

**Etablierung eines industriellen
Arbeitsablaufs zur Modulierung der
Biosynthese von Sekundärmetaboliten
in Actinobakterien**

Dissertation

im Fachbereich 08 (Biologie und Chemie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Stefanie Krahn

aus Cuxhaven

Gießen

2019

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Gutachter: PD Dr. Jens Glaeser

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Bedeutung von Sekundärmetaboliten für den produzierenden Organismus und Nutzung durch den Menschen	1
1.2 Hoher Bedarf nach neuen Antibiotika	1
1.3 Actinobakterien als Quelle für Sekundärmetabolite	2
1.4 Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese in Actinobakterien	4
1.4.1 Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Nährstoffen, morphologischer Entwicklung und Sekundärmetabolit-Biosynthese.....	4
1.4.2 Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese durch Transkriptions-Regulatoren.....	6
1.4.3 Kleine Moleküle als Signale für die Sekundärmetabolit-Biosynthese	6
1.4.3.1 <i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin als Signalmolekül.....	7
1.4.3.2 Cyclische Nucleotide als Signalmoleküle	10
1.4.3.3 Einfluss von Desferrioxaminen	11
1.4.3.4 Antibiotika und γ -Butyrolactone als Signalmoleküle.....	11
1.5 Einsatz von Signalmolekülen zur Steigerung der Expression von Sekundärmetabolit- Biosyntheseclustern	12
1.6 Charakterisierung von Bakterien einer industriellen Stammsammlung	13
1.6.1 <i>Repetitive sequencing-based</i> PCR (REP-PCR)	14
1.6.2 16S-rDNA-Sequenzierung	15
1.6.3 Analyse von 16S-23S-rDNA <i>internal transcribed spacer</i> Regionen	15
1.6.4 Kombinierte Sequenzierung von 16S-23S-rDNA <i>internal transcribed spacer</i> Regionen und 16S-rDNA-Sequenzen.....	17
2 ZIELSETZUNG	21
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Verwendete Stämme und DNA-Sequenzen	22
3.2 Medien, Kultivierungsbedingungen und verwendete Signalmoleküle	28
3.2.1 Medien.....	28
3.2.2 Kultivierungsbedingungen von Actinobakterien.....	29
3.2.3 Verwendete Signalmoleküle.....	29
3.3 Molekularbiologische Methoden	30
3.3.1 DNA-Isolation.....	30

3.3.2	Amplifikation von 16S-ITS-Regionen	30
3.3.3	BOX-Fingerprints.....	32
3.4	Sequenzierungen und bioinformatische Sequenzauswertung	33
3.4.1	<i>Library</i> -Generierung und Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten	33
3.4.2	Qualitätsfilterung von <i>circular consensus sequences</i> und 16S-ITS-OTU-Erstellung	33
3.4.3	Bioinformatische Analyse von 16S-ITS-OTUs.....	34
3.5	Spotting	35
3.5.1	Spotting (Variante 1).....	35
3.5.2	Spotting (Variante 2).....	35
3.6	Extraktion von Kulturen und Probenvorbereitung für MTT- und BacTiter-Glo™-Tests.....	36
3.6.1	Agarplatten als Ausgangsmaterial	36
3.6.2	Flüssigkulturen als Ausgangsmaterial	37
3.7	Bestimmung antibakterieller Aktivitäten.....	37
3.7.1	Topagar-Screening	38
3.7.2	MTT-Test	38
3.7.3	BacTiter-Glo™-Test	39
3.8	Analytik.....	40
3.8.1	UPLC-HR-MS- und UPLC-HR-MS/MS-Messungen	40
3.8.2	Metabolomanalyse	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Anwendbarkeit der PacBio SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen	43
4.1.1	Qualitätsfilterung der <i>circular consensus sequences</i>	43
4.1.2	Die generierten 16S-ITS-OTUs wiesen eine hohe Sequenzgenauigkeit auf	45
4.1.3	Hinweise auf eine zu geringe Anzahl hochqualitativer Sequenzen pro Probe	48
4.1.4	Stammidentifizierung über 16S-rDNA-Sequenzen	49
4.1.5	Erkennung von Stammduplikaten im Genus <i>Streptomyces</i> anhand von 16S-ITS-Sequenzen	50
4.2	Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert	56
4.2.1	Signalmolekül-induzierte gesteigerte Bioaktivität von sechs Actinobakterien	56
4.2.2	Erhöhte Produktion mehrerer Desferrioxamine bei Wachstum von ST136450 unter GlcNAc-Einfluss	61
4.2.3	Stark ausgeprägte Gram-negative Aktivität von DSM44150 im Topagar-Screening, jedoch fehlende Gram-negative Aktivität im Kulturextrakt.....	74
4.3	Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien	76
4.3.1	Stammauswahl durch BOX-Fingerprints	76
4.3.2	Eine Kultivierung von Actinobakterien unter GlcNAc-Einfluss führte zu einer erhöhten Bioaktivität von 22 Kulturextrakten.....	76

4.3.3	Analyse des Einflusses von GlcNAc auf den Sekundärmetabolismus von FH1286, HAG010024 und HAG010252.....	78
4.3.3.1	Erhöhte Desferrioxamin-B-Produktion durch HAG010024 bei Wachstum unter GlcNAc-Einfluss.....	79
4.3.3.2	Verstärkte Produktion von Viridogrisein I bei Wachstum von FH1286 unter GlcNAc-Einfluss.....	80
4.3.3.3	Verstärkte Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E bei Wachstum von HAG010252 unter GlcNAc-Einfluss.....	84
5	DISKUSSION	93
5.1	Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen	93
5.2	Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert	95
5.3	Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien	99
6	AUSBLICK	105
6.1	Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen	105
6.2	Einsatz von Signalmolekülen zur Steigerung der Produktion von Sekundärmetaboliten in Actinobakterien	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	CXI
8	ANHANG	CXXIII
8.1	Erläuterungen zu 16S-ITS-Sequenzdateien	CXXIII
8.2	Bioinformatische Qualitätsfilterung von PacBio <i>circular consensus sequences</i>	CXXVI
8.2.1	usearch 16S.sh.....	CXXVI
8.2.2	ccsPrimer.py	CXXVII
8.2.3	forward.fa und reverse.fa.....	CXXIX
8.3	UPLC-HR-MS-Analytik zu ST136450	CXXX
8.4	UPLC-HR-MS/(MS)-Analytik zu FH1286, DSM40229 und DSM40149	CXXXIX
8.5	UPLC-HR-MS/(MS)-Analytik zu HAG010252	CXLVIII
8.6	UPLC-HR-MS/(MS)-Analytik zu HAG010024	CLVII
8.7	Bioaktivität von Kulturextrakten der Stämme FH1286, HAG010024 und HAG010252	CLXII
8.8	BOX-Fingerprints	CLXIII
8.9	Strukturen und vorhergesagte MS/MS-Fragmentierungsmuster	CLXVII
9	PROJEKTBEITRÄGE	CLXIX
10	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	CLXX
11	DANKSAGUNG	CLXXI

Zusammenfassung

Der Sekundärmetabolismus dient Mikroorganismen als Adaptionsmechanismus auf sich ändernde Umweltbedingungen. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass viele Sekundärmetabolite im Labor nur in Anwesenheit von bestimmten Signalmolekülen gebildet werden, die zur Nachahmung dieser Umweltbedingungen dienen. Ziel dieser Arbeit war es, einen industriellen Arbeitsablauf zu etablieren, mit dem Modulations-Effekte von Signalmolekülen auf den Sekundärmetabolismus von Actinobakterien detektiert werden können. Basierend auf der Annahme, dass eine taxonomische Diversität auch zu einer chemischen Diversität der produzierten Sekundärmetabolite führt, sollte eine Methode zur gezielten Auswahl bakterieller Stämme aus der Sanofi-Stammsammlung etabliert werden.

Der Genom-Abschnitt, der sich zwischen dem 16S-rRNA-Gen (16S rDNA) und dem 23S-rRNA-Gen befindet, wird als 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Region (ITS) bezeichnet. Anhand eines Pilotprojektes wurde getestet, ob die Sequenzierung von Amplifikaten, die das 16S-rRNA-Gen und die ITS-Region umfassen (16S-ITS-Amplifikate), eine geeignete Methode zur Charakterisierung der bakteriellen Sanofi-Stammsammlung darstellt. Anhand der 16S-ITS-Sequenzen war eine Stammidentifizierung auf Genus-Ebene sowie eine Inter- und Intra-Spezies-Differenzierung von *Streptomyces*-Stämmen mit sehr ähnlichen/identischen 16S-rDNA-Sequenzen möglich. Trotz der erhöhten Aussagekraft der 16S-ITS-Sequenzen gegenüber 16S-rDNA-Sequenzen war die Sequenzabdeckung pro Probe mit dem gewählten Versuchsaufbau zu niedrig, um das Verfahren in dieser Form in einen industriellen Hochdurchsatzprozess einzubinden.

In einem weiteren Projekt wurde ein Kultivierungs- und Screening-Verfahren etabliert, mit dem der Einfluss von 18 Signalmolekülen auf die Bioaktivität von 70 Actinobakterien untersucht wurde. Jeweils drei Stämme hatten bei Anwesenheit der Signalmoleküle *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) bzw. Tetracyclin im Kultivierungsmedium eine erhöhte wachstumshemmende Wirkung auf *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde GlcNAc in einem industriellen Arbeitsablauf eingesetzt, um bioaktive Sekundärmetabolite in Actinobakterien zu identifizieren, deren Produktion positiv durch GlcNAc beeinflusst wird. Unter 200 Stämmen wurden 22 Stämme identifiziert, deren Kulturextrakte unter GlcNAc-Zugabe eine verstärkte antibakterielle Aktivität hatten. Bei jeweils einem Stamm konnte die erhöhte Bioaktivität in Anwesenheit von GlcNAc auf eine gesteigerte Produktion von Oxytetracyclin bzw. Viridogrisein I zurückgeführt werden. Zudem konnte gehäuft eine Induktion von Siderophoren beobachtet werden. Im Falle eines Stammes wurde gezeigt, dass GlcNAc gegenüber Eisen ein untergeordneter Stimulus für die Desferrioxamin- und Oxytetracyclin-Biosynthese darstellt.

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
bc	Barcode
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
CCS	<i>circular consensus sequence</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
c-di-AMP	<i>cyclic diadenosine monophosphate</i>
c-di-GMP	<i>cyclic diguanosine monophosphate</i>
c-GAMP	<i>cyclic guanosine monophosphate adenosine monophosphate</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
cm	Zentimeter
CRP	<i>cyclic AMP receptor protein</i>
CSR	Cluster-situierter Regulator
Da	Dalton
DasR	<i>defect in aerial hyphae and spore formation regulator</i>
Desf-	Desferrioxamin
D-G-Desf-	zweifach glykosyliertes Desferrioxamin
DmdR1	<i>divalent metal-dependent regulatory protein</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DtxR	<i>diphtheria toxin regulatory protein</i>
Δ	Abweichung
EIC	extrahiertes Ionen-Chromatogramm
ERIC	<i>enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
ESI	Elektrospray-Ionisierung
g	Gramm
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GBL	γ-Butyrolacton(e)
GC-Gehalt	prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin in der DNA

G-Desf-	glykosyliertes Desferrioxamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
GlcNAc-6P	<i>N</i> -Acetylglucosamin-6-Phosphat
GlcN-1P	Glucosamin-1-Phosphat
GlcN-6P	Glucosamin-6-Phosphat
Glc	Glucose
h	Stunden
HAC	<i>N</i> -Hydroxy- <i>N</i> -Acetylcadaverin
HR-MS/MS	<i>high resolution tandem mass spectrometry</i>
HSC	<i>N</i> -Hydroxy- <i>N</i> -Succinylcadaverin
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> Region
kb	Kilobasen
L	Liter
M	Molar
m	Meter
m-	Milli-
MH	Müller-Hinton-Medium
min	Minuten
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometrie
Msme	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	<i>microtiter turbidity test</i>
n-	Nano-
n. b.	nicht bestimmt
NRPS	nicht-ribosomale Peptid-Synthetase
OD	optische Dichte
OTU	<i>operational taxonomic unit</i>
PacBio	Pacific Biosciences
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PKS-NRPS	Hybrid-Polyketid-Synthase

ppGpp	Guanosin Tetrphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
Paer	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PTS	Phosphotransferase-System
REP	<i>repetitive extragenic palindromic</i>
REP-PCR	<i>repetitive sequencing-based PCR</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Retentionszeit
S	Svedberg
s	Sekunden
σ	Standardabweichung
Saur	<i>Staphylococcus aureus</i>
SMRT	<i>single-molecule real-time</i>
16S-ITS	Kombination aus 16S rDNA und 16S-23S-rDNA <i>internal transcribed spacer</i> Region
16S rDNA	16S-rRNA-Gen
SMRT	<i>single-molecule real-time</i>
sp./spp.	eine Spezies/mehrere Spezies
tRNA	<i>transfer RNA</i>
U	<i>units</i>
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
v	Variationskoeffizient
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i>
WHO	World Health Organization
w/v	<i>weight per volume</i>
μ -	Mikro-
z. B.	zum Beispiel
ZMV	<i>zero-mode waveguide</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Struktur von <i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin.....	7
Abbildung 2	Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese in <i>S. coelicolor</i>	9
Abbildung 3	Struktur von <i>cyclic adenosine monophosphate</i> (cAMP) und <i>cyclic diguanosine monophosphate</i> (c-di-GMP).....	10
Abbildung 4	Struktur des A-Faktors (ein γ -Butyrolacton).....	11
Abbildung 5	Aufbau eines rRNA-Operons.....	15
Abbildung 6	Sequenzierung von PCR-Amplifikaten mit der PacBio SMRT-Technologie.....	19
Abbildung 7	Übersicht über die Durchführung der Amplifikation von 16S-ITS-Regionen.....	32
Abbildung 8	Übersicht über die Arbeitsschritte von der <i>library</i> -Erstellung bis zur Generierung von 16S-ITS-OTUs.....	34
Abbildung 9	Qualitätsfilterung von <i>circular consensus sequences</i> (CCS)..	45
Abbildung 10	Überprüfung der Übereinstimmung generierter 16S-ITS-OTUs mit Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen.....	47
Abbildung 11	Anzahl <i>circular consensus sequences</i> (CCS) pro Probe.....	49
Abbildung 12	Differenzierung von <i>Streptomyces</i> -Stämmen unterschiedlicher Spezies.....	52
Abbildung 13	Differenzierung von <i>Streptomyces</i> -Stämmen gleicher Spezies.....	54
Abbildung 14	Schema für die Testung des Einflusses von 18 Signalmolekülen auf die anti- <i>P. aeruginosa</i> -Aktivität von 70 Actinobakterien.....	57
Abbildung 15	Einfluss der Signalmoleküle GlcNAc und Tetracyclin auf die Bioaktivität von ausgewählten Actinobakterien.....	60
Abbildung 16	Morphologie von ST136450.....	61
Abbildung 17	Schematische Darstellung: Detaillierte Analyse zweier Stämme, die nur unter Zugabe von GlcNAc eine Wachstumshemmung von <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 verursachten.....	62
Abbildung 18	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 3_M und ST136450 (MeOH)_Bucket 2_M	65

Abbildung 19	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Desferrioxamin B.....	66
Abbildung 20	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 6_M.....	68
Abbildung 21	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Desferrioxamine 547.....	69
Abbildung 22	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 8_M.....	70
Abbildung 23	Metabolomanalyse von ST136450.....	71
Abbildung 24	Gesteigerte Produktion mehrerer Desferrioxamine durch GlcNAc-Zugabe zum Wachstumsmedium von ST136450....	73
Abbildung 25	Ergebnisse des Topagar-Screenings von DSM44150.....	75
Abbildung 26	Effekt von GlcNAc auf die Bioaktivität von Kulturextrakten	78
Abbildung 27	Beeinflussung der Siderophorproduktion von HAG010024 durch GlcNAc.....	80
Abbildung 28	Beeinflussung der Sekundärmetabolit-Produktion von FH1286 durch GlcNAc.....	81
Abbildung 29	Einfluss von GlcNAc und Glucose auf die Griseoviridin- und Viridogrisein-I-Produktion.....	83
Abbildung 30	Einfluss von GlcNAc auf die Oxytetracyclin-Produktion von HAG010252.....	85
Abbildung 31	UPLC-HR-MS/MS-Analyse eines Extraktes von HAG010252 – Identifizierung von Oxytetracyclin und einem putativen Oxytetracyclin-Isomer.....	86
Abbildung 32	Einfluss von GlcNAc, Glucose und Eisen(III)-citrat auf die Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E sowie auf die Produktion eines potentiellen Oxytetracyclin-Isomers.....	91
Abbildung 33	Regulation der Siderophor-Biosynthese in <i>S. coelicolor</i> durch den Regulator DasR.....	103
Abbildung 34	Biosynthese von Desferrioxamin B und E.....	104
Abbildung 35	UPLC-HR-MS-Analyse von Kulturextrakten des Stammes ST136450 – Basispeak-Chromatogramme.....	CXXX
Abbildung 36	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 2_M.....	CXXXI
Abbildung 37	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 3_M.....	CXXXII

Abbildung 38	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 6_M.....	CXXXIII
Abbildung 39	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 7_M.....	CXXXIV
Abbildung 40	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 8_M.....	CXXXV
Abbildung 41	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Desferrioxamin B.....	CXXXVI
Abbildung 42	UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Desferrioxamine 547.....	CXXXVIII
Abbildung 43	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von FH1286-Kulturextrakten – Identifizierung von Viridogrisein I.....	CXXXIX
Abbildung 44	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von FH1286-Kulturextrakten – Identifizierung von Griseoviridin.....	CXL
Abbildung 45	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von DSM40149- Kulturextrakten – Identifizierung von Viridogrisein I.....	CXLI
Abbildung 46	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von DSM40229- Kulturextrakten – Identifizierung von Viridogrisein I.....	CXLII
Abbildung 47	UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von FH1286 (+ GlcNAc) und FH1286 (- GlcNAc).....	CXLIII
Abbildung 48	Detektion von Viridogrisein I und Griseoviridin in Kulturextrakten von FH1286, DSM40149 und DSM40229...	CXLIV
Abbildung 49	UPLC-HR-MS-Analyse von Kulturextrakten des Stammes FH1286 – Basispeak-Chromatogramme.....	CXLVII
Abbildung 50	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010252- Kulturextrakten – Identifizierung von Oxytetracyclin.....	CXLVIII
Abbildung 51	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010252- Kulturextrakten – Identifizierung von Desferrioxamin E.....	CXLIX
Abbildung 52	UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von HAG010252 (+ GlcNAc) und HAG010252 (- GlcNAc).....	CL
Abbildung 53	Einfluss von Eisen(III)-citrat und Glucose auf die Produktion von Desferrioxamin E und Oxytetracyclin in HAG010252.....	CLII
Abbildung 54	Einfluss von GlcNAc und Eisen(III)-citrat auf die Produktion von Desferrioxamin E, Oxytetracyclin und ein potentielles Oxytetracyclin-Isomer in HAG010252.....	CLIV
Abbildung 55	UPLC-HR-MS-Analyse von Kulturextrakten des Stammes HAG010252 – Basispeak-Chromatogramme.....	CLVI

Abbildung 56	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010024-Kulturextrakten – Identifizierung von Desferrioxamin B.....	CLVII
Abbildung 57	UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010024-Kulturextrakten – Identifizierung von Desferrioxamin E.....	CLVIII
Abbildung 58	UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von HAG010024 (+ GlcNAc) und HAG010024 (- GlcNAc) – Desferrioxamin E.....	CLIX
Abbildung 59	UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von HAG010024 (+ GlcNAc) und HAG010024 (- GlcNAc) – Desferrioxamin B.....	CLXI
Abbildung 60	BOX-Fingerprints zur Stammauswahl.....	CLXIII
Abbildung 61	Strukturen und vorhergesagte MS/MS-Fragmente von Desferrioxamin B sowie der Desferrioxamin-A ₁ -Isomere Desferrioxamin A ₁ [001], Desferrioxamin A ₁ [010] und Desferrioxamin A ₁ [100].....	CLXVII
Abbildung 62	Struktur des von Sekurova <i>et al.</i> (2016) beschriebenen Fructosyl-Glykoderivats von Desferrioxamin B.....	CLXVIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Stämme und DNA-Sequenzen für das Projekt „Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen“	22
Tabelle 2	Verwendete Stämme für das Projekt „Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert“	24
Tabelle 3	Verwendete Stämme für das Projekt „Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien“	26
Tabelle 4	Verwendete Referenzstämme für das Projekt „Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien“	28
Tabelle 5	Verwendete Stämme zur Bestimmung antibakterieller Aktivitäten	28
Tabelle 6	Verwendete Signalmoleküle	29
Tabelle 7	Verwendeter Lösungsmittelgradient für UPLC-Messungen	42
Tabelle 8	Ergebnisse des Topagar-Screenings	58
Tabelle 9	Metabolomanalyse von ST136450	72
Tabelle 10	Übersicht über die Ergebnisse des Topagar-Screenings mit DSM44150	75
Tabelle 11	Erläuterungen zu den 16S-ITS-Sequenzdateien, die in dem Projekt „Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen“ generiert wurden	CXXIII
Tabelle 12	Antibakterielle Aktivität von Kulturextrakten der Stämme FH1286, HAG010024 und HAG010252	CLXII

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Sekundärmetaboliten für den produzierenden Organismus und Nutzung durch den Menschen

Sekundärmetabolite sind Naturstoffe, die von Pflanzen, Bakterien und Pilzen produziert werden. Im Gegensatz zu Verbindungen des Primärmetabolismus haben Sekundärmetabolite keine essentielle Funktion für das vegetative Wachstum und die Vermehrung der Organismen. Vielmehr vermitteln sie dem Produzenten nur unter bestimmten Umweltbedingungen einen Überlebensvorteil. Zu den bekannten natürlichen Funktionen bakterieller Sekundärmetabolite zählen unter anderem die Abwehr anderer Organismen (z. B. Pilze, Bakterien, Amöben), die Mobilisierung von Mikro-Nährstoffen und die Wirkung als Signalmoleküle für die Intra- oder Interspezies-Kommunikation (Demain & Fang, 2000; O'Brien & Wright, 2011; Takano, 2006; Xu *et al.*, 2010).

Sekundärmetabolite sind eine wertvolle Ressource für Herbizide, antifungale und antihelminthische Substanzen, Antitumor-Medikamente und Immunsuppressiva (Barka *et al.*, 2016). Einen besonders hohen Stellenwert haben Sekundärmetabolite für den Einsatz als Antibiotika. Die meisten in der Klinik eingesetzten Antibiotika sind Sekundärmetabolite oder semi-synthetische Derivate von Sekundärmetaboliten (de Lima Procópio *et al.*, 2012). Der Begriff „Antibiotika“ ist in der Literatur nicht einheitlich definiert. In dieser Arbeit werden unter dem Begriff „Antibiotika“ kleine Moleküle zusammengefasst, die selektiv das Wachstum von Bakterien inhibieren (Walsh & Wencewicz, 2016).

1.2 Hoher Bedarf nach neuen Antibiotika

Mit der Markteinführung eines Antibiotikums geht immer auch die Verbreitung von Resistenzen einher (Fernández & Hancock, 2012). Ursprünglich sensitive Bakterien können durch DNA-Mutationen oder durch Aufnahme genetischen Materials anderer Bakterien Resistenzen erwerben (van Hoek *et al.*, 2011). Die Verbreitung von Resistenzen ist ein natürliches Phänomen, wird jedoch durch falsche und übermäßige Nutzung von Antibiotika beschleunigt. Bekannte Resistenzmechanismen beruhen auf einem gesteigerten Efflux der Antibiotika, einer reduzierten Permeabilität der Zellhülle, Veränderungen von Targets und enzymatischen Modifikationen der Antibiotika (Anaya-López *et al.*, 2013; Blair *et al.*, 2015;

Fernández & Hancock, 2012; World Health Organization (WHO), 2017). Mittlerweile besteht das Problem, dass einige bakterielle Infektionen nicht mehr mit den verfügbaren Antibiotika therapierbar sind (World Health Organization (WHO), 2017). Immer häufiger müssen Antibiotika eingesetzt werden, die zuvor aufgrund ihrer hohen Toxizität nicht verwendet wurden (z. B. Colistin) (Richter & Hergenrother, 2018).

Die WHO veröffentlichte 2017 eine Liste von Pathogenen, gegen die dringend neue, resistenzbrechende Antibiotika benötigt werden. In die Kategorie „kritische Priorität“ wurden die Gram-negativen Bakterien *Acinetobacter baumannii* (Carbapenem-resistent), *Pseudomonas aeruginosa* (Carbapenem-resistent) und *Enterobacteriaceae* (resistent gegen Carbapeneme und Cephalosporine der 3. Generation) eingeordnet. „Hohe Priorität“ sollte laut WHO unter anderem die Entwicklung von Antibiotika gegen *Enterococcus faecium* (Vancomycin-resistent) und *Staphylococcus aureus* (Vancomycin-resistent, Methicillin-resistent) haben. Herausgestellt wurde auch der dringende Bedarf neuer Antibiotika für die Behandlung von Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3 Actinobakterien als Quelle für Sekundärmetabolite

Antibiotika unterscheiden sich häufig bezüglich zweier physikochemischer Parameter von vielen anderen Medikamenten. Der erste Parameter ist das Molekulargewicht, der zweite die Lipophilie. Die meisten Antibiotika und insbesondere solche mit ausschließlich anti-Gram-positiver Aktivität, haben ein höheres Molekulargewicht (bis zu 2000 Da) als andere Medikamente. Aufgrund der limitierten Porengröße von Porinen, die für den Transport von Antibiotika über die äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien benötigt werden, ist das Molekulargewicht anti-Gram-negativ aktiver Antibiotika meist auf maximal 600 Da begrenzt (O'Shea & Moser, 2008; Richter & Hergenrother, 2018).

Die Polarität von Antibiotika ist durchschnittlich höher als die Polarität anderer Medikamente. Während die Polarität von Antibiotika mit ausschließlich anti-Gram-positiver Aktivität nur leicht erhöht ist, weisen anti-Gram-negativ aktive Antibiotika in den meisten Fällen eine deutlich höhere Polarität auf. Viele synthetische Substanzbibliotheken enthalten vorwiegend Substanzen mit hoher Lipophilie und sind somit nur bedingt für die Suche nach neuen Antibiotika geeignet. Sekundärmetabolite sind als Quelle für Antibiotika insbesondere deshalb interessant, weil sie strukturell divers sind und häufig eine hohe Dichte polarer funktioneller Gruppen aufweisen (O'Shea & Moser, 2008).

Ein großer Teil der bisher bekannten Sekundärmetabolite wurde aus Vertretern des Phylums *Actinobacteria* (Actinobakterien) isoliert. Innerhalb des Phylums *Actinobacteria* sind insbesondere Vertreter der Ordnung *Actinomycetales* für die Sekundärmetabolit-Biosynthese bekannt (Berdy, 2012). Viele der aus Actinobakterien isolierten Sekundärmetabolite sind bioaktiv und somit interessant für Anwendungen in der Medizin und Landwirtschaft. Klinisch eingesetzte Antibiotikaklassen sind unter anderem Aminoglycoside, β -Lactame, Glycopeptide, Tetracycline und Streptogramine (Barka *et al.*, 2016).

Actinobakterien wurden bereits intensiv im Hinblick auf ihren Sekundärmetabolismus untersucht (Baltz, 2007). Trotzdem besteht die gängige Meinung, dass deren Potential, unbekannte Sekundärmetabolite zu produzieren, noch nicht vollumfassend ausgeschöpft ist. Genomanalysen zeigen, dass die Anzahl bioinformatisch vorhergesagter Sekundärmetabolit-Biosynthese-Cluster in vielen Actinobakterien die Anzahl bisher isolierter Sekundärmetabolite deutlich übersteigt (Hertweck, 2009; Nett *et al.*, 2009; Pettit, 2011). Auf Basis bioinformatischer Analysen wurde beispielsweise vorhergesagt, dass die Genome von *Streptomyces avermitilis* ATCC31267 und *Streptomyces griseus* IFO13350 jeweils mehr als 30 Sekundärmetabolit-Biosynthese-Cluster umfassen. Bisher ist jedoch für *S. avermitilis* nur das Produkt von sechszehn und für *S. griseus* das Produkt von neun der bioinformatisch vorhergesagten Sekundärmetabolit-Biosynthese-Cluster bekannt (Ikeda *et al.*, 2013; Nett *et al.*, 2009).

Man geht davon aus, dass die Diskrepanz zwischen der Anzahl bekannter und vorhergesagter Sekundärmetabolite insbesondere damit zu erklären ist, dass die Expression der Biosynthese-Gene nur unter bestimmten Umweltbedingungen aktiviert bzw. verstärkt wird (Ochi & Hosaka, 2013; Scherlach & Hertweck, 2009). Die Herausforderung besteht somit darin, diese Umweltbedingungen zu identifizieren und im Labor nachzustellen.

Erkenntnisse zu Mechanismen der Biosynthese-Regulation bekannter Sekundärmetabolite können Anhaltspunkte dafür sein, welche Kultivierungsbedingungen entscheidend sind, um die Biosynthese bisher unbekannter Sekundärmetabolite anzuregen.

1.4 Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese in Actinobakterien

1.4.1 Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit von Nährstoffen, morphologischer Entwicklung und Sekundärmetabolit-Biosynthese

Viele Vertreter des Phylums *Actinobacteria* durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus, der für den Genus *Streptomyces* am besten untersucht ist. Bei Vorliegen guter Wachstumsbedingungen keimt eine Spore und bildet einen oder zwei Keimschläuche aus, die sich zu Hyphen entwickeln. Die Hyphen wachsen durch *tip extension* und verzweigen zu einem Substrat-Mycel. Verschlechtern sich die Wachstumsbedingungen deutlich, wird das Substrat-Mycel degradiert und die Bestandteile werden zum Aufbau eines Luft-Myceles verwendet (Flärdh & Buttner, 2009; McGregor, 1954; Mendez *et al.*, 1985). Die Hyphen differenzieren zu einer Kette aus Pre-Sporen-Kompartimenten, die schließlich zu Sporen differenzieren (Flärdh & Buttner, 2009; McGregor, 1954).

Auf festem Medium setzt die Sekundärmetabolit-Produktion häufig parallel mit der Bildung von Luft-Mycel ein. Beides kann als Antwort auf eine Nahrungsknappheit angesehen werden (Bibb, 2005). In Flüssigkulturen wird kein Luft-Mycel ausgebildet (Mendez *et al.*, 1985). Die Sekundärmetabolit-Produktion findet hier meist in der stationären Phase statt. (Bibb, 2005).

Ein in Bakterien weit verbreitetes System zur Erkennung und Anpassung an einen Nährstoffmangel ist die *stringent response* Regulation (Atkinson *et al.*, 2011; Cashel & Gallant, 1969). Die *stringent response* Regulation wurde bisher am ausführlichsten in *E. coli* untersucht. Das Auftreten eines Mangels an Nährstoffen (z. B. Aminosäuren, Fettsäuren oder Eisen) initiiert in *E. coli* eine erhöhte Synthese des Nucleotids Guanosin Tetraphosphat (ppGpp) (Cashel & Gallant, 1969; Seyfzadeh *et al.*, 1993; Vinella *et al.*, 2005). Primär wird durch ppGpp die Transkription an die veränderten Umweltbedingungen angepasst (Boutte & Crosson, 2013; Durfee *et al.*, 2008).

In *S. coelicolor* führt eine erhöhte ppGpp-Synthese zu einer erhöhten Transkription von Genen, die im Zusammenhang mit der stationären Phase stehen. Hierzu gehören Gene, die an der Biosynthese der Sekundärmetabolite Actinorhodin und CDA (*calcium dependent antibiotic*) beteiligt sind. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass eine erhöhte ppGpp-Synthese in *S. coelicolor* zu einer verringerten Transkription von solchen Genen führt, die für ein schnelles Wachstum benötigt werden (Hesketh *et al.*, 2007).

Auch in anderen Actinobakterien wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Nährstoffmangels und der Sekundärmetabolit-Biosynthese beschrieben. Die zugrunde liegenden Mechanismen wurden nur selten aufgeklärt. In den meisten Fällen wird die Sekundärmetabolit-Biosynthese reprimiert, wenn eine hohe Konzentration an Phosphat, eine bevorzugte Stickstoffquelle (z. B. Ammonium) oder eine schnell metabolisierbare Kohlenstoffquelle (insbesondere Glucose) vorliegt. Nitrat hat hingegen häufig einen positiven Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese (Masuma *et al.*, 1986; McIntyre *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1984; Sanchez *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2015; Wohlleben *et al.*, 2017). Weiterhin kann auch die Versorgung mit Eisen einen regulatorischen Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese von Actinobakterien ausüben. So wird beispielsweise die Biosynthese von Siderophoren durch die freie Eisenkonzentration im Cytoplasma reguliert (Flores & Martín, 2004). Siderophore sind Eisen-chelatierende Sekundärmetabolite, die dazu beitragen, die Eisenversorgung von Bakterien sicherzustellen. Eisen wird in Bakterien für viele metabolische Prozesse benötigt (z. B. Citratzyklus, Elektronentransportkette) (Messenger & Barclay, 1983). In der Umwelt liegt Eisen häufig in Form von unlöslichen Fe(III)-Oxyhydroxiden vor. Um Fe³⁺ aus den Fe(III)-Oxyhydroxiden aufzunehmen, exkretieren viele Bakterien Siderophore, die Fe³⁺ aus den Fe(III)-Oxyhydroxiden komplexieren können. Die Siderophor-Fe³⁺-Komplexe werden meist in das Cytoplasma aufgenommen. Dort wird das Fe³⁺ zu Fe²⁺ reduziert und ist metabolisch verfügbar (Saha *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2013). Die unregulierte Biosynthese von Siderophoren würde zu einer unkontrollierten Aufnahme von Eisen in das Cytoplasma führen. Da eine hohe cytoplasmatische Eisen-Konzentration zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen kann (Repine *et al.*, 1981), muss die Biosynthese von Siderophoren reguliert werden. In Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt sind Transkriptions-Regulatoren der DtxR-Familie (*diphtheria toxin regulatory protein*) hauptverantwortlich für die Regulation des Eisenhaushalts (Cheng *et al.*, 2018; Flores & Martín, 2004; Tao *et al.*, 1994). Der DtxR-Regulator DmdR1 (*divalent metal-dependent regulatory protein*) reguliert beispielsweise die Biosynthese von Desferrioxamin-Siderophoren in *S. coelicolor*. DmdR1 bindet in Anwesenheit von Fe²⁺ als Repressor an den Promotor des Desferrioxamin-Biosynthese-Clusters und inhibiert damit die Siderophor-Biosynthese bei ausreichender Eisenversorgung (Flores & Martín, 2004; Tunca *et al.*, 2007).

1.4.2 Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese durch Transkriptions-Regulatoren

Auf molekularer Ebene findet die Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese häufig durch Transkriptions-Regulatoren statt. Jene Transkriptions-Regulatoren werden in Cluster-situierte Regulatoren (CSRs) und globale Regulatoren unterteilt. Gene, die für CSRs kodieren, befinden sich innerhalb eines Sekundärmetabolit-Biosynthese-Clusters (Liu *et al.*, 2013). Sind mehrere CSRs in einem Cluster vorhanden, kontrolliert jeder CSR die Transkription eines Teils der Cluster-Gene oder die einzelnen CSRs sind hierarchisch organisiert (van der Heul *et al.*, 2018).

Globale Regulatoren werden durch Gene kodiert, die sich außerhalb von Sekundärmetabolit-Biosynthese-Clustern befinden. Sie haben üblicherweise ein größeres Regulon als CSRs (Scheu *et al.*, 1997). So ist beispielsweise das *cyclic AMP receptor protein* (CRP) in *S. coelicolor* sowohl an der Regulation der Biosynthese mehrerer Sekundärmetabolite als auch an der Regulation der morphologischen Entwicklung beteiligt (Derouaux *et al.*, 2004b; Gao *et al.*, 2012). Globale Regulatoren regulieren oft die Transkription Cluster-situierter Regulatoren, stehen also hierarchisch über CSRs. In einigen Fällen beeinflussen globale Regulatoren auch direkt die Transkription von Sekundärmetabolit-Biosynthese-Genen (van der Heul *et al.*, 2018; van Wezel & McDowall, 2011).

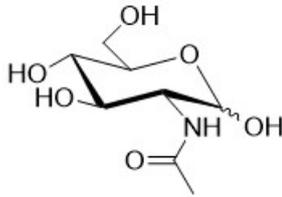
1.4.3 Kleine Moleküle als Signale für die Sekundärmetabolit-Biosynthese

Signalmoleküle, die unter bestimmten Umweltbedingungen von Mikroorganismen gebildet werden, können die Sekundärmetabolit-Biosynthese beeinflussen, indem sie als allosterische Faktoren an Transkriptions-Regulatoren binden, die an der Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese beteiligt sind. Hierdurch wird die Fähigkeit der Regulatoren, DNA zu binden, moduliert. Je nach Regulator resultiert dies in einer gesteigerten oder reprimierten Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Bisher ist jedoch nur für wenige Sekundärmetabolite bekannt, welche Signalmoleküle an der Regulation beteiligt sind (Rigali *et al.*, 2018; van der Heul *et al.*, 2018). Zu den bekannten Signalmolekülen gehören beispielsweise das cyclische Nucleotid *cyclic diguanosine monophosphate* (c-di-GMP) und Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6P), ein Zwischenprodukt des *N*-Acetyl-D-glucosamin-Abbauweges.

Für einige kleine Moleküle (z. B. Desferrioxamin E) wurde ein positiver Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese beschrieben, allerdings ist bisher unklar, auf welchem

Mechanismus die Regulation beruht. Zur Vereinfachung werden auch jene Moleküle in dieser Arbeit als Signalmoleküle bezeichnet.

1.4.3.1 *N*-Acetyl-D-glucosamin als Signalmolekül



N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc)

Abbildung 1: Struktur von *N*-Acetyl-D-glucosamin.

N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) (Abbildung 1) ist ein Baustein der bakteriellen Zellwand und Bestandteil von Chitin, einem Polymer, das im Exoskelett von Krebstieren und Insekten und in der Zellwand von Pilzen vorkommt (Hoell *et al.*, 2010; Osborn, 1969). Streptomyceten können GlcNAc als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen (Swiatek *et al.*, 2012). In Abhängigkeit zum verwendeten

Medium hat GlcNAc einen positiven oder negativen Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese von *S. coelicolor*. In Minimalmedium stimuliert GlcNAc die Produktion von Actinorhodin und Undecylprodigiosin sowie die Sporulation von *S. coelicolor*. Hingegen führt die Zugabe von GlcNAc in nährstoffreiches R2YE-Medium zu einer fehlenden morphologischen Entwicklung und der Unterdrückung der Actinorhodin- und Undecylprodigiosin-Biosynthese (Rigali *et al.*, 2008).

Der positive Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese von *S. coelicolor* bei Wachstum in Minimalmedium steht im Zusammenhang mit der Regulation durch DasR. DasR (*defect in aerial hyphae and spore formation regulator*) ist ein globaler Transkriptionsregulator, der in *S. coelicolor* an der Regulation vieler Sekundärmetabolit-Biosynthesecluster beteiligt ist (Rigali *et al.*, 2008). Zum Regulon von DasR gehören weiterhin Gene, die am Metabolismus und Transport von GlcNAc sowie am Abbau von Chitin beteiligt sind (Colson *et al.*, 2007; Joris *et al.*, 2004). In den meisten Fällen bindet DasR an Promotorregionen mit der Consensus-Bindestelle „*dre*“ (A(G/C)TGGTCTAGACCA(G/C)T). Neben *dre*-Bindestellen erkennt DasR jedoch auch nicht-kanonische Bindestellen (Colson *et al.*, 2007; Rigali *et al.*, 2008; Swiatek-Polatynska *et al.*, 2015).

Kanonische DasR-Bindestellen befinden sich in *S. coelicolor* beispielsweise in der Promotor-Region von *actII-4* und *redZ*. ActII-4 und RedZ sind Cluster-situierte Aktivatoren der Actinorhodin- bzw. Undecylprodigiosin-Biosynthese (Abbildung 2). Ist kein GlcNAc anwesend, bindet DasR an die Promotoren von *actII-4* und *redZ* und reprimiert deren Transkription. Dies hemmt die Actinorhodin- und Undecylprodigiosin-Biosynthese. Die

Situation verändert sich, wenn GlcNAc vorhanden ist. GlcNAc wird in *S. coelicolor* über das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (PTS) in die Zelle aufgenommen und hierbei zu *N*-Acetylglucosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6P) umgewandelt (Abbildung 2). GlcNAc-6P wird im nächsten Schritt deacetyliert und so zu Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6P) umgesetzt. GlcN-6P kann entweder für die Zellwandsynthese genutzt werden oder zu Fructose-6-Phosphat umgesetzt werden und in die Glykolyse einfließen (Świątek *et al.*, 2012). GlcN-6P ist ein allosterischer Faktor von DasR. Bindet GlcN-6P an DasR, führt dies zu einer Aufhebung der Bindung von DasR an die Promotor-DNA. Somit können die Aktivator-Gene *actII-4* und *redZ* transkribiert werden und die Biosynthese von Actinorhodin und Undecylprodigiosin steigt. Eine neuere Studie zeigte, dass neben GlcN-6P auch GlcNAc-6P ein allosterischer Faktor von DasR ist (Tenconi *et al.*, 2015).

Der Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese ist nicht auf *Streptomyces* spp. beschränkt. Ein Effekt durch GlcNAc wurde bereits für einzelne Stämme aus den Gattungen *Saccharopolyspora*, *Rhodococcus* und *Actinokineospora* gezeigt. GlcNAc kann sowohl einen positiven als auch einen negativen Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese haben. Das Spektrum beeinflusster Sekundärmetabolite umfasst Antibiotika, Pigmente und Siderophore (Dashti *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015; Rigali *et al.*, 2008).

Auch wenn die allosterischen Faktoren von DasR (GlcN-6P und GlcNAc-6P) erst durch den Abbau von GlcNAc gebildet werden, wird GlcNAc in dieser Arbeit vereinfachend als Signalmolekül bezeichnet, da es in dieser Form zu Kultivierungsansätzen zugegeben wurde.

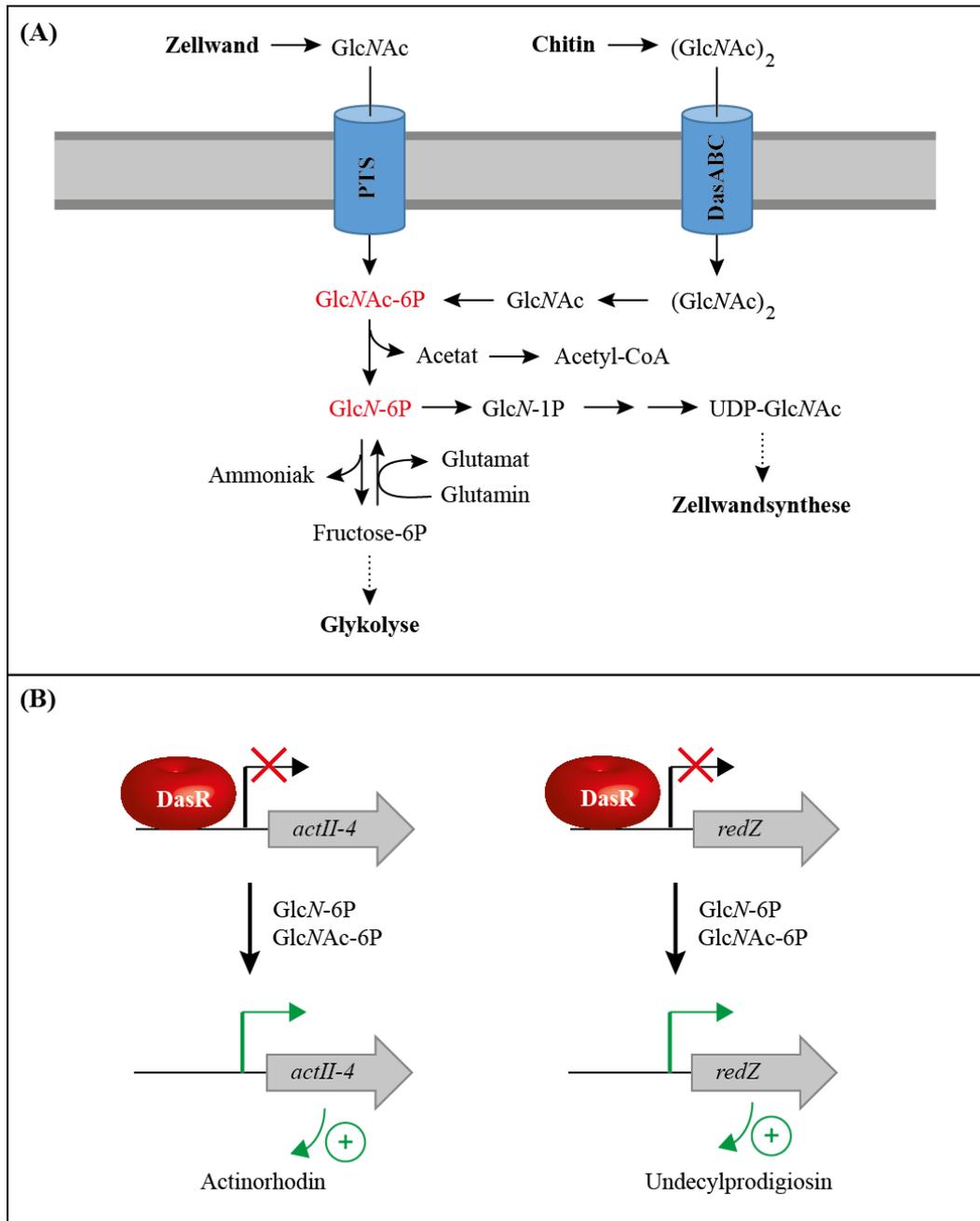


Abbildung 2: Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese in *S. coelicolor*. (A): Abbau von GlcNAc in *S. coelicolor* (nach einem Modell von Świątek *et al.* (2012)). GlcNAc akkumuliert außerhalb der Zellen, wenn Substrat-Mycel autolytisch abgebaut wird, um die Nährstoffe für den Aufbau von Luft-Mycel bereitzustellen (van der Aart *et al.*, 2018). Eine weitere Quelle für GlcNAc ist Chitin. Chitin wird außerhalb der Zelle vorwiegend zum Disaccharid abgebaut und in dieser Form über den ABC-Zuckertransporter DasABC in die Zelle transportiert. Neben DasABC existieren wahrscheinlich weitere (GlcNAc)₂-Transporter (Saito *et al.*, 2008). In der Zelle erfolgt der Abbau von (GlcNAc)₂ zu GlcNAc-6-Phosphat (GlcNAc-6P). Monomeres GlcNAc aus der bakteriellen Zellwand wird über ein Phosphotransferase-System (PTS) in die Zelle transportiert. Das PTS-System koppelt den Transport von GlcNAc über die Zellmembran mit der Phosphorylierung von GlcNAc. Die GlcNAc-6P-Deacetylase NagA katalysiert die Umsetzung von GlcNAc-6P zu Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6P) und Acetat. GlcN-6P kann entweder in die Zellwandsynthese einfließen oder wird durch die GlcN-6P-Deaminase NagB unter Ammoniakbildung zu Fructose-6-Phosphat (Fructose-6P) umgesetzt und geht in die Glykolyse ein (Świątek *et al.*, 2012). GlcN-1P: Glucosamin-1-Phosphat (B): In Abwesenheit von GlcNAc bindet DasR als Repressor an die Promotorregionen von *actII-4* und *redZ* und reprimiert dadurch die Transkription dieser Gene. *actII-4* und *redZ* kodieren für Cluster-situierte Aktivatoren für die Actinorhodin- bzw. Undecylprodigiosin-Biosynthese. Ist GlcNAc vorhanden, wird als Abbau-Zwischenprodukt GlcN-6P gebildet. GlcN-6P ist ein allosterischer Faktor des DasR-Regulators. Durch Bindung von GlcN-6P an DasR wird die DasR-Promotor-Bindung aufgehoben. Die Regulator-Gene *actII-4* und *redZ* können transkribiert werden. Dies führt zu einer gesteigerten Biosynthese von Actinorhodin und Undecylprodigiosin (Rigali *et al.*, 2008). Neuere Studien zeigen, dass neben GlcN-6P auch GlcNAc-6P als allosterischer Faktor des DasR-Regulators fungiert (Tenconi *et al.*, 2015).

1.4.3.2 Cyclische Nucleotide als Signalmoleküle

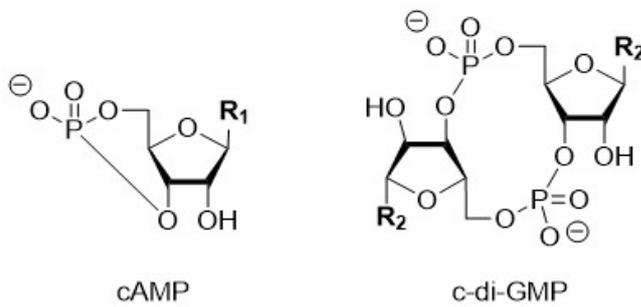


Abbildung 3: Struktur von *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) und *cyclic diguanosine monophosphate* (c-di-GMP). R₁: Adenin; R₂: Guanin. Gezeichnet nach Gomelsky (2011).

Nucleotide im Zellplasma wird durch Enzyme bestimmt, die die Signalmoleküle synthetisieren (Cyclasen) und durch solche, die sie abbauen (Hydrolasen). Signale aus der Umwelt können entweder direkt durch jene Enzyme detektiert werden und deren Aktivität verändern oder die Detektion erfolgt durch spezielle Sensor-Proteine, die das Signal an die Cyclasen und Hydrolasen weitergeben. Liegt ein cyclisches Nucleotid in hoher Konzentration vor, bindet es an mRNA-Elemente, die regulierend auf die Transkription/Translation wirken (*riboswitches*) oder an Rezeptor-Proteine. Die Bindung eines cyclischen Nucleotids an ein Rezeptor-Protein kann zum Beispiel die Aktivität des Proteins verändern (Gründling & Lee, 2016). Cyclische Nucleotide regulieren in Bakterien diverse Prozesse (z. B. Biofilmbildung, Bewegung, Virulenz) (Hengge *et al.*, 2016). Studien deuten darauf hin, dass cyclische Nucleotide in Actinobakterien unter anderem an der Regulation des Sekundärmetabolismus beteiligt sind (Gao *et al.*, 2012).

Das *cyclic AMP receptor protein* (CRP) ist in *S. coelicolor* ein globaler Regulator, der unter anderem die Sporen-Keimung und die Biosynthese von Sekundärmetaboliten reguliert (Derouaux *et al.*, 2004b; Gao *et al.*, 2012). Das cyclische Nucleotid cAMP (Abbildung 3) geht eine Bindung mit CRP ein (Derouaux *et al.*, 2004a) und dient vermutlich zur Aktivierung von CRP (Gao *et al.*, 2012). In *S. coelicolor* befinden sich in acht Sekundärmetabolit-Biosynthese-Clustern CRP-Bindestellen. Häufig aktiviert CRP die Transkription von Cluster-situierten Aktivatoren oder Sekundärmetabolit-Biosynthese-Genen, in wenigen Fällen hat CRP einen reprimierenden Einfluss auf die Transkription von Biosynthese-Genen (Chng *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2017).

Der globale Regulator BldD ist in *S. coelicolor* und *Streptomyces venezuelae* als Regulator der morphologischen Entwicklung bekannt (den Hengst *et al.*, 2010; Elliot *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2017). In *Saccharopolyspora erythraea* reguliert BldD die morphologische Entwicklung und die Biosynthese des Antibiotikums Erythromycin. BldD

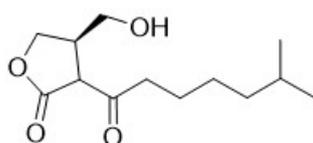
Cyclische Nucleotide sind Signalmoleküle, die in allen Domänen des Lebens verbreitet sind. In Bakterien sind die cyclischen Nucleotide cAMP, cGMP, c-di-AMP, c-di-GMP und c-GAMP (*cyclic* AMP-GMP) bekannt. Die Konzentration der cyclischen

bindet in *S. erythraea* als Transkriptions-Aktivator an fünf Promotoren im Erythromycin-Biosynthese-Cluster und beeinflusst dadurch die Produktion von Erythromycin positiv (Chng *et al.*, 2008). Experimente mit BldD-Homologen aus *S. coelicolor* und *S. venezuelae* zeigen, dass BldD ein Rezeptor-Protein von c-di-GMP ist (Tschowri *et al.*, 2014). Die Wechselwirkung zwischen BldD und c-di-GMP (Abbildung 3) ist notwendig, um eine effektive Bindung von BldD an DNA zu ermöglichen. Die Aminosäuren, die mit c-di-GMP interagieren, sind in BldD-Homologen der Ordnung *Actinomycetales* stark konserviert (Schumacher *et al.*, 2017; Tschowri *et al.*, 2014).

