökosystem der Blattschneiderameisen durch die geringen Konzentrationen, die für eine Wirkung notwendig sind, sehr schwierig sein kann.

3.1.3 Direkter Nachweis der von Actinomyceten-Symbionten identifizierten Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen

Das Potential der wachstumshemmenden Wirkung der Antibiotika, die von den Blattschneiderameisen-Symbionten produziert werden, zeigte ich bereits in Agardiffusionsassays gegen verschiedene Mikroorganismen. Bisher wurde aber noch keine der von mikrobiellen Symbionten produzierten Sekundärmetabolite im Ökosystem der Blattschneiderameisen gefunden. Die ökologische Bedeutung dieser Verbindungen für die Ameisen und ihr Ökosystem kann allerdings erst beurteilt werden, wenn die Antibiotika im Ökosystem nachgewiesen werden. Daher suchte ich Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**), Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Candicidin D (**6**) und Valinomycin (**13**) direkt im Lebensraum der Ameisen (Kapitel 6.4.3, S. 124).

Hierfür wurden Proben des Gartenpilzes der Ameisen *L. gongylophorus* und des von den Blattschneiderameisen separat gelagerten Abfalls [122] von *Acromyrmex niger* und *Acromyrmex echinator* mit Ethylacetat extrahiert und mittels LC-MS nach Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Antimycinen A₁ – A₄ (**9** - **12**) und Valinomycin (**13**) gesucht.

Actinomycin X₂ (**15**) konnte in zwei Abfallproben von *A. echinator* und Valinomycin (**13**) in 10 von 13 Proben beider Blattschneiderameisen-Gattungen gefunden werden. Die Konzentration der gefundenen Antibiotika wurde mit Hilfe einer externen Kalibrationsgeraden (Abbildung 89, Abbildung 90, S. 176) in den einzelnen Proben bestimmt. So lag Actinomycin X₂ (**15**) mit ca. 170 pmol/g vor und Valinomycin (**13**) konnte von 1,8 pmol/g bis 7,5 nmol/g detektiert werden. In den Extrakten des Gartenpilzes wurden keine der genannten Antibiotika gefunden. Die Antimycine A₁ - A₄ (**9** - **12**) konnten ebenfalls in keiner der untersuchten Proben detektiert werden.

Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob Valinomycin (**13**) homo- oder heterogen im Abfall der Ameisen verteilt ist, wurden Teile einer Abfallprobe einzeln extrahiert. Es wurden vier 1,2 g Proben (A1 – A4, Abbildung 22) und der gesamte Rest, 31,6 g (R, Abbildung 22), analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass das Antibiotikum nicht gleichmäßig über den gesamten Abfall in der Kammer verteilt ist (Abbildung 22).

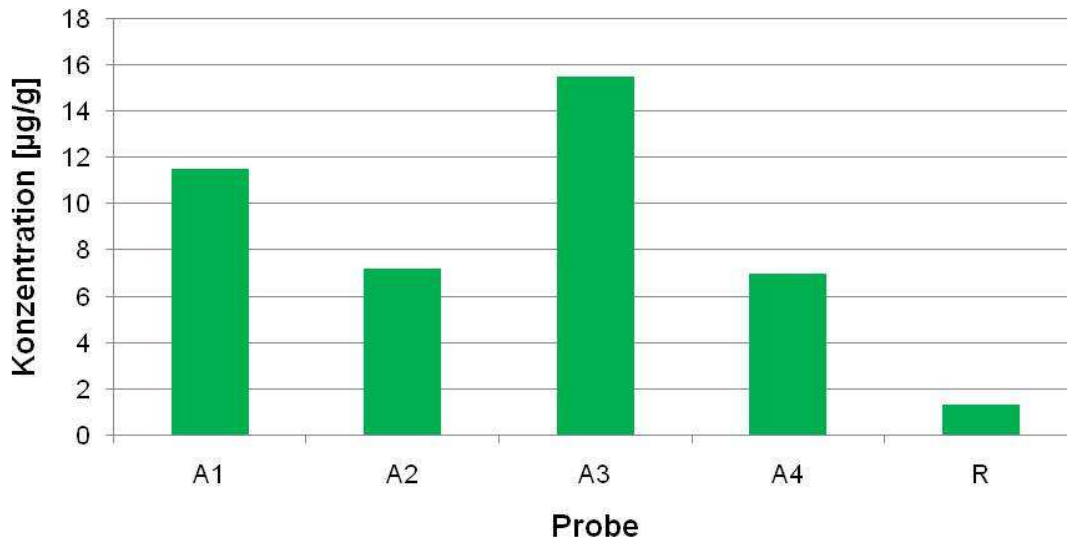


Abbildung 22: Konzentration von Valinomycin (**13**) in verschiedenen Teilen einer Abfallprobe aus derselben Abfallkammer von *A. echinator*, A1 - A4 = jeweils 1,2 g einer Probe, R = der gesamte Rest der Probe.

140 mg *Acromyrmex echinator* Individuen (etwa 35 Ameisen unterschiedlicher Größe) extrahierte ich zudem mit 10 ml Ethylacetat. Es konnte allerdings keines der bereits identifizierten Antibiotika gefunden werden. Daher entschied ich mich anschließend, die Blattschneiderameisen mit MALDI-Imaging [123] zu untersuchen, um möglicherweise sehr geringe Mengen der Verbindungen und ihre Verteilung auf dem Körper der Blattschneiderameisen detektieren zu können. Der große Vorteil des MALDI-Imaging besteht darin, neben den Massenspektren auch Informationen über die räumliche Auflösung und Intensitätsverteilung der Verbindungen, die an dem Körper der Blattschneiderameisen haften, erhalten zu können. Dies konnte bereits für die Antibiotika Piericidine (vgl. Piericidin A₁ (**17**)) und Streptochlorin gezeigt werden, die vom Streptomyceten-Symbionten des Bienenwolfes produziert werden und auf dem Kokon der Larven in verschiedenen Konzentrationen und Bereichen vorliegen. [41]

Analog zu dieser Methode wurden die Blattschneiderameisen auf einem Träger fixiert und mit einer Matrix (α -Cyano-4-hydroxymizinsäure; Kapitel 6.2.3.2, S. 96) behandelt, die die Ionisierung der Verbindungen auf der Oberfläche der Ameise unterstützt. Mit einem Laser wurden die Ameisen anschließend gezielt beschossen. Durch die Rasterbewegungen des Lasers wurden so von der gesamten Oberfläche der Blattschneiderameisen Ionen generiert, die in einem Massenspektrometer detektiert werden konnten.

Es wurde direkt auf die bereits identifizierten Antibiotika Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Antimycin A₁ – A₄ (**9** – **12**), Candicidin D (**6**) und Valinomycin (**13**) (Kapitel 3.1.1, S. 19) getunt und im HR-MS mittels Ionenspur gesucht. Valinomycin (**13**) konnte so auf dem Körper von *A. echinator*-Arbeiterinnen mit MALDI-Imaging detektiert und die Verteilung des Ionophors auf der Unterseite des Exoskelett dargestellt werden (Abbildung 23). Durch die Kalibration wurde ersichtlich, dass auf einer *A. echinator*²⁵ Blattschneiderameise etwa 10 ng Valinomycin (**13**) verteilt vorkommen. Dabei können starke lokale Konzentrationsmaxima beobachtet werden. Allerdings konnten keine der identifizierten Antibiotika auf dem Körper von *A. echinator*-Larven detektiert werden (Abbildung 23). Die hochauflösenden Messungen wurden von Manoj Ghaste aus dem Labor von Prof. Michael Spiteller der TU Dortmund durchgeführt.

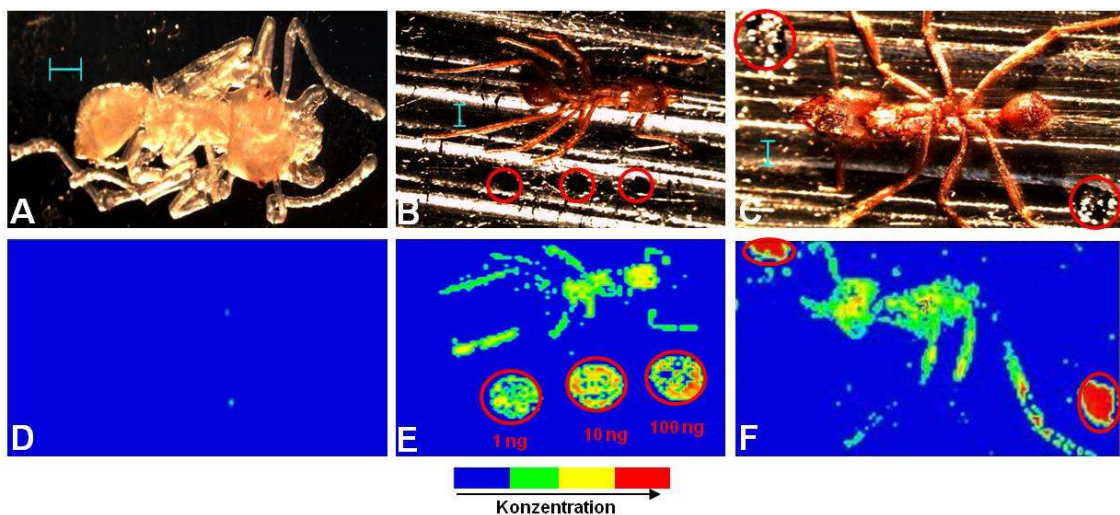


Abbildung 23: A bis C = Mikroskopische Aufnahmen: A = *A. echinator* Larve; B und C = *A. echinator*-Arbeiterin; Maßstabbalken = 1 mm; D bis F = MALDI-Image der hochaufgelösten Ionenspur von $[M+K]^+ = 1149,602$ des Valinomycin-Kalium-Komplexes, der mikroskopischen Aufnahmen A bis C; Blau = kein Valinomycin, rot = hohe Konzentration an Valinomycin; E = Kalibration mit einem Valinomycin Standard.

Mit Hilfe von LC-MS und MALDI-Imaging konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Antibiotika die von isolierten Streptomycceten produziert werden, im Ökosystem der Blattschneiderameisen und auf den Ameisen selbst vorhanden sind und nicht nur von Symbionten in Laborkulturen gebildet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Streptomycceten aktiv zur Gestaltung des Ökosystems der Blattschneiderameisen beitragen können. Damit kann den Symbionten eine wichtige Rolle im Zusammenleben mit den

²⁵ durchschnittlich 6 mg Körpergewicht

Blattschneiderameisen zugeschrieben werden. Durch die antibiotische Wirkung ihrer Sekundärmetabolite könnten die Actinomyceten-Symbionten der Ameisen die Gegenwart bestimmter Mikroorganismen verhindern. Für Valinomycin (**13**) konnte in den durchgeführten Experimenten keine hohe Aktivität gegen die verwendeten Mikroorganismen nachwiesen werden (Kapitel 3.1.2, S. 26). In Kombination mit anderen Antibiotika könnte Valinomycin (**13**) allerdings die Aktivität der Verbindungen gegen Pathogene verstärken (Kapitel 3.1.2.4, S. 31). Dies ist ebenfalls auf dem Körper der Blattschneiderameisen möglich, indem beispielsweise die Wirkung der von der Ameise selbst produzierten antibiotischen Verbindungen [65, 66] mit Hilfe von Valinomycin (**13**) noch verstärkt wird. Die akarizide Wirkung des Ionophors könnte auf dem Körper der Insekten zudem gegen Parasiten genutzt werden. [104, 105]

In meiner Dissertation konnte ich Valinomycin (**13**) und Actinomycin X₂ (**15**), die von Blattschneiderameisen-Symbionten produziert werden, in dem Ökosystem von *A. echinator* und *A. niger* nachweisen. Dass Antimycine A₁ – A₂ (**9** – **12**) und Candicidin D (**6**) nicht gefunden werden konnten, liegt möglicherweise daran, dass schon sehr geringe Mengen dieser Antibiotika ausreichen, um effektiv zu wirken (Kapitel 3.1.2.4, S. 31). Die Antibiotika Valinomycin (**13**) und Actinomycin X₂ (**15**) wurden nur im Abfall und nicht im Pilzgarten der Ameisen gefunden.

Durch das organisierte Abfallmanagement der Blattschneiderameisen wird jeder erdenkliche Abfall in Abfallkammern oder aus dem Nest heraus transportiert. [53, 122] Allein die räumliche Trennung von kontaminiertem Material kann eine mögliche Infektion durch Pathogene nicht gänzlich verhindern. In diesem Kontext stellt die Verwendung diverser aktiver Verbindungen gegen verschiedene Mikroorganismen eine notwendige Maßnahme dar, um eine Invasion des Nestes der Blattschneiderameisen zu vermeiden. Durch Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkorten und Wirkmechanismen könnte zusätzlich einer Resistenzbildung der Pathogene gegen ein bestimmtes Antibiotikum vorgebeugt werden. Im Pilzgarten dagegen könnten die Antibiotika unerwünschte Nebenwirkungen zeigen, wie beispielsweise das Absterben des Futterpilzes (Kapitel 3.1.2, S. 26). Außerdem ist es möglich, dass die

Blattschneiderameisen die Antibiotika durch die Nahrungsaufnahme mit dem Futterpilz aufnehmen und dadurch sterben.

Die heterogene Verteilung von Valinomycin (**13**) in der Abfallprobe (Abbildung 22, S. 34) könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Blattschneiderameisen das Antibiotikum nur in infizierten Bereichen verteilen. Ein präventiv appliziertes Antibiotikum würde gleichmäßig in dem Abfall verteilt sein, da die Blattschneiderameisen, die für das Abfallmanagement zuständig sind, den Abfall regelmäßig durchmischen. [122]

Können weitere Verbindungen in dem Abfall der Blattschneiderameisen gefunden werden, die aktiv gegen Pathogene der Ameisen wirken, würde die Vermutung stützen, dass die Antibiotika dem Schutz der Ameisen-Kolonie dienen. Daher suchte ich nicht nur in den Kulturen isolierter Streptomycceten-Symbionten nach bekannten, aktiven Verbindungen, sondern auch direkt im Nest der Blattschneiderameisen nach noch unbekanntem Verbindungen.

3.1.4 Antifungale Aktivität im Abfall von Blattschneiderameisen

In meinen Untersuchungen konnte ich bereits zeigen, dass die Antibiotika Valinomycin (**13**) und Actinomycin X₂ (**15**) im Ökosystem der Blattschneiderameisen vorkommen. Beide Verbindungen konnten im Abfall der Insekten gefunden werden. Die Bedrohung, die vom kontaminierten Abfall der Insekten ausgehen könnte, lässt vermuten, dass dort weitere aktive Verbindungen vorhanden sind, die einen Befall des Nests durch Pathogene verhindern. Daher suchte ich direkt im Abfall der Blattschneiderameisen nach weiteren Antibiotika (Kapitel 6.4.4, S. 125).

Als Testorganismen für Bioassays wurden hierfür die Pilze *Fusarium decemcellulare* und *Cordyceps militaris* sowie *Escovopsis weberi* verwendet. Abfallproben von *Atta sexdens*, *Atta colombica*, *Acromyrmex niger* und *Acromyrmex echinatio* wurden zunächst mit Ethylacetat extrahiert (Abbildung 24, Schritt 1), eingeengt, in Methanol aufgenommen und in Agardiffusionsassays auf ihr antifungales Potential untersucht. *C. militaris* wurde am stärksten von den getesteten Mikroorganismen durch die Extrakte im Wachstum gehemmt. Insbesondere zeigten in den meisten Fällen die Extrakte

von *A. echinator* hohe Aktivität. Dagegen konnte ich für die Extrakte von *A. sexdens*, *A. colombica* und *A. niger* nur eine sehr schwache bis gar keine Wirkung auf *C. militaris* beobachten. *E. weberi* wurde im Gegensatz zu *C. militaris* nur sehr wenig von den *A. echinator*-Abfall-Extrakten und gar nicht durch die Extrakte von *A. sexdens*, *A. colombica* und *A. niger* beeinflusst. Keiner der Extrakte konnte *F. decemcellulare* im Wachstum inhibieren.

Um Verbindungen identifizieren zu können, die für die wachstumsinhibierende Wirkung verantwortlich sind, führte ich eine Ethylacetat-Extraktion durch. Der Extrakt (Abbildung 24, Schritt 1) wurde eingengt und mit Wasser extrahiert (Abbildung 24, Schritt 2). Die Aktivität des wässrigen Extrakts gegen *C. militaris* konnte, nachdem er gefriergetrocknet und erneut in Methanol aufgenommen wurde (Abbildung 24, Schritt 3), reproduzierbar beobachtet werden. Den vorgereinigten Abfall-Extrakt trennte ich anschließend mit einer Sephadex LH20-Säule (Abbildung 24, Schritt 4). Es wurden 4 ml Fraktionen gesammelt, von denen Fraktion 4 reproduzierbar die gegen *C. militaris* aktiven Verbindungen enthielt. Die aktive Fraktion wurde dann mit einer Diaion HP-2MG Adsorptionschromatographie aufgetrennt (Abbildung 24, Schritt 5). Hier zeigte sich, dass Fraktionen 13 bis 15 der 4 ml Fraktionen *C. militaris* hemmten.

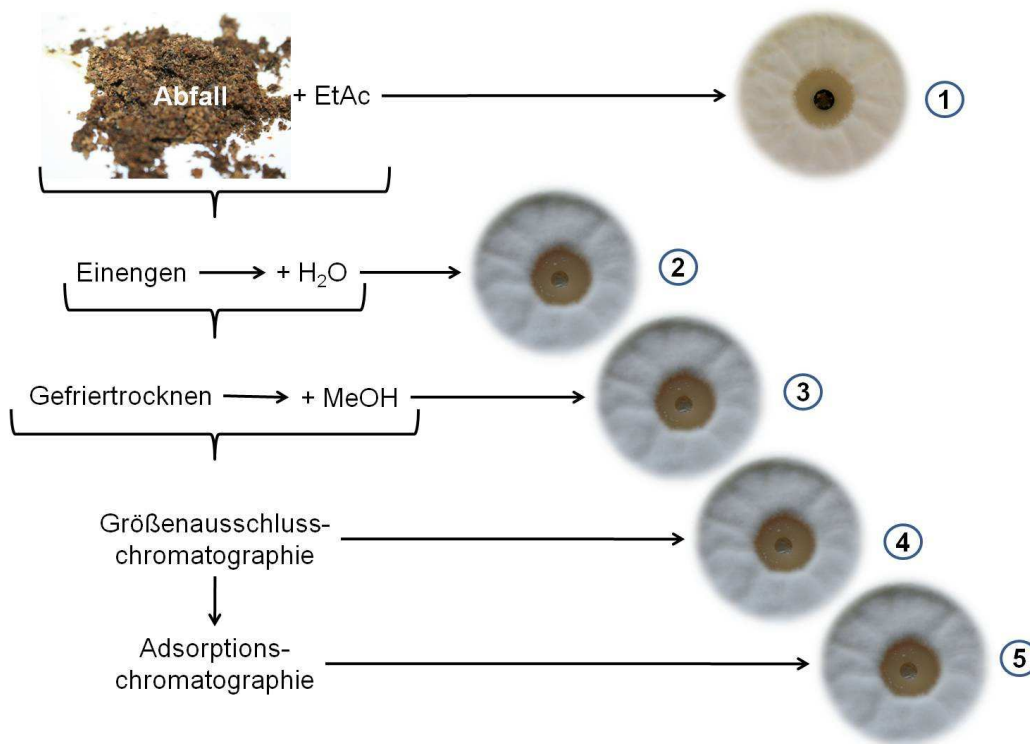


Abbildung 24: Extraktionsschema antifungaler Verbindungen aus dem Abfall der Blattschneiderameise *A. echinator*.

Im Agardiffusionsassays konnte ich die wachstumshemmende Wirkung des Abfall-Extraktes gegen *C. militaris* reproduzierbar zeigen. Dennoch reichte die erhaltene Menge an Abfall nicht aus, um die aktiven Verbindungen (bzw. die Verbindung) vollständig aufzureinigen. Daher steht die Identifikation des Wirkstoffs noch aus. In Zukunft muss eine wesentlich größere Menge an Abfall von *A. echinator* gesammelt und die Auftrennung wiederholt werden. Allerdings konnte ich anhand von LC-MS-Analysen feststellen, dass die antifungale Aktivität des Extraktes nicht von den bereits identifizierten Actinomyceten-Symbionten-Antibiotika stammt.

Neben der Extraktion des Abfalls besteht zusätzlich die Möglichkeit, Mikroorganismen die in dem Abfall vorhanden sind zu isolieren. In Agardiffusionsassays könnte die Aktivität dieser gegen *C. militaris* untersucht werden, um eventuell antifungale Verbindungen aus einem Extrakt der Flüssigkulturen zu isolieren. Genauso ist es möglich, anhand der in Kapitel 3.1.1 (S. 19) vorgestellten Methode durch phylogenetische-Analysen, anschließender Datenbanksuche und LC-MS-Messungen eine schon bekannte Verbindung in den Extrakten der Kulturen von isolierten Mikroorganismen zu finden, die für die wachstumshemmende Wirkung gegen *C. militaris* verantwortlich ist.

Die Existenz von antimikrobiellen und antifungalen Verbindungen im Abfall der Blattschneiderameisen zeigt, dass dort das Potential vorhanden ist, pathogene Mikroorganismen an ihrem Wachstum zu hindern. Ob die Ameisen die Antibiotika-Vielfalt in ihrem Ökosystem direkt kontrollieren können, muss noch untersucht werden. Die Aufklärung, wie die Actinomyceten-Symbionten die Blattschneiderameisen besiedeln, könnte zu der Beantwortung dieser Frage beitragen und würde Hinweise darauf geben, ob Actinomyceten, die ein bestimmtes Antibiotikum produzieren, gezielt von den Ameisen aufgenommen werden.

3.1.5 Entwicklung einer Methode für den Nachweis der Aufnahme von Actinomyceten durch Blattschneiderameisen

Bis heute ist unbekannt, wie die Actinomyceten überhaupt auf das Exoskelett der Blattschneiderameisen gelangen. Eine interessante Frage hierzu ist, ob sich gezielt bestimmte Spezies ansiedeln, oder ob die Auswahl zufällig geschieht. Es gibt einige kontroverse Thesen über dieses Thema. In einer Verhaltensstudie wurde beispielsweise festgestellt, dass die Blattschneiderameisen solche *Pseudocardia*-Symbionten wiedererkennen, welche von ihrem Exoskelett isoliert wurden. [72] Ein vertikaler Transfer von *Pseudocardia* durch die Königin wird dabei diskutiert, wobei auch der horizontale Austausch zwischen einzelnen Kolonien möglich scheint. [68] Phylogeographische Untersuchungen mit *Pseudocardia*-Symbionten der pilzkultivierenden Ameise *Trachymyrmex septentrionalis* ergaben, dass die Symbionten selbst über größere Distanzen kaum phylogenetische Unterscheide aufweisen. Somit wird die Wahrscheinlichkeit des Transfers der *Pseudocardia* zwischen den Ameisen einer Kolonie als sehr hoch, gegenüber der Aufnahme aus der Umgebung, eingestuft. [73] Einige Studien sprechen allerdings dafür, dass die Blattschneiderameisen ihre Symbionten offensichtlich doch wahllos aus der Umgebung aufnehmen. [67, 69, 74, 75]

Um den Zeitpunkt der Besiedlung, den Mechanismus der Aufnahme oder die Verteilung von Actinomyceten auf dem Exoskelett der Blattschneiderameisen nachvollziehen zu können, muss der Vorgang verfolgt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, isolierte Bakterien zu markieren, um sie von bereits vorhanden unterscheiden zu können. Für Experimente dieser Art eignet sich die Markierung durch fluoreszierende Proteine wie das GFP²⁶. Beispielsweise wurden Actinomyceten mit dem EGFP²⁷ markiert, um den Verlauf der Besiedlung von keimenden Weizensamen mit den Actinomyceten beobachten zu können. [65] Ebenso nutzten Tombolini *et al.* eine GFP-Markierung des Biokontrollstammes *Pseudomonas chlororaphis* für die Beobachtung seiner Ausbreitung auf Getreidesamen nach der Inokulation. [124] Angelehnt an diese Vorgehensweise entwickelte ich eine Methode, um isolierte Actinomyceten-

²⁶ GFP = green fluorescent protein

²⁷ EGFP = enhanced green fluorescent protein

Symbionten der Blattschneiderameisen zu markieren. Auf diese Weise sollten die markierten Bakterien im Nest und auf dem Körper der Ameisen nachzuweisen sein. Zusätzlich besteht die Möglichkeit durch die Lokalisation der fluoreszierenden Actinomyceten, die Verteilung der Symbionten im Ökosystem der Blattschneiderameisen nachvollziehen zu können.

3.1.5.1 Konstruktion eines Plasmids für eine Fluoreszenzmarkierung von Actinomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen

Für die Markierung der Actinomyceten-Symbionten wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches die Expression eines Fluoreszenzproteins in den Actinomyceten ermöglicht. Das Rückgrat des von mir konstruierten Plasmids stellte der Vektor pIJ8655 [125] dar (Abbildung 73, S. 127). Das pIJ8655 enthält eine Gensequenz die für eine Integrase²⁸ codiert (*int* Φ C31). Das EGFP codierende Gen kann damit in die, im Genom der Actinomyceten befindlichen, *attP*-Stelle²⁹ integriert werden. Die Expression des EGFP wird durch den *tipAp* Promotor kontrolliert, der durch Thiostrepton induziert wird. Da auch der Futterpilz der Blattschneiderameisen bei Anregung im gleichen Wellenlängenbereich wie das EGFP ($\lambda_{\text{max}} = 506 \text{ nm}$) autofluoresziert, wurde das EGFP gegen mCherry, [126] ein rosa fluoreszierendes Protein ($\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$) ausgetauscht. Zudem wurde der induzierbare *tipAp* Promotor gegen den *ermE**p Promotor [127] ersetzt, da dieser konstitutive Promotor keine Stimulation benötigt, um die Expression von mCherry im Genom der Actinomyceten zu starten. Damit wurde das Plasmid pISkR konstruiert (Abbildung 25; Kapitel 6.4.5.1, S. 126).

²⁸ Integrase = Enzym von Retroviren, das virale DNA in das Genom der Wirtszelle integriert

²⁹ *attP*-Stelle = Phagen Anlagerungsstelle

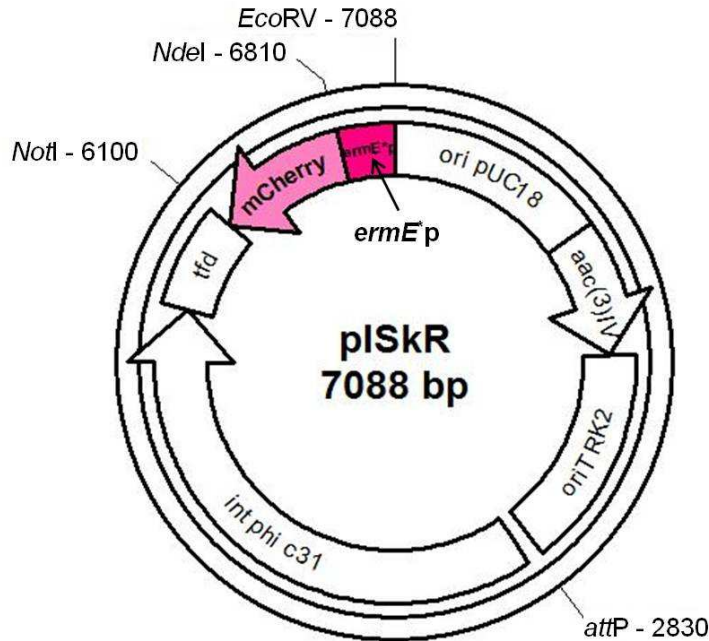


Abbildung 25: Vektorkarte des in dieser Arbeit konstruierten Plasmids pISkR; hellrosa = mCherry codierendes Gen; dunkelrosa = konstitutiv exprimierender Promotor *ermE**p; ori pUC18 = Replikationsursprung von pUC18; *aac(3)/IV* = Apramycin-Resistenzgen, selektierbar in *Streptomyces* und *E. coli*; oriT RK2 = Transferursprung des Plasmids RK2; *int* Φ C31 und *attP* = Integrase Gen und Anlagerungsstelle der „temperate phage“ Φ C31; *tfd* = Haupttranskriptions-Terminator des Phagen fd; *NotI*, *NdeI*, *EcoRV* = verwendete Schnittstellen.

Das Plasmid pISkR konjugierte³⁰ ich in die isolierten Blattschneiderameisen-Symbionten *Streptomyces* Av 25_6, *Streptomyces* Ae 32_2 und *Pseudonocardia* Ao 1. Auch *S. coelicolor* A3(2), von dem bekannt ist, dass er die *attP*-Stelle im Genom enthält, [125] wurde mit mCherry markiert und als Positivkontrolle genutzt (Kapitel 6.4.5.2, S. 130).

Mit Fluoreszenzmikroskopie³¹ verifizierte ich, ob das mCherry in den Actinomyceten exprimiert wurde (Abbildung 26). Dass die fluoreszenzmarkierten Blattschneiderameisen-Symbionten für Versuche im Ökosystem der Insekten geeignet sind, sollte in ersten Versuchen mit einer Blattschneiderameisen-Subkolonie getestet werden.

³⁰ Konjugation = Übertragung von Teilen des Genoms einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle

³¹ Leica LMD, Fluoreszenzfilter, B/G/R, 4x Vergrößerung

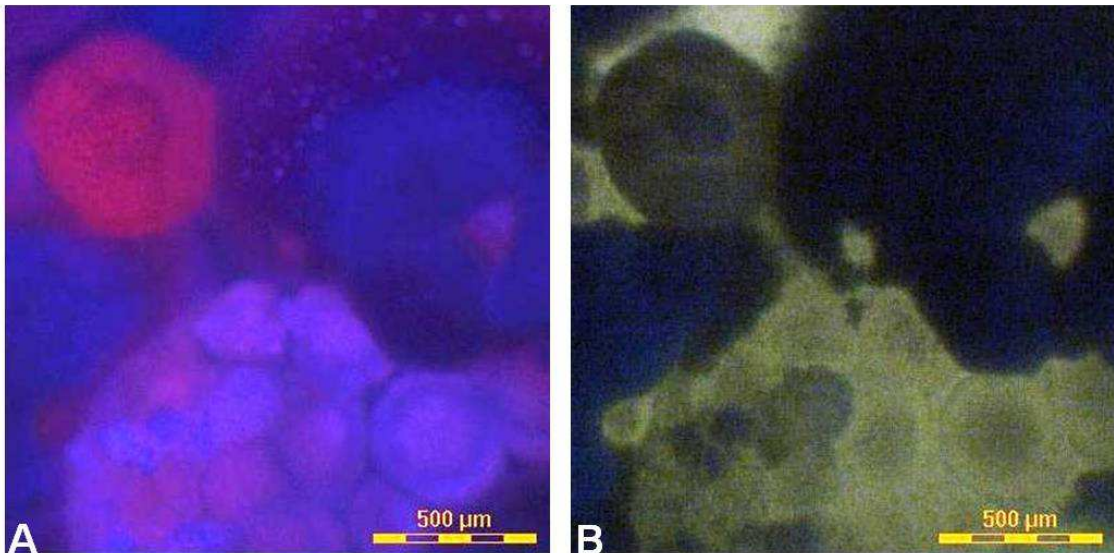


Abbildung 26: Eine mit mCherry markierte *Streptomyces Ae 32_2* Kolonie, A = Mikroskopische Ansicht durch einen Fluoreszenzfilter (B/G/R, 4x Vergrößerung) und B = Mikroskopische Ansicht, Durchlichtmikroskopie (4x Vergrößerung).

3.1.5.2 Erste Versuche zur Aufnahme der Actinomyceten-Symbionten durch Blattschneiderameisen

In einem Versuchsaufbau, der an das natürliche Verhalten der Ameisen angelehnt ist, wurden erste Experimente mit den markierten Actinomyceten (Kapitel 3.1.5.1, S. 41) und den Blattschneiderameisen *Acromyrmex echinator* durchgeführt. Zwei Kammern wurden durch einen Schlauch miteinander verbunden, so dass die Ameisen die Möglichkeit hatten, ihren Futterpilz in der einen und den Abfall in der anderen Kammer zu lagern. Es wurde eine Mischung aus allen vier mCherry-markierten Actinomyceten in die Mitte des Schlauches appliziert (Abbildung 27), um die natürliche Situation zu imitieren, in der die Ameisen über den Erdboden laufen und somit ständig den dort lebenden Bodenbakterien ausgesetzt sind. Nach sechs Tagen wurden einige der Ameisen, sowie Stücke des Gartenpilzes der Blattschneiderameisen aus dem System entnommen und einzeln auf einer Agarplatte (SFM, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) platziert. Nach weiteren drei Tagen wuchsen auf 13 von 15 Platten, neben vielen verschiedenen Pilzen und Bakterien, Kolonien von Actinomyceten (Abbildung 143, S. 209). Die Analyse unter dem Mikroskop zeigte, dass jede dieser Actinomyceten-Kolonien rosa fluoreszierte. Das deutet darauf hin, dass die Bakterien an den Ameisen haften blieben. Es konnten keine unmarkierten Actinomyceten-Kolonien auf den Platten gefunden werden. Wahrscheinlich sind die markierten Bakterien in der kurzen Versuchszeit noch

keine starke Assoziation mit den Blattschneiderameisen eingegangen. Es ist zu vermuten, dass die mCherry-Actinomyceten-Symbionten von den Extremitäten der Insekten auf die Agarplatte gelangt sind. Wären sie bei den unmarkierten Actinomyceten-Symbionten auf der Brustplatte oder anderen Körperteilen angesiedelt worden und von dort aus auf die Agarplatte gelangt, hätten wahrscheinlich ebenso unmarkierte Kolonien zu finden sein müssen (Kapitel 6.4.5.3, S. 131).

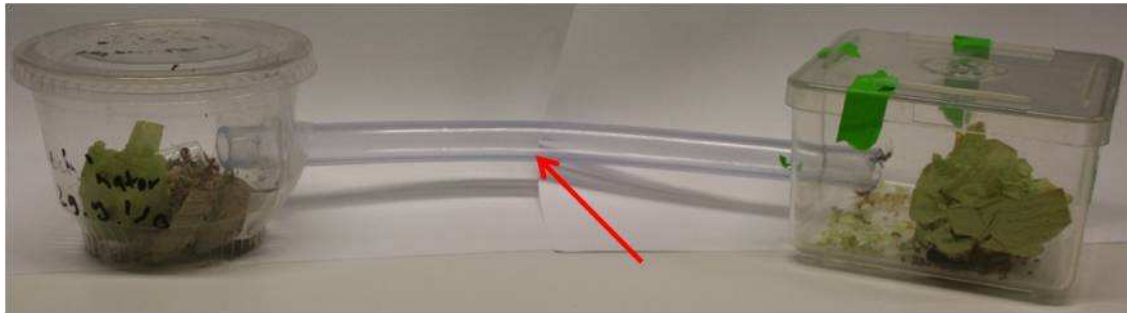


Abbildung 27: Versuchsaufbau für das Experiment mit markierten Actinomyceten; roter Pfeil = Applikation der markierten Bakterien.

Für den Versuch verwendete ich eine kleine Blattschneiderameisen-Subkolonie mit ca. 30 Individuen, mit Gartenpilz aber ohne Königin. Der Versuch mit den markierten Actinomyceten-Symbionten wurde nur über einen kurzen Zeitraum durchgeführt. Für eine eindeutige Aussage über den Mechanismus sowie den Zeitpunkt der Aufnahme der Actinomyceten ist ein Langzeitversuch mit einer intakten Kolonie und einer Königin sinnvoll. Lebt eine Ameisenkolonie über einen längeren Zeitraum mit den markierten Bakterien in einem Lebensraum, könnte die Aufnahme der markierten Mikroorganismen auf das Exoskelett der Blattschneiderameisen beobachtet werden. Zudem würde durch die Gegenwart der Königin gewährleistet sein, dass neue Ameisen geboren werden, die noch nicht mit Actinomyceten besiedelt sind. [128] Dies eröffnet die Möglichkeit zu studieren, ob die jungen Insekten die markierten Bakterien zusammen mit anderen aufnehmen oder nur die Actinomyceten auf ihrem Körper angesiedelt werden, die schon auf dem Exoskelett der ausgewachsenen Individuen zu finden sind. Zudem ist die Markierung weiterer Symbionten nötig, um eine Aussage über den Erwerb der Actinomyceten durch die Blattschneiderameisen treffen zu können. Nur durch eine hohe Diversität an markierten Actinomyeten, die zuvor von den Blattschneiderameisen isoliert wurden und solchen, die aus

anderen Ökosystemen stammen, kann zwischen zufälliger oder gezielter Aufnahme unterschieden werden.

Die entwickelte Strategie kann ebenso für andere Actinomyceten-Symbiosen verwendet werden. Durch die mCherry-Markierung kann die räumliche Verteilung und die zeitliche Ausbreitung von Actinomyceten auf ihrem Wirt beobachtet werden. Auch für Untersuchungen von Actinomyceten, die nicht in einer Symbiose, leben kann diese Methode nützlich sein. Es wurde beschrieben, dass Nematoden auf Streptomyceten grasen. [129-131] Durch die Ausscheidung mCherry-markierter Sporen könnte beispielsweise eine mögliche Verteilung der Mikroorganismen durch die Fadenwürmer im Boden direkt untersucht werden.

3.2 Untersuchungen zum Antibiotikum Antimycin, das von Blattschneiderameisen-Symbionten produziert wird

Nachdem ich Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Antimycin A₁ – A₄ (**9** – **12**) und Valinomycin (**13**) in den Kulturen der Blattschneiderameisen-Symbionten identifizieren konnte, stellte sich heraus, dass über die Biosynthese der Antimycine noch nicht viel bekannt war. Besonders der *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure Rest **27** deutete auf einen interessanten Syntheseweg hin (Abbildung 28). Daher entschied ich mich dafür, weitere Untersuchungen zu den Antimycinen durchzuführen. Die Produktion von Antimycinen ist unter den Streptomyceten weit verbreitet. [90, 132-137] Neben den isolierten Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen konnte ich feststellen, dass auch *Streptomyces odorifer*³² und *Streptomyces griseus*³³ Antimycine bilden.

1948 isolierten Leben und Keitt den Actinomyceten, „No. 3“, der antagonistisch gegen den apfelschorfverursachenden Pilz *Venturia* und weitere Pathogene wirkte. Sie nannten die neue und bis dato gegen Pilze einmalig aktive Verbindung Antimycin (Abbildung 28). [138] In Zusammenarbeit mit Strong und

³² DSM 40347

³³ *S. griseus* DSM 40236 ≠ *S. griseus* NBRC 13350 (vollständig sequenziert)

Dunshee konnte Antimycin 1949 isoliert, kristallisiert und teilweise charakterisiert werden. [139] Im Jahr 1952 zeigte sich, dass Antimycin aus einer Reihe von Strukturanaloga besteht. [140, 141] Nachdem 1960 die Struktur der Antimycine durch van Tamelen *et al.* vollständig aufgeklärt wurde, zeigte sich, dass die Verbindungen sowohl in der Länge und Verzweigung der Alkylseitenkette R_1 als auch in der Struktur des Seitenkettenesters mit R_2 variieren (Abbildung 28, (2)). [142, 143] Mittlerweile sind eine Reihe zu den Antimycinen eng verwandte Strukturen aufgeklärt worden, wie beispielsweise das JBIR-06 (18) (Abbildung 28). [144-146]

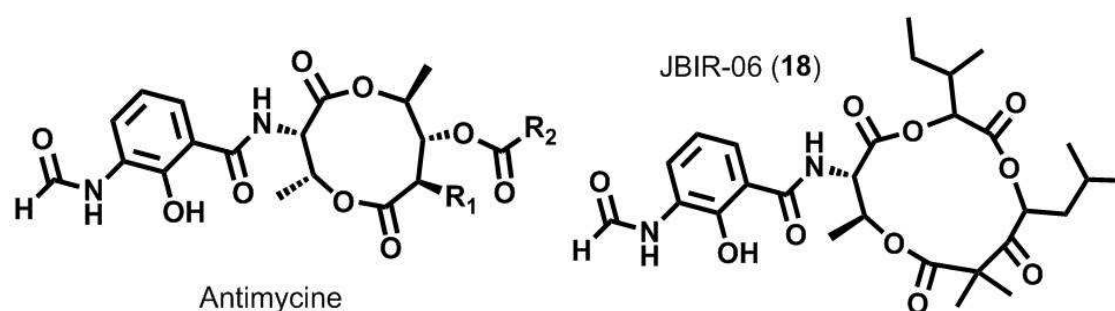


Abbildung 28: Grundstruktur der Antimycine = links, R_1 = Alkyl, R_2 = Alkyl; verwandte Verbindung zu den Antimycinen, JBIR-06 (18).

3.2.1 Produktion von Antimycinen

Streptomyceten beginnen mit der Biosynthese von antibiotisch wirksamen Verbindungen in der Regel mit dem Eintreten in die stationäre Wachstumsphase. [147, 148] Die Produktion von Antimycinen, in Korrelation zum Wachstum der Streptomyceten, wurde bereits beschrieben. Wie zu erwarten, hängt sie stark vom verwendeten Medium und damit vom Nährstoffangebot ab. [148-151]

Für die Untersuchungen der Antimycine arbeitete ich hauptsächlich mit *S. odorifer*. Es zeigte sich, dass *S. odorifer* in erster Linie die Antimycine A_1 - A_4 (9 - 12) produziert. Daher konzentrierte ich mich in meiner Arbeit hauptsächlich auf diese Verbindungen. Im Komplexmedium SFM (Kapitel 6.2.1.1, S. 93) konnte ich dabei die in Abbildung 29 gezeigte Abhängigkeit der Produktion von Antimycin A_1 - A_4 (9 - 12) mit dem Wachstum von *S. odorifer* feststellen. Die Produktion der Antimycin A_1 - A_4 (9 - 12) beginnt in der exponentiellen Wachstumsphase. Das Wachstum von *S. odorifer* erreicht sein Maximum an

Tag 4 und klingt dann relativ schnell ab. Gleichzeitig sinkt die Produktion von den Antimycinen A₁ – A₄ (9 - 12) (Kapitel 6.4.6, S. 131).

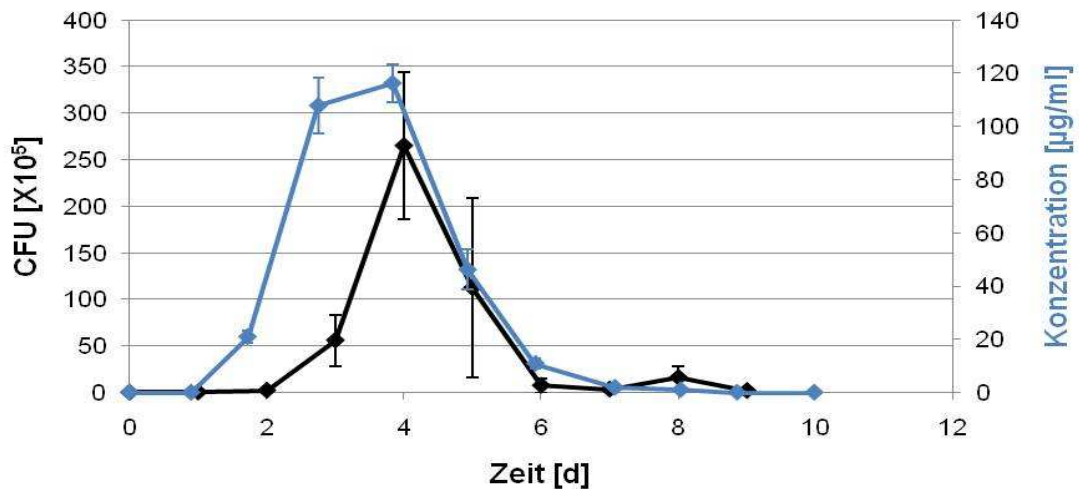


Abbildung 29: Korrelation der Produktion von Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12) mit dem Zellwachstum von *S. odorifer* in flüssigem Komplexmedium (SFM, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) über einen Zeitraum von neun Tagen; CFU = „colony forming units“; blau = Antimycinproduktion µg/ml Kultur; schwarz = Wachstumskurve, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3 (Messwerte in Tabelle 8, S. 177).

Um einen Überblick über den relativen Anteil der jeweiligen Antimycine A₁ - A₄ (9 - 12) zu bekommen, wurde die Menge der Antimycine 9 - 12 zu neun verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 30). Antimycin A₂ (10) ist zu fast allen Zeitpunkten die dominierende Verbindung. Der zeitliche Verlauf der produzierten Menge von Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12) zeigt ein ähnliches Muster der Derivate. Das Maximum der Produktion von Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12) liegt zwischen 66 und 92 Stunden (Abbildung 29).

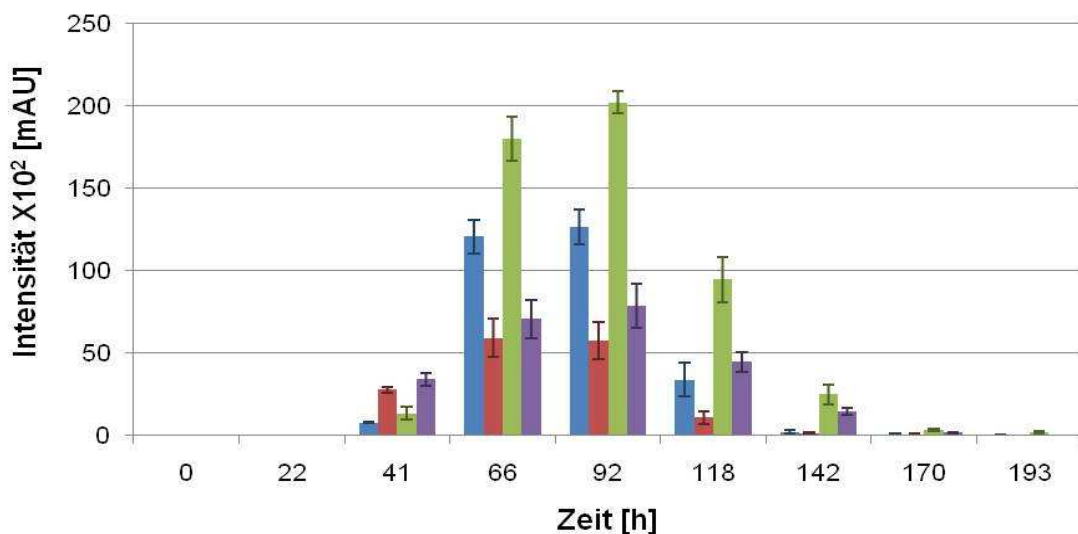


Abbildung 30: Produktion von Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12) von *S. odorifer* im flüssigem Komplexmedium (SFM, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) über einen Zeitraum von acht Tagen; blau = Antimycin A₄ (12), rot = Antimycin A₃ (11), grün = Antimycin A₂ (10), violett = Antimycin A₁ (9); Die Menge der jeweiligen Derivate wurde anhand der UV_{230nm} Absorption ermittelt; Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3.

Die Produktion weiterer Antimycin-Derivate, wie ein Antimycin mit $[M+H]^+ = 563$ (Antimycin-563) konnte ebenfalls festgestellt werden. Die Masse von 562 g/mol haben sowohl Antimycine $A_{0a, c, d}$ (**88 - 90**) und Antimycin A_{13} (**91**). Die Verbindung wurde nicht eindeutig identifiziert. Mittels ESI-MS/MS kann allerdings die typische Fragmentierung der Antimycine festgestellt werden (Abbildung 110, S. 192). Dieses Derivat wird zu einem späteren Zeitpunkt als die Antimycine $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) produziert (Abbildung 29, S. 47), wie im Vergleich zur Produktion von Antimycin A_3 (**11**) in Abbildung 31 dargestellt ist. Antimycin-563 konnte erst nach 92 Stunden detektiert werden. Das Maximum der Produktion war nach etwa 118 Stunden erreicht. Die Konzentration des Antimycin-563 in der Kultur fiel im Vergleich zu Antimycin A_3 (**11**) wesentlich geringer aus.

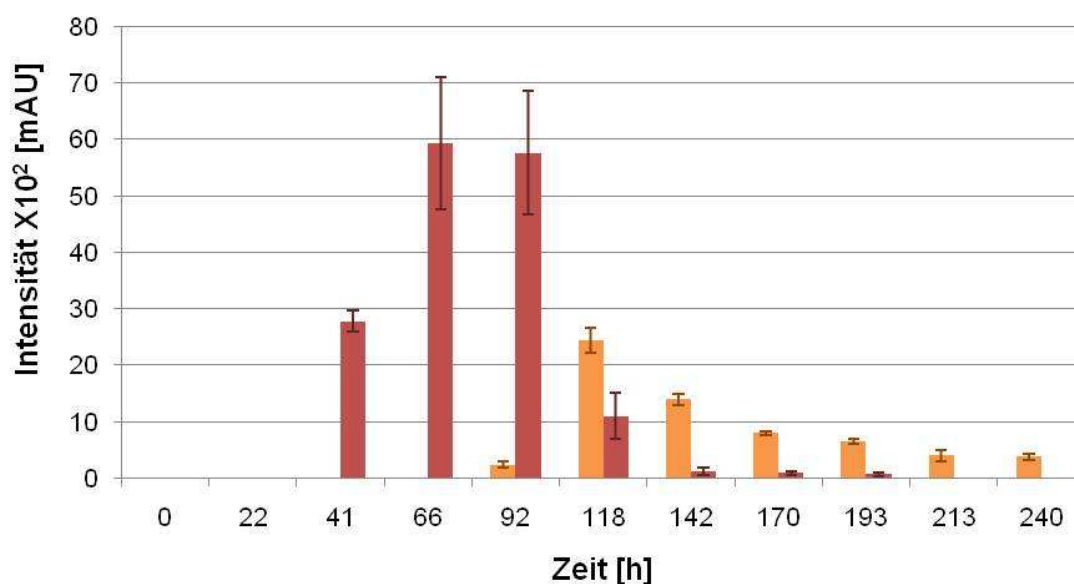


Abbildung 31: Produktion von Antimycin A_3 (**11**) und Antimycin-563 von *S. odorifer* in flüssigem Komplexmedium (SFM, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) über einen Zeitraum von 10 Tagen; rot = Antimycin A_3 (**11**); orange = Antimycin-563; Die Menge wurde anhand der UV_{230nm} Absorption ermittelt; Fehlerbalken = Standardabweichung, $n = 3$.

3.2.2 Biosynthese von Antimycinen

Zum Studium der Biosynthese der Antimycine wurden bisher einige wenige Verfütterungsstudien mit radioaktiv markierten Verbindungen durchgeführt. Birch *et al.* führten Versuche durch, in denen sie $[1-^{14}C]$ -Essigsäure, $[2-^{14}C]$ -Pyruvat und $[^{14}C]$ -Ameisensäure zu einer Kultur von *Streptomyces kitazawaensis* gaben, die zu einem nicht signifikanten Einbau von 0,002 % und 0,02 % der Essigsäure und des Pyruvats führten. Die Verfütterung von

Ameisensäure zeigte keinen Einbau in die Antimycine. Dennoch postulierten Birch *et al.* die im Folgenden möglichen Ausgangsverbindungen für die Biosynthese der Antimycine: Die Vorstufe des in Abbildung 32 gezeigten Abschnitts A soll eine über den Acetat-Malonat-Weg synthetisierte Fettsäure sein. Der Seitenkettenester B (Abbildung 32) soll von einer verzweigten Aminosäure, wie Leucin, Isoleucin oder Valin über die entsprechende α -Ketosäure herrühren. Abschnitt C (Abbildung 32) des Dilaktonrings könnte aus Pyruvat oder Lactat entstehen und der letzte Abschnitt des Dilaktonrings (Abbildung 32, D) ist ein unverändertes L-Threonin. Der aromatische Abschnitt (Abbildung 32, E) der Antimycine könnte vom Shikimat-Weg stammen. [152]

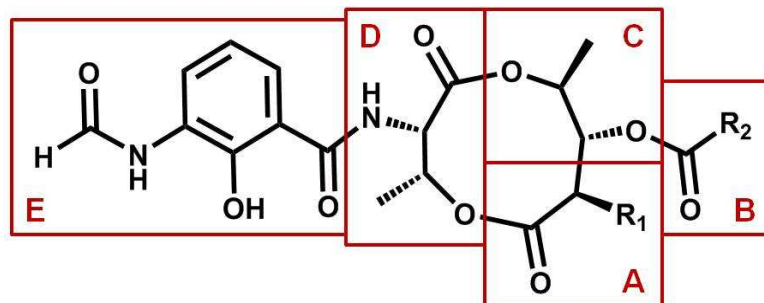


Abbildung 32: Einteilung der Antimycin-Grundstruktur in Einheiten, aus denen das Molekül während der Biosynthese aufgebaut werden könnte, nach Birch *et al.*, $R_1 = \text{Alkyl}$, $R_2 = \text{Alkyl}$. [152]

Neft *et al.* untersuchten den Einbau von ^{14}C -markierten Verbindungen, wie Glukose, Shikimisäure, Benzoesäure, L-Phenylalanin und DL-Tryptophan in den aromatischen Abschnitt E (Abbildung 32) der Antimycine, die von *Streptomyces* AY-B-265 produziert wurden. Die Experimente zeigten, dass $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Glukose, $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Shikimisäure und $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ -Benzoesäure zu jeweils 0,017 %, 0,011 % und 0,004 % in verschwindend geringen Anteilen in die Antimycine eingebaut wurden. $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -L-Phenylalanin und unterschiedlich markiertes DL-Tryptophan dagegen zeigten einen Einbau von 0,126 % und 0,18 - 1,8 % und eine Markierung der Formylgruppe (Abbildung 32, E). Aus diesem Befund wurde geschlossen, dass die Formylgruppe direkt aus dem gefütterten $[\text{2-}^{14}\text{C}]$ -DL-Tryptophan stammt. [153] Fermentationsstudien mit anderen Antimycin-produzierenden Streptomycceten unterstützten die Annahme von Tryptophan als Vorstufe der Antimycine. [150, 151]

3.2.2.1 Untersuchungen zur Bildung der 3-Aminosalicylsäure-Einheit von Antimycinen

Die Untersuchung der Vorstufen für die *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit **27** der Antimycine (Abbildung 32, E, S. 49) ist besonders interessant, da nicht viele Naturstoffe mit einer 3-Aminosalicylsäure-Einheit **38** bekannt sind. Das Substitutionsmuster des Aromaten lässt sich nicht einfach von einer Aminosäure oder einer anderen bekannten Vorstufe ableiten. Birch *et al.* und Neft *et al.* [152, 153] setzten für die Aufklärung radioaktiv markierte Vorstufen ein. Der Nachteil dieser Methode ist, dass eine Lokalisierung der markierten Positionen im Molekül meist nur durch Abbaureaktionen möglich ist. Daher verwendete ich für die Markierung der Antimycine durch Verfütterungsstudien stabile Isotope (Kapitel 6.4.7.1, S. 132). Zunächst verfütterte ich [²H₅]-L-Tryptophan (**19**) (Abbildung 33) zu einer *Streptomyces odorifer*-Kultur. Sollte die Formylgruppe, wie von Neft *et al.* [153] beschrieben (Abbildung 32, Abschnitt E), aus dem Tryptophan stammen, müsste im LC-MS der Einbau von vier Deuterium Atomen zu beispielsweise [²H₄]-Antimycin A_{3b} (**20**) festzustellen sein (Abbildung 33). Die von mir durchgeführten LC-MS/MS-Messungen zeigten eine Markierung der Antimycine mit nur drei Deuterium Atomen (Abbildung 34).

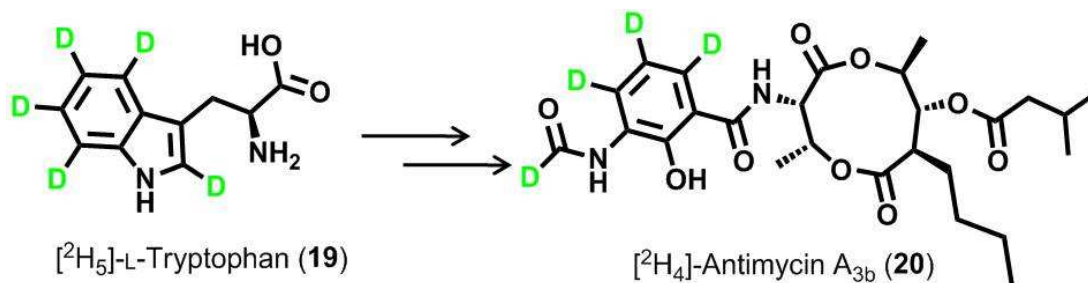


Abbildung 33: Postulierter Weg zur Bildung von [²H₄]-Antimycin A_{3b} (**20**) aus [²H₅]-L-Tryptophan (**19**) analog zu Neft *et al.*, R₁ = Alkyl, R₂ = Alkyl. [153]

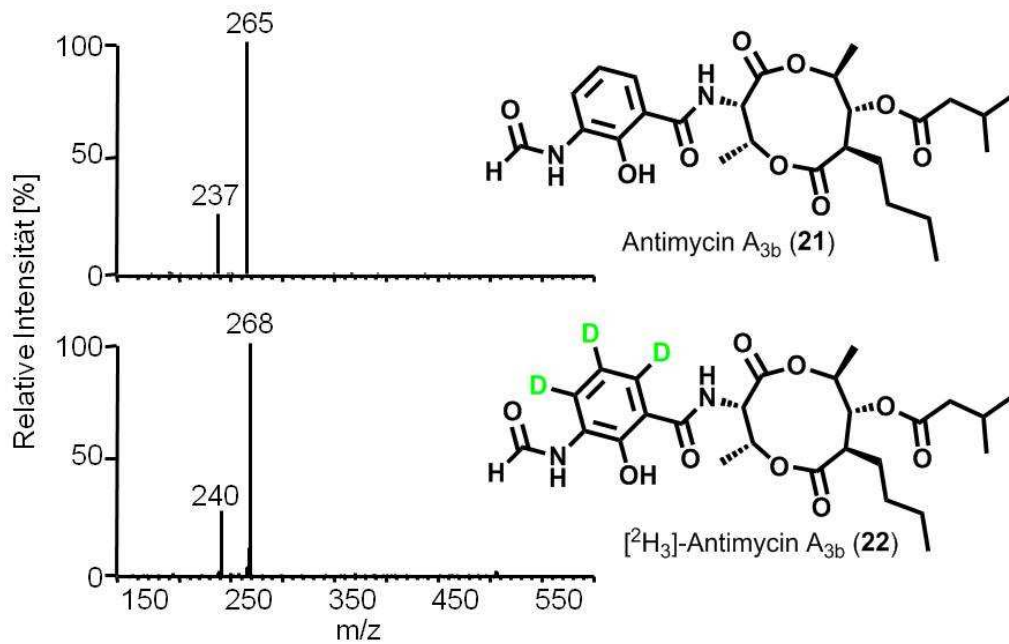


Abbildung 34: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+ = 520,9$ von Antimycin A_{3b} (**21**) und $[M+H]^+ = 523,9$ von [2H₃]-Antimycin A_{3b} (**22**); Kollisionsenergie 35%.

Der pK_a von Formamid beträgt -2. [154] Ein Austausch des sauren Deuteriums der Formylgruppe gegen ein Proton kann damit nicht ausgeschlossen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure (**27**) der Antimycine aus dem Abbau des *L*-Tryptophans (**23**) resultiert, da drei Deuterium-Markierungen in dem Antibiotikum vorhanden sind. Um zu klären, ob die Formylgruppe aus dem *L*-Tryptophan (**23**) stammt, ist die Verwendung von [2-¹³C]-*L*-Tryptophan denkbar.

Einer der Abbauewege von *L*-Tryptophan (**23**) führt über *N*-Formylkynurenin (**24**) und Anthranilsäure (**26**) (Abbildung 35). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von Anthranilsäure (**26**) zur *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit **27** nahm ich den Verlauf der Biosynthese über diesen Weg an.

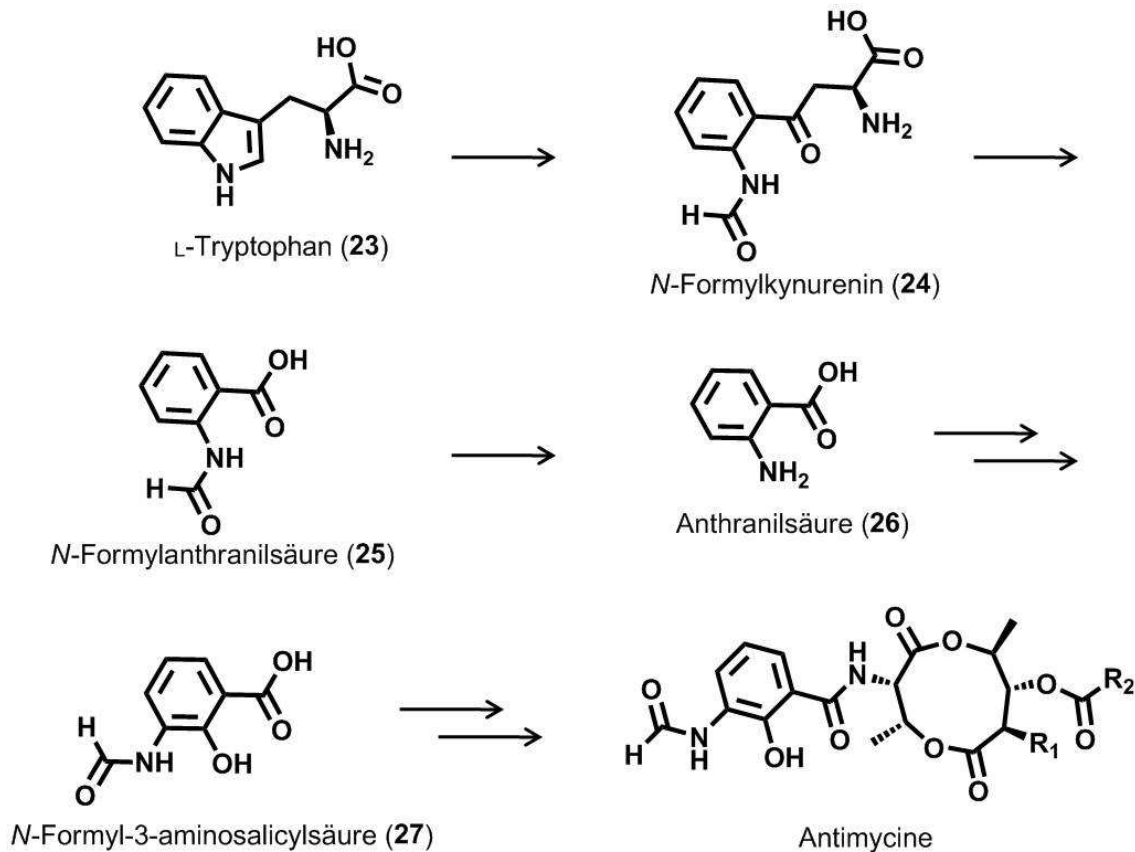


Abbildung 35: Schema des Abbaus von L-Tryptophan (23) bis zur Anthranilsäure (26) über N-Formylkynurenin (24) [155] als Vorstufen der N-Formyl-3-aminosalicylsäure (27) der Antimycine; R₁ = Alkyl, R₂ = Alkyl.

Für die Überprüfung der These zur Biosynthese der N-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit 27 verfütterte ich zunächst [¹⁵N]-Anthranilsäure (30) (Abbildung 37) an *S. odorifer*, wobei ich einen Einbau dieser Verbindung feststellen konnte. Anschließend wurde die 4-Fluoroanthranilsäure (31) (Abbildung 37) zu einer Kultur von *S. odorifer* gegeben. Da Fluor einen ähnlichen Atomradius wie Wasserstoff hat, wurde die Beeinflussung der Enzyme in der Biosynthese der Antimycine durch die Substitution eines Wasserstoffatoms vernachlässigt. Ein weiterer Vorteil der Fluormarkierung ist der eindeutige Massenunterschied von 18 amu durch die Fluormarkierung gegenüber 1 amu einer ¹³C- oder ²H-Markierung. Eine Identifizierung anhand von Massenspektrometrie wird damit vereinfacht. Es konnte ebenfalls ein Einbau der 4-Fluoroanthranilsäure (31) (Abbildung 37) in die Antimycine A₁ – A₄ (9 – 12) festgestellt werden. Daraufhin stellte ich mir die Frage, wie aus Anthranilsäure (26) die N-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit 27 der Antimycine gebildet wird. Ein möglicher Weg ist die Bildung des Aziridins 28 [156, 157] als

Zwischenstufe. Die Öffnung des Aziridins **28** könnte im Weiteren zu einer Verschiebung der Aminogruppe führen. Auch eine Epoxidierung (vgl. 2-Amino-2,4-dien-1,6-epoxycyclohexansäure (**29**)) des Aromaten mit einer anschließenden Carboxylverschiebung wäre denkbar. So würde die Hydroxylgruppe der *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit **27** direkt eingeführt werden (Abbildung 36). [158, 159]



Abbildung 36: Mögliche Zwischenstufen des Biosynthesewegs für den Aromaten der Antimycine.

