

**Induktion von veränderten Metabolitenprofilen in Streptomyceten
durch Umweltfaktoren:**

**Kokultivierung von *Streptomyces avermitilis* und *Pseudomonas
fluorescens* und von *Streptomyces coelicolor* unter
Schwermetallionenstress**

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

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Anne Behrend

geboren am 15.09.1980 in Berlin

1. Gutachter: Prof. Erika Kothe, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
2. Gutachter: Prof. Wilhelm Boland, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena
3. Gutachter: Prof. Elke Dittmann, Humboldt-Universität zu Berlin

Datum der Verteidigung: 04.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Streptomyceten - eine Quelle für bioaktive Sekundärmetabolite	2
1.1.1	Modellorganismen für die Streptomyceten: <i>Streptomyces coelicolor</i> und <i>Streptomyces avermitilis</i>	5
1.2	Funktionen mikrobieller Sekundärmetabolite für ihre Produzenten	6
1.3	Induktion des mikrobiellen Sekundärmetabolismus	9
1.3.1	Induktion des mikrobiellen Sekundärmetabolismus durch gentechnische Modifikation	10
1.3.2	Induktion des mikrobiellen Sekundärmetabolismus durch Umweltfaktoren	11
2	Zielstellung	13
3	Induktion eines veränderten Metabolitenprofils in <i>Streptomyces avermitilis</i> durch Kokultur mit <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
3.1	Einleitung	16
3.1.1	Auswirkungen biotischer Umweltfaktoren auf die Produktion von Sekundärmetaboliten in gemischten mikrobiellen Kulturen	16
3.2	Material und Methoden	17
3.2.1	Auswirkung der Kokultur mit <i>Pseudomonas fluorescens</i> auf das Metabolitenprofil von <i>Streptomyces avermitilis</i>	17
3.2.2	Analyse der Guttationstropfen von <i>Streptomyces avermitilis</i>	18
3.3	Ergebnisse	20
3.3.1	Wachstum von <i>Streptomyces avermitilis</i> in Kokultur und Überprüfung der antibiotische Wirkung der Guttationstropfen	20
3.3.2	Verteilung radioaktiv markierter Saccharose nach Injektion in die Guttationstropfen von <i>Streptomyces avermitilis</i>	24
3.4	Diskussion	26
3.4.1	Antibiotische Wirkung der Guttationstropfen	26
3.4.2	Hauptinhaltsstoff der Guttationstropfen von <i>Streptomyces avermitilis</i>	27
3.4.3	Ursprungs und Verteilung der abgebenden Saccharose in <i>Streptomyces avermitilis</i> ...	27
3.5	Ausblick	29

4	Induktion eines veränderten Metabolitenprofils durch Schwermetallionenstress in <i>Streptomyces coelicolor</i>	30
4.1	Einleitung	31
4.1.1	Einfluß von Metallionenstress auf den Sekundärmetabolismus in Actinomyceten	31
4.2	Material und Methoden	33
4.2.1	Biomassezuwachs von <i>Streptomyces coelicolor</i> unter Metallionenstress	33
4.2.2	Analyse des Metabolitenprofil von <i>Streptomyces coelicolor</i> nach Cobaltionenstress ..	34
4.3	Ergebnisse	51
4.3.1	Pigmentierte Phänotypen von <i>Streptomyces coelicolor</i> unter Metallionenstress	51
4.3.2	Metabolitenprofil von <i>Streptomyces coelicolor</i> nach Cobaltionenstress	55
4.4	Diskussion	70
4.4.1	Differenziertes Wachstum von <i>Streptomyces coelicolor</i> unter Schwermetallionenstress	70
4.4.2	Metabolitenprofile von <i>Streptomyces coelicolor</i> nach Cobaltionenstress	76
4.5	Ausblick	90
4.5.1	Metabolitenprofil von <i>Streptomyces coelicolor</i> nach Cobaltionenstress	90
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	93
7	Literatur	95
8	Anhang	106

1 Einführung

No microbe is an island.^[2]

Mikroorganismen sind so kleine Lebewesen, dass sie nicht mit dem bloßen Auge erkennbar sind. Die Größe dieser Organismen liegt unterhalb des Auflösungsvermögens des menschlichen Auges, sie können nur stark vergrößert dargestellt werden (mikroskopisch). Trotz ihrer geringen Größe und obwohl alle Organismen prinzipiell die gleiche chemische Zusammensetzung^[3] haben, unterscheiden sich die Mikroben in ihrer Zellorganisation. Aufgrund ihrer abweichenden Struktur werden die Mikroorganismen in verschiedene Klassen eingeteilt. Der Begriff Prokaryonten gilt für alle mikroskopisch kleinen Einzeller, die keinen Zellkern besitzen. Diese Klasse wird weiterhin in Bakterien und Archaea unterteilt. Dem gegenüber stehen die Eukaryonten als mikroskopisch kleine ein- oder mehrzellige Organismen mit einem Zellkern als gemeinsamem Strukturmerkmal.

Mikroorganismen waren die ersten Lebewesen auf der Erde. Sie traten vor etwa 3,8 Milliarden Jahren auf der bis dahin unbelebten Erde auf. Diese Organismen bilden die meisten Spezies und stellen den größten Anteil der Biomasse auf unserem Planeten dar.^[4] Durch ihre Stoffwechselaktivität treiben sie geochemische Kreisläufe auf der Erde an und beeinflussen die Atmosphäre sowie das Klima.^[5]

Diese mikroskopisch kleinen Lebewesen wachsen unter nahezu allen Bedingungen auf der Erde. Durch ihre enorme Anpassungsfähigkeit sind Mikroben ubiquitär verbreitet. Sie widerstehen extremen Temperaturen, Druck und Strahlung und kommen auch in dunklen, salzigen, sauren und alkalischen Lebensräumen vor. Einige Gruppen können anorganisches Material als Substrate zur Energiegewinnung nutzen.^[5] Der vielfältig angepasste Stoffwechsel von Mikroorganismen wird vom Menschen bei der industriellen Produktion von Nahrungsmitteln, medizinischen Wirkstoffen und Chemikalien sowie zur Energiegewinnung genutzt. Außerdem werden Mikroben in der Abfallbeseitigung und Abwasserklärung eingesetzt.^[5]

Im Gegensatz zu industriell eingesetzten Reinkulturen existiert in seiner natürlichen Umgebung kein Mikroorganismus allein. In ihrem unmittelbaren Umfeld stehen sie sich nicht nur mit Vertretern ihrer eigenen Art, sondern auch anderer Arten in Verbindung.^[3] Mikroben sind in der Lage, durch das Empfangen und Aussenden von chemischen Verbindungen mit ihrer Umgebung zu kommunizieren.^[6-9] Die Verbindung zur Umwelt wird häufig durch Freisetzung und Aufnahme bioaktiver Naturstoffe hergestellt.

Auch der Mensch ist ein Interaktionspartner für Mikroorganismen. Sie bevölkern die Hautoberfläche, die Mundhöhle und den Verdauungstrakt. Bakterien bewirken im menschlichen Darm die Spaltung unverdaulicher Nahrungsbestandteile. Durch die Besiedlung mit unschädlichen Bakterien ist der menschliche Körper vor krankheitserregenden Mikroorganismen geschützt.^[10]

Wenn Mikroorganismen den Körper eines Menschen nicht nur besiedeln, sondern auch in ihn eindringen, sich in ihm vermehren und krankheitserregende Reaktionen auslösen, wird von einer Infektion gesprochen.^[11] Über Jahrtausende war die Menschheit ansteckenden Krankheiten

ausgeliefert. Noch heute sind nach WHO-Angaben Infektionskrankheiten weltweit eine der häufigsten Todesursachen.^[12]

Mikroorganismen sind jedoch nicht nur die Verursacher von Krankheiten, sondern auch eine wichtige Quelle für Arzneimittel zu deren Bekämpfung. Bioaktive Substanzen aus Mikroorganismen stellen heute den Großteil aller medizinisch genutzten Verbindungen zur Bekämpfung von Infektionen dar und dienen als Leitstrukturen für die Synthese therapeutisch wirksamer Verbindungen.^[13, 14] Ein Beispiel für solche antibiotisch wirksamen Substanzen sind die Penicilline (**1** und **2**). Weiterhin stellen Mikroorganismen Naturstoffe her, die, wie beispielsweise Mitomycin C (**3**) zur Behandlung von Krebs oder wie die Avermectine (**4**) zur Bekämpfung von Parasiten eingesetzt werden.

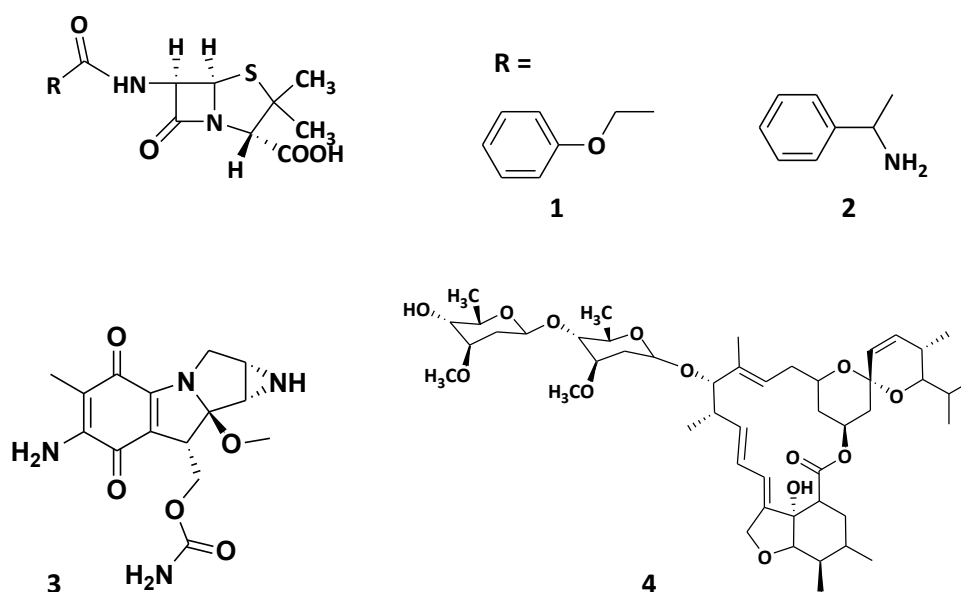


Abb. 1: Struktur des bioaktiven Sekundärmetaboliten Penicillin V (**1**) aus *Penicillium chrysogenum*, des semisynthetischen Ampicillins (**2**), des Zytostaticums Mitomycin (**3**) aus *Streptomyces caespitosus* und des Antiparasiticums Avermectin B_{1b} (**4**) aus *Streptomyces avermitilis*.

1.1 Streptomyceten – eine Quelle für bioaktive Sekundärmetabolite

Die Gattung *Streptomyces* ist eine bedeutende Quelle für medizinisch relevante Naturstoffe. Die bioaktiven Naturstoffe aus diesen Mikroorganismen sind Produkte des Sekundärmetabolismus, während der Primärmetabolismus für das Wachstum und die Entwicklung aller Organismen essentiell ist.^[15] Die Sekundärmetabolite werden aus Vorstufen der primären Stoffwechselwege aufgebaut, was eine klare Abgrenzung von Primär- und Sekundärstoffwechsel erschwert. Als Antibiotika werden natürlich durch Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen gebildete Substanzen mit antibakterieller Wirkung definiert. Diese Definition wurde auch auf synthetisch gewonnene, antimikrobiell wirkende Substanzen erweitert.^[11]

Drei Viertel aller natürlichen Antibiotika, die zur Zeit im klinischen Bereich zum Einsatz kommen, werden von Streptomyceten produziert.^[16]

Streptomyceten gehören zur Gattung der *Actinomycetales*, die aufgrund ihres filamentösen Wachstums und ihres mehrphasigen Lebenszyklus in ihrer Erstbeschreibung^[17] 1877 für Pilze gehalten wurden. Die Filamente einer Streptomycetenkolonie werden daher als Hyphen und verschiedene Entwicklungsstufen als Myzel bezeichnet. Aufgrund der Komplexität ihrer Entwicklung

nehmen Streptomyceten eine phylogenetische Stellung zwischen Pro- und Eukaryonten ein.^[18] Allerdings sind Streptomyceten bodenbewohnende Gram-positive Eubakterien, deren Genom einen außergewöhnlich hohen GC-Gehalt hat. Sie leben saprophytisch vom Abbau komplexer Substrate.

Nach dem Auskeimen aus der Spore wächst das Myzel in das Substrat. Aus dem Substratmyzel wird bei Limitation des Nährstoffangebots das Luftmyzel ausgebildet, welches sich durch Entwicklung von Zellwänden zu Sporenketten differenziert (Abb. 2).

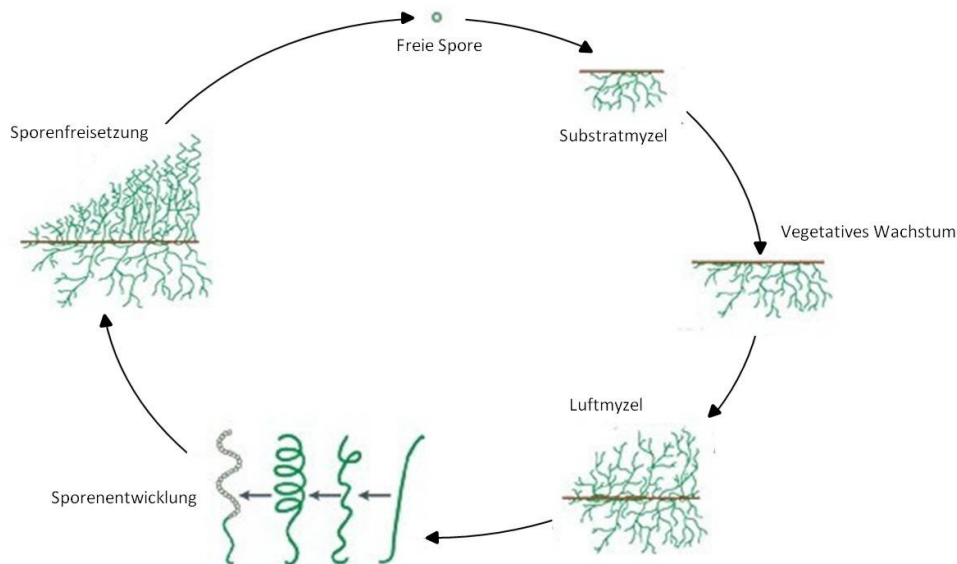


Abb. 2: Entwicklungszyklus von Streptomyceten aus einer freien Spore über die Ausbildung des Substratmyzels bis zum Luftmyzel mit erneuter Sporenbildung.^[19]

Da Streptomyceten nicht beweglich sind, können sie der Konfrontation mit ungünstigen Umweltbedingungen nicht ausweichen. Sie benötigen daher Strategien zur Anpassung an schädliche Umwelteinflüsse und ein System zu deren Koordinierung. Wahrscheinlich ist die Synthese von bioaktiven Naturstoffen eine Reaktion auf spezifische Umweltbedingungen und ihre Freisetzung erhöht die Überlebenswahrscheinlichkeit für den Produzenten. Die Biosynthese der Sekundärmetaboliten steht bei Streptomyceten in engem Zusammenhang mit der morphologischen Differenzierung der Kolonie. Oft findet in Streptomyceten die Antibiotikasythese zu einem kritischen Zeitpunkt der Entwicklung statt, wenn Nährstoffe aus dem Substratmyzel in die sporenbildenden Hyphen transportiert werden. Mit der Freisetzung von antibiotisch wirksamen Verbindungen könnten die Streptomyceten ihre Ressourcen nicht nur verteidigen, sondern durch das Abtöten von Konkurrenten in ihrer direkten Umgebung neue Nährstoffe akquirieren.^[20]

Bei der Entwicklung einer Streptomycetenkolonie setzen viele Stämme eine komplexe Mischung flüchtiger Naturstoffe frei. Auffällig ist häufig der erdige Geruch von Streptomycetenkulturen, der durch eine Hauptkomponente ihres Dufts, das Geosmin^[21] (5), verursacht wird. Anders als bei den antibiotisch wirksamen Sesquiterpenen Albaflavenon^[22] (6) aus *Streptomyces coelicolor* und Pentalenolacton^[23] (7) aus *Streptomyces avermitilis* konnte bei dem Geosmin (5) bisher keine Wirksamkeit gegen andere Organismen beobachtet werden. In *Streptomyces tendae* wurde gezeigt, dass nur ein kleiner Teil des produzierten Geosmins (5) aus den Zellen freigesetzt wurde. Möglicherweise handelt es sich um eine Verbindung mit zellinterner Funktion.^[24.]

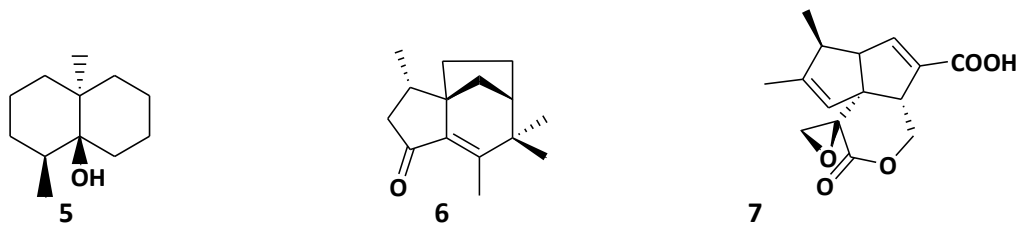


Abb. 3: Strukturformeln von Geosmin (5), Albaflavenon (6) und Pentalenolacton (7).

Bei der Kultivierung von Streptomyzeten ist neben dem typischen erdigen Geruch die Eigenschaft dieser Organismen, Tropfen auf der Oberfläche des Luftmyzels auszuschleiden, auffällig. Die Existenz, die Farbe und die Verteilung der Tropfen werden als taxonomische Merkmale für die Artbestimmung innerhalb der Actinomyceten benutzt.^[25]

Das Phänomen der Tropfenbildung wird in Analogie zur Pflanzenphysiologie als Abgabe von Guttationstropfen bezeichnet. Das Wort Guttation leitet sich vom Lateinischen „gutta“= Tropfen ab und beschreibt den Vorgang, dass Pflanzen von Blättern oder unverletzten Organen Wasser und gelöstes Material abgeben. Die Guttation bei Pflanzen erfolgt unter Witterungsbedingungen, die die Transpiration unmöglich machen, um dennoch den Transpirationssog aufrecht zu erhalten.^[26, 27] Es ist allerdings unklar, ob die Tropfen auf der Kolonieoberfläche von Streptomyzeten eine ähnliche Funktion besitzen.

Die Bildung von Guttationstropfen auf der Oberfläche des Echten Hausschwamms (*Serpula lacrimans* = tränender Hausschwamm) wurde beim Wachstum auf Festmedium und auf nährstoffarmen Oberflächen dokumentiert und systematisch untersucht.^[28] Die Bildung von Flüssigkeitsansammlungen tritt sehr häufig auf, wenn die Kolonisierung des Mediums abgeschlossen ist und der Pilz damit beginnt, Fruchtkörper zu bilden.^[29] Obwohl die Bildung von Tropfen bei Pilzen ebenfalls als taxonomisches Merkmal genutzt wird^[30], ist die genaue Funktion und Entstehungsweise bislang unklar.

Obwohl die Bildung von Tropfen auch bei den Modellorganismen *S. coelicolor* und *S. avermitilis* (Abb. 4) regelmäßig auftritt, ist die Relevanz dieser Tropfen wenig erforscht. Auch die Zusammensetzung dieser Guttationstropfen auf Kolonien von *S. coelicolor* und *S. avermitilis* ist bislang unbekannt.

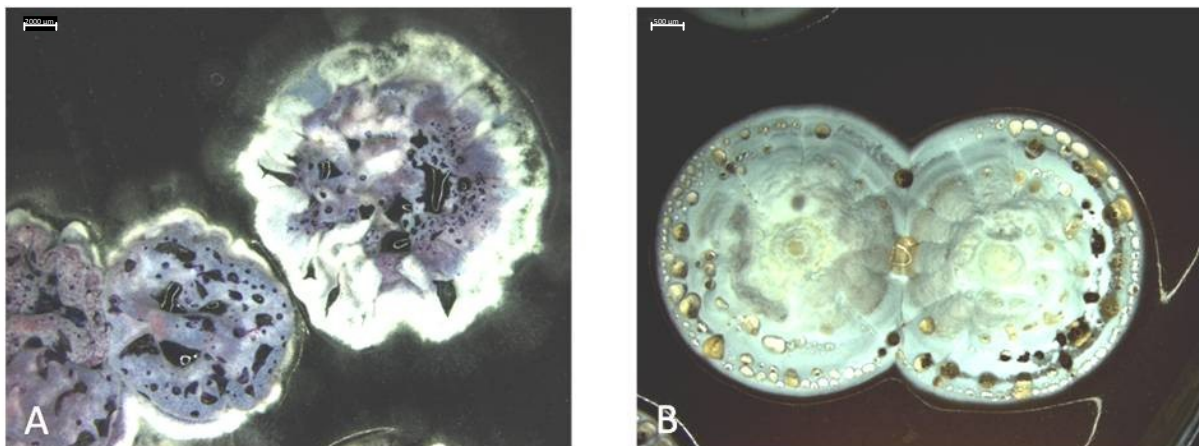


Abb. 4: Fotos der beiden Modellorganismen (A) *Streptomyces coelicolor* und (B) *Streptomyces avermitilis*. Gut erkennbar ist die Bildung von Guttationstropfen auf der Oberfläche der Kolonien.

1.1.1 Modellorganismen für die Streptomyceten: *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces avermitilis*

Die Genomsequenzierungsprojekte an den Modellorganismen *S. coelicolor*^[31] und *S. avermitilis*^[32] förderten zwei ungewöhnlich große bakterielle Genome zu Tage. Die Chromosomen beider Modellorganismen sind entgegen der Genomorganisation in anderen Bakterien linear.^[33, 34] Weiterhin beinhalten beide Organismen zusätzlich lineare Plasmide. In beiden Genomen ist die Dichte der Gene, wie für Bakterien typisch, sehr hoch. Zusätzlich zur linearen Organisation ist die Anordnung der Gene auf den Chromosomen ungewöhnlich: Die Chromosomen der Modellorganismen *S. avermitilis* und *S. coelicolor* sind zweiphasig aufgegliedert, d. h., im Kernbereich sind die überlebenswichtigen Proteine kodiert (z. B. für DNA-Replikation, Transkription, Translation) und die Armbereiche enthalten Informationen für Genprodukte, die nur unter bestimmten Bedingungen gebraucht werden (z. B. Enzyme zum Abbau von Cellulose und Chitin).^[31, 35] In diesen Außenbereichen befinden sich auch die Informationen zur Synthese von Sekundärmetaboliten.

Streptomyces coelicolor

S. coelicolor A3(2) ist der am besten genetisch charakterisierte Vertreter der Streptomyceten. Er produziert mehrere bekannte Naturstoffe (Abb. 5): die beiden farbigen Verbindungen Actinorhodin^[36] (**11**) und Undecylprodigiosin^[37] (**10**) sowie Methyleneomycin^[38] (**9**) und das CDA^[39] (*calcium dependent antibiotic*, z. B. **8**) sowie die Terpene Geosmin^[40] (**5**) und Methylisobornol^[41] (**21**), die letztgenannten flüchtigen Verbindungen machen den typischen erdigen Geruch der Kulturen aus.

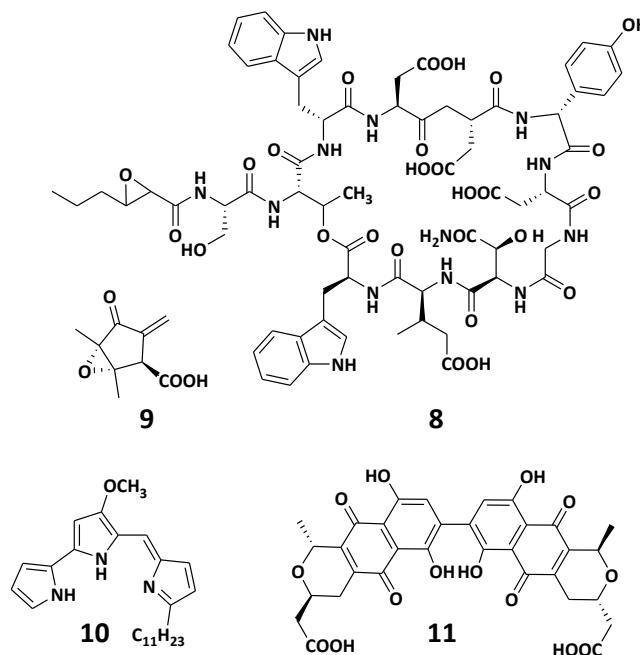


Abb. 5: Strukturen der bekannten Sekundärmetabolite aus *Streptomyces coelicolor*: CDA 4b (**8**), Methyleneomycin A (**9**), Undecylprodigiosin (**10**), Actinorhodin (**11**).

Die Produktion der farbigen Verbindungen Actinorhodin (**11**) und Undecylprodigiosin (**10**) erleichtert das gentechnische Arbeiten mit den Genen für die Biosynthese dieser Verbindungen.^[42] Modifikationen an diesen Genen lassen sich leicht optisch durch die Veränderungen des Phänotyps erkennen. *S. coelicolor* beinhaltet 17 Gencluster, deren Organisation die Biosynthese von bisher unbekanntem bioaktiven Naturstoffen nahe legt.^[31, 35] Allerdings konnten zu diesen Biosyntheseclustern keine Naturstoffe nachgewiesen werden.

Streptomyces avermitilis

S. avermitilis wird industriell als Produzent von Avermectinen eingesetzt. Diese Verbindungsklasse stört die Impulsweiterleitung im Nervensystem von Invertebraten^[43] und wird daher zur Bekämpfung parasitischer Nematoden eingesetzt. Neben dieser Verbindungsklasse produziert *S. avermitilis* zwei weitere Gruppen bioaktiver Sekundärmetabolite: die antifungal wirksamen Filipine und die antibiotisch wirksamen Oligomycine. In *S. avermitilis* sind 24 Gencluster für Sekundärmetabolite identifiziert worden, deren Produkte bis heute unbekannt sind.^[44]

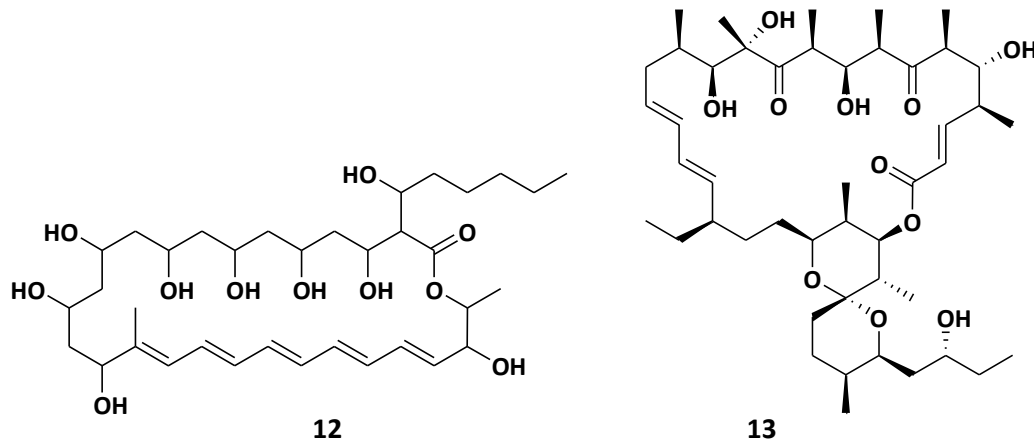


Abb. 6: Strukturen der von *Streptomyces avermitilis* produzierten Sekundärmetabolite: Filipin III (12) und Oligomycin A (13).^[45]

1.2 Funktionen mikrobieller Sekundärmetabolite für ihre Produzenten

Viele bioaktive Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen sind für den Menschen aufgrund ihrer pharmakologischen Wirksamkeit von hohem Wert.^[43] Die Bedeutung für ihre Produzenten in deren natürlichem Ökosystem ist allerdings oft unklar.^[46]

Die Investition in die Produktion von Sekundärmetaboliten scheint sich für den Organismus dann auszuzahlen, wenn die Ressourcen zum Wachstum begrenzt sind und die Abgabe der Verbindungen einen Wachstumsvorteil vermittelt.^[47, 48] Diese Naturstoffe sind für die Interaktion des produzierenden Organismus mit seiner Umwelt unentbehrlich.^[49] Wahrscheinlich unterliegt deshalb die Induktion des Sekundärmetabolismus der generellen physiologischen Kontrolle eines Organismus in Abhängigkeit von den gegebenen Umweltbedingungen.

Die Produzenten bioaktiver Sekundärmetabolite sind häufig Bodenorganismen.^[46] Unbewegliche Bodenbakterien können ungünstigen Umweltbedingungen nicht ausweichen, aber durch die Abgabe bioaktiver Sekundärmetabolite können diese Mikroorganismen ihre Umgebung beeinflussen.

Im Boden herrscht ein hoher Konkurrenzdruck um die vorhandenen Nährstoffe, deren Verfügbarkeit stark schwankt. Die Exkretion verschiedener toxischer Verbindungen kann für den Produzenten eine erfolgreiche Strategie sein, um das Wachstum von Konkurrenten zu hemmen und Ressourcen für die eigene Population zu sichern.^[20, 46] Wenn die rivalisierenden Mikroorganismen durch die freigesetzten bioaktiven Sekundärmetabolite eliminiert werden, könnte sich der produzierende Organismus nicht nur durchsetzen, sondern zusätzliche Nährstoffe gewinnen.^[20]

Durch die Sequenzierungsprojekte an antibiotikaproduzierenden Modellorganismen wurde allerdings klar, dass das Potential zur Produktion von antibiotisch wirksamen und bioaktiven Verbindungen in

den bekannten Produzenten noch nicht ausgeschöpft ist.^[45, 50, 51] Dieses Potential zu aktivieren ist eine Herausforderung.

Für bakterielle Sekundärmetabolite wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Verbindungen Hilfsmittel zur Erhaltung eines metabolischen Gleichwichts sind. Die Sekundärmetabolite sollen genau dann gebildet werden, wenn Schlüsselschritte des Primärmetabolismus unter physiologischem Stress unzureichend reguliert sind.^[52, 53] Da im Boden ein ständiger Wechsel zwischen Nährstoffüberfluss und Nährstofflimitation herrscht, könnte das Entziehen von Vorstufen aus dem Primärmetabolismus für die Synthese der Sekundärmetaboliten den Übergang zwischen den beiden Extremzuständen Nährstoffmangel und Nährstoffüberfluss erleichtern.^[54]

Neben mikrobiellen Sekundärmetaboliten, deren Funktion für ihren Produzenten noch unklar ist, konnte einer Reihe bioaktiver Naturstoffe eine klare Funktion zugeordnet werden. Beispielsweise dient Coelichelin^[55] (**14**) als Siderophor zum Komplexieren freier Eisenionen, während die Verbindung Albomycin^[56] (**15**) ein Inhibitor für die Eisenaufnahmesysteme anderer Zellen ist. Das Detergenz Surfactin (**16**) ist in der Lage, unspezifisch Zellmembranen zu durchdringen und wirkt damit antibakteriell, antiviral, antifungal sowie hämolytisch.^[57] Weiterhin sind Pigmente wie das β -Carotin (**17**) in *Streptomyces coelicolor* zum Lichtschutz bekannt.^[46] Die Biosynthese dieser Verbindung wird durch Lichteinfall stimuliert.^[58]

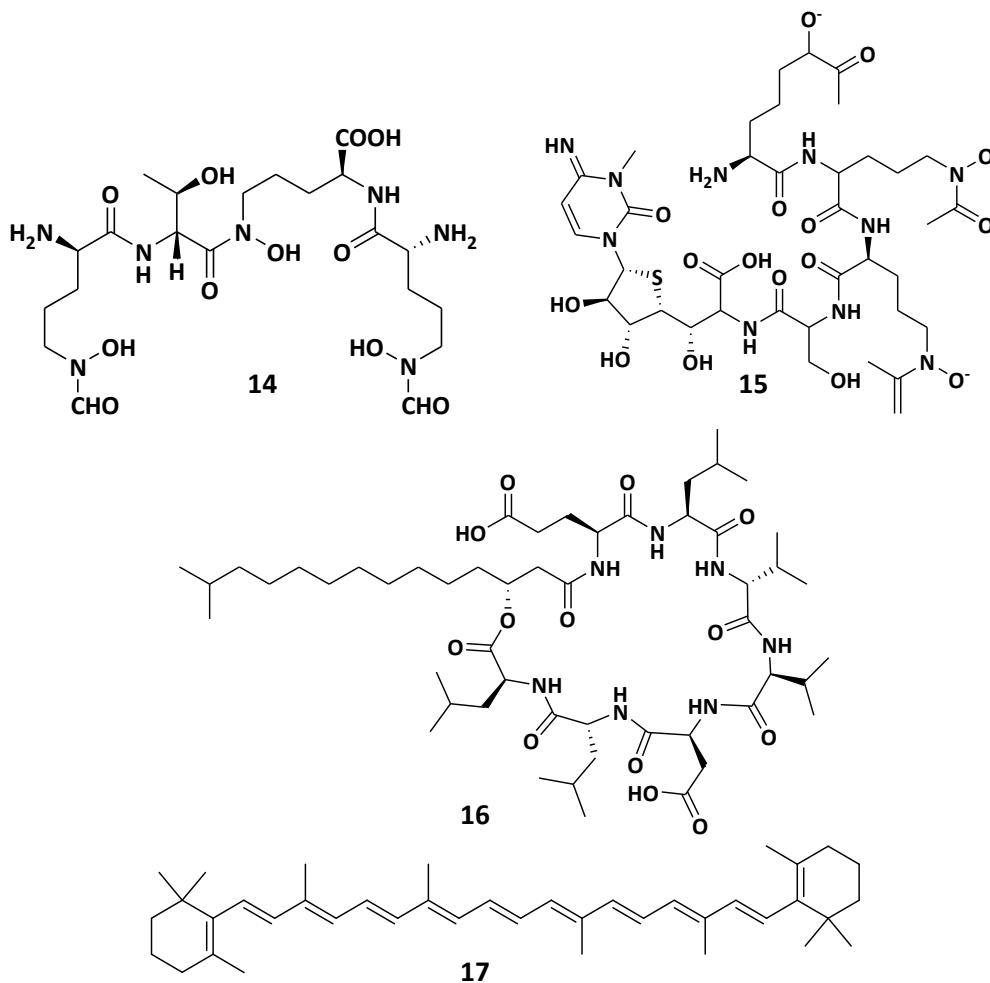


Abb. 7: Strukturformeln von Coelichelin (**14**), Albomycin ϵ , (**15**) Surfactin (**16**) und β -Carotin (**17**).

Möglicherweise dient die Produktion bestimmter bioaktiver Substanzen auch als Fraßschutz.^[59, 60] Die Pigmente von *Serratia marcescens*, *Chromobacterium violaceum* und *Pseudomans aeruginosa* wirken toxisch für bodenlebende Protozoa.^[61] Die wirksamen Verbindungen sind wahrscheinlich Prodigiosin (**18**), Violacein (**19**) und Pyoverdin (**20**).

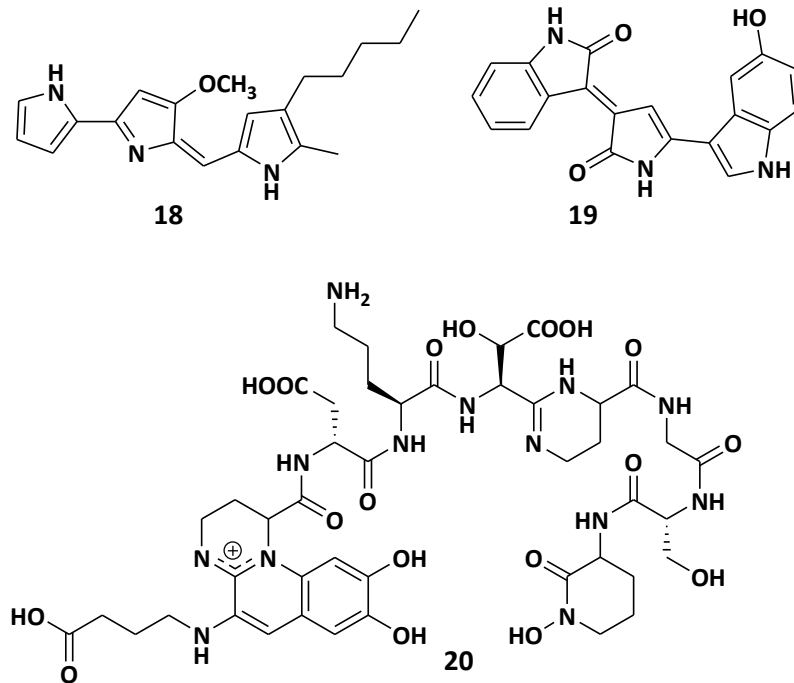


Abb. 8: Strukturformeln von Prodigiosin (**18**), Violacein (**19**) und Pyoverdin (**20**).

Gegebenenfalls könnten einige bioaktive Sekundärmetabolite ähnliche Funktionen wie Hormone besitzen und als interzelluläre Signalmoleküle in den produzierenden Mikroorganismen wirken.^[62]

Es sind bereits Metabolite aus dem Sekundärstoffwechsel von Bakterien bekannt, die als Interaktionssignal innerhalb der Bakterienpopulation dienen.^[7] Diese Autoregulatoren dienen zur Steuerung der Genexpression in Abhängigkeit von der Dichte einer bakteriellen Population (Box 1).

Box 1: *Quorum sensing*

Der Begriff *Quorum sensing* beschreibt die Fähigkeit der Bakterien, die Dichte ihrer Population in Abhängigkeit von der externen Konzentration eines chemischen Signalmoleküls zu messen. Diese Signalmoleküle werden Autoregulatoren genannt. Sobald die minimale, stimulierende Konzentration eines Autoregulators innerhalb der bakteriellen Population wahrgenommen wird, verändert sich die Expression bestimmter Gene. Durch das *Quorum sensing* sind Bakterien in der Lage, die Genexpression innerhalb ihrer Population zu synchronisieren.^[63]

1.3 Induktion des mikrobiellen Sekundärmetabolismus

Die sequenzierten Genome der Modellorganismen *S. coelicolor* und *S. avermitilis* (1.1.1, Abb. 4) zeigten, dass neben den Genclustern für bereits bekannte Sekundärmetabolite noch viele weitere potentielle bioaktive Sekundärmetabolite im Chromosom kodiert werden.

Der Großteil potentieller bioaktiver Sekundärmetabolite wird von diesen Organismen nicht unter Laborbedingungen gebildet, da unter den optimierten Wachstumsbedingungen die Umweltfaktoren zu ihrer Induktion fehlen. Die Faktoren, die die Induktion der Biosynthese von Naturstoffen in Mikroorganismen beeinflussen, stehen daher im Fokus der Forschung. Durch den gezielten Einsatz externer Stimuli könnte das volle biosynthetische Potential der bekannten Antibiotikaproduzenten besser ausgeschöpft werden.^[64]

Die Gencluster, deren Produkte bisher nicht nachgewiesen werden konnten, werden oft als „schlafend“^[65] oder „kryptisch“^[66] bezeichnet. Die Tatsache, dass ein Gencluster für die Produktion eines Sekundärmetaboliten als „kryptisch“ bezeichnet wird, heißt nicht, dass er tatsächlich nicht aktiv ist. Das Produkt könnte auch nur in sehr geringer Konzentration gebildet werden und deshalb lediglich nicht leicht nachweisbar sein.^[67]

Die Faktoren, die zur Herstellung von bioaktiven Verbindungen unter bestimmten Umweltbedingungen führen, sind weitgehend unbekannt. Auch die Abhängigkeit der Produktion bereits charakterisierter Verbindungen von verschiedenen Umweltfaktoren ist bisher unzureichend erforscht.

1.3.1 Induktion des mikrobiellen Sekundärmetabolismus durch gentechnische Modifikation

Prinzipiell kann durch die Modifikation eines regulatorischen Gens die Synthese eines Naturstoffs in Gang gesetzt werden. Es war möglich, durch gentechnische Manipulation die Gencluster für verschiedene Naturstoffe zu aktivieren. Mittels der Information aus den Genomsequenzen der Modellstreptomyeten werden dazu mehrere Ansätze verfolgt (Abb. 9):

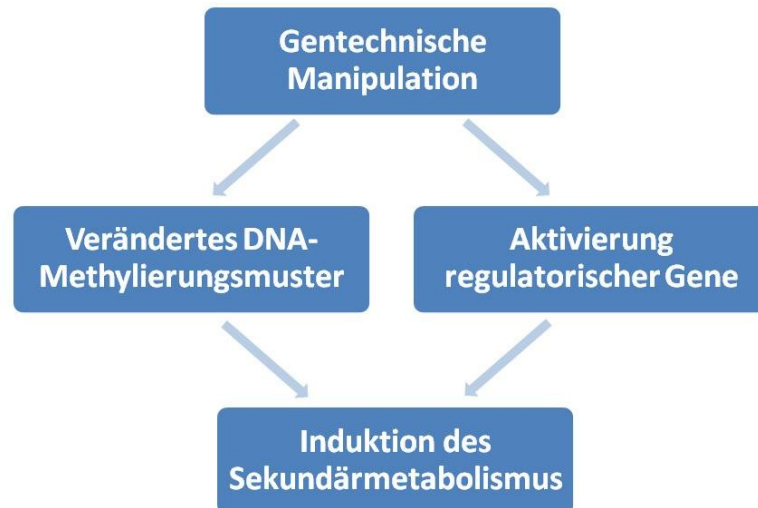


Abb. 9: Möglichkeiten zur gentechnischen Aktivierung kryptischer Gencluster.

In *Streptomyces lividans* konnte der kryptische Gencluster für die Produktion von Actinorhodin (**11**) durch Repression des Regulatorgens *afsR2* induziert werden (Tab. 1).

Die erhöhte Verfügbarkeit des universellen Methyl donors S-Adenosylmethionin bewirkt eine verstärkte Produktion von Actinorhodin (**11**) (Tab. 1). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Veränderung des DNA-Methylierungsmusters einen Einfluss auf die Produktion von Actinorhodin (**11**) in *S. coelicolor* haben kann. Allerdings konnte noch kein Sekundärmetabolit durch die Veränderung des DNA-Methylierungsmusters in Streptomyeten aktiviert werden.

Tab. 1: Beispiele für erfolgreiche gentechnische Manipulationen des Sekundärmetabolismus.

Gentechnische Methode	Aktivierter Sekundärmetabolit	Organismus	Quelle
Aktivierung von <i>afsR2</i>	Actinorhodin (11)	<i>S. lividans</i>	[68]
DNA-Methylierung	Actinorhodin (11)	<i>S. coelicolor</i>	[69]

1.3.2 Induktion des mikrobiellen Sekundärmetabolismus durch Umweltfaktoren

Alle Lebewesen, insbesondere jedoch unbewegliche Organismen wie Streptomyceten, sind direkt von ihrer Umwelt abhängig. Die Anpassungsfähigkeit eines Organismus gegenüber verschiedenen Umweltreizen ist entscheidend für sein Fortbestehen (Abb. 10). Die Freisetzung von bioaktiven Sekundärmetaboliten kann eine Strategie zur Anpassung an spezifische Umweltbedingungen sein, da diese die Wechselbeziehung des produzierenden Organismus mit seiner belebten und unbelebten Umgebung vermitteln.^[49] Die Einwirkung eines spezifischen Umweltfaktors kann die Produktion von Naturstoffen auslösen.

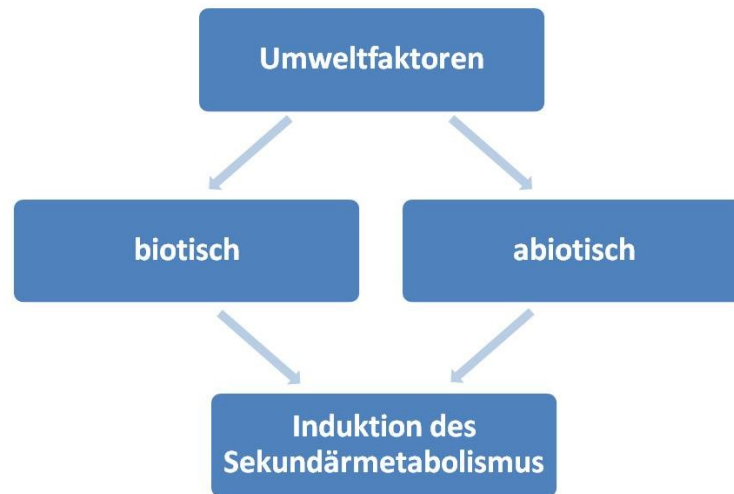


Abb. 10: Mögliche Aktivierung des Sekundärmetabolismus in Streptomyceten durch Umweltfaktoren.

Die Produktion der bekannten Sekundärmetabolite in Streptomyceten wird durch verschiedene abiotische Umweltfaktoren beeinflusst (Tab. 2).

Tab. 2: Beispiele für die Induktion von Sekundärmetaboliten durch abiotische Umweltfaktoren

Umweltfaktor	Sekundärmetabolit	Organismus	Quelle
Eisenmangel	Actinorhodin (11)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	[70]
pH-Wert	Actinorhodin (11)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	[71]
Temperaturschock	Jadomycin	<i>S. venezuelae</i> ISP5230	[72]
NaCl	Undecylprodigiosin (10)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	[73]
Lanthanoide	Actinorhodin (11)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	[74]
Calcium	Actinorhodin (11)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	[75]
Ytterbium	rotes Pigment	<i>Streptomyces</i> sp.	[76]

Für die Produktion von Sekundärmetaboliten ist die Wahl der Kulturbedingungen entscheidend. Durch die Veränderung der Kultivierungsparameter wie Medienzusammensetzung, Belüftung, Temperatur oder die Form der Kulturgefäße konnte die Biosynthese von zuvor unbekanntem Sekundärmetaboliten von verschiedenen Actinomyceten induziert werden.^[77] Eine Erklärung für den Einfluss der Kulturbedingungen auf das Metabolitenprofil naturstoffproduzierender Mikroorganismen bietet die OSMAC Theorie. Die Abkürzung OSMAC steht für „one strain - many compounds“.^[78, 79] und versinnbildlicht die Idee, dass die meisten Produzenten bioaktiver Naturstoffe (Pilze oder Bakterien) das Potential zur Synthese verschiedener Verbindungen haben.^[80] Die

unterschiedlichen Metabolite werden unter veränderten Umweltbedingungen produziert, die im Labor durch die Variation der Wachstumsparameter nachgestellt werden.

Ein weiterer entscheidender biotischer Faktor bei der Induktion des Sekundärmetabolismus in Streptomyceten ist die Konzentration von artspezifischen Signalmolekülen (Tab. 3). Verschiedene Streptomyceten nutzen 2,3-substituierte γ -Butyrolactone als Autoregulatoren. Die Konzentration dieser Verbindungen dient als Messgröße für das *Quorum sensing* (Box 1). Abhängig von der Populationsdichte werden die genetischen Prozesse zur Zelldifferenzierung und Induktion des Sekundärmetabolismus gesteuert.

Tab. 3: Induktion des Sekundärmetabolismus durch Autoregulatoren von Streptomyceten.

Autoregulator	Sekundärmetabolit	Organismus	Quelle
A-Faktor 21	Streptomycin	<i>S. griseus</i>	[81, 82]
Virginiae Butanolid 22 (R1 = H, R2 = R3 = Me), 23 (R1 = R2 = Me, R3 = H), 24 (R1 = H, R2 = Me, R3 = H), 25 (R1 = H, R2 = Et, R3 = H), 26 (R1 = Me, R2 = H, R3 = H),	Virginiamycin	<i>S. virginiae</i>	[83]
Faktor IM 27	Minimycin und Showdomycin	<i>S. lavendulae</i> FRI-5	[84]
Faktor SCB1 28	Actinorhodin (11) und Undecylprodigiosin (10)	<i>S. coelicolor</i>	[85]

Da die meisten Kulturen unter Laborbedingungen nur ein kleines Spektrum ihrer Sekundärmetabolite produzieren, scheint die Kultivierung unter naturähnlichen Bedingungen ein vielversprechender Ansatz zu sein, bisher unbekannte Metaboliten von Mikroorganismen isolieren zu können.

2 Zielstellung

Die Grundlage dieser Arbeit ist die Annahme, dass bestimmte Umweltfaktoren die Induktion des Sekundärmetabolismus in *S. avermitilis* und *S. coelicolor* bewirken können.

Da die Wechselwirkungen von *S. avermitilis* und *S. coelicolor* mit ihrer Umwelt aufgrund der Vielfalt von biotischen und abiotischen Umweltfaktoren nur schwer nachvollziehbar sind, soll sich diese Arbeit auf die Untersuchung einzelner Umwelteinflüsse auf den Sekundärmetabolismus dieser beiden Mikroorganismen konzentrieren. Dazu werden ein biotischer und ein abiotischer Umweltfaktor ausgewählt.

Als biotischer Umweltfaktor soll die Kokultivierung von *S. avermitilis* mit einer anderen Bodenbakterienart untersucht werden (Abb. 11). Als Interaktionspartner für *S. avermitilis* wurde *Pseudomonas fluorescens* ausgesucht, da sich die ökologischen Nischen der beiden Mikroorganismen im Boden sehr wahrscheinlich überschneiden. Es soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Wechselwirkung zwischen diesen Arten die Herstellung von antibiotischen Verbindungen in *S. avermitilis* und deren Speicherung in den Tropfen auf der Oberfläche bewirkt.

Die Zugabe von verschiedenen Metallionen in das Medium von *S. coelicolor* soll als abiotischer Umweltfaktor untersucht werden (Abb. 11). Viele bivalente Kationen haben in geringen Dosen essentielle Bedeutung für den Stoffwechsel. Möglicherweise wird durch eine erhöhte Konzentration von Metallionen im Medium die Freisetzung von bisher unbekanntem Chelatoren aus *S. coelicolor* induziert. Weiterhin spricht für die Untersuchung der Auswirkungen von Metallionenstress auf die chemische Differenzierung in *S. coelicolor*, dass Calcium ein wichtiger sekundärer Signalstoff ist. Das Gleichgewicht dieses Ions wird in den Zellen von Streptomyceten genau kontrolliert.^[75, 86] Eine Störung des Calciumhaushalts in *S. coelicolor* könnte als Reaktion die Freisetzung von Sekundärmetaboliten bewirken.

Zusätzlich wurde die Komplexbildung des A-Faktors (**21**), dem Autoregulator von *Streptomyces griseus*, durch Co^{2+} -Ionen postuliert.^[87] Möglicherweise ist nach der Bindung von Metallionen an den SCB-Faktor (**16**) die dichteabhängige Steuerung der morphologischen Entwicklung von *S. coelicolor* nicht mehr möglich. Die Zellen unter Schwermetallionenstress wären dann nicht mehr in der Lage, ihr Programm zur Bildung von Sporen abzuschließen und wären so zur Anpassung an die gegebenen Wachstumsbedingungen gezwungen. Die Adaptation an die durch Schwermetallionen belastete Umwelt könnte die Verschiebung des Sekundärmetabolitenprofils in *S. coelicolor* nach sich ziehen. Möglicherweise werden unter dem Einfluss von Schwermetallionen kryptische Gene in *S. coelicolor* aktiviert, die zur Synthese unbekannter Verbindungen führen.

Die Analyse des unter Umweltstress veränderten Metabolitenprofils soll nicht auf den Nachweis der produzierten Verbindungen beschränkt bleiben, sondern auch auf der Ebene der Genexpression fortgesetzt werden. Die Transkriptomanalyse kann die generelle Reaktion von *S. coelicolor* auf Schwermetallionenstress erfassen und die Induktion von Genclustern des Sekundärmetabolismus anzeigen, deren Produkte bisher nicht nachweisbar sind.

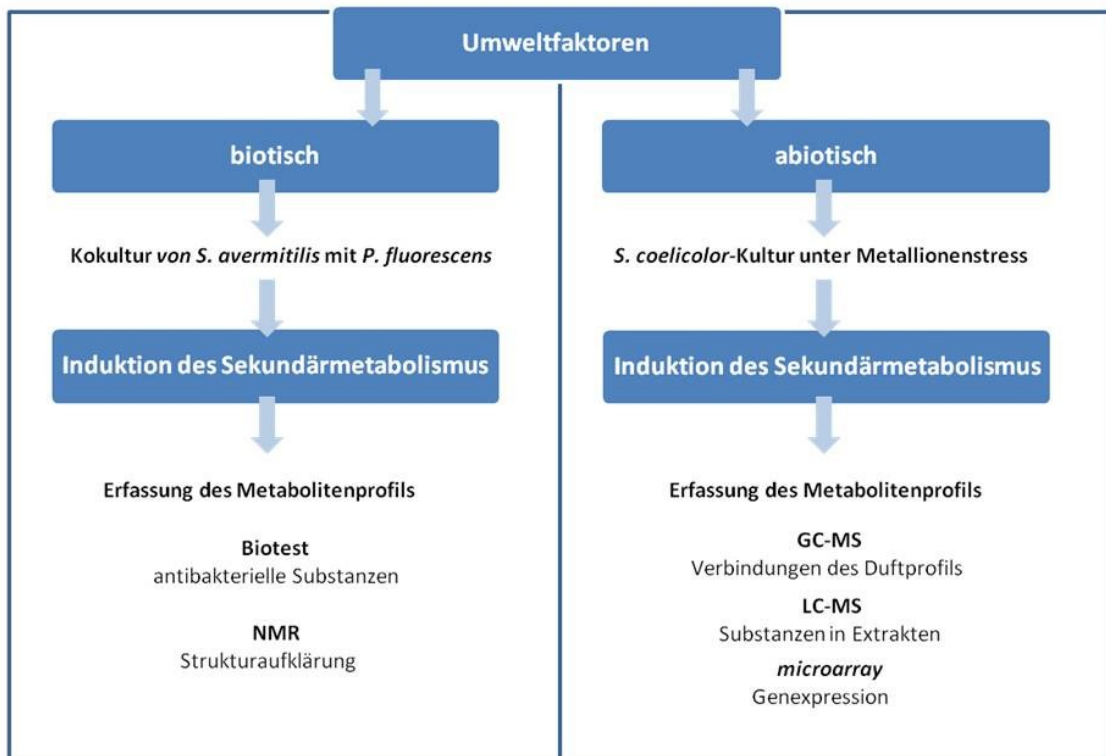


Abb. 11: Schematischer Überblick über die geplanten Versuche.

In dieser Arbeit werden folgende Schwerpunkte gesetzt, um den Effekt eines biotischen und eines abiotischen Umweltfaktors auf die Produktion von bioaktiven Naturstoffen in *S. avermitilis* und *S. coelicolor* zu untersuchen:

Induktion eines veränderten Metabolitenprofils von *Streptomyces avermitilis* durch die Kokultur mit *Pseudomonas fluorescens*

- ❖ Auswirkungen der Kokultur mit *P. fluorescens* auf den Sekundärmetabolismus in *S. avermitilis* und Überprüfung der Guttationstropfen auf antibiotische Wirksamkeit.
- ❖ Analyse der Guttationstropfen von *S. avermitilis*.

Induktion eines veränderten Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor* durch Kultivierung unter Schwermetallionenstress

- ❖ Einfluss von Cobaltionen auf das Metabolitenprofil von *S. coelicolor*.
- ❖ Etablierung der *microarray*-Technik zur Erfassung der veränderten Genexpression in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress.

3 Induktion eines veränderten Metabolitenprofils in *Streptomyces avermitilis* durch Kokultur mit *Pseudomonas fluorescens*

3.1 Einleitung

3.1.1 Auswirkungen biotischer Umweltfaktoren auf die Produktion von Sekundärmetaboliten in gemischten mikrobiellen Kulturen

In komplexen Umweltsituationen wie mikrobiellen Gemeinschaften werden Naturstoffe als Reaktion auf die Interspezieskommunikation gebildet^[88], daher ist auch unter Laborbedingungen die Induktion mikrobieller Sekundärmetaboliten durch die Kokultur mit anderen Mikroorganismen möglich. Beispielsweise stellt eine marine bakterielle Gemeinschaft aus *Pseudomonas aeruginosa* und einem Enterobakterienstamm ein blaues Pigment mit antibiotischen Eigenschaften her. Das Pyocyanin (**29**) konnte in den Reinkulturen der einzelnen Vertreter nicht nachgewiesen werden.^[19] Es wurde belegt, dass der Pseudomonadenstamm der eigentliche Produzent dieser Verbindung ist, während der Enterobakterienstamm die Synthese der Verbindung wahrscheinlich nur induziert.^[89] Häufig werden in mikrobiellen Kommunikationssystemen kleine Signalmoleküle zur Kontrolle der Naturstoffproduktion eingesetzt. Dies eröffnet neue Möglichkeiten wie den gezielten Einsatz dieser Verbindungen zur Induktion des Sekundärmetabolismus in verschiedenen Mikroorganismen. Eine wesentliche Rolle in der Kommunikation zwischen verschiedenen Mikroorganismen könnte flüchtigen Verbindungen zukommen. Ein Beispiel für die Wirkung einer flüchtigen Verbindung ist die Hemmung der Biosynthese des autoregulatorischen Signalchinolons von *P. aeruginosa* (PQS, **30**) und die anschließende Reduktion der Pyocyaninbiosynthese durch das Sesquiterpen Farnesol (**31**).^[90]

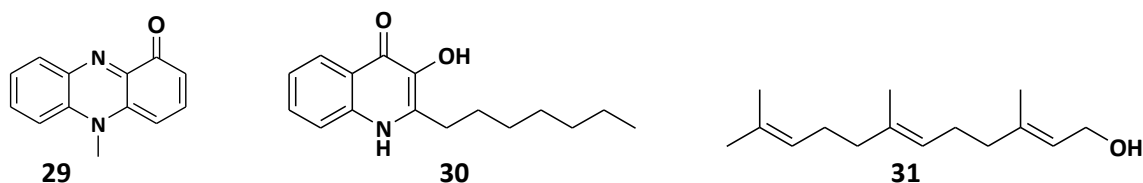


Abb. 12: Strukturen von Pyocyanin (**29**), PQS (**30**) und Farnesol (**31**).

Allerdings kann die Induktion des Sekundärmetabolismus in einer gemischten mikrobiellen Gemeinschaft auch ohne den Austausch von chemischen Signalen stattfinden. In dem Pilz *Aspergillus nidulans* wurden durch die Kokultur mit *Streptomyces hygroscopicus* die vier kryptischen Gencluster zur Herstellung von Orsellinsäure (**32**), Lecanorsäure (**33**) sowie der Cathepsin-Inhibitoren F-9775A (**34**) und F-9775B (**35**) induziert. Für die Induktion dieser Gencluster war eine enge Assoziation zwischen beiden Organismen nötig.^[91] Mikrobielle Reinkulturen sind unter natürlichen Wachstumsbedingungen eine Ausnahme.^[2] Es ist daher denkbar, dass die Biosynthese bisher unbekannter bioaktiver Naturstoffe nur in Gegenwart von bestimmten Lebensgemeinschaften stattfindet.

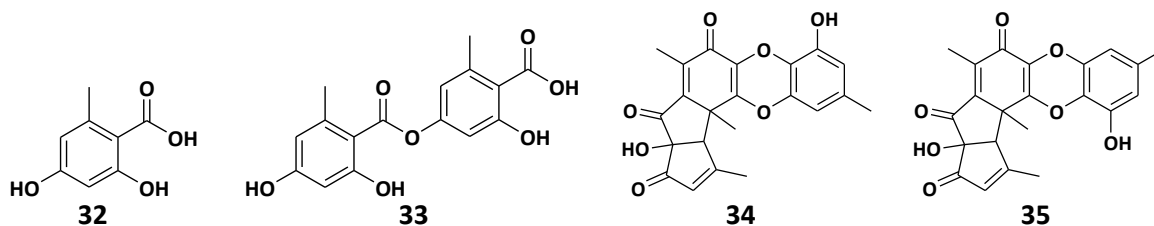


Abb. 13: Strukturen von Orsellinsäure (**32**), Lecanorsäure (**33**) und F-9775A (**34**) sowie F-9775B (**35**).

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Auswirkung der Kokultur mit *Pseudomonas fluorescens* auf das Metabolitenprofil von *Streptomyces avermitilis*

Die Auswirkungen der Kokultur mit *P. fluorescens* auf das Metabolitenprofil von *S. avermitilis* wurde durch die Analyse der Guttationstropfen, die auf der Oberfläche von *S. avermitilis* gebildet werden, untersucht.

Zuerst wurde überprüft, ob die Zusammensetzung des Mediums einen Einfluss auf die Inhaltsstoffe der gebildeten Tropfen hat. Neben dem SFM-Medium wurde *S. avermitilis* noch auf folgenden Medien kultiviert: Minimalmedium für Actinomyceten, Minimalmedium nach Hopwood, Minimalmedium mit Glycerin, Minimalmedium mit Mannitol, SFG, SFGly-Agar, SFM50, SFM75.

Die Guttationstropfen wurden mit Glaskapillaren (Durchmesser 2 mm) gesammelt. Es wurden Proben von *S. avermitilis* in Reinkultur auf SFM-Agar genommen, sobald die Bildung der Guttationstropfen auf der Oberfläche des Luftmyzels beobachtet werden konnte. Die Proben der Kokultur stammten von Agar-Platten, die auf einer Seite mit *S. avermitilis* inokuliert wurden, auf der anderen Seite der Agar-Platte zusätzlich mit *P. fluorescens* angeimpft worden waren.

Ob die gesammelten Tropfen von der Oberfläche des Myzels von *S. avermitilis* eine antibiotische Aktivität zeigten, wurde im Agardiffusionstest überprüft.

Überprüfung der Guttationstropfen auf antibiotische Wirksamkeit

Zur Beurteilung der antibiotischen Wirkung der Guttationstropfen auf andere Bakterien wurden Flüssigkulturen des Modellorganismus *E. coli* auf LB-Agar und zwei Bodenbakterien, der Gram-negative Stamm *P. fluorescens* sowie der Gram-positive Stamm *B. subtilis*, auf Nutrient-Agar ausgestrichen. Die Guttationstropfen der *S. avermitilis*-Reinkultur sowie von Kolonien, die in Kokultur mit *P. fluorescens* gewachsen waren, wurden mit Hilfe von Filterblättchen appliziert. Dazu wurde ein steriles Filterpapier in die gesammelten Tropfen getaucht, kurz an der Luft getrocknet und in die Mitte einer in dem jeweiligen Teststamm angeimpften Agar-Platte gelegt. Das vom Filterpapier aufgenommene Volumen betrug 5 µl. Die Agar-Platten mit *P. fluorescens* sowie *B. subtilis* wurden bei 28 °C, die Agar-Platten mit *E. coli* bei 37 °C über 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Größe des Hemmhofs um das Filterplättchen gemessen.

Neben dem Test mit den Tropfen wurde noch eine direkte Kokultivierung mit den oben genannten Teststämmen durchgeführt. Durch diesen Versuch sollte überprüft werden, ob durch den direkten Kontakt zwischen den Arten die Produktion von bioaktiven Sekundärmetaboliten ausgelöst wird. Die Teststämme wurden direkt mit *S. avermitilis* kultiviert. Im ersten Versuchsteil wurden die Bakterien zeitgleich angeimpft, im zweiten Teilversuch die Streptomyceten 5 d bei 28 °C vorkultiviert und erst dann die zweite Bakterienart angeimpft. Die Testbakterien wurden mit einer Impföse in einem Streifen auf einer SFM-Agarplatte ausgestrichen. Die Kultur von *S. avermitilis* wurde im rechten Winkel zum Teststamm so ausgestrichen, dass die Streifen der beiden Kulturen sich in der Mitte einer Agar-Platte durchkreuzten. Die Bestimmung der Wachstumshemmung erfolgte durch Mikroskopieren der Kontaktzone und Messung der auftretenden Hemmzone.

3.2.2 Analyse der Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

Die gaschromatographische Trennung und die anschließende Analyse in einem Massenspektrometer sollten näheren Aufschluss über die niedermolekularen Inhaltsstoffe der Guttationstropfen von *S. avermitilis* geben. Die Struktur einiger der analysierten Verbindungen wurden außerdem mit Kernspinresonanzspektroskopie untersucht und der biosynthetische Ursprung der identifizierten Substanzen durch Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie geklärt.

GC-MS-Analyse der Guttationstropfen

Die Flüssigkeitsansammlungen auf der Oberfläche der Kolonien wurden in sterile Glaskapillaren aufgesaugt und in einem GC-Vial vereinigt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Da wässrige Lösungen ungeeignet für die Analyse im GC-MS sind, wurden die Proben vor der Messung im Argonstrom getrocknet. Jeder Probe (20 µl) wurden 2 µl Sorbitollösung (1 mg/ml) als interner Standard zugesetzt.

Die GC-MS-Analyse der in den Tropfen gelösten Verbindungen erforderte die Herstellung flüchtiger und thermostabiler Derivate der Inhaltsstoffe. Dazu wurde das Derivatisierungsreagenz MSTFA (2,2,2-Trifluoro-*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-acetamid) eingesetzt. Dieses Trimethylsilylacetamid ersetzt Wasserstoff an einer Reihe polarer Verbindungen durch eine Trimethylsilyl-Gruppe.

Die getrockneten Proben wurden mit 20 µl MSFTA versetzt und 1 h bei 60 °C inkubiert. Die derivatisierte Probe wurde in Mikroglaseinsätze überführt und 1 µl der Probe injiziert. Die Trennung der flüchtigen Verbindungen erfolgte auf einer Zebronsäule (Vorsäule 10 m, 15 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Phenomenex) mit einem Split von 11 ml/min bei einem Heliumfluss von 1,5 ml/min. Die Proben wurden unter folgendem Temperaturprogramm aufgetrennt: 50 °C (0 - 2 min), 50 bis 80 °C (2 - 4 min), 80 bis 280 °C (4 - 33 min), 280 °C (33 - 36 min). Für die statistische Auswertung der Daten wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test genutzt.

Strukturaufklärung mit NMR

Die Struktur der Verbindungen aus den Tropfen von *S. avermitilis* wurde durch Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance* – NMR) untersucht.

200 µl der gesammelten Guttationstropfen von verschiedenen Reinkulturen wurden vereinigt und gefriergetrocknet, anschließend in 600 µl D₂O gelöst und Trehalose (100 µg/ml) als interner Standard zugegeben. Von dieser Probe wurde ein ¹H-NMR Spektrum aufgezeichnet.

Darstellung der Saccharoseverteilung in den Guttationstropfen durch Injektion einer radioaktiv markierten Referenzsubstanz

Während der Experimente zur Analyse der Tropfen war auffällig, dass die Flüssigkeitsansammlungen hauptsächlich Saccharose enthielten und von der Oberfläche der Kolonien von *S. avermitilis* im Verlauf der Inkubation verschwanden. Es wurde daher radioaktiv markierte Saccharose in die Tropfen injiziert, um den Abbau dieser gelösten Verbindung in den Kulturen von *S. avermitilis* nachzuvollziehen.

Für dieses Experiment wurden SFM-Agar-Platten mit *S. avermitilis* angeimpft. Das Inokulum wurde für die Reinkultur in mehreren dünnen Streifen auf der Platte verteilt. Auf den Platten der Kokulturen

wurden abwechselnd *S. avermitilis* und *P. fluorescens* in dünne Streifen angeimpft (Abb. 18). Die Platten wurden bis zur Beobachtung der Guttationstropfen bei 28 °C 7d inkubiert. Als die Guttationstropfen auf der Oberfläche der Reinkultur von *S. avermitilis* und auf den Kolonien von *S. avermitilis* in Kokultur mit *P. fluorescens* gebildet wurden, erfolgt die Injektion der Referenzsubstanz. Die radioaktiv markierte Saccharose war in Ethanol gelöst, daher wurden 10 µl (0,0076 MBq) radioaktiv markierter Saccharoselösung im Vakuum getrocknet und das Lösungsmittel gegen Wasser ausgetauscht, um einen Einfluss des Lösungsmittels auf den Versuch auszuschließen. Je 2 µl dieser Lösung wurden mit einer Mikrospritze (10 µl) in die Tröpfchen injiziert. Die so präparierten Platten wurden auf einen radiosensitiven Phosphorfilm platziert und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Film wurde auf dem Phosphorlimer während der viertägigen Versuchszeit täglich gescannt.