1.4.3.3 Einfluss von Desferrioxaminen

Die Zugabe des Siderophors Desferrioxamin E in das Wachstumsmedium von *Streptomyces tanashiensis* stimuliert das Wachstum und die morphologische Entwicklung von *S. tanashiensis* sowie die Produktion von Substanzen, die wachstumshemmend auf *Bacillus subtilis* wirken. Für Desferrioxamin B wurden dieselben Effekte, jedoch in abgeschwächter Form, detektiert (Yamanaka *et al.*, 2005). Der Mechanismus der Wirkung von Desferrioxamin E/B auf den Sekundärmetabolismus und die morphologische Entwicklung wurde nicht untersucht.

1.4.3.4 Antibiotika und γ -Butyrolactone als Signalmoleküle



A-Faktor

Abbildung 4: Struktur des A-Faktors (ein γ -Butyrolacton). Gezeichnet nach Takano (2006).

γ -Butyrolactone (GBL) sind Signalmoleküle, die in Actinobakterien an der Regulation der Antibiotika-Biosynthese beteiligt sind. In einigen Fällen regulieren sie zusätzlich die morphologische Entwicklung. GBL binden als Liganden an Transkriptions-Regulatoren (meist Repressoren) und inhibieren dadurch deren Bindung an Promotorregionen. Sie wurden bisher hauptsächlich aus *Streptomyces* spp. isoliert, sind jedoch auch in anderen Actinobakterien bekannt (Choi *et al.*, 2003; Takano, 2006). Bisher sind 14 verschiedene GBL im Genus *Streptomyces* beschrieben. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Länge der Fettsäure-Seitenkette und der Stereochemie (Willey & Gaskell, 2011). Spezifische GBL können auch über Spezies-Grenzen hinweg produziert (Zou *et al.*, 2014) und somit theoretisch auch Spezies-übergreifend wahrgenommen werden. Am besten untersucht ist der A-Faktor (Abbildung 4), ein GBL aus *Streptomyces griseus*. Wird der A-Faktor synthetisiert, akkumuliert dieser und

bindet als Ligand an den Transkriptionsregulator ArpA. Dies hebt die Bindung von ArpA an den Promotor von *adpA* auf und ermöglicht die Transkription von *adpA*. AdpA ist ein globaler Transkriptions-Aktivator von Genen, die für den Sekundärmetabolismus und die morphologische Entwicklung benötigt werden. Beispielsweise aktiviert AdpA die Transkription von *strR*, einem Cluster-situierten Aktivatorgen im Streptomycin-Biosynthesecluster (Ohnishi *et al.*, 2005).

In den meisten natürlichen Ökosystemen ist die Antibiotika-Konzentration sehr niedrig (Martinez, 2009). In Streptomycceten gibt es Hinweise, dass Antibiotika in sub-MIC-Konzentrationen als Signalmoleküle für die Sekundärmetabolit-Biosynthese fungieren können. In den Genomen zahlreicher *Streptomyces* spp. wurden Pseudo- γ -Butyrolacton-Rezeptoren identifiziert. Pseudo- γ -Butyrolacton-Rezeptoren sind homolog zu γ -Butyrolacton-Rezeptoren. Sie unterscheiden sich jedoch dahingehend von γ -Butyrolacton-Rezeptoren, dass sie keine γ -Butyrolactone als Liganden binden. Zu den bekannten Liganden von Pseudo- γ -Butyrolacton-Rezeptoren gehören Antibiotika (z. B. Aminoglycoside und Jadomycin B) sowie die Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin (Jianya *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2010).

In *S. coelicolor* wurde beispielsweise der Pseudo- γ -Butyrolacton-Rezeptor ScbR2 identifiziert. ScbR2 reguliert unter anderem die Expression von *redD*. RedD hat eine Funktion als Cluster-situierter Aktivator der Undecylprodigiosin-Biosynthese. Ohne Zugabe des Antibiotikums Jadomycin B bindet ScbR2 an die Promotorregion von *redD*, reprimiert dadurch die Synthese des Aktivators RedD und folglich die Biosynthese von Undecylprodigiosin. Jadomycin B bindet als allosterischer Effektor an ScbR2 und bewirkt damit die Auflösung der repressorischen Bindung von ScbR2 an den *redD*-Promotor. Dies führt zu einer verstärkten Transkription des Aktivators RedD und geht mit einer erhöhten Undecylprodigiosin-Produktion einher (Wang *et al.*, 2014).

1.5 Einsatz von Signalmolekülen zur Steigerung der Expression von Sekundärmetabolit-Biosyntheseclustern

Durch das Bekanntwerden von Signalmolekülen, die an der Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sind, ergeben sich Möglichkeiten für die Modulation der Expression stiller oder schwach exprimierter Gencluster. So kann getestet werden, ob die

Zugabe eines Signalmoleküls zum Kultivierungsmedium zu einer gesteigerten Produktion eines Sekundärmetabolits führt.

Gerade bei bioaktivitätsbasierten Screening-Ansätzen kann eine solche Produktionssteigerung im Idealfall zu der Identifizierung eines bisher unbekanntem bioaktiven Sekundärmetabolits führen. Wird die Expression eines normalerweise nur schwach exprimierten Sekundärmetabolit-Biosynthese-Clusters erhöht, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass das Sekundärmetabolit in ausreichend hoher Konzentration im Kulturextrakt vorliegt, um eine Aktivität im Bioaktivitäts-Test zu verursachen.

Auch eine Steigerung der Produktion bereits bekannter Sekundärmetabolite ist wertvoll, da hiermit ein Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen der Sekundärmetabolit-Biosynthese geleistet wird.

Für viele Signalmoleküle ist bisher jedoch noch unklar, unter welchen Kultivierungsbedingungen die Zugabe des Signalmoleküls zum Medium einen positiven Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Produktion hat. Das Beispiel GlcNAc zeigt, dass die Wirkung eines Signalmoleküls beispielsweise stark medienabhängig sein kann (Rigali *et al.*, 2008). Im Falle aller Signalmoleküle ist bisher weitestgehend unerforscht, wie weit verbreitet deren regulatorischer Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Produktion innerhalb des Phylums *Actinobacteria* ist. Zu klären bleibt auch, wie groß die Vielfalt der durch die Signalmoleküle regulierten Sekundärmetabolite ist.

1.6 Charakterisierung von Bakterien einer industriellen Stammsammlung

Die Sanofi-Stammsammlung umfasst etwa 84.000 Bakterien. Die taxonomische Einordnung der Bakterien erfolgte in der Vergangenheit weitestgehend anhand von morphologischen und/oder biochemischen Kriterien. Aufgrund des bekannten Potentials für die Naturstoffbiosynthese gehört ein großer Anteil der Stammsammlung zum Phylum *Actinobacteria*. Eine Morphologie-basierende Stammcharakterisierung bedarf viel Erfahrung und ermöglicht keine Unterscheidung nah verwandter Stämme (Li *et al.*, 2009). Mittlerweile existieren molekularbiologische Methoden, die eine detaillierte Charakterisierung der Stammsammlung vereinfachen könnten. Der Einsatz molekularbiologischer Methoden könnte beispielsweise die Genus-/Spezies-Zuordnung aller bisher nur grob eingeordneten Bakterien oder die Detektion von Stammduplikaten

ermöglichen. Eine präzise Charakterisierung der Stämme erhöht den Wert einer Stammsammlung, da so eine gezieltere Stammauswahl für Experimente getroffen werden kann. Ist es beispielsweise das Ziel eines Projektes, Sekundärmetabolite zu identifizieren, deren Biosynthese durch das Signalmolekül GlcNAc beeinflusst wird, könnten gezielt Genera für das Projekt ausgewählt werden, in deren Genomen der Regulator DasR konserviert vorliegt. Das Wissen über das Vorhandensein von Stammduplikaten verhindert, dass identische Stämme mehrmals in Experimenten eingesetzt und somit unnötig Ressourcen verbraucht werden.

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Differenzierung von Bakterien. Viele dieser Methoden scheiden jedoch aufgrund ihres hohen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwands für die Charakterisierung einer großen Anzahl an Stämmen aus. Hierzu gehören Methoden wie Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) und *multilocus sequence typing* (MLST) (Li *et al.*, 2009). Methoden, die sich für die Charakterisierung einer größeren Zahl von Bakterien eignen, beruhen heute meist auf der Erstellung von DNA-Mustern oder der Sequenzierung einzelner DNA-Abschnitte.

1.6.1 *Repetitive sequencing-based PCR (REP-PCR)*

Eine Methode, die auf der Detektion von DNA-Mustern beruht, ist *repetitive sequencing-based PCR* (REP-PCR). Bei diesem Verfahren wird das Vorkommen repetitiver DNA-Sequenzen auf dem bakteriellen Genom ausgenutzt. Die in der PCR eingesetzten Primer binden an die repetitiven DNA-Sequenzen und ermöglichen so eine Amplifikation der inter-repetitiven Bereiche. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate können die Bandenmuster für einen Stammvergleich herangezogen werden. Repetitive Elemente, die häufig für die REP-PCR genutzt werden, sind die 35-40 bp *repetitive extragenic palindromic* (REP) Sequenzen, die 124-127 bp *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) Sequenzen und die 154 bp BOX-Elemente (Hulton *et al.*, 1991; Koeuth *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2009; Stern *et al.*, 1984).

REP-PCR wurde unter anderem bereits für die Subspezies-Differenzierung von *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile* und *Bifidobacterium* spp. eingesetzt (Chou & Wang, 2006; Jarocki *et al.*, 2016; Northey *et al.*, 2005). Lanoot *et al.* (2004) nutzten REP-PCR mit BOX-Primern, um Typstämme des Genus *Streptomyces* zu differenzieren. 350 der 473 getesteten Typstämme hatten ein einzigartiges Bandenmuster. Es konnte eine gute Korrelation zwischen den Daten von REP-PCRs- und DNA-DNA-Hybridisierungen gezeigt werden.

REP-PCR ist preiswert, wenig zeitaufwändig und aufgrund der Verwendung spezifischer Primer relativ gut reproduzierbar (Li *et al.*, 2009).

1.6.2 16S-rDNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von 16S-rRNA-Genen (16S rDNA) wird sehr häufig als genetischer Marker für die phylogenetische Analyse und die Identifikation von Prokaryoten verwendet. Gründe hierfür sind unter anderem die ubiquitäre Verbreitung von 16S rRNA in prokaryotischen Ribosomen, die funktionelle Konstanz und die Existenz variabler Gen-Regionen (Janda & Abbott, 2007; Kim & Chun, 2014).

Die Attraktivität der 16S-rDNA-Sequenzierung ist zudem auf die Verfügbarkeit großer Datenbanken mit Vergleichssequenzen zurückzuführen. Datenbanken wie SILVA oder EzTaxon ermöglichen die Nutzung qualitätskontrollierter 16S-rDNA-Vergleichssequenzen (Chun *et al.*, 2007; Glöckner *et al.*, 2017).

16S-rDNA-Sequenzen sind sehr nützlich für die Genus-Zuordnung bakterieller Stämme. Aufgrund der relativ geringen Variation innerhalb der 16S-rDNA-Sequenzen ermöglichen diese Sequenzen nicht in jedem Fall eine Identifizierung auf Spezies-Ebene. Dies trifft beispielsweise auf Stämme der Genera *Streptomyces*, *Vibrio* oder *Bacillus* zu (Hoffmann *et al.*, 2010; Janda & Abbott, 2007; Kämpfer, 2012; Labeda *et al.*, 2012).

1.6.3 Analyse von 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Regionen

Das 16S-rRNA-Gen befindet sich in den meisten Bakterien zusammen mit dem 5S- und dem 23S-rRNA-Gen in einem Operon (Abbildung 5). Die Region zwischen dem 16S-rRNA- und dem 23S-rRNA-Gen, die 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Region, weist oft eine hohe interspezies- und intraspezies-Diversität auf (Garcia-Martinez *et al.*, 1999; Gurtler & Stanisich, 1996). Die 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Region wird im Folgenden als ITS-Region bezeichnet.

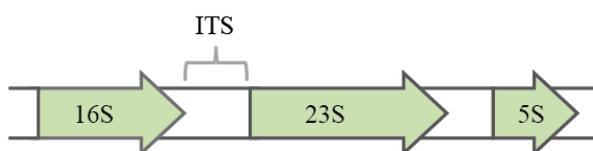


Abbildung 5: Aufbau eines rRNA-Operons. ITS: 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Region; 16S: 16S-rRNA-Gen; 5S: 5S-rRNA-Gen; 23S: 23S-rRNA-Gen.

Die Anzahl an rRNA-Operons in einem Genom und somit auch die Anzahl an ITS-Regionen ist variabel. Es wurde das Vorkommen von 1-15 rRNA-Operons pro Genom beschrieben (Gurtler & Stanisich, 1996; Stewart & Cavanaugh, 2007).

Auch die Größe der ITS-Regionen kann in unterschiedlichen Stämmen und sogar innerhalb eines Genoms variabel sein. In einer Studie, in der die ITS-Regionen von 155 Bakteriengenomen verschiedener Phyla analysiert wurden, lag die durchschnittliche ITS-Länge bei 476 bp, die Interoperon-Variation betrug 1-2201 bp (Stewart & Cavanaugh, 2007). Beispiele für besonders große und kleine ITS-Sequenzen lassen sich in *Lactobacillus salivarius* (13 bp) und *Saccharophagus degradans* (2880 bp) finden (Stewart & Cavanaugh, 2007).

In der ITS-Region befinden sich in vielen Bakterien tRNA-Gene. Die Variation der ITS-Länge lässt sich unter anderem mit dem Vorkommen und dem Typ von tRNA-Genen in dieser Region erklären. Die häufigsten bisher identifizierten tRNA-Gen-Typen sind tRNA-Alanin, tRNA-Isoleucin und tRNA-Glutamat. Einige Studien deuten darauf hin, dass im Phylum *Actinobacteria* keine tRNA-Gene in der ITS-Region vorkommen (Boyer *et al.*, 2001; Stewart & Cavanaugh, 2007).

Die Variabilität hinsichtlich der Anzahl und der Länge der ITS-Regionen kann für die Differenzierung bakterieller Stämme genutzt werden. So kann eine PCR-basierte Amplifizierung und eine nachfolgende fein-elektrophoretische Auftrennung verwendet werden, um die Anzahl und die exakte Länge der ITS-Regionen verschiedener Stämme zu vergleichen. Hoffmann *et al.* (2010) erreichten mit dieser Technik die Interspezies- und Intraspezies-Differenzierung von 69 Stämmen der Gattung *Vibrio*. Hain *et al.* (1997) nutzten die Amplifikation von ITS-Regionen für die Intraspezies-Differenzierung von *Streptomyces albidoflavus*-Stämmen.

Mittels Sequenzierung ist eine Detailanalyse von ITS-Regionen möglich. Leblond-Bourget *et al.* (1996) konnten über einen Vergleich der ITS-Sequenzen eine Interspezies- und Intraspezies-Differenzierung von Stämmen des Genus *Bifidobacterium* zeigen. Hain *et al.* (1997) wiesen darauf hin, dass zwei *S. albidoflavus*-Stämme allein anhand der Amplifikation von ITS-Regionen und der anschließenden fein-elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate nicht unterscheidbar waren. Erst ein Sequenzvergleich der ITS-Regionen beider Stämme ermöglichte eine Unterscheidung der Stämme.

1.6.4 Kombinierte Sequenzierung von 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Regionen und 16S-rDNA-Sequenzen

Die Sequenzierung von 16S rDNA ermöglicht die Identifizierung von Bakterien auf Genus- oder Spezies-Ebene (Janda & Abbott, 2007). ITS-Sequenzen haben häufig eine hohe Interspezies-/Intraspezies-Diversität (Garcia-Martinez *et al.*, 1999) und könnten somit hilfreich sein, um Stammduplikate innerhalb einer Stammsammlung zu erkennen (vgl. Abschnitte 1.6.2 und 1.6.3). Da sich beide Methoden in ihrer Aussagekraft ergänzen, wäre es attraktiv, eine industrielle Stammsammlung durch eine Kombination beider Methoden zu charakterisieren. Denkbar wäre zum Beispiel, die 16S-rDNA-Region und die benachbarte ITS-Region in einem Stück zu amplifizieren und zu sequenzieren.

Wenn 16S-ITS-Regionen (16S rDNA und die benachbarte ITS-Region) sequenziert werden sollen, muss beachtet werden, dass in einem Genom mehrere rRNA-Operons vorliegen können. Während die 16S-rDNA-Regionen verschiedener rRNA-Operons meist nur in geringem Maße voneinander abweichen, wurden bei ITS-Regionen im Durchschnitt stärkere Abweichungen beobachtet (Acinas *et al.*, 2004; Stewart & Cavanaugh, 2007). Da eine Sanger-Sequenzierung ein homogenes *template* erfordert, könnten 16S-ITS-Regionen mit dieser Technologie nur nach vorheriger Klonierung der 16S-ITS-Regionen durchgeführt werden.

Next generation Sequenzierungstechnologien ermöglichen hingegen die parallele Sequenzierung einer großen Anzahl an DNA-Molekülen (Schadt *et al.*, 2010) und könnten somit auch ohne vorherige Klonierung für die Sequenzierung von 16S-ITS-Regionen genutzt werden. Trotzdem erfüllen viele *next generation* Sequenzierungstechnologien aufgrund zu kurzer Leselängen nicht die Voraussetzungen zur Sequenzierung von 16S-ITS-Regionen. Eine *next generation* Sequenzierungstechnologie, die für die Sequenzierung von 16S-ITS-Regionen geeignet sein könnte, ist die Pacific Biosciences (PacBio) *single-molecule real-time* (SMRT)-Technologie. Diese Technologie lässt sich den Sequenzierungstechniken der dritten Generation zuordnen. Es befinden sich zwei verschiedene Systeme auf dem Markt, die auf dem SMRT-Prinzip beruhen: Das PacBio RS-II-System und das neuere PacBio Sequel System (Ardui *et al.*, 2018).

Die Sequenzierungsreaktion findet bei einer PacBio-Sequenzierung in einer SMRT Cell statt. Jede SMRT Cell setzt sich aus 150.000 (RS-II-System) bis 1.000.000 (Sequel-System) Sequenziereinheiten, den *zero-mode waveguides* (ZMWs), zusammen (Ardui *et al.*, 2018). ZMWs sind Hohlräume, die sich in einem 100 nm dünnen Metallfilm befinden und auf einer Glasschicht aufliegen. In jeder ZMW ist (im Optimalfall) ein einziges DNA-Polymerase-

Molekül auf der Glas-Oberfläche immobilisiert und bindet ein DNA-*template*-Molekül. Weiterhin befinden sich in einer ZMW Nucleotide, die mit jeweils einem von vier verschiedenen Fluorophoren markiert wurden (Eid *et al.*, 2009; Levene *et al.*, 2003; Schadt *et al.*, 2010).

Während des Sequenzierungsvorgangs wird die Polymerase von unten mit Laserlicht bestrahlt. Bindet die Polymerase ein passendes Nucleotid, kann für wenige Millisekunden ein Fluoreszenz-Puls detektiert werden. Obwohl sich eine recht hohe Konzentration an Nucleotiden in einer ZMW befindet, ist das Hintergrundrauschen gering. Dies ist damit zu begründen, dass das Laserlicht nur die untersten 30 nm der ZMW erreicht. Der Durchmesser einer ZMW ist zu gering, um die ungehinderte Ausbreitung des Lichts zu ermöglichen. Somit beschränkt sich das Volumen, in dem die Fluoreszenz-markierten Nucleotide detektiert werden, auf 10^{-21} L. Wird ein passendes Nucleotid in den wachsenden DNA-Strang eingebaut, ist die Verweilzeit dieses Nucleotids im Detektionsvolumen deutlich länger als die Verweilzeit eines Nucleotids, das sich zufällig aufgrund von Diffusion im Detektionsbereich befindet. Durch die längere Verweildauer erzielt ein eingebautes Nucleotid eine höhere Fluoreszenzintensität als Nucleotide im Hintergrund. Mit dem Einbau des Nucleotids in den DNA-Strang geht die Abspaltung der Fluorophor-Markierung des Nucleotids einher (Eid *et al.*, 2009; Schadt *et al.*, 2010).

Die SMRT-Technologie hat eine recht hohe Fehlerrate von 13-15 % (Ardui *et al.*, 2018). Trotzdem können aus einer SMRT-Sequenzierung weitaus genauere Ampliconsequenzen abgeleitet werden. Dies liegt daran begründet, dass während der *library*-Erstellung so genannte SMRTbellTM-Strukturen erstellt werden. SMRTbellTM-Strukturen werden durch das Anfügen von *hairpin loops* (Adapter) an beide Enden eines Amplifikats generiert. Hierdurch findet eine Zirkularisierung der DNA statt (Abbildung 6). Aufgrund der Zirkularisierung kann die Polymerase das Molekül während der Sequenzierung mehrmals umrunden und lange *polymerase reads* generieren (Travers *et al.*, 2010). Wenn ein *polymerase read* aus mindestens zwei *subreads* besteht (mindestens zweimal die vollständige Sequenz eines Amplifikatstranges enthält), kann eine *circular consensus sequence* (CCS) aus den *subreads* erstellt werden. Da die Fehler zufällig über die Sequenz verteilt sind, ist die Genauigkeit einer CCS höher als die der einzelnen *subreads* (Ardui *et al.*, 2018; Carneiro *et al.*, 2012; Travers *et al.*, 2010).

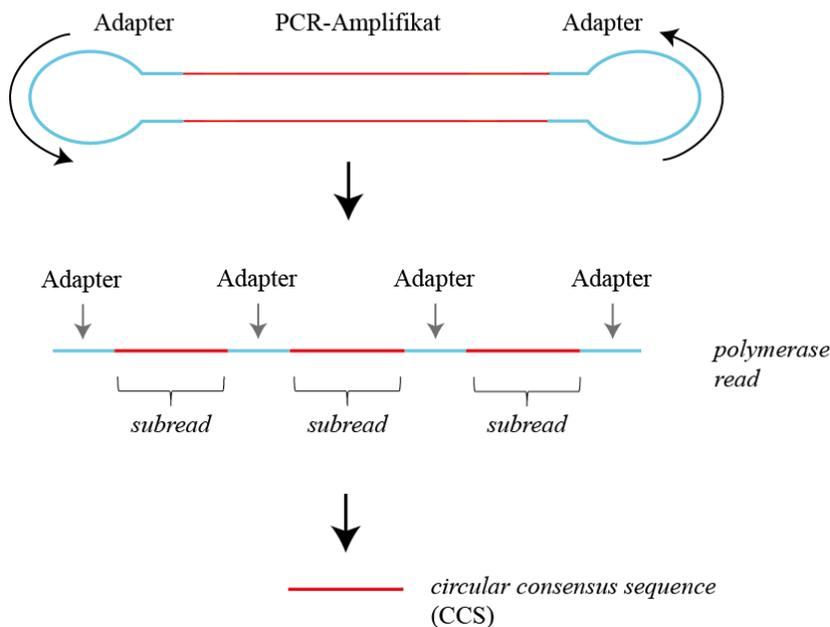


Abbildung 6: Sequenzierung von PCR-Amplifikaten mit der PacBio SMRT-Technologie. Während der *library*-Erstellung werden durch das Anfügen von Adaptersequenzen an die PCR-Amplifikate SMRTbell™-Strukturen erstellt. Hierdurch findet eine Zirkularisierung der DNA statt. Aufgrund der Zirkularisierung kann die Polymerase das Molekül während der Sequenzierung mehrmals umrunden und lange *polymerase reads* generieren (Travers *et al.*, 2010). Wenn ein *polymerase read* aus mindestens zwei *subreads* besteht, kann eine *circular consensus sequence* (CCS) aus den *subreads* erstellt werden.

Mit einem PacBio RS-II-System können derzeit *polymerase reads* mit einer durchschnittlichen Länge von mehr als 10 kb generiert werden (Rhoads & Au, 2015). Die große Leselänge ermöglicht es zum Beispiel, Sequenzen nahezu vollständiger 16S-rDNA-Regionen mit hoher Genauigkeit (99,97 %) zu bestimmen (Schloss *et al.*, 2016). Eine Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten unter Verwendung der PacBio-Technologie wurde gemäß einer Literaturrecherche bisher noch nicht beschrieben.

Im Vergleich zur Sequenzierung von 16S-rDNA-Amplifikaten mit der PacBio-Technologie ergeben sich bei der Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten folgende Herausforderungen: 1.) Aufgrund der zusätzlichen ITS-Region sind die zu sequenzierenden Amplifikate länger. Da die Länge der *polymerase reads* begrenzt ist, sinkt mit zunehmender Amplifikat-Länge die Anzahl an *subreads*, die in einem *polymerase read* enthalten sind. Dies kann sich negativ auf die Genauigkeit der *circular consensus sequences* auswirken. 2.) Bakterien können mehrere ITS-Regionen aufweisen und diese Regionen können in ihrer Sequenz deutlich voneinander abweichen (Gurtler & Stanisich, 1996; Stewart & Cavanaugh, 2007). Die Anzahl an Sequenzen, die in einem Sequenzierungslauf (pro SMRT Cell) generiert werden, ist begrenzt. Daher besteht die Gefahr, dass die Sequenzabdeckung für

16S-ITS-Varianten, die nur in geringer Kopienzahl im Genom vorliegen, nicht ausreichend hoch ist.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen industriellen Arbeitsablauf zur Steigerung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten in Actinobakterien zu etablieren. Die einzelnen Projekte dieser Arbeit adressierten dabei zwei Paradigmen der Naturstoffforschung: A) eine taxonomische Diversität führt auch zu einer chemischen Diversität und B) die Biosynthese von Sekundärmetaboliten erfolgt generell nur unter spezifischen Umweltbedingungen.

Basierend auf der Annahme, dass eine taxonomische Diversität auch zu einer chemischen Diversität der produzierten Sekundärmetabolite führt, ist die Etablierung einer Methode zur gezielten Stammauswahl notwendig. Die Sanofi-Stammsammlung ist eine wertvolle Quelle für Bakterien unterschiedlichster geographischer Herkunft. Mithilfe einer geeigneten Methode zur Stammauswahl kann Redundanz und Diversität innerhalb der Stammsammlung erkannt werden. Dies ermöglicht die gezielte Zusammenstellung von Stammsets für Kultivierungsversuche zur Steigerung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob die Sequenzierung von 16S-ITS-Regionen mit der PacBio SMRT-Technologie den Ansprüchen zur Charakterisierung der bakteriellen Sanofi-Stammsammlung genügt. Kriterien, die betrachtet wurden, waren insbesondere die Sequenzgenauigkeit, das Auflösungsvermögen, aber auch die Kosten-Nutzen-Effizienz.

Das genetische Potential von Actinobakterien, Sekundärmetabolite zu produzieren, übersteigt das bisher im Labor detektierte Potential deutlich. Man geht davon aus, dass diese Diskrepanz insbesondere damit zu erklären ist, dass die Expression der Biosynthese-Gene nur unter bestimmten Umweltbedingungen aktiviert wird. In der Literatur wurden einige Signalmoleküle beschrieben, die die Biosynthese von Sekundärmetaboliten positiv beeinflussen. Durch Bioaktivitäts-Studien wurde in dieser Arbeit getestet, welche der bekannten Signalmoleküle (und funktionell/strukturell verwandte Verbindungen) am häufigsten einen positiven Effekt auf die Bioaktivität ausgewählter Actinobakterien zeigen. Auf Basis der Ergebnisse dieses Projektes wurde ein Projekt unter Verwendung des vielversprechendsten Signalmoleküls durchgeführt. Beispielhaft wurden hervorgerufene Steigerungen von antibakterieller Aktivität in Rohextrakten bis zu den ursächlichen Sekundärmetaboliten verfolgt.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Stämme und DNA-Sequenzen

Tabelle 1: Verwendete Stämme und DNA-Sequenzen für das Projekt „Anwendbarkeit der PacBio SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen“. Stammnr. (intern): Arbeitsgruppen-interne Stammnummer; Stammnr. (extern): Stammnummer in einer öffentlichen Stammsammlung; *accession number* Genom: NCBI *accession number* zu publizierten Genom-Sequenzen, die für Vergleiche verwendet wurden. Stammbezeichnung: entspricht den Angaben der ATCC/DSMZ. Termitennest/Süßwasser: Die Stämme/Stammgemische wurden aus einem Termitennest bzw. Süßwasser isoliert.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung/Herkunft	<i>accession number</i> Genom
-	ATCC29888	<i>Actinosynnema mirum</i>	NC_013093.1
-	DSM40593	<i>Streptomyces fulvissimus</i>	-
-	ATCC14511	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	NZ_CP016279.1
-	DSM40355	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	NZ_CP016438.1
-	DSM40652	<i>Streptomyces albus</i>	-
-	DSM40763	<i>Streptomyces albus</i>	-
-	DSM40072	<i>Streptomyces olivaceus</i>	-
-	ATCC15439	<i>Streptomyces venezuelae</i>	NZ_LN881739
-	DSM40705	<i>Streptomyces fradiae</i>	-
-	ATCC10745	<i>Streptomyces fradiae</i>	-
-	ATCC21401	<i>Streptomyces fradiae</i>	-
-	ATCC31771	<i>Streptomyces antibioticus</i>	-
-	DSM40234	<i>Streptomyces antibioticus</i>	-
-	ATCC10382	<i>Streptomyces antibioticus</i>	-
-	DSM40211	<i>Streptomyces olivoviridis</i>	-
-	DSM40028	<i>Streptomyces achromogenes</i>	-
-	DSM2790	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	-
-	ATCC10762	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	-
-	DSM40233	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	DSM40554	<i>Streptomyces avellaneus</i>	-
-	DSM40017	<i>Streptomyces canus</i>	-
-	ATCC12647	<i>Streptomyces canus</i>	-
-	DSM40002	<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	-
-	ATCC19673	<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	-
-	DSM40665	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	ATCC31649	<i>Streptomyces galilaeus</i>	-
-	ATCC15395	<i>Streptomyces griseus</i>	-
-	DSM40675	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	DSM40679	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	ATCC21705	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	-

Tabelle 1: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung/Herkunft	accession number Genom
-	ATCC27438	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	
-	DSM40683	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	DSM40624	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	ATCC11924	<i>Streptomyces lavendulae</i>	-
-	DSM40681	<i>Streptomyces coelicolor</i>	-
-	ATCC29781	<i>Streptomycesnojiriensis</i>	-
C11_01,04,02_A1	-	Termitennest	-
C11_01,04,02_C3	-	Termitennest	-
C11_10,17,18_A1	-	Termitennest	-
C11_10,17,18_E2	-	Termitennest	-
C11_10,17,18_H6	-	Termitennest	-
B21_01_G7	-	Termitennest	-
B21_01_H10	-	Termitennest	-
B21_01_H3	-	Termitennest	-
B21_01_H5	-	Termitennest	-
B21_14_F5	-	Termitennest	-
B21_14_H10	-	Termitennest	-
B21_14_F11	-	Termitennest	-
B21_13_B2	-	Termitennest	-
B21_13_C2	-	Termitennest	-
B21_13_E2	-	Termitennest	-
B21_13_G2	-	Termitennest	-
B21_13_H2	-	Termitennest	-
B21_13_F4	-	Termitennest	-
B21_13_H5	-	Termitennest	-
B21_15_H10	-	Termitennest	-
B21_15_B10	-	Termitennest	-
B21_13_H6	-	Termitennest	-
B21_15_G1	-	Termitennest	-
B21_15_H3	-	Termitennest	-
B21_15_G4	-	Termitennest	-
B21_15_G9	-	Termitennest	-
MM1_A2	-	Süßwasser	-
MM1_A3	-	Süßwasser	-
MM1_C3	-	Süßwasser	-
MM1_D1	-	Süßwasser	-
MM1_D9	-	Süßwasser	-
MM1_E1	-	Süßwasser	-
MM1_E3	-	Süßwasser	-
MM1_F3	-	Süßwasser	-

Tabelle 1: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung/Herkunft	accession number Genom
MM1_F5	-	Süßwasser	-
MM1_G3	-	Süßwasser	-
-	ATCC27029	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	-
-	DSM10542	<i>Sanguibacter keddieii</i>	-
-	DSM40053	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	-
-	DSM40702	<i>Streptomyces olivaceus</i>	-
-	DSM40481	<i>Streptomyces galilaeus</i>	-

Tabelle 2: Verwendete Stämme für das Projekt „Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert“. Stammnr. (intern): Arbeitsgruppen-interne Stammnummer; Stammnr. (extern): Stammnummer in einer öffentlichen Stammsammlung. Alle Stämme, denen keine externe Stammnummer zugeordnet ist, sind Umweltisolate aus der Sanofi-Stammsammlung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung
HAG011037	-	<i>Actinobacteria</i>
ST154715	-	<i>Actinobacteria</i>
ST100325	-	<i>Actinobacteria</i>
HIL006735	-	<i>Actinobacteria</i>
ST157471	-	<i>Actinobacteria</i>
ST102142	-	<i>Actinobacteria</i>
-	DSM44434	<i>Actinocorallia aurea</i>
ST103217	-	<i>Actinomyces</i> sp.
-	DSM43148	<i>Actinoplanes campanulatus</i>
-	DSM45050	<i>Actinoplanes couchii</i>
FH2535_gelb	-	<i>Actinoplanes derwentensis</i>
-	DSM43939	<i>Actinoplanes durhamensis</i>
ST150479	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST150505	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST102864	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST102467	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST150500	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST101512	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST102818	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST100983	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST100781	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
ST100912	-	<i>Actinoplanes</i> sp.
-	DSM44132	<i>Actinosynnema pretiosum</i>
ST102890	-	<i>Actinosynnema</i> sp.
-	DSM14215	<i>Agrococcus baldri</i>
ST108229	-	<i>Amycolatopsis</i> sp.

Tabelle 2: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung
-	DSM10177	<i>Cellulosimicrobium variabile</i>
-	DSM14442	<i>Citricoccus muralis</i>
-	DSM14013	<i>Curtobacterium herbarum</i>
-	DSM43916	<i>Dactylosporangium roseum</i>
-	DSM43823	<i>Dactylosporangium vinaceum</i>
ST101730	-	<i>Dermatophilus</i> sp.
-	DSM43672	<i>Dietzia maris</i>
-	DSM44961	<i>Dietzia papillomatosis</i>
-	DSM45139	<i>Dietzia schimae</i>
-	DSM14418	<i>Georgenia muralis</i>
-	DSM44150	<i>Kibdelosporangium aridum</i>
-	DSM43858	<i>Kineosporia aurantiaca</i>
-	DSM13884	<i>Kytococcus schroeteri</i>
-	DSM43110	<i>Promicromonospora citrea</i>
-	DSM21481	<i>Promicromonospora flava</i>
ST102100	-	<i>Pseudonocardia</i> sp.
ST104584	-	<i>Saccharomonospora</i> sp.
-	ATCC31497	<i>Saccharothrix australiensis</i>
-	DSM44232	<i>Saccharothrix waywayandensis</i>
FH1294	-	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
-	DSM40262	<i>Streptomyces bottropensis</i>
-	DSM40005	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
FH6179	-	<i>Streptomyces collinus</i>
-	DSM40938	<i>Streptomyces floridae</i>
-	ATCC27439	<i>Streptomyces kashmirensis</i>
FH1614	-	<i>Streptomyces lividans</i>
-	DSM41702	<i>Streptomyces mauvecolor</i>
FH3310	-	<i>Streptomyces michiganensis</i>
HAG004870	-	<i>Streptomyces</i> sp.
FH1875	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST135315	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST136450	-	<i>Streptomyces</i> sp.
FH3535	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST160235	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST102347	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST136834	-	<i>Streptomyces</i> sp.
FH1513	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST136957	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST136659	-	<i>Streptomyces</i> sp.

Tabelle 2: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung
ST102735	-	<i>Streptomyces</i> sp.
ST106056	-	<i>Streptomyces</i> sp.
FH1291	-	<i>Streptomyces venezuelae</i>
-	DSM14246	<i>Subtercola pratensis</i>
-	DSM14184	<i>Tetrasphaera elongata</i>

Tabelle 3: Verwendete Stämme für das Projekt „Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien“. Stammnr. (intern): Arbeitsgruppen-interne Stammnummer; A: Phylum = *Actinobacteria*, Genus unbestimmt; S: Genus = *Streptomyces*. Es handelte sich bei allen Stämmen um Umweltisolate aus der Sanofi-Stammsammlung.

Stammnr. (intern)	Phylum/ Genus	Stammnr. (intern)	Phylum/ Genus	Stammnr. (intern)	Phylum/ Genus
ST161529	A	ST101053	A	FH1426	A
ST100675	A	ST102492	A	FH1387	A
ST100700	A	ST104594	A	ST100538	A
HAG010767	A	ST100678	A	ST100665	A
HAG011167	A	ST106247	A	ST100682	A
HAG010597	A	ST103680	A	ST10069	A
HAG012596	A	FH1497	A	ST100711	A
ST101010	A	FH1429	A	HAG001000	A
HAG004256	A	HAG010035	A	HAG010217	A
HAG010001	A	HAG010036	A	HAG010219	A
HAG010002	A	HAG010037	A	HAG010226	A
HAG010004	A	HAG010038	A	HAG010229	A
HAG010005	A	HAG010039	A	HAG010238	A
HAG010009	A	HAG010042	A	HAG010242	A
HAG010011	A	HAG010045	A	HAG010244	A
HAG010014	A	HAG010046	A	HAG010246	A
HAG010015	A	HAG010047	A	HAG010247	A
HAG010017	A	HAG010091	A	HAG010250	A
HAG010018	A	HAG010098	A	HAG010253	A
HAG010019	A	HAG010101	A	HAG010224	A
HAG010020	A	HAG010123	A	HAG010146	A
HAG010021	A	HAG010124	A	HAG010148	A
HAG010022	A	HAG010141	A	HAG010102	A
HAG010025	A	HAG010142	A	HAG010008	A
HAG010026	A	HAG010144	A	HAG010258	A
HAG010027	A	HAG010153	A	HAG010263	A
HAG010028	A	HAG010155	A	HAG010264	A
HAG010029	A	HAG010157	A	HAG010266	A
HAG010030	A	HAG010165	A	HAG010271	A

Tabelle 3: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Phylum/ Genus	Stammnr. (intern)	Phylum/ Genus	Stammnr. (intern)	Phylum/ Genus
HAG010276	A	HAG010167	A	HAG010273	A
HAG010232	A	HAG010168	A	HAG010324	A
HAG010283	A	HAG010172	A	HAG010325	A
HAG010288	A	HAG010174	A	HAG010326	A
HAG010230	A	HAG010175	A	HAG010327	A
HAG010147	A	HAG010176	A	HAG010330	A
HAG010126	A	HAG010178	A	HAG010331	A
HAG010302	A	HAG010179	A	HAG010332	A
HAG010303	A	HAG010216	A	HAG010334	A
HAG010304	A	HAG010363	A	HAG010336	A
HAG010306	A	HAG010364	A	HAG010337	A
HAG010308	A	HAG010365	A	HAG010338	A
HAG010309	A	HAG010366	A	HAG010341	A
HAG010312	A	HAG010368	A	HAG010342	A
HAG010314	A	HAG010369	A	HAG010343	A
HAG010315	A	HAG010373	A	HAG010344	A
HAG010094	A	HAG010378	A	HAG010346	A
HAG010164	A	HAG010379	A	HAG010348	A
HAG010100	A	HAG010415	A	HAG010349	A
HAG010254	A	HAG010416	A	HAG010350	A
HAG010280	A	HAG010417	A	HAG010351	A
HAG010321	A	HAG010424	A	HAG010352	A
HAG010322	A	HAG010426	A	HAG010353	A
HAG010522	A	HAG010427	A	HAG010354	A
HAG010832	A	HAG010428	A	HAG010355	A
HAG010843	A	HAG010429	A	HAG010356	A
HAG010844	A	HAG010431	A	HAG010357	A
HAG010845	A	HAG010434	A	HAG010358	A
HAG010846	A	HAG010435	A	HAG010359	A
HAG010847	A	HAG010440	A	HAG010360	A
HAG010851	A	HAG010448	A	HAG010362	A
HAG010853	A	HAG010449	A	HAG010459	A
HAG010856	A	HAG010451	A	HAG010460	A
HAG010857	A	HAG010452	A	HAG010463	A
HAG010858	A	HAG010453	A	HAG010464	A
HAG010859	A	HAG010455	A	HAG010503	A
HAG010519	A	HAG010458	A	HAG010016	S
HAG010629	A	HAG010521	A	HAG010848	S
FH1286	S	FH1272	S	HAG010866	S
HAG010024	S	HAG010252	S		

Tabelle 4: Verwendete Referenzstämme für das Projekt „Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien“. Stammnr. (extern): Stammnummer in einer öffentlichen Stammsammlung.

Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung
DSM40149	<i>Streptomyces daghestanicus</i>
DSM40229	<i>Streptomyces griseoviridis</i>

Tabelle 5: Verwendete Stämme zur Bestimmung antibakterieller Aktivitäten.

Stammbezeichnung	Beschreibung	Literatur
<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	Isolat aus einem Hund, TEM-1 β -Lactamase-Produzent	CLSI (2012)
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922 Δ tolC	Mutante des klinischen Isolates ATCC25922; kann anders als ATCC25922 kein TolC (Kanal der äußeren Membran) synthetisieren	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Isolat aus einer Blutkultur	CLSI (2012)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Klinisches Isolat	CLSI (2012)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC607	-	-

3.2 Medien, Kultivierungsbedingungen und verwendete Signalmoleküle

3.2.1 Medien

Folgende Medien wurden für die Kultivierung von Mikroorganismen verwendet:

- ISP2-Medium (Shirling & Gottlieb, 1966)
- Müller-Hinton-Medium II (MH-Medium), *cation adjusted* (BD, #212322)
- M9-Medium (Zusammensetzung: 2 mM MgSO₄ • 7 H₂O; 0,1 mM CaCl₂ • 2 H₂O; 0,4 % (v/v) Glycerin; 1-fach Minimalmedium-Salze (Serva, #48505.01)) (Sambrook *et al.*, 1989)
- Brain-Heart-Infusion-Medium (Becton-Dickinson, #256120), modifiziert durch Zugabe von 1 % (v/v) Tween 80

Zur Verfestigung von Medien wurde Agar eingesetzt. Die Agarkonzentration betrug 0,8 % (w/v) für Topagar und 1 % (w/v) für alle weiteren Anwendungen. Medien wurden durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert. Gegebenenfalls erfolgte nach dem

Autoklavieren die Zugabe von Signalmolekülen (Tabelle 6) in den noch flüssigen Agar bei ~ 60 °C.

3.2.2 Kultivierungsbedingungen von Actinobakterien

Die Kultivierung von Actinobakterien erfolgte bei 28 °C. Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm inkubiert (Infors, RC-406). Wenn nicht anders angegeben, betrug die Inkubationszeit sieben Tage. Flüssigkulturen hatten generell ein Mediumvolumen von 30 mL (in 100 mL Erlenmeyerkolben). Abweichend hiervon betrug das Mediumvolumen der Hauptkulturen für die in Abschnitt 4.3 dargestellten Versuche 50 mL (in 300 mL Erlenmeyerkolben). Wurden hierbei Replikate angefertigt, wurden diese ausgehend von einer gemeinsamen Vorkultur angeimpft.

3.2.3 Verwendete Signalmoleküle

Tabelle 6: Verwendete Signalmoleküle. Angegeben sind die in Abschnitt 4.2 und 4.3 verwendeten Signalmoleküle und die eingesetzten Endkonzentrationen im Medium.

Signalmolekül	Verwendete Konzentrationen	Hersteller, Bestellnummer
Fosfomycin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL	Sigma-Aldrich, #P-5396
Vancomycin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL	Sigma-Aldrich, #V2002
Tetracyclin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL	Acros Organics, #233105000
Rifampicin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL	Sigma-Aldrich, #R3501
Nalidixinsäure	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL	Applichem, #A4928.0005
Kanamycin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL	Sigma-Aldrich, #K1377
Lincomycin	0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 10 µg/mL	Sigma-Aldrich, #62143
Erythromycin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL	Sigma-Aldrich, #E-0774
Penicillin G	0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 10 µg/mL	Fluka, #13752
Bacitracin	0,01 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL	Sigma-Aldrich, #11702
Nisin A	0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 10 µg/mL	Sigma-Aldrich, #N5764
<i>cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP)</i>	0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM	Biolog, #C057-01
<i>cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP)</i>	0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM	Biolog, #C088-01
<i>cyclic guanosine monophosphate (cGMP)</i>	1,3 nM; 13 nM; 260 nM	Sigma-Aldrich, #G6129
<i>cyclic adenosine monophosphate (cAMP)</i>	29,8 nM; 1,49 nM; 14,9 nM	Sigma-Aldrich, #A9501
Desferrioxamin E	0,2 µM; 2 µM; 20 µM	Oskar Tropitzsch, #26605-16-3
Desferrioxamin B	1 µM; 10 µM; 100 µM	ArkPharm, #AK162826
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc)	5 mM; 10 mM; 20 mM	Sigma-Aldrich, #A8625

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA-Isolation

Für die Isolation genomischer DNA wurden Flüssigkulturen der in Tabelle 1 aufgeführten Stämme verwendet. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mechanisch im 96-*well*-Format (Qiagen, #19560) mit 3 mm Tungsten Carbide Beads (Qiagen, #69997) in einem TissueLyserII-System (Qiagen, #85300). Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellaufschluss-Platten zentrifugiert (5 min, 3200 × g). Der Überstand wurde für die DNA-Extraktion eingesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte entweder automatisiert oder manuell. Für die automatisierte Isolation wurde ein QIAxtractor-Roboter (aktualisierte Version, Qiagen) eingesetzt. Hierbei wurde das QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit (Qiagen, #51331) verwendet. Die manuelle DNA-Extraktion erfolgte mit einem DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen, #65982).

3.3.2 Amplifikation von 16S-ITS-Regionen

Da die 16S-ITS-PCR-Amplifikate von 96 verschiedenen Proben in einer SMRT Cell sequenziert werden sollten, mussten die Amplifikate jeder Probe durch einen von 96 Barcodes markiert werden. Für die Generierung von barcodierten 16S-ITS-PCR-Amplifikaten wurde die PacBio *barcoded universal primer* Strategie verwendet (PacBio, 2015). Diese Strategie umfasste die Durchführung zweier konsekutiver PCR-Durchläufe (Abbildung 7). Genomische DNA, die manuell oder automatisiert extrahiert wurde, diente als *template* für die erste PCR-Reaktion (PCR1) (vgl. Abschnitt 3.3.1). Die für PCR1 verwendeten Primer 8F-PCR1-for (GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACAGAGTTTGATCMTGGCTCAG) und 23S-PCR1-rev (TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGTTBCCCCATTTCRG) setzten sich aus einer targetspezifischen Region und einem 5' universellen Sequenzüberhang zusammen. Die targetspezifische Region entsprach der Sequenz von Primer 8F (Lane, 1991) bzw. Primer 23Sr (Fisher & Triplett, 1999).

Die 30 µL PCR1-Ansätze enthielten 1 × Phusion Puffer HF, dNTPs (je 0,2 mM), genomische *template* DNA (~ 1-20 ng), Primer 8F-PCR1-for (0,2 µM), Primer 23S-PCR1-rev (0,2 µM), Phusion Hot Start II DNA Polymerase (0,6 U), BSA (0,71 µM) und Wasser (*ad* 30 µL). Bei der PCR-Negativkontrolle wurde das *template*-Volumen durch Wasser ersetzt. Für PCR1 wurden die folgenden Zyklus-Parameter genutzt: Initiale Denaturierung für 30 s bei 98 °C,

(15 s bei 98 °C, 15 s bei 53 °C, 75 s bei 72 °C) x 25 Zyklen und eine finale Extension von 7 min bei 72 °C. Die amplifizierte DNA aus PCR1 wurde mit einem PureLink® Pro 96 PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, #K310096A) aufgereinigt und anschließend als *template* für die zweite PCR (PCR2) genutzt. Die PCR2-Primer (Barcoded Universal F/R Primer Plate-96, PacBio, #100-466-100) binden an die universellen Sequenzen, die durch PCR1 eingebracht wurden und haben einen 5' Barcode-Sequenz-Überhang.

Die 30 µL PCR2-Ansätze enthielten ~ 1,2 ng aufgereinigtes PCR1-Produkt, einen von 96 barcodierten Primer-Paaren der Barcoded Universal F/R Primer Plate-96 (je 0,2 µM) sowie Phusion Hot Start II DNA Polymerase (0,6 U), BSA (0,71 µM), 1 × Phusion Puffer HF, dNTPs (je 0,2 mM) und Wasser (*ad* 30 µL). Für PCR2 wurden die folgenden Zyklus-Parameter verwendet: Initiale Denaturierung für 30 s bei 98 °C, (15 s bei 98 °C, 15 s bei 64 °C, 75 s bei 72 °C) x 20 Zyklen und eine finale Extension von 7 min bei 72 °C. Nach Quantifizierung der PCR-Produkte durch einen LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (PerkinElmer, #CLS137031) wurden die Proben äquimolar gemischt. In die Berechnung der molaren Probenkonzentrationen wurden alle PCR-Banden im Größenbereich von 1400-4000 bp einbezogen. Die gepoolte Probe wurde mit AMPure PB Beads (Pacific Biosciences, #100-265-900) aufgereinigt. Die aufgereinigte Probe wurde für die *library*-Erstellung (vgl. Abschnitt 3.4.1) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden PCR-Reagenzien von Thermo Fisher Scientific bezogen.

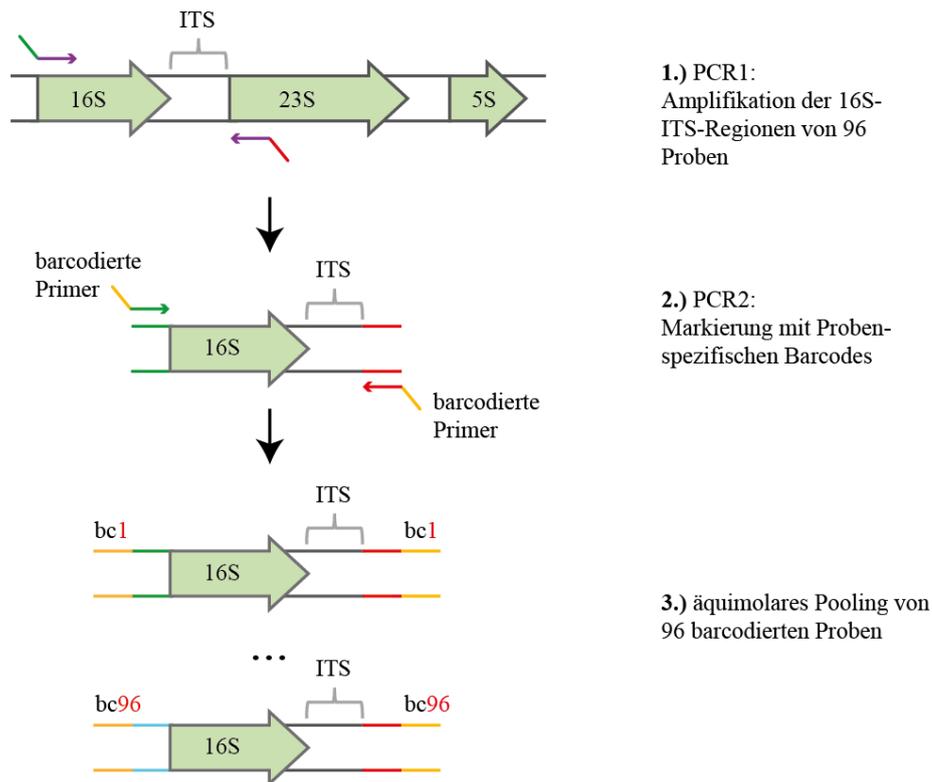


Abbildung 7: Übersicht über die Durchführung der Amplifikation von 16S-ITS-Regionen. Die 16S-ITS-Regionen von 96 verschiedenen Proben wurden in einer ersten PCR (PCR1) amplifiziert. Als *template* für PCR1 diente genomische DNA, die Primer hatten einen nicht bindenden 5' Überhang (Schritt 1). Die aufgereinigten Amplifikate aus PCR1 wurden als *template* für eine zweite PCR (PCR2) eingesetzt. In PCR2 wurden Primer verwendet, die am 5' Ende einen Barcode tragen. Für jede der 96 Proben wurde ein anderer barcodierter Primer eingesetzt (Schritt 2). Die Amplifikate aus PCR2 wurden äquimolar gepoolt (Schritt 3). ITS: 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Region; 16S: 16S-rRNA-Gen; 5S: 5S-rRNA-Gen; 23S: 23S-rRNA-Gen; bc: Barcode.

