

**Nachhaltige und effiziente Produktion neuartiger Wirkstoffe aus
extremophilen Mikroorganismen durch Einsatz heterologer
Expressionssysteme**

AZ 13070

Projektkoordinator:

Dr. Guido Meurer, Dr. Holger Zinke, BRAIN Aktiengesellschaft

Projektpartner:

Prof. Dr. Garabed Antranikian, TU Hamburg-Harburg

HD Dr. Arnulf Kletzin, TU Darmstadt & ZEB e.V.

Dr. Stephanie Grond, Universität Göttingen

Laufzeit:

01.07.2002 bis 30.06.2004

zzgl. kostenneutrale Verlängerung von 5 Monaten



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	Seite 2
Anlass und Zielsetzung	3
Überblick über verwendete Methoden	4
Ergebnisse	5
1. Pilotphase, Etablierungsarbeiten	5
2. Kultivierung und Fermentation extremophiler Mikroorganismen	7
3. Biologisches Screening von Extrakten / Fraktionen (antimikrobielle, cytotoxische Aktivität)	x
4. Chemische Profilierung von Extrakten / Fraktionen	x
5. Erstellung von Auswahlgruppen und Bearbeitung priorisierter Hitkandidaten	x
6. Fermentation, Aufarbeitung und Darstellung von Reinsubstanzen	x
7. Erfassung des genetischen Potentials priorisierter Hitkandidaten in genomischen ‚large-insert-libraries‘	x
Diskussion	x
Ausblick	x
Literatur	
Projektkooperation und Öffentlichkeitsarbeit	x
Anhang (Details der chemisch-analytischen Arbeiten)	x

Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes zur nachhaltigen und effizienten Produktion neuartiger Wirkstoffe aus extremophilen Mikroorganismen durch Einsatz heterologer Expressionssysteme (AZ 13070) gelang es erstmals den Nachweis zu führen, dass extremophile Mikroorganismen eine wertvolle Quelle von Wirkstoffen darstellen. Das Primärziel des Projekts wurde somit erreicht.

Insgesamt **105** Isolate und Stämme wurden während der Hauptprojektphase kultiviert und mittels aktivitätsbasierter Assays sowie naturstoff-chemischer Nachweismethoden hinsichtlich ihres Wirkstoffpotentials analysiert und charakterisiert. In antimikrobiellen



Agardiffusionstests zeigten **22%** der getesteten Stämme relevante Aktivitäten gegen einen oder mehrere Indikatororganismen, während **9%** der Stämme eine signifikante zell-toxische Wirkung auf CHO-K1 Tumorzellen hatten. Zusätzlich zeigten **10** Stämme chemisch interessante Metaboliten-Spektren.

Aufgrund ihres chemisch-biologischen Potentials wurden in zwei Priorisierungsrounden zunächst insgesamt **16** Isolate für eine weitere Bearbeitung ausgewählt. Nach Upscale-Fermentationen in Maßstäben zwischen 10-L und 50-L und naturstoffchemischer Bearbeitung dieser Stämme erfolgte eine finale Priorisierung hinsichtlich der Kriterien: **Aktivität, Reproduzierbarkeit und Erfolgsaussichten**. Bislang konnten über 80 mit Sekundärstoffen angereicherte Fraktionen generiert, **13** Reinstoffe isoliert und **8** charakterisiert werden. Davon sind drei in ihrer Struktur bereits literaturbekannt. Fünf Substanzen, niedermolekulare Stoffe mit $M_R < 700$, befinden sich in der Strukturaufklärung.

Zur *effizienten* Handhabung der experimentellen Datenmenge wurde eine SQL *online*-Datenbank programmiert und implementiert, die allen Projektpartnern jederzeit Zugang zu den relevanten, projektspezifischen Daten gibt.

Für die *nachhaltige* Produktion biologischer Aktivitäten aus priorisierten Isolaten wurde ein flexibles Vektorsystem konstruiert und zur Erstellung von Genbanken bereitgestellt. Ebenso wurde aus **7** der primär priorisierten Isolate hochmolekulare, genomische DNA extrahiert. Im Rahmen des zur Verfügung stehenden Zeitraums konnte die genomische Information des priorisierten Isolates 3-015 in einer Fosmid-Genbank (pEpiFOS-5) gesichert werden.

Anlass und Zielsetzung

Naturstoffe und vor allem ihre Derivate spielen als Wirkstoffe für therapeutische Anwendungen nach wie vor eine dominante Rolle. So basieren etwa die Hälfte der weltweit bedeutendsten Medikamente auf Naturstoffen und auch unter den Neuzulassungen liegt der Anteil der Naturstoff(derivate) heute bei über 30% (1,2). Trotzdem ist die Entdeckung wirklich neuartiger Wirkstoffgrundgerüste seit Jahren stark rückläufig, was aber nicht auf einen zur Neige gehenden natürlichen Wirkstoffpool, sondern eher auf die zunehmende Stornierung von Naturstoff Screening – Programmen zurückzuführen ist (3). Während jedoch die Gruppe der *Actinomyceten* dabei bis heute



den Hauptteil der Wirkstoffproduzenten stellt, muß für die Auffindung wirklich neuartiger Grundgerüste vermehrt auf neue Ressourcen zurückgegriffen werden. Hierbei ist es im Rahmen eines ‚**sustainable development**‘ von großem Interesse, bioaktive Sekundärstoffe für die Wirkstoffforschung effizient aus regenerativen, biogenen Ressourcen zu gewinnen. Die Untersuchung bislang unbekannter mikrobieller Diversität aus Nischenhabitaten ist zum einen ein vielversprechender Ansatz zur Entdeckung neuartiger Wirkstoffgrundgerüste, erlaubt zugleich aber auch eine ressourcenschonende Produktion von Wirkstoffen in Fermentationsanlagen, ohne erneut auf die meist sensiblen Nischenhabitats zurückgreifen zu müssen. Um darüber hinaus sowohl eine weitere Effizienzsteigerung zu erreichen, als auch in Folge ein umweltentlastenden Effekt bei der chemisch-analytischen Darstellung der Wirkstoffe im Produktionsmaßstab zu erzielen, wird die **rekombinante Biosynthese** der Sekundärstoffe in bekannten, hochaktiven Wirkstoffproduzenten (z.B. *Streptomyces*) angestrebt. Da in diesen Wirtssystemen die Herstellung der gewünschten Sekundärstoffe um ein vielfaches effizienter ist, können auf diese Weise bei der Fermentation und der anschließenden Reinsubstanzherstellung Rohstoffe, Lösungsmittel und Chromatographiematerialien eingespart werden.

Im vorliegenden Kooperationsprojekt wurde dieser Problemkomplex durch konsequente Anwendung moderner naturstoffchemischer, biologischer und genetischer Verfahren bearbeitet. Primärziel des Projekts war es, anhand von erstmalig aus extremophilen Mikroorganismen generierten Extrakten den Nachweis zu erbringen, dass extremophile Mikroorganismen neue, bioaktive Sekundärmetabolite produzieren und damit eine wertvolle Quelle von Wirkstoffen darstellen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse und Techniken dienen gleichermaßen grundlagenorientierten Studien wie auch der wirtschaftlichen Nutzung. Sie haben somit aufgrund Ihres Innovationsgrades eine große Bedeutung für die Zukunft der Wirkstoffforschung.

Überblick verwendeter Methoden

- **Kultivierungen** erfolgten nach guter mikrobiologischer Praxis unter Verwendung der für die Anzucht extremophiler Mikroorganismen notwendigen Infrastruktur. Details sind in Ergebnisse / Punkt 1. und 2. näher beschrieben.
- **Aufarbeitung** und **Extraktgenerierung** wurde nach dem in Abb. 1 dargestellten



Schema durchgeführt. Details hierzu sind in Ergebnisse / Punkt 1. wiedergegeben. Methoden der chemisch – biologischen **Extrakttestung** sind in Ergebnisse / Punkte 1., 3. und 4. beschrieben.

• **Fermentationen**, Aufarbeitung und **Reinsubstanzherstellung** sind in Ergebnisse / Punkt 6. dargestellt.

• **Molekulargenetische Arbeiten** zur Konstruktion eines BAC-Vektorsystems, zur Generierung hochmolekularer genomischer DNA und zur Bankenerstellung sind in Ergebnisse / Punkt 7 besprochen und orientieren sich u.a. an bekannten Protokollen [z.B. Choi *et al.* (4)]

Die projektspezifischen Arbeiten sind in der Taskforcegruppe „Methoden des ICBio“ repräsentiert.

Ergebnisse

1. Pilotphase, Etablierungsarbeiten (*Details s. Statusbericht Februar 2004*)

- Im Vorfeld und mit Hinblick auf die datentechnische Erfassung von Assay-Ergebnissen wurde eine Datenbank-kompatible Nomenklatur für zu kultivierende Stämme, Isolate, die Anzahl der durchgeführten Anzuchten sowie für daraus resultierende Extrakte, Fraktionen etc. festgelegt. Neben der Vergabe von identifizierenden Nummern für die einzelnen Projektpartner (**0**=ZEB, **1**=TUHH, **2**=UGÖ, **3**=BRAIN) war vor allem die strikt einheitliche Benennung der verwendeten Extraktionsmethoden wichtig für das Funktionieren dieses Systems.
- Im Zuge einer *effizienten* Projektarbeit war es wünschenswert, eine immer aktuelle und für alle Partner jederzeit einsehbare Datenbank zu generieren. Hierzu wurde auf Basis eines MySQL-Servers eine SQL-Datenbank programmiert, die durch eine Oberfläche gesteuert und durch Internetbrowser aller Art, Betriebssystem-unabhängig bedient werden kann. Für die Sicherheit des Systems wurden einerseits Username/Passwort Kombinationen vergeben, andererseits sind nur Rechner bestimmter IP-Adressen zugelassen. Im Rahmen des laufenden Projektes wurden bedarfsabhängig Erweiterungen des Leistungsumfanges durchgeführt.



- In einer 4-monatigen Pilotphase wurden anhand ausgewählter Mikroorganismen für alle Kooperationspartner die einzelnen Arbeitsabläufe des chemisch-biologischen Screenings ausgearbeitet und erprobt. Dabei wurden solche Verfahren selektioniert, die in der Lage sind, ein möglichst breites Spektrum an Wirksubstanzen (einschließlich peptidischer Verbindungen) aus Isolaten unterschiedlichster, extremer Habitate zu erfassen. In Abbildung 1 ist das, aufbauend auf den Erfahrungen der Pilotphase optimierte Aufarbeitungs-Schema dargestellt. Im Verlauf des Screenings wurde dieses Schema durch Erstellung von Kulturfiltraten und konzentrierten Überständen erweitert (s.u.).

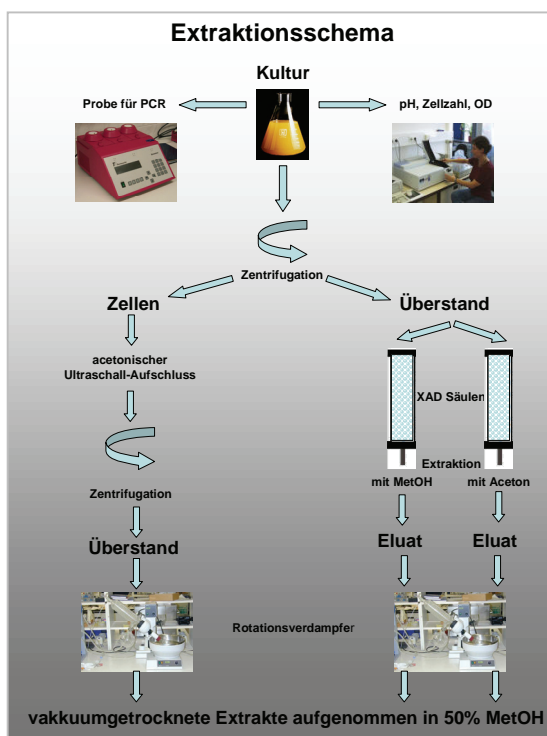


Abbildung 1: Aufarbeitungsschema zur Herstellung von Extrakten der einzelnen Stämme extremophiler Mikroorganismen. Dieses Schema wurde als Standardverfahren während des gesamten Projekts eingesetzt.