Klärung des Ursprungs der Saccharose durch IR-MS

Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (*isotope ratio mass spectrometry* – IR-MS) ist eine Methode zur Bestimmung der relativen Verteilung von Isotopen in den Proben. Aufgrund des Massenunterschieds der Kohlenstoffisotope kommt es bei Transportprozessen und chemischen Umsetzungen von Kohlenstoff zum sogenannten Fraktionierungseffekt.^[92] Da die beiden Isotope ¹³C und ¹²C nicht radioaktiv und deshalb stabil sind, kann dieser Fraktionierungseffekt über deren Isotopenverhältnis bestimmt werden. In biologischen Systemen wird das leichtere Kohlenstoffisotop bevorzugt. Das begünstigte Kohlenstoffisotop akkumuliert sich während des Stoffwechsels. Daher haben alle Verbindungen aus dem Metabolismus jedes Organismus ein typisches ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis. Durch die Bestimmung des Verhältnisses der stabilen Isotope ¹³C/¹²C ist es möglich, den Ursprung von Verbindungen aus dem Tropfen von *S. avermitilis* zu ermitteln. Anhand der ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnisse kann unterschieden werden, ob der Zucker in den Guttationstropfen von den Bakterien selbst hergestellt wurde oder aus dem Medium stammte.^[93-95]

Tab. 4: Proben für ¹³C/¹²C Isotopen-MS.

Analyt	Probe
1	Sojamehl
2	Mannitol
3	Agar-Agar
4	getrockneter, pulverisierter SFM-Agar
5	getrockneter Rückstand der Tropfen
6	getrocknetes Myzel
7	Saccharose mit HPLC aus Sojamehl gereinigt

Alle Proben (Tab. 4) wurden in drei Replikaten abgewogen und in Zinnkapseln eingefüllt. Die flüssigen Proben wurden zuvor getrocknet. Durch das Zusammenpressen der Kapseln wurde das Probenmaterial versiegelt.

Die versiegelten Kapseln wurden in einem konstanten Heliumstrom (80 ml) in einem Elementaranalysator quantitativ zu CO₂, N₂ und H₂O verbrannt (Oxidation bei 1020 °C, Reduktion bei 650 °C). Nach der Passage einer Wasserfalle Mg(ClO₄)₂ wurden die Gase bei 85 °C chromatographisch getrennt und zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse in das angekoppelte Massenspektrometer überführt. Die Isotopenverhältnisse wurden als δ relativ zum VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*)-Standard berechnet.^[96] Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den parameterfreien Kruskal-Wallis H-Test.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Wachstum von *Streptomyces avermitilis* in Kokultur und Überprüfung der antibiotischen Wirkung der Guttationstropfen

Die Ansammlung der hellbraunen Guttationstropfen (Abb. 14) auf der Kolonieoberfläche von *S. avermitilis* konnte nur bei der Kultivierung auf SFM-Agar (max. 30 µl pro Platte) in sehr geringem Ausmaß (≤ 2 µl) auf SFM75- und SFG-Agar beobachtet werden. Da das gebildete Flüssigkeitsvolumen während des Wachstums auf SFM-Agar am höchsten war, wurde dieses Medium für die Kultivierung von *S. avermitilis* in dem weiteren Versuch benutzt.

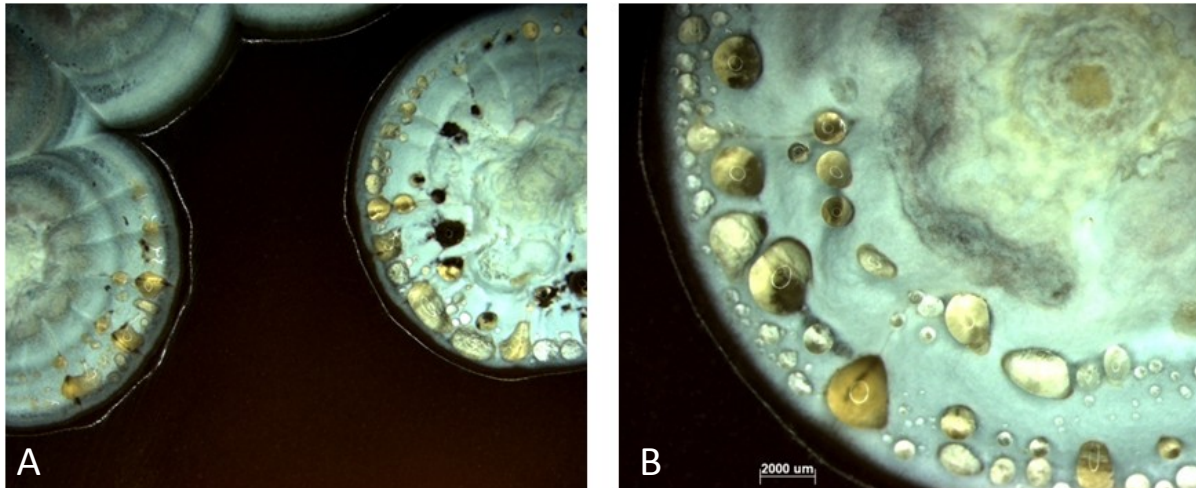


Abb. 14: Kokultur von *Streptomyces avermitilis* und *Pseudomonas fluorescens*: (A) gut zu erkennen ist die Bildung von Guttationstropfen vorrangig im Randbereich der Kolonien von *Streptomyces avermitilis*, (B) Einzelkolonie von *Streptomyces avermitilis* mit Guttationstropfen an ihrem Rand.

Die antibiotische Aktivität von gelösten Substanzen in den Guttationstropfen wurde überprüft, indem diese Flüssigkeit auf verschiedene Teststämme appliziert wurde. Weder das eingesetzte Volumen der Guttationstropfen aus den Reinkulturen von *S. avermitilis* noch die Guttationstropfen aus der Kokultur von *S. avermitilis* mit *P. fluorescens* bewirkte eine Wachstumshemmung der untersuchten Teststämme *S. subtilis*, *P. fluorescens* und *E. coli*. Daher wurde im Anschluss das Potential der untersuchten Streptomycetenarten zur direkten Wachstumshemmung der Teststämme in einem weiteren Experiment eingeschätzt. Die direkte Inokulation von *S. avermitilis* bewirkte keine Verminderung des Wachstums bei den untersuchten Teststämmen *S. subtilis*, *P. fluorescens* und *E. coli*. Daher wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem die Streptomycetenkulturen vor den Teststämmen angeimpft wurden. Streptomyceten wachsen im Vergleich zu anderen Bakterien langsam. Das zeitverzögerte Animpfen der Teststämme sollte zur Etablierung der Streptomycetenkulturen dienen; in diesem Zeitraum konnten die untersuchten Streptomycetenstämme zur Bildung des Luftmyzel übergehen und zeitgleich die bioaktive Sekundärmetabolite zum Schutz ihrer Nährstoffressourcen bilden. In diesem Versuch verursachte *S. avermitilis* keine Wachstumshemmung bei einem der Teststämme.

Analyse der Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

Die Bildung von Guttationstropfen auf der Oberfläche von Streptomycetenkolonien ist typisch für diese Organismen, bisher wurde dieses Phänomen jedoch nur unzureichend charakterisiert. Kolonien von *S. avermitilis* bildeten auf SFM-Agar regelmäßig Guttationstropfen auf ihrer Oberfläche (Abb. 14). Die Tropfen erschienen vom fünften bis zum siebten Tag der Kultivierung auf der Oberfläche des Myzels von *S. avermitilis* und waren nach dem zwölften Kulturtag nicht mehr sichtbar. Diese Tropfen entstanden sehr häufig an den Außengrenzen der Kolonien. Die Analyse und Charakterisierung der in den Guttationstropfen gelösten Substanzen erfolgte mittels GC-MS und NMR.

GC-MS-Analyse der Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

Bei der Untersuchung der Tropfen wurde Saccharose in den Guttationstropfen von *S. avermitilis* nachgewiesen und mit Hilfe von Sorbitol als internem Standard quantifiziert. Die nachweisbare Menge von Saccharose in den Tropfen von *S. avermitilis* in Kokultur mit *P. fluorescens* war zu jedem untersuchten Zeitpunkt geringer als in der Reinkultur von *S. avermitilis*.

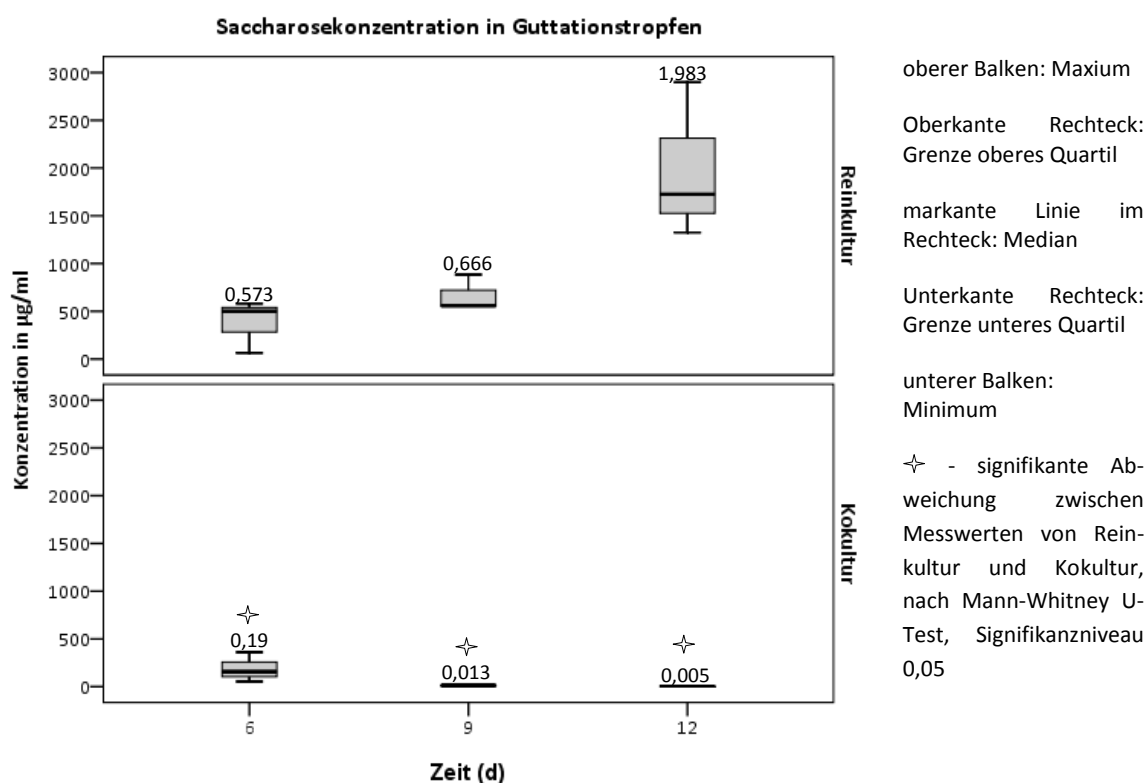


Abb. 15: Box-Plot der Saccharosekonzentration in den Guttationstropfen der *Streptomyces avermitilis*-Reinkultur (oben) im Vergleich mit der Kokultur von *Streptomyces avermitilis* mit *Pseudomonas fluorescens* (unten), Kulturdauer 12 d auf SFM-Agar, mit durchschnittlicher Saccharosekonzentration in µg/µl, n = 3.

Die Ergebnisse der GC-MS-Analysen zeigten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der Reinkultur und den korrespondierenden Messwerten der Kokultur. In der Reinkultur von *S. avermitilis* stieg die Saccharosekonzentration in den Guttationstropfen über den Kultivierungszeitraum an. Die Saccharosekonzentration in den Guttationstropfen aus der Reinkultur lag nach sechs Tagen bei 0,6 µg/µl. Dieser Wert stieg nach zwei weiteren Tagen Kultivierung leicht an. Am zwölften Tag nach der Inokulation war die durchschnittliche Saccharosekonzentration in den Guttationstropfen im Vergleich zum Versuchsbeginn verdreifacht. Im Gegensatz zur Reinkultur wurde in den Proben von *S. avermitilis* aus der Kokultur eine Verringerung der Saccharosekonzentration im

Verlauf des Experiments nachgewiesen. Die graphische Darstellung (Abb. 15) verdeutlicht, dass zu Beginn des Versuchs, nach sechs Tagen Wachstum der untersuchten Kulturen, in den Tropfen aus der Kokultur durchschnittlich die Hälfte der Menge Saccharose gemessen wurde, die in den Guttationstropfen der Reinkultur vorhanden war. Nach neuntägiger Kokultivierung mit *P. fluorescens* war nur noch ein Zehntel der anfänglich gemessenen Saccharosemenge nachweisbar. In den Proben nach zwölf Tagen Kokultivierung reduzierte sich diese Menge noch einmal um die Hälfte (Abb. 15).

Strukturaufklärung mit NMR

Zur Strukturaufklärung der in den Tropfen von *S. avermitilis* enthaltenen Substanzen wurden die Guttationstropfen von der Oberfläche der Reinkulturen per NMR untersucht. Das ^1H -NMR-Spektrum der Guttationstropfen zeigte ein Mischspektrum mit den typischen Signalen von Saccharose.

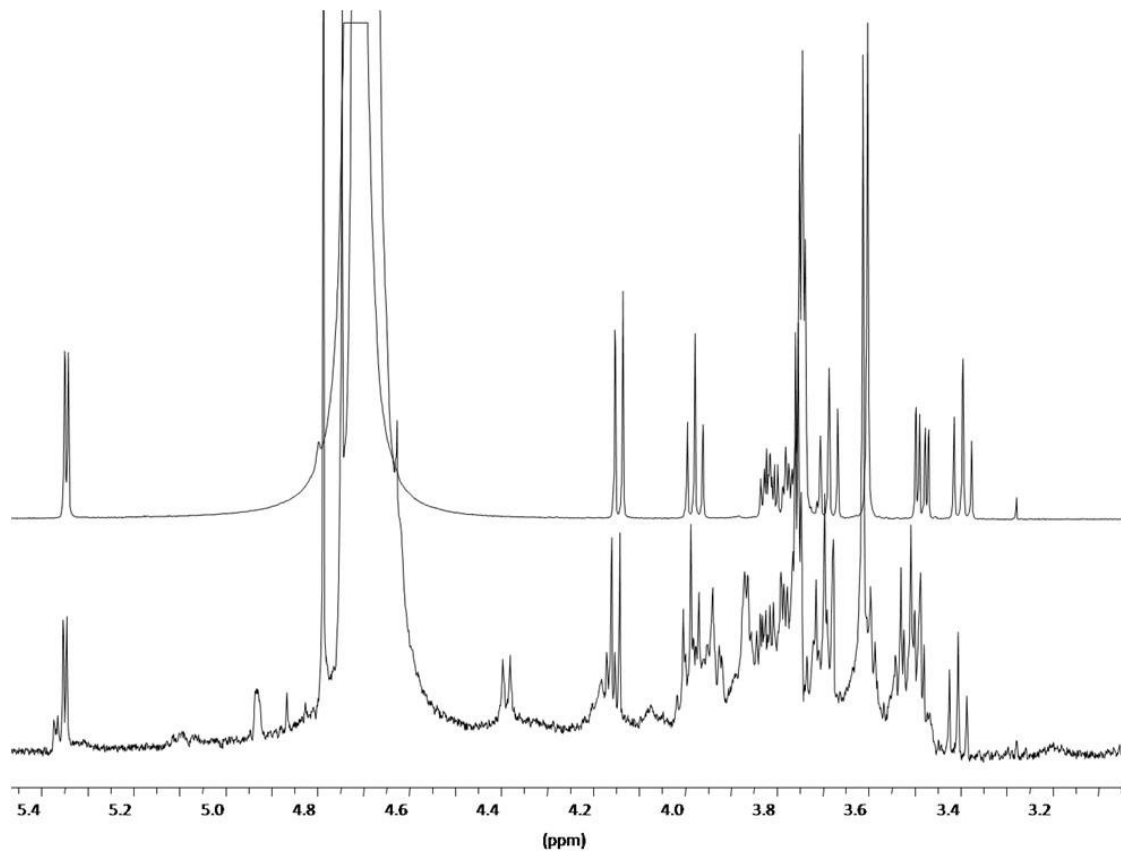


Abb. 16: ^1H -NMR-Spektrum (unten) der Tropfen von *Streptomyces avermitilis* überlagert mit dem ^1H -NMR- (oben) Spektrum von Saccharose.

Neben der Saccharose liegen vermutlich noch zwei weitere Disaccharide in den Tropfen vor. Trehalose, Maltose, Cellobiose, Gentobiose und Laktose konnten durch den Vergleich mit Standards für diese Verbindungen ausgeschlossen werden.

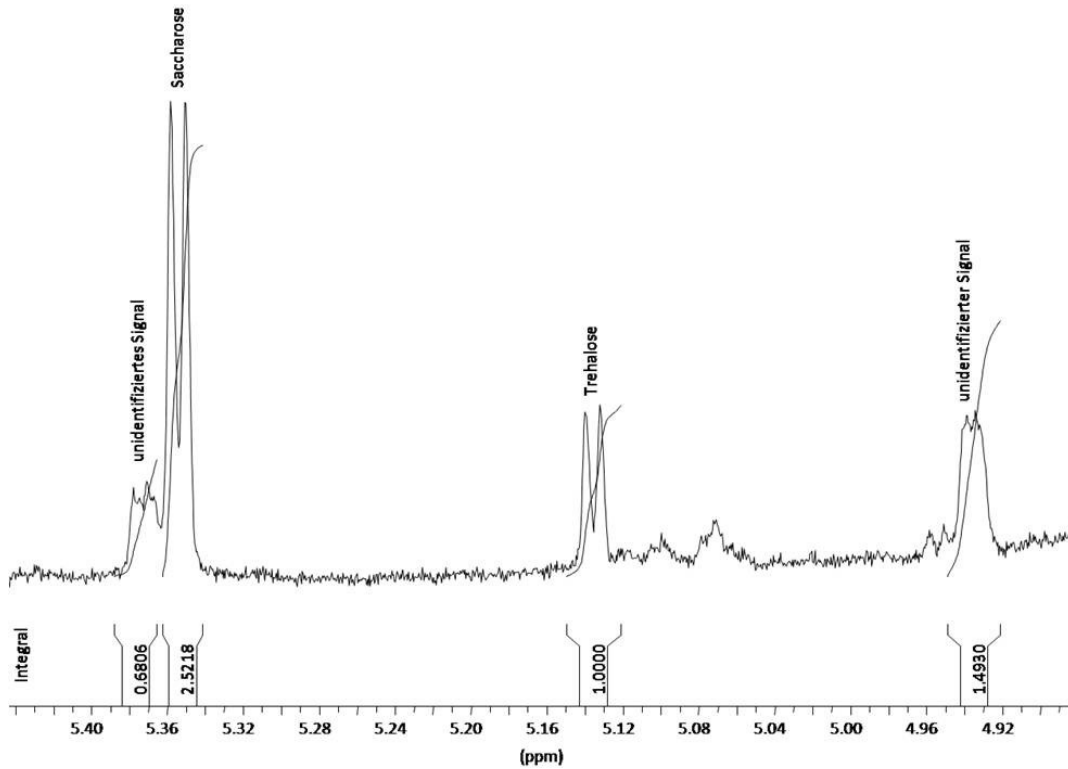


Abb. 17: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums anomerer Protonen von Zuckern in den Tropfen von *Streptomyces avermitilis* und Signalen des Trehalose-Standards, Integrale erlauben die Berechnung der ursprünglichen Saccharosekonzentration in den Tropfen von *Streptomyces avermitilis*.

Die Bestimmung der Saccharosekonzentration in den Tropfen der *S. avermitilis*-Reinkultur erfolgte über die Flächenintegration der anomeren Protonensignale im ^1H -NMR-Spektrum. Für diese Messung waren die Tropfen mehrerer Reinkulturen mit einer Kulturdauer von 6 bis 9 Tagen vereinigt worden. Aus der Messung ergab sich eine Saccharosekonzentration von $0,125 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dieser Wert lag in der gleichen Dimension wie die Ergebnisse der GC-MS-Analyse für die Guttationstropfen nach 6 und 9 d Kultivierung ($0,573$ - $0,666 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.3.2 Verteilung radioaktiv markierter Saccharose nach Injektion in die Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

Die Abgabe der Guttationstropfen war in der Reinkultur sowie in der Kokultur auf einen bestimmten Zeitraum beschränkt und die Guttationstropfen waren wenige Tage nach ihrem Erscheinen auf der Oberfläche des Myzels nicht mehr sichtbar. Durch die Injektion radioaktiv markierter Saccharose in die Guttationstropfen war die Verteilung dieser Substanz auf einem radiosensitiven Film nachvollziehbar. Aus diesem Versuch konnte geschlossen werden, ob die Saccharose in den Guttationstropfen zur Abgabe an die Umwelt bestimmt war oder wieder in die Kultur aufgenommen wurde.

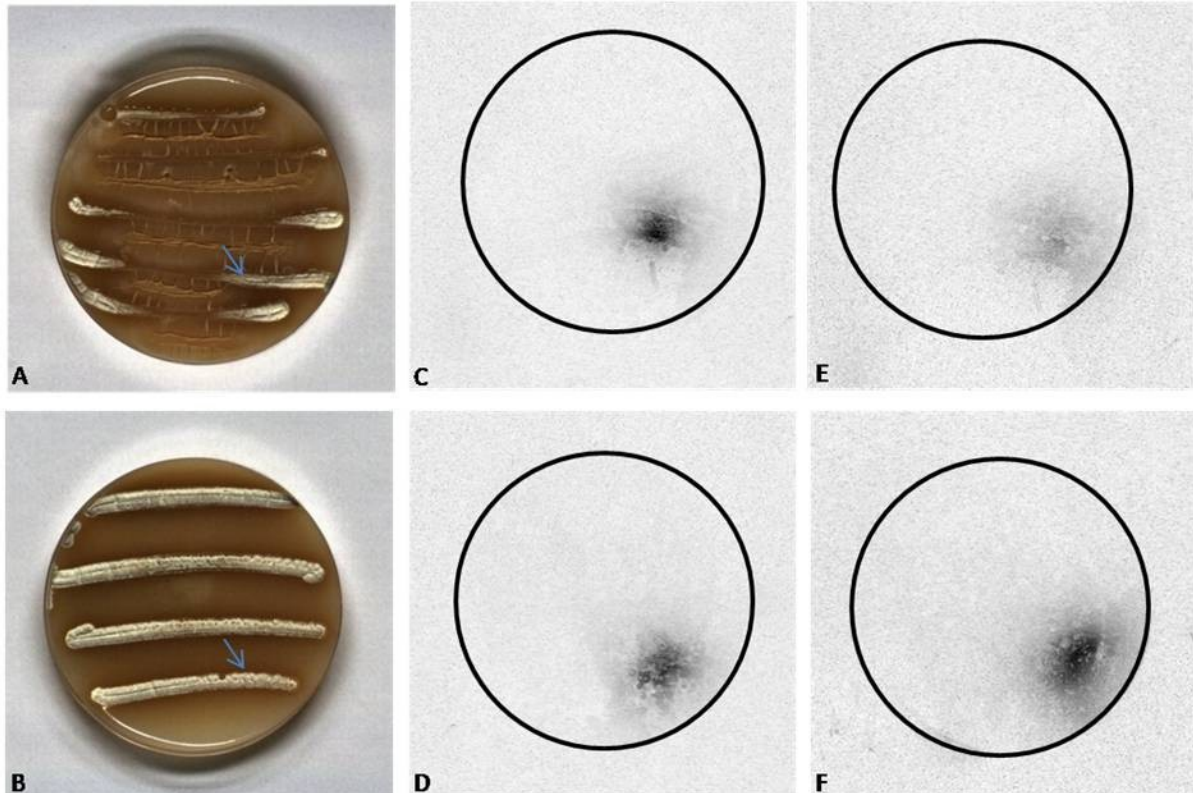


Abb. 18: Verteilung mit radioaktiv markierter Saccharose dotierter Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*, die Pfeile kennzeichnen die Positionen der Injektion von ^{14}C -markierter Saccharose in jeweils einem Guttationstropfen jeder Kultur: (A) Foto der Kokultur nach dem Versuch, (B) Foto der Reinkultur nach dem Versuch, (C) Scan der Kokultur nach 1 d, (D) Scan der Reinkultur nach 1 d Inkubation mit ^{14}C -markierter Saccharose, (E) Scan der Kokultur nach 4 d, (F) Scan der Reinkultur nach 4 d.

Nach der Inkubation über Nacht war die Radioaktivität der ^{14}C -markierten Saccharose in der Reinkultur sowie in der Kokultur um die Position des ursprünglich injizierten Tropfens nachweisbar (Abb. 18 C und D). Im Vergleich zu diesen Aufnahmen schwächte sich das Signal nach der viertägigen Inkubationszeit in der Kokultur mit *P. fluorescens* (Abb. 18 E) deutlich ab, während sich das Signal in der Reinkultur (Abb. 18 F) verstärkte.

Woher stammt die Saccharose in den Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*? Bestimmung der Isotopenverhältnisse durch IR-MS

Durch die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse sollte die Frage, ob der Zucker in den Guttationstropfen von *S. avermitilis* direkt aus dem Medium stammte oder von den Bakterien aus Bestandteilen des Mediums produziert wurde, beantwortet werden. Dazu wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse der Substanzen aus den Guttationstropfen mit dem Isotopenverhältnis des Mediums und dessen einzelnen Komponenten verglichen (Abb. 19).

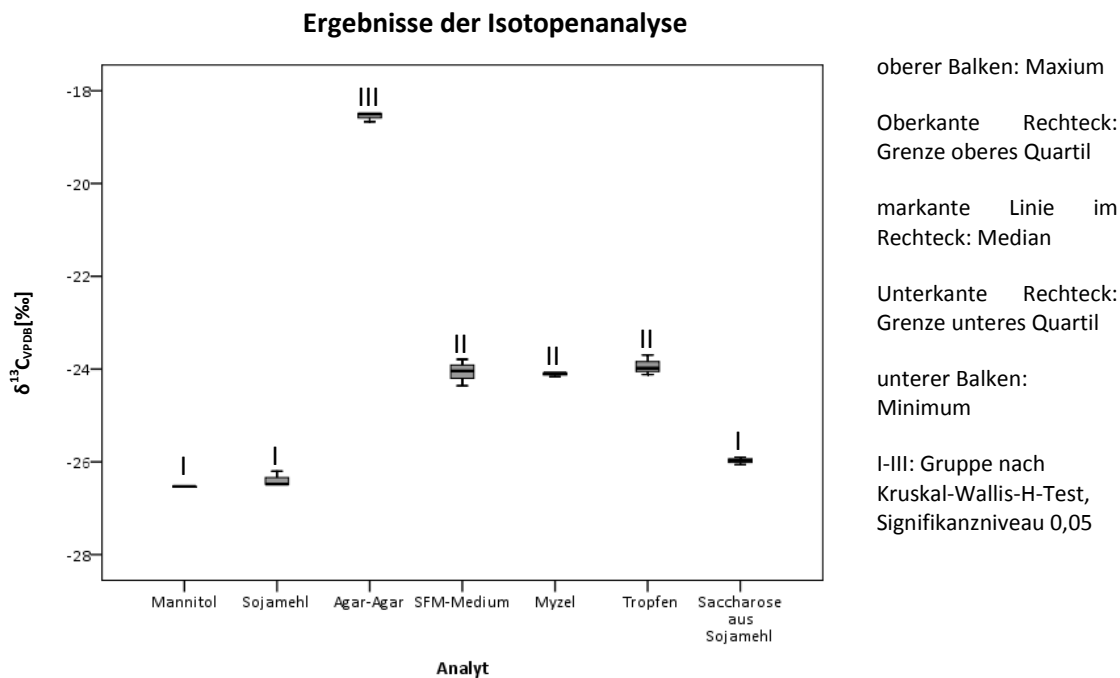


Abb. 19: Box-Plot der Isotopenverhältnisse des Mediums, der Bestandteile des Mediums sowie des Myzels von *Streptomyces avermitilis* und der Guttationstropfen, n=3.

Die statistische Auswertung zeigte, dass die Messwerte in drei verschiedene Gruppen zusammengefasst werden konnten, die sich signifikant voneinander unterschieden. Die die Proben des Sojamehls, des Mannitols und der Saccharose aus dem Sojamehl weisen ähnliche $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse auf und wurden daher als Gruppe I zusammengefasst (Abb. 19). Da alle diese Verbindungen aus der Photosynthese von Landpflanzen stammen, liegen diese Messwerte in der gleichen Größenordnung. Dieser Bestandteil des Mediums wird von marinen Algen produziert und ist daher durch ein abweichendes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis (III in Abb. 19) gekennzeichnet. Für die deutlich voneinander divergierenden Isotopenverhältnisse der einzelnen Bestandteile (Mannitol, Sojamehl, Agar-Agar) ergab sich ein Durchschnittswert für das SFM-Medium von $\delta = -24,06$. Der rechnerisch ermittelte Mittelwert aus den Isotopenverhältnissen der Mediumsbestandteile beträgt $\delta = -23,83$. Die Abweichung zum tatsächlich gemessenen Wert über den Rahmen der Messgenauigkeit von 0,23 ‰ hinaus ist einem Einwaagefehler bei der Herstellung des Mediums geschuldet. Das auf dem SFM-Medium kultivierte Myzel und die Guttationstropfen von *S. avermitilis* zeigten mit $\delta = 24,11$ und $\delta = 23,93$ sehr ähnliche $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse und wurden daher mit dem SFM-Medium in der Gruppe II zusammengefasst. Der Wert für die Saccharose, die aus dem Sojamehl aufgereinigt wurde, ist mit $\delta = 25,97$ deutlich verschieden von dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der Guttationstropfen. Dieses Ergebnis stützt die These, dass die Saccharose in den Tropfen nicht direkt aus dem Medium dort eingelagert, sondern aus den Bestandteilen des Mediums durch *S. avermitilis* aufgebaut und in die Tropfen transportiert wird.

3.4 Diskussion

3.4.1 Antibiotische Wirkung der Guttationstropfen

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Effekt von Kokultivierung mit *P. fluorescens* auf das Metabolitenprofil von *S. avermitilis* untersucht werden. Zur Induktion potentiell bioaktiver Naturstoffe in *S. avermitilis* wurde *S. avermitilis* mit anderen Bakterien auf Festmedien kultiviert. Die gemischten Kulturen wurden auf eine Wachstumshemmung der Teststämme untersucht. Gleichzeitig wurden die Tropfen von der Oberfläche der Streptomycetenkolonien auf ihre Bioaktivität getestet.

Obwohl die Bildung von Guttationstropfen auf der Oberfläche von Streptomycetenkolonien ein häufig beobachtetes Phänomen ist und sie zur phylogenetischen Bestimmung einzelner Arten herangezogen wird^[25], wurde sie bisher kaum systematisch studiert. Allerdings gibt es zur ökologischen Bedeutung der Tropfen, die von Pilzen gebildet werden, mehrere Untersuchungen. Es wurde nachgewiesen, dass die Tropfen auf der Oberfläche von *Scerotia sclerotiorum* und des Basidiomycetenstamms RES I_k Enzyme beinhalten.^[97-100] Es wurde auch postuliert, dass die Tropfen ein Reservoir für Sekundärmetabolite oder andere Stoffwechselprodukte sind und sie diese Verbindungen bis zu ihrer Verwendung speichern.^[101] Eine gegenläufige Hypothese lautet, dass die Tropfen als Wasserreservoir dienen.^[28] Annahmen über Bedeutung der Guttationstropfen für Streptomyceten sind bisher reine Spekulation.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass *S. avermitilis* auf SFM-Agar keine gegen die Teststämme *S. subtilis*, *P. fluorescens* und *E. coli* wirksamen Verbindungen in den Guttationstropfen speichern. Auch die Tropfen von Kulturen von *S. avermitilis*, die gemeinsam mit *P. fluorescens* inkubiert worden waren, zeigten keine antibakterielle Aktivität. *S. avermitilis* wird industriell zur Produktion des Makrolids Avermectin (**4**) eingesetzt, allerdings ist von dieser Verbindung keine antimikrobielle Wirkung bekannt.^[43] Falls die Tropfen auf der Oberfläche von *S. avermitilis* tatsächlich als Reservoir für bioaktive Sekundärmetabolite dienen sollten, werden diese Substanzen nicht bei der Kultivierung auf SFM-Medium gebildet, sind nicht gegen die verwendeten Teststämme aktiv oder nicht in ausreichender Konzentration vorhanden, um eine antibiotische Wirkung entfalten zu können.

Die direkte Untersuchung von gemischten Kulturen auf festem Medium klärte die Frage, ob die untersuchten Streptomycetenarten überhaupt unter den gewählten Wachstumsbedingungen eine Hemmung der Teststämme *B. subtilis*, *E. coli* und *P. fluorescens* durch antibiotisch wirksame Verbindungen verursachen. Auch in diesem Versuch konnte keine Wachstumsbeeinträchtigung der Teststämme festgestellt werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei der Suche nach antibiotisch wirksamen Substanzen aus *S. avermitilis* mit *B. subtilis* als Indikatorstamm ermittelt.^[102]

Die Bildung der Guttationstropfen auf der Oberfläche von *S. avermitilis* konnte auf einzelnen Medien beobachtet werden und die gelösten Bestandteile in den Tropfen stammen nach den Ergebnissen der Isotopenanalyse aus dem Medium. Daher scheint die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums einen direkten Einfluss auf die Bildung sowie die Zusammensetzung der Tropfen auf der Oberfläche von *S. avermitilis* zu haben. Möglicherweise hatte das reichhaltige Medium auch Auswirkungen auf das Ergebnis des Biotests. Am Beispiel des Granaticins wurde gezeigt, dass Aminosäuren aus dem Medium den Wirkmechanismus dieses Antibiotikums aufheben. Granaticin ist eine dem Actinorhodin

(11) strukturell ähnliche Verbindung und vermindert das Wachstum von Gram-positiven Bakterien durch die Hemmung der Leucin-Aminoacyl-t-RNA-Synthetase.^[103] Eine hohe Leucinkonzentration im Medium schwächt daher seine Wirkung ab. Das komplexe Versuchsmedium in den Experimenten zur direkten Kokultur könnte die Bildung einer Hemmzone verhindert haben. Unter natürlichen Bedingungen könnten von *S. avermitilis* gebildete Substanzen Effekte auf die Teststämme haben, die unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu beobachten waren.

3.4.2 Hauptinhaltsstoff der Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

Erstmalig konnte (3.2.2) gezeigt werden, dass die Tropfen auf der Oberfläche von *S. avermitilis* neben zwei unidentifizierten Disacchariden hauptsächlich gelöste Saccharose enthalten. Die Konzentration dieses Disaccharides nahm in den Tropfen der Reinkultur mit der Dauer der Kultivierung zu. Diese Beobachtung kann durch die Verdunstung von Wasser aus den Tropfen erklärt werden. Die Reinkultur von *S. avermitilis* schien im beobachteten Zeitraum nicht auf den Energielieferanten Saccharose angewiesen zu sein. Die Tropfen von *S. avermitilis* aus der Kokultur mit *P. fluorescens* enthielten schon zu Beginn der Messung weniger Zucker als die Kontrolle und sind vergleichsweise gering konzentrierte Lösungen. Möglicherweise gibt *S. avermitilis* in Konkurrenzsituationen um Nährstoffe weniger von dieser Ressource an die Umgebung ab. Da *S. avermitilis* weder in Reinkultur noch in Kokultur mit *P. fluorescens* in den Versuchen dieser Arbeit abiotisch wirksame Verbindungen produzierte, könnte die Saccharose an den Konkurrenten verloren gehen. Andererseits ist es auch denkbar, dass weniger Zucker in den Tropfen nachweisbar war, weil *S. avermitilis* in der Kokultur weniger Substrat für das Wachstum als in der Reinkultur zur Verfügung stand.

3.4.3 Ursprung und Verteilung der abgebenden Saccharose in *Streptomyces avermitilis*

S. avermitilis produzierte die gelösten Inhaltsstoffe in den Tropfen aus den Bestandteilen des Mediums und lagerte sie in den Tropfen ein. Dieser Schluss lässt sich aus den ermittelten Isotopenverhältnissen des Mediums und der gelösten Bestandteile in den Tropfen ziehen. Die Versuche zur Verteilung der Saccharose aus den Guttationstropfen von *S. avermitilis* während der Inkubation in der Kokultur ergaben, dass die Saccharose aus den Tropfen wahrscheinlich in Gegenwart von *P. fluorescens* wieder aufgenommen und dann veratmet wurde. In der Konkurrenzsituation mit *P. fluorescens* mobilisierten die Zellen von *S. avermitilis* scheinbar diese Ressource wieder, während der Zucker in der Reinkultur von *S. avermitilis* in den Tropfen verblieb.

Mögliche ökologische Bedeutung der Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

Die Abgabe der Tropfen erfolgte verstärkt an den Grenzzonen der Kolonie, in denen die jüngsten Teile des Myzels lokalisiert sind. Möglicherweise diente die Saccharose in den Tropfen als Energiespeicher (ein Molekül Saccharose = 28 ATP) nach dem Abbau des Substratmyzels, um die Versorgung des metabolisch aktiven Teils der Kolonie zu gewährleisten. Allerdings ist das bevorzugte Disaccharid zur Speicherung von Energie in Streptomyceten Trehalose.^[104] Dieses Disaccharid ist weitestgehend inert gegen den Abbau durch metabolische Enzyme und wird während des Wachstums der Kolonie und auch in den Sporen als Energiespeicher genutzt.^[105]

Noch ist unklar, ob diese Tropfen von Streptomyceten aktiv von *S. avermitilis* abgegeben werden oder ob sie sich passiv auf der hydrophoben Oberfläche der Kolonien sammeln. Das Myzel von Streptomyceten auf einer Agar-Platte besteht aus vielfach verzweigten Filamenten. Wasser aus dem Medium könnte durch Kapillarkräfte zwischen den Filamenten aufsteigen und durch aktive Abgabe

von Saccharose angereichert werden. Sollte allerdings ein passiver Mechanismus zugrunde liegen, müsste die Verteilung der Tropfen zufällig über die Kolonie erfolgen und die Bildung der Tropfen anhalten, solange das Myzel besteht. Da die Bildung der Guttationstropfen auf der Oberfläche von der *S. avermitilis*-Kolonie jedoch lokal und zeitlich beschränkt erfolgte, scheint eine Kopplung an das Wachstum der Kolonie wahrscheinlicher. Möglicherweise erzeugt die aktive Abgabe einer konzentrierten Saccharoselösung einen Nachstrom von Wasser entlang des osmotischen Gefälles. Denkbar ist auch, dass die Abgabe der Saccharoselösung eine ähnliche Funktion hat, wie der florale Nektar bei Pflanzen. Möglicherweise dient der Zucker zur Belohnung von im Boden lebenden Tieren, die die Sporen der Kolonie verbreiten. Vertreter der Collembolen (Springschwänze)^[65] und der Oligochaetenfamilie der *Enchytreidae*^[106] weiden Streptomycetenkulturen ab und könnten so Sporen aufnehmen und transportieren.

Die höchste ermittelte Zuckerkonzentration lag in den Tropfen der Reinkultur nach 12 d Kultur bei ca. 0,2 % (S. 21 und 22). Pflanzen belohnen ihre Bestäuber mit konzentrierten Zuckerlösungen (10 - 30 %)^[107]. Die Zuckerkonzentration in den Tropfen von *S. avermitilis* ist im Vergleich mit dem floralen Nektar von Pflanzen relativ gering. Saccharose ist nicht flüchtig, das heißt, bodenbewohnende Insekten müßten erst auf einen Guttationstropfen stoßen und die Lösung aufnehmen, um vom enthaltenen Zucker zu profitieren. Zusätzlich wäre im Fall von *S. avermitilis* die Aufnahme des Myzels für bodenlebende Insekten oder Nematoden fatal, da *S. avermitilis* Avermectin (**4**) produziert. Diese Substanz wird zur Bekämpfung von parasitischen Nematoden und Arthropoden eingesetzt.^[108] Hopwood^[65] schlug vor, dass Nematoden und Insekten nach dem Abweiden einer Streptomycetenkolonie von den enthaltenen bioaktiven Verbindungen getötet werden und ihre Kadaver im Anschluss als Nährstoffquelle für die sporulierenden Bakterien dienen. Diese Tatsachen sprechen gegen die Hypothese zur Belohnung der Sporenverbreitung durch die Guttationstropfen von *S. avermitilis*.

3.5 Ausblick

Bei der Kultivierung auf SFM-Agar konnte keine Speicherung von antibiotisch wirksamen Substanzen gegen die Teststämme *B. subtilis*, *P. fluorescens* und *E. coli* in den Guttationstropfen von *S. avermitilis* nachgewiesen werden. Auch die gemeinsame Kultivierung mit *S. avermitilis* bewirkte keine Wachstumshemmung der Teststämme, möglicherweise ist ein anderer Versuchsaufbau erfolgreicher:

Die Kultivierung auf nährstoffarmen Medien, die Kokultur mit anderen Bakterien (Streptomyceten) oder Pilzen könnten vielversprechende Ansätze zur Induktion und Nachweis bioaktiver Sekundärmetabolite sein.^[102]

Die Analyse der Guttationstropfen in GC-MS und NMR lieferte durch zusätzliche Signale von Zuckern Hinweise auf weitere Inhaltsstoffe neben dem Hauptbestandteil Saccharose. Daher wäre die Charakterisierung der weiteren Zucker eine interessante Weiterführung dieser Untersuchungen.

**4 Induktion eines veränderten Metabolitenprofils durch
Schwermetallionenstress in *Streptomyces coelicolor***

4.1 Einleitung

4.1.1 Einfluss von Metallionenstress auf den Sekundärmetabolismus in Actinomyceten

Unter extremen Umweltbedingungen, wie z. B. in hyperhalinen Gewässern oder schwermetallbelasteten Bergbauflächen, können nur wenige Arten existieren. Die mikrobiellen Bewohner dieser, vom Menschen als lebensfeindlich betrachteten, ökologischen Nischen unterliegen daher kaum dem Konkurrenzdruck anderer Spezies und sollen ein geringes Potential haben, Antibiotika zu produzieren, weil sie sich nicht gegen andere Organismen durchsetzen müssen.^[46] Allerdings konnten aus den Böden früherer Urantagebaue acht metallresistente Actinomyceten isoliert werden, die in antimikrobiellen Biotests die Produktion bioaktiver Substanzen unter Schwermetallionenstress zeigten. Alle untersuchten Stämme stellten in einer mit Schwermetallionen belasteten Umgebung, unabhängig von der Dauer der Exposition, bioaktive Substanzen her. Eine Verschiebung des Sekundärmetabolitenprofils unter Schwermetallstress wurde aber auch bei zwei Stämmen beobachtet, die aus unbelasteten Böden isoliert wurden. Nicht nur die Stämme langfristiger belasteter Böden wiesen bei der Kultivierung in Gegenwart von Schwermetallionen Veränderungen des Metabolitenprofils auf, sondern auch solche Stämme, die sich nur über einen relativ kurzen Zeitraum an den belasteten Lebensraum anpassen mussten oder aus völlig unbelasteten Habitaten stammten. Eine mögliche Erklärung für die Produktion von antimikrobiell wirksamen Verbindungen unter Schwermetallionenstress ist die Vermutung, dass die Aktivierung des Sekundärmetabolismus mit der Stressantwort der getesteten Stämme gekoppelt sein könnte.^[109] Viele Schwermetallionen sind in geringen Konzentrationen als Mikroelemente essentiell für das Wachstum von Mikroorganismen^[110], da sie für metallabhängige Enzymfunktionen unerlässlich sind. Höhere Konzentrationen dieser Ionen haben allerdings einen toxischen Effekt.^[111, 112] Insbesondere Schwermetalle ohne bekannte physiologische Funktion wie Blei und Cadmium stören schon in geringen Mengen den Metabolismus^[113, 114]. Biochemisch essentielle Metallionen haben eine höhere Affinität zu sauerstoffhaltigen Liganden und neigen eher zur Ausbildung von ionischen Bindungen^[115], während nicht-essentielle, toxische Metallionen eher kovalent an stickstoff- oder schwefelhaltige Substanzen binden. Ob der Stoffwechsel einer bakteriellen Zelle in Gegenwart von Schwermetallionen aufrechterhalten werden kann, hängt von der Konzentration, den spezifischen Eigenschaften der Metallionen sowie von der Nährstoffverfügbarkeit ab.^[116] In Abhängigkeit von den Umweltbedingungen haben bakterielle Zellen verschiedene Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Metabolismus bei hohen Konzentrationen von Metallionen in ihrer Umgebung entwickelt, so beispielsweise:

- Vor der Aufnahme in die Zelle können freie Metallionen außerhalb durch Freisetzung von Chelatoren ins Medium gebunden werden.^[116]
- Zusätzlich können Metallkationen durch die negative Netto-Ladung der Außenseite an der Zellwand akkumulieren (Biosorption).^[117-119]
- Nach der Aufnahme in die Zelle können Metallionen aktiv aus der Zelle durch spezifische Efflux-Transporter abgegeben werden.^[120]
- Weiterhin kann die Bindung und Detoxifizierung der Metallionen innerhalb der Zelle erfolgen.^[121]

Die Bildung von Sekundärmetaboliten kann ein Teil der eingeleiteten Stressantwort gegen erhöhte Schwermetallkonzentrationen außerhalb der Zelle sein. Eine große Anzahl von Sekundärmetaboliten wie das Antibiotikum Istatin^[122], das Pigment Melanin^[123, 124] und wahrscheinlich ebenfalls Actinorhodin^[70] (**11**) können als Chelatoren wirken. Auch für den A-Faktor (**21**) wurde die Bindung von Cobaltionen postuliert.^[87] Bivalente Metallkationen könnten somit nicht nur mit Sekundärmetaboliten selbst interagieren, sondern auch durch die Beeinflussung der Genregulation einen Effekt auf die Produktion von Antibiotika und Pigmenten haben (Tab. 5).

Tab. 5: Effekte physiologisch aktiver bivalenter Kationen auf den Sekundärmetabolismus verschiedener Streptomycesarten.

Metallion	Sekundärmetabolit	Organismus	Quelle
Cobalt (Co ²⁺)	Coumermycin A1-Produktion stimuliert	<i>S. rishiriensis</i>	[125]
Cobalt (Co ²⁺)	Bildung eines roten Pigments stimuliert	<i>S. griseus</i>	[87]
Kupfer (Cu ²⁺), Zink (Zn ²⁺), Mangan (Mn ²⁺) und Chrom (Cr ²⁺)	Pigmentbildung stimuliert	<i>S. galbus</i>	[126]
Nickel (Ni ²⁺) und Cadmium (Cd ²⁺)	Pigmentbildung gehemmt	<i>S. galbus</i>	[127]
Quecksilber (Hg ²⁺), Cadmium (Cd ²⁺), Kupfer (Cu ²⁺), Nickel (Ni ²⁺) und Blei (Pb ²⁺)	Actinorhodinbiosynthese gehemmt	<i>S. coelicolor</i> A2(3)	[128]
Calcium (Ca ²⁺), Chrom (Cr ²⁺)	Actinorhodinbiosynthese stimuliert	<i>S. coelicolor</i> A2(3)	[128]

Die Induktion des Sekundärmetabolismus durch Metallionen wird als eine Antwort des Organismus auf Stress interpretiert und könnte bei der Suche nach neuen bioaktiven Substanzen nützlich sein. Bislang wurden die Auswirkungen von Schwermetallionen im Medium als induzierende oder verstärkende Faktoren auf die Produktion von bioaktiven Substanzen noch nicht systematisch untersucht.^[109]

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Biomassezuwachs von *Streptomyces coelicolor* unter Metallionenstress

Die Auswirkungen von Metallionenstress als abiotischer Umweltfaktor auf den Sekundärmetabolismus von *S. coelicolor* wurden durch die Zugabe von Metallsalzen in unterschiedlichen Konzentrationen in das Medium getestet.

Tab. 6: Nomenklatur der verschiedenen *Streptomyces coelicolor* Phänotypen.

Abkürzung	Phänotyp
wt	<i>S. coelicolor</i> Wildtyp, SFM-Agar/SFM-Medium
wt+Co ²⁺	<i>S. coelicolor</i> Wildtyp, SFM-Agar/SFM-Medium 200 µg/ml CoSO ₄
rot	<i>S. coelicolor</i> rot pigmentierter Phänotyp, SFM-Agar/SFM-Medium 200 µg/ml CoSO ₄
blau	<i>S. coelicolor</i> blau pigmentierter Phänotyp, SFM-Agar/SFM-Medium 200 µg/ml CoSO ₄

Die Kulturen von *S. coelicolor* wurden auf SFM-Platten mit bivalenten Kationen im Medium bei 28 °C angezogen. Die getesteten Metallsalze waren: CaCl₂, MgCl₂, CoCl₂, CoSO₄, MnCl₂, CuCl₂. Es wurden folgende Konzentrationen (µg/ml) im Medium eingestellt: 20, 40, 100, 200, 400, 1000, 2000, 4000. Unter Cobaltionenstress wurden zwei intensiv pigmentierte Phänotypen beobachtet. Es wurde eine Wachstumsreihe für den wt, den wt+Co²⁺, den roten und blauen Phänotyp (Tab. 6) erstellt um zu ermitteln, ob einer dieser Phänotypen besser an die mit Cobaltionen belastete Umwelt angepasst war. Für die Wachstumsreihe wurde für den wt und den wt+Co²⁺ aus einer Sporenlösung eine Vorkultur in flüssigem SFM-Medium angesetzt. Das Animpfen der Vorkultur für den roten und den blauen Phänotyp erfolgte mit Einzelkolonien der farbigen Phänotypen. Die Vorkulturen wurden 7 d unter Schütteln (200 rpm) bei 28 °C angezogen. Dann wurde 1 ml Kulturlösung entnommen. Das Wasser aus der Probe wurde über Nacht im Trockenschrank bei 80 °C verdampft und der verbleibende Rückstand gewogen. Aus dem ermittelten Gewicht der Vorkultur wurde das Inokulum errechnet, um für alle Kulturen die gleiche Biomasse zum Start der Wachstumsreihe zu gewährleisten. Das entsprechende Volumen Startkultur wurde auf SFM-Agar-Platten beziehungsweise SFM-Agar mit Cobaltionen ausgestrichen, die mit autoklavierten Cellulosemembranen abgedeckt worden waren.^[129] Die Inkubation erfolgte 7 d bei 28 °C. Täglich wurden drei Replikate entnommen. Das Myzel wurde von der Oberfläche des Mediums mit einer Rasierklinge geschabt. Über Nacht wurde das Myzel getrocknet und die verbliebene Biomasse gewogen. Für die statistische Auswertung der Daten wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test genutzt und der α -Fehler durch die FDR (S. 48) korrigiert.

Streptomyces coelicolor unter UV-Stress

Die Durchführung dieses Versuchs sollte klären, ob einer der Phänotypen generell besser an UV-Stress angepasst war als die anderen. Die Versuchsbedingungen waren analog zur Wachstumsreihe.

Die verschiedenen Phänotypen wurden auf SFM-Agar ohne Metallionenzusatz ausgestrichen. Zusätzlich wurde die Biomasse von je drei Replikaten eines Phänotyps auf SFM-Agar untersucht, die nach dem Animpfen 10 min UV-Strahlung (30 Watt, 254 nm) ausgesetzt wurden. In diesem Versuch wurde keinem Phänotyp CoSO₄ in das Medium zugesetzt. Diese Daten wurden ebenfalls mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet und der α -Fehler durch die FDR korrigiert.

4.2.2 Analyse des Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

GC-MS-Analyse der flüchtigen Verbindungen von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Streptomyces coelicolor produziert während seiner Kultivierung einen typischen Duft. Die Analyse des Dufts der mit Cobalt behandelten Kulturen und der Vergleich mit dem Wildtyp von *S. coelicolor* zeigte Unterschiede bei der Freisetzung von flüchtigen Sekundärmetaboliten zwischen den einzelnen Phänotypen auf.

Zuerst wurden die flüchtigen Verbindungen über 16 h mit der *closed-loop stripping*-Methode^[130] gesammelt. Kolben mit je 200 ml Flüssigkulturen jedes Phänotyps wurden an Umwälzpumpen angeschlossen. Die Duftsammlung erfolgt durch die Umwälzung der Luft über einen Aktivkohlefilter (1,5 mg Aktivkohle, CLSA-Filter), auf dem sich die flüchtigen Verbindungen anreicherten. Die Aktivkohlefilter wurden mit Pentan (3 x 20µl) eluiert und die Proben im GC-MS analysiert. Die Duftprofile der verschiedenen Phänotypen, die mit dieser Methode erstellt wurden, waren unzureichend reproduzierbar.

Daher wurden die flüchtigen Verbindungen, die von festen Kulturen des wt, wt+Co²⁺, dem roten und blauen Phänotyp emittiert wurden, alternativ mittels Festphasenmikroextraktion (*solid phase micro extraction* – SPME) aus der Gasphase über dem Myzel auf dem Absorbenz einer SPME-Faser (Abb. 20) angereichert.

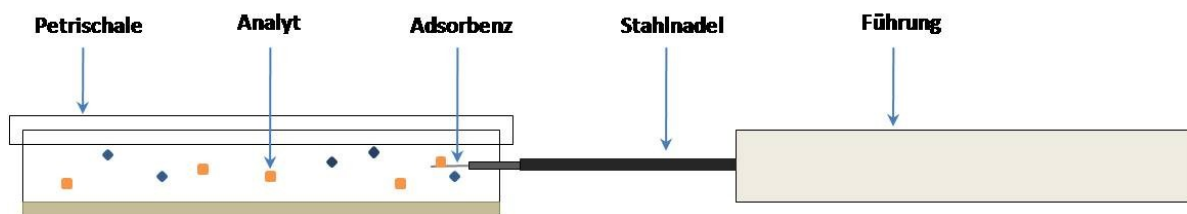


Abb. 20: Schematische Darstellung der Funktion einer SPME-Faser.

Nachdem das Myzel 7 d auf SFM-Agar über Cellulosemembranen kultiviert worden war, wurde es mit einer Rasierklinge von der Oberfläche gekratzt und von allen Kulturen 0,4 g Biomasse abgewogen. Die von den Kulturen emittierten flüchtigen Verbindungen wurden mit SPME für 30 min gesammelt und mit GC-MS auf einer Zebron-Säule (Vorsäule 10 m, 15 m, 0,25 mm, 0,25 µm) bei einem Heliumfluss von 1,5 ml/min und einem Split von 10 ml/min mit folgendem Programm analysiert: 50 °C (0 - 2 min), 50 bis 200 °C (2 - 25 min), 200 bis 280 °C (25 - 30 min), 280 °C (30 - 33 min). Die Identifikation der analysierten flüchtigen Verbindungen erfolgte durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen.

Herstellung der rekombinaten Isozizaenzyklase aus *Streptomyces coelicolor*

Die Identifikation einer Verbindung aus dem Duft von *S. coelicolor* erforderte die Herstellung eines Standards für diese Substanz. Dazu wurde das Gen der Isozizaenzyklase aus *S. coelicolor* in *E. coli* nach der Publikation Lin *et al.*, 2007^[131] kloniert und exprimiert (Abb. 21). Die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

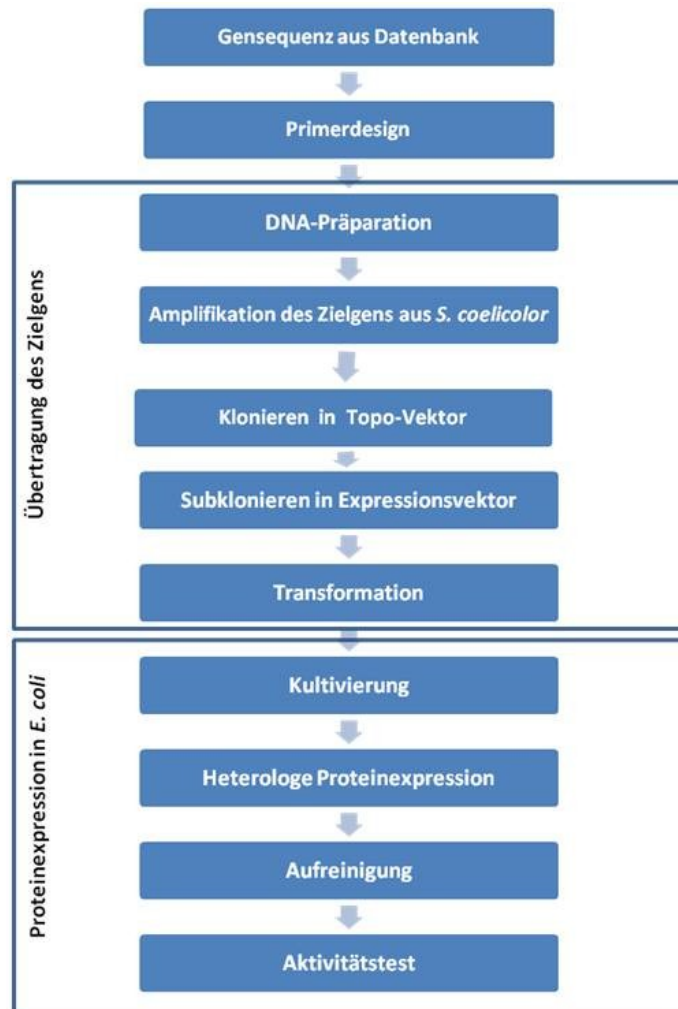


Abb. 21: Schematische Darstellung der Einzelschritte zur heterologen Expression des Isozizaenzyklase aus *Streptomyces coelicolor*.

Um die Isozizaenzyklase aus *S. coelicolor* heterolog exprimieren zu können, wurde die genomische DNA aus *S. coelicolor* extrahiert. Hierzu wurde *S. coelicolor* sieben Tage bei 28 °C im flüssigen SFM-Medium unter kräftigem Schütteln (200 rpm) kultiviert.

Das Myzel wurde durch Zentrifugation für 10 min mit 3800 x g abgetrennt. Das so erhaltene Pellet wurde in 30 ml STE B und 600 µl EDTA-Lösung durch intensives Mischen resuspendiert. Die Zellen wurden durch den enzymatischen Verdau der Zellwand bei 37 °C für 1 h mit 1200 µl Lysozymbilösung aufgeschlossen. Anschließend wurden 12 ml SDS-Lösung dem Gemisch zugesetzt und für eine Stunde bei 55 °C inkubiert. Danach wurden 12 ml NaCl-Lösung zugegeben und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach diesem Schritt folgte die Zugabe von 30 ml Chloroform. Die Phasen wurden durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit dem gleichen

Volumen Isopropanol zum Ausfällen der DNA aus der Lösung versetzt. Die Flüssigkeiten im Röhrchen wurden durch wiederholtes Invertieren gemischt. Die gefällte DNA wurde mit einem Glashaken aufgewickelt und aus der Lösung entfernt. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde die so isolierte DNA zweimal mit je 1 ml Ethanol und anschließend mit 1 ml Wasser gewaschen. Die erhaltene DNA wurde über Nacht in 2 ml Wasser bei 4 °C gelöst. Die Konzentration und Reinheit der Präparation wurden am Biophotometer bestimmt.

Das Gen der Isozizaenzyklase (SCO5222) wurde mit genspezifischen Primern (Tab. 7) in einer PCR-Reaktion (Tab. 8, Tab. 9) aus der genomischen DNA von *S. coelicolor* vervielfältigt.

Tab. 7: Primersequenzen mit farbig unterlegten Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI* (grün) und *NdeI* (orange).

Name des Primers	Sequenz
Terp2007_for	5'-GGT CAT ATG GTG CAT GCT TTC CCA CAC GGC-3'
Terp2007_rev	5'-CGG ACT CTC GAG TCA TTT CTC ACC TGC CGC TTC 3'

Tab. 8: PCR-Ansatz mit *HotStar HiFidelity Kit*.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (µl)
<i>HotStar HiFidelity</i> PCR Puffer	5
Q-Solution	10
Primer 1 (100 µM)	1
Primer2 (100 µM)	1
DNA	1
MgSO ₄ (25 µM)	3
<i>HotStar HiFidelity</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)	0,5
Wasser	28,5

Tab. 9: PCR-Programm zur Amplifikation von SCO5222.

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1	95	10
2	95	1
3	61	1
4	72	1,4
5	35 mal Schritt 2 bis 4 wiederholen	
6	72	10

Der Erfolg der Reaktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das PCR-Produkt wurde aus dem 1%igem Agarosegel aufgereinigt und in den pCR 2.1 Topo Vektor ligiert. Dieser Vektor wurde nach den Angaben des Herstellers in Top10 *E. coli*-Zellen kloniert. Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten, konnten aufgrund ihrer Kanamycinresistenz und zusätzlich durch Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden. Aus den entsprechenden Klonen wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem *GeneJet* Plasmid Miniprep *Kit* das Plasmid isoliert. Das isolierte Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen bei 37 °C über Nacht verdaut, um zu überprüfen, ob das erwünschte PCR-Produkt im Vektor enthalten war (Tab. 10).

Tab. 10: Doppelverdau mit *Xho*I und *Nde*I.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (µl)
BSA	0,5
Puffer 2	5
<i>Xho</i> I (20 U/µl)	1
<i>Nde</i> I (20 U/µl)	1
Plasmid (20 ng/µl)	25
Wasser	17,5

Der Erfolg der Reaktion wurde auf einem Agarose-Gel überprüft. Das aus dem Vektor geschnittene Fragment mit entsprechender Größe wurde aus dem Gel gereinigt und bei 16 °C innerhalb einer einstündigen Inkubation in den Expressionsvektor pET28a ligiert (Tab. 11). Der Vektor wurde zuvor unter den gleichen Bedingungen wie das Fragment geschnitten.

Tab. 11: Ligationsansatz mit T4-Ligase.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (µl)
ATP-Lösung	2
Ligationspuffer	2
Plasmid (5 ng/µl)	5
Insert (5 ng/µl)	5
T4-Ligase	1
Wasser	5

Das Plasmid aus dem Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* Rosetta 2 Zellen transformiert. Die kompetenten Zellen wurden nach dem Protokoll aus „The QIAexpressionist“^[132] vorbereitet.

Nach Aufnahme des Plasmids wurden die Zellen anhand ihrer Kanamycinresistenz selektiert. Die Sequenz der Isozyklase wurde durch Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) überprüft.

Anhand der Ergebnisse aus der Sequenzierung wurde ein Klon ausgewählt. Die heterologe Proteinproduktion erfolgte nach Lin *et al.*, 2007^[131]. Die Funktion des rekombinanten Proteins wurde durch den Aktivitätstest mit einem bakteriellen Rohextrakt überprüft.

Für einen Rohextrakt wurden 200 ml bakterielle Zellkultur bei 10000 x g für 10 min abzentrifugiert und in 40 ml „reaction mix“ resuspendiert, mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zellfragmente bei 4 °C für 30 min mit 12000 x g durch Zentrifugation abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde direkt im Aktivitätstest (Tab. 12) eingesetzt. Die flüchtigen Produkte des Aktivitätstests wurden mit SPME 90 min bei 30 °C gesammelt und unter den gleichen Bedingungen wie die Duftproben der bakteriellen Kulturen mittels GC-MS analysiert.

Tab. 12: Aktivitätstest mit bakteriellem Rohextrakt.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (µl)
bakterieller Rohextrakt	1000
DTT	6,25
FPP	21,6

Das funktionale Protein wurde nach erfolgreichem Nachweis von Isozizaen (37) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min vom Medium abgetrennt und mittels Ultraschall im Lysispuffer aufgeschlossen. Die Zellfragmente wurden bei 4 °C für 30 min mit 12000 x g abzentifugiert und der Überstand auf eine Ni-NTA Säule geladen. Die Säule wurde im Anschluss zweimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit dem Elutionspuffer von der Säule gelöst. Abschließend wurde der Elutionspuffer durch Ultrafiltration ausgetauscht und das Protein im Probenpuffer aufgenommen. Die Aufreinigung wurde auf einem Polyacrylamidgel (Tab. 13, Tab. 14, Abb. 97) durch Gelelektrophorese überprüft. Für die elektrophoretische Trennung auf dem 10 % SDS Polyacrylamidgel wurden die Proben 5 min bei 95 °C erhitzt und dann mit einem Proteinmarker auf das Gel geladen. Die Trennung erfolgte bei 120 V in 120 min. Die Proteine mit Biosafe Coomassie angefärbt (Abb. 97).

Tab. 13: Zusammensetzung des Trenngels für SDS-Page.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (ml)
PAM 40	1,25
Trenngelpuffer	1,25
H ₂ O	2,5
TEMED	0,005
APS	0,05

Tab. 14: Zusammensetzung des Sammelgels für SDS-Page.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (ml)
PAM 40	0,25
Sammelgelpuffer	0,625
H ₂ O	1,625
TEMED	0,0025
APS	0,025

Die Funktion des rekombinaten Enzyms wurde durch die Umsetzung des Substrats FPP zu Isozizaen (37) (Tab. 15, Tab. 12) überprüft.

Tab. 15: Aktivitätstest mit gereinigtem Protein.

Bestandteil	Eingesetztes Volumen (µl)
„reaction mix“	193,35
Proteinlösung (0,8 mg/ml)	50
DTT	1
FPP	5,4

Die flüchtigen Produkte aus beiden Aktivitätstests wurden mit SPME 90 min bei 30 °C gesammelt und unter den gleichen Bedingungen wie die Duftproben der bakteriellen Kulturen mittels GC-MS analysiert (S. 34).

Die Auswertung der Gaschromatogramme des Rohextrakts aus *E. coli* Rosetta 2/SCO5222 des gereinigten Enzyms (Abb. 22, Abb. 76, Abb. 77) zeigten ein Hauptprodukt 20.

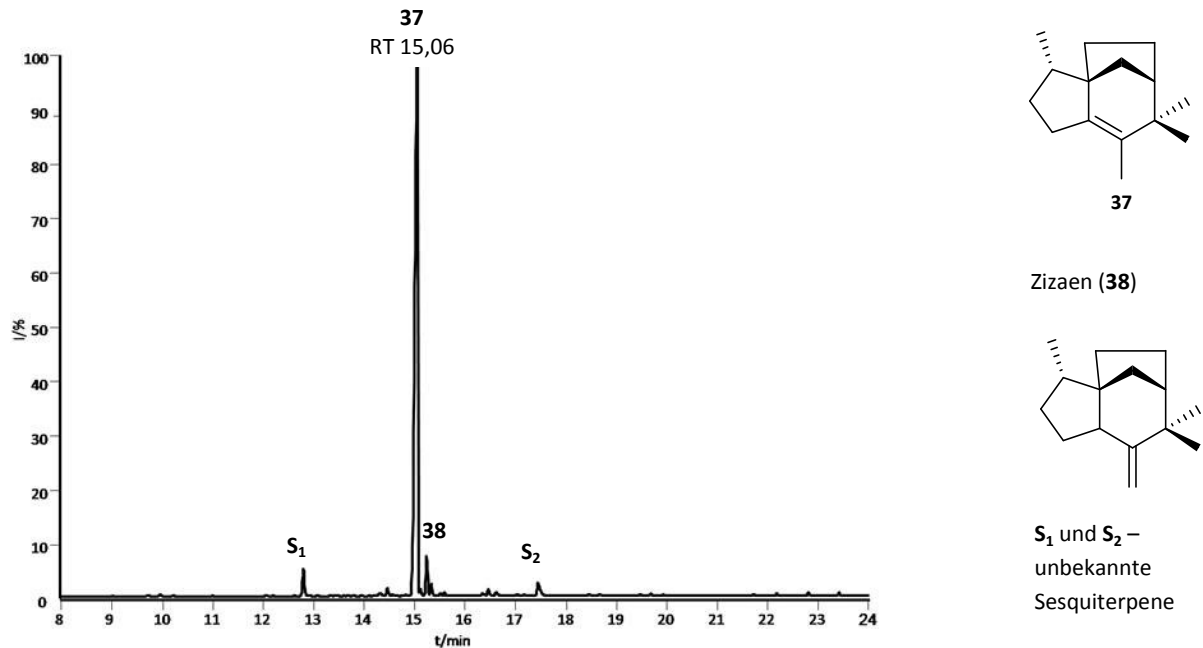


Abb. 22: Gaschromatogramm der flüchtigen Produkte des gereinigten rekombinaten Enzyms SCO5222.

Das Hauptprodukt konnte anhand seiner typischen Fragmentationen im MS (Abb. 77, Abb. 76) als Isozaen (37) identifiziert werden und als eine Komponente des Dufts von *S. coelicolor* bestätigt werden.

HPLC-Analyse des Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor* unter Cobaltionenstress

Das Metabolitenprofil der verschiedenen pigmentierten Phänotypen wurde durch Extraktion der Kulturen und anschließender Flüssigphasenchromatographie weiter charakterisiert.

Extraktion mit Ethylacetat

Drei Flüssigkulturen (200 ml) jedes Phänotyps in SFM-Medium wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen und das Lösungsmittel verdampft. Der verbliebene Rückstand wurde in 4 ml Methanol aufgenommen.