3.3.3 BOX-Fingerprints

Als *template* für BOX-Fingerprints (vgl. Abschnitt 1.6.1) wurde manuell isolierte genomische DNA verwendet (vgl. Abschnitt 3.3.1). Die 25 μ L PCR-Ansätze enthielten 1 \times Dream Taq Puffer, dNTPs (je 0,2 mM), genomische *template* DNA (~ 1-20 ng), BSA (6,1 μ M), Dream Taq Polymerase (0,6 U), Primer BoxA1R (0,1 μ M) (Versalovic *et al.*, 1995) und Wasser (*ad* 25 μ L). Für die PCR wurden folgende Zyklus-Parameter eingestellt: Initiale Denaturierung für 3 min bei 95 $^{\circ}$ C, (30 s bei 94 $^{\circ}$ C, 1 min bei 53 $^{\circ}$ C, 8 min bei 70 $^{\circ}$ C) \times 30 Zyklen und eine finale Extension von 16 min bei 70 $^{\circ}$ C. Die Größenauftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte mit einem LabChip GX Touch Nucleic Acid Analyzer (PerkinElmer, #CLS137031). Das Clustern von BOX-Fingerprints mehrerer Stämme erfolgte mit dem Programm GelCompar II (Version 6.6.11). Folgende Einstellungen wurden für den Vergleich verwendet: 1.) *similarity coefficient: optimization* = 8 %, *minimum height* = 0 %, *minimum surface* = 0 %, *tolerance* = 5 %, *tolerance change* = 0 %, *ignore uncertain bands, relaxed doublet matching, fuzzy logic, Dice*; 2.) *cluster analysis: UPGMA*.

3.4 Sequenzierungen und bioinformatische Sequenzauswertung

3.4.1 *Library*-Generierung und Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten

Die *library*-Generierung und Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten (Abbildung 8) wurde von GATC (Konstanz) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit einem PacBio RS-II-Sequenzierungssystem unter Verwendung der P6-C4-Chemie.

3.4.2 Qualitätsfilterung von *circular consensus sequences* und 16S-ITS-OTU-Erstellung

Circular consensus sequences (CCS) wurden mit der PacBio SMRT Analysis Software unter Verwendung von Standardeinstellungen erstellt. Ausgehend von den CCS-Sequenzen erfolgte eine bioinformatische Qualitätsfilterung der Daten (Abbildung 8). Die hierzu verwendeten Skripte (`usearch_16S.sh` und `ccsPrimer.py`) wurden von Richard Hall (PacBio) zur Verfügung gestellt (vgl. Abschnitt 8.2) (Hall, 2016; Hall, 2017).

Zur Bestimmung geeigneter Filterbedingungen wurden die Werte zweier Parameter variiert:

- 1.) *expected error* (in `usearch_16S.sh`): getestete Werte: 0,5; 1 und 3
- 2.) *minScore* (in `ccsPrimer.py`): getestete Werte: 80; 75 und 70

Der Parameter „*expected error*“ ist ein Maß für die mindestens zu erwartende Sequenzgenauigkeit (z. B. wird bei einem Wert von 0,5 eine Sequenzgenauigkeit von mindestens 99,5 % erwartet). Der Parameter „*minScore*“ gibt an, wie genau die CCS-Enden mit den verwendeten Primersequenzen übereinstimmen müssen und entspricht dem *alignment score* des Smith-Waterman-Algorithmus (Smith & Waterman, 1981).

CCS mit einer Länge außerhalb des Bereiches von 1401-2599 bp wurden aussortiert. Das Clustern der gefilterten CCS zu *operational taxonomic units* (OTUs) erfolgte unter Verwendung eines Identitäts-Grenzwertes von 99 %.

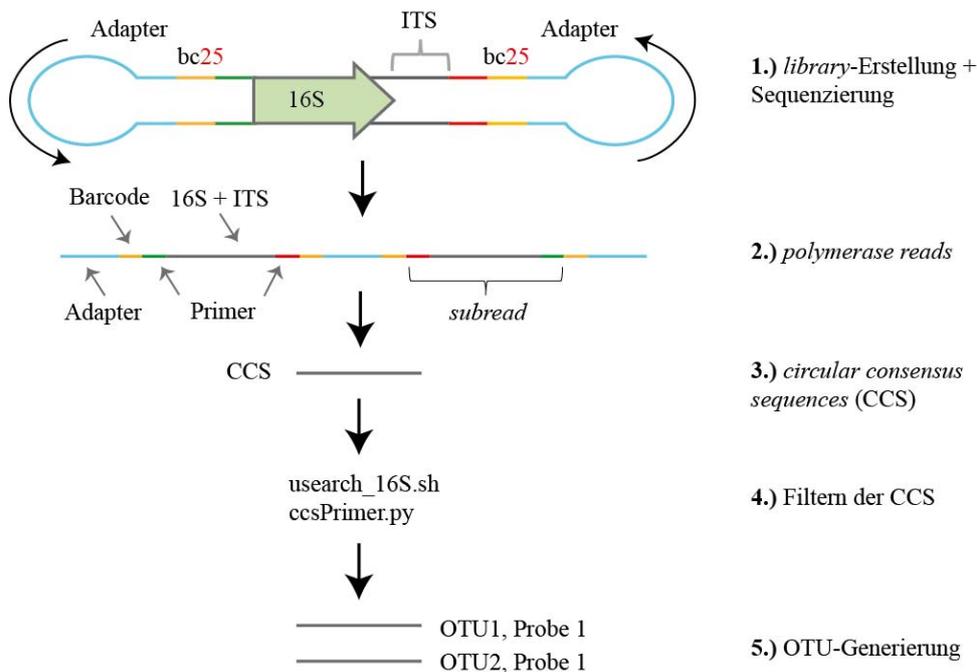


Abbildung 8: Übersicht über die Arbeitsschritte von der *library*-Erstellung bis zur Generierung von 16S-ITS-OTUs. Ausgehend von einem Pool aus barcodierten 16S-ITS-Amplifikaten 96 verschiedener Proben wurde eine *library* erstellt. Bei der *library*-Erstellung wurde durch das Anfügen von Adapter-Sequenzen eine Zirkularisierung der DNA-Moleküle erreicht. Dies ermöglichte während der Sequenzierungsreaktion die mehrfache Umrundung jedes DNA-Moleküls durch die Polymerase (Schritt 1). Aus der Sequenzierung gingen *polymerase reads* hervor, die die Adaptersequenzen und 16S-ITS-Sequenzen enthielten (Schritt 2). Wenn ein *polymerase read* aus mindestens drei *subreads* bestand, wurde aus den *subreads* eine *circular consensus sequence* (CCS) erstellt. Da die Sequenzierungsfehler zufällig über die Sequenz verteilt sind, ist die Genauigkeit einer CCS höher als die der einzelnen *subreads* (Schritt 3). Nach einer bioinformatischen Qualitätsfilterung der Sequenzen unter Verwendung der Skripte `usearch_16S.sh` und `ccsPrimer.py` (Schritt 4) wurden die verbliebenen Sequenzen für die Generierung von 16S-ITS-OTUs eingesetzt (Schritt 5). bc: Barcode; OTU: *operational taxonomic unit*. ITS: 16S-23S-rDNA *internal transcribed spacer* Region; 16S: 16S-rRNA-Gen.

3.4.3 Bioinformatische Analyse von 16S-ITS-OTUs

Zum Vergleich von 16S-ITS-OTUs bzw. 16S-rDNA-Sequenzen unterschiedlicher Kulturen wurden *alignments* in Genious 10.2.4 durchgeführt. Es wurden Genious *alignments* verwendet (*global alignment with free end gaps*; verwendete Einstellungen: *cost matrix: 65 % similarity; gap opening/extension costs: -12/-3*).

Für einige der prozessierten Stämme waren Genom-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken verfügbar. Zum Vergleich generierter 16S-ITS-OTUs mit den 16S-ITS-Sequenzen sequenzierter Genome dieser Stämme wurde in Geneious 10.2.4 ein Megablast durchgeführt (verwendete Einstellungen: *match: +2; mismatch: -2; gap opening/extension costs: linear; word size: 28*).

Um die Anzahl verschiedener 16S-ITS-Varianten pro Genom zu bestimmen, wurden *in silico* alle Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen aus den jeweiligen Genomsequenzen extrahiert. Als Start- und Endpunkt der 16S-ITS-Regionen wurden die Bindestellen der Primer 8F-PCR1-for und 23S-PCR1-rev (vgl. Abschnitt 3.3.2) definiert. Es folgte ein

Vergleich aller 16S-ITS-Regionen eines Genoms durch ein *Genious alignment* in *Genious 10.2.4 (global alignment with free end gaps)*; verwendete Einstellungen: *cost matrix: 65 % similarity; gap opening/extension costs: -12/-3*). Sehr ähnliche oder identische 16S-ITS-Regionen ($\geq 99,3$ % Identität im *alignment*) wurden als eine 16S-ITS-Variante definiert.

Die generierten 16S-ITS-OTUs umfassten nahezu vollständige 16S-rDNA-Sequenzen. Zur Identifizierung der Bakterien auf Genus-Ebene wurden die 16S-rDNA-Sequenzen *in silico* aus den 16S-ITS-OTUs extrahiert. Hierzu wurden die Sequenzabschnitte hinter der Bindestelle von Primer 1492R (Lane, 1991) abgeschnitten. Es folgte ein Abgleich der 16S-rDNA-Sequenzen mit der SILVA_123.1_SSUParc_tax-Datenbank.

3.5 Spotting

Der Begriff „Spotting“ bezeichnet in dieser Arbeit das Auftropfen von Bakterienkulturen auf die Oberfläche von Agarplatten. Es wurden zwei Spotting-Varianten durchgeführt. Diese unterschieden sich hinsichtlich der Größe der verwendeten Agarplatten und des Pipettierroboters, der für das Spotting verwendet wurde. Generell wurde Variante 1 durchgeführt. Zur Anfertigung von *scale-ups* wurde Variante 2 angewandt.

3.5.1 Spotting (Variante 1)

Die Agarplatten im Mikrotiterplattenformat (Fisher Scientific, #264728) enthielten 35 mL ISP2-Agar (1 % (w/v) Agar), der gegebenenfalls mit einem Signalmolekül (Tabelle 6) versetzt worden war. Das Spotting erfolgte ausgehend von Flüssig-Vorkulturen der Stämme (Tabelle 2). Es wurden maximal 24 Spots auf eine Agarplatte aufgebracht. Für das Spotting wurde ein CyBi-Well-Roboter (CyBio) mit 96er-Pipettierkopf und Spitzen mit extra breiter Öffnung (Fisher Scientific, #10394873) verwendet. Das pipettierte Volumen betrug etwa 4 μ L. Aufgrund teilweise inhomogener Kulturen ist das pipettierte Volumen nicht exakt angebar. Nach sieben Tagen Inkubation bei 28 °C wurde ein Topagar-Screening als Bioaktivitäts-Test durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.7.1).

3.5.2 Spotting (Variante 2)

Zur Anfertigung eines *scale-up* wurde ein Stamm mithilfe eines VIAFLO384 (Integra, #6031) mehrmals (14 Spots) auf eine Agarplatte gespottet. Es wurden Petrischalen im

Standard-Format (9,2 cm Durchmesser) verwendet. Die Agarplatten enthielten 25 mL ISP2-Medium, welches mit Agar (1 % (w/v)) verfestigt wurde. Das Medium enthielt gegebenenfalls GlcNAc (20 mM) als Zusatz. Der eingewogene Agar wurde vor dem Autoklavieren dreimal mit Reinstwasser gewaschen, um polare Verunreinigungen des Agars zu entfernen.

Es wurden 4 μ L einer Flüssig-Vorkultur gespottet. Nach sechs Tagen Inkubation des Stammes wurde ein Teil der Agarplatten extrahiert (vgl. Abschnitt 3.6.1). Mit einem weiteren Teil der Platten wurde nach sechs Tagen und zu einem weiteren Zeitpunkt ein Topagar-Screening als Bioaktivitäts-Test durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.7.1).

3.6 Extraktion von Kulturen und Probenvorbereitung für MTT- und BacTiter-Glo™-Tests

3.6.1 Agarplatten als Ausgangsmaterial

Die Extraktion erfolgte ausgehend von Agarplatten, auf die ein Stamm gespottet worden war (vgl. Abschnitt 3.5.2). Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet. Die Methanol-Extraktion umfasste folgende Schritte: **1.)** Am Erntetag (nach 6 Tagen Inkubation des gespotteten Stammes) wurden die Agarplatten mit einem Messer in Stücke ($\sim 2 \text{ cm}^2$) geschnitten und in 250 mL Erlenmeyerkolben überführt. Jeder Erlenmeyerkolben (= 1 Replikat) enthielt Agarstücke von jeweils vier Agarplatten; von jeder Probe wurden fünf Replikate angefertigt; **2.)** Die Agarstücke wurden gefriergetrocknet; **3.)** Zugabe von 80 mL Methanol pro Erlenmeyerkolben; **4.)** Inkubation (schüttelnd, 28 °C, 1 h); **5.)** Filtration des Extraktes über ein 30 μ M Zellsieb (Miltenyi Biotec, #130-098-458) in ein 50 mL Zentrifugationsröhrchen; **6.)** Zentrifugation (10 min, 3200 \times g); **7.)** Überführung von 50 mL Zentrifugationsüberstand in einen Rundkolben; **8.)** Wiederholung von Schritt 3-6; **9.)** Überführung von 65 mL Zentrifugationsüberstand in den Rundkolben aus Schritt 7; **10.)** Verdampfen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer; **11.)** Rücklosen des getrockneten Extraktes in 18 mL Methanol; **12.)** Trocknung in der SpeedVac im 20 mL Glasgefäß.

Die Methanol-Extrakte wurden wie folgt für die Durchführung eines MTT-Tests (vgl. Abschnitt 3.7.2) vorbereitet: Die getrockneten Extrakte wurden in 3 mL Methanol rückgelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe der Extrakte (Extraktvolumen: 16 μ L; 8 μ L; 4 μ L; 2 μ L; 1 μ L; 0,5 μ L; 0,25 μ L; 0,13 μ L) in 96-*well* Mikrotiterplatten angefertigt (Greiner Bio-One, #655201).

3.6.2 Flüssigkulturen als Ausgangsmaterial

Das folgende Extraktionsverfahren wurde ausgehend von 50 mL Flüssigkulturen durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.3, Abschnitt 3.2.2). Die Extraktion umfasste folgende Schritte: **1.)** Die Kulturen wurden im Erlenmeyerkolben gefriergetrocknet; **2.)** Zugabe von 40 mL Methanol pro Erlenmeyerkolben; **3.)** Inkubation (schüttelnd, 28 °C, 2 h); **4.)** Überführung des Extraktes in ein 50 mL Zentrifugationsröhrchen; **5.)** Zentrifugation (15 min, 3220 × g); **6.)** Filtration des Zentrifugationsüberstandes über ein 30 µM Zellsieb (Miltenyi Biotec, #130-098-458) in ein neues 50 mL Zentrifugationsröhrchen; **7.)** Trocknung des Extraktes in einer SpeedVac.

Die Extrakte wurden wie folgt für die Durchführung des MTT- und BacTiter-Glo™-Tests (vgl. Abschnitte 3.7.2 und 3.7.3) vorbereitet: Die getrockneten Extrakte wurden in 1 mL Methanol rückgelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Extrakte in 2 mL Zentrifugationsröhrchen (30 min, 19083 × g). Die Zentrifugationsüberstände wurden in 96-well-Mikrotiterplatten überführt (Thermo Scientific, #AB-0788). Anschließend wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert (10 min, 3220 × g). 150 µL des Zentrifugationsüberstandes wurden in eine neue 96-well-Mikrotiterplatte überführt (Thermo Scientific, #AB-0788). Zur Aufkonzentrierung der Extrakte wurden die 150 µL Aliquots in einer SpeedVac getrocknet und anschließend in 75 µL DMSO rückgelöst. Die Mikrotiterplatten wurden zentrifugiert (10 min, 3220 × g). Der Zentrifugationsüberstand wurde in eine neue Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, #651201) pipettiert. Diese Platte wird als „Assay-Mutterplatte“ bezeichnet.

Drei verschiedene Extraktvolumina (1 µL; 0,5 µL und 0,25 µL) wurden im MTT- bzw. BacTiter-Glo™-Test pro Screeningstamm getestet. Die entsprechenden Volumina wurden mithilfe eines CyBi-Well-Roboters (CyBio) aus der Assay-Mutterplatte in die finalen Screeningplatten pipettiert (Mikrotiterplatten zur Durchführung von MTT-Tests: Greiner Bio-One, #655201; Mikrotiterplatten zur Durchführung von BacTiter-Glo™-Tests: Greiner Bio-One, #655083).

3.7 Bestimmung antibakterieller Aktivitäten

Zur Bestimmung antibakterieller Aktivitäten wurden drei verschiedene Methoden eingesetzt: Topagar-Screening, *microtiter turbidity test* (MTT-Test) und BacTiter-Glo™-Test.

3.7.1 Topagar-Screening

Topagar-Screenings wurden in Anlehnung an Kelner (1948) durchgeführt. Topagar setzte sich aus Medium zusammen, welches mit Agar (0,8 % (w/v)) verfestigt wurde. Für die Versuche in Abschnitt 4.2.1 wurde ISP2-Medium verwendet, für die Versuche in Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3 neben ISP2- auch MH-Medium.

Direkt vor dem Topagar-Screening wurde der flüssige Topagar (45 °C) mit einer Vorkultur eines Screeningstammes beimpft. Die Animpfdichte des Topagars betrug $OD_{600\text{ nm}} = 0,036$. Das Vorkultur-Medium des Screeningstammes war stets MH-Medium.

Mit dem beimpften Topagar wurden Agarplatten überschichtet, auf die zuvor Bakterien gespottet worden waren (vgl. Abschnitt 3.5). Für die Überschichtung von Agarplatten im Mikrotiterplattenformat (vgl. Abschnitt 3.5.1) wurden etwa 20 mL Topagar pro Agarplatte eingesetzt (Abweichungen durch hydrophobe Oberfläche einiger Stämme möglich). Die Überschichtung von Agarplatten im Standard-Format (vgl. Abschnitt 3.5.2) erfolgte generell mit 10 mL pro Agarplatte. Aufgrund der hydrophoben Oberfläche von ST136450 wurden bei diesem Stamm 20 mL Topagar pro Agarplatte benötigt. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde überprüft, ob Hemmhöfe im Topagar sichtbar sind.

3.7.2 MTT-Test

Der *microtiter turbidity test* (MTT) wurde durchgeführt, um die antibakterielle Aktivität von Kulturextrakten und fraktionierten Kulturextrakten gegen Stämme der Spezies *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* zu testen.

Der MTT-Test verlief im 96-*well*- bzw. 384-*well*-Format, wenn Kulturextrakte bzw. fraktionierte Kulturextrakte getestet wurden. Die Belegung der Testplatten mit Extrakten erfolgte wie in Abschnitt 3.6 und Abschnitt 3.8.1 (Fraktionierungen) beschrieben. Auf jede Testplatte wurde als Positivkontrolle eine Gentamycin-Verdünnungsreihe (Endkonzentrationen: 16 µg/mL; 8 µg/mL; 4 µg/mL; 2 µg/mL; 1 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,125 µg/mL) pipettiert.

Zur Vorbereitung der Zellsuspension, die für die Überschichtung der Extrakte eingesetzt wurde, wurde eine Vorkultur des Screeningstammes angeimpft. Generell wurde als Vorkultur-Medium MH-Medium verwendet. Wenn *E. coli* ATCC35218 im MTT-Test in M9-Medium getestet werden sollte, wurde auch die Vorkultur dieses Stammes in M9-Medium angefertigt. Die Vorkulturen wurden bei 180 rpm inkubiert (Infors, #103077). Die Inkubationszeit der Vorkulturen betrug generell etwa 24 h (~ 16 h bei 37 °C, danach 28 °C).

Abweichend hiervon betrug die Inkubationszeit einer Vorkultur von *E. coli* ATCC35218 in M9-Medium etwa 48 h (37 °C).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Vorkultur des Screeningstammes auf eine Zelldichte von McFarland 1 eingestellt. Hiervon ausgehend wurde generell eine 1:15000-Verdünnung in MH-Medium angefertigt. Abweichend hiervon wurde eine 1:600-Verdünnung in M9-Medium vorgenommen, wenn *E. coli* ATCC35218 in M9-Medium getestet wurde.

Von dieser verdünnten Zellsuspension wurden je 100 µL/*well* (96-*well*-Platten) bzw. 20 µL/*well* (384-*well*-Platten) auf die Testplatten verteilt. Dies erfolgte mithilfe eines Multidrop-Dispensers (Thermo Scientific, #5840150) oder eines WellMate-Dispensers (Matrix Technologies). Die Mikrotiterplatten wurden in einem Feuchtrauminkubator (Kühner, ISF-4-W) bei 180 rpm und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % inkubiert. Die Inkubationszeit betrug für *E. coli* ATCC35218 in M9-Medium zwei Tage, alle weiteren Testplatten wurden für 18 h ± 2 h inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte eine Messung der Absorption bei 590 nm mit einem FLUOstar Omega-Mikrotiterplatten-Lesegerät (BMG Labtech). Die prozentuale Inhibition wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times [1 - (\text{AU}_{\text{Probe}} - \text{AU}_{\text{niedrig}}) / (\text{AU}_{\text{hoch}} - \text{AU}_{\text{niedrig}})]$$

AU_{Probe} = Absorptionseinheiten Probe (Medium + Zellen + Extrakt)

AU_{niedrig} (bei 96-*well*-Platten) = Absorptionseinheiten Kontrolle 1 (Medium + Zellen + 16 µg/mL Gentamycin)

AU_{niedrig} (bei 384-*well*-Platten) = Absorptionseinheiten Kontrolle 1 (Medium)

AU_{hoch} = Absorptionseinheiten Kontrolle 2 (Medium + Zellen)

Wenn nicht anders angegeben, wurden *wells* mit einer prozentualen Inhibition von ≥ 80 % als aktiv bewertet.

3.7.3 BacTiter-Glo™-Test

Der BacTiter-Glo™-Test (Promega, #G8233) wurde durchgeführt, um die antibakterielle Aktivität von Kulturextrakten und fraktionierten Kulturextrakten gegen *M. smegmatis* ATCC607 zu bestimmen.

Der BacTiter-Glo™-Test wurde im 96-*well*- bzw. 384-*well*-Format durchgeführt, wenn Kulturextrakte bzw. fraktionierte Kulturextrakte getestet wurden. Die Belegung der

Testplatten mit Extrakten erfolgte wie in Abschnitt 3.6 und Abschnitt 3.8.1 (Fraktionierungen) beschrieben.

Auf jede Testplatte wurde als Positivkontrolle eine Isoniazid-Verdünnungsreihe (Endkonzentrationen: 64 µg/mL; 32 µg/mL; 16 µg/mL; 8 µg/mL; 4 µg/mL; 2 µg/mL; 1 µg/mL; 0,5 µg/mL) pipettiert.

Als vorbereitender Schritt zur Durchführung des Tests wurde eine Vorkultur von *M. smegmatis* ATCC607 in Brain Heart Infusion Medium mit 1 % (v/v) Tween 80 angeimpft. Die Inkubation der Vorkultur erfolgte für 48 h bei 180 rpm und 37 °C (Infors, #103077). Das weitere Vorgehen (Herstellung der Zellsuspension, Überschichtung der Mikrotiterplatten, Inkubation) erfolgte generell wie bei der Durchführung des MTT-Tests (vgl. Abschnitt 3.7.2). Abweichend hiervon wurde zur Testung von *M. smegmatis* ATCC607 eine 1:3000 Verdünnung einer auf McFarland 1 eingestellten Zellsuspension verwendet (in MH-Medium). Die Testplatten wurden für 48 h bei 180 rpm und 37 °C (Infors, #103077) inkubiert.

Anschließend wurde BacTiter-Glo™-Reagenz nach Herstellerangaben angesetzt (Promega, #G8233) und in jedes *well* der Testplatten pipettiert (50 µL bei 96-*well*- bzw. 20 µL bei 384-*well*-Platten). Nach einer Inkubationszeit von 5 min erfolgte eine Messung der Lumineszenzintensität mit einem LUMIstar Omega-Mikrotiterplatten-Lesegerät (BMG Labtech). Die prozentuale Inhibition wurde gemäß folgender Formel bestimmt:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times [1 - (\text{RLU}_{\text{Probe}} - \text{RLU}_{\text{niedrig}}) / (\text{RLU}_{\text{hoch}} - \text{RLU}_{\text{niedrig}})]$$

$\text{RLU}_{\text{Probe}}$ = Relative Lumineszenzeinheiten Probe (Medium + Zellen + Extrakt)

$\text{RLU}_{\text{niedrig}}$ = Relative Lumineszenzeinheiten Kontrolle 1 (Medium)

RLU_{hoch} = Relative Lumineszenzeinheiten Kontrolle 2 (Medium + Zellen)

Wenn nicht anders angegeben, wurden *wells* mit einer prozentualen Inhibition von ≥ 80 % als aktiv bewertet.

3.8 Analytik

3.8.1 UPLC-HR-MS- und UPLC-HR-MS/MS-Messungen

Alle *ultra performance liquid chromatography* (UPLC) Messungen wurden mit einem Agilent 1290 Infinity LC-System durchgeführt. Es wurde die Säule ACQuity UPLC BEH

C18 (1,7 μm ; 2,1 mm x 100 mm) (Waters, #186002352) verwendet. Die Trennung des Injektionsvolumens erfolgte mit einem Gradienten aus (A) Wasser + 0,1 % (v/v) Ameisensäure und (B) Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure (Tabelle 7) bei einer Flussrate von 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einer Säulenofentemperatur von 40 $^{\circ}\text{C}$.

Vor dem Eintreten in das Massenspektrometer maXis II (Bruker Daltonics) wurde der UPLC-Fluss 1:10 gespalten. Elektrospray-Ionisierung (ESI) diente als Ionisierungsmethode. Bei der Durchführung von UPLC-HR-MS/MS-Messungen (HR-MS/MS = *high resolution tandem mass spectrometry*) wurde Stickstoff als Kollisionsgas und eine Kollisionsenergie von 28-35,05 eV eingesetzt. Massenspektren wurden in einem Bereich von m/z 50-2000 aufgenommen.

Zur Durchführung von Fraktionierungen wurden 2 μL bzw. 5 μL Injektionsvolumen in die UPLC injiziert. 1 Volumenanteil wurde in das Massenspektrometer geleitet (HR-MS/MS-Messung), die verbliebenen 9 Volumenanteile wurden mithilfe eines spezialgefertigten μFRACS -Fraktionssammlers (Zinsser Analytics) in 384-*well*-Platten fraktioniert. Pro Injektion wurden 159 Fraktionen gesammelt (Retentionszeitfenster: 0-22 min, $\sim 8,2$ s/Fraktion). Durch einen MTT-Test oder BacTiter-GloTM-Test (Abschnitt 3.7) wurde untersucht, welche der Fraktionen eine antibakterielle Aktivität aufweisen. Die Dereplikation der Verbindungen in den aktiven Fraktionen basierte auf einem Abgleich der UPLC-HR-MS/MS-Daten mit einer hausinternen Reinsubstanz-UPLC-HR-MS/MS-Datenbank.

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die relative Quantifizierung einzelner Sekundärmetabolite in Kultur-Extrakten eines Stammes durch einen Vergleich der integrierten Peakflächen in extrahierten Ionen-Chromatogrammen von UPLC-HR-MS-Messungen (Summe der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ und m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Molekülionenpeak)). War dieses Vorgehen aufgrund des Erreichens der Detektor-Sättigung nicht möglich, erfolgte die relative Quantifizierung auf Basis der Peakflächen in extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität $[\text{M}+1]^+$) oder auf Basis der Peakflächen in UV-Chromatogrammen (Wellenlänge = Absorptionsmaximum der Substanz).

Für die Auswertung von UPLC-HR-MS/(MS)-Rohdaten wurde DataAnalysis (Version 4.4, Bruker Daltonik GmbH) verwendet. Die Vorhersage von Molekülformeln detektierter Substanzen anhand von UPLC-HR-MS-Daten erfolgte mithilfe der SmartFormula-Funktion von DataAnalysis.

Tabelle 7: Verwendeter Lösungsmittelgradient für UPLC-Messungen.

Zeit (min)	Eluent A (%) (Wasser + 0,1 % (v/v) Ameisensäure)	Eluent B (%) (Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure)
0	95	5
0,3	95	5
18,0	4,75	95,25
18,1	0	100
22,5	0	100
22,6	95	5
25,0	95	5

3.8.2 Metabolomanalyse

Die Durchführung von Metabolomanalysen erfolgte ausgehend von den Rohdaten durchgeführter UPLC-HR-MS-Messungen (vgl. Abschnitt 3.8.1). Die Rohdaten wurden unter Verwendung von DataAnalysis (Version 4.4, Bruker Daltonik GmbH) prozessiert. Dies umfasste die Rekalibrierung der Daten und die Erstellung einer *molecular feature list* mithilfe des Find Molecular Features Algorithmus. In der *molecular feature list* wurden alle Ionen, die einer Substanz zugeordnet werden konnten, zusammengefasst (z. B. gewöhnliche Addukte, Isotope, verschiedene Ladungszustände).

Die *molecular feature list* wurde zur Erstellung einer Bucket-Liste eingesetzt. Buckets sind Retentionszeit-Masse/Ladung-Paare, denen eine Signalintensität zugeordnet wird. Die Bucketerstellung (*advanced bucketing*) erfolgte mit ProfileAnalysis (Version 2.3, Bruker Daltonik GmbH). Folgende Parameter wurden verwendet: $\Delta RT = 20$ s, $\Delta m/z = 0,02$ Da, Intensitätsschwellenwert = 1000 *counts per second* und Signal-Rausch-Verhältnis = 10:1. Die Bucket-Liste war Ausgangspunkt für die Durchführung einer *principal component analysis* (PCA) mithilfe des Programms MetaboScape (Version 3.0, Bruker Daltonik GmbH). Bei der PCA wurde keine Skalierung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Anwendbarkeit der PacBio SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen

Um zu überprüfen, ob die Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten mithilfe der PacBio SMRT-Sequenzierungstechnologie eine geeignete Methode zur Charakterisierung einer industriellen bakteriellen Stammsammlung darstellt, wurde ein Pilotprojekt mit 95 Bakterienkulturen durchgeführt. Die ausgewählten Bakterienkulturen setzten sich aus Actinobakterien mit bekannter Identität (DSMZ-/ATCC-Stämme) und Bakterien unbekannter Identität (Umweltisolate) zusammen.

Durch zwei konsekutive PCR-Reaktionen wurden ausgehend von genomischer DNA der Bakterienkulturen 16S-ITS-Amplifikate generiert, die durch einen probenspezifischen Barcode markiert waren. Die 16S-ITS-Amplifikate aller 96 Proben (Amplifikate von 95 Kulturen + 1 PCR-Negativkontrolle) wurden äquimolar gepoolt und für die *library*-Erstellung eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte in einer einzigen PacBio SMRT Cell. *Polymerase reads*, die mindestens drei *subreads* umfassten, wurden zur Erstellung von *circular consensus sequences* (CCS) verwendet. Dies resultierte in einer Gesamtanzahl von 25.465 CCS. Die mittlere CCS-Länge pro Probe lag bei 2167 bp ($\sigma = 100$).

4.1.1 Qualitätsfilterung der *circular consensus sequences*

CCS, die eine geringe Qualität aufwiesen, sollten bioinformatisch durch zwei von PacBio zur Verfügung gestellte Skripte aus dem Datensatz entfernt werden. Die Skripte umfassten folgende sukzessiv durchgeführte Filterschritte:

Filterschritt 1:

Entfernen von Sequenzen mit einer Länge außerhalb von 1401-2599 bp;
Aussortieren von Sequenzen, in denen die verwendeten PCR-Primer nicht mit ausreichender Genauigkeit detektiert wurden.

Filterschritt 2:

Entfernen von Sequenzen mit einem hohen theoretischen Fehler.

Filterschritt 3:

Entfernen von Sequenzen, die nur einmal detektiert wurden.

Sequenzen, die diese Filterkriterien erfüllten, wurden zur Erstellung von *operational taxonomic units* (OTUs) verwendet. Die Filterparameter „minScore“ und „*expected error*“ sind Stellschrauben für die Strenge der Filterbedingungen. Der Parameter „minScore“ (enthalten in Filterschritt 1) ist ein Maß für die Genauigkeit, mit der die verwendeten PCR-Primer in einer Sequenz detektiert werden müssen. Der Parameter „*expected error*“ (enthalten in Filterschritt 2) beschreibt, wie hoch die mindestens zu erwartende Sequenzgenauigkeit ist. Um geeignete Filterbedingungen für die Auswertung des Datensatzes zu definieren, wurde in einem ersten Schritt getestet, welche Parameterwerte einen guten Kompromiss zwischen erwarteter Sequenzqualität und auswertbarer Probenzahl darstellen. Je strenger die Filterbedingungen gewählt werden, desto geringer ist die Gefahr, dass qualitativ schlechte Sequenzen den Filter passieren. Andererseits hat die Wahl strenger Filterbedingungen den Nachteil, dass die Anzahl jener Proben steigt, die aufgrund einer unzureichenden Anzahl sehr hochqualitativer Sequenzen nicht auswertbar sind.

Für den Parameter minScore wurden die Werte 80 (höchste Stringenz), 75 und 70 getestet. Wurde in Filterschritt 1 eine sehr hohe Primerqualität gefordert (minScore = 80), konnten für 31-38 % der Proben (je nach *expected error* in Filterschritt 2) keine OTUs bestimmt werden. Eine Absenkung der geforderten Primerqualität (minScore = 75) führte zu einer deutlichen Abnahme der Proben ohne OTUs auf 7-15 %. Eine weitere Absenkung der geforderten Primerqualität (minScore = 70) erbrachte keine Veränderungen gegenüber minScore = 75 (Abbildung 9). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein minScore von 75 für die Auswertung des Datensatzes ausgewählt.

Eine weitere Absenkung der Probenzahl ohne OTUs wurde erreicht, wenn der Wert für den Parameter *expected error* in Filterschritt 2 bei gleichbleibender Primerqualität (minScore = 75) variiert wurde. Es wurden die Parameterwerte 3, 1 und 0,5 analysiert; dies entspricht einer zu erwartenden Sequenzgenauigkeit von mindestens 97 %, 99 % bzw. 99,5 %.

Bei einem Parameterwert von 0,5 bzw. 1 bzw. 3 betrug der Anteil an Proben ohne OTUs 15 % bzw. 11 % bzw. 7 % der Gesamtprobenzahl (Abbildung 9). Für die weitere Analyse wurde ein *expected error* von 3 festgelegt, was einer vorhergesagten Sequenzgenauigkeit von mindestens 97 % entspricht.

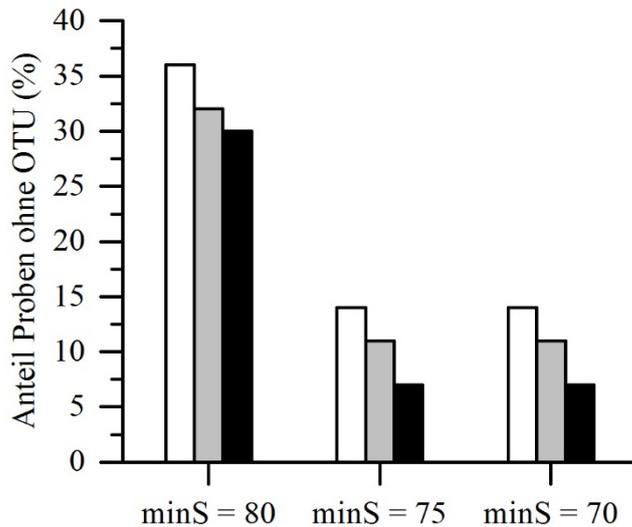


Abbildung 9: Qualitätsfilterung von circular consensus sequences (CCS). Es wurde getestet, wie sich unterschiedliche Werte für die Filterparameter „minScore“ und „expected error“ auf die Anzahl nicht auswertbarer Proben (Proben ohne OTUs) auswirken. Für den Parameter minScore (Filterschritt 1) wurden die Werte 80 (höchste Stringenz), 75 und 70 getestet. Für den Parameter „expected error“ (Filterschritt 2) wurden die Werte 0,5/1/3 analysiert. Die Abbildung zeigt den Anteil an Proben ohne OTUs (%) nach Durchführung beider Filterschritte. weiß/grau/schwarz: expected error = 0,5/1/3. minS: minScore. Es traten deutlich weniger Proben ohne OTUs auf, wenn minScore = 75 statt minScore = 80 verwendet wurde; eine weitere Absenkung auf minScore = 70 führte zu keiner Verbesserung. Die Erhöhung der Werte für den Parameter expected error von 0,5 zu 1 bzw. 3 führte zu einer weiteren Verringerung der Probenzahl ohne OTUs.

4.1.2 Die generierten 16S-ITS-OTUs wiesen eine hohe Sequenzgenauigkeit auf

Unter den sequenzierten Proben befanden sich 16S-ITS-Amplifikate der vier Genomsequenzierten Stämme *Streptomyces griseochromogenes* ATCC14511, *Streptomyces venezuelae* ATCC15439, *Streptomyces lincolnensis* DSM40355 und *Actinosynnema mirum* ATCC29888. Die 16S-ITS-Amplifikate dieser Proben wurden im Triplikate sequenziert.

Anhand eines Abgleichs der Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen mit den 16S-ITS-OTUs sollte eine Abschätzung gemacht werden, ob unter den gewählten Filterbedingungen (minScore = 75 und expected error = 3) 16S-ITS-OTUs generiert wurden, die eine hohe Sequenzgenauigkeit aufweisen und die unterschiedlichen 16S-ITS-Regionen auf dem Genom widerspiegeln.

Die 16S-ITS-OTUs der Genom-sequenzierten Stämme hatten eine durchschnittliche Sequenzlänge von 1918 bp ($\sigma = 15$). Mit einer relativ konstanten Größe des 16S-rRNA-Gens von etwa 1550 bp (Clarridge, 2004) ergibt sich hieraus eine mittlere ITS-Länge von etwa 360 bp. Zur Überprüfung der Sequenzübereinstimmung der 16S-ITS-OTUs mit den Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen wurde ein BLAST durchgeführt, bei dem die Genomsequenzen der Stämme als Datenbank dienten. Die 16S-ITS-OTUs zeigten eine paarweise Identität von 99,8-100 % zu jeweils mindestens einer Genom-annotierten 16S-

ITS-Region (Abbildung 10). Hieraus lässt sich ableiten, dass die 16S-ITS-OTUs unter den gewählten Filterbedingungen eine hohe Sequenzgenauigkeit hatten.

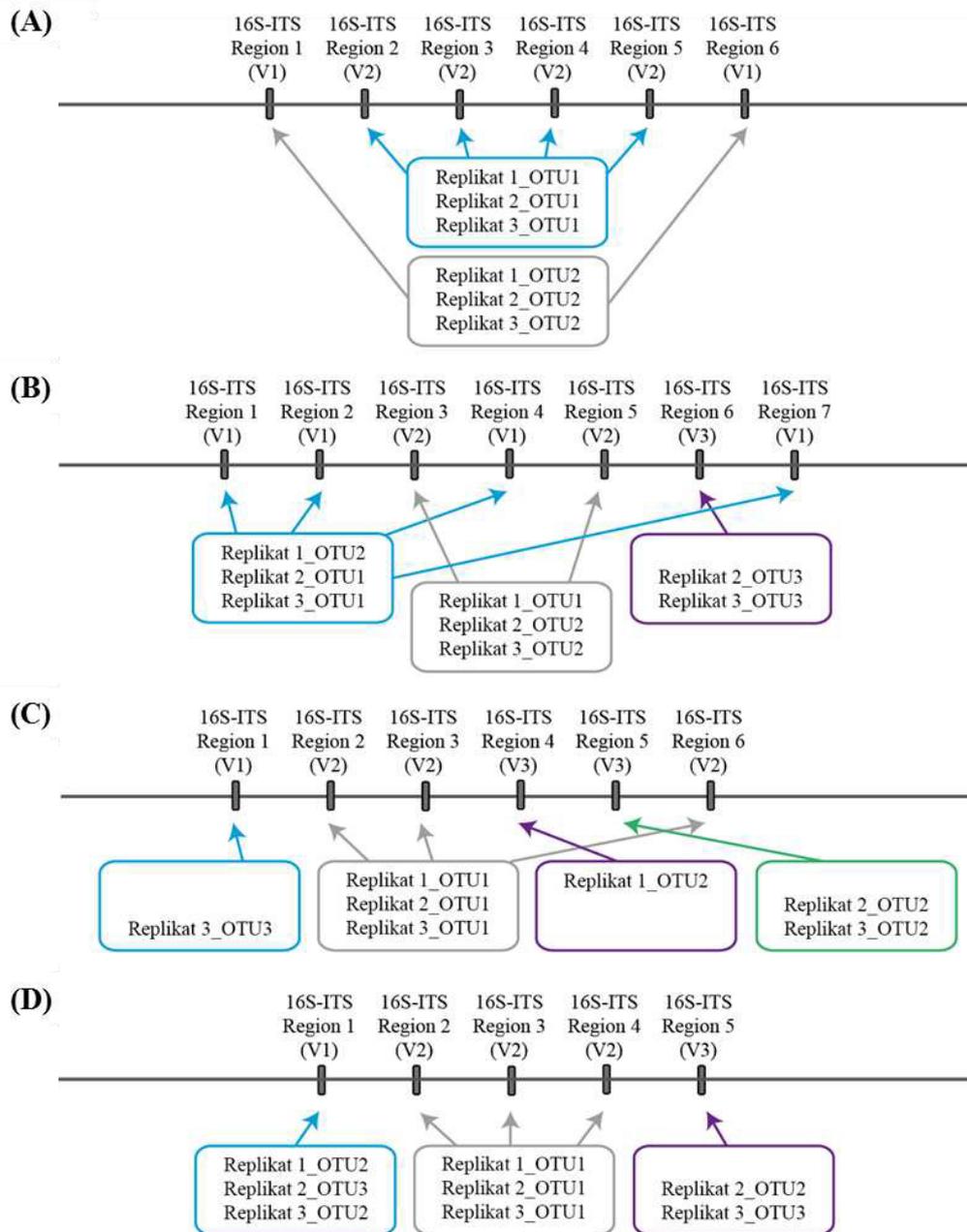


Abbildung 10: Überprüfung der Übereinstimmung generierter 16S-ITS-OTUs mit Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen. Unter den sequenzierten Proben befanden sich 16S-ITS-Amplifikate von vier Genom-sequenzierten Stämmen. Ein Abgleich der PacBio 16S-ITS-OTUs dieser Stämme mit Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen sollte Aufschluss über die Sequenzgenauigkeit der OTUs geben. Hierzu wurden die PacBio 16S-ITS-OTUs durch einen BLAST mit den Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen verglichen. In den Abbildungen (A-D) ist dargestellt, wie viele 16S-ITS-OTUs für die jeweilige Probe generiert wurden (pro Stamm drei Replikate) und ob die OTUs eine hohe Übereinstimmung mit den 16S-ITS-Regionen auf dem jeweiligen Genom zeigten (ein Pfeil kennzeichnet eine paarweise Identität von 99,8-100 %). Beispiel: Im Genom von *A. mirum* (D) sind fünf 16S-ITS-Regionen annotiert (Region 1-5). Aus Replik 2 und 3 der 16S-ITS-Sequenzierung gingen jeweils drei 16S-ITS-OTUs hervor (OTU1-OTU3), aus Replik 1 der Sequenzierung hingegen nur zwei OTUs (OTU1, OTU2). Beispielsweise zeigten OTU2 von Replik 2 sowie OTU3 von Replik 3 im lokalen *alignment* mit dem Genom von *A. mirum* eine paarweise Identität von 99,8-100 % zu 16S-ITS-Region 5. Der Abgleich der 16S-ITS-OTUs erfolgte mit Genomen von *S. griseochromogenes* ATCC14511 (NZ_CP016279.1) (A), *S. venezuelae* ATCC15439 (NZ_LN881739) (B), *S. lincolnensis* DSM40355 (NZ_CP016438.1) (C) und *A. mirum* ATCC29888 (NC_013093.1) (D). Alle 16S-ITS-OTUs hatten zu mindestens einer 16S-ITS-Region eine paarweise Identität von 99,8-100 %. Bei (B), (C) und (D) traten Abweichungen unter den Replikaten hinsichtlich der Anzahl an OTUs auf. Nicht alle in einem Genom annotierten 16S-ITS-Regionen unterschieden sich deutlich in ihrer Sequenz. Sehr ähnliche oder identische 16S-ITS-Regionen ($\geq 99,3$ % Identität im multiplen *alignment*) wurden als eine 16S-ITS-Variante (V1/V2/V3 = Variante 1/Variante 2/Variante 3) definiert.

4.1.3 Hinweise auf eine zu geringe Anzahl hochqualitativer Sequenzen pro Probe

In den Genomen der vier oben genannten Genom-sequenzierten Stämme sind sechs (*S. griseochromogenes*, *S. lincolnensis*), sieben (*S. venezuelae*) bzw. fünf (*A. mirum*) 16S-ITS-Regionen annotiert. Nicht alle in einem Genom annotierten 16S-ITS-Regionen unterschieden sich deutlich in ihrer Sequenz. Sehr ähnliche oder identische 16S-ITS-Regionen ($\geq 99,3$ % Identität im multiplen *alignment*) werden im Folgenden als eine 16S-ITS-Variante bezeichnet.

S. griseochromogenes hatte zwei, alle anderen Stämme hatten drei unterschiedliche 16S-ITS-Varianten. Im Falle von *S. griseochromogenes* stimmte die Anzahl Genom-annotierter 16S-ITS-Varianten in allen Replikaten genau mit der Anzahl an generierten 16S-ITS-OTUs überein. Bei *S. lincolnensis*, *S. venezuelae* und *A. mirum* fehlte in einigen der drei Replikate ein 16S-ITS-OTU, um alle 16S-ITS-Varianten auf dem Genom abzubilden (Abbildung 10). Die nicht repräsentierten 16S-ITS-Varianten setzten sich aus nur einer 16S-ITS-Region zusammen (Abbildung 10). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Anzahl hochqualitativer Sequenzen pro Probe insgesamt zu niedrig war, um zuverlässig auch 16S-ITS-OTUs zu 16S-ITS-Varianten mit geringer Kopienzahl im Genom zu generieren.

Unter den gewählten Filterbedingungen ($\text{minScore} = 75$, $\text{expected error} = 3$) konnten für 7 der 96 sequenzierten Proben keine 16S-ITS-OTUs generiert werden. Vergleicht man die Anzahl ungefilterter *circular consensus sequences* (CCS) in der Gesamtheit aller Proben und in den Proben ohne OTUs, so fällt auf, dass Proben ohne OTUs eine unterdurchschnittliche Anzahl an CCS hatten. Der CCS-Mittelwert lag in der Gesamtprobenzahl bei 265 Sequenzen pro Probe ($\sigma = 85$); hingegen war der Mittelwert der CCS in den 7 Proben ohne OTUs mit 131 ($\sigma = 22$) CCS nur etwa halb so groß. Von den 96 sequenzierten Proben hatten 13 Proben eine CCS-Anzahl von < 150 . Unter den 13 Proben mit < 150 CCS befanden sich 6 der 7 Proben ohne OTUs (Abbildung 11). Eine wahrscheinliche Ursache für das Vorliegen von Proben mit einer unterdurchschnittlichen CCS-Anzahl sind Abweichungen beim äquimolaren Poolen der einzelnen Proben vor der Sequenzierung. Dass wahrscheinlich geringe Abweichungen beim Poolen dazu führten, dass für einige Proben keine 16S-ITS-OTUs gebildet werden konnten, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Anzahl hochqualitativer Sequenzen pro Probe als zu gering eingestuft werden muss.

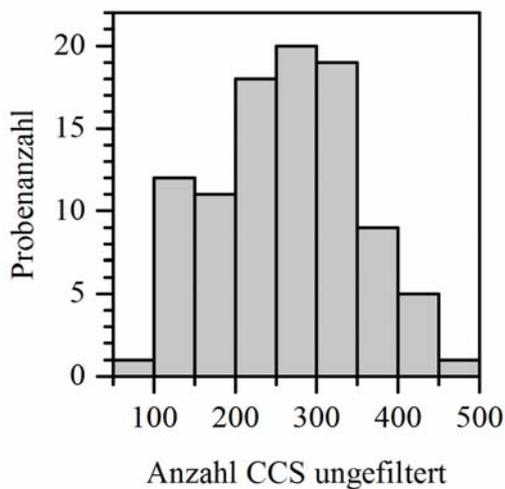


Abbildung 11: Anzahl circular consensus sequences (CCS) pro Probe. Die 16S-ITS-Amplifikate aller 96 Proben wurden gepoolt und in einer SMRT Cell sequenziert. Aus den Rohdaten wurden *circular consensus sequences* (CCS) gebildet. Der CCS-Mittelwert pro Probe lag (vor der Qualitätsfilterung) bei 265 ($\sigma = 85$); 13 Proben hatten eine CCS-Anzahl von < 150 .

4.1.4 Stammidentifizierung über 16S-rDNA-Sequenzen

Die generierten 16S-ITS-OTUs umfassten nahezu vollständige 16S-rDNA-Sequenzen. Zur Identifizierung der phylogenetischen Zugehörigkeit der Stämme wurden die 16S-rDNA-Sequenzen *in silico* extrahiert und mit 16S-rDNA-Sequenzen der SILVA_123.1_SSUParc_tax-Datenbank abgeglichen.

Die Identität von 56 Proben war bekannt, da die entsprechenden Stämme aus einer öffentlichen Stammsammlung (ATCC oder DSMZ) stammten. In Übereinstimmung mit den Spezifikationen der DSMZ/ATCC konnten anhand ihrer 16S-rDNA-Sequenzen 38 bzw. drei Proben dem Genus *Streptomyces* bzw. *Actinosynnema* zugeordnet werden (Anhang, Tabelle 11). Elf Proben ließen sich als kontaminiert einordnen. Dies ließ sich an der Detektion unterschiedlicher Genera in den jeweiligen Proben festmachen. Die PCR-Negativkontrolle und vier weitere Proben enthielten 16S-rDNA-Sequenzen von *Shewanella* sp., die wahrscheinlich ihren Ursprung in Kontaminationen von Plastikmaterialien oder Reagenzien hatten (Anhang, Tabelle 11).

Bei weiteren 32 Proben handelte es sich um Umweltisolate unbekannter Identität. Es wurden Rein- und Co-Kulturen erwartet. Sechs der Proben konnten als Co-Kulturen identifiziert werden, da gemäß 16S-rDNA-Sequenzen mehr als ein Genus in den Proben vorlag. In den Umweltisolaten wurden insgesamt 17 verschiedene Genera identifiziert, wobei die Genera *Sphingomonas*, *Bacillus* und *Nocardioides* gehäuft auftraten (Anhang, Tabelle 11).

Für sieben Proben konnten keine 16S-ITS-OTUs bestimmt werden, sodass keine Stammidentifizierung möglich war (Anhang, Tabelle 11).

4.1.5 Erkennung von Stammduplikaten im Genus *Streptomyces* anhand von 16S-ITS-Sequenzen

Ein großer Anteil der Sanofi-Stammsammlung besteht aus Stämmen des Genus *Streptomyces*. Im Genus *Streptomyces* ist die Variabilität von 16S-rDNA-Sequenzen oft nicht hinreichend hoch, um die Unterscheidung verschiedener Spezies zu ermöglichen (Kämpfer, 2012). Studien von Lanoot *et al.* (2005) und Hain *et al.* (1997) deuten darauf hin, dass die Sequenzierung von 16S-ITS-Regionen eine bessere Inter- und Intra-Spezies-Differenzierung im Genus *Streptomyces* ermöglichen könnten. Exemplarisch sollte überprüft werden, ob die generierten 16S-ITS-OTUs geeignet wären, um Stammduplikate im Genus *Streptomyces* zu identifizieren.

Wenn 16S-ITS-Sequenzen genutzt werden sollen, um Stammduplikate zu erkennen, sollten identische Stämme hinsichtlich ihrer 16S-ITS-OTUs übereinstimmen. Wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, wurden die 16S-ITS-Amplifikate von vier Genom-sequenzierten Stämmen als Triplikate sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse dieser Stämme können somit als Beispiel für jeweils drei identische Stämme gewertet werden. Wie zuvor beschrieben, zeigten die 16S-ITS-OTUs aller Replikate eine sehr gute Sequenzübereinstimmung mit den Genom-annotierten 16S-ITS-Regionen. Jedoch wich die Anzahl unterschiedlicher 16S-ITS-OTUs in einigen Replikaten voneinander ab (vgl. Abschnitt 4.1.3). Für den gesamten Datensatz bedeutet dies, dass identische Stämme nicht zwangsläufig eine gleiche Anzahl an 16S-ITS-OTUs aufweisen. Hierdurch wird die Erkennung von Stammduplikaten erschwert.