- Agardiffusionstests wurden zur Analyse wachstumshemmender Wirkungen eines Extraktes oder einer Reinsubstanz auf ein Set von Indikatororganismen (s. Tab. 1) etabliert. Vorgeformte Kavitäten zur Aufnahme der zu testenden Substanzen / Extrakte erhielt man durch keramische Zylinder (Abb. 2), die vor Überschichtung der Assay-Platten mit Overlay / Indikator auf das stammspezifische Basismedium gesetzt wurden. Im Rahmen der Evaluierung wurden Overlay-Bedingungen für alle Indikatorstämme etabliert und Inkubationszeiten festgelegt. Das Spektrum an Indikatororganismen wurde später erweitert (s.u.).



Testkeim	Zugehörigkeit
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	Yeast
<i>Candida glabrata</i>	Yeast
<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Proteobacteria
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Actinobacteria
<i>Micrococcus luteus</i>	Actinobacteria
<i>Halobacterium sp.</i> YC-819-9	Archaea



Tabelle 1 und Abbildung 2:
Indikatorstämme und Aufbau
eines Plattendiffusions-Assays
mit keramischen Zylindern als
Platzhaltern

- Die Bestimmung der generellen Toxizität von Extrakten extremophiler Mikroorganismen wurde als zweites biologisches Auswahlkriterium adaptiert. Dabei erwies sich eine Verdünnung von 1:1000 als die für Standardtests mit CHO-K1 Tumorzellen aussagekräftigste Extraktkonzentration im Assay. Stark toxische Extrakte (Ranking 3) wurden in einer 1:2000 Verdünnung nachgetestet.

2. Kultivierung und Fermentation extremophiler Mikroorganismen

(siehe auch Statusbericht Februar 2004)

Im Rahmen des Projektes wurden insgesamt **105** extremophile bzw. extremotolerante Stämme und Isolate aus den verschiedenen Sammlungen und Archiven der Projektpartner Antranikian, Kletzin und BRAIN, unter Verwendung der vor Ort vorhandenen technischen Einrichtungen, angezogen und **16** Isolate nach Priorisierung in Maßstäben ≥ 10 -L fermentiert. Trotz der sehr langen Verdopplungszeiten und des für extremophile Mikroorganismen typischen, generell schlechten Wachstums ist es überraschend gut gelungen, in der zur Verfügung stehenden Zeit diese hohe Zahl an Isolaten zu kultivieren. **Tabelle 2** gibt einen Überblick:



<i>Projektpartner</i>	<i>Isolate</i>	<i>Bemerkungen</i>
TUHH	27	psychrotolerant, thermophil, teilweise anaerob
ZEB	49	thermo ~, acido ~, halophil; Archaea & Bakterien
BRAIN	25	thermotolerant; Kultivierung & Aufarbeitung nach OSMAC beim Projektpartner UGÖ
UGÖ	4	Kultivierung & Aufarbeitung nach OSMAC
Gesamt	105	

Die **TUHH** übernahm vornehmlich die, teilweise unter anaeroben Bedingungen durchzuführende Kultivierung psychrotoleranter bzw. thermophiler Bakterien im 1-L Maßstab sowie deren Aufarbeitung für Testreihen zur Wirkstoffdetektion. Dabei waren Kultivierungen zunächst hinsichtlich Zellwachstum optimiert gefahren worden, später wurde eine mögliche, erst in der spätlogarithmischen bis stationären Wachstumphase einsetzende Wirkstoffproduktion stärker berücksichtigt. Teilweise schwieriger als erwartet war die Reaktivierung von Stämmen aus der Organismenbank, was langwierige und aufwändige Versuche notwendig machte. Die DSMZ hatte ebenfalls mit Problemen zu kämpfen in deren Folge es zu sehr langen Lieferzeiten für Aktivkulturen kam.

Dem **ZEB** stand für Untersuchungen eine Stammsammlung zur Verfügung, die Prof. W. Zillig in den 90er Jahren angelegt hatte (**5**). Diese umfasst ca. 800 Isolate, zumeist extrem thermophile und acidophile Stämme, die überwiegend aus sauren, heißen vulkanischen Quellen (Solfataren) gewonnen worden waren und der Ordnung der Sulfolobales (Archaea) angehören. Aus dieser Sammlung sowie aus den Ressourcen der DSMZ wurden für das Screening zunächst **49** verschiedene Stämme ausgewählt, angezogen und gemäß dem Extraktionsschema (Abb.1) aufgearbeitet. Versuche, durch Standardisierung der Anzuchtbedingungen auf möglichst **effiziente** Art und Weise eine große Anzahl an Stämmen einem Screening zuzuführen, waren nicht zielführend. Wie Ergebnisse nachfolgender Biotests zeigten, war die Sekundärstoffproduktion unter diesen Bedingungen unbefriedigend und die produzierten Substanzmengen aufgrund der kleinen Kulturvolumina zu gering.



Seitens der **BRAIN AG** wurden 25 thermotolerante, bakterielle Isolate für das Screening bereitgestellt und durch den Partner UGÖ nach dem OSMAC Prinzip kultiviert sowie nachfolgend aufgearbeitet.

Gleichermaßen wurden aus der **AG Grond** vier Eigenisolate in das Screening eingebracht und ebenfalls gemäß OSMAC angezogen und aufgearbeitet.

Upscale Fermentationen in Maßstäben > 10-L wurden zum Zwecke der Bereitstellung ausreichender Mengen an aktiven Wirkprinzipien für die naturstoffchemische Substanzauflärung durchgeführt. Fermentiert wurden primär die **16** Isolate und Stämme der beiden Auswahlgruppen (s.u.), wobei aus Gründen der technischen Ausstattung die Durchführung dem jeweiligen Projektpartner oblag, aus dessen Sammlung die zu fermentierenden Isolate stammten.

Für weitergehende Fermentationen in größeren Maßstäben (> 100-L) wäre eine Übernahme dieser Aktivitäten durch den Partner TUHH aufgrund der dort vorhandenen Kapazitäten sinnvoll (s. Ausblick).

3. **Biologisches Screening von Extrakten / Fraktionen (antimikrobielle, cytotoxische Aktivität)** *(siehe auch Statusbericht Februar 2004)*

Die **antimikrobielle Extrakttestung** erfolgte mittels Plattendiffusions-Assay mit zunächst sechs pro- und zwei eukaryontischen Indikatorstämmen (s. Abb. 2).

Extraktsets kultivierter, extremophiler Stämme bestehend aus extrahierten Kulturüberständen (Bezeichnung „XA“, „XM“ oder „K“), aufgearbeiteten Zellsedimenten „M“ und entsprechenden Medienkontrollen („NXA“, „NXM“ und „NM“) wurden von den Projektpartnern entsprechend dem in Abb. 1 dargestellten Aufarbeitungsschema hergestellt. Mit stärkerer Fokussierung auf peptidische Wirkstoffe wurde das Set der zu testenden Proben im Verlauf des Projekts um Aliquots der Kulturüberstände selbst („PU“, „PF“) in einfacher und aufkonzentrierter Form (+ entsprechende Kontrollen „NPU“, „NPF“) erweitert. Je 25-µl Extrakt wurden für die einzelnen Tests eingesetzt.

Im Verlauf des Projekts wurden von Seiten des Projektpartners BRAIN zwei neue, therapeutisch relevante Indikatorstämmen (*Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acne*) für den Einsatz im Plattendiffusions-Assay entwickelt. In einer separaten Kampagne wurden alle Extrakte und Fraktionen nochmals gegen diese beiden



Stämme getestet.

Tabelle 3 gibt einen Gesamtüberblick über die mit diesem Assay detektierten, antimikrobiellen Aktivitäten:

Plattendiffusions-Assay	
Anzahl untersuchter Stämme, Isolate	105
Anzahl Extrakttestungen mit diesen Stämmen / Isolaten	918
Stämme mit signifikanter Hemmwirkung (>16 mm)	43
Stämme mit relevanter Hemmwirkung (Medium berücksichtigt)	22
<i>gegen Bacillus subtilis</i>	14
<i>gegen Staphylococcus aureus</i>	9
<i>gegen Micrococcus luteus</i>	3
<i>gegen Escherichia coli</i>	2
<i>gegen Mycobacterium smegmatis</i>	6
<i>gegen Pseudomonas stutzeri</i>	2
<i>gegen Halobacterium sp.</i>	8
<i>gegen Sporobolomyces johnsonii</i>	13
<i>gegen Candida glabrata</i>	2
<i>gegen Streptococcus mutans</i>	2
<i>gegen Propionibacterium acne</i>	1
Priorisierte Hitkandidaten (s.u.)	11

Parallel zu den antimikrobiellen Screening-Assays wurden Aliquots der Extraktsets hinsichtlich ihrer **generellen Zytotoxizität** auf Hamster CHO-K1 Tumorellen getestet. Hierzu wurde, gemäß den Ergebnissen der Pilotphase, standardmäßig eine Extraktverdünnung von 1:1000 im Assay eingesetzt und die Überlebensrate nach 48 h Inkubation gegenüber einer nur mit Methanol (1:1000) inkubierten Kontrolle (=100%) bestimmt. Stark toxische Extrakte (Ranking **3**) wurden in einer 1:2000 Verdünnung nachgetestet. **Tabelle 4** gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse. Ausschlaggebend sind hier keine Rohdaten sondern ein darauf basierendes Rating nach folgendem Schlüssel: Rating **0** (100% - 80% Überlebensrate); Rating **1** (79% - 60% Überlebensrate); Rating **2** (59% - 20% Überlebensrate) und Rating **3** (19% - 0% Überlebensrate).

Assay der generellen Zytotoxizität	
Anzahl untersuchter Stämme, Isolate	105
Anzahl Extrakttestungen mit diesen Stämmen / Isolaten	766
Stämme mit signifikanter Zytotoxizität (Rating 2-3)	16
Stämme mit relevanter Zytotoxizität (Medium berücksichtigt)	9
Priorisierte Hitkandidaten (s.u.)	5



4. Chemische Profilierung von Extrakten / Fraktionen

(siehe auch Statusbericht Februar 2004)

Neue Stammisolate extremophiler Mikroorganismen wurden in Sätzen von jeweils 5 Stämmen untersucht. Die 4 - 6 Rohextrakte jeder Kultivierung und ihrer Medien wurden in den ausgewählten Bioaktivitätstests (s.o.) und nach der Methode des chemischen Screenings (TLC, HPLC-DAD, HPLC-MS) auf ihre erfolgreiche Wirkstoffproduktion hin analysiert und die Ergebnisse in der eigenen Datenbank („WEM-Datenbank“, BRAIN AG) gesammelt und allen Partnern zugänglich gemacht. Die Bewertung der Dünnschichtchromatographien erfolgte aufgrund unterschiedlicher Anfärbeverhalten der aufgetrennten Stoffe eines Extraktgemisches (Abb. 3A), aktivitätsgeleitet isolierte Fraktionen wurden massenspektrometrisch (HPLC-MS) untersucht (Abb. 3B).