Um beide Reaktionsmechanismen prüfen zu können, nutzte ich die Eigenschaft, dass Fluor eine schlechte Abgangsgruppe ist. Zunächst wurde die 3-Fluoroanthranilsäure (**32**) zu einer *S. odorifer*-Kultur gegeben. Die Position neben der Aminogruppe wurde damit blockiert. Dadurch würde die Verschiebung der Aminogruppe bzw. eine Rearomatisierung verhindert, die letztendlich zu der 3-Aminosalicylsäure (**38**) führen sollte. Falls der Biosyntheseweg der Antimycine über das zyklische Amin **28** führt, dürfte die Fluormarkierung nicht in diese Verbindungen eingebaut werden. Die LC-MS-Analysen zeigten allerdings den Einbau von Fluor in die Antimycine (Abbildung 37). Damit schloss ich die Aziridin-Bildung als Reaktionsmechanismus in der Antimycin-Biosynthese für die 3-Aminosalicylsäure (**38**) aus. Analog zur Blockierung der Position 3 der Anthranilsäure (**26**) verwendete ich die 6-Fluoroanthranilsäure (**33**), um die Position neben der Carboxylgruppe zu blockieren. Diese Position würde für eine Epoxidbildung (vgl. **29**) genutzt werden. Nach der Verfütterung der 6-Fluoroanthranilsäure (**33**) konnte ich diesmal keinen Einbau der Fluormarkierung feststellen (Abbildung 37). Das bedeutete, die Blockierung in Position 6 hat den Einbau der fluormarkierten Anthranilsäure in die Antimycine verhindert. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Aminogruppe in ihrer Position bleibt und die Carboxylgruppe in Relation zu der Aminogruppe von der *ortho*- in die *meta*-Position verschoben wird, um die 3-Aminosalicylsäure (**38**) zu bilden.

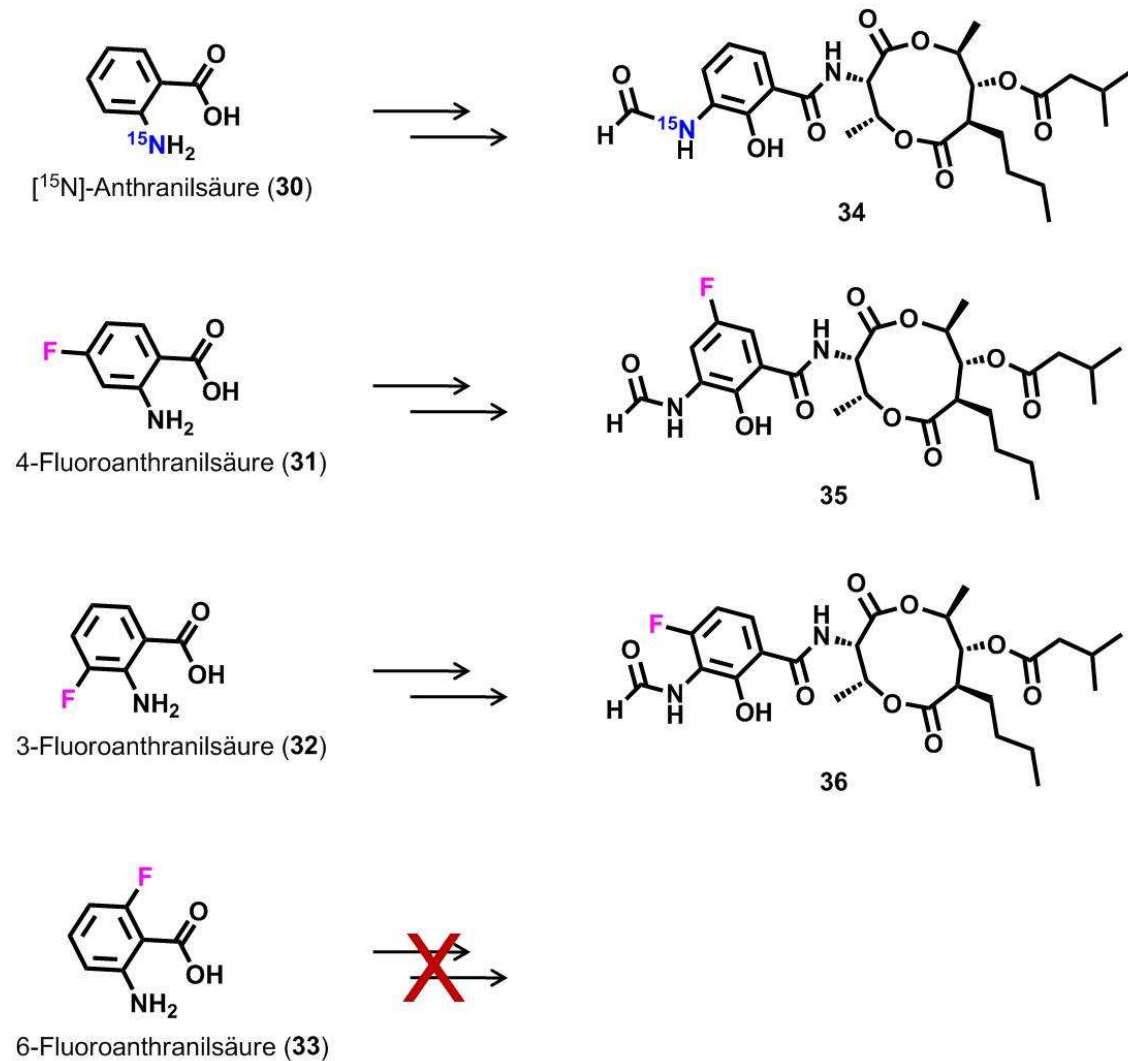


Abbildung 37: Verfütterung von [¹⁵N]-Anthranilsäure (30), 3-Fluoroanthranilsäure (31), 4-Fluoroanthranilsäure (32), 6-Fluoroanthranilsäure (33) und ihr Einbau in die Antimycine.

Das Substitutionsmuster der *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit **27**, das sich aus dem Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums (Kapitel 6.4.7.1, S. 132, Kapitel 8.6.5, S. 193) des isolierten 5-F-Antimycins mit einem ¹⁹F-¹H-entkoppeltem Proton-NMR-Spektrum ableiten lässt, belegt die Verschiebung der Carboxylgruppe (Abbildung 38). Die Signale der aromatischen Protonen sind in Abbildung 38 markiert. Es ist sehr gut zu erkennen, dass die beiden Protonen im ¹H-Spektrum von 5-F-Antimycin als Dublett vom Dublett (dd) auftreten. Dies resultiert aus der Kopplung mit dem Fluor und dem jeweils anderen aromatischen Proton. Wird die Kopplung zwischen den Protonen und dem Fluor unterbunden, so sind nur die Dubletts aus der Kopplung der Protonen untereinander zu erkennen. Aus der kleinen Kopplungskonstante von 2,9 Hz der Dubletts (*meta*-Kopplung) in dem entkoppelten NMR-Spektrum sowie der zusätzlichen Kopplungskonstanten von 10,1 Hz und 9,2 Hz (*ortho*-Kopplung)

der Signale (Dublett vom Dublett) des einfachen Proton-NMR-Spektrums wird das gezeigte (Abbildung 38) Substitutionsmuster am Aromaten bestätigt. Zudem zeigt sich bei einem Vergleich der NMR-Spektren einer Referenz aus den Antimycinen A₁ - A₄ (**9** - **12**) mit den isolierten, fluorierten Antimycinen (vgl. **35**), dass das Signal der Kopplungen des dritten aromatischen Protons bei 7,00 ppm in dem Spektrum des 5-F-Antimycins fehlt (Abbildung 116, S. 195).

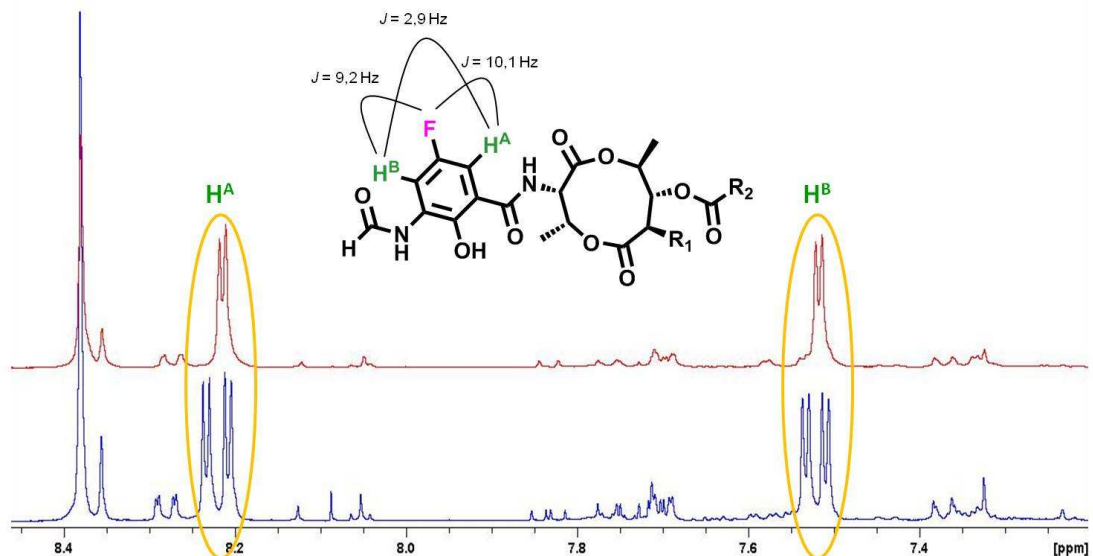


Abbildung 38: Ausschnitt eines ^{19}F - ^1H -entkoppelten-Proton-NMR-Spektrums (400 MHz) = rot im Vergleich zu einem Proton-NMR-Spektrum von 5-F-Antimycin = blau, welches durch die Verfütterung von 4-Fluoroanthranilat (**31**) von *S. odorifer* produziert wurde; Die markierten Signale resultieren aus der Kopplung der aromatischen Protonen.

In Anlehnung an die bekannte Aryl-Verschiebung bei der Umwandlung von Flavonen zu Isoflavonen [159, 160] schlage ich den folgenden Mechanismus für die Bildung der 3-Aminosalicylsäure (**38**) aus Anthranilsäure (**26**) vor. Zunächst würde die Anthranilsäure (**26**) durch eine Oxidase epoxidiert werden. Das durch eine Decarboxylierung entstehende 2-Aminophenol (**37**) würde anschließend in *ortho*-Position zur Aminogruppe carboxyliert werden (Abbildung 39). Eine Alternative zu diesem Mechanismus wäre eine direkte Verschiebung der Carboxylgruppe (Abbildung 39), wie sie aus der Biosynthese der Tropasäure bekannt ist. [158, 161]

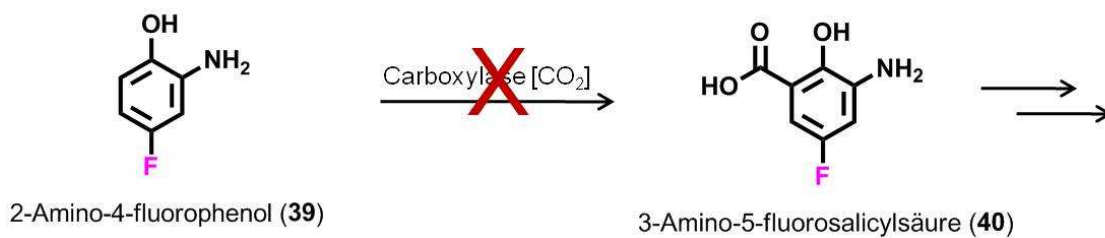
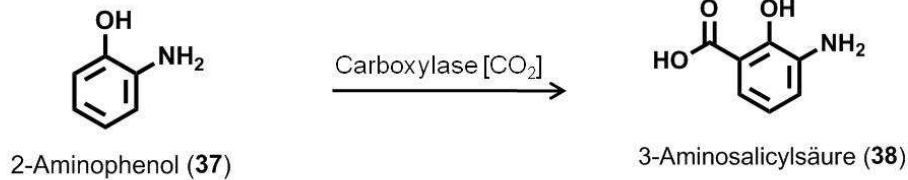
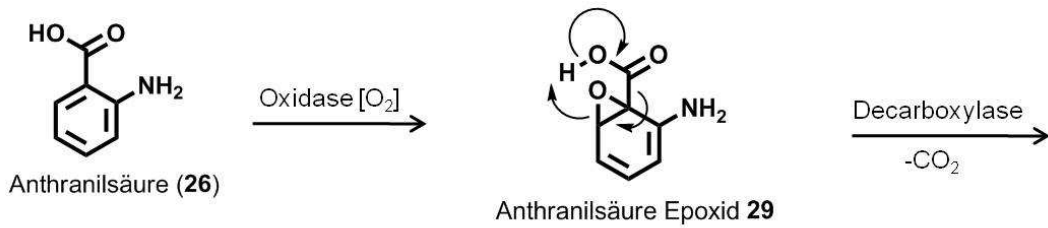


Abbildung 39: Möglicher Reaktionsmechanismus für die Bildung der 3-Aminosalicylsäure (38) der Antimycine aus Anthranilsäure (26) über das 2-Aminophenol (37).

Um zwischen den zwei möglichen Biosynthesewegen der Carboxylverschiebung zu differenzieren, verfütterte ich 2-Amino-4-fluorophenol (39) zu einer *S. odorifer*-Kultur. Würde die Bildung der *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure (27) über das 2-Aminophenol (37) verlaufen, würde das Fluor in die Antimycine eingebaut werden. Die LC-MS-Analyse der Extrakte zeigte allerdings keine Fluormarkierung der Verbindungen. Daher postuliere ich den in Abbildung 40 gezeigten Biosyntheseweg für die Bildung der 3-Aminosalicylsäure-Einheit 38 der Antimycine.

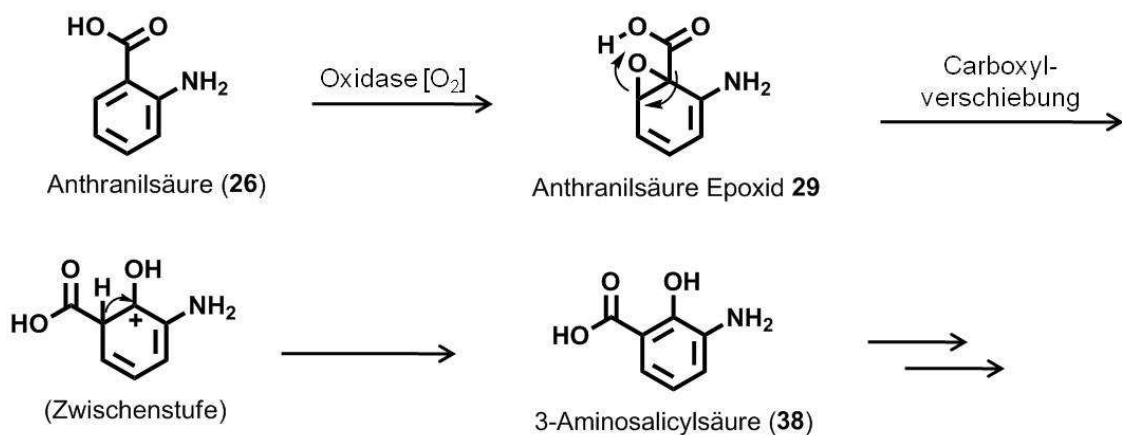


Abbildung 40: Postulierter Mechanismus für die Biosynthese der 3-Aminosalicylsäure-Einheit 38 der Antimycine über eine konzertierte Carboxylverschiebung.

Um den postulierten Mechanismus zur Bildung der 3-Aminosalicylsäure (**38**) zu bestätigen, könnte ^{18}O -markierter Sauerstoff während der Kultivierung von *S. odorifer* genutzt werden. Dadurch könnte überprüft werden, ob tatsächlich eine Epoxidbildung stattfindet. Eine hohe Einbaurate der ^{18}O -Markierung in die phenolische Hydroxylgruppe der Antimycine würde die Epoxidbildung als Zwischenstufe bestätigen.

Eine Anthranilsäure **26** mit einer ^{13}C -markierten Carboxylgruppe, die zu einer *S. odorifer*-Kultur verfüttert werden könnte, würde durch einen Einbau bestätigen, dass die Carboxylgruppe konzertiert verschoben wird. Würde CO_2 , das aus der Decarboxylierung der Anthranilsäure (**26**) resultiert, direkt weiter für die anschließende Carboxylierung verwendet werden, würde die Markierung während der Biosynthese nicht verloren gehen. Wäre der Kohlenstoff der 3-Aminosalicylsäure-Carboxylgruppe weitgehend unmarkiert, würde die Carboxylgruppe nicht weiter verwendet werden. Dies würde die Ergebnisse der Verfütterung von 2-Amino-4-fluorphenol (**39**) bestätigen.

Durch die Identifizierung von Zwischenstufen der *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure (**27**) Biosynthese könnte der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (Abbildung 40) ebenfalls überprüft werden.

3.2.2.2 Verfütterungsstudien zur weiteren Aufklärung der Antimycin-Biosynthese

Analog zu Birch *et al.*, [152] wurde von mir angenommen, dass der Abschnitt A des Dilaktonrings (Abbildung 32, mit R_1 , S. 49) der Antimycine aus einer Fettsäure, der Seitenkettenester (Abbildung 32, B, mit R_2 , S. 49) aus einer der drei Aminosäuren Leucin, Isoleucin oder Valin und Abschnitt C des Dilaktonrings (Abbildung 32, S. 49) aus Milchsäure stammen. Daher gab ich zunächst die unmarkierten Aminosäuren L-Isoleucin (**45**) und L-Valin (**46**) in das Komplexmedium SFM (Kapitel 6.2.1.1, S. 93). Sollte die Antimycin-Produktion von der Konzentration dieser Aminosäuren abhängen, müsste ein Unterschied im Verhältnis der verschiedenen Antimycine (Abbildung 41) zueinander zu beobachten sein (Kapitel 6.4.7.2, S. 135).

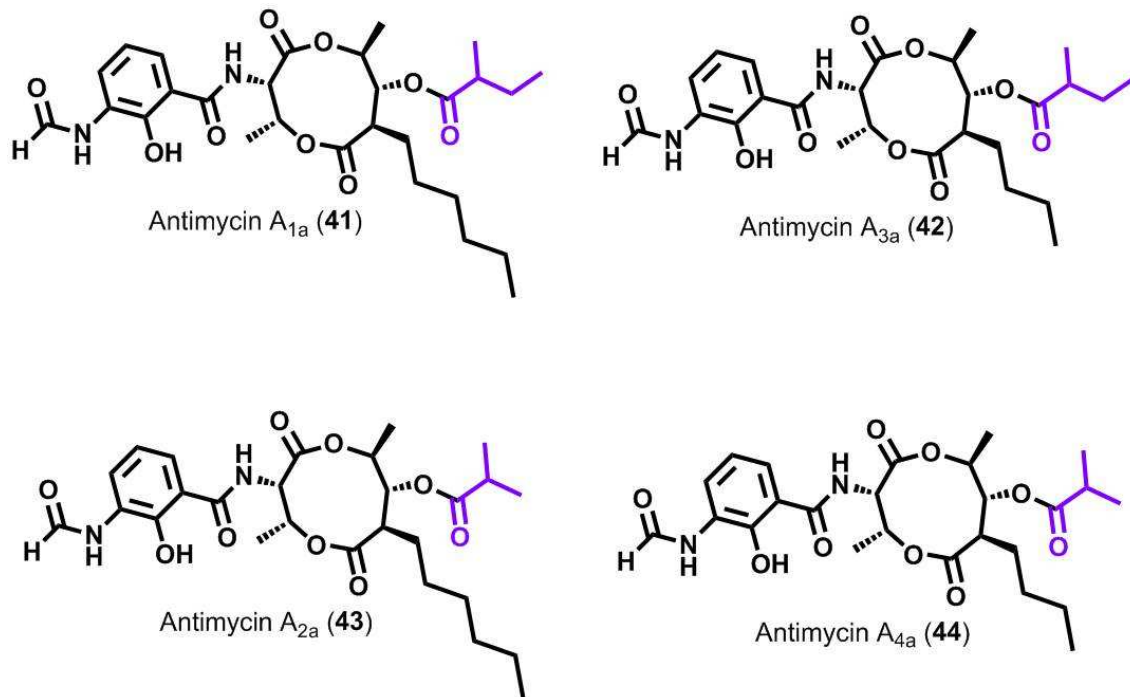


Abbildung 41: Antimycine, deren Seitenkettenester (lila) aus Isoleucin bzw. Valin stammen könnten.

Bei den anschließenden LC-MS-Messungen konnte ich allerdings keine größeren Unterschiede im Verhältnis der verschiedenen Antimycine zueinander feststellen (Abbildung 42).

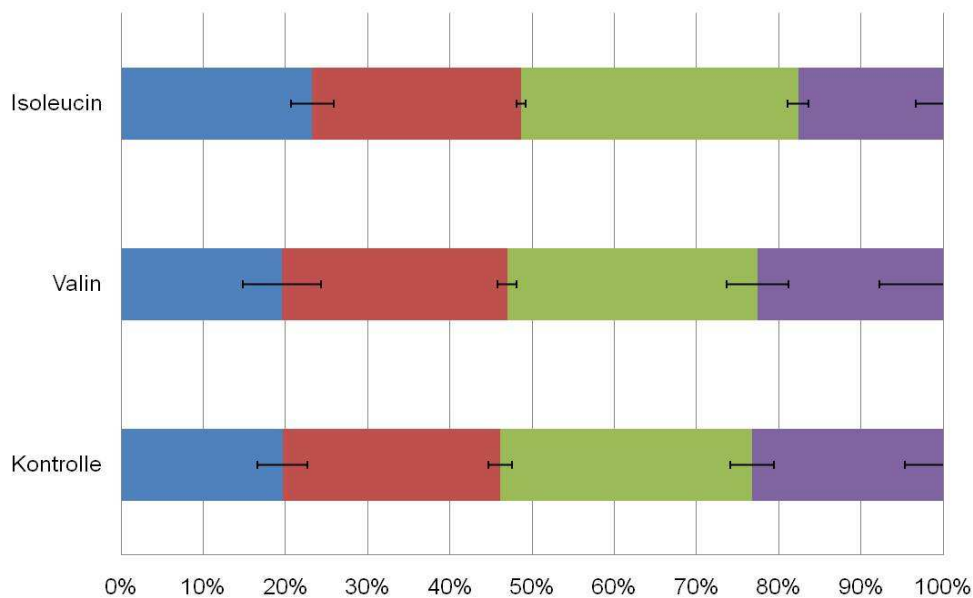


Abbildung 42: Balkendiagramm der *S. odorifer* Verfütterungsstudie mit L-Isoleucin (45) und L-Valin (46), SFM Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93), sechs Tage; Peakfläche der UV₂₃₀ Absorption der Antimycine A₁ (9) = blau, Antimycin A₂ (10) = rot, Antimycin A₃ (11) = grün, Antimycin A₄ (12) = violett, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3.

Um der Annahme nachzugehen, dass verzweigte Aminosäuren als Vorstufe des Seitenkettenesters (Abbildung 32, B, mit R₂, S. 49) dienen, verfütterte ich die markierten Aminosäuren [²H₈]-L-Valin (**47**), [¹³C₆, ¹⁵N]-L-Isoleucin (**48**) und [2-¹³C]-L-Leucin (**49**). Zusätzlich sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob die Verzweigung des Esters (Abbildung 32, B, R₂, S. 49) durch eine Methylierung mit S-Adenosylmethionin (SAM) gebildet wird. Dafür wurde [¹³C, ²H₃]-L-Methionin (**50**) zu einer *S. odorifer*-Kultur gegeben (Kapitel 6.4.7.2, S. 135).

Für die Identifikation der Vorstufe der Alkylseitenkette (Abbildung 32, B, R₁, S. 49) der Antimycine sollte untersucht werden, ob ein Antimycin mit einer ungewöhnlichen Heptyl-Seitenkette gebildet wird, wenn der Nonansäuremethylester (**51**) verfüttert wird (Kapitel 6.4.7.2, S. 135).

Zusätzlich sollte eine Verfütterung zeigen, ob Milchsäure in die Antimycine eingebaut wird. Dafür gab ich die zu [²H]-Milchsäure (**52**) reduzierte Brenztraubensäure (**80**) (Kapitel 6.4.7.3, S. 137) zu einer *S. odorifer*-Kultur. Untersucht wurde, ob das Deuterium in den Dilaktonring (Abbildung 32, C, S. 49) eingebaut wird (Kapitel 6.4.7.2, S. 135).

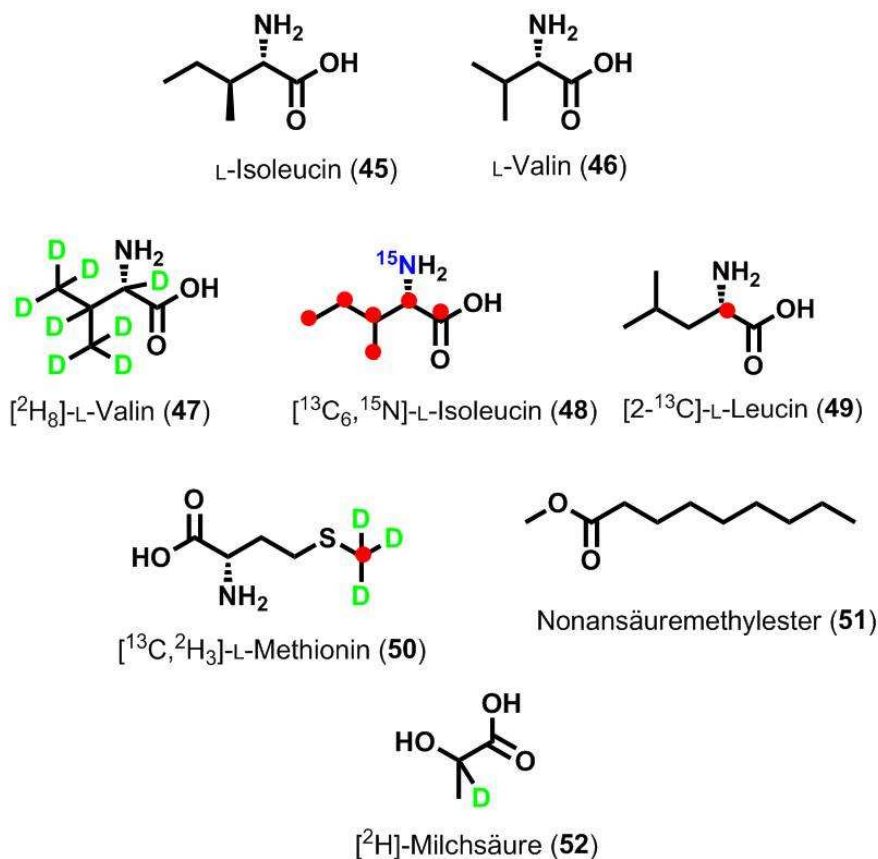


Abbildung 43: Verfütterte Verbindungen: L-Isoleucin (**45**), L-Valin (**46**), [²H₈]-L-Valin (**47**), [¹³C₆, ¹⁵N]-L-Isoleucin (**48**), [2-¹³C]-L-Leucin (**49**), [¹³C, ²H₃]-L-Methionin (**50**) Nonansäuremethylester (**51**), [²H]-Milchsäure (**52**); roter Punkt = ¹³C-Markierung.

Für keine der verfütterten Verbindungen (Abbildung 43) konnte ein Einbau in die Antimycine beobachtet werden. Dieses Ergebnis widerspricht der weit verbreiteten Annahme über die Vorstufen der Antimycine. [148, 152, 153] Eine mögliche Erklärung dafür, dass [$^2\text{H}_8$]-L-Valin (**47**), [$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}$]-L-Isoleucin (**48**) und [$2\text{-}^{13}\text{C}_6$]-L-Leucin (**49**) nicht in die Antimycine $A_1 - A_2$ (**9 - 12**) eingebaut wurden, ist der hohe Verbrauch der Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. Die Wiederholung der Experimente in einem definierten Medium wäre denkbar. In diesem Fall könnten die Aminosäuren Valin und Isoleucin nur als markierte Verbindungen eingesetzt werden. Dadurch könnte die Nutzung von unmarkierten Aminosäuren als potentielle Vorstufen von R_2 (Abbildung 32, B, S. 49) ausgeschlossen werden. Bei einem Einbau der jeweiligen Markierungen könnte man davon ausgehen, dass die Aminosäuren als Vorstufe des Esters dienen.

Es ist möglich, dass der verfütterte Nonansäuremethylester (**51**) nicht als Seitenkette in die Antimycine $A_1 - A_2$ (**9 - 12**) eingebaut wurde, weil er bereits in dem Medium hydrolysiert wurde und damit zu polar sein würde, um von der Zelle aufgenommen zu werden. Die Polarität könnte ebenso das Problem bei der Aufnahme der [^2H]-Milchsäure (**52**) in die Zellen gewesen sein.

Für die vollständige Aufklärung der Biosynthese der Antimycine sollte daher zunächst der Gencluster identifiziert werden, der für die an der Biosynthese beteiligten Enzyme codiert. Die Konstruktion verschiedener Mutanten des Antimycin-Biosynthese-Clusters und die darauf folgende Isolierung der sich akkumulierenden Zwischenstufen stellt, neben der Verfütterung von weiteren markierten Verbindungen, eine Möglichkeit für die Untersuchung der Biosynthese der Antimycine dar. Dr. J. Dickschat (TU Braunschweig) konnte bereits einen potentiellen Gencluster für die Biosynthese der Antimycine identifizieren, der allerdings noch betätigt werden muss. [162] Daher habe ich bereits begonnen eine Knockout-Mutante des potentiellen Clusters herzustellen.

Für die Konstruktion stabiler Mutanten soll die Methode des „double crossovers“ verwendet werden. [163] Hierfür wurden bereits die Flanken der Zielgene sowie eine Antibiotikaresistenzkassette für die spätere Selektion der Mutanten von mir

amplifiziert. Die für die Knockout-Mutante gewählten Zielgene codieren für Enzyme, die für die Umwandlung der Anthranilsäure-Vorstufe zur *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure (**27**) zuständig sein sollten. Die drei Fragmente sollen anschließend in den Vektor pKC1139 [164] ligiert werden, der für die Konjugation in Streptomyceten geeignet ist. Mit den beiden Flanken der Antimycin-Biosynthese-Gene *Anti_L*, *Anti_R* und der Hygromycin B-Resistenzkassette (*hygB*) soll das Plasmid pKC1139-AntiKO konstruiert werden (Abbildung 44; Kapitel 6.4.7.4, S. 137).

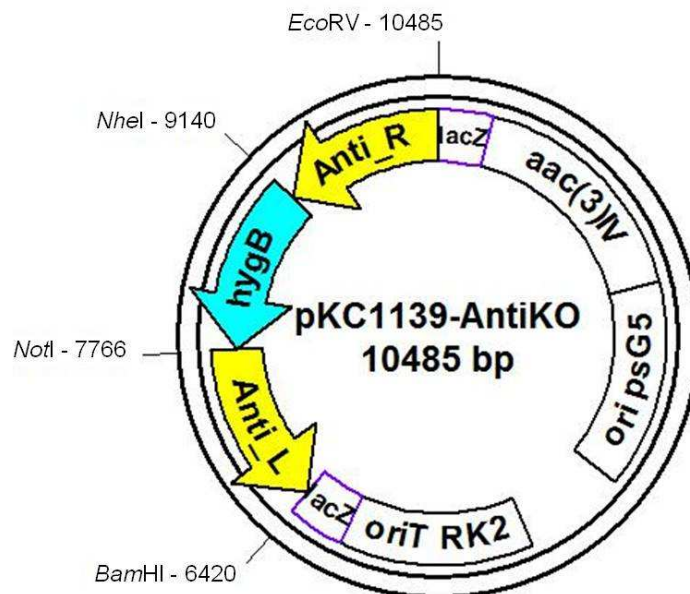


Abbildung 44: Karte des Plasmids für die Antimycin-Knockout-Mutante; *EcoRV*, *NheI*, *NotI*, *BamHI* = zu nutzende Schnittstellen; *lacZ* = Genfragmente für die Expression einer Galaktosidase, Blau / Weiß-Selektion; *aac(3)IV* = Apramycin Resistenzkassette, *ori psG5* = temperatursensitiver Replikationsursprung von *psG5*; *oriT RK2* = Transferursprung des Plasmids *RK2*; *hygB* = Hygromycin B-Resistenz Kassette; *Anti_L* und *Anti_R* = Flanken der Targetgene.

Nach einer Konjugation des Plasmids pKC1139-AntiKO in *S. odorifer* und der nachfolgenden Kultivierung mit anschließender LC-MS-Analyse könnte untersucht werden, ob die Mutante weiterhin in der Lage ist Antimycine zu produzieren. So kann bestimmt werden, ob der vorgeschlagene Gencluster für die Biosynthese der Antimycine verantwortlich ist. Im Anschluss könnten weitere Mutanten der einzelnen Biosynthesegene konstruiert werden, um die einzelnen Vorstufen der Biosynthese aufklären zu können. So könnten beispielsweise die Gene für Enzyme der Biosynthese der *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure (**27**) nacheinander ausgeschaltet werden und die sich akkumulierenden Vorstufen isoliert werden, um den postulierten Biosyntheseweg (Kapitel 3.2.2.1, S. 50) zu überprüfen.

3.2.3 Stabilität und Wirkungsweise der Antimycine

Für die Strukturaufklärung der Antimycine in den 50er und 60er Jahren wurden die Verbindungen schrittweise abgebaut. Anhand der Eigenschaften der Bruchstücke des Antibiotikums konnte ihre Struktur identifiziert werden. [137, 142, 152] So wurde durch die milde alkalische Hydrolyse von Antimycin A_{3b} (**21**) mit 5 %iger Natriumhydroxidlösung, die sogenannte „Blastmycic acid“ (**53**) und ihr deformyliertes Analogon „Antimycic acid“ (**54**) sowie das Antimycinlaktone **55** erhalten. Nach der anschließenden sauren Esterhydrolyse wurde das 3-Hydroxy- γ -butyrolaktone (**56**) gebildet. [89] Schilling *et al.* erhielten durch Pyrolyse von Antimycin A_{3b} (**21**) bei 600 °C neben dem 3-Acyloxylaktone **55** auch das α,β -ungesättigte Laktone **57** (Abbildung 45). [165]

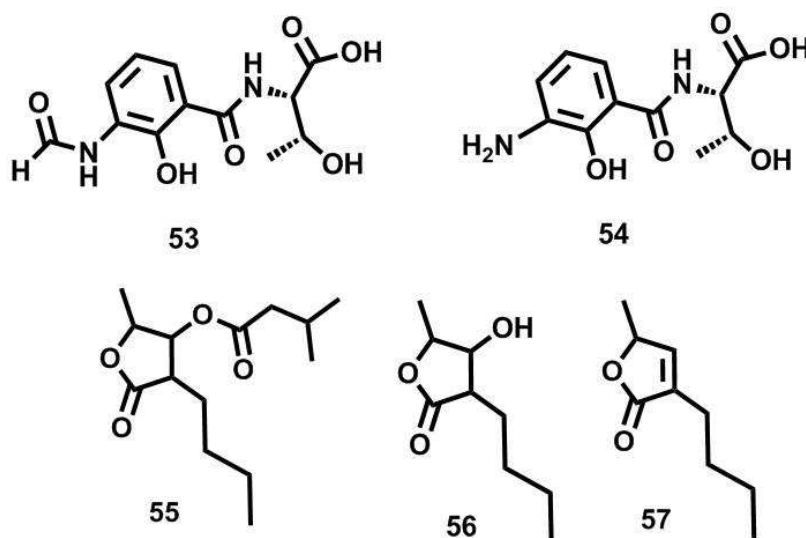


Abbildung 45: Abbauprodukte von Antimycin A_{3b} (**21**). [89, 165]

Im Jahr 1969 publizierte Hussain seine Untersuchungen zur Kinetik des Abbaus von Antimycin A₁ (**9**) in neutraler und alkalischer Lösung. Er konnte zeigen, dass sich bereits bei einem pH von 8 die Abbauprodukte **53**, **54** und das entsprechende 3-Acyloxylaktone (vgl. **55**) bilden. [166]

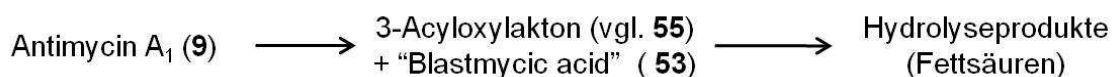


Abbildung 46: Schema des Zerfalls von Antimycin A₁ (**9**) nach A. Hussain. [166]

Nancy Gerber beschrieb 1973 die Entdeckung von fünf α,β -ungesättigten Laktone, die aus einer Flüssigkultur von *Streptomyces odorifer*³⁴ und

³⁴ *Streptomyces odorifer* 100-2

*Streptomyces griseus*³⁵ isoliert wurden (Abbildung 47). [167] Bis dahin wurden die Laktone der Antimycine nur im Kontext mit der Strukturaufklärung dieser Antibiotika und ihrem erzwungenen Zerfall diskutiert. Řezanka *et al.* beschrieben 2006 ebenfalls die Entdeckung von verschiedenen γ -Butyrolaktonen **64**, **94** – **107** in einer Kultur von *Streptomyces avermitilis*³⁶. [168] Allerdings wurde die Herkunft der Laktone in den Kulturen der Streptomyceten bisher noch nicht beschrieben.

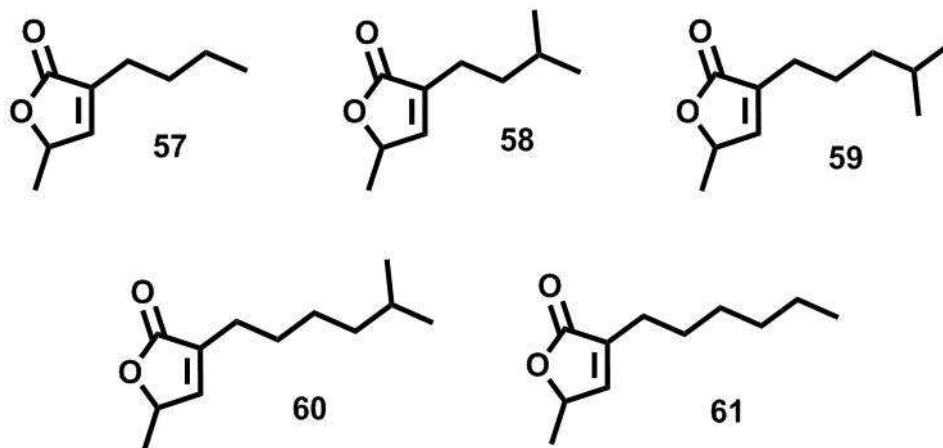


Abbildung 47: Laktone, die Gerber in den Kulturen von *S. odorifer* und *S. griseus* identifizierte. [167]

Das Antimycin A₃ (**11**) konnte ich bereits im LC-MS-Profil einiger Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen (Kapitel 3.1.1, S. 19), *S. griseus* und *S. odorifer* detektieren. Anhand eines Vergleichs der durch das Erhitzen von Antimycinen A₁ – A₄ (**9** – **12**) im Liner³⁷ des GC-MS entstandenen Verbindungen mit einem Ethylacetat-Extrakt einer *S. odorifer*-Kultur stellte ich fest, dass das Profil von *S. odorifer* zum größten Teil aus den Abbauprodukten der Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**) besteht (Abbildung 48; Kapitel 6.4.8, S. 142).

³⁵ *Streptomyces griseus* IMRU 3334

³⁶ *Streptomyces avermitilis* C-18, mutierter Stamm von ATCC 1267

³⁷ Injektortemperatur 270 °C

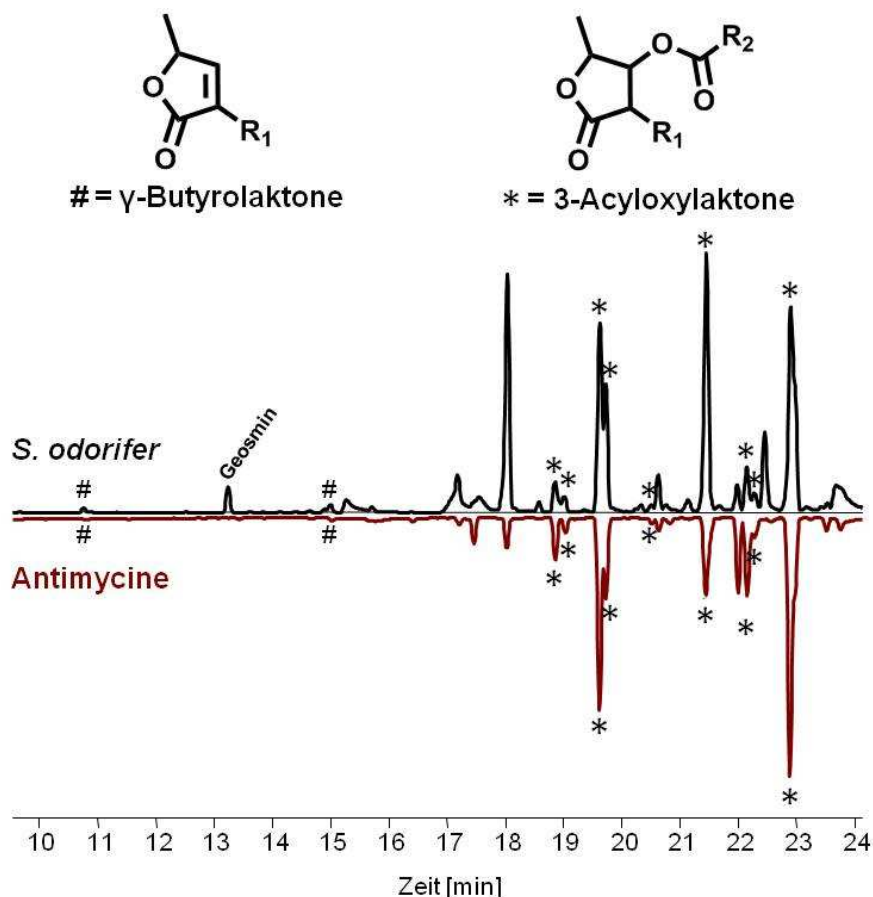


Abbildung 48: GC-MS-Vergleich von rot = Antimycinen A₁ – A₄ (9 - 12) in Ethylacetat, Zerfall durch Injektortemperatur 270 °C; schwarz = Ethylacetat-Extrakt einer zwei Tage alten *S. odorifer*-Flüssigkultur; identische MS-Spektren von Verbindungen aus *S. odorifer* und Antimycin-Abbau sind markiert mit # = γ -Butyrolaktone, * = 3-Acyloxylaktone; R₁ = Alkyl, R₂ = Alkyl; Methode A (Kapitel 6.1.1.1, S. 89).

Mit diesem Ergebnis konnte ich zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen Antimycinen und den von Gerber [167] und Řezanka *et al.* [168] beschriebenen γ -Butyrolaktonen (Abbildung 47, S. 63, Abbildung 102, S. 186) herstellen. Das γ -Butyrolakton **57** wurde im Duft von *S. odorifer* anhand eines von mir synthetisierten Standards (Kapitel 6.4.8.1, S. 143) eindeutig identifiziert (Abbildung 49). Indem ich die Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12) kurz auf 100 °C erhitze, anschließend mittels SPME³⁸ sammelte und per GC-MS analysierte, konnte ich die flüchtigen Abbauprodukte der Antimycine A₁ – A₂ (9 – 12) mit dem Duft von *S. odorifer* vergleichen. Einige der durch den Zerfall der Antimycine A₁ – A₂ (9 – 12) entstandenen Verbindungen konnten anhand ihrer MS-Spektren dem Duft von *S. odorifer* zugeordnet werden (Abbildung 49).

³⁸ SPME = solid phase microextraction (Festphasenmikroextraktion)

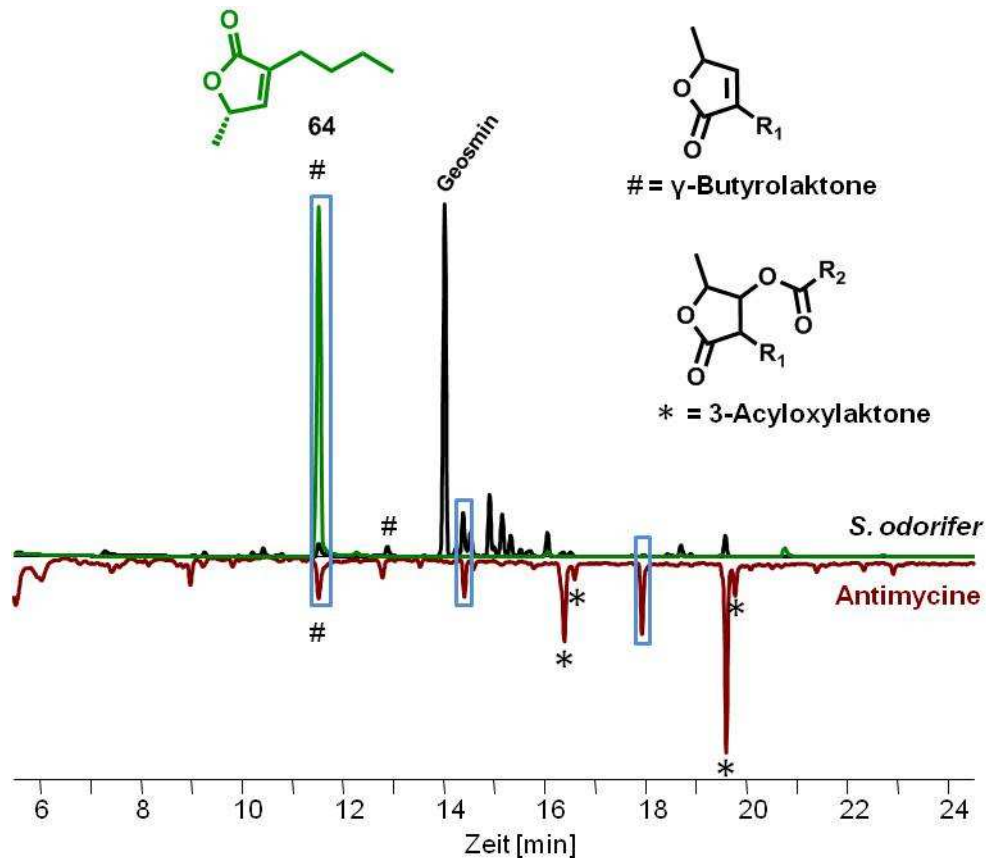


Abbildung 49: GC-MS Vergleich von rot = Antimycine A₁ – A₄ (9 – 12) in SFM nach 10 min Erhitzen auf 100 °C (SPME, Dauer der Duftsammlung: eine Stunde); schwarz = SPME (Dauer der Duftsammlung: sechs Stunden) einer 11 Tage alten *S. odorifer*-Kultur; grün = Laktone (64). identische MS-Spektren von Verbindungen aus *S. odorifer* und Antimycin-Abbau = blaue Umrandung; # = γ-Butyrolaktone, * = 3-Acyloxylaktone; R₁ = Alkyl, R₂ = Alkyl; Methode A (Kapitel 6.1.1.1, S. 89).

Sobald ich die Antimycine A₁ – A₂ (9 – 12) in Wasser (pH ≈ 8) löste, konnte das ungesättigte γ-Butyrolaktone 57 nach dem Sammeln der flüchtigen Verbindungen mit SPME und der anschließenden Analyse anhand von GC-MS nachgewiesen werden (Methode A, Kapitel 6.1.1.1, S. 89). Das Ergebnis zeigte, dass Antimycine bereits im schwach alkalischen Milieu nicht nur bis zu den Antimycin Laktone wie 55 abgebaut werden, [166] sondern weiter bis zu den α,β-ungesättigten Laktone analog zu Verbindung 57 reagieren (Abbildung 50).

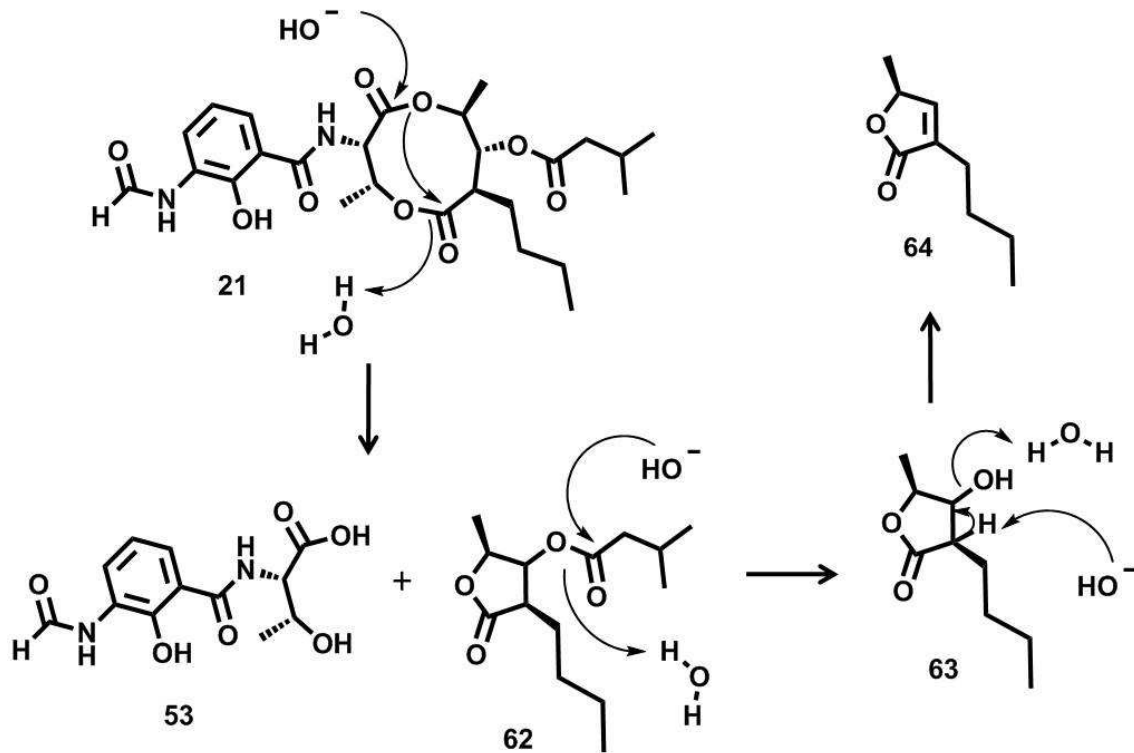


Abbildung 50: Postulierter Reaktionsmechanismus für den Abbau der Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12), hier Antimycin A_{3b} (21).

Da die Antimycine, wie gezeigt, erstaunlich labil sind, stellte ich mir die Frage, ob die flüchtigen Abbauprodukte dieser Verbindungen, wie das Lakton **57**, eine bestimmte Funktion haben. Tokutake *et al.* [169, 170] führten Versuche mit synthetischen Analoga der Antimycine durch (Abbildung 51). Sie fanden heraus, dass die *N*-Formyl-3-aminosalicylsäure-Einheit **27** des Moleküls hauptverantwortlich für die Inhibierung der Atmungskette durch die Antimycine ist (Kapitel 3.2.4, S. 67).

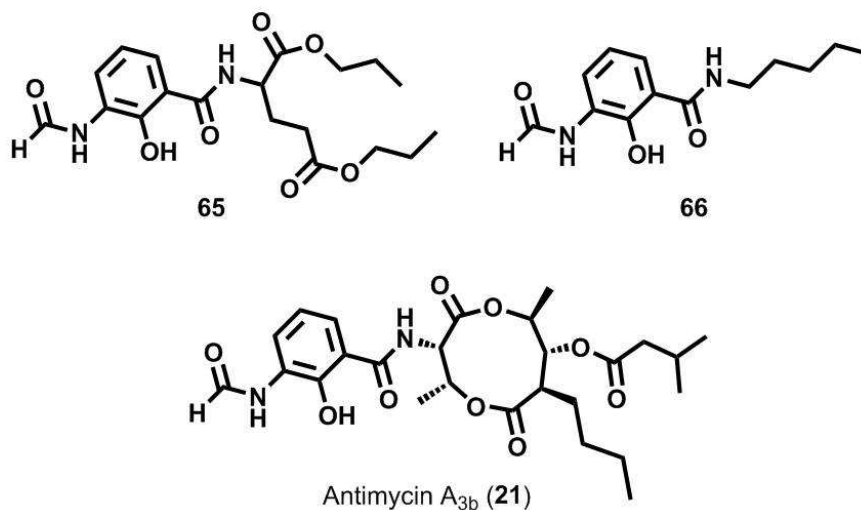


Abbildung 51: Synthetische Analoga der Antimycine mit identisch inhibierender Wirkung auf die Atmungskette wie Antimycin A₃ (11). [170]

Der Dilaktonring könnte daher dazu dienen, das Antibiotikum anhand seiner hydrophoben Eigenschaften durch die Zellmembranen zu bringen. In der Zelle würden die instabilen Antimycine zerfallen und der aromatische Teil des Moleküls zu der Q_i-Stelle der Atmungskette (Abbildung 53, S. 68) diffundieren und anschließend den Elektronenfluss hemmen.

Die Abspaltung von Teilstrukturen eines Moleküls für die Aktivierung bestimmter Verbindungen ist bereits aus anderen Systemen gut bekannt. Pflanzen nutzen Glucosinolate, die zum Zweck der Verteidigung in den Zucker und das Aglykon gespalten werden. Im Fall des Glucosinolat-Myrosinase-Systems wandelt sich das Aglykon spontan in toxische Isothiocyanate (Abbildung 52). [171-173] Das Strictosidin (**67**), ein Indol-Alkaloid das in vielen Pflanzen vorkommt, ist ein weiteres Beispiel für die Aktivierung von Verbindungen in der Verteidigung von Pflanzen (Abbildung 52). Durch die Abspaltung von Glukose wirkt das Aglykon abstoßend auf Herbivoren. [174, 175]

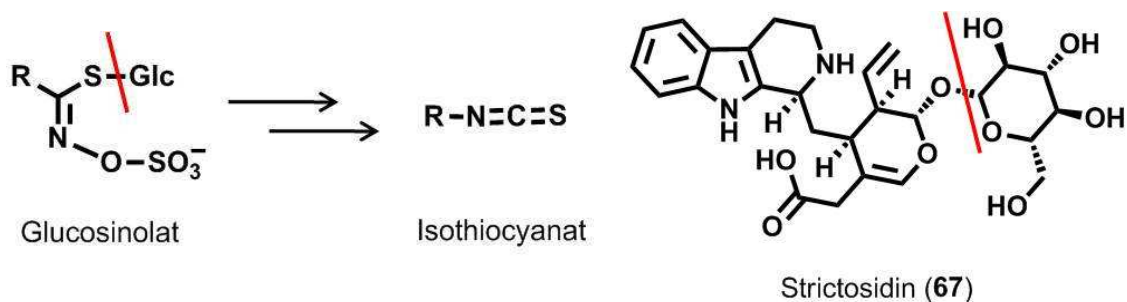


Abbildung 52: Die in vielen Pflanzen vorkommenden Glucosinolate [173] und Strictosidin (**67**), durch die Abspaltung von Glukose (roter Strich) [175] werden sie zu aktiven Verbindungen.

3.2.4 Untersuchungen zur Funktion von Antimycinen und (S)-3-Butyl-5-methylfuran-2(5H)-on (**64**)

Keitt versprach sich mit der Entdeckung der Antimycine den Apfelschorf in Apfelplantagen bekämpfen zu können. Doch es stellte sich heraus, dass die Anwendung im Gewächshaus zwar funktionierte, aber sobald die Antimycine in Freilandversuchen auf Pflanzenblätter aufgetragen wurden, nicht mehr den gewünschten Effekt erzielten, da sie unter anderem vom Regen herunter gewaschen wurden. [176, 177]

Zudem wurde die tödliche Wirkung der Antimycine auf Insekten und Milben beschrieben, wenn sie das Antibiotikum mit der Nahrung aufnahmen. [178]

Ahmad *et al.* zeigten, dass Antimycin A einen potenten Succinatdehydrogenase-Inhibitor darstellt. [149] Dieses Enzym ist Teil des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette, in der es den Komplex II bildet. Die Funktion der Dehydrogenase besteht darin, Succinat zu Fumarat zu oxidieren und die dabei gewonnenen Elektronen für die Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol zu verwenden. [179] Zwei Jahre später wurde die Inhibierung des Elektronentransports der Atmungskette an einer weiteren, sogenannten Antimycin-sensitiven Stelle entdeckt. [180] Erst 1967 bestimmten Rieske *et al.* diesen Bereich als ein Intermediat des Cytochrom b und c_1 . [181] Mittlerweile ist bekannt, dass Antimycine die Atmungskette an der Q_i Bindungsstelle des Cytochrom bc_1 blockieren, das Teil des Q-Zyklus in dem Komplex III ist. An der Q_i -Stelle bindet das Ubichinon und wird zu Ubichinol reduziert, wodurch letztendlich ein Protonengradient über die Zellmembran aufgebaut wird (Abbildung 53). [182]

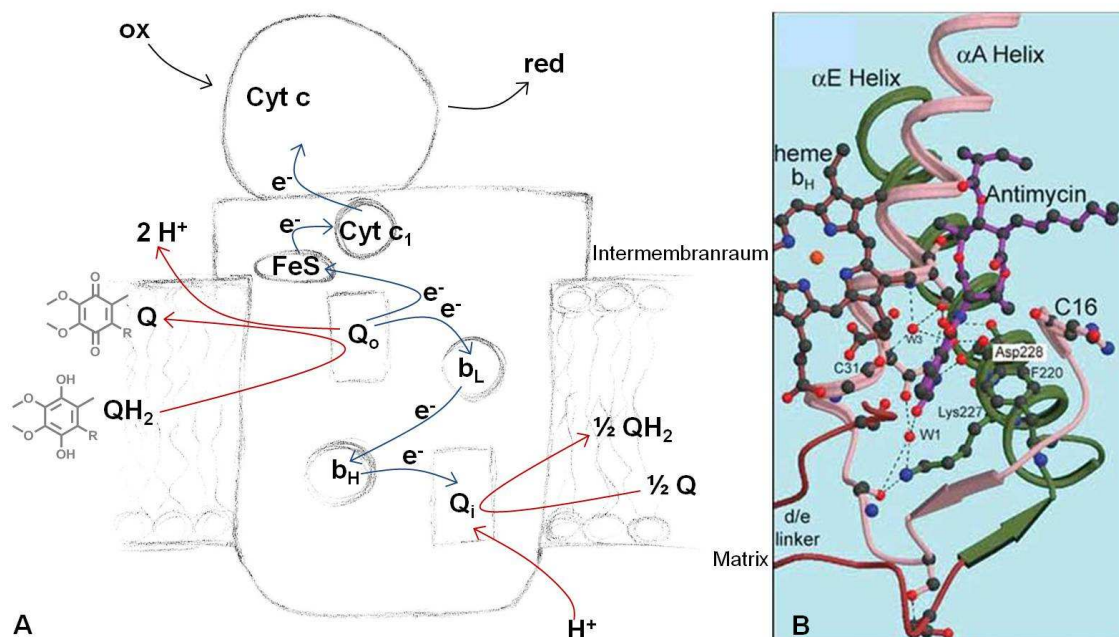


Abbildung 53: A = Skizze des Q-Zyklus im Komplex III der Atmungskette: Cyt c = Cytochrom c, ox = Cyt c oxidiert, red = Cyt c reduziert, Cyt c_1 = Cytochrom c_1 Untereinheit, FeS = FeS-Zentrum des Rieske Proteins, b_L = Häm b_L , b_H = Häm b_H , b_L + b_H entsprechen der Cytochrom b Untereinheit, Q_o = Q_o -Bindungsstelle, Q_i = Q_i -Bindungsstelle, Q = Ubichinon, QH_2 = Ubichinol, R = $C_{50}H_{81}$, e^- = Elektron, H^+ = Proton; B = Modell der Röntgenstrukturanalyse der Q_i -Stelle mit gebundenem Antimycin. [183]

Antimycine wirken auf unterschiedliche Organismen in verschiedener Art und Weise. Zum Beispiel regt das Antibiotikum die Carotenoid Biosynthese in *Mycobacterium marinum* an, die unter normalen Lebensbedingungen durch Licht induziert wird. [184] Antimycine wirken in Sonnenpflanzen (Heliophyten) wie *Chrysanthemum morifolium*, bei gleichzeitigem Auftreten von Hitze und

starker Sonneneinstrahlung, negativ auf die Effizienz der photochemischen Reaktionen und reduzieren damit das Wachstum der Pflanze. [185]

Außerdem beeinflusst Antimycin A in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* reversibel die Morphologie von Plastiden. [186]

Wie 2001 entdeckt wurde, binden Antimycine auch an hydrophobe Bereiche der Bcl-2 Proteine. Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) verwandte Proteine sind in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert und regulieren den programmierten Zelltod und somit das Überleben von Zellen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Krebstherapie. Bei einer Überproduktion dieser zellschützenden Proteine sind die meisten Krebsmedikamente wirkungslos. So inhibieren Antimycine die schützende Aktivität der Bcl-2 Proteine der Krebszellen und lassen damit den Zelltod dieser bösartigen Zellen zu. [187]

Antimycine besitzen nicht nur eine antibiotische Wirkung sondern zeigen auch die Eigenschaft Eisenionen zu komplexieren. 1965 veröffentlichten Farley *et al.* Studien zu dem Komplezierungsverhalten von Antimycin A₃ (**11**) mit Fe³⁺-Ionen. Dabei zeigten sich zwei Koordinationsmöglichkeiten für die Ionen. Bei einem pH von 2,6 bildet sich ein 2:1 Antimycin-Fe³⁺-Komplex. Bei einem niedrigeren pH verschiebt sich die Koordination in Richtung 1:1. Die berechnete Komplexbildungskonstante beträgt für das 1:1 Verhältnis, $\log K_1 = 10^{7,8}$, und $\log K_2 = 10^{15}$ für das 2:1 Verhältnis. [188] Im Jahr 2003 zeigte Pick, dass die halotolerante Alge *Dunaliella salina* diese Eigenschaft der Antimycine in Laborversuchen zu ihrem Vorteil nutzen kann. So produzierte die Alge unter eisenlimitierten Bedingungen in der Gegenwart von Antimycinen mehr Chlorophyll und wuchs wesentlich besser als bei der Zugabe anderer Siderophore. Da das Antibiotikum einen lipophilen Komplex mit Fe³⁺-Ionen bildet, kann davon ausgegangen werden, dass die Alge diesen Komplex durch passive Diffusion über die Zellmembran aufnehmen kann. [189]

3.2.4.1 Siderophore Eigenschaften

In Agardiffusionsassays stellte ich eine stark inhibierende Wirkung von Antimycinen A₁ – A₄ (**9** - **12**) auf das Wachstum des Fichtenporlings *Fomitopsis pinicola* fest. Siderophore können ihre Produzenten vor Konkurrenten schützen, indem sie ihr Wachstum verhindern. Dies gelingt, da die Eisenversorgung der

Konkurrenten durch die Fe^{3+} -Komplexierung stark eingeschränkt wird. [190, 191] Es wurde bereits beschrieben, dass einige Pilze eine veränderte Atmungskette aufweisen und somit resistent gegen Antimycine als Inhibitor des Elektronentransports sind. [192, 193] Um zu untersuchen, ob die Antimycine $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) das Wachstum von *F. pinicola* durch ihre siderophoren Eigenschaften inhibieren, applizierte ich die Antimycine zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von FeCl_3 in einem Agardiffusionsassay mit *F. pinicola*. (Abbildung 54). Durch Zugabe von FeCl_3 veränderte sich die inhibierende Wirkung auf *F. pinicola* nicht (Kapitel 6.4.9.1, S. 148).

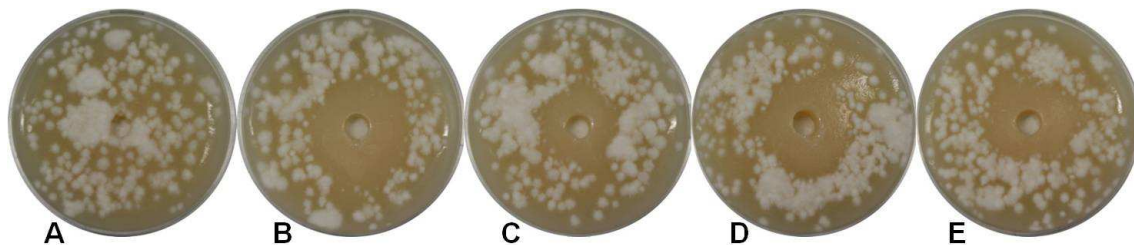


Abbildung 54: Sechs Tage alter Agardiffusionsassay mit *F. pinicola* A = Kontrolle (Ethanol), B – D = FeCl_3 :Antimycinen $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) molares Verhältnis, B = 0,35:1, C = 0,5:1, D = 1:1, E = $A_1 - A_4$ (**9 - 12**).