Die Trennung des Stoffgemischs im Extrakt erfolgte durch HPLC (*high performance liquid chromatography* – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und die Bestimmung der Molmassen der einzelnen Verbindungen durch Massenspektrometrie. Die Trennung der Substanzen wurde auf einer Synergi Polar RP 80A–HPLC-Säule (250 x 2 mm) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Wasser (A, 0,5 % Essigsäure) und Acetonitril (B, 0,5 % Essigsäure) verwendet. Bei einem konstanten Fluss von 0,2 ml/min wurden die Proben bei folgendem Gradienten analysiert: 100 % A (0 - 3 min), 100 % A auf 100% B (3 - 30 min), 100 % B (30 - 45 min), 100 % B auf 100 % A (45 - 47 min), 100 % A (47 - 52 min). Die Detektion der verschiedenen Substanzen erfolgte durch ESI⁺-MS (full scan) und UV/VIS-Messung an einem DAD.

Die Konzentration der extrahierten Substanzen in den Kulturlösungen wurde über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet:

Abs = gemessene Lichtabsorption (Undecylprodigiosin bei 530 nm = 435000 μ AU, Actinorhodin (**11**) bei 542nm = 1000000 μ AU)

ϵ = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ (Undecylprodigiosin (**6**) ϵ_{530} = 100500^[133], Actinorhodin (**11**) ϵ_{530} = 18600)^[134]

c = Konzentration der Verbindung

d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (1 cm)

Ausfällen von Actinorhodin (11)

Die Anreicherung von Actinorhodin (**11**) aus je 200 ml Flüssigkultur jedes Phänotyps erfolgte wie beschrieben durch die Ausfällung des Pigments.^[135] Der getrocknete Rückstand wurde in 4 ml Wasser gelöst. Es folgte die Trennung der gefällten Bestandteile durch HPLC auf einer Phenomenex Gemini C18-HPLC-Säule (250 x 2 mm) mit einem Lösungsmittelgemisch Wasser (A, 0,5 % Essigsäure) und Acetonitril (B, 0,5 % Essigsäure) bei einem konstanten Fluss von 0,2 ml/min mit folgendem Gradienten: 100% A (0 - 3 min), 100 % A auf 100 % B (3 - 17 min), 100 % B (27 - 52 min), 100 % B auf 100 % A (52 - 53 min), 100 % A (53 - 58 min). Die Bestimmung der Molmassen der einzelnen Verbindungen erfolgt durch ESI-MS und zusätzlich wurde das UV-Signal bei 530 nm aufgezeichnet.

Mit hochauflösender Massenspektrometrie (*high resolution mass spectrometry* – HR-MS) ist die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung von Molekül- und Fragmentpeaks möglich. Die Proben wurden zur Analyse an Prof. Michael Spiteller an das Institut für Umweltforschung der Universität Dortmund gesandt. Die Ergebnisse der Messungen wurden verwendet, um anhand der berechneten Summenformeln im *ISI Web of knowledge* und im *Dictionary of natural products*^[136] nach bekannten Verbindungen aus Streptomyceten zu suchen.

Transkriptomanalyse von *Streptomyces coelicolor*-Kulturen unter Cobaltionenstress mit DNA-microarray

Der Schwermetallionenstress induzierte die Biosynthese einer Reihe von Verbindungen, die nicht durch die GC-MS oder HPLC-MS-Analyse des Metabolitenprofils charakterisiert werden konnten. Daher konnte die Induktion von Stoffwechselwegen durch Metallionenstress in *S. coelicolor* mit Hilfe eines *microarrays* beurteilt werden. Mit einem DNA-*microarray*-Chip, der alle Gene von *S. coelicolor* abdeckt, war es möglich, das Expressionsniveau jedes Gens in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress zu bestimmen. Damit konnten auf die Reaktion von *S. coelicolor* auf Metallionenstress und die nachfolgende Induktion der Biosynthese potentiell bioaktiver Verbindungen geschlossen werden.

Der *microarray* ist eine Anordnung von synthetischen DNA-Molekülen auf einem Objektträger aus Glas. Diese fixierten DNA-Moleküle werden als Sonden zur Bindung von komplementärer, fluoreszenzmarkierter Nukleinsäure aus der Probenlösung benutzt. Das Intensitätssignal des Fluoreszenzfarbstoffs ist proportional zur Menge der gebunden, markierten Nukleinsäure und kann daher als Indikator für das Expressionsniveau des Gens verwendet werden. Die Veränderung der Genexpression durch die Einwirkung von Co^{2+} -Ionen kann durch den Unterschied zwischen den Fluoreszenzsignalen der Probe des wt und der Probe des gestressten Phänotyps bestimmt werden.

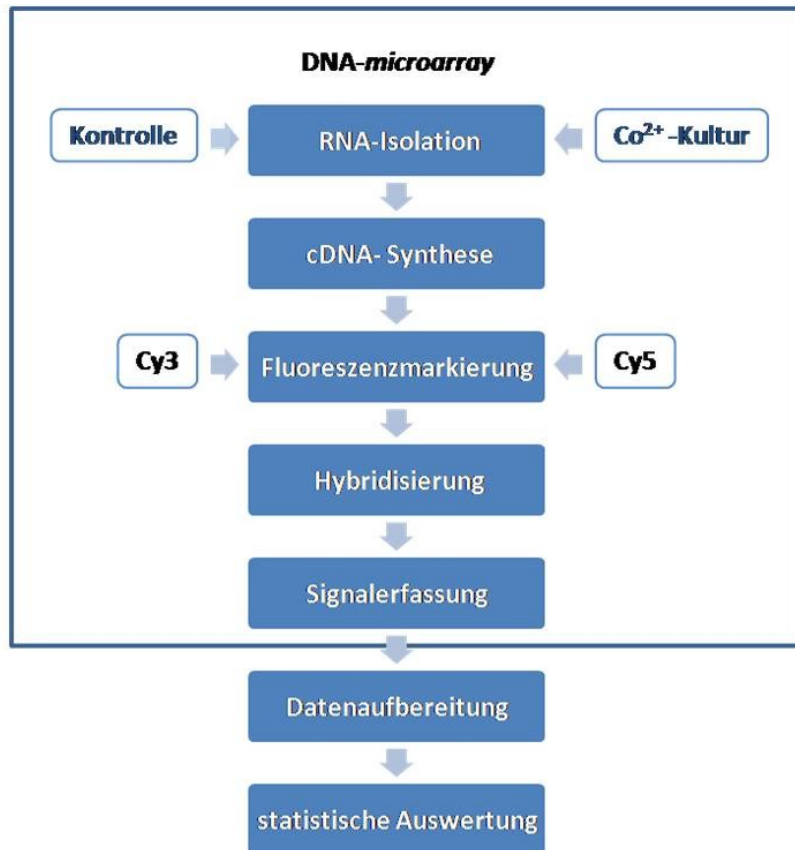


Abb. 23: Schema mit Einzelschritten der Genexpressionsanalyse mit *microarray*.

Die gespotteten PCR-*S. coelicolor*-*microarrays* mit einer UltraGaps Oberfläche (Aminosilan), das Hybridisierungsprotokoll und die *grid maps* stammten von der *Streptomyces coelicolor microarray resource* (University of Surrey, Guildford, UK).

Dieser *microarray* deckt die meisten *S. coelicolor* ORFs (*open reading frames*) und die Gene des Plasmids SCP1 durch 150-500 bp lange PCR-Amplifikationsproduktion ab (Tab. 16). Es wurden mit Hilfe der PCR-Technik DNA-Sonden für die meisten ORFs hergestellt, die im Genomsequenzierungsprogramm des *Sanger Centers* vorhergesagt worden sind. Für Pseudogene, Transposons und Insertionselemente wurden keine Sonden entwickelt. Alle Sonden wurden in zweifacher Ausführung auf dem Chip fixiert, beide Replikate waren im gleichen Block (*subgrid*) angeordnet.

Tab. 16: Sonden des *microarray*-Chips.

Sonde für Gen	Chromosom	SCP1	gesamt
einzigartig	6997	180	7177
nicht einzigartig*	86	74	160
alternativ**	52	69	121
fehlend	690	33	723
zusammen	7825	356	8181

* = Sequenz der Sonden bindet cDNAs mehrerer Gene

** = Sequenz der Sonde bindet cDNA eines anderen Gens

Die Anordnung der Sonden auf dem Glasträger erfolgte in 48 Blocks mit je 342 Sonden (Abb. 24).

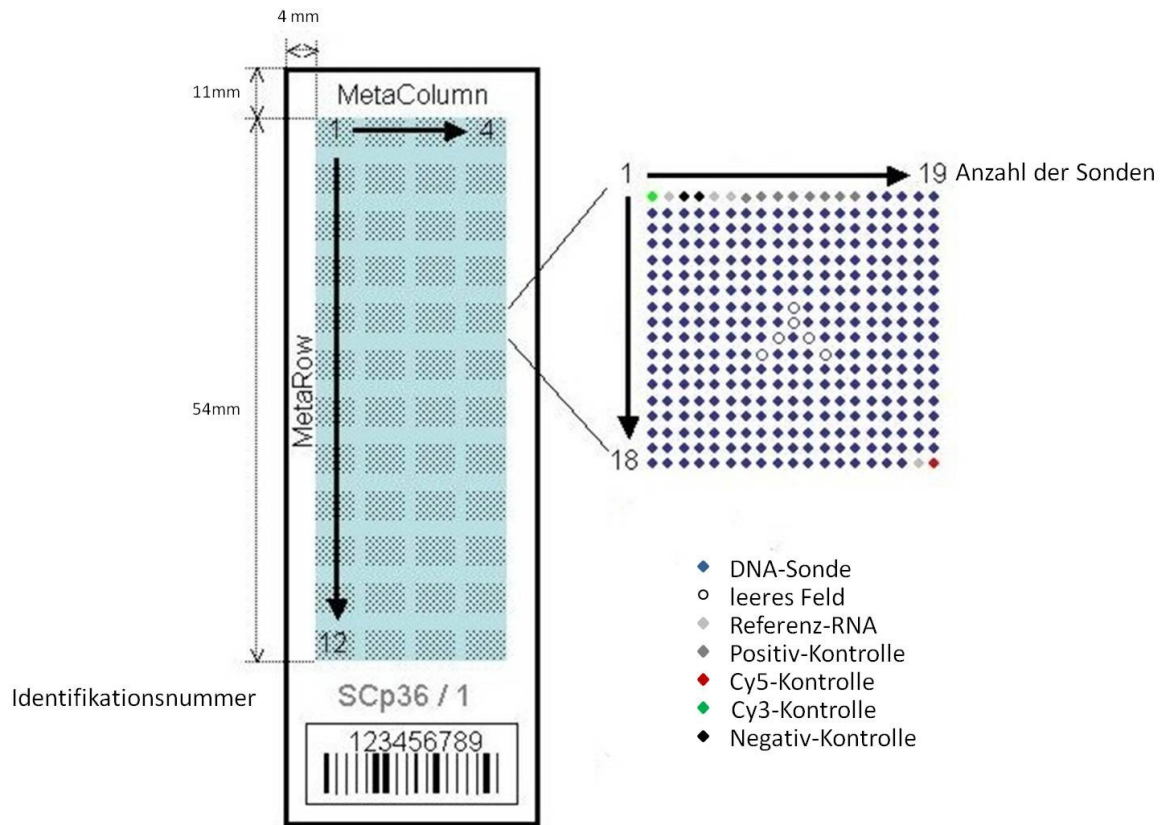


Abb. 24: Schematische Darstellung des verwendeten PCR-Produkt-microarray mit blockweiser Anordnung der Sonden auf dem Chip und Überblick über die Zusammensetzung eines Blocks, © The University of Surrey.

Für die Einführung der Fluoreszenzmarkierung **21** wurden die Farbstoffe Cy3 und Cy5 verwendet. Das grundlegende Prinzip dieser Markierungsmethode ist die dreiteilige Zusammensetzung des Markierungsreagenzes (Abb. 25): der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 oder Cy5 (grün); das Verbindungsstück (orange), welches elektrostatische Wechselwirkungen zur cDNA vermittelt; die reaktive Alkylgruppe (blau) bindet das Markierungsreagenz kovalent über jegliches reaktive Heteroatom innerhalb der cDNA.

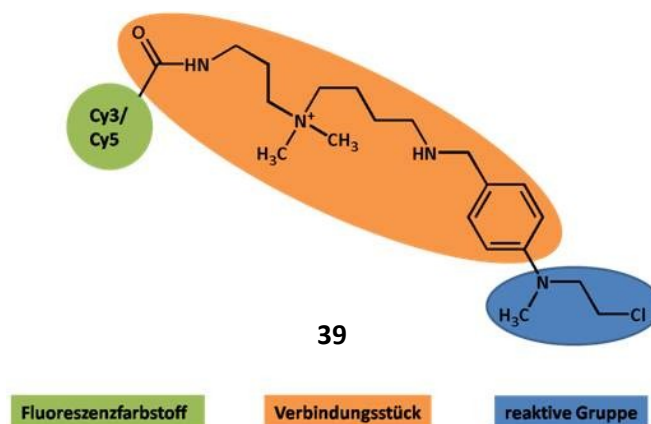


Abb. 25: Chemische Struktur des Cy3/Cy5 Markierungsreagenzes (39).

Die differentielle Expression eines Gens wird auf dem Genchip durch das Verhältnis der Fluoreszenzfarbstoffe aus den Proben dargestellt. Das Expressionsmuster des i-ten Gens auf dem *microarray*-Chip wird als das Verhältnis (V) des Kanals A (Referenz) durch den Kanal B (Behandlung) beschrieben.

$$V_i = \frac{A_i}{B_i}$$

V = Verhältnis Fluoreszenzsignale aus den Proben

A = Probe mit Cy3 Markierung

B = Probe mit Cy5 Markierung

Zur symmetrischen Darstellung der Expressionsverhältnisse wird die \log_2 -Transformation des ermittelten Werts eingeführt.^[137] Wichtig bei der Planung eines *microarray*-Experiments ist die Festlegung des experimentellen Designs. Da in dieser Arbeit die Unterschiede im Metabolitenprofil zwischen *S. coelicolor* unter Standardbedingungen und *S. coelicolor*-Kulturen, die unter Umweltstress gewachsen waren, im Vordergrund steht, wurde das „Referenz-Design“ ausgewählt. Die gemeinsame Referenz wt wurde mit einem der Cy-Farbstoffe markiert, die mit Cobaltionen behandelte Probe mit dem anderen. Im *microarray*-Versuch wurde der wt *S. coelicolor* als gemeinsame Referenz gegen alle cobalthaltigen Kulturen hybridisiert (Abb. 26). Die gemeinsame Referenz erlaubt den Vergleich aller Experimente miteinander. Jeder Versuchsteil wurde in vier Replikaten durchgeführt.

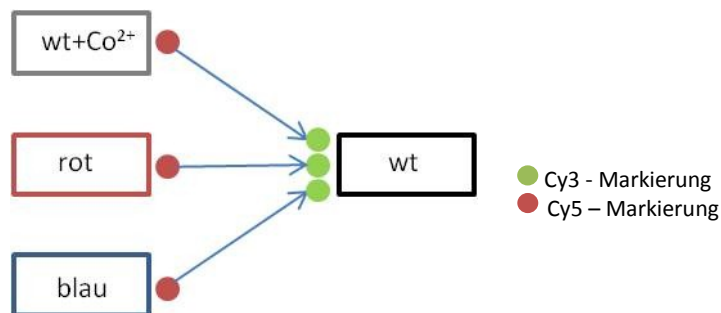


Abb. 26: Versuchsaufbau *microarray*-Experiment mit einer gemeinsamen Referenz für alle Co^{2+} -behandelten Kulturen zum Vergleich der Genexpression.

Um den Effekten entgegenzuwirken, dass die Einbauraten der Cy-Farbstoffe unterschiedlich sein können oder bestimmte Gene vorrangig mit einem Farbstoff markiert werden^[137], wurde die Kombination der Cy-Markierungen für die Hälfte der Replikate getauscht (*dye swap*, Abb. 27). Aufgrund der höheren Einbaurate des einen Farbstoffs könnte das Expressionsverhältnis der Proben signifikant von Eins verschieden sein, obwohl diesen Abweichungen kein biologischer Effekt, sondern ein systematischer Fehler zugrunde liegt. Da für zwei identische Proben zu erwarten ist:

$$V_{1i} = \frac{A_{1i}}{B_{1i}} \text{ und } V_{2i} = \frac{B_{2i}}{A_{2i}}$$

$$V_{1i} * V_{2i} = \left(\frac{A_{1i}}{B_{1i}} * \frac{B_{2i}}{A_{2i}} \right) = 1$$

V = Verhältnis der Intensität

A = Probe mit Cy3-Markierung

B = Probe mit Cy5-Markierung

ergibt sich dieser Versuchsaufbau:

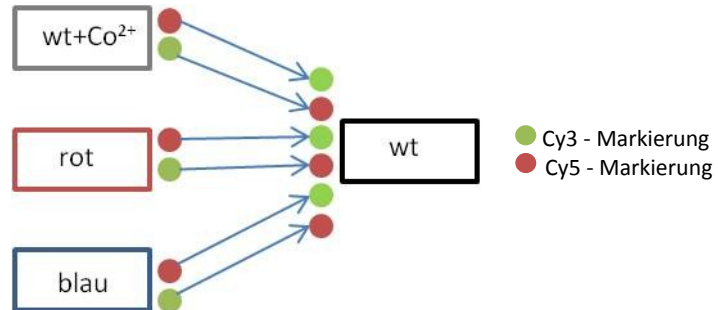


Abb. 27: Versuchsaufbau *microarray*-Experiment mit einer gemeinsamen Referenz für alle Co²⁺-behandelten Kulturen und *dye swap*.

Für die Beurteilung der Induktion von Genen durch den Co²⁺-Ionenstress in *S. coelicolor* wurde RNA aller verschiedener Phänotypen isoliert. Die Gesamt-RNA diente als Vorlage zur Synthese von fluoreszenzmarkierter cDNA, die an die Sonden des Genchips gebunden wird.

Nach 7 d Inkubation wurde das Myzel von der Oberfläche der Cellulosemembranen der Agar-Platten mit einer Rasierklinge abgeschabt und mit 2-3 ml *RNAprotect bacteria reagent*-Lösung von der Oberfläche heruntergespült. Für jeden Phänotyp wurde die Biomasse von fünf Agar-Platten vereinigt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurde die *RNAprotect bacteria reagent*-Lösung bei 3800 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Mörsern des Myzels unter flüssigem Stickstoff.^[138] Das pulverisierte Myzel wurde dann mit 2 ml Trizol versetzt und gründlich vermischt. Im Anschluss erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden 600 µl Chloroform zugegeben und die Mischung für 20 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben 15 min bei 4 °C mit 16000 x g zentrifugiert, um nach der Phasentrennung die wässrige Phase abzunehmen. Diese Lösung wurde mit 1,2 ml Isopropanol vermischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Die denaturierten Nukleinsäuren wurden bei 4 °C mit 16000 x g abzentrifugiert. Der Überstand aus der Probe wurde verworfen und das Pellet mit 1,6 ml 80%igem Ethanol gewaschen. Die Ethanollösung wurde durch Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min abgetrennt und verworfen. Der Lösungsrückstand wurde durch kurzes Zentrifugieren gesammelt und abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet und zur weiteren Reinigung der RNA mit dem *RNeasy Midi Kit* aufgearbeitet. Dazu war es allerdings nötig, die Aufreinigungsschritte des *kits* zu modifizieren: Erst nach dem Einsatz der dreifachen Puffermenge konnte die erhaltene RNA erfolgreich in der cDNA-Synthese eingesetzt werden. Zusätzlich zum empfohlenen Protokoll wurde ein DNA-Verdau mit dem *RNAse free DNase Set* durchgeführt. Die Quantifizierung der erhaltenen RNA erfolgte spektrometrisch am NanoDrop-UV/VIS-Spektrometer. Die Reinheit der isolierten RNA konnte über das Absorptionsverhältnis bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt werden. Reine Proben wiesen ein Wert um 2 auf.

Da cDNA robuster ist als RNA, wurde die isolierte RNA durch reverse Transkription in cDNA umgesetzt. Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte nach dem Hybridisierungsprotokoll der *Streptomyces coelicolor microarray resource*. Da die Markierung erst in einem nachfolgenden Schritt erfolgte, wurden die Farbstoffe Cy3-dCTP und Cy5-dCTP im cDNA-Synthese-Ansatz durch Wasser

ersetzt. Um die beiden Proben in einem Versuch differenzieren zu können, wurde die Markierung nach dem Protokoll aus dem *LabelIT* μ Array Cy3/Cy5 *Labeling Kit* in die cDNA eingebracht.

Die markierte cDNA musste im Anschluss nach den Angaben im Hybridisierungsprotokoll der *Streptomyces coelicolor microarray resource* von nicht gebundenem Farbstoff befreit werden. Der Aufreinigungsgrad der Proben nach der Passage der Silikasäule aus dem empfohlenen MinElute PCR *Purification Kit* war für die Verwendung der Proben in der Hybridisierung nicht ausreichend, daher wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt über Microspin G-50 Säulen in das Protokoll eingefügt. Die Markierungsdichte der cDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde am NanoDrop-UV/VIS-Spektrometer bestimmt. Die markierten Proben wurden vereinigt und bei -80 °C bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Bei der Hybridisierung banden die markierten cDNAs der Probe an die fixierten Sonden auf dem Genchip. Vor der Hybridisierung wurden die Proben des wt+Co²⁺, des roten und des blauen Phänotyps mit einer komplementär markierten Probe des wt gemischt. Die Vorbehandlung des *microarray*-Glasträgers und die anschließenden Waschschriffe erfolgten nach den Angaben des Pronto! *Hybridization Kits*. Die Hybridisierung wurde, wie im Hybridisierungsprotokoll der *Streptomyces coelicolor microarray resource* beschrieben, 20 h bei 42 °C in einer Hybridisierungskammer mit automatischer Probendurchmischung durchgeführt. Allerdings wurde anstelle der Pronto! cDNA/LongOligo Hybridisierungslösung der Hybridisierungspuffer aus dem *Gene Expression Hybridisation Kit* benutzt. Weiterhin wurde nur die Hälfte der im Protokoll empfohlenen Menge cDNA eingesetzt. Die Waschschriffe nach der Hybridisierung erfolgten wieder gemäß dem Protokoll der *Streptomyces coelicolor microarray resource*.

Erstellung der Transkriptomdaten von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Die Datenerfassung von den hybridisierten Glasträgern erfolgte durch Scannen der aktiven Oberfläche. Die Daten wurden in einer TIFF-Datei gespeichert. Im folgenden Schritt wurden die Fluoreszenzsignale aus der Bilddatei den Sonden zugeordnet. *Streptomyces coelicolor microarray resource* stellt dazu eine Datei (*grid map*) zur Verfügung, in der die Position und die Annotation jeder Sonde gespeichert sind.

Die Signalerfassung aus der TIFF-Datei wurde mit dem Programm TIGR Spotfinder (MEV Software Paket) durchgeführt. Zur Extraktion der Daten wurden die TIFF-Dateien der einzelnen *microarrays* in die TIGR-Software geladen und mit der *grid map* (GAL-Datei) überlagert. Die Lage der *grid map* wurde manuell optimal an den jeweiligen Scan angepasst. Die Signalerfassung und die Ermittlung der Expressionsverhältnisse erfolgten automatisch im TIGR Spotfinder.

Der relative Fehler ist bei der Erfassung von Fluoreszenzsignalen, die sich kaum vom Hintergrund abheben, höher als bei Signalen mit hoher Intensität.^[137] Die Sonden mit einem zu geringen Intensitätsunterschied zum Hintergrund wurden von der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen, wenn folgende Bedingungen nicht erfüllt waren:

$$A_i^{spot} > 2 * \sigma(A_i^{Hintergrund}) \text{ und } B_i^{spot} > 2 * \sigma(B_i^{Hintergrund})$$

A = Probe mit Cy3-Markierung

B = Probe mit Cy5-Markierung

σ = Standardabweichung vom Hintergrund

Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte in *tab delimited* MEV-Dateien.

Für die weitere Analyse war die Zuordnung der Genannotation zu den einzelnen Sonden auf dem *microarray* erforderlich. Die Annotation der einzelnen Datenpunkte konnte nicht aus der von der *Streptomyces coelicolor microarray resource* frei zur Verfügung gestellten GAL-Dateien entnommen werden, da diese die Strukturanforderungen des MEV *software* Pakets nicht erfüllte. Es war nötig, eine separate Annotationsdatei zu erstellen. Für die Zuordnung der Genannotation wurde jeder Sonde auf dem *microarray* in der MEV-Datei in der ersten Spalte der Datei eine Nummer (UID – *unique identifier*) zugeteilt. In der Annotationsdatei wurde diese Nummer mit der Position der Sonde auf dem *microarray* sowie der Genannotation verknüpft. Die Genannotation einer Sonde war die Nummer ihres ORFs im *S. coelicolor*-Sequenzierungsprojekt. Alle redundanten Genannotationen (leere Felder, Cy3-/Cy5-Kontrolle, Referenz-RNA, Negativ-Kontrolle, Positiv-Kontrolle) wurden aus den Dateien entfernt und waren damit aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen.

Die Normalisierung der Daten und der Vergleich der Replikate einer Probe auf einem Objektträger wurde im Programm Ginkgo ausgeführt, wofür die MEV-Dateien aus dem TIGR Spotfinder und die Annotationsdatei in die Ginkgo Software geladen wurden. Die lokale Normalisierung wurde angewendet, da dieser Algorithmus systematische räumliche Unterschiede wie z. B. ungleiche Farbstoffkonzentration in den Proben oder lokale Hybridisierungsunterschiede auf dem Genchip ausgleicht. Die *lowess*-Normalisierung berichtigt diese systematischen Abweichungen durch die lokal gewichtete lineare Regression.^[137] Die Normalisierung erfolgt nach *lowess* (*locally weighted linear regression*) mit dem *smoothing parameter* 0,33 im *block mode* für beide Fluoreszenzfarbstoffe.

Exemplarisch für alle normalisierten Datensätze wird im Folgenden ein Replikat aus dem Telexperiment wt/rot vorgestellt: Die gemessene Intensität (I) des Referenzkanals repräsentiert die mit Cy3-markierte Probe (A). Dementsprechend wird die gemessene Intensität (I) der mit Cy5-markierten Probe (B) zugeordnet. Die graphische Darstellung der gemessenen Intensität erlaubt eine erste Beurteilung der Daten. Der RI-Plot der Daten ist eine Auftragung der Intensitätsverhältnisse gegen die relative Intensität einer Sonde auf dem *microarray*-Chip. Je weiter rechts auf der x-Skala die Punkte in der Abbildung liegen, umso höher war ihre gemessene Intensität. Je weiter sie von der 0-Linie auf der y-Achse abweichen, desto höher war die Differenz zwischen den gemessenen Intensitäten der beiden Kanäle für eine Sonde. Jeder Punkt in der folgenden Abbildung stimmt mit einer Sonde des *microarray*-Chips überein. Die Position auf der x-Achse entspricht dem Verhältnis der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, während die Verteilung auf der y-Achse der Signalstärke entspricht. Für alle Messpunkte, deren Position auf der x-Achse gleich null ist, wurde keine Veränderung in der Genexpression nachgewiesen. Für die meisten betrachteten Gene in einem *microarray*-Experiment ist das der Fall. Die Datenwolke wurde durch die *lowess*-Normalisierung daher so angepasst, dass die Verteilung der einzelnen Punkte dieser Annahme entspricht (Abb. 28).

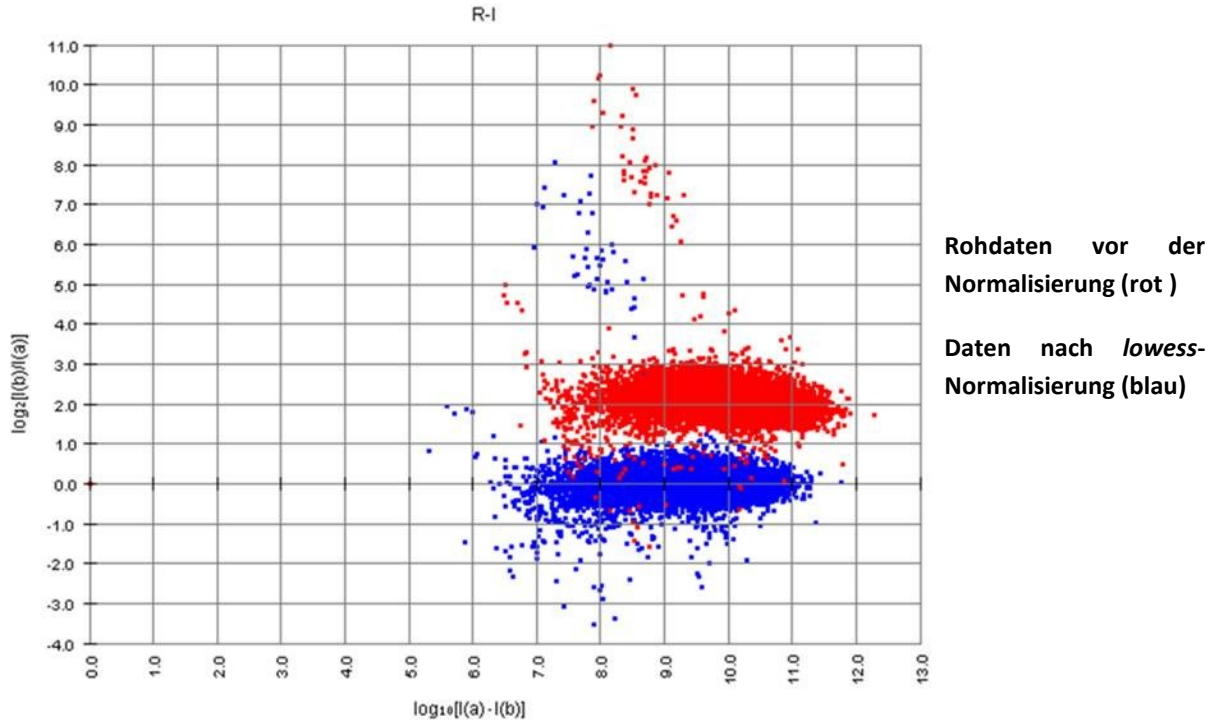


Abb. 28: RI-Plot der Rohdaten eines Replikats aus dem Telexperiment wt/rot.

Die Analyse der Rohdatendaten (in Abb. 28 rot markiert) aus dem Teilversuch wt/rot zeigte eine kompakte Verteilung. Es gab nur wenige Datenpunkte, die sich aus der Gesamtverteilung abhoben. Die Punkte waren auf der y-Achse im Bereich von 1 bis 3 konzentriert. Auf der x-Achse erstreckte sich die Verteilung von 7 bis 12. Insgesamt waren die Datenpunkte in den positiven Bereich über der x-Achse verschoben. Diese Verteilung bedeutete, dass für diese Datenpunkte die gemittelte Intensität im Kanal IB (rot) größer war als IA (wt). Die Signalintensität in der unbehandelten Probe (wt) wäre damit kleiner gewesen als die Signalintensität der behandelten Probe. Dies legt den Schluss nahe, dass die Genexpression annähernd aller Gene im roten Phänotyp herauf reguliert wurden.

Nach der *lowess*-Normalisierung lagen die meisten Datenpunkte (blau) auf der y-Achse im Bereich zwischen 1 und -1. Datenpunkte in diesem Areal zeigen keine oder nur geringe Abweichung zwischen den beiden Kanälen. Die Verteilung entlang der x-Achse wurde durch eine Verminderung der Signalstärke geringfügig korrigiert. Insgesamt blieb die Anordnung der Datenpunkte kompakt, aber es fielen einige Datenpunkte auf, die weit außerhalb der Punktwolke zwischen 1 und -1 auf der y-Achse sowie 7 und 12 auf der x-Achse lagen. Besonders vielversprechende Kandidaten sind dabei die Punkte, die gleichzeitig relativ weit rechts in der Graphik positioniert sind (Abb. 28).

Nach der Normalisierung wurde die Replikatanalyse der Sonden auf jedem der Objektträger durchgeführt. Alle Datenpunkte wurden anhand ihrer Annotation abgeglichen und ihrem jeweiligen Replikat zugeordnet. Aus den Expressionsverhältnissen der beiden Replikate wurde der Mittelwert gebildet. In die weitere Auswertung ging nur noch das gemittelte Expressionsverhältnis ein. Jede Sonde, für die gilt:

$$\log_2 (V_{1i} * V_{2i}) = \log_2 \left(\frac{A_{1i}}{B_{1i}} * \frac{B_{2i}}{A_{2i}} \right) \neq 0$$

V = Verhältnis der Proben

A = Probe mit Cy3-Markierung

B = Probe mit Cy5-Markierung

wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die Replikatanalyse verringerte den Datensatz von 16416 Sonden (je Sonde in doppelter Ausführung) auf durchschnittlich 7304 Sonden im Teilversuch wt/wt+Co²⁺. Nach dem Abgleich der technischen Replikate ergab sich im Teilversuch wt/rot eine Anzahl von 7303 Sonden und im Teilversuch wt/blau wurde die Anzahl der Sonden auf 7312 vor der weiteren Auswertung reduziert (Tab. 17). Die neu berechneten Intensitätsverhältnisse wurden im MEV-Format gespeichert.

Tab. 17: Anzahl der Sonden mit gemittelten Intensitätsverhältnissen nach *in-slide*-Replikatanalyse.

Teilversuch	Anzahl Spots nach Replikatanalyse
wt/wt+Co ²⁺	7311, 7293, 7304, 7306
wt/rot	7306, 7313, 7299, 7294
wt/blau	7316, 7309, 7314, 7303

Statistische Auswertung der Transkriptomdaten von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Nach der Erfassung der Signale und der Ermittlung der Expressionsverhältnisse erfolgte die statistische Auswertung der Daten, um die differentiell unter Co²⁺-Ionenstress regulierten Gene zu erfassen.

Die statistische Auswertung durch den Einstichproben t-Test, Zweistichproben t-Test und Varianzanalyse der Daten (*anova – analysis of variance*) erfolgte im Programm MEV. Die MEV-Dateien aus dem Programm Ginkgo und die Annotationsdatei wurden in MEV geladen. Für alle statistischen Tests wurde ein α -Fehler von 0,05 angenommen.

Da sich beim multiplen Testen die α -Fehler akkumulieren, besteht eine starke Tendenz, Null-Hypothesen fälschlich zu verwerfen, d. h. falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Zur Fehlerkontrolle in der multiplen Testsituation wurde die *false discovery rate* (FDR) verwendet. Die FDR kontrolliert das multiple Niveau durch Bestimmung des erwarteten Anteils fälschlicherweise verworfener Hypothesen an allen verworfenen Hypothesen.^[139]

Dazu wurden alle berechneten p-Werte nach ihrer Größe geordnet:

$$p_{(1)} \leq p_{(2)} \leq p_{(p)}$$

Demzufolge ergab sich die folgende Anordnung der Null-Hypothesen:

$$H_{(1)} \leq H_{(2)} \leq H_{(3)}$$

Im Anschluss wurde der größte Index k bestimmt, für den galt:

$$P_{(k)} = k \frac{\alpha}{p}$$

Wenn ein solcher Index k existiert, werden die Hypothesen von H_1 bis H_k abgelehnt und die übrigen verworfen. Für alle Tests, in denen ein solcher Index k gefunden wurde, kam zusätzlich die modifizierte Version der beschriebenen Methode zum Einsatz. Das Zwei-Stufen-Verfahren erreicht das gewünschte Signifikanzniveau durch die Bestimmung der Anzahl wahrer Null-Hypothesen (m_0) in der Gesamtanzahl der getesteten Hypothesen (m) und die Einführung des Zufallsfaktors (q)^[140]:

$$q = p \frac{m}{m_0}$$

q = Zufallsfaktor

m = Anzahl aller Nullhypothesen

m_0 = Anzahl der wahren Nullhypothesen

p = festgelegtes Signifikanzniveau

Im ersten Schritt wurde die FDR mit:

$$q' = \left(\frac{q}{1 + q} \right)$$

q = Zufallsfaktor

q' = korrigierter Zufallsfaktor auf festgelegtem Signifikanzniveau

durchgeführt, um die Anzahl der abgelehnten Nullhypothesen (r) zu bestimmen. Im zweiten Schritt wurde die Anzahl wahrer Nullhypothesen (m_0) mit:

$$m_0 = (m - r)$$

m_0 = Anzahl der wahren Nullhypothesen

m = Anzahl aller Nullhypothesen

r = abgelehnte Nullhypothesen

bestimmt.

Anschließend wurde die FDR mit:

$$q^* = q \cdot \left(\frac{m}{m_0} \right)$$

m_0 = Anzahl der wahren Nullhypothesen

m = Anzahl der Nullhypothesen

q' = korrigierter Zufallsfaktor auf festgelegtem Signifikanzniveau

q^* = exakt auf festgelegtem Signifikanzniveau korrigierter Zufallsfaktor

exakt bestimmt. Die FRD wurde zur Korrektur des α -Fehlers aller statistischen Tests in dieser Arbeit angewendet.

Funktionelle Auswertung der Transkriptomdaten von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Zur Identifizierung der unter Cobaltionenstress regulierten Proteine wurden die Namen der Sonden (SCONummer) aus den *microarray*-Experimenten mit den Daten aus dem *S. coelicolor* Sequenzierungsprojekt abgeglichen. Die identifizierten Proteine wurden anhand des Schemas des *Sanger Centers* für das *S. coelicolor Genome* Projekt klassifiziert.

Die Annotation der einzelnen, im Versuch als statistisch signifikant differentiell exprimierten identifizierten Gene wurde online in der Datenbank *StrepoBASE* der *University of Surrey* abgefragt und anhand ihrer Funktion in Gruppen zusammengefasst. Zusätzlich wurden diese Proteine in derselben Datenbank noch auf ihre Funktion im Stoffwechsel überprüft.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Pigmentierte Phänotypen von *Streptomyces coelicolor* unter Metallionenstress

Alle Metallionen bewirkten abhängig von ihrer spezifischen Toxizität für *S. coelicolor* eine Inhibierung der Sporulation. Kupferionen erwiesen sich im Versuch als sehr toxisch für *S. coelicolor*. Der Einfluss von Cobalt- und Manganionen war weniger dramatisch als die Auswirkungen der Applikation von Kupferionen.^[75] Allerdings fielen im Versuch mit Cobaltionen bei der Konzentration von 200 µg/ml Cobaltsulfat oder Cobaltchlorid im Medium neben der starken Einschränkung des Wachstums und der fehlenden Sporenbildung unter diesen Kulturbedingungen außergewöhnlich pigmentierte Kolonien (Abb. 29B) auf.

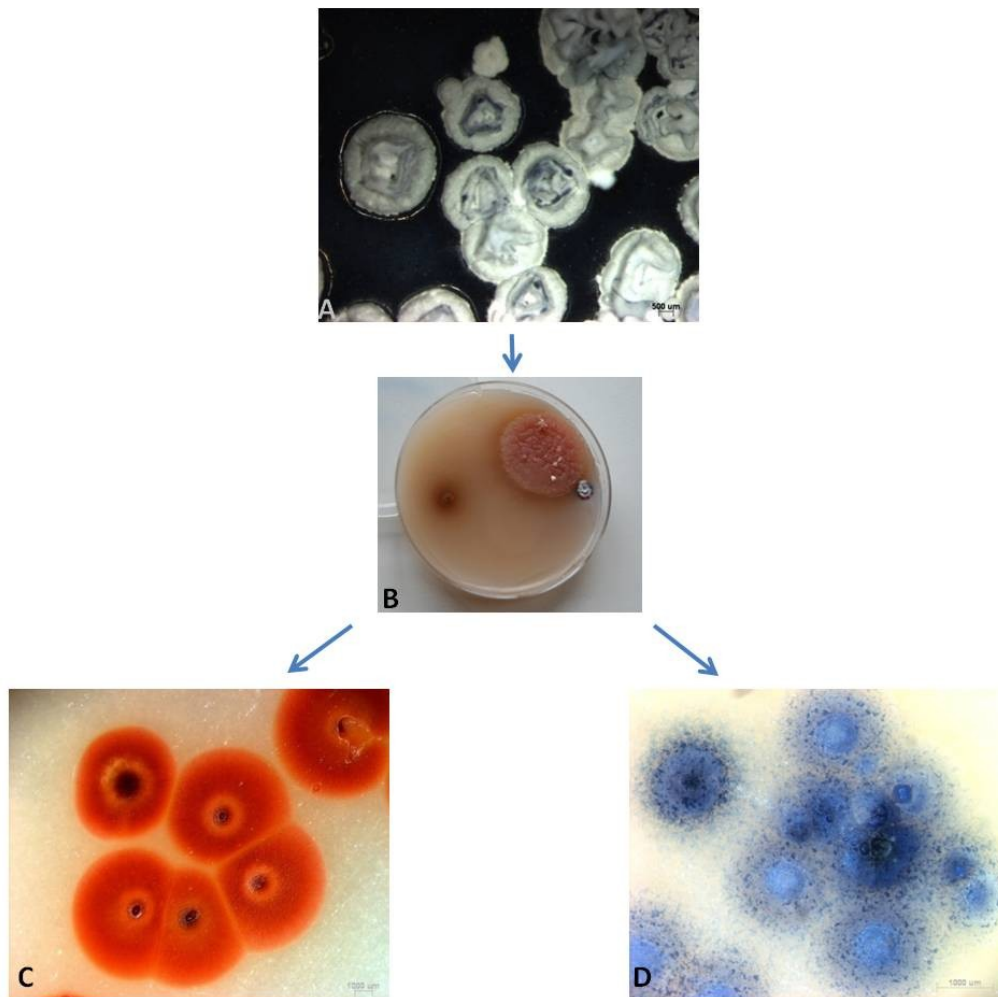


Abb. 29: *Streptomyces coelicolor* Wildtyp auf SFM-Agar (A), farbige Kolonie von *Streptomyces coelicolor* auf SFM-Agar 200 µg/ml Cobaltsulfat (B), roter Phänotyp von *Streptomyces coelicolor* auf SFM-Agar 200 µg/ml Cobaltsulfat (C), blauer Phänotyp von *Streptomyces coelicolor* auf SFM-Agar 200 µg/ml Cobaltsulfat (D).

Der Phänotyp dieser Kolonien unterschied sich drastisch. Sie waren eindeutig sowohl von dem mit grauen Sporen überzogenem Wildtyp auf metallionenfreiem Medium (Abb. 29A) als auch von dem bräunlichen Erscheinungsbild des Wildtyps auf cobaltsulfathaltigem Medium (Abb. 29B) zu unterscheiden. Die Kolonien waren leuchtend rot (Abb. 29C) oder blau (Abb. 29D) gefärbt.

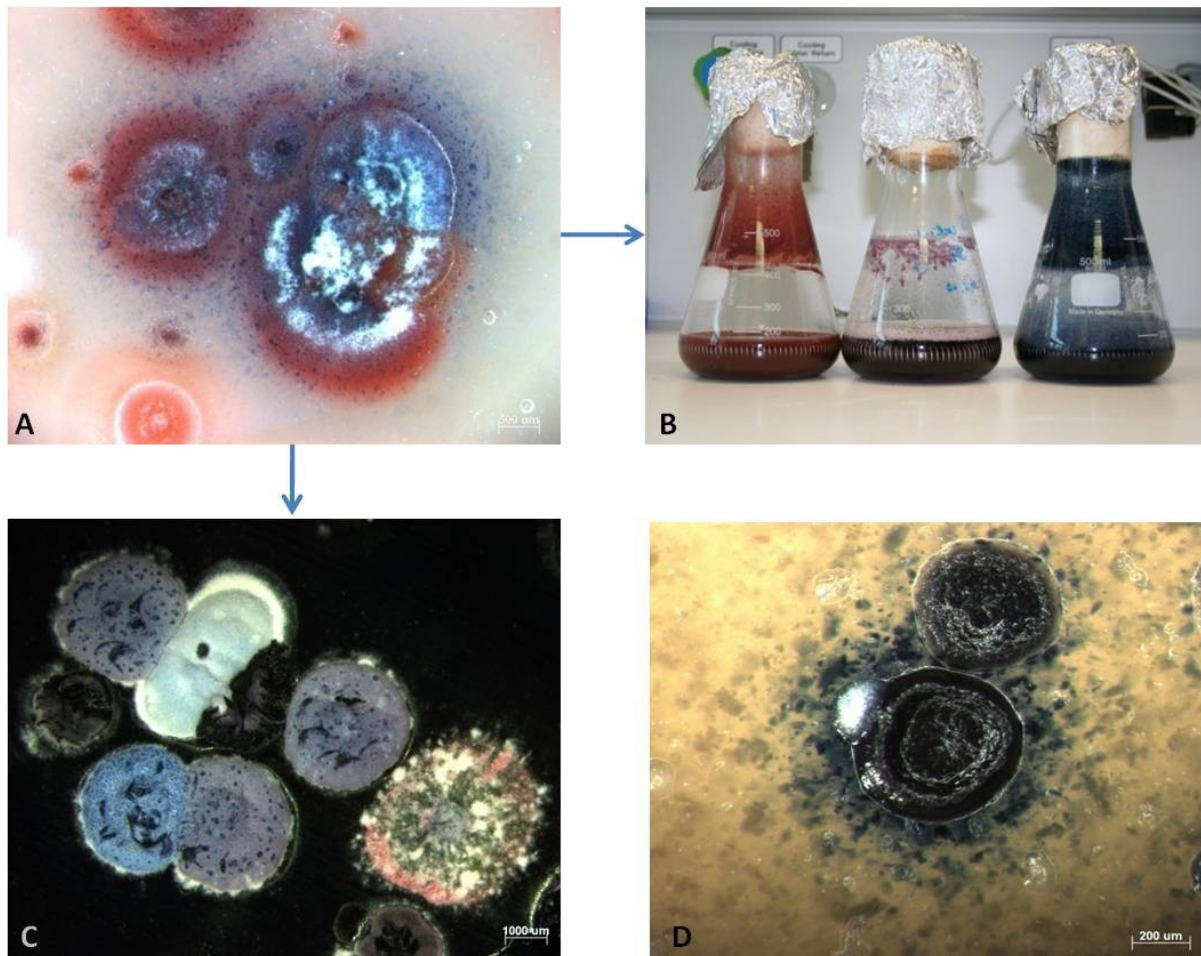


Abb. 30: Repräsentative Aufnahmen der pigmentierten Phänotypen von *Streptomyces coelicolor*: farbiger Phänotyp auf SFM-Agar 200 µg/ml Cobaltchlorid im Medium (A), farbige Phänotypen von *Streptomyces coelicolor* in Flüssigkultur mit 200 µg/ml Cobaltsulfat (rot, violett, blau) im Medium (B), verschieden gefärbte Kolonien von *Streptomyces coelicolor* nach mehreren Generationen auf cobalthaltigem Medium auf SFM-Agar ohne Metallionenzusatz (C), farbige Kolonien von *Streptomyces coelicolor* auf SFM-Agar mit Manganchlorid 2000 µg/ml im Medium (D).

Für die weiteren Versuche wurden diese gefärbten Kolonien vereinzelt. Der Effekt der verstärkten roten oder blauen Pigmentierung stellte sich auch bei der Kultivierung von *S. coelicolor* unter Zugabe von Cobaltchlorid in das Medium ein. Auch diese Wachstumsbedingungen induzierten die Differenzierung eines blauen und eines roten Phänotyps von *S. coelicolor*. Interessanterweise wurden die farbigen Phänotypen in beiden Fällen unter denselben Kulturbedingungen erhalten. Bei der Kultivierung von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress traten nicht nur rote und blaue Kolonien gemeinsam auf einer Agar-Platte auf, sondern auch Kolonien mit gemischtem Phänotyp, die sowohl rot als auch blau gefärbt waren (Abb. 30A). In der Flüssigkultur bewirkte dieses Phänomen neben den rot oder blau gefärbten Phänotypen das Auftreten violetter Kulturen (Abb. 30B). Für die weiteren Versuche wurden diese gefärbten Kolonien vereinzelt. Die Ausbildung verschiedenfarbiger Phänotypen von *S. coelicolor* blieb auch bei der Kultivierung ohne Metallionenstress erhalten, wenn einzelne Kolonien nach mehreren Generationen auf cobalthaltigem Medium wieder auf metallionenfrees Medium übertragen wurden (Abb. 30C). Die Kultivierung auf SFM-Medium mit 2000 µg/ml Manganchlorid generierte ebenfalls intensiv pigmentierte Phänotypen, allerdings war die Färbung dieser Kolonien dunkelviolet oder dunkelblau (Abb. 30D).

Wachstumskurve der farbigen Phänotypen auf cobalthaltigem Medium

Von den verschiedenen Phänotypen wurden Wachstumskurven erstellt, um herauszufinden, ob die Pigmentierung der farbigen Phänotypen auf dem cobalthaltigen Medium einen Fitnessvorteil gegenüber den wt+Co²⁺ auslöste.

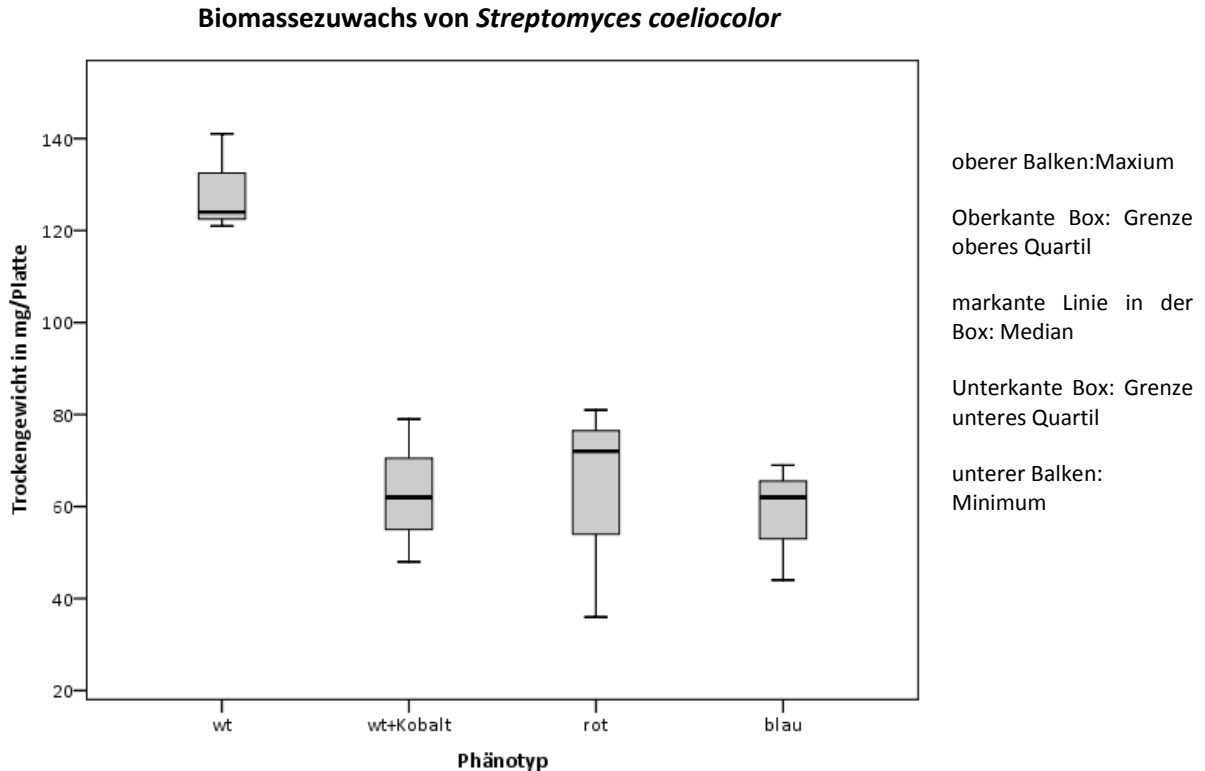


Abb. 31: Box-Plot der Trockengewichte des Wildtyps, des Wildtyps mit Cobalt im Medium, des roten Phänotyps und des blauen Phänotyps nach siebentägiger Kultivierung auf SFM-Agar. Alle Kulturen außer dem Wildtyp wurden mit 200 µg/ml CoSO₄ im Medium kultiviert, n=3.

Alle Kulturen zeigten im Verlauf der siebentägigen Anzucht auf SFM-Medium bei 28 °C eine Zunahme der Biomasse. Der Vergleich der jeweiligen Trockengewichte mit dem des wt verdeutlichte, dass Cobaltionenstress das Wachstum von allen drei *S. coelicolor*-Phänotypen auf cobaltsulfathaltigem Medium (wt+Co²⁺, rot, blau) gleichermaßen einschränkte. Obwohl im Box-Plot eine deutliche Differenz zwischen den Messwerten für den wt und den Messwerten für die Kulturen mit Cobaltzusatz abzulesen ist, konnte keine statistisch signifikante Abweichung zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 31). Zwischen den drei unter Cobaltionenstress inkubierten Kulturen von *S. coelicolor* war in Bezug auf die gebildete Biomasse in diesem Versuch kein Unterschied festzustellen. Die Kulturen mit Zusatz von Cobaltsulfat im Medium (wt+Co²⁺, rot, blau) haben nach siebentägiger Kultivierung im Vergleich zum wt die Hälfte der Biomasse gebildet, die der Wildtyp im gleichen Zeitraum aufgebaut hat.

Wachstum der unterschiedlichen Phänotypen von *Streptomyces coelicolor* ohne Cobaltionenstress

Im folgenden Versuch wurde überprüft, ob die verstärkte Pigmentierung der farbigen Phänotypen auf eine verbesserte Anpassungsfähigkeit an die Stressbedingungen schließen ließ. Daher wurden die verschiedenen Phänotypen UV-Strahlung ausgesetzt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die auf unbehandeltem SFM-Agar ausgestrichen wurden.

Biomassezuwachs von *Streptomyces coelicolor* auf cobaltfreiem Medium

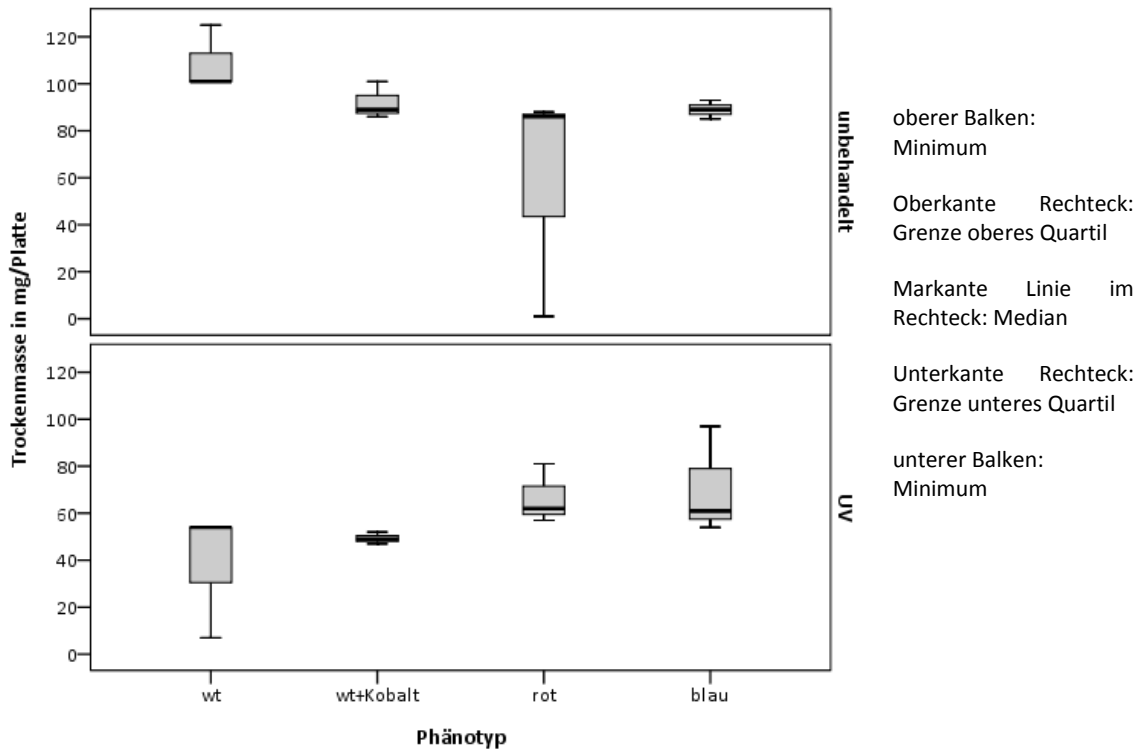


Abb. 32: Box-Plot der Trockengewichte aller vier Phänotypen nach siebentägiger Kultivierung auf unbehandeltem Medium sowie nach UV-Einstrahlung, Vorkultur des Wildtyps unter Cobaltionenstress, rotem Phänotyp, blauem Phänotyp mit 200 µg/ml CoSO₄ im Medium, n=3.

Die Auftragung der von den vier verschiedenen Phänotypen in diesem Versuch gebildete Trockenmasse und deren statistische Auswertung zeigt, dass es keine Wachstumsunterschiede zwischen dem wt, wt+Co²⁺, dem roten und dem blauen Phänotyp unter den ausgewählten Kulturbedingungen gab. Alle Phänotypen bildeten in den beiden verschiedenen Telexperimenten die gleiche Biomasse (Abb. 32).

4.3.2 Metabolitenprofil von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Die optisch verschieden pigmentierten Phänotypen von *S. coelicolor* wurden auf charakteristische Stoffwechselprodukte untersucht. Als Erstes wurde das Profil ihrer flüchtigen Metaboliten untersucht. Flüchtige Verbindungen könnten innerhalb der Populationen zur Signalweitergabe dienen oder z. B. wie Albaflavenon^[22] (**6**) gegen andere Organismen wirksam sein.

Analyse der flüchtigen Verbindungen von *Streptomyces coelicolor*-Kulturen nach Cobaltionenstress durch GC-MS

Zur Charakterisierung der Metabolitenprofile des Wildtyps, des Wildtyps unter Cobaltionenstress, des roten und blauen Phänotyps, (nachfolgend abgekürzt, Nomenklatur Tab. 6) wurden die flüchtigen Stoffe, die die Kulturen freisetzen, analysiert (Abb. 67 bis Abb. 96).

Das Duftprofil aller Phänotypen von *S. coelicolor* wurde durch Terpene bestimmt (Abb. 33, Tab. 24). Der wt setzte in diesem Experiment die meisten Verbindungen frei. Alle Terpene mit Ausnahme des Isozizaen (**37**) wurden am stärksten vom wt freigesetzt. Die Kulturen, die auf CoSO₄-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigten eine deutliche Reduktion der Duftemission.

Das Monoterpen Methylisoborneol (**40**) konnte in allen Kulturen nachgewiesen werden. Die intensivste Emission dieser Verbindung wurde über dem wt nachgewiesen, während die Kulturen unter Cobaltionenstress nur Spuren dieser Verbindung freisetzen. Die Emission von Oktalinen wurde über dem wt und in geringen Mengen auch über dem wt+Co²⁺ belegt. Die Produktion der Oktalinisofomene S₃₋₆ (Vorschlag nach Massenspektren,) wurde nur über dem wt gemessen. Im roten und blauen Phänotyp konnten dagegen diese Verbindungen nicht beobachtet werden.

Die Emission von (**5**) aus den Kulturen erfolgte, wie in Abb. 33 dargestellt, von unten nach oben abnehmend. Die Produktion der höchsten Menge Geosmin (**5**) wurde über dem wt aufgezeichnet. Der wt+Co²⁺ war durch eine deutlich verringerte Geosminfreisetzung gekennzeichnet. Die Reduktion der Geosminproduktion unter Cobaltionenstress war im roten Phänotyp noch stärker ausgeprägt. Die deutlichste Verminderung der Geosminemission wies der blaue Phänotyp auf.

Das Sesquiterpen Isozizaen (**37**) wurde von allen Kulturen freigesetzt. Abweichend von der generellen Reduktion der Terpenemission unter Cobaltionenstress setzte der blaue Phänotyp die größte Menge dieser Substanz frei. Im roten wie auch im wt+Co²⁺ wurde weniger Isozizaen (**37**) produziert, während der wt im Vergleich zu diesen durch eine leicht erhöhte Freisetzung gekennzeichnet war.

In den Messungen über dem wt wurde Zizaen (**38**) nachgewiesen. Diese Verbindung ist ein Nebenprodukt der Isozizaenzylase.

Die Produktion von Germacren D (**42**) und Germacradienol (**45**) ließ sich ebenfalls über dem wt beobachten.

Im Duft des roten Phänotyps wurden unter Cobaltionenstress zwei neue Verbindungen induziert, die als Tridecanon (**43**) und Undecylpyrrol (**44**) identifiziert werden konnten.

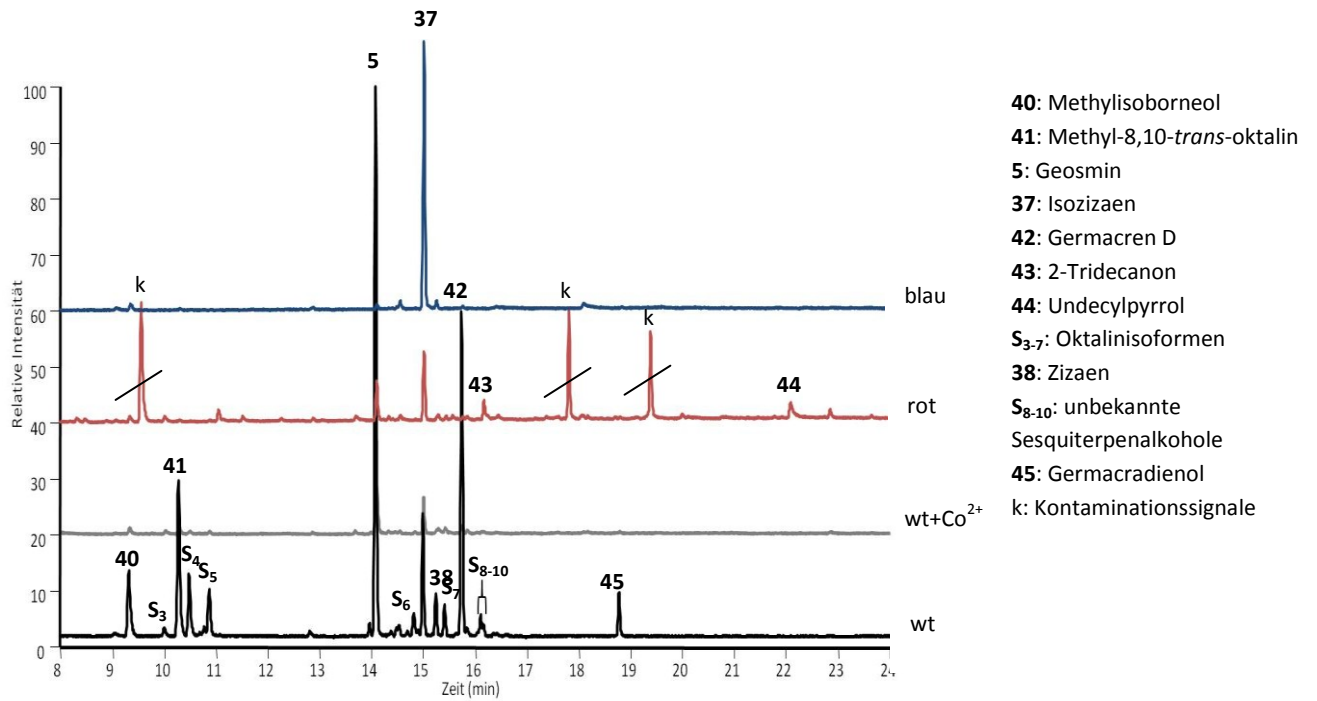


Abb. 33: Vergleich der typischen Gaschromatogramme vom Duft des wt (schwarz) sowie des wt+Co²⁺ (grau), des roten (rot) und des blauen Phänotyps (blau) von *Streptomyces coelicolor*.

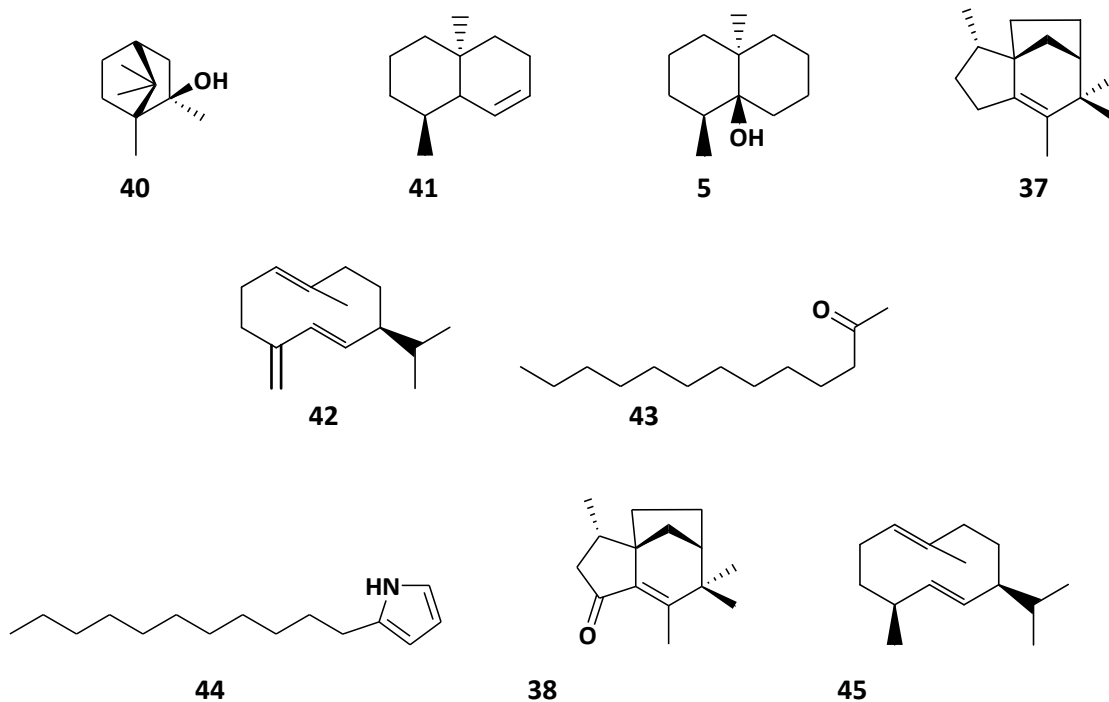


Abb. 34: Strukturformeln der Verbindungen aus Abb. 33, (40) Methylisoborneol, (41) Methyl-8,10-*trans*-oktalin, (5) Geosmin, (37) Isozizaen, (42) Germacren D, (43) 2-Tridecanon, (44) Undecylpyrrol, (38) Zizaen, (45) Germacradienol, Stereochemie von 5, 41, 42 und 45 nach Jiang *et al.*, 2007^[1].

HPLC-MS-Analyse des Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Die Identifizierung der Farbstoffe der pigmentierten Phänotypen von *S. coelicolor* erforderte die Extraktion dieser Verbindungen aus den Kulturen. Die weitere Charakterisierung der Pigmente erfolgte durch die Trennung der einzelnen Verbindungen durch HPLC und die Detektion der Molmassen mit MS (Abb. 98 bis Abb. 107).

Wie schon bei der Charakterisierung der Duftprofile (Abb. 33) war auch beim Vergleich der LC-MS-Messungen jeder Phänotyp durch ein individuelles Profil gekennzeichnet (Tab. 25). Die Substanzen, deren $M+H^+$ -Ion ein m/z -Verhältnis von 183, 197 oder 255 aufwiesen, wurden in allen untersuchten Proben beobachtet. Nur im blauen Phänotyp konnte das $M+H^+$ -Ion mit dem m/z -Verhältnis von 197 nicht detektiert werden. Im Gegensatz zur Analyse der flüchtigeren Verbindungen wurde im wt die geringste Anzahl von Verbindungen beobachtet (Abb. 35). Die Extrakte der Kulturen von *S. coelicolor*, die unter Cobaltionenstress kultiviert wurden, beinhalteten jeweils eine höhere Anzahl von Substanzen. Die Kultivierung unter Cobaltionenstress induzierte die Produktion zusätzlicher Verbindungen, die nicht im wt nachweisbar waren. Der rote Phänotyp war durch eine auffällige Konzentration der Substanz **51** gekennzeichnet (Abb. 35). Der blaue Phänotyp zeichnet sich in diesem Experiment in Gegensatz zum Duftprofil durch die meisten nachweisbaren Verbindungen aus.