Ein zweites wichtiges Kriterium für die Erkennung von Stammduplikaten ist, dass Stämme, die nicht identisch sind, sich hinsichtlich ihrer 16S-ITS-OTUs unterscheiden. Der Datensatz umfasste einige *Streptomyces*-Stämme verschiedener Spezies, die sich allein anhand ihrer 16S-rDNA-Sequenzen nicht differenzieren ließen. Im 16S-rDNA *alignment* wurde innerhalb der folgenden Stammgruppen eine paarweise Identität von 99,2-100 % berechnet: Gruppe 1: *Streptomyces albus* DSM40652, *Streptomyces olivoviridis* DSM40211 und *Streptomyces griseus* ATCC15395, Gruppe 2: *Streptomyces chattanoogensis* DSM40002 und *Streptomyces hygroscopicus* ATCC21705, Gruppe 3: *Streptomyces lavendulae* DSM40069 und *Streptomycesnojiriensis* ATCC29781 und Gruppe 4: *S. aureofaciens* ATCC10762 und *S. avellaneus* DSM40554 (Abbildung 12).

Anders als die 16S-rDNA-Sequenzen zeigten die 16S-ITS-OTUs im Falle von Gruppe 1-3 deutlich, dass es sich nicht um Stammduplikate handelte. Innerhalb der drei Gruppen wurde im *alignment* der 16S-ITS-OTUs in keinem Fall eine höhere paarweise Identität als 98,1 %

berechnet. In Gruppe 4 (*S. aureofaciens* ATCC10762 und *S. avellaneus* DSM40554) wäre jedoch auch anhand eines Vergleichs der 16S-ITS-OTUs keine eindeutige Unterscheidung beider Stämme möglich gewesen. Jeweils ein 16S-ITS-OTU beider Stämme zeigte im *alignment* eine hundertprozentige paarweise Identität. Dass für *S. aureofaciens* zwei und für *S. avellaneus* nur ein OTU generiert wurde, kann aus oben erläuterten Gründen nicht als hinreichendes Unterscheidungsmerkmal angesehen werden. Lanoot *et al.* (2004) stellten auf Basis der Ergebnisse von BOX-Fingerprints die Vermutung auf, dass es sich bei *S. aureofaciens* und *S. avellaneus* um synonyme Speziesnamen handelt. Insgesamt deuteten die Daten somit darauf hin, dass 16S-ITS-Sequenzen für die Differenzierung nah verwandter *Streptomyces* Spezies eingesetzt werden könnten.

Der 16S-ITS-Datensatz umfasste außerdem verschiedene Stämme einer *Streptomyces* Spezies. Anhand dieser Daten sollte exemplarisch überprüft werden, ob mithilfe der 16S-ITS-OTUs eine Differenzierung von *Streptomyces*-Stämmen auf Subspezies-Niveau möglich ist. Zu den ausgewählten Stämmen gehörten drei Stämme der Spezies *Streptomyces coelicolor* (DSM40233, DSM40675, DSM40681), zwei *Streptomyces-fradiae*-Stämme (ATCC10745, ATCC21401) sowie zwei Stämme der Spezies *Streptomyces lavendulae* (DSM40069, ATCC11924). Von allen Stämmen gleicher Spezies wurden die 16S-rDNA-Sequenzen bzw. die 16S-ITS-OTUs durch ein *alignment* verglichen. Die 16S-rDNA-Sequenzen der Stämme gleicher Spezies wiesen im *alignment* eine hohe Ähnlichkeit auf (99,4-100 % paarweise Identität) (Abbildung 13). Anhand der 16S-ITS-OTUs konnte einer der drei *S. coelicolor*-Stämme (DSM40233) als deutlich unterschiedlich zu den beiden anderen *S. coelicolor*-Stämmen (DSM40675, DSM40681) eingestuft werden. Die *S. coelicolor*-Stämme DSM40675 und DSM40681 hatten zwei sehr ähnliche 16S-ITS-OTUs mit einer paarweisen Identität von 99,3-99,9 %, sodass keine eindeutige Unterscheidung der Stämme möglich war. Die 16S-ITS-OTUs der *S. lavendulae*-Stämme DSM40069 und ATCC11924 wichen mit einer maximalen paarweisen Identität von 97 % deutlich voneinander ab. Bei den *S. fradiae*-Stämmen ATCC10745 und ATCC21401 war eines der 16S-ITS-OTUs beider Stämme identisch. Die weiteren OTUs würden jedoch eine deutliche Unterscheidung der Stämme zulassen.

Zusammenfassend ermöglichten die analysierten 16S-ITS-OTUs häufig, aber nicht in jedem Fall, die Erkennung von Stammduplikaten im Genus *Streptomyces*.

(A) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. albus*, *S. olivoviridis*, *S. griseus*)

	<i>S. albus</i> OTU1	<i>S. albus</i> OTU3	<i>S. albus</i> OTU4	<i>S. olivo.</i> OTU1	<i>S. olivo.</i> OTU2	<i>S. olivo.</i> OTU3	<i>S. griseus</i> OTU1
<i>S. albus</i> OTU1		● 99,9	● 99,9	● 99,5	● 99,5	● 99,5	● 99,9
<i>S. albus</i> OTU3	● 99,9		● 100	● 99,4	● 99,4	● 99,4	● 99,8
<i>S. albus</i> OTU4	● 99,9	● 100		● 99,4	● 99,4	● 99,4	● 99,8
<i>S. olivo.</i> OTU1	● 99,5	● 99,4	● 99,4		● 100	● 100	● 99,4
<i>S. olivo.</i> OTU2	● 99,5	● 99,4	● 99,4	● 100		● 100	● 99,4
<i>S. olivo.</i> OTU3	● 99,5	● 99,4	● 99,4	● 100	● 100		● 99,4
<i>S. griseus</i> OTU1	● 99,9	● 99,8	● 99,8	● 99,4	● 99,4	● 99,4	

(B) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. albus*, *S. olivoviridis*, *S. griseus*)

	<i>S. albus</i> OTU1	<i>S. albus</i> OTU3	<i>S. albus</i> OTU4	<i>S. olivo.</i> OTU1	<i>S. olivo.</i> OTU2	<i>S. olivo.</i> OTU3	<i>S. griseus</i> OTU1
<i>S. albus</i> OTU1		● 98,4	● 98,7	● 97,1	● 96,6	● 97,3	● 96,6
<i>S. albus</i> OTU3	● 98,4		● 97,9	● 98,2	● 97,4	● 97	● 97,6
<i>S. albus</i> OTU4	● 98,7	● 97,9		● 96,4	● 97,4	● 96,8	● 95,9
<i>S. olivo.</i> OTU1	● 97,1	● 98,2	● 96,4		● 98,1	● 98,3	● 97,6
<i>S. olivo.</i> OTU2	● 96,6	● 97,4	● 97,4	● 98,1		● 97,6	● 96,7
<i>S. olivo.</i> OTU3	● 97,3	● 97	● 96,8	● 98,3	● 97,6		● 96,8
<i>S. griseus</i> OTU1	● 96,6	● 97,6	● 95,9	● 97,6	● 96,7	● 96,8	

(C) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. chattanoogensis*, *S. hygrosopicus*)

	<i>S. chatt.</i> OTU1	<i>S. chatt.</i> OTU2	<i>S. hygro.</i> OTU1	<i>S. hygro.</i> OTU2
<i>S. chatt.</i> OTU1		● 100	● 99,2	● 99,2
<i>S. chatt.</i> OTU2	● 100		● 99,2	● 99,2
<i>S. hygro.</i> OTU1	● 99,2	● 99,2		● 99,9
<i>S. hygro.</i> OTU2	● 99,2	● 99,2	● 99,9	

(D) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. chattanoogensis*, *S. hygrosopicus*)

	<i>S. chatt.</i> OTU1	<i>S. chatt.</i> OTU2	<i>S. hygro.</i> OTU1	<i>S. hygro.</i> OTU2
<i>S. chatt.</i> OTU1		● 96,4	● 97,7	● 97,6
<i>S. chatt.</i> OTU2	● 96,4		● 96,3	● 95,5
<i>S. hygro.</i> OTU1	● 97,7	● 96,3		● 98
<i>S. hygro.</i> OTU2	● 97,6	● 95,5	● 98	

Abbildung 12: Differenzierung von *Streptomyces*-Stämmen unterschiedlicher Spezies. Unter den sequenzierten Proben befanden sich 16S-ITS-Amplifikate von *Streptomyces*-Stämmen unterschiedlicher Spezies, die sich anhand ihrer 16S-rDNA-Sequenzen nicht unterscheiden ließen. Es sollte überprüft werden, ob die 16S-ITS-OTUs zur Differenzierung dieser Stämme herangezogen werden können. Gezeigt sind die Ergebnisse multipler *alignments* der 16S-ITS-OTUs (B, D, F, H) sowie multiple *alignments* der *in silico* aus den 16S-ITS-OTUs extrahierten 16S-rDNA-Sequenzen (A, C, E, G). Die Zahlen geben die paarweise Identität (%) der Sequenzen zueinander an. *S. albus* = *S. albus* DSM40652, *S. olivo.* = *S. olivoviridis* DSM40211, *S. griseus* = *S. griseus* ATCC15395, *S. chatt.* = *S. chattanoogensis* DSM40002, *S. hygro.* = *S. hygrosopicus* ATCC21705, *S. laven.* = *S. lavendulae* DSM40069, *S. nojir.* = *S. nojiriensis* ATCC29781, *S. aureo.* = *S. aureofaciens* ATCC10762, *S. avell.* = *S. avellaneus* DSM40554. Die Kreise kennzeichnen paarweise Identitäten von $\geq 99\%$ (rot), $< 99\%$ und $\geq 98,5\%$ (gelb) sowie $< 98,5\%$ (grau). 16S: 16S rDNA. Eine Unterscheidung von *S. albus*, *S. olivoviridis* und *S. griseus* bzw. *S. chattanoogensis* und *S. hygrosopicus* bzw. *S. lavendulae* und *S. nojiriensis* war mithilfe der 16S-ITS-OTUs möglich. *S. aureofaciens* und *S. avellaneus* ließen sich auch anhand der 16S-ITS-OTUs nicht unterscheiden.

(E) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. lavendulae*, *S. nojiriensis*)

	<i>S. laven.</i> OTU1	<i>S. laven.</i> OTU2	<i>S. nojir.</i> OTU1	<i>S. nojir.</i> OTU2	<i>S. nojir.</i> OTU3
<i>S. laven.</i> OTU1		● 99,9	● 99,9	● 99,9	● 99,9
<i>S. laven.</i> OTU2	● 99,9		● 99,9	● 99,9	● 99,9
<i>S. nojir.</i> OTU1	● 99,9	● 99,9		● 100	● 100
<i>S. nojir.</i> OTU2	● 99,9	● 99,9	● 100		● 100
<i>S. nojir.</i> OTU3	● 99,9	● 99,9	● 100	● 100	

(F) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. lavendulae*, *S. nojiriensis*)

	<i>S. laven.</i> OTU1	<i>S. laven.</i> OTU2	<i>S. nojir.</i> OTU1	<i>S. nojir.</i> OTU2	<i>S. nojir.</i> OTU3
<i>S. laven.</i> OTU1		● 98,7	● 96,2	● 96,7	● 96,5
<i>S. laven.</i> OTU2	● 98,7		● 95,9	● 96,7	● 97,1
<i>S. nojir.</i> OTU1	● 96,2	● 95,9		● 97,7	● 96,9
<i>S. nojir.</i> OTU2	● 96,7	● 96,7	● 97,7		● 97,5
<i>S. nojir.</i> OTU3	● 96,5	● 97,1	● 96,9	● 97,5	

(G) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. aureofaciens*, *S. avellaneus*)

	<i>S. aureo.</i> OTU1	<i>S. aureo.</i> OTU2	<i>S. avell.</i> OTU1
<i>S. aureo.</i> OTU1		● 99,7	● 100
<i>S. aureo.</i> OTU2	● 99,7		● 99,7
<i>S. avell.</i> OTU1	● 100	● 99,7	

(H) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. aureofaciens*, *S. avellaneus*)

	<i>S. aureo.</i> OTU1	<i>S. aureo.</i> OTU2	<i>S. avell.</i> OTU1
<i>S. aureo.</i> OTU1		● 98,2	● 100
<i>S. aureo.</i> OTU2	● 98,2		● 98,2
<i>S. avell.</i> OTU1	● 100	● 98,2	

Abbildung 12: Fortsetzung.

(A) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. coelicolor*, 3 Stämme)

	<i>S. coeli. 1</i>	<i>S. coeli. 1</i>	<i>S. coeli. 2</i>	<i>S. coeli. 2</i>	<i>S. coeli. 2</i>	<i>S. coeli. 3</i>	<i>S. coeli. 3</i>
	OTU1	OTU2	OTU1	OTU2	OTU3	OTU1	OTU2
<i>S. coeli. 1</i> OTU1		● 100	● 100	● 100	● 100	● 99,9	● 99,9
<i>S. coeli. 1</i> OTU2	● 100		● 100	● 100	● 100	● 99,9	● 99,9
<i>S. coeli. 2</i> OTU1	● 100	● 100		● 100	● 100	● 99,9	● 99,9
<i>S. coeli. 2</i> OTU2	● 100	● 100	● 100		● 100	● 99,9	● 99,9
<i>S. coeli. 2</i> OTU3	● 100	● 100	● 100	● 100		● 99,9	● 99,9
<i>S. coeli. 3</i> OTU1	● 99,9	● 99,9	● 99,9	● 99,9	● 99,9		● 100
<i>S. coeli. 3</i> OTU2	● 99,9	● 99,9	● 99,9	● 99,9	● 99,9	● 100	

(B) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. coelicolor*, 3 Stämme)

	<i>S. coeli. 1</i>	<i>S. coeli. 1</i>	<i>S. coeli. 2</i>	<i>S. coeli. 2</i>	<i>S. coeli. 2</i>	<i>S. coeli. 3</i>	<i>S. coeli. 3</i>
	OTU1	OTU2	OTU1	OTU2	OTU3	OTU1	OTU2
<i>S. coeli. 1</i> OTU1		● 98,4	● 97,9	● 97,2	● 96,3	● 96,6	● 97,2
<i>S. coeli. 1</i> OTU2	● 98,4		● 98,9	● 98,6	● 97,8	● 97,3	● 98,6
<i>S. coeli. 2</i> OTU1	● 97,9	● 98,9		● 98,8	● 98,3	● 98,4	● 98,7
<i>S. coeli. 2</i> OTU2	● 97,2	● 98,6	● 98,8		● 98,4	● 98,4	● 99,9
<i>S. coeli. 2</i> OTU3	● 96,3	● 97,8	● 98,3	● 98,4		● 99,3	● 98,3
<i>S. coeli. 3</i> OTU1	● 96,6	● 97,3	● 98,4	● 98,4	● 99,3		● 98,4
<i>S. coeli. 3</i> OTU2	● 97,2	● 98,6	● 98,7	● 99,9	● 98,3	● 98,4	

(C) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. fradiae*, 2 Stämme)

	<i>S. fradi. 1</i>	<i>S. fradi. 1</i>	<i>S. fradi. 1</i>	<i>S. fradi. 2</i>	<i>S. fradi. 2</i>
	OTU1	OTU2	OTU3	OTU1	OTU2
<i>S. fradi. 1</i> OTU1		● 100	● 100	● 100	● 100
<i>S. fradi. 1</i> OTU2	● 100		● 100	● 100	● 100
<i>S. fradi. 1</i> OTU3	● 100	● 100		● 100	● 100
<i>S. fradi. 2</i> OTU1	● 100	● 100	● 100		● 100
<i>S. fradi. 2</i> OTU2	● 100	● 100	● 100	● 100	

(D) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. fradiae*, 2 Stämme)

	<i>S. fradi. 1</i>	<i>S. fradi. 1</i>	<i>S. fradi. 1</i>	<i>S. fradi. 2</i>	<i>S. fradi. 2</i>
	OTU1	OTU2	OTU3	OTU1	OTU2
<i>S. fradi. 1</i> OTU1		● 98,1	● 96,9	● 100	● 96,9
<i>S. fradi. 1</i> OTU2	● 98,1		● 98,8	● 98,1	● 97,6
<i>S. fradi. 1</i> OTU3	● 96,9	● 98,8		● 96,9	● 98,9
<i>S. fradi. 2</i> OTU1	● 100	● 98,1	● 96,9		● 96,9
<i>S. fradi. 2</i> OTU2	● 96,9	● 97,6	● 98,9	● 96,9	

Abbildung 13: Differenzierung von *Streptomyces*-Stämmen gleicher Spezies. Unter den sequenzierten Proben befanden sich 16S-ITS-Amplifikate von *Streptomyces*-Stämmen gleicher Spezies, die sich anhand ihrer 16S-rDNA-Sequenzen nicht differenzieren ließen. Es wurde überprüft, ob die 16S-ITS-OTUs zur Unterscheidung dieser Stämme herangezogen werden können. Gezeigt sind die Ergebnisse multipler *alignments* der 16S-ITS-OTUs (B, D, F) sowie multiple *alignments* der *in silico* aus den 16S-ITS-OTUs extrahierten 16S-rDNA-Sequenzen (A, C, E). Die Zahlen geben die paarweise Identität (%) der Sequenzen zueinander an. *S. coeli. 1* = *S. coelicolor* DSM40233, *S. coeli. 2* = *S. coelicolor* DSM40675, *S. coeli. 3* = *S. coelicolor* DSM40681, *S. fradi. 1* = *S. fradiae* ATCC10745, *S. fradi. 2* = *S. fradiae* ATCC21401, *S. laven. 1* = *S. lavendulae* DSM40069, *S. laven. 2* = *S. lavendulae* ATCC11924. Die Kreise kennzeichnen paarweise Identitäten von $\geq 99\%$ (rot), $< 99\%$ und $\geq 98,5\%$ (gelb) sowie $< 98,5\%$ (grau). Die 16S-ITS-OTUs des *S. coelicolor*-Stammes DSM40233 unterschieden sich deutlich von den 16S-ITS-OTUs der beiden anderen *S. coelicolor*-Stämme. Die *S. coelicolor*-Stämme DSM40675 und DSM40681 hatten hingegen sehr ähnliche 16S-ITS-OTUs und waren nicht eindeutig unterscheidbar. *S. fradiae* ATCC10745 und *S. fradiae* ATCC21401 hatten zwar eine identische 16S-ITS-OTU, unterschieden sich jedoch deutlich hinsichtlich der weiteren OTUs. Auch die beiden *S. lavendulae*-Stämme ließen sich anhand der 16S-ITS-OTUs unterscheiden.

(E) Vergleich 16S-rDNA-Sequenzen (*S. lavendulae*, 2 Stämme)

	<i>S. laven. 1</i> OTU1	<i>S. laven. 1</i> OTU2	<i>S. laven. 2</i> OTU1	<i>S. laven. 2</i> OTU2
<i>S. laven. 1</i> OTU1		● 99,9	● 99,4	● 99,4
<i>S. laven. 1</i> OTU2	● 99,9		● 99,4	● 99,4
<i>S. laven. 2</i> OTU1	● 99,4	● 99,4		● 100
<i>S. laven. 2</i> OTU2	● 99,4	● 99,4	● 100	

(F) Vergleich 16S-ITS-Sequenzen (*S. lavendulae*, 2 Stämme)

	<i>S. laven. 1</i> OTU1	<i>S. laven. 1</i> OTU2	<i>S. laven. 2</i> OTU1	<i>S. laven. 2</i> OTU2
<i>S. laven. 1</i> OTU1		● 98,9	● 97	● 95,7
<i>S. laven. 1</i> OTU2	● 98,9		● 96,3	● 95,3
<i>S. laven. 2</i> OTU1	● 97	● 96,3		● 98,1
<i>S. laven. 2</i> OTU2	● 95,7	● 95,3	● 98,1	

Abbildung 13: Fortsetzung.

4.2 Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert

4.2.1 Signalmolekül-induzierte gesteigerte Bioaktivität von sechs Actinobakterien

In der Literatur wurden Signalmoleküle beschrieben, für die ein regulatorischer Einfluss auf die Sekundärmetabolit-Produktion einzelner Actinobakterien bekannt ist (vgl. Abschnitt 1.4.3). In diesem Projekt sollte getestet werden, welche der Signalmoleküle (oder funktionell/strukturell verwandte Moleküle) bei Zugabe ins Wachstumsmedium in nicht wachstumshemmender Konzentration am häufigsten die Bioaktivität ausgewählter Actinobakterien positiv beeinflussen. Eine erhöhte Bioaktivität deutet auf die erhöhte Produktion bioaktiver Sekundärmetabolite hin. Zur Durchführung des Projektes wurde zunächst ein Festphasen-Kultivierungs- und Screening-Verfahren etabliert (Abbildung 14). Dieses Verfahren umfasste folgende Schritte: 1.) Mithilfe eines Pipettierroboters wurden 23-24 verschiedene Actinobakterien auf Agarplatten gespottet, die Medium mit Signalmolekülen oder Medium ohne Signalmoleküle (Kontrollplatten) enthielten. Die Platten wurden vier Tage inkubiert. 2.) Die bewachsenen Agarplatten wurden mit Topagar überschichtet, der direkt vor der Überschichtung mit *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 angeimpft worden war. Nach einer Inkubation der überschichteten Platten über Nacht wurden Hemmhöfe gegen *P. aeruginosa* detektiert. Zeigte ein Stamm bei Kultivierung unter Einfluss eines Signalmoleküls eine antibakterielle Aktivität, die ohne Zugabe eines Signalmoleküls nicht detektierbar war, wurde dies als Hinweis auf die gesteigerte Produktion eines oder mehrerer Sekundärmetabolite mit anti-*P. aeruginosa*-Aktivität gewertet. *P. aeruginosa* wurde als Testorganismus ausgewählt, da der wirtschaftliche Fokus der Arbeitsgruppe zum Zeitpunkt der Experimente auf der Auffindung von Verbindungen mit antibakterieller Aktivität gegen Pseudomonaden lag.

Das Festphasen-Kultivierungs- und Screening-Verfahren wurde angewendet, um den Einfluss von 18 Signalmolekülen auf die Bioaktivität von 70 Actinobakterien zu untersuchen. Die ausgewählten Signalmoleküle umfassten Verbindungen, die einen nachgewiesenen Einfluss auf den Sekundärmetabolismus von Actinobakterien haben und strukturell/funktionell verwandte Moleküle, für die bisher kein Einfluss auf den Sekundärmetabolismus gezeigt wurde. Es wurden folgende Signalmoleküle getestet: Cyclische Nucleotide (c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP), Siderophore

(Desferrioxamin B, Desferrioxamin E), Substanzen mit antimikrobieller Aktivität (Fosfomycin, Vancomycin, Tetracyclin, Rifampicin, Nalidixinsäure, Kanamycin, Lincomycin, Erythromycin, Penicillin G, Bacitracin, Nisin A) sowie *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) (Tabelle 6). Unter den 70 getesteten Actinobakterien befanden sich 23 Stämme des Genus *Streptomyces*, 14 Stämme des Genus *Actinoplanes*, 27 Stämme aus 21 weiteren Genera sowie 6 Stämme ohne Genus-Zuordnung (Tabelle 2).

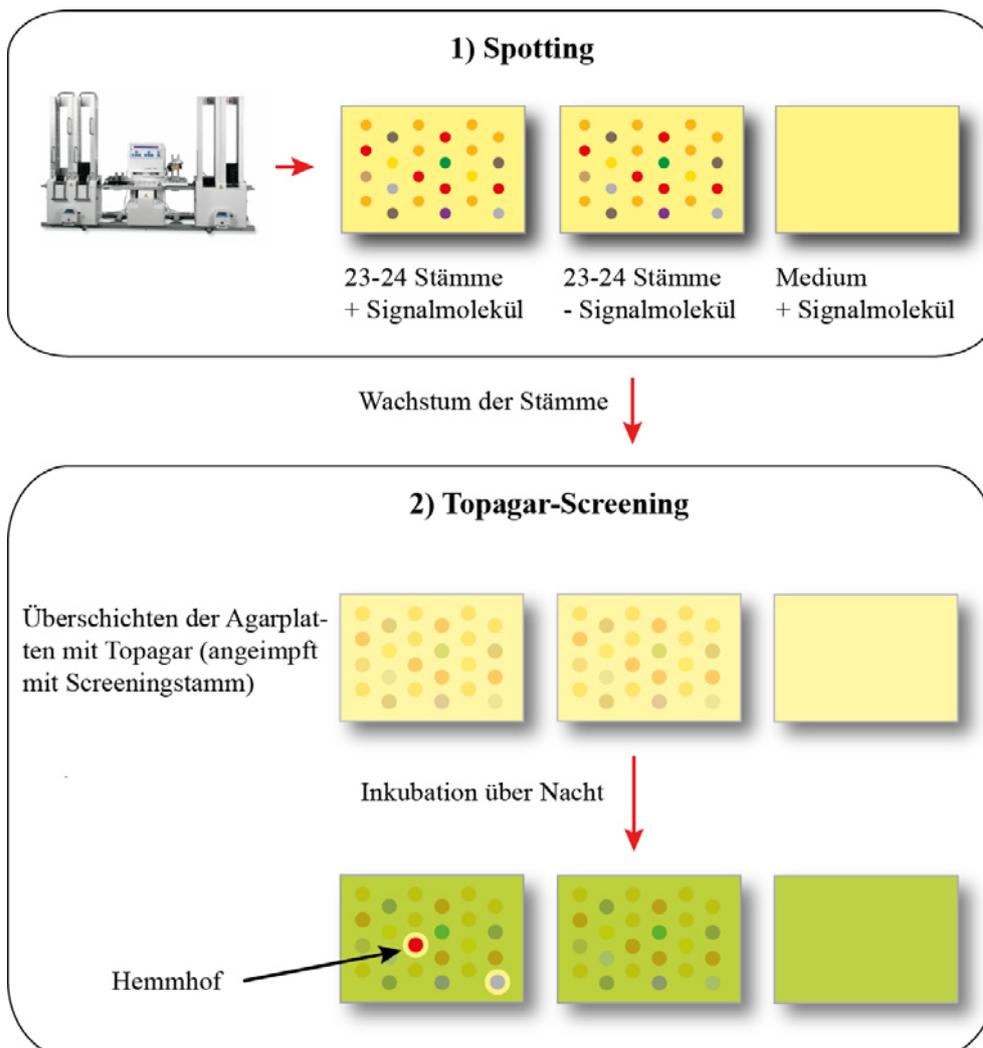


Abbildung 14: Schema für die Testung des Einflusses von 18 Signalmolekülen auf die anti-*P. aeruginosa*-Aktivität von 70 Actinobakterien. Die Actinobakterien wurden mithilfe eines Pipettierroboters auf Agarplatten gespottet, in die eines der Signalmoleküle eingegossen worden war. Zum Vergleich wurden dieselben Stämme auf Agarplatten gespottet, die kein Signalmolekül enthielten. Auf jede Agarplatte wurden 23-24 Actinobakterien gespottet. Zudem wurden Medienkontrollen mitgeführt, die jeweils eines der Signalmoleküle enthielten (Schritt 1: Spotting). Nach vier Tagen Wachstum der Stämme wurden die Agarplatten mit Topagar überschichtet, der direkt zuvor mit *P. aeruginosa* ATCC27853 angeimpft worden war. Nach Inkubation der Platten über Nacht wurden Hemmhöfe detektiert (Schritt 2: Topagar-Screening). Relevant waren solche Hemmhöfe, die nur auf den Platten auftraten, auf denen die Actinobakterien unter Einfluss eines Signalmoleküls gewachsen waren.

Unter den 70 getesteten Actinobakterien wurden sechs Stämme identifiziert, die nur dann eine Hemmung des *P. aeruginosa*-Wachstums hervorriefen, wenn eines der Signalmoleküle

in das Medium zugegeben worden war. GlcNAc hatte einen solchen Effekt auf ST136450 (*Streptomyces* sp.), ST106056 (*Streptomyces* sp.) und DSM44150 (*Kibdelosporangium aridum largum*). Tetracyclin beeinflusste die anti-*P. aeruginosa*-Aktivität von ST102347 (*Streptomyces* sp.), DSM40005 (*Streptomyces cinnamoneus*) und ST102142 positiv. Weitere Signalmoleküle, die zur Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* führten, waren das Antibiotikum Rifampicin (bei ST102142) und das Siderophor Desferrioxamin E (bei ST136450: *Streptomyces* sp.) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnisse des Topagar-Screenings. 70 Actinobakterien wurden auf Agarplatten gespottet, die eines von 18 Signalmolekülen (in verschiedenen Konzentrationen) enthielten. Zum Vergleich wurden alle Stämme auch auf Agarplatten gespottet, die kein Signalmolekül enthielten. Nach Wachstum der gespotteten Bakterienkulturen wurden diese mit Top-Agar überschichtet, der mit *P. aeruginosa* ATCC27853 als Screening-Organismus beimpft worden war. Nach Inkubation der Platten über Nacht konnten bei sechs der 70 gespotteten Stämme nur dann Hemmhöfe gegen *P. aeruginosa* ATCC27853 detektiert werden, wenn der Agar mit einem Signalmolekül versetzt worden war. Alle Stämme wurden im Duplikat gespottet. In der Tabelle aufgeführt sind Hemmhöfe, die in zwei Replikaten detektiert wurden (x, x) und solche Hemmhöfe, die nur in einem der beiden Replikate auftraten, hier jedoch sehr deutlich sichtbar waren (x). DSM40005: *Streptomyces cinnamoneus*, ST136450: *Streptomyces* sp., ST102347: *Streptomyces* sp., ST106056: *Streptomyces* sp., DSM44150: *Kibdelosporangium aridum largum*; ST102142: Genus unbestimmt. Mitgeführte Medienkontrollen, die jeweils eines der Signalmoleküle enthielten, führten zu keiner Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* ATCC27853.

Signalmoleküle	DSM40005	ST136450	ST102347	ST106056	DSM44150	ST102142
Tetracyclin						
0,01 µg/mL	x					x, x
0,1 µg/mL	x					x
1 µg/mL	x, x		x, x			x
Rifampicin						
0,01 µg/mL						x, x
0,1 µg/mL						x, x
Desferrioxamin E						
0,2 µM						
2 µM						
20 µM		x, x				
GlcNAc						
5 mM					x, x	
10 mM					x	
20 mM		x		x, x	x, x	

GlcNAc und Tetracyclin hatten unter den 18 getesteten Signalmolekülen am häufigsten einen positiven Effekt auf die anti-*P. aeruginosa*-Aktivität der Actinobakterien. Um die Reproduzierbarkeit der Effekte von GlcNAc und Tetracyclin auf die anti-*P. aeruginosa*-Aktivität zu testen, wurden die Stämme DSM40005, ST102142, ST102347, ST106056, ST136450 und DSM44150 erneut auf Agarplatten ohne/mit Zusatz von GlcNAc bzw.

Tetracyclin gespottet. Im Unterschied zum vorherigen Spotting-Experiment wurde nur ein Stamm pro Agarplatte gespottet und mehrfache Replikate angefertigt.

Die Kultivierung von ST136450 (*Streptomyces* sp.) und ST106056 (*Streptomyces* sp.) in Anwesenheit von 20 mM GlcNAc führte erneut zu einer Inhibierung des Wachstums von *P. aeruginosa* ATCC27853 (Abbildung 15). Auch der vorherig beobachtete Effekt von Tetracyclin auf die Bioaktivität von ST102347 (*Streptomyces* sp.) konnte reproduziert werden. Der Effekt von GlcNAc auf Stamm DSM40005 (*S. cinnamoneus*) konnte nicht konsistent reproduziert werden. Auch ohne Zugabe von Tetracyclin zum Kulturmedium konnte bei einigen Replikaten ein inhibierender Effekt auf *P. aeruginosa* detektiert werden. Der inhibierende Einfluss von DSM40005 auf das Wachstum von *P. aeruginosa* war allerdings durch die Zugabe von Tetracyclin deutlich ausgeprägter (Abbildung 15). Für DSM44150 (*K. aridum largum*) bzw. ST102142 (*Streptomyces* sp.) konnte der ursprünglich beobachtete Einfluss von GlcNAc bzw. Tetracyclin in diesem Ansatz nicht bestätigt werden. Durch die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden insgesamt sechs Actinobakterien identifiziert, deren Sekundärmetabolit-Produktion möglicherweise durch eines der verwendeten Signalmoleküle beeinflusst wurde. Zwei der Stämme wurden für eine weitere Analyse priorisiert. Ziel dieser Analyse war die Identifizierung der Sekundärmetabolite, deren Produktion bei Wachstum unter Einfluss des Signalmoleküls erhöht ist. ST136450 (*Streptomyces* sp.) wurde für eine detaillierte Analyse ausgewählt, da der Stamm bei Wachstum unter GlcNAc-Einfluss zusätzlich auch eine veränderte Morphologie aufwies (vgl. Abschnitt 4.2.2) und die GlcNAc-induzierte Aktivität gegen *P. aeruginosa* in zwei voneinander unabhängigen Experimenten gezeigt werden konnte. Der zweite Stamm, DSM44150 (*Kibdelosporangium aridum largum*), war deshalb von großem Interesse, da bisher noch kein Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Produktion im Genus *Kibdelosporangium* beschrieben wurde.

Im Folgenden wird ein Stamm, der in GlcNAc-haltigem Medium kultiviert wurde, mit (+ **GlcNAc**) hinter der Stammbezeichnung gekennzeichnet. Wurde der Stamm ohne Zugabe von GlcNAc kultiviert, wird dies durch (- **GlcNAc**) hinter der Stammbezeichnung markiert.

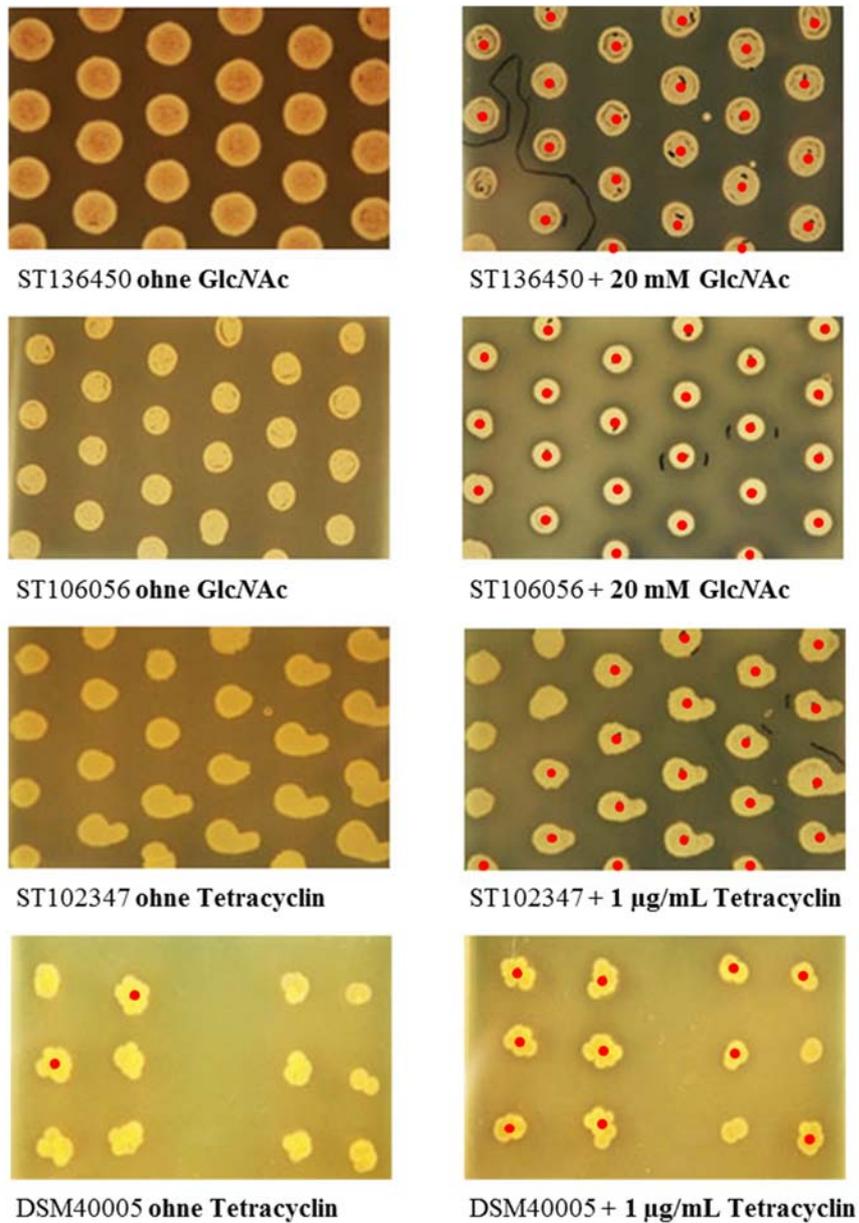


Abbildung 15: Einfluss der Signalmoleküle GlcNAc und Tetracyclin auf die Bioaktivität von ausgewählten Actinobakterien. Jene Stämme, die im ersten Topagar-Screening (Tabelle 8) nur dann eine Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* ATCC27853 verursachten, wenn GlcNAc oder Tetracyclin im Medium vorhanden waren, wurden erneut durch ein Topagar-Screening hinsichtlich einer induzierten Aktivität gegen *P. aeruginosa* getestet. Hiermit sollte getestet werden, ob die beobachteten Effekte durch GlcNAc und Tetracyclin reproduzierbar sind. Die Agarplatten zeigen die Ergebnisse dieses Topagar-Screenings. Das Auftreten einer Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* um einen Spot herum ist mit einem roten Punkt gekennzeichnet. Bei den Stämmen ST136450, ST106056, ST102347 trat nur dann eine Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* auf, wenn GlcNAc bzw. Tetracyclin im Medium vorhanden waren. Bei Stamm DSM40005 waren auch ohne Zugabe von Tetracyclin Hemmhöfe sichtbar, allerdings nur bei vereinzelt Spots (2 von 12) und deutlich schwächer als mit Tetracyclin-Zugabe. Bei den Stämmen DSM44150 und ST102142 konnten anders als im ersten Topagar-Screening (Tabelle 8) keine Hemmhöfe detektiert werden (die Agarplatten sind nicht abgebildet). Auf der Platte ST136450 + 20 mM GlcNAc überlagerten sich die Hemmhöfe häufig stark; daher war nahezu auf der gesamten Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* ATCC27853.

4.2.2 Erhöhte Produktion mehrerer Desferrioxamine bei Wachstum von ST136450 unter GlcNAc-Einfluss

Um zu überprüfen, ob GlcNAc die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in ST136450 beeinflusst, wurde der Stamm zunächst auf Agarplatten gespottet, die 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc (Kontrollansätze) enthielten (Abbildung 17, Schritt 1) und für sechs Tage bei 28 °C inkubiert. Die Morphologie von ST136450 unterschied sich augenscheinlich deutlich zwischen der Kultivierung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von GlcNAc. Die Bildung von Luft-Mycel wurde durch GlcNAc-Zugabe unterdrückt.

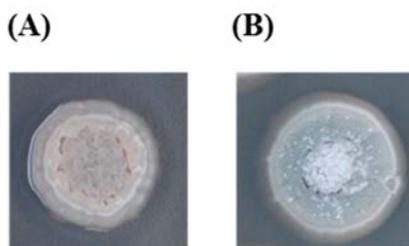


Abbildung 16: Morphologie von ST136450. Gezeigt ist ein Foto eines Spots von ST136450 nach sechstägigem Wachstum auf GlcNAc-haltigem ISP2-Medium (A) bzw. ISP2-Medium ohne GlcNAc (B). Die Luft-Mycel-Bildung von ST136450 wurde durch GlcNAc-Zugabe unterdrückt.

Die bewachsenen Agarplatten wurden gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert (Abbildung 17, Schritt 2b und 3). Die Extrakte wurden in einem MTT-Test hinsichtlich einer wachstumshemmenden Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC35218 und *S. aureus* ATCC25923 untersucht (Abbildung 17, Schritt 4a). Sowohl mit MH als auch mit ISP2 als Screeningmedium konnten keine Aktivitäten detektiert werden. In einem parallel durchgeführten Topagar-Screening (Abbildung 17, Schritt 2a) mit *P. aeruginosa* ATCC27853 und *E. coli* ATCC35218 konnte in diesem Ansatz auch keine Bioaktivitätsänderung durch die Zugabe von GlcNAc detektiert werden. Da ST136450 in den beiden vorherigen Ansätzen bei Wachstum unter GlcNAc-Einfluss das Wachstum von *P. aeruginosa* hemmte, wurden die Extrakte dennoch analytisch betrachtet, um etwaige Unterschiede im Metabolom analytisch zu detektieren.

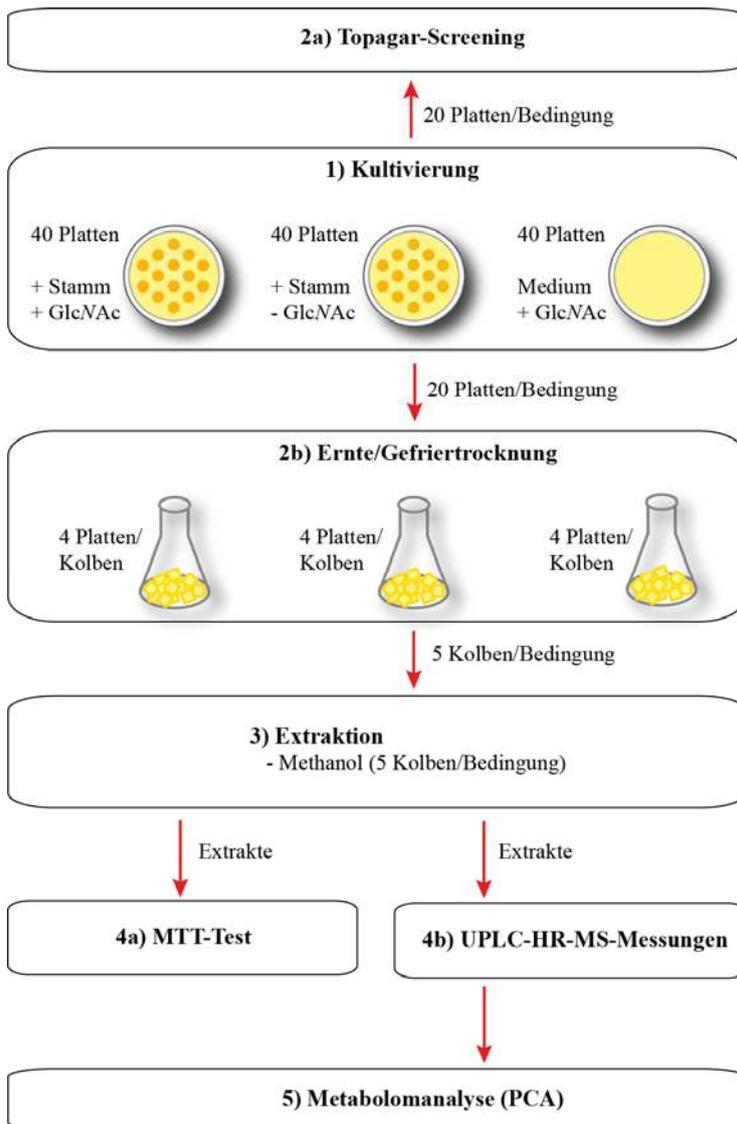


Abbildung 17: Schematische Darstellung: Detaillierte Analyse zweier Stämme, die nur unter Zugabe von GlcNAc eine Wachstumshemmung von *P. aeruginosa* ATCC27853 verursachen. Die Stämme ST136450 und DSM44150 wurden auf je 40 Agarplatten mit bzw. ohne GlcNAc gespottet. Es wurden weitere 40 Agarplatten Medienkontrollen (mit GlcNAc) mitgeführt. Die Platten wurden inkubiert (Schritt 1). Am Erntetag (nach 6 Tagen Wachstum) und an einem weiteren Tag wurden Topagar-Screenings durchgeführt (je 20 Platten pro Bedingung) (Schritt 2a). Die restlichen Platten wurden am Erntetag zerkleinert, in Erlenmeyerkolben überführt und gefriergetrocknet (Schritt 2b). In den Erlenmeyerkolben erfolgte eine Extraktion mit Methanol (je 5 Kolben pro Bedingung = 5 Replikate) (Schritt 3). Die Extrakte wurden durch einen MTT-Test auf eine wachstumshemmende Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC35218 und *S. aureus* ATCC25923 getestet (Schritt 4a). Mit den Methanol-Extrakten wurden UPLC-HR-MS-Messungen vorgenommen (Schritt 4b). Die UPLC-HR-MS-Daten waren die Grundlage für eine Metabolomanalyse durch eine *principal component analysis* (PCA) (Schritt 5).

Um aktivitätsunabhängig Sekundärmetabolite in ST136450 zu identifizieren, deren Produktion bei Zugabe von GlcNAc geändert wird, wurde das Metabolom von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) verglichen. Hierzu wurden zunächst UPLC-HR-MS-Messungen der Methanol-Extrakte von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) durchgeführt (Abbildung 17, Schritt 4b). Die UPLC-HR-MS-Daten wurden mithilfe einer *principal component analysis* (PCA) ausgewertet (Abbildung 17, Schritt 5). Eine PCA ist eine statistische Methode, die die variabelsten Komponenten multidimensionaler Daten in

einem 2D-Plot darstellt und somit visuell fassbar macht (Dettmer *et al.*, 2007). Bezogen auf die Analyse von ST136450 ermöglichte die PCA, Aussagen darüber zu treffen, wie stark sich das Metabolom von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) ähnelte und welche Metabolite den größten Einfluss auf die Varianz des Metaboloms von ST136450 (+ GlcNAc) zu ST136450 (- GlcNAc) hatten.

Der *scatter plot* einer PCA (Abbildung 23) zeigt, wie stark die Varianz der Proben im Bezug auf ihre Bucket-Zusammensetzung ist. Die Extrakt-Replikate der einzelnen Proben bildeten aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit Cluster im *scatter plot*. Die Extrakte von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) bildeten hingegen eigenständige Cluster. Dies weist darauf hin, dass die GlcNAc-Zugabe zum Medium das Metabolom von ST136450 veränderte.

Durch eine Analyse des *loading plots* der PCA-Analyse (Abbildung 23) wurden jene Buckets identifiziert, die den größten Einfluss auf die Varianz der Extrakte bzw. das Clustering von ST136450 (+ GlcNAc) zu ST136450 (- GlcNAc) im *scatter plot* hatten. Buckets sind Retentionszeit-Masse/Ladung-Paare, denen eine Signalintensität zugeordnet wird. Verschiedene Signale einer Verbindung (z. B. gewöhnliche Addukte, Isotope, verschiedene Ladungszustände) sind in einem Bucket zusammengefasst. Im Idealfall repräsentiert jedes Bucket ein Metabolit.

Für eine genauere Betrachtung wurden jene Buckets priorisiert, die entweder ausschließlich in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) detektiert wurden oder deren Intensität in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) deutlich höher war als in den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc). Eine weitere Voraussetzung war, dass die Buckets nicht in der Medienkontrolle auftreten durften. Von allen so priorisierten Buckets wurden die UPLC-HR-MS-Rohdaten betrachtet, um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse der PCA mit den Rohdaten deckten. Auf Basis der Peakflächen extrahierter Ionen-Chromatogramme (EICs) wurde eine relative Quantifizierung der Verbindungen in den Extrakten (+ GlcNAc) und (- GlcNAc) durchgeführt.

Durch dieses Vorgehen wurden fünf Buckets identifiziert, die eine deutlich höhere Intensität in den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) hatten (Tabelle 9): Bucket 2_M: (3,65 min: m/z 723.4144 [M+H]⁺), Bucket 3_M: (3,64 min: m/z 885.4675 [M+H]⁺), Bucket 6_M: (3,50 min: m/z 871.4520 [M+H]⁺), Bucket 7_M: (2,52 min: m/z 571.3037 [M+H]⁺) und Bucket 8_M: (4,40 min: m/z 587.3407 [M+H]⁺).

Für Bucket 2_M (Anhang, Abbildung 36; Tabelle 9) wurde anhand der UPLC-HR-MS-Daten die Molekülformel $C_{31}H_{58}N_6O_{13}$ vorhergesagt. Gemäß der vorhergesagten Molekülformel könnte es sich bei dieser Verbindung um ein von Sekurova *et al.* (2016) isoliertes Glykoderivat von Desferrioxamin B ($C_{25}H_{48}N_6O_8$) (Anhang, Abbildung 62) handeln. Ein Vergleich der MS/MS-Fragmentierungsmuster von Bucket 2_M und Desferrioxamin B stand im Einklang mit dieser Vermutung (Abbildung 18). Der Betrag der Differenz zwischen theoretischem und gemessenem m/z -Wert ($\Delta m/z$) betrug 1,24 ppm und lag damit im Bereich der Massengenauigkeit des Massenspektrometers von etwa ≤ 2 ppm. Die relative Konzentration der Verbindung war in den Extrakten der GlcNAc-supplementierten Kulturen etwa 10-fach höher als in den Extrakten der unsupplementierten Kulturen (Tabelle 9, Abbildung 24).

Die für Bucket 3_M (Anhang, Abbildung 37; Tabelle 9) vorhergesagte Molekülformel ($C_{37}H_{68}N_6O_{18}$, $\Delta m/z = 1,36$) unterschied sich um eine $C_6H_{10}O_5$ -Einheit von Bucket 2_M. Ein Abgleich des MS/MS-Fragmentierungsmusters von Bucket 3_M mit den MS/MS-Fragmentierungsmustern von kommerziellem Desferrioxamin B und Bucket 2_M deutete darauf hin, dass es sich bei dieser Verbindung um ein zweifach glykosyliertes Derivat (zwei C_6 -Kohlenhydrate) von Desferrioxamin B handelte (Abbildung 18). Gemäß einer Literaturrecherche wurde bisher kein zweifach glykosyliertes Derivat von Desferrioxamin B beschrieben. In den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) wurde ein relatives Konzentrationsverhältnis der Verbindung von (+ GlcNAc): (- GlcNAc) = 11:1 bestimmt (Tabelle 9, Abbildung 24).

Da die Analyse von Bucket 2_M und Bucket 3_M darauf hindeutete, dass ST136450 unter GlcNAc-Einfluss verstärkt Glykoderivate von Desferrioxamin B synthetisiert, wurde überprüft, ob dies auch auf nicht glykosyliertes Desferrioxamin B ($C_{25}H_{48}N_6O_8$, $m/z_{\text{theoretisch}} 561.3606 [M+H]^+$) zutrifft. In den EICs bei $m/z 561.3606$ wurde eine Substanz mit einer Retentionszeit von etwa 3,7 min detektiert (Anhang, Abbildung 41). Ein Vergleich des MS/MS-Fragmentierungsmusters der Verbindung mit dem MS/MS-Fragmentierungsmuster von kommerziellem Desferrioxamin B zeigte eine hohe Übereinstimmung (Abbildung 19). Somit handelte es sich bei der detektierten Verbindung mit hoher Wahrscheinlichkeit um Desferrioxamin B. Die relative Konzentration von Desferrioxamin B war in den Extrakten der GlcNAc-supplementierten Kulturen etwa 5-fach höher als in den Extrakten der unsupplementierten Kulturen (Abbildung 24).