Die siderophoren Eigenschaften der Antimycine könnten *S. odorifer* und den Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen nicht nur zur Verteidigung dienen. Siderophore ermöglichen ihren Produzenten, Fe^{3+} -Ionen aus der Umgebung aufzunehmen. Eine solche Verbindung muss bestimmte chemische Eigenschaften aufweisen, um Fe^{3+} -Ionen komplexieren zu können. Daneben kann man Siderophore oft auch daran erkennen, dass sie von Mikroorganismen unter eisenlimitierten Bedingungen in wesentlich höheren Konzentrationen oder überhaupt gebildet werden. [194-196]

Um zu untersuchen, ob die Antimycine in höheren Konzentrationen produziert werden sobald wenig Fe^{3+} -Ionen zur Verfügung stehen, kultivierte ich *S. odorifer* unter eisenlimitierten Bedingungen. Zu einer Flüssigkultur von *S. odorifer* wurde der Eisenchelator 2,2'-Dipyridyl (**70**) (Abbildung 55) gegeben. In anschließenden LC-MS-Messungen von Extrakten der Kultur wurde allerdings keine Veränderung der Antimycin $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) Produktion festgestellt (Abbildung 56, gelbe Markierung). Stattdessen wurden zwei neue Peaks detektiert. Hochaufgelöste Massenspektren der Verbindungen zeigten, dass Desferrioxamin B (**68**) und Desferrioxamin E (**69**) von *S. odorifer*

produziert wurden. Die Biosynthese von Desferrioxaminen als Siderophore ist unter Streptomyceten weit verbreitet (Kapitel 6.4.9.1, S. 148). [197]

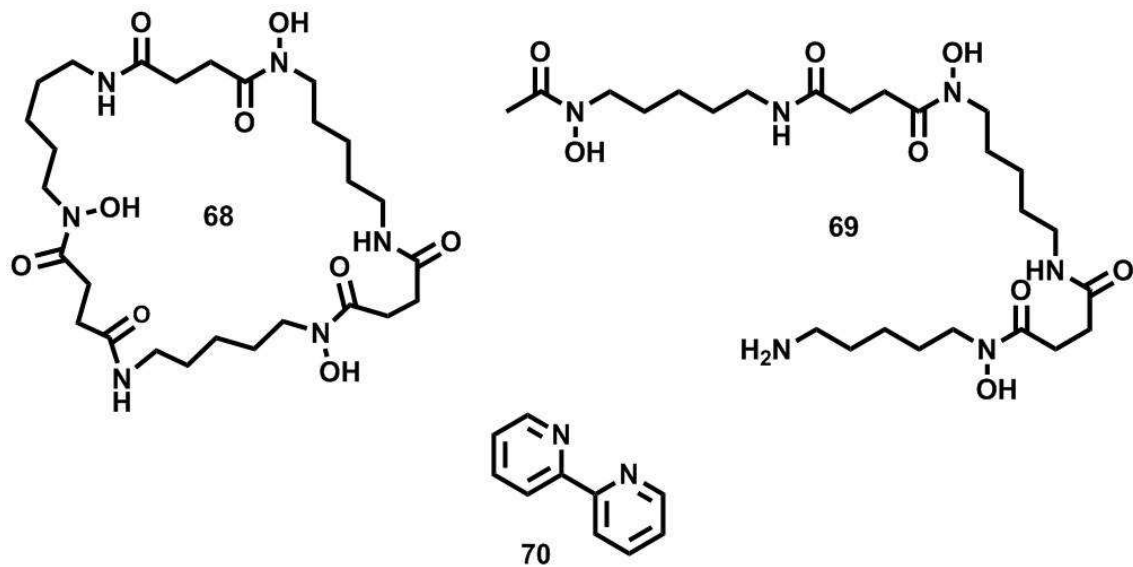


Abbildung 55: Von vielen Streptomyceten produzierte Siderophore: Desferrioxamin B (**68**), Desferrioxamin E (**69**) und ein synthetischer Eisenchelator 2,2'-Dipyridyl (**70**).

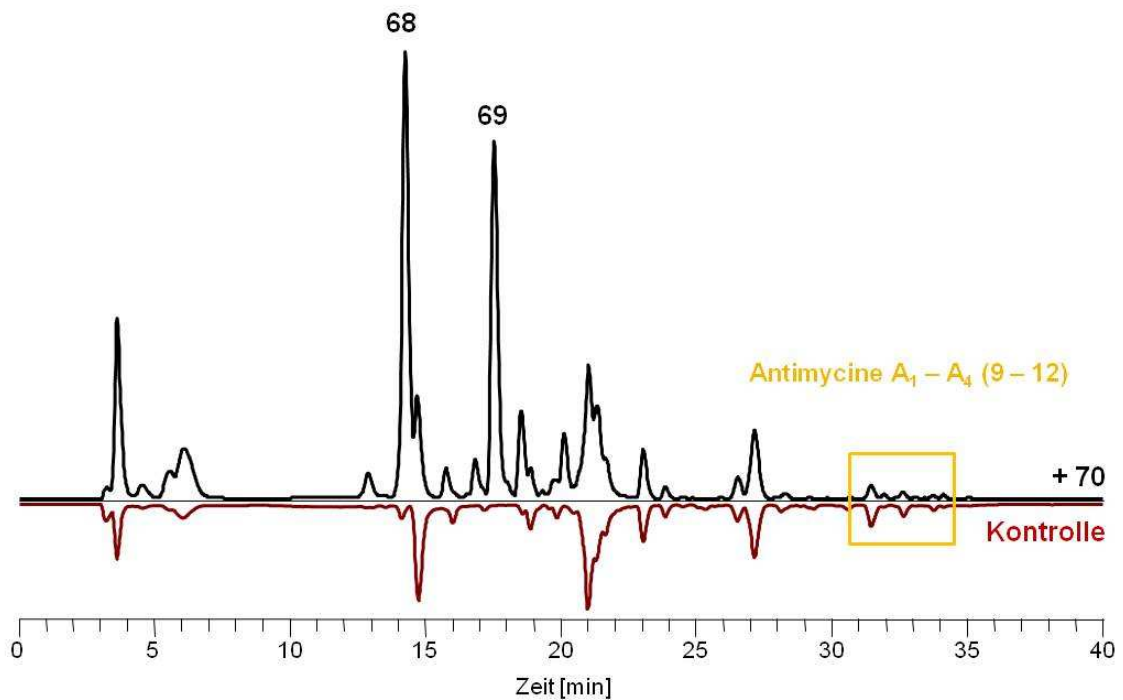


Abbildung 56: Gegenüberstellung der LC-MS-Messungen von rot = MeOH-Extrakt einer *S. odorifer*-Kultur als Kontrolle, schwarz = MeOH Extrakt einer *S. odorifer*-Kultur mit 2,2'-Dipyridyl (**70**); Desferrioxamin B (**68**), Desferrioxamin E (**69**); Methode A Säule 2 (Kapitel 6.1.2, S. 90).

Die Antimycine werden von *S. odorifer* demnach weder als Siderophore für die Fe³⁺-Ionen-Aufnahme noch für die Verteidigung durch Fe³⁺-Komplexierung gegenüber *F. pinicola* genutzt.

Antibiotika werden hauptsächlich im Zusammenhang der Verteidigung diskutiert. Allerdings mehren sich die Hinweise darauf, dass Antibiotika von Mikroorganismen in subinhibitorischen Konzentrationen auch andere Aufgaben, wie beispielsweise eine Signalfunktion erfüllen können. [198-202] So induziert das Antibiotikum Imipenem (**71**) in *Pseudomonas aeruginosa* die Produktion von Polysaccharid Alginaten. [203] Die Nutzung von Phenazinen für den extrazellulären-Elektrontransport in Biofilmen von *P. aeruginosa* konnte ebenfalls gezeigt werden. [204] Enterobactin (**72**) ist verantwortlich für die pathogene Eigenschaft seiner Produzenten. Die Verbindung ist ein Siderophor und komplexiert die lebenswichtigen Eisenionen, die dadurch für andere Organismen nicht mehr verfügbar sind. [190]

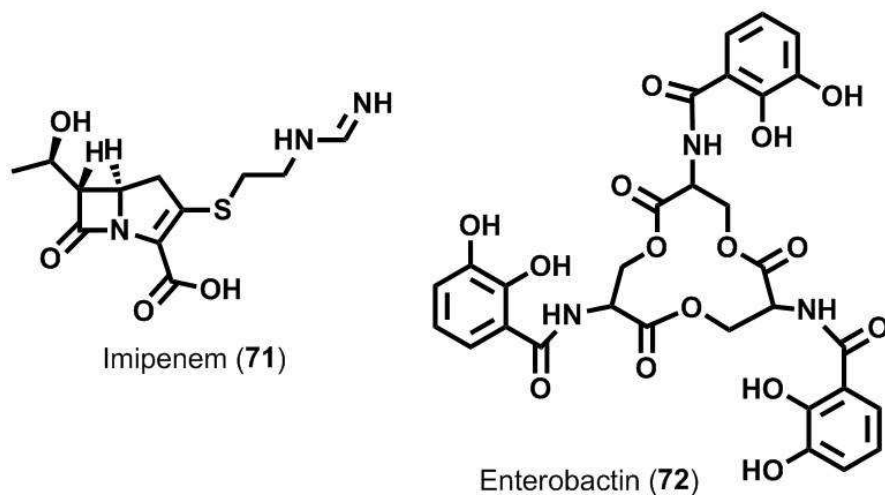


Abbildung 57: Imipenem (**71**) [203] und Enterobactin (**72**), [190] Sekundämetabolite die antibiotisch wirken, für ihren Produzenten aber auch eine andere Funktion erfüllen.

3.2.4.2 Quorum sensing und Quorum quenching als mögliche Funktionen des Laktone **64** und der Antimycine

Die Kommunikation der Mikroorganismen mit Hilfe von kleinen Molekülen („Autoinducer“) ist als Quorum sensing, die Blockierung dieses Mechanismus als Quorum quenching bekannt. [205, 206] Das γ -Butyrolakton **64** weist eine ähnliche Grundstruktur zum „Autoinducer“ A-Faktor (**73**) von *Streptomyces griseus* [207, 208] und den bromierten Quorum quenching Verbindungen, wie dem Fimbrilid **74** von *Delisea fimbriata*, [205, 206, 209-211] auf (Abbildung 58). Daher untersuchte ich das Quorum sensing und Quorum quenching Potential von Verbindung **64** anhand verschiedener Bioassays mit Reporterstämmen, die auf Signalmoleküle wie die AHL's (*N*-Acyl-

homoserinlaktone) **85** mit der Produktion von Farben oder dem Emittieren von Licht reagieren (Kapitel 6.4.9.2, S. 149).[212, 213]

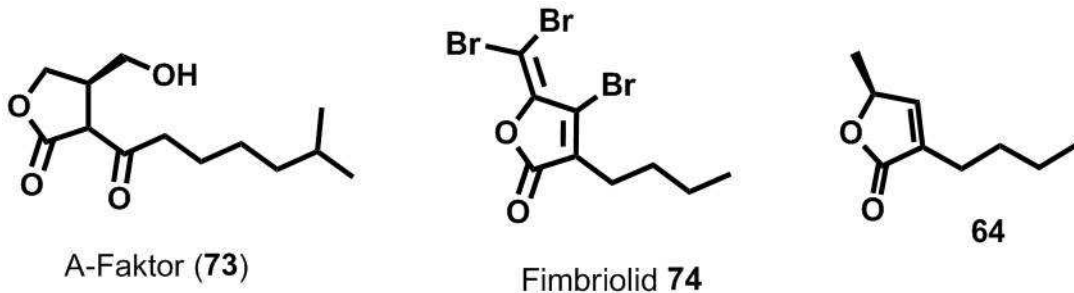


Abbildung 58: „Autoinducer“ A-Faktor (**73**) von *Streptomyces griseus* und ein Fimbriolid **74** von *Delisea fimbriata*, mit ähnlicher Grundstruktur wie das Lakton **64**.

Quorum sensing-Moleküle regulieren unter anderem die Zelldifferenzierung in ihren Produzenten und fördern damit ihr Wachstum. Daher wurden die Eigenschaften der Antimycine A₁ – A₄ (**9** - **12**), des Abbauprodukts **64** und der gesamten flüchtigen Verbindungen von *S. odorifer* hinsichtlich dieser Fähigkeit getestet. Ich kultivierte *S. odorifer* in Flüssigkulturen mit Antimycinen A₁ - A₄ (**9** - **12**) sowie mit dem Lakton **64**. Durch das Zählen der CFU³⁹ wurde das Wachstum der entsprechenden Kulturen ausgewertet. Die Antimycine A₁ - A₄ (**9** - **12**), das γ -Butyrolakton **64** und der Duft einer älteren Kultur von *S. odorifer* wurden zudem mit *S. odorifer* auf einer Agarplatte kultiviert. Mögliche morphologische Veränderungen von *S. odorifer* wurden beobachtet, um das Wachstum auf der Agarplatte zu studieren (Kapitel 6.4.9.2, S. 149).

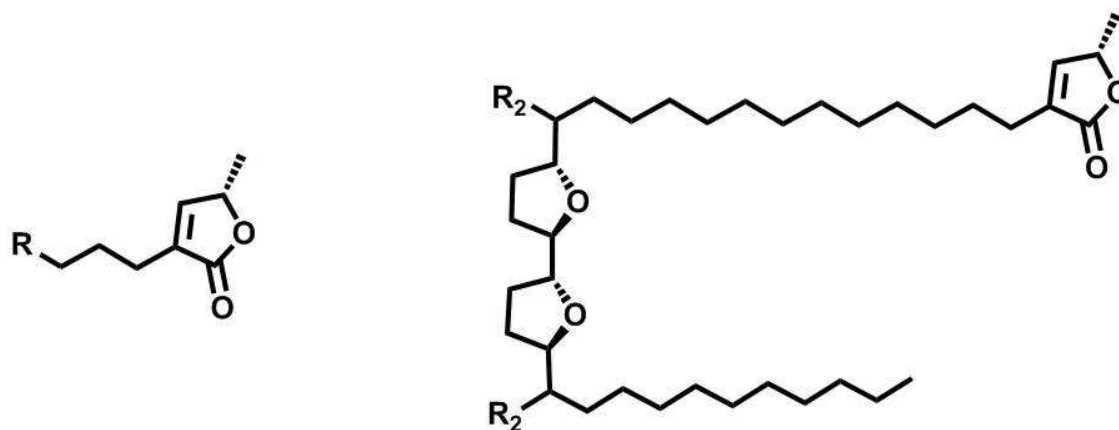
In keinem der durchgeführten Assays konnte eine Quorum sensing oder Quorum quenching Aktivität des γ -Butyrolaktons **64** oder der Antimycine A₁ – A₄ (**9** - **12**) festgestellt werden. Da die verwendeten Reporterstämme hauptsächlich auf AHL's (vgl. **85**) als „Autoinducer“ reagieren, besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung des Laktons **64** mit diesen Stämmen nicht gezeigt werden konnte. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass das γ -Butyrolakton **64** in den Antimycin-produzierenden Streptomyceten nicht doch eine Signalfunktion erfüllt. Allerdings kann es auch sein, dass die Verbindungen durch *S. odorifer* selbst schon in hohen Mengen in das Medium abgegeben wurden. Die Wirkgrenze könnte damit bereits erreicht gewesen sein, wodurch die externe Zugabe der Verbindungen keinen Effekt mehr hervorrufen würde.

³⁹ CFU = colony forming units

Ein Weg, um die Bedeutung von Antimycinen bzw. ihren Abbauprodukten wie Lakton **64** besser untersuchen zu können, wäre die Konstruktion einer Antimycin-Knockout-Mutante. Die Verfütterung des γ -Butyrolaktons **64** und der Antimycine A₁ – A₄ (**9** - **12**) zu einer Kultur von *S. odorifer* sowie von einer *S. odorifer*-Mutante würde durch die mögliche Veränderung des Metabolitenprofils im Vergleich Aufschluss über Quorum sensing oder Quorum quenching-Eigenschaften geben.

3.2.4.3 Untersuchungen zur Wirkung des γ -Butyrolaktons **64** auf Pflanzen und Insekten

1998 und 2004 wurden zwei Publikationen veröffentlicht [214, 215] in denen die Identifizierung des γ -Butyrolaktons **64** in den Extrakten von Früchten der tropischen Pflanze *Trichilia clausenii* und der Rinde von *Trichilia catigua* beschrieben wurde. Es ist bekannt, dass die Schuppenapfelgewächse (Annonaceae) langkettige Verbindungen produzieren, die Acetogenine, von denen einige an einem Enden die Struktureinheit des Laktons **64** aufweisen (Abbildung 59). [216, 217] Muskatnussgewächse (Myristicaceae) produzieren Grandinolide und Juruenolide, die ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten zu den γ -Butyrolaktonen wie **64** aufweisen. [218]



Annonaceae-Acetogenine

Abbildung 59: Beispiele der Acetogenine der Annonaceae, [216] mit struktureller Ähnlichkeit zu den γ -Butyrolaktonen wie **64**; R = Alkyl, R₂ = OAc oder H.

Die Pflanze *Trichilia clausenii* ist hauptsächlich in den Tropen verbreitet. Um eine Beeinflussung von Insekten durch das Lakton **64** im Lebensraum von *Trichilia* zu untersuchen, wurden Feldversuche im Regenwald von Peru durchgeführt. Dafür wurden Filterpapiere an unterschiedlichen Orten

angebracht, auf denen die flüchtige Verbindung **64** appliziert wurde (Kapitel 6.4.9.3, S. 153).

Das Lakton **64** resultiert aus dem Zerfall von Antimycinen. Diese Antibiotika konnte ich in Kulturen von Streptomycceten-Symbionten der Blattschneiderameisen identifizieren (Kapitel 3.1.1, S. 19). Um zu testen, ob die Ameisen durch die flüchtige Verbindung **64** in ihrem Verhalten beeinflusst werden, wurde ein Versuch mit einem Olfaktometer im Labor von Dr. R. Wirth (TU Kaiserslautern) durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, ob die Insekten durch das Lakton **64** angelockt werden und in den Arm des Olfaktometers laufen, in welchem die Verbindung appliziert wurde. Denkbar wäre auch, dass sie durch den Duft abgestoßen werden und so in den anderen Arm laufen, in dem sich eine Kontrolle befand (Kapitel 6.4.9.3, S. 153).

Da mir die Pflanze *Trichilia* nicht zur Verfügung stand, nutzte ich zunächst *Arabidopsis thaliana* für Versuche, in denen ich die Möglichkeit einer morphologischen Beeinflussung durch das Lakton **64** untersuchte. In einem Agardiffusionsassay mit *Arabidopsis*-Samen beobachtete ich das Wachstum der Pflanze (Kapitel 6.4.9.3, S. 153).

Keines der durchgeführten Experimente zeigte eine Beeinflussung der verwendeten Insekten und Pflanzen durch das Lakton **64**. Es sind daher weitere Versuche nötig, um eine mögliche Wirkung der flüchtigen Verbindung **64** auf Insekten und Pflanzen zu untersuchen. So könnten weitere Feldversuche, die in der näheren Umgebung der Pflanze *Trichilia* durchgeführt werden eine direkte Wirkung auf die Insekten ihres Ökosystems zeigen. Eine weitere Möglichkeit wäre das Sammeln von Insekten aus der Umgebung von *Trichilia*, um mit diesen anschließend Verhaltensversuche in Gegenwart des Laktons **64** durchführen zu können. Denkbar wäre ebenso, dass keine sichtbare Beeinflussung der Insekten und Pflanzen auftritt, sondern das Lakton **64** in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten eingreift. Durch einen Vergleich entsprechender Extrakte könnte eine mögliche Beeinflussung untersucht werden.

3.3 Untersuchungen zu Antibiotika in Tröpfchen auf dem Luftmycel von Streptomyceten

Werden Streptomyceten auf Agarplatten mit einem nährstoffreichen Medium kultiviert, kann bei einigen Spezies nach etwa fünf Tagen die Ansammlung von Tröpfchen auf dem Luftmycel beobachtet werden (Abbildung 60). Bis heute wurden kaum Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung, zur Ursache oder zur Funktion dieser Flüssigkeitsansammlungen publiziert. A. Behrend [219] fand heraus, dass die Tröpfchen von *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseus* und *Streptomyces cattleya* zu einem großen Anteil Saccharose enthalten. Nach einer Kultivierungsdauer von sechs Tagen betrug die Konzentration der Saccharose in den Tröpfchen von *S. avermitilis* im Mittel 0,6 µg/µl, nach 12 Tagen bereits 2,0 µg/µl. Bei einer Kokultivierung mit *Pseudomonas fluorescens* dagegen sank die Konzentration des Zuckers mit der Zeit. Zudem konnte A. Behrend zeigen, dass der Zucker nicht aus dem Medium aufgenommen und dann in die Tröpfchen abgegeben, sondern von *S. avermitilis* selbst produziert wurde.

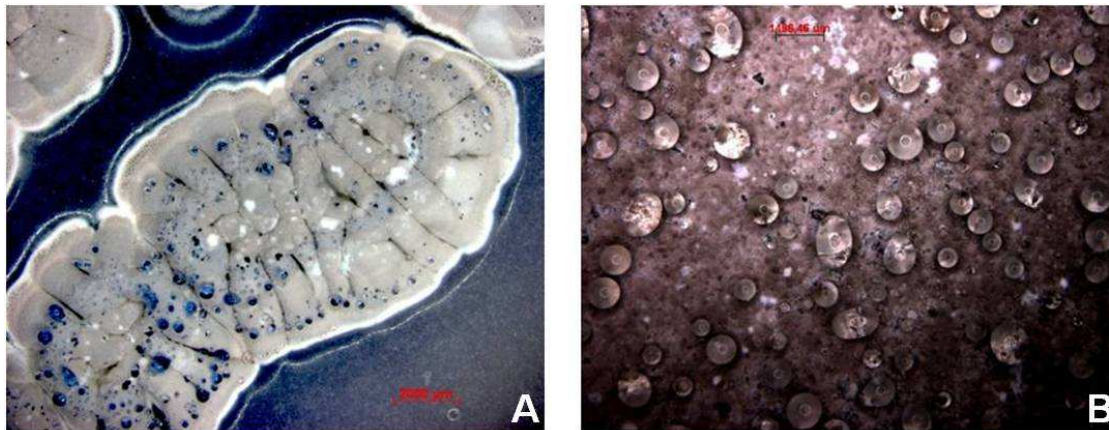


Abbildung 60: Mikroskopische Aufnahmen der Tröpfchen die sich auf Streptomyceten-Kulturen gebildet haben: A = *S. coelicolor*, B = *S. avermitilis*.

Die Tröpfchen von drei Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen (*Streptomyces* Ao 10, *Streptomyces* Av 25_2 und *Streptomyces* Av 25_6), in deren Kulturen ich bereits Antimycine, Actinomycine und Valinomycine (Kapitel 3.1.1, S. 19) identifizieren konnte, untersuchte ich, um festzustellen, ob die Antimycine, Actinomycine, Valinomycine oder Candididine [70] in den Tröpfchen akkumuliert werden. Dafür analysierte ich die Tröpfchen per LC-MS (Kapitel 6.4.10, S. 155).

In den Tröpfchen von *Streptomyces* Av 25_2 konnte ich zum ersten Mal die Antibiotika Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) in einer Gesamtkonzentration von 200 ng/μl nachweisen. Auch Valinomycin (**13**) fand ich in den Tröpfchen von *Streptomyces* Av 25_6 mit einer Konzentration von 70 ng/μl. Zusätzlich wurde die Aktivität der Tröpfchen von *Streptomyces* Av 25_2 gegen *Bacillus subtilis* analog zu den Bioassays in Kapitel 3.1.2 (S. 26) getestet. Bereits 10 μl der Tröpfchen zeigten eine deutliche wachstumsinhibierende Wirkung (Abbildung 61). *Streptomyces* Ao 10 hingegen enthielt in den Tröpfchen weder Candicidin D (**6**), noch Antimycine A₁ – A₄ (**9 - 12**).



Abbildung 61: Bioassay mit 10 μl der Tröpfchen von *Streptomyces* Av 25_2 gegen *B. subtilis*.

Die Ergebnisse zeigen, dass Antibiotika in Tröpfchen von Streptomyceten akkumuliert werden können. Zudem reicht die Konzentration an Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) in den Tröpfchen aus, um andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum zu hemmen.

Ähnliche Tröpfchenbildungen lassen sich auch bei Pilzen beobachten. Ein Beispiel sind sogenannte Exsudate oder Guttationstropfen von Sklerotien, einer Dauerform, die von manchen Pilzarten gebildet wird, um ungünstige Umweltbedingungen zu überstehen. [220] Es wurden einige Proteine identifiziert, die unter anderem als Virulenzfaktoren bekannt sind oder in der Entwicklung der Sklerotien eine wichtige Rolle spielen. [221] Die Akkumulation von Mykotoxinen wurde ebenfalls berichtet. [222, 223] Es wird diskutiert, dass die Flüssigkeitsansammlungen als Speicher für Metabolite dienen könnten, die zum Zeitpunkt, zu dem sie produziert werden, nicht benötigt werden. [224] Jennings vermutet, dass die Tröpfchen als Wasserreservoir dienen. [225]

Die Identifikation von Antibiotika in den Tröpfchen von Streptomyceten sowie eine Veränderung der Konzentration an Saccharose in den Tröpfchen bei der Kokultivierung mit anderen Mikroorganismen [219] könnte ein Zeichen dafür sein, dass die Tröpfchen eine Rolle bei der Verteidigung ihrer Produzenten

spielen können. Die akkumulierten Antibiotika könnten als Barriere für die Invasion durch Pathogene dienen, die sich durch die Luft verbreiten.

Eine detaillierte Analyse der Inhaltsstoffe von Tröpfchen unterschiedlicher Streptomyceten-Kulturen per LC-MS sowie Untersuchungen zu vorhandenen Proteinen ist notwendig, um die Bedeutung dieser Flüssigkeitsansammlungen klären zu können. Anhand des Metabolitenprofils der Tröpfchen könnten Schlüsse über eine mögliche Funktion für die Streptomyceten gezogen werden. Zudem könnte die Wirkung der Tröpfchen auf andere Organismen, wie pathogene Mikroorganismen oder Insekten weitere Informationen liefern.

4 Zusammenfassung

Mit der Entdeckung von Actinomyceten auf dem Exoskelett der Blattschneiderameisen durch Currie *et al.* [43] stellte sich die Frage, ob die Antibiotika der mikrobiellen Symbionten dazu beitragen, das Ökosystem der Blattschneiderameisen vor Pathogenen zu schützen. Mittlerweile konnten Candicidine, [70] Dentigerumycin [77] und Nystatin P1 [69] in Kulturen von isolierten Actinomyceten-Symbionten identifiziert werden.

Bisher konnten nur selten Antibiotika in ihrer natürlichen Umgebung nachgewiesen werden. So wurden bisher auch noch keine der genannten Antibiotika direkt im Ökosystem der Blattschneiderameisen detektiert. Um die ökologische Funktion von antimikrobiell wirkenden Verbindungen beurteilen zu können, ist es allerdings wichtig, sie in ihrer natürlichen Umgebung nachzuweisen.

Um das Zusammenspiel und die Rolle der unterschiedlichen Mikroorganismen [43, 51, 59-61, 226] und Antibiotika [69, 70, 77] im Ökosystem der Blattschneiderameisen zu verstehen, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden:

Identifikation und Wirkspektrum von Antibiotika der Streptomyceten-Symbionten von *Acromyrmex*-Blattschneiderameisen

Mit phylogenetischen Analysen (16S rDNA-Vergleich) ermittelte ich eng verwandte Streptomyceten der Streptomyceten-Symbionten von *Acromyrmex*-Blattschneiderameisen. Das bereits bekannte Antibiotikaspektrum der verwandten Mikroorganismen konnte für die gezielte Suche per LC-MS in den Kulturen der Symbionten genutzt werden. Auf diese Weise konnte ich Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Valinomycin (**13**) und Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**) identifizieren (Abbildung 62).

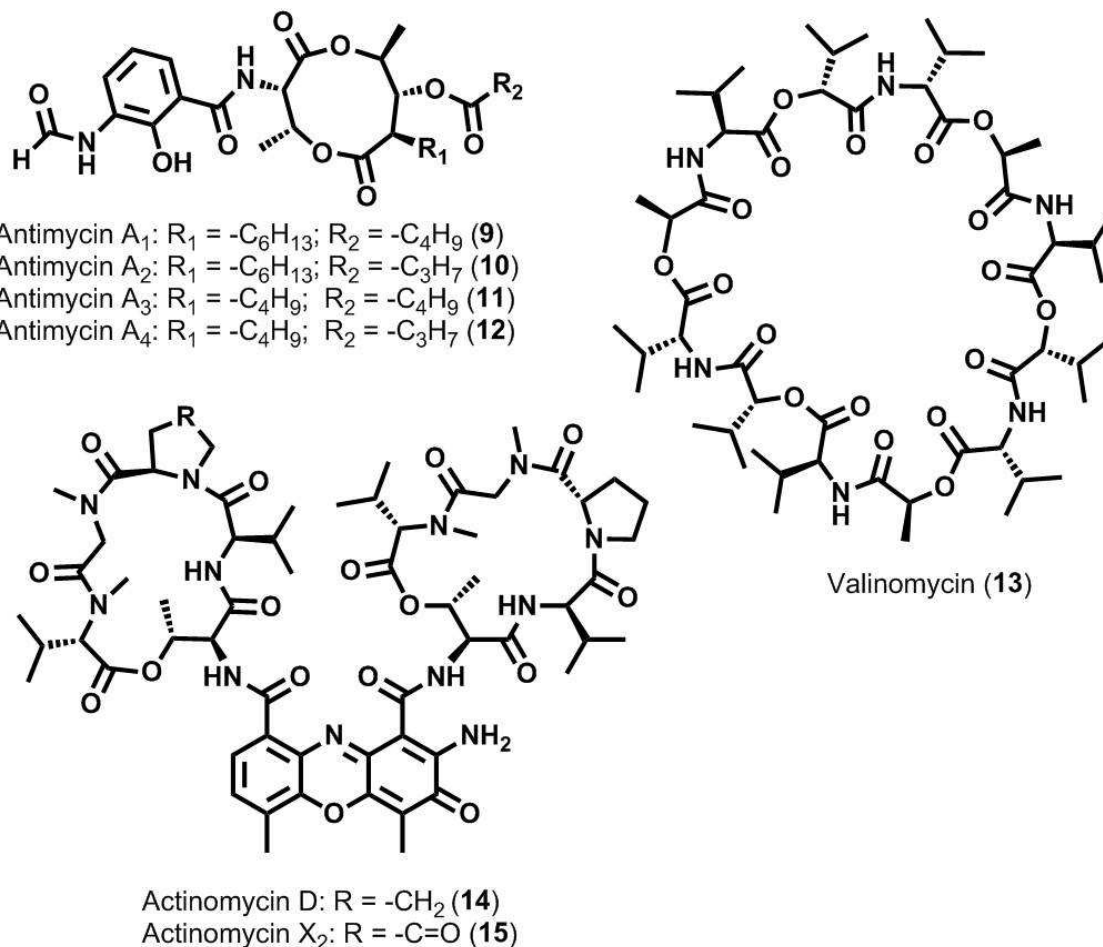


Abbildung 62: Strukturen von Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15), Valinomycin (13) und Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12).

Das Wirkspektrum dieser Antibiotika wurde gegen acht unterschiedliche Pilze, zwei Hefen und sieben Bakterien untersucht. 2 nmol Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15) hemmten das Wachstum von *Bacillus subtilis* sowie von drei isolierten Symbionten *Streptomyces* Av 25_4 (4 nmol), *Pseudonocardia* Av 30 (12 nmol) und *Pseudonocardia* Ao_1 (12 nmol) stark. Die Antibiotika inhibierten in hohen Konzentrationen auch das Wachstum des Gartenpilzes der Blattschneidermeisen, *Leucoagaricus gongylophorus* (24 nmol), sowie des pathogenen Pilzes *Fusarium decemcellulare* (239 nmol) und der Hefe *Phialophora fastigiata* (239 nmol).

Die Antimycine A₁ – A₄ (9 – 12) (6 nmol) wirkten sehr stark inhibierend auf das Wachstum des Gartenpilzes der Ameisen. *Saccharomyces cerevisiae* (29 nmol), *Escovopsis weberi* (58 nmol), *Cordyceps militaris* (58 nmol) und *Trichoderma harzianum* (58 nmol) sowie *P. fastigiata* (115 nmol) wurden durch hohe Mengen des Antibiotikums am Wachstum gehindert.

Valinomycin (**13**) zeigte eine inhibierende Wirkung auf *S. cerevisiae* (13 nmol) und in einer hohen Dosis (266 nmol) auch auf *B. subtilis*. Allerdings ist bekannt, dass Valinomycin (**13**) sehr aktiv gegen Schädlinge, wie beispielsweise Milben, wirkt. [101-105]

Bei der Kombination von Actinomycin D (**14**), Actinomycin X₂ (**15**), Valinomycin (**13**), Antimycinen A₁ – A₄ (**9** – **12**) und Candicidin D in beinahe sub-inhibitorischen Konzentrationen stellte ich noch eine deutlich hemmende Wirkung auf *E. weberi* fest.

Direkter Nachweis von Antibiotika im Nest und auf dem Körper der *Acromyrmex*-Blattschneiderameisen

Erstmalig konnte ich Antibiotika, Valinomycin (**13**) und Actinomycin X₂ (**15**), im Abfall von *Acromyrmex echinator* und *Acromyrmex niger* nachweisen. In Extrakten des Gartenpilzes der Ameisen fand ich keine der bekannten Antibiotika. Erstmalig wurde ein von Blattschneiderameisen-Symbionten produziertes Antibiotikum, Valinomycin (**13**), anhand von MALDI-Imaging auf dem Exoskelett der Insekten detektiert und lokalisiert.

Eine aktive Verbindung im Abfall von *Acromyrmex echinator*-Blattschneiderameisen

Der Ethylacetat-Extrakt des Abfalls von *A. echinator* zeigte reproduzierbar stark wachstumshemmende Aktivität gegen den entomopathogenen Pilz *C. miliaris*. Dagegen wies der Abfall anderer Blattschneiderameisen, wie beispielsweise von *Atta colombica*, keine Aktivität auf. Durch eine Bioassay-geleitete Fraktionierung konnte nach einer Sephadex LH-20 und Diaion HP-2MG Chromatographie eine aktive Fraktion erhalten werden. Für eine Charakterisierung reichte die verfügbare Menge an Abfall leider noch nicht aus.

Fluoreszenzmarkierte Actinomyceten zum Studium ihrer Aufnahme durch die Blattschneiderameisen

Ein Plasmid mit dem konstitutiv exprimierenden Promoter *ermE**p sowie dem für das fluoreszierende Enzym mCherry codierenden Gen wurde konstruiert. Das Plasmid konjugierte ich erfolgreich in zwei Streptomyceten und einen *Pseudonocardia*-Stamm, diese wurden zuvor von den Blattschneiderameisen

isoliert. Erste Versuche zeigten das Potential der Methode, um in zukünftigen Untersuchungen die Aufnahme von Actinomyceten durch die Blattschneiderameisen zu studieren.

Biosynthese von Antimycinen

Durch Verfütterungsstudien mit stabilisotopenmarkiertem Tryptophan, ^{15}N -markierter Anthranilsäure, 3-Fluoroanthranilsäure, 4-Fluoroanthranilsäure, 2-Fluoroanthranilsäure und 2-Amino-4-fluorophenol untersuchte ich den Biosyntheseweg der 3-Aminosalicylsäure-Einheit **38** der Antimycine. Die Blockierung verschiedener Positionen der Anthranilsäure (**26**) durch die Fluormarkierungen zeigte, dass die Carboxylgruppe der Anthranilsäure (**26**) bei der Bildung der 3-Aminosalicylsäure (**38**) der Antimycine die Position wechselt. Damit konnte ich den in Abbildung 63 gezeigten Biosyntheseweg ableiten.

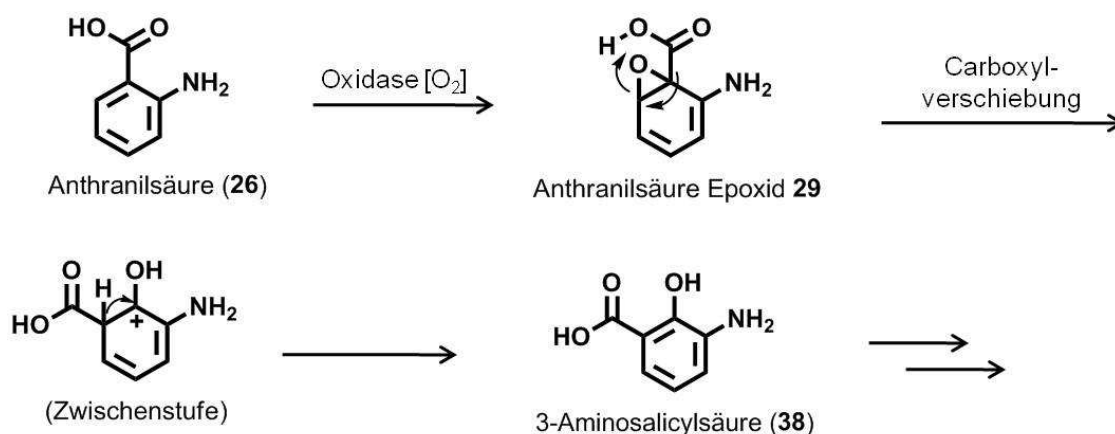


Abbildung 63: Vorschlag des Mechanismus zur Bildung der 3-Aminosalicylsäure (**38**) der Antimycine aus Anthranilsäure (**26**).

Studien zum Abbau und zur Funktion von Antimycinen sowie dem Abbauprodukt (*S*)-3-Butyl-5-methylfuran-2(5*H*)-on (**64**)

Antimycine zerfallen bereits in schwach alkalischem Milieu, wie es in dem Komplexmedium zur Kultivierung von Streptomyceten vorherrscht. Als Abbauprodukte wurden Laktone, wie (*S*)-3-Butyl-5-methylfuran-2(5*H*)-on (**64**) nachgewiesen (Abbildung 64).

Die siderophoren Eigenschaften der Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**) sind für den produzierenden Streptomyceten weder für die Aufnahme von Eisenionen, noch für die Verteidigung gegen den Pilz *Fomitopsis pinicola* wichtig.

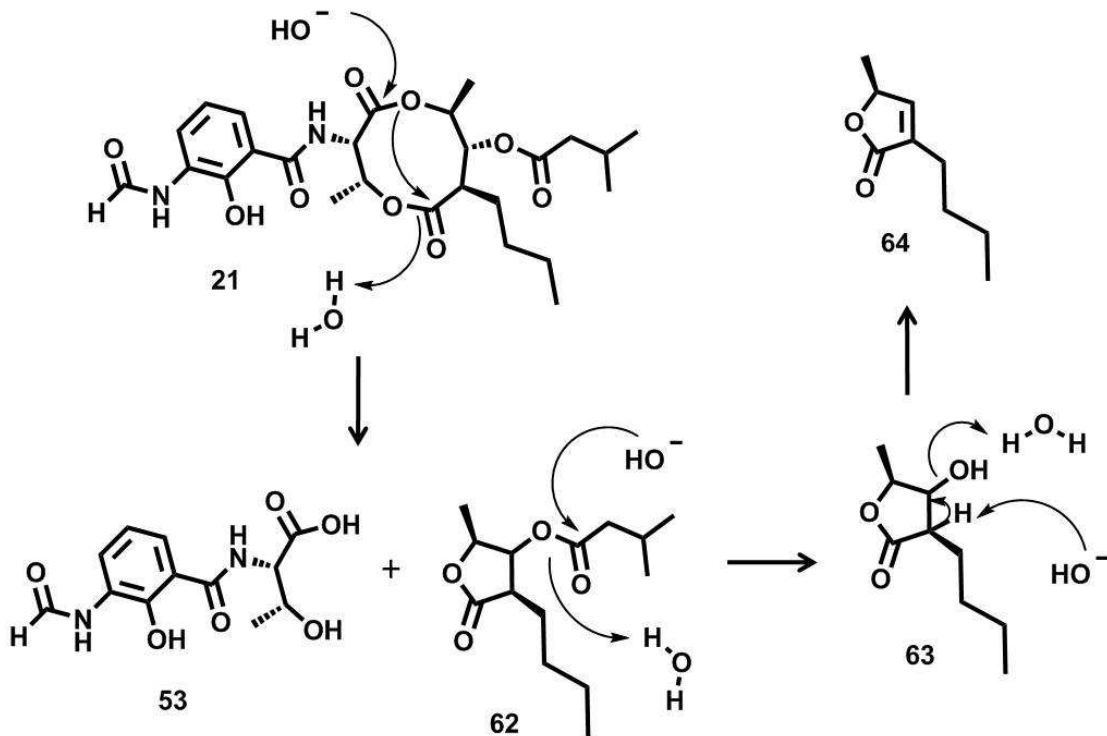


Abbildung 64: Postulierter Reaktionsmechanismus für den Abbau von Antimycinen, hier Antimycin A_{3b} (21).

Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Laktone **64** zu bekannten Quorum sensing und Quorum quenching Signalmolekülen, untersuchte ich, ob das Laktone **64** und die Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**) Signaleigenschaften aufweisen. Weder für den Antimycin produzierenden *Streptomyces odorifer*, noch für bekannte *N*-Acyl-homoserinlaktone-Reporterstämme konnte ein Quorum sensing oder Quorum quenching Effekt festgestellt werden.

In Bioassays zur potentiellen Signalwirkung des flüchtigen Laktone **64** und einer damit verbundenen Beeinflussung des Wachstums von *Arabidopsis thaliana* konnte kein Effekt festgestellt werden. Ebenso zeigten Versuche, die einen anlockenden bzw. abstoßenden Reize des Duftes von **64** auf Blattschneiderameisen untersuchten, kein verändertes Verhalten der Insekten.

Nachweis von Antibiotika in den Guttationströpfchen von Streptomyceten

In den Tröpfchen von isolierten Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen, die sich auf dem Luftmycel einiger Streptomyceten bilden, wenn sie auf Agarplatten kultiviert werden, fand ich per LC-MS 70 ng/μl Valinomycin (**13**) sowie 200 ng/μl Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**). Die Konzentration der Actinomycine in 10 μl Tröpfchen reichte aus, um im Agardiffusionsassay wachstumshemmend gegen *Bacillus subtilis* zu wirken.

5 Summary

With discovering that *Actinomyces* are carried by leaf cutting ants on their cuticle, [43] the question arose whether the antibiotics produced by the microbial symbionts might help the ants to defend themselves against pathogens. Meanwhile candicidin macrolides, [70] dentigerumycin [77] and nystatin P1 [69] were identified in cultures of isolated *Actinomyces*-symbionts.

Today, only few antibiotics could be detected in the natural environment. None of the mentioned antibiotics were proven to be present in the leaf cutting ants' ecosystem. In order to evaluate the ecological function of secondary metabolites, it is necessary to detect these compounds also in the environment.

Further investigations are needed in order to understand the interactions and role of all different microorganisms [43, 51, 59-61, 226] and antibiotics [69, 70, 77] participating in the leaf cutting ants' ecosystem:

Identification and activity of antibiotics produced by *Streptomyces*-symbionts of *Acromyrmex*-leaf cutting ants

Using phylogenetic analysis (comparison of 16S rDNA), closely related *Streptomyces*, which are already well investigated, to the isolated *Streptomyces*-symbionts were identified. The information about already known antibiotics, produced by those related microorganisms was successfully used to screen for metabolites in cultures of the symbionts with LC-MS. Actinomycin D (**14**) and actinomycin X₂ (**15**), valinomycin (**13**) and the antimycins A₁ – A₄ (**9 - 12**) were identified (Figure 65).

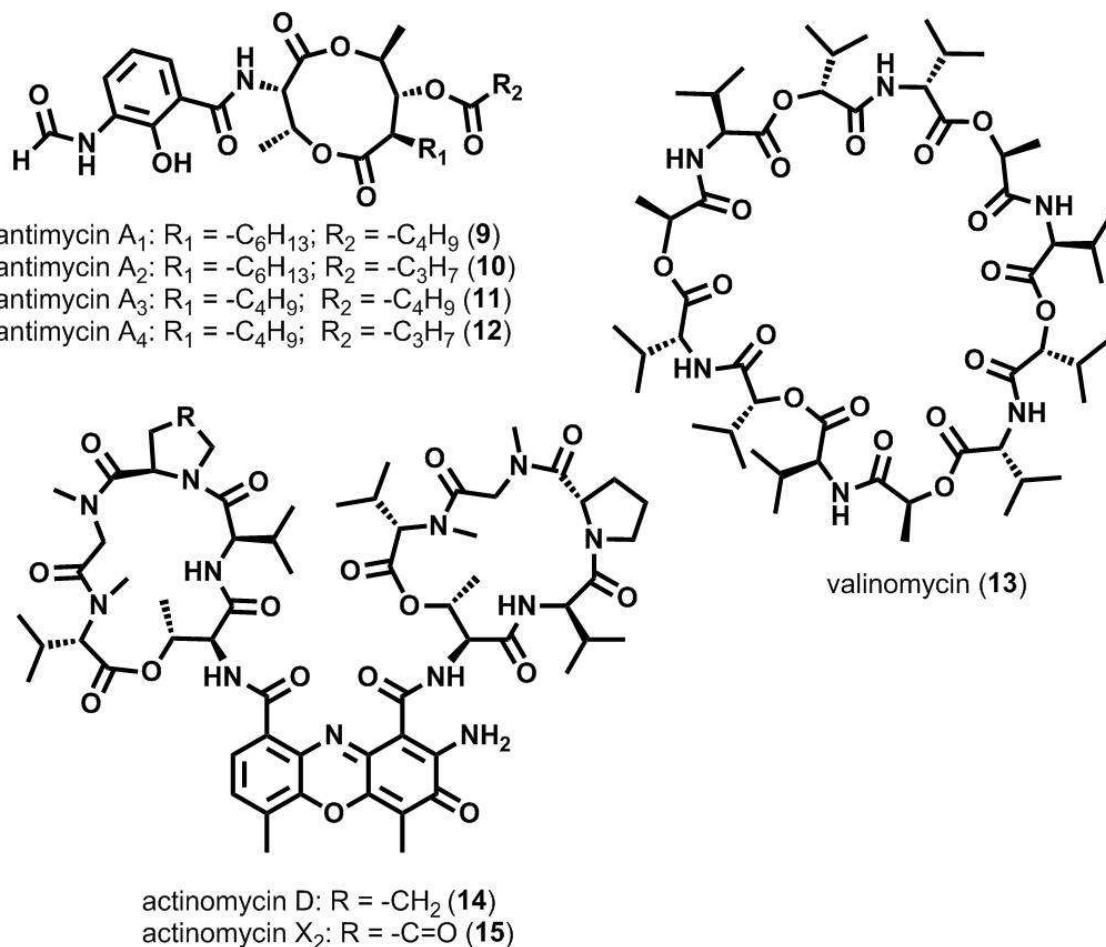


Figure 65: Structures of actinomycin D (14), actinomycin X₂ (15), valinomycin (13) and antimycins A₁ - A₄ (9 - 12).

The antimicrobial activity of the identified antibiotics has been tested against eight fungi, two yeasts and seven bacteria. 2 nmol of actinomycin D (14) and actinomycin X₂ (15) inhibited the growth of *Bacillus subtilis*, as well as of three symbionts *Streptomyces* Av 25_4 (4 nmol), *Pseudonocardia* Av 30 (12 nmol) und *Pseudonocardia* Ao 1 (12 nmol) strongly. In higher concentrations the growth of the leaf cutting ants' garden fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (24 nmol), the pathogen *Fusarium decemcellulare* (239 nmol) and the black yeast *Phialophora fastigiata* (239 nmol) was repressed.

The antimycins A₁ – A₄ (9 – 12) (6 nmol) inhibited the growth of the leaf cutting ants' garden fungus. *Saccharomyces cerevisiae* (29 nmol), *Escovopsis weberi* (58 nmol), *Cordyceps militaris* (58 nmol) and *Trichoderma harzianum* (58 nmol) as well as *P. fastigiata* (115 nmol) were only affected by higher amounts of antimycins A₁ – A₄ (9 – 12).

Valinomycin (**13**) was active against the growth of *S. cerevisiae* (13 nmol) and in higher concentrations (266 nmol) against *B. subtilis*. However, it is known that valinomycin (**13**) is highly active against pests such as mites. [101-105]

The combination of almost subinhibitory amounts of the identified antibiotics actinomycin D (**14**), actinomycin X₂ (**15**), valinomycin (**13**), antimycins A₁ – A₄ (**9** – **12**) and candicidin D caused clear growth inhibition of *E. weberi*.

Direct detection of antibiotics in the *Acromyrmex*-leaf cutting ants' nest and on their cuticle

For the first time it was possible to directly detect the antibiotics valinomycin (**13**) and actinomycin X₂ (**15**). Both antibiotics were found in the waste material of *Acromyrmex echinator* and *Acromyrmex niger*. Extracts of the leaf cutting ants' garden fungus didn't contain any detectable amount of actinomycin D (**14**), actinomycin X₂ (**15**), valinomycin (**13**), antimycins A₁ – A₄ (**9** – **12**) or candicidin D. However, with MALDI-imaging, valinomycin (**13**) was also detected on the insects' cuticle as well.

An active compound present in the waste of *Acromyrmex echinator*-leaf cutting ants

The insect pathogenic fungus *C. miliaris* showed to be reproducibly inhibited in growth by an ethylacetate extract of the *A. echinator* waste material, whereas the extracts of waste from other leaf cutting ant species were inactive. A bioassayguided fractionation using Sephadex LH-20 chromatography followed by Diaion HP-2MG chromatography led to an active fraction. The responsible compounds need to be further characterized after sufficient amount of material is available.

Using fluorescence labeled *Actinomyces* to study their uptake by leaf cutting ants

A plasmid for the constitutive expression of the fluorescent protein mCherry with the *ermE**p promoter was constructed. The plasmid was efficiently conjugated into two *Streptomyces* and one *Pseudonocardia* which were previously isolated from the leaf cutting ants. Initial experiments demonstrated the potential of this

method for future investigations on the uptake of *Actinomyces* by leaf cutting ants.

Biosynthesis of the antimycins

Feeding studies with labeled tryptophan, ^{15}N -labelled anthranilic acid, 3-fluoroanthranilic acid, 4-fluoroanthranilic acid, 6-fluoroanthranilic acid and 2-amino-4-fluorophenol as well as helped to investigate the biosynthesis of the 3-Aminosalicylic acid-unit **38** of the Antimycins. By blocking different positions of the Anthranilic acid (**26**) with Fluor and further analysis of the produced Antimycins, it is assumed that the carboxyl group of the Anthranilic acid **26** is changing positions to finally form the 3-Aminosalicylic acid (**38**) (Figure 66).

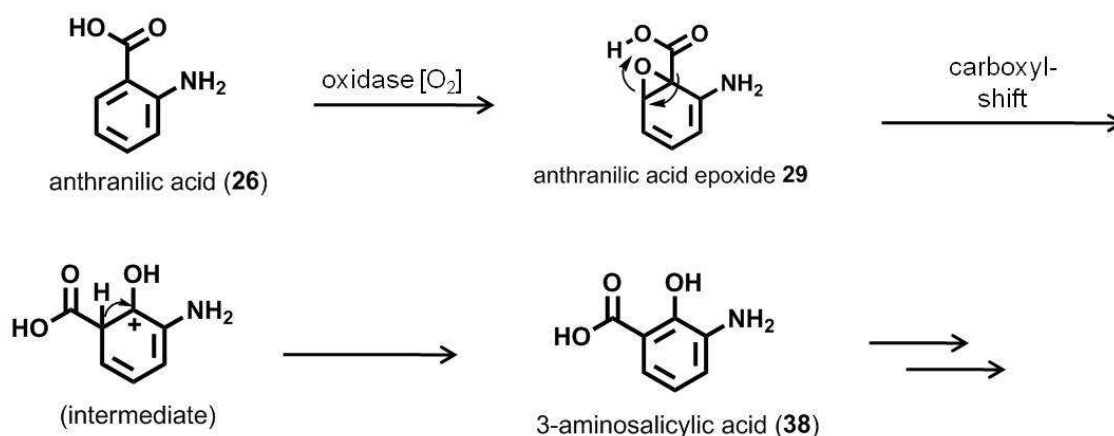


Figure 66: Proposed mechanism for the reaction to 3-aminosalicylic acid (**38**) of the antimycins.

Decomposition and function of the antimycins as well as the degradation product (S)-3-butyl-5-methylfuran-2(5H)-one (**64**)

Antimycins already decompose under weak alkaline conditions, such as in media for culturing *Streptomyces*, generating γ -butyrolactones, such as (S)-3-butyl-5-methylfuran-2(5H)-one (**64**) (Figure 67).

The producing *Streptomyces odorifer* neither depend on the siderophoric properties of antimycins $\text{A}_1 - \text{A}_4$ (**9 - 12**) for iron uptake nor for the defense against fungi, such as *Fomitopsis pinicola*.

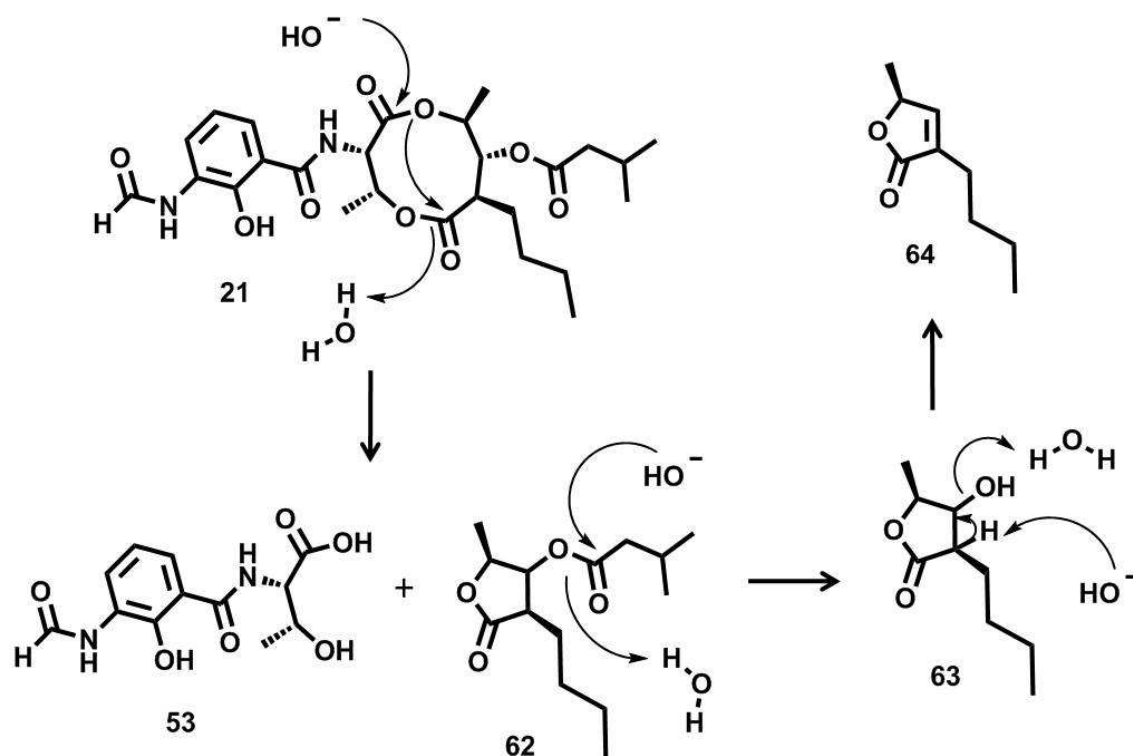


Figure 67: Proposed mechanism for the decomposition of the antimycins, exemplified by antimycin A_{3b} (21).

The structural similarity of γ -butyrolactone **64** to well known quorum sensing and quorum quenching signal molecules led to the assumption of signal properties of **64** and thus of Antimycins. However, there was no effect, neither for the producing *S. odorifer* nor for widely used biosensors, which responds to the presence of signal compounds such as *N*-Acyl-homoserine lactones, with the production of light or colors.

Bioassays with *Arabidopsis thaliana*, targeting possible signaling properties of the volatile lactone **64**, did not show any visible influence growth of the plant. Leaf cutting ants neither responds to the volatile **64** with rejection nor with attraction.

Droplets formed by *Streptomyces* contain antibiotics

Droplets produced by *Streptomyces*-symbionts of the leaf cutting ants were analyzed. The LC-MS measurements showed the presence of 70 ng/ μ l valinomycin (**13**), 200 ng/ μ l actinomycin D (**14**) and actinomycin X₂ (**15**). 10 μ l of actinomycin-containing droplets was sufficient to inhibit the growth of *B. subtilis* in an agar diffusion assay.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte

6.1.1 Massenspektrometrie (MS)

6.1.1.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Alle Messungen wurden bei einer Elektronenenergie von 70 eV durchgeführt. Als Trägergas wurde Helium verwendet.

Methode A:

Finnigan Trace MS 2000 Series; GC-Säule: Zebron ZB-5 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Injektortemperatur: 270 °C; Splitless-Modus; Trägergasfluss: 1,5 ml/min

Temperaturprogramm:

50 °C (2 min) – 6 °C min⁻¹ – 200 °C – 15 °C min⁻¹ – 300 °C (3 min)

Methode B:

Finnigan MAT Magnum; GC-Säule: Alltech EC-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Injektortemperatur: 250 °C; Split = 21 ml/min; Trägergasdruck: 827 mbar

Temperaturprogramm: 50 °C (1 min) – 15 °C min⁻¹ – 280 °C (1 min)

Methode C:

Hewlett Packard MS 5890 Series II; GC-Säule: Alltech EC-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Injektortemperatur: 250 °C; Split = 21 ml/min; Trägergasdruck: 344 mbar

Temperaturprogramm: 50 °C (3 min) – 15 °C min⁻¹ – 280 °C (1 min)

Methode D:

Hochauflösende GC-MS-Messungen

HP6890 Micromass GCT; GC-Säule: Phenomenex ZB-5 ms 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Injektortemperatur: 250 °C; Split = 30 ml/min; Trägergasfluss: 1 ml/min

Temperaturprogramm:

45 °C (2 min) – 10 °C min⁻¹ – 200 °C – 30 °C min⁻¹ – 280 °C

6.1.1.2 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Die LC-MS-Messungen wurden mit Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) und dem Finnigan LTQ Massenspektrometer angefertigt.

6.1.1.3 Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation (MALDI) und Imaging

Die Proben für das MALDI-Imaging wurden mittels ImagePrep™ von Bruker automatisch mit der Matrix besprüht. Die MALDI-Quelle wurde mit einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer (Kapitel 6.1.1.2, S. 90) gekoppelt.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit einem Leica S8 Binokular (Kapitel 6.1.9, S. 92) und einer Digitalkamera aufgenommen.

Die Messungen wurden in dem Labor von Prof. Michael Spittler (TU Dortmund) durchgeführt.

6.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurden ausschließlich Laufmittel in HPLC-Qualität verwendet.

Wasser wurde vor Gebrauch durch eine Quarzdestillationsanlage gereinigt.

Die im Folgenden aufgeführten Methoden wurden verwendet:

Methode A:

Dionex UltiMate 3000 HPLC; Finnigan LTQ

Die Ultimate 3000 Nano HPLC von Dionex mit einem kühlbaren Autosampler, binärer Pumpe (0,1 – 2 ml/min Flussrate), Entgaser und einem variablen Wellenlängen Detektor (VWD) wurde für die analytische Auftrennung von Proben genutzt.

Laufmittel: Acetonitril (0,5 % Essigsäure) = ACN, Wasser (0,5 % Essigsäure)

Programm: 0 % ACN (3 min) – 3,7 % ACN min⁻¹ – 100 % ACN (10 min)

1: Analytische Säule Phenomenex Gemini C18 110A 250 x 2.00 mm, 5 µm
Fluss: 200 µl/min

2: Analytische Säule Phenomenex Kinetex C18 100A 150 x 2.10 mm, 2.6 µm
Fluss: 150 µl/min

Methode B:

HP1100 System mit Autosampler, binärer Pumpe (0,2 – 5 ml/min Flussrate), Entgaser, Säulenofen und wahlweise einem Diodenarraydetektor (DAD) oder einem variablen Wellenlängen-Detektor (VWD) wurde für semipräparative Trennungen mit einem Fraktionssammler (Gilson 206) genutzt.

Laufmittel: Acetonitril = ACN, Wasser

Programm: 0 % ACN (3 min) – 3,7 % ACN min⁻¹ – 100 % ACN (30 min)

3: Präparative Säule Alltech Grom-Sil ODS 5ST RP18 250 mm x 10 mm, 5 µm

Hochauflösende Messungen wurden mit der Dionex UltiMate 3000 HPLC und dem Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL im Labor von Prof. Michael Spiteller (TU Dortmund) durchgeführt.

Abweichende Konditionen sind bei den entsprechenden Experimenten aufgeführt.

6.1.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die folgenden Geräte wurden für die Messungen verwendet:

Bruker Avance DRX 500

Bruker Avance AV 400

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, relativ zu dem verwendeten Lösungsmittel, das als interner Standard diente und die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

¹H: CDCl₃ δ = 7,26 ppm; ¹³C: CDCl₃ δ = 77,16 ppm

¹H: CD₃OD δ = 3,31 ppm; ¹³C: CD₃OD δ = 49,00 ppm.

¹H: D₂O δ = 4,79 ppm [227]

6.1.4 Infrarotspektrometrie (IR)

Für die IR-Spektren wurde ein Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer verwendet. Feste Proben wurden als KBr-Presslinge bzw. Flüssigkeiten als Film auf NaCl oder ZnS-Platten gemessen.

6.1.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfolien von Merck verwendet. Die Verbindungen wurden auf der DC-Platte unter einer UV₂₅₄-Lampe detektiert.

6.1.6 Säulenchromatographie (SC)

Kieselgel von ICN (Silika 60 Å) wurde teilweise unter Druck (Flash-Chromatographie) für die SC genutzt. Zur Größenausschlusschromatographie wurde Sephadex LH-20, zur Adsorptionschromatographie Diaion HP-2MG von Supelco verwendet.

Die jeweiligen Eluenten sind bei den entsprechenden Experimenten angegeben.

6.1.7 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Für das Sammeln von flüchtigen Verbindungen wurde die „Solid Phase Microextraction“ (SPME) [228] Technik von Supelco entweder mit einer schwarzen SPME-Faser mit 75 µm CarboxenTM/Polydimethylsiloxan (PDMS) Beschichtung oder einer roten SPME-Faser mit 100 µm PDMS Beschichtung für die Duftmessungen verwendet (Kapitel 6.3.14, S. 114).

6.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurde der Mastercycler gradient von Eppendorf verwendet.

Die Bedingungen werden bei den entsprechenden Experimenten angeführt.

6.1.9 Mikroskope

Leica Lasermikrodissektion Mikroskop (LMD) DM6000 B

Elektronik Box CTR 6000

Fluoreszenzfilter

B/G/R: BP 420/30 nm, 495/15 nm, 570/20 nm

I3: BP 450-490 nm

A: BP 340-380 nm

Leica S8 APO Greenough stereo

Kaltlichtquelle (KL) 1500 LCD, Schott

Zeiss Binokular Stemi DV4

Zeiss Stemi SV11

AxioCam HRC

Kaltlichtquelle (KL) 1500 LCD, Schott

Quecksilber Kurzbogenlampe HBO 100W

6.2 Materialien

6.2.1 Medien

Für Agarplatten wurden zusätzlich 15 g Agar-Agar zu 1 l des Mediums gegeben. Die Medien wurden alle autoklaviert. Das verwendete Wasser wurde mit einer Quarzdestillationsanlage destilliert (ddH₂O).