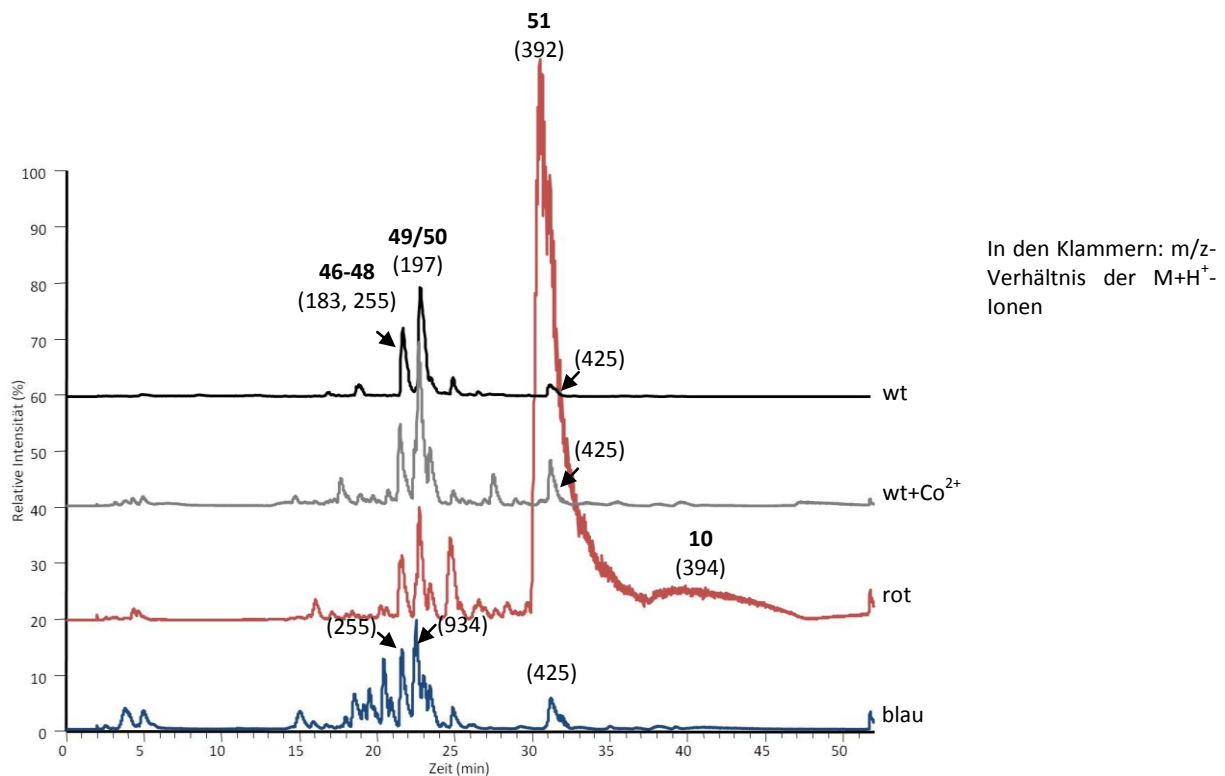
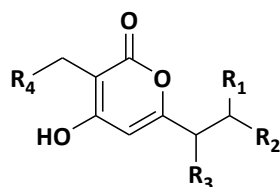


Abb. 35: LC-MS-Chromatogramme der Ethylacetatextrakte des Wildtyps (schwarz), des Wildtyps unter Cobaltionenstress (grau), des roten (rot) und des blauen Phänotyps (blau) von *Streptomyces coelicolor*.



$m/z = 183$

46 Germicidin B **47** Germicidin C **48** Germicidin C

$R_1 = R_2 = H$ $R_1 = R_3 = H$ $R_1 = R_4 = H$

$R_3 = R_4 = Me$ $R_2 = R_4 = Me$ $R_2 = R_3 = Me$

$m/z = 197$

49 Germicidin A **50** Isogermicidin A

$R_1 = H$ $R_1 = R_2 = R_4 = Me$

$R_2 = R_3 = R_4 = Me$ $R_3 = H$

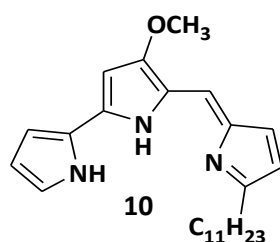
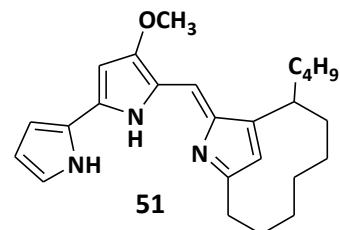


Abb. 36: Strukturformel der in Abb. 35 markierten Substanzen, Germicidinderivate (**46-50**), Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und Undecylprodigiosin (**10**).

Die weitere Charakterisierung der extrahierten Substanzen aus *S. coelicolor* erfolgte durch die Trennung des komplexen Stoffgemischs durch LC-UV/VIS gekoppelt mit hochauflösender MS. Aus den hochaufgelösten Molmassen der detektierten Verbindungen konnten die abgebildeten Strukturformeln (Abb. 36) bestätigt werden.

Bei Verbindung mit dem m/z -Verhältnis 183 könnte es sich um eine Isoform des Germicidins (**46**, **47** oder **48**) handeln, wie die Übereinstimmungen des gemessenen Lichtabsorptionsmaximums und die errechnete Summenformel belegen. Die Substanz mit dem m/z -Verhältnis 197 konnte anhand der berechneten Summenformel (Tab. 18) und dem Vergleich des Absorptionsmaximums mit Literaturwerten einer weiteren Isoform des Germicidins (**49** oder **50**) zugeordnet werden. Durch die hochauflösende MS konnte die Verbindung **51** und **10** als die roten Farbstoffe Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und Undecylprodigiosin (**10**) von *S. coelicolor* identifiziert werden (Tab. 18, Abb. 36). Durch die Analyse der Ethylacetatextrakte konnten die blauen Farbstoffe nicht identifiziert werden, daher wurde anschließend der wässrige Kulturüberstand untersucht.

S. coelicolor ist für die Produktion der blauen wasserlöslichen Polyketid-Familie der Actinorhodine bekannt. Die Actinorhodine lassen sich aus dem Kulturüberstand anreichern und weisen typische UV/VIS-Spektren auf.^[135]

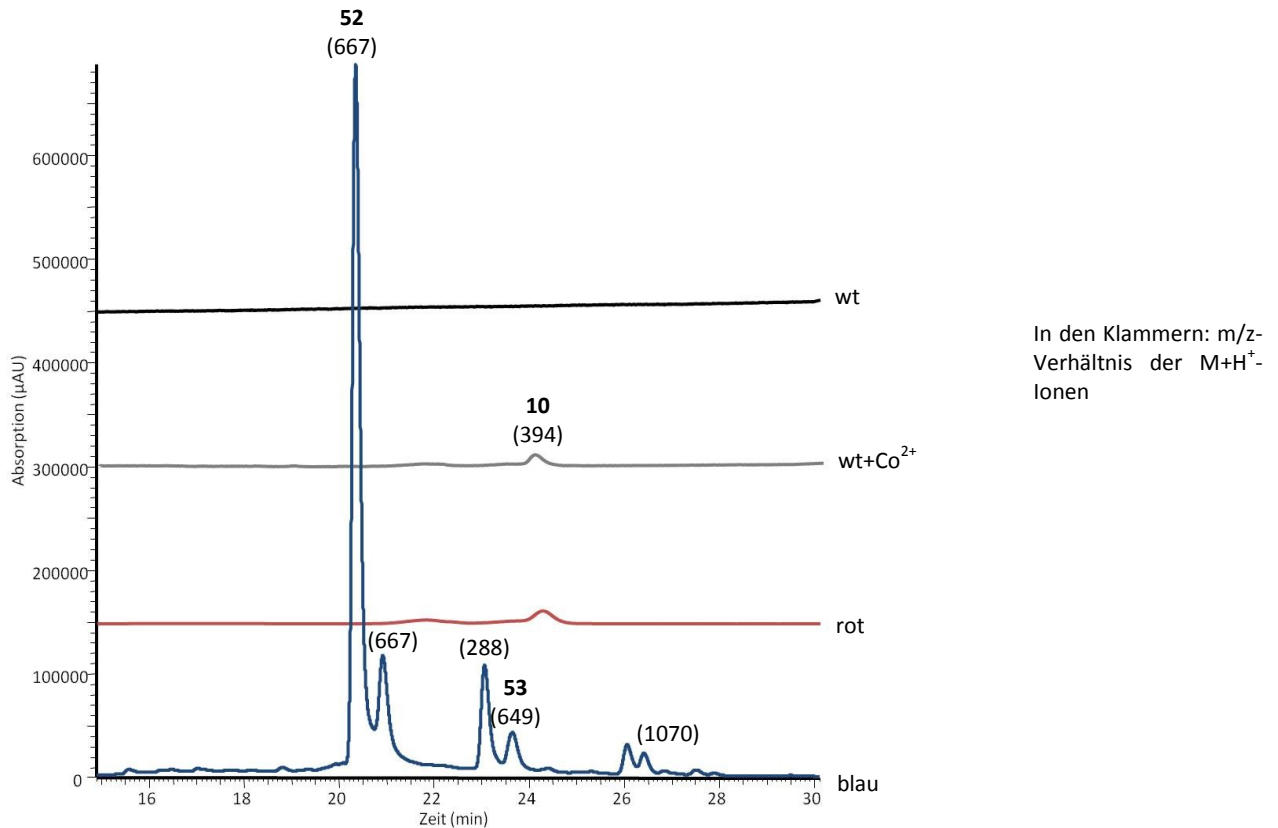


Abb. 37: HPLC-Chromatogramme der gefällten Bestandteile aus den Kulturen des Wildtyps (schwarz), des Wildtyps unter Cobaltionenstress (grau), des roten (rot) und des blauen Phänotyps (blau) von *Streptomyces coelicolor*, $\lambda = 530\text{nm}$.

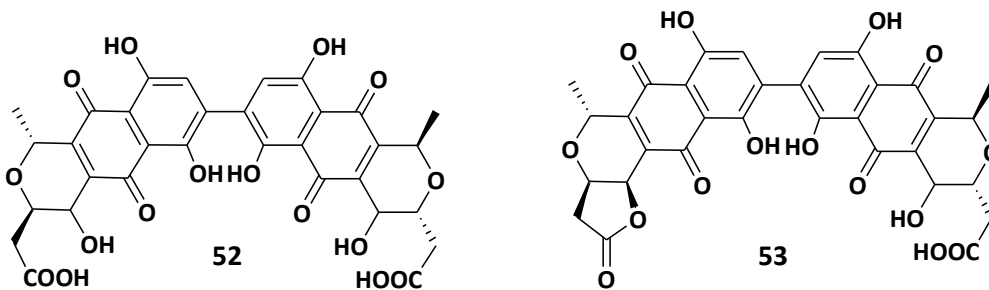


Abb. 38: Strukturformeln der Actinorhodinsäure (52) und ϵ -Actinorhodin (53).

Die HPLC-Analyse der Rohpigmente aus den Kulturüberständen der vier verschiedenen Phänotypen lieferte für den Wildtyp unter den gewählten Kulturbedingungen keinen Nachweis farbiger Verbindungen (Abb. 37). Im Wildtyp unter Cobaltionenstress und im roten Phänotyp wurden in Spuren Undecylprodigiosin (10) nachgewiesen. Der blaue Phänotyp produzierte sechs verschiedene, farbige Verbindungen, die bei 530 nm Licht absorbierten. Die Komponente mit der stärksten Lichtabsorption konnte über die hochaufgelöste Masse als Actinorhodinsäure (52) identifiziert werden. Als weitere blaue Verbindung wurde ϵ -Actinorhodin (53) nachgewiesen.

Zusammenfassend konnten aufgrund der Absorptionsmaxima und der über HR-MS bestimmten Summenformeln für fünf Verbindungen aus den Extrakten der vier Phänotypen die folgende Zuordnung vorgeschlagen werden: (Tab. 18, Tab. 19) zwei Gericidinderivate (m/z 183 46-48 und m/z 197 49/50), Butylcycloheptylprodigiosin (51), Undecylprodigiosin (10), Actinorhodinsäure (51) und ϵ -Actinorhodin (53) (Abb. 38).

Tab. 18: Vorschläge für die in *Streptomyces coelicolor* nachgewiesenen Verbindungen, basierend auf den Ergebnissen von LC-UV/VIS, HPLC-MS und HR-MS.

Verbindung		Summenformel	λ_{\max} (nm)	Hochaufgelöste Masse (g/mol)	Berechnete Masse (g/mol)
46-48	Germicidin B/C, Isogermicidin B	C ₁₀ H ₁₅ O ₃	290	183,1016	182,0943
49/50	Germicidin A, Isogermicidin A	C ₁₁ H ₁₇ O ₃	290	197,1172	196,1099
10	Undecylprodigiosin	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O	530	394,2854	393,278
51	Butylcycloheptylprodigiosin	C ₂₅ H ₃₆ N ₃ O	515	392,2697	391,2624
52	Actinorhodinsäure	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆	530	667,1295	666,1221
53	ϵ -Actinorhodin	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅	525	649,1191	648,1115

Die Summenformel und die Lichtabsorptionsmaxima der Germicindinderivate sowie der Actinorhodinsäure (**52**) stimmen mit den Literaturdaten (Tab. 19) überein. Die abweichenden Werte der Lichtabsorptionsmaxima für Undecylprodigiosin (**10**) und Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) können durch das Lösungsmittel begründet sein. Die Analyse der Referenzsubstanzen wurde in einer sauren CH₂Cl₂/Hexan-Lösung durchgeführt.^[141]

Tab. 19: Referenzen zu den vorgeschlagenen Verbindungen aus *Streptomyces coelicolor*.

Verbindung	Summenformel	λ_{\max} (nm)	Quelle
46-48	Germicidin B/C, Isogermicidin B	C ₁₀ H ₁₅ O ₃	290 [142]
49/50	Germicidin A, Isogermicidin A	C ₁₁ H ₁₇ O ₃	290 [142]
10	Undecylprodigiosin	C ₂₅ H ₃₄ N ₃ O	535 [141]
51	Butylcycloheptylprodigiosin	C ₂₅ H ₃₆ N ₃ O	525 [141]
52	Actinorhodinsäure	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆	530 [135]

Die Konzentration von Undecylprodigiosin (**10**) in der Kultur des roten Phänotyps erfolgte mit dem bekannten molaren Extinktionskoeffizienten dieser Verbindung $\epsilon_{530} = 100500$ ^[134] und ergab einen Wert von 34 μ g Undecylprodigiosin (**10**)/l Flüssigkultur des roten Phänotyps. Die Konzentration der Actinorhodinsäure (**52**) wurde mit $\epsilon_{542} = 18600$ ^[133] berechnet. Dieser Wert ist allerdings der molare Extinktionskoeffizient des Actinorhodins (**11**). Aus der Berechnung wurde eine Konzentration von 700 μ g Actinorhodinsäure (**52**)/l Flüssigkultur des blauen Phänotyps (**31**) erhalten. Beide errechneten Konzentrationen können als Richtwerte betrachtet werden, da die molaren Extinktionskoeffizienten beider Verbindungen in anderen Lösungsmitteln bestimmt wurden.

Transkriptomanalyse von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Nach der Analyse des Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress durch GC-MS und LC-MS und dem Auffinden charakteristischer Unterschiede zum Wildtyp auf unbelastetem Medium erfolgte die Untersuchung des Genexpressionsprofils der einzelnen Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp. Die Analyse des Transkriptoms ergab Aufschlüsse über spezifische Reaktionen der einzelnen Phänotypen von *S. coelicolor* auf den Cobaltionenstress und erlaubte Rückschlüsse auf die Bildung von Stoffwechselprodukten, die mit GC-MS und LC-MS nicht erfasst werden konnten. Der Nachweis der dementsprechend induzierten Biosynthese-Gene kann einen Hinweis auf die Produktion weiterer Verbindungen nach Cobaltionenstress geben.

Statistische Auswertung der Transkriptomdaten von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress durch Varianzanalyse

Die statistische Auswertung der Daten ermittelte die Sonden auf dem *microarray*-Chip, die ORFs mit signifikanten Abweichungen in der Genexpression zwischen dem Wildtyp auf unbelastetem Medium und dem Phänotyp unter Cobaltionenstress repräsentieren.

Der Einstichproben t-Test ermittelte die Sonden, deren Fluoreszenzsignale zwischen der Probe des wt auf unbelastetem Medium und dem Phänotyp unter Cobaltionenstress signifikant abwichen. Es wurden mit diesem statistischen Test alle Sonden erfasst, deren Signalstärke sich zwischen den Proben des wt auf unbelastetem Medium und dem Phänotyp unter Cobaltionenstress stärker unterschied als zwischen den einzelnen technischen Replikaten der Sonde. Die statistische Auswertung der Daten mittels t-Test für die Expressionsverhältnisse aller vier Replikate aus jedem Teilversuch und die anschließende Korrektur des α -Fehlers ergaben für die Teilversuche die folgende Anzahl signifikant regulierter Gene (Abb. 39):

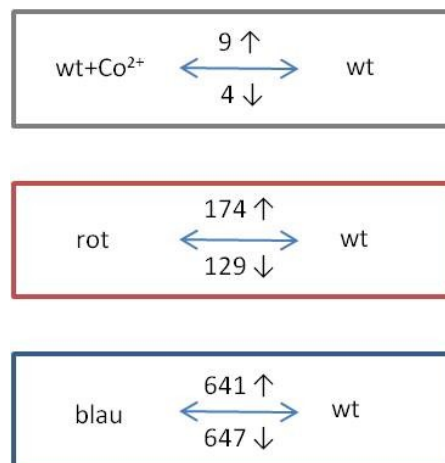


Abb. 39: Resultate des Einstichproben t-Tests für wt/wt+Co²⁺ (grau), wt/rot (rot), wt/blau (blau) nach Korrektur des α -Fehlers, die blauen Pfeile in den Rechtecken symbolisieren die differentielle Genregulation zwischen dem wt und dem jeweiligen Phänotyp unter Cobaltionenstress, die Zahlen geben die Anzahl der differentiiell regulierten ORFs zwischen dem wt und dem jeweiligen Phänotyp unter Cobaltionenstress an, die Orientierung der schwarzen Pfeile verdeutlicht gesteigerte Genexpression unter Cobaltionenstress (nach oben) oder verminderte Genexpression (nach unten).

Die geringste Anzahl signifikant regulierter Gene zwischen dem wt auf unbelastetem Medium und dem Phänotyp unter Cobaltionenstress wurde im Teilversuch wt/wt+Co²⁺ ermittelt. In diesem Experiment trat eine abweichende Genregulation zwischen dem wt und dem wt+Co²⁺ bei 0,15 % aller ORFs auf dem *microarray*-Chip auf. Die höchste Anzahl signifikanter Abweichungen in der Genexpression wurde im blauen Phänotyp unter Cobaltionenstress im Vergleich mit dem Wildtyp auf

unbelastetem Medium ermittelt. Im blauen Phänotyp wurden 15,7 % aller untersuchten ORFs im Vergleich zum wt differentiell reguliert. Die Resultate dieser beiden Teilversuche unterschieden sich um den Faktor 100. Der rote Phänotyp unter Cobaltionenstress exprimiert im Vergleich zum Wildtyp auf Cobaltmedium zwanzigmal so viele Gene differentiell zum wt. Im roten Phänotyp wurde bei der Kultivierung unter Cobaltionenstress eine zum wt abweichende Genregulation bei 3,7 % aller in den Versuch eingegangenen ORFs verzeichnet. Im blauen Phänotyp wurden im Vergleich zum roten Phänotyp viermal so viele Gene als signifikant unterschiedlich zum wt reguliert eingestuft.

Auffällig bei den Ergebnissen des Einstichproben t-Tests ist die stark abweichende Anzahl der signifikant regulierten ORFs zwischen den Gruppen, das heißt die Varianz innerhalb der untersuchten Gruppen ist unterschiedlich hoch. Der Einstichproben t-Test prüfte die Varianz innerhalb der Replikate des wt und verglich diese mit der Varianz innerhalb der Replikate jeweils eines Phänotyps unter Cobaltionenstress. Alle Sonden, deren Fluoreszenzsignale höhere Abweichungen zwischen dem wt und dem Phänotyp unter Cobaltionenstress (wt+Co²⁺, rot, blau) aufwiesen als die Signalstärke zwischen den Replikaten einer Gruppe schwankte, waren signifikant abweichend im Vergleich vom wt mit dem Phänotyp unter Cobaltionenstress reguliert. Die statistische Auswertung zeigte, dass die Varianz innerhalb der Gruppen beim Vergleich wt/wt+Co²⁺ sowie wt/rot eindeutig höher war als beim Vergleich wt/blau. Die ermittelten Schwankungen innerhalb der Gruppen können entweder technisch oder biologisch bedingt sein. Die Hybridisierungen für den Versuch wt/blau wurden nach den Hybridisierungen für Versuche wt/wt+Co²⁺ und wt/rot durchgeführt. Möglicherweise resultierten die geringeren Schwankungen innerhalb der letzten Gruppe aus der höheren Versuchsroutine. Andererseits ist es möglich, dass der wt+Co²⁺ und der rote Phänotyp biologisch heterogener sind als der blaue Phänotyp, dass also die Zellen auch innerhalb dieser Gruppen unterschiedlich auf den Umweltreiz Cobaltionenstress reagieren.

Der Zweistichproben t-Test verglich die Varianz zwischen den Ergebnissen von zwei Experimenten (Abb. 40). Damit konnten über die Abweichungen der Phänotypen unter Cobaltionenstress im Vergleich zum Wildtyp auf unbelastetem Medium Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Phänotypen unter Cobaltionenstress ermittelt werden.

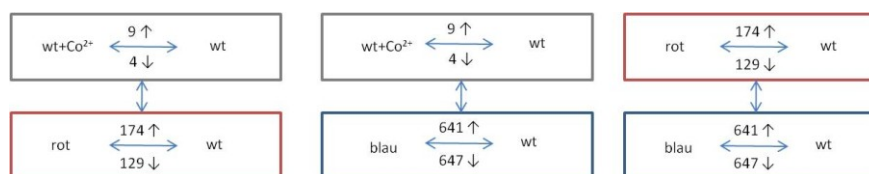


Abb. 40: Schema des Zweistichproben t-Tests für die Gruppen wt/wt+Co²⁺ (grau), wt/rot (rot), wt/blau (blau) nach Korrektur des α -Fehlers, die blauen Pfeile in den Rechtecken symbolisieren die Varianz in der Gruppe, die blauen Pfeile zwischen den Rechtecken verdeutlichen die Varianz zwischen den Gruppen, die Orientierung der schwarzen Pfeile verdeutlicht gesteigerte Genexpression unter Cobaltionenstress (nach oben) oder verminderte Genexpression (nach unten).

Im Zweistichproben-t-Test konnte kein ORF nachgewiesen werden, dessen Expression zwischen den Phänotypen unter Cobaltionenstress signifikant verschieden war. Es gab keine signifikante Abweichung in der Genexpression zwischen dem Wildtyp auf Cobaltmedium und dem roten Phänotyp oder zwischen dem Wildtyp auf Cobaltmedium und dem blauen Phänotyp. Es konnten auch keine signifikanten Abweichungen in der Genexpression zwischen dem roten und dem blauen Phänotyp ermittelt werden.

Die *anova* prüfte die Varianz zwischen allen Experimenten.

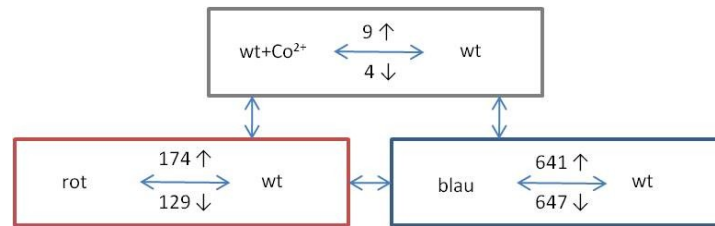


Abb. 41: Schema der *anova* für die Gruppen wt/wt+Co²⁺ (grau), wt/rot (rot), wt/blau (blau) nach Korrektur des α -Fehlers, die blauen Pfeile in den Rechtecken symbolisieren die Unterschiede in der Genexpression zwischen dem wt und dem jeweiligen Phänotyp unter Cobaltionenstress innerhalb der Gruppe, die blauen Pfeile zwischen den Rechtecken verdeutlichen die Varianz zwischen den Gruppen, die Orientierung der schwarzen Pfeile veranschaulicht gesteigerte Genexpression unter Cobaltionenstress (nach oben) oder verminderte Genexpression (nach unten).

Da es keine Abweichungen zwischen je zwei untersuchten Gruppen gab, konnten folglich in der *anova* (Abb. 41) keine statistischen Abweichungen zwischen allen drei Versuchsgruppen ermittelt werden. Dieses Ergebnis der statistischen Varianzanalyse bedeutet, dass die miteinander verglichenen Phänotypen unter Cobaltionen hinsichtlich ihrer Genexpression gleich waren, da die Abweichungen innerhalb der analysierten Gruppen (wt/wt+Co²⁺, wt/rot, wt/blau) höher waren als die Abweichungen in der Genexpression zwischen den Gruppen (wt/wt+Co²⁺ ↔ wt/rot, wt/wt+Co²⁺ ↔ wt/blau, wt/rot ↔ wt/blau). Der Vergleich der verschiedenen Phänotypen unter Cobaltionenstress erfolgte aufgrund des Versuchsaufbaus mit einer gemeinsamen Referenz (wt) für alle Hybridisierungen *in silico*. Die Versuchsergebnisse sollten zur Ermittlung von Differenzen in der Genexpression zwischen den Phänotypen unter Cobaltionenstress durch den direkten Vergleich der Phänotypen (wt+Co²⁺/rot, wt+Co²⁺/blau, rot/blau) in einem *microarray*-Experiment überprüft werden.

Bestimmung der nach Cobaltionenstress maximal differentiell regulierten *openreading frames*

Zur Bestimmung der am stärksten regulierten Gene wurde ein *cut-off* bei einer 1,5fachen Abweichung zwischen den Expressionsverhältnissen der Referenz und der untersuchten Kultur auf Cobaltmedium festgelegt. Nur mit diesen ORFs wurde, soweit nicht anders angegeben, die weitere Auswertung durchgeführt.

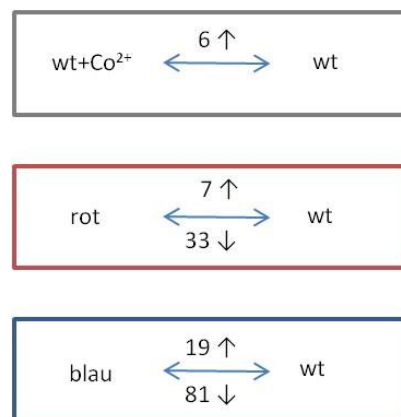


Abb. 42: Resultate des Einstichproben-t-Tests für die Teilexperimente wt/wt+Co²⁺ (grau), wt/rot (rot), wt/blau (blau) nach *cut-off* zur Bestimmung der maximal differentiell regulierten ORFs in den Kulturen unter Cobaltionenstress, die Orientierung der schwarzen Pfeile symbolisiert gesteigerte Genexpression unter Cobaltionenstress (nach oben) oder verminderte Genexpression (nach unten).

Die höchste Anzahl (100 ORFs) von Genen mit einer Regulation \geq Faktor 1,5 trat im blauen Phänotyp auf. In diesem Versuch waren 1,2 % aller untersuchten ORFs signifikant differentiell um den Faktor 1,5 reguliert. Im wt+Co²⁺ wurde bei 0,07 % (6 ORFs) der ORFs auf dem *microarray*-Chip eine Abweichung in der Genregulation \geq Faktor 1,5 festgestellt. Der rote Phänotyp wies im Vergleich zum Wildtyp eine abweichende Genregulation um den Faktor \geq 1,5 bei 0,5 % (40 ORFs) der ORFs im Versuch auf. Im blauen Phänotyp wurden unter Cobaltionenstress demnach siebzehnmal mehr Gene um den Faktor 1,5 differentiell exprimiert als im wt+Co²⁺. Im Vergleich zum roten Phänotyp zeichnete sich der blaue Phänotyp durch mehr als die doppelte Anzahl signifikant regulierter Gene aus. Nach Bestimmung der maximal differentiell unter Cobaltionenstress regulierten Gene verblieben im roten Phänotyp siebenmal so viele signifikant regulierte Gene wie der Wildtyp auf Cobaltmedium für die weitere Auswertung.

Insgesamt ist die Anzahl der differentiell unter Cobaltionenstress regulierten ORFs und deren Abweichung in der Genexpression im Vergleich zum wt relativ gering. In *microarray*-Studien mit anderen SONDENSEQUENZEN zur Induktion der Antibiotikasythese in *S. coelicolor* wurden 25 % bzw. 12 % der Gene um den Faktor \geq 2 differentiell reguliert ermittelt.^[143, 144] Allerdings wurden in dieser Studie andere *microarray*-Chips verwendet. Bei der Charakterisierung einer $\Delta bldA$ -Mutante von *S. coelicolor* mit den PCR *microarrays* der *Streptomyces coelicolor microarray resource* wurde derselbe *cut-off* wie in der vorliegenden Arbeit festgesetzt und bei 2 % aller untersuchten ORFs eine signifikante Abweichung nachgewiesen.^[145] Dieses Vorgehen spricht für den Nachweis geringer Abweichungen bei der Regulation der Genexpression in *S. coelicolor*. Möglicherweise hat die Länge der Sonden auf den PCR-*S. coelicolor-microarrays* den entscheidenden Einfluss auf die nachweisbare Anzahl differentiell regulierter ORFs und den Grad ihrer Abweichung. Bei Verwendung des einzigen kommerziell erhältlichen PCR-*S. coelicolor-microarrays* kommen relativ lange Sonden (150-500 bp) zum Einsatz. Mit der Länge der verwendeten Sonden erhöht sich das Risiko der unspezifischen Bindung von markierter cDNA, da auch cDNA mit teilweiser Sequenzüberlappung an die Sonden binden kann.^[146, 147] Es könnte dann zu einer Abschwächung der Differenz zwischen Kontrolle und behandelte Probe kommen, da neben der eigentlichen Zielsequenz noch weitere cDNAs an die Sonde gebunden haben könnten.

Weiterhin hatte mit Sicherheit auch der Zeitpunkt der Probenahme Auswirkungen auf die Anzahl der nachweisbaren Abweichungen im Genexpressionsprofil der einzelnen *S. coelicolor* Phänotypen. Die Induktion des Sekundärmetabolismus erfolgt in der späten Phase der Entwicklung einer Kultur von *S. coelicolor*, wenn die Ressourcen zum weiteren Wachstum begrenzt sind. Daher wurde das Myzel für die RNA-Präparation nach siebentägiger Inkubation aufgearbeitet. Sehr wahrscheinlich ist die Induktion der Proteinbiosynthese zu diesem Zeitpunkt schon abgeschlossen. Es erfolgt die Modulation des Stoffwechsels auf der Ebene der Proteinaktivität. Möglicherweise konnten daher bei der Auswertung der *microarray*-Daten nur geringe Abweichungen zwischen dem wt und den Phänotypen unter Cobaltionenstress ermittelt werden.

Vorschläge für die funktionelle Annotation der nach Cobaltionenstress differentiell regulierten *open reading frames*

Nachdem die Sonden für alle ORFs identifiziert worden waren, die deutlich signifikant abweichend zwischen dem wt und den Phänotypen unter Cobaltionenstress reguliert worden waren, schloss sich die funktionelle Annotation der Sonden an. Die ORFs wurden nach Proteinklassen und Stoffwechselwegen gruppiert. Die vollständige Auflistung befindet sich im Anhang (Tab. 35, Tab. 40).

Vorschläge für die Proteinklassifizierung und Zuordnung in Stoffwechselwege

Es konnten nicht alle signifikant regulierten ORFs aus dem Experiment in Proteinklassen eingeordnet werden, da die Informationen für die ORFs des Plasmids SCP1 nicht zur Verfügung standen.

wt/wt+Co²⁺

Der *wt+Co²⁺* exprimiert unter Cobaltionenstress drei ORFs deutlich signifikant abweichend zum *wt* auf unbelastetem Medium, die aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen klassifiziert werden konnten (Tab. 35). Der ORF SCO5154, dessen Transkription in der Kultur unter Cobaltionenstress um den Faktor 2 erhöht war, zeigte Sequenzhomologie zu einem Magnesium-Transporter aus *Thermotoga maritima*. Das potentielle Protein dieses ORFs könnte in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress eine Funktion bei der Regulation des Ionenhaushalts haben.

wt/rot

Die funktionelle Annotation der ORFs mit unterschiedlichen Expressionsprofilen zwischen dem roten Phänotyp unter Cobaltionenstress mit dem *wt* auf unbelastetem Medium klassifiziert 23 signifikant differentiell regulierte ORFs (Tab. 36). Die am häufigsten in der Proteinklassifizierung angetroffene Gruppe waren Membranproteine. Im roten Phänotyp wurden unter Cobaltionenstress drei ORFs verstärkt abgelesen, die Proteine des Fettsäuremetabolismus kodieren. Es handelte sich dabei um eine putative Fettsäure-CoA-Racemase (SCO6730), die Methylmalonyl-CoA-Mutase (SCO4800) und die putative Biotin-Carboxylase AccA (SCO4921). Die putative Fettsäure-CoA-Racemase (SCO6730) katalysiert den Abbau von verzweigten Fettsäuren. Das Protein AccA stellt Malonyl-CoA für die Synthese von Fettsäuren und Polyketiden zu Verfügung. Die C-terminale Domäne der Methylmalonyl-CoA-Mutase (SCO4800) ist Teil eines Cobalt- und Vitamin B12-abhängigen Enzyms, das die Freisetzung von Methylmalonyl-CoA katalysiert. Unter Cobaltionenstress wurde im roten Phänotyp ein unspezifizierter Genomabschnitt (SCO5464) verstärkt zu mRNA umgesetzt. Dieser ORF zeigt keine Homologie zu bakteriellen Proteinen, wies allerdings Ähnlichkeiten mit calciumbindenden Proteinen aus verschiedenen Eukaryonten, u. a. einem Calmodulin aus *Dictyostelium discoideum*, auf. Möglicherweise bindet dieses Genprodukt im roten Phänotyp Cobaltionen. Zusätzlich wurde im roten Phänotyp unter Cobaltionenstress die Expression von drei Transkriptionsregulatoren verstärkt. Einer dieser vermehrt transkribierten ORFs ähnelt den Mitgliedern der Sir2-Familie. Diese Transkriptionsregulatoren sind in allen Organismen konserviert und bewirken eine Herabsetzung der Transkription in bestimmten Bereichen des Genoms durch die Veränderung der Chromatinstruktur.^[148]

wt/blau

Da der Vergleich des blauen Phänotyps unter Cobaltionenstress mit dem *wt* auf unbelastetem Medium die höchste Anzahl signifikant differentiell regulierter Gene ergab, konnten bei der Auswertung dieses Versuchs die meisten ORFs (92) in Proteinklassen eingeordnet werden (Tab. 37). Wie im roten Phänotyp war auch im blauen Phänotyp die Expression der putativen Biotin-Carboxylase AccA (SCO4921) verstärkt. Unter der Einwirkung von Cobaltionenstress wurde im blauen Phänotyp die Expression von zwei putativen Transkriptionsrepressoren sowie die Expression des vermutlich regulatorisch wirkenden Proteins SCO6130 um den Faktor 1,5 erhöht. Dieses putative Protein SCO6130 wies Sequenzhomologie zu dem regulatorisch auf die Antibiotikasythese

wirksamen Lokus *abaA*^[149] auf. Die Transkriptionsrepressoren fielen in die Klasse der TerR und MerR-Proteine. Diese Proteine blockieren das Ablesen bestimmter Gene, bis sie durch die Bindung eines Effektors von der DNA dissoziieren. Daher dienen Proteine dieser Familien häufig der Transkriptionskontrolle unter bestimmten Umweltbedingungen.^[150, 151] Ein weiteres regulatorisches Protein, das im blauen Phänotyp signifikant verstärkt exprimiert wurde, ist der ORF SCO7339, welcher ein Genprodukt mit Ähnlichkeit zu SgaA kodiert. Den unter Cobaltionenstress verstärkt induzierten Produkten der ORFs SCO2173 und SCO1553 könnte eine Funktion in der Synthese von Cobalamin zugeschrieben werden. Das putative Enzym des ORFs SCO2173 wäre an der Biosynthese des Coenzym B12 beteiligt, während das Produkt des ORFs SCO1553 in den Aufbau von Porphyrinringen involviert wäre. Unter den potentiellen Genprodukten, die unter Cobaltionenstress im blauen Phänotyp signifikant vermindert exprimiert wurden, waren zwei Elektronentransportproteine. Der ORF SCO3946 kodiert ein putatives Protein der Atmungskette und wurde daher in die oxidative Phosphorylierung eingegliedert. Der ORF SCO1421 weist Ähnlichkeiten mit einem elektronentransportierenden Protein aus *S. coelicolor* auf, ist jedoch bisher nicht genauer charakterisiert.

Vorschläge für differentiell unter Cobaltionenstress regulierte *open reading frames* des Sekundärstoffwechsels

Besonderes Augenmerk wurde bei der Auswertung der *microarray*-Daten auf Veränderungen in der Expression von Genen aus dem Sekundärstoffwechsel gelegt. Diese Ergebnisse geben Aufschluss darüber, ob auf Transkriptionsebene die Bildung von Sekundärmetaboliten durch Cobaltionenstress induziert wurde. Der DANN-*microarray* erfasste auch die Aktivierung der Gene, die Enzyme zur Produktion von Sekundärmetaboliten kodieren. Diese Methode soll die potentielle Produktion von Substanzen erfassen, die bisher aus *S. coelicolor* unbekannt sind oder mit anderen Analysetechniken noch nicht nachweisbar waren. Aufgrund von Homologien zu bereits charakterisierten Genen zur Biosynthese von bioaktiven Naturstoffen kann auf mögliche Strukturmerkmale unbekannter Sekundärmetabolite aus *S. coelicolor* geschlossen werden.

wt/wt+Co²⁺

Nach dem Cobaltionenstress war im *wt+Co²⁺* die Induktion eines ORFs aus dem Sekundärmetabolismus zu beobachten. Eine putative Salicylat-1-Monooxygenase wurde in der Kultur auf cobaltionenhaltigem Medium im Vergleich zur Kontrolle auf Standard-SFM-Agar signifikant um den Faktor 1,4 höher exprimiert als im *wt*. Die N-terminale Signalsequenz legt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym aus dem Myzel in das Medium abgegeben werden könnte. Die Salicylat-1-Monooxygenase katalysiert die Umsetzung von Salicylat zu Catechol und ist in den Abbau von aromatischen Verbindungen eingebunden.

wt/rot

Bei der Auswertung der vier vom *wt* abweichenden Expressionsmuster im Sekundärmetabolismus des roten Phänotyps wurde festgestellt (Tab. 20), dass die Transkription des ORF SCO0388 signifikant erhöht war. Dieser DNA-Abschnitt von *S. coelicolor* hat Ähnlichkeiten mit der Sequenz für die Heparinase III aus *Cytophaga heparina*. Dieses Enzym baut Glykosaminoglykane zu Disacchariden ab. Die Expression der ORFs SCO1275, SCO3214, SCO0392 wurde signifikant verringert. Der ORF SCO1275 zeigt Homologien zu einem Gen, das in *Pseudomonas fluorescens* für die Halogenase PrnC

kodiert. Die FAD-abhängigen Monooxygenasen aus der PrnC-Familie bevorzugen Phenolderivate als Substrate.^[152] Diese Halogenasen werden häufig in der Nähe von PKS- und NRPS-Clustern gefunden und katalysieren die Halogenierung von Substraten, die noch an *carrier*-Proteine gebunden sind.^[153] Der ORF 3214 wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zu einem Gen der Anthranilat-Synthase aus *Pseudomonas putida* dem Sekundärmetabolismus zugeordnet. Anthranilat ist eine Vorstufe der Aminosäure Tryptophan. Die Basenabfolge der putativen Methyltransferase weist Übereinstimmungen mit verschiedenen Methyltransferasen auf, u. a. mit dem Protein DnrX aus der Daunorubicin Biosynthese in *Streptomyces peucetius*.

Farbkodierung für signifikante Abweichungen der Expressionsverhältnisse.

1,5	1,4	1,3	1,1	0,9	0,8	0,7	0,67
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Tab. 20: Signifikant differentiell regulierte ORF des Sekundärstoffwechsels aus dem Telexperiment wt/rot.

ORF	Funktion	Homologie
SCO0388	hypothetisches Protein	Heparinase III, <i>Cytophaga heparina</i>
SCO1275	putative Halogenase	PrnC, <i>Pseudomonas fluorescens</i>
SCO3214	putative Anthranilat-Synthase	TrpE, <i>Pseudomonas putida</i>
SCO0392	putative Methyltransferase	u. a. DnrX, <i>Streptomyces peucetius</i>

Zusätzlich wurden im roten Phänotyp unter Cobaltionenstress signifikante Veränderungen für die Transkriptionsaktivität von vier ORFs aus der PKS-Klasse ermittelt (Tab. 21). Der Transkriptionsregulator für den Prodigiosin-Gencluster war im roten Phänotyp signifikant erhöht exprimiert. Das Genprodukt dieses ORFs ist der Aktivator für die Transkription des *Red*-Clusters für die Biosynthese von Undecylprodigiosin (**10**) in *S. coelicolor*. Die ORFs SCO5075, für eine putative Oxidoreduktase, SCO1266 mit der Information für eine 3-Oxoacyl-Synthase II (*Acyl-carrier*-Protein) aus der Fettsäurebiosynthese aus *E. coli* und der funktionell nicht charakterisierte ORF SCO0128 wurden in ihrer Expression unter Cobaltionenstress vermindert. Für diese Abschnitte des Genoms von *S. coelicolor* konnten keine Entsprechungen in bekannten Polyketidsynthese-Clustern gefunden werden.

Tab. 21: Signifikant differentiell regulierte ORF der Polyketidsynthese aus dem Telexperiment wt/rot.

ORF	Funktion	Homologie
SCO5877	Transkriptionsregulator RedD	-
SCO5075	putative Oxidoreduktase	-
SCO1266	3-Oxoacyl-Synthase II FabF2	FabF, <i>Escherichia coli</i>
SCO0128	hypothetisches Protein	-

wt/blau

Der blaue Phänotyp exprimerte unter Einwirkung von Cobaltionen 21 Gene signifikant differentiell im Vergleich zum wt (Tab. 22).

Tab. 22: Liste der signifikant differentiell regulierten ORFs des Sekundärstoffwechsels aus dem Teilerperiment wt/blau.

ORF	Funktion	Homologie
SCO2338	putative O-Methyltransferase	Makrolid-Biosynthese, <i>Streptomyces mycarofaciens</i>
SCO6438	Diaminopimelat-Decarboxylase,	DecD, <i>Escherichia coli</i>
SCO6762	putative Dehydrogenase	Karotinoid-Biosynthese. <i>Streptomyces griseus</i>
SCO6764	putative Hopen-/Squalen-Zyklase	Hopen-/Squalen-Zyklase A, <i>Bacillus acidocaldarius</i>
SCO6437	hypothetisches Protein	-
SCO6761	kleines hypothetisches Protein	-
SCO6765	putatives Lipoprotein	Tyrosinase Co-Faktor, <i>Streptomyces lincolnensis</i>
SCO0381	putative Glykosyl-Transferase	UDP-Galactose-Lipid-Carrier-Transferase, <i>Erwinia amylovora</i>
SCO2785	hypothetisches Protein	Rhizobactin-Biosynthese, <i>Rhizobium meliloti</i>
SCO0522	putative Oxidoreduktase	Clavulanat-9-aldehyd-Reduktase, <i>Streptomyces clavuligerus</i>
SCO3227	putative Aminotransferase	Vancomycin-Biosynthese, <i>Amycolatopsis orientalis</i>
SCO0648	Methyltransferase	Avermectin (4)-Biosynthese, <i>Streptomyces avermitilis</i>
SCO0769	putative Oxidoreduktase putative Aldo-/Keto-Reduktase	YajO, <i>Escherichia coli</i> , NorA, <i>Aspergillus flavus</i>
SCO3240	konserviertes hypothetisches Protein	-
SCO0382	UDP-Glukose/GDP-Mannose-Familie-Dehydrogenase	GDP-Mannose-6-Dehydrogenase, <i>Pseudomonas syringae</i>
SCO0383	hypothetisches Protein	Mannosyltransferase B, <i>Escherichia coli</i>
SCO0389	putatives Lipoprotein	-
SCO0040	Glykosyl-Transferase	Makrolid-Glykosyl-Transferase, <i>Streptomyces ambofaciens</i>
SCO3226	putativer Regulator der Antibiotikasyntese	LuxR-Familie
SCO6431	putative Peptid-Synthetase	<i>aps</i> , <i>Amycolatopsis mediterranei</i>
SCO3218	putatives konserviertes kleines Protein	Vancomycin-Biosynthese, <i>Amycolatopsis orientalis</i>

In der Klasse der Proteine für die Polyketidbiosynthese in *S. coelicolor* wurden im Versuchsteil wt/blau 18 Abweichungen des blauen Phänotyps zum wt nachgewiesen (Tab. 23). Drei ORFs SCO5892, SCO5890 und SCO5878 aus dem *red*-Kluster zur Produktion von Undecylprodigiosin (10) wurden signifikant erhöht im blauen Phänotyp exprimiert (Tab. 23). Aus dem *act*-Genkluster zur Biosynthese von Actinorhodin (11) wurde der ORF SCO5086 verstärkt im blauen Phänotyp abgelesen. Von den signifikant differentiell unter Kobaltstress abgelesenen Oxidoreduktasen SCO0331 und

SCO3978 weisen beide Proteine Ähnlichkeiten zu Enzymen aus der Actinorhodinbiosynthese auf. Der ORF SCO1266 zeigt in seiner Basenabfolge Ähnlichkeit zu FabF auf *E. coli*. Dieses Gen codiert in *E. coli* die 3-Oxoacyl-Synthase II für die Fettsäurebiosynthese. Ebenfalls durch eine Sequenzhomologie zu einem Enzym aus der Fettsäurebiosynthese ist der signifikant erhöht exprimierte ORF SCO1198 gekennzeichnet. Auch in diesem Telexperiment wurde eine Anzahl von ORFs, die mögliche Gene für die Produktion von Polyketiden enthalten, in ihrer Expression vermindert. Der verringert translatierte ORF SCO5898 gehört zum *red*-Cluster.

Tab. 23: Liste der signifikant differentiell regulierten ORFs der Polyketidsynthese aus dem Telexperiment wt/blau.

ORF	Funktion	Homologie
SCO5878	Polyketidsynthase RedX	-
SCO0129	hypothetisches Protein	-
SCO1266	3-Oxoacyl-Synthase II (Acyl-carrier-protein) FabF2	FabF, <i>Escherichia coli</i>
SCO5086	Ketoacylreduktase ActIII	-
SCO5892	Polyketidsynthase RedL	-
SCO3978	putative Oxidoreduktase	u. a. Actinorhodin (11), <i>Streptomyces coelicolor</i>
SCO1198	putative Acyl-CoA-Dehydrogenase	FamB, <i>Streptomyces purpurascens</i>
SCO0331	putative kurzkettige Oxidoreduktase	u. a. Actinorhodin (11), <i>Streptomyces coelicolor</i>
SCO0128	hypothetisches Protein SCJ.21.09	-
SCO7669	putative Oxidoreduktase	-
SCO5890	putative 8-Amino-7-Oxononanoat-Synthase RedN	-
SCO5072	Hydroxylacyl-CoA-Dehydrogenase	-
SCO7670	konserviertes hypothetisches Protein	-
SCO1267	putatives Acyl-carrier-Protein	AcpP, <i>Rhizobium meliloti</i>
SCO1330	putative Fettsäure-CoA-Ligase	Malonyl-CoA-Synthetase, <i>Rhizobium trifolii</i>
SCO5075	putative Chinon-Oxidoreduktase	-
SCO3249	putatives Acyl-carrier-Protein	Acyl-carrier-Protein, <i>Helicobacter pylori</i>
SCO5898	putatives Membranprotein RedF	-

Bei der Analyse der Auswirkung von Cobaltionenstress auf *S. coelicolor* konnte keine signifikante Änderung der Genregulation einer Terpenzyklase nachgewiesen werden. Weiterhin war die Regulation von Genen des Sekundärmetabolismus im *microarray* durch signifikante, allerdings relativ geringe Differenzen zwischen dem wt und den Phänotypen unter Cobaltionenstress belegbar. Die Aktivierung der gesamten Gencluster für die Produktion von Undecylprodigiosin (**10**) und Actinorhodin (**11**) konnte nicht detektiert werden, obwohl schon die auffällige Pigmentierung des roten und des blauen Phänotyps für die Produktion dieser Verbindungen sprach und diese Verbindungen durch die HPLC-MS-Analyse nachgewiesen wurden.

4.4 Diskussion

4.4.1 Differenziertes Wachstum von *Streptomyces coelicolor* unter Schwermetallionenstress

Eine hohe Konzentration von Schwermetallionen im Medium führt in der Zelle zum Wettbewerb mit anderen Metallionen, z. B. Magnesiumionen, beim Transport oder bei der Bindung an spezifischen Positionen in metallabhängigen Enzymen.^[154] Weiterhin wird die Hydrolyse von Biopolymeren begünstigt.^[155] Zusätzlich können Schwermetallionen aus dem Medium an verschiedene Moleküle in der Zelle binden und deren Aktivität verändern oder die Bildung freier Radikale induzieren.^[156] Verschiedene Metallionen wirken sich in *S. coelicolor* unterschiedlich auf das Wachstum und die Freisetzung von diesen Sekundärmetaboliten aus.^[75, 128] Die folgende Anordnung der getesteten Metalle nach ihrer beobachteten toxischen Wirkung auf *S. coelicolor*: $\text{Cu}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$ wird durch Ergebnisse einer früheren Studie gestützt.^[128] Die starke Hemmung des Wachstums von *S. coelicolor* durch Kupfer beruht auf der kupferionkatalysierten Freisetzung von schädlichen Sauerstoffradikalen.^[128, 157]

In einer früheren Studie mit verschiedenen Streptomycetenstämmen hatte eine hohe Calciumionenkonzentration im Medium einen stimulierenden Effekt auf die Sporenbildung.^[158] Calciumionen im Medium können Phosphat komplexieren und damit die Induktion der Sporulation durch Nährstoffmangel beeinflussen.^[158] In Analogie zur Bildung von Calciumphosphaten sollten auch andere bivalente Kationen die Induktion der Sporenbildung begünstigen. Andererseits bewirkt die Zugabe von Metallsalzen in das Medium eine Erhöhung des osmotischen Drucks im Medium. Das Wachstum unter erhöhter Osmolarität führt zur Unterdrückung der morphologischen Differenzierung von *S. coelicolor*. Unter Salzstress wird in *S. coelicolor* der Sigma-Faktor SigH induziert, der die Sporulation verhindert.^[159] Dieser Effekt könnte zur beobachteten Unterdrückung der Sporenbildung unter Metallionenstress führen (Abb. 43).

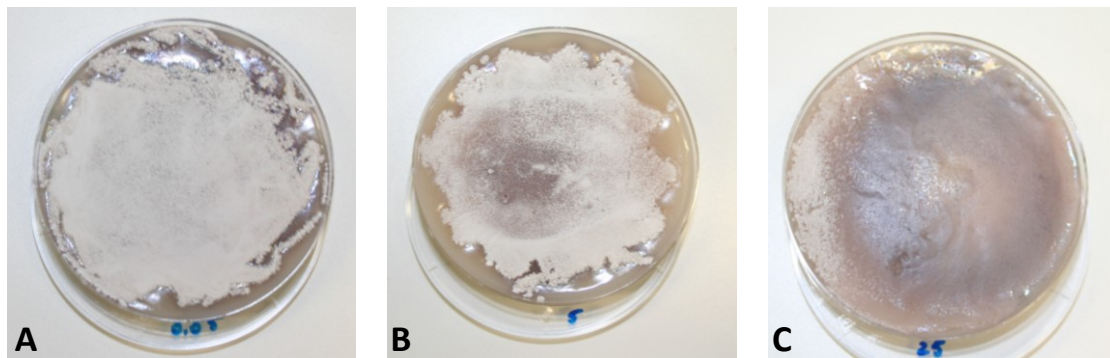


Abb. 43: Fotos von *S. coelicolor*-Kulturen unter Cobaltionenstress, (A) Kultur mit 0,05 µg/ml CoSO_4 , (B) Kultur mit 5 µg/ml CoSO_4 , (C) Kultur mit 25 µg/ml CoSO_4 , deutlich erkennbar die fehlende Weißfärbung der Kulturen durch die ausbleibende Sporenbildung bei steigender Cobaltionenkonzentration im Medium.

Die morphologische Differenzierung von *S. coelicolor* beim Wachstum in Gegenwart von Metallionen könnte durch die Komplexbildung des SCB1-Faktors (**28**) verhindert werden. Über eine mögliche Bildung von Cobaltionenkomplexen des A-Faktors (**21**) von *S. griseus* ist bereits spekuliert worden (Abb. 44).^[87]

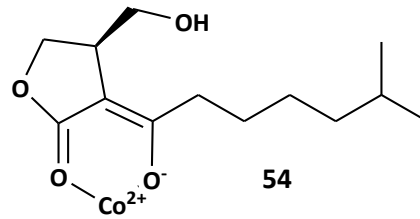


Abb. 44: Strukturformel des postulierten Komplexes aus dem A-Faktor (21) von *Streptomyces griseus* mit Cobaltionen nach Gräfe *et al.*, 1985^[87].

Pigmentierte Phänotypen

Beim Wachstum unter Cobaltionenstress wurden einzelne Kolonien von *S. coelicolor* mit verstärkter Pigmentierung beobachtet. Der Modellstreptomycet *S. coelicolor* produziert erwiesenermaßen nach Eintritt in die stationäre Wachstumsphase die beiden farbigen Polyketide Actinorhodin (11) und Undecylprodigiosin (10).^[160]

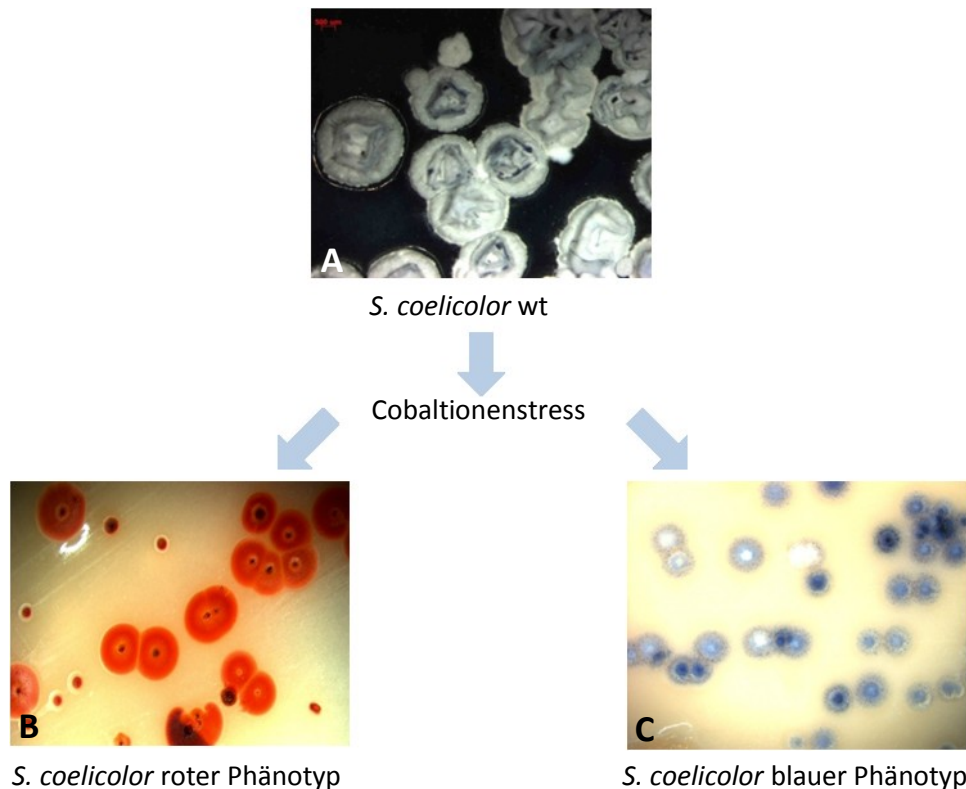


Abb. 45: Fotos der verschiedenen *Streptomyces coelicolor* Phänotypen, (A) alle Experimente wurden mit dem auf unbelastetem SFM grau erscheinenden Phänotyp gestartet, unter Cobaltionenstress wurde (B) ein rot und (C) ein blau pigmentierter Phänotyp beobachtet.

Durch die Ergebnisse der LC-MS-Analysen kann davon ausgegangen werden, dass die verstärkte Pigmentierung des roten Phänotyps durch die Produktion von Undecylprodigiosin (10) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (51) unter Cobaltionenstress ausgelöst wurde. Zusätzlich ergab die Auswertung der *microarray*-Daten, dass der ORF (SCO5877) des Transkriptionsregulators für die Prodigiosinbiosynthese *redD* im roten Phänotyp um den Faktor 1,4 verstärkt abgelesen wurde (Tab. 21).

Undecylprodigiosin (10) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (51) sind Sekundärmetabolite, die in der späten Wachstumsphase von *S. coelicolor* gebildet werden. Die physiologische und ökologische

Bedeutung des Moleküls für den produzierenden Stamm ist noch unklar. Die Regulation der Prodigiosinbiosynthese ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Es existieren unabhängige Regulationsmechanismen, die von der Wachstumsrate oder dem *Quorum sensing* durch γ -Butyrolactone abhängig sind.^[161] Die Produktion von Undecylprodigiosin (**10**) in *S. coelicolor* erfolgt unter limitierten Wachstumsraten wie z. B. in der stationären Phase einer Kultur.

Die Erhöhung der Prodigiosinproduktion unter NaCl-Stress wurde dokumentiert und über Induktion der *red*-Gene durch eine Veränderung der DNA-Struktur unter osmotischem Stress spekuliert.^[73] Die modifizierte DNA-Struktur sollte den Promoter des *red*-Genclusters leichter für die DNA-Polymerase zugänglich machen. Eine Veränderung der DNA-Struktur könnte auch unter dem Einfluss von CoSO_4 möglich sein.

Insbesondere die Konzentration der essentiellen Übergangsmetalle Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} wird in bakteriellen Zellen exakt ausbalanciert.^[155] Die roten Farbstoffe Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) könnte von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress zur Chelatisierung von Cobaltionen in der Umgebung der Zellen gebildet werden. Das Molekül Prodigiosin (**18**) komplexiert unter physiologischen Bedingungen bivalente Kationen. Mit Cu^{2+} -Ionen bildet Prodigiosin (**18**) 1:1 Komplexe.^[162] Diese Komplexe bewirkten Doppelstrangbrüche in der DNA (Abb. 46) und sind die Erklärung für die Wirksamkeit von Prodigiosin (**18**) bei der Einleitung der Apoptose in humanen Krebszelllinien.^[163] Undecylprodigiosin (**10**) ist aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung und seiner Aktivität gegen humane Krebszellen ein viel versprechender Kandidat für die Zulassung als Arzneimittel.^[164] Auch Zn^{2+} und Co^{2+} (Abb. 46) werden von Prodigiosin (**18**) im Verhältnis 1:2 komplexiert.^[162]

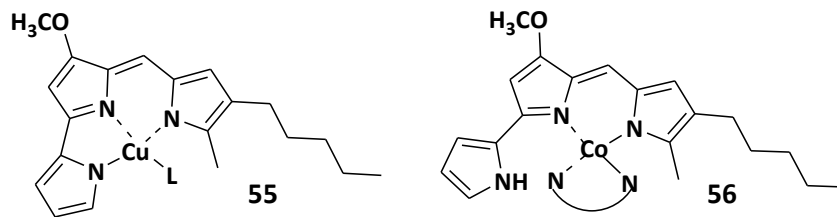


Abb. 46: Strukturformel der beschriebenen Metallkomplexe von Prodigiosin (**18**): $\text{Cu}(\mathbf{18})$ und $\text{Co}(\mathbf{18})_2$ (der Bogen symbolisiert zweites Prodigiosinmolekül) nach Park *et al.*, 2003^[162]. Die mutagene Wirkung von **54** wird wahrscheinlich in der Zelle durch Bindung an das Phosphatrückgrat (L) der DNA verursacht.

Mit den LC-MS-Analysen der Pigmente aus dem Kulturüberstand des blauen Phänotyps von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress wurde Actinorhodinsäure (**52**) nachgewiesen (Abb. 37, Abb. 38). Dieses Molekül ist ein Abbauprodukt des γ -Actinorhodins (**57**), das während der Aufarbeitung entstanden ist.^[165] Im Datensatz der Genexpressionanalyse des blauen Phänotyps konnte die um den Faktor 1,4 verstärkte Expression des ORFS SCO5086 nachvollzogen werden. Das Genprodukt dieses ORFs ist die Ketoacylreduktase *actIII* aus der Actinorhodinbiosynthese (Tab. 23).

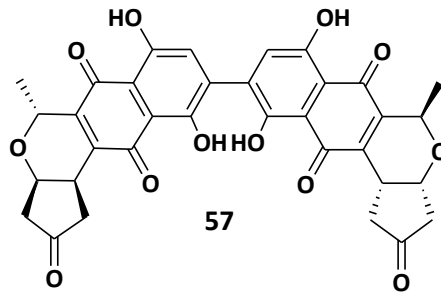


Abb. 47 : Strukturformel von γ -Actinorhodin (57).

Die Produktion von Actinorhodin (**11**) in *S. coelicolor* erfolgt unter limitierten Wachstumsraten^[166] wie in der stationären Phase einer Kultur und wird durch den Mangel von Phosphat, Stickstoff und Eisen im Medium stimuliert.^[70, 167, 168] Unter natürlichen Bedingungen wird die Produktion dieses Naturstoffs im Übergangszustand vom vegetativen Wachstum zur Sporenbildung induziert. Während dieses Differenzierungsprozesses werden die älteren Teile des vegetativen Myzels durch programmierten Zelltod^[169] gezielt abgebaut und die freigesetzten Nährstoffe zum Aufbau des Luftmyzels „recycelt“. Die jüngeren Teile der Kolonie sind durch das kleine hydrophobe Protein Leupeptin, einem Inhibitor Trypsin-verwandter Enzyme, geschützt.^[65] Die Kopplung der Freisetzung des antibiotisch wirksamen Actinorhodins (**11**) an die Lyse des Substratmyzels könnte zum Schutz der freigesetzten Ressourcen vor Konkurrenten dienen. Actinorhodin (**11**) ist allerdings nur eine schwach antibiotisch wirksame Verbindung.^[36] Aufgrund seiner Struktur könnte auch dieser Naturstoff Metallionen über seine Carbonyl- und Hydroxylgruppen komplexieren.

Die Auswirkung verschiedener abiotischer Umweltfaktoren auf die Produktion des Polyketids Actinorhodin (**11**) in *S. coelicolor* wurde bereits untersucht. So wirkt eine erhöhte Salzkonzentration im Medium genauso wie bestimmte Metallionen dämpfend auf die Actinorhodinbiosynthese in *S. coelicolor*.^[73] Die Zugabe von Quecksilber-, Cadmium-, Kupfer-, Nickel- und Bleiionen in das Kulturmedium von *S. coelicolor* senkt die Menge des produzierten Actinorhodins^[128] (**11**), während Calcium^[128] in einem frühen Wachstumsstadium der Kultur und die Zugabe von Lanthanoid^[74]- und Chromionen^[128] in bestimmten Konzentrationen die Freisetzung von Actinorhodin (**11**) erhöht. Auch Kulturen von *S. coelicolor*, die einem pH-Schock ausgesetzt waren, produzieren verstärkt Actinorhodin (**11**).^[71]

Die gesteigerte Produktion von Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und γ -Actinorhodin (**57**) dieser beiden Naturstoffe veranlasst zu Mutmaßungen über die Funktion dieser Naturstoffe für *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress.

Ökologische Bedeutung der farbigen Verbindungen

Es ist möglich, dass die Synthese der farbigen Sekundärmetabolite unter Cobaltionenstress einen Fitnessvorteil bedeutet. Es ist unwahrscheinlich, dass die Synthese von komplexen Molekülen wie Undecylprodigiosin (**10**) und γ -Actinorhodin (**57**) Entsorgungswege für überschüssige Stoffwechselprodukte darstellen.^[46] Es ist daher fraglich, welche Bedeutung diese Verbindungen für den Organismus haben, in dem sie synthetisiert werden. Möglicherweise sind Actinorhodin (**11**) und die Prodigosine innerhalb der Population von *S. coelicolor* wirksam. Ein Beispiel für die Freisetzung eines bioaktiven Naturstoffs zur Durchsetzung gegen Vertreter der eigenen Art ist die Produktion von Colicin in *E. coli*:

Colicin produzierende Zellen von *E. coli* setzen dieses antibakterielle Toxin ein, um benachbarte Zellen ihrer eigenen Art abzutöten und die frei werdenden Ressourcen zu nutzen.^[170] Die Frequenz, mit der die Colicin-Produzenten in einer Population von *E. coli* auftreten, ist abhängig von ihrer Umgebung. Da die Produktion des Toxins Energie kostet, wachsen die toxinproduzierenden Zellen langsamer als Zellen, die diese Verbindung nicht herstellen. In einer Schüttelkultur (unstrukturierte Umwelt) werden die freigesetzten Colicin-Moleküle in der Lösung verteilt, damit ergibt sich kein Vorteil für die Colicin-Produzenten in der Population und sie werden verdrängt. Bei der Kultivierung auf einem Festmedium (strukturierte Umwelt) kommt es zu einer Anreicherung von Colicin um die produzierenden Zellen. Das Antibiotikum schafft eine Hemmzone, in der die Colicin-produzierenden Zellen alle Ressourcen für das eigene Wachstum ausbeuten und sich trotz ihrer verminderten Wachstumsrate etablieren können. Die Durchsetzung des toxinproduzierenden Stamms ist in einer strukturierten Umwelt begünstigt, nicht jedoch in einer unstrukturierten Umgebung.^[47]

Möglicherweise bewirkt die Synthese der beiden verschiedenen Polyketide für die farbigen Phänotypen von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress in einer strukturierten Umwelt ebenfalls einen Wachstumsvorteil, dann würden sich die pigmentierten Phänotypen gegenüber unpigmentierten Vertretern der eigenen Art durchsetzen. Die produzierten Naturstoffe könnten negative Auswirkungen auf Kolonien haben, die diese nicht herstellen. Diese Hypothese könnte durch die gemeinsame Kultivierung der verschiedenen farbigen Phänotypen auf festem Medium überprüft werden.

Alternativ ist auch eine Funktion innerhalb der produzierenden Kolonien vorstellbar: Die beiden farbigen Pigmente von *S. coelicolor* Actinorhodin (**11**) und Undecylprodigiosin (**10**) aktivieren ein putatives *soxR*-Regulon.^[171] Das *soxR*-Regulon steuert in *E. coli* die Antwort auf Superoxidstress. In *S. coelicolor* fehlen die Gene für die Stressantwort in dieser gemeinsam regulierten Gruppe von Genen, allerdings wurde ein entschiedener Einfluss der Pigmente von *S. coelicolor* auf die Genexpression und die Morphologie der Produzenten dieser Farbstoffe während ihrer späten Entwicklung festgestellt.^[171]

Wachstum der Phänotypen von *Streptomyces coelicolor* unter verschiedenen Kulturbedingungen

Das Wachstum der unterschiedlichen Phänotypen von *S. coelicolor* wurde unter drei verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht. Die gebildete Biomasse der verschiedenen Kulturen erlaubt Rückschlüsse auf die Fitness der einzelnen Phänotypen unter den getesteten Bedingungen. Das Wachstum von *S. coelicolor* auf cobalthaltigem Medium (wt+Co²⁺) war im Vergleich zum Wildtyp auf cobaltfreiem Medium (wt) stark eingeschränkt. Die ermittelten Werte für den Biomassezuwachs des roten Phänotyps (rot, Differenz zwischen Messwerten bis zu 50 %) und des Wildtyps unter Cobaltionenstress (wt+Co²⁺, Differenz zwischen Messwerten bis zu 40 %) schwankten im Verlauf des Versuchs (Abb. 58). Im Gegensatz dazu zeigten der blaue Phänotyp unter Cobaltionenstress sowie der Wildtyp auf unbelastetem Medium (wt) einen gleichmäßigen Anstieg der Biomassenentwicklung im Versuchsverlauf (Abb. 58). In der Proteinklassifizierung der *microarray*-Daten für den blauen Phänotyp unter Cobaltionenstress wurde für das hypothetische Produkt des signifikant erhöht exprimierten ORFs SCO7339 eine hohe Ähnlichkeit mit SgaA aus *S. griseus* festgestellt (Tab. 37). Das Protein SgaA unterdrückt Wachstumsschwankungen in *S. griseus* bei der Kultivierung unter erhöhter Osmolarität.^[172] Die Wachstumsschwankungen im Wildtyp auf Cobaltmedium und im roten Phänotyp könnten auf die Reaktion von *S. coelicolor* auf osmotischen Stress zurückgeführt werden, die zur Störung der physiologischen Abläufe in den Zellen führten und ohne die verstärkte Expression von SgaA nicht synchronisiert werden. Obwohl der blaue Phänotyp durch die Induktion von SgaA unter Cobaltionenstress gleichmäßiger wächst, bildet er nicht mehr Biomasse als der wt+Co²⁺ und der rote Phänotyp. Alle Phänotypen unter Cobaltionenstress bilden in Monokulturen die gleiche Biomasse. Obwohl der wt auf unbehandeltem Medium zum Abschluss des Versuchs doppelt so viel Biomasse wie die Phänotypen auf Cobaltmedium gebildet hatte, ist statistisch kein Unterschied zwischen allen Proben festzustellen. Das bedeutet, dass das Wachstum auf cobaltsulfathaltigem Medium keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen den Biomassezunahmen der verschiedenen Phänotypen induzierte.