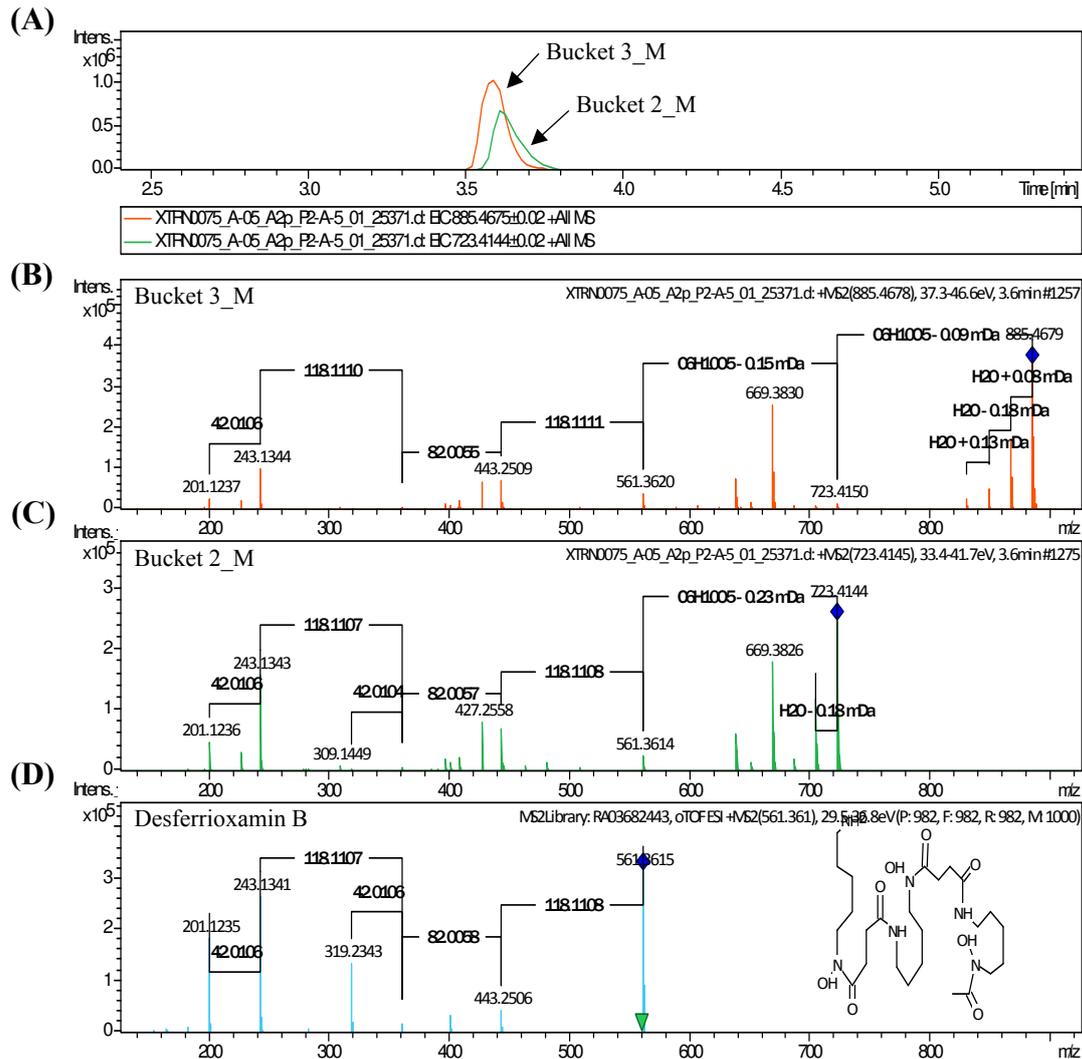


Abbildung 18: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 3_M und ST136450 (MeOH)_Bucket 2_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthält. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Methanol-Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten der Methanol-Extrakte wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Anhand der Metabolomanalyse wurde ermittelt, dass Bucket 3_M: (3,64 min: m/z 885.4675 $[M+H]^+$) und Bucket 2_M: (3,65 min: m/z 723.4144 $[M+H]^+$) in den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) in höherer Konzentration vorlagen als in den Methanol-Extrakten von ST136450 (- GlcNAc). Ein Methanol-Extrakt von ST136450 (+ GlcNAc) wurde durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)-(C). (A): Extrahiertes Ionenchromatogramm bei m/z 885.4675 (rot) und m/z 723.4144 (grün). (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 885.4678 $[M+H]^+$, RT = 3,6 min. (C): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 723.4145 $[M+H]^+$, RT = 3,6 min. (D): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von kommerziellem Desferrioxamin B. Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin B (m/z 561.361 $[M+H]^+$) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). In (B) und (C) konnten Fragmente detektiert werden, die für Desferrioxamin B (D) charakteristisch sind (z. B. m/z 443.3, m/z 243.1, m/z 201.1, m/z 361.2) (vgl. Anhang, Abbildung 61). Zudem wurde in (B) und (C) ein Fragment bei m/z 561.4 detektiert. Der m/z -Wert dieses Fragmentes stimmte mit dem m/z -Wert des Molekionenpeaks von Desferrioxamin B in (D) überein. Dies spricht dafür, dass es sich bei (B) und (C) um Derivate von Desferrioxamin B handelt. Die Signale bei m/z 723.4 und m/z 885.5 in (B) bzw. bei m/z 723.4 in (C) deuten darauf hin, dass (B) ein zweifach glykosyliertes und (C) ein einfach glykosyliertes Desferrioxamin-B-Derivat darstellt.

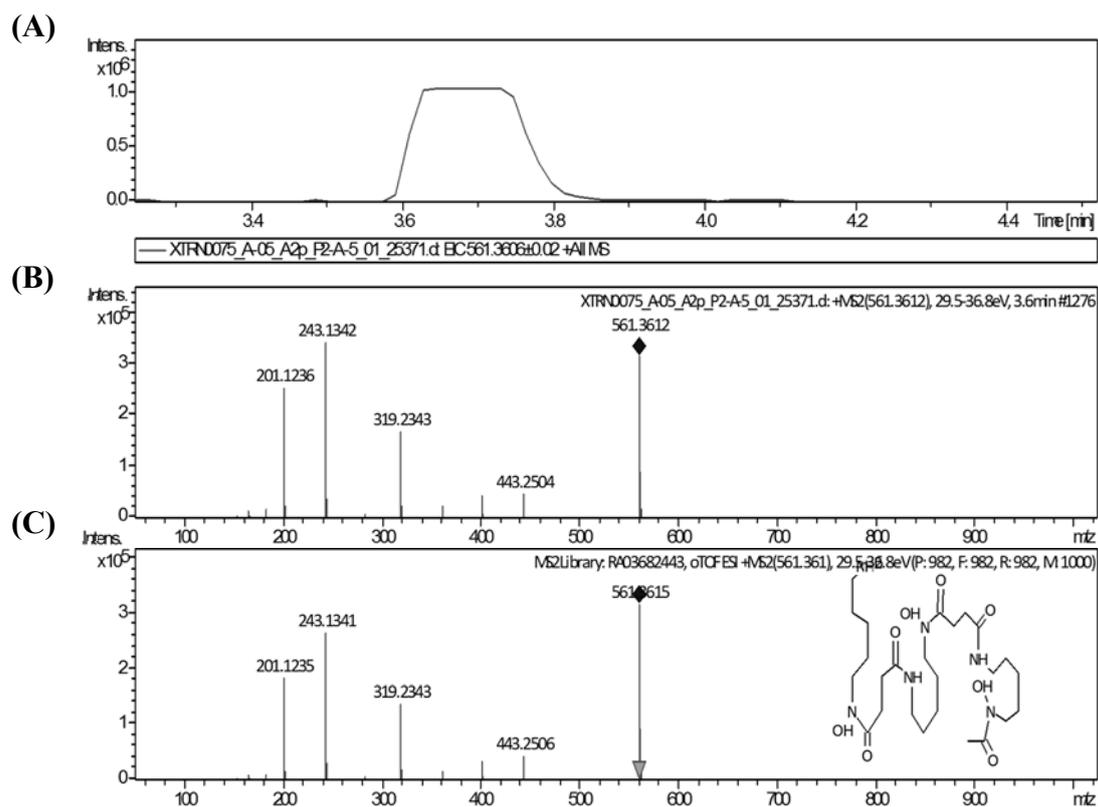


Abbildung 19: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Desferrioxamin B. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Ein Methanol-Extrakt von ST136450 (+ GlcNAc) wurde durch UPLC-HR-MS/MS analysiert, um zu überprüfen, ob Desferrioxamin B ($m/z_{\text{theoretisch}} 561.3606 [M+H]^+$) im Extrakt vorhanden war (A)-(B). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei $m/z 561.3606$. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 561.3612 [M+H]^+$, RT = 3,6 min. (C): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von kommerziellem Desferrioxamin B. Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin B ($m/z 561.361 [M+H]^+$) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). Die MS/MS-Fragmentierungsmuster in (B) und (C) zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung. Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Desferrioxamin B.

Bucket 6_M (3,50 min: $m/z 871.4520 [M+H]^+$) umfasste zwei Peaks mit einer Retentionszeit von etwa 3,3 min bzw. 3,5 min und identischer Masse (Anhang, Abbildung 38; Tabelle 9). Die Verbindungen wurden ausschließlich in den Extrakten (+ GlcNAc) und nicht in den Extrakten (- GlcNAc) detektiert (Tabelle 9, Abbildung 24). Anhand der UPLC-HR-MS-Daten wurde für die Verbindungen die Molekülformel $C_{36}H_{66}N_6O_{18}$ ($\Delta m/z = 1,61$ ppm) vorhergesagt. Die MS/MS-Fragmentierungsmuster der Verbindungen mit RT = 3,3 min bzw. RT = 3,5 min wiesen deutliche Unterschiede auf (Abbildung 20). Die Analyse der Fragmentierungsmuster deutete darauf hin, dass es sich um zweifach glykosylierte (zwei C6-Kohlenhydrate) Derivate verschiedener Desferrioxamin-A₁-Isomere handeln könnte. Die Substanzen mit RT = 3,3 min könnten ein Isomerengemisch aus zweifach glykosyliertem Desferrioxamin A₁ [010] und Desferrioxamin A₁ [100] darstellen, die Substanzen mit RT = 3,5 min ein Gemisch aus zweifach glykosylierten Derivaten von Desferrioxamin A₁ [001] und einem weiteren Isomer (vgl. nächsten Absatz). Desferrioxamin A₁ [010],

Desferrioxamin A₁ [100] und Desferrioxamin A₁ [001] sind Konstitutionsisomere ($m/z_{\text{theoretisch}} 547.3450 [M+H]^+$) mit der Summenformel C₂₄H₄₆N₆O₈ (Anhang, Abbildung 61) (Telfer *et al.*, 2016). Gemäß einer Literaturrecherche wurden glykosylierte Derivate von Desferrioxamin A₁ in der Literatur bisher nicht beschrieben. Alle Desferrioxamine, die im EIC bei m/z 871.4520 detektiert wurden, werden im Folgenden unter der Bezeichnung „zweifach glykosylierte Desferrioxamine 547“ zusammengefasst.

Da die Analyse von Bucket 6_M darauf hindeutete, dass ST136450 unter GlcNAc-Einfluss verstärkt Glyko-Derivate verschiedener Desferrioxamin-A₁-Isomere produzierte, wurde überprüft, ob dies auch auf die entsprechenden nicht glykosylierten Desferrioxamin-A₁-Isomere (C₂₄H₄₆N₆O₈, $m/z_{\text{theoretisch}} 547.3450 [M+H]^+$) zutrifft. In den EICs bei m/z 547.3450 traten zwei überlappende Peaks mit einer Retentionszeit von etwa 3,4 min bzw. 3,6 min auf (Anhang, Abbildung 42). Die MS/MS-Fragmentierungsmuster der Verbindungen mit RT = 3,4 min bzw. RT = 3,6 min deuteten darauf hin, dass es sich in beiden Fällen um Isomerengemische handelte (Abbildung 21). Das MS/MS-Fragmentierungsmuster der Verbindungen mit RT = 3,4 min zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem auf Basis wahrscheinlicher Bindungsbrüche vorhergesagten MS/MS-Fragmentierungsmuster eines Isomerengemisches aus Desferrioxamin A₁ [010] und Desferrioxamin A₁ [100] (Anhang, Abbildung 61) (Telfer *et al.*, 2016). Das MS/MS-Fragmentierungsmuster der Verbindungen mit RT = 3,6 min wies alle Fragmente auf, die für Desferrioxamin A₁ [001] auf Basis der Struktur vorhergesagt wurden (Anhang, Abbildung 61) (Telfer *et al.*, 2016). Zusätzlich wurden jedoch die Fragmente m/z 227.1390 und m/z 319.2342 detektiert. Diese beiden Fragmente ließen sich durch die Struktur von Desferrioxamin A₁ [001] nicht erklären. Dies wirft die Hypothese auf, dass es sich bei den Verbindungen mit RT = 3,6 min um ein Gemisch aus Desferrioxamin A₁ [001] und einem weiteren Isomer handelte. Alle Desferrioxamine, die im EIC bei m/z 547.3450 detektiert wurden, werden im Folgenden unter der Bezeichnung „Desferrioxamine 547“ zusammengefasst. Aufgrund der unvollständigen Trennung der Verbindungen mit RT = 3,4 min und RT = 3,6 min im EIC wurde die summierte Peakfläche beider Peaks für die relative Quantifizierung der Verbindungen in den Methanol-Extrakten herangezogen. In den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) lag ein relatives Konzentrationsverhältnis der Desferrioxamine 547 von (+ GlcNAc): (- GlcNAc) = 8:1 vor (Abbildung 24).

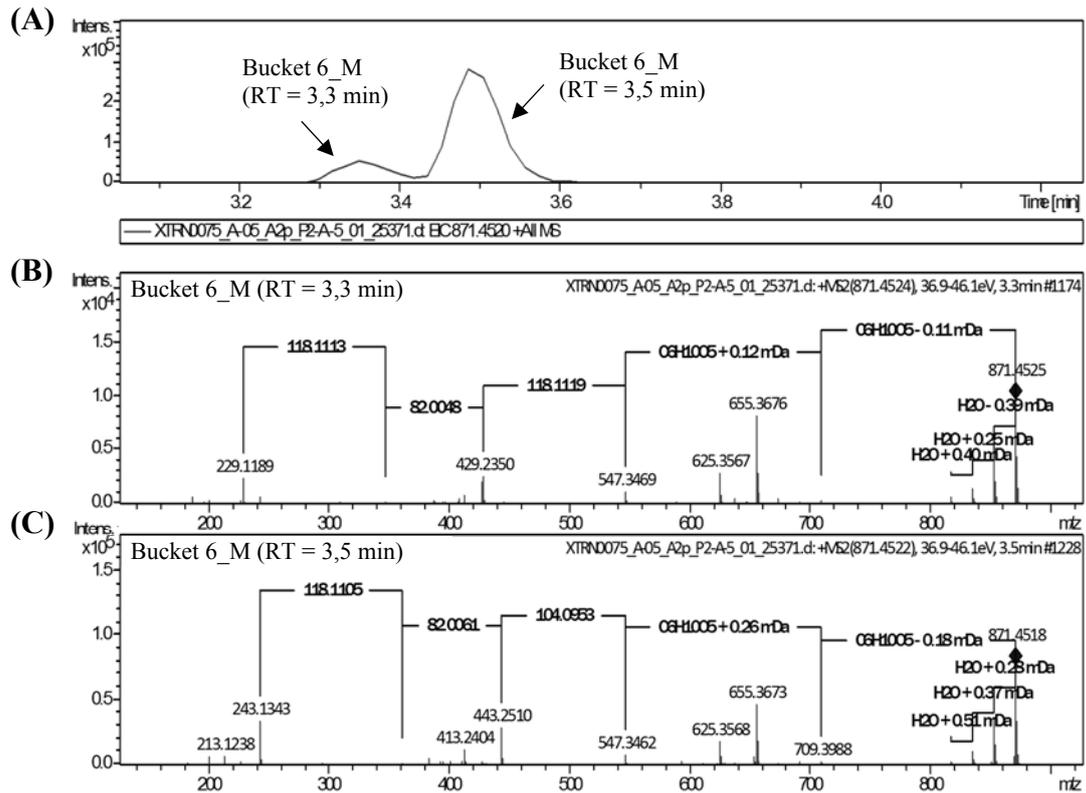


Abbildung 20: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH) Bucket 6_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikat. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Anhand der Metabolomanalyse wurde ermittelt, dass Bucket 6_M: (3,50 min: m/z 871.4520 $[M+H]^+$) in den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) in höherer Konzentration vorlag als in den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc). Ein Methanol-Extrakt von ST136450 (+ GlcNAc) wurde durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)-(C). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 871.4520. Es waren zwei Peaks mit einer Retentionszeit von 3,3 bzw. 3,5 min detektierbar. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster von Verbindungen mit m/z 871.4524 $[M+H]^+$, RT = 3,3 min. (C): MS/MS-Fragmentierungsmuster von Verbindungen mit m/z 871.4522 $[M+H]^+$, RT = 3,5 min. Das Fragmentierungsmuster in (B) und (C) unterschied sich deutlich. Das Fragmentierungsmuster in (B) und das Fragmentierungsmuster eines putativen Isomerengemisches aus Desferrioxamin A₁ [010] und Desferrioxamin A₁ [100] (Abbildung 21, B) wiesen gemeinsame Fragmente auf (z. B. m/z 229.1; m/z 429.2; m/z 347.2). Zudem wurde in (B) ein Fragment bei m/z 547.3 detektiert. Der m/z -Wert dieses Fragmentes stimmte mit dem m/z -Wert des Molekülionenpeaks von Desferrioxamin A₁ [010]/Desferrioxamin A₁ [100] überein (Abbildung 21, B). Dies spricht dafür, dass es sich bei (B) um Derivate eines Isomerengemisches aus Desferrioxamin A₁ [010]/Desferrioxamin A₁ [100] handelt. Die Fragmente bei m/z 709.4 und m/z 871.5 deuten darauf hin, dass (B) ein zweifach glykosyliertes Derivat (zwei Hexosen) von Desferrioxamin A₁ [010]/Desferrioxamin A₁ [100] darstellt. Das Fragmentierungsmuster in (C) und das Fragmentierungsmuster eines putativen Gemisches aus Desferrioxamin A₁ [001] und einem weiteren Isomer (Abbildung 21, C) wiesen deutliche Gemeinsamkeiten auf (z. B. m/z 243.1, m/z 361.2, m/z 443.3). Zudem wurde in (C) ein Fragment bei m/z 547.3 detektiert. Der m/z -Wert dieses Fragmentes stimmte mit dem m/z -Wert des Molekülionenpeaks der putativen Desferrioxamin-A₁-Isomere (Abbildung 21, C) überein. Dies spricht dafür, dass es sich bei (C) um Derivate eines Gemisches aus Desferrioxamin A₁ [001] und einem weiteren Isomer handelt. Die Fragmente bei m/z 709.4 und m/z 871.5 deuten darauf hin, dass (C) ein Gemisch eines zweifach glykosylierten Derivates (zwei Hexosen) von Desferrioxamin A₁ [001] und einem weiteren Isomer darstellt.

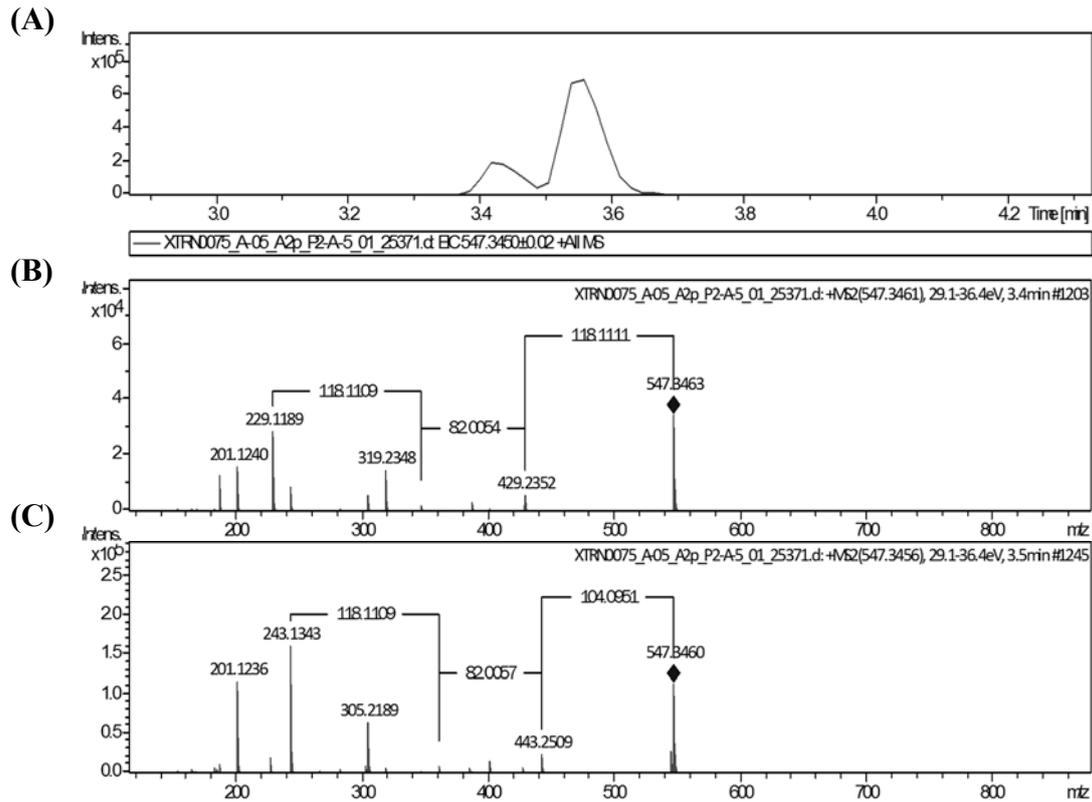


Abbildung 21: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH) Desferrioxamine 547. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur Detektion von Desferrioxaminen mit $m/z_{\text{theoretisch}} 547.3450 [M+H]^+$ wurde ein Extrakt von ST136450 (+ GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)-(C). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei $m/z 547.3450$. Es konnten zwei Peaks mit einer Retentionszeit von 3,4 min bzw. 3,5 min detektiert werden. (B): MS/MS-Fragmentierung von Verbindungen mit $m/z 547.3461 [M+H]^+$, RT = 3,4 min. (C): MS/MS-Fragmentierung von Verbindungen mit $m/z 547.3456 [M+H]^+$, RT = 3,5 min. Die MS/MS-Fragmentierungsmuster in (B) und (C) unterschieden sich deutlich. Das MS/MS-Fragmentierungsmuster in (B) zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem auf Basis wahrscheinlicher Bindungsbrüche vorhergesagten MS/MS-Fragmentierungsmuster eines Isomerengemisches aus Desferrioxamin A₁ [010] und Desferrioxamin A₁ [100] (Anhang, Abbildung 61). Das MS/MS-Fragmentierungsmuster in (C) wies alle Fragmente auf, die auf Basis der Struktur von Desferrioxamin A₁ [001] vorhergesagt wurden. Zusätzlich wurden in (C) jedoch die Fragmente $m/z 227.1390$ und $m/z 319.2342$ detektiert. Diese beiden Fragmente ließen sich durch die Struktur von Desferrioxamin A₁ [001] (Anhang, Abbildung 61) nicht erklären. Dies wirft die Hypothese auf, dass es sich um ein Gemisch aus Desferrioxamin A₁ [001] und einem weiteren Isomer handelte.

Die für Bucket 8_M (4,40 min: $m/z 587.3407 [M+H]^+$) (Anhang, Abbildung 40; Tabelle 9) vorhergesagte Molekülformel ($C_{26}H_{46}N_6O_9$, ($\Delta m/z = 1,36$ ppm)) stimmte mit der Molekülformel von Desferrioxamin D₂ überein. Das MS/MS-Fragmentierungsmuster der Verbindung (Abbildung 22) zeigte eine sehr gute, aber nicht vollständige Übereinstimmung mit dem von Jadhav und Dorrestein (2017) veröffentlichten MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin D₂. Das Fragmentierungsmuster von Bucket 8_M wies ein zusätzliches Fragment bei $m/z 243.1345$ auf. Das Desferrioxamin wird im Folgenden als Desferrioxamin 587 bezeichnet. Die relative Konzentration der Verbindung war in den Extrakten der GlcNAc-supplementierten Kulturen etwa 3-fach höher als in den Extrakten der unsupplementierten Kulturen (Tabelle 9, Abbildung 24).

Für das fünfte durch die PCA priorisierte Bucket, Bucket 7_M: (2,52 min: m/z 571.3037 $[M+H]^+$) (Anhang, Abbildung 39; Tabelle 9), wurde anhand der UPLC-HR-MS-Daten die Molekülformel $C_{32}H_{38}N_6O_4$ ($\Delta m/z = 1,75$ ppm) vorhergesagt. Durch eine Literaturrecherche und einen Abgleich der Molekülformel mit dem Dictionary of Natural Products (Version 27.2) konnte diesem Bucket keine bekannte Verbindung zugeordnet werden. Das relative Konzentrationsverhältnis der Verbindung in den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) betrug (+ GlcNAc): (- GlcNAc) = 5:1 (Tabelle 9). In einer nachfolgenden UPLC-HR-MS/MS-Messung war die Substanz nur noch sehr schwach detektierbar. Dies lässt vermuten, dass es sich um eine instabile Substanz handelte.

Zusammenfassend deutete die Metabolomanalyse der Extrakte von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) darauf hin, dass die Zugabe von GlcNAc ins Medium zu einer gesteigerten Produktion mehrerer Desferrioxamine führte. Unter den Desferrioxaminen befanden sich einige putative glykosylierte Desferrioxamine, die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurden.

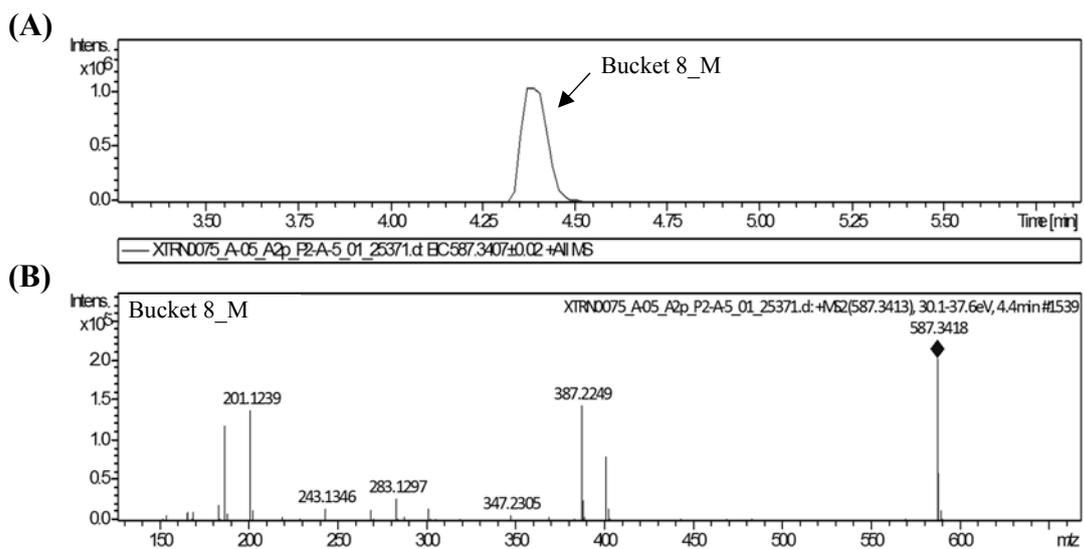
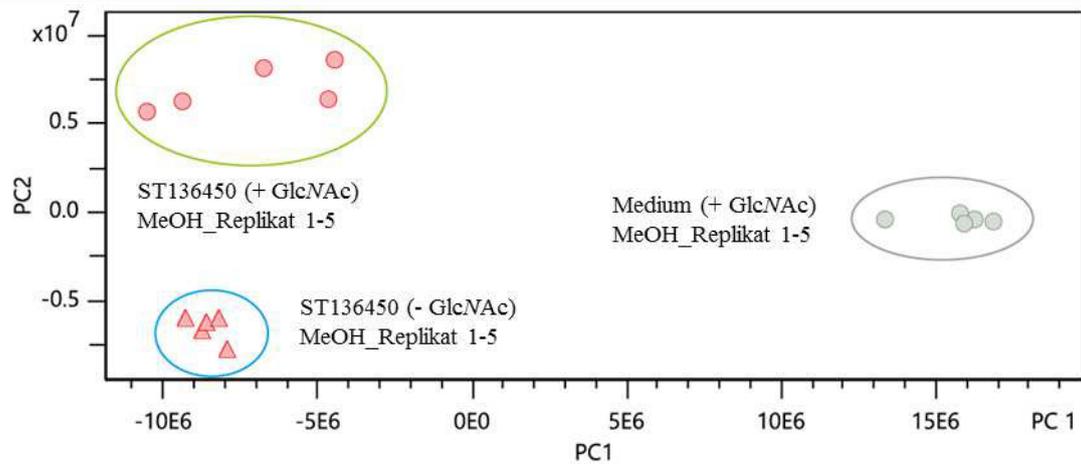


Abbildung 22: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 8_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Methanol-Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Anhand der Metabolomanalyse wurde ermittelt, dass Bucket 8_M: (4,40 min: m/z 587.3407 $[M+H]^+$) in den Methanol-Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) in höherer Konzentration vorlag als in den Methanol-Extrakten von ST136450 (- GlcNAc). Ein Methanol-Extrakt von ST136450 (+ GlcNAc) wurde durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)-(B). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 587.3407. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 587.3413 $[M+H]^+$, RT = 4,4 min. Das MS/MS-Fragmentierungsmuster in (B) zeigte eine sehr gute, aber nicht vollständige Übereinstimmung mit dem von Jadhav und Dorrestein (2017) veröffentlichten MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin D₂. Das Fragmentierungsmuster in (B) wies ein zusätzliches Fragment bei m/z 243.1345 auf.

(A)



(B)

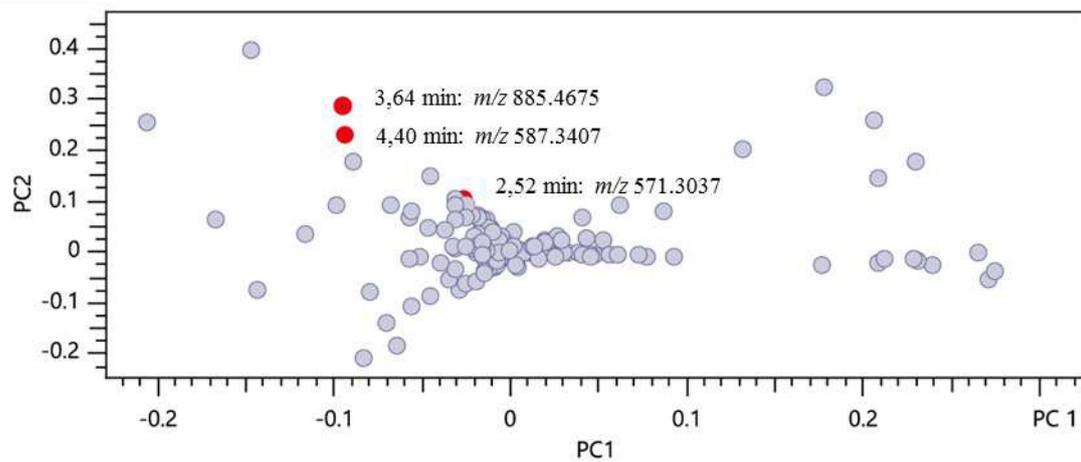


Abbildung 23: Metabolomanalyse von ST136450. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten der Methanol-Extrakte von ST136450 wurde eine *principal component analysis* (PCA) basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Es wurden die Daten von jeweils fünf Extraktions-Replikaten pro Bedingung (Replikate 1-5) in die Analyse einbezogen. Der *scatter plot* (A) zeigte, dass die Extrakte von ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) separate Cluster bildeten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die GlcNAc-Zugabe zum Medium einen Einfluss auf das Metabolom von ST136450 hatte. Der zugehörige *loading plot* (B) zeigte, welche Buckets den größten Einfluss auf die Varianz der Extrakte hatten. Jeder Punkt steht für ein Bucket. Buckets, die ausschließlich oder in höherer Intensität in den Extrakten (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten (- GlcNAc) detektiert wurden, sind rot hervorgehoben (zu weit im Zentrum gelegene Buckets überlagerten sich optisch zu stark für eine Markierung). PC1: *principal component* 1; PC2: *principal component* 2. Durch die PCA-Analyse wurden fünf Buckets identifiziert, die in erhöhter Intensität in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) (im Vergleich zu ST136450 (- GlcNAc)) vorkamen. Bei vier der fünf Buckets handelte es sich wahrscheinlich um Desferrioxamine.

Tabelle 9: Metabolomanalyse von ST136450. Die Tabelle zeigt jene Buckets, die gemäß den Ergebnissen der *principal component analysis* (PCA) ausschließlich oder in deutlich höherer Intensität in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) detektiert wurden. RT: Retentionszeit; Vorhergesagte Molekülformel: die Molekülformel wurde auf Basis der UPLC-HR-MS-Daten mit der SmartFormula-Funktion von DataAnalysis vorhergesagt; $\Delta m/z$ (ppm): Betrag der Differenz zwischen dem berechneten m/z der vorhergesagten Molekülionenformel $[M+H]^+$ und dem m/z des Buckets $[M+H]^+$ in *parts per million*; Peakfläche: Für die Peakflächenbestimmung wurden die extrahierten Ionen-Chromatogramme von m/z Bucket $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ (Molekülionenpeak) herangezogen. - GlcNAc: Extrakte von ST136450 (- GlcNAc); + GlcNAc: Extrakte von ST136450 (+ GlcNAc). Faktor Peakfläche: Quotient aus Peakfläche der Proben ST136450 (+ GlcNAc) und Peakfläche der Proben ST136450 (- GlcNAc); n. b.: nicht bestimmt; G-DesfB: einfach glykosyliertes Desferrioxamin B; D-G-DesfB: zweifach glykosyliertes Desferrioxamin B; D-G-Desf547: zweifach glykosylierte Desferrioxamine 547; Desf587: Desferrioxamin 587. Durch die PCA-Analyse wurden fünf Buckets identifiziert, die in erhöhter Intensität in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) (im Vergleich zu ST136450 (- GlcNAc)) vorkamen. Bei vier der fünf Buckets handelte es sich wahrscheinlich um Desferrioxamine.

Name Bucket	Mögliche Identität	RT Bucket [min]	m/z Bucket $[M+H]^+$	Vorhergesagte Molekülformel	m/z theoretisch $[M+H]^+$	$\Delta m/z$ (ppm)	Peakfläche - GlcNAc	Peakfläche + GlcNAc	Faktor Peakfläche
2_M	G-DesfB	3,65	723.4144	C ₃₁ H ₅₈ N ₆ O ₁₃	723.4135	1,24	7,3E+05 ($\sigma = 1,9E+05$)	7,4E+06 ($\sigma = 1,4E+06$)	10
3_M	D-G-DesfB	3,64	885.4675	C ₃₇ H ₆₈ N ₆ O ₁₈	885.4663	1,36	9,4E+05 ($\sigma = 2,7E+05$)	1,0E+07 ($\sigma = 2,0E+06$)	11
6_M	D-G-Desf547	3,50	871.4520	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₁₈	871.4506	1,61	0	2,1E+06 ($\sigma = 4,7E+05$)	n. b.
7_M		2,52	571.3037	C ₃₂ H ₃₈ N ₆ O ₄	571.3027	1,75	4,8E+06 ($\sigma = 5,8E+05$)	2,6E+07 ($\sigma = 2,9E+06$)	5
8_M	Desf587	4,40	587.3407	C ₂₆ H ₄₆ N ₆ O ₉	587.3399	1,36	9,8E+06 ($\sigma = 1,6E+06$)	3,2E+07 ($\sigma = 4,4E+06$)	3

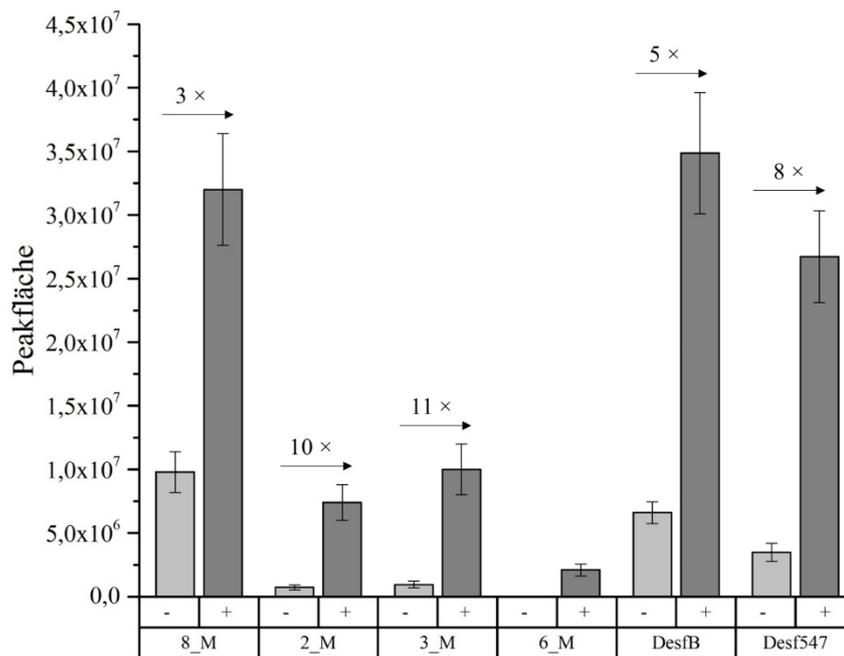


Abbildung 24: Gesteigerte Produktion mehrerer Desferrioxamine durch GlcNAc-Zugabe zum Wachstumsmedium von ST136450. Der Stamm ST136450 wurde in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von GlcNAc kultiviert. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse erstellt. Hiermit wurden Buckets ausfindig gemacht, die nur oder in höherer Intensität in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) auftraten. Hierzu gehörten Bucket 2_M, Bucket 3_M, Bucket 6_M und Bucket 8_M. Anhand von UPLC-HR-MS/MS-Daten wurde ermittelt, dass es sich bei allen vier Buckets wahrscheinlich um Desferrioxamine handelte (Bucket 2_M: einfach glykosyliertes Desferrioxamin B; Bucket 3_M: zweifach glykosyliertes Desferrioxamin B; Bucket 6_M: zweifach glykosylierte Desferrioxamine 547; Bucket 8_M: Desferrioxamin 587). Anhand der UPLC-HR-MS-Daten (Anhang, Abbildung 36-Abbildung 42) erfolgte eine relative Quantifizierung der Buckets in den Extrakten (+ GlcNAc) und (- GlcNAc). Dabei dienen die Peakflächen in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen von m/z Bucket $[M+H]^+$ und m/z Bucket $[M+Na]^+$ (Molekülionenpeak) als Maß für die relative Konzentration der Buckets in den Extrakten. Unabhängig von den Ergebnissen der PCA-basierten Metabolomanalyse wurden weitere Desferrioxamine identifiziert, deren Produktion unter GlcNAc-Einfluss erhöht war. Hierbei handelte es sich um Desferrioxamin B (DesfB) und die Desferrioxamine 547 (Desf547). Die relative Quantifizierung der Desferrioxamine 547 erfolgte auf Basis der Peakflächen in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z 547.3450 $[M+H]^+$ und m/z 569.3269 $[M+Na]^+$. Im Falle von Desferrioxamin B wurden die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z 562.3636 $[M+H]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität) für die relative Quantifizierung herangezogen. -: Kultivierung in Abwesenheit von GlcNAc; +: Kultivierung in Anwesenheit von GlcNAc. Die Zahlen über den Pfeilen geben den Quotienten der Peakfläche der Proben ST136450 (+ GlcNAc) und ST136450 (- GlcNAc) an. Die Daten zeigten, dass die Zugabe von GlcNAc zum Medium von ST136450 die Produktion mehrerer Desferrioxamine erhöhte.

4.2.3 Stark ausgeprägte Gram-negative Aktivität von DSM44150 im Topagar-Screening, jedoch fehlende Gram-negative Aktivität im Kulturextrakt

Um zu analysieren, ob DSM44150 (*Kibdelosporangium aridum*) bei Wachstum unter GlcNAc-Einfluss die Biosynthese einzelner Sekundärmetabolite steigert, wurde der Stamm analog zu ST136450 bearbeitet (vgl. Abschnitt 4.2.2). Nach vier bzw. sechs Tagen Wachstum des Stammes auf Agarplatten mit/ohne GlcNAc wurde ein Topagar-Screening durchgeführt. An Tag 4 hatte sowohl DSM44150 (+ GlcNAc) als auch DSM44150 (- GlcNAc) eine schwache Aktivität gegen *S. aureus* ATCC25923. Eine Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853 war nicht detektierbar. An Tag 6 wies DSM44150 nur dann eine Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853 und *S. aureus* ATCC25923 auf, wenn der Stamm unter Einfluss von GlcNAc gewachsen war (Abbildung 25). Dies deutete darauf hin, dass GlcNAc in DSM44150 einen positiven Einfluss auf die Biosynthese anti-Gram-negativer Sekundärmetabolite hatte.

Agarplatten, auf denen DSM44150 (+ GlcNAc) bzw. DSM44150 (- GlcNAc) sechs Tage lang kultiviert worden war, wurden gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Keines der Extrakte wies im MTT-Test eine Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853, *E. coli* ATCC35218 oder *S. aureus* ATCC25923 auf. Die fehlende Extrakt-Aktivität könnte beispielsweise auf eine geringe Stabilität oder schlechte Extrahierbarkeit der aktiven Substanz(en) zurückzuführen sein. Eine PCA-Analyse, die ausgehend von den UPLC-HR-MS-Messungen von DSM44150 (+ GlcNAc) und DSM44150 (- GlcNAc) durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt), deutete darauf hin, dass sich das Metabolom ohne und mit GlcNAc-Zugabe zum Wachstumsmedium stark ähnelte. Anhand der Metabolomanalyse wurde ein Bucket identifiziert, das ausschließlich in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) vorkam (0,68 min: m/z 525.1869 [M+H]⁺). In einer nachfolgenden UPLC-HR-MS/MS-Messung war diese Substanz nicht mehr detektierbar, sodass von einer geringen Stabilität der Substanz auszugehen ist. Es wurden keine weiteren Buckets identifiziert, die in signifikant höherer Intensität in den Proben mit GlcNAc im Vergleich zu den Proben ohne GlcNAc detektiert wurden.

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse des Topagar-Screenings mit DSM44150. Der Stamm DSM44150 wurde auf Agarplatten mit/ohne GlcNAc (+ GlcNAc/- GlcNAc) gespottet und vier bzw. sechs Tage (Tag 4, Tag 6) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ein Topagar-Screening durchgeführt, um eine Produktion von antibakteriellen Substanzen zu detektieren. Als Screeningorganismen wurden *P. aeruginosa* ATCC27853 und *S. aureus* ATCC25923 eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Screeningmedien verwendet (ISP2, MH). +: schwach wachstumshemmende Wirkung; ++: stark wachstumshemmende Wirkung; -: keine wachstumshemmende Wirkung; n. b.: nicht bestimmt. Nach vier Tagen Wachstum von DSM44150 wurde im Topagar-Screening eine schwache wachstumshemmende Wirkung des Stammes auf *S. aureus* ATCC25923 detektiert, unabhängig davon, ob DSM44150 auf Medium mit oder ohne GlcNAc gewachsen war und unabhängig vom verwendeten Screeningmedium. Nach sechs Tagen Wachstum von DSM44150 (+ GlcNAc) konnte eine starke wachstumshemmende Wirkung des Stammes auf *P. aeruginosa* ATCC27853 und *S. aureus* ATCC25923 detektiert werden. Auch diese Beobachtung konnte unabhängig vom verwendeten Screeningmedium gemacht werden. DSM44150 (- GlcNAc) zeigte an Tag sechs keine wachstumshemmende Wirkung auf die Screeningorganismen. Eine mitgeführte Medienkontrolle, die GlcNAc enthält, hatte keinen inhibierenden Effekt auf die Screeningorganismen.

	<i>P. aeruginosa</i> MH	<i>P. aeruginosa</i> ISP2	<i>S. aureus</i> MH	<i>S. aureus</i> ISP2
DSM44150				
Tag 4, + GlcNAc	-	n. b.	+	+
Tag 4, - GlcNAc	-	n. b.	+	+
Tag 6, + GlcNAc	++	++	++	++
Tag 6, - GlcNAc	-	-	-	-
Medienkontrollen	-	-	-	-

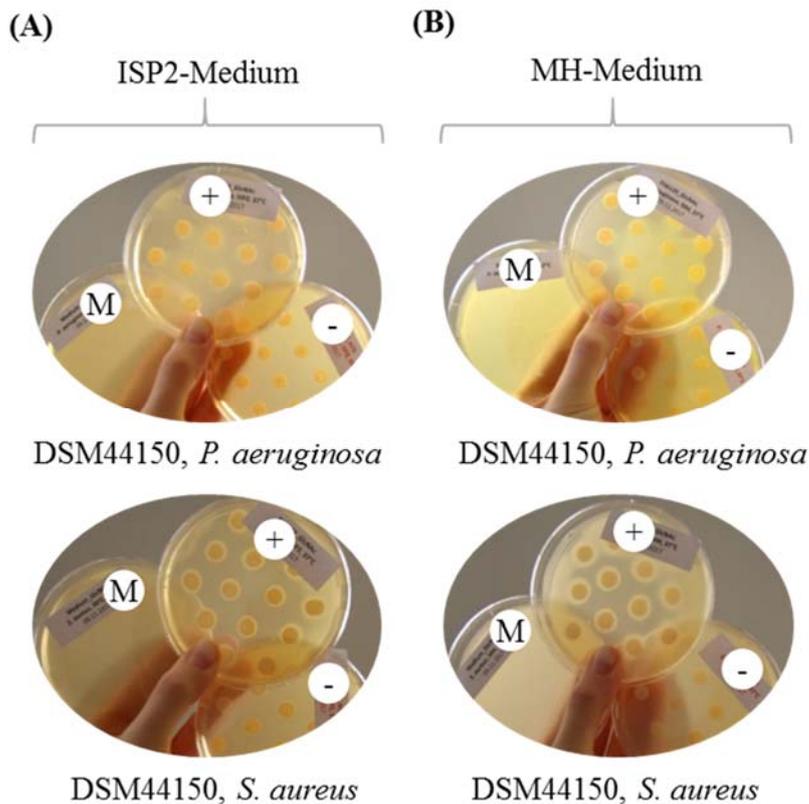


Abbildung 25: Ergebnisse des Topagar-Screenings von DSM44150. Der Stamm DSM44150 wurde auf Agarplatten mit bzw. ohne GlcNAc gespottet und sechs Tage inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde ein Topagar-Screening mit den Screeningorganismen *P. aeruginosa* ATCC27853 und *S. aureus* ATCC25923 durchgeführt. +: DSM44150 (+ GlcNAc); -: DSM44150 (- GlcNAc); M: Medienkontrolle mit GlcNAc. Das Topagar-Screening wurde mit zwei verschiedenen Screeningmedien (ISP2 (A) und MH (B)) durchgeführt. In beiden Screeningmedien hemmte DSM44150 (+ GlcNAc) das Wachstum von *P. aeruginosa* ATCC27853 und *S. aureus* ATCC25923 deutlich. DSM44150 (- GlcNAc) hatte keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Screeningorganismen.

4.3 Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien

In der Literatur wurde für einzelne Actinobakterien beschrieben, dass die Zugabe von GlcNAc in das Kultivierungsmedium die Sekundärmetabolit-Biosynthese steigert (vgl. Abschnitt 1.4.3.1). In dem zuvor dargestellten Projekt gehörte GlcNAc unter 18 getesteten Signalmolekülen zu den Verbindungen, deren Zugabe in das Wachstumsmedium von Actinobakterien am häufigsten eine verstärkte Bioaktivität der Stämme anregte. Auf Basis des Literaturwissens und der Ergebnisse des vorherig durchgeführten Projektes wurde GlcNAc als Signalmolekül für ein zweites Projekt ausgewählt. Durch dieses Projekt sollten weitere Sekundärmetabolite in Actinobakterien identifiziert werden, deren Produktion durch GlcNAc-Zugabe zum Medium moduliert wird.

4.3.1 Stammauswahl durch BOX-Fingerprints

Bei den 209 Stämmen, die für dieses Projekt in Betracht gezogen wurden, handelte es sich um Actinobakterien, deren genaue phylogenetische Zuordnung unbekannt war. Unklar war dementsprechend auch, ob sich unter den 209 Stämmen Stammduplikate befanden. Um mögliche Stammduplikate vor der Durchführung des Projektes auszusortieren, wurden von allen Stämmen BOX-DNA-Fingerprints angefertigt (Anhang, Abbildung 60). Bei 141 der 209 Stämme ergab die BOX-PCR aussagekräftige Fingerprints. Die Fingerprints wurden anhand ihrer Ähnlichkeit geclustert. Während sich die Fingerprints der meisten Stämme deutlich voneinander unterschieden, wurden sieben Stammgruppen mit sehr ähnlichen Fingerprints identifiziert. Aus jeder dieser Stammgruppen wurde nur je ein Stamm für das Kultivierungsprojekt mit GlcNAc ausgewählt, alle weiteren Stämme der Stammgruppe wurden aussortiert. Hieraus ergab sich für die Durchführung weiterer Versuche ein Set aus 200 Stämmen.

4.3.2 Eine Kultivierung von Actinobakterien unter GlcNAc-Einfluss führte zu einer erhöhten Bioaktivität von 22 Kulturextrakten

Die verbliebenen 200 Stämme wurden sowohl in GlcNAc-supplementiertem ISP2-Medium als auch in ISP2-Medium ohne GlcNAc in Erlenmeyerkolben kultiviert. Aufgrund der hohen Probenanzahl erfolgte die Kultivierung in Einfachbestimmung. Im Folgenden werden

Stämme, die mit bzw. ohne GlcNAc-Zugabe gewachsen sind, mit dem Zusatz (+ GlcNAc) bzw. (- GlcNAc) gekennzeichnet.

Nach einer Wachstumszeit von sieben Tagen wurden die Kulturen gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden in drei verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich einer antibakteriellen Aktivität gegen die Gram-negativen Screeningorganismen *E. coli* ATCC35218, *E. coli* ATCC25922 $\Delta tolC$, *P. aeruginosa* ATCC27853 und die Gram-positiven Screeningorganismen *S. aureus* ATCC25923 und *M. smegmatis* ATCC607 getestet.

Die generierten Bioaktivitäts-Daten wurden vergleichend zwischen den Proben mit/ohne GlcNAc ausgewertet. Dazu wurden folgende Kriterien angesetzt:

- 1.) Das Extrakt der GlcNAc-supplementierten Kultur musste in der mittleren getesteten Konzentrationsstufe eine relative Wachstumsinhibierung von mindestens 80 % aufweisen.
- 2.) Die Differenz der relativen Wachstumsinhibierung der Extrakte von GlcNAc-supplementierter und nicht supplementierter Kultur musste in zwei Extrakt-Verdünnungsstufen mindestens 70 Prozentpunkte betragen.

Diese Kriterien wurden von insgesamt 22 Extrakten erfüllt, was etwa 12 % der prozessierten Stämme entspricht. Am häufigsten hatten die Extrakte (+ GlcNAc) eine im Vergleich zu den Extrakten (- GlcNAc) verstärkte Aktivität gegen die Gram-positiven Stämme *S. aureus* ATCC25923 und *M. smegmatis* ATCC607 (10 bzw. 6 Extrakte). Selten wurde eine verstärkte Aktivität gegen Gram-negative Screeningorganismen detektiert: Ein Extrakt (+ GlcNAc) hatte eine erhöhte Aktivität gegen *E. coli* ATCC35218, ein weiteres Extrakt eine erhöhte Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853. Jeweils zwei Extrakte (+ GlcNAc) wiesen eine gesteigerte Aktivität gegen *E. coli* ATCC35218 (in M9-Medium) bzw. *E. coli* ATCC25922 $\Delta tolC$ auf (Abbildung 26).

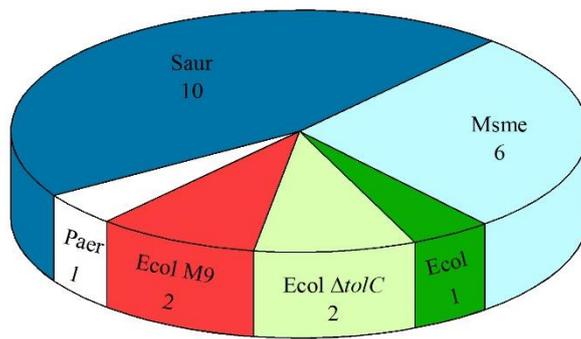


Abbildung 26: Effekt von GlcNAc auf die Bioaktivität von Kulturextrakten. 200 Actinobakterien wurden in ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (-GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+GlcNAc) enthielt. Nach einer Wachstumszeit von einer Woche wurden die Kulturen gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Es wurde getestet, ob die Extrakte eine antibakterielle Aktivität gegen einen der folgenden Screeningstämme haben: *E. coli* ATCC35218, *E. coli* ATCC25922 $\Delta tolC$, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. aureus* ATCC25923 und *M. smegmatis* ATCC607. Bei der Aktivitätstestung wurden drei verschiedene Extraktkonzentrationen getestet. Wenn nicht anders angegeben, wurde MH als Screeningmedium verwendet. Für eine weitere Bearbeitung wurden jene Actinobakterien in Betracht gezogen, die bei mindestens einem Screeningstamm folgende Kriterien erfüllten: 1.) Das Extrakt der GlcNAc-supplementierten Kultur musste in der mittleren getesteten Konzentrationsstufe mindestens eine prozentuale relative Wachstumsinhibierung von 80 % haben. 2.) Die Differenz der prozentualen relativen Wachstumsinhibierung der Extrakte von GlcNAc-supplementierter und nicht supplementierter Kultur musste in zwei Konzentrationsstufen mindestens 70 Prozentpunkte betragen. Dargestellt ist die Anzahl an Actinobakterien, die Kriterium 1 und 2 bei einem der aufgeführten Screeningstämme erfüllten. Kein Stamm erfüllte die Kriterien für mehrere Screeningstämme. Saur: *S. aureus* ATCC25923, Msme: *M. smegmatis* ATCC607, Ecol: *E. coli* ATCC35218, Ecol $\Delta tolC$: *E. coli* ATCC25922 $\Delta tolC$, Ecol M9: *E. coli* ATCC35218 in M9-Screeningmedium, Paer: *P. aeruginosa* ATCC27853. 22 der 200 Actinobakterien erfüllten Kriterium 1 und 2. Die meisten GlcNAc-bedingten Aktivitätssteigerungen wurden gegen *S. aureus* ATCC25923 und *M. smegmatis* ATCC607 detektiert.