6.2.1.1 Sojamehl-Mannitol-Medium (SFM) [229]

20 g Sojamehl (Vollsoja, Hensel)

20 g Mannitol

1000 ml ddH₂O

6.2.1.2 Lennox broth (LB) [230]

10 g Pepton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

1000 ml ddH₂O

6.2.1.3 2xYT (Yeast-Tryptone) [8]

1,6 g Trypton

10 g Hefe Extrakt

0,5 g NaCl

100 ml ddH₂O

6.2.1.4 MgCl₂-SFM-Agar

95 mg MgCl₂

2 g Sojamehl (Vollsoja, Hensel)

2 g Mannitol

100 ml ddH₂O

6.2.1.5 SFM-NA-Sel (Selektionsmedium mit Nalidixinsäure)

2,5 mg Nalidixinsäure (nach dem autoklavieren hinzugeben)
Selektions-Antibiotikum (nach dem autoklavieren hinzugeben)
2 g Sojamehl (Vollsoja, Hensel)
2 g Mannitol
100 ml ddH₂O

6.2.1.6 Murashige & Skoog-Agar (MS) [231]

440 mg MS-Salz
1 g Sucrose
50 mg 2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)
800 mg Agar-Agar (Kobe)
100 ml ddH₂O
pH 5,7 – 5,8

6.2.2 Puffer**6.2.2.1 Natrium-EDTA-Tris (SET) [8]**

440 mg NaCl (75 mM)
730 mg EDTA (25 mM), pH 8
242 mg Tris (20 mM), pH 7,5 (mit HCl einstellen)
100 ml ddH₂O

6.2.2.2 Tris-EDTA (TE) [8]

121 mg Tris (10 mM), pH 8 (mit HCl einstellen)
33,8 mg Na₂-EDTA (1 mM), pH 8
100 ml ddH₂O

6.2.2.3 Tris-Acetat-EDTA (TAE)

4,84 g Tris (40 mM)
1,18 g Acetat (20 mM)
338 mg Na₂-EDTA (1 mM)
1000 ml ddH₂O

6.2.2.4 Transformationspuffer 1 (TFB1) [232]

1,21 g RbCl (100 mM)
630 mg MnCl₂ (50 mM)
294 mg KOAc (30 mM)
111 mg CaCl₂ (10 mM)
15 ml Glycerol (15 %)
pH 5,8 mit KOH
auf 100 ml mit ddH₂O
steril filtriert

6.2.2.5 Transformationspuffer 2 (TFB2) [232]

209 mg MOPS (10 mM, 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure)
121 mg RbCl (10 mM)
833 mg CaCl₂ (75 mM)
15 ml Glycerol (15 %)
pH 6,8 mit KOH
auf 100 ml mit ddH₂O
steril filtriert

6.2.3 Weitere Lösungen

Das für die folgenden Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Quarzdestillationsanlage destilliert (ddH₂O).

6.2.3.1 6x Ladepuffer

121 mg Tris (10 mM) pH 7,6
60 ml Glycerol (60 %)
30 mg Bromphenolblau (0,03 %) (Blau, bei 1kb)
30 mg Xylen Cyanol FF (0,03 %) (Türkise, bei 10 kb)
1,75 g EDTA (60 mM)
40 ml ddH₂O

6.2.3.2 α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure-Matrix Lösung [233]

7 mg α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
1 ml 80:20 ACN-Wasser (v:v)
2 μ l Trifluoressigsäure (0,2 %)

6.2.3.3 Bleichreagenz

2,62 g NaOCl (2,625 %)
50 μ l Tween20 oder TritonX (0,05 %)
auf 100 ml mit ddH₂O
autoklavieren

6.3 Allgemeine Methoden

6.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen [232]

Materialien:

Escherichia coli Stamm
LB Platte (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)
Steriles Reagenzglas
110 ml LB-Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)
300 ml Erlenmeyerkolben
3 x 50 ml Falcon Tubes
30 ml TFB1 Puffer (Kapitel 6.2.2.4, S. 95)
4 ml TFB2 Puffer (Kapitel 6.2.2.5, S. 95)
Sterile Eppendorf Tubes

Arbeitsschritte:

Zunächst müssen Zellen des Stammes, der kompetent gemacht werden soll, vereinzelt werden, indem sie auf einer LB-Platte ausgestrichen werden und über Nacht bei 37 °C Kolonien bilden.

Eine einzelne Kolonie wird gepickt und in ein steriles Reagenzglas mit 10 ml flüssigem LB-Medium inokuliert und erneut über Nacht bei 37 °C im Schüttler kultiviert.

1 ml der Übernachtskultur wird in einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium gegeben. Die Kultur wird bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C geschüttelt.

Ist die OD_{600} erreicht, wird die Kultur 5 min auf Eis gestellt, in drei Falcon Tubes transferiert und bei 4 °C und 4000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und die Zellen werden weiter auf Eis gelagert.

Die Zellen werden in 4 °C kaltem TFB1 Puffer resuspendiert (10 ml pro Falcon Tube) und weitere 90 min auf Eis inkubiert, erneut bei 4 °C und 4000 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Die Falcon Tubes werden weiter auf Eis gelagert.

Die Zellen werden in insgesamt 4 ml eiskaltem TFB2 Puffer resuspendiert. 50 – 100 µl Aliquots der Zellen werden in sterile Eppendorf Tubes gefüllt, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

6.3.2 DNA-Isolierung von Streptomycceten [8, 234]

Materialien:

20 ml SFM-Agar Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93)

Petrischale, d = 9 cm

Streptomycceten-Sporenlösung

5 ml SET-Puffer (Kapitel 6.2.2.1, S. 94)

200 µl Lysozym, 5 mg (in ddH₂O)

600 µl SDS, 10 %ig

2 ml NaCl, 5M

5 ml Chloroform

6 ml – 10 ml Isopropanol

Pasteurpipette

1 ml – 2 ml Ethanol, 70 %ig

200 µl – 500 µl TE-Puffer (Kapitel 6.2.2.2, S. 94)

Arbeitsschritte:

Für die Isolierung von genomischer DNA einer Streptomycceten-Kultur werden 20 ml des SFM-Komplexmediums mit Agar und eine Petrischale von 9 cm

Durchmesser benötigt. Zunächst wird die Agarplatte mit einer Sporenlösung inokuliert. Nach zwei bis drei Tagen wird das gesamte Mycel von der Platte gekratzt und in einem 15 ml Falcon Tube in 5 ml SET-Puffer suspendiert. 200 µl Lysozym-Lösung werden hinzugegeben und nach vorsichtigem Durchmischen bei 37 °C 60 min inkubiert.

Nach Zugabe von 600 µl SDS wird vorsichtig durchmischt, bei 55 °C zwei Stunden inkubiert und mehrmals invertiert. 2 ml NaCl-Lösung werden hinzugegeben, gemischt, auf Raumtemperatur abgekühlt, 5 ml Chloroform beigefügt und 30 min bei Raumtemperatur alle 5 min invertiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 4500 x g, 20 °C wird der Überstand vorsichtig in ein 15 ml Falcon Tube überführt und mit 0,6 Volumen Isopropanol vermischt. Nach 3 min kontinuierlichem Invertieren wird die ausgefallene DNA auf eine Pasteurpipette aufgewickelt.

Die DNA wird in 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in einem der DNA-Menge entsprechendem Volumen TE-Puffer oder Wasser über Nacht bei 4°C gelöst. Die Lösung wird in 50 µl Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der genomischen DNA wird spektrometrisch bestimmt.

6.3.3 16S rDNA PCR [235, 236]

Diese Methode wurde für die Bestimmung von Streptomycceten verwendet.

Materialien:

- 1 µl reverse Primer⁴⁰ 8F (100 pM)
- 1 µl forward Primer 1492r (100 pM)
- 3 µl dNTP's (25 mM)
- 10 µl GC Puffer (mit 7,5 mM MgCl₂)
- 4 µl MgCl₂ (50 mM)
- 4 µl DMSO
- 200 ng DNA (Kapitel 6.3.2, S. 97) bzw. Mycel
- 25 µl bzw. 26 µl steriles ddH₂O
- 1 µl Phusion Polymerase⁴¹ (2 u/µl, New England BioLabs, NEB)
- 50 µl Gesamtvolumen

⁴⁰ Primer = Oligonukleotid, das als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie DNA-Polymerase dient.

⁴¹ DNA-Polymerase = Enzym; katalysiert Synthese von DNA aus Desoxyribonukleotiden an DNA-Matrize.

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	98	30	1
Denaturierung	98	10	35
Primerhybridisierung	52,5	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	600 (10 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

8F Primer (5'→3'): AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG

T_m: 55,3 °C

1492r Primer (5'→3'): GGT TAC CTT GTT ACG ACT T

T_m: 52,4 °C

Fragmentgröße: ca. 1500 bp

Arbeitsschritte:

PCR mit genomischer DNA

Für die 16S rDNA PCR mit isolierter genomischer DNA werden die Materialien zusammen pipettiert, in den Thermocycler gestellt und gestartet.

Kolonie-PCR [237]

Zunächst werden die Primer, dNTP's, Puffer, MgCl₂, DMSO und 26 µl Wasser zusammen in ein PCR-Tube gegeben.

Eine Pipettenspitze wird nur vorsichtig in das Mycel einer zwei bis drei Tage alten Agarplatten-Kultur getippt, so dass eine kaum sichtbare Menge Mycel haften bleibt. Diese Spitze wird im PCR-Ansatz gehalten, damit das Mycel sich von der Pipettenspitze lösen kann. Das PCR-Tube wird im Thermocycler 15 min bei 95 °C erhitzt. Erst dann wird die Polymerase zügig in den Ansatz gegeben und die PCR gestartet.

Nach beendeter PCR wird das Fragment isoliert (Kapitel 6.3.5, S. 101) und für das Sequenzieren in einen Vektor⁴² ligiert (Kapitel 6.3.6, S. 102).

6.3.4 18S rDNA PCR

Diese Methode wurde für die Bestimmung von Pilzen verwendet.

Materialien:

1 µl 18S_rev Primer (100 pM)

1 µl 18S_for Primer (100 pM)

5 µl dNTP's (10 mM)

5 µl grüner Puffer (20 mM MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, inkl. Ladepuffer, Fermentas)

Mycel

37,5 µl steriles ddH₂O

0,5 µl Dream Taq Polymerase (5 u/µl, Fermentas)

50 µl Gesamtvolumen

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	180 (3 min)	1
Denaturierung	95	30	40
Primerhybridisierung	57	30	
Elongation	72	60	
Finale Elongation	72	900 (15 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

18S_rev Primer (5'→3'): TTA AGT TCA GCG GGT AGT CCC AC

T_m: 62,3 °C

18S_for Primer (5'→3'): TTT CCG TAG GTG AAC CTG CG

T_m: 61,9 °C

Fragmentgröße: ca. 700 bp

⁴² Vektor = Ringförmige DNA zur Übertragung einer Fremd-Nukleinsäure in eine lebende Empfängerzelle

Arbeitsschritte:

Zunächst werden die Primer, dNTP's und der Puffer zusammen in ein PCR-Tube gegeben. Eine Pipettenspitze Mycel einer zwei bis drei Tage alten Kultur werden von einer Agarplatte genommen, in 500 µl Wasser durch Vortexen suspendiert und 37,5 µl der Suspension in den PCR Ansatz pipettiert, der darauf für 15 min bei 94 °C in der PCR-Maschine erhitzt wird. Erst dann wird die Polymerase in den Ansatz gegeben und die PCR gestartet.

Nach beendeter PCR wird das Fragment isoliert (Kapitel 6.3.5, S. 101) und für das Sequenzieren in einen Vektor ligiert (Kapitel 6.3.6, S. 102).

6.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten [238]

Die amplifizierten oder aus Plasmiden⁴³ herausgeschnittenen DNA-Fragmente, werden mittels Elektrophorese im Agarosegel aufgereinigt.

Materialien:

0,4 g Agarose, 0,8 %ig

50 ml TAE-Puffer (Kapitel 6.2.2.3, S. 94)

3 µl Ethidiumbromid

8,4 µl 6x Ladepuffer pro 50 µl Ansatz (Kapitel 6.2.3.1, S. 95)

12 µl DNA Leiter 1 kb Plus (0,5 µg/µl; für 50 µl Ansatz), Fermentas
„Gel Extraction Kit“, Qiagen

Arbeitsschritte:

Die Agarose wird in TAE-Puffer in einer Mikrowelle gelöst (800 W), nach dem Abkühlen wird das Ethidiumbromid zugemischt und das Gel gegossen. Das Gel wird in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese Kammer gelegt.

Der aufzureinigende Ansatz wird mit 6x Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die DNA-Fragmente werden über eine Stunde (120 V, 300 mA) im Gel aufgetrennt und dann unter einer UV-C-Lampe analysiert. Anhand der DNA Leiter, die zusammen mit den Proben aufgetragen

⁴³ Plasmid = kleine, ringförmige, autonom replizierende, doppelsträngige DNA-Moleküle, nicht zum Bakterienchromosom zählend

wurde, wird das gewünschte Fragment anhand der Größe identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Mit dem „Gel Extraction Kit“ von Qiagen wird die DNA aus dem Gelstück extrahiert. Die Konzentration der DNA wird spektrometrisch bestimmt und zum Sequenzieren in einen Klonierungsvektor ligiert (Kapitel 6.3.6, S. 102).

6.3.6 Ligation für die Sequenzierung [239]

Für die Sequenzierung wird das DNA-Fragment in den Klonierungsvektor pJet1.2 (CloneJET™ „PCR Cloning Kit“, Fermentas) ligiert, in *E. coli*-Zellen transformiert, kloniert, isoliert (Kapitel 6.3.8 bis 6.3.9, S. 106 bis 107) und das Plasmid anschließend sequenziert (Eurofins MWG Operon).

Materialien:

10 µl Ligations Puffer (400 mM Tris-HCl (pH 7,8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP)

150 ng DNA

1 µl DNA „blunting“ Enzym

1 µl pJet1.2 / „blunt“ Klonierungsvektor (50 ng/µl)

Steriles ddH₂O

1 µl T4 DNA Ligase (5 u/µl, Fermentas)

20 µl Gesamtvolumen

Arbeitsschritte für die Ligation glatter Enden:

Nach der Amplifizierung mit der Phusion Polymerase (Fermentas) sind die Enden der Fragmente glatt („blunt“). In diesem Fall kann sofort mit der Ligation anfangen werden.

Der Puffer wird mit 150 ng des gereinigten PCR-Produkts gemischt. Das Volumen sollte nicht größer als 8 µl sein. Wird weniger als 8 µl des PCR-Fragments eingesetzt, wird der Rest mit Wasser aufgefüllt. Der Vektor und die Ligase werden hinzugefügt, vorsichtig gemixt und 30 min im Dunkeln, bei

Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz kann für die Transformation⁴⁴ (Kapitel 6.3.8, S. 106) genutzt oder bei -20 °C gelagert werden.

Arbeitsschritte für Ligation von kohäsiven Enden:

Nach dem Schneiden mit Restriktionsenzymen und der Amplifikation mit der Taq Polymerase sind die Enden der DNA-Fragmente meistens nicht glatt („sticky“). Die Enden müssen erst geglättet werden, bevor die Ligation in den pJet1.2 Vektor durchgeführt werden kann.

Der Puffer wird mit 150 ng des gereinigten PCR-Produkts gemischt. Das Volumen sollte nicht größer als 17 µl sein. Wird weniger als 17 µl des PCR-Fragments eingesetzt, wird der Rest auf 17 µl mit Wasser aufgefüllt. Das „DNA-blunting“ Enzym wird hinzugegeben und 5 min bei 70 °C inkubiert.

Die Reaktionsmischung wird auf Eis abgekühlt, der Vektor und die Ligase hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 30 min im Dunkeln, bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz kann direkt für die Transformation (Kapitel 6.3.8, S. 106) genutzt oder bei -20 °C gelagert werden.

6.3.7 Konstruktion von Plasmiden

6.3.7.1 Verdau des Vektors

Materialien:

50 ng Vektor

1 u Restriktionsenzym 1

1 u Restriktionsenzym 2

2 µl 10x Restriktionspuffer (abhängig von Restriktionsenzymen)

Steriles ddH₂O

2 µg BSA

20 µl Gesamtvolumen

„PCR Purification Kit“, Qiagen

⁴⁴ Transformation = Aufnahme isolierter DNA in kompetente Bakterienzellen sowie in Pilze, Algen, Hefen und Pflanzen

Arbeitsschritte:

Für die Konstruktion eines Plasmids wird der Vektor mit einem oder zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Der Reaktionsansatz wird auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt, gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Damit der geschnittene Vektor weiter verwendet werden kann, müssen die Restriktionsenzyme deaktiviert werden. Dafür wird der Ansatz bis zu 20 min (abhängig von Restriktionsenzymen) bei entsprechender Temperatur (65 °C - 80 °C) erhitzt oder mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen von den Enzymen gereinigt.

6.3.7.2 Dephosphorylierung des geöffneten VektorsMaterialien:

20 µl Restriktionsansatz (Kapitel 6.3.7.1, S. 103)

2 µl 10x Puffer (0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 M MgCl₂, 1 mg/ml BSA)

1 µl SAP (1 u/µl; Shrimp Alkaline Phosphatase), Fermentas

20 µl Gesamtvolumen

„PCR Purification Kit“, Qiagen

Arbeitsschritte:

Zum Restriktionsansatz wird der Puffer für die Dephosphorylierung sowie 1 µl der SAP hinzugegeben und bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen des gesamten Ansatzes auf 65 °C für 15 min deaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor wird mit dem „PCR Purification Kit“ aufgereinigt.

6.3.7.3 Präparation des InsertsMaterialien:

1 µg Plasmid

1 u Restriktionsenzym 1

1 u Restriktionsenzym 2

2 µl 10x Restriktionspuffer (abhängig von Restriktionsenzymen)

Steriles ddH₂O

2 µg BSA

20 µl Gesamtvolumen

Arbeitsschritte:

Das Insert wird mit den gleichen Restriktionsenzymen wie der Vektor (Kapitel 6.3.7.1) geschnitten. Der Reaktionsansatz wird bis auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt, gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

6.3.7.4 Aufreinigung des Inserts [238]Materialien:

0,4 g Agarose, 0,8 %ig

50 ml TAE-Puffer (Kapitel 6.2.2.3, S. 94)

3 µl Ethidiumbromid

3,4 µl 6x Ladepuffer pro 20 µl Ansatz (Kapitel 6.2.3.1, S. 95)

8 µl DNA Leiter 1kb Plus (0,5 µg/µl; für 50 µl Ansatz), Fermentas

20 µl Gesamtvolumen

„Gel Extraction Kit“, Qiagen

Arbeitsschritte:

Nach der Restriktion wird dem Ansatz der Ladepuffer zugesetzt und analog zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen (Kapitel 6.3.5, S. 101) auf ein vorbereitetes Agarosegel pipettiert und in diesem getrennt. Das gewünschte Fragment wird aus dem Gel geschnitten und mit dem Qiagen „Gel Extraction Kit“ isoliert (Kapitel 6.3.7.4 S. 105).

6.3.7.5 Ligation von Vektor und InsertMaterialien:

Dephosphorylierter Vektor (Kapitel 6.3.7.1 und 6.3.7.2, S. 104)

Insert (Kapitel 6.3.7.3 und 6.3.7.4, S. 105)

2 µl 10x Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA

Steriles ddH₂O

1 µl T4 Ligase, NEB (400 u/µl, New England BioLabs)

20 µl Gesamtvolumen

Arbeitsschritte:

Für die Ligation des Vektors mit dem Insert zu einem neuen Plasmid, werden Ansätze mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von Vektor und Insert verwendet (z.B.: 1:3, 1:9, 1:1, 3:1, 9:3). Der Puffer und so viel Wasser bis 19 µl erreicht sind, werden in den Ansatz pipettiert. Die Ligase wird hinzugegeben und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Das konstruierte Plasmid wird in *E. coli*-Zellen transformiert, kloniert (Kapitel 6.3.8, S. 106) und das Plasmid isoliert (Kapitel 6.3.9, S. 107). Für diese Schritte wird das Selektions-Antibiotikum des neuen Plasmids verwendet. Das Plasmid wird erneut verdaut und die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 6.3.7.1 und 6.3.5, S. 103 und 101). Bei der richtigen Größe des Inserts wird das Plasmid zur Kontrolle sequenziert.

6.3.8 Transformation und Klonierung

6.3.8.1 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente *E.coli*

Materialien:

50 µl kompetente *E. coli*-Zellen (Kapitel 6.3.1, S. 96)

1 µl - 2 µl Ligationsansatz / isoliertes Plasmid

Arbeitsschritte:

Um ein Plasmid zu vervielfältigen muss es beispielsweise in *E.coli*-Zellen transformiert werden. Dafür werden in dieser Arbeit hauptsächlich die chemisch kompetenten *E. coli* Top 10 verwendet. In gefrorenem Zustand werden sie für 15 min auf Eis gestellt, um langsam aufzutauen. Das Plasmid, oder der Ligationsansatz wird zur Kultur pipettiert. Der Ansatz wird vorsichtig in ein neues Eppendorf Tube, welches vorher kalt gestellt wurde, transferiert und für 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden für 30 – 45 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend abgekühlt. Anschließend werden die *E. coli*-Zellen kloniert (Kapitel 6.3.8.2).

6.3.8.2 Klonierung von transformierten *E. coli*-Zellen

Materialien:

500 µl LB-Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)
20 ml LB-Agar Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)
Selektions-Antibiotikum
Petrischale, d = 9 cm

Arbeitsschritte:

Der Klonierungsansatz wird auf Eis gekühlt. 500 µl LB-Medium werden hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Es werden 50 µl des Ansatzes auf eine Agarplatte mit dem Selektions-Antibiotikum der entsprechenden Resistenz des transformierten Plasmids (Kapitel 6.3.8.1, S. 106) ausgestrichen. Über Nacht wird die Platte in einen 37 °C Inkubator inkubiert.

6.3.9 Plasmidisolierung [240]

6.3.9.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

Materialien für einen Ansatz:

50 ml Falcon Tube
5 ml LB-Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)
Selektions-Antibiotikum
„Plasmid Isolation Kit“, Fermentas
2,0 ml Eppendorf Tube
1,5 ml Eppendorf Tube

Arbeitsschritte:

Die über Nacht gewachsenen Klone (Kapitel 6.3.8.2, S. 107) werden in 5 ml flüssigem LB-Medium mit dem Selektions-Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Am nächsten Tag werden 2 ml des Ansatzes in ein Eppendorf Tube gefüllt und zentrifugiert. Das Pellet wird mit dem „Plasmid Isolation Kit“ isoliert.

6.3.9.2 Plasmidisolierung aus Streptomycceten-Zellen

Materialien:

50 ml Falcon Tube

5 ml LB-Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)

Streptomycceten-Sporenlösung / Mycel

2 x 2 ml Eppendorf Tube

0,5 ml SET-Puffer (Kapitel 6.2.2.1, S. 94)

50 µg Lysozym (in ddH₂O)

0,2 ml 10 %ige SDS-Lösung (10 g SDS in 100 ml ddH₂O)

„PCR Purification Kit“, Qiagen

10 µl 1M HCl

1,5 ml Eppendorf Tube

Arbeitsschritte:

In ein Falcon Tube werden 5 ml LB-Medium mit dem Selektions-Antibiotikum gefüllt und mit einer Sporenlösung oder Mycel des Streptomycceten inokuliert. Nach vier Tagen werden zwei Mal 2 ml in Eppendorf Tubes gefüllt, zentrifugiert, das Pellet in SET-Puffer resuspendiert, das in H₂O gelöste Lysozym hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die SDS-Lösung wird zu dem Ansatz gegeben und zwei Stunden bei 55 °C inkubiert. Der Ansatz wird alle 10 min invertiert. Das „PCR Purification Kit“ wird für die Plasmidisolierung verwendet.

6.3.10 Konjugation von Streptomycceten [8, 241, 242]

Die Konjugation⁴⁵ stellt eine weitere Möglichkeit dar, ein Plasmid in die Zellen von Mikroorganismen zu schleusen. Diese Methode wurde angewendet, um Plasmide in die Zellen von Streptomycceten zu integrieren.

Zunächst wird das zu konjugierende Plasmid konstruiert und auf seine Richtigkeit hin überprüft (Kapitel 6.3.7 bis 6.3.9, S. 103 bis 107). Anschließend wird das Plasmid in *E. coli*-Zellen transformiert und kloniert (Kapitel 6.3.10.1).

⁴⁵ Konjugation = Übertragung von DNA einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle

6.3.10.1 Transformation und Klonierung von *E. coli* ET12567/pUZ8002Materialien:

Kompetente *E. coli* ET12567/pUZ8002 [243, 244] (Kapitel 6.3.1, S. 96)

1 µl Plasmid (Kapitel 6.3.7 bis 6.3.9, S. 103 bis 107)

Selektions-Antibiotika

Arbeitsschritte:

Die *E. coli* ET12567/pUZ8002 werden mit dem Plasmid, welches in die Streptomyceten konjugiert werden soll, transformiert und kloniert (Kapitel 6.3.8, S. 106). In diesem Schritt werden nur die Selektions-Antibiotika für das zu konjugierende Plasmid eingesetzt.

6.3.10.2 Präparation der mit einem Plasmid transformierten *E. coli* ET12567/pUZ8002Materialien:

Transformierte *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Kapitel 6.3.10.1, S. 109)

313 ml LB-Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93)

Selektions-Antibiotika

7 x 50 ml Falcon Tube

2 x 300 ml Erlenmeyerkolben

Arbeitsschritte:

Drei der transformierten *E. coli* ET12567/pUZ8002 Klone werden in je 10 ml flüssigem LB-Medium mit Antibiotika (für die Selektion des transformierten Plasmids, Kanamycin und Chloramphenicol (je 50 µg/ml für die Selektion des pUZ8002 Plasmids und der *dam*-Mutation⁴⁶ des *E. coli* ET12567/pUZ8002) inokuliert und in Falcon Tubes über Nacht bei 37 °C geschüttelt. In zwei autoklavierte 300 ml Erlenmeyerkolben werden je 100 ml LB-Medium mit Zusatz der Antibiotika (s.o.) gefüllt, mit 1 ml – 10 ml von je einer Vorkultur inokuliert und bei 37 °C geschüttelt, bis die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 erreicht haben (2 h – 10 h).

⁴⁶ *Dam*-Mutation = die Methylierung von DNA wird durch die Mutation verhindert

Die Kulturen werden in je zwei 50 ml Falcon Tubes umgefüllt, bei 4 °C, 2500 rpm, 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet zwei Mal mit je 20 ml LB-Medium gewaschen und alle Pellets in insgesamt 3 ml LB-Medium resuspendiert. Damit wird eine ausreichende Menge der transformierten Zellen erhalten, die im Folgenden für die Konjugation benötigt werden.

6.3.10.3 Präparation von kompetenten Sporen

Materialien:

Streptomycceten-Sporenlösung

2 x 1,5 ml Eppendorf Tube

1 ml 2xYT-Medium (Kapitel 6.2.1.3, S. 93)

Arbeitsschritte:

10 µl der Sporenlösung werden in einem autoklavierten Eppendorf Tube in 500 µl 2xYT-Medium suspendiert und 10 min in einem 50 °C heißen Wasserbad geschockt und auf Eis abgekühlt.

6.3.10.4 Konjugation von Streptomycceten mit *E. coli*

Materialien:

Kompetente Streptomycceten-Sporen (Kapitel 6.3.10.3, S. 110)

Präparierte, transformierte *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Kapitel 6.3.10.1, S. 109)

40 ml MgCl₂-SFM-Agar (Kapitel 6.2.1.4, S. 93)

2 x Petrischalen, d = 9 cm

2 ml steriles ddH₂O

1 mg Nalidixinsäure

Je 1 mg Selektions-Antibiotikum

20 ml SFM-NA-Sel-Medium (Kapitel 6.2.1.5, S. 94)

Arbeitsschritte:

Zu den kompetenten Streptomycceten-Sporen werden 500 µl der präparierten, transformierten *E. coli* ET12567/pUZ8002 gemischt. Der Ansatz wird bei 2,5 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 150 µl entnommen und verworfen. In dem restlichen Überstand wird das Pellet resuspendiert, auf eine

Agarplatte (20 ml MgCl_2 -SFM) ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wird jede Platte mit 0,5 mg Nalidixinsäure und je 1 mg der Antibiotika, die für das konjugierte Plasmid selektieren, in 1 ml Wasser überschichtet. Die Platten werden bei 30 °C solange inkubiert, bis einzelne Kolonien der konjugierten Streptomycceten zu sehen sind.

Einzelne Klone der konjugierten Zellen werden gepickt und auf SFM-NA-Sel-Medium, welches die für das Plasmid selektierenden Antibiotika enthält, in kleinen Patches ausgestrichen (Abbildung 68).



Abbildung 68: Skizze von Patches auf einer Agarplatte.

6.3.11 Kultivierung von Streptomycceten

6.3.11.1 Flüssigkultur

Materialien:

Erlenmeyerkolben

Metallspirale, l = 15 cm

Aluminiumfolie

Papierstopfen

SFM-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93)

Sporenlösung bzw. Mycel von Streptomycceten

Wasser

Arbeitsschritte:

Ein Erlenmeyerkolben wird mit einer Spirale und einem Papierstopfen versehen, mit Aluminiumfolie abgedeckt und autoklaviert. Der Kolben wird mit dem flüssigen SFM-Medium gefüllt (100 ml Erlenmeyerkolben = 30 ml Medium) und mit 10 μl einer Sporenlösung oder in Wasser suspendiertem Mycel inokuliert. Die Kultur wird bis zu 10 Tage bei 28 °C und 220 rpm geschüttelt.

6.3.11.2 Agarplattenkultur

Materialien:

Petrischale, d = 9 cm

20 ml SFM-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93)

Sporenlösung bzw. Mycel von Streptomycceten

Wasser

Arbeitsschritte:

10 µl einer Sporenlösung oder in etwas Wasser suspendiertes Mycel werden mit einer sterilen, in einem Bunsenbrenner gebogenen Pasteurpipette auf SFM-Agar ausplattiert. Die Kultur wird bei 28 °C gelagert.

6.3.12 Analytische-Extraktion von Streptomycceten-Flüssigkulturen

Um LC-MS (Kapitel 6.1.1.2, S. 90) oder GC-MS (Kapitel 6.1.1.1, S. 89) Messungen von Streptomycceten-Kulturen durchzuführen, wurden Extrakte hergestellt.

Für das LC-MS:

Materialien:

30 ml Flüssigkultur (Kapitel 6.3.11.1, S. 111)

20 ml Gläschen

500 µl Methanol

1,5 ml Eppendorf Tube

200 µl Insert + Feder

2 ml Vial

Arbeitsschritte:

Eine Flüssigkultur des entsprechenden Streptomycceten wird benötigt.

2 ml der Kultur werden in einem 20 ml Gläschen lyophilisiert, in 500 µl Methanol für eine Stunde mit einem Rührfisch gerührt, in einem Eppendorf Tube 2 min zentrifugiert, der Überstand in das Insert eines 2 ml Vials gefüllt und

anschließend im LC-MS analysiert. Methode A und die analytische Säule 2 (Kapitel 6.1.2, S. 90) wurden als Standardmethode verwendet.

Für das GC-MS:

Materialien:

30 ml Flüssigkultur (Kapitel 6.3.11.1, S. 111)

1,08 ml Ethylacetat

4 ml Vial

2 x 2 ml Eppendorf Tube

2 ml Vial

200 µl Insert + Feder

Arbeitsschritte:

Eine Flüssigkultur des entsprechenden Streptomycceten wird benötigt.

2 ml einer Kultur werden mit 1 ml Ethylacetat in einem 4 ml Vial extrahiert. Die Emulsion wird in zwei Eppendorf Tubes gefüllt, zentrifugiert, die organische Phase in ein 2 ml Vial gefüllt und im Argonstrom vollständig abgeblasen. Die eingetrocknete Probe wird in 80 µl Ethylacetat gelöst, in das Insert eines 2 ml Vials gefüllt und mittels GC-MS analysiert. Methode A (Kapitel 6.1.1.1, S. 89) wurde als Standardmethode verwendet.

6.3.13 Agardiffusionsassay

Die wachstumsinhibierende Wirkung von unterschiedlichen Mikroorganismen zueinander wurde mit Agardiffusionssays untersucht. Die Assays wurden auch verwendet, um Extrakte auf ihre Hemmwirkung gegen verschiedene Testorganismen zu untersuchen.

Materialien:

20 ml SFM-Agar-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93)

2 x Petrischalen, d = 5 cm

Sporenlösung bzw. Mycel der Mikroorganismen

1 ml steriles ddH₂O

2 ml Eppendorf Tube

2 x Pasteurpipetten

50 µl Extrakt bzw Lösungsmittel

Arbeitsschritte:

Die Sporen oder das Mycel des Testorganismus werden in etwa 500 µl sterilem Wasser in einem Eppendorf Tube suspendiert. Durch starkes Mixen werden die Sporen oder das Mycel suspendiert. 150 µl der Suspension werden auf zwei SFM-Agarplatten gleichmäßig verteilt. Sobald die Flüssigkeit der Suspension in die Platte eingezogen ist, wird die hintere Seite einer Pasteurpipette in der Bunsenbrennerflamme sterilisiert und nach dem Abkühlen für das Stechen eines Lochs in der Mitte der Platten verwendet. 50 µl des zu testenden Extrakts werden in das Loch pipettiert (Abbildung 69). Alternativ wird in die Mitte einer Platte der Stamm inokuliert, der auf seine wachstumshemmende Wirkung hin getestet werden soll (Abbildung 69).

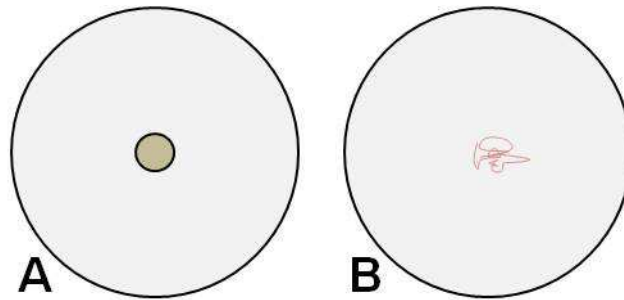


Abbildung 69: Skizze eines Bioassays A = mit einem Extrakt, B = mit einem Stamm, der in der Mitte inokuliert wurde.

Die zweite Platte stellt die Kontrollplatte dar und wird im Fall des inokulierten Stammes nicht weiter behandelt. Wird ein Extrakt getestet, der nicht Wasser als Lösungsmittel enthält, muss das gleiche Volumen des Lösungsmittels in das Loch der zweiten Platte gegeben werden, um einen hemmenden Effekt durch das Lösungsmittel ausschließen zu können.

6.3.14 Sammeln von Duftstoffen

6.3.14.1 Festphasenmikroextraktion (SPME) von Flüssigkulturen

Soll der Duft von Flüssigkulturen gesammelt werden, kann die SPME (Kapitel 6.1.7, S. 92) verwendet werden.

2 ml Flüssigkultur werden in ein 4 ml Vial mit einem Septum in der Verschlusskappe gefüllt. Die SPME-Faser wird in ihrem Halter durch das bereits vorgestochene Septum gesteckt und mit einer Klemme an einem Stativ

befestigt. Um die Sammlung zu beginnen muss die Faser anschließend ausgefahren werden (Abbildung 70).



Abbildung 70: A = SPME-Halter mit integrierter SPME-Faser; B = Aufbau für das Sammeln von Duftstoffen mittels SPME.

Die Länge der Inkubation im Gasraum des Vials liegt im Durchschnitt bei 1 h - 24 h, abhängig von der Menge der emittierten Verbindungen.

6.3.14.2 SPME von Streptomyceten-Kulturen einer Agarplatte

Für das Sammeln wird eine Platte mit einer Kultur verwendet, die schon mindestens zwei Tage alt ist, da sonst zu wenige Duftstoffe produziert werden. In die Petrischale muss in den Rand der Unterseite ein Loch gestochen werden. Die SPME wird durch das Loch geschoben (Abbildung 71).



Abbildung 71: Aufbau für das Sammeln von Duftstoffen mittels SPME von einer Agarplatte.

Die Länge der Inkubation in dem Gasraum des Vials hängt von der Menge der emittierten Verbindungen ab.

6.3.15 Trimethylsilylierung von Extrakten mit MSTFA

Viele Extrakte enthalten Verbindungen mit freien OH-Gruppen, Säure-Gruppen oder Aminen. Diese reagieren mit den meisten Phasen der GC-Säulen und müssen daher derivatisiert werden.

Materialien:

Extrakt in einem 2 ml Vial

50 µl *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA)

50 µl Ethylacetat

Arbeitsschritte:

Das Lösungsmittel des Extraktes wird im Argonstrom abgeblasen und zu 0,05 - 0,5 mg Probe 50 µl MSTFA (**75**) gegeben. Bei 40 °C wird der Ansatz eine Stunde geschüttelt (Abbildung 72). Nachdem das Vial abgekühlt ist, werden 50 µl Ethylacetat aufgefüllt und der Extrakt im GC-MS analysiert.

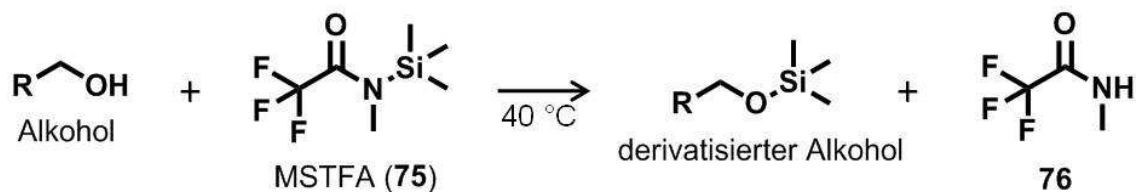


Abbildung 72: Trimethylsilylierung von freien OH-Gruppen mit MSTFA (**75**).

6.3.16 Oberflächensterilisation von Samen [245]

Für die Durchführung von Bioassays mit *Arabidopsis thaliana* müssen die Samen oberflächensterilisiert werden, damit Mikroorganismen das Wachstum der Pflanze nicht beeinflussen und damit den Versuch verfälschen.

Materialien:

Eppendorf Tube mit Samen

500 µl 95 %iger Ethanol

500 µl 50 % Bleichreagenz (Kapitel 6.2.3.3, S. 96)

4,0 ml steriles ddH₂O

Arbeitsschritte:

Die Arbeitsschritte werden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Samen werden 30 s - 60 s in Ethanol und 5 min - 6 min im Bleichreagenz gewaschen. Acht Waschschrirte mit Wasser à 2 min werden durchgeführt, um die Reagenzien zu entfernen. Zwischen den Schritten wird das Eppendorf Tube mit den Samen immer wieder zentrifugiert, damit der Überstand ausgetauscht werden kann.

6.4 Experimente

6.4.1 Identifizierung von Antibiotika isolierter Streptomyceten von *Acromyrmex* Blattschneiderameisen

6.4.1.1 Identifizierung von Stämmen die zu Blattschneiderameisen-Symbionten verwandt sind

Um die nächsten Verwandten der isolierten Streptomyceten zu identifizieren (Kapitel 3.1.1, S. 19), wurden ihre 16S rDNA-Sequenzen (Kapitel 6.3.3, S. 98) verwendet. Sie wurden genutzt um die Datenbanken „Greengenes“⁴⁷ und „NCBI“⁴⁸ mit dem Blast Algorithmus zu durchsuchen und mit den dort gespeicherten 16S rDNA-Sequenzen von anderen Actinomyceten zu vergleichen. Es wurden solche Treffer berücksichtigt, die eine Sequenzübereinstimmung von mehr als 98,5 % zu den isolierten Stämmen aufwiesen. Die erhaltenen Informationen der nah verwandten Streptomyceten wurden für die Suche nach antibakteriellen und antifungalen Sekundärmetaboliten, die von ihnen produziert werden, weiter verwendet. Dafür wurden die Datenbanken „SciFinder“⁴⁹ und „ISI Web of Knowledge“⁵⁰ für eine Literatursuche genutzt. Es wurden die Antibiotika ermittelt, die von den nah verwandten Streptomyceten aus der Blast-Suche produziert werden.

Für die Erstellung eines phylogenetischen Baumes wurden die 16S rDNA Sequenzen, die über „NCBI“ zugänglich sind, mit den 16S rDNA Sequenzen der isolierten Streptomyceten (Kapitel 6.3.3, S. 98) in dem Programm MEGA

⁴⁷ <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>

⁴⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

⁴⁹ Chemical Abstract Service, CAS

⁵⁰ www.isiknowledge.com

(Version 4) und der Neighbor-Joining-Methode⁵¹ (Bootstrap⁵² value, n = 1000) verglichen.

6.4.1.2 Antibiotika von Symbionten der Blattschneiderameisen

Um zu verifizieren, ob die Antibiotika, die in der Literatur für die zu den Symbionten nah verwandten Streptomycceten auch von den isolierten Streptomycceten-Symbionten produziert werden, wurden Extrakte von Flüssigkulturen der Symbionten hergestellt. Dafür wurden die Bakterien drei Tage in 30 ml Medium kultiviert (Kapitel 6.3.11.1, S. 111) und als Methanol Extrakte aufgearbeitet (Kapitel 6.3.12, S. 112).

Für die LC-MS-Analysen wurden 15 µl Extrakt injiziert, aufgetrennt und gemessen (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90). Für hochauflösende Messungen wurde ein LTQ Orbitrap mit ESI Quelle genutzt (Kapitel 6.1.1.2, S. 90). Für die Identifizierung der Antibiotika wurden kommerziell erhältliche Standards als Referenzsubstanzen sowie die hochaufgelösten Massenspektren verwendet.

Mit Hilfe einer externen Kalibrationsgeraden (Abbildung 89 bis Abbildung 91, S. 176 und 177) wurden drei Methanol-Extrakte quantitativ auf ihren Antibiotikagehalt hin untersucht, um die Größenordnung der Antibiotika-Menge in den Streptomycceten-Kulturen abschätzen zu können. Es ergaben sich die folgenden Werte: Eine drei Tage alte Kultur von *Streptomycces* Av 25_2 enthält zusammen 92 nmol/ml Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**). *Streptomycces* Av 25_6 produziert nach drei Tagen 74 nmol/ml Valinomycin (**13**) und Valinomycin Derivate. Die Antimycine A₁ - A₄ (**9 - 12**), die von *Streptomycces* Ao 10 ins Medium abgegeben werden, erreichen nach drei Tagen 207 nmol/ml.

Für die Isolierung von Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) wurden drei Mal 200 ml Kultur des *Streptomycces* Av 25_2 über drei Tage (Kapitel 6.3.11.1, S. 111) kultiviert. Die gelben Kulturen wurden mit je 200 ml Ethylacetat extrahiert, die Phasen in einer Zentrifuge getrennt und die Ethylacetat Phasen eingengt. Durch Normalphasen-Säulenchromatographie (50 cm x 4 cm,

⁵¹ Neighbor-Joining-Algorithmus = mathematisches Verfahren, um Datensätze zu vergleichen und hierarchisch zweigabelig anzuordnen

⁵² Bootstrapping = Methode des Resampling- es werden wiederholt Statistiken auf der Grundlage lediglich einer Stichprobe berechnet

Kapitel 6.1.6, S. 92) wurde der in 1 ml Ethylacetat resuspendierte Extrakt vorgetrennt. Als mobile Phase wurde 1 l Ethylacetat und schließlich 1 l Methanol genutzt. Alle 17 gesammelten Fraktionen wurden eingengt und in Methanol anhand von Agardiffusionsassays (Kapitel 6.3.13, S. 113) auf ihre Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* getestet. Fraktion 15 und 16 zeigten Aktivität, wurden vereint und durch semipräparative HPLC (Methode A⁵³, Säule 3, Kapitel 6.1.2, S. 90) aufgereinigt. Bei einer Flussrate von 3 ml/min wurden Fraktionen im Abstand von 30 s gesammelt. Beim erneuten Aktivitätstest gegenüber *B. subtilis* zeigte Fraktion 4 (Delay von 20 min) die höchste Aktivität. Aus den gesammelten 42 ml konnten 15 mg Reinsubstanz gewonnen werden.

Actinomycin D (14)

Summenformel: C₆₂H₈₇N₁₂O₁₆

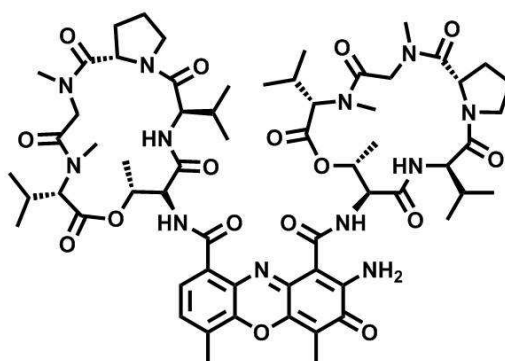
Retentionszeit: 24,8 min
(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

UV nm
Max: 216, 442

HR-ESI-MS m/z [M+H]⁺
Gemessen: 1255,6353
Berechnet: 1255,6363

ESI-MS m/z (%)
[M+H]⁺ 1255(100)

ESI-MS/MS von [M+H]⁺: 1255,50; Kollisionsenergie 40 %; m/z (%)
1228(13), 1142(70), 1124(11), 956(63), 928(100), 857(73), 843(13), 745(12),
629(11), 558(27), 530(28), 459(37)



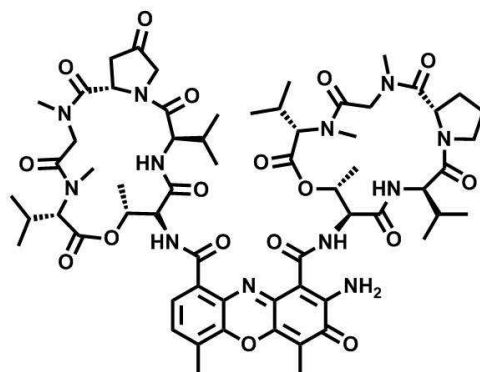
Actinomycin D (14)

Actinomycin X₂ (15)

Summenformel: C₆₂H₈₅N₁₂O₁₇

Retentionszeit: 25,2 min
(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

UV nm
Max: 220, 444



Actinomycin X₂ (15)

⁵³ Laufmittel ohne Säurezugabe, Methanol statt Acetonitril

HR-ESI-MS m/z $[M+H]^+$

Gemessen: 1269,6143

Berechnet: 1269,6156

ESI-MS m/z (%) $[M+H]^+$ 1269(100)ESI-MS/MS von $[M+H]^+$: 1269,50; Kollisionsenergie 40 %; m/z (%)

1251(40), 1156(100), 1043(18), 970(22), 928(50), 871(48), 857(35), 797(10), 758(24), 687(17), 502(11), 459(29), 387(17), 359(12)

Valinomycin-28 amu [87]

Summenformeln:

 NH_4^+ -Komplex: $C_{52}H_{90}N_7O_{18}$ K^+ -Komplex: $C_{52}H_{86}N_6O_{18}K$

Retentionszeit: 41,5 min

(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

HR-ESI-MS m/z $[M+NH_4]^+$

Gemessen: 1100,6338

Berechnet: 1100,6342

 $[M+K]^+$

Gemessen: 1121,5621

Berechnet: 1121,5630

ESI-MS m/z (%) $[M+NH_4]^+$ 1100(100)ESI-MS/MS von $[M+NH_4]^+$: 1100,50; Kollisionsenergie 35 %; m/z (%)

668(68), 441(100), 376(53), 331(85)

Valinomycin-14 amu [87]

Summenformeln:

 NH_4^+ -Komplex: $C_{53}H_{92}N_7O_{18}$ K^+ -Komplex: $C_{53}H_{88}N_6O_{18}K$

Retentionszeit 43,6 min

(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

HR-ESI-MS m/z $[M+NH_4]^+$

Gemessen: 1114,6499

Berechnet: 1114,6493

[M+K]⁺

Gemessen: 1135,5776

Berechnet: 1135,5787

ESI-MS *m/z* (%)[M+NH₄]⁺ 1114(100)ESI-MS/MS von [M+NH₄]⁺: 1114,60; Kollisionsenergie 35 %; *m/z* (%)

560(51), 528(56), 505(49), 483(49), 441(99), 427(52), 397(52), 331(100)

Valinomycin (13)

Summenformeln:

NH₄⁺-Komplex: C₅₄H₉₄N₇O₁₈K⁺-Komplex: C₅₄H₉₀N₆O₁₈K

Retentionszeit: 46,3 min

(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

HR-ESI-MS *m/z*[M+NH₄]⁺

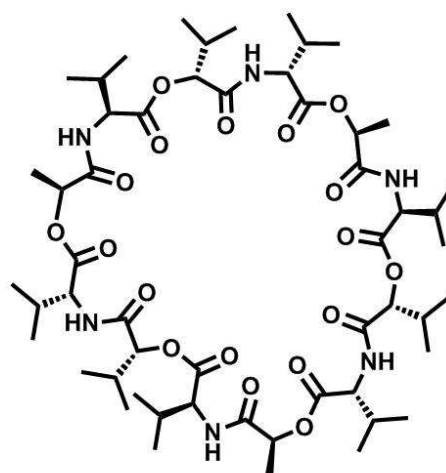
Gemessen: 1128,6658

Berechnet: 1128,6650

[M+K]⁺

Gemessen: 1149,5936

Berechnet: 1149,5949



Valinomycin (13)

ESI-MS *m/z* (%)[M+NH₄]⁺ 1128(100)ESI-MS/MS von [M+NH₄]⁺: 1128,80; Kollisionsenergie 35 %; *m/z* (%)

1121(53), 987(63), 754(64), 743(51), 613(48), 518(61), 441(77), 331(100)

Valinomycin+14 amu [87]

Summenformeln:

NH₄⁺-Komplex: C₅₅H₉₄N₇O₁₈K⁺-Komplex: C₅₅H₉₀N₆O₁₈K

Retentionszeit: 49,7 min

(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

HR-ESI-MS *m/z*[M+NH₄]⁺

Gemessen: 1142,6808

Berechnet: 1142,6806

[M+K]⁺

Gemessen: 1163,6087

Berechnet: 1163,6100

ESI-MS m/z (%)

$[M+NH_4]^+$ 1142(100)

ESI-MS/MS von $[M+NH_4]^+$: 1142,70; Kollisionsenergie 35 %; m/z (%)

960(88), 884(82), 830(87), 809(80), 527(82), 441(99), 331(100)

Antimycin A₁ (9)

Summenformel: C₂₈H₄₁O₉N₂

Retentionszeit: 29,0 min

(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

UV nm

Max: 224, 320, 360, 380, 404

HR-ESI-MS m/z $[M+H]^+$

Gemessen: 549,2805

Berechnet: 549,2812

ESI-MS m/z (%)

$[M+H]^+$ 549(100)

ESI-MS/MS von $[M+H]^+$: 549,00; Kollisionsenergie 40 %; m/z (%)

543(18), 532(11), 490(25), 464(22), 444(29), 434(11), 414(13), 285(46), 265(99), 237(100), 183(45)

Antimycin A₂ (10)

Summenformel: C₂₇H₃₉O₉N₂

Retentionszeit: 28,0 min

(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

UV nm

Max: 224, 320, 360, 382, 404

HR-ESI-MS m/z $[M+H]^+$

Gemessen: 535,2651

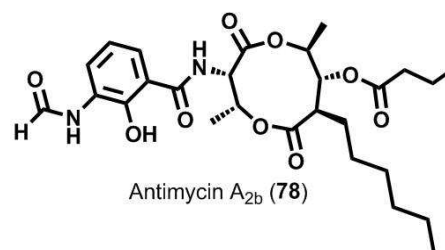
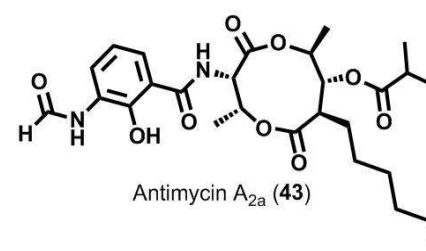
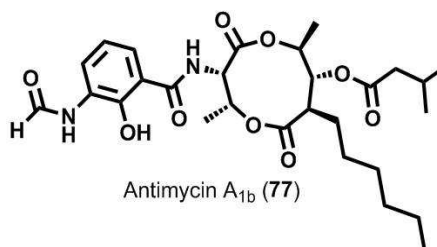
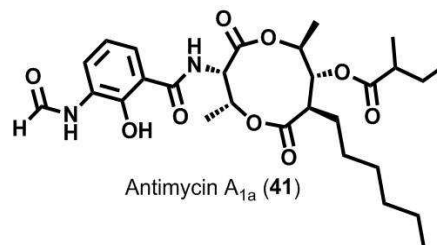
Berechnet: 535,2656

ESI-MS m/z (%)

$[M+H]^+$ 535(100)

ESI-MS/MS von $[M+H]^+$: 534,90; Kollisionsenergie 40 %; m/z (%)

517(20), 265(100), 237(30), 232(14), 183(10)



Antimycin A₃ (11)Summenformel: C₂₆H₃₇O₉N₂Retentionszeit: 27,0 min
(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)UV nm

Max: 222, 362, 382, 404

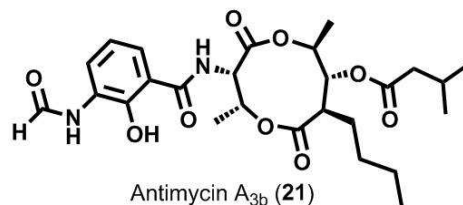
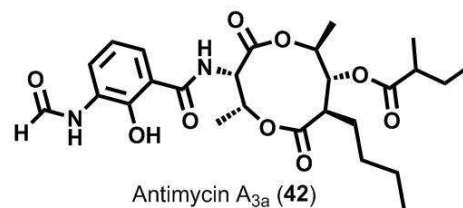
HR-ESI-MS *m/z* [M+H]⁺

Gemessen: 521,2493

Berechnet: 521,2500

ESI-MS *m/z* (%)[M+H]⁺ 521(100)ESI-MS/MS von [M+H]⁺: 520,90; Kollisionsenergie 40 %; *m/z* (%)

521(100), 504(28), 289(32), 283(40), 265(60), 257(15), 237(67), 155(25)

**Antimycin A₄ (12)**Summenformel: C₂₅H₃₅O₉N₂.Retentionszeit: 26,0 min
(Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)UV nm

Max: 222, 362, 382, 404

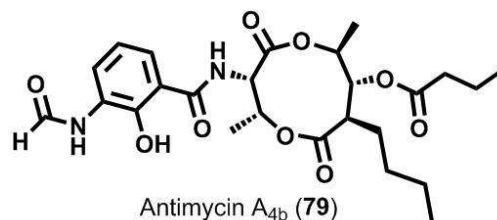
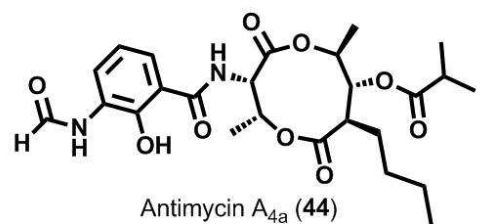
HR-ESI-MS *m/z* [M+H]⁺

Gemessen: 507,2342

Berechnet: 507,2343

ESI-MS *m/z* (%)[M+H]⁺ 507(100)ESI-MS/MS von [M+H]⁺: 506,90; Kollisionsenergie 40 %; *m/z* (%)

506(20), 463(14), 315(14), 265(100), 242(16), 237(51), 155(24)

**6.4.2 Aktivität von identifizierten Antibiotika der Symbionten auf Mikroorganismen des Ökosystems der Blatt-schneiderameisen**

Die Aktivität der in Kapitel 6.4.1.2 (S. 118) beschriebenen Antibiotika wurde in Agardiffusionsassays (Kapitel 6.3.13, S. 113) getestet. Die Antimycine A₁ - A₄ (9 - 12) wurden mit einer Konzentration von 5,5 nmol - 550 nmol, Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15) mit 2,4 nmol - 240 nmol und Valinomycin (13) mit

2,7 nmol - 270,0 nmol verwendet (Tabelle 6, S. 173). Nachfolgend sind die in den Bioassays verwendeten Mikroorganismen tabellarisch aufgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: In den Bioassays verwendete Mikroorganismen, Pathogene des Gartenpilzes der Ameisen = blau, Insektenpathogene = rot, aus dem Nest der Blattschneiderameisen isolierte Mikroorganismen = orange [59, 60], Blattschneiderameisen-Symbionten = grün.

<u>Pilze</u>		<u>Bakterien</u>		<u>Hefen</u>	
Name	Nummer	Name	Nummer	Name	Nummer
<i>Beauveria bassiana</i>	FSU 5084	<i>Streptomyces Av 25_4</i>	Isolat	<i>Phialophora fastigiata</i>	DSM 2692
<i>Metarhizium anisopliae</i>	DSM 1490	<i>Streptomyces Av 25_2</i>	Isolat	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Netto/Plus)
<i>Cordyceps militaris</i>	DSM 1153	<i>Streptomyces Av 25_6</i>	Isolat		
<i>Fusarium decemcellulare</i>	No 27	<i>Streptomyce Ao 10</i>	Isolat		
<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Isolat	<i>Pseudonocardia Ao 1</i>	Isolat		
<i>Escovopsis weberi</i>	CBS 110660	<i>Pseudonocardia Av 30</i>	Isolat		
<i>Trichoderma harzianum</i>	DSM 63059	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10		
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	DSM 859				

Um die synergistische Wirkung der identifizierten Antibiotika gegen *E. weberi* zu testen, wurden Konzentrationen von 2,4 nmol - 5,8 nmol verwendet (Tabelle 7, S 174). Die Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12) und Candicidin D (6), wurden dabei in subinhibitorischen Konzentrationen gegenüber dem Wachstum von *E. weberi* appliziert. Die Bioassays wurden jeweils mit drei Replikaten durchgeführt.

6.4.3 Direkter Nachweis der von Actinomyceten-Symbionten identifizierten Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen

Für den Nachweis der identifizierten Antibiotika im Ökosystem der Blattschneiderameisen wurden Proben des Gartenpilzes der Ameisen, *L. gongylophorus* (0,6 g – 32 g Frischgewicht) und des separat aufbewahrten Abfalls (0,6 g - 1,4 g Frischgewicht) von *Acromyrmex niger* und *Acromyrmex echinator* mit 10 ml - 300 ml Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde

eingeeengt, in 0,2 ml - 2,5 ml Methanol aufgenommen und mittels LC-MS (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90) nach Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Antimycinen A₁ – A₄ (**9** - **12**) und Valinomycin (**13**) durchsucht. Die Konzentrationen in den Extrakten wurden durch Peakflächen-Vergleich extern erstellter Kalibrationsgeraden ermittelt (Abbildung 89 und Abbildung 90, S. 176). Es wurden Valinomycin (**13**) und Actinomycin X₂ (**15**) gefunden.

Die MALDI-Imaging-Messungen wurden von Manoj Ghaste aus dem Labor von Prof. M. Spiteller der TU Dortmund durchgeführt. Jede einzelne Blattschneiderameise wurde auf einem Träger fixiert und mit einer α -Cyano-4-hydroxymethylsäure [233] Matrix-Lösung (Kapitel 6.2.3.2, S. 96) besprüht. Die Probe wurde mit einem Laser beschossen und die entstandenen Ionen mittels hochauflösender Massenspektrometrie detektiert (Kapitel 6.1.1.3, S. 90). Die Messungen wurden mit mehreren *A. echinator* Individuen in unterschiedlichen Wachstumsstadien durchgeführt. Es wurde direkt mit der Ionenspur nach Antimycinen A₁ – A₄ (**9** - **12**), Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), Candicidin D (**6**) und Valinomycin (**13**) gesucht. Es wurde Valinomycin (**13**) detektiert.

Um die Menge an Valinomycin (**13**) auf dem Exoskelett der Blattschneiderameisen abschätzen zu können, wurde eine Konzentrationsreihe des Antibiotikums auf einen Träger gegeben und unter identischen Konditionen gemessen.

6.4.4 Antifungale Aktivität im Abfall von Blattschneiderameisen

Die Abfall-Proben (20 g – 200 g) wurden von Dr. R. Wirth der TU Kaiserslautern aus Ameisenkolonien von *Atta colombica*, *Atta sexdens*, *Acromyrmex echinator* und *Acromyrmex niger* entnommen. Der Abfall wurde extrahiert, indem er über Nacht im gleichen Volumen Ethylacetat gerührt, dann über Glaswolle und anschließend durch einen Papierfilter filtriert wurde. Die Ethylacetat-Extrakte der Abfallproben wurden anhand von Agardiffusionsassays gegen die Pilze *Fusarium decemcellulare*, *Escovopsis weberi* und *Cordyceps militaris* getestet. Eine wachstumshemmende Wirkung der Extrakte von *A. echinator* gegen

C. militaris wurde festgestellt. Der aktive Ethylacetat-Extrakt wurde eingengt und über Nacht durch ständiges Rühren in Wasser (2 ml – 20 ml) resuspendiert. Die zwei entstandenen Phasen wurden durch Zentrifugation in einem Falcon Tube voneinander getrennt. Nur die wässrige Phase zeigte im Agardiffusionsassay (Kapitel 6.3.13, S. 113) Aktivität gegen *C. militaris*. Der Wasserextrakt wurde lyophilisiert und in Methanol (0,2 ml – 2 ml) gelöst. Die Aktivität des Extraktes wurde durch einen erneuten Agardiffusionsassay gegen *C. militaris* überprüft.

Durch Größenausschlusschromatographie (29 cm x 1,4 cm, Sephadex LH-20-Phase) wurde der Methanol-Extrakt aufgetrennt. Die mobile Phase bestand ausschließlich aus Methanol. Die gesammelten 4 ml Fraktionen wurden erneut im Agardiffusionsassay auf ihre Aktivität getestet. Fraktion 4 zeigte nach einer Wiederholung reproduzierbare Aktivität.

Für eine weitere Auftrennung des Extraktes wurde eine Adsorptionschromatographie (29 cm x 1,4 cm, Diaion HP-2MG-Phase) durchgeführt und mit Methanol eluiert. Die 4 ml Fraktionen wurden gegen *C. militaris* getestet, wobei die Fraktionen 13 - 15 Aktivität zeigten.

6.4.5 Entwicklung einer Methode für den Nachweis der Aufnahme von Actinomyceten durch Blattschneiderameisen

6.4.5.1 Konstruktion eines Plasmids für eine Fluoreszenzmarkierung von Actinomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen

Als Grundgerüst des Plasmids, für das Markieren der von Blattschneiderameisen isolierten Streptomyceten und *Pseudonocardia* wurde das Plasmid pIJ8655 [125] verwendet (Abbildung 73). Da der Futterpilz der Blattschneiderameisen in der gleichen Wellenlänge autofluoresziert wie das EGFP⁵⁴, musste dieses gegen das Gen eines Proteins ausgetauscht werden, das eine andere Wellenlänge emittiert, damit das Plasmid für die Markierungsexperimente genutzt werden konnte.

⁵⁴ EGFP = enhanced green fluorescent protein

Das Plasmid pIJ8655 wurde aus einer (Kapitel 6.2.1.2, S. 93, 100 µg/ml Apramycin, LB-Medium) Über-Nacht-Kultur von DH5α-*E. coli*-Zellen⁵⁵ isoliert (Kapitel 6.3.9.1, S. 107).

Das EGFP codierende Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NdeI* (Kapitel 6.3.7.1, S. 103) aus dem Plasmid pIJ8655 herausgeschnitten und der Vektor direkt dephosphoryliert (Kapitel 6.3.7.2, S. 104).

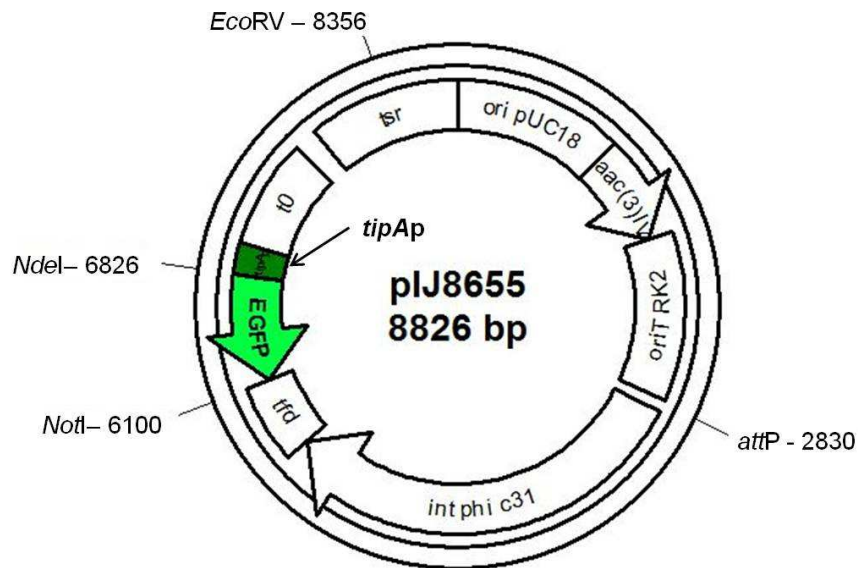


Abbildung 73: Vektorkarte des Plasmids pIJ8655 [125] mit den genutzten Schnittstellen *NotI*, *NdeI*, *EcoRV*; hellgrün = EGFP codierendes Gen; dunkelgrün = Thiostrepton induzierbarer *tipAp* Promotor; *to* = Transkriptionsterminator; *tsr* = Thiostrepton Resistenz Gen; *ori pUC18* = Replikationsursprung von pUC18; *aac(3)IV* = Apramycin Resistenz Gen, selektierbar in Streptomyceten und *E. coli*; *oriT RK2* = Transferursprung des Plasmids RK2; *int ΦC31* und *attP* = Integrase Gen und Anlagerungsstelle der „temperate phage“ ΦC31; *tfd* = Haupttranskriptionsterminator des Phagen fd.