Wenn alle Phänotypen auf unbehandeltem SFM-Medium kultiviert wurden, konnten ebenfalls keine statistisch relevanten Änderungen in der Produktion von Biomasse zwischen allen Phänotypen (wt, wt+Co²⁺, rot, blau) nachgewiesen werden. Der Messwert für den wt war in diesem Versuch geringfügig höher als die Messwerte für die Kulturen, die zuvor unter Cobaltionenstress kultiviert worden waren. Die Gegenwart von Cobaltionen in der vorangegangenen Kultivierung könnte das Myzel von *S. coelicolor* geschädigt haben und die Zellen erholten sich im untersuchten Zeitraum nicht vollständig.

Auch unter Einwirkung von UV-Strahlung entwickelten alle Phänotypen statistisch die gleiche Biomasse. Die pigmentierten Phänotypen entwickelten in diesem Versuch jeweils einen leicht erhöhten Messwert im Vergleich zum wt und dem wt+Co²⁺. Diese Abweichung war jedoch nicht signifikant. Möglicherweise bieten die Pigmente, die unter Cobaltionenstress in diesen Phänotypen gebildet worden waren, einen gewissen Schutz gegen UV-Strahlung.

4.4.2 Metabolitenprofile von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Die Charakterisierung der verschiedenen Phänotypen von *S. coelicolor* ergab, dass jeder dieser Phänotypen durch ein individuelles Metabolitenprofil gekennzeichnet war. Die Zugabe von Cobaltionen in das Kultivierungsmedium von *S. coelicolor* verschob die Verhältnisse der einzelnen Substanzen zueinander und induziert die Synthese zusätzlicher Verbindungen. Weiterhin bildeten die verschiedenen Phänotypen von *S. coelicolor* unterschiedliche Verbindungen, die nur in den einzelnen Phänotypen nachgewiesen werden konnten.

Analyse der flüchtigen Verbindungen von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress durch GC-MS

Die Kultivierung von *S. coelicolor* auf cobalthaltigem Medium löste gravierende Unterschiede im Duftprofil aus. Generell wurde die Terpenemission durch die Zugabe von Cobaltionen in das Kultivierungsmedium vermindert (Abb. 33). Eine Ausnahme davon stellte das Isozizaen (**37**) dar, das vom blauen Phänotyp auf cobalthaltigem SFM-Agar verstärkt emittiert wurde. Nur im roten Phänotyp konnten zusätzliche Verbindungen im Duft nachgewiesen werden.

Tab. 24: Beobachtete Substanzen aus dem Duft von *S. coelicolor* mit Angabe der relativen Abundanz des zugehörigen Signals in den einzelnen Phänotypen (- = nicht nachweisbar, +/- = in Spuren detektierbar, + = nachweisbar, ++ = mit hoher Intensität nachgewiesen) und des m/z-Verhältnisses der einzelnen Signale.

Substanz	wt	wt+Co ²⁺	rot	blau
40 Methylisoborneol	+	+/-	+/-	+/-
41 Methyl-8,10- <i>trans</i> -oktalin	+	+/-	-	-
5 Geosmin	++	+	+	+/-
37 Isozizaen	+	+	+	++
42 Germacren D	++	+/-	+/-	-
43 2-Tridecanon	-	-	+	-
44 Undecylpyrrol	-	-	+	-
S₁	+	-	-	-
S₂	+	-	-	-
S₃	+	-	-	-
S₄	+	-	-	-
38 Zizaen	+	-	-	-
S₆	+	-	-	-
S₇	+	-	-	-
S₈	+	-	-	-
45 Germacradienol	+	-	-	-

Die neuen Substanzen im Duft des roten Phänotyps konnten beide der Biosynthese des Undecylprodigiosin (**10**) zugeordnet werden. Tridecanon (**43**) könnte durch die Decarboxylierung der β -Ketosäure **67** am Protein RedM entstehen und Undecylpyrrolmoleküle (**44**) könnten nach der Reduktion seiner Vorstufe **66** durch RedK in der Biosynthese von Undecylprodigiosin (**6**)/Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) (Abb. 48) freigesetzt werden.

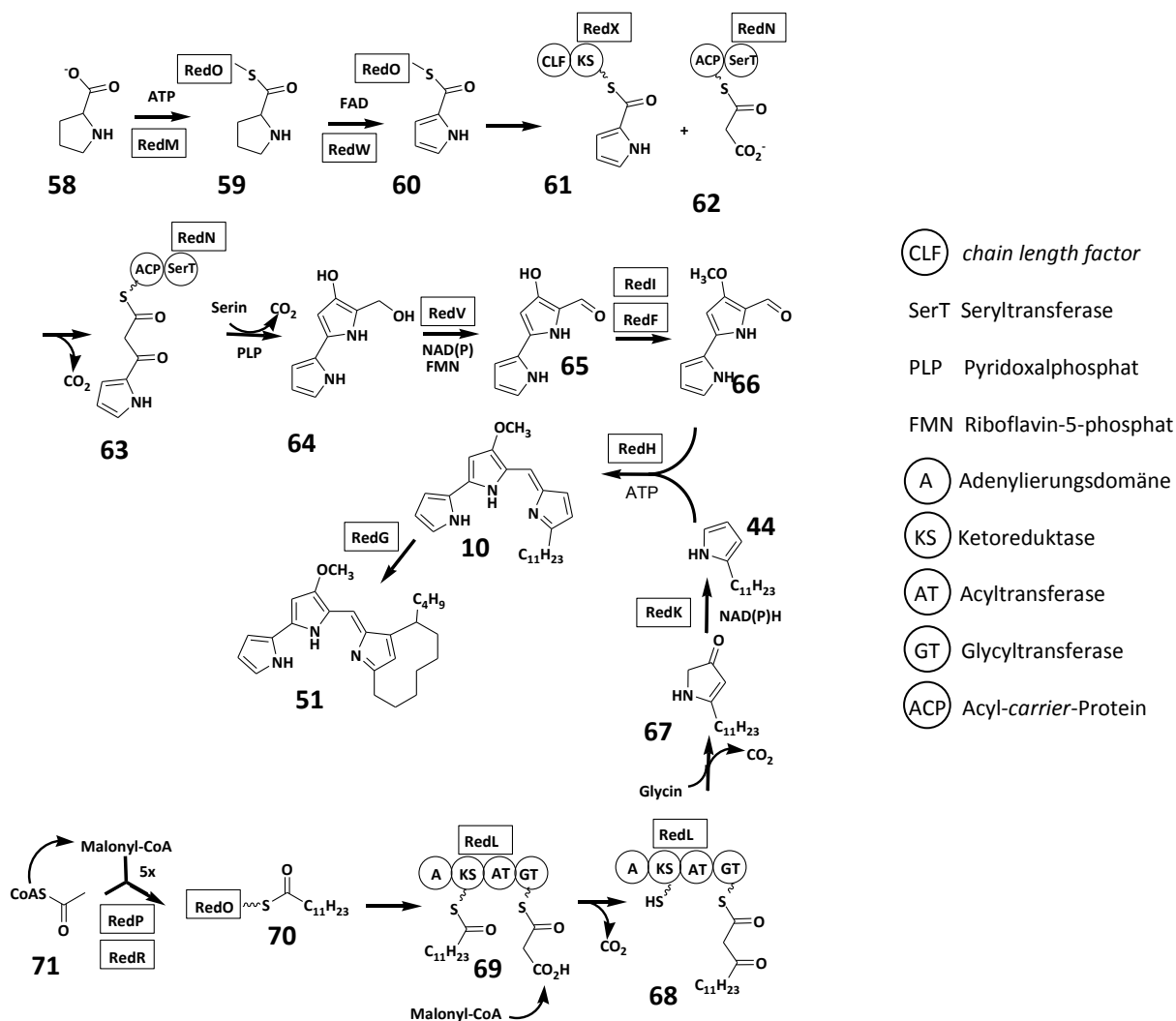


Abb. 48: Biosynthese von Undecylprodigiosin (10) und Butylcycloheptylprodigiosin (51).^[161]

Da keine Reduktion der Transkriptionsrate der Terpenzyklen in den Kulturen auf Cobaltmedium nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Regulation der Terpenemission zum Zeitpunkt der Probenahme auf Proteinebene vermutlich durch eine direkte Interaktion von Cobaltionen mit den verantwortlichen Enzymen. Cobaltionen können an Thiolgruppen von Cysteinen^[173] sowie an Histidin^[174] binden und damit *in vivo* mit der Aktivität einer Vielzahl von Enzymen interferieren. Weiterhin ist die Aktivität von Terpenzyklen vom Kofaktor Mg²⁺ abhängig.^[175, 176] Cobaltionen könnten diesen essentiellen Kofaktor verdrängen.^[154] Der Ionenradius von Co²⁺ liegt mit 82 pm in der gleichen Dimension wie Mg²⁺ mit 78 pm. Co²⁺ können daher Mg²⁺-Ionen ersetzen oder ihre Funktion im biologischen System nachahmen.^[156] Dann könnte die Enzymfunktion der Terpenzyklen blockiert werden. Erstaunlicherweise war die Isozycloheptylprodigiosinase des blauen Phänotyps nicht in ihrer Aktivität eingeschränkt, obwohl dieser Phänotyp auf cobalthaltigem Medium kultiviert wurde. Diese Beobachtung spricht gegen eine direkte Interaktion der Cobaltionen mit den Terpenzyklen. Die Isozycloheptylprodigiosinase des blauen Phänotyps könnte aber auch gegen den Effekt der Cobaltionen unempfindlich sein. Möglicherweise stellt Isozycloheptylprodigiosin (37) unter Stressbedingungen ein Signal dar, dass nur vom blauen Phänotyp ausgesendet wird.

HPLC-MS-Analyse des Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor*-Kulturen nach Cobaltionenstress

Die Analysen der Ethylacetatextrakte aus den vier untersuchten Phänotypen und der aus dem Kulturüberstand angereicherten Pigmente ergaben für jeden Phänotyp typische Chromatogramme mit wenigen Übereinstimmungen zwischen den ermittelten Metabolitenprofilen. Der wt+Co²⁺ und der rote Phänotyp bildeten mehr Verbindungen als der wt auf unbehandeltem Medium. Der blaue sowie der rote Phänotyp bildeten farbige Verbindungen, die in größeren Mengen nicht aus den Kulturen der anderen Phänotypen anzureichern waren. Anders als bei der Analyse der flüchtigen Verbindungen konnte die Induktion löslicher Verbindungen in jedem Phänotyp von *S. coelicolor* unter der Einwirkung von Cobaltionenstress beobachtet werden.

Tab. 25: Mit HPLC-MS-Analyse nachgewiesene Substanzen aus *S. coelicolor* mit Angabe der relativen Abundanz des Signals (- = nicht nachweisbar, +/- = in Spuren detektierbar, + = nachweisbar, ++ = mit hoher Intensität nachgewiesen) und des m/z-Verhältnisses der einzelnen Signale.

Substanz	wt	wt+Co ²⁺	rot	blau
46-48 Germicidin (m/z 183)	+	+	+	-
49/50 Germicidin (m/z 197)	+	+	+	-
10 Undecylprodigiosin	-	+/-	++	-
51 Butylcycloheptylprodigiosin	-	+/-	+/-	-
52 Actinorhodinsäure	-	-	-	++

Eine in diesem Versuch nachgewiesene Übereinstimmung aller vier Phänotypen von *S. coelicolor* war die Produktion von Germicidin (m/z 183 **46-48** und m/z 197 **49/50**). Germicidin wurde erstmalig als autoregulatorisches Polyketid von *Streptomyces viridochromogenes* beschrieben, das die Keimung der eigenen Sporen hemmt. Dieses Molekül wird von auskeimenden Sporen dieses Stammes freigesetzt und auch bei der Kultivierung in flüssigem Medium produziert.^[142] Die Biosynthese dieser Verbindung wurde in *S. coelicolor* durch die Nutzung der Genomdaten aufgeklärt.^[50] Da *S. coelicolor* in flüssigen Medien keine Sporen bildet^[177], ist folglich die Freisetzung von Germicidin (m/z 183 **46-48** und m/z 197 **49/50**) ebenfalls mit der Kultivierung in Flüssigmedium verbunden, denn für diesen Versuchsabschnitt wurden Flüssigkulturen von *S. coelicolor* extrahiert.

Im roten Phänotyp gelang die Identifikation der bekannten roten Farbstoffe von *S. coelicolor* Undecylprodigiosin (**10**) und Butylcycloheptylprodigiosin (**51**). Im Wildtyp unter Cobaltionenstress wurden ebenfalls geringe Mengen Undecylprodigiosin (**10**) gebildet. Dieser Phänotyp zeigte keine verstärkte Pigmentierung. Für die typische Färbung des Myzels und des Mediums des blauen Phänotyps ist die extrazelluläre Lactonform des Actinorhodins (γ -Actinorhodin **57**) verantwortlich.^[165]

Differentielle Genexpression in *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Die Metabolitenprofile der einzelnen Phänotypen von *S. coelicolor* wurden durch die Transkriptomanalyse ergänzt, um spezifische Reaktionen der einzelnen Phänotypen auf den Cobaltionenstress auch auf der Ebene der Genregulation zu untersuchen und die Induktion von Biosynthesegenen für nicht nachweisbare Sekundärmetabolite unter Cobaltionenstress zu überprüfen. Nach der erfolgreichen Etablierung der *microarray*-Technik ergab die Auswertung der Transkriptomdaten, dass die beobachteten Veränderungen des Metabolitenprofils sich nur bruchstückhaft in den Expressionsverhältnissen der *microarray*-Datensätze widerspiegeln.

Auch an den Ergebnissen des *microarrays* ist abzulesen, dass in jedem Phänotyp unterschiedliche Gene unter Cobaltionenstress induziert wurden. Die Anzahl der differentiell regulierten Gene war in den verschiedenen Phänotypen unterschiedlich hoch (S. 61). Der blaue Phänotyp induzierte unter Cobaltionenstress 18 ORFs des Sekundärmetabolismus (Tab. 22, Tab. 23), während der rote Phänotyp unter Cobaltionenstress zwei potentielle Gene des Sekundärmetabolismus stärker exprimerte (Tab. 20, Tab. 21). Im Wildtyp unter Cobaltionenstress wurde die Expression eines putativen Genprodukts unter Cobaltionenstress induziert (S. 66). Allerdings ließen im Metabolitenprofil sich in den Phänotypen unter Cobaltionenstress keine gravierenden Unterschiede in der Anzahl der gebildeten Substanzen beobachten.

Diese Beobachtung könnte verschiedene Gründe haben:

1. Zeitpunkt der Probenahme

Die Daten über die veränderte Genexpression lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die Produktion von Naturstoffen in *S. coelicolor* zu, weil die Induktion der Biosynthese-Cluster zum Zeitpunkt der Probenahme bereits abgeschlossen war und bereits die Freisetzung der produzierten Naturstoffe, z. B. der Terpene, erfolgte. Die Freisetzung von Geosmin (**5**) in Kulturen von *Streptomyces tendula* wurde zeit- und medienabhängig untersucht und schon nach dem dritten Kulturtag nachgewiesen.^[24] In *S. avermitilis* wurde ebenfalls die Geosminemission dokumentiert, diese war nach dem vierten Kulturtag zu beobachten und hielt über den gesamten Versuchsverlauf (10 d) an.^[178] Mit den Ergebnissen dieser Studien ist davon auszugehen, dass der Zeitpunkt zur Probenahme für die RNA aus *S. coelicolor* am siebten Kulturtag für den Nachweis der differentiellen Genregulation verschiedener Terpenzyklen zu spät gewählt war.

Die Induktion der Actinorhodin- und Prodigiosin-Biosynthese war durch die Aktivierung von *actIII* und *redD* nachvollziehbar, allerdings ist die Genexpression der gesamten Gencluster nicht zu beobachten. Da für die Genexpressionsstudie nur ein Probenahmezeitpunkt geprüft wurde, ist anzunehmen, dass die Induktion der Transkription bereits abgeschlossen war. Die Probenahme erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt, da erst dann die vollständige Ausdifferenzierung in der Farbgebung und im Duftspektrum^[179] der Phänotypen zu beobachten war und damit sichergestellt wurde, den farbigen Phänotyp in Reinkultur erhalten zu haben. Durch das Auftreten der gemischten Phänotypen bestand die Möglichkeit, Verunreinigungen eines anderen Phänotyps in die RNA-Proben einzuführen. Die nachgewiesenen Abweichungen der Genexpression der *actIII* (SCO5086, ORF der Ketoacylreduktase ActIII, Tab. 23) und *redD* (SCO5877, ORF des Transkriptionsregulators RedD (Tab. 21), scheinen wegen ihrer Beobachtung in der späten Wachstumsphase nach der Produktion von Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und γ -Actinorhodin (**57**) dauerhafte Veränderungen des Genexpressionsprofils im roten und blauen Phänotyp zu sein. Die Induktion des

act und *red*-Genclusters ließ sich einer *microarray*-Studie^[143] nachweisen, deren Probenmaterial zu einem früheren Zeitpunkt der Kultivierung genommen worden war, die Induktion des *red*-Clusters erfolgte in dieser Studie bereits nach 20 h Kultur und der *act*-Cluster wurde nach 40 h aktiviert. In dieser Studie wurden 1100 differentiell um den Faktor 2 regulierte Gene erfasst. Allerdings wurden diese Daten über neun verschiedene Zeitpunkte erhoben, daher lässt sich die Zahl der differentiell regulierten Gene schwer mit den Daten dieser Arbeit vergleichen. Die Daten für die einzelnen Messpunkte fehlen in dieser Publikation. Mit der Annahme, dass zu jedem der untersuchten Zeitpunkte gleich viele Gene reguliert worden wären, ist von durchschnittlich 122 signifikant um den Faktor 2 differentiell regulierten Genen auszugehen. Bei der Analyse des Transkriptionsprofils von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress wurden insgesamt in allen Phänotypen sieben um mindestens den Faktor 2 differentiell regulierten Gene nachgewiesen.

2. Schwache Differenzen in der Genregulation

Im Vergleich mit anderen Transkriptom-Studien^[143, 144, 179] in Streptomyceten sind die mit den PCR-*microarrays* der *Streptomyces microarray resource* ermittelten Abweichungen relativ gering. Die *microarray*-Studien mit Oligo-*microarrays* nach Huang^[143] wurden mit Sonden von 20-25 bp Länge durchgeführt. Mit diesem *microarray* wurde die maximale Genregulation um den Faktor $\geq 5,6$ nachgewiesen.^[143] Bei weiteren Anwendungsbeispielen der *microarray*-Technik zum Vergleich verschiedener Streptomycetenarten wurden Abweichungen in der Genregulation um den Faktor 3^[144] oder 4^[180] nachgewiesen. Diese Versuche sind jedoch nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar, da sie zudem die Genexpressionsunterschiede zwischen mehreren Arten untersuchten. Mit dem Einsatz der PCR-*microarrays* der *Streptomyces microarray resource* beim Studium einer $\Delta bldA$ -Mutante^[145] erfolgte der Nachweis geringer Abweichungen in der Genregulation von *S. coelicolor*. In dieser Veröffentlichung wurde auch der Faktor 1,5 als Grenze für die am stärksten regulierten ORFs angegeben. Dieser Faktor wurde auch in dieser Arbeit gewählt. Möglicherweise lassen sich die Abweichungen des Transkriptlevels zur Genregulation in *S. coelicolor* mit den langen Sonden des PCR *microarrays* der *Streptomyces microarray resource* nicht ideal erfassen, da die Sondenlänge ein ausschlaggebender Faktor für die Bindungen der fluoreszenzmarkierten cDNAs während der Hybridisierung sein kann.^[147] Zusätzlich kann die mögliche biologische Heterogenität innerhalb der einzelnen Phänotypen die Differenzen der Genexpression zwischen dem wt und den cobaltionengestressten Phänotypen abschwächen. Der Nachweis geringer Anzahl der differentiell regulierten Gene im Wildtyp und im roten Phänotyp unter Cobaltionenstress im Vergleich zum blauen Phänotyp könnte im asynchronen Wachstum dieser Kulturen liegen. Der Wildtyp (wt+Co²⁺) und der rote Phänotyp zeigten beim Wachstum auf cobalthaltigem Medium eine ungleichmäßige Biomasseentwicklung, während beim blauen Phänotyp diese Schwankungen nicht zu beobachten waren. Der blaue Phänotyp zeigte in diesem Versuch durch die Expression eines hypothetischen homologen Proteins zu SgaA eine gleichmäßige Biomasseentwicklung. Das Protein SgaA schützt *S. griseus* vor Wachstumsstörungen bei der Kultivierung unter hoher Osmolarität.^[172] Die Wachstumsstörungen können Rückschlüsse auf uneinheitliche Genregulation innerhalb des Wildtyps und des roten Phänotyps unter Cobaltionenstress zulassen. Diese hypothetischen Schwankungen im Transkriptlevel einzelner Gene im roten Phänotyp und im Wildtyp auf Cobaltmedium könnten die Differenzen zum Transkriptlevel dieser Gene im Wildtyp abschwächen.

3. Unzutreffende Annotation

Die Funktion der differentiell regulierten ORFs lässt sich möglicherweise nicht korrekt zuweisen, da die Annotation der ORFs aus dem *S. coelicolor*-Sequenzierungsprojekt des *Sanger Centers* aufgrund von Sequenzhomolgien nicht mit der tatsächlichen Funktion in der Zelle korrelieren.

Der ORF für die Isozizaenzyklase SCO5222 ist beispielsweise als putative Lyase annotiert. Es ist denkbar, dass sich die Induktion von Verbindungen auf der Transkriptebene widerspiegelt, sich diese Daten aber aufgrund der fehlenden Strukturinformationen der gebildeten Produkte und der unaufgeklärten Biosynthese nicht mit Sequenzinformationen vernetzen lassen. Es ist daher nötig, zukünftig die von *S. coelicolor* produzierten Substanzen strukturell zu charakterisieren und sie geeigneten Biosynthesegenen zuzuordnen.

Differentielle Genregulation im Sekundärmetabolismus des Wildtyps nach Cobaltionenstress

Im wt+Co²⁺ wurde ein ORF (SCO3245) mit Funktion im Sekundärstoffwechsel unter Cobaltionenstress um den Faktor 1,4 induziert. Die Sequenz dieses ORFs zeigte eine Homologie zur Salicylat-Hydroxylase aus *Sphingomonas sp. AJ1* (42 % Übereinstimmung bei überlappenden 320 AS). Die Salicylat-Hydroxylase ist eine Monooxygenase, die die Umsetzung von Salicylat zu Catechol katalysiert. Catechol ist ein bekannter Chelator von Bakterien.^[181]

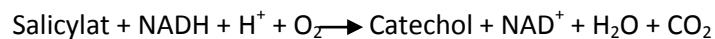


Abb. 49: Katalysierte Reaktion der Salicylat-Hydroxylase.

Diese Monooxygenase dient dem Abbau von Naphthalen oder der Verstoffwechslung von Salicylat als Kohlenstoffquelle. Da keine der beiden Verbindungen dem Kulturmedium zugesetzt wurde und die Homologie dieses putativen Genprodukts zur Salicylat-Hydroxylase aus *Sphingomonas sp. AJ1* relativ gering, könnte es sich um eine Monooxygenase handeln, die in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress den Abbau einer aromatischen Verbindung katalysiert und möglicherweise damit Catechol zur Komplexbildung von Cobaltionen freisetzt.

Differentielle Genregulation im Sekundärmetabolismus des roten Phänotyps nach Cobaltionenstress

Im roten Phänotyp wurden vier ORFs aus dem Sekundärmetabolismus gegenüber dem wt signifikant reguliert (Tab. 20). Die Transkription einer putativen Vorstufe (SCO0388) wurde im roten Phänotyp unter Cobaltionenstress um den Faktor 1,1 induziert. Der Abbau von Heparin durch *S. coelicolor* ist bisher unbekannt. Allerdings die Homologie zur Heparinase-III-Vorstufe aus *Cytophaga heparina* relativ gering (23 % Übereinstimmung bei überlappenden 421 AA). Wenn dieses putative Protein eine ähnliche Reaktion wie eine Heparinase katalysiert, ist eine Funktion im Stoffwechsel anderer Polysaccharide wahrscheinlicher. Der ORF SCO1275, der im roten Phänotyp mit verminderter Häufigkeit im Vergleich zum Wildtyp in mRNA umgesetzt wurde, korrespondiert mit der Halogenase PrnC aus der Biosynthese von Pyrrolnitrin in *P. fluorescens* (41 % Übereinstimmung bei 541 überlappenden AS). Das Transkriptlevel dieses ORFs war im roten Phänotyp um 10 % niedriger als im wt, dies könnte ein Indiz sein, dass der Wildtyp eine chlorierte Verbindungen produzieren, die nicht im roten Phänotypen zu finden ist. Es gibt eine Reihe chlorierter Sekundärmetabolite aus anderen Streptomyceten, z. B. Chloramphenicol^[182] aus *Streptomyces venezuelae*, Pyrroindomycin^[183] aus *Streptomyces rugosporus* oder Chlorothricin^[184] aus *Streptomyces antibioticus*. Sollte dieses Enzym in

S. coelicolor die gleiche Funktion ausüben wie PrnC in *P. fluorescens*, könnte ein noch unbekannter chlorierter Naturstoff im Wildtyp von *S. coelicolor* synthetisiert werden. Aus *S. coelicolor* sind bisher keine halogenierten Sekundärmetabolite bekannt. Im Extrakt des wt ließen sich durch LC-MS-Analyse keine Substanzen nachweisen, die nicht auch in den Chromatogrammen des roten Phänotyps zu beobachten waren. Allerdings ist zu beachten, da die Ethylacetat-Extraktion nicht für alle potentiell gebildeten Naturstoffe die geeignete Anreicherungsmethode ist. Das blaue Polyketid Actinorhodinsäure (**52**) aus dem blauen Phänotyp konnte nicht in den Ethylacetat-Extrakten nachgewiesen werden. Zusätzlich könnte die vom Wildtyp gebildete Menge dieser Verbindungen zu gering sein, um sie im LC-MS nachzuweisen oder die Methode ist nicht geeignet, um diese Verbindung zu erfassen.

Im roten Phänotyp wird auch die genetische Information für ein putatives Enzym um den Faktor 0,8 geringer als im wt translatiert, das vom *Sanger Center* als Anthranilat-Synthase (44 % Übereinstimmung bei 492 überlappenden AS) annotiert wurde. Anthranilat (**73**) ist in Pflanzen^[185] und Bakterien^[186] eine Vorstufe für die Synthese aromatischer Sekundärmetabolite. Diese Funktion könnte das hypothetische Enzym auch in *S. coelicolor* erfüllen.

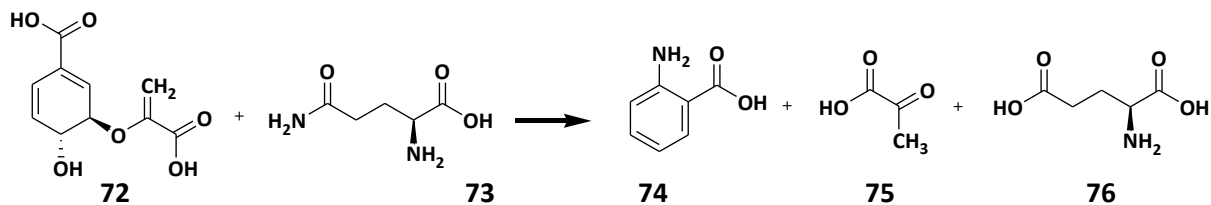


Abb. 50: Katalysierte Reaktion der Anthranilat-Synthase: Umsetzung von Chorisat (71) mit Glutamin (72) zu Anthranilat (73), Pyruvat (74) und Glutaminsäure (76).

Von den signifikant regulierten ORFs, die für Polyketide kodieren, wurde der Transkriptionsregulator *redD* (SCO5877) für die Synthese von Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) unter Cobaltionenstress im roten Phänotyp um den Faktor 1,3 verstärkt expremiert (Tab. 21). Die Expression von *redD* führt über die nachfolgende Aktivierung des *red*-Genclusters zur Produktion von Undecylprodigiosin (**10**) im Myzel von *S. coelicolor* (Abb. 51)^[187]. Die Induktion der verstärkten von Undecylprodigiosin- und Butylcycloheptylprodigiosinsynthese im roten Phänotyp ließ sich damit auf der Transkriptionsebene beobachten.



Abb. 51: Schematische Darstellung des *red*-Clusters.

Differentielle Genregulation im Sekundärmetabolismus des blauen Phänotyps nach Cobaltionenstress

Im blauen Phänotyp wurden mehr Gene des Sekundärmetabolismus signifikant reguliert als in den beiden anderen Phänotypen. In diesem Phänotyp wurden mehrere aufeinanderfolgende ORFs unter Cobaltionenstress reguliert, so dass Biosynthese-Cluster vermutet werden können (Tab. 22). Ein hypothetischer Cluster beinhaltet ORFs verstärkt für ein Genprodukt mit Homologie zur Hopan-/Squalen-Synthase (SCO6764 mit 52 % Übereinstimmung bei 620 überlappenden AS) und einer Squalen-/Phytoen-Dehydrogenase (SCO6762 mit 30 % Übereinstimmung in 512 überlappenden AS). Möglicherweise synthetisierten die hypothetischen Genprodukte dieser Sequenzen ein Hopanoid im blauen Phänotyp unter Cobaltionenstress. In Prokaryonten dienen diese pentazyklischen

Triterpenoid-Lipide (Analoge der eukaryotischen Steroide) als stabilisierende Elemente in der Zellmembran.

Unter Metallionenstress wurden im blauen Phänotyp eine Gruppe von ORFs um den Faktor 0,8 herunterreguliert. Das hypothetische Gencluster aus den ORFs SCO0382, SCO0383 und SCOSCO389 könnte aufgrund von Sequenzhomologien zu Genen aus der Biosynthese von Alginat und bakteriellen Exopolysacchariden an der Biosynthese eines Exopolysaccharides in *S. coelicolor* eingebunden sein.

Nach ihrer funktionellen Annotation fallen noch verschiedene signifikant differentiell regulierte ORFs in die Gruppe der Polyketidbiosynthesegene (Tab. 23). Die Induktion von ORFs (SCO5892, SCO5878, SCO5898), die zum *red*-Gencluster gehören, legt die Biosynthese von Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) im blauen Phänotyp nahe, allerdings lassen sich diese Verbindungen in der LC-MS-Analyse im Gegensatz zum roten Phänotyp nur in Spuren nachweisen. Aus dem Cluster zur Biosynthese von Actinorhodin (**11**) wurde *actIII* (SCO5086) um den Faktor 1,3 signifikant erhöht exprimiert.

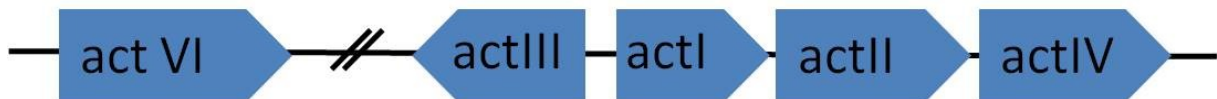


Abb. 52: Schematische Darstellung des *act*-Clusters.

Das Genprodukt von *actIII* ist eine Ketoacylreduktase. Dieses Enzym katalysiert die Modifikation von funktionellen Gruppen am Polyketidrückgrat des Actinorhodins.

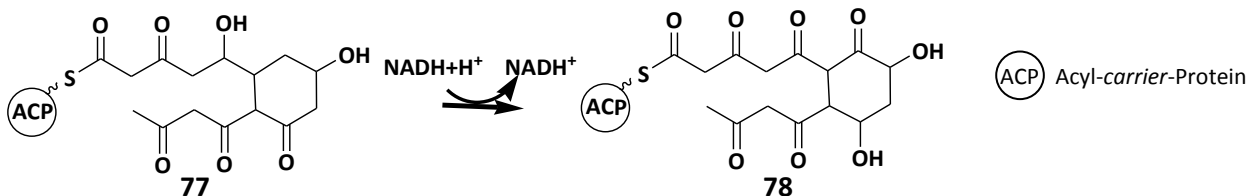


Abb. 53: Durch *actIII* katalysierte Reaktion in der Actinorhodinbiosynthese.

Hypothesen zur Ausbildung der farbigen Phänotypen von *Streptomyces coelicolor*

Undecylprodigiosin (**10**)/Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und γ -Actinorhodin (**57**) gehören zur Klasse der Polyketide. Diese Verbindungen werden aus Malonyl-CoA aufgebaut. Das Enzym zur Synthese von Malonyl-CoA wird im roten wie auch im blauen Phänotyp unter Cobaltionenstress verstärkt transkribiert (Tab. 36, Tab. 37). Dieses Enzym stellt Malonyl-CoA für die Synthese von Polyketiden her. Die Synthese von Undecylprodigiosin (**10**)/Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) erfolgt beim Eintritt in die Transitionsphase des Wachstums der Kulturen, während die Induktion der Biosynthese von Actinorhodin (**11**) nach Erreichen der stationären Phase eingeleitet wird.^[143, 188] Die Biosynthese dieser beiden Verbindungen könnte unter Cobaltionenstress durch verschiedene Transkriptionsregulatoren kontrolliert werden. In den Datensätzen aus dem *microarray*-Experiment, wurde die differentielle Regulation verschiedener putativ regulatorisch wirksamer ORFs in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress nachgewiesen. Im roten Phänotyp wurden die ORFs SCO0523 (AsnC-Familie), SCO6144 und SCO6464 (Sir2-Familie) unter Cobaltionenstress signifikant um den Faktor 1,5 verstärkt exprimiert, eine regulatorische Wirkung auf die Transkription haben könnten (Tab. 39). Der ORF SCO6464 könnte für ein Protein aus der Sir2-Familie kodieren. Diese Transkriptionsregulatoren sind in vielen Organismen konserviert und nehmen eine Schlüsselstellung bei der Stressantwort ein, indem sie die Expression von Genomabschnitten verhindern.^[189] Es könnte im roten Phänotyp zum

Ausbleiben der Bildung von Actinorhodin (**11**) kommen, da die Transkription durch den putativen Regulator aus der Sir2-Familie (SCO6464) verhindert wird und Malonyl-CoA für Actinorhodinbiosynthese durch die verstärkte Produktion von Undecylprodigiosin (**10**) und Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) verbraucht wird. Dieser Hypothese folgend könnte die Ausbildung des blauen Phänotyps durch die nachstehende Überlegung begründet werden: Im blauen Phänotyp werden ebenfalls mehrere putative Transkriptionsregulatoren unter Cobaltionenstress um den Faktor 1,5 verstärkt exprimiert (Tab. 40): SCO7137 (LuxR-Familie), SCO1094 (TerR-Familie), SCO6119 (AraC-Familie), SCO2378 (MerR-Familie) und SCO6130 (Homologie zu AbaA). Die Transkriptionsregulatoren aus der LuxR-, TerR-, MerR-Familie unterdrücken die Transkription von Genen, bis sie ein Effektor-Molekül binden und von der DNA dissoziieren. Der Vertreter der AraC-Proteine und das homologe Protein zu AbaA sind potentielle Transkriptionsaktivatoren. Der Locus AbaA ist in *S. coelicolor* als Aktivator des Sekundärmetabolismus beschrieben worden.^[149] Im blauen Phänotyp unterbleibt die gesteigerte Expression des ORFs SCO6464, der den potentiellen Sir2-Transkriptionsregulator kodiert. Die Aktivierung des Sekundärmetabolismus durch SCO6130 könnte dann die Induktion der Actinorhodinbiosynthese und folglich die Ausbildung des blauen Phänotyps von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress bewirken (Abb. 54).

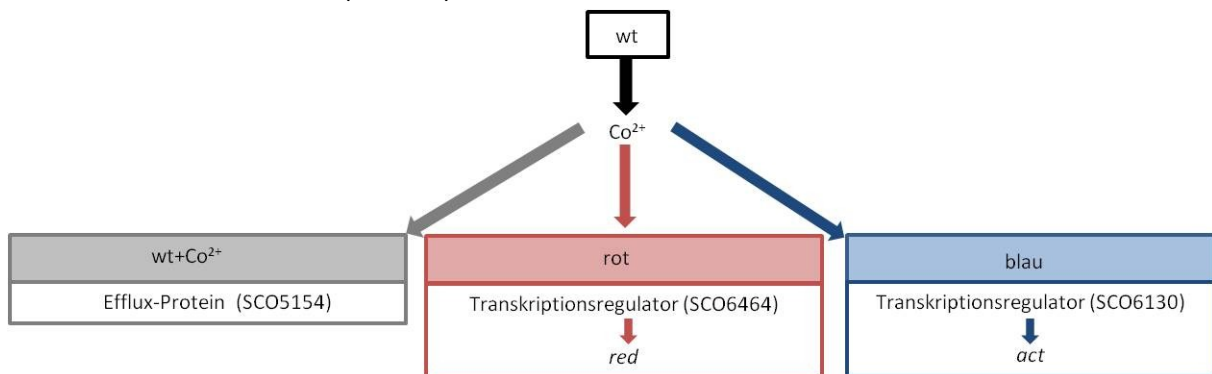


Abb. 54: Hypothese zur Entstehung der verschiedenen Phänotypen auf Grundlage der *microarray*-Resultate.

Mögliche Ursachen für das gleichzeitige Auftreten der verschiedenen Phänotypen nach Cobaltionenstress

Die Kultivierung von *S. coelicolor* auf festem Medium unter Cobaltionenstress führte zu unterschiedlichen Reaktionen auf diesen Umweltfaktor innerhalb der untersuchten Kultur. Die Ausbildung der chemisch differenzierten Phänotypen könnte eine Strategie zur Erhöhung der Diversität innerhalb einer Bakteriengemeinschaft sein, die den Fortbestand der Art unter Stressbedingungen gewährleistet. Die in dieser Arbeit gewählte Kultivierung von *S. coelicolor* scheint die geeignete Umgebung zu sein, um die differentielle Produktion von Sekundärmetaboliten zu charakterisieren. Die Abweichungen zwischen einzelnen Zellen einer bakteriellen Population werden in konventionellen Studien von mikrobiellen Flüssigkulturen mit mehreren Millionen von Zellen maskiert.^[190] Durch die Nutzung von Festmedien (strukturierte Umwelt) und die Selektion nach optischen Charakteristika ließ sich die Heterogenität innerhalb einer Population von *S. coelicolor* in dieser Arbeit nachweisen.

Unter natürlichen Bedingungen wird die Produktion von antibiotisch wirksamen Naturstoffen während des Übergangs vom vegetativen Wachstum zur Sporenbildung induziert. Die morphologische Differenzierung und die Synthese von Sekundärmetaboliten sind zwei parallel ablaufende Prozesse, die wahrscheinlich durch gleichartige Signale gesteuert werden.^[191] Die Induktion der beiden farbigen Pigmente Actinorhodin (**11**) und Undecylprodigiosin (**10**) in *S.*

coelicolor durch den gleichen Umweltfaktor konnte bereits bei der Kultivierung von *S. coelicolor* auf nährstoffarmem Medium durch die Simulation der Zellwandhydrolyse durch den Zusatz von N-Acetylglukosamin in das Kulturmedium gezeigt werden.^[102] Andererseits wurde in Mutanten von *S. coelicolor* mit gestörter Osmoregulation eine massive Überproduktion von Actinorhodin (**11**) und Undecylprodigiosin (**10**) festgestellt.^[179] Wahrscheinlich steht die Produktion dieser beiden Naturstoffe in engem Zusammenhang mit der Stressantwort von *S. coelicolor*. In diesen Studien wird die Produktion von Actinorhodin (**11**) und Undecylprodigiosin (**10**) als Reaktion auf einen Umweltreiz in einer Kultur von *S. coelicolor* beschrieben. Im Gegensatz dazu werden diese Pigmente von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress in dieser Arbeit von verschiedenen chemisch differenzierten Phänotypen von *S. coelicolor* (Abb. 55) produziert.

Die unterschiedliche Reaktion auf den gleichen Umweltfaktor ist gegebenenfalls ein Spiegel für die Heterogenität innerhalb der untersuchten *S. coelicolor*-Population. Die Ausbildung einzelner Phänotypen spricht für eine Plastizität innerhalb einer untersuchten Population von *S. coelicolor*. Die Basis dieser phänotypischen Variabilität kann theoretisch auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen.

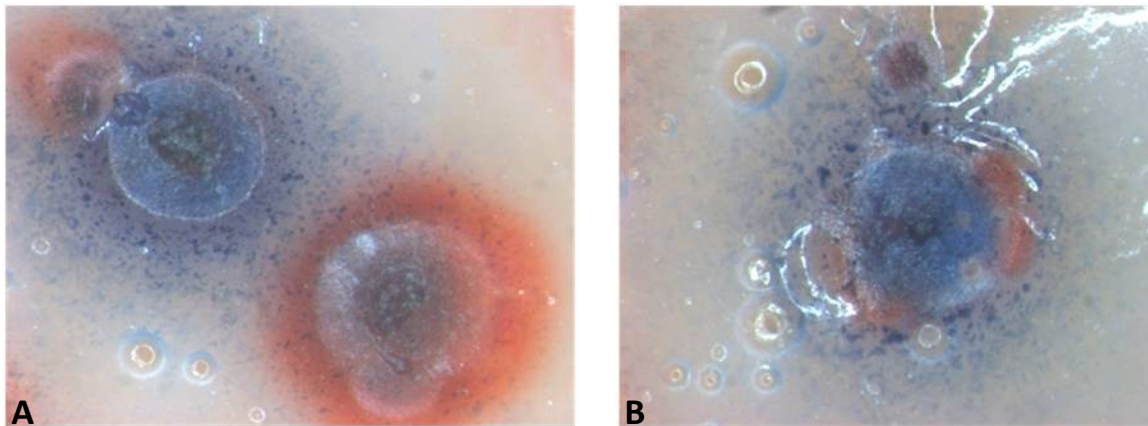


Abb. 55: Fotos der farbigen Phänotypen unter Cobaltionenstress, (A) Einzelkolonien des roten und des blauen Phänotyps, (B) blaue Kolonie mit Produktion der roten Farbstoffe Undecylprodigiosin (**10**) /Butylcycloheptylprodigiosin (**51**).

Hypothese 1: Stochastische Fluktuation der Genexpression in Streptomyces coelicolor unter Cobaltionenstress

Möglicherweise sind stochastische Fluktuationen in der Proteinexpression die Grundlage der beobachteten phänotypischen Varianz von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress. Genetisch identische Zellen können unter den gleichen Umweltbedingungen signifikante Abweichungen in ihren molekularen und ihren phänotypischen Charakteristika aufweisen. Diese stochastischen Abweichungen in der Genexpression könnten die nötige Flexibilität garantieren, die zur Anpassung an plötzlich auftretenden Stress vorteilhaft ist.^[192] Grundlegende Kontrollmechanismen der Zellfunktion können zu jedem Zeitpunkt des Wachstums verschieden aktiviert sein. Da in einer Zelle regulatorische Proteine nur in geringer Anzahl vorhanden sind, können Abweichungen in der Kopienzahl drastische Effekte bei der Aktivierung der Transkription haben.^[193] Es ist denkbar, dass geringe Unterschiede bei der Expression von Regulatormolekülen in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress auftreten und zu den verschiedenen Phänotypen mit differentieller Produktion

von Sekundärmetaboliten führen. Mit den natürlichen Schwankungen bei Transkriptionskontrollen ist es möglich, dass die Aktivierung eines bestimmten Promotors unter Cobaltionenstress in einzelnen Zellen von *S. coelicolor* möglich war und in einem anderen Teil der Population nicht erfolgen konnte und daraus die Ausbildung der unterschiedlichen Phänotypen resultierte.

Hypothese 2: Heterologe Subpopulationen von Streptomyces coelicolor

Der Versuch zur chemischen Differenzierung von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress wurde mit Kulturen aus Sporenlösungen gestartet. Möglicherweise enthielt die Sporenlösung mehrere verschiedene Subpopulationen von *S. coelicolor*. Eine bakterielle Spezies wird anhand ihrer charakteristischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften sowie der Übereinstimmung ihrer DNA-Sequenz definiert. Allerdings können diese Kriterien unzureichend sein, da bei der DNA-DNA-Hybridisierung 30 %^[194] und bei der Sequenzierung der 16S rRNA Gene 3 % Differenz^[195] zulässig sein, um die Speziesdefinition zu erfüllen. Bei Vergleich der beschreibenden Artenzahlen stehen 4500 prokaryontische Spezies^[196] über einer Million Eukaryonten^[197] gegenüber, obwohl die Prokaryonten als phylogenetisch ältere Gruppe länger zu evolutionären Anpassungen gezwungen waren. Daher scheint die bisherige Artdefinition für Prokaryonten ungenügend zu sein. Möglicherweise beinhaltete die untersuchte Population von *S. coelicolor* mehrere Subspezies, die unter Cobaltionenstress hervortreten. Die OSMAC-Theorie^[78, 79] könnte einen weiteren Hinweis zur Existenz gemischter Population von naturstoffproduzierenden Organismen geben. Es ist möglich, durch veränderte Kulturbedingungen aus einem bekannten Produzenten eines Naturstoffs unbekannte Verbindungen zu isolieren.^[77, 79] Unter den neuen Kulturbedingungen könnte eine andere Subpopulation begünstigt werden, die auf Grundlage von genetischen Abweichungen ein anderes Metabolitenprofil produziert.^[47] Wenn dieser Gedanke weiter geführt wird, produzieren verschiedene Subpopulationen die einzelnen Naturstoffe, die aus einem Organismus nachgewiesen wurden. Die Annahme, dass alle Zellen dieses Organismus das gleiche Potential zur Biosynthese dieser Verbindungen besitzen, würde aus der durch die Analyse der gemischten Subpopulationen resultieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen aus diesem Blickwinkel nahe, dass es in der untersuchten Population mindestens drei Subpopulationen gab, die unter der Art *S. coelicolor* zusammengefasst wurden. Eine Population produziert unter Cobaltionenstress γ -Actinorhodin (**57**) (blau), eine weitere Population produziert Undecylprodigiosin (**10**) und Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) (rot) und die dritte Population (wt+Co²⁺) produziert keine erhöhte Menge der beiden Verbindungen. Die Existenz dieser Subpopulationen könnte durch den Vergleich der Genomsequenzen der chemisch differenzierten Subpopulationen bewiesen werden.

Selbst in einer isogenen Population von Organismen können Individuen enthalten sein, die sich durch verschiedene DNA-Methylierungsmuster auszeichnen. Die epigenetische Regulation der Genexpression steuert Interaktionen zwischen DNA und Proteinen durch die Adenin-DNA-Methylierung^[198]. Aufgrund eines unterschiedlichen DNA-Methylierungsmusters innerhalb der Kultur von *S. coelicolor* könnte die Interaktion der DNA mit Transkriptionsfaktoren unter Cobaltionenstress unterschiedlich sein und so die Ausbildung der verschieden farbigen Phänotypen erklären.

Hypothese 3: Entstehung der verschieden pigmentierten Phänotypen durch Mutationen

Allgemein scheinen Streptomyceten einer genetischen Instabilität zu unterliegen, da Mutationen mit einer Frequenz von mehr als 10^{-3} auftreten. Spontane Abweichungen der DNA-Sequenz kommen besonders häufig in den Außenbereichen der Chromosomen vor und beeinflussen daher viele phänotypische Charakteristiken wie die Zelldifferenzierung und den Sekundärmetabolismus. Diese Bereiche des Genoms unterliegen unter physiologischem Stress häufig umfassenden Deletionen und Genamplifikationen.^[199] Mutationen im Genom können daher Abweichungen in der Erbinformation hervorrufen und ein Grund für das Auftreten der farbigen Phänotypen unter Cobaltionenstress sein. Zusätzlich wirkten Cobaltionen in verschiedenen Experimenten schwach mutagen.^[200] *In vitro* verdrängen Co^{2+} -Ionen den Kofaktor Mg^{2+} der DNA-Polymerase^[154] und erhöhen die Fehlerrate des Enzyms bei der DNA-Synthese.^[201, 202] Außerdem können Cobaltionen Komplexe mit Adenin bilden und *in vitro* an DNA-Stränge binden.^[203] Dies verursacht allerdings keine oder nur sehr wenige DNA-Schäden.^[204] Der mutagene Effekt von Cobaltionen wird durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter physiologischen Bedingungen hervorgerufen.^[155] Cobaltionen katalysieren die Bildung von Hydroxylradikalen aus endogen in der Atmungskette der Zelle entstandenem Wasserstoffperoxid. Damit erfolgt eine Steigerung des oxidativen Stresses in der Zelle.

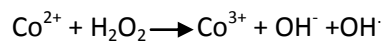
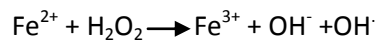


Abb. 56: Fenton Reaktion mit Eisenionen zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und Fenton-analoge Reaktion mit Cobaltionen.

Wenn die Produktion von ROS die Kapazität zu deren Detoxifizierung übersteigt, können oxidative Schäden an Makromolekülen wie der DNA und Proteinen entstehen.^[205] Diese könnten spontane Mutationen^[206] oder Veränderungen von Enzymfunktionen in den Versuchen zur Kultivierung von *S. coelicolor* unter Metallionenstress zur Folge gehabt haben. Für die Wirkung von oxidativem Stress in den blauen Kulturen von *S. coelicolor* mit Co^{2+} -Zusatz im Medium spricht die signifikante Reduktion der Genexpression der putativen Cytochromoxidase-Untereinheit II SCO3946 (Tab. 37). In allen aerob wachsenden Zellen ist die Atmungskette die Hauptquelle endogener reaktiver Sauerstoffspezies.^[207-209] Die verminderte Produktion eines Proteins zur Respiration könnte im blauen Phänotyp von *S. coelicolor* eine Strategie zur Vermeidung von weiterem oxidativen Stress sein. In den Zellen der Co^{2+} -behandelten Kulturen wurde durch Zugabe der Metallionen das Gleichgewicht der Prooxidantien und Antioxidantien auf die Seite der prooxidativ wirkenden Substanzen verschoben. Durch oxidativen Stress tritt in Eukaryonten die Degradation der tRNAs innerhalb der Zellen ein.^[210] Dieser Mechanismus wurde auch in *Streptomyces coelicolor* beobachtet und als konservierte Antwort auf spezifische Stressbedingungen beschrieben.^[211] Möglicherweise führt Cobaltionenstress ohne die direkte Einführung von Mutationen über den Abbau von tRNAs zur Verlangsamung der Proteinbiosynthese oder durch oxidative Veränderungen an Proteinen regulatorisch zu der Ausprägung der verschieden farbigen Phänotypen. In diesem Fall würden Zellen von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress wieder stochastischen Fluktuationen regulatorisch wirksamer Proteine unterliegen.

Hypothese 4: Unterschiede in der Mikroumgebung von Streptomyces coelicolor

Die Induktion von zwei verschiedenen Phänotypen durch den gleichen Umweltfaktor könnte die Folge von unterschiedlichen Anpassungsstrategien sein, die aufgrund lokaler Abweichungen im Umkreis der Kolonie ausgelöst werden. Die Konzentration der Cobaltionen könnte wegen struktureller Unterschiede in der Umgebung im Experiment variabel sein und daher haben sich zwei verschiedene Phänotypen herausgebildet. Solche lokalen Unterschiede könnten durch das Medium bedingt sein. Das SFM-Medium beinhaltet Sojamehl. Da die Sojabohnen vollständig gemahlen werden, sind im Medium Schalenbestandteile vorhanden. Möglicherweise akkumulieren die Ionen im Medium an diesen Partikeln. Die Absorption von Schwermetallionen wurde beispielsweise an den faserigen Bestandteilen von Kokosnussschalen nachgewiesen.^[212] Damit ist ein ähnlicher Effekt auch im SFM-Medium vorstellbar, so dass es zu einem Konzentrationsgefälle innerhalb des Festmediums kommen könnte. Die verschiedenen pigmentierten Kolonien von *S. coelicolor* könnten sich dann in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration in der Umgebung ausgeprägen.

Was induziert die verschieden pigmentierten Phänotypen von *Streptomyces coelicolor*?

Die Ausbildung der unterschiedlich gefärbten Phänotypen erfolgte unter der Einwirkung von Cobaltionenstress auf eine *S. coelicolor*-Kultur, die aus einer Sporenlösung auf Festmedium kultiviert worden war. Nach der Beobachtung des roten und des blauen Phänotyps wurden diese Kolonien vereinzelt und vermehrt. Bei der Kultivierung der farbigen Phänotypen dieser Klone kann es zu gemischten Phänotypen (rot und blau in Abb. 57B) kommen bzw. traten zwischen den roten Klone blaue Kolonien auf und zwischen den roten Kolonien fanden sich vereinzelt blaue Phänotypen (Abb. 57A). Der Cobaltionenstress induzierte eine Heterogenität von *S. coelicolor*-Phänotypen, die auch nach der Übertragung der farbigen Phänotypen auf unbelastetes Medium beobachtet wurden (Abb. 57E).

Gegen die Ausprägung der verschiedenen Phänotypen durch Subpopulationen spricht die beobachtete Umwandelbarkeit der Phänotypen ineinander. Durch die Selektion von Einzelkolonien sollte das Auftreten der anders gefärbten Kolonie im Verlauf der Kultivierung ausgeschlossen sein.

Die Existenz der gemischten Phänotypen spricht auch gegen die Ausprägung der verschiedenen farbigen Phänotypen aufgrund von Unterschieden in der Mikroumgebung, da es Kolonien von *S. coelicolor* gab, die gleichzeitig beide Farbstoffe herstellten (Abb. 57B).

Für die Ausprägung der farbigen Phänotypen durch zufällige Schwankungen der Genexpression spricht, dass dieser Mechanismus keine strukturellen Veränderungen der Erbinformation in der Zelle benötigt. Die verschieden farbigen Phänotypen würden durch die unterschiedlichen Modifikationen der Genexpression in *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress induziert werden. Allerdings ist es fraglich, ob die stochastischen Abweichungen der Genexpression über mehrere Generationen stabil sind, da die verstärkte Pigmentierung in der weiteren Kultur erhalten blieb. Die Genexpression in den Biosyntheseclustern *red* und *act* zum späten Probenahmezeitpunkt spricht für eine dauerhafte Veränderung des Transkriptionsprofils. Daher wären Mutationen als Ursache für die unterschiedlichen Phänotypen am wahrscheinlichsten.

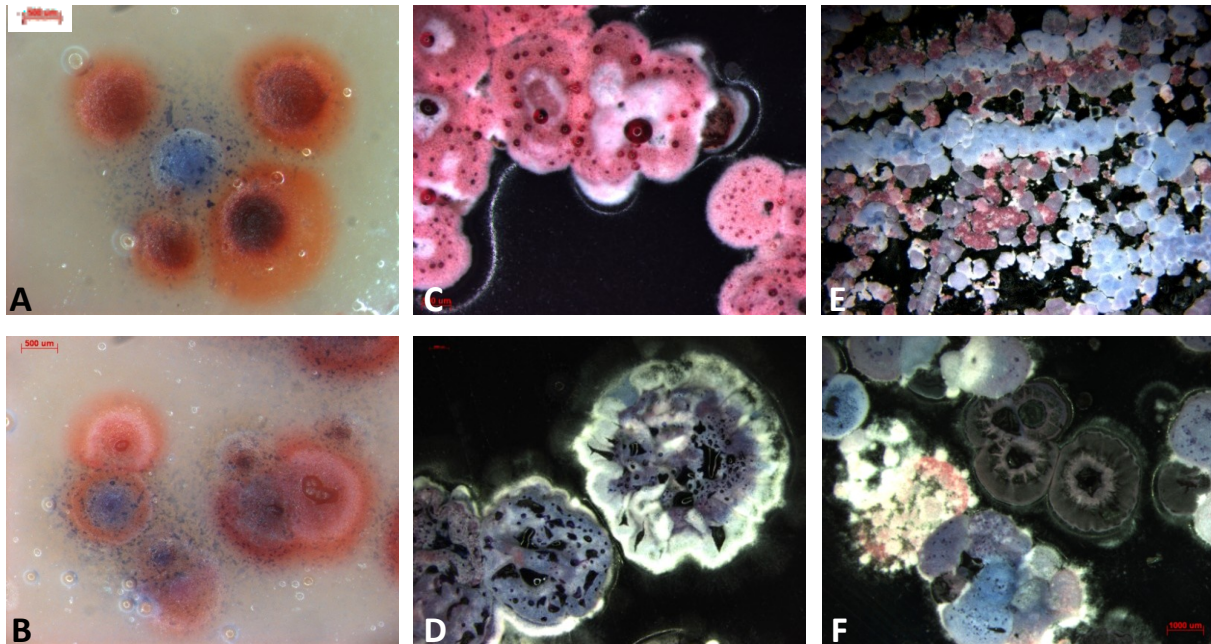


Abb. 57: Fotos von *Streptomyces coelicolor* Kolonien, Kultur roter Phänotyp unter Cobaltionenstress mit vereinzelter blauer Kolonie (A) oder Einzelkolonie, die sowohl den roten als auch den blauen Farbstoff herstellt (B), Kultur des roten Phänotyps nach Übertragung auf cobaltionenfreies Medium, das samtige Aussehen der Kultur spricht für Sporenbildung (C), Kolonien des blauen Phänotyps auf unbelastetem SFM-Medium nach viermaligem Übertragen mit je einer Woche Kultivierungsdauer (D), Kolonien des gemischten Phänotyps auf unbelastetem SFM-Agar (E), Kolonien eines gemischten Phänotyps nach mehrmaliger Übertragung auf cobaltionenfreies Medium (F).

Die farbigen Phänotypen wären durch Mutationen in der Biosynthese von γ -Actinorhodin (**57**) oder Undecylprodigiosin (**10**) und Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) begründet und das Auftreten der gemischten Phänotypen würde durch das gleichzeitige Vorliegen von Mutationen in beiden Biosynthesewegen entstehen. Die einzelne blaue Kolonie in Abb. 57A wäre dann durch eine Rückmutation im *act*-Gencluster und eine Neumutation im *red*-Gencluster ausgeprägt worden. Die heterogenen Phänotypen auf unbelastetem Medium würden dann verschiedene Mutationen tragen (Abb. 57E), die durch die mutagene Wirkung von Cobaltionen im Medium entstanden wären und in einer Umgebung ohne Cobaltionen erhalten blieben. Die Mutationen könnten durch den Vergleich der Genomsequenz nachgewiesen werden. Zusätzlich könnte mit der Bestimmung der Mutationsrate von *S. coelicolor* unter Cobaltionenstress errechnet werden, ob das Eintreten der Mutationen und der Rückmutationen wahrscheinlich ist.

4.5 Ausblick

4.5.1 Metabolitenprofil von Streptomyces coelicolor nach Cobaltionenstress

Die Kultivierung unter Cobaltionenstress verändert den Sekundärstoffwechsel von *S. coelicolor*. Die Bildung der bekannten Polyketide γ -Actinorhodin (**57**) und Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) konnte im Metabolitenprofil nachgewiesen werden. Neben diesen Verbindungen wurden in der Analyse der Ethylacetat-Extrakte aus Kulturen des Wildtyps unter Cobaltionenstress, des roten sowie des blauen Phänotyps unidentifizierte Substanzen beobachtet (Abb. 35, wt+Co²⁺: RT in min 17,6; 18,51; 19,62; 29,64, rot: RT in min 16,08; 24,74, blau: RT in min 15,05; 18,56; 20,42; 23,01; 23,43; 26,92), die der Wildtyp nicht produzierte. Während im Duftprofil des wt eine Reihe von unbekanntes Sesquiterpene (**S**₁₋₉) nachgewiesen wurde, die von den Kulturen unter Cobaltionenstress nicht freigesetzt wurden. Die Strukturaufklärung dieser differentiell induzierten Verbindungen der unterschiedlichen Phänotypen unter Cobaltionenstress würden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hervorragend ergänzen.

Hinweise auf die ökologische Bedeutung der induzierten Verbindungen γ -Actinorhodin (**57**) und Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) könnte die Kokultur der verschiedenen Phänotypen geben. Falls sich einer der farbigen Phänotypen unter Cobaltionenstress durchsetzt, ist die Produktion der farbigen Verbindungen mit einem Fitnessvorteil verbunden.

Transkriptomanalyse von Streptomyces coelicolor-Kulturen nach Cobaltionenstress

Die mit dem *microarray* nachweisbaren Unterschiede in der Genexpression zwischen dem wt und den Phänotypen unter Cobaltionenstress waren für die ORFs des Sekundärmetabolismus relativ gering. Der Nachweis der verstärkten Expression von ORFs aus dem Sekundärmetabolismus ist für *redD* (ORF 5877) im roten Phänotyp und *actIII* (ORF SCO5086) im blauen Phänotyp gelungen. Allerdings konnte weder die Aktivierung der Biosynthese für Undecylprodigiosin (**10**) bzw. Butylcycloheptylprodigiosin (**51**), γ -Actinorhodin (**57**) oder Isozizaen (ORF SCO5222) noch die verminderte Transkription der Geosminzyklase (ORF SCO6073) beobachtet werden. In einer erneuten *microarray*-Studie könnten die Daten durch die Auswertung von Probenmaterial, das zu einem oder mehreren früheren Zeitpunkten als Zeitreihe entnommen wird, ergänzt werden, um die veränderte Transkription dieser Enzyme unter Cobaltionenstress nachzuweisen. Der Einsatz verkürzter Sonden könnte eine verbesserte Darstellung der Unterschiede in der Genexpression ermöglichen. Zusätzlich könnte die technische Varianz zwischen den Hybridisierungen minimiert werden. Mit einem verkleinerten Satz Sonden könnten alle Replikate für die statistischen Auswertungen auf einem Chip in einer Hybridisierung erzeugt werden. Gleichzeitig würde sich der Materialeinsatz für die Transkriptomanalyse verringern. Die Validierung dieser Daten durch RT-PCR, die zusätzliche Analyse des Proteoms oder die Untersuchung des Metabolitenprofils sollte erwogen werden.

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus, der die verschiedenen farbigen Phänotypen induziert, sollten bestimmte ORFs aus den unterschiedlichen Phänotypen sequenziert werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf Veränderung in der Basensequenz der ORFs SCO5086 (*actIII*) und SCO5877 (*redD*), ORFs SCO6464 (Homologie zu Sir2) und SCO6130 (Homologie zu AbaA) gelegt werden, um festzustellen, ob diese ORFs in den farbigen Phänotypen unter Cobaltionenstress Mutationen unterlagen. Mit *knock out*-Mutanten der genannten Transkriptionsregulatoren könnte der Effekt dieser ORFs auf die Pigmentierung von *S. coelicolor* untersucht werden. Falls Mutationen nicht die Entstehung der farbigen Phänotypen bewirken, könnte die Bestimmung der DNA-Methylierungsmuster Aufschlüsse zum zugrundeliegenden Mechanismus geben.

5 Zusammenfassung

Induktion eines veränderten Metabolitenprofils in *Streptomyces avermitilis* durch Kokultur mit *Pseudomonas fluorescens*

In Mikroben induziert die Kultivierung mit artfremden Mikroorganismen die Produktion antibakterieller Sekundärmetabolite.^[19, 89, 90, 91] Eine solche Reaktion könnte für *S. avermitilis* durch die Analyse der häufig beobachteten Guttationstropfen nachgewiesen werden, da die Guttationstropfen von Streptomyceten und Pilzen Sekundärmetabolite speichern sollen.

In den Guttationstropfen von *S. avermitilis* konnten allerdings keine antibiotisch wirksamen Verbindungen nachgewiesen werden. Stattdessen wurde durch die GC-MS- und NMR-Analyse der von *S. avermitilis* gebildeten Tropfen nachgewiesen, dass sie hauptsächlich Saccharose enthielten.

Die Saccharose in den Tropfen wurde von *S. avermitilis* aus den Nährstoffen des Mediums produziert und in die Guttationstropfen transportiert, wie die IR-MS-Messung zeigen konnte.

Als Reaktion auf die Kokultur mit *P. fluorescens* wurde eine Reduktion der verfügbaren Saccharosemenge in den Guttationstropfen von *S. avermitilis* beobachtet. Mit Hilfe radioaktiv markierter Saccharose konnte gezeigt werden, dass, im Vergleich zu Reinkulturen, produzierte Saccharose schneller aufgenommen und verstoffwechselt wurde. Die Saccharose in den Guttationstropfen könnte somit einen Energiespeicher darstellen, der unter dem Konkurrenzdruck in der Kokultur mobilisiert wird.

Induktion eines veränderten Metabolitenprofils durch Schwermetallionenstress in *Streptomyces coelicolor*

Metallionen haben einen stimulierenden Effekt auf den Sekundärmetabolismus in *S. coelicolor*.^[74, 75] Obwohl veränderte Sekundärmetabolitenprofile verschiedener Streptomyceten unter Schwermetallionenstress nachgewiesen werden konnten, wurden die Auswirkungen von Schwermetallionen auf *S. coelicolor* bisher nicht systematisch studiert.^[89, 109]

Ein Ziel in meiner Arbeit war es daher, die Auswirkungen von Cobaltionenstress auf den Sekundärmetabolismus von *Streptomyces coelicolor* zu charakterisieren.

Nach der Zugabe von Cobaltsalzen in das Kulturmedium (200µg/ml) differenzierte *S. coelicolor* zwei farbige Phänotypen (rot und blau). Die Phänotypen mit Cobaltionenstress bildeten nur die Hälfte der Biomasse im Vergleich zum Wildtyp auf cobaltfreiem Medium. Der blaue Phänotyp zeigte unter Cobaltionenstress einen konstanten Biomassezuwachs, während die Messwerte für den roten Phänotyp um bis zu 50 % schwankten.

Die beiden pigmentierten Phänotypen produzierten vom Wildtyp abweichende Duftprofile, die in der GC-MS-Analyse beobachtet werden konnten. Der Wildtyp setzte Methylisoborneol, verschiedene Oktalinisofomene und Geosmin (**5**), Germacren D (**42**), Germacradienol (**45**) und Isozizaen (**37**) frei. Der Duft der Phänotypen unter Cobaltionenstress war durch reduzierte Terpenemission gekennzeichnet. Typisch für den roten Phänotyp war die Produktion von 2-Tridecanon (**43**) und Undecylpyrrol (**44**), während der blaue Phänotyp unter Cobaltionenstress verstärkt Isozizaen (**37**) bildete.

Durch die LC-MS-Analyse wurde in allen untersuchten Kulturen Germicidin (m/z 183 **46-49** und m/z 197 **49/50**) nachgewiesen. Dieses autoregulatorische Polyketid hemmt die Keimung der Sporen des Produzenten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die roten Kolonien Undecylprodigiosin (**10**) sowie Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und die blauen Kolonien γ -Actinorhodin (**57**) produzierten. Diese Polyketide trugen maßgeblich zur Ausprägung der Pigmentierung bei.

Microarray-Analysen der Kulturen unter Cobaltionenstress zeigten signifikante Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zum Wildtyp auf. Die statistische Analyse der Transkriptomdaten des blauen Phänotyps wies eine erhöhte Expression eines putativen Proteins mit Homologie zu SgaA aus *S. griseus* (SCO6430) auf. Dieses putative Protein könnte möglicherweise Wachstumsschwankungen unter osmotischem Stress unterdrücken, wie es für SgaA aus *S. griseus* gezeigt werden konnte.^[172]

Unter Cobaltionenstress wurden im roten Phänotyp vier ORFs und im blauen Phänotyp 21 ORFs des Sekundärmetabolismus abweichend zum Wildtyp reguliert. Im roten Phänotyp wurde der Transkriptionsregulator der Prodigiosinbiosynthese *redD* (SCO5877) und im blauen Phänotyp die Ketoacylreduktase aus der Actinorhodinbiosynthese *actIII* (SCO5086) verstärkt transkribiert. In beiden farbigen Phänotypen wurde der ORF (SCO4912) der putativen Biotin-Carboxylase AccA2 signifikant verstärkt gegenüber dem Wildtypen exprimiert. Dieses Enzym stellt die Vorstufe Malonyl-CoA für die Polyketidbiosynthese her. Überschneidungen induzierter ORFs in den Phänotypen unter Cobaltionenstress waren Ausnahmen. Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass jedem Phänotyp unter Cobaltionenstress ein spezifisches Genexpressionsprofil zugrunde liegt, aus dem ein charakteristisches Metabolitenmuster resultiert.