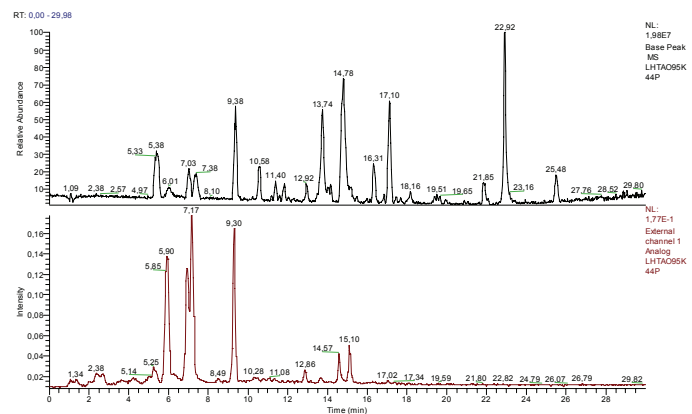
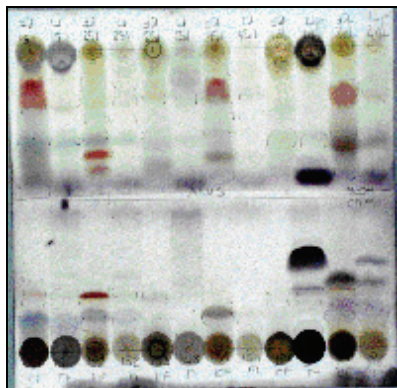


Abb. 3A

Abb. 3B

A: TLC der Extrakte des Stammes 3-015, Zell- und Kulturfiltratsextrakte der Anzuchten 1-4; Anfärbreagenz: Anisaldehyd/Schwefelsäure

B: HPLC-MS-Spektrum des zytotoxischen Prinzips aus dem Kulturfiltrat (-3K) einer 10-L Fermentation des Stammes 3-009

Tabelle 5: Überblick über die chemische Profilierung von Extrakten

Überblick chemische Profilierung *)	
Anzahl untersuchter Stämme, Isolate	105
Anzahl untersuchter Extrakte aus diesen Stämmen / Isolaten	418
Stämme mit signifikantem chemischen Profil	10
Stämme mit außergewöhnlich interessantem chemischen Profil	3
Priorisierbare Hitkandidaten (s.u.)	5

*) Aufgrund der Fokussierung auf biologisch aktive Isolate und Stämme sowie der kapazitären Beanspruchung durch Reinsubstanz-Isolierung und -Aufklärung wurden hier gegenüber dem Statusbericht keine weiteren Aktivitäten durchgeführt



5. Erstellung von Auswahlgruppen und Bearbeitung priorisierter Hitkandidaten (siehe auch Statusbericht Februar 2004)

5.1 Zusammenstellung von Auswahlgruppen für eine fokussierte Bearbeitung

Im Rahmen der verschiedenen, chemisch-biologischen Extrakttestungen wurden, zunächst für jeden Test getrennt, solche Stämme priorisiert, die aufgrund ihrer Wirkung im Test oder aufgrund ihres Metabolitenspektrums in der chemischen Bearbeitung aufgefallen waren (s. Tabellen 3 - 5). Diese ‚Hitlisten‘ wurden dann im Zuge zweier Projektteam-Meetings diskutiert und **zwei** Auswahlgruppen an priorisierten Hitkandidaten für die weitere Bearbeitung (s.u.) festgelegt. Die nachfolgenden **Tabellen 6** und **7** zeigen alle priorisierten Isolate und die Gründe ihrer Priorisierung. Dabei ist zu bemerken, dass bevorzugt solche Stämme ausgewählt wurden, die sich in mehr als einem Assay unter den ‚priorisierbaren‘ Kandidaten befanden. Desweiteren wurden biologisch aktive Stämme stärker gewichtet, als chemisch interessante Stämme ohne entsprechende Aktivitäten.

Tabelle 6: Priorisierte Kandidaten der ersten Auswahlgruppe

Stamm-ID	Priorisierter Kandidat	Priorisierung erfolgt wegen:
1-004	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	Starke zell-toxische Wirkung
1-009	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Antifungale Wirkung gegen <i>Candida glabrata</i>
1-014	<i>50qoura</i>	Breite antibakterielle und antifungale Wirkung
0-002	<i>Sulfurisphaera MC'1</i>	Breite Antibakterielle Wirkung
0-005	<i>Halogeometricum sp.</i>	Starke anti-archeale Wirkung; peptidische Substanz ?
3-001	<i>Streptomyces sp. B-1017B</i>	chemisch interessant; anti-archeale, -fungale Aktivität
3-002	<i>Streptomyces sp. B-1014C</i>	chemisch interessant; breite Aktivität; starke Cytotoxizität
3-006	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	hoch-spezifische Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i>
3-009	<i>Saccharomonospora sp. B-4007</i>	Sehr starke zell-toxische Wirkung

Tabelle 7: Priorisierte Kandidaten der zweiten Auswahlgruppe

Stamm-ID	Priorisierter Kandidat	Priorisierung erfolgt wegen:
0-024	<i>Acidianus ambivalens</i>	Sehr starke und breite antimikrobielle Aktivität
0-047	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	breites antimikrobielles Aktivitätsspektrum
0-049	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	Antimikrobielle Aktivität gegen <i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Micrococcus</i>
1-017	<i>Anaerocellum thermophilum</i>	breites antimikrobielles Aktivitätsspektrum
2-003	<i>Streptomyces sp.</i>	Antimikrobielle Aktivität gegen <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> & sehr starke Cytotoxizität
3-015	<i>Bakterium sp. (ZF0050744)</i>	starke antimikrobielle Aktivität und Cytotoxizität
3-018	<i>Bakterium sp. (ZF0050749b)</i>	geringe antimikrobielle Aktivität aber starke Cytotoxizität



6. Fermentation, Aufarbeitung und Darstellung von Reinsubstanzen

Mit dem Ziel, aus Kultivierungsansätzen im Maßstab 10 - 50 L die bioaktiven Substanzen dieser Hitkandidaten zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären, wurden in Zusammenarbeit aller Projektpartner **16** Fermentationen durchgeführt, wobei das Fermentationsvolumen die Bedürfnisse der Reinsubstanz- und Gesamt-DNA-Isolierung gleichermaßen berücksichtigen musste. Die Aufarbeitung der Kulturüberstände bzw. Zellsedimente (je nach Auftreten der Aktivität im Primärscreening) erfolgte im Upscale analog dem Aufarbeitungsschema (Abb. 1). Dabei wurden Kulturüberstände und -extrakte priorisierter Kandidaten einerseits mittels Aktivitätsprofilierung wie bisher analysiert und mittels spektroskopischer Methoden chemisch charakterisiert. Andererseits wurde ein Teil der Zellpellets zur Isolierung genomischer DNA (s.u.) bereitgestellt. Für die Analyse mittels Dünnschichtchromatographie („Chemisches Screening“) setzte man nach etablierter Methode voraus, dass intensiv anfärbbare Metabolite auf interessante Naturstoffstrukturen schließen lassen. Stieß man in einer Fraktion auf interessante Bestandteile durch massenspektrometrische Analyse, so wurde das Substanzgemisch mittels chromatographischer Aufreinigung hinsichtlich möglicher Wirkstoffe untersucht und bearbeitet.

Basierend auf den so erzielten Ergebnissen erfolgte eine finale Einteilung der 16 priorisierten Hitkandidaten hinsichtlich der Kriterien **Aktivität**, **Reproduzierbarkeit** und **Erfolgsaussichten der Substanzaufklärung**. Eine derartige weitere Fokussierung der Arbeiten erwies sich vor allem wegen des, für ein derartiges Vorhaben viel zu eng gesetzten Förderzeitrahmens als notwendig.

Tabelle 8 fasst die finale Einteilung der Kandidaten zusammen. Alle weiteren Arbeiten beschäftigten sich danach vornehmlich mit Kandidaten der obersten Prioritätsstufe sowie aussichtsreichen Kandidaten der Stufe 2. Im folgenden ist das Bioaktivitätsprofil ihres Metabolitenpatterns und die Ergebnisse der chemischen Charakterisierung im Detail beschrieben.



Stamm	Prioritätsstufe 1	Prioritätsstufe 2	Prioritätsstufe 3
1-004	starke spezifische Cytotoxizität, Fraktionierung positiv; Substanzmenge der Fraktion > 600 mg; Aufklärung greifbar		
1-009			Ergebnisse nicht reproduzierbar
1-014		bestätigte antifungale und antimycobakterielle Aktivität; viele aktive Fraktionen aber nur 17 mg Substanzgemisch	
0-002		Hohe antibakterielle Aktivität, aber auch Kontrollen zeigen manchmal Aktivität	
0-005			nur anti-archeale Aktivität bestätigt
3-001	Antifungale Aktivität reproduzierbar; Reinsubstanz greifbar (Fraktionen 551, 552)		
3-002		Breite antimikrobielle, antifungale Aktivität, starke Cytotoxizität; Reinigung der Fraktionen führt zum Verlust der aktiven Substanzen	
3-006			Ergebnisse nicht reproduzierbar
3-009	Struktur-neue, aber nicht aktive Substanz (-5K36) bereits aufgeklärt; sehr gute Cytotoxizität; zu wenig Substanz – neue Fermentation		
0-024	Breite antimikrobielle Aktivität bestätigt; aber erneute Testung mit allen Kontrollen notwendig	-> Potentielle Rückstufung	
0-047			Extrem komplexe Wirkstoffpalette
0-049		In Anzucht #3 (Fermenter) spezifische Aktivität gegen <i>Mycobacterium sp.</i>	
1-017			Ergebnisse nicht reproduzierbar
2-003		Starke Cytotoxizität & spezif. antimikrobielle Aktivität; Greifbarkeit problematisch	
3-015	Spezifische Aktivität gegen <i>Propionibacterium acne</i> und <i>Streptococcus mutans</i>		
3-018		Starke Cytotoxizität; Reproduzierbarkeit uneindeutig	

Isolat ID # 3-001 (Prioritätsstufe 1)

Der Stamm war durch leichte Cytotoxizität im Kulturfiltrat und gute antifungale Aktivität gegen *Sporidiobolus johnsonii* im biologischen Screening aufgefallen. Die chemische Profilierung der Anzucht Nr. 4 (3-001-4M) ergab eine polare, mit Anis violett anfärbbare Substanz im Mycel und durch mit Anis grün und rot anfärbbare Substanzen im Kulturfiltrat. Die reproduzierbaren Ergebnisse des chemischen Screenings der zweiten Anzucht 3-001-2 rückten den Stamm in die Liste priorisierter



Kandidaten. Auch in Anzucht Nr. 5 (10 L- Fermenter) bestätigte sich die antifungale Aktivität, man erhielt neben zwei Tryptophan-Derivaten (Abb. 4) auch fast reine Substanzen die aufgrund der Menge von nur 0.2-0.7 mg jedoch nicht weiter bearbeitet werden konnten. Andererseits deutet dies jedoch auf hochaktive Substanzen hin, da so kleine Mengen große biologische Effekte zeigten. Eine weitere Anzucht (Nr. 6) wurde als 10 L- Fermenter angesetzt und lieferte 6.9 g des Kulturfiltrates und 9.8 g Mycel. Da die Aktivität sich im Kulturfiltrat befand, wurde dieses zuerst chromatographisch aufgearbeitet. Man erhielt sieben Fraktionen von denen die fünfte, sechste und siebte Fraktion weiter bearbeitet wurden. Besonderes Interesse galt der, in den Fraktionen zwei, drei, vier und fünf auftretenden, unpolaren purpur-rosa Zone und den, in den Fraktionen fünf und sechs sich wiederholenden grünen und rosa-farbenen Metaboliten (DC-Analyse). In Fraktion 3-001-6K3 (2.4 g) traten als Massen 865, 685 und 569 (HPLC-MS-DAD-Analyse) auf. Die Fraktion 3-001-6K5 (189.8 mg) barg neben 865 und 569 auch die Massen 778, 457, 390. Fraktion 3-001-6K6 (35.9 mg) ergab 881, 457, 465, 340 und 291 als gesuchte Massen. Zentraler Leitfaden war bisher die antimikrobielle Aktivität der Fraktion Nr. 5 in der Anzucht Nr.5 (Subfraktionen 3-001-5K551 und 3-001-5K552). Die entsprechende Fraktion 3-001-6K5 der Anzucht Nr. 6 enthält in Subfraktion Nr. 8 (3-001-6K5-8, 5.0 mg) eine besonders auffällige reine Substanz. Die chemische Analyse ist nicht abgeschlossen. Die Subfraktion 3-001-6K5-9 (80.1 mg) wurde nochmals weiter subfraktioniert. Die EI-MS Analyse zeigte höhermolekulare Ionen, so dass die Feinfraktionen 3001-6K5-94 (1.6 mg), 3-001-6K5-95 (11.0 mg) und 3-001-6K5-96 (14.6 mg) weiterhin für die Naturstoff-Analyse von hohem Interesse sind.