Nachdem sichergestellt wurde, dass weder der Futterpilz der Blattschneiderameisen, noch die Ameisen selber rosa autofluoreszieren, wurde mCherry [126] als EGFP-Ersatz festgelegt. Das Protein wird bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 587$ nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 610$ nm. Das Plasmid pFPV-mCherry⁵⁶ [246] wurde als Grundlage für eine PCR verwendet, um das mCherry codierende Gen zu amplifizieren und gleichzeitig die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NotI* und *NdeI* an jeweils einem Ende des Gens einzufügen.

⁵⁵ zur Verfügung gestellt von Prof. Mervyn Bibb, John Innes Centre, Norwich, England

⁵⁶ zur Verfügung gestellt von Prof. Roger Tsien, University of California, San Diego, USA

Materialien:

1 µl Primer mCherry_rev (100 pM)
 1 µl Primer mCherry_for (100 pM)
 3 µl dNTP's (25 mM)
 10 µl HF-Puffer (mit 7,5 mM MgCl₂)
 40 ng pFPV-mCherry
 33 µl steriles ddH₂O
 1 µl Phusion Polymerase (2 u/µl, New England BioLabs, NEB)
 50 µl Gesamtvolumen

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	98	30	1
Denaturierung	98	10	30
Primerhybridisierung	70,7	60	
Elongation	72	30	
Finale Elongation	72	600 (10 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

mCherry_rev (5'→3'): **CGT AGC GGC CGC** TCA CTT GTA CAG CTC

T_m: 71,0 °C

mCherry_for (5'→3'): **TTA GCA TAT GGT** GAG CAA GGG CGA GGA

T_m: 66,5 °C

Fragmentgröße: 710 bp

Nachdem der PCR-Ansatz aufgereinigt (Kapitel 6.3.5, S. 101) und das 710 bp große DNA-Fragment isoliert wurde, konnte das Insert direkt in den pJet1.2 Vektor (Fermentas) ligiert (Kapitel 6.3.6, S. 102) und nach der Sequenzierung⁵⁷ auf seine Richtigkeit überprüft werden.

Das Plasmid pIJ8655 wurde mit dem mCherry codierenden Gen ligiert und in *E. coli*-Zellen kloniert (Kapitel 6.3.7.3 bis 6.3.8.2, S. 104 bis 107). Das pIJ8655-mCherry Konstrukt wurde mit **NotI** und **NdeI** (Kapitel 6.3.7.3 und 6.3.7.4, S. 104

⁵⁷ durchgeführt von der Firma Eurofins MWG Operon

und 105) verdaut, um anhand der Fragmentgrößen der DNA sicherzustellen, dass das gewünschte Plasmid hergestellt wurde.

Der *tipAp* Promotor⁵⁸ des pIJ8655 Plasmids exprimiert das Enzym mCherry in dem konstruierten Plasmid nur, wenn er mit Thiostrepton induziert wurde. Daher wurde der Promotor ebenfalls ausgetauscht. Hierfür wurde das Plasmid pIJ4090⁵⁹ [8] mit dem konstitutiv exprimierenden Promotor *ermE**p aus *Streptomyces erythraeus* genutzt. [127] Das Plasmid wurde in *Streptomyces lividans* TK24 erhalten. Der Stamm wurde über vier Tage in 10 ml LB-Medium (Kapitel 6.2.1.2, S. 93) mit 100 µg/ml Thiostrepton kultiviert und das Plasmid anschließend isoliert (Kapitel 6.3.9.2 S. 108). Analog zur Gewinnung des mCherry codierenden Gens, wurde eine PCR durchgeführt. Die Primer wurden so konstruiert, dass die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NdeI* und *EcoRV* an jeweils einem Ende des Gens angefügt wurden.

Materialien:

1 µl Primer *ermE**p_rev (100 pM)

1 µl Primer *ermE**p_for (100 pM)

3 µl dNTP's (von 25 mM)

10 µl GC-Puffer (mit 7,5 mM MgCl₂)

1 µl Plasmid pIJ4090 (50,5 ng)

1 µl DMSO

1 µl MgCl₂ (50 mM)

31,5 µl steriles ddH₂O

1 µl Phusion Polymerase (2 u/µl, New England BioLabs, NEB)

50 µl Gesamtvolumen

⁵⁸ Promotor = Nukleotid-Sequenz auf der DNA, ermöglicht regulierte Expression eines Gens

⁵⁹ zur Verfügung gestellt von Prof. Mervyn Bibb, John Innes Centre, Norwich, England

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	98	30	1
Denaturierung	98	30	30
Primerhybridisierung	60	45	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	600 (10 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

*ermE**p_rev (5'→3'): **CAT ATG** ACC AAC CGG CAC GA

T_m: 59,4 °C

*ermE**p_for (5'→3'): **GAT ATC** AGC CCG ACC CGA GCA

T_m: 63,7 °C

Fragmentgröße: 278 bp

Analog zur Konstruktion des pIJ8655-mCherry Plasmids wurde das konstitutiv mCherry-exprimierende, in die *attP*-Stelle integrierende Plasmid pISkR (Abbildung 25, S. 42) erhalten.

6.4.5.2 Konjugation des Plasmids pISkR in Streptomyceten und *Pseudonocardia*-Symbionten

Das Plasmid pISkR wurde in verschiedene Streptomyceten-Stämme konjugiert (Kapitel 6.3.10, S. 108). *Streptomyces coelicolor* A3(2), von dem bekannt ist, dass er die entsprechende *attP*-Stelle im Genom enthält, wurde als Positivkontrolle genutzt. [125] Für die Konjugation wurden verwendet: *Streptomyces* Av 25_6 (Valinomycin (**13**)), *Streptomyces* Av 25_2 (Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**)), *Streptomyces* Ae 32_2, ein Isolat aus dem Pilzgarten von *Acromyrmex echinatio*r (Antimycine A₁ – A₂ (**9** – **12**) und Candicidin D (**6**)), *Pseudonocardia* Ao 1 und *Pseudonocardia* Ao 30.

Durch Fluoreszenzmikroskopie⁶⁰ (Kapitel 6.1.9, S. 92) wurde sichergestellt, dass die Integration des Plasmids in das Genom der Actinomyceten erfolgt ist.

⁶⁰ Leica LMD, Fluoreszenzfilter, B/G/R, 4x Vergrößerung

6.4.5.3 Erste Versuche zur Aufnahme der Actinomyceten-Symbionten durch Blattschneiderameisen

Für die Versuche mit den markierten Actinomyceten (Kapitel 6.4.5.2, S. 130), wurde die Blattschneiderameise *A. echinator*⁶¹ genutzt. Der Versuchsaufbau bestand aus zwei mit einem Schlauch verbundenen Plastikbehältern. In die Mitte des Schlauches wurden 10 µl einer Sporen-Mischung der vier markierten Actinomyceten (*S. coelicolor* A3(2), *Streptomyces* Ae 32_2, *Streptomyces* Av 25_6, *Pseudonocardia* Ao 1) appliziert. Nach sechs Tagen wurden Proben der Ameisen und des Gartenpilzes der Ameisen entnommen und je auf eine Agarplatte gelegt. Die Proben wurden über die Agarplatte verteilt, indem die Platte vorsichtig hin und her gekippt wurde. Anschließend wurden die Platten bei 28 °C drei Tage inkubiert. Die Agarplatten wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop⁶² (Kapitel 6.1.9, S. 92) untersucht (Abbildung 143, S. 209).

6.4.6 Produktion von Antimycinen

*Streptomyces odorifer*⁶³ wurde für die Analyse der Antimycine in SFM-Medium kultiviert (Kapitel 6.3.11.1, S. 111) und anschließend mit Ethylacetat extrahiert (Kapitel 6.3.12, S. 112). Der Extrakt wurde im Argonstrom eingetrocknet, in 200 µl Methanol aufgenommen, per LC-MS aufgetrennt und vermessen (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90). Die Quantifizierung der Antimycine A₁ – A₄ (9 - 12) erfolgte durch einen Vergleich der Peakflächen der gemessenen UV-Absorption bei 230 nm gegenüber einer externen Kalibrationsgeraden (Abbildung 91, S. 177; Tabelle 11, S. 181). Genauso wurde für die Untersuchung der Produktionsmenge der einzelnen Antimycine A₁ - A₄ (9 - 12) sowie für den Vergleich von Antimycin A₃ (11) und Antimycin-563 verfahren (Tabelle 12, S. 182).

Die CFU⁶⁴ wurde durch die Entnahme von 10 µl Kultur etwa alle 24 Stunden bestimmt. Die 10 µl wurden bis zu einem Endverhältnis von 1:10.000.000 mit sterilem Wasser verdünnt. 100 µl der 1:10.000.000 Verdünnung und der 1:10.000 Verdünnung wurden zwei Tage auf Agarplatten kultiviert (Kapitel

⁶¹ zur Verfügung gestellt von Dr. Rainer Wirth, TU Kaiserslautern, Deutschland

⁶² Leica LMD, Fluoreszenzfilter, B/G/R, 4x Vergrößerung

⁶³ DSM 40347

⁶⁴ CFU = colony forming unit

6.3.11.2, S. 112) und ausgezählt. Das Verdünnungsverhältnis bei Streptomyceten ist schlecht abzuschätzen und die Kolonien schwer zu vereinzeln. Daher sind die Messwerte mit großen Fehlerbalken behaftet. Der Trend des Zellwachstums konnte dennoch nachvollzogen werden (Abbildung 93, S. 179). Das Messen der OD₆₀₀, wie es bei *E. coli*-Kulturen für die Bestimmung des Wachstums genutzt wird, ist bei Streptomyceten nicht möglich. Die einzelnen Sporen aggregieren, wodurch keine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Kultur gegeben ist.

Antimycin-563

ESI-MS/MS von [M+H]⁺: 563; Kollisionsenergie 40 %; *m/z* (%)
393(21), 266(34), 265(100), 238(21), 237(80)

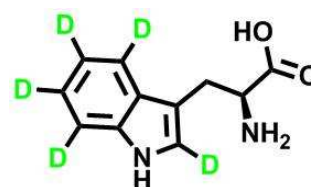
6.4.7 Biosynthese von Antimycinen

6.4.7.1 Untersuchungen zur Bildung der 3-Aminosalicylsäure-Einheit von Antimycinen

Verbindungen, die *S. odorifer*-Kulturen (SFM-Komplexmedium, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) verfüttert wurden, um die Biosynthese von Antimycinen zu untersuchen:

[²H₅]-L-Tryptophan (19)

Masse: M = 209 g/mol
Summenformel: C₁₁H₇²H₅N₂O₂
Einbaurrate⁶⁵: 28 %⁶⁶
Verfüttert: 1,2 μmol (250 μg) / 30 ml

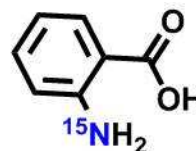


[²H₅]-L-Tryptophan (19)

ESI-MS/MS von [M+H]⁺: 523,9 ([²H₃]-Antimycin A₃) Kollisionsenergie 35 %; *m/z* (%)
268(100), 267(12), 240(28)

[¹⁵N]-Anthranilsäure (30)

Masse: M = 137 g/mol
Summenformel: C₇H₇¹⁵N₂O₂
Einbaurrate: 95 %
Verfüttert: 36 μmol (5 mg) / 30 ml



[¹⁵N]-Anthranilsäure (30)

⁶⁵ Vergleich der Peakflächen der [M+H]⁺-Ionen Spuren von markierten und unmarkierten Verbindungen

⁶⁶ Die geringe Einbaurrate kann dadurch erklärt werden, dass ein Komplexmedium für die Kultivierung verwendet wurde, in dem bereits unmarkiertes Tryptophan vorhanden ist

HR-ESI-MS m/z $[M+H]^+$ $[^{15}\text{N}]$ -Antimycin A₁:

Gemessen: 550,2775

Berechnet: 550,2777

 $[^{15}\text{N}]$ -Antimycin A₂:

Gemessen: 536,2617

Berechnet: 536,2620

 $[^{15}\text{N}]$ -Antimycin A₃:

Gemessen: 522,2464

Berechnet: 522,2464

 $[^{15}\text{N}]$ -Antimycin A₄:

Gemessen: 508,2310

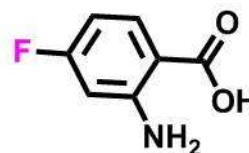
Berechnet: 508,2307

4-Fluoroanthranilsäure (31)

Masse: M = 155 g/mol

Summenformel: C₇H₆NO₂F

Einbaurrate: 75 %

Verfüttert: 32 μmol (5 mg) / 30 ml

4-Fluoroanthranilsäure (31)

HR-ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 5-F-Antimycin A₁:

Gemessen: 567,2717

Berechnet: 567,2712

5-F-Antimycin A₂:

Gemessen: 553,2559

Berechnet: 553,2556

5-F-Antimycin A₃:

Gemessen: 539,240

1

Berechnet: 539,2399

5-F-Antimycin A₄:

Gemessen: 525,2242

Berechnet: 525,2243

ESI-MS m/z (%) $[M+H]^+$ 525(100)ESI-MS/MS von $[M+H]^+$: 524,90; Kollisionsenergie 35 %; m/z (%)

283(100), 255(27), 243(27), 155(20)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm)

1,02-0,80 (m, 12H), 1,44-1,16 (m, 35H), 1,68-1,55 (m, 4H), 2,12-2,04 (m, 3H), 2,50-2,39 (m, 1H), 2,66-2,53 (m, 2H), 2,84-2,75 (m, 2H), 5,04-4,97 (m, 3H), 5,40-5,31 (m, 5H), 5,71-5,62 (m, 2H), 7,52 (dd, $J = 2,9$ Hz, $J = 9,2$ Hz, 1H), 8,22 (dd, $J = 2,9$ Hz, $J = 10,1$ Hz, 1H), 8,38 (s, CHO)

3-Fluoroanthranilsäure (32)

Masse: M = 155 g/mol
 Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2\text{F}$
 Einbaurrate: 95 %
 Verfüttert: 32 μmol (5 mg) / 30 ml



3-Fluoroanthranilsäure (32)

ESI-MS m/z (%)

4-F-Antimycin A₁: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 567(100)

4-F-Antimycin A₂: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 553(100)

4-F-Antimycin A₃: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539(100)

4-F-Antimycin A₄: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 525(100)

6-Fluoroanthranilsäure (33)

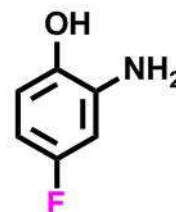
Masse: M = 155 g/mol
 Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}_2\text{F}$
 Einbaurrate: 0 %
 Verfüttert: 32 μmol (5 mg) / 30 ml



6-Fluoroanthranilsäure (33)

2-Amino-4-fluorophenol (39)

Masse: M = 127 g/mol
 Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_6\text{NOF}$
 Einbaurrate: 0 %
 Verfüttert: 24 μmol (3 mg) / 30 ml



2-Amino-4-fluorophenol (39)

Für die NMR-Aufnahmen des durch die Verfütterung von 4-Fluoroanthranilsäure (31) fluorierten Antimycins wurde 1 l *S. odorifer* kultiviert. Um eine möglichst hohe Ausbeute der markierten Verbindung zu isolieren, wurden insgesamt 165 mg (1,1 mmol) der 4-Fluoroanthranilsäure (31) zum Medium gegeben. Nach vier Tagen Kultivierung in fünf Erlenmeyerkolben à 200 ml wurde jeweils zwei Mal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugieren voneinander getrennt, die organischen Phasen vereint und bis

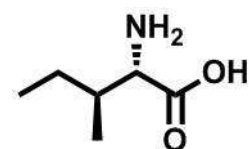
zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in insgesamt 3 ml Methanol aufgenommen und in einem Eppendorf Tube zentrifugiert. Die Methanol-Phase wurde mit LC-MS (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90) hinsichtlich des markierten 5-F-Antimycins analysiert. Der Rest des Extrakts wurde mit einer HPLC in 4 min Fraktionen aufgetrennt und gesammelt (Methode B, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90). Fraktion 7 (33 min – 36 min) enthielt die gewünschte Verbindung. Die eingetrocknete und in deuteriertem Methanol aufgenommene Fraktion (9 mg) wurde anschließend mittels NMR untersucht (Kapitel 8.6.5, S.193). Die unmarkierten Antimycine konnten nicht abgetrennt werden.

6.4.7.2 Verfütterungsstudien zur Aufklärung der Antimycin-Biosynthese

Der Einbau verschiedener Verbindungen in die Antimycine A₁ – A₄ (**9** - **12**) wurde anhand von *S. odorifer*-Flüssigkulturen (Kapitel 6.3.11.1, S. 111) in 100 ml Kolben untersucht. Nach drei Tagen wurden Methanol-Extrakte hergestellt (Kapitel 6.3.12, S. 112), und mit LC-MS aufgetrennt und vermessen (Methode A, Säule 1, Kapitel 6.1.2, S. 90). In Kapitel 6.4.7.2 (S. 135) sind die verwendeten Mengen der entsprechenden Verbindungen, die *S. odorifer* verfüttert wurden, aufgeführt. Die Versuche mit L-Valin (**46**) und L-Isoleucin (**45**) wurden in 6 ml SFM-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93) in einem Reagenzglas für sechs Tage kultiviert.

L-Isoleucin (**45**)

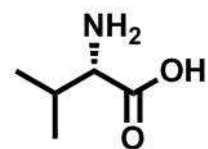
Masse: M = 131 g/mol
Summenformel: C₆H₁₃NO₂
Verfüttert: 13 µmol (1,71 mg) / 6 ml



L-Isoleucin (**45**)

L-Valin (**46**)

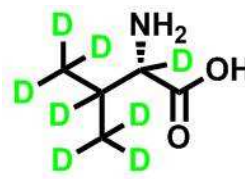
Masse: M = 117 g/mol
Summenformel: C₅H₁₁NO₂
Verfüttert: 15 µmol (1,71 mg) / 6 ml



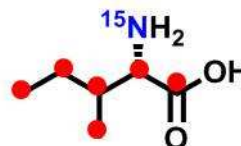
L-Valin (**46**)

[²H₈]-L-Valin (47)

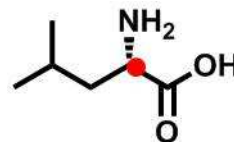
Masse:	M = 125 g/mol
Summenformel:	C ₅ H ₃ ² H ₈ NO ₂
Einbaurrate:	0 %
Verfüttert:	8 μmol (1 mg) / 6 ml

[²H₈]-L-Valin (47)**[¹³C₆, ¹⁵N]-L-Isoleucin (48)**

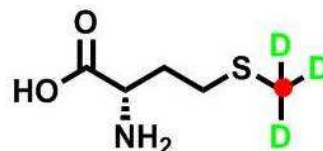
Masse:	M = 138 g/mol
Summenformel:	¹³ C ₆ H ₁₃ ¹⁵ NO ₂
Einbaurrate:	0 %
Verfüttert:	3,6 μmol (0,5 mg) / 6 ml

[¹³C₆, ¹⁵N]-L-Isoleucin (48)**[2-¹³C]-L-Leucin (49)**

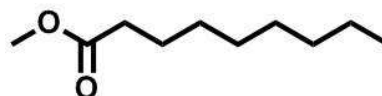
Masse:	M = 132 g/mol
Summenformel:	¹³ CC ₅ H ₁₃ NO ₂
Einbaurrate:	0 %
Verfüttert:	3,8 μmol (0,5 mg) / 6 ml

[2-¹³C]-L-Leucin (49)**[¹³C, ²H₃]-L-Methionin (50)**

Masse:	M = 153 g/mol
Summenformel:	C ₄ ¹³ CH ₈ ² H ₃ NO ₂ S
Einbaurrate:	0 %
Verfüttert:	2,6 μmol (0,4 mg) / 30 ml

[¹³C, ²H₃]-L-Methionin (50)**Nonansäuremethylester (51)**

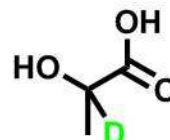
Masse:	M = 172 g/mol
Summenformel:	C ₁₀ H ₂₀ O ₂
Einbaurrate:	0 %
Verfüttert:	0,1 mmol (17,2 mg) / 30 ml



Nonansäuremethylester (51)

[²H]-Milchsäure (52)

Masse:	M = 91 g/mol
Summenformel:	C ₃ H ₄ ² H ₂ O ₃
Einbaurrate:	0 %
Verfüttert:	0,1 mmol (10 mg) / 30 ml

[²H]-Milchsäure (52)

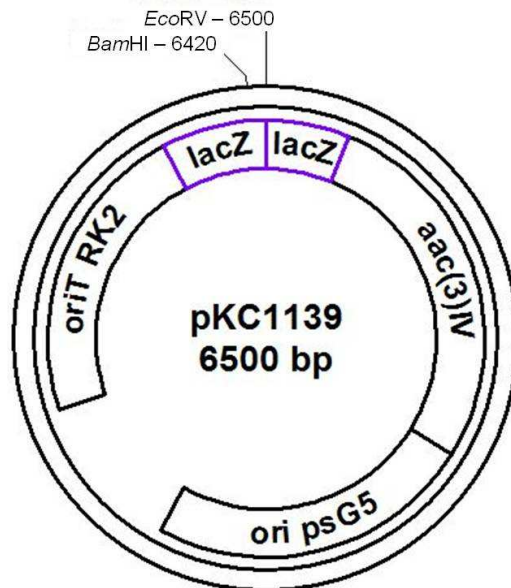


Abbildung 75: Karte des Vektors pKC1139; [164] *EcoRV*, *BamHI* = zu nutzende Schnittstellen; *lacZ* = Gen für die Expression einer Galaktosidase, nutzbar für die Blau / Weiß-Selektion; *aac(3)IV* = Apramycin Resistenzkassette, *ori psG5* = temperatursensitiver Replikationsursprung von psG5; *oriT RK2* = Transferursprung des Plasmids RK2.

Um eine „double crossover“ Mutagenese durchführen zu können, müssen zwei Flanken des Zielgens bzw. Clusters amplifiziert werden. Diese Stücke müssen innerhalb des Bereichs liegen, der inaktiviert werden soll. Um später diese Flanken zusammen mit der Resistenzkassette in das Plasmid ligieren zu können, müssen entsprechende Schnittstellen in die Primer für die Flanken integriert werden. So wurden für die linke Flanke Anti_L die Schnittstellen *NotI* und *BamHI* gewählt. Für die rechte Flanke Anti_R wurden *EcoRV* und *NheI* Schnittstellen in die Primer integriert.

Materialien:

- 1 µl Primer Anti_L_rev (100 pM)
- 1 µl Primer Anti_L_for (100 pM)
- 3 µl dNTP's (25 mM)
- 10 µl GC-Puffer (mit 7,5 mM MgCl₂)
- 500 ng DNA
- 2 µl DMSO
- 1 µl MgCl₂ (50 mM)
- 30,5 µl steriles ddH₂O
- 0,5 µl Phusion Polymerase (2 u/µl, New England BioLabs, NEB)
- 50 µl Gesamtvolumen

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	98	30	1
Denaturierung	98	30	30
Primerhybridisierung	75	45	
Elongation	74	45	
Finale Elongation	72	600 (10 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

Anti_L_rev⁶⁷ (5'→3'): **GCG GCC GCC** XXX XXX GGC GCG GTC C
 T_m: 89,9 °C

Anti_L_for⁶⁸ (5'→3'): **GGA TCC** XXX GGT GTC GAA XXX GAG GGC GAT
 CTC GGG XXX ACG GG
 T_m: 89,4 °C

Fragmentgröße: 1346 bp

Materialien:

1 µl Primer Anti_R_rev (100 pM)

1 µl Primer Anti_R_for (100 pM)

3 µl dNTP's (25 mM)

10 µl GC-Puffer (mit 7,5 mM MgCl₂)

500 ng DNA

2 µl DMSO

4 µl MgCl₂ (50 mM)

27,5 µl steriles ddH₂O

0,5 µl Phusion Polymerase (2u/µl, New England BioLabs, NEB)

50 µl Gesamtvolumen

⁶⁷ Die Sequenz der Primer wurde modifiziert, da die Daten noch nicht veröffentlicht sind

⁶⁸ Die Sequenz der Primer wurde modifiziert, da die Daten noch nicht veröffentlicht sind

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	98	30	1
Denaturierung	98	30	30
Primerhybridisierung	70,5	45	
Elongation	74	45	
Finale Elongation	72	600 (10 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

Anti_R_rev⁶⁹ (5'→3'): **GAT ATC** TTG XXX CGC GCC CGA XXX TCG CGT
CAC XXX

T_m: 85,5 °C

Anti_R_for⁷⁰ (5'→3'): **GCT AGC** XXX GCG CGC ACC XXX CCC ACG T

T_m: 85,4 °C

Fragmentgröße: 1345 bp

Bevor die Resistenzkassette *hygB* amplifiziert werden konnte, musste diese aus dem Plasmid pUCH2-8⁷¹ [247] (Abbildung 76) geschnitten, in den pJet1.2 Vektor (Fermentas) ligiert (pJet1.2_*hygB*), dieser dann in *E. coli* kloniert und schließlich sequenziert werden. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme *KpnI* und *HindIII* verwendet (Kapitel 6.3.7.3, 6.3.5 und 6.3.6, S. 104, 101-103). Es wurden Primer entworfen, die die Schnittstellen *BamHI*, *NotI* und *EcoRV*, *NheI* enthalten, um das gewünschte Fragment der Resistenzkassette aus dem pJet1.2 Vektor, mit den passenden Schnittstellen zu den Flanken, amplifizieren zu können. Die Fragmente Anti_L und Anti_R sollen anschließend hintereinander in den pJet1.2 Vektor, in dem die *hygB*-Kassette bereits mit den entsprechenden Schnittstellen (*BamHI*, *NotI* und *EcoRV*, *NheI*) integriert vorliegt, ligiert werden. Die zwei Schnittstellen *BamHI*, *EcoRV* wurden eingefügt, um die Sequenz später in das Plasmid pKC1139 ligieren zu können.

⁶⁹ Die Sequenz der Primer wurde modifiziert, da die Daten noch nicht veröffentlicht sind

⁷⁰ Die Sequenz der Primer wurde modifiziert, da die Daten noch nicht veröffentlicht sind

⁷¹ zur Verfügung gestellt von Prof. Dirk Hoffmeister, Hans-Knöll-Institut, Jena, Deutschland

Materialien:

- 1 µl Primer *hygB_rev* (100 pM)
- 1 µl Primer *hygB_for* (100 pM)
- 3 µl dNTP's (25 mM)
- 10 µl GC-Puffer (mit 7,5 mM MgCl₂)
- 128 ng DNA Plasmid pJet1.2_ *hygB*
- 1 µl DMSO
- 4 µl MgCl₂ (50 mM)
- 28,5 µl steriles ddH₂O
- 0,5 µl Phusion Polymerase (2 u/µl, New England BioLabs, NEB)
- 50 µl Gesamtvolumen

Methode:

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	98	30	1
Denaturierung	98	30	30
Primerhybridisierung	72,6	60	
Elongation	74	60	
Finale Elongation	72	600 (10 min)	1
Aufbewahren	4	Halten	

hygB_rev (5'→3'): **GAT ATC GCT AGC** GGC AGC AGC CTG CCC ATG AAA
AAG CCT GAA CTC

T_m: 84,8 °C

hygB_for (5'→3'): **GGA TCC GCG GCC GCA** CCA CAC CCG TCC TGT GGA
T_m: 89,4 °C

Fragmentgröße: 1374 bp

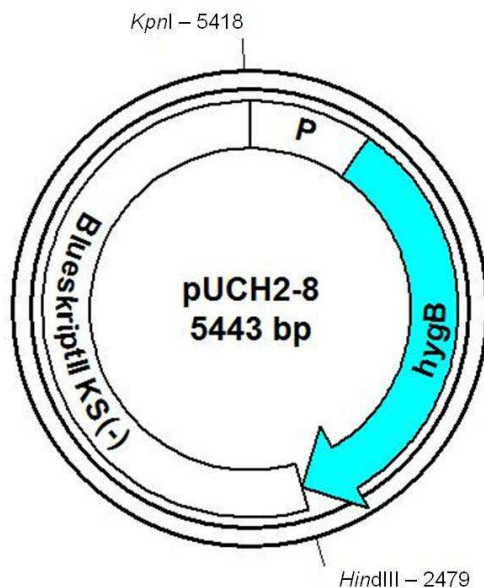


Abbildung 76: Vektorkarte des Plasmids pUCH2-8 [247] mit den verwendeten Schnittstellen *KpnI*, *HindIII*; P = Promotor, *hygB* = Hygromycin B-Resistenzkassette.

6.4.8 Stabilität und Wirkungsweise der Antimycine

Analyse der *S. odorifer*-Kulturen:

Der Duft der *S. odorifer*-Kulturen wurde, wie in Kapitel 6.3.14 (S. 114) beschrieben, gesammelt, im GC-MS (Kapitel, 6.1.1.1, S. 89) vermessen und analysiert. Die entsprechenden Methoden sind bei den aufgeführten Spektren der Duftstoffe angegeben. Ethylacetat-Extrakte wurden von drei Tage alten Kulturen angefertigt (Kapitel 6.3.11.1, S. 111).

Analyse der Antimycine:

Die Antimycin A₁ – A₄ (**9** – **12**) Abbauprodukte wurden durch Erhitzen von 1 mg Substanz in 500 µl Wasser in einem 4 ml Vial erhalten, anschließend innerhalb einer Stunde mittels SPME gesammelt und im GC-MS vermessen (Kapitel 6.3.14.1, S. 114). Alternativ wurden 0,5 mg der Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**) in 300 µl Ethylacetat direkt in das GC injiziert, wodurch die Antimycine A₁ – A₄ (**9** – **12**) in dem Injektor des GC's⁷² ebenfalls zerfielen. Der Standard des Laktone **64** wurde synthetisiert (Kapitel 6.4.8.1, S. 143).

⁷² Injektortemperatur = 280 °C

6.4.8.1 Synthese von (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (64)

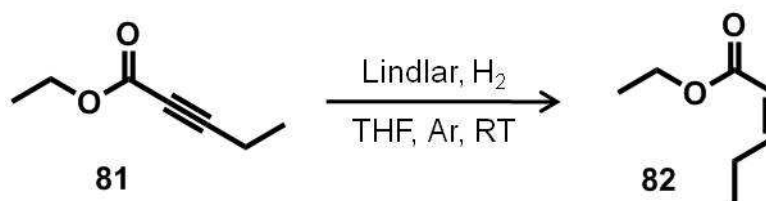
1. Stufe: Pent-2(E/Z)-enethylester (82)

Abbildung 77: Reaktionsschema der ersten Stufe der Synthese von (5S)-3-butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (64); *Syn*-Addition von H₂ an Pent-2-ynethylester (81) zu Pent-2(E/Z)-enethylester (82).

Der Versuchsaufbau der ersten Stufe wurde so konstruiert, dass die Apparatur vollständig evakuiert und für die zweite Stufe direkt weiter verwendet werden konnte. Ein äußerer Hals eines Dreihalskolbens wurde mit einem Argon/Vakuum-Anschluss verbunden und mit einem Rührfisch ausgestattet. An dem zweiten äußeren Hals wurde eine Umkehrfritte befestigt. Auf der anderen Seite der Fritte wurde dann ein mit einem weiteren Rührfisch ausgestatteter Zweihalskolben angebracht. Die beiden noch offenen Hälse der beiden Kolben wurden mit einem Septum verschlossen.

Die Apparatur wurde evakuiert, mit einem Heißluftfön ausgeglüht, mit Argon geflutet und abgekühlt. Durch das Septum des Zweihalskolbens, der am oberen Ende der Apparatur positioniert war, wurde ein mit Wasserstoff gefüllter Ballon gestochen. Um das Argon aus der Konstruktion zu verdrängen, wurde Vakuum gezogen und der Wasserstoff in den Geräten verteilt. Der Lindlar-Katalysator (100 mg) wurde nach dem schnellen Entfernen des Septums in den Ansatz gegeben. Mit einer Spritze wurde das bereits vorbereitete Gemisch aus Pent-2-ynethylester (81) (2 ml, 15,2 mmol) und trockenem THF (10 ml) durch das Septum in den Dreihalskolben gegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Aceton/Trockeneis-Gemisch auf -78 °C gekühlt und mit Alufolie vor Licht geschützt, um eine Racemisierung zu verhindern. Der Ansatz wurde acht Stunden gerührt und anschließend auf Raumtemperatur gebracht.

Nachdem das Edukt umgesetzt war, wurde die Apparatur um 180° gedreht, damit der Katalysator durch die Fritte abgetrennt werden konnte. Der Dreihalskolben der ersten Stufe wurde mit THF durchgespült. Durch das Anlegen von Vakuum an dem unteren Ventil der Fritte wurde die Filtration

beschleunigt. Die Fritte wurde nach der Filtration im kontinuierlichen Argonstrom von der Apparatur entfernt.

Ausbeute: Nicht bestimmt (*cis/trans*-Isomere: 20 % ee^{73})

EI-MS m/z (%)

M^+ : 128(100), 99(11), 83(34), 82(19), 79(11), 55(18), 53(12)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm)

1,06 (q, $J = 7,4$ Hz, 3H), 1,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 2,25-2,19 (m, 1H, *cis*), 2,68-2,62 (m, 1H, *trans*), 4,20-4,14 (m, 2H), 5,72 (dt, $J = 1,75$ Hz, $J = 11,6$ Hz, 0,5H, *cis*), 5,81 (dt, $J = 1,75$ Hz, $J = 15,6$ Hz, 0,5H, *trans*), 6,22-6,17 (m, 0,5H, *cis*), 7,04-6,98 (m, 0,5H, *trans*)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm)

13,6 ($\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$); 14,4 (CH_2CH_3); 22,6 (*cis*- $\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$); 25,4 (*trans*- $\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$); 59,9 (*cis*- CH_2CH_3); 60,3 (*trans*- CH_2CH_3); 119,3 (*cis*- $\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$); 120,5 (*trans*- $\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$); 150,8 (*cis*- $\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$); 152,0 (*trans*- $\text{CHCHCH}_2\text{CH}_3$)

IR (ZnS) $\tilde{\nu}$, cm^{-1} :

2978, 2876, 1723, 1631, 1462, 1370, 1199, 1034, 870, 796

2. Stufe: 2-Butyl-3(*E*)-pentenethylester (**83**) [248]

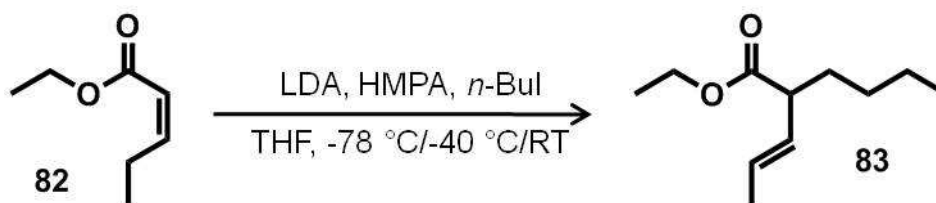


Abbildung 78: Reaktionsschema der zweiten Stufe der Synthese von (5*S*)-3-Butyl-5-methyl-2(5*H*)-furanon (**64**); Alkylierung des Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**) zu 2-Butyl-3(*E*)-pentenethylester (**83**).

In einem evakuierten, ausgeglühten, mit Rührfisch und einem Argon gefüllten Ballon ausgestatten Zweihalskolben wurde LDA (7,6 ml, 1,8M in THF) vorgelegt und auf -78 °C mit einem Aceton/Trockeneis-Gemisch herunter gekühlt. HMPA (2,7 ml, 1 eq., 15,2 mmol) wurde hinzugefügt und das Gemisch 30 min bei -78 °C gerührt. Der (Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**), 15,2 mmol), der in einem Zweihalskolben bereits in THF gelöst unter Argon vorlag, wurde in den Kolben mit der HMPA/LDA-Mischung getropft und 30 min bei -78 °C gerührt.

⁷³ Mit *cis*-Isomer im Überschuss

Das *n*-Bul (1,8 ml, 1 eq., 15,2 mmol) wurde in einem evakuierten und ausgeglühten Kolben unter Argonatmosphäre mit trockenem THF (12 ml) verdünnt, zum Reaktionsansatz getropft und bei -78 °C kontinuierlich über acht Stunden gerührt. Dann wurde die Mischung auf Raumtemperatur gebracht.

Der Reaktionsansatz wurde mit einem Eisbad bei 0 °C gehalten. Das gleiche Volumen einer gesättigten NH₄Cl-Lösung wurde hinzugegeben und eine Stunde gerührt. Die wässrige Phase wurde angesäuert, so dass sie gerade neutral war und mit Ether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereint und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen.

Der mit Na₂SO₄ getrocknete und einrotierte Extrakt wurde mit einer Silika-Säule gereinigt (Ethylacetat:Petrolether 1,5:100).

Ausbeute (über zwei Stufen): 480 mg (17 %)

Die Daten der Strukturaufklärung stimmen mit denen von He *et al.* [248] überein.

EI-MS *m/z* (%)

M⁺: 184(27), 155(20), 141(42), 139(27), 127(34), 113(75), 109(30), 100(10), 95(34), 81(28), 79(14), 73(11), 69(79), 67(100), 65(11), 57(11), 55(88), 53(18)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

0,90 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 1,34-1,25 (m, 6H), 1,57 (s, 3H), 1,70 (dd, *J* = 1,1 Hz, *J* = 6,35 Hz, 3H), 2,93 (q, *J* = 8,15 Hz, 1H), 4,19-4,12 (m, 2H), 5,48-5,41 (m, 1H), 5,60-5,52 (m, 1H)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

14,1 (CH₂CH₃); 14,4 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 18,1 (CHCHCH₃); 22,6 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 29,4 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 32,5 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 49,5 (CH); 60,4 (CH₂CH₃); 127,8 (CHCHCH₃); 129,2 (CHCHCH₃)

3. Stufe: (4*S*, 5*S*)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**) [248]

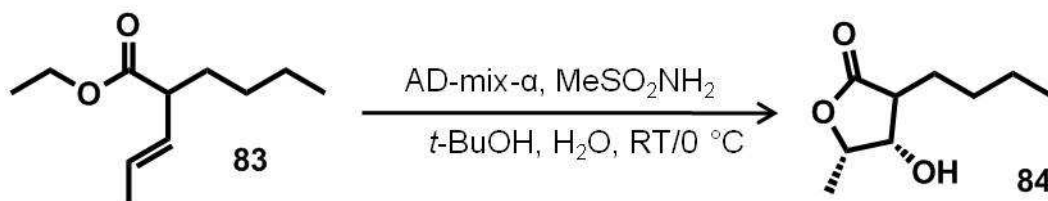


Abbildung 79: Reaktionsschema der dritten Stufe der Synthese von (5*S*)-3-Butyl-5-methyl-2(5*H*)-furanon (**64**); Sharpless *cis*-Hydroxylierung mit anschließender Laktonisierung von 2-Butyl-3(*E*)-pentenylester (**83**) zu (4*S*, 5*S*)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**).

In einem Kolben wurde der AD-Mix- α (3,7 g, 0,2 eq., 0,564 mmol (DHQ)₂PHAL,) bei Raumtemperatur in einem 1:1 Gemisch aus Wasser und *tert*-Butanol (je 13 ml) gelöst. Methansulfonamid (247 mg, 1 eq., 2,6 mmol) wurde unter ständigem Rühren zum Reaktionsansatz hinzugegeben und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. 480 mg 2-Butyl-3(*E*)-pentenethylester (**83**) (2,6 mmol) wurden tropfenweise zum Ansatz gegeben und bei 0 °C 26 Stunden gerührt. Zur Laktonisierung wurde bei Raumtemperatur Na₂SO₃ (4 g, 31,8 mmol) zum Reaktionsansatz gegeben und weitere zwei Stunden gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit 2N KOH gewaschen anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet, eingeeengt und mit einer Silika-Säule (zunächst Petrolether:Diethylether 1:1, dann Petrolether:Diethylether:Ethylacetat 1:1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 337 mg (75 %) (Diastereomere)

Die Daten der Strukturaufklärung stimmen mit denen von He *et al.* [248] überein. Im Folgenden sind nur die Daten für ein Diastereomer aufgeführt.

EI-MS *m/z* (%)

M^+ : 172(30), 116(19), 115(10), 99(65), 82(25), 71(25), 69(12), 67(26), 57(100), 55(32)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

0,92 (q, J = 7,05 Hz, 3H), 1,50-1,32 (m, 4H), 1,44 (d, J = 6,55 Hz, 3 H), 1,74-1,64 (m, 2H), 2,55-2,50 (m, 1H), 4,47-4,42 (m, 1H), 4,64-4,60 (m, 1H)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm)

13,7 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 13,9 (Me); 22,5 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 23,0 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 29,8 (CH₂CH₂CH₂CH₃); 49,2 (CH); 74,1 (CHOH); 78,8 (CHMe)

IR (ZnS) $\tilde{\nu}$, cm⁻¹:

3450, 2959, 2873, 1757, 1174, 1103, 1021, 862

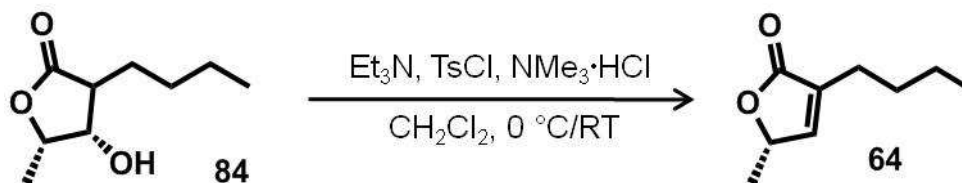
4. Stufe: (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (**64**)

Abbildung 80: Reaktionsschema der vierten Stufe der Synthese von (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (**64**); (4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**) zu (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (**64**).

In einem auf 0 °C abgekühlten Kolben wurde die dritte Stufe (337 mg (4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**), 2,0 mmol) vorgelegt, das in Dichlormethan (85 ml) gelöste Triethylamin (1,2 ml, 4,3 eq., 8,7 mmol), das Tosylchlorid (573,0 mg, 1,5 eq., 3 mmol) und NMe₃·HCl (19,2 mg, 0,25 eq., 0,4 mmol) hinzugegeben. Der Ansatz wurde nach acht Stunden auf Raumtemperatur aufgewärmt, wobei sich die Mischung dunkelrot färbte.

Zum Reaktionsabbruch wurde das gleiche Volumen Wasser zum Reaktionsansatz gegeben. Es wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetat-Phase wurde mit einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Silika aufgereinigt (zunächst Petrolether:Diethylether 5:1, weiter Petrolether:Diethylether 3:1, Petrolether:Ethylacetat 7:3, schließlich mit Petrolether:Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 216 mg (70 %)

Die Daten der Strukturaufklärung stimmen mit denen von He *et al.* [248] überein.

HR-EI-MS⁷⁴ m/z [M+H]⁺:

Gemessen: 154,0992

Berechnet: 154,0994

EI-MS m/z (%)

M⁺: 154(34), 139(16), 125(29), 121(10), 113(12), 112(100), 111(81), 109(31), 108(13), 97(42), 95(11), 94(25), 93(19), 81(13), 79(12), 69(29), 67(41), 66(12), 55(41), 53(14)

⁷⁴ Methode D Kapitel 6.1.1.1, S. 1

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm)

0,92 (t, $J = 6,3$ Hz, 3H), 1,33-1,40 (m, 2H), 1,4 (d, $J = 7,05$ Hz, 3H), 1,50-1,56 (m, 2H), 2,25-2,29 (m, 2H), 4,96-5,01 (m, 1H), 6,98 (q, $J = 1,65$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm)

13,7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 19,2 (Me); 22,2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 24,8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 29,5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 77,5 (CHMe); 149,1 (CH); 174,0 (CO)

IR (KBr) $\tilde{\nu}$, cm^{-1} :

2959, 2933, 2873, 1755, 1652, 1455, 1320, 1199, 1111, 1072, 1028

Gesamtausbeute über vier Stufen: 19 %

6.4.9 Untersuchungen zur Funktion von Antimycinen und (S)-3-Butyl-5-methylfuran-2(5H)-on (64)

6.4.9.1 Siderophore Eigenschaften

Der Einfluss der Inhibierung von *Fomitopsis pinicola* durch Antimycine $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) durch Fe^{3+} -Konzentration im Medium wurde untersucht. Dafür wurde *F. pinicola* im Agardiffusionsassay (Kapitel 6.3.13, S. 113) mit jeweils drei Replikaten gegen Antimycine $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen FeCl_3 getestet. Die in Tabelle 2 angegebenen Mengenverhältnisse wurden verwendet. Die Antimycine $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) wurden in Ethanol gelöst, daher wurde Ethanol in dem gleichen Volumen wie die anderen Proben als Kontrolle verwendet.

Tabelle 2: Im Agardiffusionsassay gegen *F. pinicola* verwendete Mengen an Antimycinen $A_1 - A_4$ (**9 - 12**) und FeCl_3 .

Menge FeCl_3 :Antimycine [μmol]	Molares Verhältnis FeCl_3 :Antimycine
0	-
0,7:2,0	0,35:1
1,0:2,0	0,5:1
2,0:2,0	1:1
0,0:2,0	0:1

Für die Versuche mit *S. odorifer* Kulturen wurden 8 μmol 2,2'-Dipyridyl (**70**) in 50 ml Flüssigkultur (Kapitel 6.3.11.1, S. 111) gegeben, nach drei Tagen

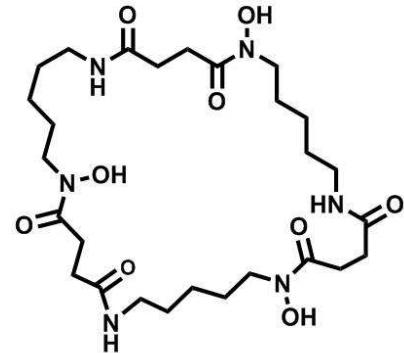
aufgearbeitet (Kapitel 6.3.12, S. 112) und anhand von LC-MS (Methode A, Säule 1, Kapitel 6.1.2, S. 90) analysiert. Hochaufgelöste Massenspektren wurden im Labor von Prof. Michael Spiteller der TU Dortmund aufgenommen.

Desferrioxamin B (68)

Masse: $M = 560 \text{ g/mol}$
 Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8$
 Retentionszeit: 14,24 min
 (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

HR-ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gemessen: 561,3608
 Berechnet: 561,3601



Desferrioxamin B (68)

ESI-MS m/z (%)

$[\text{M}+\text{H}]^+$ 561(100)

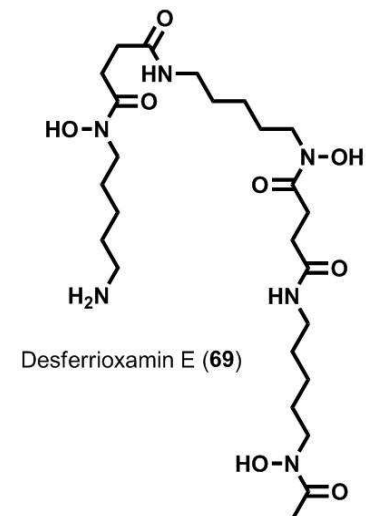
ESI-MS/MS von $[\text{M}+\text{H}]^+$: 561,30; Kollisionsenergie 35 %; m/z (%)
 443(30), 401(21), 361(38), 319(88), 243(100), 201(79)

Desferrioxamin E (69)

Masse: $M = 600 \text{ g/mol}$
 Summenformel: $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_9$
 Retentionszeit: 17,53 min
 (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90)

HR-ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Gemessen: 601,3557
 Berechnet: 601,3556



Desferrioxamin E (69)

ESI-MS m/z (%)

$[\text{M}+\text{H}]^+$ 601(100)

ESI-MS/MS von $[\text{M}+\text{H}]^+$: 602,00; Kollisionsenergie 35 %; m/z (%)
 401(100), 201(23),

6.4.9.2 Quorum sensing und Quorum quenching als mögliche Funktionen des Laktons 64 und der Antimycine

In verschiedenen Bioassays wurden Reporterstämme [212, 213] verwendet (Tabelle 3, S. 151), um die Quorum sensing oder Quorum quenching [205, 206] Eigenschaften des γ -Butyrolaktons **64** zu testen. Die Versuche wurden analog zu den Agardiffusionsassays in Kapitel 6.3.13 (S. 113) durchgeführt. Reporterstämme sind Mikroorganismen, die als Wildtyp Quorum sensing

Moleküle für die Regulation ihres Stoffwechsels verwenden. Sie wurden gentechnisch so verändert, dass sie nicht mehr in der Lage sind die sogenannten „Autoinducer“ zu produzieren. Werden diese Verbindungen extern zu den Stämmen gegeben, wird der Promotor aktiviert und das Target Enzym exprimiert. [213]

Das Plasmid pZLR4 des *Agrobacterium tumefaciens* NT1 wurde so konstruiert, dass das *traG*-Gen⁷⁵, welches mit dem *lacZ*-Gen (*traG::lacZ*) gekoppelt ist, bei externer Zugabe von „Autoinducern“ exprimiert wird. Dadurch verfärben sich die Zellen bei der Anwesenheit von Quorum sensing Signalen blau. Das *lacZ* Gen codiert für eine β -Galaktosidase. Wird dem Medium X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) hinzugegeben, wird es bei der Expression der Galaktosidase in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol gespalten. Letzteres wird durch den Sauerstoff der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. [249, 250]

Chromobacterium violaceum CV026 ist eine Mutante, die bei Zugabe von „Autoinducern“ das Pigment Violacein produziert, das stark violett gefärbt ist. [212]

Escherichia coli RV308 enthält das Plasmid pSB403, welches das *luxR* Gen aus *Vibrio fischeri* und die zugehörige Promotorregion *luxI* sowie die Gene *luxCDABE* aus *Photobacterium luminescens* enthält. [251] Diese Gene codieren für das Enzym Luciferase, das bei ausreichender Konzentration der „Autoinducer“ exprimiert und durch die Oxidation von Luciferinen mittels Sauerstoff zu den instabilen Dioxetanen umgewandelt wird, wodurch der Organismus bei Zerfall der Verbindungen bioluminesziert. [252, 253]

Vibrio harveyi BB170 ist eine Mutante, die nur bei der Zugabe von „Autoinducern“ bioluminesziert. [254] Der Wildtyp wäre ohne externe Zugabe der Signalmoleküle in der Lage die Luciferase zu exprimieren.

Vibrio fischeri ist ein Stamm, der nicht genetisch manipuliert wurde und daher auch ohne die externe Zugabe von „Autoinducern“ bioluminesziert. Das marine Bakterium produziert die Signalmoleküle (Acylhomoserinlaktone) selber und

⁷⁵ *tra* = „transfer“ Gen

exprimiert daher ab einer bestimmten Zelldichte (Quorum sensing) die oben erwähnte Luciferase. [255, 256]

Wegen der Ähnlichkeit der Grundstruktur des Laktons **64** zu den „Autoinducern“ der Acylhomoserinlaktone (AHL) (vgl. **85**) oder dem Autoinducer 2 (AI-2) (**86**) wurden die genannten Reporterstämme ausgewählt. Die Stämme reagieren nicht nur auf ihre eigenen Signalmoleküle, sondern auch auf strukturell verwandte Verbindungen, die in anderen Organismen ähnliche Reaktionen induzieren. Daher können die Reporterstämme für die Identifikation von Signalmolekülen verwendet werden.

Tabelle 3: Verwendete Reporterstämme für Quorum sensing und Quorum quenching Bioassays. [213, 257]

Mikroorganismus	Sensibilität	Quorum sensing Assay	Quorum quenching Assay
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 pZLR4	AHL	X	
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	AHL	X	
<i>Escherichia coli</i> RV308 pSB403	AHL	X	
<i>Vibrio harveyi</i> BB170	AI-2	X	
<i>Vibrio fischeri</i>	AHL		X

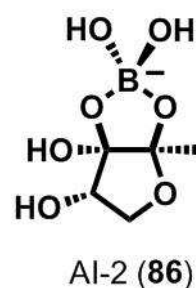
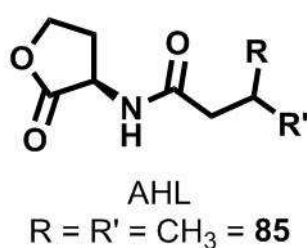


Abbildung 81: „Autoinducer“, die von den verwendeten Reporterstämmen erkannt werden.

Die Eigenschaft, das Wachstum des Antimycin-Produzenten *S. odorifer*, durch die Zugabe von Antimycinen A₁ – A₄ (**9** – **12**) oder dessen Abbauprodukt **64** zu fördern, wurde anhand von Verfütterungen zu Flüssigkulturen untersucht. Kulturen mit 50 ml SFM-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93) wurden angesetzt und mit jeweils vier Replikaten als Kontrolle (170 µl Ethanol) oder als Testkultur mit 4,25 mg (8,1 µmol) Antimycinen A₁ – A₄ (**9** – **12**) bzw. 1,25 mg (8,1 µmol)

γ -Butyrolakton (**64**) in 170 μ l Ethanol verwendet (Abbildung 94, S. 180). Auf Grund der Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Wachstums von Streptomyceten durch die Bildung von Aggregaten entstanden teilweise große Abweichungen der einzelnen Replikate zueinander.

Ein weiterer Versuch wurde mit in drei Kompartimente eingeteilten 9 cm Petrischalen durchgeführt. Die drei Kompartimente der Schalen wurden mit gleichen Mengen SFM-Agar (Kapitel 6.2.1.1, S. 93) befüllt. In den mit A, B und C (Abbildung 82) bezeichneten Bereichen wurden die in Tabelle 4 (S. 153) aufgeführten Verbindungen oder *S. odorifer* appliziert.

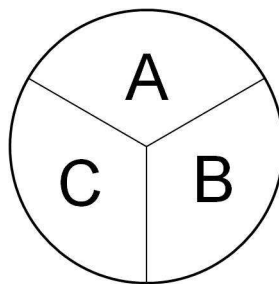


Abbildung 82: 3'er, Petrischale d = 9 cm

In Feld A wurde generell die Kolonie inokuliert, deren Wachstum gegenüber einer Kontrolle (Tabelle 4, Experiment 1) beobachtet wurde. Der zweite Versuch (Tabelle 4) wurde so konstruiert, dass der Duft einer älteren Kolonie zu der frisch inokulierten diffundieren und somit durch flüchtige Verbindungen deren Wachstum beeinflussen konnte. Experiment 3 (Tabelle 4) stellte die Konfrontation von *S. odorifer* mit dem Abbauprodukt **64** der Antimycine durch die Diffusion über die Luft dar. So konnte zwischen einer eventuellen Beeinflussung durch die Diffusion im Agar von der des Duftes unterschieden werden. In Experiment 4 (Tabelle 4) wurden die Verbindungen in Tropfen auf die Platte appliziert. Der Streptomycet wurde direkt auf die Verbindungen inokuliert. Die Experimente wurden jeweils mit drei Replikaten durchgeführt.

Tabelle 4: Experimenteller Aufbau für die Untersuchung auf wachstumsfördernde Wirkung von Antimycinen A₁ – A₂ (9 - 12) und γ -Butyrolakton **64**.

Experiment	Feld A	Feld B	Feld C
1 (Kontrolle)	<i>S. odorifer</i> Kolonie	-	-
2	<i>S. odorifer</i> Kolonie	3d alte <i>S. odorifer</i> Kolonie	-
3	<i>S. odorifer</i> Kolonie	γ -Butyrolakton (64) (130 nmol)	-
4	Antimycine (96 nmol) + <i>S. odorifer</i> Kolonie	<i>S. odorifer</i> Kolonie + 50 μ l Ethanol	-

6.4.9.3 Untersuchungen zur Wirkung des γ -Butyrolakton **64** auf Pflanzen und Insekten

Um die Reaktion von Insekten auf das γ -Butyrolakton **64** zu untersuchen, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt:

Ein Versuch wurde an der TU Kaiserslautern unter der Leitung von Dr. R. Wirth ein Versuch mit einem Olfaktometer (Abbildung 83) durchgeführt. Dafür wurde am Ende des linken Arms der Apparatur wurde ein Tropfen des synthetisch hergestellten Laktons **64** (Kapitel 6.4.8.1, S. 143), am Ende des rechten Arms eine Kontrolle (Ethanol) appliziert. Die Apparatur wurde in das Kammersystem integriert, in dem die Blattschneiderameisen leben. Dadurch wurde verhindert, dass die Ameisen durch ein ungewohntes Umfeld in ihrem Verhalten beeinflusst wurden. Durch einen Schlauch konnten sich die Ameisen zwischen zwei Kammern bewegen. Während der Passage des Schlauchs wurde ein Zwischenstück um 90° gedreht, um die Ameisen zu dem Eingang des Y-Rohrs zu bringen (Abbildung 83). Nun konnten die Ameisen entscheiden, welchen der Arme des Olfaktometers sie betreten möchten. Von dem Lakton **64** angelockt, würden sie nach links gehen. Wenn sie von dem Duft abgestoßen würden, wäre die Wahl der rechte Arm. Dieser Versuch wurde mit 74 Individuen der Spezies *Acromyrmex niger* durchgeführt. 32 der Ameisen entschieden sich für das Lakton **64**, 28 dagegen und 14 entschieden sich für keines der beiden.

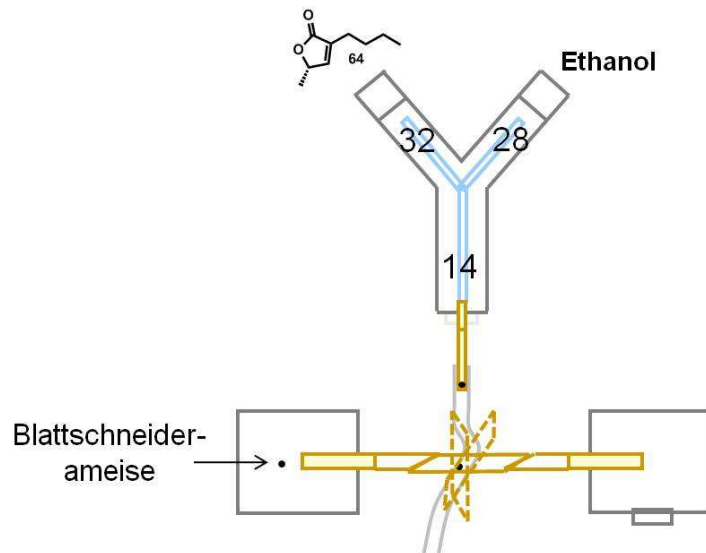


Abbildung 83: Aufbau des Versuchs mit einem Olfaktometer und Blattschneiderameisen = schwarzer Punkt, um die Reaktion auf das Lakton **64** zu beobachten; Gelb gestrichelt = Bewegung.

Ein weiterer Versuch war ein Feldversuch, der im Regenwald von Peru in der Nähe der Mündung des Flusses La Torre von Dr. Stefan Bartram und Dr. Axel Mithöfer durchgeführt wurde.

An unterschiedlichen Stellen wurden Filterpapiere platziert, die mit dem Lakton **64** (10 µg pro Filter in Ethanol) behandelt wurden. Mit Ethanol behandelte Filter dienten als Kontrolle (Abbildung 84). Es wurde beobachtet, ob Insekten vom Duft angelockt werden.



Abbildung 84: Aufbau des Feldversuchs im Regenwald von Peru.

Ob das Lakton **64** das Wachstum von Pflanzen beeinflusst, wurde in einem Bioassay mit sechs *Arabidopsis thaliana colombica-0* (gesammelt Mai 2006) Samen pro Platte und je drei Replikaten für Kontrolle und Test untersucht. Die Samen wurden oberflächensterilisiert (Kapitel 6.3.16, S. 116) und einzeln in den MS-Agar (Kapitel 6.2.1.6, S. 94) einer hochkant gestellten Petrischale (d = 15 cm, 100 ml Medium) gepflanzt. In den Agar der Petrischalen wurde je ein Loch gestochen und mit 50 µl Ethanol als Kontrolle oder 3,2 µmol Lakton **64** als Test befüllt (Abbildung 85). Um die Keimung der Samen zu induzieren, wurden die Petrischalen vier bis fünf Tage bei 4 °C im Dunklen aufbewahrt. Die Schalen wurden hochkant zwei Tage bei 25 °C und für den Rest des Wachstums in

einer „longday“-Klimakammer⁷⁶ aufgestellt. Der Versuch wurde zwei Wochen beobachtet. Die Pflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt alle eine Größe von etwa 4 cm über und bis zu 9 cm im Agar. Es konnte kein Unterschied im Wachstum oder der Morphologie zwischen den Kontroll- und den Testpflanzen festgestellt werden.

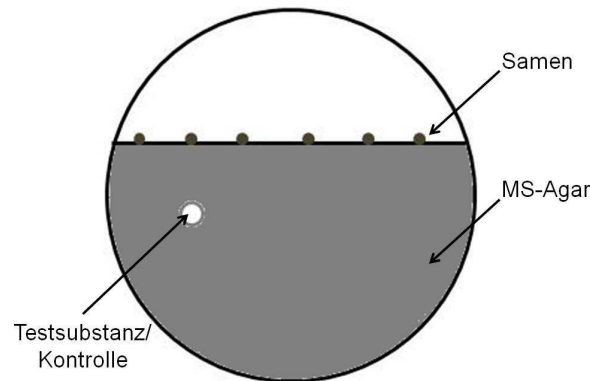


Abbildung 85: Schema einer Petrischale, mit MS-Agar = grau zu 2/3 befüllt, mit *Arabidopsis*-Samen bespickt, Loch für die Applikation des Laktons **64** auf etwa der Hälfte der Platte.

6.4.10 Untersuchungen zu Antibiotika in Tröpfchen auf dem Luftmycel von Streptomyceten

Die drei isolierten Streptomyceten *Streptomyces* Ao 10 (Antimycine A₁ – A₄ (**9 - 12**), Candicidin D (**6**)), *Streptomyces* Av 25_2 (Actinomycin D (**15**) und Actinomycin X₂ (**15**)) und *Streptomyces* Av 25_6 (Valinomycin (**13**)) (Kapitel 6.4.1.2, S. 118) wurden auf SFM-Agarplatten kultiviert (Kapitel 6.2.1.1 und 6.3.11.2, S. 93 und 112). Sobald sich Tröpfchen auf dem Luftmycel bildeten (Abbildung 86), wurden diese mit Hilfe einer Kapillare durch vorsichtiges Berühren der Tröpfchen gesammelt, um sie anschließend mittels LC-MS zu analysieren (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90). Die Konzentration der Antibiotika wurde anhand der Peakflächen und extern aufgenommener Kalibrationsgeraden (Abbildung 89 bis Abbildung 91, S. 176 und 177) ermittelt. In den Tröpfchen von *Streptomyces* Av 25_2 ließen sich zusammen 201 ng/μl Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) nachweisen. Valinomycin (**13**) wurde in den Tröpfchen von *Streptomyces* Av 25_6 mit einer Konzentration von 71 ng/μl detektiert. *Streptomyces* Ao 10 zeigte in den Untersuchungen weder die Akkumulation von Candicidin D (**6**), noch von Antimycinen A₁ – A₄ (**9 - 12**).

⁷⁶ Temperatur = 24 °C, Luftfeuchte = 55 %, Licht von 6:00 bis 20:00, Beleuchtungsstärke = 24 klx

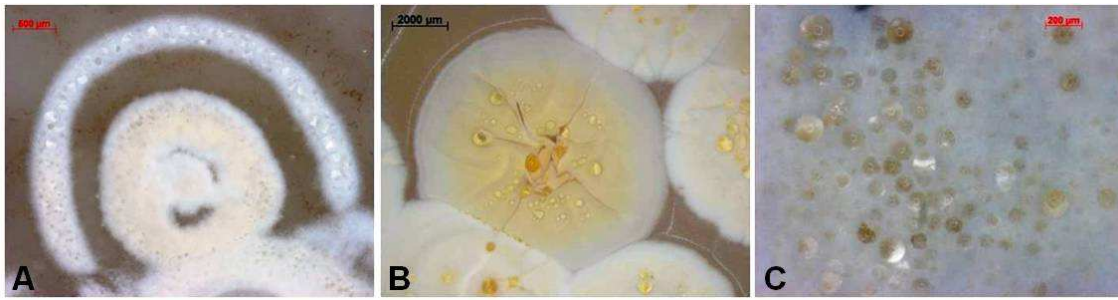


Abbildung 86: Mikroskopische Aufnahmen der Tröpfchen, die sich auf den Kulturen der von Blattschneiderameisen isolierten Streptomyceten gebildet haben; A = *Streptomyces* Ao 10, B = *Streptomyces* Av 25_2, C = *Streptomyces* Av 25_6.