6 Summary

Induction of an altered metabolite profile in *Streptomyces avermitilis* in coculture with *Pseudomonas fluorescens*

The cultivation with non kind microorganisms induces the production of antibacterial secondary metabolites in microbes. ^[19, 89, 90, 91] In *S. avermitilis* such reaction could be monitored by analyzing the frequently observed guttation droplets, which are postulated to serve as reservoir for secondary metabolites in streptomycetes and fungi.

However, no antibiotic activity could be proven the guttation droplets of *S. avermitilis*. Instead GC-MS and NMR analyses showed that *S. avermitilis* formed guttation droplets mainly contained sucrose.

S. avermitilis produced the sucrose from the nutrients of the medium and transported it in the guttation droplets, as revealed by IR-MS measurement. As reaction to the mixed culture with *P. fluorescens* the reduction of available sucrose amount in the guttation droplets was detected. Using radioactive labeled sucrose, re-uptake and metabolisation of the produced sucrose into the colonies of *S. avermitilis* growing in coculture with *P. fluorescens* was observed. This suggests that the sucrose in the guttation droplets could serve as energy storage, which is mobilized under the competitive pressure in the mixed culture.

Induction of a changed metabolite profile by heavy metal ion stress in *Streptomyces coelicolor*

Metal ions have a stimulating effect on the secondary metabolism of *S. coelicolor*.^[74, 75] Although altered secondary metabolite profiles of different streptomycetes under heavy metal ion stress have been proven, the effects of heavy metal ions on *S. coelicolor* have been so far not systematically studied.^[89, 109]

Therefore, one aim of my thesis was therefore to characterize the effects of cobalt ion stress on the secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor*.

Relatively high concentration (200µg/ml) of cobalt ion in the medium induced the differentiation of a red and a blue colored phenotype of *S. coelicolor*. The colored phenotypes generated only about 50 % of the biomass compared to the wild type of *S. coelicolor* on cobalt-free medium. The blue phenotype showed a constant biomass increase under cobalt ion stress, whereas the measured values for the red phenotype varied up to 50%.

GC-MS analysis indicates that the two pigmented phenotypes produce a volatile profile different from the wild type. The wild type emitted methylisborneol, various octaline isoforms and geosmin (**5**), germacrene D (**42**), germacradienol (**45**) and isozizaene (**37**). The volatile emission of *S. coelicolor* was characterized by the reduction of terpene release under cobalt ion stress. Specifically the red phenotype produced 2-tridecanone (**43**) and undecyl-pyrrole (**44**), whereas the blue phenotype intensified its isozizaene (**37**) emission.

LC-MS analysis revealed the production of germicidin (m/z 183 **46-49** and m/z 197 **49/50**) in all cultures. Thus, the producing strain inhibits germinating of the own spores by this autoregulatory polyketide.^[142] In addition, formation of undecylprodigiosin (**10**) as well as butylcycloheptylprodigiosin (**51**) in the red colonies, and γ -actinorhodin (**57**), in the blue colonies was detected. These polyketides considerably contributed to pigmentation of the colored colonies.

The gene expression of the colored phenotypes under cobalt ion stress was differentially regulated compared to the wild type. The statistical analysis of *microarray* data, gained from the blue phenotype, provided information about increased expression of a putative protein that shares identity to SgaA protein of *S. griseus* (SCO6430). This putative protein possibly suppresses the growth fluctuations under stress as the SgaA protein of *S. griseus*.^[172]

Cobalt stress induces an increased expression of four ORFs, coding for putative genes of the secondary metabolism, in the red colored phenotype. In the blue phenotype 21 ORFs, also coding for putative genes of the secondary metabolism, were differentially regulated compared to the *S. coelicolor* wild typ. The red phenotype shows an enhanced transcription of *redD* (SCO5877), the transcriptional regulator of prodigiosin biosynthesis. In the blue phenotype the transcription of *actIII* (SCO5086), the ketoacyl reductase from the actinorhodin biosynthesis, was increased. In both colored phenotypes the ORF (SCO4912) of the putative biotin carboxylase AccA2 was significantly higher expressed than in the wild type. This enzyme provides the precursor malonyl-CoA for the polyketide biosynthesis. Overlaps of induced ORFs in the colored phenotypes were exceptional. It can be concluded, that the development of an altered metabolite profile in *S. coelicolor* under cobalt ion stress is based on characteristic patterns in gene expression.

7 Literatur

1. Jiang, J., He, X., and Cane, D. E., *Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional Streptomyces coelicolor enzyme*. Nature Chemical Biology, 2007. 3: 711-5.
2. Hurst, C. J., Crawford, R. L., Garland, J. L., Lipson, D. A., Mills, A. L., and Stetzenbach, L. D. *Manual of environmental microbiology*, Third edition. 2007.
3. Stanier, R., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., and Paiter, P. R., *General microbiology*. Fifth edition ed. 1987, London: Macmillan.
4. Schaechter, M., Ingraham, J. L., and Neidhardt, F. C. M., *Microbe*. 2006, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
5. Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J., *Brock - Biology of microorganisms*. Ninth Edition ed. 2000, Upper Saddle River: Prentice Hall International. Inc.
6. Horswill, A. R., Stoodley, P., Stewart, P. S., and Parsek, M. R., *The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. 387: 371-80.
7. Bassler, B. L., *Small Talk: Cell-to-cell communication in bacteria*. Cell, 2002. 109: 421-4.
8. Bassler, B. L. and Losick, R., *Bacterially speaking*. Cell, 2006. 125: 237-46.
9. Fuqua, C. and Greenberg, E. P., *Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. 3: 685-95.
10. ed. Lengeler JW., D. G., Schlegel HG., *Biology of the Prokaryotes*. 1999.
11. Hof, H. and Dörris, R., *Medizinische Mikrobiologie*. 2005, Stuttgart: Thieme.
12. WHO, *The world health report 2004 - changing history*. 2004.
13. Berdy, J., *Bioactive microbial metabolites*. Journal of Antibiotics, 2005. 58: 1-26.
14. Mann, J., *Natural products in cancer chemotherapy: Past, present and future*. Nature reviews cancer, 2002. 2: 143-8.
15. Seigler, D., *Plant secondary metabolism*. 1998, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
16. Hu, H., Zhang, Q., and Ochi, K., *Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the rpoB Gene (encoding the RNA polymerase β -subunit) of Streptomyces lividans*. The Journal of Bacteriology, 2002. 184: 3984-91.
17. Harz, C. O., *Actinomyces bovis, ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes*. Deutsche Zeitschrift für Thiermedizin, 1877. 1877-1878: 125-40.
18. Horinouchi, S., *Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus Streptomyces*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007. 71: 283-99.
19. Angell, S., Bench, B. J., Williams, H., and Watanabe, C. M. H., *Pyocyanin isolated from a marine microbial population: Synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action*. Chemistry & Biology, 2006. 13: 1349-59.
20. Chater, K. F. and Merrick, M. J., *Streptomyces*. Developmental Biology of Prokaryotes, ed. Parrish, J. H. 1979, Oxford: Blackwell. 93-114.
21. Gerber, N. N. and Lecheval, H. A., *Geosmin an earthy-smelling substance isolated from Actinomycetes*. Applied Microbiology, 1965. 13: 935-8.
22. Zhao, B., Lin, X., Lei, L., Lamb, D. C., Kelly, S. L., Waterman, M. R., and Cane, D. E., *Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283: 8183-9.
23. Quaderer, R., Omura, S., Ikeda, H., and Cane, D. E., *Pentalenolactone biosynthesis. Molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlI, a cytochrome P450 of Streptomyces avermitilis*. Journal of the American Chemical Society, 2006. 128: 13036-7.
24. Dionigi, C. P., Millie, D. F., Spanier, A. M., and Johnsen, P. B., *Spore and geosmin production by Streptomyces tendae on several media*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. 40: 122-5.
25. Waksman, S. A. and Lechevalier, H. A., *Guide to the classification and identification of the Actinomycetes and their antibiotics*. 1953 Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
26. Nultsch, W., *Allgemeine Botanik*. 10. neubearbeitete Auflage ed. 1996, Stuttgart: Thieme.

27. Freudig, D. and Sauermost, R. *Lexikon der Biologie*. 2001, Spektrum: Heidelberg.
28. Jennings, D. H., *The role of droplets in helping to maintain a constant growth rate of aerial hyphae*. *Mycological research: an international journal of fungal biology*, 1991. 95: 883-4.
29. Schmidt, O., *Wood and tree fungi*. 2006, Berlin: Springer.
30. Thom, C. and Raper, K. B., *A manual of the Aspergilli* Vol. 103. 1945, Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
31. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A., *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Nature*, 2002. 417: 141-7.
32. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S., *Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003. 21: 526-31.
33. Chen, C. W., *Complications and implications of linear bacterial chromosomes*. *Trends in Genetics*, 1996. 12: 192-6.
34. Kolsto, A. B., *Dynamic bacterial genome organization*. *Molecular Microbiology*, 1997. 24: 241-8.
35. Challis, G. L. and Hopwood, D. A., *Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. 100: 14555-61.
36. Brockmann, H. and Pini, H., *Actinorhodin, ein roter Farbstoff aus Actinomyceten*. *Naturwissenschaften*, 1947. 34: 190.
37. Rudd, B. A. M. and Hopwood, D. A., *A pigmented mycelial anitiotic in Streptomyces coelicolor: Control by a chromosomal gene cluster*. *Journal of General Microbiology*, 1980. 119: 333-40.
38. Wright, L. F. and Hopwood, D. A., *Identification of antibiotic determined by SCP1 plasmid of Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Journal of General Microbiology*, 1976. 95: 96-106.
39. Lakey, J. H., Lea, E. J. A., Rudd, B. A. M., Wright, H. M., and Hopwood, D. A., *A new channel-forming antibiotic from Streptomyces coelicolor A3(2) which requires calcium for its activity*. *Journal of General Microbiology*, 1983. 129: 3565-73.
40. Jiang, J., He, X., and Cane, D. E., *Geosmin biosynthesis. Streptomyces coelicolor germacradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. 128: 8128-9.
41. Wang, C.-M. and Cane, D. E., *Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in Streptomyces coelicolor*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. 130: 8908-9.
42. Malpartida, F. and Hopwood, D. A., *Molecular-cloning of the whole biosynthetic-pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host*. *Nature*, 1984. 309: 462-4.
43. Demain, A. L., *Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999. 52: 455-63.
44. Nett, M., Ikeda, H., and Moore, B. S., *Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the Actinomycetes*. *Natural Product Reports*, 2009. 26: 1362-84.
45. Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., and Hattori, M., *Genome sequence of an industrial microorganism Streptomyces avermitilis: Deducing the ability of producing secondary metabolites*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98: 12215-20.
46. Vining, L. C., *Functions of secondary metabolites*. *Annual Review of Microbiology*, 1990. 44: 395-427.

47. Chao, L. and Levin, B. R., *Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. 78: 6324-8.
48. Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., and Bohannan, B. J. M., *Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors*. Nature, 2002. 418: 171-4.
49. Lancini, G. and Demain, A. L., *Secondary metabolism in bacteria: Antibiotic pathways, regulation, and function*, in *Biology of the Prokaryotes*, Lengeler, J., Drews, G., and Schlegel, H., Editors. 1999, Thieme: Stuttgart.
50. Challis, G., *Genome mining for novel natural product discovery*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. 51: 2618-28.
51. Wilkinson, B. and Micklefield, J., *Mining and engineering natural - product biosynthetic pathways*. Nature Chemical Biology, 2007. 3: 379-86.
52. Malik, V. S., *Microbial secondary metabolism*. Trends in Biochemical Sciences, 1980. 5: 68-72.
53. Malik, V. S., *Regulation of chorismate-derived antibiotic production*. Advances in Applied Microbiology, 1979. 25: 75-93.
54. Woodruff, H. B., *Natural-products from microorganisms*. Science, 1980. 208: 1225-9.
55. Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M., and Challis, G. L., *Discovery of a new peptide natural product by Streptomyces coelicolor genome mining*. Nature Chemical Biology, 2005. 1: 265-9.
56. Hartmann, A., Fiedler, H. P., and Braun, V., *Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by Escherichia coli K14*. European Journal of Biochemistry, 1979. 99: 517-24.
57. Singh, P. and Cameotra, S. S., *Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences*. Trends in Biotechnology, 2004. 22: 142-6.
58. Takano, H., Obitsu, S., Beppu, T., and Ueda, K., *Light-induced carotenogenesis in Streptomyces coelicolor A3(2): Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster*. Journal of Bacteriology, 2005. 187: 1825-32.
59. Stout, J. D., *The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow*. Advances in Microbial Ecology, 1980. 4: 1-50.
60. Martin, M. M., *Biochemical implication of insect mycophagy*. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 1979. 54: 1-21.
61. Singh, B. N., *Toxic effects of certain bacterial metabolic products on soil protozoa*. Nature London, 1942. 149: p. 108.
62. Demain, A. L. and Fang, A. Q., *The natural functions of secondary metabolites*. History of Modern Biotechnology, 2000. 69: 1-39.
63. Waters, C. M. and Bassler, B. L., *Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005. 21: 319-46.
64. Hertweck, C., *Hidden biosynthetic treasures brought to light*. Nature Chemical Biology, 2009. 5: 450-2.
65. Hopwood, D. A., *Streptomyces in nature and medicine: The antibiotic markers*. 2007, Oxford: Oxford University Press. 250.
66. Hall, B. G. and Betts, P. W., *Cryptic genes for cellobiose utilization in natural isolates of Escherichia coli*. Genetics, 1987. 115: 431-9.
67. Scherlach, K. and Hertweck, C., *Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2009. 7: 1753-60.
68. Kim, E. S., Hong, H. J., Choi, C. Y., and Cohen, S. N., *Modulation of actinorhodin biosynthesis in Streptomyces lividans by glucose repression of afsR2 gene transcription*. The Journal of Bacteriology, 2001. 183: 2198-203.
69. Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K., *Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Bacteriology, 2003. 185: 601-9.
70. Coisne, S., Bechet, M., and Blondeau, R., *Actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2) in iron-restricted media*. Letters in Applied Microbiology, 1999. 28: 199-202.

71. Kim, Y., Song, J., Moon, M., Smith, C., Hong, S.-K., and Chang, Y., *pH shock induces overexpression of regulatory and biosynthetic genes for actinorhodin production in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. 76: 1119-30.
72. Doull, J. L., Ayer, S. W., Singh, A., and Thibault, P., *Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by Streptomyces venezuelae following heat shock*. Industrial microorganisms: Basic and applied molecular genetics, 1993: 279.
73. Sevcikova, B. and Kormanec, J., *Differential production of two antibiotics of Streptomyces coelicolor A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions*. Archives of Microbiology, 2004. 181: 384-9.
74. Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., and Ochi, K., *The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in Streptomyces spp.* FEMS Microbiology Letters, 2007. 274: 311-5.
75. Abbas, A. and Edwards, C., *Effects of metals on a range of Streptomyces species*. Applied and Environmental Microbiology, 1989. 55: 2030-5.
76. Kamijo, M., Suzuki, T., Kawai, K., Fujii, T., and Murase, H., *Ytterbium-decreasing Streptomyces sp. and its naphthoquinone-pigment production in the presence of rare-earth elements*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999. 87: 340-3.
77. Arai, T., Yazawa, K., Mikami, Y., Kubo, A., and Takahashi, K., *Isolation and characterization of satellite antibiotics, mimosamycin and chlorocarcins from Streptomyces lavendulae, streptothricin source*. Journal of Antibiotics, 1976. 29: 398-407.
78. Bethe, B., *Ausarbeitung von Methoden und Konzepten zum Auffinden und Bewerten von Biosyntheseleistungen im Sekundärstoffwechsel sowie Isolierung und Strukturaufklärung der Sekundärstoffe des Streptomycten Stammes Gö 40/14*. 1994, Universität Göttingen, Institut für Organische Chemie.
79. Fuchser, J. and Zeeck, A., *Secondary metabolites by chemical screening. 34. Aspinolides and aspinonene/aspyrone co-metabolites, new pentaketides produced by Aspergillus ochraceus*. Liebigs Annalen-Recueil, 1997: 87-95.
80. Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., and Zeeck, A., *Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity*. ChemBioChem, 2002. 3: 619-27.
81. Khoklov, A. S., Tovarova, I. I., and Anisova, L. N., *Regulators of streptomycin biosynthesis and development in Actinomyces streptomycini*. Nova Acta Leopoldina, 1967. 7: 289-97.
82. Mori, K., *Synthetic microbial chemistry. 3. Revision of the absolute-configuration of A-Factor - the inducer of Streptomycin biosynthesis, basing on the reconfirmed (R)-configuration of (+)-paraconic Acid*. Tetrahedron, 1983. 39: 3107-9.
83. Kondo, K., Higuchi, Y., Sakuda, S., Nihira, T., and Yamada, Y., *New virginiae butanolides from Streptomyces virginiae*. Journal of Antibiotics, 1989. 42: 1873-6.
84. Sato, K., Nihara, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M., and Yamada, Y., *Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from Streptomyces sp. FRI-5*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1989. 68: 170-3.
85. Takano, E., Nihira, T., Hara, Y., Jones, J. J., Gershater, C. J. L., Yamada, Y., and Bibb, M., *Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275: 11010-6.
86. Danilenko, V. N., Mironov, V. A., and Elizarov, S. M., *Calcium as a regulator of intracellular processes in actinomycetes: A review*. Applied Biochemistry and Microbiology, 2005. 41: 319-29.
87. Gräfe, U., Eritt, I., and Riesenber, D., *Synergistic effect of cobalt on the induction by A-factor of the formation of aerial mycelium and anthracyclines by a blocked mutant of Streptomyces griseus*. Journal of Basic Microbiology, 1985. 25: 279-83.
88. Shank, E. A. and Kolter, R., *New developments in microbial interspecies signaling*. Current Opinion in Microbiology, 2009. In Press, Corrected Proof.
89. Bode, H. B., *No need to be pure: Mix the cultures!* Chemistry & Biology, 2006. 13: 1245-6.

90. Cugini, C., Calfee, M. W., Farrow, J. M., Morales, D. K., Pesci, E. C., and Hogan, D. A., *Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2007. 65: 896-906.
91. Schröckh, V., Scherlach, K., Nutzmann, H. W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., and Brakhage, A. A., *Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. 106: 14558-63.
92. Tolosa, I., Lopez, J. F., Bentaleb, I., Fontugne, M., and Grimalt, J. O., *Carbon isotope ratio monitoring-gas chromatography mass spectrometric measurements in the marine environment: biomarker sources and paleoclimate applications*. *Science of the Total Environment*, 1999. 237-238: 473-81.
93. Doner, L. W. and White, J. W., *Carbon-13/Carbon-12 ratio is relatively uniform among honeys*. *Science*, 1977. 197: 891-2.
94. Gonzalez, J., Remaud, G., Jamin, E., Nault, N., and Martin, G. G., *Specific natural isotope profile studied by isotope ratio mass spectrometry (SNIP-IRMS): C-13/C-12 ratios of fructose, glucose, and sucrose for improved detection of sugar addition to pineapple juices and concentrates*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. 47: 2316-21.
95. Soe, A. R. B., Bartram, S., Gatto, N., and Boland, W., *Are iridoids in leaf beetle larvae synthesized de novo or derived from plant precursors? A methodological approach*. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 2004. 40: 175-80.
96. Werner, R. A. and Brand, W. A., *Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001. 15: 501-19.
97. Colotelo, N., *Fungal exudates*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978. 24: 1173-81.
98. Colotelo, N., *Physiological and biochemical properties of exudates associated with Sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1973. 19: 73-9.
99. Colotelo, N., Sumner, J. L., and Voegelin, W. S., *Chemical studies on exudate and developing Sclerotia of Sclerotia sclerotiorum (Lib.) De Bary*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1971. 17: 1189-94.
100. Willmann, G. and Fakoussa, R. M., *Extracellular oxidative enzymes of coal-attacking fungi*. *Fuel Processing Technology*, 1997. 52: 27-41.
101. McPhee, W. J. and Colotelo, N., *Fungal Exudates. 1. Characteristics of hyphal exudates in Fusarium culmorum*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 1977. 55: 358-65.
102. Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., and van Wezel, G. P., *Feast or famine: The global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces*. *Embo Reports*, 2008. 9: 670-5.
103. Heinsteins, P., *Mechanism of action of granaticin - inhibition of ribosomal-RNA maturation and cell-cycle specificity*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1982. 71: 197-200.
104. McBride, M. J. and Ensign, J. C., *Effects of intracellular trehalose content on Streptomyces griseus spores*. *Journal of Bacteriology*, 1987. 169: 4995-5001.
105. Schneider, D., Bruton, C. J., and Chater, K. F., *Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Molecular and General Genetics*, 2000. 263: 543-53.
106. Kristufek, V., Novakova, A., and Pizl, V., *Coprophilous streptomycetes and fungi - food sources for enchytraeid worms (Enchytraeidae)*. *Folia Microbiologica*, 2001. 46: 555-8.
107. De la Barrera, E. and Nobel, P. S., *Nectar: Properties, floral aspects, and speculations on origin*. *Trends in Plant Science*, 2004. 9: 65-9.
108. Hotson, I. K., *The avermectins - a new family of antiparasitic agents*. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging*, 1982. 53: 87-90.
109. Haferburg, G., Groth, I., Mollmann, U., Kothe, E., and Sattler, I., *Arousing sleeping genes: Shifts in secondary metabolism of metal tolerant actinobacteria under conditions of heavy metal stress*. *BioMetals*, 2009. 22: 225-34.

110. Doelman, P., *Resistance of soil microbial communities to heavy metals, FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Symposium No. 33, August 4-8, 1985, Microbial Communities in Soil*. 1986, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.: Copenhagen. 369-84.
111. Wood, J. M. and Wang, H. K., *Microbial resistance to heavy metals*. Environmental Science & Technology, 1983. 17: A582-A90.
112. Gadd, G. M. and Griffiths, A. J., *Microorganisms and heavy metal toxicity*. Microbial Ecology, 1978. 4: 303-17.
113. Vallee, B. L. and Ulmer, D. D., *Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead*. Annual Review of Biochemistry, 1972. 41: 91-128.
114. Bowen, H. J. M., *Trace elements in biochemistry*. 1966, New York: Academic Press.
115. Hughes, M. N. and Poole, R. K., *Metals and microorganisms*. 1989, London: Chapman and Hall.
116. Haferburg, G. and Kothe, E., *Microbes and metals: Interactions in the environment*. Journal of Basic Microbiology, 2007. 47: 453-67.
117. Beveridge, T. J., *Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall*. International Review of Cytology, 1981. 72: 229-317.
118. Nies, D. H., *Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes*. FEMS Microbiology Reviews, 2003. 27: 313-39.
119. Nies, D. H., *The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from Alcaligenes eutrophus functions as a cation-proton antiporter in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1995. 177: 2707-12.
120. Silver, S. and Misra, T. K., *Plasmid-mediated heavy-metal resistances*. Annual Review of Microbiology, 1988. 42: 717-43.
121. Gonzalez, H. and Jensen, T. E., *Nickel sequestering by polyphosphate bodies in Staphylococcus aureus*. Microbios, 1998. 93: 179-85.
122. Gräfe, U. and Radics, L., *Isolation and structure elucidation of 6-3' Methylbuten-2'-ylisatin an unusual metabolite from Streptomyces albus*. Journal of Antibiotics, 1986. 39: 162-3.
123. Nosanchuk, J. D. and Casadevall, A., *The contribution of melanin to microbial pathogenesis*. Cellular Microbiology, 2003. 5: 203-23.
124. Beausejour, J. and Beaulieu, C., *Characterization of Streptomyces scabies mutants deficient in Melanin biosynthesis*. Canadian Journal of Microbiology, 2004. 50: 705-9.
125. Claridge, C. A., Rossoman, V., Buono, N. S., Gourevit, A., and Lein, J., *Influence of cobalt on fermentative methylation*. Applied Microbiology, 1966. 14: 280-3.
126. Paul, A. K. and Banerjee, A. K., *Determination of optimum conditions for antibiotic production by Streptomyces galbus*. Folia Microbiologica, 1983. 28: 397-405.
127. Raytapadar, S., Datta, R., and Paul, A. K., *Effects of some heavy metals on growth, pigment and antibiotic production by Streptomyces galbus*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 1995. 42: 171-7.
128. Abbas, A. S. and Edwards, C., *Effects of metals on Streptomyces coelicolor growth and actinorhodin production*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. 56: 675-80.
129. Hirsch, C. F. and Christensen, D. L., *Novel method for selective isolation of actinomycetes*. Applied and Environmental Microbiology, 1983. 46: 925-9.
130. Donath, J. and Boland, W., *Biosynthesis of acyclic homoterpens - Enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor*. Phytochemistry, 1995. 39: 785-90.
131. Lin, X., Hopson, R., and Cane, D. E., *Genome mining in Streptomyces coelicolor: Molecular cloning and characterization of a new sesquiterpene synthase*. Journal of the American Chemical Society, 2006. 128: 6022-3.
132. Qiagen, *The QIAexpressionist - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. 2003.
133. Christiansen, P., *Isolierung, Strukturermittlung und absolute Konfiguration neuer Actinorhodine*. 1970, Universität Göttingen, Organisch-Chemisches Institut.

134. Tsao, S., Rudd, B., He, X., Chang, C., and Floss, H., *Identification of a red pigment from Streptomyces coelicolor A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives*. Journal of Antibiotics, 1985. 38: 128-31.
135. Zhang, H. C., Zhan, J. X., Su, K. M., and Zhang, Y. X., *A kind of potential food additive produced by Streptomyces coelicolor: Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin*. Food Chemistry, 2006. 95: 186-92.
136. *Dictionary of natural products on DVD, version 17:2*, Buckingham, J., Editor. 2009, CRC Press: London.
137. Quackenbush, J., *Microarray data normalization and transformation*. Nature Genetics, 2002. 32: 496-501.
138. van Keulen, G., Siebring, J., Rembacz, K. P., Hoogeveen, M., Tomczynska, M., and Dijkhuizen, L., *Improved method for the isolation of RNA from (standing liquid cultures of) Streptomyces*. Journal of Microbiological Methods, 2004. 58: 139-42.
139. Benjamini, Y. and Hochberg, Y., *Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing*. Journal of the Royal Statistical Society Series B, 1995. 57: 289-300.
140. Benjamini, Y., Krieger, A. M., and Yekutieli, D., *Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate*. Biometrika, 2006. 93: 491-507.
141. Gerber, N. N., *New prodiginine (podiginosin-like) pigment from Streptomyces - antimalarial activity of several prodiginines*. Journal of Antibiotics, 1975. 28: 194-9.
142. Petersen, F., Zahner, H., Metzger, J. W., Freund, S., and Hummel, R. P., *Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of Streptomyces viridochromogenes Nrrl B-1551*. Journal of Antibiotics, 1993. 46: 1126-38.
143. Huang, J., Lih, C.-J., Pan, K.-H., and Cohen, S. N., *Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in Streptomyces coelicolor using DNA microarrays*. Genes & Development, 2001. 15: 3183-92.
144. Weaver, D., Karoonuthaisiri, N., Tsai, H. H., Huang, C. H., Ho, M. L., Gai, S. N., Patel, K. G., Huang, J. Q., Cohen, S. N., Hopwood, D. A., Chen, C. W., and Kao, C. M., *Genome plasticity in Streptomyces: Identification of 1 Mb TIRs in the S. coelicolor A3(2) chromosome*. Molecular Microbiology, 2004. 51: 1535-50.
145. Hesketh, A., Bucca, G., Laing, E., Flett, F., Hotchkiss, G., Smith, C. P., and Chater, K. F., *New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from Streptomyces coelicolor, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures*. BMC Genomics, 2007. 8: 261-83.
146. Xu, W. Y., Bak, S., Decker, A., Paquette, S. M., Feyereisen, R., and Galbraith, D. W., *Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: The cytochrome P450 gene superfamily of Arabidopsis thaliana*. Gene, 2001. 272: 61-74.
147. Chou, C.-C., Chen, C.-H., Lee, T.-T., and Peck, K., *Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression*. Nucleic Acids Research, 2004. 32: published online e99.
148. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., and Boeke, J. D., *The Sir2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell-cycle, and chromosome stability*. Genes & Development, 1995. 9: 2888-902.
149. Fernandez-Moreno, M. A., Martintriana, A. J., Martinez, E., Niemi, J., Kieser, H. M., Hopwood, D. A., and Malpartida, F., *AbaA, a new pleiotrophic regulatory locus for antibiotic production in Streptomyces coelicolor*. Journal of Bacteriology, 1992. 174: 2958-67.
150. Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., and Hobman, J. L., *The MerR family of transcriptional regulators*. FEMS Microbiology Reviews, 2003. 27: 145-63.
151. Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., and Tobes, R., *The TetR family of transcriptional repressors*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. 69: 326-56.
152. Büdenbender, S., *Kristallstruktur der myxobakteriellen Chondrochloren Halogenase CndH aus Chondromyces crocatus sowie Analyse der strukturellen Basis enzymatischer Cyclodextrin*

- Hydrolyse*. 2009, Albert-Ludwigs-Universität, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften.
153. Dorrestein, P. C., Yeh, E., Garneau-Tsodikova, S., Kelleher, N. L., and Walsh, C. T., *Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH(2)-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102: 13843-8.
 154. Sirover, M. A., Dube, D. K., and Loeb, L. A., *On the fidelity of DNA replication metal activation of Escherichia coli DNA polymerase I*. Journal of Biological Chemistry, 1979. 254: 107-11.
 155. Outten, F. W., Outten, C. E., and O'Halloran, T., *Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance*. Bacterial Stress Responses, ed. Storz, G. and Hengge-Aronis, R. 2000, Washington D. C.: ASM Press. 145-57.
 156. Jennette, K. W., *The role of metals in carcinogenesis - biochemistry and metabolism*. Environmental Health Perspectives, 1981. 40: 233-52.
 157. Kawanishi, S., Inoue, S., and Yamamoto, K., *Hydroxyl radical and singlet oxygen production and DNA damage induced by carcinogenic metal compounds and hydrogen peroxide*. Biological Trace Element Research, 1989. 21: 367-72.
 158. Daza, A., Martin, J. F., Dominguez, A., and Gil, J. A., *Sporulation of several species of Streptomyces in submerged cultures after nutritional downshift*. Journal of General Microbiology, 1989. 135: 2483-91.
 159. Sevcikova, B., Benada, O., Kofronova, O., and Kormanec, J., *Stress-response sigma factor sigma(H) is essential for morphological differentiation of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Archives of Microbiology, 2001. 177: 98-106.
 160. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A., *Practical Streptomyces genetics*. 2000, Norwich: John Innes Foundation.
 161. Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., and Salmond, G. P. C., *The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines*. Nature Reviews Microbiology, 2006. 4: 887-99.
 162. Park, G., Tomlinson, J. T., Melvin, M. S., Wright, M. W., Day, C. S., and Manderville, R. A., *Zinc and copper complexes of prodigiosin: Implications for copper-mediated double-strand DNA cleavage*. Organic Letters, 2003. 5: 113-6.
 163. Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, K., Yamamoto, D., Tsubura, A., Kamata, K., Hirata, H., Yamamoto, A., Kano, H., Seki, T., and Inoue, K., *Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H+/Cl- symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice*. Hepatology, 1999. 30: 894-902.
 164. Pandey, R., Chander, R., and Sainis, K. B., *Prodigiosins as anti cancer agents: Living upto their name*. Current Pharmaceutical Design, 2009. 15: 732-41.
 165. Bystrykh, L. V., Fernandez-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., and Dijkhuizen, L., *Production of actinorhodin-related "blue pigments" by Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Bacteriology, 1996. 178: 2238-44.
 166. Ozerginulgen, K. and Mavituna, F., *Actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2) - kinetic-parameters related to growth, substrate uptake and production*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993. 40: 457-62.
 167. Doull, J. L. and Vining, L. C., *Nutritional control of actinorhodin production by Streptomyces coelicolor A3(2) - suppressive effects of nitrogen and phosphate*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990. 32: 449-54.
 168. Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Flett, F., and Oliver, S. G., *Pigmented antibiotic production by Streptomyces coelicolor A3(2) - kinetics and the influence of nutrients*. Journal of General Microbiology, 1990. 136: 2291-6.
 169. Miguez, E. M., Hardisson, C., and Manzanal, M. B., *Hyphal death during colony development in Streptomyces antibioticus: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote*. Journal of Cell Biology, 1999. 145: 515-25.
 170. Reeves, P., *The bacteriocins*. 1972, New York: Springer.

171. Dietrich, L. E. P., Teal, T. K., Price-Whelan, A., and Newman, D. K., *Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria*. *Science*, 2008. 321: 1203-6.
172. Ando, N., Ueda, K., and Horinouchi, S., *A Streptomyces griseus gene (sgaA) suppresses the growth disturbance caused by high osmolality and a high concentration of A-factor during early growth*. *Microbiology*, 1997. 143: 2715-23.
173. Leonard, A. and Lauwerys, R., *Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds*. *Mutation Research*, 1990. 239: 17-27.
174. Burk, D., Hearon, J., Caroline, L., and Schade, A. L., *Reversible complexes of cobalt, histidine, and oxygen gas*. *Journal of Biological Chemistry*, 1946. 165: 723-4.
175. Lesburg, C. A., Caruthers, J. M., Paschall, C. M., and Christianson, D. W., *Managing and manipulating carbocations in biology: Terpenoid cyclase structure and mechanism*. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998. 8: 695-703.
176. Cane, D. E., *Enzymatic formation of sesquiterpenes*. *Chemical Reviews*, 1990. 90: 1089-103.
177. Hopwood, D. A., Chater, K. F., Dowding, J. E., and Vivian, A., *Advances in Streptomyces coelicolor genetics*. *Bacteriological Reviews*, 1973. 37: 371-405.
178. Rezanka, T., Sobotka, M., Prell, A., and Sigler, K., *Relationship between volatile odorous substances and production of avermectins by Streptomyces avermitilis*. *Folia Microbiologica*, 2007. 52: 26-30.
179. Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P., and Herron, P., *Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: A link between osmoadaptation and antibiotic production*. *Genome Research*, 2004. 14: 893-900.
180. Lum, A. M., Huang, J. Q., Hutchinson, C. R., and Kao, C. M., *Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays*. *Metabolic Engineering*, 2004. 6: 186-96.
181. Miles, A. A. and Khimji, P. L., *Enterobacterial chelators of iron - their occurrence, detection, and relation to pathogenicity*. *Journal of Medical Microbiology*, 1975. 8: 477-90.
182. Ehrlich, J., Bartz, Q. R., Smith, R. M., Joslyn, D. A., and Burkholder, P. R., *Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete*. *Science*, 1947. 106: 417.
183. Ding, W. D., Williams, D. R., Northcote, P., Siegel, M. M., Tsao, R., Ashcroft, J., Morton, G. O., Alluri, M., Abbanat, D., Maiese, W. M., and Ellestad, G. A., *Pyrrroindomycins, novel antibiotics produced by Streptomyces rugosporus Sp LI-42d005. 1. Isolation and structure determination*. *Journal of Antibiotics*, 1994. 47: 1250-7.
184. Keller-Schierlein, W., Muntwyler, R., Pache, W., and Zähler, H., *Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 73. Mitteilung [1] Chlorothricin und Des-Chlorothricin*. *Helvetica Chimica Acta*, 1969. 52: 127-42.
185. Romero, R. M., Roberts, M. F., and Phillipson, J. D., *Anthranilate synthase in microorganisms and plants*. *Phytochemistry*, 1995. 39: 263-76.
186. Bera, A. K., Atanasova, V., Robinson, H., Eisenstein, E., Coleman, J. P., Pesci, E. C., and Parsons, J. F., *Structure of PqsD, a Pseudomonas quinolone signal biosynthetic enzyme, in complex with anthranilate*. *Biochemistry*, 2009. 48: 8644-55.
187. Takano, E., Gramajo, H. C., Strauch, E., Andres, N., White, J., and Bibb, M. J., *Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in Streptomyces coelicolor A3(2)*. *Molecular Microbiology*, 1992. 6: 2797-804.
188. Jayapal, K. P., Philp, R. J., Kok, Y.-J., Yap, M. G. S., Sherman, D. H., Griffin, T. J., and Hu, W.-S., *Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in Streptomyces coelicolor*. *PLoS One*, 2008. 3: Article No.: e2097.
189. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., and Boeke, J. D., *The sir2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell-cycle progression, and chromosome stability*. *Genes & Development*, 1995. 9: 2888-902.
190. Avery, S. V., *Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity*. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. 4: 577-87.

191. Pogell, B. M., *Regulation of aerial mycelium formation in Streptomyces*. Genetics of Industrial Microorganisms, ed. Sebek, O. K. and Laskin, A. I. 1979, Madison: American Society for Microbiology. 218-24.
192. Koern, M., Elston, T. C., Blake, W. J., and Collins, J. J., *Stochasticity in gene expression: From theories to phenotypes*. Nature Reviews Genetics, 2005. 6: 451-64,35.
193. Raser, J. M. and O'Shea, E. K., *Noise in gene expression: Origins, consequences, and control*. Science, 2005. 309: 2010-3.
194. Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G., *Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987. 37: 463-4.
195. Stackebrandt, E. and Goebel, B. M., *A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994. 44: 846-9.
196. Garrity, G. M., Bell, J. A., and Lilburn, T. G., *Taxonomic outline of the prokaryotes*. Second edition ed. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2004, New York: Springer Verlag.
197. Konstantinidis, K. T., Ramette, A., and Tiedje, J. M., *The bacterial species definition in the genomic era*. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2006. 361: 1929-40.
198. Casadesus, J. and Low, D., *Epigenetic gene regulation in the bacterial world*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. 70: 830-56.
199. Leblond, P. and Decaris, B., *New insights into the genetic instability of Streptomyces*. FEMS Microbiology Letters, 1994. 123: 225-32.
200. Wong, P. K., *Mutagenicity of heavy metals*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1988. 40: 597-603.
201. Sirover, M. A. and Loeb, L. A., *Metal induced infidelity during DNA synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976. 73: 2331-5.
202. Zakour, R. A., Kunkel, T. A., and Loeb, L. A., *Metal induced infidelity of DNA synthesis*. Environmental Health Perspectives, 1981. 40: 197-206.
203. Liqueurmilward, J., *Evidence of a complex compound of cobalt with a purine base (Adenine)*. Nature, 1951. 167: 1068-9.
204. Eichhorn, G. L. and Shin, Y. A., *Interaction of metal ions with polynucleotides and related Compounds. 12. Relative effect of various metal ions on DNA helicity*. Journal of the American Chemical Society, 1968. 90: 7323-8.
205. Chen, J.-H., Hales, C. N., and Ozanne, S. E., *DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: Causal or correlative?* Nucleic Acids Research, 2007. 35: 7417-28.
206. Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T., and Nakatsu, Y., *Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids*. Biological Chemistry, 2006. 387: 373-9.
207. Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B., *Triggering of oxidative stress response during aerobic growth*. Journal of Cellular Biochemistry, 1995: 244-.
208. Gonzalezflecha, B. and Demple, B., *TRIGGERING OF OXIDATIVE STRESS RESPONSES DURING AEROBIC GROWTH*. Journal of Cellular Biochemistry, 1995: 244-.
209. Imlay, J. A. and Fridovich, I., *Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266: 6957-65.
210. Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J., and Parker, R., *tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes*. RNA, 2008. 14: 2095-103.
211. Haiser, H. J., Karginov, F. V., Hannon, G. J., and Elliot, M. A., *Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium Streptomyces coelicolor*. Nucleic Acids Research, 2007: 1-10.
212. Pino, G. H., de Mesquita, L. M. S., Torem, M. L., and Pinto, G. A. S., *Biosorption of heavy metals by powder of green coconut shell*. Separation Science and Technology, 2006. 41: 3141-53.

213. Hopwood, D., *Genetic analysis and genome structure in Streptomyces coelicolor*. Bacteriological Reviews, 1967. 31: 373-403.
214. Fortin, J. A. and Piché, Y., *Cultivation of Pinus strobus root-hypocotyl explants for synthesis of ectomycorrhizae*. New Phytologist, 1979. 83: 109-19.
215. Croteau, R. and Cane, D. E., *Monoterpene and sesquiterpene cyclases*. Methods in Enzymology, 1985. 110: 383-405.
216. He, X. F. and Cane, D. E., *Mechanism and stereochemistry of the germacradienol/germacrene D synthase of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of the American Chemical Society, 2004. 126: 2678-9.
217. Kovats, E., *Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. 1. Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone*. Helvetica Chimica Acta, 1958. 41: 1915-32.

8 Anhang

Medien	Inhaltsstoffe
LB-Agar	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 15 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
LB-Agar für Selektion von Kanamycin-resistenten Zellen	LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin, Zugabe nach dem Autoklavieren
LB-Agar mit Kanamycin für Blau-weiß-Selektion	LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin und 40 µl X-Gal-Lösung (40 mg/ml im DMF) pro Platte
LB-Medium (flüssig)	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 1000 ml destilliertes Wasser
Nutrient-Agar	5g Pepton, 3 g Fleischextrakt, 15 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
SFM-Agar ^[160]	20 g Sojamehl, 20 g Mannitol, 20 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
SFM50-Agar	20 g Sojamehl, 10 g Mannitol, 20 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
SFM75-Agar	20 g Sojamehl, 15 g Mannitol, 20 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
SFG-Agar	20 g Sojamehl, 20 g Glukose, 20 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
SFGly-Agar	20 g Sojamehl, 20 g Glycerin, 20 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
Minimalmedium ^[213]	0,5 g L-Asparagin, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,2 g MgSO ₄ x 7H ₂ O, 0,01 g FeSO ₄ x 7H ₂ O, 10 g Glukose, 10 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
Minimalmedium für Actinomyceten (Haferburg, persönliche Kommunikation)	0,5 g L-Asparagin, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,2 g MgSO ₄ x 7H ₂ O, 0,01 g FeSO ₄ x 7H ₂ O, 10 g Glukose, 10 g Agar-Agar, 3 ml Spurenelementelösung, 1000 ml destilliertes Wasser
Spurenelementelösung ^[214]	3,7 g KCl, 1,5 g H ₃ BO ₃ , 0,8 g MnSO ₄ x 5H ₂ O, 0,6 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O, 0,1 g CuSO ₄ x 5H ₂ O, 0,02 g (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O
Minimalmedium mit Glycerin	10 g Pepton, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,2 g MgCO ₄ x 7H ₂ O, 0,01 g FeSO ₄ x 7H ₂ O, 20 g Glycerin, 10 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
Minimalmedium mit Mannitol	10 g Pepton, 0,5 g K ₂ HPO ₄ , 0,2 g MgCO ₄ x 7H ₂ O, 0,01 g FeSO ₄ x 7H ₂ O, 20 g Mannitol, 10 g Agar-Agar, 1000 ml destilliertes Wasser
SFM-Medium flüssig	20 g Sojamehl, 20 g Mannitol, 1000 ml destilliertes Wasser

Kits	Hersteller
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent, Böblingen, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Hot Start HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
LabelIT μ ArrayCy3/Cy5 Labeling Kit	Mirus, Madison, USA
MinElute PCR purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Midi	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pronto!Universal Hybridization Kit	Corning, Corning, USA
Topo TA Cloning	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Bakterienart	Quelle
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	DSMZ Nr. 46492
<i>Streptomyces avermitilis</i>	DSMZ Nr. 46492
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSMZ Nr. 6506
<i>Bacillus subtilis</i> subspec <i>subtilis</i>	DSMZ Nr. 10
<i>Escherichia coli</i> Top10 (F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> Rosetta 2 F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE2 (Cam ^R)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> Rosetta 2/SCO5222	diese Arbeit

Plasmid	Quelle
Topo 2.1 TA Cloning Vektor (Kan/Amp)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Topo 2.1/SCO5222	diese Arbeit
pET28a (Kan)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
pET28a/SCO5222	diese Arbeit

Puffer und Lösungen für DNA-Präparation	Bestandteile
STE B	25 mM NaCl, 75 mM EDTA, 20 mM Tris in destilliertem Wasser
Lysozym-Lösung	50 mg/ml Lysozym in destilliertem Wasser
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA in destilliertem Wasser
SDS-Lösung	10 % SDS in destilliertem Wasser
NaCl	5 M in destilliertem Wasser

Puffer für SDS-Page	Zusammensetzung
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS,
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS
Ladepuffer	30 % Glycerin, 0,9 % SDS, Spatelspitze Bromphenolblau, Sammelgelpuffer, vierfaches Volumen destilliertes Wasser

Puffer für Proteinaufreinigung	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol in destilliertem Wasser
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol in destilliertem Wasser
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol in destilliertem Wasser
Probenpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 % Glycerol in destilliertem Wasser

Puffer und Lösungen für Enzymaktivitätstest	Zusammensetzung
FPP-Lösung	1 mg/ml FPP in 250 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ -Puffer
DTT-Lösung	0,2 M DTT in destilliertem Wasser
"reaction mix" ^[215]	25 mM Hepes, 12,5 mM MgCl ₂ , 0,25 mM MnCl ₂ , 0,25 mM NaWO ₄ , 0,125 mM NaF

Kommerzielle Puffer	Hersteller
Ligationspuffer	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Restriktionspuffer 2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM Dithiothreitol)	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland

Enzyme	Hersteller
Lysozym	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Nde</i> I	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland
<i>T4</i> -Ligase	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
<i>Xho</i> I	NEB, Frankfurt a. M., Deutschland

Chemikalien	Hersteller
2-Tridecanon (43)	Fluka, Seelze, Deutschland
Acetonitril für HPLC	VWR, Darmstadt, Deutschland
Alice, IR-MS Standard	Zur Verfügung gestellt von Stefan Bartram
Apramycin	Fluka, Seelze, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Promega, Mannheim, Deutschland
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ATP	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Bio-safe Coomassie	Biorad, München, Deutschland
BSA	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cafice, IR-MS Standard	Zur Verfügung gestellt von Stefan Bartram
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
CoCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CoSO ₄	Fluka, Seelze, Deutschland
CuCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D ₂ O, 99,9 %	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Dimethylformamid	Fluka Seelze, Deutschland
dNTPs	Bioline, Luckenwalde, Deutschland

Anhang

DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	VWR, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat	Sigma, Seelze, Deutschland
FeSO ₄	Fluka, Seelze, Deutschland
Fleischextrakt	Fluka, Seelze, Deutschland
FPP	Zur Verfügung gestellt von Stefan Garms
Geosmin (5)	Sigma, Seelze, Deutschland
Germacren D (42)	Zur Verfügung gestellt von Stefan Garms
Glukose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₃ BO ₃	Fluka, Seelze, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma, Seelze, Deutschland
Imidazol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Fluka, Seelze, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Fluka, Seelze, Deutschland
L-Asparagin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mannitol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methylisoborneol (22)	Sigma, Seelze, Deutschland
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka, Seelze, Deutschland
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MnCl ₂	Fluka, Seelze, Deutschland
MnSO ₄ x 5 H ₂ O	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
MSTFA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaF	Sigma, Seelze, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaWO ₄	Sigma, Seelze, Deutschland
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	Fluka, Seelze, Deutschland
Oktalin Standard (41)	Synthetisiert von Thorben Narwth
PAM 40	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pentan	Sigma, Seelze, Deutschland
Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Primer	MWG, Ebersberg, Deutschland
Proteinmarker (Pageruler, ungefärbt)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Saccharose [¹⁴ C(U)]-; 50 µci (1,85 MBq in 0,5 ml 9EtOH/1H ₂ O), unspezifisch radioaktiv markiert	Perkin Elmer, Waltam, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sojamehl (Vollsoja)	Hensel, Magstadt, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland,
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Undecylpyrrol (44)	Synthetisiert von Dieter Spittler
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka, Seelze, Deutschland

Software	Quelle
Ginkgo	J. Craig Venter Institute, USA
MEV	Dana-Farber Cancer Institute, USA
TIGR Spotfinder	Dana-Farber Cancer Institute, USA

Geräte	Hersteller
Aktivkohlefilter	Le Ruisseau de Montbrun, Daumazan sur Arize, Frankreich
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cellulosemembran (Einmachhaut)	Insula, Köln, Deutschland
Gelkammer und Gießstand (Mini Protean)	Bio-Rad, München, Deutschland
Elementaranalysator (EuroEA CN2 dual)	HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland
GC-MS (Trace-MS)	Finnigan, Egelsbach, Deutschland
GC-Vials	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Glaskapillaren	Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland
Halter für SPME-Fasern	Supelco, Seelze, Deutschland
HPLC (1100 Series)	Agilent, Böblingen, Deutschland
Hybridisierungskammer (Slidebooster)	Advalytix, München, Deutschland
IR-MS (IsoPrime)	Micromass, Manchester, UK
PCR- <i>S. coelicolor</i> -microarray	<i>University of Surrey Guildford, UK</i>
Mircoarray Scanner (G2505 B)	Agilent, Böblingen, Deutschland
Mircoeinsätze und Federn	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
MicroSpin G-50 Säulen (Illustra)	GE Healthcare, München, Deutschland
NanoDrop ND UV-VIS Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Ni-NTA Säule	Qiagen, Hilden, Deutschland
NMR (Avance DRX 500)	Bruker, Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaagen	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
PhosphorImager	Molecular dynamics, München, Deutschland
radiosensitiver Phosphorfilm	Molecular dynamics, München, Deutschland
Speed vac (DNA Speed Vac DNA 110)	Savant, GMI, Ramsey, USA
Speed vac (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen	Postnova, Landsberg/Lech, Deutschland
Schüttler (Multitron II)	Infors, Bottmingen-Basel, Schweiz
Tischzentrifuge (5415 D)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler (Mastercycler Gradient)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
SPME-Fasern (Polydimethylsiloxan, 100 µm)	Supelco, Seelze, Deutschland
Ultrafiltrationsäulen (VivaSpin)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Ultraschallfänger (Super R K102)	Sonorex Bandelin, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Umwälzpumpen	Fürgut, Aitrach, Deutschland
UV-Lampe	Kendro, Bonn, Deutschland
Zinnkartuschen (0,04 ml)	IVA Analysetechnik, Meerbusch/Düsseldorf, Deutschland
Zentrifuge (3K18)	Sigma, Seelze, Deutschland

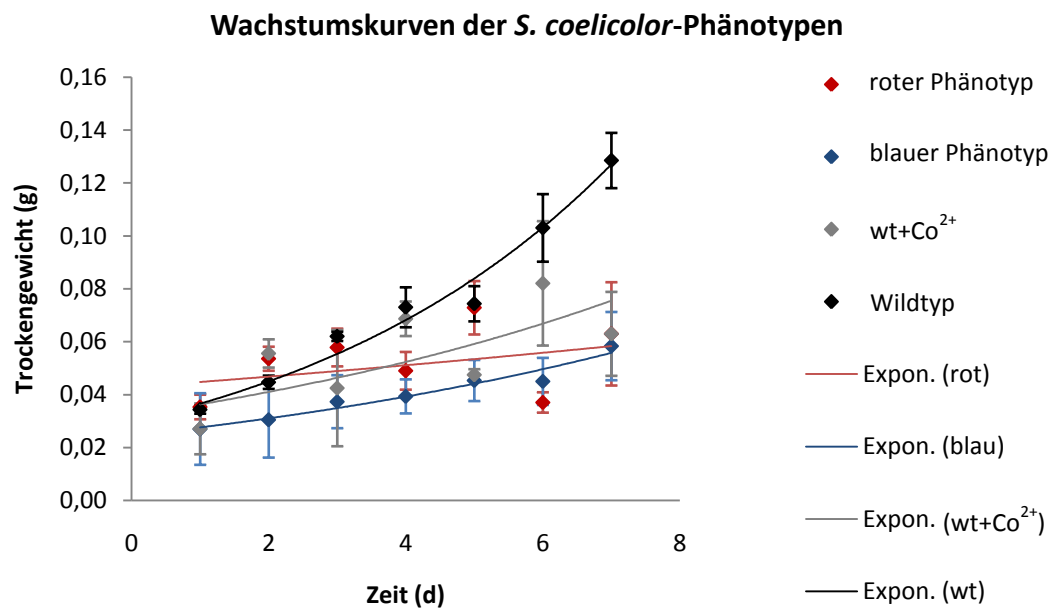
Wachstum von *Streptomyces coelicolor* unter Metallionenstress

Abb. 58: Wachstumskurve über siebentägige Kultivierung auf SFM-Agar, Trockengewicht Wildtyp (schwarz) ohne Zusatz von Cobaltsulfat, Wildtyp auf Cobaltmedium (grau), roter Phänotyp (rot) auf Cobaltmedium, blauer Phänotyp (blau) auf Cobaltmedium, Medium mit 200 µg/ml Cobaltsulfat, alle Datenreihen mit exponentieller Trendlinie und Fehlerbalken für Standardabweichung, n = 3.

Analysen der Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis*

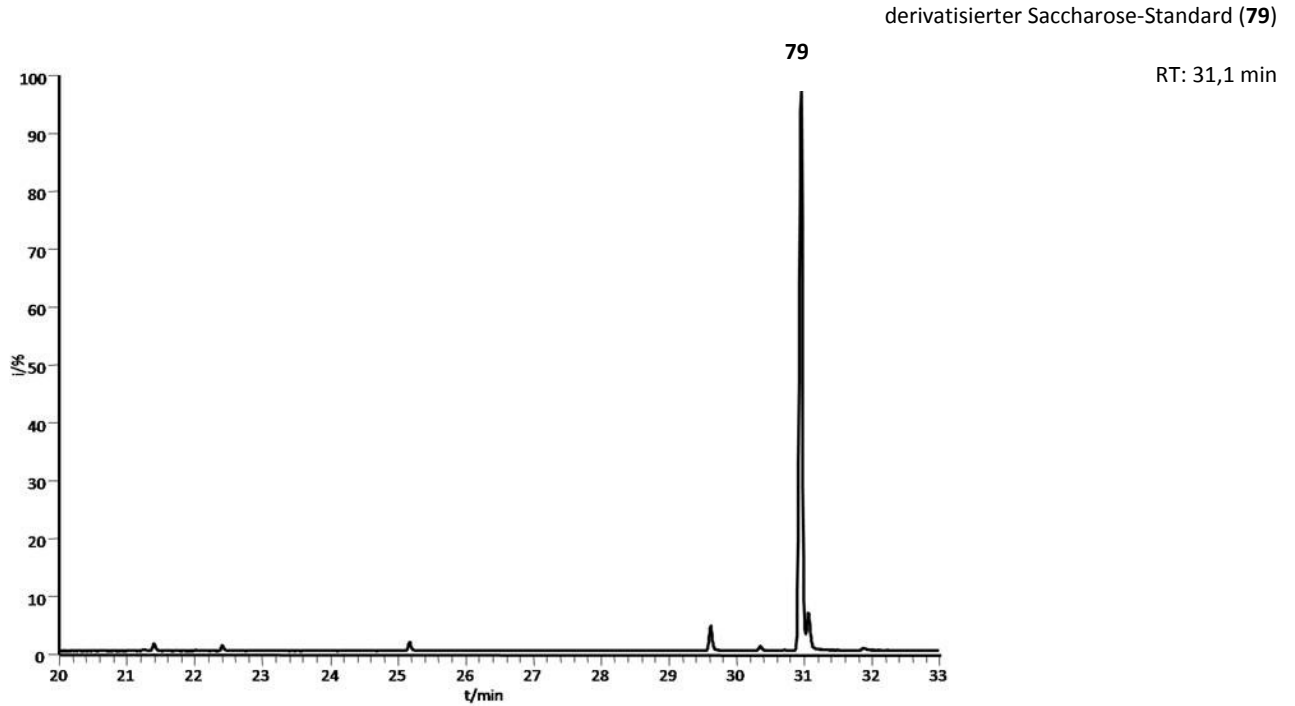


Abb. 59: Gaschromatogramm des trimethylsilylierten Saccharose-Standards (79).

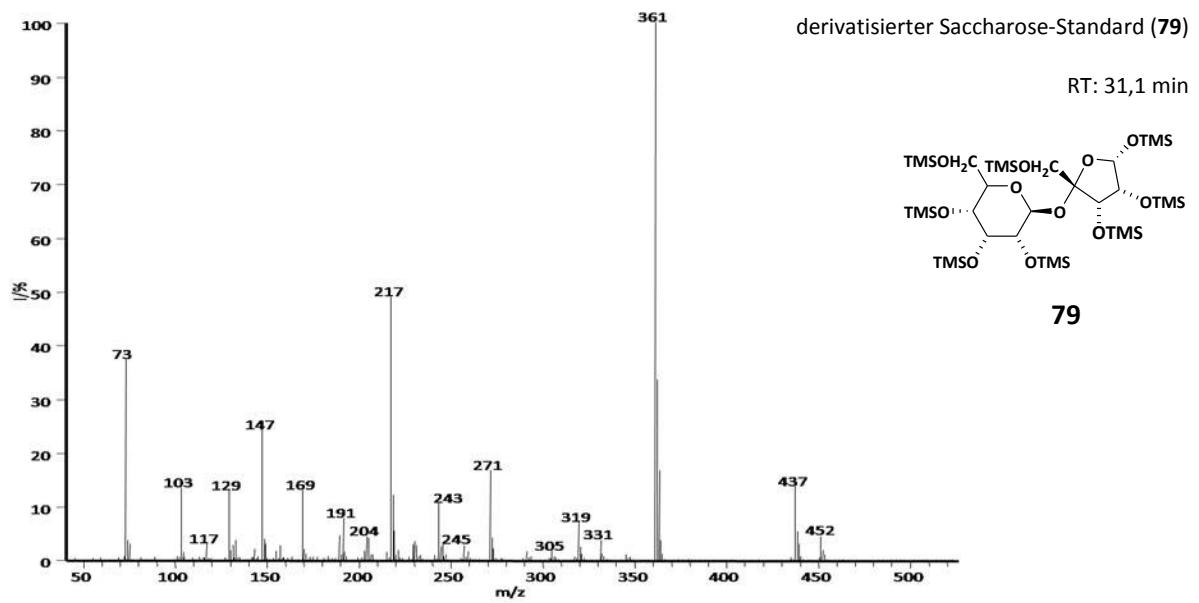
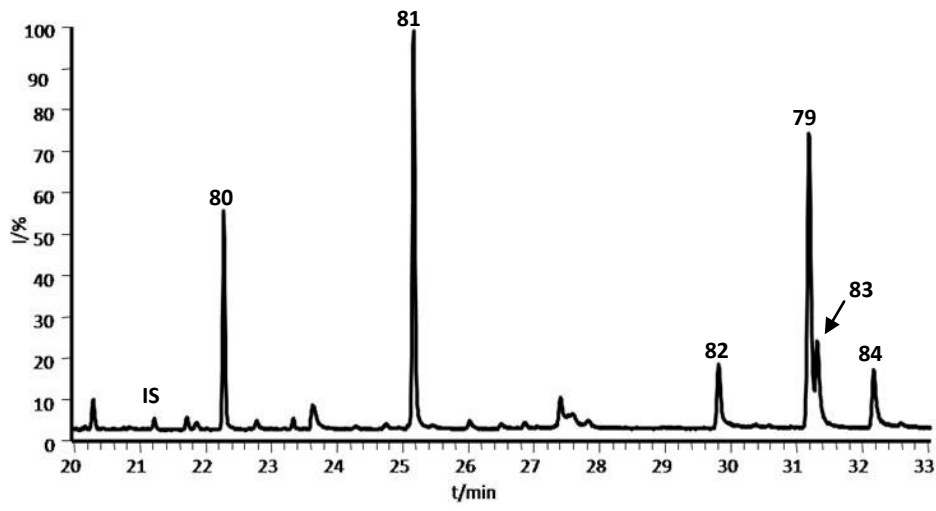
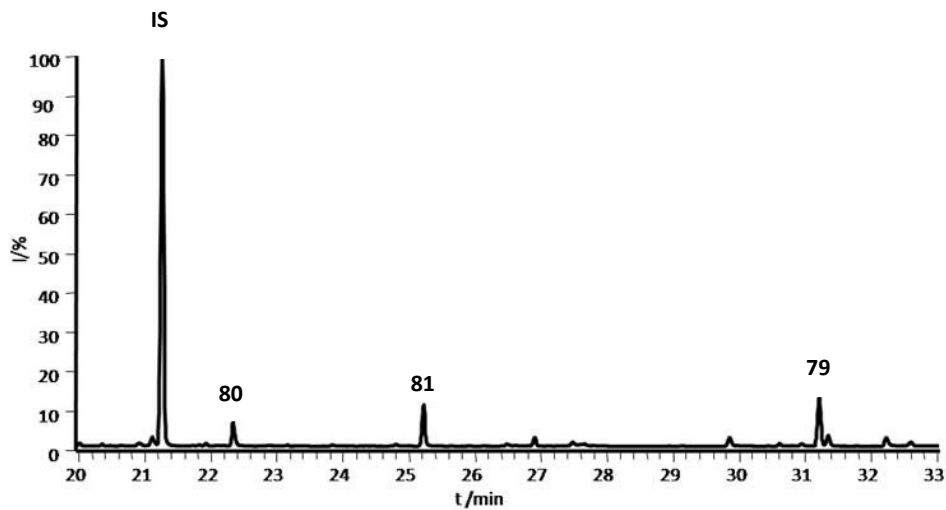


Abb. 60: Massenspektrum des trimethylsilylierten Saccharose-Standards (79).



- IS: interner Standard Sorbitol (TMS-Ester)
- 80: Hexadecansäure (TMS-Ester)
- 81: Oktadecansäure (TMS-Ester)
- 82: unidentifiziertes Disaccharid (TMS-Ester)
- 79: Saccharose (TMS-Ester)
- 81: unidentifiziertes Disaccharid (TMS-Ester)
- 82: Stearinsäure (TMS-Ester)

Abb. 61: Gaschromatogramm (TIC) der mit MSTFA derivatisierten Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis* nach 12 d Wachstum auf SFM-Agar.



- IS: interner Standard Sorbitol (TMS-Ester)
- 80: Hexadecansäure (TMS-Ester)
- 81: Oktadecansäure (TMS-Ester)
- 79: Saccharose (TMS-Ester)

Abb. 62: Gaschromatogramm (TIC) der mit MSTFA derivatisierten Guttationstropfen von *Streptomyces avermitilis* in Kokultur mit *Pseudomonas fluorescens* nach 12 d Wachstum auf SFM-Agar.

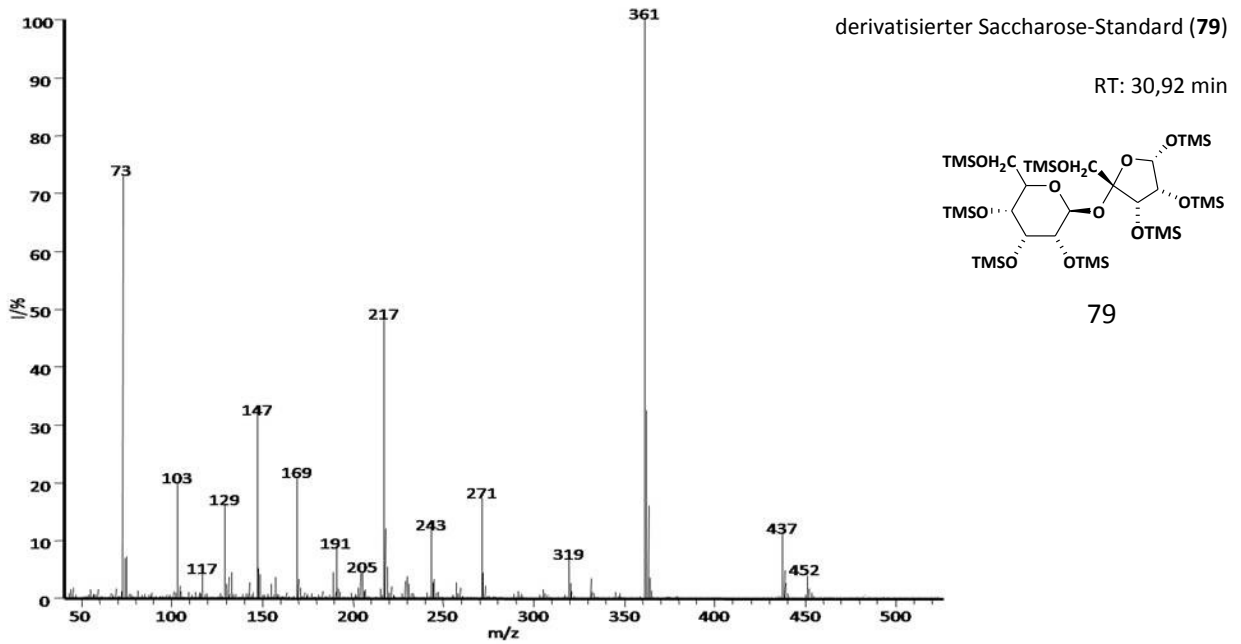


Abb. 63: EI-Massenspektrum der trimethylsilierten Saccharose (79), gemessen in den Tropfen von *Streptomyces avermitilis*.

Berechnung der Isotopenverhältnisse

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} \cdot 1000 \text{ ‰}$$

$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis in δ -Annotation gegen den *Vienna Pee Dee Belemnite*-Standard

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{Probe}}$ gemessenes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis in der Probe

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{VPDB}}$ $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis des *Vienna Pee Dee Belemnite*-Standards

Emission flüchtiger Verbindungen von *Streptomyces coelicolor* Kulturen unter Cobaltionenstress

Analyse der flüchtigen Verbindungen von *Streptomyces coelicolor*-Kulturen nach Cobaltionenstress durch GC-MS

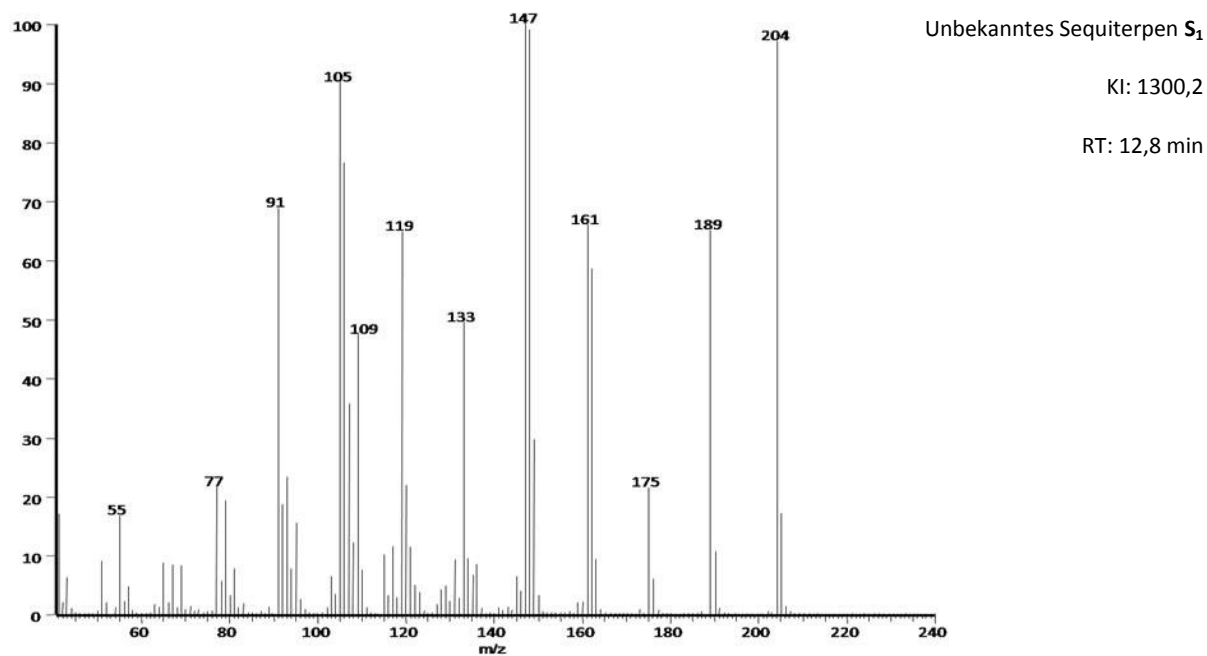


Abb. 64: EI-Massenspektrum des unbekannten Sesquiterpens S₁, Nebenprodukt des aufgereinigten rekombinanten Enzyms SCO5222.