4.3.3 Analyse des Einflusses von GlcNAc auf den Sekundärmetabolismus von FH1286, HAG010024 und HAG010252

Drei der 22 Actinobakterien, bei denen Effekte von GlcNAc auf die Bioaktivität in Einfachbestimmung beobachtet werden konnten, wurden detaillierter im Hinblick auf die Beeinflussung des Sekundärmetabolismus durch GlcNAc untersucht. Bei den drei ausgewählten Stämmen handelte es sich um die Streptomyceten FH1286, HAG010024 und HAG010252. Diese Stämme wurden in Triplikaten in Medium mit/ohne Zugabe von GlcNAc kultiviert. Nach einwöchiger Inkubation wurden die gefriergetrockneten Kulturen mit Methanol extrahiert.

Die Extrakte wurden erneut in drei verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich einer antibakteriellen Aktivität gegen die Screeningorganismen *E. coli* ATCC35218, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. aureus* ATCC25923 und *M. smegmatis* ATCC607 getestet. Um die Substanzen zu identifizieren, die für die gesteigerte Bioaktivität der Extrakte (+GlcNAc) verantwortlich waren, wurde je ein Extrakt (+GlcNAc) der drei Actinobakterien durch UPLC aufgetrennt und Fraktionen des Extraktes in einer 384-well-Platte gesammelt.

Die Fraktionen wurden erneut im Hinblick auf eine antibakterielle Aktivität gegen einen ausgewählten Screeningorganismus getestet. Anhand von UPLC-HR-MS/MS-Daten wurde analysiert, welche Sekundärmetabolite in den aktiven Fraktionen vorhanden waren.

Weiterhin wurden UPLC-HR-MS-Messungen aller drei Extrakte-Replikate vorgenommen, um eine relative Quantifizierung der aktiven Substanzen in den Extrakten (+ GlcNAc) und (- GlcNAc) zu ermöglichen. Die relative Quantifizierung erfolgte auf Basis der Peakflächen entsprechender EICs bzw. UV-Chromatogramme. Die Peakfläche der Extrakt-Replikate (- GlcNAc) wurde dabei als 100 % gesetzt.

4.3.3.1 Erhöhte Desferrioxamin-B-Produktion durch HAG010024 bei Wachstum unter GlcNAc-Einfluss

Kulturextrakte des Stammes HAG010024 hatten eine erhöhte antibakterielle Aktivität gegen *M. smegmatis* ATCC607, wenn die Kultivierung des Stammes in Anwesenheit von GlcNAc erfolgte (Anhang, Tabelle 12). In den *M. smegmatis*-aktiven UPLC-Fraktionen eines aktiven Extraktes wurden die Siderophore Desferrioxamin B ($C_{25}H_{48}N_6O_8$, $\Delta m/z = 0,71$ ppm) und Desferrioxamin E ($C_{27}H_{48}N_6O_9$, $\Delta m/z = 0,17$ ppm) derepliziert (Anhang, Abbildung 56, Abbildung 57).

In den Extrakt-Triplikaten der GlcNAc-supplementierten Kulturen war die relative Konzentration von Desferrioxamin B etwa 15-fach (1532 %, $v = 14$ %) und die relative Konzentration von Desferrioxamin E etwa 2-fach (185 %, $v = 1$ %) erhöht im Vergleich zu den unsupplementierten Proben (Abbildung 27; Anhang, Abbildung 58 und Abbildung 59). Dies deutete darauf hin, dass GlcNAc in HAG010024 einen deutlichen Einfluss auf die Produktion von Desferrioxamin B und einen verhältnismäßig geringen Einfluss auf die Desferrioxamin-E-Produktion hatte. Da Siderophore keine klassischen Antibiotika mit spezifischem Wirkmechanismus sind, wurden mit HAG010024 keine weiteren Experimente durchgeführt.

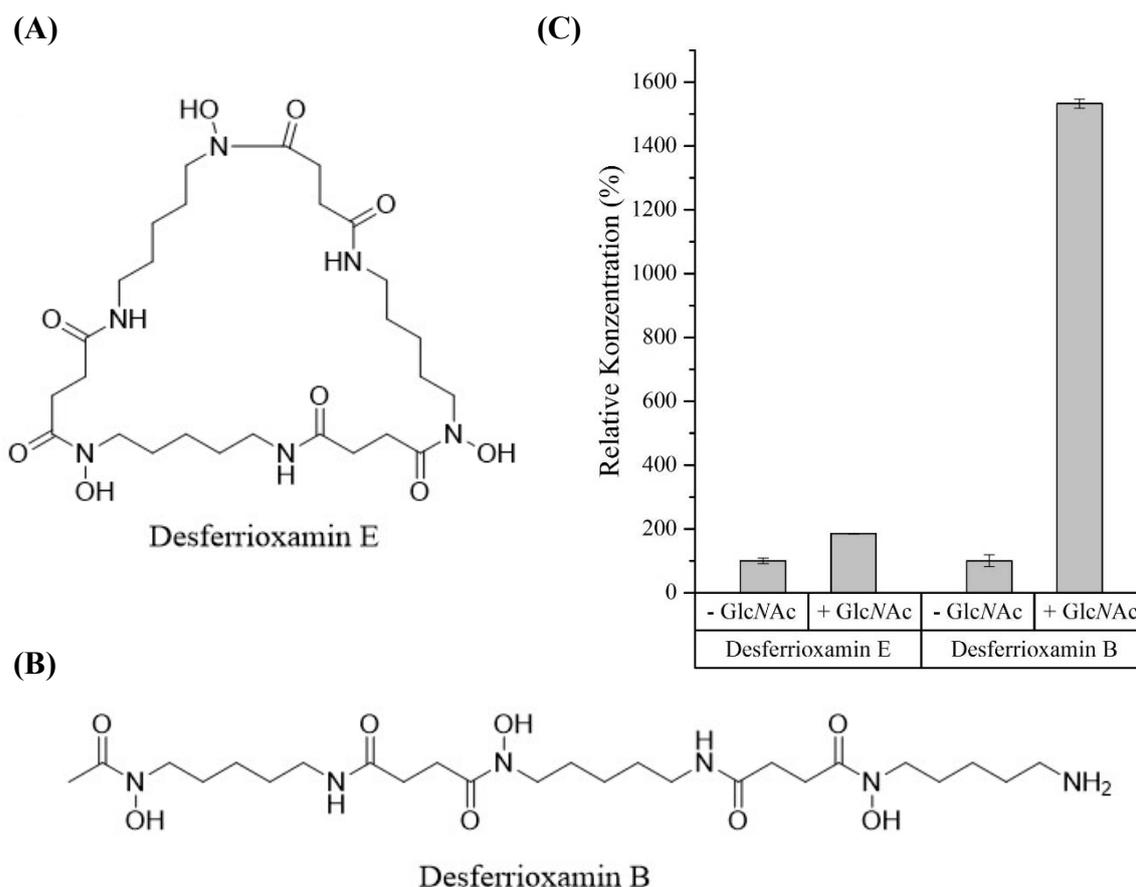


Abbildung 27: Beeinflussung der Siderophorproduktion von HAG010024 durch GlcNAc. (A): Struktur von Desferrioxamin E, gezeichnet nach Barona-Gómez *et al.* (2004). (B): Struktur von Desferrioxamin B, gezeichnet nach Telfer *et al.* (2016). (C): Relative Quantifizierung von Desferrioxamin E und Desferrioxamin B in Kulturextrakten von HAG010024. HAG010024 wurde im Triplikate in ISP2-Medium kultiviert, das 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) bzw. keine Zusätze (- GlcNAc) enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Desferrioxamin E und Desferrioxamin B in den Kulturextrakten wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt (Anhang, Abbildung 58, Abbildung 59). Dabei dienten die Peakflächen von Desferrioxamin B in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z $[M+H]^+$ und m/z $[M+Na]^+$ (Molekülionenpeak) als Maß für die relative Desferrioxamin-B-Konzentration. Im Falle von Desferrioxamin E wurden die UV-Chromatogramme beim Absorptionsmaximum von Desferrioxamin E (211 nm) zur relativen Quantifizierung herangezogen. Die Peakfläche der Extrakt-Replikate (- GlcNAc) wurde als 100 % gesetzt. Es konnte eine unter GlcNAc-Einfluss deutlich gesteigerte Produktion von Desferrioxamin B und eine schwach gesteigerte Produktion von Desferrioxamin E detektiert werden.

4.3.3.2 Verstärkte Produktion von Viridogrisein I bei Wachstum von FH1286 unter GlcNAc-Einfluss

Die Kulturextrakte von FH1286 (+ GlcNAc) wiesen eine verstärkte Aktivität gegen *S. aureus* ATCC25923 und *M. smegmatis* ATCC607 auf (Anhang, Tabelle 12). In den *S. aureus*-aktiven Fraktionen eines Extraktes von FH1286 (+ GlcNAc) wurde Viridogrisein I derepliziert ($C_{44}H_{62}N_8O_{11}$, $\Delta m/z = 1,59$ ppm) (Abbildung 28; Anhang, Abbildung 43).

Viridogrisein I gehört zur Antibiotikaklasse der Streptogramine. Streptogramine bestehen aus einem Gemisch eines A-Gruppen-Streptogramins (vielfach ungesättigte Macrolactone) und eines B-Gruppen-Streptogramins (cyclische Hexadepsipeptide). Beide Komponenten allein sind bakteriostatisch, als Gemisch wirken die Verbindungen synergistisch und sind

bakterizid. Therapeutisch als Antibiotikum eingesetzt wird das Streptogramin Synercid, ein semi-synthetisches Derivat von Pristinamycin (Conrath *et al.*, 2001; Mast & Wohlleben, 2014). Viridogrisein I ist ein Streptogramin der B-Gruppe, das zugehörige A-Gruppen-Streptogramin ist Griseoviridin. Die antibakterielle Aktivität von Viridogrisein I ist weitestgehend auf Gram-positive Bakterien beschränkt. Für einige Gram-negative Bakterien (z. B. *Haemophilus pertussis*) wurde eine schwache antibakterielle Wirkung von Viridogrisein I beschrieben (Cocito, 1979; Haste *et al.*, 2010). In *S. griseoviridis* DSM40229 werden Viridogrisein I und Griseoviridin durch ein Biosynthesecluster mit einer Größe von 105 kb kodiert (Xie *et al.*, 2012). Das Grundgerüst von Viridogrisein I wird durch nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPSs) synthetisiert. An der Biosynthese von Griseoviridin sind Hybrid-Polyketid-Synthetasen (PKS-NRPSs) beteiligt (Xie *et al.*, 2012).

Die relative Viridogrisein-I-Konzentration war in den Extrakten von FH1286 (+ GlcNAc) etwa 5-fach höher (491 %, $v = 15$ %) als in den Extrakten von FH1286 (- GlcNAc) (100 %, $v = 6$ %) (Abbildung 28). Dies deutete auf eine positive Beeinflussung der Viridogrisein-I-Produktion durch 20 mM GlcNAc hin.

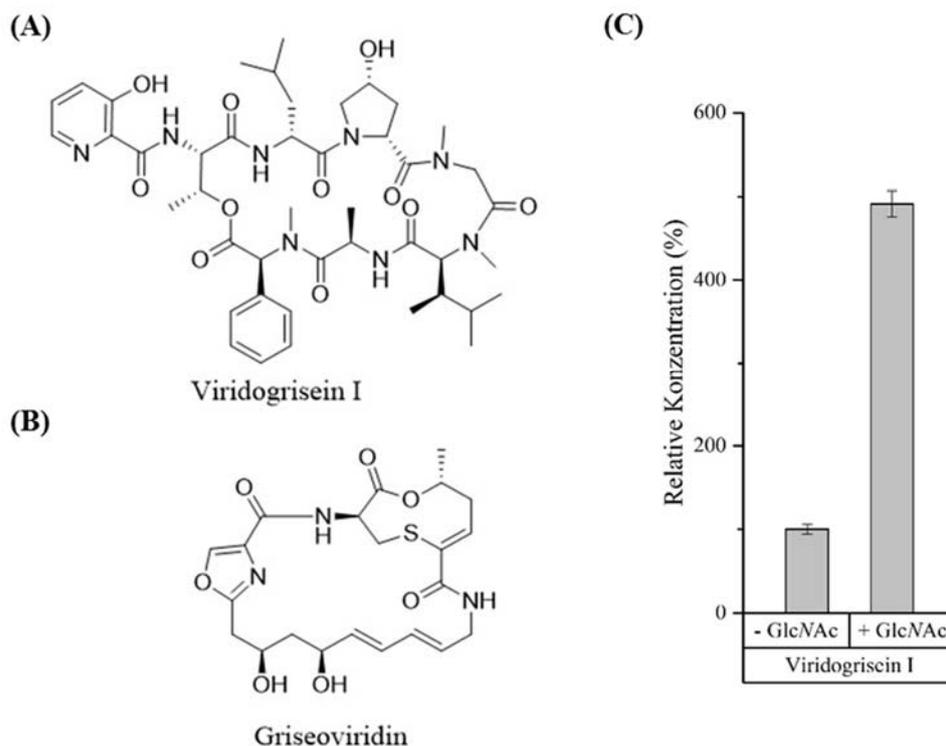


Abbildung 28: Beeinflussung der Sekundärmetabolit-Produktion von FH1286 durch GlcNAc. (A): Struktur von Viridogrisein I, gezeichnet nach Xie *et al.* (2017); (B): Struktur von Griseoviridin, gezeichnet nach Xie *et al.* (2017). (C): Relative Quantifizierung von Viridogrisein I in Kultur-Extrakten von FH1286. FH1286 wurde in ISP2-Medium kultiviert, das 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) bzw. keine Zusätze (- GlcNAc) enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Viridogrisein I wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Kulturextrakte durchgeführt (Anhang, Abbildung 47). Dabei dienten die Peakflächen der Substanz in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z $[M+H]^+$ und m/z $[M+Na]^+$ (Molekülionenpeak) als Maß für die relative Konzentration. Die Peakfläche der Extrakt-Replikate (- GlcNAc) wurde als 100 % gesetzt. Es konnte eine unter GlcNAc-Einfluss gesteigerte Produktion von Viridogrisein I detektiert werden.

In einem Folgeprojekt wurde überprüft, ob der zuvor beobachtete Effekt von 20 mM GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion in FH1286 eher auf einer erhöhten C-Quellen-Verfügbarkeit oder einem spezifischen GlcNAc-Einfluss beruhte. Weiterhin wurde analysiert, ob neben der Viridogrisein-I-Produktion auch die Griseoviridin-Produktion in FH1286 durch 20 mM GlcNAc beeinflusst wird. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt von GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion von FH1286 stammspezifisch oder in Viridogrisein-I-Produzenten konserviert ist, wurde der Einfluss von GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion der literaturbekannten Viridogrisein-I-Produzenten DSM40149 (*Streptomyces daghestanicus*) und DSM40229 (*Streptomyces griseoviridis*) analysiert (DSMZ, 2019; Schlumbohm & Keller, 1990).

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden FH1286, DSM40149 und DSM40229 in ISP2-Medium, in ISP2-Medium mit verschiedenen GlcNAc-Konzentrationen (2 mM bzw. 20 mM GlcNAc) und in ISP2-Medium mit Zusatz einer alternativen C-Quelle (20 mM Glucose) kultiviert. Zur Quantifizierung von Viridogrisein I bzw. Griseoviridin wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt.

Während die Zugabe von 20 mM GlcNAc in das Kultivierungsmedium von FH1286 im Vergleich zur un-supplementierten Probe zu einer etwa 2-fachen Erhöhung (244 %, $v = 12$ %) der relativen Viridogrisein-I-Konzentration führte, hatte die Zugabe einer äquimolaren Glucose-Konzentration keinen steigernden Effekt auf die relative Viridogrisein-I-Konzentration (89 %, $v = 4$ %) (Abbildung 29). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass der Effekt von GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion spezifisch auf GlcNAc und nicht auf einer erhöhten C-Quellen-Konzentration im Medium beruhte. Die Zugabe von GlcNAc in einer vergleichsweise geringen Konzentration von 2 mM hatte keinen positiven Einfluss auf die relative Viridogrisein-I-Konzentration in den Kulturextrakten (75 %, $v = 1$ %) (Abbildung 29).

Es wurde eine nahezu unveränderte relative Griseoviridin-Konzentration zwischen der Kultivierung von FH1286 in Anwesenheit (97 %, $v = 21$ %) bzw. Abwesenheit (100 %, $v = 14$ %) von 20 mM GlcNAc bestimmt (Abbildung 29). Somit verstärkte GlcNAc in FH1286 die Produktion des B-Gruppen-Streptogramins Viridogrisein I, nicht aber die Produktion des zugehörigen A-Gruppen-Streptogramins Griseoviridin. Dies bedeutet, dass durch die Zugabe von 20 mM GlcNAc das ursprüngliche Produktions-Verhältnis der synergistisch wirkenden Substanzen zu Ungunsten von Griseoviridin verschoben wurde.

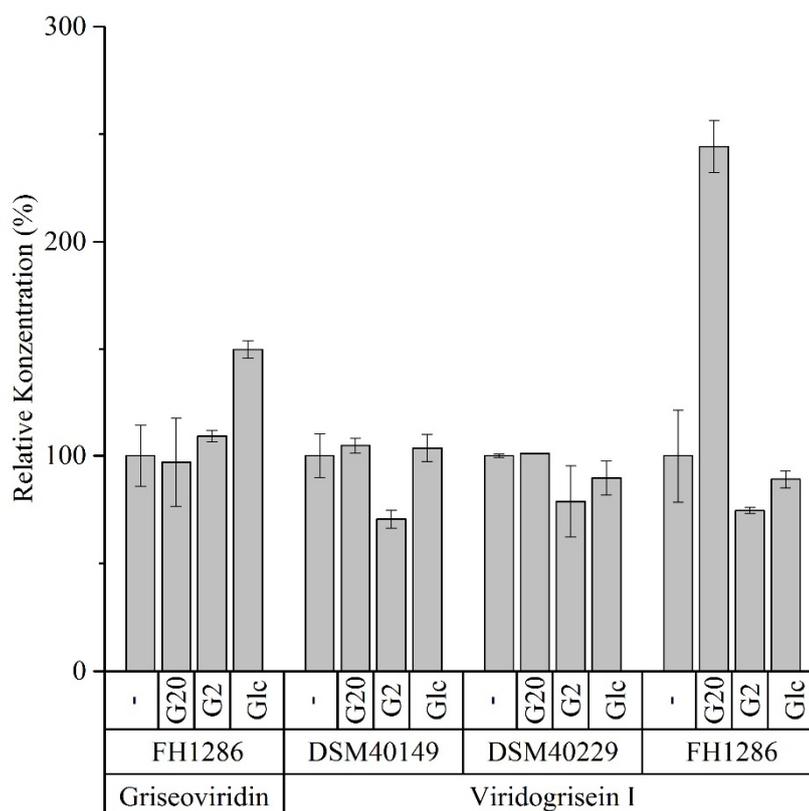


Abbildung 29: Einfluss von GlcNAc und Glucose auf die Griseoviridin- und Viridogrisein-I-Produktion. Die Stämme DSM40149, DSM40229 und FH1286 wurden jeweils im Triplikate in ISP2-Medium und in ISP2-Medium mit verschiedenen Zusätzen (+ 20 mM GlcNAc; + 2 mM GlcNAc; + 20 mM Glucose) kultiviert. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Viridogrisein I in den Kulturextrakten von FH1286, DSM40229 und DSM40149 bzw. Griseoviridin in den Kulturextrakten von FH1286 wurden UPLC-HR-MS-Messungen durchgeführt (Anhang, Abbildung 48). Dabei dienten die Peakflächen der Substanzen in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z $[M+H]^+$ und m/z $[M+Na]^+$ (Molekülionenpeak) als Maß für die relative Konzentration. Die Peakfläche der Extrakt-Replikate (- GlcNAc) wurde als 100 % gesetzt. -: ISP2 ohne Zusätze; G2: ISP2 + 2 mM GlcNAc; G20: ISP2 + 20 mM GlcNAc; Glc: ISP2 + 20 mM Glucose. Ein positiver Einfluss von 20 mM GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion konnte nur bei Stamm FH1286, nicht jedoch bei den Stämmen DSM40149 und DSM40229 beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass es sich um einen stammspezifischen GlcNAc-Effekt handelte. Die Zugabe von 20 mM Glucose beeinflusste die Viridogrisein-I-Produktion in FH1286 nicht. Dies ist ein erster Hinweis auf eine spezifische Wirkung von GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion in FH1286.

Anhand von UPLC-HR-MS/MS-Messungen jeweils eines Kulturextraktes (+ 20 mM GlcNAc) wurde bestätigt, dass die in der Literatur als Viridogrisein-I-Produzenten beschriebenen Stämme DSM40149 und DSM40229 unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen Viridogrisein I produzierten (Anhang, Abbildung 45 und Abbildung 46). Beide Stämme zeigten keine positive Beeinflussung der Viridogrisein-I-Produktion durch 2 mM oder 20 mM GlcNAc (Abbildung 29). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei dem in FH1286 beobachteten Effekt von GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion um einen stammspezifischen Effekt handelt, der unter den gewählten Bedingungen nicht allgemein für die Viridogrisein-I-Produktion konserviert erscheint.

4.3.3.3 Verstärkte Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E bei Wachstum von HAG010252 unter GlcNAc-Einfluss

HAG010252 war ein weiterer Stamm, der im Hinblick auf die Bioaktivität positiv auf die Zugabe von 20 mM GlcNAc zum Wachstumsmedium reagierte. Die Kulturextrakte von HAG010252 zeigten eine erhöhte *P. aeruginosa*-Aktivität im Vergleich zu den Proben ohne GlcNAc (Anhang, Tabelle 12). In den *P. aeruginosa*-aktiven UPLC-Fractionen eines Extraktes von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) wurde Oxytetracyclin derepliziert ($C_{22}H_{24}N_2O_9$, $\Delta m/z = 0,87$ ppm) (Abbildung 50). Oxytetracyclin gehört zur Antibiotikaklasse der Tetracycline und wurde bereits 1950 von der Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung von Infektionskrankheiten zugelassen. Weiterhin dient Oxytetracyclin als Ausgangssubstanz für das semisynthetisch hergestellte Doxycyclin, welches auch heute noch klinische Anwendung findet (Nelson & Levy, 2011). Obwohl Tetracycline eine antibakterielle Wirkung auf viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien haben (Chopra, 1985), ist die antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa*-Stämme meist nur schwach ausgeprägt. Die MIC-Werte (MIC = *minimal inhibitory concentration*) der Tetracycline Minocyclin, Doxycyclin und Tetracyclin liegen im Falle von *P. aeruginosa* ATCC27853 im Bereich von 32-64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fass & Barnishan, 1979). Die intrinsische Resistenz vieler *P. aeruginosa*-Stämme gegenüber Tetracyclinen kann auf die geringe Permeabilität der äußeren Membran und Efflux-Mechanismen zurückgeführt werden (Li *et al.*, 1994).

Die relative Oxytetracyclin-Konzentration war in den Extrakten der GlcNAc-supplementierten Kulturen etwa 3-fach (322 %, $v = 7$ %) höher als in den Extrakten der Kontrollansätze ohne GlcNAc (100 %, $v = 7$ %) (Abbildung 30).

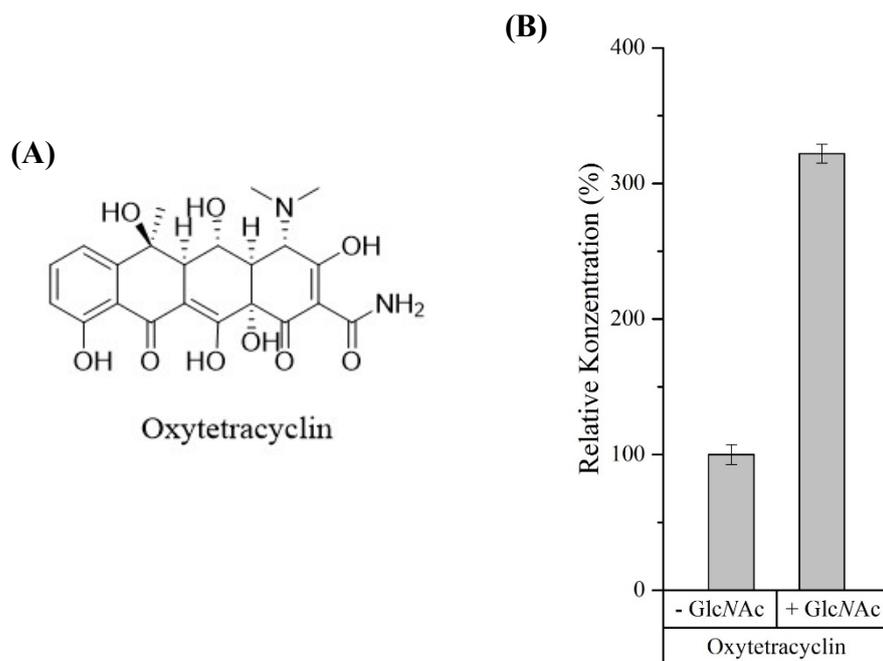


Abbildung 30: Einfluss von GlcNAc auf die Oxytetracyclin-Produktion von HAG010252. (A): Struktur von Oxytetracyclin, gezeichnet nach Petković *et al.* (2017). (B): Relative Quantifizierung von Oxytetracyclin in Kultur-Extrakten von HAG010252. HAG010252 wurde in ISP2-Medium kultiviert, das 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) bzw. keine Zusätze (- GlcNAc) enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Oxytetracyclin wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Kulturextrakte durchgeführt (Anhang, Abbildung 52). Dabei dienten die Peakflächen der Substanz in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z $[M+H]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität) als Maß für die relative Konzentration. Die Peakfläche der Extrakt-Replikate (- GlcNAc) wurde als 100 % gesetzt. Es konnte eine unter GlcNAc-Einfluss gesteigerte Produktion von Oxytetracyclin detektiert werden.

Um neben Oxytetracyclin mögliche weitere Sekundärmetabolite in HAG010252 zu identifizieren, deren Produktion durch GlcNAc moduliert wird, wurde analytisch überprüft, welche weiteren Sekundärmetabolite von HAG010252 synthetisiert werden und ob sich die Produktion dieser Substanzen unter Einfluss von GlcNAc verändert. Durch UPLC-HR-MS/MS-Messungen eines Kulturextrakts von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) konnte gezeigt werden, dass HAG010252 Desferrioxamin E produziert ($C_{27}H_{48}N_6O_9$, $\Delta m/z = 0$ ppm) (Anhang, Abbildung 51). Desferrioxamin E war in den Extrakten der unter Zusatz von 20 mM GlcNAc gewachsenen Kulturen, nicht jedoch in den Proben ohne GlcNAc detektierbar (Abbildung 32).

Oxytetracyclin hat einen theoretischen m/z -Wert von m/z 461.1555 $[M+H]^+$. Durch die Analyse von UPLC-HR-MS/MS-Messungen eines Kulturextraktes von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) wurde detektiert, dass HAG010252 unter Einfluss von GlcNAc neben Oxytetracyclin (m/z_{gemessen} 461.1556, RT = 3,4 min) eine weitere Substanz mit nahezu identischem m/z -Wert (m/z_{gemessen} 461.1558) und leicht unterschiedlicher Retentionszeit (RT = 3,3 min) produziert (Abbildung 31). Diese Substanz zeigte ein sehr ähnliches, aber dennoch abweichendes MS/MS-Fragmentierungsmuster zu kommerziellem Oxytetracyclin (Abbildung 31). Das Intensitätsverhältnis der MS/MS-Fragmente m/z 380.1133 und

m/z 381.0610 von der detektierten Substanz und kommerziellem Oxytetracyclin wick deutlich voneinander ab. Wahrscheinlich handelte es sich bei der detektierten Substanz um ein Isomer von Oxytetracyclin. Im Folgenden wird die Verbindung als potentielles Oxytetracyclin-Isomer bezeichnet. Wurde HAG010252 in unsupplementiertem ISP2-Medium kultiviert, war das potentielle Oxytetracyclin-Isomer nicht in den Extrakten detektierbar (Abbildung 32). Die Substanz wäre demnach in einem Versuchsaufbau ohne 20 mM GlcNAc nicht gefunden worden.

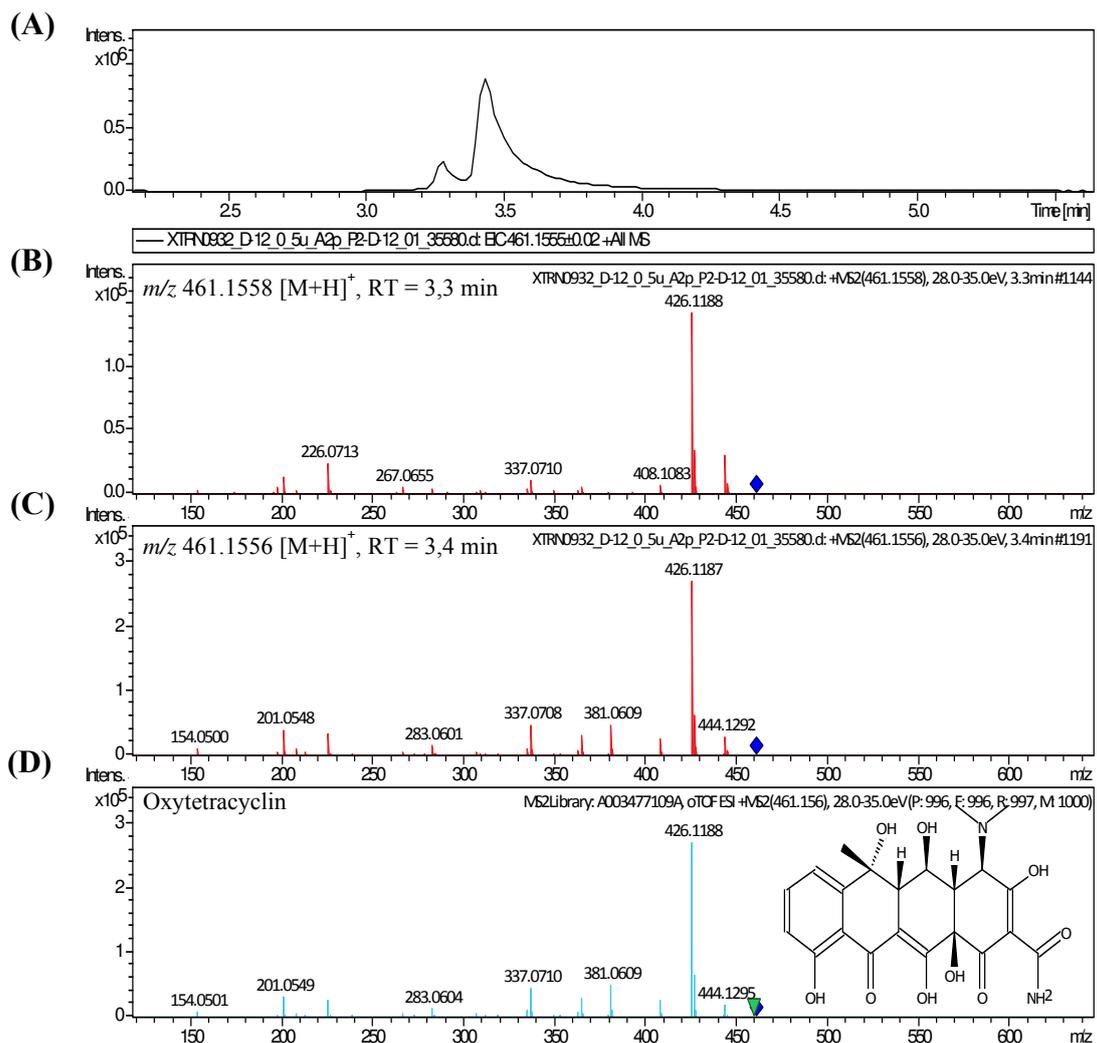


Abbildung 31: UPLC-HR-MS/MS-Analyse eines Extraktes von HAG010252 – Identifizierung von Oxytetracyclin und einem potentiellen Oxytetracyclin-Isomer. Zur Identifizierung von Oxytetracyclin (m/z theoretisch 461.1555 $[M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert ((A)-(C) und (E)-(F)). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 461.1555. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 461.1558 $[M+H]^+$, RT = 3,3 min. (C): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 461.1556 $[M+H]^+$, RT = 3,4 min. (D): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von Oxytetracyclin (Reinsubstanz). Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Oxytetracyclin (m/z 461.156 $[M+H]^+$) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). (E): Ausschnitt von (B). (F): Ausschnitt von (C). (G): Ausschnitt von (D). Das Fragmentierungsmuster in (C) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster in (D). Somit handelte es sich bei der in (C) analysierten Substanz sehr wahrscheinlich um Oxytetracyclin. Das Fragmentierungsmuster in (B) hatte Ähnlichkeit zu dem Fragmentierungsmuster in (D), jedoch unterschied sich das Intensitätsverhältnis der Fragmente m/z 380.1133 und m/z 381.0610 deutlich in beiden Fragmentierungen (vgl. (E) mit (F) und (G)). Wahrscheinlich handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung um ein Isomer von Oxytetracyclin.

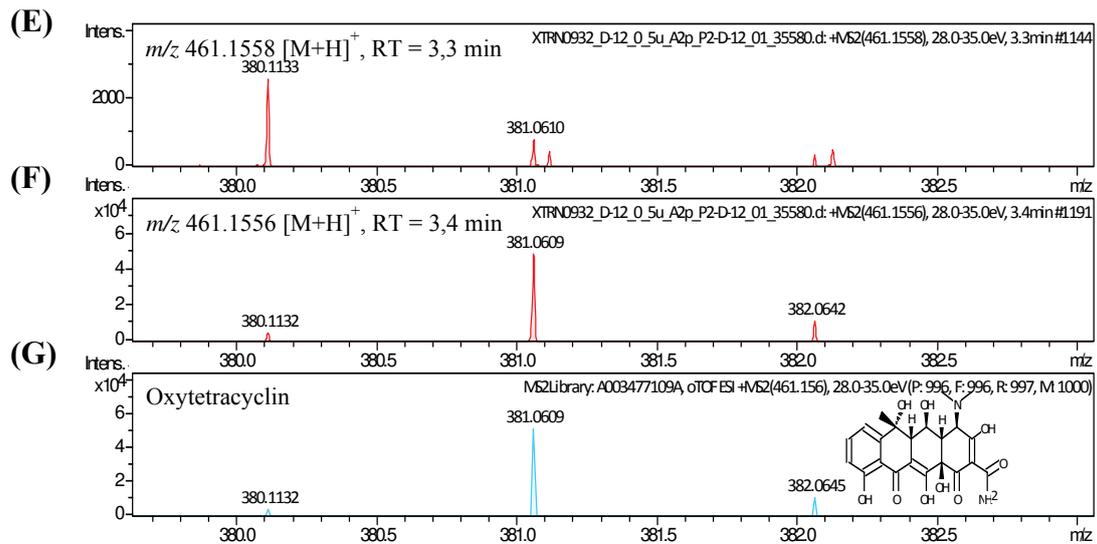


Abbildung 31: Fortsetzung.

Zur Abschätzung der Spezifität des GlcNAc-Effektes auf die Produktion von Oxytetracyclin, Desferrioxamin E und des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers wurde der Einfluss von 20 mM Glucose auf die Produktion der Substanzen untersucht. Hierzu wurde HAG010252 in ISP2-Medium mit 20 mM Glucose kultiviert. Zur Kontrolle wurde eine Kultivierung von HAG010252 in ISP2-Medium ohne Zusätze durchgeführt. Es folgte eine relative Quantifizierung der Substanzen in den Kulturextrakten. Auf die Produktion von Desferrioxamin E und des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers hatte die Glucose-Zugabe keinen positiven Effekt. Weder Desferrioxamin E noch das potentielle Oxytetracyclin-Isomer konnten in den Extrakten der Glucose-supplementierten Kulturen detektiert werden (Abbildung 32). Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis darauf, dass die Produktionssteigerung beider Substanzen durch Zugabe von 20 mM GlcNAc spezifisch auf GlcNAc beruhte. Im Gegensatz hierzu zeigte Glucose einen schwach positiven Effekt auf die Oxytetracyclin-Produktion. Im Vergleich zu den unsupplementierten Proben war die relative Oxytetracyclin-Konzentration in den Extrakten (+ 20 mM Glucose) um das 1,6-fache erhöht (Abbildung 32). Dieses Ergebnis ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die gesteigerte Oxytetracyclin-Produktion durch 20 mM GlcNAc nicht absolut spezifisch auf GlcNAc, sondern genereller auf eine erhöhte C-Quellen-Verfügbarkeit zurückzuführen sein könnte.

Um den Einfluss einer verhältnismäßig geringen GlcNAc-Konzentration auf die Produktion der drei genannten Sekundärmetabolite zu überprüfen, wurde HAG010252 in ISP2-Medium mit Zusatz von 2 mM GlcNAc kultiviert und die Kulturextrakte analytisch untersucht. Die relative Konzentration der Substanzen in den Kulturextrakten (+ 2 mM GlcNAc) wurde mit

der relativen Konzentration jener Verbindungen in den Kulturextrakten (- GlcNAc) und (+ 20 mM GlcNAc) verglichen. Desferrioxamin E konnte in Anwesenheit von 2 mM GlcNAc, nicht jedoch ohne GlcNAc-Zugabe detektiert werden (Abbildung 32). Die Ausprägung des Effektes von GlcNAc auf die Desferrioxamin-E-Produktion war abhängig von der eingesetzten GlcNAc-Konzentration: Die relative Desferrioxamin-E-Konzentration der mit 2 mM GlcNAc supplementierten Proben betrug das 0,15-fache der mit 20 mM GlcNAc supplementierten Proben (Abbildung 32).

Im Vergleich zu den Proben einer unsupplementierten Kultur war die relative Oxytetracyclin-Konzentration in den Extrakten (+ 2 mM GlcNAc) um das 3,1-fache erhöht (Abbildung 32). Die Zugabe von 2 mM GlcNAc hatte einen etwas stärkeren Effekt auf die Oxytetracyclin-Produktion als die Zugabe von 20 mM GlcNAc. In den Extrakten der Kulturen (+ 2 mM GlcNAc) war die relative Oxytetracyclin-Konzentration 1,6-fach so hoch wie in den Proben (+ 20 mM GlcNAc) (Abbildung 32). Das potentielle Oxytetracyclin-Isomer konnte ausschließlich in den Extrakten einer unter Einfluss von 20 mM GlcNAc gewachsenen Kultur detektiert werden. In den Extrakten der mit 2 mM GlcNAc supplementierten Kulturen blieb die Substanz unterhalb des Detektionslimits (Abbildung 32).

Die Beobachtung, dass drei Streptomyceten, die in dieser Arbeit analysiert wurden (HAG010252, HAG010024 und ST136450) eine gesteigerte Desferrioxamin-Produktion bei Wachstum unter GlcNAc-Einfluss zeigten, ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich hierbei um einen in Streptomyceten verbreiteten Effekt handeln könnte. Interessanterweise beobachteten Craig *et al.* (2012) in *S. coelicolor* und anderen Streptomyceten einen gegensätzlichen Effekt von GlcNAc auf die Siderophor-Produktion. Die Autoren beobachteten eine verringerte Produktion von Siderophoren durch GlcNAc-Zugabe ins Medium. Craig *et al.* (2012) konnten zeigen, dass der inhibierende Einfluss von GlcNAc auf die Desferrioxamin-Biosynthese in Verbindung mit den Transkriptionsregulatoren DmdR1 und DasR steht. DmdR1 ist ein globaler Regulator des Eisenhaushalts. Bei Vorliegen hoher Eisenkonzentrationen bindet DmdR1 unter anderem an Promotoren von Siderophor-Biosynthese-Clustern und hemmt dadurch die Siderophor-Produktion (Flores & Martín, 2004; Tunca *et al.*, 2007). DasR ist ein globaler Regulator, der in *S. coelicolor* die Biosynthese mehrerer Sekundärmetabolite reguliert und dessen Aktivität durch GlcN-6P und GlcNAc-6P (beide Zwischenprodukte des GlcNAc-Abbauweges) gesteuert wird (Rigali *et al.*, 2008; Tenconi *et al.*, 2015). In *S. coelicolor* beeinflusst DasR die Siderophor-Produktion indirekt durch die Kontrolle der Transkription von *dmdR1* (Craig *et al.*, 2012). Die

Beeinflussung von DmdR1 durch DasR verdeutlicht, dass in *S. coelicolor* sowohl die Eisen- als auch die GlcNAc-Versorgung der Zellen modulierend auf die Siderophor-Produktion wirkt. Interessanterweise konnte auch schon für Tetracyclin gezeigt werden, dass die Biosynthese in *Streptomyces aureofaciens* durch eine hohe Eisenkonzentration gehemmt wird (Bechet & Blondeau, 1998). Um zu überprüfen, ob auch die Oxytetracyclin-Biosynthese in HAG010252 durch die Eisenkonzentration im Medium beeinflusst wird und um das Zusammenspiel der Stimuli GlcNAc und Eisen auf die Sekundärmetabolit-Produktion in HAG010252 zu untersuchen, wurde der Stamm unter folgenden Bedingungen kultiviert:

- ISP2 + GlcNAc (20 mM) + Eisen(III)-citrat (0,03 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,12 mg/mL)
- ISP2 + Eisen(III)-citrat (0,03 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,12 mg/mL)

In den Extrakten erfolgte eine relative Quantifizierung von Desferrioxamin E und Oxytetracyclin.

Die Hypothese, dass eine hohe Eisen-Konzentration die Oxytetracyclin-Produktion negativ beeinflusst, konnte bestätigt werden. Die Zugabe von 0,03 mg/mL bzw. 0,06 mg/mL bzw. 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat führte zu einer Abnahme der relativen Oxytetracyclin-Produktion auf das 0,7-fache bzw. 0,5-fache bzw. 0,3-fache im Vergleich zur unsupplementierten Probe (Abbildung 32).

Der in dieser Arbeit beobachtete positive Effekt von 20 mM GlcNAc auf die Desferrioxamin-E- und Oxytetracyclin-Produktion von HAG010252 wurde durch die Zugabe von Eisen(III)-citrat aufgehoben.

Im Falle von Desferrioxamin E war die Aufhebung des GlcNAc-Effektes durch Eisen(III)-citrat-Zugabe vollständig. In den Extrakten der Kulturen, die neben 20 mM GlcNAc 0,03 mg/mL, 0,06 mg/mL oder 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat enthielten, war kein Desferrioxamin E detektierbar (Abbildung 32). Dies entspricht der Situation in den unsupplementierten Proben: auch dort konnte kein Desferrioxamin E detektiert werden (Abbildung 32).

Der eisenreprimierende Effekt auf die Oxytetracyclin-Produktion in Anwesenheit von GlcNAc war ebenfalls deutlich. Die Zugabe von GlcNAc und zusätzlich 0,03 mg/mL bzw. 0,06 mg/mL bzw. 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat zum Medium führte zu einer Abnahme der relativen Oxytetracyclin-Konzentration auf das 0,5-fache bzw. 0,3-fache bzw. 0,05-fache im Vergleich zu den Proben mit ausschließlicher GlcNAc-Supplementation (Abbildung 32). Wurde das Medium von HAG010252 sowohl mit GlcNAc als auch mit 0,03 mg/mL bzw. 0,06 mg/mL bzw. 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat supplementiert, war die relative

Oxytetracyclin-Konzentration in diesen Proben 0,9-fach bzw. 0,5-fach bzw. 0,1-fach so hoch wie in den unsupplementierten Proben (Abbildung 32). Der positive Einfluss von GlcNAc auf die Oxytetracyclin-Produktion wurde somit durch die Zugabe von Eisen(III)-citrat vollständig aufgehoben.

Auch im Falle des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers trat ein eisenreprimierender Effekt auf die Produktion der Substanz in Anwesenheit von GlcNAc auf. Unter Zugabe von 20 mM GlcNAc und gleichzeitig 0,03 mg/mL bzw. 0,06 mg/mL bzw. 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat war die relative Konzentration der Substanz 0,3-fach bzw. 0,2-fach bzw. 0,02-fach so hoch wie in den ausschließlich mit 20 mM GlcNAc supplementierten Proben (Abbildung 32). Trotz des deutlich negativen Einflusses von Eisen(III)-citrat auf die Produktion der Substanz in Anwesenheit von 20 mM GlcNAc war die relative Konzentration der Verbindung auch bei Zugabe von 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat höher als in den unsupplementierten Proben (Abbildung 32). Somit war die Aufhebung des positiven Effektes von 20 mM GlcNAc auf die Produktion des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers deutlich, aber nicht vollständig.

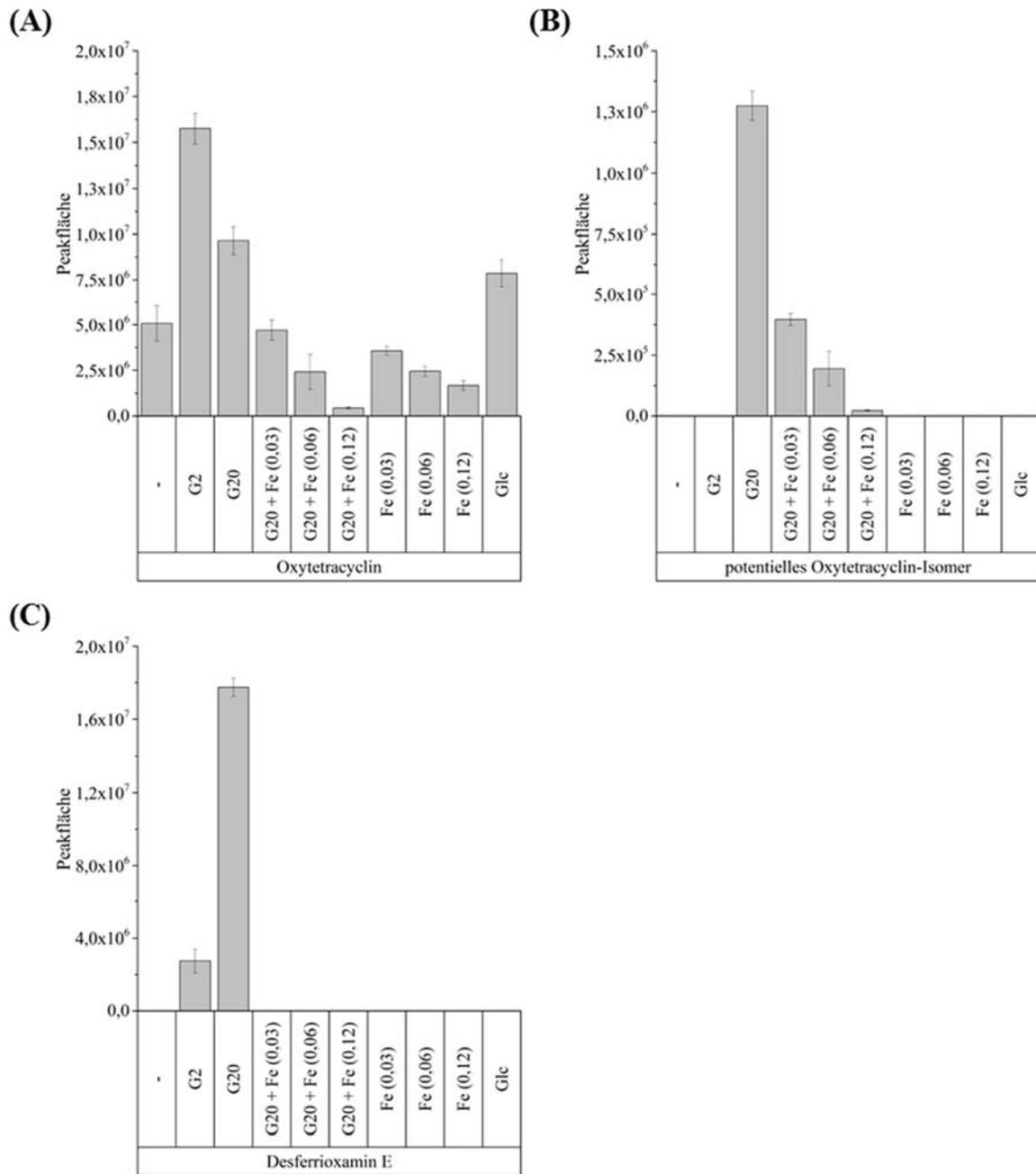


Abbildung 32: Einfluss von GlcNAc, Glucose und Eisen(III)-citrat auf die Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E sowie auf die Produktion eines potentiellen Oxytetracyclin-Isomers. Der Stamm HAG010252 wurde jeweils im Triplikат in neun verschiedenen Medien kultiviert. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Oxytetracyclin, Desferrioxamin E und dem potentiellen Oxytetracyclin-Isomer in den Kulturextrakten wurden UPLC-HR-MS-Messungen durchgeführt (Abbildung 53, Abbildung 54). Es wurden die Peakflächen der Substanzen in den extrahierten Ionen-Chromatogrammen bei m/z $[M+H]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität) zur relativen Quantifizierung herangezogen. Folgende Medien wurden zur Kultivierung eingesetzt: -: ISP2 ohne Zusätze; G2: ISP2 + 2 mM GlcNAc; G20: ISP2 + 20 mM GlcNAc; G20 + Fe (0,03): ISP2 + 20 mM GlcNAc + 0,03 mg/mL Eisen(III)-citrat; G20 + Fe (0,06): ISP2 + 20 mM GlcNAc + 0,06 mg/mL Eisen(III)-citrat; G20 + Fe (0,12): ISP2 + 20 mM GlcNAc + 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat; Fe (0,03): ISP2 + 0,03 mg/mL Eisen(III)-citrat; Fe (0,06): ISP2 + 0,06 mg/mL Eisen(III)-citrat; Fe (0,12): ISP2 + 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat; Glc: ISP2 + 20 mM Glucose. (A): Oxytetracyclin, (B): potentielles Oxytetracyclin-Isomer, (C): Desferrioxamin E. Der positive Effekt von GlcNAc auf die Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E sowie die auf die Produktion des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers wurde durch hohe Eisen-Konzentrationen aufgehoben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Eisen-Konzentration im Medium einen entscheidenden Einfluss darauf hatte, ob die Zugabe von 20 mM GlcNAc zum Kultivierungsmedium von HAG010252 einen positiven Effekt auf die Produktion von Oxytetracyclin, Desferrioxamin E und des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers hatte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Eisenkonzentration eine Art An-/Aus-Schalter für die Biosynthese der genannten Sekundärmetabolite darstellt und GlcNAc unterhalb eines Eisen-Schwellenwertes eine Fein-Regulierung der Biosynthese auslöst.

5 Diskussion

5.1 Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob sich die PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen eignet. Während die Sequenzgenauigkeit der generierten 16S-ITS-OTUs überzeugen konnte, gab es deutliche Hinweise dafür, dass die Anzahl hochqualitativer Sequenzen pro Probe als kritisch zu bewerten ist. Die Sequenzanzahl war zu gering, um zuverlässig Sequenzinformationen über alle 16S-ITS-Varianten der 95 Kulturen zu generieren. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass im Hinblick auf die routinemäßige Anwendung der Methode eine Erhöhung der Sequenzanzahl pro Probe angestrebt werden sollte. Eine mögliche Umsetzung wird in Abschnitt 6.1 beschrieben.

Exemplarisch wurde gezeigt, dass 16S-ITS-Sequenzen hilfreich für die Differenzierung von nah verwandten *Streptomyces* Spezies sein können. Insgesamt war das Datenset jedoch zu klein, um eine sichere Vorhersage treffen zu können, ob sich alle bekannten *Streptomyces* Spezies anhand von 16S-ITS-Sequenzen differenzieren ließen. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass eine 16S-ITS basierte Differenzierung unterschiedlicher *Streptomyces*-Stämme in vielen Fällen möglich ist. Lanoot *et al.* (2005) amplifizierten 16S-ITS-Regionen von 463 Typstämmen des Genus *Streptomyces* und des nah verwandten Genus *Kitasatospora*. Die 16S-ITS-Amplifikate wurden anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit diesem Vorgehen konnten *Streptomyces* Spezies mit sehr ähnlicher 16S rDNA in vielen, aber nicht in allen Fällen anhand ihres 16S-ITS-Bandenmusters differenziert werden. Es ist davon auszugehen, dass einige der von Lanoot *et al.* (2005) analysierten Spezies, die sehr ähnliche oder identische 16S-ITS-Bandenmuster aufwiesen, durch Sequenzierung der 16S-ITS-Regionen differenzierbar wären, da durch eine Sequenzierung auch sehr geringe Abweichungen der 16S-ITS-Regionen detektierbar wären.