Fazit: Anzucht 6 des Stammes 3-001 hat eine Fülle verfolgungswerter Fraktionen geliefert, die jedoch im Projektzeitraum nicht abschließend analysiert werden konnten.

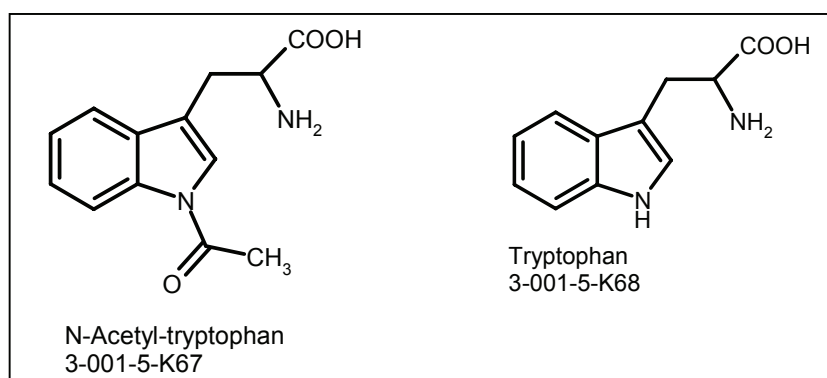


Abb. 4 Schnelle Dereplikation und Aufklärung bekannter Substanzen in der Fraktion 3-001-5-K6



Isolat ID # 3-002 (Prioritätsstufe 2)

Der Extrakt des Stammes versprach breite Anwendung durch seine antimikrobielle und antifungale Wirkung sowie die sehr hohe cytotoxische Aktivität (3-002-3K), die sich auch in verschiedenen Anzuchten bestätigte. Auch die chemische Profilierung war vielversprechend: die Dünnschichtchromatographie zeigte nach Anfärbung eine breite Palette von violetten, grünen, roten und gelben Metaboliten, was auf eine hohe chemische Strukturdiversität hindeutete. Die Isolierung der Substanzen selber erwies sich als überaus schwierig, da große Mengen Fettgemische produziert wurden, die die Aufreinigung ausreichender Mengen an Substanzen stark behinderte. Die Neufermentation in Schüttelkolben (E = 15 L) wurde angegangen, um die Substanzen erneut isolieren zu können und vor allem die antifungale Aktivität zu klären, da sich diese unregelmäßig über die Fraktionen des Kulturfiltrats erstreckte. Von zehn Fraktionen wurde den Fraktionen fünf, sechs und sieben besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Besonders interessant erschien Fraktion 3-002-6K5 (3.1 g), die proportional zu ihrer Menge auch ein breites Substanzspektrum aufwies. Massen wie 721, 637, 599, 585, 561, 523, 407 und 399 wurden vorgefunden. Die nachfolgende Fraktion 3-002-6K6 (539.9 mg) enthielt weniger Substanzen (MS, 401, 351, 321, 275, 221 und 414). 3-002-6K7 (289.4 mg) zeigte in ihrem ESI spektroskopischen Befund die Massen wie 655, 414, und 251. Fraktion 3-002-6K6 wurde zuerst chromatographisch vorgetrennt. Die grün anfärbbare Fraktion befand sich nach der Trennung in Subfraktion 3-002-6K6-2 (53.7 mg) und zeigte drei Massen von 414, 560 und 360. Eine sehr intensive rosa Zone fiel in Fraktion 3-002-6K6-3 (84.7 mg, MS 360, 560, 414, 602) auf. Leider konnte die Substanz nach dem ausgewählten Chromatographieschritt nicht wieder detektiert werden (s. DC-Analyse in Abb. 5 A, B). Eine erneute Fermentation wäre notwendig, um dieses Phänomen genauer zu untersuchen. Die Fraktion 3-002-6K7 wurde weiter bearbeitet. Eine intensiv fluoreszierende, nicht anfärbbare Substanz in Subfraktion 3-002-6K7-6 (9.6 mg) konnte als 3-002-6K7-68 (3.1 mg) isoliert werden (MS, 150). Eine im Dünnschichtchromatogramm auffällige, bisher im Arbeitskreis noch nicht beobachtete hellrot-fluoreszierende Substanz 3-002-6K10 (10.0 mg) stammt nicht aus dem Medium (s. Abb. 5 C). Sie ist sehr polar, löst sich nicht in gängigen organischen Lösungsmitteln und entzog sich bisher allen Versuchen zur weiteren chromatographischen Aufreinigung und MS-Analyse. Sie zeigt auch in den NMR-Spektren keine Signale.

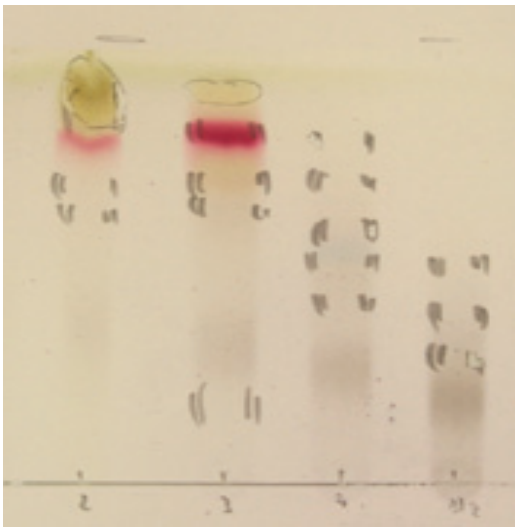


Eine Elementaranalyse wird angestrebt. Alle Fraktionen wurden hier bei Raumtemperatur und nicht wie üblich in der Wirkstoffforschung bei -20°C gelagert, um eine Zersetzung der Substanzen, die in mikrobiellen Kulturen bei $+50^{\circ}\text{C}$ gebildet wurden zu verhindern.

Fazit: Anzucht 6 des Stammes 3-002 hat drei verfolgenswerte Fraktionen geliefert, eine abschließende Analyse war im Projektzeitraum nicht möglich. Eine Reinsubstanz (3-002-6K7-68) der Masse 150 konnte dargestellt werden. Eine neue Anzucht 7 ist geplant, welche die Untersuchung der Stabilität und die Reinisolierung der Verbindung 3-002-6K6-3 zum Ziel hat.

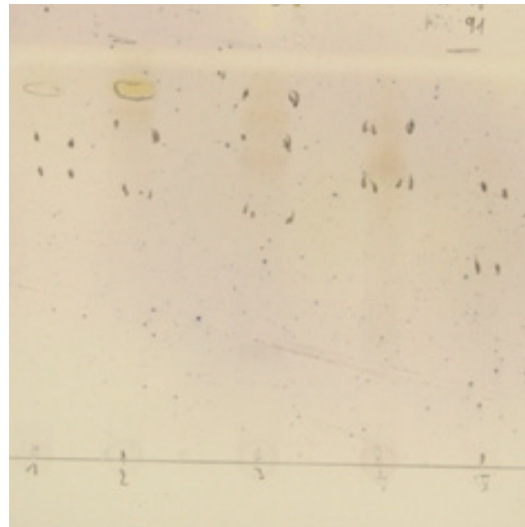
Abb. 5:

A
3-002-6K6



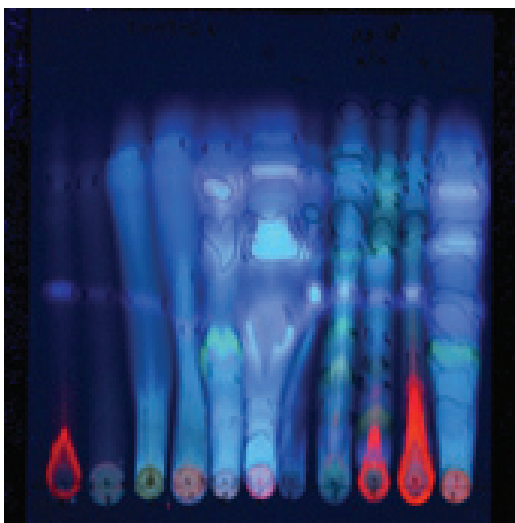
*Vor den chromatographischen Reinigung,
kräftig rosa, stark fluoreszierend*

B
3-002-6K6-3



*Nach dem Trennungsgang auf RP-18
die rosa Substanz fehlt*

C
3-002-6K10

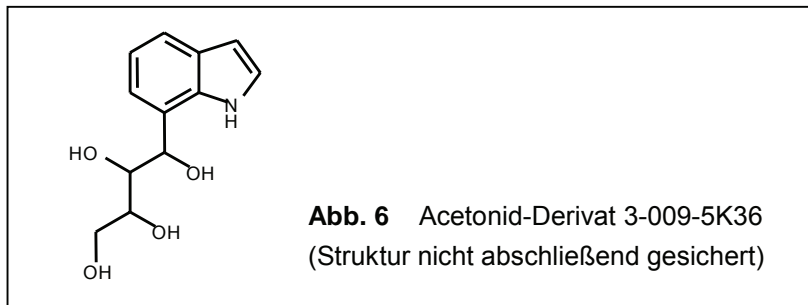


*Chromatographische Reinigung von
3-002-6K, selten: hellrote Fluoreszenz
von 3-002-6K10*



Isolat ID # 3-009 (Prioritätsstufe 1)

In den biologischen Screening-Assays erwies sich der Stamm als reproduzierbar sehr cytotoxisch (3-009-3M), während die zunächst guten Aktivitätsergebnisse gegen *Mycobacterium smegmatis* nicht reproduzierbar waren. Aus dem Stamm konnte relativ schnell ein neuer, bisher nicht beschriebener Naturstoff isoliert werden: ein Acetonid-Derivat (3-009-5K36), das keine biologische Aktivität zeigte (Abb. 6). Um weitere und insbesondere die aktiven Strukturen aufklären zu können, war zu wenig Substanz vorhanden. Daher wurde eine weitere 10 L-Fermentation durchgeführt und erneute Testreihen gefahren. Starke Cytotoxizität konnte diesmal sowohl im Kulturfiltrat in der Fraktion 3-009-6M3 (427 mg) als auch im Mycel 3-009-6K1 (254 mg) nachgewiesen werden. Eine weitere chemisch-analytische Bearbeitung ist in naher Zukunft geplant, da die Produktion des aktiven Prinzips reproduzierbar ist und die Reindarstellung damit aussichtsreich ist. Im Rahmen der bisherigen Projektlaufzeit konnten diese Arbeiten in der AG Grund jedoch noch nicht weiter fortgeführt werden.