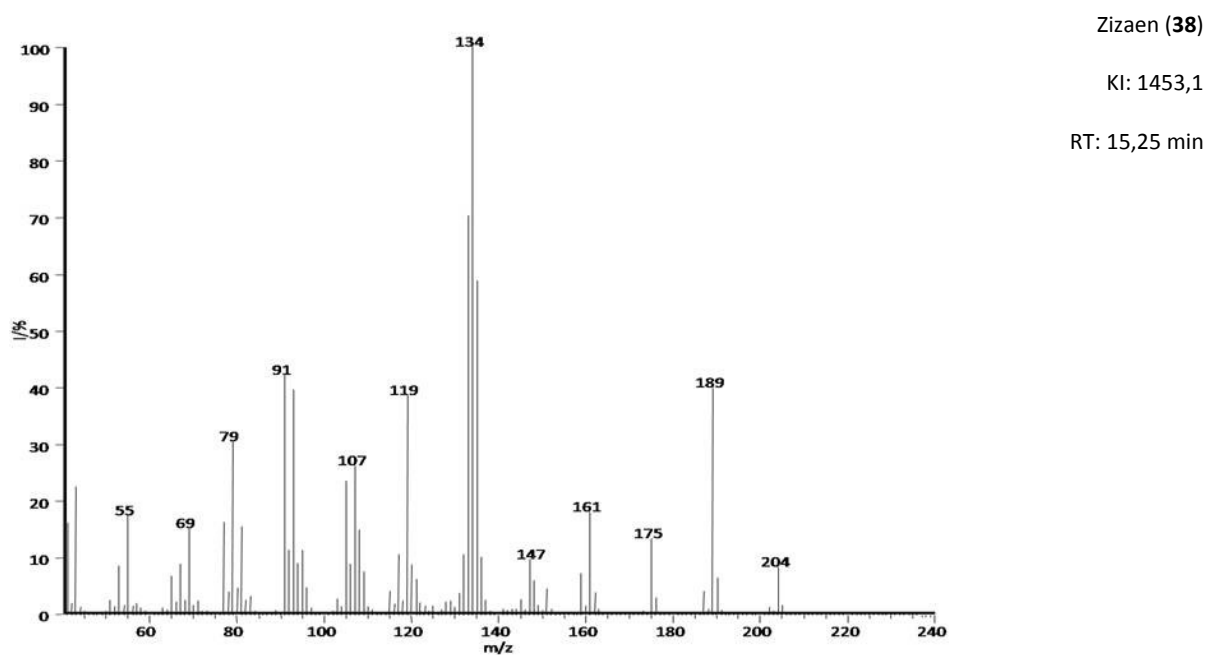


Abb. 65: EI-Massenspektrum des Zizaens (38), Nebenprodukt des aufgereinigten rekombinanten Enzyms SCO5222.

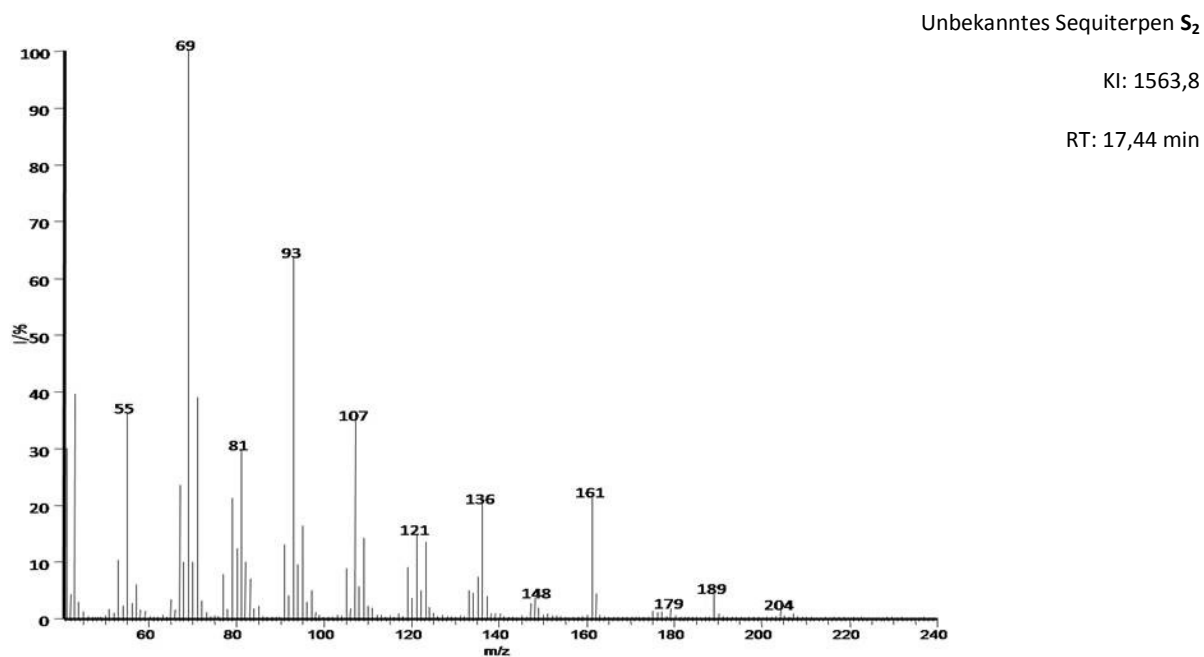


Abb. 66: EI-Massenspektrum des unbekanntes Sesquiterpens **S₂**, Nebenprodukt des aufgereinigten rekombinanten Enzyms SCO5222.

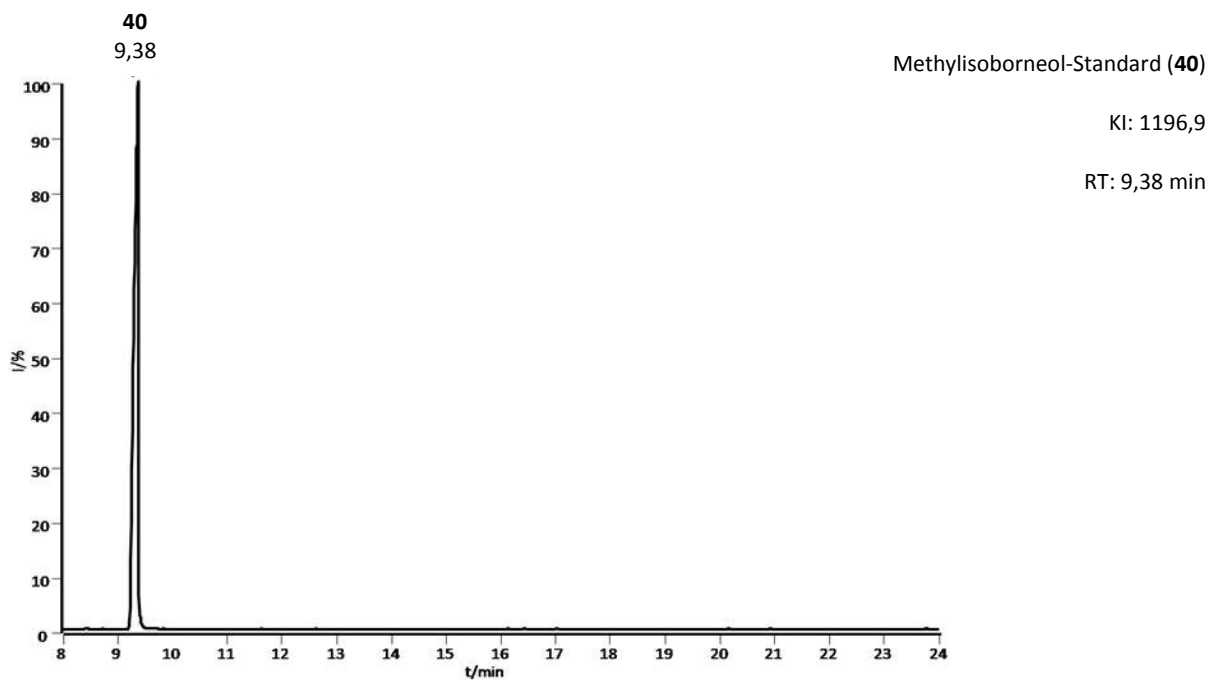


Abb. 67: Gaschromatogramm des Methylisoborneol-Standards (**40**).

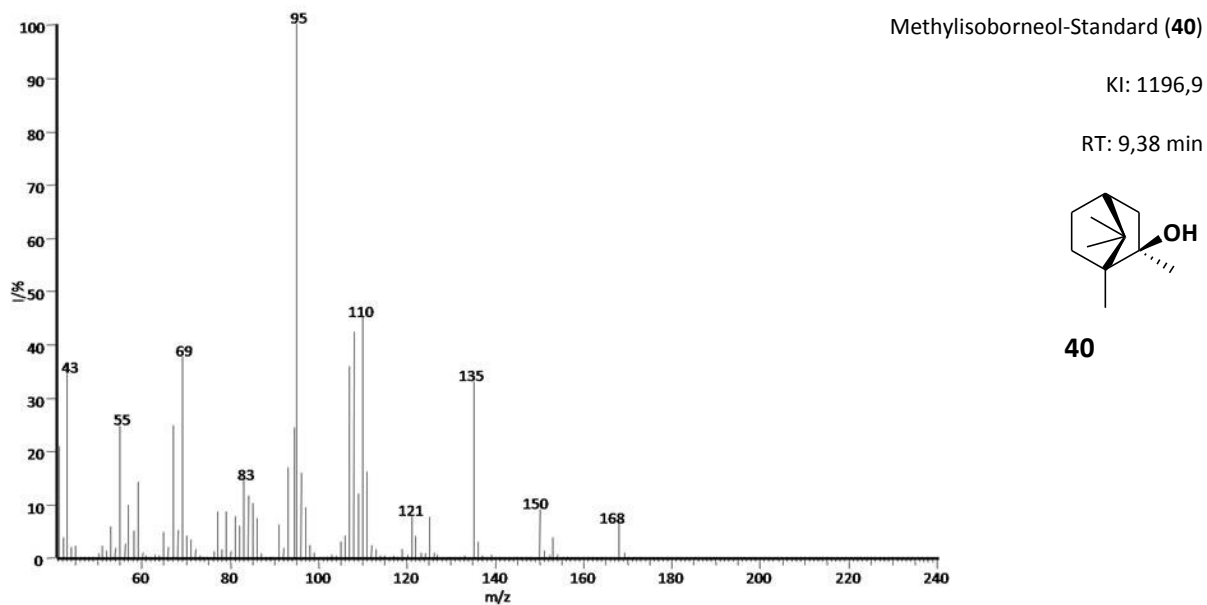


Abb. 68: EI-Massenspektrum des Methylisoborneol-Standards (40).

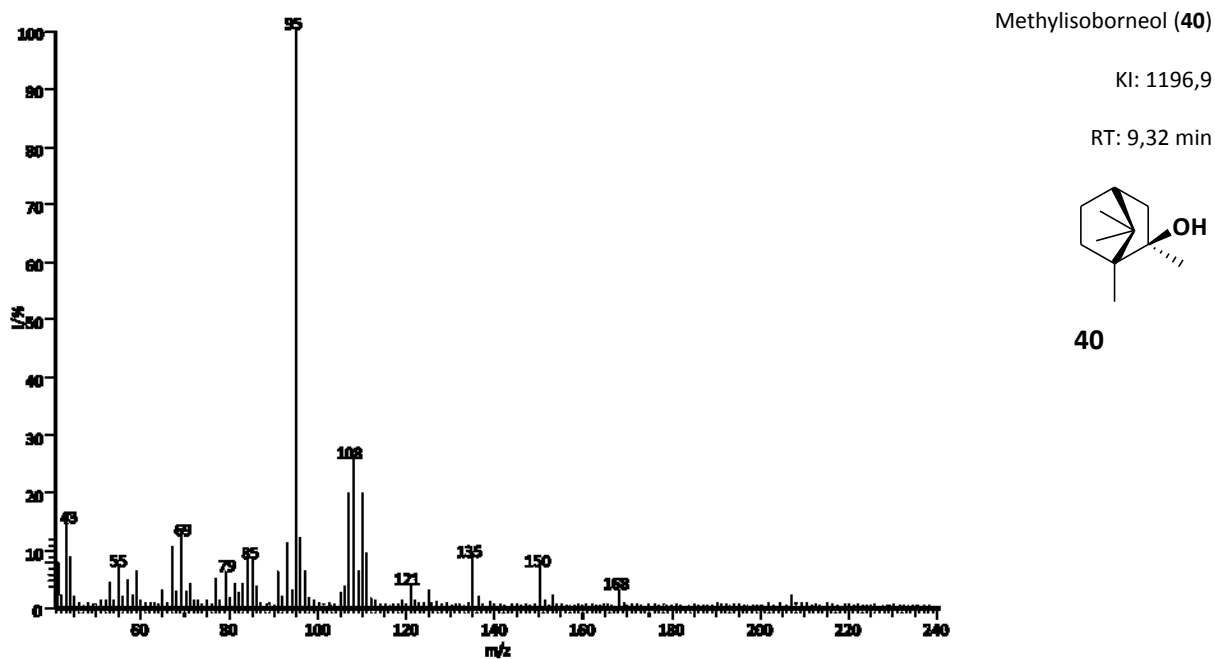
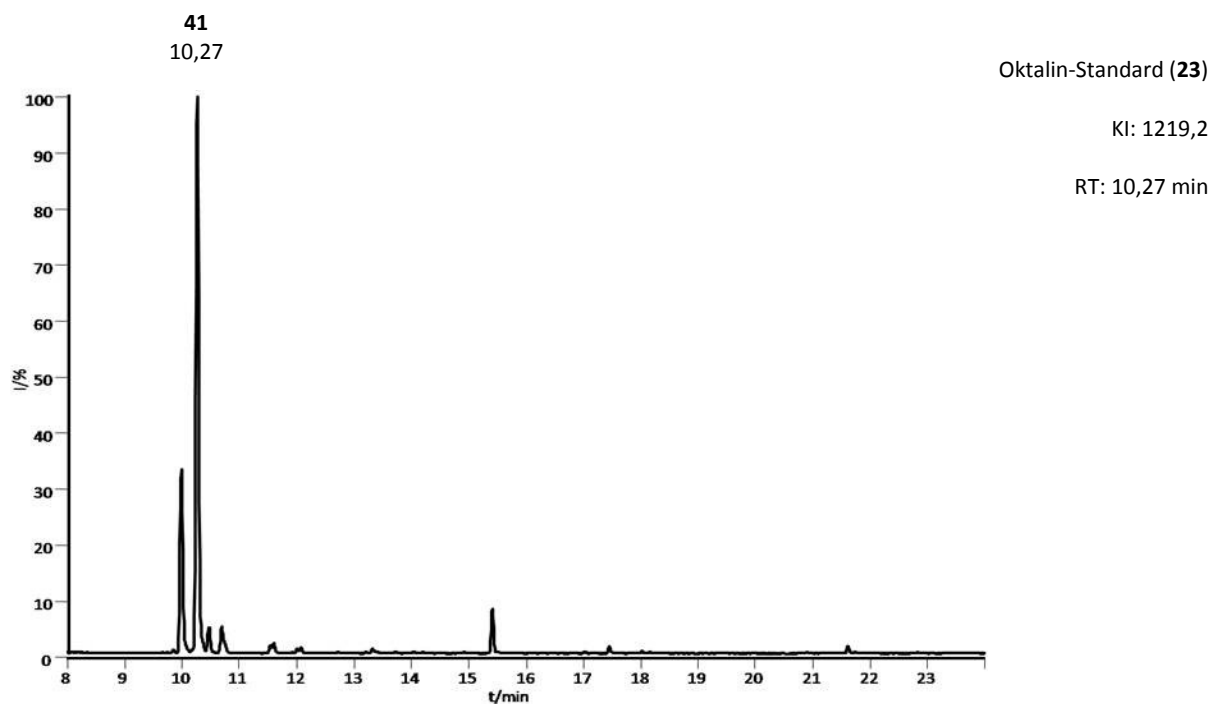
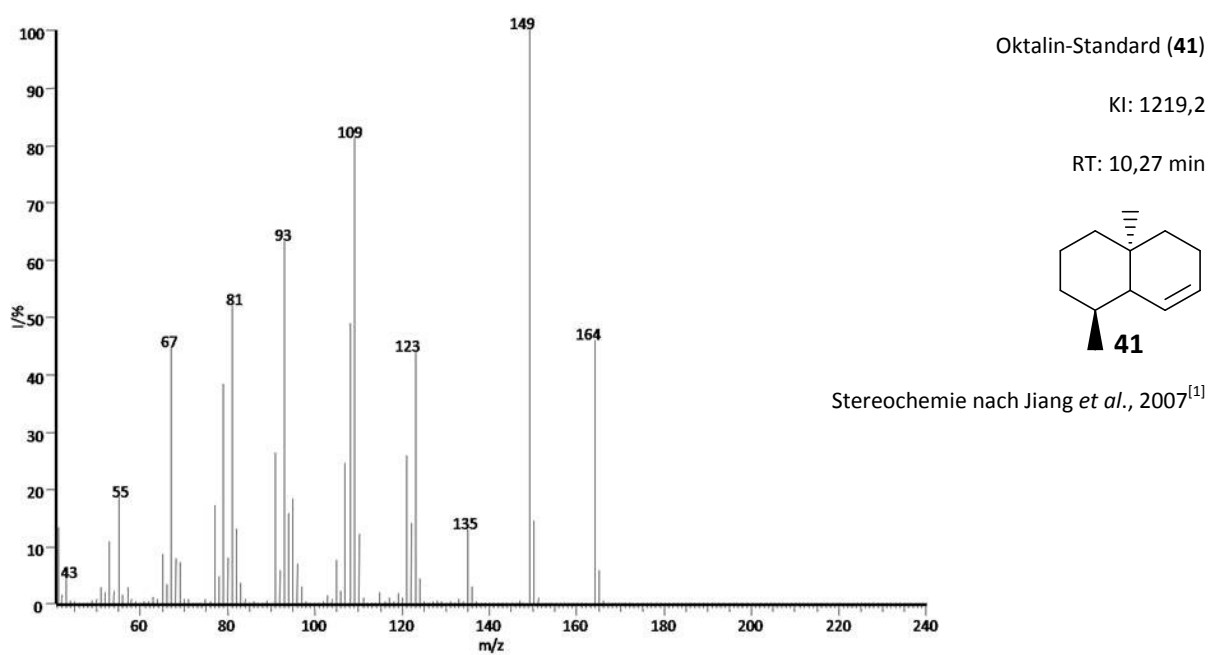
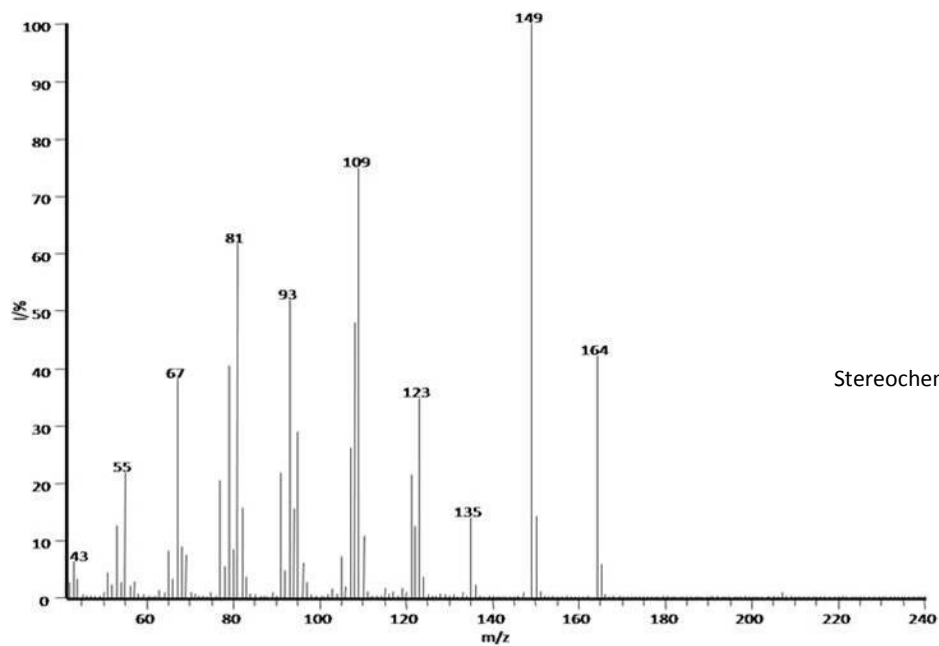


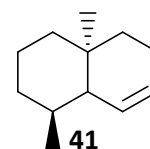
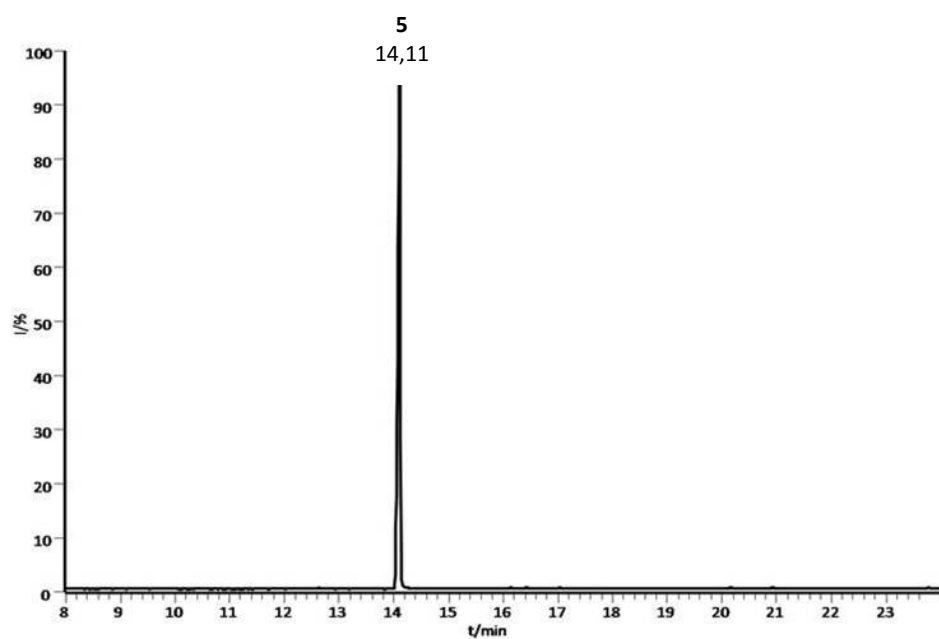
Abb. 69: EI-Massenspektrum des Methylisoborneols (40), gemessen im wt.

Abb. 70: Gaschromatogramm des *trans*-8,10-Methyl-1-Oktalin-Standards (41).Abb. 71: EI-Massenspektrum des *trans*-8,10-Methyl-1-Oktalin Standards (41).

Oktalin (**41**)

KI: 1219,2

RT: 10,28 min

Stereochemie nach Jiang *et al.*, 2007^[1]Abb. 72: EI-Massenspektrum des *trans*-8,10-Methyl-1-Oktalin (**41**), gemessen im wt.Geosmin-Standard (**5**)

KI: 1395,6

RT: 14,11 min

Abb. 73: Gaschromatogramm des Geosmin-Standards (**5**).

Geosmin-Standard (5)

KI: 1395,6

RT: 14,11 min

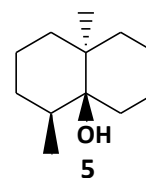
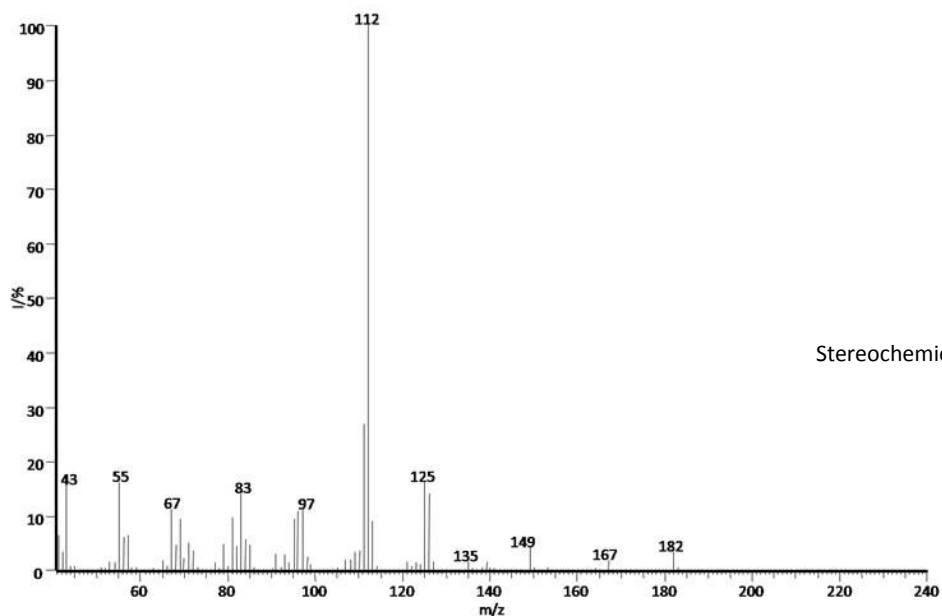
Stereochemie nach Jiang *et al.*, 2007^[1]

Abb. 74: EI-Massenspektrum des Geosmin-Standards (5).

Geosmin (5)

KI: 1394,7

RT: 14,09 min

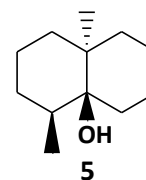
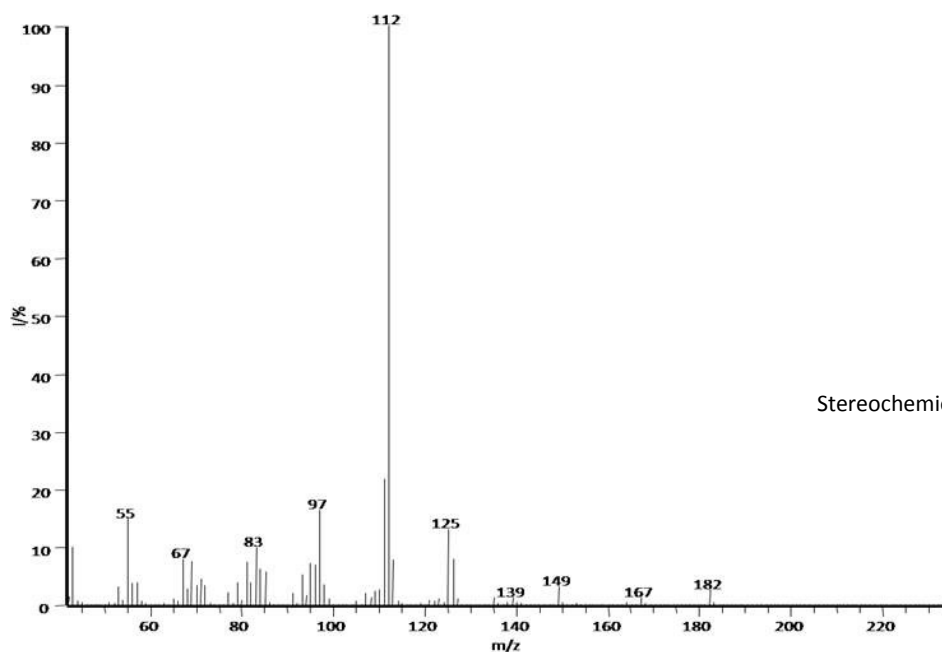
Stereochemie nach Jiang *et al.*, 2007^[1]

Abb. 75: EI-Massenspektrum des Geosmins (5), gemessen im wt.

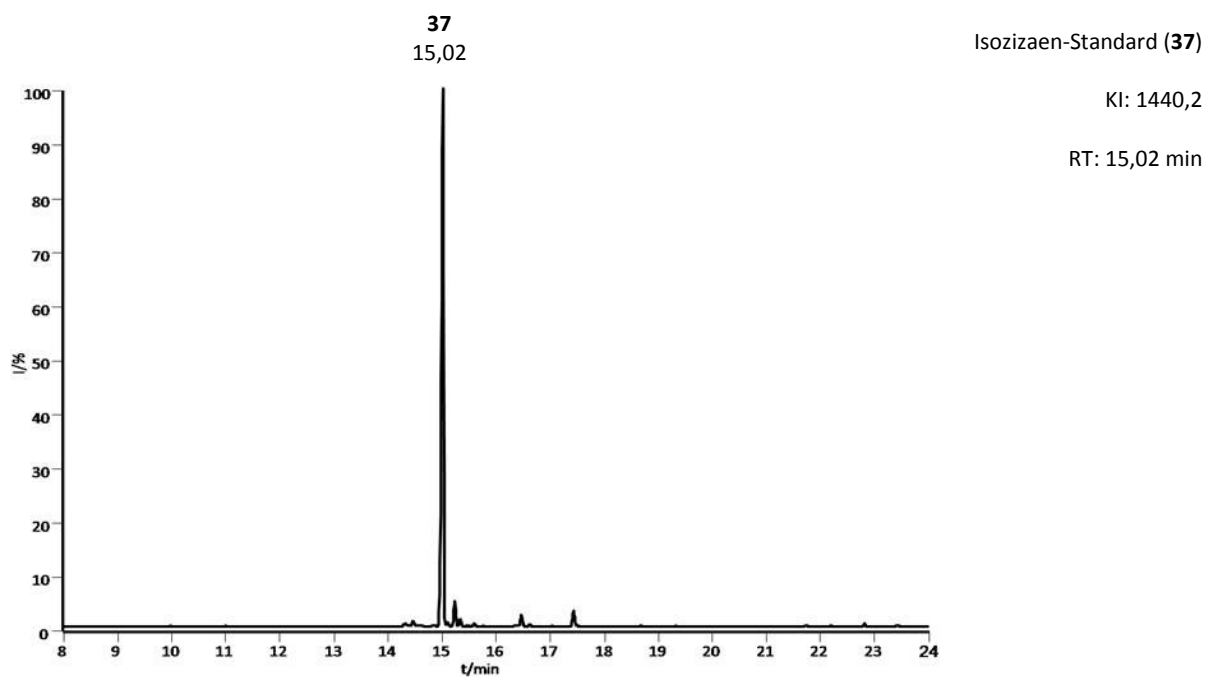


Abb. 76: Gaschromatogramm des Isozizaen-Standards (**37**), gesammelt über dem bakteriellen Rohextrakt von *E. coli* Rosetta 2/SCO5222.

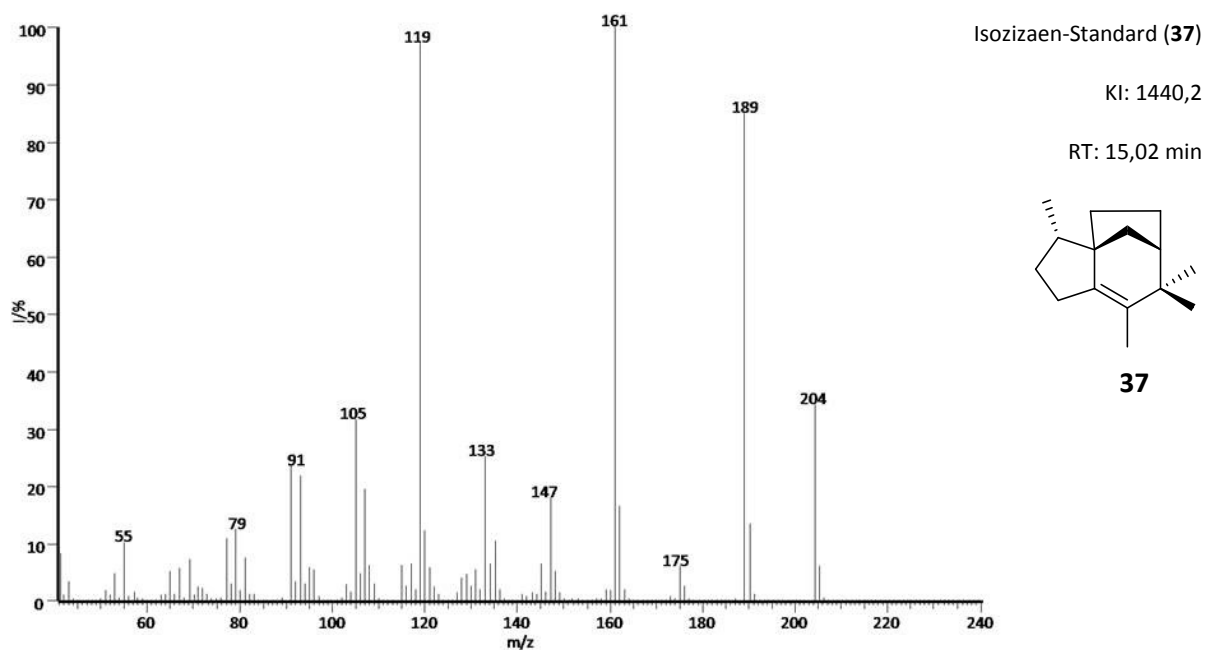
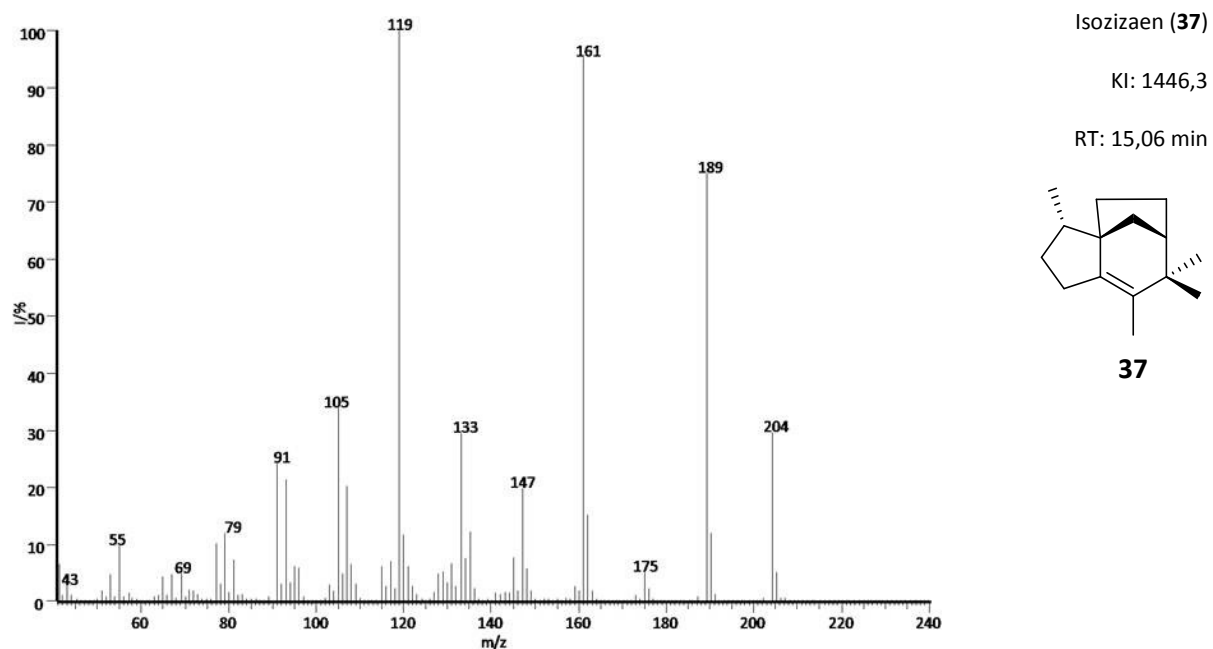
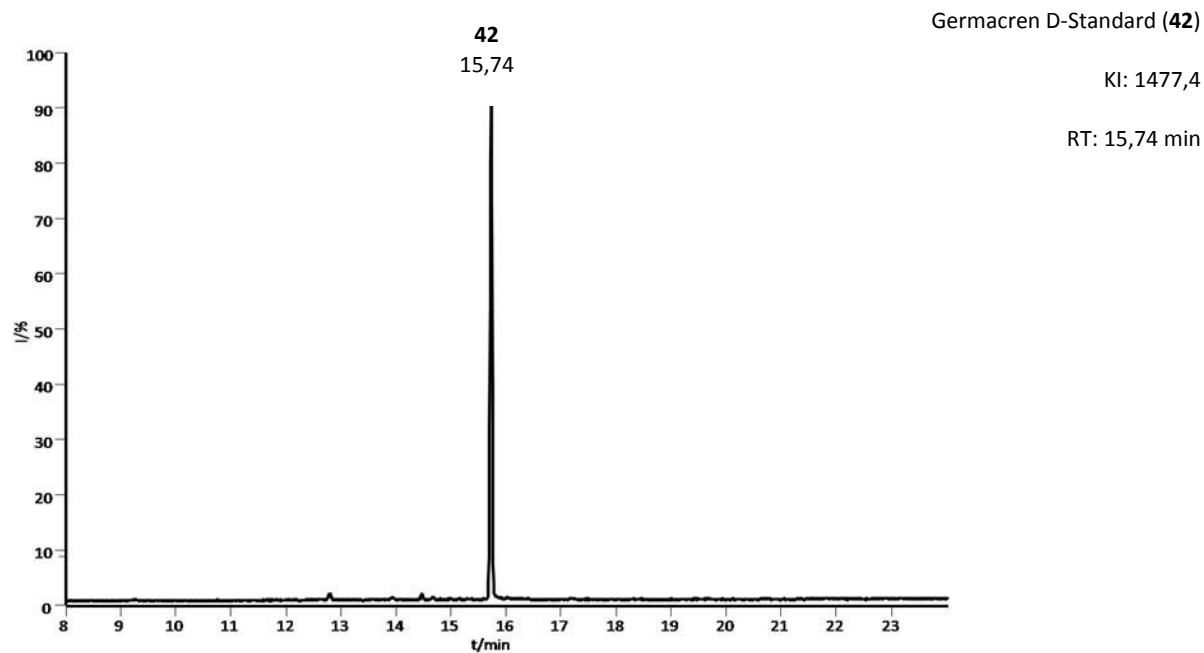


Abb. 77: EI-Massenspektrum des Isozizaen-Standards (**37**).

Abb. 78: EI-Massenspektrum des Isozizaens (**37**), gemessen im wt.Abb. 79: Gaschromatogramm des Germacren D-Standards (**42**).

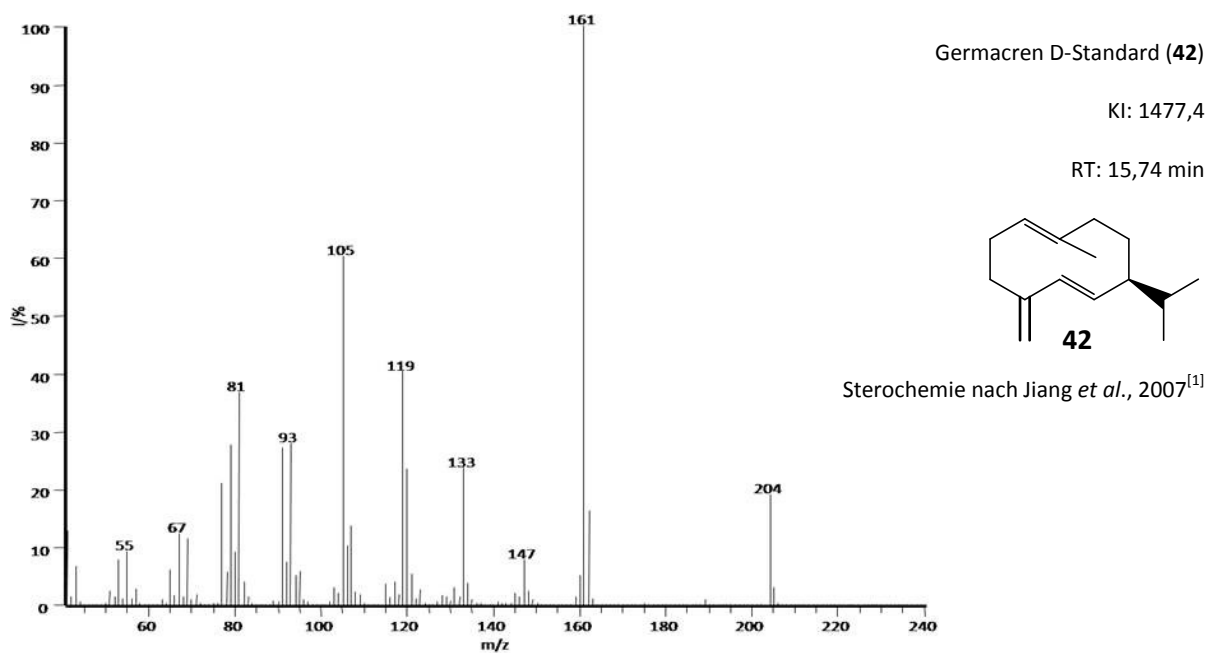


Abb. 80: EI-Massenspektrum des Germacren D-Standards (42).

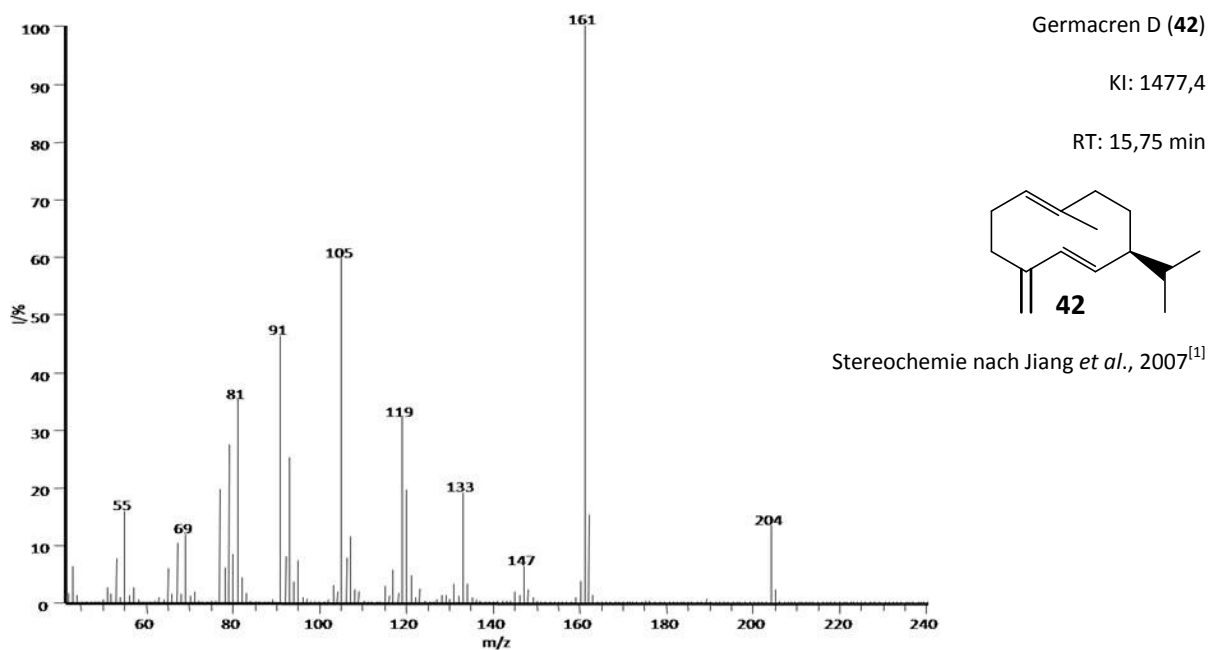
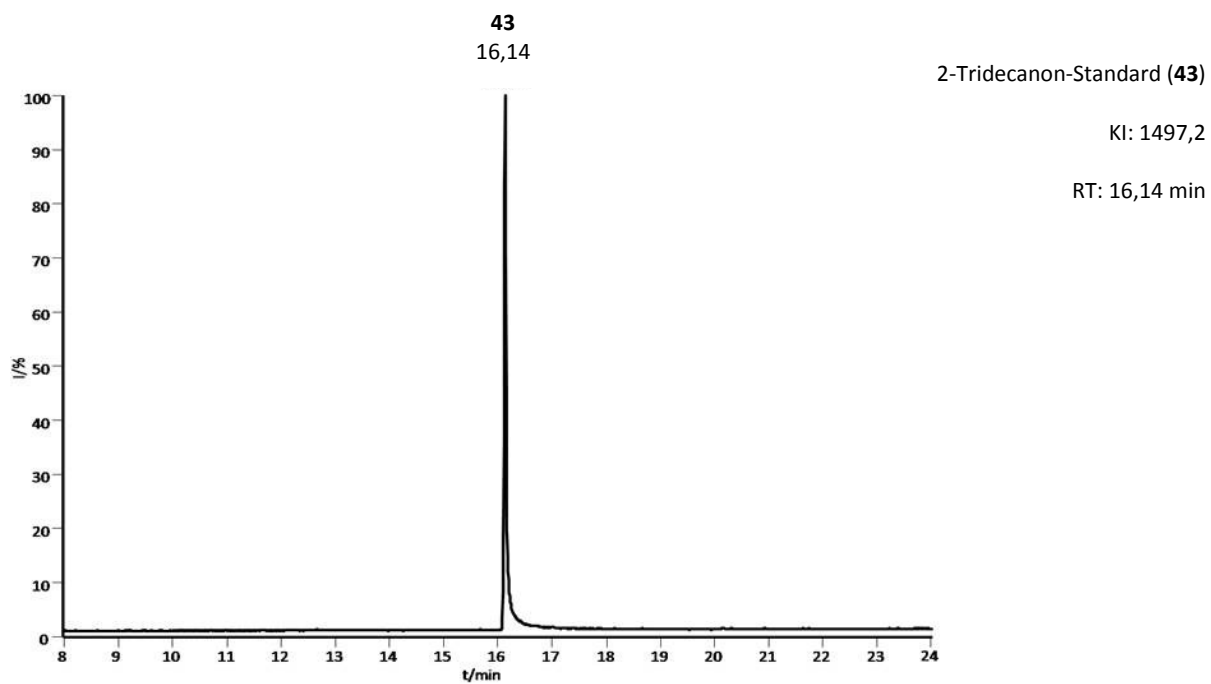
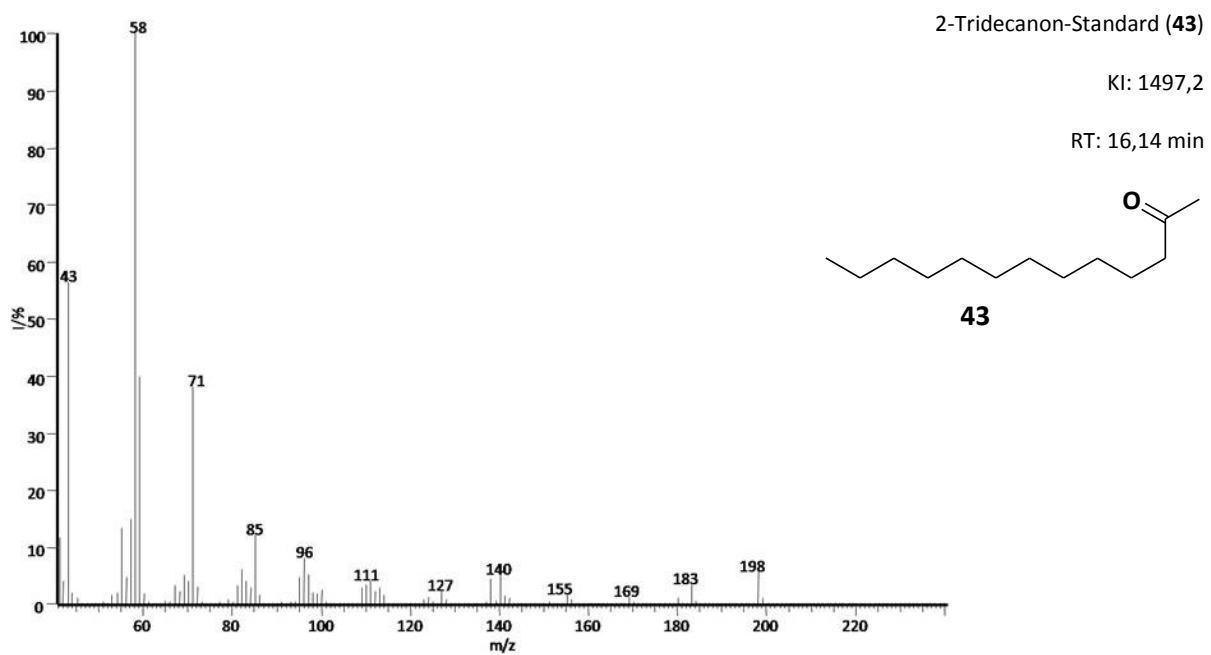
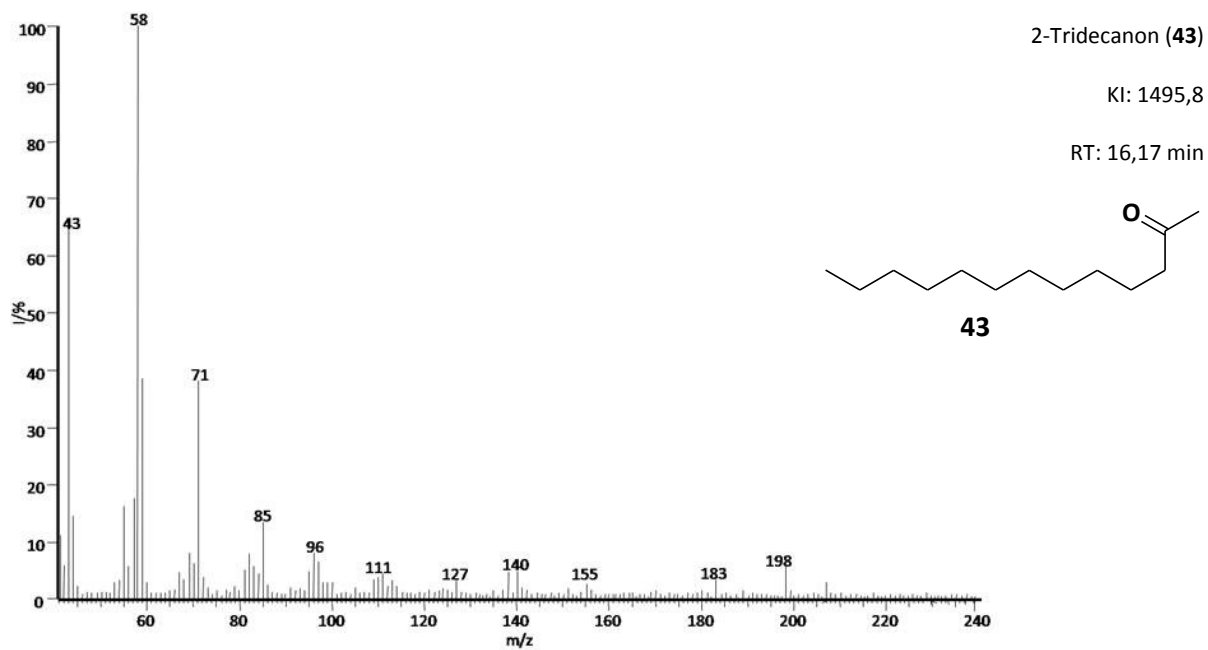
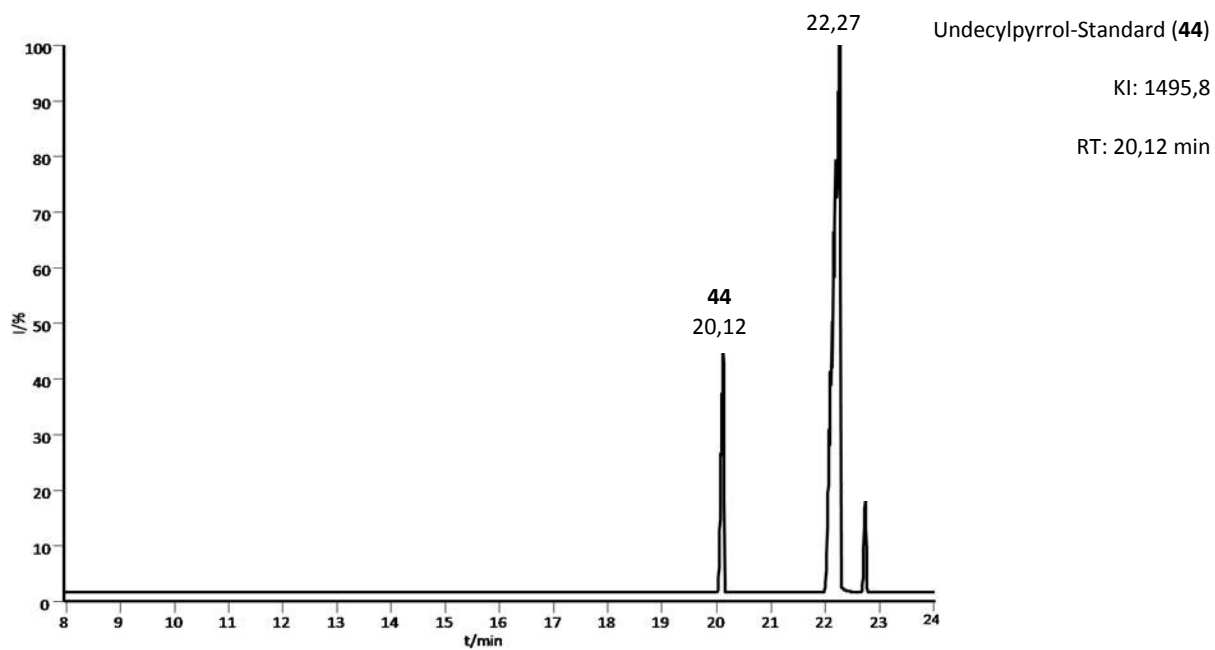


Abb. 81: EI-Massenspektrum von Germacren D (42), gemessen im wt.

Abb. 82: Gaschromatogramm des 2-Tridecanon-Standards. (**43**)Abb. 83: EI-Massenspektrum des 2-Tridecanon-Standards (**43**).

Abb. 84: EI-Massenspektrum von 2-Tridecanon (**43**), gemessen im Duft des roten Phänotyps.Abb. 85: Gaschromatogramm des Undecylpyrrol-Standards (**44**).

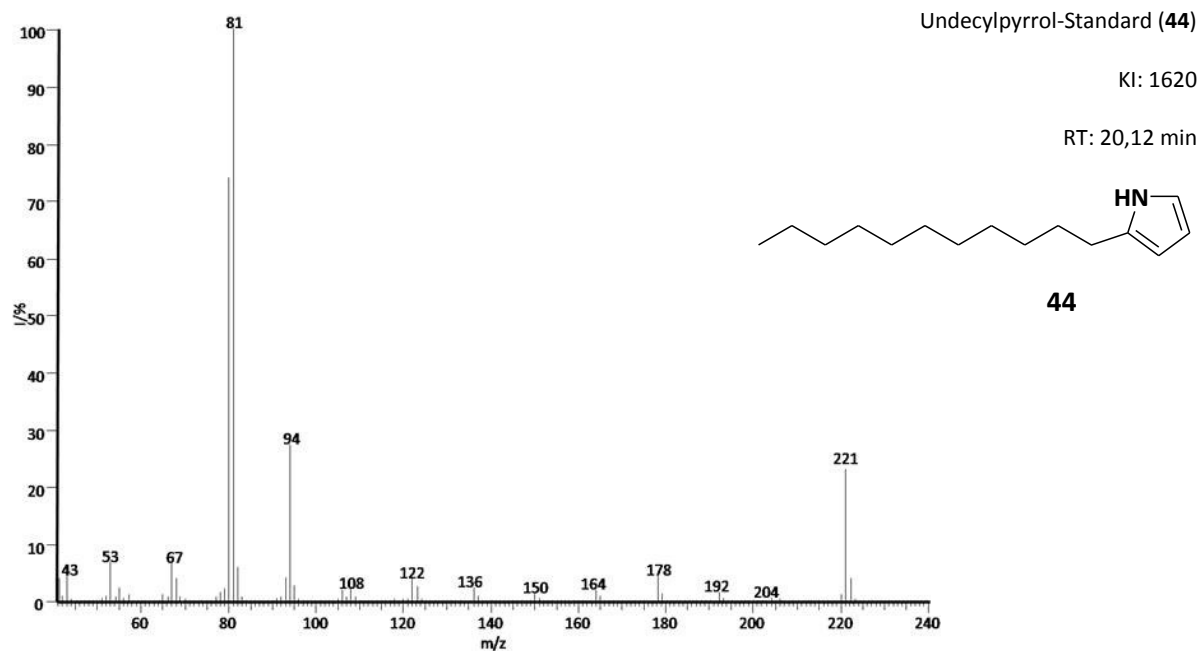


Abb. 86: EI-Massenspektrum des Undecylpyrrols (44) aus dem Standard.

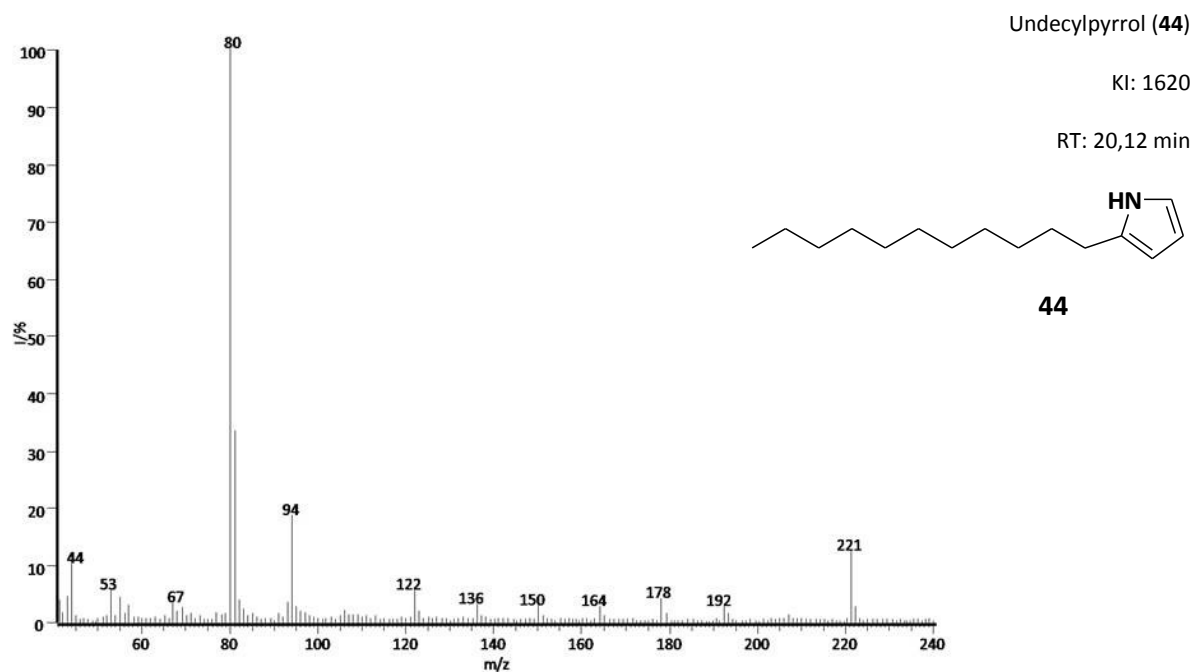


Abb. 87: EI-Massenspektrum Undecylpyrrol (44), gemessen im Duft des roten Phänotyps.

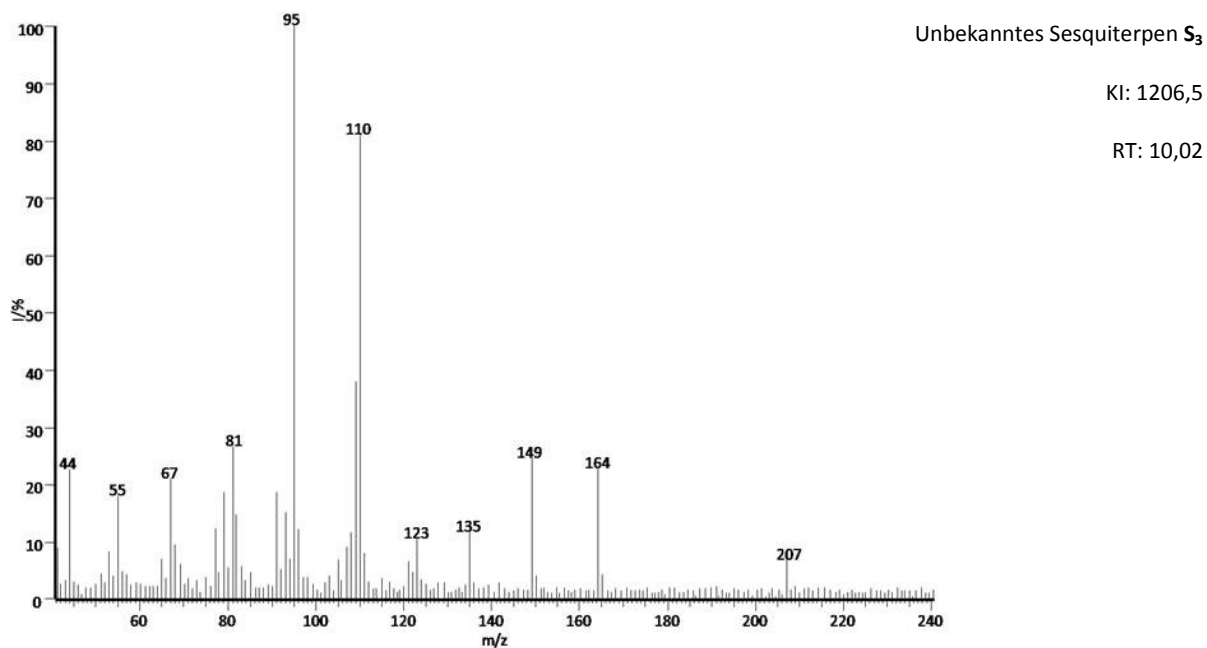


Abb. 88: EI-Massenspektrum zum unbekanntem Sesquiterpens **S₃**, gemessen im Duft des Wildtyps von *Streptomyces coelicolor*.

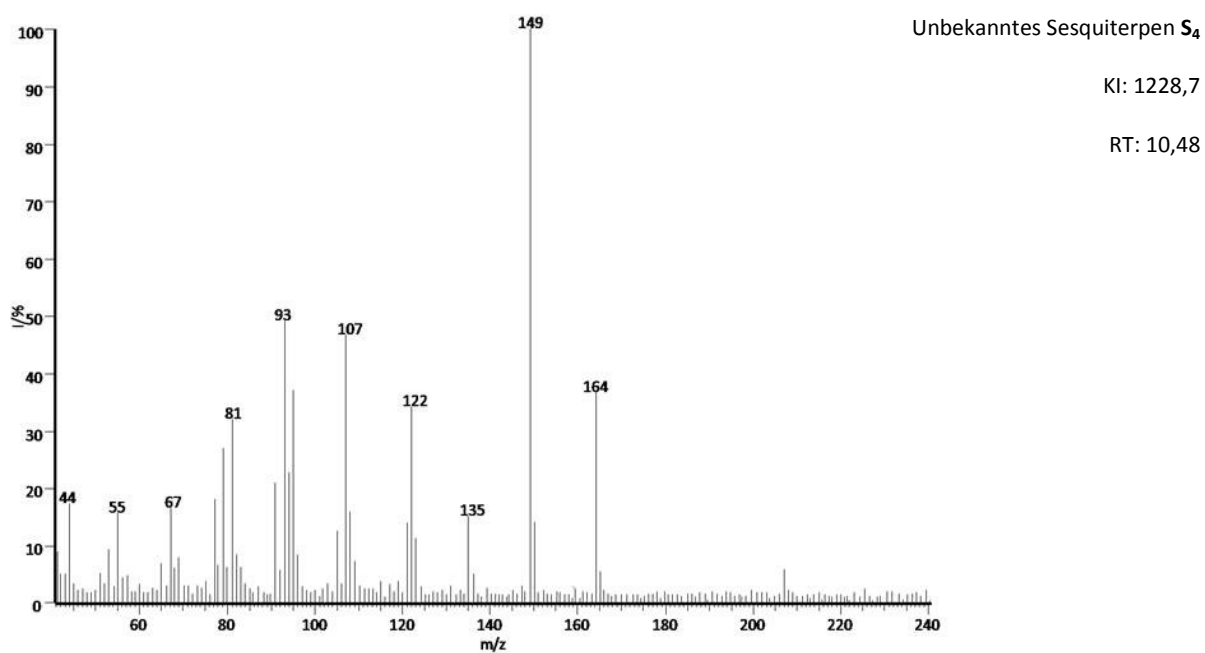


Abb. 89: EI-Massenspektrum zum unbekanntem Sesquiterpens **S₄**, gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

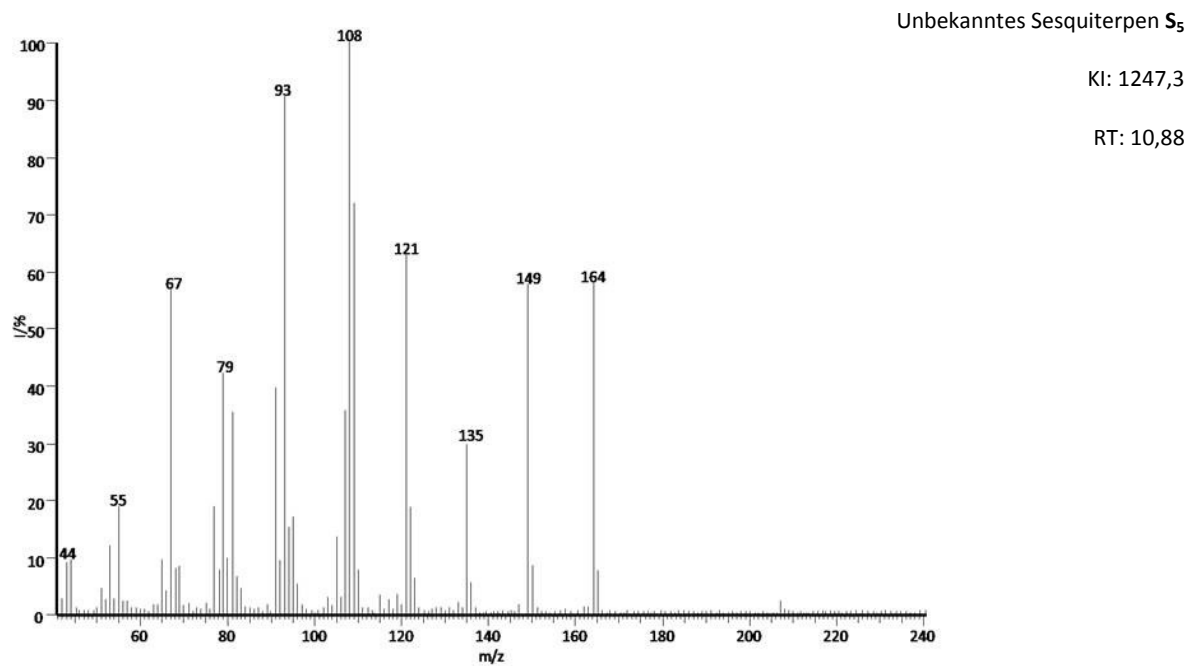


Abb. 90: EI-Massenspektrum zum unbekanntem Sesquiterpen S_5 , gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

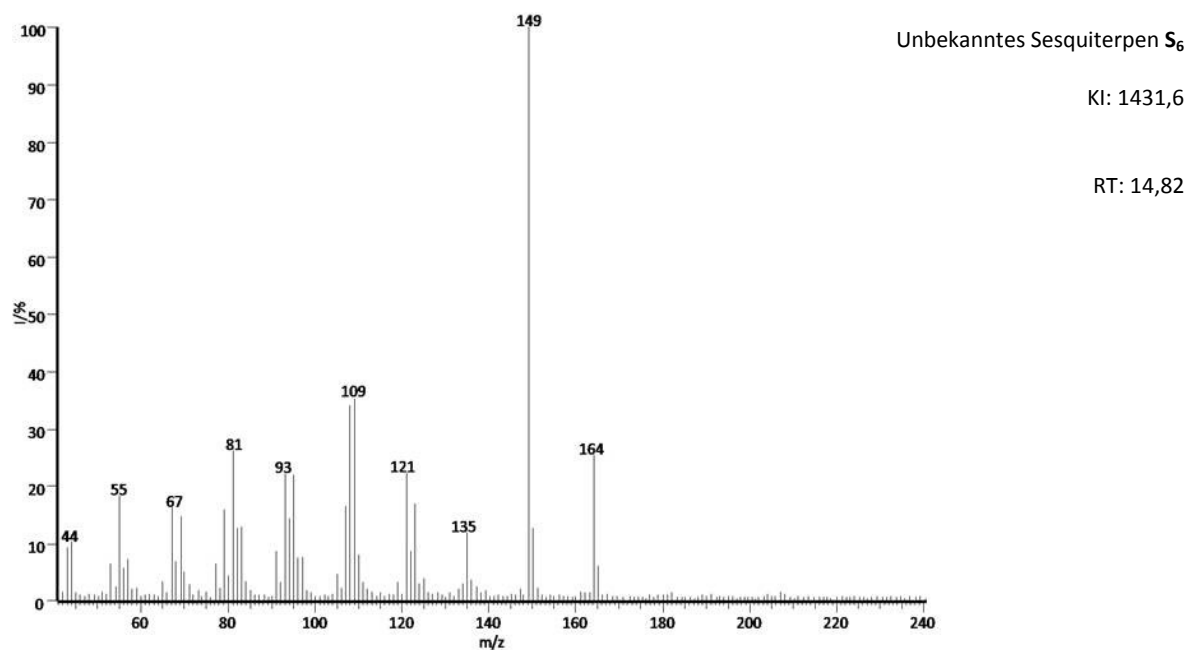


Abb. 91: EI-Massenspektrum des unbekanntem Sesquiterpen S_6 , gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

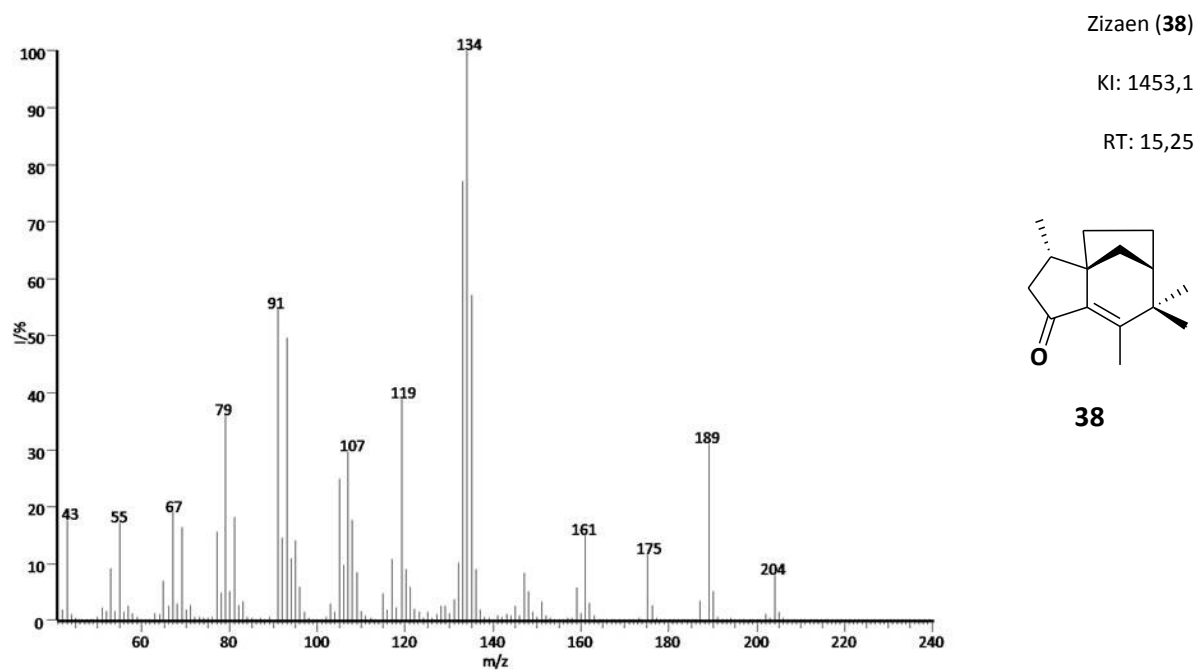


Abb. 92: EI-Massenspektrum des Zizaens^[22] (**38**), gemessen im Duft des wt von *Streptomyces coelicolor*.