Weiterhin wurde exemplarisch getestet, ob sich auch Stämme derselben *Streptomyces* Spezies anhand der generierten 16S-ITS-OTUs unterscheiden ließen. Hierbei zeigte sich, dass es stammabhängig ist, ob anhand der ITS-Variabilität eine Unterscheidung von

Stämmen einer *Streptomyces* Spezies möglich ist. Um eine Abschätzung machen zu können, wie groß die Intraspezies-Diversität im Genus *Streptomyces* ist, müsste eine weitere Studie mit einer größeren Anzahl an Stämmen durchgeführt werden. Dass die Variabilität von ITS-Sequenzen für die Intra-Spezies-Differenzierung von Streptomyceten hilfreich sein kann, zeigten zuvor auch Hain *et al.* (1997) am Beispiel von *S. albidoflavus*. In jener Studie konnten verschiedene *S. albidoflavus*-Stämme anhand der Größe, Anzahl und Sequenz der ITS-Regionen unterschieden werden.

Soll eine industrielle Stammsammlung mit diverser Stamm-Zusammensetzung basierend auf der vorgestellten Methode charakterisiert werden, sollten folgende Aspekte beachtet werden: Die Sequenzgenauigkeit der in dieser Arbeit generierten 16S-ITS-OTUs wurde anhand eines Abgleichs der 16S-ITS-OTUs vierer Genom-sequenzierter Stämme mit den entsprechenden Genom-annotierten 16S-ITS-Sequenzen abgeschätzt. Die ITS-Sequenzen dieser Stämme hatten eine durchschnittliche Länge von etwa 360 bp. Im Hinblick auf die Charakterisierung einer Stammsammlung muss beachtet werden, dass die Länge der ITS-Sequenzen in einigen Stämmen deutlich länger als in den hier analysierten Stämmen sein kann. Je größer die ITS-Länge ist, desto größer sind die zu sequenzierenden 16S-ITS-Amplifikate. Aufgrund der begrenzten Länge der *polymerase reads* sinkt mit zunehmender Amplifikat-Größe die Anzahl an *subreads*, die für jedes sequenzierte Molekül generiert werden. Dies kann sich negativ auf die Genauigkeit der *circular consensus sequences* auswirken. In einer Studie, in der die ITS-Regionen von 155 Bakteriengenomen verschiedener Phyla bioinformatisch analysiert wurden, hatten die ITS-Regionen eine durchschnittliche Länge von 476 bp (Stewart & Cavanaugh, 2007) und lagen somit in einem ähnlichen Größenbereich wie die ITS-Regionen der hier analysierten Genom-sequenzierten Stämme. Tendenziell lange ITS-Regionen wurden jedoch beispielsweise in α -Proteobakterien detektiert (554-1255 bp, Mittelwert: 825 bp). Unter den analysierten Stämmen hatte *Saccharophagus degradans* mit 2880 bp die größte ITS-Sequenz (Stewart & Cavanaugh, 2007).

Weiterhin müsste bei der Charakterisierung einer Stammsammlung beachtet werden, dass die Anordnung der rRNA-Gene in einigen Bakterien von der üblichen Operon-Struktur (16S rDNA/23S rDNA/5S rDNA) abweicht. So ist beispielsweise in *Anaplasma marginale* das 16S-rRNA-Gen mindestens 100 kb vom 23S-/5S-rDNA-Cluster entfernt (Rurangirwa *et al.*, 2002). Bei Bakterien mit einer solchen abweichenden rRNA-Gen-Anordnung wäre keine 16S-ITS-Analyse möglich.

Neben der PacBio-SMRT-Technologie erfüllt auch die Nanopore-Technologie (Oxford Nanopore Technologies) zwei wichtige Voraussetzungen für die Sequenzierung von 16S-

ITS-Amplifikaten: Die Technologie ermöglicht lange Leselängen und beruht auf der Sequenzierung einzelner Moleküle (Jain *et al.*, 2016). Ein Schwachpunkt der Nanopore-Technologie ist bisher jedoch die hohe Fehlerrate (Rang *et al.*, 2018). Calus *et al.* (2018) verwendeten die Nanopore-Technologie für die Sequenzierung nahezu vollständiger 16S-rRNA-Gene. Hierbei wurde eine Consensus-Sequenzgenauigkeit von 99,50 % erreicht. Im Vergleich hierzu konnten Schloss *et al.* (2016) zeigen, dass mit der PacBio-SMRT-Technologie nahezu vollständige 16S-rRNA-Gen-Sequenzen mit einer Genauigkeit von 99,97 % generiert werden können.

Ein mögliches alternatives Vorgehen zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung wäre die parallele Durchführung von 16S-rDNA-Sequenzierungen und REP-PCRs (vgl. Abschnitt 1.6.1). REP-PCRs wurden bereits in einigen Genera für die Inter- und Intra-Spezies-Differenzierung von Bakterien eingesetzt (Chou & Wang, 2006; Jarocki *et al.*, 2016; Lanoot *et al.*, 2004; Northey *et al.*, 2005). Nachteil eines solchen Verfahrens gegenüber der 16S-ITS-Sequenz-basierten Charakterisierung wäre, dass zwei Datenbanken (Fingerprints bzw. 16S-rDNA-Sequenzen) parallel verwaltet und zwei Labor-Prozesse koordiniert werden müssten.

5.2 Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert

Durch ein Festphasen-Kultivierungs- und Screening-Verfahren wurden sechs Stämme identifiziert, die nach Kultivierung unter Zugabe eines Signalmoleküls eine erhöhte oder neu auftretende anti-*P. aeruginosa*-Aktivität im Topagar-Screening zeigten. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Anwesenheit der Signalmoleküle die Produktion antibakterieller Sekundärmetabolite positiv beeinflusst hat.

Die Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin führte bei den Stämmen ST102142, ST102347 und DSM40005 zu einer neu auftretenden bzw. erhöhten anti-*P. aeruginosa*-Aktivität im Topagar-Screening. Der Stamm ST102142 hemmte das Wachstum von *P. aeruginosa* zusätzlich nach Kultivierung in Anwesenheit des Antibiotikums Rifampicin. Dass einige Antibiotika in sub-MIC-Konzentrationen eine Signalfunktion haben, wurde bereits in der Literatur beschrieben. In einigen Streptomycceten wurden Pseudo- γ -Butyrolacton-Rezeptoren identifiziert, die an der transkriptionellen Regulation der Sekundärmetabolit-

Biosynthese beteiligt sind und endogene oder exogene Antibiotika als Liganden binden (Jianya *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014). Ein positiver Einfluss von Tetracyclin auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten wurde in der Literatur für *S. coelicolor* A3(2) beschrieben. In *S. coelicolor* A3(2) ist die Produktion von Actinorhodin und CDA (*calcium-dependent antibiotic*) in Anwesenheit von Tetracyclin erhöht (Imai *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2017). Der molekulare Mechanismus des Tetracyclin-Effektes auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese von *S. coelicolor* A3(2) ist nicht bekannt.

ST136450 (*Streptomyces* sp.) hemmte das Wachstum von *P. aeruginosa* ATCC27853 im Topagar-Screening, wenn der Stamm zuvor in Anwesenheit von Desferrioxamin E kultiviert worden war. Ohne Signalmolekül-Zugabe wurde keine anti-*P. aeruginosa*-Aktivität detektiert. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Desferrioxamin E den Sekundärmetabolismus und die morphologische Entwicklung in Streptomyceten beeinflusst. So stimuliert Desferrioxamin E in *Streptomyces tanashiensis* die morphologische Entwicklung und die Biosynthese von Substanzen, die wachstumshemmend auf *Bacillus subtilis* wirken. In einem weiteren Actinobakterium (Genus unbestimmt) beeinflusst Desferrioxamin E die Biosynthese eines gelben Pigments und einer antibakteriellen Substanz positiv (Yamanaka *et al.*, 2005). Der molekulare Mechanismus der Wirkung von Desferrioxamin E auf den Sekundärmetabolismus ist ebenfalls nicht bekannt.

Nach Kultivierung in Anwesenheit von GlcNAc hatten die Stämme ST136450 (*Streptomyces* sp.), ST106056 (*Streptomyces* sp.) und DSM44150 (*Kibdelosporangium largum*) im Topagar-Screening eine wachstumshemmende Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853. In Abwesenheit von GlcNAc wurde keine anti-*P. aeruginosa*-Aktivität detektiert. Ein Effekt von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese wurde bereits für einzelne Stämme verschiedener Genera gezeigt (z. B. *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Rhodococcus*, *Actinokineospora*). Es wurden sowohl positive als auch negative Effekte von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese beschrieben. Das Spektrum bekannter beeinflusster Sekundärmetabolite umfasst Antibiotika, Pigmente sowie Siderophore (Craig *et al.*, 2012; Dashti *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015; Rigali *et al.*, 2008).

Zwei der Stämme, deren Bioaktivität im Festphasen-Kultivierungs- und Screening-Verfahren positiv durch GlcNAc moduliert wurde, wurden detaillierter bearbeitet, um Sekundärmetabolite zu identifizieren, deren Produktion durch GlcNAc beeinflusst wird.

Bei einem dieser Stämme handelte es sich um ST136450 (*Streptomyces* sp.). Die Zugabe von GlcNAc ins Medium hatte einen deutlichen Einfluss auf die Morphologie von

ST136450. Die Bildung von Luft-Mycel wurde in Anwesenheit von GlcNAc unterdrückt. In der Literatur wurde ein Einfluss von GlcNAc auf die morphologische Entwicklung bereits für *S. coelicolor*, *Streptomyces acrimycini*, *Streptomyces antibioticus* und *Streptomyces cacaoi* beschrieben. Es wurde berichtet, dass der GlcNAc-Effekt auf die Morphologie von *S. coelicolor* medienabhängig ist. Während die Anwesenheit von GlcNAc in nährstoffreichem R2YE-Medium die morphologische Entwicklung hemmte, hatte GlcNAc in Minimalmedium einen gegenteiligen Effekt (Craig *et al.*, 2012; Rigali *et al.*, 2008).

Basierend auf einer Metabolomanalyse wurde ermittelt, dass bei Kultivierung von ST136450 in Anwesenheit von GlcNAc die Produktion mehrerer Desferrioxamine erhöht war. Hierzu gehörten unter anderem verschiedene putativ glykosylierte Desferrioxamine. Aus Studien mit *S. coelicolor* ist bekannt, dass die Enzyme DesABCD die Biosynthese mehrerer unterschiedlicher Desferrioxamine katalysieren (Barona-Gómez *et al.*, 2004; Ronan *et al.*, 2018). Für die Biosynthese glykosylierter Desferrioxamin-Derivate wird neben DesABCD sehr wahrscheinlich eine Glykosyltransferase benötigt.

Zu den glykosylierten Desferrioxaminen, deren Produktion in ST136450 unter GlcNAc-Einfluss erhöht war, gehörte ein putativ einfach glykosyliertes Desferrioxamin-B-Derivat mit der Molekülformel $C_{31}H_{58}N_6O_{13}$. Hierbei könnte es sich um jenes Fructosyl-*N*-Glykoderivat von Desferrioxamin B handeln, das von Sekurova *et al.* (2016) beschrieben wurde. Sekurova *et al.* (2016) entdeckten dieses Derivat und drei weitere einfach glykosylierte Desferrioxamine bei dem Versuch, ein stilles Gencluster in *Streptomyces albus* PVA94-07 zu aktivieren. Hierzu wurde ein Cluster-situiertes Regulator-Gen homolog überexprimiert. Unerwarteterweise führte dies zur Produktion von glykosylierten Desferrioxaminen. Es ist zu vermuten, dass diese induzierte Glykosylierung die enzymatische Aktivität einer trans-agerenden Glykosyltransferase benötigt, welche eventuell durch die Überexprimierung des Regulators aktiviert wurde. Einen solchen Zusammenhang konnten Sekurova *et al.* (2016) allerdings nicht belegen. Im Falle von ST136450 wäre denkbar, dass die beobachtete erhöhte Produktion glykosylierter Desferrioxamine in Anwesenheit von GlcNAc auf ein Glykosyltransferase-Gen zurückzuführen ist, das unter transkriptioneller Kontrolle des globalen Regulators DasR steht. In *S. coelicolor* steuern die allosterischen Faktoren GlcN-6P und GlcNAc-6P die Aktivität von DasR (Rigali *et al.*, 2008; Tenconi *et al.*, 2015).

Neben dem genannten putativ einfach glykosylierten Desferrioxamin-B-Derivat wurden in den Kulturextrakten von ST136450 auch putativ zweifach glykosylierte Desferrioxamin-B- und Desferrioxamin-A₁-Derivate detektiert, deren Produktion bei Wachstum in

Anwesenheit von GlcNAc erhöht war. Gemäß einer Literaturrecherche wurden mehrfach glykosylierte Desferrioxamin-Derivate bisher nicht beschrieben.

Während in ST136450 durch GlcNAc-Zugabe eine deutlich erhöhte Produktion diverser Desferrioxamine auftrat, beobachteten Craig *et al.* (2012) in *S. coelicolor* und anderen *Streptomyces* spp. bei Anwesenheit von GlcNAc eine verminderte Produktion von Desferrioxaminen. Durch Zugabe von GlcNAc in das Kultivierungsmedium von *S. coelicolor* verringerte sich die Produktion der Siderophore Desferrioxamin B und Desferrioxamin E um das 25-fache bzw. 5-fache (Craig *et al.*, 2012).

Dass die GlcNAc-Zugabe ins Medium gegensätzliche Effekte auf die Desferrioxamin-Produktion in *S. coelicolor* und ST136450 hatte, könnte auf Abweichungen bezüglich der Regulation der Desferrioxamin-Biosynthese zurückzuführen sein. Möglich wäre auch, dass der abweichende Effekt in der Nutzung unterschiedlicher Kultivierungsmedien begründet liegt. Während die Experimente mit ST136450 in ISP2-Medium durchgeführt wurden, verwendeten Craig *et al.* (2012) für die Kultivierung von *S. coelicolor* R2YE-Medium. Dass die Wirkung von GlcNAc auf den Sekundärmetabolismus stark davon abhängig sein kann, in welchem Medium die Bakterien kultiviert werden, zeigten Rigali *et al.* (2008). Wurde *S. coelicolor* auf reichhaltigen R2YE-Agarplatten kultiviert, führte die Zugabe von ≥ 10 mM GlcNAc zum Medium zu einer Inhibierung der Produktion von Actinorhodin und Undecylprodigiosin. Bei einer Kultivierung auf Minimalmedium-Agarplatten hatte die Zugabe von ≥ 5 mM GlcNAc hingegen einen positiven Effekt auf die Produktion von Actinorhodin und Undecylprodigiosin (Rigali *et al.*, 2008).

Bei dem zweiten Stamm, der detailliert betrachtet wurde, handelte es sich um DSM44150 (*Kibdelosporangium aridum*). DSM44150 hatte bei der erneuten Bearbeitung im Topagar-Screening nur dann eine wachstumshemmende Wirkung auf *P. aeruginosa* ATCC27853 und *S. aureus* ATCC25923, wenn der Stamm zuvor unter GlcNAc-Einfluss kultiviert worden war. Dies deutete darauf hin, dass durch Supplementierung des Mediums mit GlcNAc die Produktion eines antibakteriellen Sekundärmetabolits verstärkt wurde. Trotz deutlicher Aktivität von DSM44150 (+ GlcNAc) im Topagar-Screening hatten die Methanol-Extrakte der Kulturen im MTT-Test keine Aktivität gegen *P. aeruginosa* ATCC27853 oder *S. aureus* ATCC25923. Dies könnte beispielsweise einer mangelnden Stabilität oder einer schlechten Extrahierbarkeit der anti-Gram-negativen Verbindung zugrunde liegen. Denkbar wäre auch, dass die anti-Gram-negative Verbindung nur dann verstärkt von DSM44150 produziert wird, wenn GlcNAc anwesend ist und gleichzeitig ein Zell-Zell-Kontakt zwischen DSM44150 und

dem Screeningstamm besteht. Eine solche Situation liegt im Topagar-Screening, nicht jedoch im MTT-Test vor. Die Notwendigkeit eines Zell-Zell-Kontaktes zur Anregung der Sekundärmetabolit-Biosynthese wurde beispielsweise bei der Co-Kultivierung von *Streptomyces lividans* mit dem Mycolsäure produzierenden Stamm *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 beobachtet. Onaka *et al.* (2011) zeigten, dass *T. pulmonis* TP-B0596 die Biosynthese eines roten Pigments in *Streptomyces lividans* TK23 induzieren kann. Für den Induktionseffekt ist die Mycolsäure in der Zellhülle von *T. pulmonis* notwendig. Entscheidend für das Auftreten eines Induktionseffektes ist auch, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen *T. pulmonis*-Zellen und *S. lividans* besteht. Der induzierende Effekt trat nur bei Verwendung lebendiger *T. pulmonis*-Zellen, nicht jedoch bei Einsatz eines *T. pulmonis*-Kulturfiltrates auf.

5.3 Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien

GlcNAc wurde in einem weiteren Projekt als Signalmolekül eingesetzt. Ziel dieses Projektes war es, weitere Sekundärmetabolite zu identifizieren, deren Produktion durch Anwesenheit von GlcNAc positiv beeinflusst wird. Unter 200 Stämmen wurden 22 Stämme identifiziert, deren Kulturextrakte nach Wachstum der Stämme unter GlcNAc-Zugabe eine verstärkte antibakterielle Aktivität hatten. Bei den drei Stämmen HAG010024, FH1286 und HAG010252 konnte dieser auf Einzelpunktbestimmungen basierende Erstbefund in weiteren durchgeführten Experimenten bestätigt werden. Nachfolgend wurde der Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Produktion in diesen Stämmen detaillierter analytisch nachverfolgt.

Bei FH1286 (*Streptomyces* sp.) führte die Anwesenheit von 20 mM GlcNAc zu einer Erhöhung der Produktion des B-Gruppen-Streptogramins Viridogrisein I. Hingegen wurde die Produktion des synergistisch mit Viridogrisein I wirkenden A-Gruppen-Streptogramins Griseoviridin nicht durch GlcNAc-Zugabe beeinflusst. Hierdurch entstand eine Verschiebung des Produktionsverhältnisses von Viridogrisein I und Griseoviridin zugunsten von Viridogrisein I.

In dem Pristinamycin-Produzenten *Streptomyces pristinaespiralis* wurde eine solche Verschiebung des natürlichen Produktionsverhältnisses eines A-Gruppen-Streptogramins (Pristinamycin II) und eines B-Gruppen-Streptogramins (Pristinamycin I) von Meng *et al.*

(2017) gezielt forciert. Die Produktion der Pristinamycin-Komponenten Pristinamycin I und Pristinamycin II ist industriell relevant, da Pristinamycin zur semi-synthetischen Herstellung des klinisch eingesetzten Synercids verwendet werden kann (Barrière *et al.*, 1994; Mast & Wohlleben, 2014). Die gleichzeitige Produktion von Pristinamycin I und II durch einen Stamm bringt zwei Nachteile mit sich. Aufgrund der synergistischen Wirkung beider Substanzen wird das Wachstum des Produzenten-Stammes bereits bei geringen Produktkonzentrationen gehemmt. Dies behindert weitere Maßnahmen zur Produktionssteigerung der Substanzen. Zudem verkompliziert sich durch die gleichzeitige Produktion von Pristinamycin I und Pristinamycin II die Produkt-Aufreinigung. Daher gibt es Bestrebungen, beide Pristinamycin-Komponenten separat zu produzieren (Meng *et al.*, 2017).

Durch Deletion zweier Pristinamycin-II-Biosynthese-Gene erstellten Meng *et al.* (2017) einen *S. pristinaespiralis*-Stamm, der ausschließlich Pristinamycin I produziert. Überraschenderweise führte die Deletion der Pristinamycin-II-Biosynthesegene zu einer um etwa 20-40 % reduzierten Pristinamycin-I-Produktion (Meng *et al.*, 2017). Meng *et al.* (2017) vermuten deshalb, dass Pristinamycin II die Pristinamycin-I-Produktion beeinflusst. Durch nachfolgende Deletion eines Repressor-Gens und durch das Hinzufügen einer zusätzlichen Kopie des Pristinamycin-I-Clusters konnte eine etwa zweifache Erhöhung der Pristinamycin-I-Produktion im Vergleich zum Parentalstamm erzielt werden (Meng *et al.*, 2017). Es wäre interessant zu untersuchen, ob GlcNAc in *S. pristinaespiralis* einen vergleichbaren Effekt auf die Streptogramin-Produktion hat wie in FH1286. Sollte dies zutreffen, könnte mit vergleichsweise geringem Aufwand eine Verschiebung des Produktionsverhältnisses von Pristinamycin I und Pristinamycin II zugunsten von Pristinamycin I erreicht werden. Dies könnte zu einer Optimierung der Kultivierungsbedingungen für die industrielle Produktion von Pristinamycin I beitragen.

Anders als im Falle von FH1286 hatte die Supplementierung des Mediums mit GlcNAc in zwei weiteren Viridogrisein-I-Produzenten (*Streptomyces daghestanicus* DSM40149 und *S. griseoviridis* DSM40229) keinen positiven Einfluss auf die Viridogrisein-I-Biosynthese. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieses Projektes somit eher darauf hin, dass der positive Effekt von GlcNAc auf die Viridogrisein-I-Produktion stammspezifisch und nicht konserviert für die Substanzklasse ist.

In HAG010252 (*Streptomyces* sp.) wurde die Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E durch GlcNAc-Zugabe positiv beeinflusst. Der positive Effekt von 20 mM GlcNAc auf die Desferrioxamin-E- und Oxytetracyclin-Produktion wurde durch

gleichzeitige Zugabe von Eisen(III)-citrat aufgehoben. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Eisenkonzentration als eine Art An-/Aus-Schalter für die Oxytetracyclin- und Desferrioxamin-E-Biosynthese fungiert und GlcNAc bei Unterschreitung eines Eisen-Schwellenwertes eine Fein-Regulierung der Biosynthese auslöst.

Gemäß einer Literaturrecherche wurde bisher nicht beschrieben, dass die Produktion von Oxytetracyclin durch GlcNAc oder Eisen beeinflusst wird. Zuvor wurde jedoch bereits von Bechet und Blondeau (1998) beobachtet, dass die Produktion von Tetracyclin bei Vorliegen hoher Eisenkonzentrationen gehemmt wird.

Dass hohe Eisenkonzentrationen im Medium zu einer Hemmung der Desferrioxamin-Biosynthese führen, ist literaturbekannt. Der dahinterstehende molekulare Mechanismus beruht zumindest teilweise auf der Wirkung von DmdR1, einem globalen Regulator des Eisenhaushalts. DmdR1 bindet bei ausreichender Eisen-Versorgung unter anderem an den Promotor des Desferrioxamin-Biosynthese-Operons *desABCD* und hemmt dadurch die Desferrioxamin-Produktion (Flores & Martín, 2004; Tunca *et al.*, 2007).

Eine Beeinflussung der Desferrioxamin-Produktion durch GlcNAc wurde bereits durch Craig *et al.* (2012) beschrieben. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeiten beobachteten Craig *et al.* (2012) in *S. coelicolor* jedoch einen komplett gegensätzlichen Effekt von GlcNAc auf die Desferrioxamin-Produktion. Die Zugabe von GlcNAc führte in *S. coelicolor* nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einer Verringerung der Desferrioxamin-Produktion. Der molekulare Mechanismus des negativen Effektes von GlcNAc auf die Desferrioxamin-Produktion in *S. coelicolor* konnte durch Craig *et al.* (2012) aufgeklärt werden. Hierbei zeigte sich, dass in *S. coelicolor* ein enges Zusammenspiel zwischen den Einflussfaktoren GlcNAc und Eisen auf die Desferrioxamin-Biosynthese existiert. Der globale Regulator DasR bindet in Abwesenheit von GlcNAc an die Promotorregion von *dmdR1* und reprimiert dadurch die Transkription dieses Gens. Bindet der allosterische Faktor GlcN-6-P an DasR, führt dies zur Verringerung der Bindungsaffinität von DasR und dem *dmdR1*-Promotor (Abbildung 33); dies resultiert in einer verstärkten Transkription von *dmdR1* und einer damit einhergehenden Hemmung der Desferrioxamin-Biosynthese (Craig *et al.*, 2012). Die Anwesenheit von GlcNAc hat in *S. coelicolor* somit einen Einfluss darauf, in welchem Maße der DmdR1-Regulator synthetisiert wird. Wie hoch die Bindungsaffinität des DmdR1-Regulators zum Promotor des *desABCD*-Operons ist, ist wiederum abhängig von der Eisenkonzentration (Flores & Martín, 2004; Tunca *et al.*, 2007).

Dass die Anwesenheit von GlcNAc in *S. coelicolor* und dem in diesem Projekt bearbeiteten Stamm HAG010252 gegensätzliche Effekte auf die Desferrioxamin-Produktion hatte, deutet

darauf hin, dass der *crossstalk* zwischen GlcNAc und Eisen in beiden Stämmen voneinander abweicht. Möglich wäre auch, dass die gegensätzlichen Effekte von GlcNAc auf einen unterschiedlichen Medienhintergrund zurückzuführen sind (vgl. Abschnitt 5.2).

Der im Rahmen dieses Projektes durchgeführte Screeningansatz zielte darauf ab, Stämme mit erhöhter Produktion antibakterieller Sekundärmetabolite bei Kultivierung unter Zugabe von GlcNAc zu identifizieren. Daher wurden nur solche Stämme weiterverfolgt, die eine erhöhte Extrakt-Aktivität nach Kultivierung in GlcNAc-haltigem Medium aufwiesen. Das Datenset umfasste jedoch auch Stämme, deren Extrakte nach Wachstum der Stämme unter GlcNAc-Einfluss eine verringerte antibakterielle Aktivität hatten. Es ist daher durchaus möglich, dass in einigen der 200 prozessierten Stämme unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen ein negativer Effekt von GlcNAc auf die Siderophor-Produktion auftrat.

GlcNAc beeinflusste in HAG010252 die Biosynthese zweier Sekundärmetabolite, deren Produktion gleichzeitig auch durch niedrige Eisen-Konzentrationen begünstigt wurde (Desferrioxamin E und Oxytetracyclin). Die Eisenkonzentration im Medium ist ein bekannter Einflussfaktor auf die Sekundärmetabolit-Produktion in Streptomyceten. Häufig haben niedrige Eisen-Konzentrationen einen positiven Effekt auf die Sekundärmetabolit-Produktion (Locatelli *et al.*, 2016). Es wäre interessant zu untersuchen, ob es ein allgemeiner Trend in Streptomyceten ist, dass eine verstärkte Produktion spezifischer Sekundärmetabolite unter Eisen-Limitierung mit einer erhöhten Produktion dieser Sekundärmetabolite in Anwesenheit von GlcNAc einhergeht. Sollte dies der Fall sein, könnte eventuell darauf verzichtet werden, stark Eisen-limitierte Medien zur Anregung der Produktion dieser Sekundärmetabolite zu verwenden. Stattdessen könnten die Produzenten in einem GlcNAc supplementiertem Komplexmedium wie ISP2 kultiviert werden. Dies hätte den Vorteil, dass das Wachstum der Stämme nicht aufgrund von Eisenmangel-Bedingungen herabgesetzt wird.

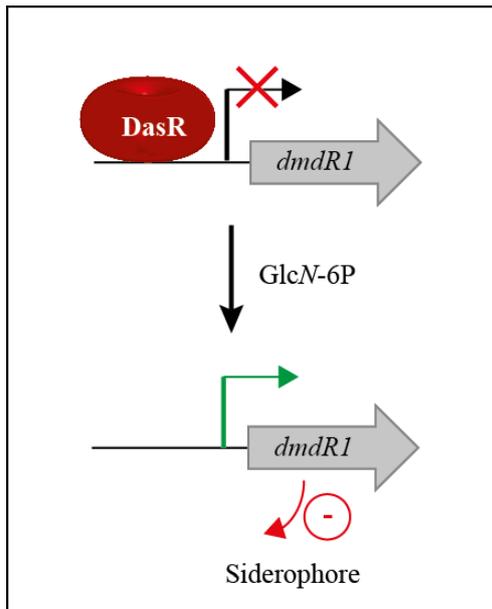


Abbildung 33: Regulation der Siderophor-Biosynthese in *S. coelicolor* durch den Regulator DasR. In Abwesenheit von GlcNAc bindet DasR als Repressor an die Promotorregion von *dmdR1* und reprimiert dadurch die Transkription dieses Gens. *dmdR1* kodiert für einen Repressor der Desferrioxamin-Biosynthese. Ist GlcNAc vorhanden, wird als Abbau-Zwischenprodukt GlcN-6P gebildet. GlcN-6P ist ein allosterischer Faktor des DasR-Regulators. Durch Bindung von GlcN-6P an DasR wird die DasR-Promotor-Bindung aufgehoben. Das Regulator-Gen *dmdR1* kann transkribiert werden. Dies führt zu einer Inhibition der Siderophor-Biosynthese (Craig *et al.*, 2012).

Auch im Falle von HAG010024 wurde ein deutlicher Effekt von GlcNAc auf die Siderophor-Produktion beobachtet. Somit wurden in diesem und dem vorherigen Projekt insgesamt drei *Streptomyces*-Stämme mit erhöhter Siderophor-Produktion detektiert (ST136450, HAG010252, HAG010024). Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich hierbei um einen in Streptomyceten weiter verbreiteten Effekt handelt.

Auffällig war, dass GlcNAc in HAG010024 einen deutlich stärkeren Effekt auf die Desferrioxamin-B-Produktion im Vergleich zur Desferrioxamin-E-Produktion hatte. In den Extrakten GlcNAc-supplementierter Kulturen war die relative Konzentration von Desferrioxamin B bzw. Desferrioxamin E etwa 15-fach bzw. 1,9-fach erhöht. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der Verfügbarkeit von Acetyl-CoA und Succinyl-CoA liegen. Die Biosynthese von Desferrioxamin B und E wurde in *S. coelicolor* aufgeklärt. Die ersten Schritte der Biosynthese von Desferrioxamin E und B sind die DesA-katalysierte Decarboxylierung von L-Lysin zu Cadaverin und die DesB-vermittelte Hydroxylierung von Cadaverin zu *N*-Hydroxycadaverin (Abbildung 34). Anschließend erfolgt die Acylierung von *N*-Hydroxycadaverin durch DesC. DesC ist durch eine gewisse Enzympromiskuität für die beiden Substrate Acetyl-CoA und Succinyl-CoA gekennzeichnet. Aus diesem Grund katalysiert DesC die Synthese der Verbindungen *N*-Hydroxy-*N*-Acetylcadaverin (HAC) sowie auch *N*-Hydroxy-*N*-Succinylcadaverin (HSC). DesD katalysiert die Verknüpfung von

6 Ausblick

6.1 Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mithilfe der PacBio-SMRT-Technologie 16S-ITS-Sequenzen hoher Genauigkeit generiert werden können. 16S-ITS-Sequenzen ermöglichten die Identifizierung von Stämmen auf Genus-Ebene. In vielen Fällen konnten *Streptomyces*-Stämme mithilfe von 16S-ITS-Sequenzen auch dann noch differenziert werden, wenn sie anhand ihrer 16S-rDNA-Sequenzen nicht mehr unterscheidbar gewesen wären. Prinzipiell ist die 16S-ITS-Sequenzierung somit eine interessante Methode zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung.

Um dieses Verfahren routinemäßig einsetzen zu können, wäre jedoch eine Optimierung der Sequenzanzahl pro Probe notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass die Sequenzanzahl pro Probe zu niedrig war (vgl. Abschnitt 4.1.3). Zwei Vorgehensweisen zur Erhöhung der Sequenzanzahl pro Probe wären denkbar. Zum einen könnte die Anzahl an Proben, die gemeinsam in einer SMRT Cell sequenziert werden, verringert werden. Die Gesamtanzahl an Sequenzen würde sich hierdurch auf weniger Proben verteilen und somit zu einer Erhöhung der Sequenzanzahl pro Probe führen. Der Preis für die *library*-Generierung und Sequenzierung mit einem PacBio RS-II-System (wie in dieser Studie verwendet) liegt bei etwa 890 \$ pro SMRT Cell¹. Hieraus ergibt sich für 96 gepoolte 16S-ITS-Proben ein Preis von etwa 9,27 \$/Probe. Um beispielsweise die Anzahl an Sequenzen pro Probe zu verdoppeln, müsste ein Preis von etwa 18,54 \$/Probe kalkuliert werden. Aufgrund der hohen Stammanzahl industrieller Stammsammlungen wäre ein solcher Preis als zu hoch einzustufen.

Eine günstigere Alternative könnte die Sequenzierung von 16S-ITS-Amplifikaten mit dem neu entwickelten PacBio Sequel-System darstellen. Das PacBio RS-II- und das Sequel-System basieren auf derselben Sequenzierungstechnologie. Während sich eine SMRT Cell

¹Diese Angaben beziehen sich auf die Kosten, die die Universität Washington für die Durchführung von *library*-Erstellung und Sequenzierung für akademische Arbeitsgruppen berechnet (<https://pacbio.gs.washington.edu/>, abgerufen am 25.11.18)

in einem PacBio RS-II-System jedoch aus 150.000 Sequenzierereinheiten zusammensetzt, ist ein Sequel-System aus 1.000.000 Sequenzierereinheiten aufgebaut. Hieraus ergibt sich, dass die Sequenzanzahl, die von einer SMRT Cell generiert wird, im PacBio Sequel-System etwa 7-fach höher ist als im PacBio RS-II-System (Ardui *et al.*, 2018). Der Preis für die *library*-Generierung und Sequenzierung mit einem Sequel-System liegt bei etwa 1937 \$ pro SMRT Cell¹. In der Theorie wäre somit ein Pooling von etwa 336 Proben möglich, um im Vergleich zu dieser Studie die doppelte Anzahl an Sequenzen pro Probe zu generieren. In diesem Fall läge der Preis für *library*-Generierung und Sequenzierung bei etwa 5,76 \$/Probe.

6.2 Einsatz von Signalmolekülen zur Steigerung der Produktion von Sekundärmetaboliten in Actinobakterien

In zwei Projekten dieser Arbeit wurde der Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Produktion ausgewählter Actinobakterien untersucht. Die Anwesenheit von GlcNAc im Kultivierungsmedium hatte einen positiven Effekt auf die Viridogrisein-I-Produktion durch FH1286 und die Oxytetracyclin-Produktion durch HAG010252. Weiterhin wurde in drei Stämmen (ST136450, HAG010252 und HAG010024) ein positiver Einfluss von GlcNAc auf die Desferrioxamin-Produktion detektiert.

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Sekundärmetaboliten, deren Produktion durch GlcNAc-Zugabe ins Medium beeinflusst wird. Ein Ziel nachfolgender Projekte könnte es sein, den molekularen Mechanismus der Wirkung von GlcNAc auf die Produktion der identifizierten Sekundärmetabolite aufzuklären. Eine solche Untersuchung könnte neue Erkenntnisse über die GlcNAc-abhängige Regulation des Sekundärmetabolismus von Streptomyceten liefern. Diese Erkenntnisse könnten für die Planung weiterer industrieller Projekte zur GlcNAc-vermittelten Modulation der Sekundärmetabolit-Produktion relevant sein.

Bevor zeitintensive Untersuchungen zum molekularen Mechanismus durchgeführt werden, sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten GlcNAc-Effekte auf einem Biomasse-Effekt beruhen. Da GlcNAc von Streptomyceten als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden kann (Swiatek *et al.*, 2012), wäre es möglich, dass die GlcNAc-Zugabe zum Medium zu einer erhöhten Biomasse der Kulturen mit GlcNAc-Zugabe im Vergleich zu den Kulturen ohne GlcNAc-Zugabe führte. Da alle Kulturen mit dem gleichen Lösungsmittelvolumen extrahiert wurden, könnte ein solcher Biomasse-Effekt für die

beobachteten Effekte von GlcNAc auf die relative Konzentration der Sekundärmetabolite in den Extrakten verantwortlich sein.

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus könnte zunächst eine Genom-Sequenzierung der Stämme durchgeführt werden. Auf Basis der Genominformationen wäre die Ableitung von Primern für die Durchführung quantitativer PCRs möglich. Mithilfe quantitativer PCRs könnte überprüft werden, ob die GlcNAc-vermittelte Produktions-Steigerung der oben genannten Sekundärmetabolite mit einer erhöhten Transkription der entsprechenden Biosynthese-Gene einhergeht.

Wenn dies zutrifft, wäre ein nächstmögliches Ziel die Identifizierung von Transkriptionsregulatoren, auf die die erhöhte Transkription der Biosynthese-Gene unter GlcNAc-Einfluss zurückzuführen ist. Aufgrund des bekannten Einflusses des globalen Regulators DasR auf die Sekundärmetabolit-Biosynthese von *S. coelicolor* (Craig *et al.*, 2012; Rigali *et al.*, 2008) und *S. erythraea* (Liao *et al.*, 2015) sollte als erster Ansatzpunkt untersucht werden, ob DasR eine regulierende Funktion auf die Biosynthese der identifizierten Sekundärmetabolite hat. Hierzu könnte zunächst auf Basis der Genominformationen abgeleitet werden, ob die Stämme das Potential haben, ein Regulatorprotein mit hoher Sequenzähnlichkeit zu DasR aus *S. coelicolor* zu produzieren.

In *S. coelicolor* umfasst das DasR-Regulon Gene, die am Metabolismus und Transport von GlcNAc sowie am Abbau von Chitin beteiligt sind (Colson *et al.*, 2007; Joris *et al.*, 2004; Swiatek-Polatynska *et al.*, 2015). Kann *in silico* eine DasR-Bindestelle in der Promotorregion entsprechender Gene auch in ST136450, HAG010252 und HAG010024 detektiert werden, wäre dies ein weiterer Hinweis dafür, dass die Stämme einen DasR-Regulator produzieren. Weiterhin sollte *in silico* überprüft werden, ob sich putative DasR-Bindestellen in Promotor-Regionen von Genen befinden, die im Zusammenhang mit der Biosynthese von Oxytetracyclin, Viridogrisein I bzw. Desferrioxaminen stehen könnten. Sofern solche putativen Bindestellen *in silico* detektiert wurden, könnten *electrophoretic mobility shift assays* durchgeführt werden, um die Bindestellen *in vitro* zu bestätigen.

Zudem könnten *dasR*-Knockout-Mutanten von ST136450, HAG010252 und HAG010024 erstellt werden. Durch UPLC-HR-MS-Messungen könnte eine relative Quantifizierung von Oxytetracyclin, Viridogrisein I bzw. Desferrioxaminen in den Kulturextrakten der Mutanten und der Wildtyp-Stämme erfolgen. Wenn der im Wildtyp beobachtete positive Effekt von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Produktion durch den Knockout von *dasR* aufgehoben wird, wäre dies ein deutlicher Hinweis dafür, dass DasR eine regulierende Funktion auf die Biosynthese dieser Sekundärmetabolite hat.

Während in den Stämmen ST136450, HAG010252 und HAG010024 unter GlcNAc-Einfluss eine verstärkte Desferrioxamin-Produktion auftrat, beobachteten Craig *et al.* (2012) in *S. coelicolor* und anderen *Streptomyces* spp. einen gegensätzlichen Effekt von GlcNAc auf die Desferrioxamin-Produktion. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieses gegensätzliche Ergebnis mit der Nutzung unterschiedlicher Medien zusammenhängen könnte. Craig *et al.* (2012) verwendeten für die Kultivierungen R2YE-Medium, für die Kultivierung von ST136450 wurde ISP2-Medium eingesetzt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte getestet werden, ob GlcNAc auch dann einen positiven Effekt auf die Siderophor-Produktion von ST136450 hat, wenn R2YE- statt ISP2-Medium verwendet wird. Ebenso wäre zu testen, ob GlcNAc auch dann einen negativen Einfluss auf die Desferrioxamin-Produktion in *S. coelicolor* hat, wenn ISP2- statt R2YE-Medium genutzt wird.

Bei der Planung eines zukünftigen industriellen Arbeitsablaufes zur GlcNAc-vermittelten Steigerung der Sekundärmetabolit-Biosynthese sollte angestrebt werden, das Verhältnis zwischen der Anzahl detektierter GlcNAc-Effekte und hierzu benötigter Ressourcen (Arbeitszeit und Material) zu erhöhen. Um dies zu erreichen, könnte zum einen daran gearbeitet werden, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines GlcNAc-Effektes zu steigern, zum anderen könnte eine verbesserte Detektion der GlcNAc-Effekte zielführend sein.

Es gibt mehrere Hinweise in der Literatur, dass der Einfluss von GlcNAc auf die Sekundärmetabolit-Produktion medienabhängig ist. So beobachteten Rigali *et al.* (2008), dass GlcNAc in nährstoffarmem MM-Medium, nicht jedoch in nährstoffreichem R2YE-Medium einen positiven Effekt auf die Actinorhodin- und Undecylprodigiosin-Produktion hat. Weiterhin wurde berichtet, dass die DasR-Promotorbindung positiv durch eine hohe Phosphatkonzentration beeinflusst wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Verbindung zwischen Phosphat-Nutzung und DasR bestehen könnte (Tenconi *et al.*, 2015). Auch die in dieser Arbeit detektierte Aufhebung des GlcNAc-Effektes auf die Oxytetracyclin-Produktion durch Eisen(III)-citrat deutet darauf hin, dass die Wirkung von GlcNAc durch Medien-Komponenten beeinflusst werden kann. Es könnte daher zielführend sein, den Einfluss von GlcNAc in verschiedenen Medien zu testen. Denkbar wäre beispielsweise eine Variation der Phosphat- oder Eisen-Konzentration oder das Testen verschiedener Kohlenstoffquellen.

Rigali *et al.* (2008) beschrieben, dass GlcNAc in *S. coelicolor* nur in hoher Konzentration (≥ 5 mM) einen Effekt auf die Produktion der Sekundärmetabolite Actinorhodin und Undecylprodigiosin hat. Eine ähnliche Tendenz konnte in dieser Arbeit auch für den GlcNAc-Effekt auf die Viridogrisein-I-Produktion beobachtet werden: GlcNAc beeinflusste die Viridogrisein-I-Produktion detektierbar nur bei Einsatz von 20 mM GlcNAc, nicht hingegen bei einer Konzentration von 2 mM. Auf der anderen Seite wurde in der Literatur beschrieben, dass GlcNAc bereits bei einer deutlich geringeren Konzentration (50 μ M) einen positiven Effekt auf die Produktion von Actinosporinen durch *Actinokineospora* sp. hat (Dashti *et al.*, 2017). Durch Variation der GlcNAc-Konzentration könnte getestet werden, ob GlcNAc je nach Konzentration die Biosynthese unterschiedlicher Sekundärmetabolite beeinflusst.

Consensus-Bindestellen der DasR-Regulatoren von *S. coelicolor* und *Saccharopolyspora erythraea* sind bekannt (Colson *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2014). Es könnte hilfreich sein, dieses Wissen in die Stammauswahl einzubeziehen. Kriterium für die Auswahl eines Stammes könnte sein, dass sich DasR-Bindestellen in bioinformatisch vorhergesagten Sekundärmetabolit-Biosyntheseclustern befinden. Auf diese Weise könnte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass GlcNAc einen Effekt auf den Sekundärmetabolismus der ausgewählten Stämme zeigt. Zu beachten ist dabei, dass dieses Vorgehen die Stammauswahl auf genomsequenzierte Stämme beschränkt. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Consensus-Bindestelle des DasR-Regulators möglicherweise in entfernter verwandten Genera von den bekannten Consensus-Bindestellen abweicht.

Eine verbesserte Detektion auftretender GlcNAc-Effekte auf den Sekundärmetabolismus könnte beispielsweise dadurch erreicht werden, dass alle Kultivierungen in Triplikaten durchgeführt werden. Hiermit würde die Gefahr falschpositiver bzw. falschnegativer Ergebnisse verringert werden. Ein Nachteil wäre jedoch, dass dieses Vorgehen die Probenanzahl pro Stamm deutlich steigern würde.

GlcNAc kann von einigen Bakterien (z. B. *Streptomyces* spp.) als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden. Wenn deutlicher zwischen Biomasse-Effekten und spezifisch regulatorischen Effekten durch GlcNAc unterschieden werden soll, müssten eine Biomassebestimmung der Kulturen und eine Normierung der Proben stattfinden. Eine solche Unterscheidung wäre dann sinnvoll, wenn in nachfolgenden Arbeiten die molekularen Grundlagen der spezifischen GlcNAc-Effekte aufgeklärt werden sollen.

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass GlcNAc in mehreren Stämmen einen positiven Einfluss auf die Siderophor-Produktion hatte. Diese Beobachtung ist akademisch interessant, hat jedoch für die Arbeitsgruppe keine direkte Relevanz. Die wachstumshemmende Aktivität von Siderophoren auf einige bakterielle Screeningorganismen basiert darauf, dass Siderophore im Medium vorhandene Eisen-Ionen abfangen. Um die Detektion von Siderophoren zukünftig zu verhindern, könnte den Kulturextrakten vor der Aktivitäts-Testung Eisen(III)-citrat zugefügt werden. Alternativ könnten die Screeningorganismen auf solche Stämme beschränkt werden, die insensitiv gegenüber häufig in Actinobakterien vorkommende Siderophore sind.

Eine weitere Maßnahme könnte die Ausweitung der analytischen Auswertung der Kulturextrakte sein. Beispielsweise könnte anhand der UPLC-HR-MS-Daten jedes Stammes eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt werden. Durch eine PCA könnte abgeschätzt werden, ob sich das Metabolom des Stammes durch GlcNAc deutlich ändert. Weiterhin könnte überprüft werden, welche Metabolite den größten Einfluss auf die Varianz zwischen den Proben mit und ohne GlcNAc haben. In Verbindung mit UPLC-HR-MS/MS-Daten könnte analysiert werden, ob es sich hierbei um bekannte oder unbekannte Verbindungen handelt.

In dieser Arbeit beschränkte sich das Screeningfenster auf Sekundärmetabolite mit antibakterieller Aktivität. Mit einer Ausweitung des Screeningfensters würde die Wahrscheinlichkeit steigen, dass in einem Stamm GlcNAc-Effekte auf die Produktion bioaktiver Sekundärmetabolite detektiert werden können. So könnte es beispielsweise sinnvoll sein, die Extrakte hinsichtlich einer antifungalen Bioaktivität zu testen. Chitin ist Bestandteil der pilzlichen Zellwand und setzt sich aus GlcNAc-Monomeren zusammen (Hoell *et al.* 2010). Möglicherweise signalisiert GlcNAc Bakterien, dass Pilze anwesend sind und führt zu einer Steigerung der Produktion antifungaler Substanzen.

7 Literaturverzeichnis

Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M. F. (2004). Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *J Bacteriol* **186**, 2629-2635.

Anaya-López, J. L., López-Meza, J. E. & Ochoa-Zarzosa, A. (2013). Bacterial resistance to cationic antimicrobial peptides. *Crit Rev in Microbiol* **39**, 180-195.

Ardui, S., Ameer, A., Vermeesch, J. R. & Hestand, M. S. (2018). Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res* **46**, 2159-2168.

Atkinson, G. C., Tenson, T. & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS one* **6**, e23479-e23479.

Baltz, R. (2007). Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future. *Microbe* **2**, 125-131.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y. & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 1-43.

Barona-Gómez, F., Wong, U., Giannakopoulos, A. E., Derrick, P. J. & Challis, G. L. (2004). Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J Am Chem Soc* **126**, 16282-16283.

Barrière, J. C., Bouanchaud, D., Desnottes, J. & Paris, J. (1994). Streptogramin analogues. *Expert Opin Investig Drugs* **3**, 115-131.

Bechet, M. & Blondeau, R. (1998). Iron deficiency-induced tetracycline production in submerged cultures by *Streptomyces aureofaciens*. *J Appl Microbiol* **84**, 889-894.

Berdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* **65**, 385-395.

Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**, 208-215.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**, 42-51.

Boutte, C. C. & Crosson, S. (2013). Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* **21**, 174-180.

Boyer, S. L., Flechtner, V. R. & Johansen, J. R. (2001). Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol Biol Evol* **18**, 1057-1069.

Calus, S. T., Ijaz, U. Z. & Pinto, A. J. (2018). NanoAmpli-Seq: a workflow for amplicon sequencing for mixed microbial communities on the nanopore sequencing platform. *GigaScience* **7**.

Carneiro, M. O., Russ, C., Ross, M. G., Gabriel, S. B., Nusbaum, C. & DePristo, M. A. (2012). Pacific Biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data. *BMC Genomics* **13**, 375.

Cashel, M. & Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* **221**, 838-841.

Cheng, Y., Yang, R., Lyu, M., Wang, S., Liu, X., Wen, Y., Song, Y., Li, J. & Chen, Z. (2018). IdeR, a DtxR Family Iron Response Regulator, Controls Iron Homeostasis, Morphological Differentiation, Secondary Metabolism, and the Oxidative Stress Response in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Environ Microbiol* **84**, 1-19.

Chng, C., Lum, A. M., Vroom, J. A. & Kao, C. M. (2008). A key developmental regulator controls the synthesis of the antibiotic erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 11346-11351.

Choi, S. U., Lee, C. K., Hwang, Y. I., Kinoshita, H. & Nihira, T. (2003). Gamma-butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites. *Arch Microbiol* **180**, 303-307.

Chopra, I. (1985). Mode of Action of the Tetracyclines and the Nature of Bacterial Resistance to Them. In: *The Tetracyclines*, S. 317-392. Edited by J. J. Hlavka & J. H. Boothe: Springer Berlin Heidelberg.

Chou, C.-H. & Wang, C. (2006). Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. *Int J Food Microbiol* **110**, 135-148.

Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y.-W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.

Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**, 840-862.

CLSI (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard; CLSI document M07-A9.

Cocito, C. (1979). Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol Rev* **43**, 145-192.

Colson, S., Stephan, J., Hertrich, T., Saito, A., van Wezel, G. P., Titgemeyer, F. & Rigali, S. (2007). Conserved cis-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of streptomycetes are DasR-responsive elements. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 60-66.

Conrath, G., Vacus, J. & Barker, N. P. (2001). Pharmaceutical compositions based on dalfofristine and on quinupristine, and preparation thereof. Patent US6187746B1. Aventis Pharma SA.

Craig, M., Lambert, S., Jourdan, S., Tenconi, E., Colson, S., Maciejewska, M., Ongena, M., Martin, J. F., van Wezel, G. & Rigali, S. (2012). Unsuspected control of siderophore production by N-acetylglucosamine in streptomycetes. *Environ Microbiol Rep* **4**, 512-521.

Dashti, Y., Grkovic, T., Abdelmohsen, U. R., Hentschel, U. & Quinn, R. J. (2017). Actinomycete Metabolome Induction/Suppression with N-Acetylglucosamine. *J Nat Prod* **80**, 828-836.

de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L. & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis* **16**, 466-471.

Demain, A. L. & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **69**, 1-39.

den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K. & Buttner, M. J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* **78**, 361-379.

Derouaux, A., Dehareng, D., Lecocq, E., Halici, S., Nothaft, H., Giannotta, F., Moutzourelis, G., Dusart, J., Devreese, B., Titgemeyer, F., Van Beeumen, J. & Rigali, S. (2004a). Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind cAMP. *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 983-990.

Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J., Titgemeyer, F. & Rigali, S. (2004b). Deletion of a Cyclic AMP Receptor Protein Homologue Diminishes Germination and Affects Morphological Development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **186**, 1893-1897.

Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**, 51-78.

DSMZ (2019). Katalogeintrag *Streptomyces daghestanicus* DSM40149. Verfügbar unter "<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-40149.html>" (Zugriffsdatum: 20.02.2019).

Durfee, T., Hansen, A.-M., Zhi, H., Blattner, F. R. & Jin, D. J. (2008). Transcription Profiling of the Stringent Response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 1084-1096.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong,

- F., Korfach, J. & Turner, S. (2009).** Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* **323**, 133-138.
- Elliot, M. A., Bibb, M. J., Buttner, M. J. & Leskiw, B. K. (2001).** BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **40**, 257-269.
- Fass, R. J. & Barnishan, J. (1979).** Minimal inhibitory concentrations of 34 antimicrobial agents for control strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Antimicrob Agents Chemother* **16**, 622-624.
- Fernández, L. & Hancock, R. E. W. (2012).** Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* **25**, 661-681.
- Fisher, M. M. & Triplett, E. W. (1999).** Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4630-4636.
- Flärdh, K. & Buttner, M. J. (2009).** *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**, 36-49.
- Flores, F. J. & Martín, J. F. (2004).** Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes. *Biochem J* **380**, 497-503.
- Gao, C., Hindra, Mulder, D., Yin, C. & Elliot, M. A. (2012).** Crp is a global regulator of antibiotic production in streptomyces. *MBio* **3**.
- Garcia-Martinez, J., Acinas, S. G., Anton, A. I. & Rodriguez-Valera, F. (1999).** Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods* **36**, 55-64.
- Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G., Yarza, P., Peplies, J., Westram, R. & Ludwig, W. (2017).** 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *J Biotechnol* **261**, 169-176.
- Gomelsky, M. (2011).** cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: Bacteria use them all! *Mol Microbiol* **79**, 562-565.
- Gründling, A. & Lee, V. T. (2016).** Old concepts, new molecules and current approaches applied to the bacterial nucleotide signalling field. *Philos Trans Royal Soc B* **371**.
- Gurtler, V. & Stanisich, V. A. (1996).** New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142** 3-16.
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1997).** Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 202-206.
- Hall, R. (2016).** usearch_16S.sh. Verfügbar unter "<https://gist.github.com/rhallPB/49b1b1ac282fab9cca77>" (Zugriffsdatum: 13.05.2019).