Der Bioassay gegen *Bacillus subtilis* wurde mit gesammelten Tröpfchen des *Streptomyces* Av 25_2 durchgeführt. 10 µl der Tropfen wurden eingetrocknet, in 10 µl Methanol aufgenommen und in einem Agardiffusionsassay getestet. *B. subtilis* wurde gehemmt (Kapitel 6.3.13, S. 113).

7 Literaturverzeichnis

1. Clardy, J., *et al.*, *Current Biology*, **2009**. 19(11): p. R437-R441.
2. Fleming, A., *British Journal of Experimental Pathology*, **1929**. 10(3): p. 226-236.
3. Kyle, R.A. and M.A. Shampo, *Jama*, **1978**. 240(9): p. 847.
4. Duchesne, E. 1897; Available from: http://santards.trad.pagesperso-orange.fr/grandes_figures.htm.
5. Waksman, S.A., *Mycologia*, **1947**. 39(5): p. 565-569.
6. Lawrence, P.A., *Nature*, **2002**. 415(6874): p. 835-836.
7. Kresge, N., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **2004**. 279(48).
8. Kieser, T., *et al.*, *Practical Streptomyces Genetics*. **2000**.
9. Wright, F. and M.J. Bibb, *Gene*, **1992**. 113(1): p. 55-65.
10. Hopwood, D.A., *Streptomyces in Nature and Medicine*. **2007**.
11. Glauert, A.M. and D.A. Hopwood, *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, **1961**. 10(4): p. 505-&.
12. Nett, M., *et al.*, *Nat Prod Rep*, **2009**. 26(11): p. 1362-84.
13. Waksman, S.A. and H.A. Lechevalier, *Guide to the classification and identification of the Actinomycetes and their antibiotics*. 1953, The Williams and Wilkins Company: Baltimore.
14. Tresner, H.D., *et al.*, *Journal of Bacteriology*, **1961**. 81(1): p. 70-&.
15. Lin, Y.-S., *et al.*, *Molecular Microbiology*, **1993**. 10(5): p. 923-933.
16. Leblond, P. and B. Decaris, *Fems Microbiology Letters*, **1994**. 123(3): p. 225-232.
17. Medema, M.H., *et al.*, *Genome Biology and Evolution*, **2010**. 2: p. 212-224.
18. Bibb, M.J., *et al.*, *Molecular & General Genetics*, **1981**. 184(2): p. 230-240.
19. Grohmann, E., *et al.*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2003**. 67(2): p. 277-+.
20. Chater, K.F. and M.J. Bibb, *Regulation of bacterial antibiotic production.*, H. Kleinkauf and H.v. Döhren, Editors. **1997**, VHC. p. 57-105.
21. Howarth, T.T., *et al.*, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, **1976**(7): p. 266-267.

22. Hotta, K., *et al.*, Journal of Antibiotics, **1981**. 34(9): p. 1175-1182.
23. Ajaz, A.A., *et al.*, Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, **1987**(1): p. 27-36.
24. Thompson, J. and E. Cundliffe, Biochimie, **1991**. 73(7-8): p. 1131-1135.
25. Chater, K.F. and M.J. Merrick, *Streptomyces*. Parish, J. H. (Ed.). Studies in Microbiology, Vol. 1. Developmental Biology of Prokaryotes. Xii+297p. University of California Press: Berkeley, Calif., USA; Blackwell Scientific Publications: Oxford, England. Illus. **1979**. P93-114.
26. Wiener, P., Evolutionary Ecology, **1996**. 10(4): p. 405-421.
27. Hoskin, D.W. and A. Ramamoorthy, Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, **2008**. 1778(2): p. 357-375.
28. Kumar, C.G., *et al.*, Critical Reviews in Biotechnology, **2008**. 28(3): p. 173-212.
29. Copping, L.G. and S.O. Duke, Pest Management Science, **2007**. 63(6): p. 524-554.
30. Stokstad, E.L.R., Physiological Reviews, **1954**. 34(1): p. 25-51.
31. Vining, L.C., Annual Review of Microbiology, **1990**. 44: p. 395-427.
32. Jevons, M.P., *et al.*, Lancet, **1963**. 7287: p. 904-907.
33. ; Available from: <http://www.cdc.gov/>.
34. MRSA-net, E.; Available from: <http://www.mrsa-net.org/>.
35. Nikaido, H., Annual Review of Biochemistry, **2009**. 78: p. 119-146.
36. Zhang, L. and Z.H. Xu, Journal of Soils and Sediments, **2008**. 8(6): p. 379-388.
37. Coombs, J.T. and C.M.M. Franco, Applied and Environmental Microbiology, **2003**. 69(7): p. 4260-4262.
38. de Araujo, J.M., *et al.*, Brazilian Archives of Biology and Technology, **2000**. 43(4): p. 447-451.
39. Sardi, P., *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **1992**. 58(8): p. 2691-2693.
40. Kaltenpoth, M., *et al.*, Physiological Entomology, **2010**. 35(2): p. 196-200.
41. Kroiss, J., *et al.*, Nature Chemical Biology, **2010**. 6(4): p. 261-263.
42. Scott, J.J., *et al.*, Science, **2008**. 322(5898): p. 63-63.
43. Currie, C.R., *et al.*, Nature, **1999**. 398(6729): p. 701-704.
44. Belt, T., **1874**: p. Unpaginated.

45. Weber, N.A., *Science*, **1966**. 153(3736): p. 587-&.
46. Belt, T. 1874; Available from:
<http://www.archive.org/stream/naturalistinnica00belt#page/n5/mode/2up>.
47. Mueller, U.G., *et al.*, *Science*, **1998**. 281(5385): p. 2034-2038.
48. Grimaldi, D., *et al.*, *American Museum Novitates*, **1997**(Series 3208): p. 1-43.
49. Janzen, D.H., *Science*, **1995**. 268(5212): p. 785-785.
50. Mueller, U.G., *et al.*, *Quarterly Review of Biology*, **2001**. 76(2): p. 169-197.
51. Pinto-Tomas, A.A., *et al.*, *Science*, **2009**. 326(5956): p. 1120-1123.
52. Lopez, E. and S. Orduz, *Biological Control*, **2003**. 27(2): p. 194-200.
53. Bot, A.N.M., *et al.*, *Ethology Ecology & Evolution*, **2001**. 13(3): p. 225-237.
54. Miyashira, C.H., *et al.*, *Brazilian Journal of Microbiology*, **2010**. 41(2): p. 506-511.
55. Currie, C.R., *Annual Review of Microbiology*, **2001**. 55: p. 357-380.
56. Powell, S. and E. Clark, *Insectes Sociaux*, **2004**. 51(4): p. 342-351.
57. Orr, M.R., *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **1992**. 30(6): p. 395-402.
58. Braganca, M.A.L., *et al.*, *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **1998**. 89(3): p. 305-311.
59. Rodrigues, A., *et al.*, *Folia Microbiologica*, **2005**. 50(5): p. 421-425.
60. Little, A.E.F. and C.R. Currie, *Biology Letters*, **2007**. 3(5): p. 501-504.
61. Muchovej, J.J. and T.M.C. Dellalucia, *Mycotaxon*, **1990**. 37: p. 191-195.
62. Belt, T., *Naturalist in Nicaragua*. **1874**.
63. Currie, C.R., *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1999**. 96(14): p. 7998-8002.
64. Currie, C.R. and A.E. Stuart, *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **2001**. 268(1471): p. 1033-1039.
65. Schildknecht H. and K. Koob, *Angewandte Chemie-International Edition*, **1971**. 10(2): p. 124-&.
66. Ortius-Lechner, D., *et al.*, *Journal of Chemical Ecology*, **2000**. 26(7): p. 1667-1683.
67. Kost, C., *et al.*, *Naturwissenschaften*, **2007**. 94: p. 821-828.
68. Poulsen, M., *et al.*, *Molecular Ecology*, **2005**. 14(11): p. 3597-3604.

69. Barke, J., *et al.*, BMC Biol, **2010**. 8: p. 109.
70. Haeder, S., *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2009**. 106(12): p. 4742-4746.
71. Sen, R., *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2009**. 106(42): p. 17805-17810.
72. Zhang, M.M., *et al.*, Isme Journal, **2007**. 1: p. 313-320.
73. Mikheyev, A.S., *et al.*, Molecular Ecology, **2008**. 17(20): p. 4480-4488.
74. Mueller, U.G., *et al.*, Evolution, **2008**. 62(11): p. 2894-2912.
75. Mueller, U.G., *et al.*, Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, **2010**. 98(2): p. 195-212.
76. Zucchi, T.D., *et al.*, Microbiological Research, **2011**. 166(1): p. 68-76.
77. Oh, D.C., *et al.*, Nature Chemical Biology, **2009**. 5(6): p. 391-393.
78. Lechevalier, H., *et al.*, Mycologia, **1953**. 45(2): p. 155-171.
79. Theron, J. and T.E. Cloete, Critical Reviews in Microbiology, **2000**. 26(1): p. 37-57.
80. Jensen, P.R., *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **2007**. 73(4): p. 1146-1152.
81. Matter, A.M., *et al.*, Plos One, **2009**. 4(9).
82. Jorgensen, H., *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **2009**. 75(10): p. 3296-3303.
83. Mordarski, M., *et al.*, Arch Immunologii I Terapii Doswiadczalnej, **1958**. 6((2)): p. 367-373.
84. Bullock, E. and A.W. Johnson, Journal of the Chemical Society, **1957**(JUL): p. 3280-3285.
85. Brockmann, H. and J.H. Manegold, Chemische Berichte-Recueil, **1960**. 93(12): p. 2971-2982.
86. Shemyakin, M.M., *et al.*, Tetrahedron Letters, **1963**. 28: p. 1921-1925.
87. Pitchayawasin-Thapphasaraphong, S. and M. Isobe, ITE Letters on Batteries, New Technologies and Medicine, **2006**. 7(5): p. 465-473.
88. Matter, A.M., *et al.*, PLoS One, **2009**. 4(9): p. e7194.
89. van Tamelen, E., *et al.*, Journal of the American Chemical Society, **1961**. 83(7): p. 1639-&.
90. Yan, L.L., *et al.*, Journal of Antibiotics, **2010**. 63(5): p. 259-261.

91. Akiba, T., *et al.*, Japanese Journal of Microbiology, **1960**. 4(2): p. 219-227.
92. Tamura, K., *et al.*, Molecular Biology and Evolution, **2007**. 24(8): p. 1596-1599.
93. Waksman, S.A. and M. Tishler, Journal of Biological Chemistry, **1942**. 142(2): p. 519-528.
94. Moore, G.E., *et al.*, Cancer, **1958**. 11(6): p. 1204-1214.
95. Currie, C.R., *et al.*, Science, **2006**. 311(5757): p. 81-83.
96. Pearson, M.L., *et al.*, Annals of Internal Medicine, **1992**. 117(3): p. 191-196.
97. Davies, J., Science, **1994**. 264(5157): p. 375-382.
98. Timurkaynak, F., *et al.*, International Journal of Antimicrobial Agents, **2006**. 27(3): p. 224-228.
99. Hemaiswarya, S., *et al.*, Phytomedicine, **2008**. 15(8): p. 639-652.
100. Watanabe, H., *et al.*, Journal of Antibiotics, **2005**. 58(12): p. 753-758.
101. Lim, T.H., *et al.*, Natural Products Sciences, **2007**. 13: p. 144-147.
102. Park, C.N., *et al.*, Journal of Microbiology and Biotechnology, **2008**. 18(5): p. 880-884.
103. Angus, T.A., Journal of Invertebrate Pathology, **1968**. 11(1): p. 145-&.
104. Pansa, M.C., *et al.*, Journal of Invertebrate Pathology, **1973**. 22(2): p. 148-152.
105. Heisey, R.M., *et al.*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1988**. 36(6): p. 1283-1286.
106. Schmid-Hempel, P., Parasites in social insects., **1998**: p. i-xi, 1-409.
107. Cremer, S., *et al.*, Current Biology, **2007**. 17(16): p. R693-R702.
108. Patterson, E.L. and D.P.J. Wright, *Process for controlling insects, nematodes and mites using valinomycin*. 1970, AMERICAN CYANAMID CO.
109. Ueki, M., *et al.*, Journal of Antibiotics, **1997**. 50(7): p. 551-555.
110. Marquis, R.E., Journal of Bacteriology, **1965**. 89(6): p. 1453-&.
111. Kluepfel, D., *et al.*, Journal of Antibiotics, **1970**. 23(2): p. 75-&.
112. Schoenian, I., *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2011**. 108(5): p. 1955-1960.

113. Neu, H.C., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1976**. 10(3): p. 535-542.
114. Chen, P., *et al.*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**. 58(2): p. 332-337.
115. Wagner, H. and G. Ulrich-Merzenich, *Phytomedicine*, **2009**. 16(2-3): p. 97-110.
116. Henry, N. and J. Bolard, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1986**. 854(1): p. 84-92.
117. Aszalos, A., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1975**. 7(6): p. 754-757.
118. Bolard, J., *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1986**. 864(3-4): p. 257-304.
119. Kwan, C.N., *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1972**. 2(2): p. 61-&.
120. Hammond, S.M., *et al.*, *Journal of General Microbiology*, **1974**. 81(APR): p. 325-330.
121. Pinkerton, M., *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1969**. 35(4): p. 512-&.
122. Ballari, S., *et al.*, *Journal of Insect Behavior*, **2007**. 20(1): p. 87-98.
123. Karas, M., *et al.*, *Analytical Chemistry*, **1985**. 57(14): p. 2935-2939.
124. Tombolini, R., *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**. 65(8): p. 3674-3680.
125. Sun, J.H., *et al.*, *Microbiology-Uk*, **1999**. 145: p. 2221-2227.
126. Shaner, N.C., *et al.*, *Nature Biotechnology*, **2004**. 22(12): p. 1567-1572.
127. Bibb, M.J., *et al.*, *Gene*, **1985**. 38(1-3): p. 215-226.
128. Cafaro, M.J., *et al.*, *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **2010**. Early online edition.
129. Blanc, C., *et al.*, *European Journal of Soil Biology*, **2006**. 42: p. S70-S78.
130. Freckman, D.W., *Agriculture Ecosystems & Environment*, **1988**. 24(1-3): p. 195-217.
131. Venette, R.C. and H. Ferris, *Soil Biology & Biochemistry*, **1998**. 30(7): p. 949-960.
132. Kinoshit.M, *et al.*, *Journal of Antibiotics*, **1972**. 25(6): p. 373-&.
133. Barrow, C.J., *et al.*, *Journal of Antibiotics*, **1997**. 50(9): p. 729-733.
134. Chen, G.Y., *et al.*, *Journal of Antibiotics*, **2005**. 58(8): p. 519-522.

135. Shiomi, K., *et al.*, Journal of Antibiotics, **2005**. 58(1): p. 74-78.
136. Hosotani, N., *et al.*, Journal of Antibiotics, **2005**. 58(7): p. 460-467.
137. Schilling, G., *et al.*, Journal of Antibiotics, **1970**. 23(2): p. 81-&.
138. Leben, C. and G.W. Keitt, Phytopathology, **1948**. 38(11): p. 899-906.
139. Dunshee, B.R., *et al.*, Journal of the American Chemical Society, **1949**. 71(7): p. 2436-2437.
140. Schneider, H.G., *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **1952**. 37(1): p. 147-157.
141. Lockwood, J.L., *et al.*, Phytopathology, **1954**. 44(8): p. 438-446.
142. Liu, W.C., *et al.*, Journal of the American Chemical Society, **1960**. 82(7): p. 1652-1654.
143. Strong, F.M., *et al.*, Journal of the American Chemical Society, **1960**. 82(6): p. 1513-1514.
144. Ueda, J., *et al.*, Journal of Antibiotics, **2008**. 61(4): p. 241-244.
145. Strangman, W.K., *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry, **2009**. 52(8): p. 2317-2327.
146. Komoda, T., *et al.*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **1995**. 59(5): p. 924-926.
147. Kannan, L.V., *et al.*, Folia Microbiologica, **1968**. 13(1): p. 1-&.
148. Vézina, C. and S.N. Sehgal, *Antimycin A: Properties, biosynthesis, and fermentation* **1984**. p. 629-650.
149. Ahmad, K., *et al.*, Archives of Biochemistry, **1950**. 28(2): p. 281-294.
150. Rehacek, Z., *et al.*, Hindustan Antibiotics Bulletin, **1968**. 10(4): p. 280-286.
151. Ramankutty, M., *et al.*, Indian Journal of Biochemistry, **1969**. 6(4): p. 230-&.
152. Birch, A.J., *et al.*, Journal of the Chemical Society, **1962**(JAN): p. 303-&.
153. Neft, N. and T.M. Farley, Journal of Antibiotics, **1972**. 25(5): p. 298-&.
154. Marlier, J.F., *et al.*, Journal of Organic Chemistry, **2006**. 71(10): p. 3829-3836.
155. KEGG, K.E.o.G.a.G.; Available from: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00380.
156. Sitachitta, N., *et al.*, Journal of Biological Chemistry, **2007**. 282(29): p. 20941-20947.

157. Ogasawara, Y. and H.-w. Liu, *Journal of the American Chemical Society*, **2009**. 131(50): p. 18066-18068.
158. Leete, E., *Journal of the American Chemical Society*, **1984**. 106(23): p. 7271-7272.
159. Hagmann, M. and H. Grisebach, *Febs Letters*, **1984**. 175(2): p. 199-202.
160. Hakamatsuka, T., *et al.*, *Tetrahedron*, **1991**. 47(31): p. 5969-5978.
161. Leete, E., *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, **1987**. 65(1): p. 226-228.
162. Dickschat, J., *Antimycin biosynthetic gene cluster*. 2011: Braunschweig.
163. Nangreave, J., *et al.*, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**. 14(5): p. 608-615.
164. Bierman, M., *et al.*, *Gene*, **1992**. 116(1): p. 43-49.
165. Schilling, G., *et al.*, *Journal of Antibiotics*, **1970**. 23(2): p. 81-&.
166. Hussain, A., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1969**. 58(3): p. 316-&.
167. Gerber, N.N., *Tetrahedron Letters*, **1973**(10): p. 771-774.
168. Rezanka, T. and K. Sigler, *European Journal of Organic Chemistry*, **2006**(18): p. 4277-4284.
169. Tokutake, N., *et al.*, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1994**. 1185(3): p. 271-278.
170. Tokutake, N., *et al.*, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1993**. 1142(3): p. 262-268.
171. Bennett, R.N. and R.M. Wallsgrove, *New Phytologist*, **1994**. 127(4): p. 617-633.
172. Rask, L., *et al.*, *Plant Molecular Biology*, **2000**. 42(1): p. 93-113.
173. Wittstock, U., *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**. 101(14): p. 4859-4864.
174. Brown, R.T. and C.L. Chapple, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, **1974**(18): p. 740-742.
175. Guirimand, G., *et al.*, *BMC Plant Biology*, **2010**. 10: p. Article No.: 182.
176. Leben, C., *Annual Review of Phytopathology*, **1981**. 19: p. 35-40.
177. Leben, C., *Phytopathology*, **1949**. 39(1): p. 13-13.
178. Kido, G.S. and E. Spyhalski, *Science*, **1950**. 112(2902): p. 172-173.
179. Ackrell, B.A.C., *Febs Letters*, **2000**. 466(1): p. 1-5.

180. Potter, V.R. and A.E. Reif, *Journal of Biological Chemistry*, **1952**. 194(1): p. 287-297.
181. Rieske, J.S., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, **1967**. 242(21): p. 4854-&.
182. Kim, H., *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, **1999**. 121(20): p. 4902-4903.
183. Huang, L.S., *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, **2005**. 351(3): p. 573-597.
184. Batra, P.P. and L. Storms, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1968**. 33(5): p. 820-&.
185. Gamboa, J., *et al.*, *Plant Science*, **2009**. 177(6): p. 643-647.
186. Itoh, R.D., *et al.*, *Physiologia Plantarum*, **2010**. 139(2): p. 144-158.
187. Tzung, S.P., *et al.*, *Nature Cell Biology*, **2001**. 3(2): p. 183-191.
188. Farley, T.M., *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, **1965**. 87(15): p. 3501-&.
189. Pick, U., *Biometals*, **2004**. 17(1): p. 79-86.
190. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2007**. 71: p. 413-+.
191. Elad, Y. and R. Baker, *Phytopathology*, **1985**. 75(9): p. 1053-1059.
192. Joseph-Horne, T., *et al.*, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **2001**. 1504(2-3): p. 179-195.
193. Ramachandran, S. and D. Gottlieb, *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1961**. 53(2): p. 396-&.
194. Neilands, J.B., *Journal of Biological Chemistry*, **1995**. 270(45): p. 26723-26726.
195. Gehring, A.M., *et al.*, *Biochemistry*, **1997**. 36(28): p. 8495-8503.
196. Crosa, J.H. and C.T. Walsh, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2002**. 66(2): p. 223-+.
197. Meiwes, J., *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1990**. 32(5): p. 505-510.
198. Davies, J., *Clinical Microbiology and Infection*, **2009**. 15: p. 1-4.
199. Ryan, R.P. and J.M. Dow, *Microbiology-Sgm*, **2008**. 154: p. 1845-1858.
200. Lopez, D., *et al.*, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2010**. 2(7).

201. Kolter, R., *International Journal of Infectious Diseases*, **2010**. 14: p. E326-E326.
202. Yim, G., *et al.*, *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **2007**. 362(1483): p. 1195-1200.
203. Bagge, N., *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2004**. 48(4): p. 1175-1187.
204. Hernandez, M.E. and D.K. Newman, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2001**. 58(11): p. 1562-1571.
205. Waters, C.M. and B.L. Bassler, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **2005**. 21: p. 319-346.
206. Uroz, S., *et al.*, *Chembiochem*, **2009**. 10(2): p. 205-216.
207. Horinouchi, S., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **2007**. 71(2): p. 283-299.
208. Khokhlov, A.S., *et al.*, *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*, **1973**. 13(8): p. 647-655.
209. Kazlauskas, R., *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1977**(1): p. 37-40.
210. Wright, A.D., *et al.*, *Journal of Natural Products*, **2006**. 69(8): p. 1180-1187.
211. Defoirdt, T., *et al.*, *Environmental Microbiology*, **2007**. 9(10): p. 2486-2495.
212. McClean, K.H., *et al.*, *Microbiology-Sgm*, **1997**. 143: p. 3703-3711.
213. Steindler, L. and V. Venturi, *Fems Microbiology Letters*, **2007**. 266(1): p. 1-9.
214. Pupo, M.T., *et al.*, *Phytochemistry*, **1998**. 48(2): p. 307-310.
215. Pizzolatti, M.G., *et al.*, *Natural Product Research*, **2004**. 18(5): p. 433-438.
216. Hamada, T., *et al.*, *Biochemistry*, **2004**. 43(12): p. 3651-3658.
217. Chaves, M.H. and N.F. Roque, *Phytochemistry*, **1997**. 44(3): p. 523-528.
218. Vieira, P.C., *et al.*, *Phytochemistry*, **1983**. 22(3): p. 711-713.
219. Behrend, A., *Induktion von veränderten Metabolitenprofilen in Streptomyceten durch Umweltfaktoren*. 2010, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie: Jena.
220. Willetts, H.J. and S. Bullock, *Mycological Research*, **1992**. 96: p. 801-816.

221. Liang, Y., *et al.*, Journal of Proteome Research, **2010**. 9(6): p. 3290-3298.
222. Gareis, M. and E.M. Gareis, Mycopathologia, **2007**. 163(4): p. 207-214.
223. Grovel, O., *et al.*, Toxicon, **2003**. 42(3): p. 297-300.
224. McPhee, W.J. and N. Colotelo, Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique, **1977**. 55(3): p. 358-365.
225. Jennings, D.H., Mycological Research, **1991**. 95: p. 883-884.
226. Rodrigues, A., *et al.*, Antonie van Leeuwenhoek, **2009**. 96(3): p. 331-342.
227. Gottlieb, H.E., *et al.*, Journal of Organic Chemistry, **1997**. 62(21): p. 7512-7515.
228. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, Analytical Chemistry, **1990**. 62(19): p. 2145-2148.
229. Hobbs, G., *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology, **1989**. 31(3): p. 272-277.
230. Sambrook, J., *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA. Illus. Paper, **1989**. 1, 2 and 3.
231. Murashige, T. and F. Skoog, Physiologia Plantarum, **1962**. 15(3): p. 473-&.
232. Qiagen, *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th edition. June 2003*. p. 39.
233. Beavis, R.C., *et al.*, Organic Mass Spectrometry, **1992**. 27(2): p. 156-158.
234. Pospiech, A. and B. Neumann, Trends in Genetics, **1995**. 11(6): p. 217-218.
235. Edwards, U., *et al.*, Nucleic Acids Research, **1989**. 17(19): p. 7843-7853.
236. Kolganova, T.V., *et al.*, Microbiology, **2002**. 71(2): p. 243-246.
237. Ishikawa, J., *et al.*, Actinomycetologica, **2000**. 14(1): p. 1-5.
238. Qiagen, *QIAquick Spin Handbook. March 2001*. p. 23-24.
239. Fermentas, *CloneJET™ PCR Cloning Kit*.
240. Fermentas, *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit. 2009*.
241. Simon, R., *et al.*, Bio-Technology, **1983**. 1(9): p. 784-791.
242. Flett, F., *et al.*, Fems Microbiology Letters, **1997**. 155(2): p. 223-229.
243. MacNeil, D.J., *et al.*, Gene, **1992**. 111(1): p. 61-68.
244. Paget, M.S.B., *et al.*, Journal of Bacteriology, **1999**. 181(1): p. 204-211.

245. Rivero-Lepinckas, L., *et al.*, *Growth of plants and preservation of seeds*, J. Sánchez-Serrano and J. Salinas, Editors. **2006**, Humana Press. p. 3-12.
246. Drecktrah, D., *et al.*, *Traffic*, **2007**. 8(3): p. 212-225.
247. Alexander, N.J., *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **1998**. 64(1): p. 221-225.
248. He, Y.T., *et al.*, *Tetrahedron*, **2002**. 58(43): p. 8805-8810.
249. Cha, C., *et al.*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **1998**. 11(11): p. 1119-1129.
250. Farrand, S.K., *et al.*, *Bacterial Pathogenesis, Pt C*, **2002**. 358: p. 452-484.
251. Winson, M.K., *et al.*, *Fems Microbiology Letters*, **1998**. 163(2): p. 185-192.
252. Meighen, E.A., *Microbiological Reviews*, **1991**. 55(1): p. 123-142.
253. Stewart, G. and P. Williams, *Journal of General Microbiology*, **1992**. 138: p. 1289-1300.
254. Bassler, B.L., *et al.*, *Molecular Microbiology*, **1993**. 9(4): p. 773-786.
255. Neilson, K.H., *et al.*, *Journal of Bacteriology*, **1970**. 104(1): p. 313-&.
256. Engebrecht, J., *et al.*, *Cell*, **1983**. 32(3): p. 773-781.
257. Eberhard, A., *et al.*, *Biochemistry*, **1981**. 20(9): p. 2444-2449.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

(DHQ) ₂ PHAL	Bis-(dihydrochinyll)-1,4-phthalazin-diyldiether
°C	Grad Celsius
μAU	10 ⁻⁶ Absorptions Einheiten (Absorbance Unit)
μl	10 ⁻⁶ Liter
μmol	10 ⁻⁶ mol
Ac	Actinomycine
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AD-mix-α	(DHQ) ₂ PHAL, K ₂ OsO ₂ (OH) ₄ , K ₃ Fe(CN) ₆ , K ₂ CO ₃
Ae	Acromyrmex echinator
amu	atomare Masseneinheit
An	Antimycine
Ao	<i>Acromyrmex octospinosus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptions Einheiten (Absorbance Unit)
Av	<i>Acromyrmex volcanus</i>
Blast	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
BPC	Basispeak Chromatogramm
BSA	„Bovine serum albumin“
bzw.	beziehungsweise
C	Candididine
ca.	Zirka
CFU	Kolonie-formende Einheit
CLS	„closed loop stripping“
d	Durchmesser
DAD	Diodenarraydetektor
dd	Dublett vom Dublett
ddH ₂ O	Quarzdestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ⁷⁷
DTT	Dithiothreitol

⁷⁷ <http://www.dsmz.de/>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verbessertes, grün fluoreszierendes Protein
EI	Elektronenstoß Ionisation
eq.	Equivalent
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	und andere
EtAc	Ethylacetat
eV	Elektronenvolt
for	Vorwärts
g	Gramm
GATC	Basen der DNA (Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin)
GC	Gaschromatographie
h	Stunden
HMPA	Hexamethylphosphoramid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Hochauflösung
inkl.	inklusive
IR	Infrarotspektrometrie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
klx	10 ³ Lux (Beleuchtungsstärke)
l	Liter oder Länge
LC	Flüssigkeitschromatographie
LDA	Lithiumdiisopropylamid
M	Molar
m	Multipllett (NMR)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
M ⁺	Molekülion (GC-MS)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation
mAU	10 ⁻³ Absorptions Einheiten (Absorbance Unit)
Mb	Megabasen (10 ⁶ Basen)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Stoffmenge 6x10 ²³ Teilchen
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
nBuI	Butyliodid

ng	10 ⁻⁹ Gramm
nm	Nanometer
nmol	nanomol
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
pM	10 ⁻¹² molar
ppm	„parts per million“
q	Quartett
rDNA	ribosomale DNA
rev	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
s	Singulett (NMR) oder Sekunde (Zeit)
s.o.	siehe oben
SPME	Festphasenmikroextraktion
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -Butanol
td	Triplett vom Dublett
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstrom Chromatogramm
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>t</i> RNA	transfer RNA
TsCl	Tosylchlorid
UV	Ultraviolettspektroskopie
UV ₂₃₀	UV-Absorption bei $\lambda = 230$ nm
V	Valinomycine
vgl.	vergleiche
VWD	Variabler Wellenlängen Detektor
δ	Chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

8.2 Tabellen

Tabelle 5: Verwandtschaften der von Blattschneiderameisen isolierten Streptomycceten zu bereits bekannten Spezies und von ihnen produzierte Antibiotika, An = Antimycine, Ac = Actinomycine, V = Valinomycine, C = Candidine, Ao = *Acromyrmex octospinosus*, Ae = *Acromyrmex echinator*, Av = *Acromyrmex volcanus*, n.b. = nicht bestimmt, - keine Produktion, + Produktion.

Isolierte Stämme / NCBI Zugangsnummer					Phylogenetische Analyse Verwandte Stämme / NCBI Zugangsnummer				
Isoliert von	Produktion von				Produktion von				Ähnlichkeiten (Blast Algorithmus) [%]
	An	Ac	V	C	An	Ac	V	C	
<i>Streptomyces</i> sp. Av 25_1 / FJ490532					<i>Streptomyces</i> sp. str. PM185 / EU714282.1				
<i>A. volcanus</i>	+	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	97,79
<i>Streptomyces</i> sp. Av 25_2 / HM538454					<i>Streptomyces parvus</i> str. NBRC 14599 / AB184603.1				
<i>A. volcanus</i>	-	+	-	-	n.b.	+	n.b.	n.b.	99,57
<i>Streptomyces</i> sp. Av 25_3 / FJ490533					<i>Streptomyces tsusimaensis</i> str. NBRC 13782 / EU622279				
<i>A. volcanus</i>	-	-	+	-	n.b.	n.b.	+	n.b.	99,21
<i>Streptomyces</i> sp. Av 25_4 / FJ490534					<i>Streptomyces</i> sp. str. 696 / EF063475.1				
<i>A. volcanus</i>	-	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,28
<i>Streptomyces</i> sp. Av 25_5 / FJ490535					<i>Streptomyces</i> sp. str. 13638J / EU741132.1				
<i>A. volcanus</i>	-	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,86
<i>Streptomyces</i> sp. Av 25_6 / FJ490536					<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> str. NRRL 3985 / X80827.1				
<i>A. volcanus</i>	-	-	+	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,57
<i>Streptomyces</i> sp. Av 26_2 / FJ490537					<i>Streptomyces xylophagus</i> str. NBRC 13845 / AB184526.1				
<i>A. volcanus</i>	-	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,64
<i>Streptomyces</i> sp. Av 26_3 / HM538453					<i>Streptomyces</i> sp. str. 213101 / FJ263419.1				
<i>A. volcanus</i>	-	-	+	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,53
<i>Streptomyces</i> sp. Av 26_5 / FJ490538					<i>Streptomyces albidoflavus</i> / AJ002090.1				
<i>A. volcanus</i>	+	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,93
<i>Streptomyces</i> sp. Av 28_2 / FJ490539					<i>Streptomyces albidoflavus</i> str. UST040711-291 / FJ591130.1				
<i>A. volcanus</i>	+	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	98,23
<i>Streptomyces</i> sp. Av 28_3 / FJ490540					<i>Streptomyces albidoflavus</i> / AJ002090.1				
<i>A. volcanus</i>	+	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,07
<i>Streptomyces</i> sp. Av 29_7 / FJ490541					<i>Streptomyces carnosus</i> str. NBRC 13025 / AB184263.1				
<i>A. volcanus</i>	-	-	-	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,93
<i>Streptomyces</i> sp. Ao 10 / FJ490543					<i>Streptomyces albidoflavus</i> / DQ855477.1				
Pilzgarten <i>A. octospinosus</i> Kolonie A	+	-	-	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	99,72
<i>Streptomyces</i> sp. Ae 32_2 / FJ490544					<i>Streptomyces albidoflavus</i> / AJ002090.1				
Pilzgarten <i>A. echinator</i> Kolonie 2	+	-	-	+	+	n.b.	n.b.	n.b.	100,00

Tabelle 6: Ergebnisse der Agardiffusionsassays mit Antimycinen A₁ – A₄ (9 - 12), Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15) und Valinomycin (13) unter Verwendung von verschiedenen Konzentrationen; Rot = Keine Wachstumshemmung; Grün = Wachstumshemmung; # = Hemmhof gemessen vom Rand des Loches bis Ende des Hemmhofs, Ao = *Acromyrmex octospinosus*, Ae = *Acromyrmex echinator*, Av = *Acromyrmex volcanus*.

	Organismus	Nr.	Antimycine nmol/10ml SFM cm Hemmhof [#]	Actinomycine nmol/10ml SFM cm Hemmhof [#]	Valinomycine nmol/10ml SFM cm Hemmhof [#]
1	<i>Beauveria bassiana</i>	FSU 5084	28,8 X	4,0/24,0 X/X	13,3 X
2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	DSM 1490	28,8/57,7 X/X	4,0/24,0 X/X	13,3 X
3	<i>Cordyceps militaris</i>	DSM 1153	28,8/57,7/115,4/230,8 0,1/0,2/0,2/0,2	4,0/24,0 X/X	13,3 X
4	<i>Fusarium decemcellulare</i>	No 27	2,4µg X	119,5/239,0 0,05/0,1	266,0 X
5	<i>Streptomyces</i> Av 25_4	Isolat von <i>A. volcanus</i>	28,8 X	0,4/4,0/12,0 0,2/0,8	13,3 X
6	<i>Streptomyces</i> Av 25_2	Isolat von <i>A. volcanus</i>	28,8 X	12,0 X	-
7	<i>Streptomyces</i> Av 25_6	Isolat von <i>A. volcanus</i>	-	-	13,3 X
8	<i>Streptomyces</i> Ao 10	Isolat von <i>A. octospinosus</i>	28,8 X	4,0 X	13,3 X
9	<i>Pseudonocardia</i> Ao 1	Isolat von <i>A. octospinosus</i>	28,8 X	4,0/12,0 0,1/0,8	13,3 X
10	<i>Pseudonocardia</i> Av 30	Isolat von <i>A. volcanus</i>	28,8 X	0,4/12,0 0,1/0,6	13,3/26,6 X/X
11	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10	Extr 10/288,5 X/X	0,4/2,0/12,0 0,3/0,8/1,1	Extr 25_6/266,0 X/0,2
12	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Isolat	5,8/57,7 1,0/1,7	2,4/24,0 X/0,2	2,7/26,6 X/X
13	<i>Escovopsis weberi</i>	CBS 110660	Extr 10/5,8/9,6/57,7 X/0,3/0,3/0,4	Extr 25_2 /2,4/4,0/24,0 X/X/X/X	Extr 25_6/2,7/4,4/266,0 X/X/X/X/X
14	<i>Phialophora fastigiata</i>	DSM 2692	57,7/115,4/230,8/288,5 0,1/0,1/0,1/0,2	12,0/239,0 X/0,2	26,6/266,0 X/X
15	<i>Trichoderma harzianum</i>	DSM 63059	57,7/230,8 0,3/0,4	24,0 X	26,6 X
16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Netto/Plus)	28,8 0,6	12,0 X	13,3 0,4
17	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	DSM 859	144,2 X	120,0 0,1	266,0 X

Tabelle 7: Ergebnisse der Agardiffusionsassays mit Antimycinen A₁ – A₄ (9 - 12), Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15), Valinomycin (13) und Candicidin D (6), sowie verschiedener Kombinationen der genannten Antibiotika; Rot = Keine Wachstumshemmung; Grün = Wachstumshemmung.

Antibiotika	Konzentration nmol/10ml SFM	Hemmhof cm
Actinomycine	2.4	X
Antimycine	5.8	0.3
Candicine	2.7	0.2
Valinomycine	2.7	X
Actinomycine Antimycine Candicine Valinomycine	2.4 5.8 2.7 2.7	0.4
Antimycine	1.0	0.05
Candicine	0.9	X
Valinomycine	2.7	X
Antimycine Candicine	1.0 0.9	0.1
Candicine Valinomycine	0.9 2.7	0.1

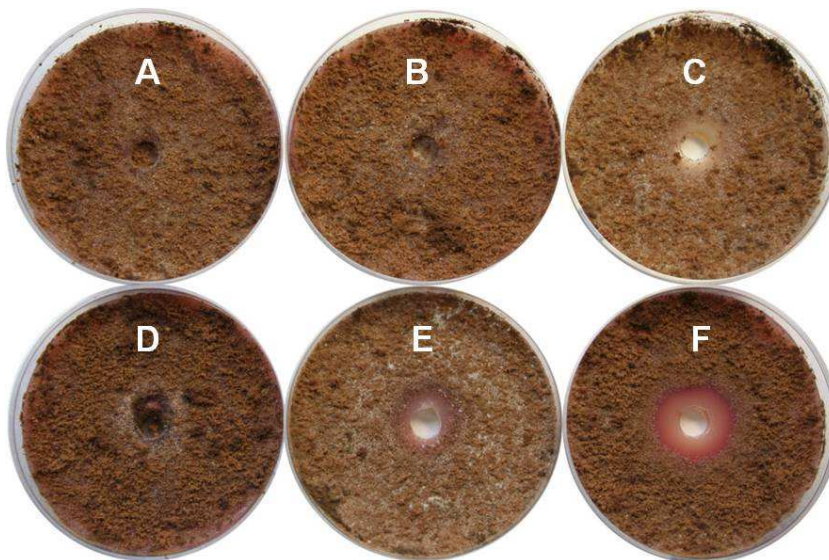


Abbildung 87: Agardiffusionsassay des Synergismus der Antibiotika die von Streptomyceten-Symbionten der Blattschneiderameisen produziert werden, gegen *E. weberi*; A = Methanol Kontrolle; B = 2,4 nmol Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15); C = 5,8 nmol Antimycin A₁ – A₄ (9 - 12); D = 2,4 nmol Valinomycin (13); 2,4 nmol E = Candicidin D (6); F = 2,4 nmol Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15) + 5,8 nmol Antimycin A₁ – A₄ (9 - 12) + 2,4 nmol Valinomycin (13) + 2,4 nmol Candicidin D (6) zusammen.

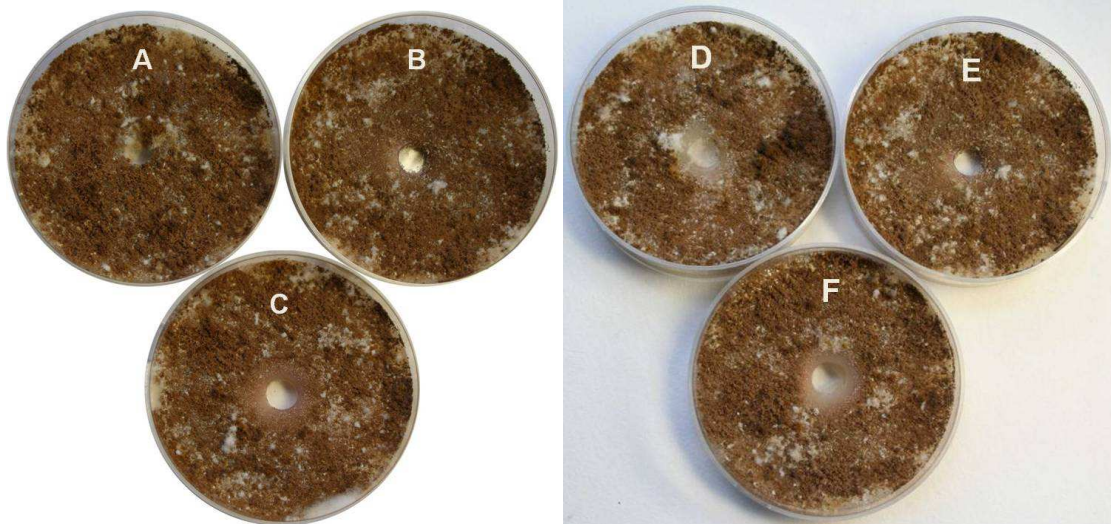


Abbildung 88: Agardiffusionsassay des Synergismus der Antibiotika die von Streptomycceten-Symbionten der Blattschneiderameisen produziert werden, gegen *E. weberi*; A = 2,7 nmol Valinomycin (**13**); B = 0,9 nmol Candicidin D (**6**), C = 2,7 nmol Valinomycin (**13**) + 0,9 nmol Candicidin D (**6**) zusammen; D = 1,0 nmol Antimycin A₁ – A₄ (**9 - 12**); E = 0,9 nmol Candicidin D (**6**), F = 1,0 nmol Antimycin A₁ – A₄ (**9 - 12**) + 0,9 nmol Candicidin D (**6**) zusammen

8.3 Graphen

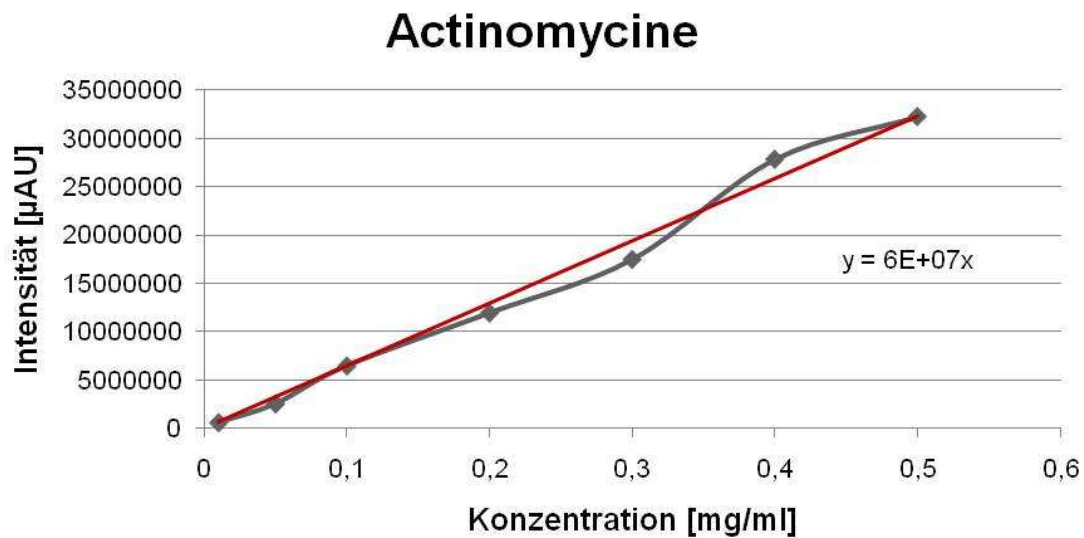


Abbildung 89: Kalibrationsgerade von Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**) zusammen; Quantifizierung anhand der gesamten Peakfläche der UV₂₅₄ Absorption im HPLC-Lauf von Actinomycin D (**14**) und Actinomycin X₂ (**15**), n=1, (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90).

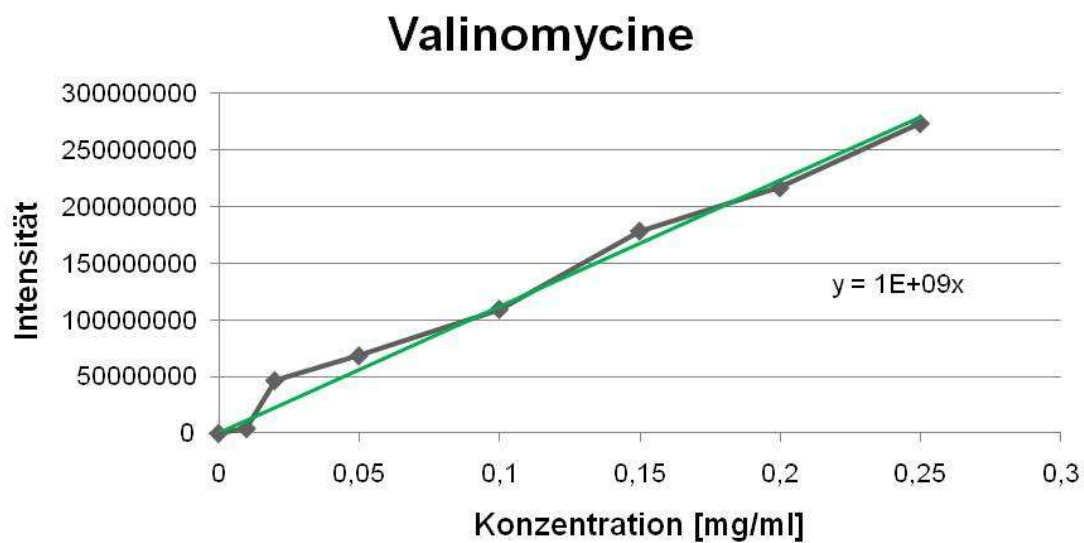


Abbildung 90: Kalibrationsgerade von Valinomycinen; Quantifizierung anhand der gesamten Peakfläche der Ionenspur von [M+H]⁺ 1100,5; [M+H]⁺ 1114,5; [M+H]⁺ 1128,5 (**13**) und [M+H]⁺ 1142,6, alle vier Valinomycin Derivate, n = 1, (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90).

Antimycine

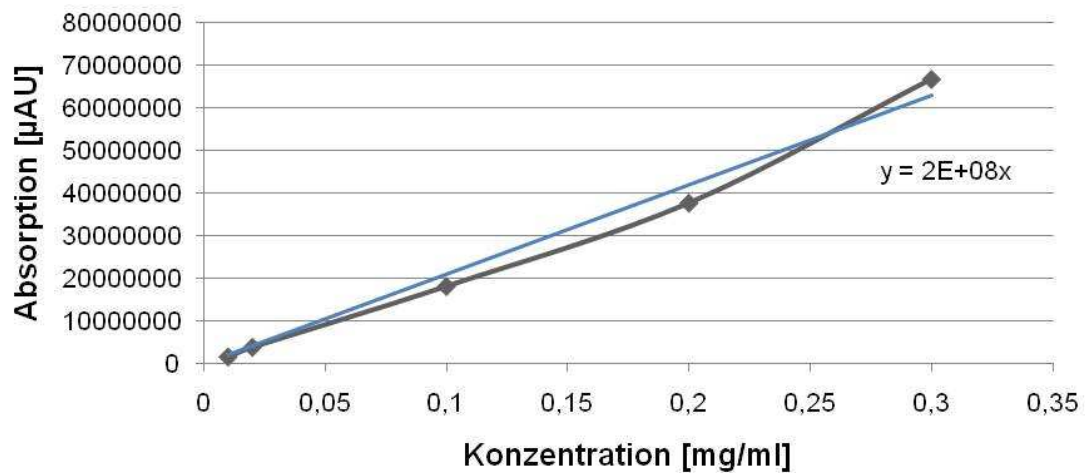


Abbildung 91: Kalibrationsgerade von Antimycinen A₁ – A₄ (9 - 12) zusammen; Quantifizierung anhand der gesamten Peakfläche der UV₂₃₀ Absorption im HPLC-Lauf von Antimycin A₁ (9); Antimycin A₂ (10); Antimycin A₃ (11) und Antimycin A₄ (12), n = 1, (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90).

Tabelle 8: Messwerte der Antimycinproduktion von *S. odorifer* über 10 Tage; A, B, C = Replikate, gezeigt sind die Peakflächen der UV₂₃₀ Absorption im HPLC-Lauf, (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90).

Zeit [h]	Peakfläche UV _{230nm} Absorption		
	A	B	C
0	0	0	0
21,5	0	0	0
41,25	53750812	55706467	50870871
66	135077644	128149958	128145353
92	169833027	118659005	107491088
118,25	48045984	39481077	55462975
142	17804374	27403313	24161756
169,75	4191421	4621534	5297689
192,75	9297864	3804539	2920141
212,5	1914620	4618732	2197819
239,5	1667459	3525597	1441383

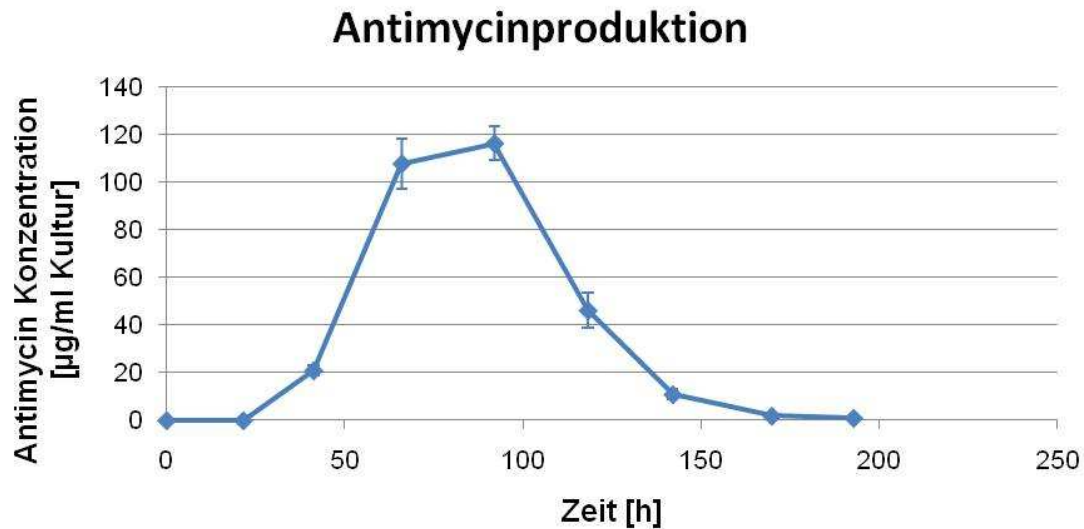


Abbildung 92: Produktionskurve von Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12) zusammen, errechnet anhand der Kalibrationsgeraden in Abbildung 91 und der Peakflächen der UV₂₃₀ Absorption der Antimycine A₁ - A₄ (9 - 12) zusammen, über acht Tage (Messwerte in Tabelle 8), angegeben in µg/ml Kultur von *S. odorifer*; Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3.

Tabelle 9: CFUs (colony forming units), Anzahl an Kolonien von *S. odorifer* auf je einer Agarplatte über neun Tage; A, B, C, D = Replikate.

Zeit [d]	CFU / Platte			
	A	B	C	D
0	11300	20800	22100	19900
1	44000	42500	58800	55300
2	274900	224700	246700	195000
3	8200000	5600000	6810000	1830000
4	28000000	32000000	31000000	15000000
5	12000000	24000000	8000000	1000000
6	1820000	920000	150000	180000
7	140000	620000	140000	545000
8	1990000	3200000	400000	910000
9	290000	410000	50000	90000

Wachstumskurve

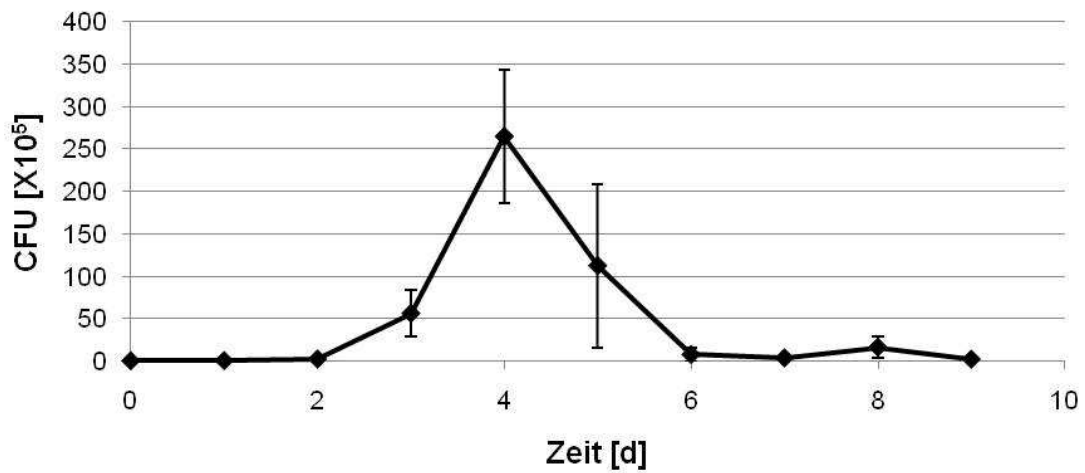


Abbildung 93: Wachstumskurve des *S. odorifer* über einen Zeitraum von neun Tagen, angegeben in colony forming units (CFU) (Messwerte in Tabelle 9), Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3.

Tabelle 10: CFUs (colony forming units), Anzahl an Kolonien von *S. odorifer* auf je einer Agarplatte über neun Tage nach Verfüterung von Antimycinen A₁ – A₄ (9 – 12) und γ -Butyrolakton (64), Mittelwerte aus n = 4.

Zeit [d]	CFU / Platte		
	Antimycin 8,1 μ mol/50 ml	γ -Butyrolakton 64 8,1 μ mol/50ml	Kontrolle
0	22925	19100	18525
1	41025	37600	50150
2	86000	173050	235325
3	4777500	8355000	5610000
4	26000000	23000000	27000000
5	32000000	22000000	11000000
6	1000000	5915000	767500
7	4290000	3465000	361250
8	4117500	2300000	1625000
9	1752500	515000	210000

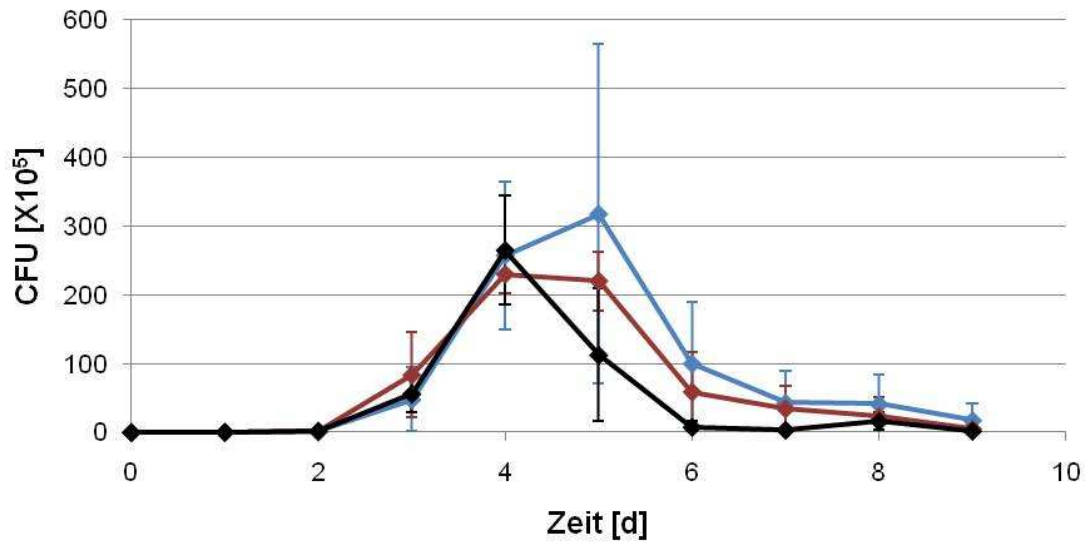


Abbildung 94: Vergleich der Wachstumskurve des *S. odorifer* durch die Verfütterung von **Blau** = Antimycinen A₁ – A₂ (9 – 12), **rot** = γ-Butyrolakton 64 mit einer Ethanol Kontrolle = Schwarz, über einen Zeitraum von neun Tagen, angegeben in colony forming units (CFU), (Messwerte in Tabelle 10), Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3.

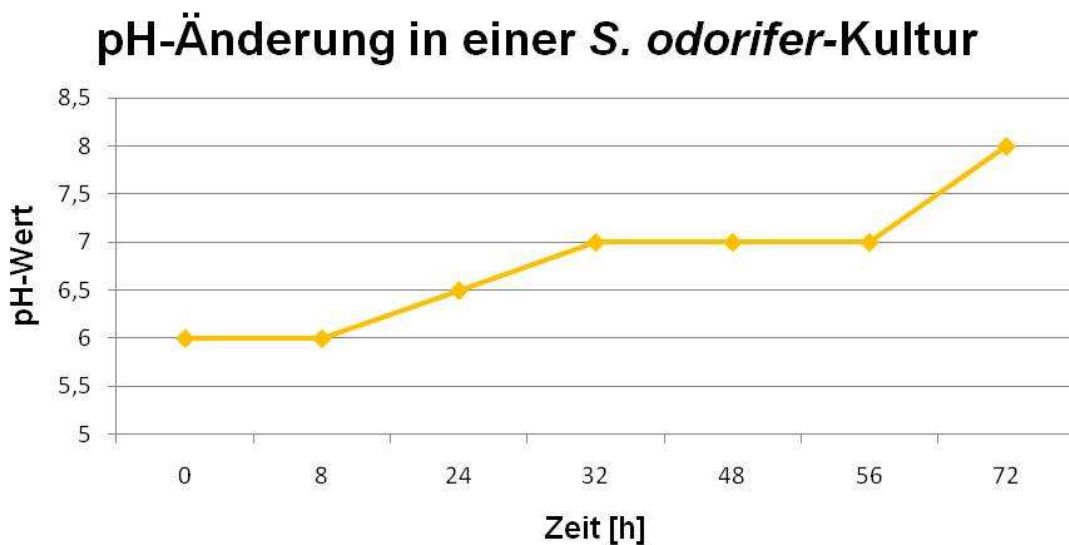


Abbildung 95: Entwicklung des pH in einer *S. odorifer*-Kultur über die Zeit, SFM-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93), über einen Zeitraum von drei Tagen.

Tabelle 11: Messwerte der Antimycinproduktion von *S. odorifer* für die einzelnen Antimycine A₁ - A₄ (9 - 12) über acht Tage, als Mittelwerte mit n=3; gezeigt sind die Peakflächen der UV₂₃₀ Absorption im HPLC-Lauf (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90).

Zeit [h]	Peakfläche UV _{230nm} Absorption			
	Antimycin-A ₄	Antimycin-A ₃	Antimycin-A ₂	Antimycin-A ₁
0	0	0	0	0
21,5	0	0	0	0
41,25	807131	2781182	1359901	3424156
66	12088028	5926300	18016925	7080245
92	12650166	5763764	20210140	7878601
118,25	3398128	1098806	9485305	4474230
142	241232	119482	2517455	1470830
169,75	88550	91766	378001	184590
192,75	56873	66939	207347	73377

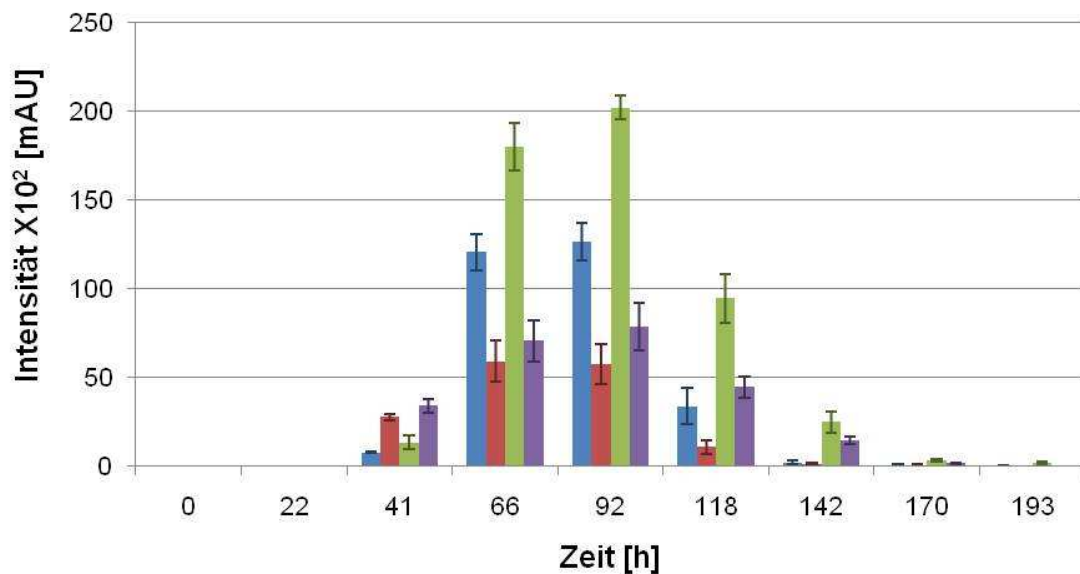


Abbildung 96: Produktion von Antimycinen A₁ - A₄ (9 - 12) von *S. odorifer* in flüssigem Komplexmedium (SFM, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) über einen Zeitraum von acht Tagen; blau = Antimycin A₄ (12), rot = Antimycin A₃ (11), grün = Antimycin A₂ (10), violett = Antimycin A₁ (9); Die Menge der jeweiligen Derivate wurde mit der Peakfläche der UV_{230nm} Absorption ermittelt und errechnet anhand der Kalibrationsgeraden in Abbildung 91; Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3 (Messwerte in Tabelle 11).

Tabelle 12: Messwerte der Antimycinproduktion von *S. odorifer* für die Antimycine A₃ (11) und Antimycin-563 über 10 Tage, als Mittelwerte mit n = 3; gezeigt sind die Peakflächen der UV_{230nm} Absorption im HPLC-Lauf (Methode A, Säule 2, Kapitel 6.1.2, S. 90).

Zeit [h]	Peakfläche UV _{230nm} Absorption	
	Antimycin-A ₃	Antimycin-563
0	0	0
21,5	0	0
41,25	2781182	0
66	5926300	0
92	5763764	295879
118,25	1098806	2188058
142	119482	1435982
169,75	91766	771823
192,75	66939	594303
212,5	0	511064
239,5	0	315915

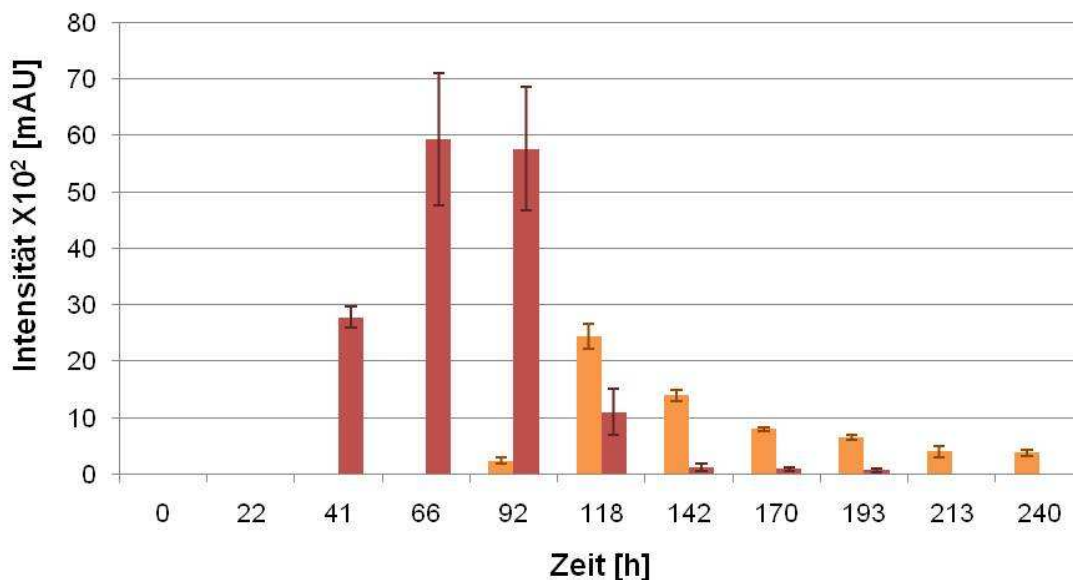


Abbildung 97: Produktion von Antimycin A₃ (11) und Antimycin-563 von *S. odorifer* in flüssigem Komplexmedium (SFM, Kapitel 6.2.1.1, S. 93) über einen Zeitraum von 10 Tagen; rot = Antimycin A₃ (11); orange = Antimycin-563; Die Menge wurde anhand der Peakfläche der UV_{230nm} Absorption ermittelt und errechnet anhand der Kalibrationsgeraden in Abbildung 91; Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3, (Messwerte in Tabelle 12).