**Isolat ID # 3-015 (Prioritätsstufe 1)**

Kulturfiltrat und Mycel (3-015-7K/-7M) zeigten im chemischen Screening eine auffällig mit Anis rot anfärbbare Zone, die auch stark antimikrobiell aktiv war. Der Stamm war in Anzucht Nr. 5 insbesondere wegen seiner Aktivität gegen die Indikatorstämme *Streptococcus mutans* und *Propionibacterium acne* aufgefallen und umgehend priorisiert worden. Daher versuchte man in Anzucht Nr. 10 (Schüttelkulturen) die chemische und antimikrobielle Aktivität zu reproduzieren. Die Fraktion Nr. 6 (3-015-10K6) zeigte dasselbe chemische Muster wie 3-015-5K. Die rote Substanz konnte aus dem Kulturfiltrat nahezu rein (3-015-10K5-3, rot, 18.1 mg; 3-015-10K6-1, rot, 3.3 mg) dargestellt werden, die Aktivität war nicht nachweisbar. In der Subfraktion 3-015-10K5-5 befand sich eine interessante grünlich färbende Substanz, deren Ausbeute 10.9 mg betrug. Weiterhin konnten aus Subfraktion 3-015-10M1-3 7.2 mg einer interessanten, intensiv blauen Substanz isoliert werden. Beide Substanzen befinden sich in der



Strukturaufklärung. Um die Struktur der roten Substanz endgültig klären zu können, wurde Stamm 3-015 nochmals in einer 10-L Fermentation angezogen. Aus 3-015-11K3-6 gelang es die rote Substanz zu isolieren und die Struktur mittels $^1\text{H-NMR}$ und HPLC-MS zu klären. Es handelte sich um Tryptophan (s. auch Abb. 4). Die antimikrobielle Aktivität konnte bislang nicht reproduziert werden und entsprechend keine verantwortliche Substanz isoliert und identifiziert werden.

Fazit: die hoch interessante, spezifische antimikrobielle Aktivität dieses Stammes war bislang nicht reproduzierbar. Die noch in der Aufklärung befindlichen Substanzen sind chemisch von Interesse. Trotzdem ist eine Rückstufung auf Priorität 2 vorgenommen worden. Für die Wirkstoffentwicklung ist Stamm 3-015 nicht mehr als höchst aussichtsreicher Kandidat einzustufen. Nachdrücklich wünschenswert ist aber eine Weiterbearbeitung in der AG Grond bei ausreichender Kapazität.

Isolat ID # 3-018 (Prioritätsstufe 2)

Der Stamm war aufgefallen, weil seine Extrakte eine auffällig hohe Cytotoxizität zeigten. Die Ergebnisse der früheren Anzuchten konnten jedoch nicht reproduziert werden. In Fermentation 3-018-11 war die Cytotoxizität weder im Mycel noch im Kulturfiltrat nachweisbar. Dennoch sind die Fraktionen 3-018-11K4 (589.3 mg) und 3-018-11K6 (121.7 mg) in weiterer Bearbeitung, da die DC- und MS-Analyse komplexe Metabolitenstrukturen aufgrund intensiver Anfärbbarkeit versprochen. Der Subfraktion 3-018-11K4-3 (13.4 mg) konnte eine Masse von 1.092 zugeordnet werden (Abb. 7), der ein sehr polarer Stoff, evtl. ein peptidischer Wirkstoff zugrunde liegt. Subfraktion 3-018-11K4-4 (8.6 mg) enthält eine Masse von 343 und Subfraktion 3-018-11K4-5 (3.8 mg) die Massen 878 und 358. Nach präparativer Trennung der Proben wurden Substanzmengen von 0.2 mg erhalten, die für chemische und biologische Charakterisierungen nicht ausreichend sind und keine Strukturaufklärung versprechen. Für weitergehende Analysen ist somit eine erneute Fermentation evtl. in größerem Maßstab notwendig

Fazit: Bei nicht reproduzierbarer Bioaktivität stützt sich das weitergehende Interesse an diesem Stamm vor allem auf die Substanz in 3-018-11K4-38, die möglicherweise peptidischer Natur ist. Auch hier ist die weitere Untersuchung des Stammes 3-018 hinsichtlich der chemischen Analytik der Sekundärstoffproduktion durch die AG Grond nachdrücklich wünschenswert. Jedoch ist im Forschungsverbund derzeit keine weitere Entwicklung geplant, da die Zielverbindung in den derzeitigen Tests keine Bioaktivität zeigt.



Isolat ID # 2-003 (Prioritätsstufe 2)

Der Stamm war wegen seiner cytotoxischen wie auch antimikrobiellen Aktivität aufgefallen. In der chemischen Profilierung konnten nach Fraktionierung aber keine Komponenten identifiziert werden, die nicht auch im Nährmedium enthalten waren (Nährmedium-Kontrolle). Obwohl die Aktivität nach Upscale Fermentation bestätigt werden konnte, wurde der Stamm nicht für die weitere naturstoffchemische Bearbeitung final priorisiert.

Fazit: Da die Bioaktivität reproduziert werden konnte, aber zunächst kein aussichtsreiches Metabolitenspektrum beobachtet wurde, gilt der Stamm zwar als interessant, konnte aber wegen der knappen Kapazitätsplanungen im Forschungsverbund nicht der Prioritätsstufe 1 zugeordnet werden. Auch hier wäre eine weitere Untersuchung des Stammes 2-003 hinsichtlich der chemischen Analytik der Sekundärstoffproduktion durch die AG Grond nachdrücklich wünschenswert.

Isolat ID # 1-004 (Prioritätsstufe 1)

Da der Extrakt 1-004-1XA sehr cytotoxisch war und breite antimikrobielle Aktivität gegen etliche Indikatorstämme zeigte, wurde eine zweite Anzucht zur Reproduktion der Ergebnisse durchgeführt. Die Cytotoxizität konnte in Fraktion 1-004-2XA1 bestätigt werden, die mittels Gelchromatographie isolierten Subfraktionen selber zeigten jedoch keine Aktivität. Hier stellt sich die Frage, ob verschiedene Substanzen synergistisch, d.h. nur in bestimmter Mischung wirken. Das bedeutete auch, dass die einzeln isolierten Verbindungen nicht das Aktivitätsprofil des Gesamtextraktes zeigen würden. Für die Identifizierung des aktiven Prinzips wäre dann die in der Wirkstoffforschung sehr aufwendige Methode der Isolierung und nachfolgenden definierten Mischung der Substanzen eine Option. Dieses Vorgehen war im Rahmen der Projektlaufzeit nicht durchführbar. Trotzdem wurde eine Aufreinigung angestrebt. Die Fraktion 1-004-2XA1 wurde als sehr polar eingestuft, sodass die für die Toxizität verantwortliche(n) Komponente(n) nur über HPLC präparativ zu erhalten sind. Entsprechend wurden 60 mg der Fraktion 1-004-2XA1 über eine semipräparative Säule getrennt und 19 Fraktionen erhalten, die zur biologischen Testung geschickt worden sind. Vier Subfraktionen zeigten geringe Cytotoxizität (1-004-2XA1-4 bis -8), sodass das Ergebnis der ersten Anzucht im Wesentlichen bestätigt werden konnte. Eine starke Erhöhung der Aktivität im Test durch Anreicherung der Zielverbindung über die



Fraktionierung wurde jedoch nicht beobachtet, so dass eine weitere Chromatographie der potentiellen, schwach cytotoxischen Verbindung hinter der Bearbeitung von 10L-Fermentationen der anderen, aussichtsreichen Kandidaten wie 3-001 und 3-002 bisher hintenanstand.

Fazit: Da die Bioaktivität reproduziert werden konnte, gilt der Stamm weiterhin als interessant. Eine fortgesetzte Untersuchung des Stammes 1-004 hinsichtlich der Optimierung der Fermentation zur besseren Produktausbeute und der chemischen Analytik der Sekundärstoffproduktion durch die AG Antranikian und AG Grond ist wünschenswert.

Isolat ID # 0-024 (Prioritätsstufe 1)

Die Extrakte 0-024-6XM und 0-024-7XA waren wegen ihrer antifungalen Aktivität gegenüber *Sporidiobolus johnsonii* von besonderer Bedeutung. Die Extrakte 0-024-6XM2, 0-024-7XA und 0-024-8XA erwiesen sich zudem im chemischen Screening mit zahlreichen rosafarbenen, gelb-orangen und fluoreszierenden Spots als besonders interessant. Es konnten bislang keine Reinstoffe isoliert werden, allerdings liegen mit den Zielverbindungen angereicherte Fraktionen vor. So zeigte sich 0-024-6X2-2 (0.5 mg) als chemisch stabil (stark fluoreszierende, UV-löschende Substanz), war aber einer Strukturaufklärung wegen der geringen Menge bisher nicht zugänglich. Für die Bearbeitung der sehr polaren, offensichtlich niedermolekularen Substanzen in der Fraktion 0-024-7XA müssen neuartige, über das breite Spektrum der reversed phase-HPLC-Technik hinausgehende Chromatographie-Methoden getestet werden. An Cellulose- und neue Kieselgel-Materialien ist gedacht, eine Umsetzung dieser Ideen bleibt aber einem Anschlussprojekt vorbehalten.

Fazit: Nur eine Ausweitung des Methodenarsenals der Chromatographie in der AG Grond und eine sorgfältige Ausarbeitung einer neuen Isolierungssequenz kann bei den gewünschten Fraktionen zum Erfolg der Reinstoffdarstellung führen.

Isolat ID #0-047 (Prioritätsstufe 3)

Von den neu untersuchten Extrakten aus Darmstadt hatten die Extrakte der dritten Anzucht 0-047-3 (*Acidithiobacillus caldus*) die Aufmerksamkeit erregt. Aber auch bei den vorhergehenden Anzuchten Nr. 1+2 waren antimikrobielle Aktivitäten in den Extrakten 0-047-1M gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*,



Pseudomonas fluorescens, *Mycobacterium smegmatis*, *Micrococcus luteus* (in der Reproduktion des Ansatzes leider negativ) und 0-047-2M gegen *Sporidiobolus johnsonii* und *Halobacterium sp.* festgestellt worden. Außerdem zeigten auch die Überstände der zweiten Anzucht 0-047-2PU und 0-047-2PF breite antimikrobielle Aktivität. In der zu untersuchenden Anzucht 0-047-3 konnte die Aktivität von 0-047-3XM und 0-047-3XA gegen *Mycobacterium smegmatis* bestätigt werden. Extrakt 0-047-3M zeigte eine breite Aktivitätspalette gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *Micrococcus luteus*. Mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-MS-Methode war in allen Extrakten eine für die Isolierung unvorteilhaft große Zahl an Metaboliten nachweisbar: Extrakt 0-047-3XM (46.1 mg) zeigte mindestens 10 Verbindungen, von denen drei auffällig rosa anfärbbar waren, während Extrakt 0-047-3M (54.9 mg) mehr als 15 Verbindungen enthielt, von denen zwei besonders auffällig waren. Wegen der reproduzierbar hohen Bioaktivität der Extrakte könnte trotz der geringen Mengen eine weitere Isolierung vernünftig erscheinen, um die Substanzklasse der Verbindungen zu identifizieren. Daraufhin können die Fermentationsbedingungen für eine neue Fermentation im Großmaßstab (mindestens 100 L) gezielt gewählt werden.

Fazit: Dieser Stamm ist das beste Beispiel und „proof-of-concept“, dass die erstmalig in diesem Projekt hinsichtlich der Wirkstofffindung untersuchten extremophilen Mikroorganismen tatsächlich begabte Produzenten von niedermolekularen Wirkstoffen sind. Der Stamm ist als ein „sehr begabter mikrobieller Sekundärstoffbildner“ einzustufen, für dessen Bearbeitung die Projektlaufzeit bei weitem nicht ausreichte.

Eine Optimierung der Fermentation zur besseren Produktausbeute bestimmter Verbindungen, z. B. durch gezielte Zugaben von Aminosäuren durch die AG Kletzin macht diesen Stamm zu einem weiterhin sehr interessanten Kandidaten. Da die nachfolgende chemische Analytik in der AG Grund für den Beginn einer erfolgversprechenden Entwicklung der Zielverbindungen eine Herausforderung bleibt, konnte im Rahmen dieses Projektes keine höhere Priorisierung vorgenommen werden. Dass die überaus große Fülle an chemischen und biologisch interessanten Metaboliten eine große Schwierigkeit bei der Darstellung der Reinstoffe ist, gilt als besonderer Anreiz für eine gewünschte, unbedingt angestrebte weitere Bearbeitung.