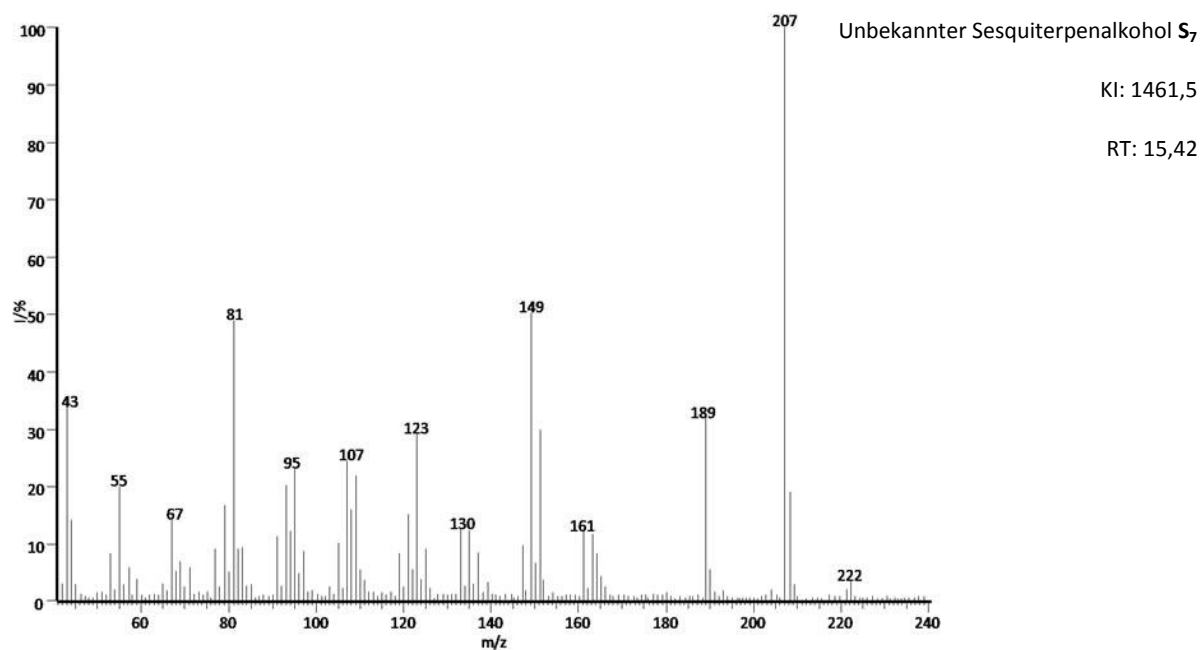


Abb. 93: EI-Massenspektrum zum unbekanntem Sesquiterpenalkohol **S₇**, gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

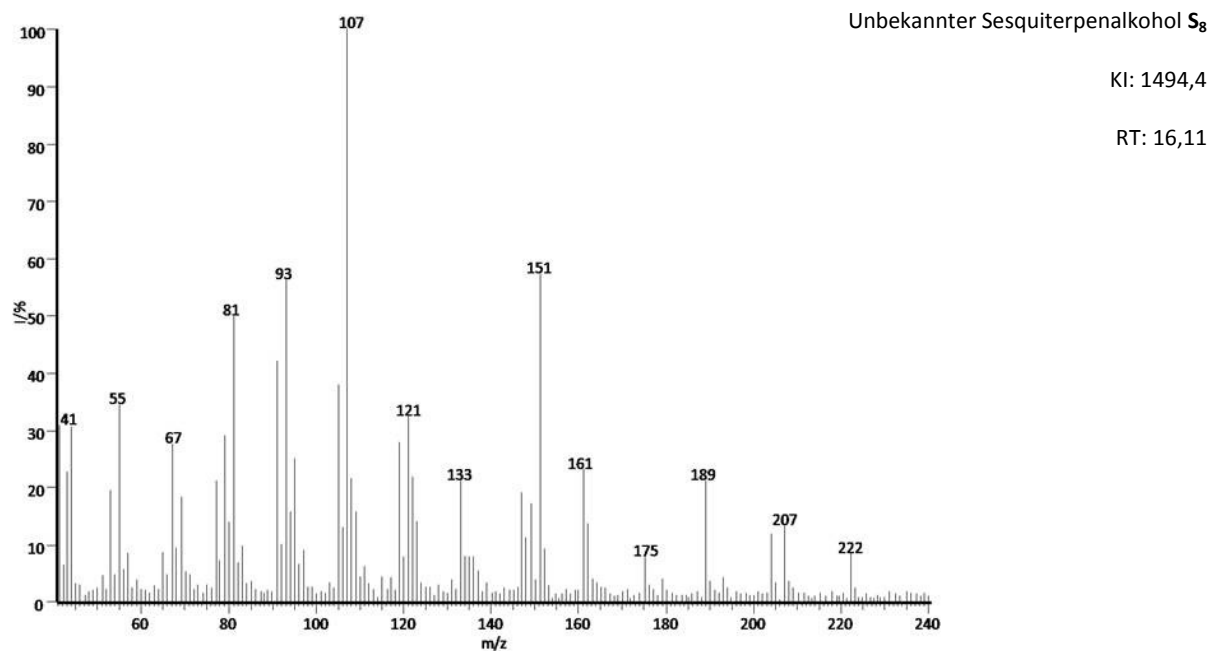


Abb. 94: EI-Massenspektrum zum unbekanntem Sesquiterpenalkohol S₈, gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

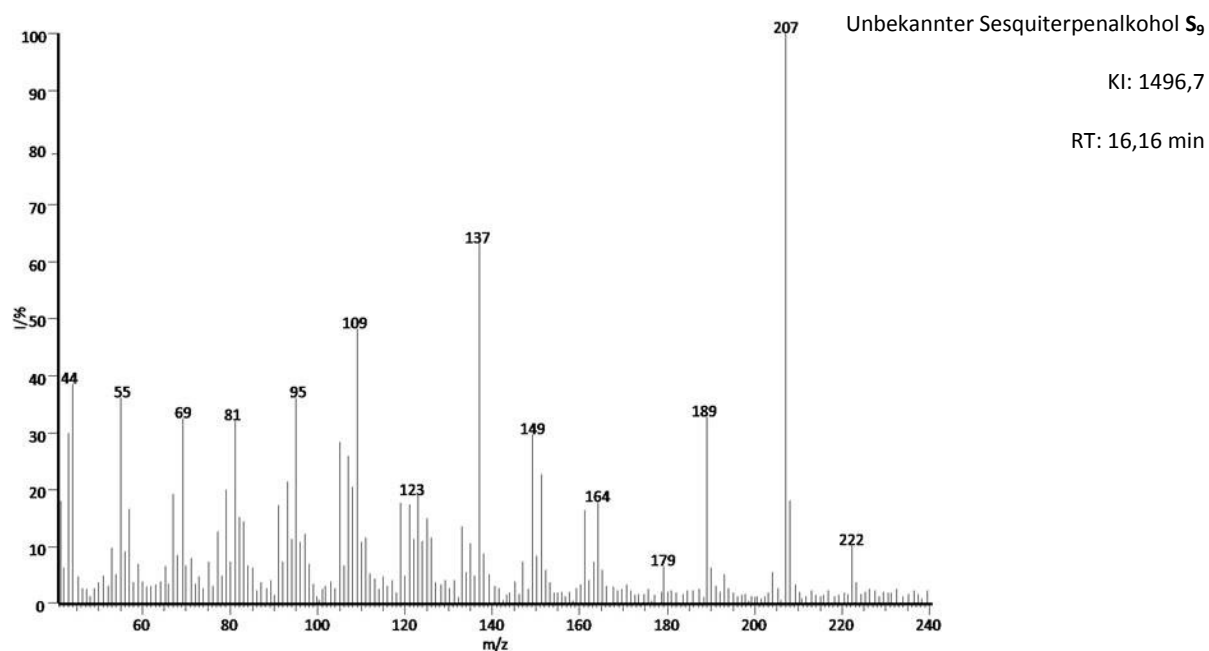


Abb. 95: EI-Massenspektrum des Sesquiterpenalkohols S₉, gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

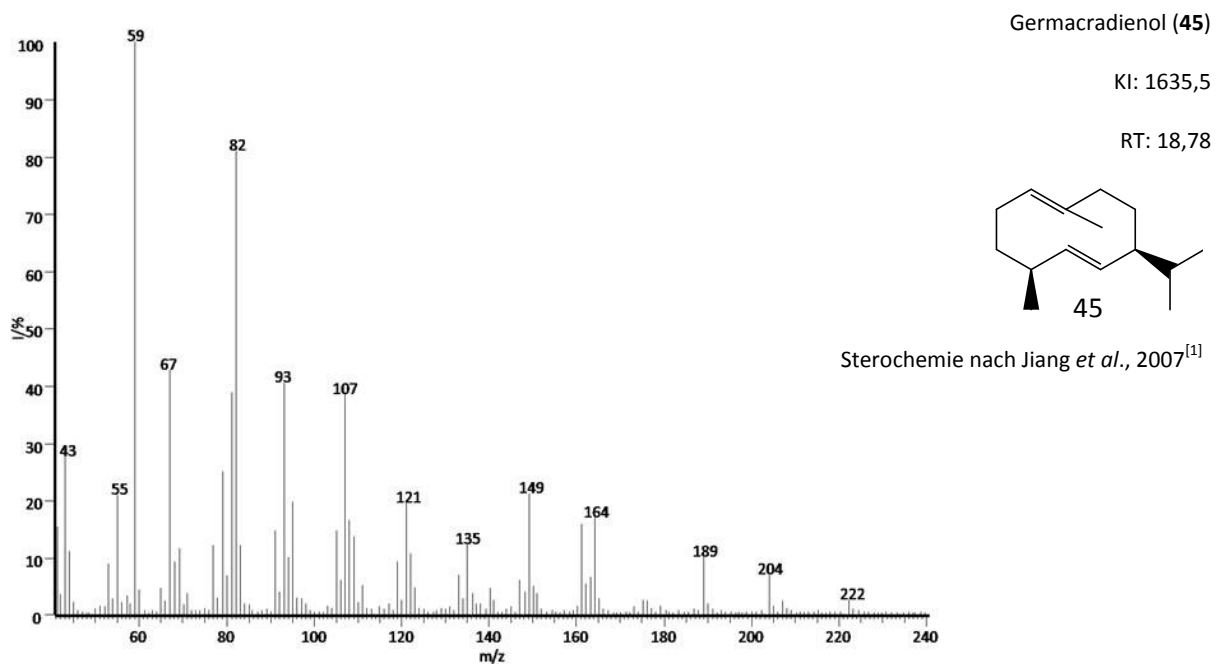


Abb. 96: EI-Massenspektrum des Germacradienols^[216] (45), gemessen im Duft des *Streptomyces coelicolor*-Wildtyps.

Reinigung der rekombinanten Isozizaenzyklase

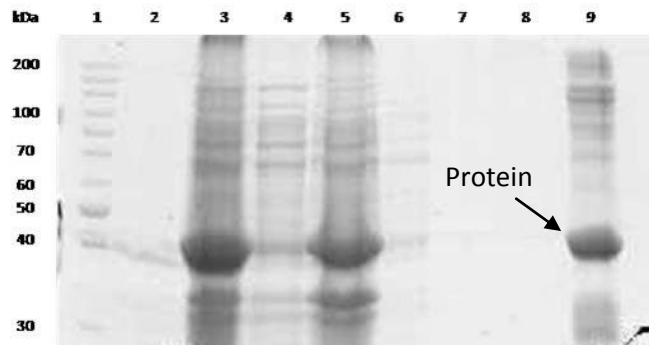


Abb. 97: SDS-Page, affinitätschromatographische Aufreinigung der Isozizaenzyklase aus *E. coli* Rosetta 2/SCO5222: (1) Marker, (2) Kulturüberstand, (3) Zellpellet, (4) Lysat, (5) Zelltrümmer, (6) Bindungspuffer, (7) Waschpuffer, (8) Elutionspuffer nach Ultrafiltration, (9) Protein.

Berechnung der Kovatsindices

$$KI(x) = 100P_z + 100 \cdot \left(\frac{\log RT(x) - \log RT(P_z)}{\log RT(P_{z+1}) - \log RT(P_z)} \right)$$

KI	Kovatsindex ^[217]
P_z	Anzahl der C-Atome des Alkans vor der Verbindung
$RT(P_z)$	Retentionszeit des Alkans vor Verbindung in min
RT	Retentionszeit der Verbindung in min
$RT(P_{z+1})$	Retentionszeit des Alkans nach der Verbindung in min

Tab. 26: Kovatsindices der Terpene aus dem Duft des Wildtyps.

Nummer	Name	P_z	$RT(P_z)$	$RT(x)$	$RT(P_{z+1})$	KI	Ursprung
40	Methylisoborneol	11	7,63	9,23	9,38	1196,9	wt
S ₁	unbekanntes Sesquiterpen S1	12	9,89	10,02	12,1	1206,5	wt
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	12	9,89	10,28	12,1	1219,2	wt
S ₂	unbekanntes Sesquiterpen S2	12	9,89	10,48	12,1	1228,7	wt
S ₃	unbekanntes Sesquiterpen S3	12	9,89	10,88	12,1	1247,3	wt
5	Geosmin	13	12,1	14,09	14,21	1394,7	wt
S ₄	unbekanntes Sesquiterpen S4	14	14,21	14,82	16,23	1431,6	wt
37	Isozizaen	14	14,21	15	16,23	1440,7	wt
38	Zizaen	14	14,21	15,25	16,23	1453,1	wt
S ₆	unbekannter Sesquiterpenalkohol S6	14	14,21	15,42	16,23	1461,5	wt
44	Germacren D	14	14,21	15,75	16,23	1477,4	wt
S ₇	unbekannter Sesquiterpenalkohol S7	14	14,21	16,11	16,23	1494,4	wt
S ₈	unbekannter Sesquiterpenalkohol S8	14	14,21	16,16	16,23	1496,7	wt
45	Germacradienol	16	18,16	18,79	19,99	1635,5	wt

Tab. 27: Kovatsindices der Terpene aus dem Duft des Wildtyps unter Cobaltionenstress.

Nummer	Name	P_z	$RT(P_z)$	$RT(x)$	$RT(P_{z+1})$	KI	Ursprung
40	Methylisoborneol	11	7,63	9,23	9,38	1196,9	wt+Co ²⁺
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	12	9,89	10,28	12,1	1219,2	wt+Co ²⁺
5	Geosmin	13	12,1	14,08	14,21	1394,3	wt+Co ²⁺
37	Isozizaen	14	14,21	15	16,23	1440,7	wt+Co ²⁺
42	Germacren D	14	14,21	15,75	16,23	1477,4	wt+Co ²⁺

Tab. 28: Kovatsindices der flüchtigen Substanzen aus dem Duft des roten Phänotyps unter Cobaltionenstress.

Nummer	Name	P_z	$RT(P_z)$	$RT(x)$	$RT(P_{z+1})$	KI	Ursprung
40	Methylisoborneol	11	7,63	9,32	9,38	1196,9	rot
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	12	9,89	10,28	12,1	1219,2	rot
5	Geosmin	13	12,1	14,1	14,21	1395,2	rot
37	Isozizaen	14	14,21	15	16,23	1440,7	rot
42	Germacren D	14	14,21	15,76	16,23	1477,9	rot
43	2-Tridecanon	14	14,21	16,17	16,23	1497,2	rot
26		16	21,75	22,08	23,45	1620	rot

Tab. 29: Kovatsindices der Terpene aus dem Duft des blauen Phänotyps unter Cobaltionenstress.

Nummer	Name	P _z	RT(P _z)	RT(x)	RT(P _{z+1})	KI	Ursprung
40	Methylisoborneol	11	7,63	9,23	9,38	1196,9	blau
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	12	9,89	10,28	12,1	1219,2	blau
5	Geosmin	13	12,1	14,09	14,21	1394,7	blau
37	Isozizaen	14	14,21	14,99	16,23	1440,2	blau
42	Germacren D	14	14,21	15,73	16,23	1476,4	blau

Tab. 30: Kovatsindices von Referenzsubstanzen.

Nummer	Name	P _z	RT(P _z)	RT(x)	RT(P _{z+1})	KI
40	Methylisoborneol	11	7,63	9,23	9,38	1196,9
41	<i>trans</i> -8-10-dimethyl-1-Oktalin	12	9,89	10,27	12,1	1218,7
5	Geosmin	13	12,1	14,11	14,21	1395,6
37	Isozizaen (Rohextrakt)	14	14,21	15,02	16,23	1444,4
37	Isozizaen (SCO5222)	14	14,21	15,06	16,23	1446,3
42	Germacren D	14	14,21	15,73	16,23	1476,5
43	2-Tridecanon	14	14,21	16,14	16,23	1495,8
44	Undecylpyrrol	16	21,75	22,04	23,45	1617,6

Tab. 31: Differenzen der Kovatsindices zwischen den kalkulierten Werten für die Substanzen aus dem Duft des Wildtyps und den Kovatsindices der Referenzsubstanzen.

Nummer	Name	KI _{mess}	KI _{Ref}	Differenz KI _{mess} -KI _{Ref}
40	Methylisoborneol	1196,9	1196,9	0
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	1219,2	1218,7	0,5
5	Geosmin	1394,7	1395,6	-0,9
37	Isozizaen (Rohextrakt)	1440,7	1444,4	-3,7
37	Isozizaen (SCO5222)	1440,7	1446,3	-5,6
42	Germacren D	1477,4	1476,5	0,9

Tab. 32: Differenzen der Kovatsindices zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten Werten für die Substanzen aus dem Duft des Wildtyps unter Cobaltionenstress und die Referenzsubstanzen.

Nummer	Name	KI _{mess}	KI _{Ref}	Differenz KI _{mess} -KI _{Ref}
40	Methylisoborneol	1196,9	1196,9	0
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	1219,2	1218,7	0,5
1	5	1394,3	1395,6	-1,3
37	Isozizaen (Rohextrakt)	1440,7	1444,4	-3,7
37	Isozizaen (SCO5222)	1440,7	1446,3	-5,6
42	Germacren D	1477,4	1476,5	0,9

Tab. 33: Differenzen der Kovatsindices zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten Werten für die Substanzen aus dem Duft des roten Phänotyps und die Referenzsubstanzen.

Nummer	Name	KI _{mess}	KI _{Ref}	Differenz KI _{mess} -KI _{Ref}
40	Methylisoborneol	1196,9	1196,9	0
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	1219,2	1218,7	0,5
5	Geosmin	1395,2	1395,6	-0,4
37	Isozizaen (Rohextrakt)	1440,7	1444,4	-3,7
37	Isozizaen (SCO5222)	1440,7	1446,3	-5,6
42	Germacren D	1477,9	1476,5	1,4
43	2-Tridecanon	1497,2	1495,8	1,4
44	Undecylpyrrol	1620	1617,6	2,4

Tab. 34: Differenzen der Kovatsindices zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten Werten für die Substanzen aus dem Duft des blauen Phänotyps und die Referenzsubstanzen.

Nummer	Name	KI _{mess}	KI _{Ref}	Differenz KI _{mess} -KI _{Ref}
40	Methylisoborneol	1196,9	1196,9	0
41	<i>trans</i> -8-10-Dimethyl-1-Oktalin	1219,2	1218,7	0,5
5	Geosmin	1394,7	1395,6	-0,9
37	Isozizaen (Rohextrakt)	1440,2	1444,4	-4,2
37	Isozizaen (SCO5222)	1440,2	1446,3	-6,1
42	Germacren D	1476,4	1476,5	-0,1

Die ermittelten Differenzen kann aus der Zeitverzögerung bei der Injektion der einzelnen SPME-Fasern resultieren.

HPLC-MS-Analyse des Metabolitenprofils von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

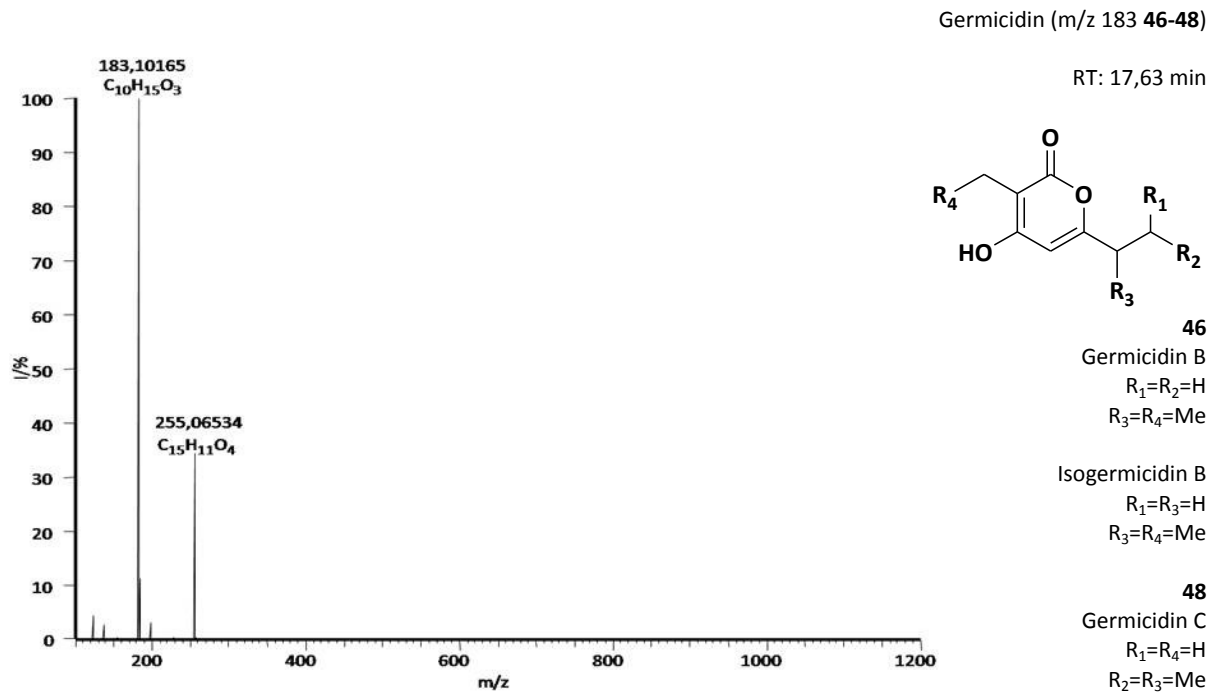


Abb. 98: Hoचाufgelöstes Massenspektrum des Germicidins (m/z 183 46-48) und die daraus berechnete Summenformel.

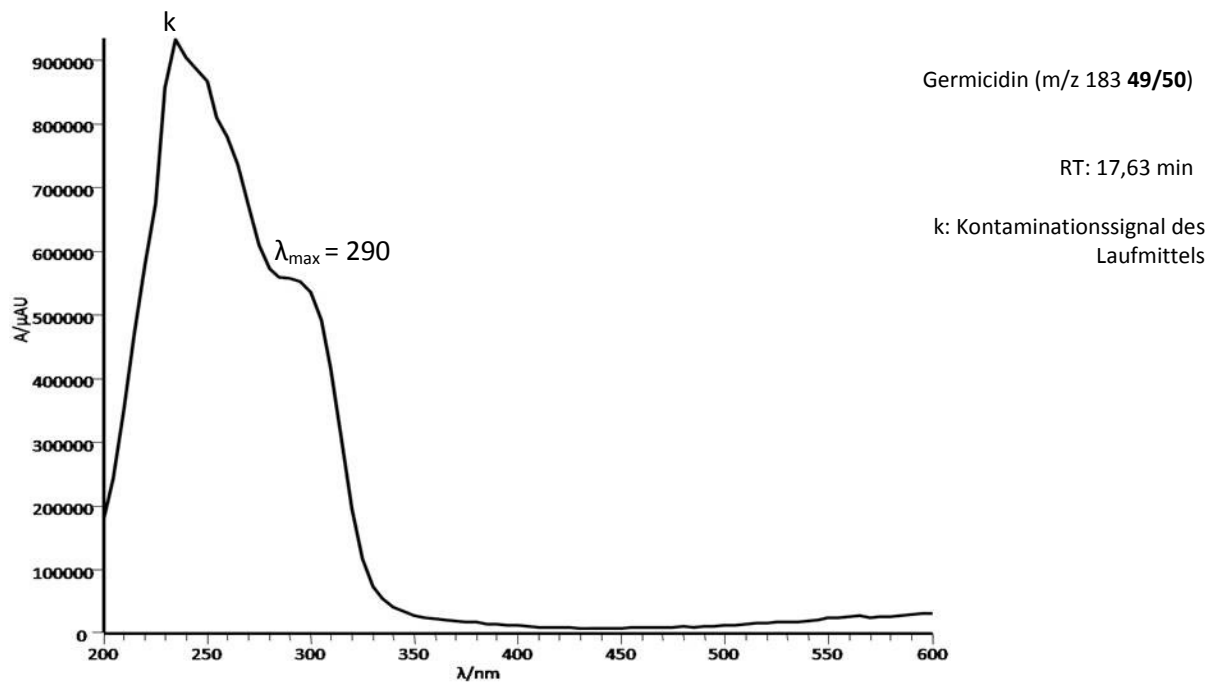


Abb. 99: UV/VIS-Spektrum des Germicidins (m/z 183 49/50).

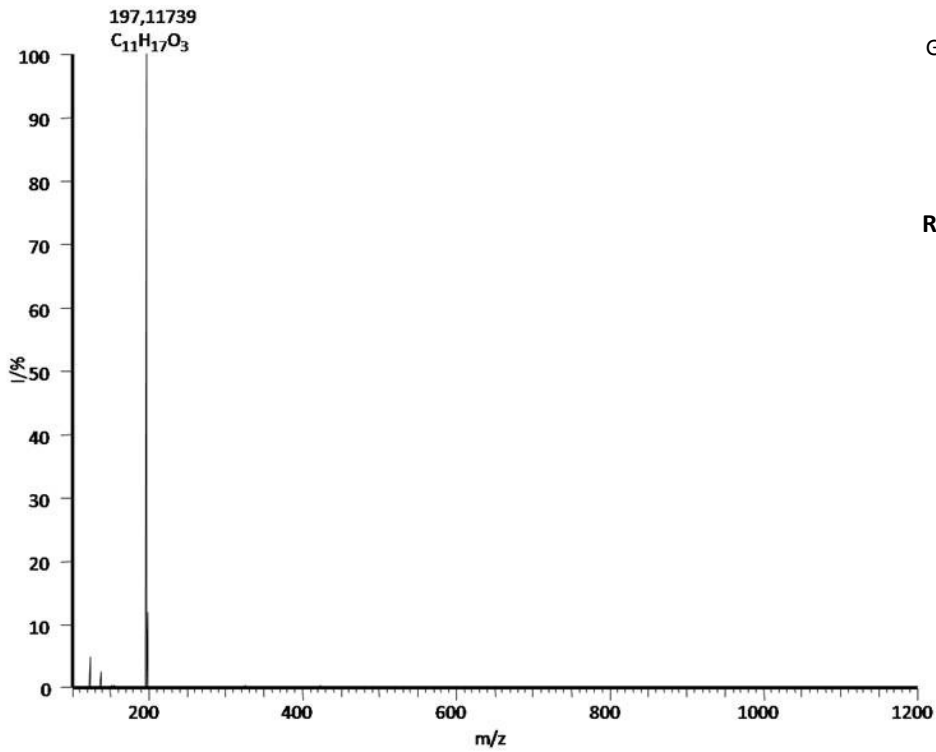


Abb. 100: Hochaufgelöstes Massenspektrum des Germicidins (m/z 183 49/50) und die daraus berechnete Summenformel.

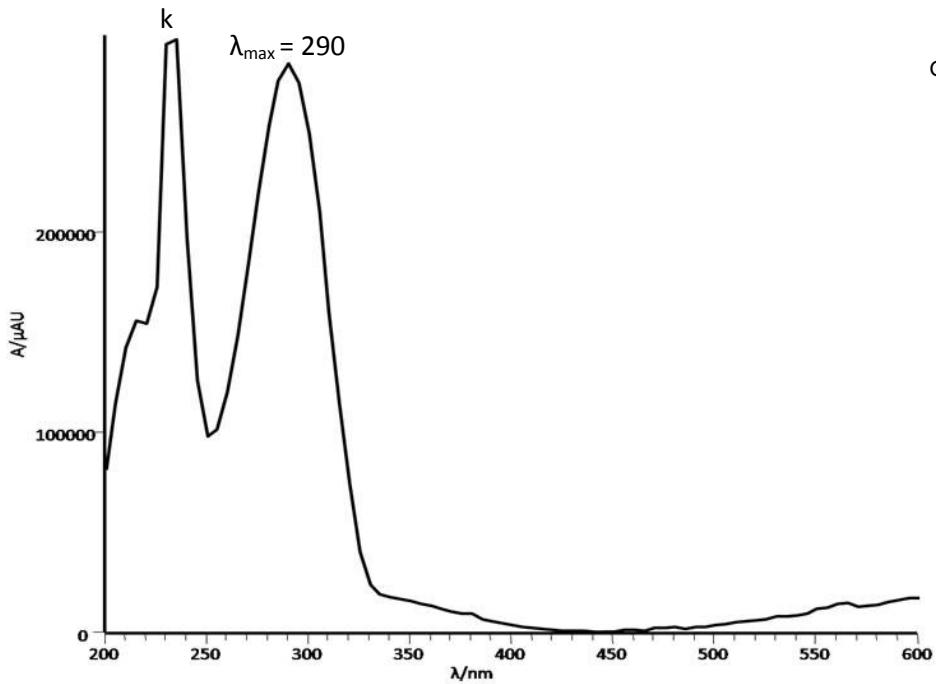


Abb. 101: UV/VIS-Spektrum des Germicidins (m/z 197 48/49).

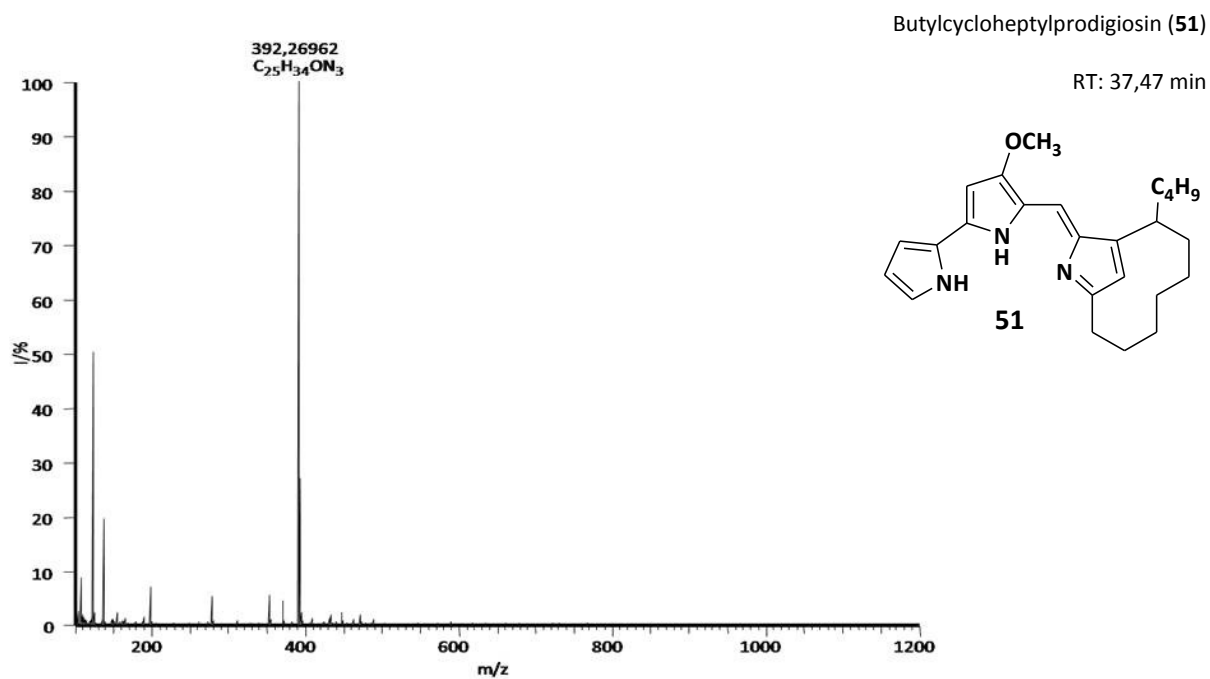


Abb. 102: Hochaufgelöstes Massenspektrum des Butylcycloheptylprodigiosin (**51**) und die daraus berechnete Summenformel.

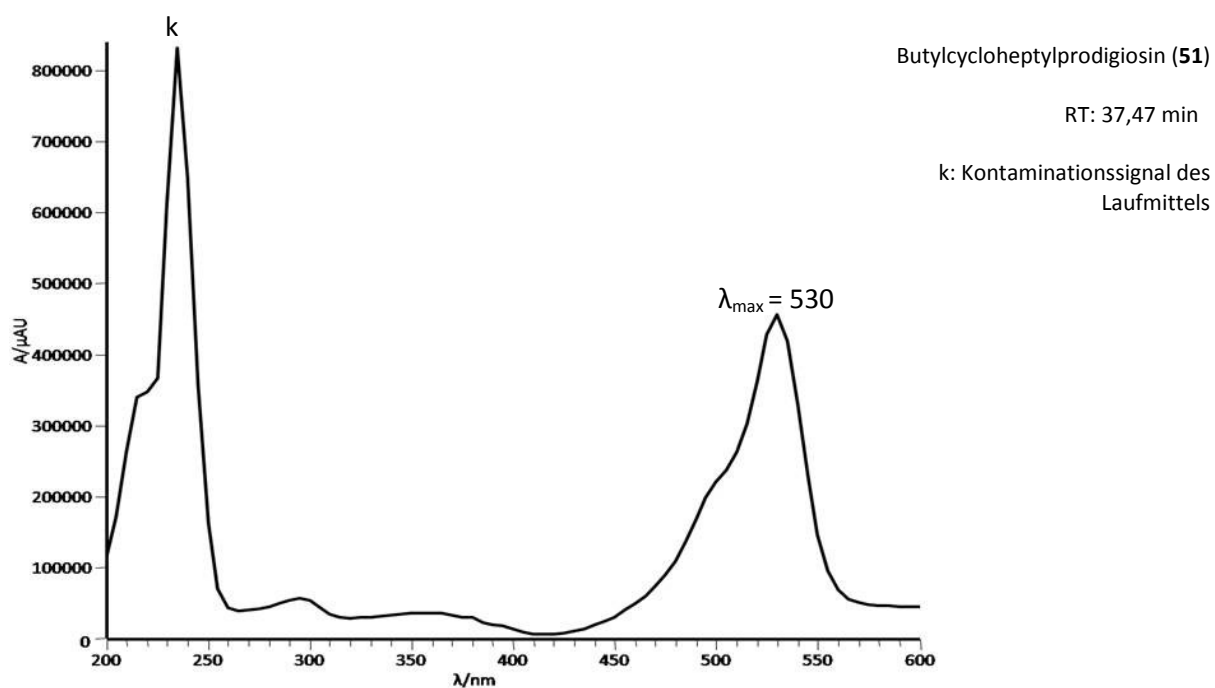
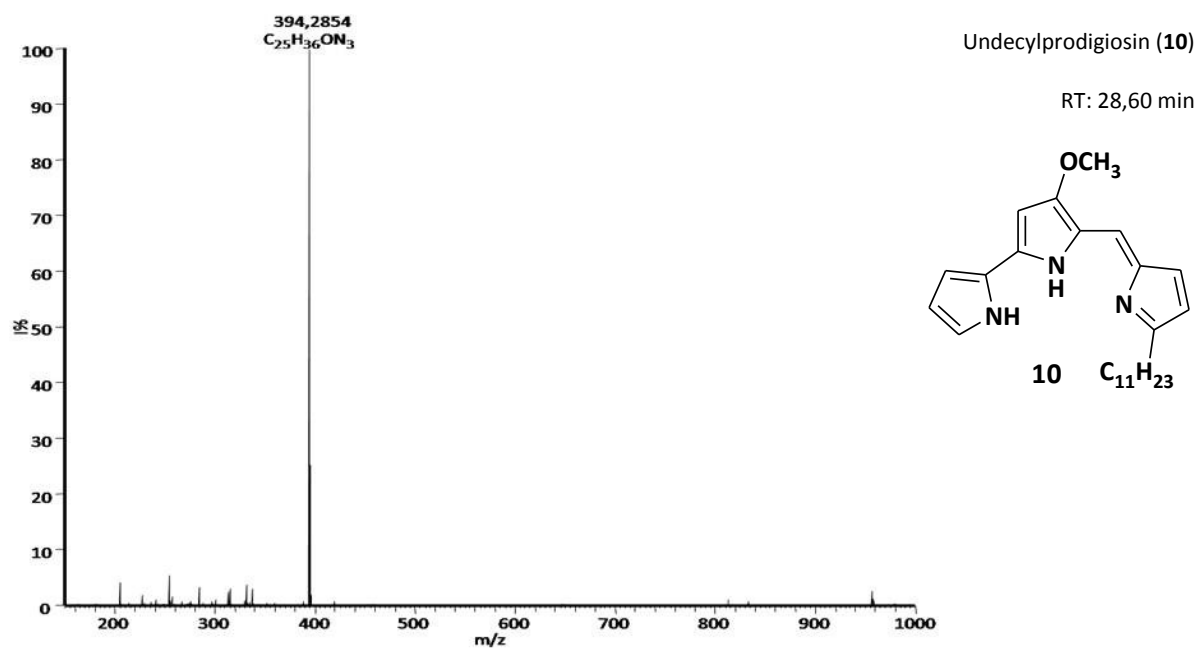
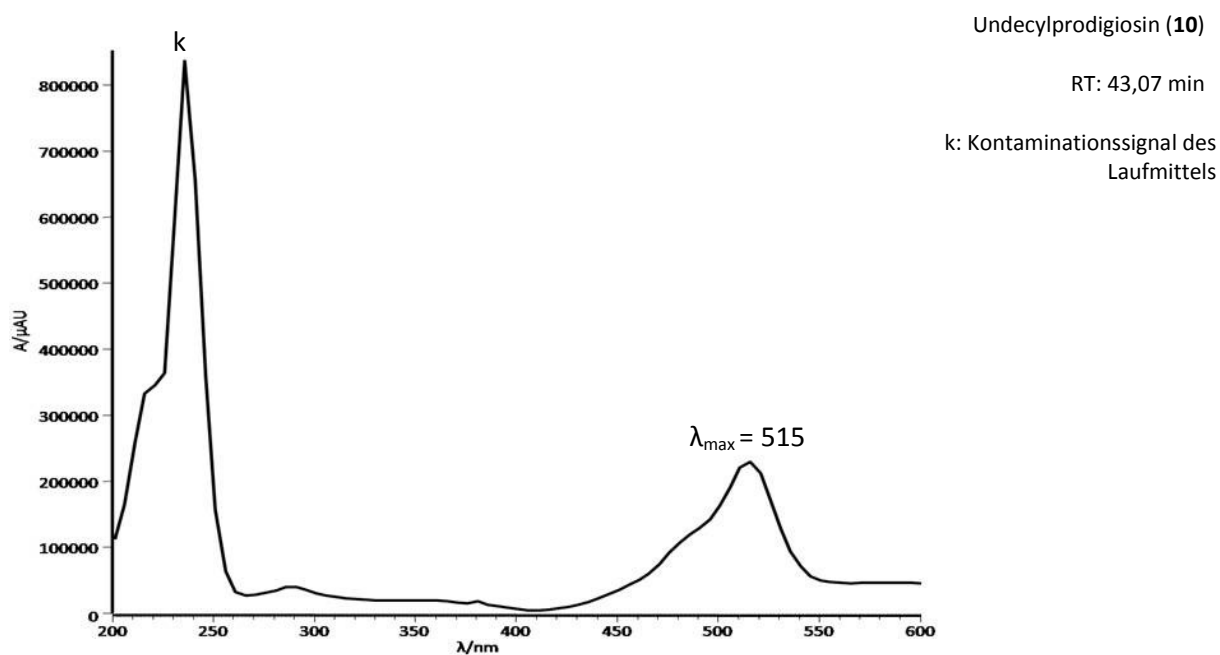


Abb. 103: UV/VIS-Spektrum von Butylcycloheptylprodigiosin (**51**).

Abb. 104: Hochaufgelöstes Massenspektrum des Undecylprodigiosins (**10**) und die daraus berechnete Summenformel.Abb. 105: UV/VIS-Spektrum von Undecylprodigiosin (**10**).

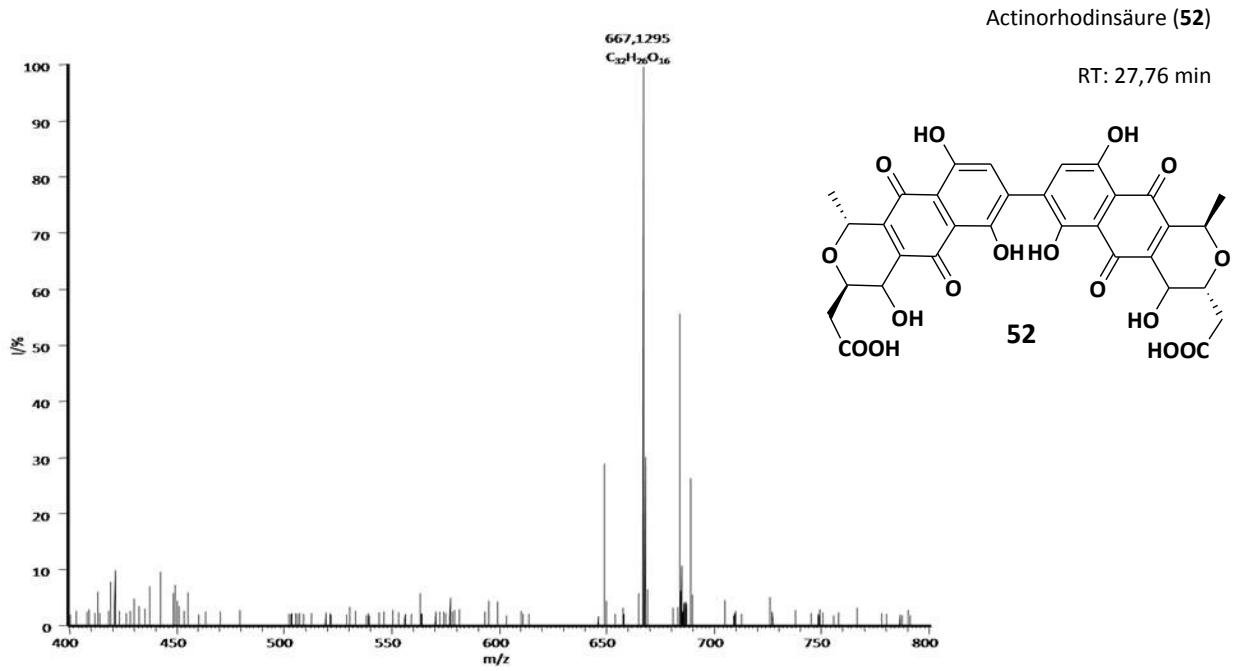


Abb. 106: Hochaufgelöstes Massenspektrum der Actinorhodinsäure (52) und die daraus berechnete Summenformel.

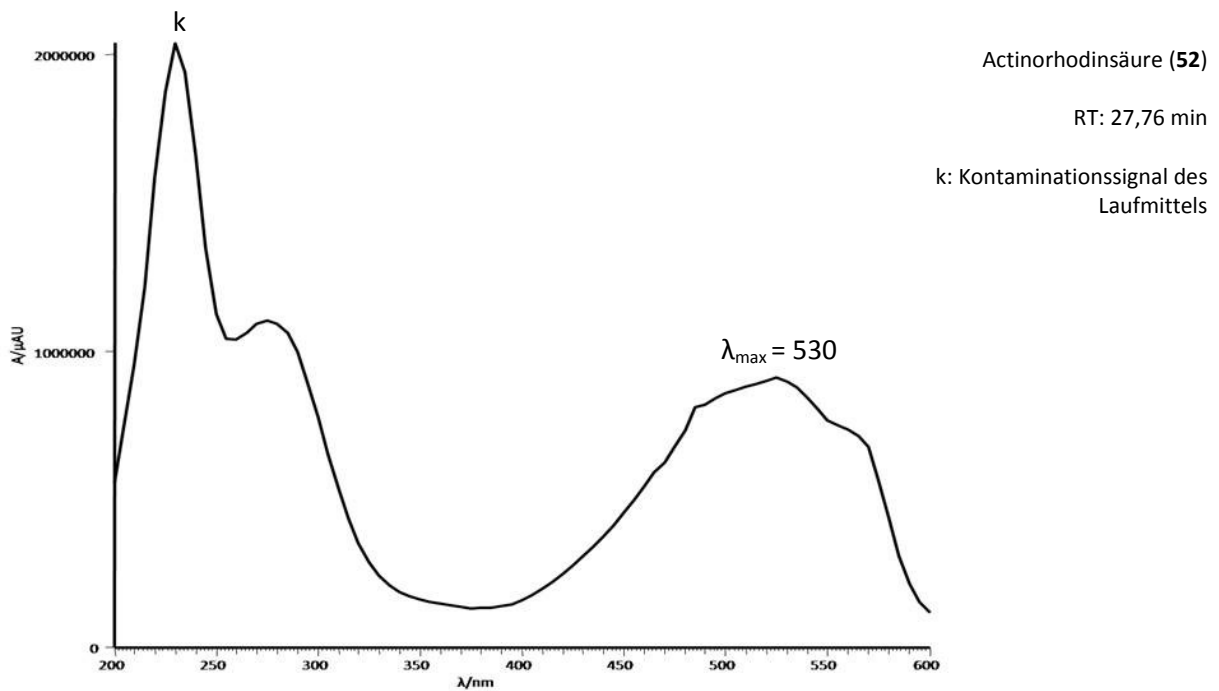


Abb. 107: UV/VIS-Spektrum der Actinorhodinsäure (52).

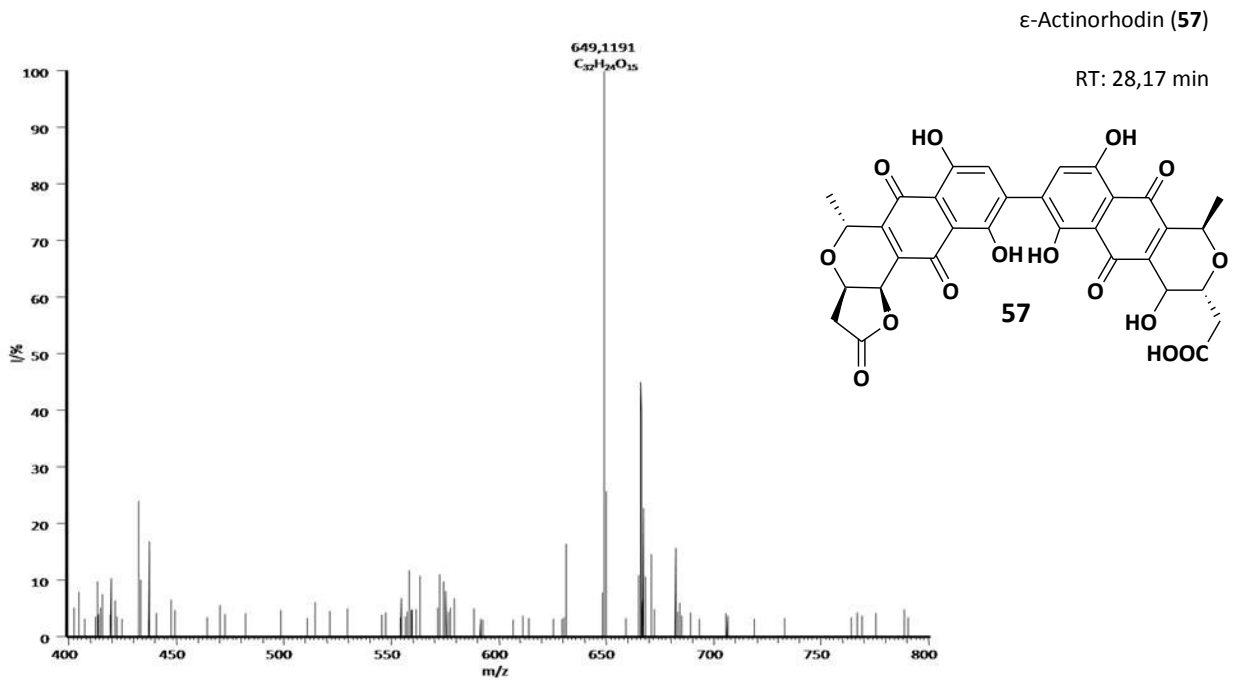


Abb. 108: : Hocharaufgelöstes Massenspektrum von ε-Actinorhodin (57) und die daraus berechnete Summenformel.

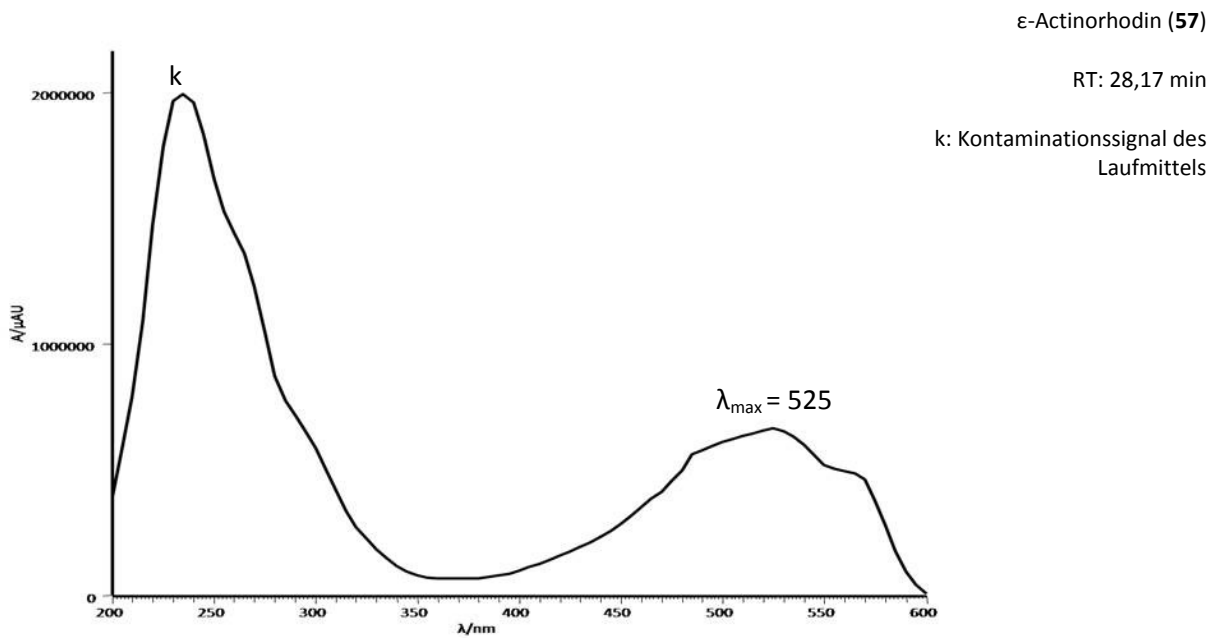


Abb. 109: UV/VIS-Spektrum von ε-Actinorhodin (57).

Transkriptomanalyse von *Streptomyces coelicolor* nach Cobaltionenstress

Farbkodierung für signifikante Abweichung der Expressionsverhältnisse

3	2	1,5				0,67
---	---	-----	--	--	--	------

Tab. 35: Proteinklassifizierung der signifikant um Faktor 1,5 regulierten ORFs aus dem Teilversuch wt/wt+Co²⁺.

Proteinklasse	ORF
exportierte/Lipoproteine von Gram-positiven Bakterien	SCO0432
Glykoproteine	SCO6557
AsnC	SCO5323
nicht in <i>E. coli</i> konserviert	SCO5154 SCO6478

Tab. 36: Proteinklassifizierung der signifikant um Faktor 1,5 regulierten ORFs aus dem Teilversuch wt/rot.

Proteinklasse	ORF
Transport/Bindung	SCO2690 SCO7703 SCO5810
Replikation/Modifizierung/Reparatur DNA	SCO1475 SCO4577
Sensorkinasen	SCO6139
Glykolyse	SCO2806
Membranproteine von Gram-positiven Bakterien	SCO3973 SCO1685 SCO6371 SCO4438 SCO6373 SCO6538 SCO1835
exportierte/Lipoproteine von Gram-positiven Bakterien	SCO4650 SCO3456
AsnC	SCO0523
Biotin-Carboxyl-Träger-Protein	SCO4921
Fettsäure-Metabolismus	SCO4800 SCO6730
Abbau von Polysacchariden	SCO2292
Glyoxylate-Bypass	SCO6246
nicht in <i>E. coli</i> konserviert	SCO5464 SCO2849 SCO7067
unbekannte Funktion	SCO1277 SCO0592 SCO5952 SCO4173 SCO5928
andere	SCO6144 SCO6464 SCO7067
nicht klassifiziert	SCO1558 SCO2589 SCO1103 SCO5146

Tab. 37: Proteinklassifizierung der signifikant um Faktor 1,5 regulierten ORFs aus dem Teilversuch wt/blau.

Proteinklasse	ORF			
Transport/Bindung	SCO4332	SCO0819	SCO3331	SCO1751
	SCO0538	SCO7369	SCO5711	
Replikation/Modifizierung/Reparatur-DNA	SCO1475			
Sensorkinase	SCO3119			
Membranproteine von Gram-positiven Bakterien	SCO3421	SCO3555	SCO0201	SCO2896
	SCO3553	SCO2400	SCO2989	SCO3289
	SCO3861	SCO1161	SCO6330	SCO1911
	SCO1527			
exportierte/Lipoproteine von Gram-positiven Bakterien	SCO0544	SCO2716	SCO2342	SCO6890
Biotin-Carboxyl-Träger-Protein	SCO4921			
Abbau von Polysacchariden	SCO0765			
LuxR (GerR)	SCO7137			
Phagen	SCO5619			
Cobalamin	SCO2173			
Proteintranslation	SCO1528			
Elektronentransport	SCO3946			
AraC	SCO6119			
Glutaredoxin	SCO5187			
Ribonukleotid-Biosynthese	SCO1760			
Heme, Porphyrin	SCO1553			
Thiamin	SCO2109			
Detoxifizierung	SCO4558			
Nukleotid-Interkonversion	SCO2548	SCO2546		
Proteinabbau	SCO2617	SCO2188		
TerR	SCO1094			
Chaperone	SCO2899			
Aminoacyl-tRNA	SCO1663			
Sekundärmetabolismus	SCO2338	SCO3218		
MerR	SCO2378			
nicht in <i>E. coli</i> konserviert	SCO1799	SCO6130	SCO7339	SCO1086
	SCO3038	SCO1788	SCO7668	SCO4520
	SCO4378	SCO4590	SCO5985	SCO1339
	SCO1511	SCO4186	SCO2804	
nicht klassifiziert	SCO1803	SCO4367	SCO4125	SCO2318
	SCO7436	SCO1711		
unbekannte Funktion	SCO3991	SCO5536	SCO5927	SCO3761
keine bekannten Homologien	SCO7312	SCO2713	SCO3117	SCO0001
	SCO5340	SCO5757	SCO2167	SCO3273
	SCO2341	SCO0149	SCO4925	SCO6245
	SCO2002	SCO3117	SCO5189	SCO3990
	SCO1421	SCO1512	SCO3992	
andere	SCO2287			

Tab. 38: Einordnung der signifikant um Faktor 1,5 regulierten ORFs aus dem Teilversuch wt/wt+Co²⁺ in Stoffwechselwege.

ORF	Funktion/Produkt	Stoffwechselweg
SCO6557	putative Neuraminidase	Glykan-Abbau
		Sphingolipid-Stoffwechsel

Tab. 39: Einordnung der signifikant um Faktor 1,5 regulierten ORFs aus dem Teilversuch wt/rot in Stoffwechselwege.

ORF	Funktion	Stoffwechselweg
SCO4800	Isobutyryl-CoA-Mutase, kleine Untereinheit, Methylmalonyl-CoA-Mutase, C-terminale Domäne	Propanoat-Stoffwechsel
		Valin-, Leucin-, Isoleucin-Abbau
SCO4921	putative Acyl-CoA-Carboxylase, Komplex α -Untereinheit, Biotin-Carboxylase	Fettsäure-Biosynthese

Tab. 40: Einordnung der signifikant um Faktor 1,5 regulierten ORFs aus dem Teilversuch wt/blau in Stoffwechselwege.

ORF	Funktion/Produkt	Stoffwechselweg
SCO2338	putative O-Methyltransferase, Makrolid-O-Methyltransferase	Androgen-/Östrogen-Stoffwechsel
		Tyrosin-Stoffwechsel
		Selenoaminosäure-Stoffwechsel
		Histidin-Stoffwechsel
		Tryptophan-Stoffwechsel
		Naphthalin-/Anthracen-Abbau
SCO2173	putative Adenosylcobinamid-Kinase	Porphyrin-/Chlorophyll-
SCO1553	putative Uroporphyrin-III-Methyltransferase/ Precorrin-2-Oxidase/Ferrochelatase	Stoffwechsel
SCO1760	putative Cytidylat-Kinase	Pyrimidin-Stoffwechsel
SCO1663	putative Cysteinyl-tRNA-Synthase	Aminoacyl-t-RNA-Biosynthese
		Cystein-Stoffwechsel
SCO7436	putative Aldehyd-Dehydrogenase	Benzoat-Abbau
		Toluen-/Xylen-Abbau
SCO4921	putative Acyl-CoA-Carboxylase, Komplex α Untereinheit, Biotin-Carboxylase	Fettsäure-Biosynthese
SCO0819	putatives Transmembran-Transportprotein	ABC-Transporter
SCO2546	putative Adenosin-Deaminase	Purin-Stoffwechsel
SCO2109	putatives Thiazol-Biosyntheseprotein	Thiamin-Stoffwechsel
SCO1527	putative Membran-Transferase/CDP-Diacylglycerol-Glycerol-3-Phosphat-3-Phosphatidyl-Transferase	Glycerolphospholipid-Stoffwechsel
SCO3946	putative Cytochrom-Oxidase, Untereinheit II	Oxidative Phosphorylierung

9 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
A	Adenin
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit</i>
blau	<i>S. coelicolor</i> blau pigmentierter Phänotyp
Bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CDA	<i>calcium dependent antibiotic (8)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
Cy	Cyanin
d	Tag
DAD	<i>diode array detector</i>
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EI	<i>electron impact</i>
ESI-MS	Elektrosprayionisierung-Massenspektrometrie
FDR	<i>false discovery rate</i>
FPP	Farnesylpyrophosphat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
H	Nullhypothese
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Intensität
IR-MS	<i>isotope ratio mass spectrometry</i>
Kan	Kanamycin
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Log	Logarithmus
M	Mol

M	Mega
m	Meter
m	Milli
min	Minute
MS	Massenspektrum
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trifluoroacetamide
n	Nano
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Nr.	Nummer
NRPS	nicht ribosomale Peptidsynthese
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAM	Polyacrylamidlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKS	Polyketidsynthese
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rot	<i>S. coelicolor</i> rot pigmentierter Phänotyp
pm	Picometer
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
S.	Seite
SCO	<i>Streptomyces coelicolor</i> Chromosom
SCP	<i>Streptomyces coelicolor</i> Plasmid
SDS	Natriumdodecylsulfate
<i>sp.</i>	Spezies
SPME	<i>solid phase micro extraction</i>
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIC	<i>total ion current plot</i>
TIGR	<i>Institute for Genomic Reseach/J. Craig Venter Institute</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TMS	Trimethylsilyl-Rest
UV	Ultraviolett
UK	<i>United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland</i>
USA	<i>United States of America</i>
Vis	<i>visible</i>
VPDB	<i>Vienna Pee Dee Belemnite</i>
WHO	<i>World health organisation</i>
wt	<i>S. coelicolor</i> Wildtyp
wt+Co ²⁺	<i>S. coelicolor</i> Wildtyp mit 200 µg/ml CoSO ₄ im Medium
X-GAL	Bromochloroindolylgalactopyranosid

10 Eigenständigkeitserklärung

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität ist mir bekannt. Die vorliegende Dissertation habe ich selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen, persönlichen Mitteilungen und Hilfsmittel benutzt.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials haben mich die in der Danksagung genannten Personen unterstützt.

Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen und Dritte haben weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich nicht versucht, diese Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Anne Behrend

11 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich maßgeblich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Professor Wilhelm Boland hat mich in seinen Arbeitskreis aufgenommen. Dort durfte ich die Forschung im spannenden Feld der chemischen Ökologie kennenlernen. Ich bin dankbar für die Begutachtung meiner Arbeit und das stete Interesse an meinen Ergebnissen im Grenzgebiet zwischen der mikrobiellen Ökologie und Chemie sowie für seine Ermunterung zur kritischen Fragestellung.

Professor Erika Kothe war so freundlich, die Betreuung dieser Arbeit an der Friedrich-Schiller-Universität zu übernehmen. Für ihre fachliche und persönliche Unterstützung möchte ich mich bedanken.

Doktor Dieter Spiteller hat mir das Thema dieser Arbeit nahegelegt und mich bei der praktischen Durchführung mit allen Mitteln unterstützt. Ich habe durch die Zusammenarbeit mit ihm sehr viel gelernt.

Doktor Heiko Vogel hat mich bei der Durchführung der *microarray*-Versuche betreut und hat mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich empfand die Zusammenarbeit mit ihm als sehr inspirierend.

Doktor Christian Kost übernahm das erste Korrekturlesen meiner Arbeit und war stets zum wissenschaftlichen Austausch bereit. Ich hatte viel Freude an unseren Gedankenexperimenten. Er hat mir mit seiner Begeisterung für ökologische und evolutionsbiologische Fragestellungen wertvolle Hinweise gegeben. Zusätzlich hat er mir die Kontakte zu Markus Hartl und Martin Tremmel vermittelt.

Ich danke Stefan Garms für seine Unterstützung rund um das Thema Terpene: das Ausleihen von SPME-Fasern, die Nutzung seiner Standards und die Hilfestellung bei der Identifikation der Verbindungen aus meinen Duftmessungen, das Zustellen von Literatur und seine große Hilfsbereitschaft.

Doktor Stefan Bartram führte die IR-MS-Messungen durch und steuerte die erhellenden Gespräche über Chemie bei.

Markus Hartl unterstützte mich beim Umgang mit MEV, Ginkgo und Midas. Die Zusammenarbeit mit ihm hat die Auswertung der *microarray*-Versuche sehr beschleunigt.

Martin Tremmel war so freundlich, mir die Anwendung die *false discory rate* schnell und unkompliziert zu erklären sowie alle meine Fragen zu diesem Thema geduldig zu beantworten. Er hat mir damit die statistische Auswertung meiner *microarray*-Daten erleichtert.

Ich danke allen meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie, der Bibliothek und der IT-Abteilung für ihre Unterstützung. Ganz besonders hervorheben möchte ich: Doktor Nicolas Delaroque, Sabrina Köpke, Doktor Matthias Funke, Lydia Lieb, Andreas Habel, Sindy Frick, Susanne Häder, Ilka Schönian, Anne Morgenstern, Grit Winnefeld, Doktor Fabio Rui und Doktor Paulina Dabrowska, Sandy Rottlof sowie Matthias Rott.

Meine Anerkennung gilt zusätzlich Doktor Andrea Fiedler, Diana Köpke, PD Doktor Axel Mithöfer und Katrin Henkel für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ich habe während meiner Arbeit am MPI wunderbare Menschen kennengelernt.

Außerhalb des MPI für chemische Ökologie bin ich Gerald Lackner, Tobias Kusebauch und Benjamin Busch aus der Arbeitsgruppe von Professor Hertweck des HKI für das Protokoll zur Herstellung der Rohextrakte und die ersten LC-MS-Messungen sehr verbunden. Zusätzlich möchte ich mich bei Alexander Funk und Frank Schindler, Doktor Katrin Kolbe und Lydia Schild für ihre fachlichen Hinweise und die moralische Unterstützung bedanken.

Vielen Dank an Professor Michael Spittler vom Institut für Umweltforschung der Universität Dortmund für die hochauflösenden MS-Messungen.

Diese Arbeit wurde innerhalb des internationalen Graduiertenkollegs ILRS angefertigt. Meine Graduiertenschule war stets eine Plattform zum Austausch und zur fachlichen Diskussion.

Außerhalb der fachlichen Betreuung haben mich die Graduierten-Akademie der Universität Jena und das Studentenwerk Thüringen während meiner Dissertation unterstützt.



Ich danke aus tiefstem Herzen meiner Familie. Meine Eltern und mein Bruder haben mir immer Sicherheit gegeben – danke!

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diplom-Biologin Anne Behrend
Anschrift:
E-Mail:
Telephon:
Geburtsdatum: 15.09.1980
Geburtsort: Berlin

Beruflicher Werdegang

seit 03/2006 Doktorandin am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie und an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena, Promotionsstudentin in der International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions

08/2005 Forschungsaufenthalt an der Universität Joensuu Finnland

08/2000-02/2006 Biologiestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin, Schwerpunkte Ökologie/Mikrobiologie/Paläontologie, Diplom (Prädikat „mit Auszeichnung“), Thema der Diplomarbeit: Einfluss des cyanobakteriellen Toxins Microcystin auf die Proteinexpression in *Daphnia magna*

06/2000 Abitur am Leonard-Bernstein-Gymnasium in Berlin

Wissenschaftlich Fachbeiträge

Publikationen

Sugar droplets from *Streptomyces*, in Bearbeitung

Poster

Behrend, Vogel & Spiteller, Adaptation of *Streptomyces* to the Environment – Shifts in secondary metabolism, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Institutssymposium 2009.

Behrend & Wiegand, Changes of protein pattern in *Daphnia magna* due to exposure to cyanobacterial compounds - a proteomic approach, 6th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria, Gdańsk, Poland.

Vorträge

Behrend, Vogel & Spiteller, Heavy metal ion stress – Induction of chemical differentiation in *Streptomyces coelicolor*, 2nd ILRS Symposium 2008.

Behrend & Spiteller, Chemical differentiation of *Streptomyces*: Influence of abiotic and biotic factors, 1st ILRS Symposium 2007.

Jena, den

Anne Behrend