Tabelle 13: Messwerte der Antimycinproduktion von *S. odorifer* für die Antimycine A₁ - A₄ (9 – 12) nach sechs Tagen und der Verfüterung von L-Isoleucin (45) und L-Valin (46); Mittelwert aus n = 3, dargestellt als prozentualer Anteil der einzelnen Antimycine A₁ - A₄ (9 – 12) an der gesamten Antimycin A₁ - A₄ (9 – 12) Menge, berechnet anhand der Peakflächen der UV₂₃₀ Absorption im HPLC-Lauf (Methode A, Säule 1, Kapitel 6.1.2, S. 90).

Anteil an gesamt Antimycin Menge [%]				
	Antimycin-A ₄	Antimycin-A ₃	Antimycin-A ₂	Antimycin-A ₁
Isoleucin	18	34	25	23
Valin	23	30	27	20
Kontrolle	23	31	27	20

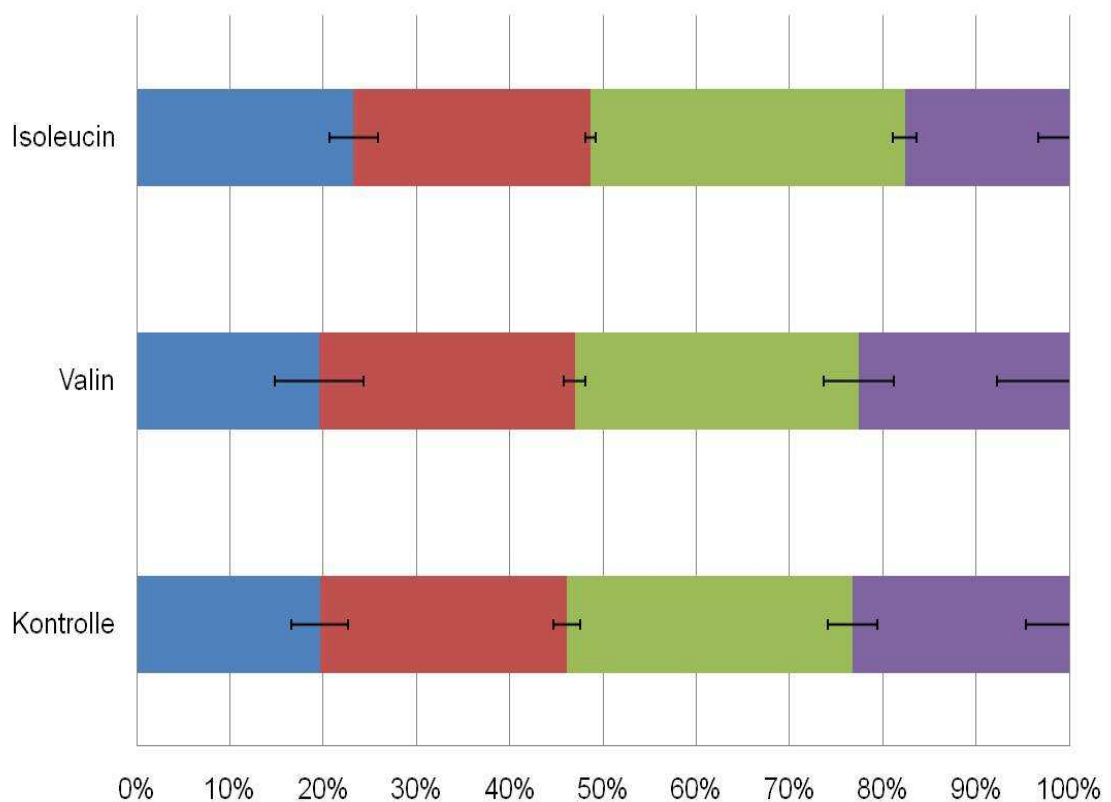


Abbildung 98: Balkendiagramm der *S. odorifer* Verfüterungsstudie mit L-Isoleucin (45) in SFM-Medium und L-Valin (46) in SFM-Medium, Kontrolle = nur SFM-Medium (Kapitel 6.2.1.1, S. 93), nach sechs Tagen; Peakfläche der UV₂₃₀ Absorption von Antimycin A₁ (9) = blau, Antimycin A₂ (10) = rot, Antimycin A₃ (11) = grün, Antimycin A₄ (12) = violett, Fehlerbalken = Standardabweichung, n = 3, (Messwerte in Tabelle 13).

8.4 Strukturformeln

8.4.1 Antimycine

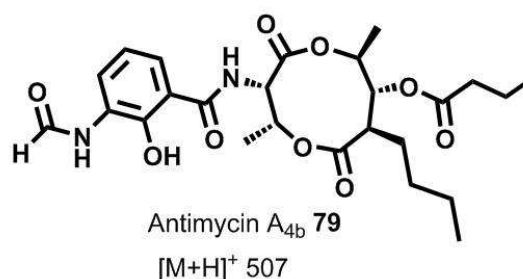
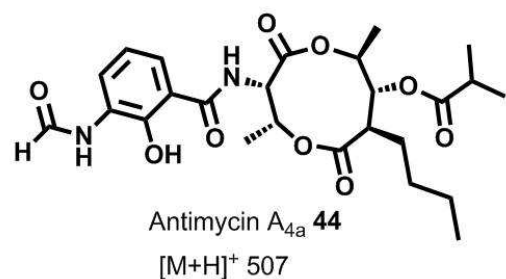
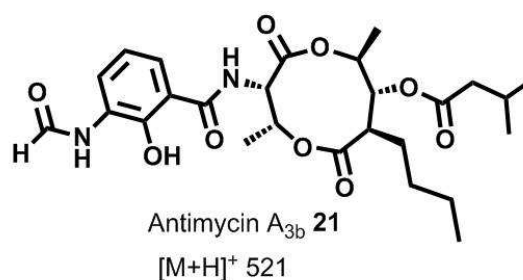
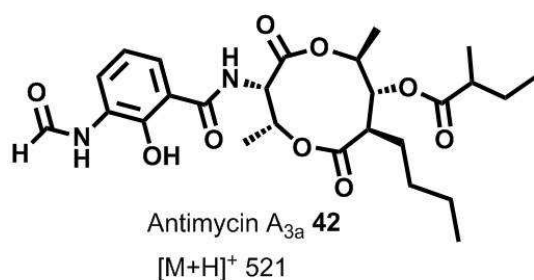
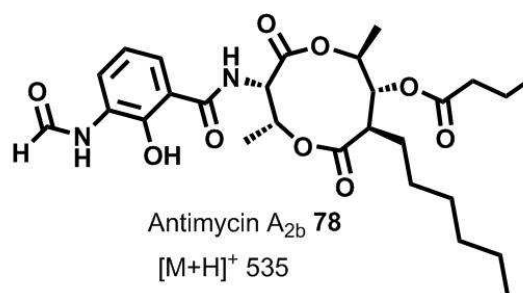
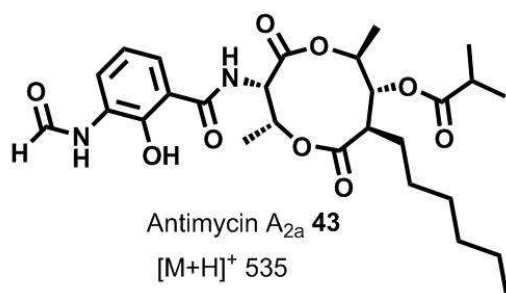
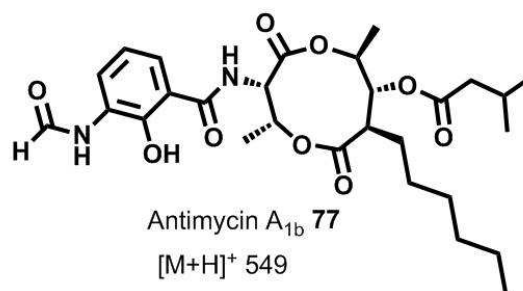
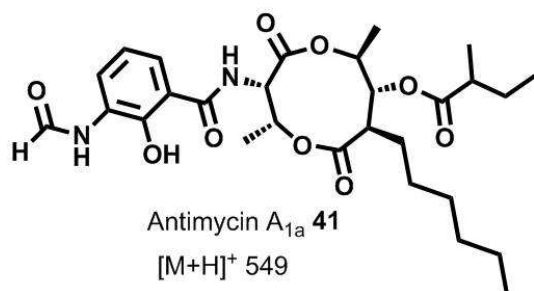


Abbildung 99: Antimycine A₁ – A₄ [132, 133, 165]

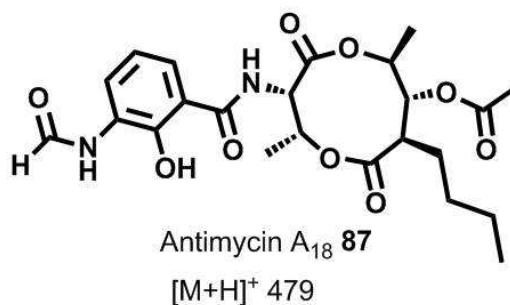


Abbildung 100: Das in der Kultur von *Streptomyces albidoflavus* identifizierte Antimycin A₁₈ (87). [90]

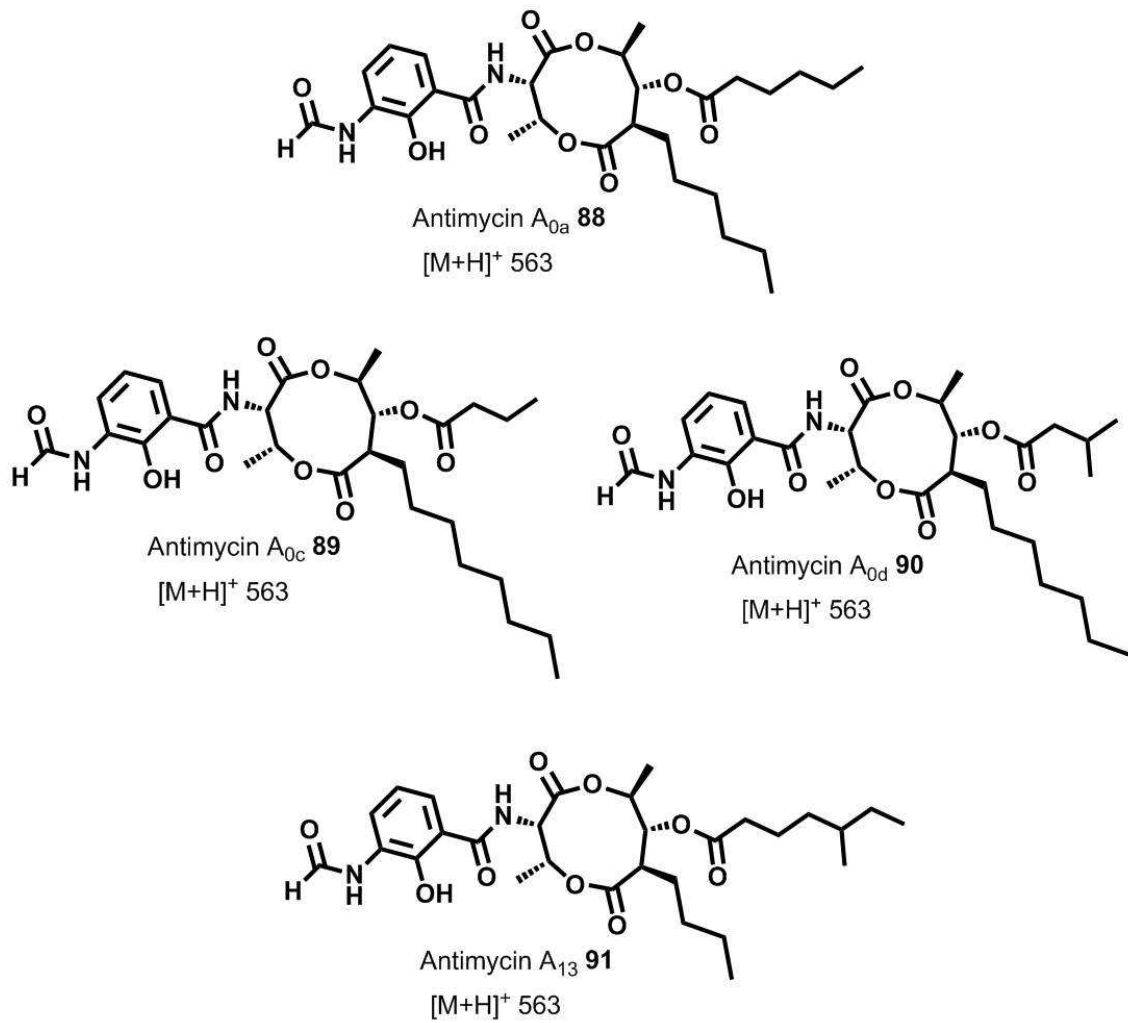


Abbildung 101: Antimycine mit [M+H]⁺ = 563 [136, 137]

8.4.2 Laktone

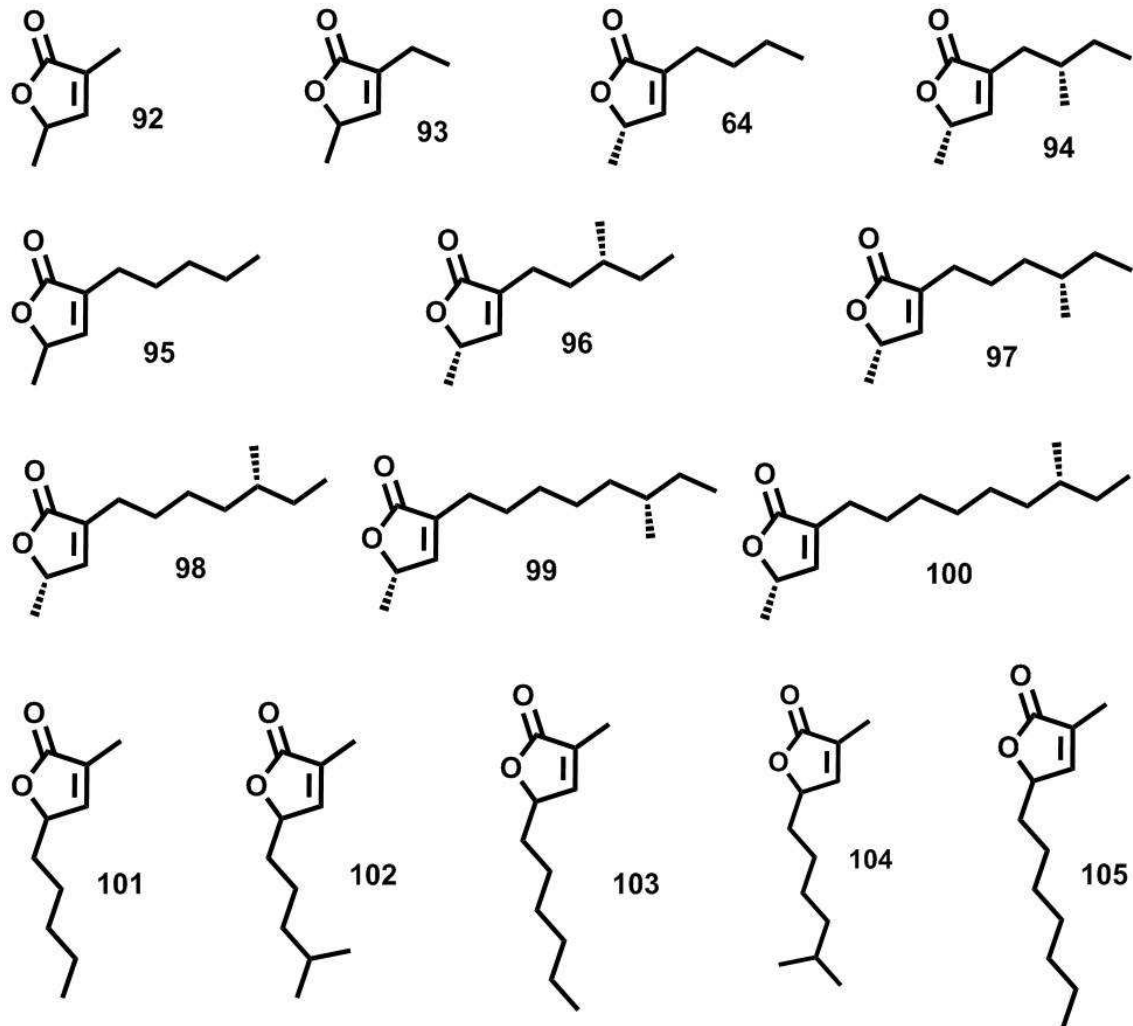


Abbildung 102: Strukturen der Laktone, die Řezanka *et al.* von *S. avermitilis* identifizierten. [168]

8.5 SPME-Chromatogramm-Vergleich von *S. odorifer*

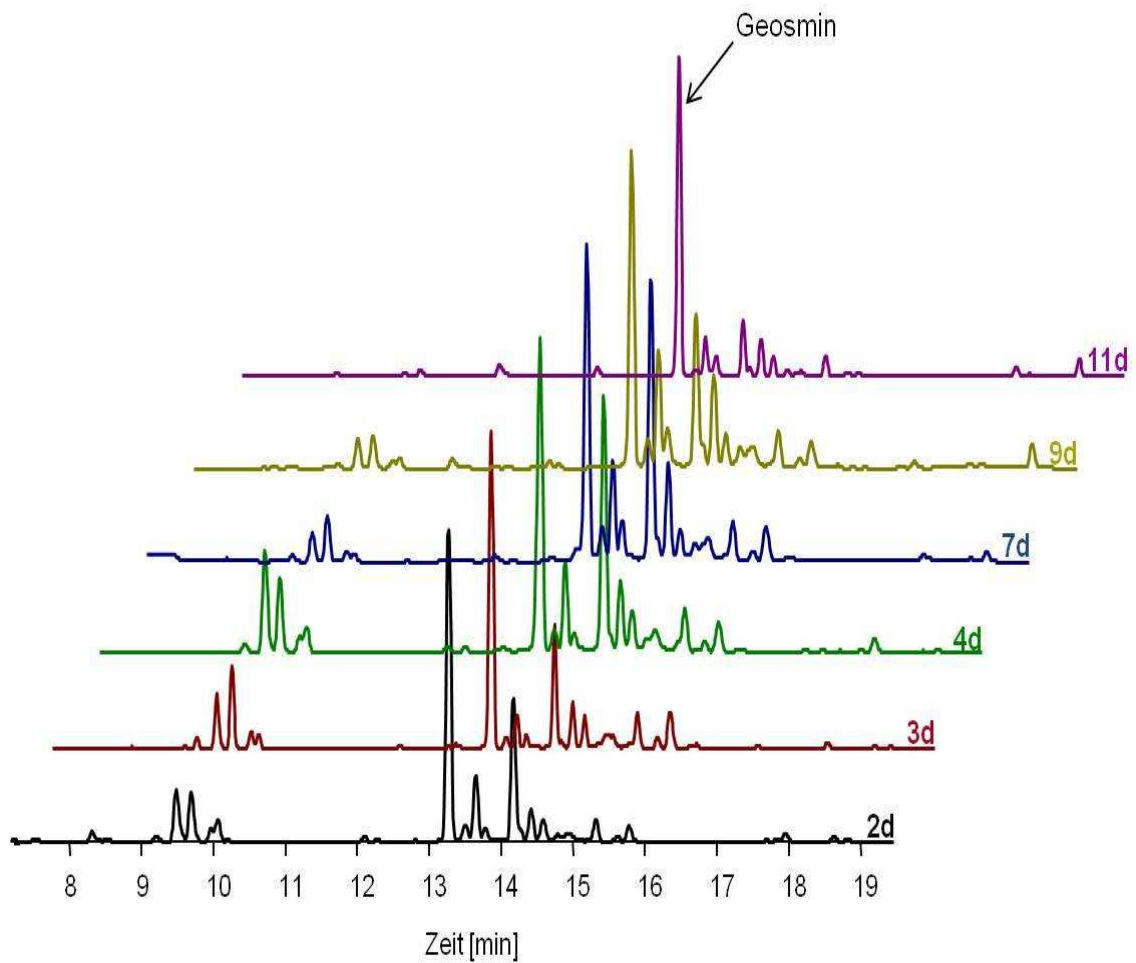


Abbildung 103: Überlagerung von SPME-Messungen, Dauer der Duftsammlung: sechs Stunden, TIC, *S. odorifer* Agarplatten-Kultur, verschiedene Zeitpunkte, Veränderung des Duft-Profiles über die Zeit.

8.6 Spektren

8.6.1 Actinomycine

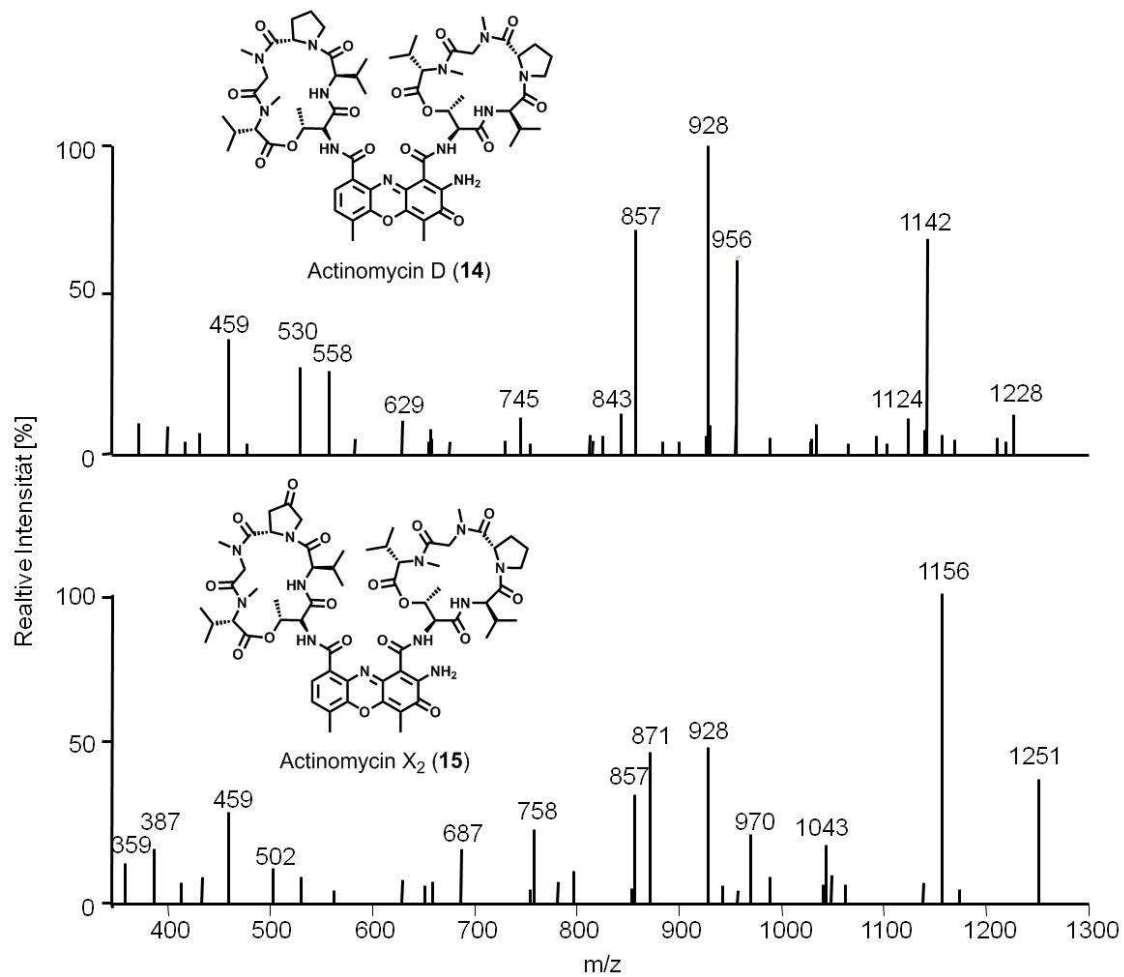


Abbildung 104: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+ = 1255,5$ von Actinomycin D (**14**), und $[M+H]^+ = 1269,5$ von Actinomycin X₂ (**15**), Kollisionsenergie 40 %.

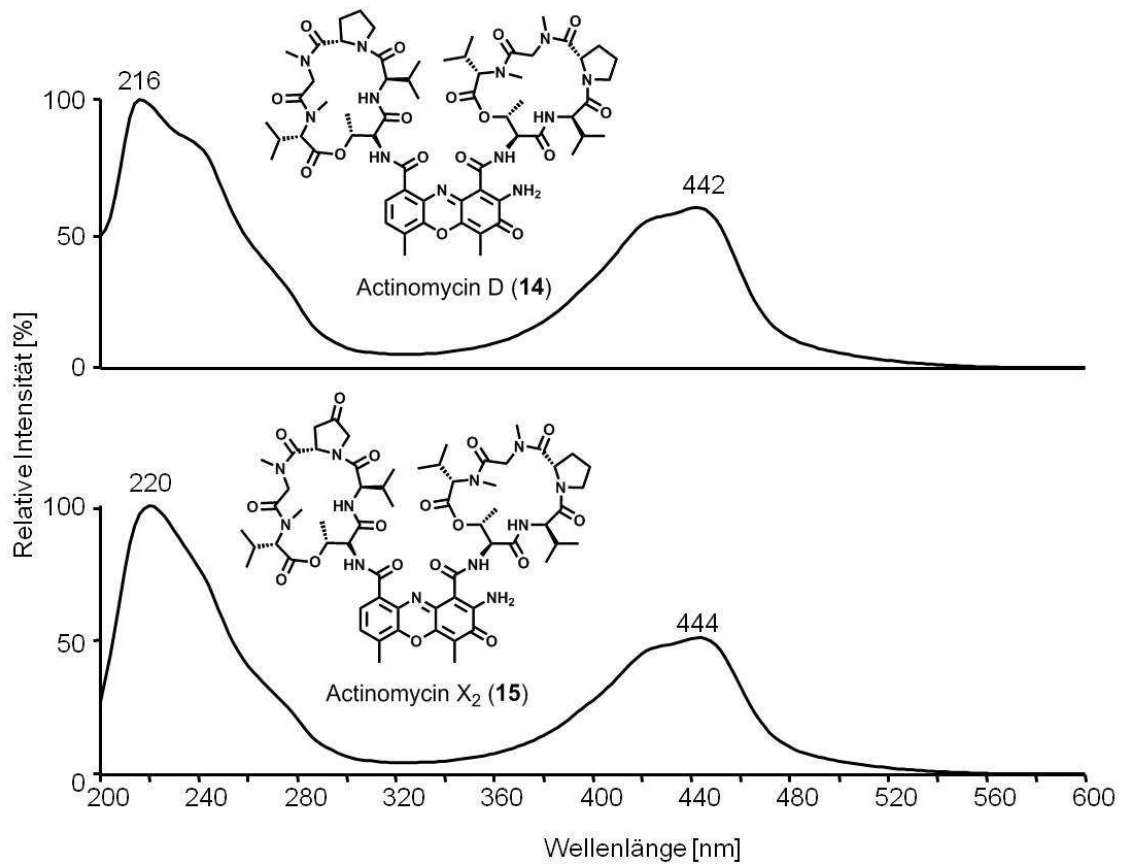


Abbildung 105: UV-Spektrum von Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15).

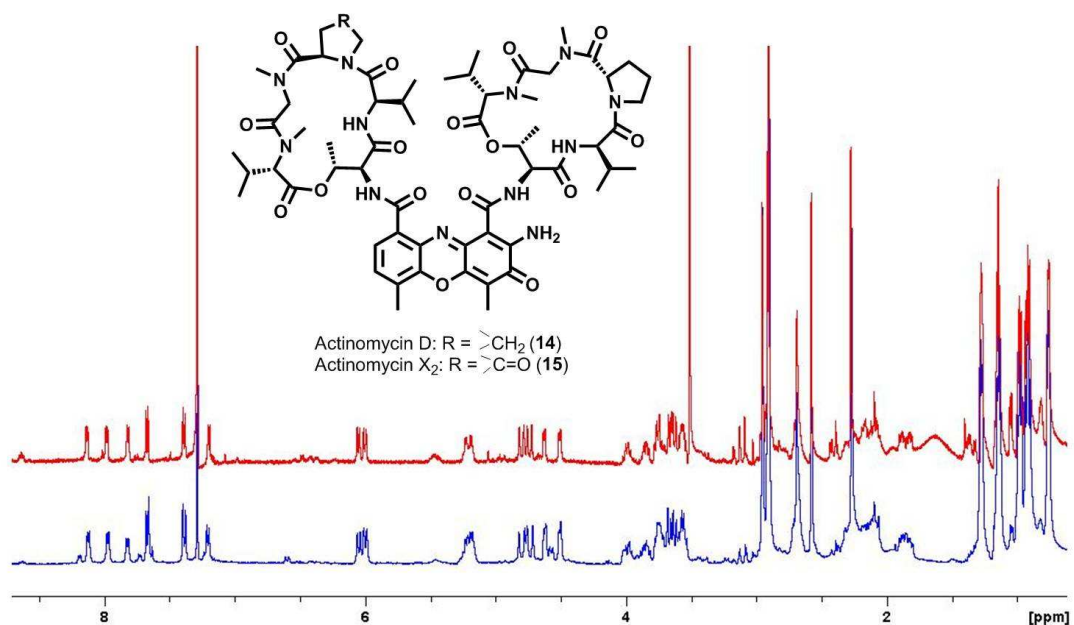


Abbildung 106: ¹H-NMR-Spektrum rot = Standard Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15) zusammen (500 MHz), blau = isoliertes Actinomycin D (14) und Actinomycin X₂ (15) zusammen (400 MHz), CDCl₃.

8.6.2 Valinomycine

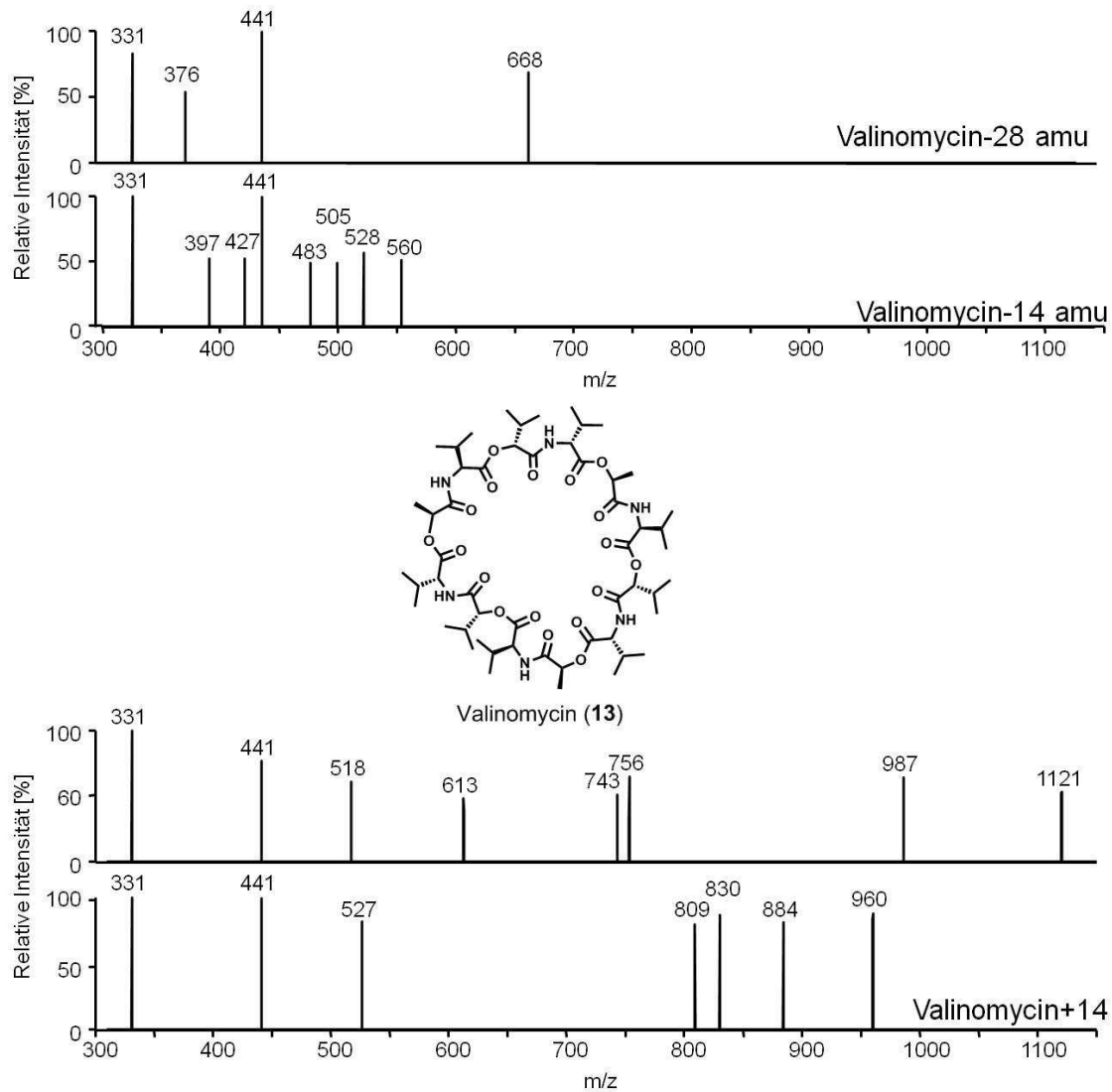


Abbildung 107: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+ = 1100$ von Valinomycin-28 amu; $[M+H]^+ = 1114$ von Valinomycin-14 amu; $[M+H]^+ = 1128$ von Valinomycin (13); $[M+H]^+ = 1142$ von Valinomycin+14 amu; Kollisionsenergie 35 %.

8.6.3 Antimycine

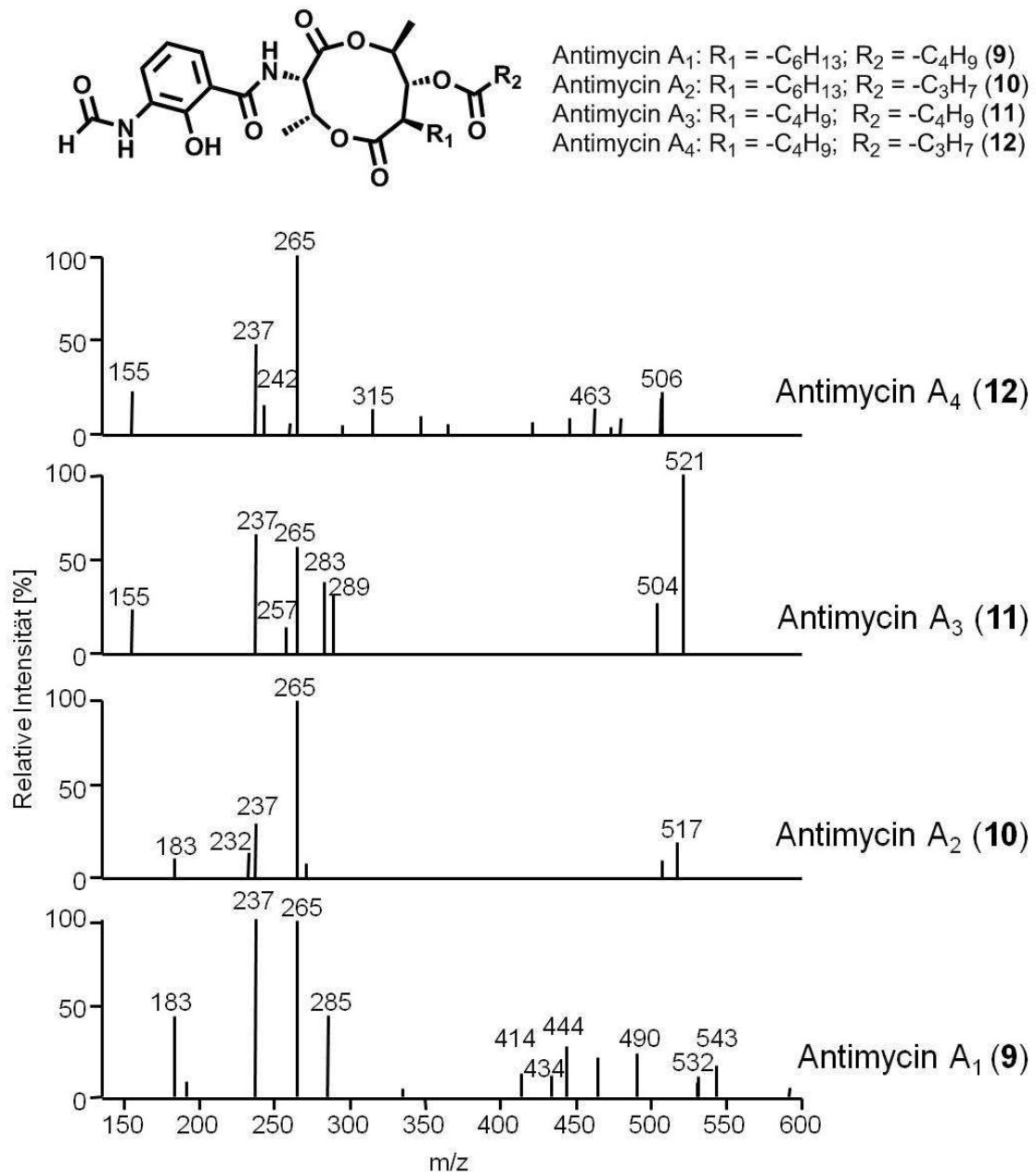


Abbildung 108: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+ = 506,9$ von Antimycin A₄, (**12**); $[M+H]^+ = 520,9$ von Antimycin A₃ (**11**); $[M+H]^+ = 534,9$ von Antimycin A₂ (**10**); $[M+H]^+ = 549$ von Antimycin A₁ (**9**); Kollisionsenergie 40 %.

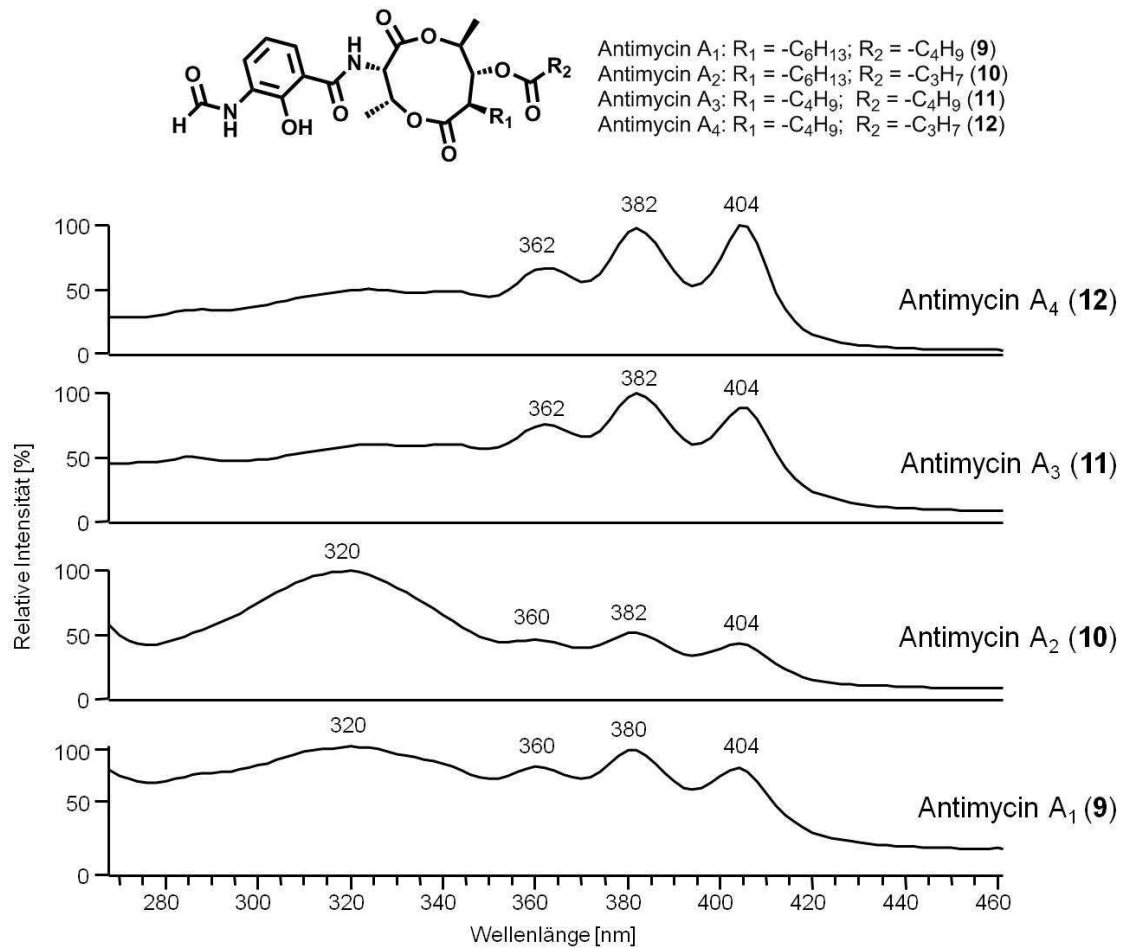


Abbildung 109: Charakteristischer Ausschnitt des UV-Spektrums von Antimycin A₄ (**12**); Antimycin A₃ (**11**); Antimycin A₂ (**10**); Antimycin A₁ (**9**).

8.6.4 Antimycin-563

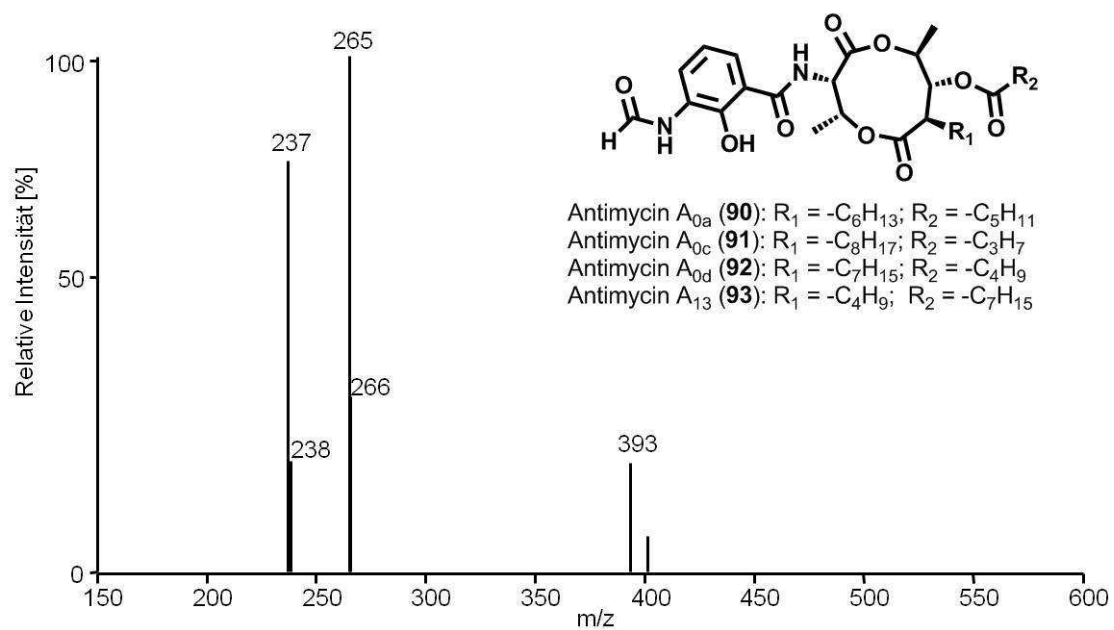


Abbildung 110: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+ = 562,9$ von Antimycin-563, Kollisionsenergie 35 %.

8.6.5 5-F-Antimycin

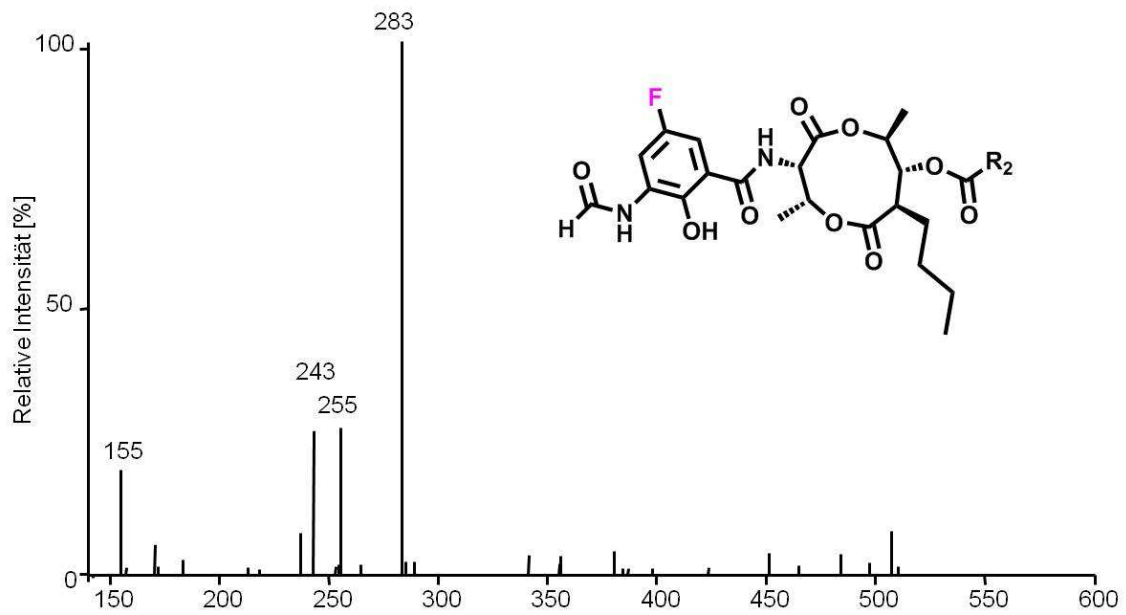


Abbildung 111: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+$ = 524,9 von 5-F-Antimycin A₄ nach 4-Fluoroantraniisäure (31) Verfütterung, R₂ = C₄H₉, Kollisionsenergie 35 %.

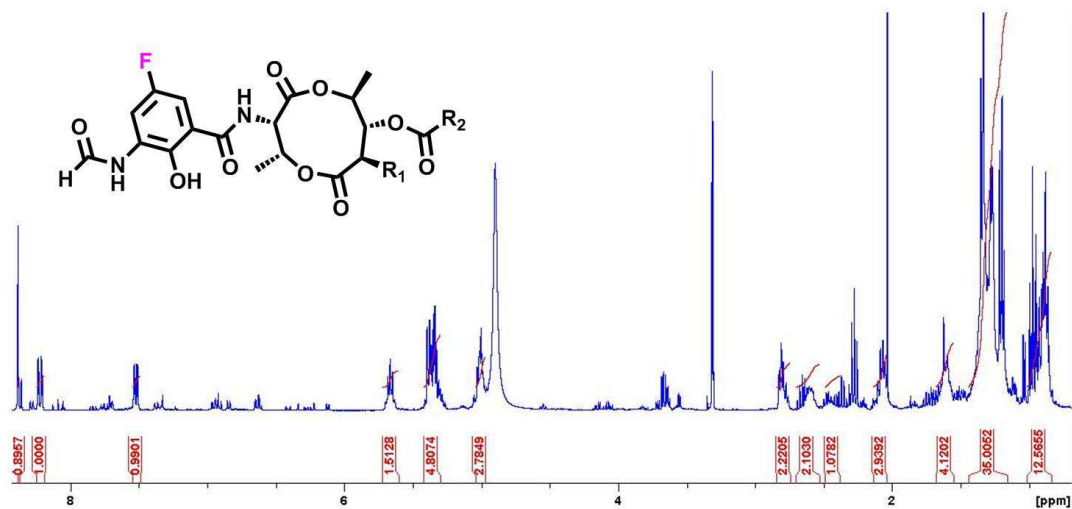


Abbildung 112: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) 5-F-Antimycin nach 4-Fluoroantraniisäure (31) Verfütterung, R₁ = Alkyl, R₂ = Alkyl; CD₃OD.

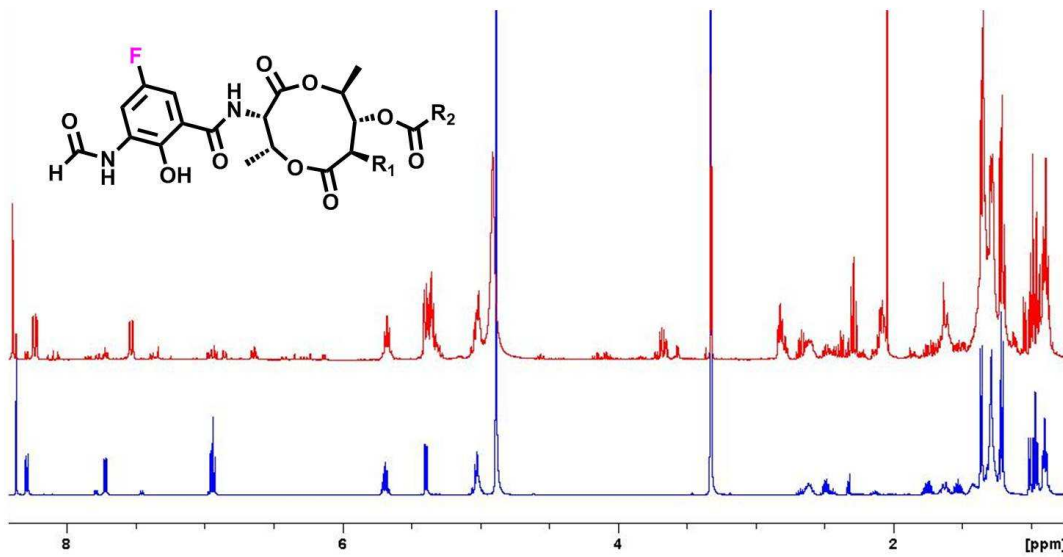


Abbildung 113: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) rot = 5-F-Antimycin nach 4-Fluoroanthranilsäure (31) Verfütterung, blau = Antimycin A₁ – A₄ (9 – 12) Standard, R₁ = Alkyl, R₂ = Alkyl; CD₃OD.

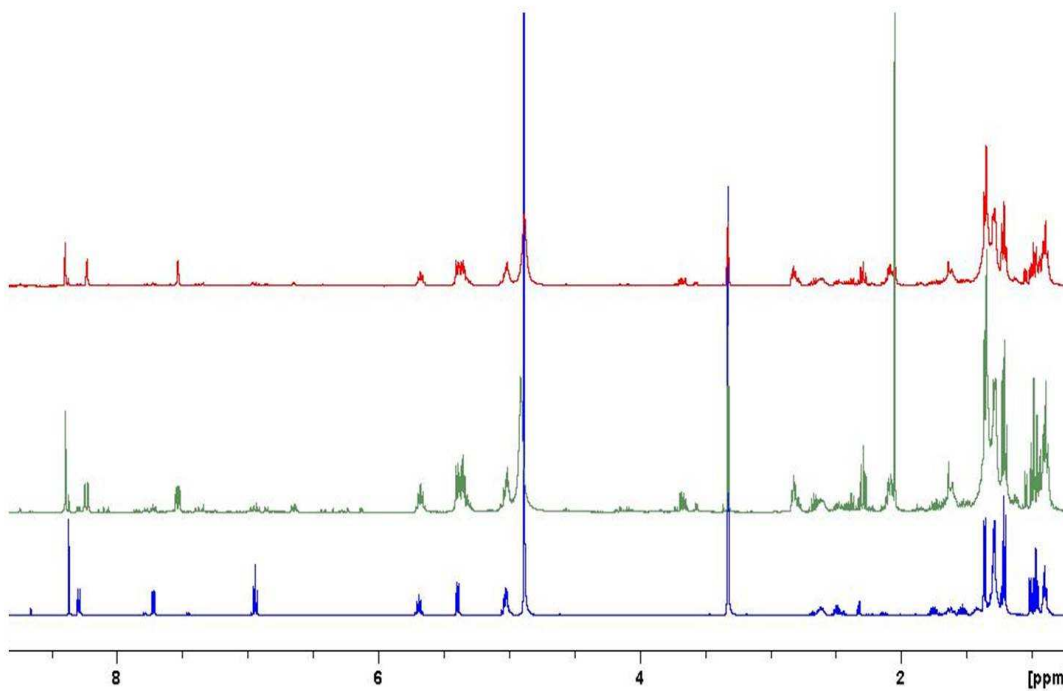


Abbildung 114: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz) rot = 5-F-Antimycin nach 4-Fluoroanthranilsäure (31) Verfütterung mit F-Entkopplung, grün = 5-F-Antimycin nach 4-Fluoroanthranilsäure (31) Verfütterung, blau = Antimycin A₁ – A₄ (9 – 12) Standard; CD₃OD.

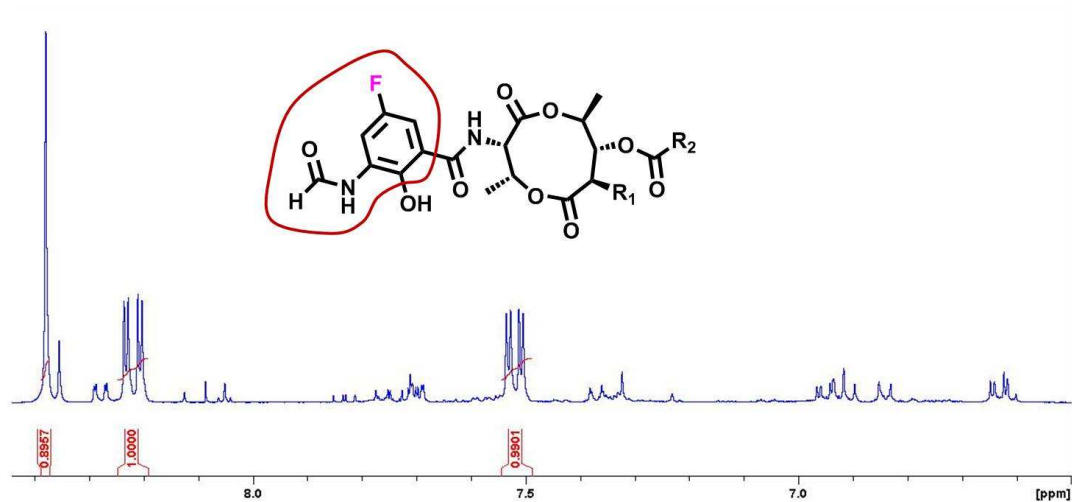


Abbildung 115: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) aromatischer Bereich des 5-F-Antimycins nach 4-Fluoroanthranilsäure (31) Verfütterung, $\text{R}_1 = \text{Alkyl}$, $\text{R}_2 = \text{Alkyl}$, roter Kreis = Ausschnitt des Spektrums; CD_3OD .

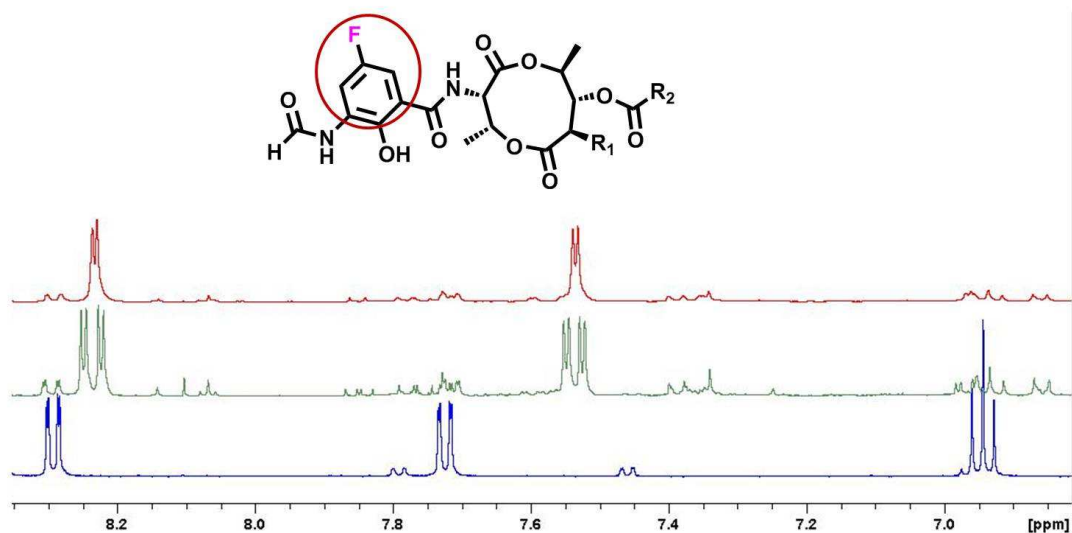


Abbildung 116: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) aromatischer Bereich, rot = 5-F-Antimycin nach 4-Fluoroanthranilsäure (31) Verfütterung mit F-Entkopplung, grün = 5-F-Antimycin nach 4-Fluoroanthranilsäure (31) Verfütterung, blau = Antimycin $\text{A}_1 - \text{A}_4$ (9 - 12) Standard, $\text{R}_1 = \text{Alkyl}$, $\text{R}_2 = \text{Alkyl}$, roter Kreis = Ausschnitt des Spektrums; CD_3OD .

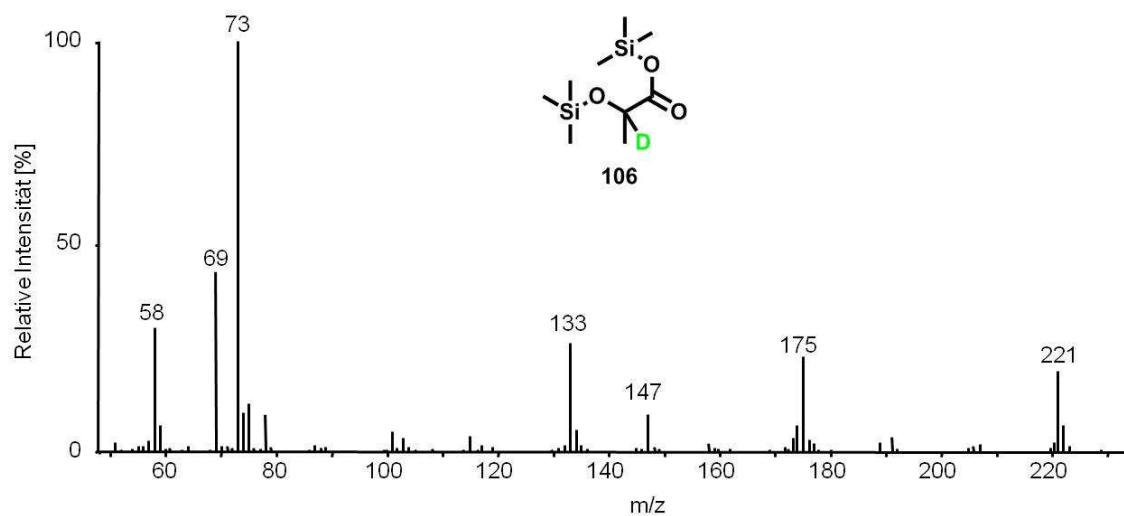
8.6.6 $[^2\text{H}]$ -Milchsäure (52)

Abbildung 117: EI-MS-Spektrum von $[^2\text{H}]$ -Milchsäure mit MSTFA derivatisiert **106**, $\text{M}^{+-15} = 221$.

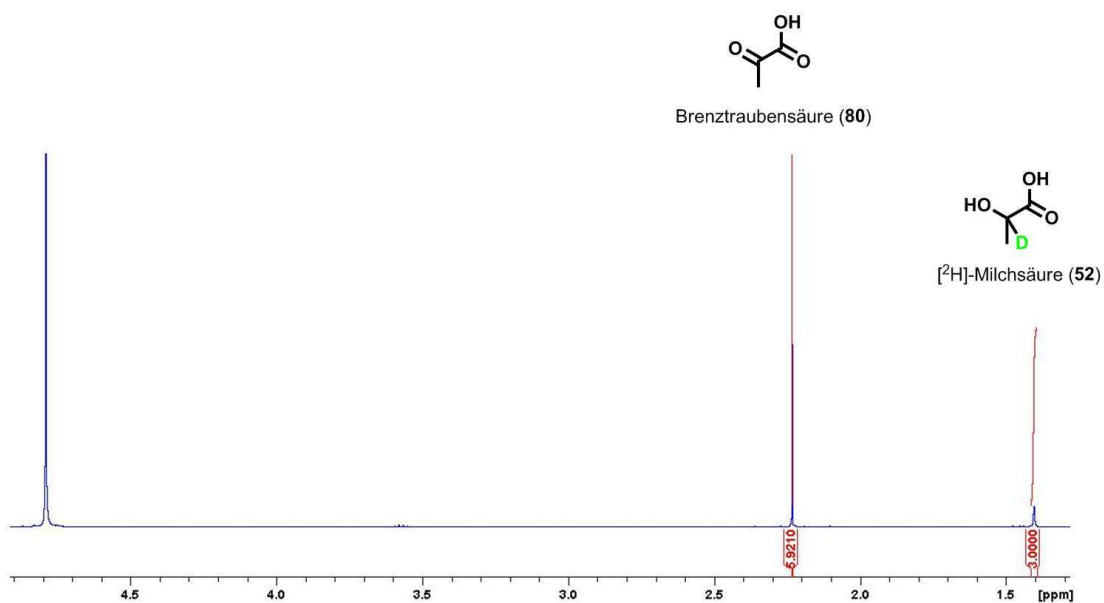


Abbildung 118: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) einer Mischung (nicht aufgereinigt) aus Brenztraubensäure (**80**) = 2,24 ppm und $[^2\text{H}]$ -Milchsäure (**52**) = 1,40 ppm, D_2O .

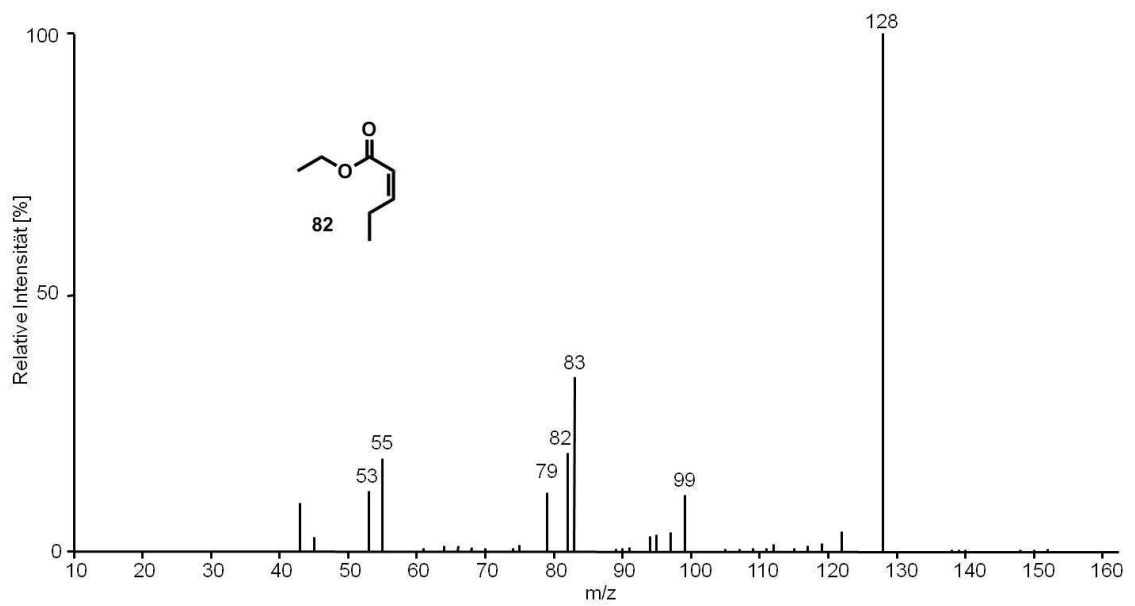
8.6.7 Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**)

Abbildung 119: EI-MS-Spektrum von Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**) $M^{++} = 128$.