Eine zusammenfassende Einsicht von bisher bearbeiteten Stämmen bietet die tabellarische Darstellung der Ergebnisse im Anhang des Berichtes.

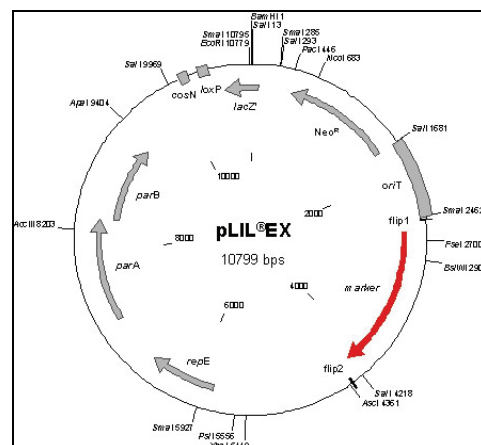


7. Erfassung des genetischen Potentials priorisierter Hitkandidaten in genomischen ‚large-insert-libraries‘ (siehe auch Statusbericht Februar 2004)

7.1. *Konstruktion eines flexiblen Shuttle-BAC Vektor Systems:* Niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch antimikrobiell wirksame Peptide werden z.T. von Gruppen sukzessiv arbeitender Synthesenzyme hergestellt und modifiziert. In Mikroorganismen liegen diese Gene oftmals gruppiert in Form von Genclustern vor. Um entsprechende Cluster als Funktionseinheiten in einer Genbank abzubilden, ist es notwendig, für die Anlage der Genbanken Vektoren zu wählen, die entsprechend große DNA Fragmente stabil propagieren können. Zu diesen Zweck werden in der Regel Fosmid- oder BAC-Vektoren eingesetzt, die aber, bei Insert-Kapazitäten zwischen 50 – 200 kb, reine *E. coli* Systeme darstellen (z.B. [6]). Eine *effiziente*, heterologe Expression der Gencluster in geeigneten Wirtssystemen (*E. coli* ist primär eher ungeeignet) erfordern daher den Umbau entsprechender Vektoren zu Shuttle-Vektoren. Im Rahmen des Projektes wurde daher ein BAC-Vektorsystem konstruiert, mit dem, aufbauend auf einem Basisvektor pLIL[®]EX (zur Herstellung von Large-Insert-Genbanken; Abb. 9), die shuttle-Funktionen verschiedener Expressionswirte flexibel über ein Set sogenannter FLIP-Konstrukte (Abb. 10) gerichtet in den Vektor eingebracht werden können.

Abb. 9:

pLIL[®]EX BAC-Basisvektor zur Herstellung von Genbanken hochmolekularer Insert-DNA



Im Rahmen des Projektes konnten insgesamt drei FLIP-Konstrukte zur Verwendung der Expressionswirte *Mycobacterium sp.*, *Streptomyces sp.* und *Bacillus sp.* verwirklicht und funktionell getestet werden. Hierzu wurde jeweils das, in der FLIP-Kassette vorhandene *ccdB*-Gen gegen eine Kombination aus wirtsspezifischen,



genomischen Integrationselementen (*int-attP* oder *dif-site*) und Resistenzgenen (Gm^R , Ap^R bzw. Cm^R) aus pMH497 ([8]; Abb. 10B), pOJ436 ([7]; Abb. 10C) und pSAS144 ([9]; Abb. 10D) ausgetauscht.

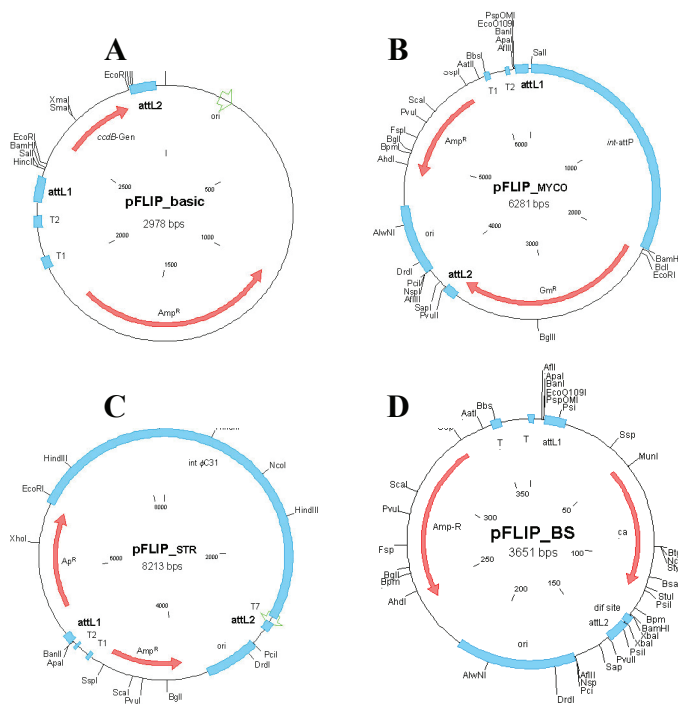


Abb. 10:
Vektorkarten des FLIP Basis-Vektors (A) sowie der drei *Mycobacterium sp.* – (B), *Streptomyces sp.* – (C) und *Bacillus sp.* – (D) spezifischen FLIP-Konstrukte

Die Funktionalität des Systems konnte mittels der **Int**, **Xis**, **IHF**-vermittelten Konversionsreaktion mit Basisvektor pLIL[®]EX und den beiden FLIP-Vektoren pFLIP_{MYCO} und pFLIP_{STR} gezeigt werden und führte zur Generierung der shuttle-BAC Vektoren pLIL[®]EX_{MYCO} und pLIL[®]EX_{STR} (s. Statusbericht).

7.2. Bankengenerierung: Die Präparation hochmolekularer DNA (~100-kb) aus priorisierten Stämmen wurde mithilfe der bei der Fermentation der Stämme anfallenden Zellsedimente durchgeführt. Hierbei wurde entsprechend den bei BAC-Klonierungen üblichen Protokollen (z.B. von Choi *et al.* [4]) unter Einbettung der Zellen in eine Agarose-Matrix vorgegangen und die genomische DNA (gDNA) nach Zell-Lyse und Pulsfeld-Gelelektrophorese gewonnen (z.B. Abb. 11).

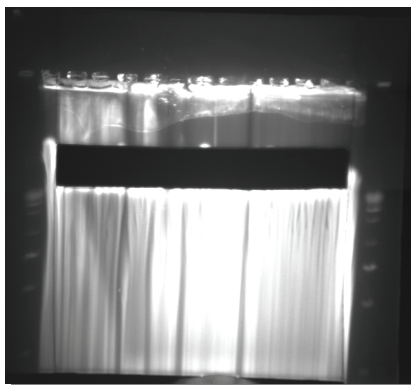


Abb. 11:
Pulsfeld-gelelektrophoretische Auftrennung hoch-molekularer, genomischer DNA aus Stamm **1-004**. Aufnahme nach Exzision der in einer Kompressionszone laufenden gDNA größer 112-kb.



Im Verlauf der Arbeiten zeigte sich, dass diese Vorgehensweise mehrfach durchlaufen werden muß, um ausreichende Mengen an final klonierbarer DNA im gewünschten Größenbereich bereit zu stellen. Mit entscheidend in diesem Zusammenhang ist auch das, möglicherweise noch nicht ausgereifte pLILEX Vektorsystem, für das in der Kürze der zur Verfügung stehenden Projektlaufzeit kein optimales Protokoll etabliert werden konnte. Da in entsprechenden Klonierungsexperimenten keine repräsentativen Klonzahlen erzeugt werden konnten, wurde parallel mithilfe eines gDNA Isolierungskits von EpiCentre Gesamt-DNA geringerer Größe von Stämmen der Prioritätsstufe 1 (z.B. 3-009 oder 3-015) gewonnen und testweise zur Klonierung in den Fosmidvektor pEpiFOS-5 eingesetzt. Auf diese Weise konnte bislang eine Fosmid-Genbank des Isolates 3-015 hergestellt und 1.152 Klone in MTPs abgelegt werden. Die Insert-Analyse (Abb. 12) zeigt Insertionen zwischen ca. 20 – 48 kb entsprechend der Kapazität des Vektors. Legt man eine durchschnittliche Insertgröße von 40 kb und eine Genomgröße von 4 Mb zugrunde, ergibt sich aus der Formel:

$$N = \ln(1 - P) / \ln[1 - (I / G)]$$

eine Klonzahl N von 458 Klonen zur 99% Abdeckung des Genoms. Die abgelegten Klone der Genbank repräsentieren somit eine ca. 2,5 fache Abdeckung des Genoms von Isolat 3-015.

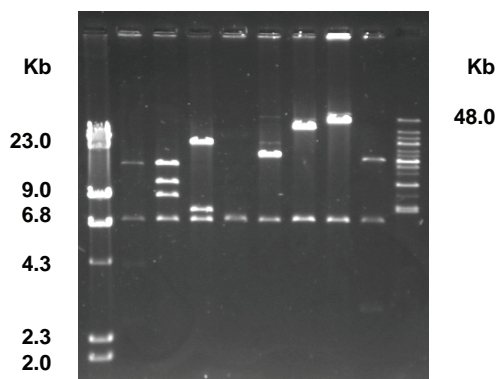


Abb. 12

Pulsfeld-gelelektrophoretische Auftrennung einer Restriktionsanalyse (*NotI*) von acht zufällig ausgewählten Klonen der Genbank 3-015. Die Insertgrößen liegen zwischen 20 – 48 kb.

Die aktivitätsbasierte Analyse aller Genbank - *E. coli* Klone durch Überschichtung mit Indikatorstamm *Propionibacterium acne* (s. chemische Analyse und Tabelle 8) ergab primär fünf antimikrobiell wirkende Klone, deren Aktivität sich jedoch im Einzeltest nachfolgend nicht reproduzieren ließ. Nachdem auch mit dem Isolat 3-015 selbst



bislang eine Reproduktion der antimikrobiellen Aktivität nicht gelungen ist, wurden hier keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Fazit: Nachdem das avisierte, flexible BAC Shuttle-Vektorsystem erfolgreich erstellt und funktionell getestet werden konnte, erwies es sich als unerwartet zeitraubend entsprechende Protokolle für die Erstellung von Genbanken mit diesem Vektor zu etablieren.

Diskussion

Im Rahmen der Projektlaufzeit konzentrierten sich die Aktivitäten der Projektpartner zunächst auf die Kultivierung und das Primärscreening extremophiler Mikroorganismen und im weiteren Verlauf auf die Bearbeitung priorisierter Hitstämme nach biologischen und chemischen Gesichtspunkten. Mit den dabei erzielten Ergebnissen konnte das Primärziel des Projektes – also der Nachweis, dass extremophile Mikroorganismen eine interessante Quelle neuer Wirkstoffe darstellen – erbracht werden.