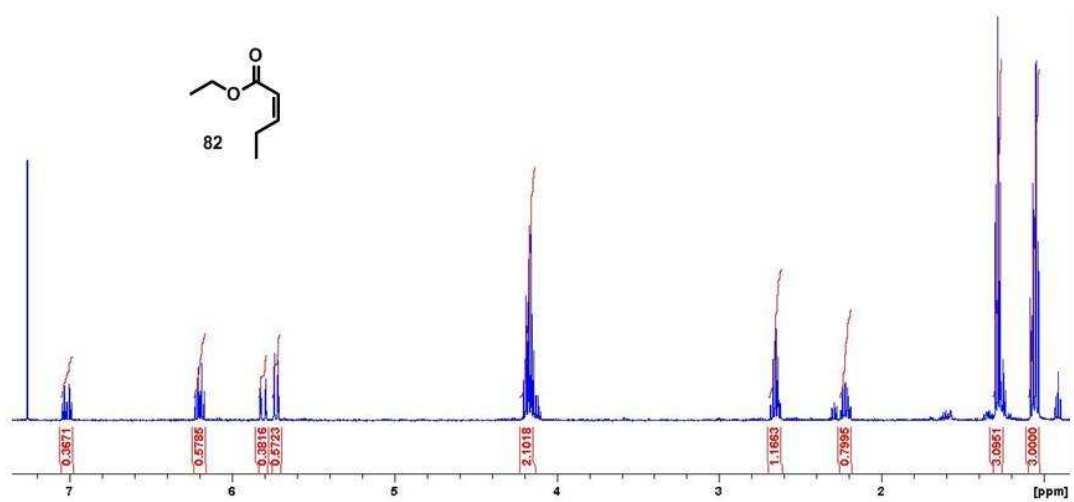


Abbildung 120: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**), CDCl_3 .

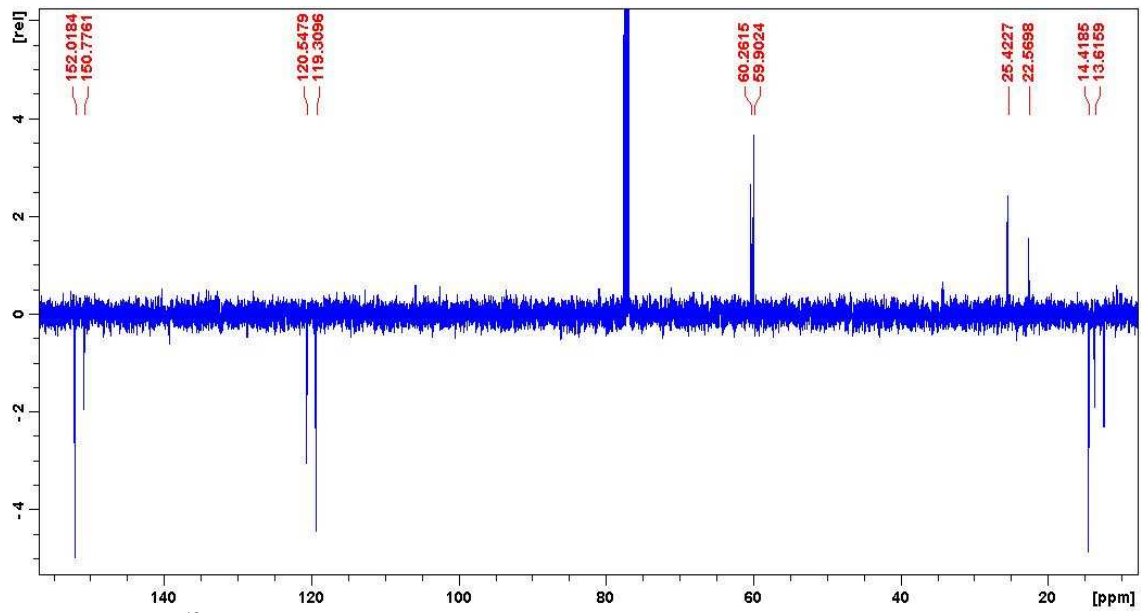


Abbildung 121: ^{13}C -APT-NMR-Spektrum (125 MHz) von Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**), für CO-Signal zu schwach, CDCl_3 .

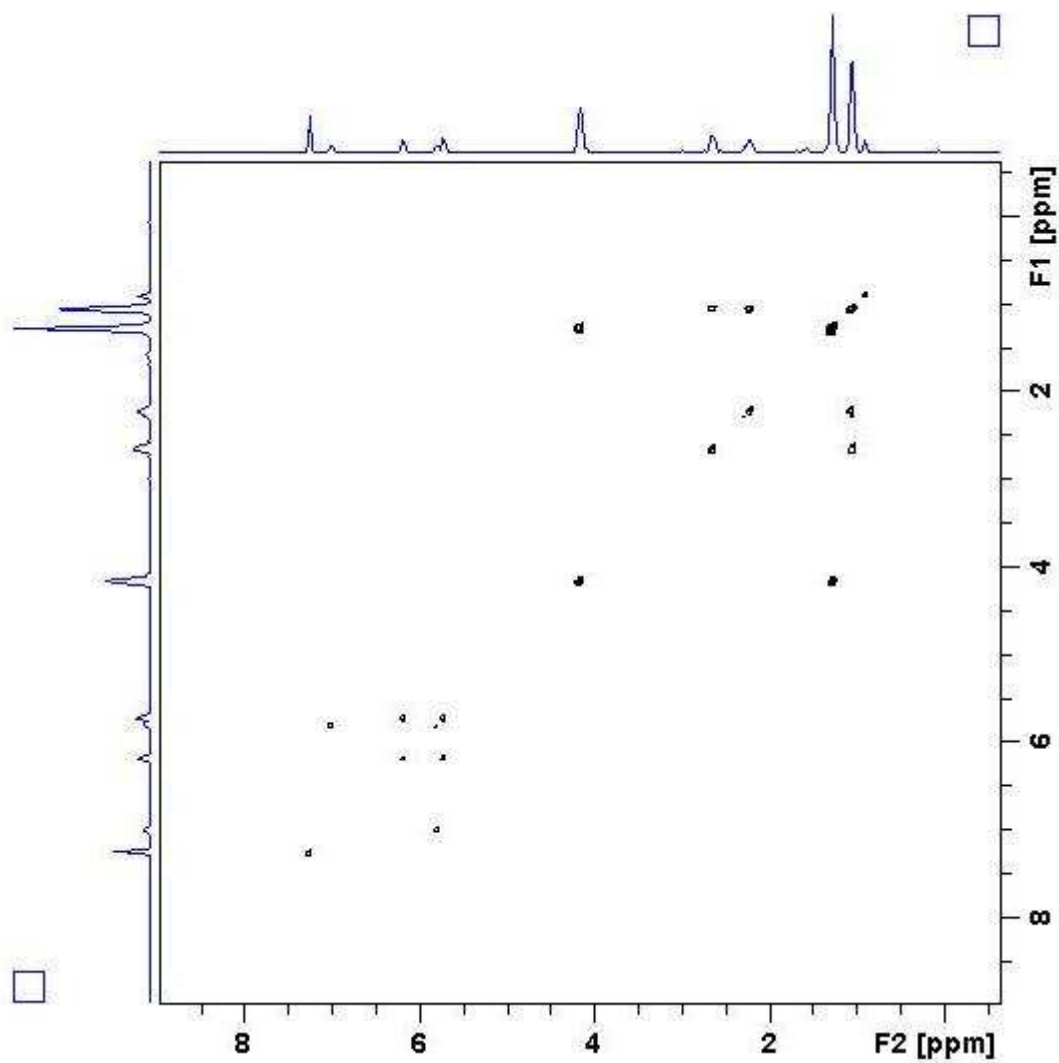


Abbildung 122: H,H-COSY-NMR Spektrum (500 MHz) von Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**), CDCl_3 .

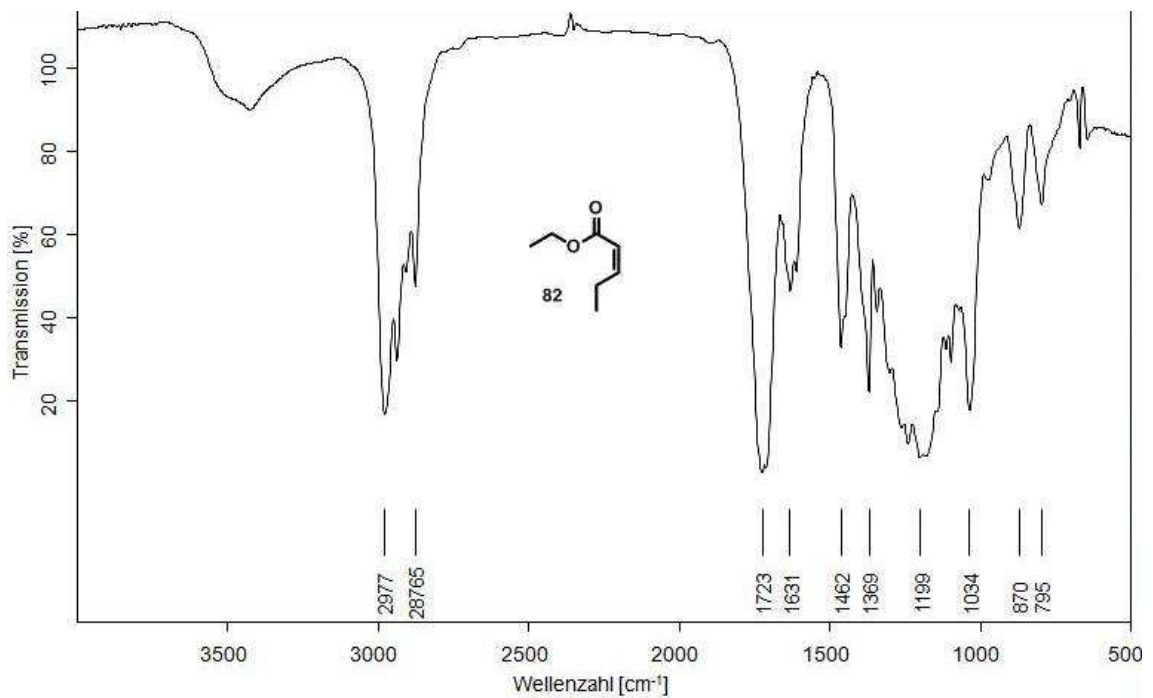


Abbildung 123: IR-Spektrum von Pent-2(*E/Z*)-enethylester (**82**), ZnS.

8.6.8 2-Butyl-3(*E*)-pentenethylester (**83**) [248]

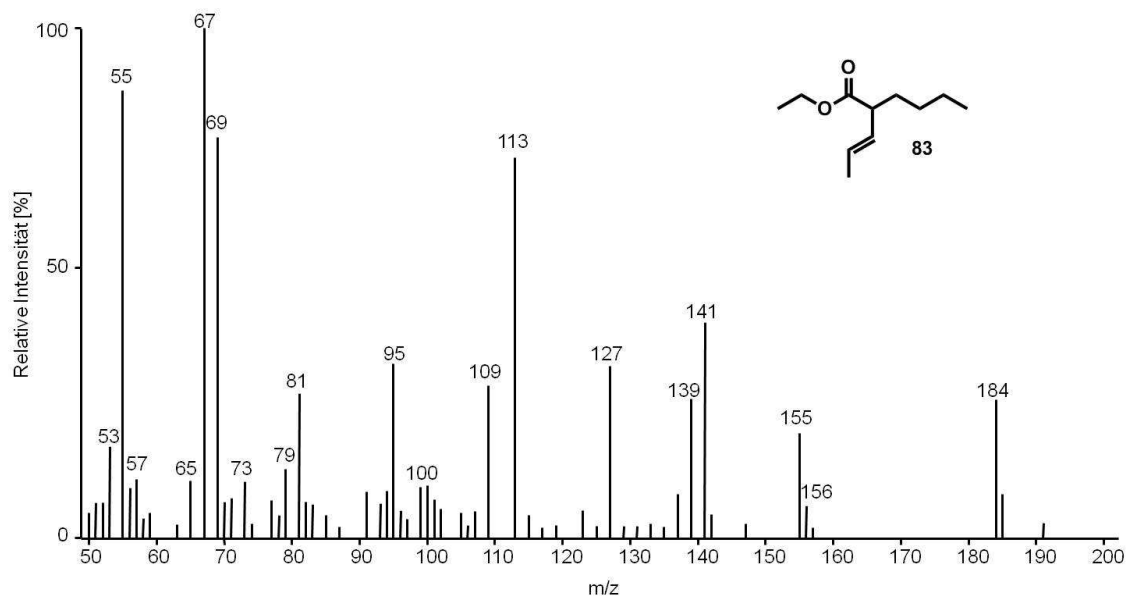


Abbildung 124: EI-MS-Spektrum von 2-Butyl-3(*E*)-pentenethylester (**83**) $M^{++} = 184$.

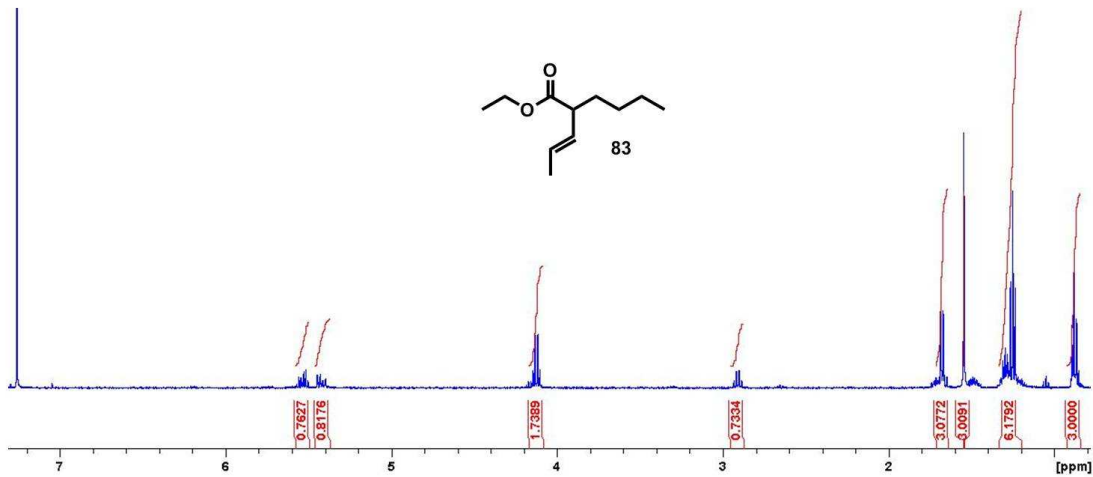


Abbildung 125: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) von 2-Butyl-3(E)-pentenylester (83), CDCl₃.

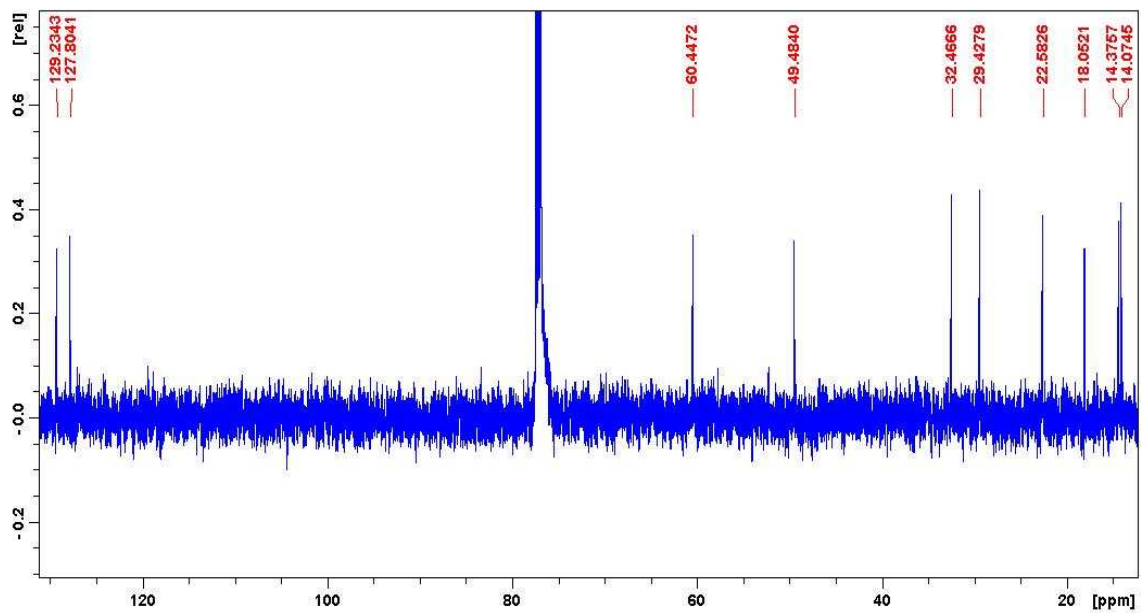


Abbildung 126: ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz) von 2-Butyl-3(E)-pentenylester (83), für CO-Signal zu schwach, CDCl₃.

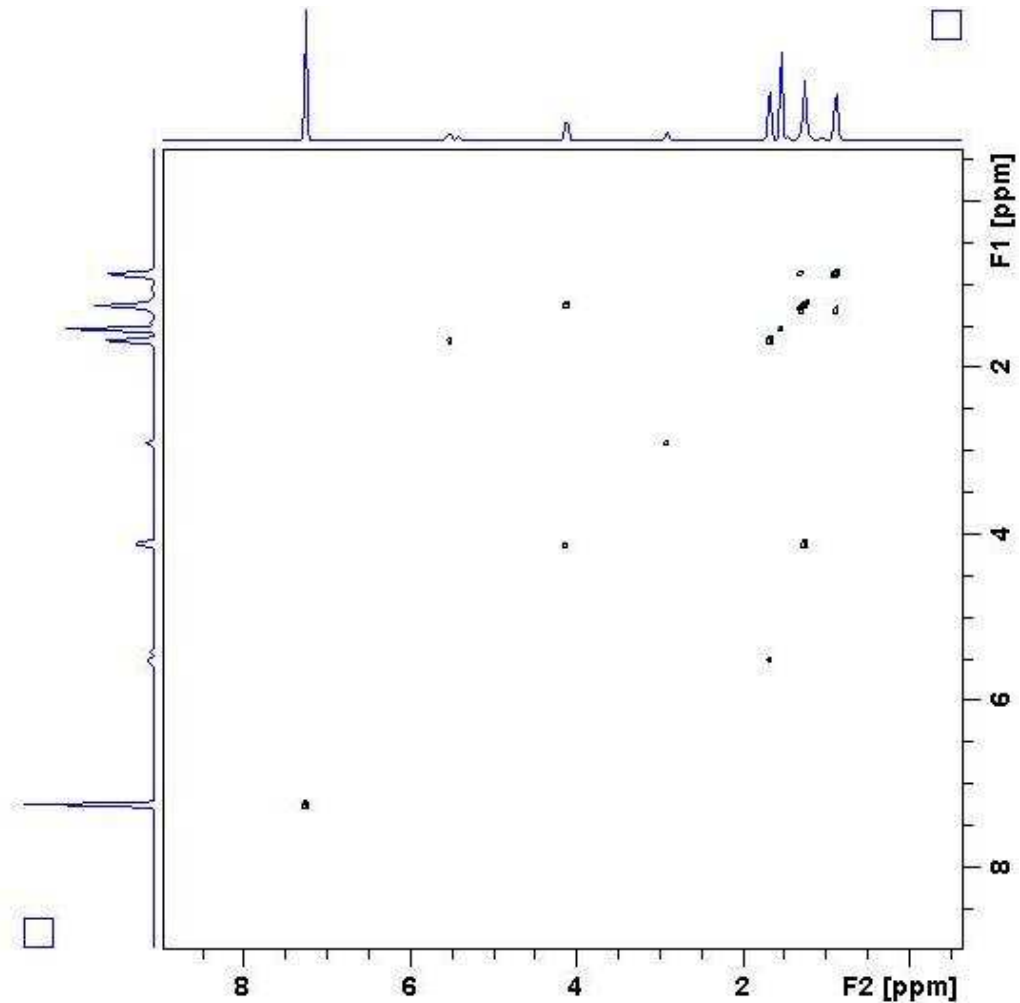


Abbildung 127: H,H-COSY-NMR-Spektrum (500 MHz) von 2-Butyl-3(E)-pentenylester (**83**), CDCl_3 .

8.6.9 (4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**) [248]

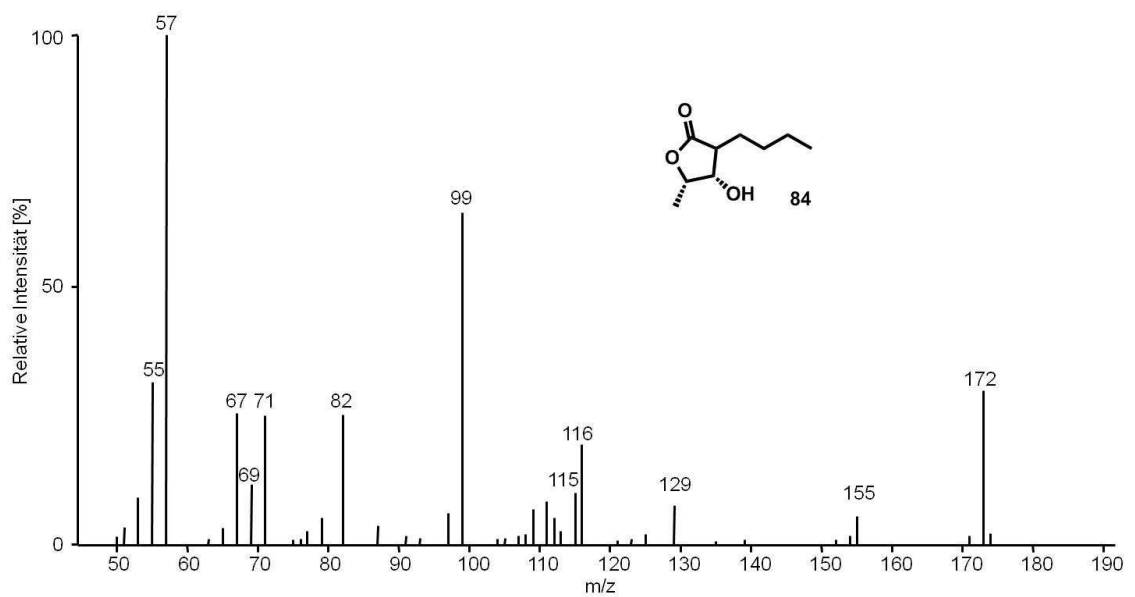


Abbildung 128: EI-MS-Spektrum von (4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**), $M^{++} = 172$.

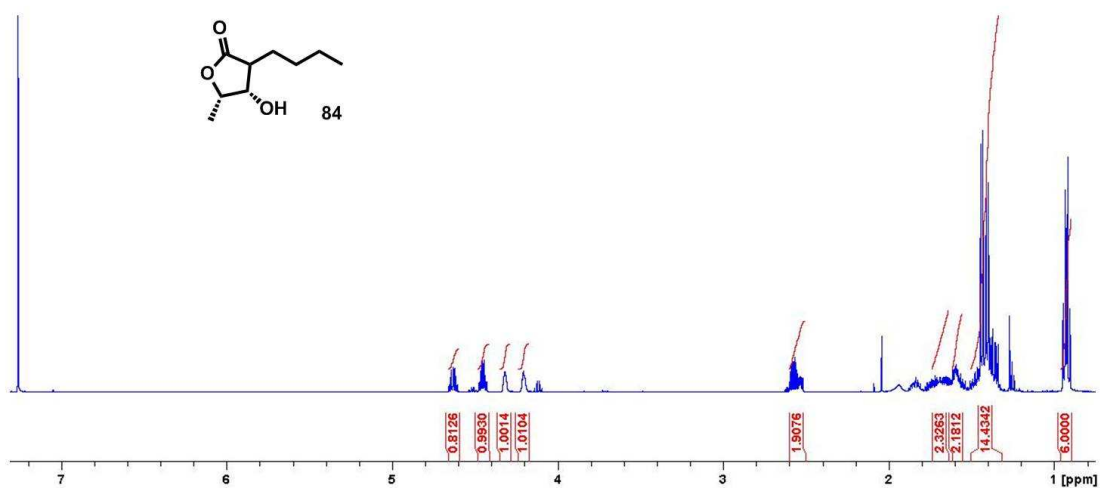


Abbildung 129: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) von ((4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (84) und Diastereomer, CDCl₃.

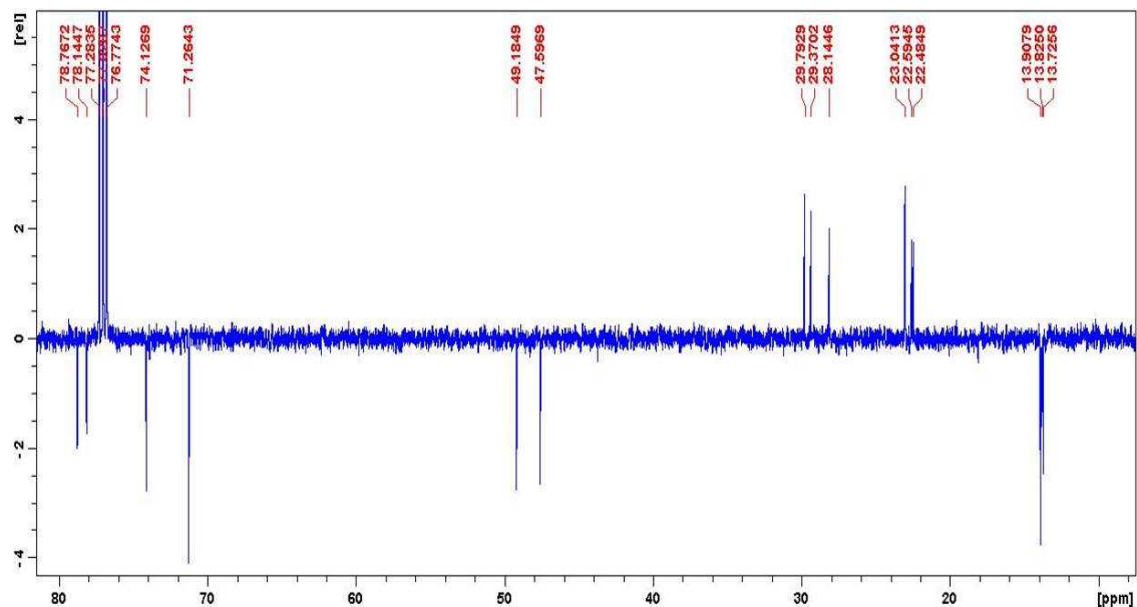


Abbildung 130: ¹³C-APT-NMR-Spektrum (125 MHz) von ((4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (84) mit Diastereomer, für CO-Signal zu schwach; CDCl₃.

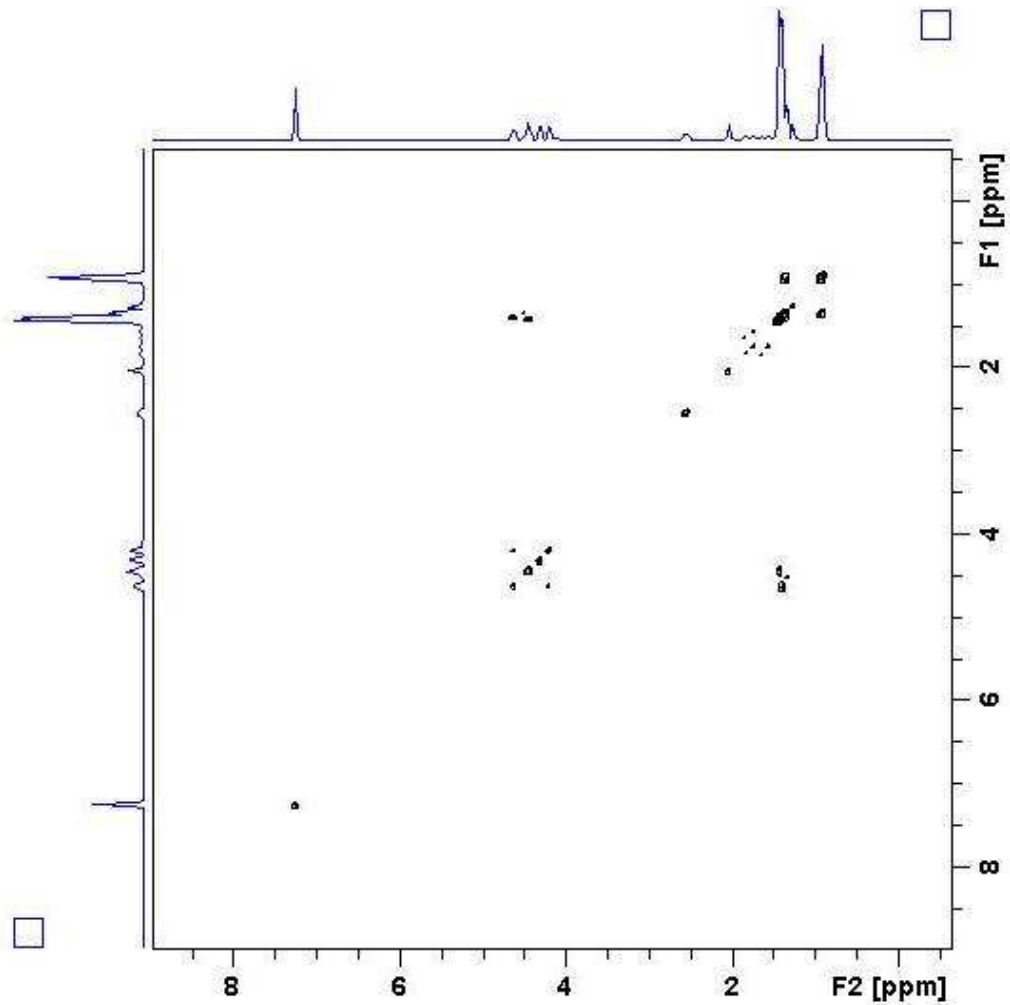


Abbildung 131: H,H-COSY-NMR-Spektrum (500 MHz) von (4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**) und Diastereomer; CDCl₃.

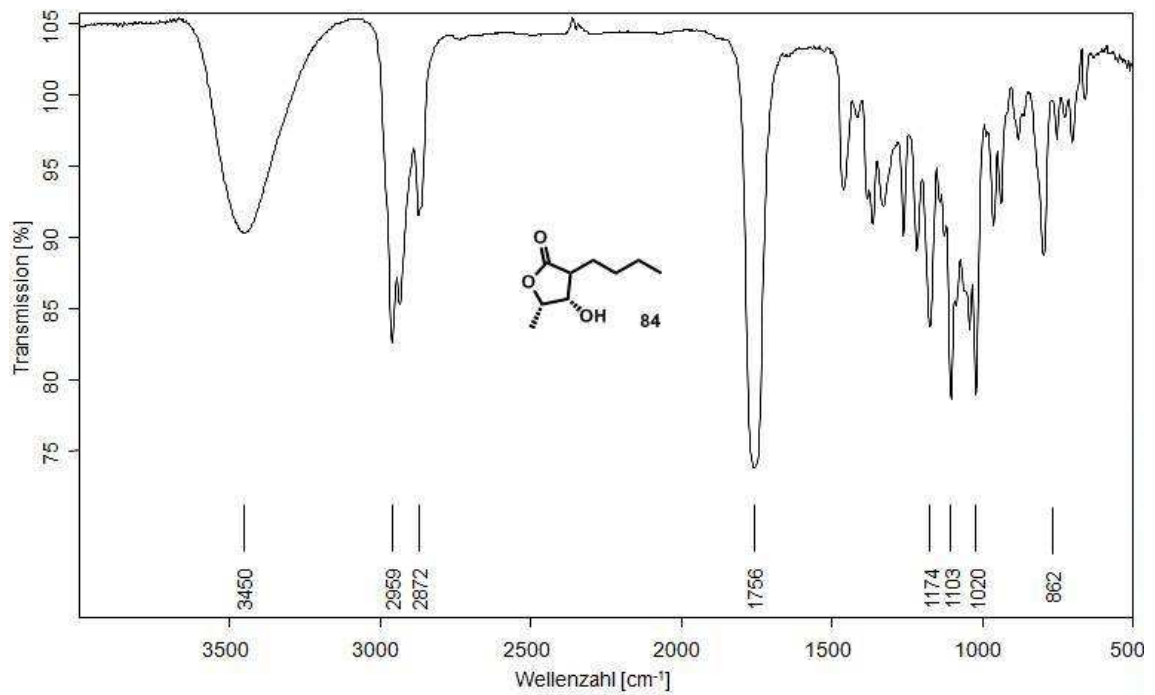
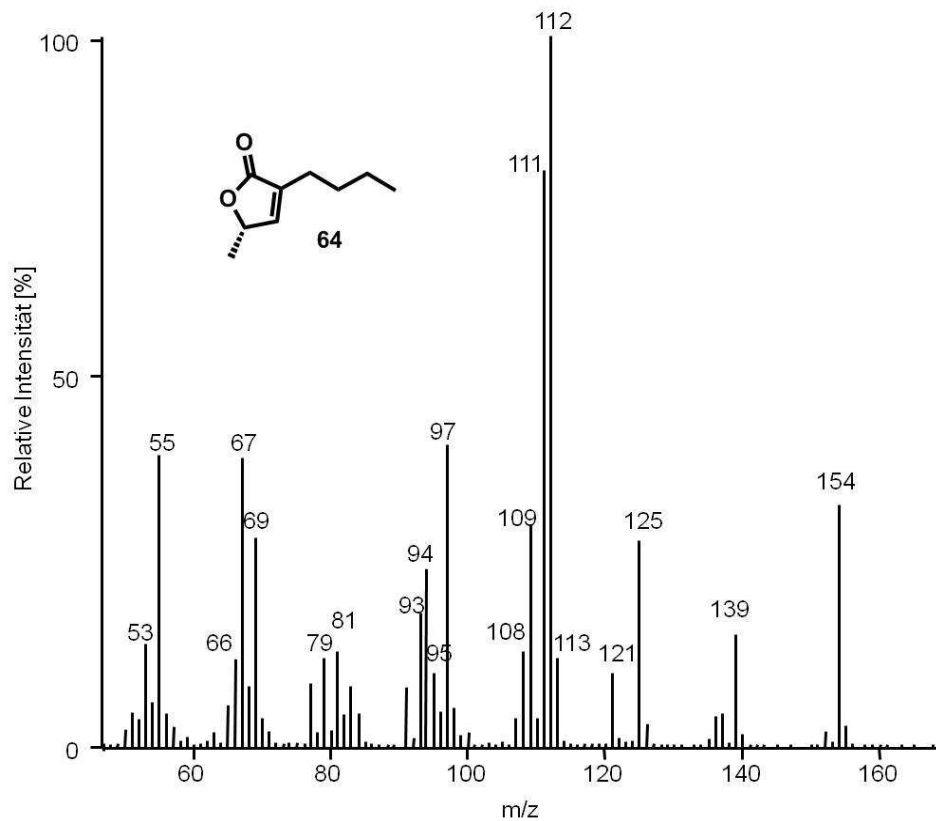
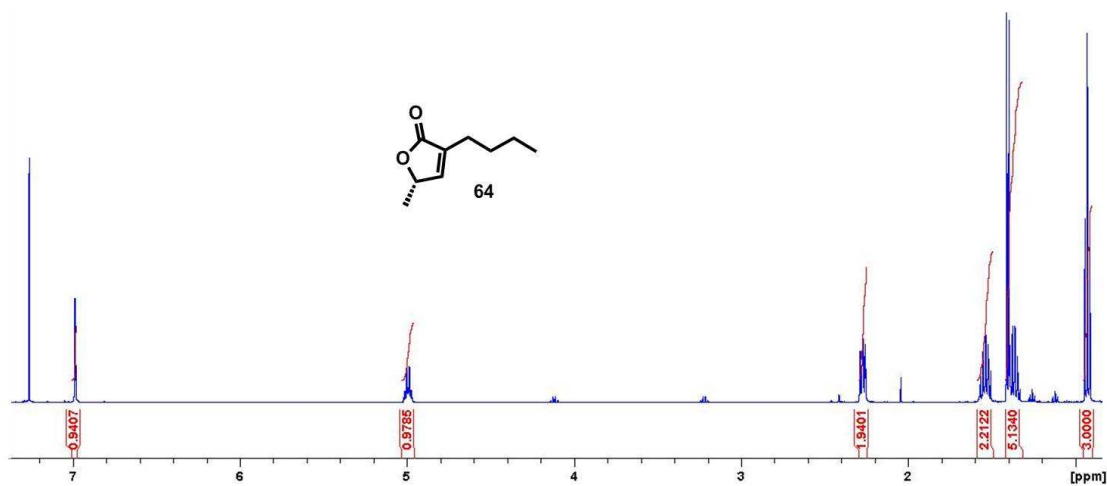


Abbildung 132: IR-Spektrum von (4S, 5S)-3-Butyl-4-hydroxy-5-methyltetrahydro-2-furanon (**84**) und Diastereomer, ZnS.

8.6.10 (5*S*)-3-Butyl-5-methyl-2(5*H*)-furanon (64) [248]Abbildung 133: EI-MS-Spektrum von (5*S*)-3-Butyl-5-methyl-2(5*H*)-furanon (64), $M^{+} = 154$.Abbildung 134: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) von (5*S*)-3-Butyl-5-methyl-2(5*H*)-furanon (64), CDCl₃.

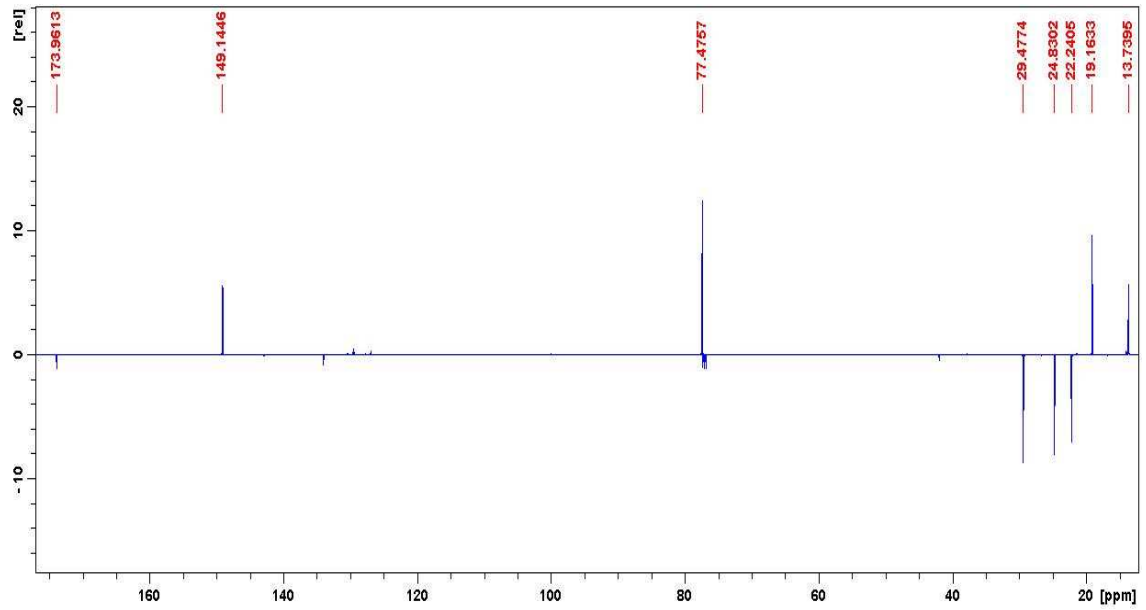


Abbildung 135: ^{13}C -APT-NMR-Spektrum (125 MHz) von (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (64), CDCl_3 .

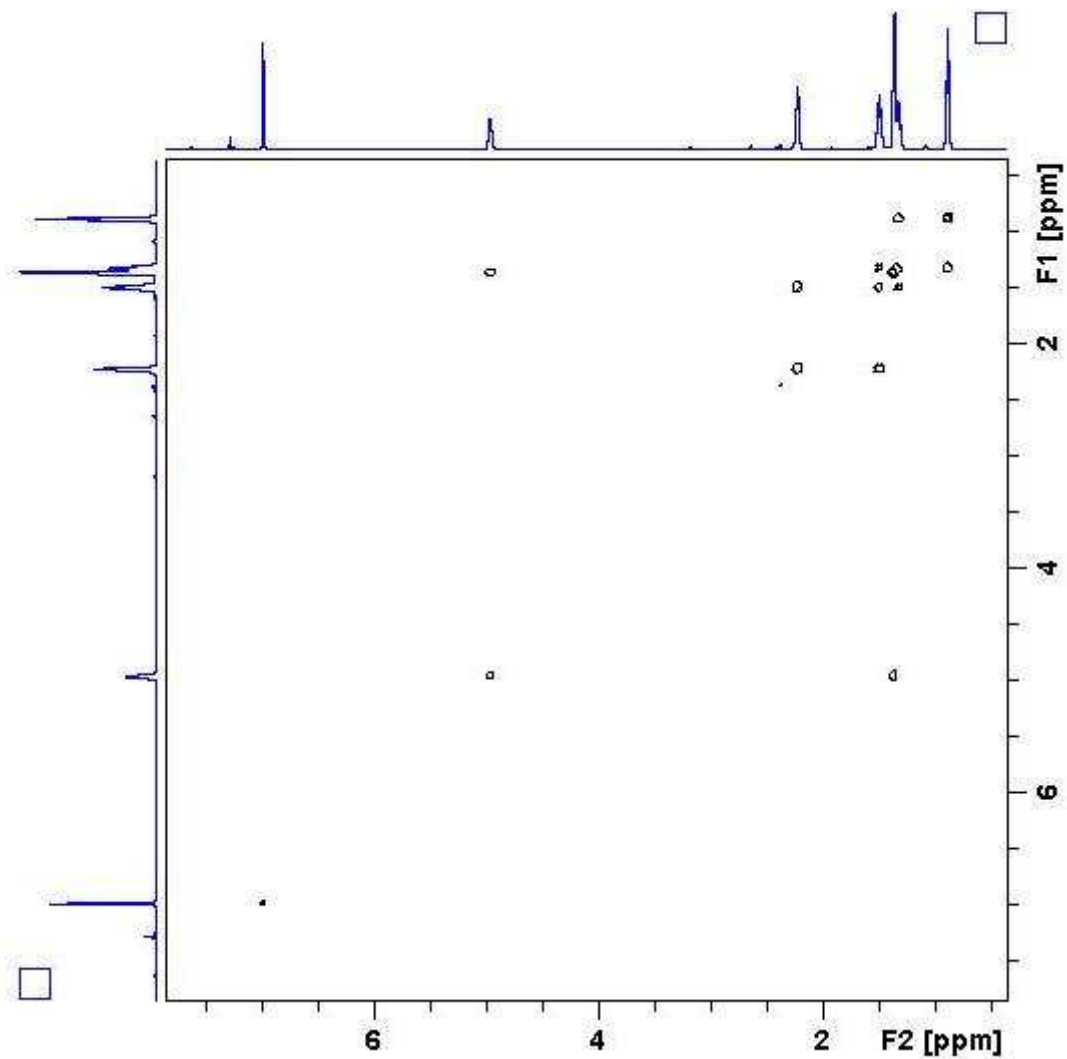


Abbildung 136: H,H -COSY-NMR-Spektrum (500 MHz) von (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (64), CDCl_3 .

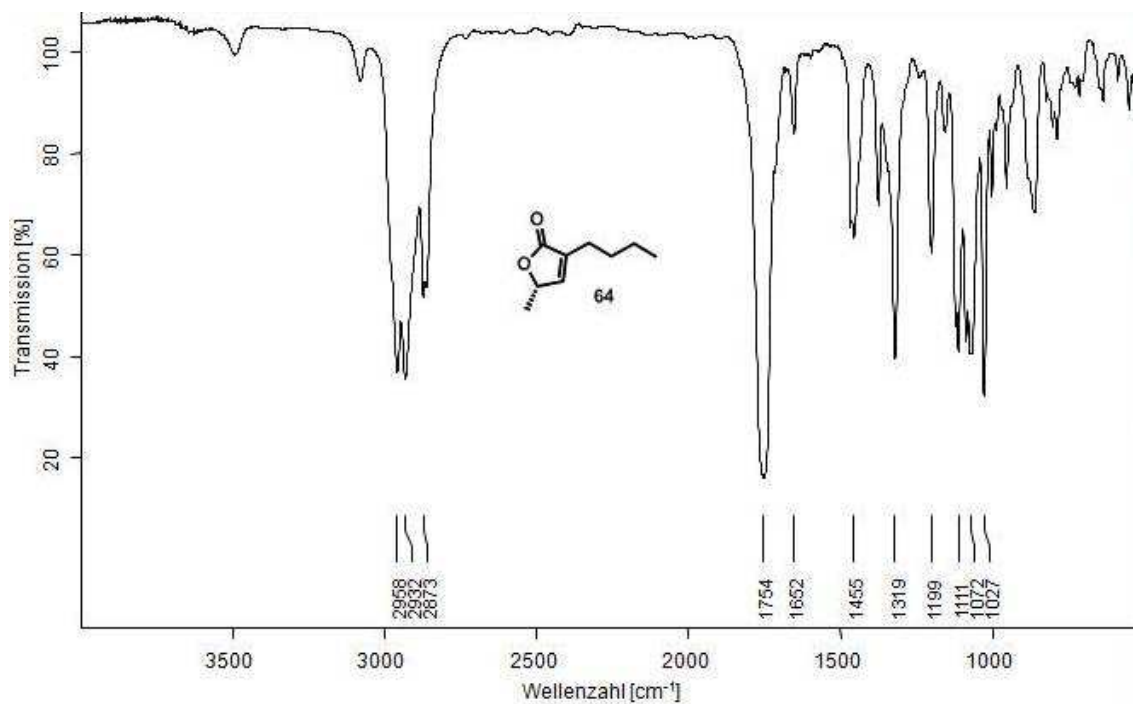


Abbildung 137: IR-Spektrum von (5S)-3-Butyl-5-methyl-2(5H)-furanon (**64**), NaCl.

8.6.11 Desferrioxamine

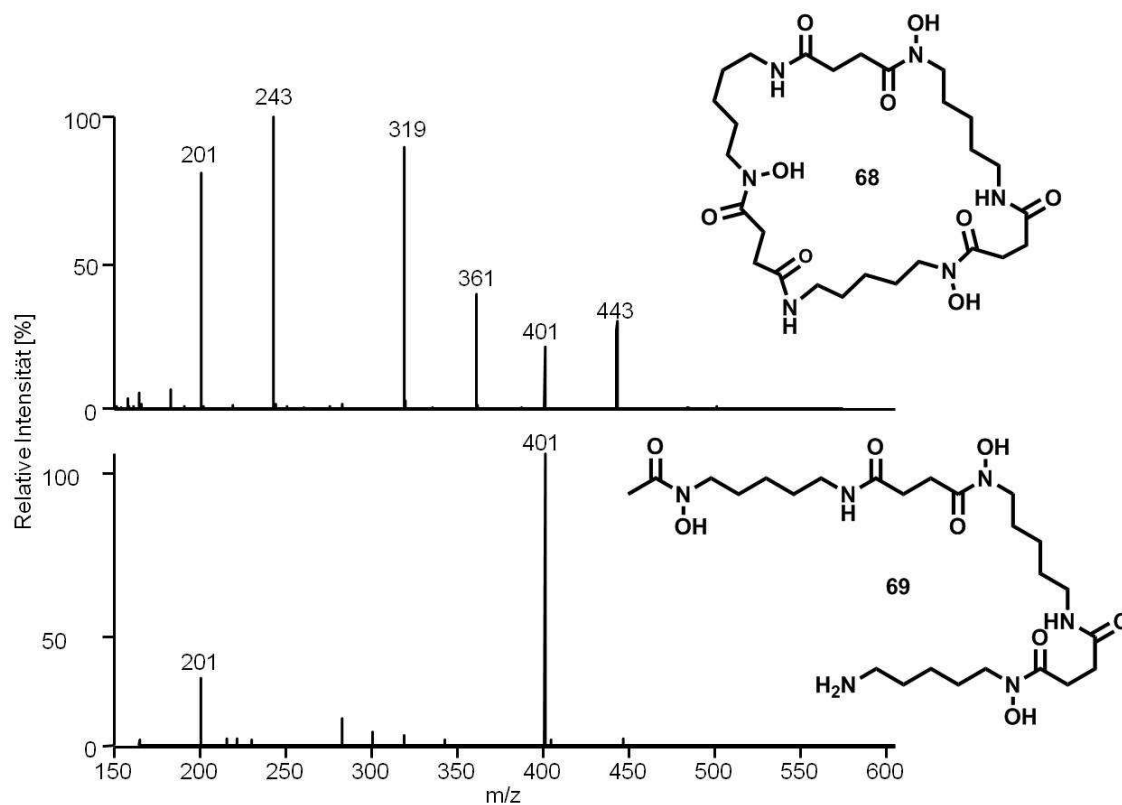


Abbildung 138: ESI-MS/MS-Spektrum des $[M+H]^+ = 601$ von Desferrioxamin B (**68**); $[M+H]^+ = 561$ von Desferrioxamin E (**69**); Kollisionsenergie 35%.

8.7 DNA Sequenzen

8.7.1 *ermE**_p

GATATCAGCCCCGACCCGAGCA CGCGCCGGCACGCCTGGTCGATGTCGGACCGGAGTTCGAGGTAC
GCGGCTTGCAGGTCCAGGAAGGGGACGTCCATGCGAGTGTCCGTTTCGAGTGGCGGCTTGCSCCGG
ATGCTAGTCGCGGTTGATCGGCGATCGCAGGTGCACGCGGTTCGATCTTGACGGCTGGCGAGAGGTG
CGGGGAGGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTGGCACCCGCGATGCTGTTGTGGGCTGGACAA TCGT
GCCGTTGGT CATATG

8.7.2 mCherry

TTAGCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAG
GTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCC
CTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGA
CATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGAC
TACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGC
GTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGC
GGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCC
GAGCGGATGTACCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGA
CGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGG
CGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAG
TACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGAC GAGCTGTACAAGTGA GCGGCCGG
TACG

8.7.3 *hygB*

GATATCGCTAGCGGCAGCAGCCTGCCATGAAAAAGCCTGAACTCACCCGACGTCTGTGAGAAGT
TTCTGATCGAAAAGTTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGC
TTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGATATGTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTAC
AAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGG
GGCATTACGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTG
CCTGAAACCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCC
GATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGC
GTGATTTATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAACCTGTGATGGACGACACCCGTC
AGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGG
CACCTCGTGCACGCGGATTTCCGGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCA
TTGACTGGAGCGAGGCGATGTTCCGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCC
GTGGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATC
GCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAAACCTATCAGAGCTTGGTTGACGGC
AATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACT
GTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTC
GCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCG
ACAAGAGCTGATTTGAGAACGCCTCAGCCAGCAACTCGCGCGAGCCTAGCAAGGCAAATGCGAG
AGAACGGCCTTACGCTTGGTGGCACAGTTCTCGTCCACAGTTTCGTAAGCTCGCTCGGCTGGGTCCG
GGGAGGGCCGGTTCGAGTATTAGGCCCTTCTGGATTGTGTTGGTCCCCAGGGCACGATTGTCAT
GCCACGCACTCGGGTGTACTGATCCCGCAGATTGGAGATCGCCGCCCGTGCCTGCCGATTG
GGTGCAGATCCACAGGACGGGTGTGGT CCGGCCCGGATCC

8.8 Bilder von fluoreszenzmarkierten Actinomyceten

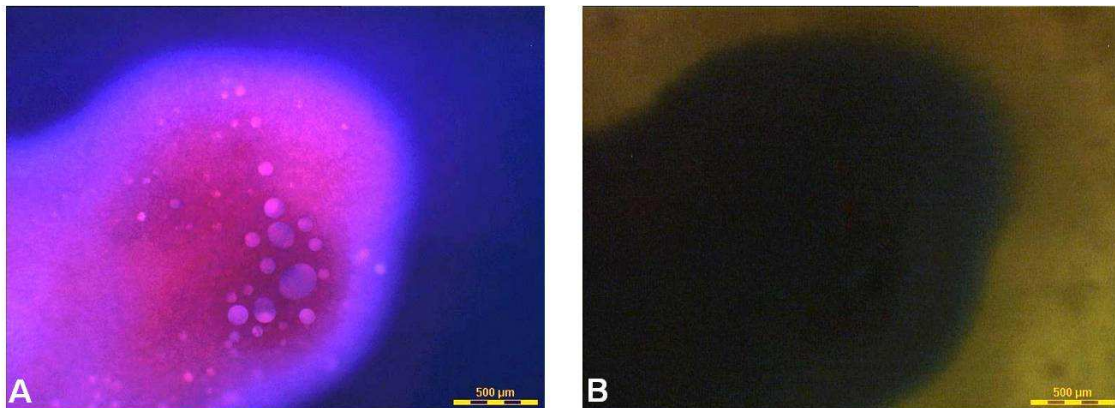


Abbildung 139: Eine mit mCherry markierte *Streptomyces Av 25_6* Kolonie, A = Mikroskopische Ansicht durch einen Fluoreszenzfilter (B/G/R, 4x Vergrößerung) und B = Mikroskopische Ansicht, Durchlichtmikroskopie (4x Vergrößerung).

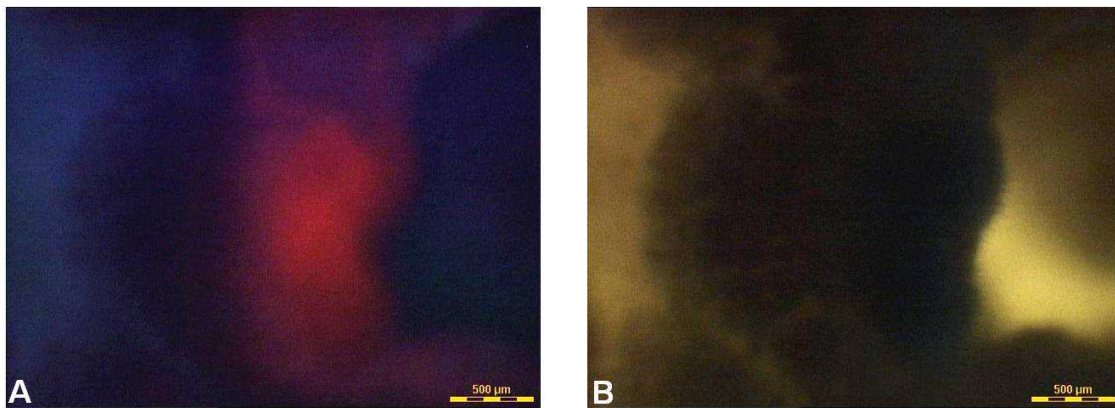


Abbildung 140: Eine mit mCherry markierte *Streptomyces coelicolor* Kolonie, A = Mikroskopische Ansicht durch einen Fluoreszenzfilter (B/G/R, 4x Vergrößerung) und B = Mikroskopische Ansicht, Durchlichtmikroskopie (4x Vergrößerung).

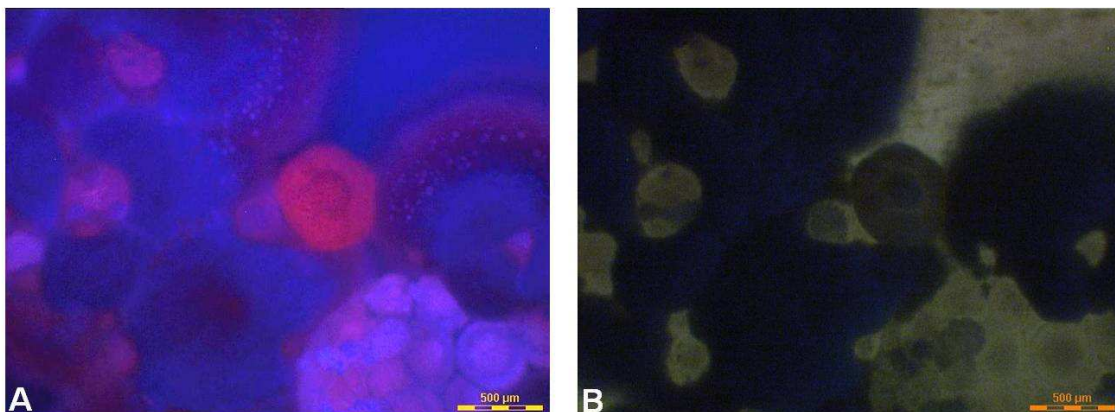


Abbildung 141: Eine mit mCherry markierte *Streptomyces Ae 32_2* Kolonie, A = Mikroskopische Ansicht durch einen Fluoreszenzfilter (B/G/R, 4x Vergrößerung) und B = Mikroskopische Ansicht, Durchlichtmikroskopie (4x Vergrößerung).

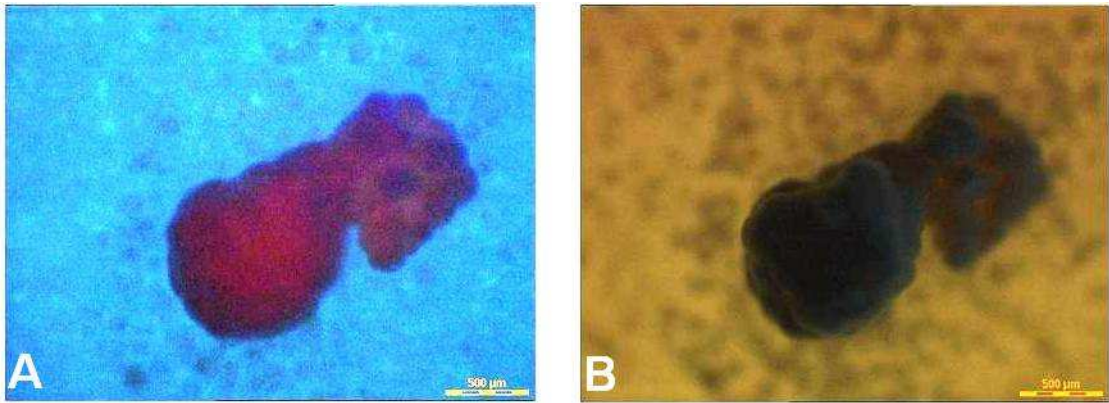


Abbildung 142: Eine mit mCherry markierte *Pseudonocardia* Ao 1 Kolonie, A = Mikroskopische Ansicht durch einen Fluoreszenzfilter (B/G/R, 4x Vergrößerung) und B = Mikroskopische Ansicht, Durchlichtmikroskopie (4x Vergrößerung).

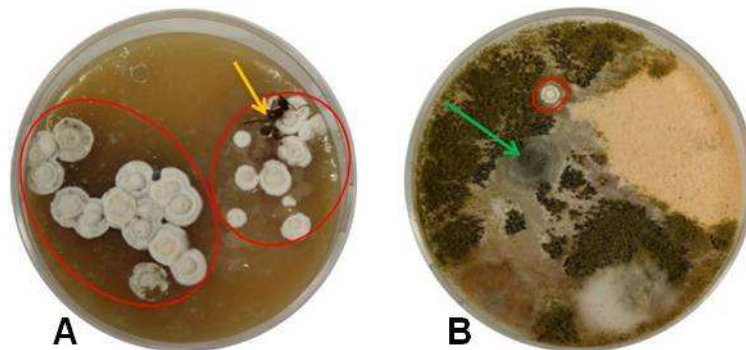


Abbildung 143: Sechs Tage alte Agarplatten mit A = *Acromyrmex echinator* Blattschneiderameise; B = Gartenpilz; Zuvor wurden mCherry-markierte Actinomyceten in einen Aufbau mit Ameisen und Gartenpilz appliziert und nach einigen Tagen die Ameisen und Pilzproben entommen, um sie auf einer Agarplatte zu inokulieren (Kapitel 3.1.5.2, S. 43); **Roter Kreis = mCherry-markierte Actinomyceten**; **Gelber Pfeil = Blattschneiderameise**; **Grüner Pfeil = Gartenpilzinzokulationsstelle**

8.9 Veröffentlichungen

8.9.1 Publikationen

02/2011 I. Schoenian, M. Spiteller, M Ghaste, R. Wirth, H. Herz, D. Spiteller, *Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nest of leaf-cutting ants*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2011**, *108*, 1955-1960

8.9.2 Vorträge

08/2010 ISCE “International Society of Chemical Ecology” Konferenz, Tours, Frankreich, *Chemical aspects of synergism and antagonism in microbial communities of leaf-cutting ants*

10/2010 Doktoranden Workshop “Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie”, Würzburg, *Streptomyces – Ants – Antibiotics*

8.9.3 Poster

08/2010 Summer School in Applied Molecular Microbiology “From signals to drugs”, Dubrovnik, Kroatien, *Antibiotics in the leaf-cutting ants’ ecosystem*

8.10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ilka Schoenian
E-Mail	ischoenian@ice.mpg.de
Geburtsdatum	3. März 1983
Geburtsort	Achim, Deutschland
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

06/2002	Abitur Schulzentrum Carl von Ossietzky, Bremerhaven
10/2002 – 11/2007	Studium der Biomedizinischen Chemie Johannes Gutenberg-Universität Mainz
11/2007	Diplom der Chemie
03/2007 – 11/2007	Diplomarbeit im Fachbereich Pharmakognosie Universität Wien, Österreich
10/2005 – 02/2006	Auslandssemester im Fachbereich Organische Chemie Université de Paris XI, Paris-Sud, Orsay, Frankreich
	Promotion im Fach Chemie
12/2007 – Heute	Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena

8.11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Wilhelm Boland, dass er mir die Anfertigung meiner Dissertation in seiner Abteilung ermöglicht hat, für sein Interesse sowie vielen Ideen in Bezug auf meine Arbeit.

Dr. Dieter Spittler danke ich vor allem für die Betreuung meiner Arbeit, für hilfreiche Tipps, interessante und aufschlussreiche Diskussionen. Dafür dass er für jede Frage offen war und mir die Möglichkeit gegeben hat, durch interdisziplinäres Arbeiten in die faszinierende Welt der Blattschneiderameisen und Streptomyceten einzutauchen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Georg Pohnert für die Betreuung meiner Arbeit an der Friedrich-Schiller-Universität sowie für hilfreiche Gespräche und Diskussionen.

Ich danke der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) für die finanzielle Unterstützung.

Der gesamten Abteilung der Bioorganischen Chemie des MPI-CE danke ich für einige schöne und lehrreiche Jahre, in denen ich viele unterschiedliche Menschen kennen lernen und meinen Horizont erweitern konnte.

Dr. Christian Paetz danke ich sehr für seine Unterstützung in Sachen NMR und GeneVac. Dr. Stefan Bartram danke ich für die HR-GC-MS-Messungen, die Unterstützung beim Schreiben meiner Dissertation sowie für den Feldversuch in Peru bei dem auch Dr. Axel Mithöfer mitgewirkt hat. Ich danke Prof. Michael Spittler der TU Dortmund für die HR-LC-MS und MALDI-Messungen, die in seinem Labor durchgeführt wurden. Zudem möchte ich mich bei Dr. Rainer Wirth der TU Kaiserslautern für die Versorgung mit Blattschneiderameisen, ihren Abfällen und Pilzgärten bedanken sowie für die Versuche mit dem Olfaktometer. Auch Dr. Jeroen Dickschat danke ich für die Diskussionen rund um Antimycine.

Dr. Stefan Garms und Anja Strauß danke ich für die Korrektur meiner Arbeit sowie einiger schöner Momente während meiner Zeit in Jena, für die ich mich

auch bei Dr. Andreas Habel, Dr. Tobias Munde und Dr. Doreen Schachtschabel bedanken möchte.

Ich danke Dr. Anne Behrend, Raphael Seidel, Anne Morgenstern und Janine Hofmann für die Zusammenarbeit und viele ernste Gespräche und spaßige Momente in der Arbeitsgruppe. Anne Morgenstern danke ich besonders für das Korrekturlesen und die vielen Diskussionen. Mit Franziska Buch, Monika Heyer und Sandy Rottloff hatte ich immer nette Mittagsstunden.

Kerstin Ploß danke ich für die Hilfe beim „troubleshooting“ in Sachen LC-MS und GC-MS. Für viele Gespräche und Diskussionen bedanke ich mich bei Dr. Maritta Kunert, Dr. Jelena Pesek, Holger Merker, Felix Bertel, Dr. Christian Kost, Daniela Schmid, Dr. Axel Mithöfer.

Für die administrative Unterstützung bedanke ich mich bei Grit Winnefeld. Auch den Servicegruppen danke ich für die Arbeit im Hintergrund, ohne die eine Arbeit am Institut wohl nur bedingt möglich wäre.

Meine Familie hat mir immer den Rücken gestärkt und so meinen Weg geebnet. Ohne sie wären manche Zeiten härter und einige Durststrecken trockener gewesen! Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mit Rat und Tat begleitet haben. Meinem Vater danke ich sehr für die grammatikalische Fehlersuche in meiner schriftlichen Arbeit. Ich danke meinem Freund für seine Geduld und dafür, dass er mir neue Energie gab, wenn es nötig war!

8.12 Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 14. Juni 2011

Erklärung:

Ich erkläre,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist;

dass ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben (siehe Danksagung);

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen;

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe;

dass ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 14.06.2011