Gleich zu Beginn des Projektes wurde, aufgrund der Neuartigkeit der zu untersuchenden Isolate, der damit verbundenen, möglichen Unwägbarkeiten in Bezug auf verwendete Assays bzw. chemische Profilierungsansätze und aufgrund der Anforderung, auch peptidische Wirkstoffe untersuchen zu wollen, eine Pilotphase durchgeführt, die in dieser Form nicht im Projektplan vorgesehen war (Tabelle 9). Im Rahmen dieser Testphase wurde ein Protokoll zur Herstellung von bioaktiven Rohextrakten etabliert und durch den hohen Anteil antimikrobieller Aktivitäten in nachfolgend hergestellten Rohextrakten erfolgreich validiert. Bereits während dieser Etablierungsphase wurde klar, dass das geplante Teilprojekt A nicht wie geplant durchführbar sein würde. Ursprünglich geplant war eine intensive, stark parallele Kultivierungsphase zur Anzucht und Analyse möglichst vieler, der in den Sammlungen existierenden extremophilen MO. Ursache für unsere Änderung sind die beschriebenen Schwierigkeiten, entweder bei der Reaktivierung der Isolate oder der für eine parallele Kultivierung notwendigen, standardisierten Anzuchtbedingungen. Eine zeitnahe Priorisierung von Hitkandidaten nach erfolgter Durchforstung der Stammsammlungen wurde daher durch eine Änderungsplanung mit fortlaufender Primärscreeningphase und abschnittsweiser Auswahl auffälliger Stämme und Isolate ersetzt (Tabelle 9: Auswahlgruppe -1, -2, finale Priorisierung). Auswirkungen hatte dies vor allem auf die Aktivitäten des Teilprojekt B, die aufgrund der sehr späten Priorisierung im letzten



Projektabschnitt komprimiert angegangen werden mussten. Letztendlich gelang es daher in der verbleibenden Projektlaufzeit nicht, die in diesem Teilprojekt geplanten Arbeitspakete vollständig zu bearbeiten.

Im Rahmen des zweiten Projektabschnitts konzentrierten sich die Aktivitäten der Projektpartner auf die Bearbeitung priorisierter Hitstämme nach biologischen und chemischen Gesichtspunkten unter der Anforderung, auch peptidische Wirkstoffe untersuchen zu wollen. Die Wiederfindung der in der Screeningphase aufgefallenen Aktivitäten priorisierter Stämme nach Fermentation verlief erfreulich positiv: so konnten bislang die Aktivitäten der Stämme 3-001, 3-002, 3-009, 0-047 und 1-004 im Extrakt verifiziert werden. Allerdings erwiesen sich die, aus den einzelnen Isolaten darstellbaren, extrem geringen Reinsubstanzmengen als größte Herausforderung für einen erfolgreichen Projektabschluss, weil in den allermeisten Fällen die erforderliche Strukturaufklärung und biologische Testung trotz der aus Eigenmitteln neu gewonnenen Technologie des automatisierten HPLC-DAD-Trennganges zur Gewinnung von Reinsubstanzen, nicht durchzuführen war. Bei der Ursachensuche müssen folgende Fragen experimentell untersucht werden, was in dieser Projektlaufzeit nicht möglich war:

- 1) Sind die Wirksubstanzen im Extrakt tatsächlich in derart geringer Menge vorhanden und zeigen trotzdem so starke Aktivität? Dann wären diese Stoffe sehr außergewöhnlich unter den Biotika und von besonders hohem Interesse.
- 2) Sind die Wirksubstanzen chemisch sehr labil, z. B. gegen Luftsauerstoff, acide Lösungsmittel?
- 3) Sind es nicht die Reinstoffe, die die Wirkung vermitteln, sondern Substanzgemische, so dass bei den aufreinigenden Chromatographieschritten die Wirkung verloren geht?
- 4) Die außergewöhnlich hohe Polarität vieler Zielverbindungen stellt eine weitere Schwierigkeit dar. Hier müssen veränderte Chromatographiesequenzen jeweils individuell neu überprüft werden.

Die Zahl der bisher als Reinsubstanzen in ausreichender Menge isolierbaren Wirksubstanzen entspricht daher bisher nicht den Erwartungen. Eine Fermentation im bisherigen Maßstab (10 - 50 L) reicht nicht aus, um das Wirkprinzip zu isolieren, in seiner Struktur aufzuklären und biologisch zu testen. Andererseits zeigen einige Stämme eine derartige Fülle von Verbindungen (z. B. 0-047), dass man sie

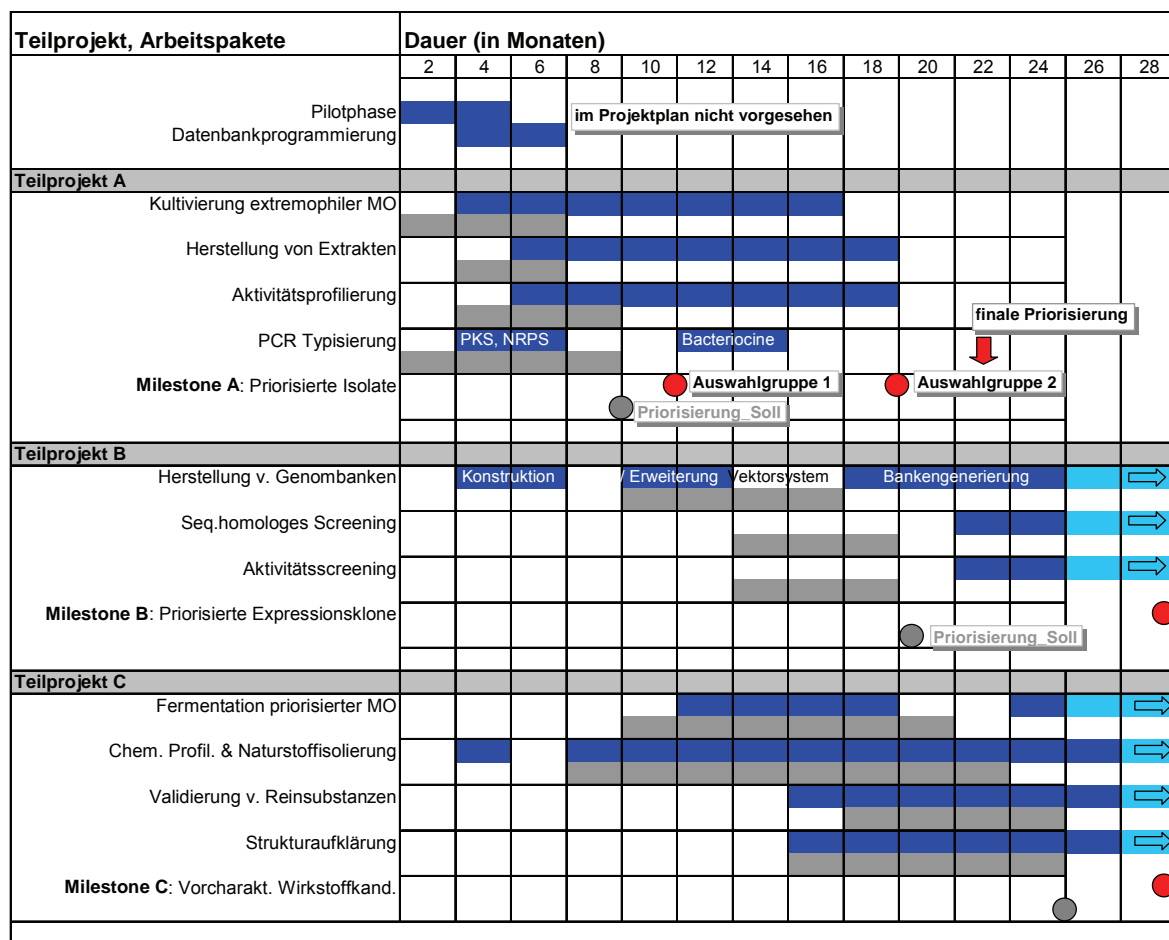


erfreulicherweise als sehr „begabte Sekundärstoffproduzenten“ einstufen muß. Sorgfältige, wenn auch zeitintensive Fermentationsoptimierungen können hier für eine um das Vielfache höhere Produktion sorgen. Methoden sind die Zugabe von Polystyrol-XAD-Adsorberharzen oder die Zugabe von Aminosäuren zur wachsenden Mikroorganismen-Kultur. Gelingt auf diese Weise die Strukturaufklärung neuartiger Wirkstoffe erlaubt diese möglicherweise Rückschlüsse auf die Biosynthese der Substanzen und liefert damit die Basis für ein genetisches Screening erstellter Genbanken der priorisierten Isolate. Da der für ein derartiges F&E Projekt zur Verfügung stehende Zeitrahmen von vorne herein als zu kurz angesehen wurde, müssen diese weitergehenden Charakterisierungen, vor allem in den Bereichen *nachhaltige* Produktion und Substanzentwicklung neu entdeckter Wirkstoffe in einem nachgeschalteten Projekt verstärkt angegangen werden. Als Paradebeispiel seien hier die Arbeitsgruppen Höfle und Reichenbach/GBF Braunschweig genannt, die erst durch extrem hohen Aufwand (1.000 L-Fermentationen) Wirkstoffe aus Myxobakterien isolieren konnten. Die konsequente Weiterführung des Projektansatzes über drei Jahrzehnte (!) führte zum weltweit einmaligen Erfolg. Heute gelten Myxobakterien als unerreicht begabte, überaus erfolgreiche Wirkstoffproduzenten Das Epothilon ist als Krebstherapeutikum in Phase II klinischer Prüfungen und gilt auf dem Weltmarkt derzeit als Millionen-Dollar-Naturstoff. Andererseits validieren gerade diese, in der Naturstoffforschung hinlänglich bekannten Schwierigkeiten den in diesem Projekt gewählten Ansatz der *nachhaltigen* Produktion durch heterologe Expression, der gerade auch beim Epothilon erfolgreich umgesetzt werden konnte (10).

Zusammenfassend ist es dem Forschungsverbund in der vergangenen Projektlaufzeit von nur 24 Monaten gelungen, erstmalig die extremophilen Mikroorganismen der unterschiedlichsten Gattungen als Wirkstoffproduzenten mit den modernen Methoden der Projektpartner eingehend zu untersuchen und den Nachweis zu erbringen, dass dieser Mikroorganismengruppe begabte Wirkstoffproduzenten angehören („proof-of-concept“). Erwartungsgemäß braucht aber der Weg bis zum Mrd.-Dollar-Wirkstoffproduzenten sicher noch eine längere, intensive Forschungszeit in weitaus größeren Projektverbänden. Hier kann der bestehende Forschungsverbund mit dem Ziel, zunächst wenige Produzenten und ausgewählte bioaktive Prinzipien mit der Firma BRAIN in eine industrielle Entwicklung zu bringen, einen ganz entscheidenden Beitrag leisten. Das Konzept zukünftiger Arbeiten des etablierten Verbundes ist bereits erstellt. Dieser Beitrag wird die Wirkstoffforschung und hier vor allem die nachhaltige Produktion von Naturstoffen mit Mikroorganismen und molekularbiologischen Methoden weiter anregen.



Tabelle 9: Arbeits- und Kapazitätsplan im Soll- / Ist- Vergleich. Milestones sind als farbige Kreise markiert.



Legende

- Tatsächlicher Zeitbedarf nach Änderungsplanung
- Projektierter Zeitbedarf laut Antrag
- Zusätzlicher Zeitbedarf außerhalb der Projektlaufzeit

Ausblick

Das Projekt befindet sich zum Abschluss der laufenden Förderung hinsichtlich der Charakterisierung interessanter Wirkstoffkandidaten aus extremophilen Mikroorganismen in einer „bottleneck“ Situation in Bezug auf die zur Verfügung stehenden Substanzmengen. Am Ende der Projektlaufzeit waren die angereicherten Wirkstofffraktionen von vier größeren Fermentationen mit dem Ziel in Arbeit, die Reinstoffe in ausreichender Menge zu isolieren, in ihrer Struktur aufzuklären und zu



testen. Da für aufwendige Großfermentationen im abgelaufenen Projekt aufgrund der zeitlichen Rahmenbedingungen keine freien Valenzen verfügbar waren, werden für die ausdrücklich angestrebte Weiterbearbeitung der aussichtsreichsten Kandidaten in einem Folgeprojekt Fermentationen von 100-L und mehr zur entgeltigen Strukturaufklärung und weitergehenden Wirkstoffcharakterisierung ausdrücklich priorisiert. Hier ist u.a. die AG Antranikian mit den vor Ort verfügbaren Kapazitäten gefragt. Die Isolierung der Wirkstoffe mit modernen Chromatographiemethoden wird auch weiterhin durch die kontinuierliche Testung in Bioassays geleitet (BRAIN AG) und mit chemisch-analytischen Methoden (TLC, HPLC-DAD, HPLC-MS) verfolgt (AG Grond).

Die Charakterisierung von Wirkstoffen wird neben ihrer chemischen Beschreibung vor allem auch durch umfassende Aufklärung ihrer biologischen Eigenschaften voran zu treiben sein. Hier sollen unter anderem auch vermehrt Fragestellungen aus den Bereichen Hygiene, „Personal Care“ und mikrobielle Konsortien angegangen werden. Die Methode der Ultrafiltration zur Herstellung von Extrakten mit höherem Peptidanteil wurde in der AG Kletzin ausgearbeitet und erfolgreich eingesetzt. Hiervon versprechen sich die Projektpartner eine Erweiterung des biologischen Wirkungsspektrums gerade auch im Hinblick auf die oben genannten Fragestellungen. Weiterführende Forschungsarbeiten könnten in diesem Zusammenhang z.B. zelluläre Reporteragen-Assays zur Anwendung bringen, die eine genauere Beschreibung der cytotoxischen Aktivität hinsichtlich der Art des induzierten Zelltodes (Apoptose) zulassen. Pharmazeutisch nutzbare Effektoren könnten in Assay-Systemen, basierend auf Säugerzellen, zur Identifizierung neuartiger Rezeptorliganden für eine mögliche Nutzung im Bereich der Therapie immunologischer Dysfunktionen eingesetzt werden. Die so gewonnenen Erkenntnisse wären ein wichtiger Ausgangspunkt für zahlreiche entwickelnde Forschungsansätze und für eine Umsetzung zu vermarktbareren Wirkstoffen. Hierauf fokussieren auch die Ansätze zur rekombinanten Darstellung von Entwicklungskandidaten in kompetenten, industriekompatiblen Wirtssystemen.



Literatur

- (1) A.L. Demain. 1998. *Nature Biotechnol.* **16**:3-4.
- (2) M.J. Pramik. 1998. *Genetic Engineer. News.* March **1**:8ff.
- (3) Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D. 2001. *Arch Microbiol.* **176**:386-390.
- (4) Choi S. and Wing R.A. CUGI Protocols: www.genome.clemson.edu
- (5) Zillig W., Kletzin A., Schleper C., Holz I., Janekovic D., Hain J., Lanzendörfer M. and Kristjansson J. K. 1994. *System. Appl. Microbiol.* **16**:609-628.
- (6) Shizuya, H. California Institute of Technology, Pasadena, CA; www.tree.caltech.edu.
- (7) Bierman M., Logan R., O'Brien K., Seno E.T., Rao R.N. and Schoner B.E. 1992. *Gene* **116**:43-49.
- (8) Marklund B.I., Speert D.P. and Stokes R.W. 1995. *J. Bacteriol.* **177**:6100-6105.
- (9) Sciochetti S.A., Piggot P.J., Blakely G.W. 2001. *J. Bacteriol.* **183**:1058-1068.
- (10) Tang L., Shah S., Chung L., Carney J., Katz L., Khosla C. and Julien B. 2000. *Science* **287**:640-642.
- (11) Meurer G. Grond S., Kletzin A., Grote R. und Antranikian G. 2003. *transkript* Sonderband **9**:43-46.

Projektkooperation und Öffentlichkeitsarbeit

Die bereits etablierten Kooperationen im Forschungsverbund sollen auch weiterhin intensiv genutzt und ausgebaut werden. Im Rahmen des Projektes wurde von vorne herein vielfach arbeitsteilig vorgegangen, was u.a. das gegenseitige Verständnis für bestehende, wie zu entwickelnde Prozesse bei den einzelnen Partnern deutlich erhöht hat. Dem soll auch in der künftigen Zusammenarbeit z.B. durch Austausch von Arbeitsgruppen-Mitgliedern, Rechnung getragen werden. Die etablierte *online* Datenbank trägt wesentlich zu einem hohen Informationsstand innerhalb des Projekts bei und ermöglicht eine effiziente Diskussion und systematische Planung anstehender Arbeitspakete. Das System zeigt sich insgesamt stabil und ausbaufähig, obwohl im Verlauf des Projektes bereits Erweiterungen vorgenommen wurden. Die Planung anstehender Arbeitspakete findet sowohl bilateral als auch im Rahmen der vierteljährlich stattfindenden Projekttreffen der Projektleiter und Mitarbeiter statt. Für die Testung der Wirkstoffderivate plant die BRAIN AG in einer weiteren Projektphase bei Bedarf die Einbeziehung weiterer ausgewählter Forschergruppen.

Im Rahmen der vom ICBio koordinierten Öffentlichkeitsarbeit wurde das Projekt im *transkript* Sonderheft ‚Nachhaltige Biokatalyse‘ (11) und durch einen ‚flyer‘ zur Biotechnica 2003 vorgestellt.



Anhang (Details der chemisch-analytischen Arbeiten)

In den folgenden Tabellen sind die besprochenen Fraktionen der untersuchten Stämme eingeordnet, mit der Angabe von Ausbeute und mit der Angabe von untersuchten Massen

3-001-6

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-001-6K1	376.7	
3-001-6K2	180.5	kräftig rosa, unpolar
3-001-6K3	2400.4	kräftig rosa, unpolar
3-001-6K4	1195.3	kräftig rosa, unpolar
3-001-6K5	89.8	grün fluoreszierend, gelb, rosa
3-001-6K6	35.9	
3-001-6K7	3.6	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-001-6K5-1	1.2	
3-001-6K5-2	5.1	rosa, unpolar, gelb-grün unpolar
3-001-6K5-3	6.1	
3-001-6K5-4	14.6	
3-001-6K5-5	10.6	
3-001-6K5-6	5.8	
3-001-6K5-7	19.9	grün, orange Spots, fluoreszierend
3-001-6K5-8	5.0	rote Substanz, bei 366 nm aktiv
3-001-6K5-9	80.1	grüne Substanz, bei 366 nm aktiv, UV-löschend



3-001-6K5-10	40,7	lila, UV-löschend
--------------	------	-------------------

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-001-6K5-91	0.6	
3-001-6K5-92	0.7	
3-001-6K5-93	0.5	
3-001-6K5-94	1.6	
3-001-6K5-95	11.0	gelb
3-001-6K5-96	14.6	grün
3-001-6K5-97	10.7	rosa

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-001-6K6-1	22.7	grün, schwach rosa, unpolar
3-001-6K6-2	8.1	schwach rosa, unpolar
3-001-6K6-3	2.5	
3-001-6K6-4	1.6	
3-001-6K6-5	1.8	

3-002-6

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K1	1.1	
3-002-6K2	4.9	
3-002-6K3	336.1	
3-002-6K4	4179.4	stark UV-löschend
3-002-6K5	3133.6	stark fluoreszierend, stark UV-löschende Zonen, rosa, gelb, blau, grün
3-002-6K6	539.9	grün, gelb, rosa, orange, stark fluoreszierend, stark UV-löschend
3-002-6K7	289.4	
3-002-6K8	39.8	



3-002-6K9	14.6	
3-002-6K10	9.0	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K5-1	14.8	grün, lila, orange
3-002-6K5-2	22.7	rosa, grün, lila, orange
3-002-6K5-3	16.9	blau, lila, grün
3-002-6K5-4	88.7	
3-002-6K5-5	46.7	Stark UV-löschende Spot
3-002-6K5-6	42.3	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K6-1	1.3	
3-002-6K6-2	53.7	dunkel grün, UV-löschend
3-002-6K6-3	84.7	kräftig rosa
3-002-6K6-4	3.1	
3-002-6K6-Nz	5.3	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K6-21	22.4	grün, stark fluoreszierend, rosa Substanz verloren gegangen
3-002-6K6-22	2.7	
3-002-6K6-23	1.7	
3-002-6K6-24	3.4	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K6-31	12.3	
3-002-6K6-32	13.9	Fettsäuren
3-002-6K6-33	8.1	
3-002-6K6-34	23.2	Fettsäuren
3-002-6K6-35	4.8	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K7-1	0.3	fluoreszierend



3-002-6K7-2	0.4	
3-002-6K7-3	9.0	
3-002-6K7-4	0.9	stark fluoreszierend
3-002-6K7-5	1.2	fluoreszierend, UV-löschend
3-002-6K7-6	9.6	grün-gelb, orange, stark fluoreszierend, UV-löschend

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-002-6K76-Vz	3.0	
3-002-6K76-1	3.1	stark fluoreszierend
3-002-6K76-2	0.2	
3-002-6K76-3	0.2	
3-002-6K76-4	0.3	

3-018-11

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
3-018-11K4-1	1.4	
3-018-11K4-2	1.0	
3-018-11K4-3	13.4	bei 366 nm aktiv, gelb
3-018-11K4-4	8.6	UV-löschender, brauner Spot
3-018-11K4-5	3.8	UV-löschend, grün
3-018-11K4-6	2.6	

*Fraktion	Ausbeute/mg
3-018-11K4-31	0.6
3-018-11K4-32	1.6
3-018-11K4-33	0.7
3-018-11K4-34	0.3
3-018-11K4-35	0.6
3-018-11K4-36	0.2
3-018-11K4-37	0.1
3-018-11K4-38	0.2
3-018-11K4-39	0.9
3-018-11K4-310	0.2



3-018-11K4-311	4.7
3-018-11K4-312	0.1

*präparativ getrennt

*Fraktion	Ausbeute/mg
3-018-11K4-41	0.1
3-018-11K4-42	0.3
3-018-11K4-43	0.6
3-018-11K4-44	0.3
3-018-11K4-45	0.1
3-018-11K4-46	0.1
3-018-11K4-47	0.3
3-018-11K4-48	0.2
3-018-11K4-49	0.5
3-018-11K4-410	0.3
3-018-11K4-411	0.3

*präparativ getrennt

Die HPLC-MS Ergebnisse der TUHH Extrakte

Extrakte	m/z	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
0-024-6XA3 (7.0 mg)	144	stark UV-löschend
	195	
	209	
	209	
	223	
	225	
0-024-6XA5 (10.0 mg)	144	rosa aktiv bei 366 nm, gelb aktiv bei 254 nm
	241	
	276	
0-024-6XM2-2 (0.5 mg) (EI-MS)	154	stark fluoreszierend, stark UV-löschend
0-024-6XM2-3 (2.9 mg) (EI-MS)	127	stark fluoreszierend, stark UV-löschend, rosa



0-024-7XA (45.8 mg)	188	
	217	
	398	
0-024-7XM (127.1 mg)	165	gelb, rot, stark aktiv bei 366 nm
	188	
	217	
0-024-8XA2 (30.7 mg)	270	rosa, blau, UV-löschend
	282/545	
	374	
	479	
0-024-8XA4 (1.6 mg) (EI-MS)	168	rosa, stark aktiv bei 366 nm
0-024-8XA5 (1.6 mg) (EI-MS)	168	stark aktiv bei 366 nm und bei 254 nm, nicht anfärbbar
0-024-8XM (5.4 mg)	242	kräftig rosa
	245	
	270	
	288/597	
	311	
	325	
	339	
0-024-8XM3	173	kräftig rosa
	343	
	386/529	
	479	

Fraktion	Ausbeute/mg	chemische Profilierung (mit Anis anfärbbar)
0-047-3XM1	0.1	
0-047-3XM2	0.2	
0-047-3XM3	0.2	
0-047-3XM4 (ESI-MS m/z = 361, 298)	0.2	zwei stark fluoreszierende Substanzen



0-047-3XM5 (HPLC-MS m/z = 597)	0.4	Rosa, noch zwei stark fluoreszierende Substanzen
0-047-3XM6 (HPLC-MS m/z = 339)	1.2	stark fluoreszierend
0-047-3XM7	0.1	lila
0-047-3XM8	0.1	
0-047-3XM9	0.4	
0-047-3XM10	6.5	
0-047-3XM11	0.1	