Hall, R. (2017). ccsPrimer.py. Verfügbar unter "<https://gist.github.com/rhallPB/f225234f5a55fb00d5b64a6f70969d55>" (Zugriffsdatum: 13.05.2019).

Haste, N. M., Perera, V. R., Maloney, K. N., Tran, D. N., Jensen, P., Fenical, W., Nizet, V. & Hensler, M. E. (2010). Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antibiot* **63**, 219-224.

Hengge, R., Gründling, A., Jenal, U., Ryan, R. & Yildiz, F. (2016). Bacterial Signal Transduction by Cyclic Di-GMP and Other Nucleotide Second Messengers. *J Bacteriol* **198**, 15-26.

Hertweck, C. (2009). Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nat Chem Biol* **5**, 450-452.

Hesketh, A., Chen, W. J., Ryding, J., Chang, S. & Bibb, M. (2007). The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biol* **8**, R161-R161.

Hoell, I. A., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2010). Structure and function of enzymes acting on chitin and chitosan. *Biotechnol Genet Eng* **27**, 331-366.

Hoffmann, M., Brown, E. W., Feng, P. C. H., Keys, C. E., Fischer, M. & Monday, S. R. (2010). PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species. *BMC Microbiol* **10**, 90-90.

Hulton, C. S., Higgins, C. F. & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* **5**, 825-834.

Ikeda, H., Shin-ya, K. & Omura, S. (2013). Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**.

Imai, Y., Sato, S., Tanaka, Y., Ochi, K. & Hosaka, T. (2015). Lincomycin at Subinhibitory Concentrations Potentiates Secondary Metabolite Production by *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol* **81**, 3869-3879.

Jadhav & Dorrestein (2017). GNPS Library Spectrum CCMSLIB00000848941 Verfügbar unter "<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/gnpslibraryspectrum.jsp?SpectrumID=CCMSLIB00000848941#%7B%7D>" (Zugriffsdatum: 12.11.2018).

Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B. & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* **17**, 239.

Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* **45**, 2761-2764.

Jarocki, P., Podleśny, M., Komoń-Janczara, E., Kucharska, J., Glibowska, A. & Targoński, Z. (2016). Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal bifidobacteria at the species, subspecies and strain level. *BMC Microbiol* **16**, 159.

- Jianya, Z., Di, S., Wenshuai, L., Zhi, C., Jilun, L. & Ying, W. (2016).** AvaR2, a pseudo γ -butyrolactone receptor homologue from *Streptomyces avermitilis*, is a pleiotropic repressor of avermectin and avenolide biosynthesis and cell growth. *Mol Microbiol* **102**, 562-578.
- Joris, B., Titgemeyer, F., Nothhaft, H., Merzbacher, M., Schlicht, M., Hoskisson, P. & Rigali, S. (2004).** Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix–turn–helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships. *Nucleic Acids Res* **32**, 3418-3426.
- Kämpfer, P. (2012).** Genus *Streptomyces*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Actinobacteria. Editiert von W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K. I. Suzuki & A. Parte: Springer.
- Kelner, A. (1948).** A Method for Investigating Large Microbial Populations for Antibiotic Activity. *J Bacteriol* **56**, 157-162.
- Kim, M. & Chun, J. (2014).** Chapter 4 - 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. In: Method Microbiol, S. 61-74. Editiert von M. Goodfellow, I. Sutcliffe & J. Chun: Academic Press.
- Koeuth, T., Versalovic, J. & Lupski, J. R. (1995).** Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* **5**, 408-418.
- Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, S.-B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., Sakane, T., Suzuki, K. I. & Hatano, K. (2012).** Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **101**, 73-104.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, S. 115-175. Editiert von E. Stackebrandt & M. Goodfellow: Wiley.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z. & Swings, J. (2004).** BOX-PCR Fingerprinting as a Powerful Tool to Reveal Synonymous Names in the Genus *Streptomyces*. Emended Descriptions are Proposed for the Species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol* **27**, 84-92.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M. C., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y. & Swings, J. (2005).** Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Res Microbiol* **156**, 755-762.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. & Decaris, B. (1996).** 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int J Syst Evol Microbiol* **46**, 102-111.
- Levene, M. J., Korlach, J., Turner, S. W., Foquet, M., Craighead, H. G. & Webb, W. W. (2003).** Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations. *Science* **299**, 682-686.

- Li, W., Raoult, D. & Fournier, P. E. (2009).** Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 892-916.
- Li, X. Z., Livermore, D. M. & Nikaido, H. (1994).** Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1732-1741.
- Liao, C., Rigali, S., Cassani, C. L., Marcellin, E., Nielsen, L. K. & Ye, B. C. (2014).** Control of chitin and *N*-acetylglucosamine utilization in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology* **160**, 1914-1928.
- Liao, C. H., Xu, Y., Rigali, S. & Ye, B. C. (2015).** DasR is a pleiotropic regulator required for antibiotic production, pigment biosynthesis, and morphological development in *Saccharopolyspora erythraea*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 10215-10224.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G. & Tan, H. (2013).** Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 112-143.
- Locatelli, F. M., Goo, K. S. & Ulanova, D. (2016).** Effects of trace metal ions on secondary metabolism and the morphological development of streptomycetes. *Metallomics* **8**, 469-480.
- Martinez, J. L. (2009).** Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* **157**, 2893-2902.
- Mast, Y. & Wohlleben, W. (2014).** Streptogramins – Two are better than one! *Int J Med Microbiol* **304**, 44-50.
- Masuma, R., Tanaka, Y., Tanaka, H. & Omura, S. (1986).** Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. *J Antibiot* **39**, 1557-1564.
- McGregor, J. F. (1954).** Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces* sp. *J Gen Microbiol* **11**, 52-56.
- McIntyre, J. J., Bull, A. T. & Bunch, A. W. (1996).** Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnol Bioeng* **49**, 412-420.
- Mendez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. (1985).** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol* **31**, 446-450.
- Meng, J., Feng, R., Zheng, G., Ge, M., Mast, Y., Wohlleben, W., Gao, J., Jiang, W. & Lu, Y. (2017).** Improvement of pristinomycin I (PI) production in *Streptomyces pristinaespiralis* by metabolic engineering approaches. *Synth Syst Biotechnol* **2**, 130-136.
- Messenger, A. J. M. & Barclay, R. (1983).** Bacteria, iron and pathogenicity. *Biochem Educ* **11**, 54-63.
- Muller, P. J., Haubold, G., Menner, M., Grosse, H. H., Ozegowski, J. H. & Bocker, H. (1984).** Effect of phosphate on the biosynthesis of nourseothricin by *Streptomyces noursei* JA 3890b. *Z Allg Mikrobiol* **24**, 555-564.

Nelson, M. L. & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci* **1241**, 17-32.

Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* **26**, 1362-1384.

Northey, G., Gal, M., Rahmati, A. & Brazier, J. S. (2005). Subtyping of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 by REP-PCR and PFGE. *J Med Microbiol* **54**, 543-547.

O'Shea, R. & Moser, H. E. (2008). Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J Med Chem* **51**, 2871-2878.

O'Brien, J. & Wright, G. D. (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr Opin Biotech* **22**, 552-558.

Ochi, K. & Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 87-98.

Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J.-y., Tomono, A. & Horinouchi, S. (2005). AdpA, a Central Transcriptional Regulator in the A-Factor Regulatory Cascade That Leads to Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 431-439.

Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol* **77**, 400-406.

Osborn, M. J. (1969). Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu Rev Biochem* **38**, 501-538.

PacBio (2015). Procedure & Checklist - Preparing SMRTbell™ Libraries using PacBio® Barcoded Universal Primers for Multiplex SMRT® Sequencing. Verfügbar unter "<https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Procedure-and-Checklist-Preparing-SMRTbell-Libraries-PacB-Barcoded-Universal-Primers.pdf>" (Zugriffsdatum: 11.12.2018).

Petković, H., Lukežič, T. & Šušković, J. (2017). Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*: Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technol Biotech* **55**, 3-13.

Pettit, R. K. (2011). Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microb Biotechnol* **4**, 471-478.

Rang, F. J., Kloosterman, W. P. & de Ridder, J. (2018). From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol* **19**, 90.

Repine, J. E., Fox, R. B. & Berger, E. M. (1981). Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *J Biol Chem* **256**, 7094-7096.

- Rhoads, A. & Au, K. F. (2015).** PacBio Sequencing and Its Applications. *Genom Proteom Bioinf* **13**, 278-289.
- Richter, M. F. & Hergenrother, P. J. (2018).** The challenge of converting Gram-positive-only compounds into broad-spectrum antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* **1435**, 18-38.
- Rigali, S., Anderssen, S., Naome, A. & van Wezel, G. P. (2018).** Cracking the regulatory code of biosynthetic gene clusters as a strategy for natural product discovery. *Biochem Pharmacol* **153**, 24-34.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A. & van Wezel, G. P. (2008).** Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep* **9**, 670-675.
- Ronan, J. L., Kadi, N., McMahan, S. A., Naismith, J. H., Alkhalaf, L. M. & Challis, G. L. (2018).** Desferrioxamine biosynthesis: diverse hydroxamate assembly by substrate-tolerant acyl transferase DesC. *Philos Trans Royal Soc B* **373**.
- Rurangirwa, F. R., Brayton, K. A., McGuire, T. C., Knowles, D. P. & Palmer, G. H. (2002).** Conservation of the unique rickettsial rRNA gene arrangement in *Anaplasma*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1405-1409.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. (2016).** Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**, 3984-3999.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S. & Bestervelt, L. L. (2013).** Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol* **53**, 303-317.
- Saito, A., Fujii, T., Shinya, T., Shibuya, N., Ando, A. & Miyashita, K. (2008).** The *msiK* gene, encoding the ATP-hydrolysing component of N,N'-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **154**, 3358-3365.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Edn. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Avalos, M., Guzman-Trampe, S., Rodriguez-Sanoja, R., Langley, E. & Ruiz, B. (2010).** Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot* **63**, 442-459.
- Schadt, E. E., Turner, S. & Kasarskis, A. (2010).** A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* **19**, R227-R240.
- Scherlach, K. & Hertweck, C. (2009).** Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem* **7**, 1753-1760.
- Scheu, A.-K., Martínez, E., Soliveri, J. & Malpartida, F. (1997).** *abaB*, a putative regulator for secondary metabolism in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **147**, 29-36.

Schloss, P. D., Jenior, M. L., Koumpouras, C. C., Westcott, S. L. & Highlander, S. K. (2016). Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system. *PeerJ* **4**, e1869.

Schlumbohm, W. & Keller, U. (1990). Chromophore activating enzyme involved in the biosynthesis of the mikamycin B antibiotic etamycin from *Streptomyces griseoviridis*. *J Biol Chem* **265**, 2156-2161.

Schumacher, M. A., Zeng, W., Findlay, K. C., Buttner, M. J., Brennan, R. G. & Tschowri, N. (2017). The *Streptomyces* master regulator BldD binds c-di-GMP sequentially to create a functional BldD(2)-(c-di-GMP)(4) complex. *Nucleic Acids Res* **45**, 6923-6933.

Sekurova, O. N., Perez-Victoria, I., Martin, J., Degnes, K. F., Sletta, H., Reyes, F. & Zotchev, S. B. (2016). New Deferoxamine Glycoconjugates Produced upon Overexpression of Pathway-Specific Regulatory Gene in the Marine Sponge-Derived *Streptomyces albus* PVA94-07. *Molecules* **21**.

Seyfzadeh, M., Keener, J. & Nomura, M. (1993). SpoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11004-11008.

Shao, Z. H., Ren, S. X., Liu, X. Q., Xu, J., Yan, H., Zhao, G. P. & Wang, J. (2015). A preliminary study of the mechanism of nitrate-stimulated remarkable increase of rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* U32 by RNA-seq. *Microb Cell Fact* **14**, 75.

Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **16**, 313-340.

Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**, 195-197.

Stern, M. J., Ames, G. F.-L., Smith, N. H., Clare Robinson, E. & Higgins, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015-1026.

Stewart, F. J. & Cavanaugh, C. M. (2007). Intragenomic Variation and Evolution of the Internal Transcribed Spacer of the rRNA Operon in Bacteria. *J Mol Evol* **65**, 44-67.

Swiatek-Polatynska, M. A., Bucca, G., Laing, E., Gubbens, J., Titgemeyer, F., Smith, C. P., Rigali, S. & van Wezel, G. P. (2015). Genome-wide analysis of *in vivo* binding of the master regulator DasR in *Streptomyces coelicolor* identifies novel non-canonical targets. *PLoS One* **10**, e0122479.

Świątek, M. A., Tenconi, E., Rigali, S. & van Wezel, G. P. (2012). Functional Analysis of the N-Acetylglucosamine Metabolic Genes of *Streptomyces coelicolor* and Role in Control of Development and Antibiotic Production. *J Bacteriol* **194**, 1136-1144.

Swiatek, M. A., Urem, M., Tenconi, E., Rigali, S. & van Wezel, G. P. (2012). Engineering of N-acetylglucosamine metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and an unsuspected role of NagA in glucosamine metabolism. *Bioengineered* **3**, 280-285.

Takano, E. (2006). Gamma-butyrolactones: Streptomyces signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* **9**, 287-294.

Tanaka, Y., Izawa, M., Hiraga, Y., Misaki, Y., Watanabe, T. & Ochi, K. (2017). Metabolic perturbation to enhance polyketide and nonribosomal peptide antibiotic production using triclosan and ribosome-targeting drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 4417-4431.

Tao, X., Schiering, N., Zeng, H.-y., Ringe, D. & Murphy, J. R. (1994). Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol Microbiol* **14**, 191-197.

Telfer, T. J., Gotsbacher, M. P., Soe, C. Z. & Codd, R. (2016). Mixing Up the Pieces of the Desferrioxamine B Jigsaw Defines the Biosynthetic Sequence Catalyzed by DesD. *ACS Chem Biol* **11**, 1452-1462.

Tenconi, E., Urem, M., Świątek-Połatyńska, M. A., Titgemeyer, F., Muller, Y. A., van Wezel, G. P. & Rigali, S. (2015). Multiple allosteric effectors control the affinity of DasR for its target sites. *Biophys Res Commun* **464**, 324-329.

Travers, K. J., Chin, C. S., Rank, D. R., Eid, J. S. & Turner, S. W. (2010). A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Res* **38**, e159.

Tschowri, N., Schumacher, Maria A., Schlimpert, S., Chinnam, Naga b., Findlay, Kim C., Brennan, Richard G. & Buttner, Mark J. (2014). Tetrameric c-di-GMP Mediates Effective Transcription Factor Dimerization to Control *Streptomyces* Development. *Cell* **158**, 1136-1147.

Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. J. & Martin, J. F. (2007). Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the desA gene. *FEBS J* **274**, 1110-1122.

van der Aart, L. T., Spijksma, G. K., Harms, A., Vollmer, W., Hankemeier, T. & van Wezel, G. P. (2018). High-Resolution Analysis of the Peptidoglycan Composition in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **200**, e00290-00218.

van der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F. & van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Nat Prod Rep* **35**, 575-604.

van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P. & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* **2**, 203-203.

van Wezel, G. P. & McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep* **28**, 1311-1333.

Versalovic, J., Kapur, V., Koeuth, T., Mazurek, G. H., Whittam, T. S., Musser, J. M. & Lupski, J. R. (1995). DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-

enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* **119**, 23-29.

Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M. & D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **56**, 958-970.

Walsh, C. & Wencewicz, T. (2016). Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities, 1. Edn. American Society of Microbiology.

Wang, W., Ji, J., Li, X., Wang, J., Li, S., Pan, G., Fan, K. & Yang, K. (2014). Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 5688-5693.

Willey, J. M. & Gaskell, A. A. (2011). Morphogenetic Signaling Molecules of the Streptomycetes. *Chem Rev* **111**, 174-187.

Wohlleben, W., Bera, A., Mast, Y. & Stegmann, E. (2017). Regulation of Secondary Metabolites of Actinobacteria. In: *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*. Edited by J. Wink, F. Mohammadipanah & J. Hamed.

World Health Organization (WHO) (2017). Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. WHO/EMP/IAU/2017.12.

Xie, Y., Ma, J., Qin, X., Li, Q. & Ju, J. (2017). Identification and utilization of two important transporters: SgvT1 and SgvT2, for griseoviridin and viridogrisein biosynthesis in *Streptomyces griseoviridis*. *Microb Cell Fact* **16**, 177.

Xie, Y., Wang, B., Liu, J., Zhou, J., Ma, J., Huang, H. & Ju, J. (2012). Identification of the biosynthetic gene cluster and regulatory cascade for the synergistic antibacterial antibiotics griseoviridin and viridogrisein in *Streptomyces griseoviridis*. *Chembiochem* **13**, 2745-2757.

Xu, G., Wang, J., Wang, L., Tian, X., Yang, H., Fan, K., Yang, K. & Tan, H. (2010). "Pseudo" gamma-butyrolactone receptors respond to antibiotic signals to coordinate antibiotic biosynthesis. *J Biol Chem* **285**, 27440-27448.

Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.-o., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. & Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* **151**, 2899-2905.

Zou, Z., Du, D., Zhang, Y., Zhang, J., Niu, G. & Tan, H. (2014). A γ -butyrolactone-sensing activator/repressor, JadR3, controls a regulatory mini-network for jadomycin biosynthesis. *Mol Microbiol* **94**, 490-505.

8 Anhang

8.1 Erläuterungen zu 16S-ITS-Sequenzdateien

Tabelle 11: Erläuterungen zu den 16S-ITS-Sequenzdateien, die in dem Projekt „Anwendbarkeit der PacBio-SMRT-Technologie zur Charakterisierung einer industriellen Stammsammlung anhand von 16S-ITS-Sequenzen“ generiert wurden. Die Sequenzdateien der einzelnen Proben beginnen mit den angegebenen Probennummern. Stammnr. (intern): Arbeitsgruppen-interne Stammnummer; Stammnr. (extern): Stammnummer in einer öffentlichen Stammsammlung; Stammbezeichnung: entspricht den Angaben der ATCC/DSMZ; identifizierte Genera: die 16S-rDNA-Sequenzen wurden *in silico* aus den 16S-ITS-OTUs extrahiert und durch einen BLAST mit der SILVA_123.1_SSUParc_tax-Datenbank abgeglichen. *: in diesen Proben befanden sich unter anderem 16S-ITS-OTUs, die dem Genus *Shewanella* zugeordnet werden konnten. *Shewanella* 16S-ITS-OTUs wurden ebenfalls in der stark aufkonzentrierten PCR-Negativkontrolle identifiziert. **: für diese Proben konnten keine 16S-ITS-OTUs generiert werden. ***: gemäß der Analyse der 16S-ITS-OTUs handelte es sich bei diesen Kulturen nicht wie erwartet um Reinkulturen. ****: gemäß der Analyse der 16S-ITS-OTUs handelte es sich bei diesen Kulturen um Co-Kulturen (das Vorkommen von Co-Kulturen in den Umweltisolaten war erwartet worden).

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung/ Herkunft	Probennummer	identifizierte Genera
-	ATCC29888	<i>Actinosynnema mirum</i>	ccs.0_0, ccs.8_8, ccs.16_16	<i>Actinosynnema</i>
-	DSM40593	<i>Streptomyces fulvissimus</i>	ccs.4_4, ccs.12_12, ccs.20_20, ccs.50_50	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC14511	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	ccs.5_5, ccs.13_13, ccs.21_21	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40355	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	ccs.6_6, ccs.14_14, ccs.22_22	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40652	<i>Streptomyces albus</i>	ccs.7_7*	<i>Streptomyces</i> , <i>Shewanella</i>
-	DSM40763	<i>Streptomyces albus</i>	ccs.15_15*	<i>Streptomyces</i> , <i>Shewanella</i>
-	DSM40072	<i>Streptomyces olivaceus</i>	ccs.23_23	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC15439	<i>Streptomyces venezuelae</i>	ccs.24_24, ccs.32_32, ccs.40_40	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40705	<i>Streptomyces fradiae</i>	ccs.25_25	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC10745	<i>Streptomyces fradiae</i>	ccs.26_26	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC21401	<i>Streptomyces fradiae</i>	ccs.27_27	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC31771	<i>Streptomyces antibioticus</i>	ccs.28_28	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40234	<i>Streptomyces antibioticus</i>	ccs.29_29	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC10382	<i>Streptomyces antibioticus</i>	ccs.30_30	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40211	<i>Streptomyces olivoviridis</i>	ccs.33_33	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40028	<i>Streptomyces achromogenes</i>	ccs.34_34	<i>Streptomyces</i>
-	DSM2790	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	ccs.35_35	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC10762	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	ccs.36_36	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40233	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ccs.37_37	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40554	<i>Streptomyces avellaneus</i>	ccs.38_38	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40017	<i>Streptomyces canus</i>	ccs.39_39	<i>Streptomyces</i>

Tabelle 11: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung/ Herkunft	Probennummer	identifizierte Genera
-	ATCC12647	<i>Streptomyces canus</i>	ccs.41_41	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40002	<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	ccs.42_42	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC19673	<i>Streptomyces chattanoogensis</i>	ccs.43_43	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40665	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ccs.45_45**	-
-	ATCC31649	<i>Streptomyces galilaeus</i>	ccs.46_46*	<i>Streptomyces</i> , <i>Shewanella</i>
-	ATCC15395	<i>Streptomyces griseus</i>	ccs.47_47	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40675	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ccs.48_48	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40679	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ccs.49_49**	-
-	ATCC21705	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	ccs.51_51	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC27438	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	ccs.52_52*	<i>Streptomyces</i> , <i>Shewanella</i>
-	DSM40187	<i>Streptomyces endus</i>	ccs.53_53	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40069	<i>Streptomyces lavendulae</i>	ccs.54_54	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40624	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ccs.55_55**	-
-	ATCC11924	<i>Streptomyces lavendulae</i>	ccs.56_56	<i>Streptomyces</i>
-	DSM40681	<i>Streptomyces coelicolor</i>	ccs.57_57	<i>Streptomyces</i>
-	ATCC29781	<i>Streptomycesnojiriensis</i>	ccs.58_58	<i>Streptomyces</i>
C11_01,04,02_A1	-	Termitennest	ccs.59_59****	<i>Microbacterium</i> , <i>Sphingomonas</i>
C11_01,04,02_C3	-	Termitennest	ccs.60_60	<i>Pseudosphingobacterium</i>
C11_10,17,18_A1	-	Termitennest	ccs.61_61	<i>Bacillus</i>
C11_10,17,18_E2	-	Termitennest	ccs.62_62	<i>Bacillus</i>
C11_10,17,18_H6	-	Termitennest	ccs.63_63	<i>Bacillus</i>
B21_01_G7	-	Termitennest	ccs.64_64****	<i>Afpia</i> , <i>Bacillus</i>
B21_01_H10	-	Termitennest	ccs.65_65	<i>Burkholderia</i>
B21_01_H3	-	Termitennest	ccs.66_66	<i>Pseudoxanthomonas</i>
B21_01_H5	-	Termitennest	ccs.67_67	<i>Burkholderia</i>
B21_14_F5	-	Termitennest	ccs.68_68	<i>Nocardioides</i>
B21_14_H10	-	Termitennest	ccs.69_69	<i>Sphingomonas</i>
B21_14_F11	-	Termitennest	ccs.70_70	<i>Nocardioides</i>
B21_13_B2	-	Termitennest	ccs.71_71****	<i>Nocardioides</i> , <i>Sphingomonas</i>
B21_13_C2	-	Termitennest	ccs.72_72	<i>Nocardioides</i>
B21_13_E2	-	Termitennest	ccs.73_73	<i>Nocardioides</i>
B21_13_G2	-	Termitennest	ccs.74_74	<i>Gryllotalpicola</i>
B21_13_H2	-	Termitennest	ccs.75_75	<i>Sphingomonas</i>
B21_13_F4	-	Termitennest	ccs.76_76****	<i>Gryllotalpicola</i> , <i>Sphingosinicella</i>
B21_13_H5	-	Termitennest	ccs.77_77****	<i>Sphingomonas</i> , <i>Jatrophihabitans</i>
B21_15_H10	-	Termitennest	ccs.78_78	<i>Pseudomonas</i>
B21_15_B10	-	Termitennest	ccs.79_79	<i>Bacillus</i>
B21_13_H6	-	Termitennest	ccs.80_80	<i>Sphingomonas</i>

Tabelle 11: Fortsetzung.

Stammnr. (intern)	Stammnr. (extern)	Stammbezeichnung/ Herkunft	Probennummer	identifizierte Genera
B21_15_G1	-	Termitennest	ccs.81_81**	-
B21_15_H3	-	Termitennest	ccs.82_82**	-
B21_15_G4	-	Termitennest	ccs.83_83****	<i>Bacillus</i> , <i>Sphingomonas</i>
B21_15_G9	-	Termitennest	ccs.84_84	<i>Bacillus</i>
MM1_A2	-	Süßwasser	ccs.85_85	<i>Bacillus</i>
MM1_A3	-	Süßwasser	ccs.86_86	<i>Pseudomonas</i>
MM1_C3	-	Süßwasser	ccs.87_87	<i>Aeromonas</i>
MM1_D1	-	Süßwasser	ccs.88_88	<i>Flavobacterium</i>
MM1_D9	-	Süßwasser	ccs.89_89	<i>Aeromonas</i>
MM1_E1	-	Süßwasser	ccs.90_90	<i>Aeromonas</i>
MM1_E3	-	Süßwasser	ccs.91_91	<i>Enterobacter</i>
MM1_F3	-	Süßwasser	ccs.92_92**	-
MM1_F5	-	Süßwasser	ccs.93_93	<i>Elizabethkingia</i>
MM1_G3	-	Süßwasser	ccs.94_94**	-
-	ATCC27029	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	ccs.1_1, ccs.9_9, ccs.17_17	***
-	DSM10542	<i>Sanguibacter keddieii</i>	ccs.2_2, ccs.10_10, ccs.18_18	***
-	DSM40053	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	ccs.3_3*, ccs.11_11*, ccs.19_19	***
-	DSM40702	<i>Streptomyces olivaceus</i>	ccs.31_31	***
-	DSM40481	<i>Streptomyces galilaeus</i>	ccs.44_44	***

8.2 Bioinformatische Qualitätsfilterung von PacBio *circular consensus sequences*

8.2.1 usearch 16S.sh

```
# bash script / commands
# Starting with a directory of demultiplexed fastq ccs2 files, default
filtering.
# Assumes install of:
# pbcore https://github.com/PacificBiosciences/pbcore
# usearch 8.1 http://www.drive5.com/usearch/download.html

# point variable to the usearch executable
export usearch=/usr/bin/usearch8.1.1861_i86linux32

# loop over the ccs2 fastq file
for f in *.fastq
do
  # parse each read for the presence of both forward and reverse adapter at
  100% acc., and a size of 1400
  ./parseNoBarcode.py ${f} 0 forward.fa reverse.fa
  # filter the resulting fastq for an expected error of 0.5
  $usearch -fastq_filter ${f}.primers.fastq -fastaout
  ${f%.*}.primers.filter.fasta -fastq_maxee 0.5
  # calculate and dereplicate 100% identical sequences
  $usearch -derep_fulllength ${f%.*}.primers.filter.fasta -fastaout
  ${f%.*}.primers.filter.uniques.fasta -sizeout
  # Cluster resulting sequences into OTUs 97%
  $usearch -cluster_otus ${f%.*}.primers.filter.uniques.fasta -otus
  ${f%.*}.97.otus.fa -uparseout ${f%.*}.97.up -relabel OTU -minsize 2 -
  otu_radius_pct 3
  # 98%
  $usearch -cluster_otus ${f%.*}.primers.filter.uniques.fasta -otus
  ${f%.*}.98.otus.fa -uparseout ${f%.*}.98.up -relabel OTU -minsize 2 -
  otu_radius_pct 2
  # 99%
  $usearch -cluster_otus ${f%.*}.primers.filter.uniques.fasta -otus
  ${f%.*}.99.otus.fa -uparseout ${f%.*}.99.up -relabel OTU -minsize 2 -
  otu_radius_pct 1
  # Map unfiltered reads to OTUs at 97% threshold
  $usearch -usearch_global ${f} -db ${f%.*}.97.otus.fa -strand both -id 0.97
  -otutabout ${f%.*}.97.res
  # 98%
  $usearch -usearch_global ${f} -db ${f%.*}.98.otus.fa -strand both -id 0.98
  -otutabout ${f%.*}.98.res
  # 99%
  $usearch -usearch_global ${f} -db ${f%.*}.99.otus.fa -strand both -id 0.99
  -otutabout ${f%.*}.99.res
done
```

8.2.2 ccsPrimer.py

```

#!/mnt/secondary/Smrtanalysis/current/smrtcmds/bin/smrtwrap
python

# Adapted from John Hartings ccsBarcode to look for primer
sequences in any orientation, then generate consistent
orientation of the
# amplicon in the output

import pbbarcode.SWaligner as Aligner
from pbcore.io.FastaIO import *
from pbcore.io.FastqIO import *
from collections import defaultdict
import numpy as np

def main(parser):

    args = parser.parse_args()

    aligner = Aligner.SWaligner()

    forwardPrimerFasta =
list(FastaReader(args.reversePrimerFasta))
    reversePrimerFasta =
list(FastaReader(args.forwardPrimerFasta))
    forwardPrimerSeqs =
[(forwardPrimer.sequence.upper(),rc(forwardPrimer.sequence.upper
())) for forwardPrimer in forwardPrimerFasta]
    reversePrimerSeqs =
[(reversePrimer.sequence.upper(),rc(reversePrimer.sequence.upper
())) for reversePrimer in reversePrimerFasta]
    # barcodeLabels = [ rec.name.replace(' ','_') for rec in
barcodeFasta ]
    forwardScorer = aligner.makeScorer([x[0] for x in
forwardPrimerSeqs])
    rcforwardScorer = aligner.makeScorer([x[1] for x in
forwardPrimerSeqs])
    reverseScorer = aligner.makeScorer([x[0] for x in
reversePrimerSeqs])
    rcreverseScorer = aligner.makeScorer([x[1] for x in
reversePrimerSeqs])

    n =
max(len(forwardPrimerSeqs[0][0]),len(reversePrimerSeqs[0][0])) +
4

    reader,writer,ext = (FastqReader,FastqWriter,'q') if
args.ccsFastq.endswith('q') else (FastaReader,FastaWriter,'a')

    readEnds = np.array([[rec.sequence[:n],rec.sequence[-n:]]
for rec in reader(args.ccsFastq)])

    sf = map(forwardScorer, readEnds[:,0])
    maxsf = [np.amax(array) for array in sf]
    sr = map(reverseScorer, readEnds[:,0])
    maxsr = [np.amax(array) for array in sr]

    s = [maxsf,maxsr]

    ef = map(rcforwardScorer, readEnds[:,1])
    maxef = [np.amax(array) for array in ef]
    er = map(rcreverseScorer, readEnds[:,1])
    maxer = [np.amax(array) for array in er]

    e = [maxef,maxer]

    w = writer('%s/%s.fast%s' % (args.outDir,args.outFastq,ext))

    for i,rec in enumerate(reader(args.ccsFastq)):
        if (len(rec.sequence) < 2600)&(len(rec.sequence) >
1400):
            if (s[0][i] > s[1][i]) & (e[1][i] > e[0][i]) &
(s[0][i] >= args.minScore) & (e[1][i] >= args.minScore):
                name = rec.name+"/Score="+str(s[0][i])+"-

```

```

"+str(e[1][i])
    if ext=='q':
        newRecord = FastqRecord(name,
                                rec.sequence[n:-n],
                                rec.quality[n:-n])
    else:
        newRecord = FastaRecord(name,
                                rec.sequance[n:-n])
    w.writeRecord(newRecord)

    elif (s[1][i] >= args.minScore) & (e[0][i] >=
args.minScore):
    name = rec.name+"/Score="+str(s[1][i])+"-
"+str(e[0][i])
    if ext=='q':
        newRecord = FastqRecord(name,
                                rec.sequence[n:-n],
                                rec.quality[n:-n])
    else:
        newRecord = FastaRecord(name,
                                rec.sequance[n:-n])
    rcNewRecord = newRecord.reverseComplement()
    w.writeRecord(rcNewRecord)

w.close()

# for i,rec in enumerate(reader(args.ccsFastq)):
#     barcodePair =
# [(bestFrontBarcode[i],bestFrontScore[i]),(bestBackBarcode[i],best
# tBackScore[i])]
#     if not args.noSort:
#         barcodePair.sort(key=lambda v:v[0])
#     if np.all([s>=args.minScore for l,s in barcodePair]):
#         barcode = '--'.join([p[0] for p in barcodePair])
#         if writers.has_key(barcode):
#             w = writers[barcode]
#         else:
#             w = writer('%s/%s.fast%s' %
# (args.outDir,barcode,ext))
#         writers[barcode] = w
#         #will the above fail for many barcode pairs?
# (too many open files?)
#         header = '{name} ({f},{b})'.format(name=rec.name,
# f=barcodePair[0][1], b=barcodePair[1][1])
#         oRec = [header,rec.sequence]
#         if ext=='q':
#             oRec.append(rec.quality)
#         w.writeRecord(*oRec)

def rc(seq):
    rcMap = dict(zip('AGTCagtcN-', 'TCAGtcagN-'))
    return ''.join([rcMap[b] for b in seq][::-1])

if __name__ == '__main__':

    import argparse
    import os

    parser = argparse.ArgumentParser(prog='ccsPrimer.py',
description='Generate primer filtered CCS data')
    parser.add_argument('forwardPrimerFasta',
metavar='forwardPrimerFasta', type=str,
                        help='fasta of forward primer')
    parser.add_argument('reversePrimerFasta',
metavar='reversePrimerFasta', type=str,
                        help='fasta of reverse primer')
    parser.add_argument('ccsFastq', metavar='ccsFastq',
type=str,
                        help='fastq of output sequences to be
barcoded')
    parser.add_argument('outFastq', metavar='outFastq',
type=str,
                        help='fastq of output')
    parser.add_argument('-s,--minScore', dest='minScore',
default=0, type=int,
                        help='minimum score (both ends). default 0'
)
    parser.add_argument('--outDir', dest='outDir', type=str,
default=os.getcwd(),
                        help='output directory. default cwd')
    parser.add_argument('--noSort', dest='noSort',
action='store_true', default=False,
                        help='do not sort order in header. default
sort')

    main(parser)

```

8.2.3 forward.fa und reverse.fa

```
forward.fa:
>8F-Pac-PCR1_1
GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACAGAGTTTGATCATGGCTCAG
>8F-Pac-PCR1_2
GCAGTCGAACATGTAGCTGACTCAGGTCACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
```

```
reverse.fa:
>23Sr-Pac-PCR1_1
TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGGTTCCCCATTCAG
>23Sr-Pac-PCR1_2
TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGGTTGCCCATTCAG
>23Sr-Pac-PCR1_3
TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGGTTCCCCATTCAG
>23Sr-Pac-PCR1_4
TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGGTTCCCCATTCGG
>23Sr-Pac-PCR1_5
TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGGTTGCCCATTCGG
>23Sr-Pac-PCR1_6
TGGATCACTTGTGCAAGCATCACATCGTAGGGGTTCCCCATTCGG
```

8.3 UPLC-HR-MS-Analytik zu ST136450

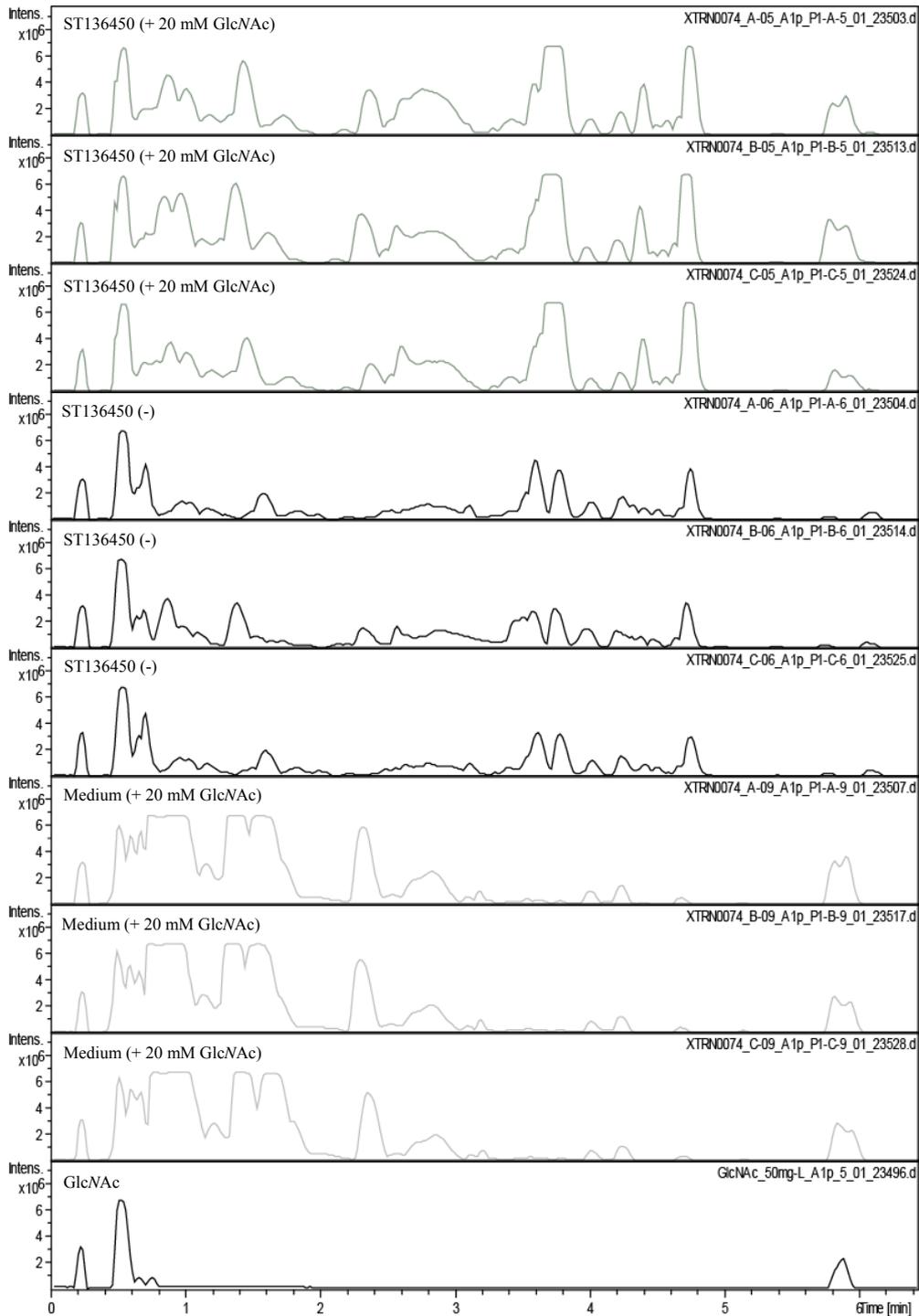


Abbildung 35: UPLC-HR-MS-Analyse von Kulturextrakten des Stammes ST136450 – Basispeak-Chromatogramme. Der Stamm ST136450 wurde im fünffachen Replikate auf Agarplatten kultiviert, die 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc enthielten. Nach sechs Tagen Wachstum von ST136450 wurden die Agarplatten gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Dargestellt sind die Basispeak-Chromatogramme von jeweils drei Extrakt-Replikaten. ST136450 (+ 20 mM GlcNAc): ST136450 wurde auf Agarplatten kultiviert, die GlcNAc enthielten; ST136450 (-): ST136450 wurde auf Agarplatten ohne GlcNAc kultiviert; Medium (+ 20 mM GlcNAc): Medienkontrolle mit 20 mM GlcNAc. Die Basispeak-Chromatogramme der Extrakte in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von GlcNAc gewachsener Kulturen unterschieden sich deutlich.

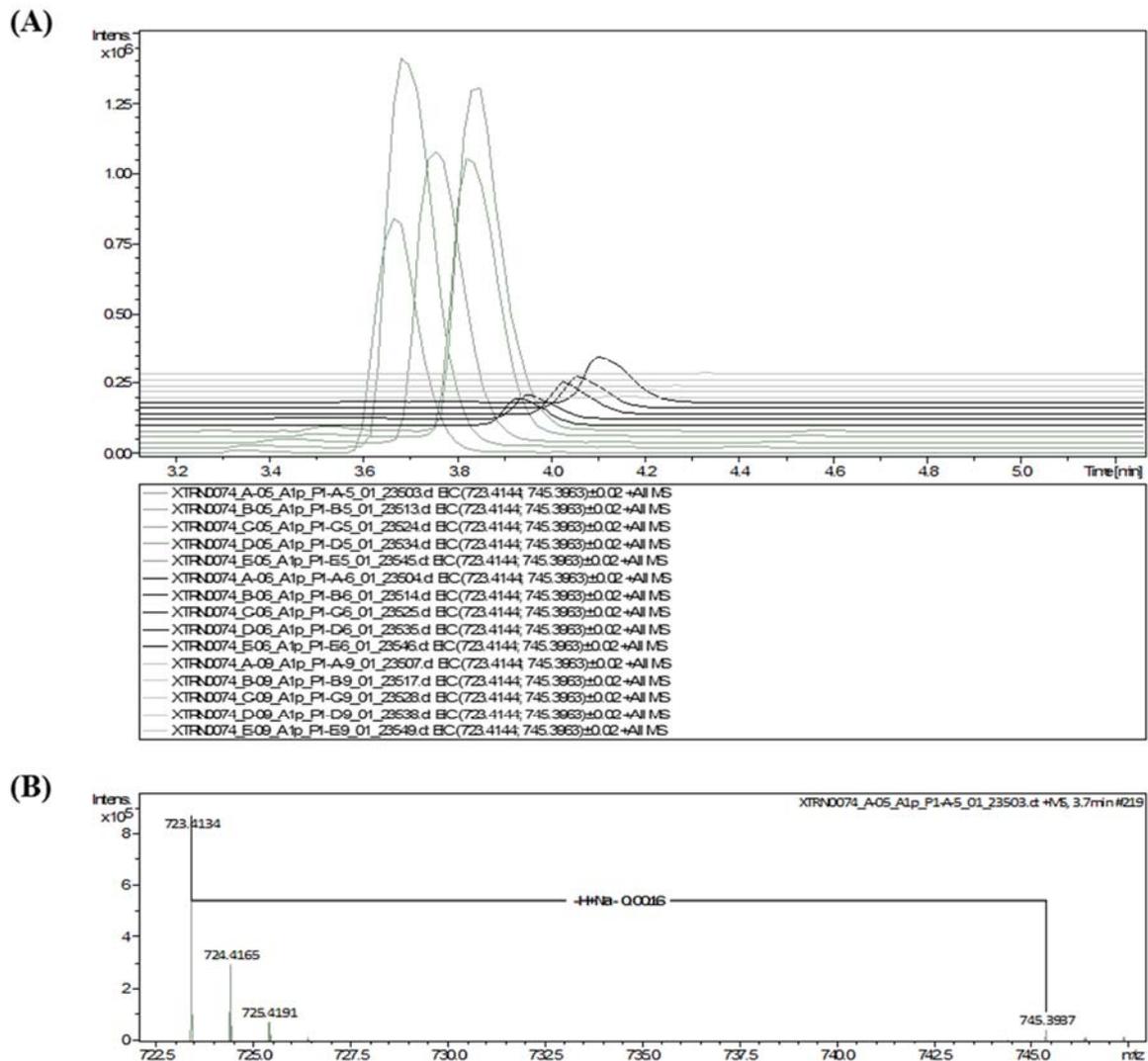


Abbildung 36: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH) Bucket 2_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikate. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Hiermit sollten Buckets auffindig gemacht werden, die nur oder in höherer Konzentration in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) vorkamen. Bucket 2_M: (3,65 min; m/z 723.4144 $[M+H]^+$) erfüllte dieses Kriterium. Dargestellt sind die Ergebnisse der UPLC-HR-MS-Analyse dieses Buckets. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 723.4144 $[M+H]^+$ und m/z 745.3963 $[M+Na]^+$) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Bucket 2_M eingesetzt (vgl. Abbildung 24, Tabelle 9). Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,7 min.

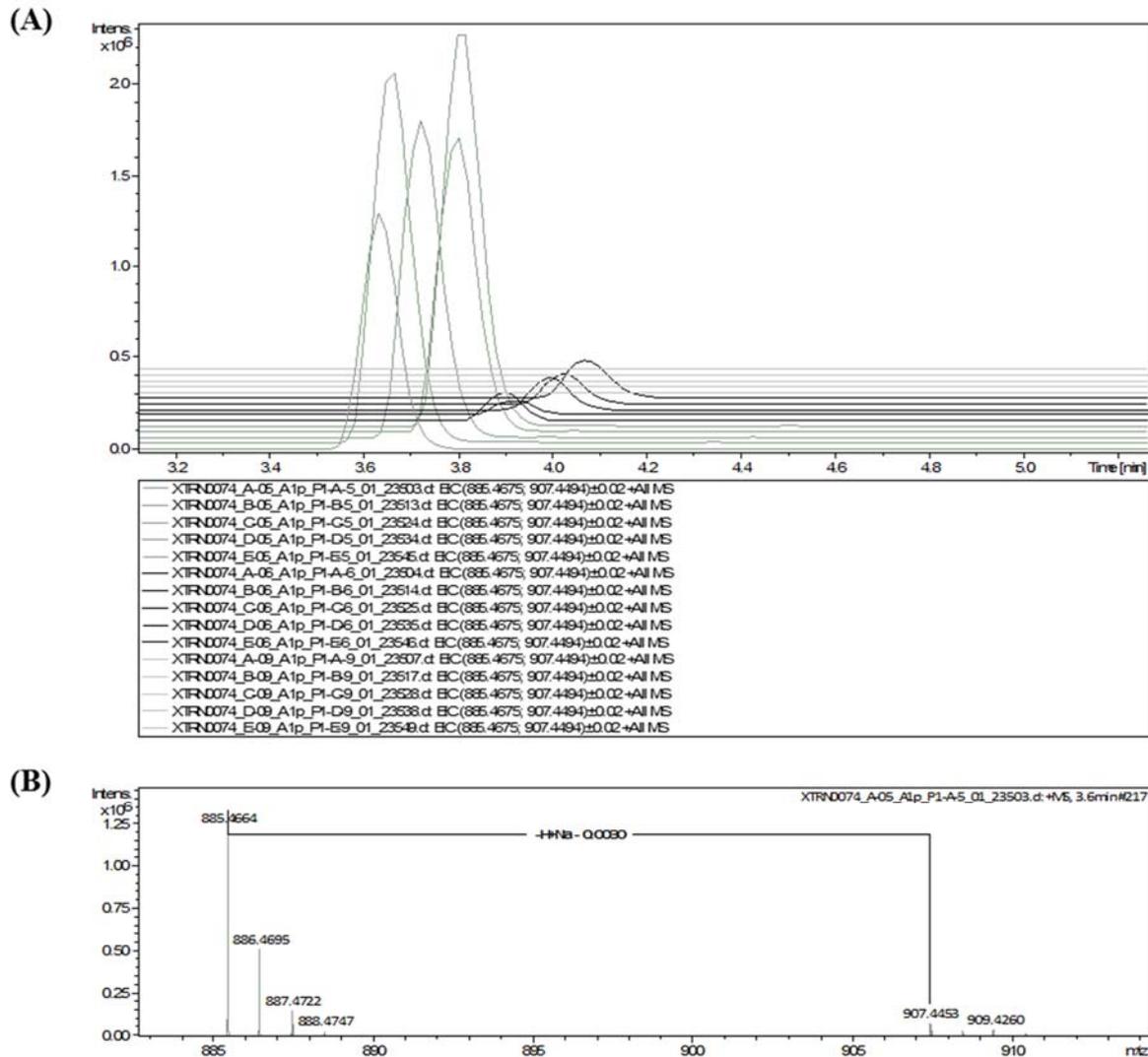


Abbildung 37: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 3_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikat. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Hiermit sollten Buckets auffindig gemacht werden, die nur oder in höherer Konzentration in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) vorkamen. Bucket 3_M: (3,64 min: m/z 885.4675 $[M+H]^+$) erfüllte dieses Kriterium. Dargestellt sind die Ergebnisse der UPLC-HR-MS-Analyse dieses Buckets. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 885.4675 $[M+H]^+$ und m/z 907.4494 $[M+Na]^+$) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Bucket 3_M eingesetzt (vgl. Abbildung 24, Tabelle 9). Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle. (B): Ausschnitte des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,6 min.

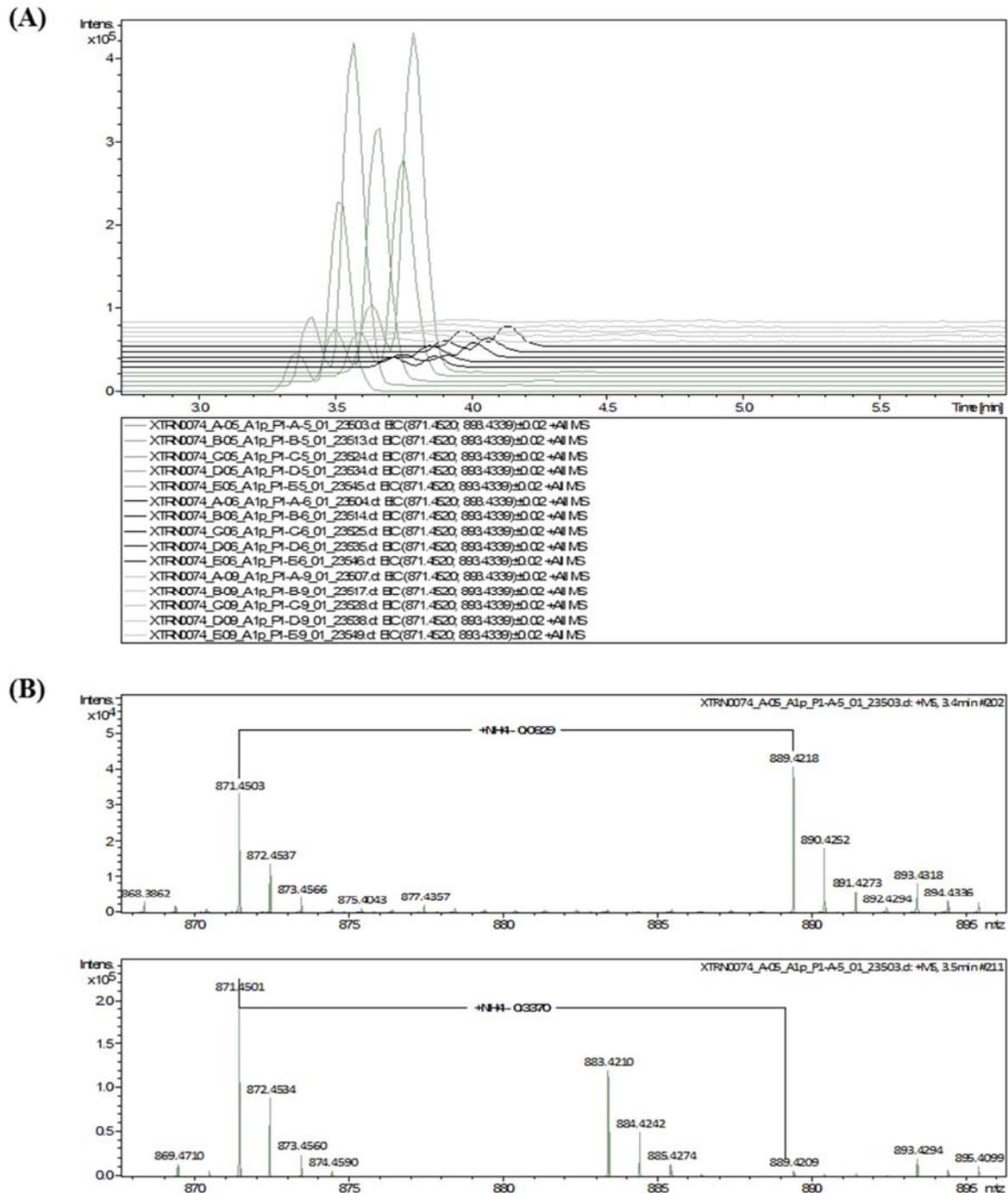


Abbildung 38: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 6_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikate. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Hiermit sollten Buckets auffindig gemacht werden, die nur oder in höherer Konzentration in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) vorkamen. Bucket 6_M: (3,50 min: m/z 871.4520 $[M+H]^+$) erfüllte dieses Kriterium. Dargestellt sind die Ergebnisse der UPLC-HR-MS-Analyse dieses Buckets. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 871.4520 $[M+H]^+$ und m/z 893.4339 $[M+Na]^+$) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Bucket 6_M eingesetzt (vgl. Abbildung 24, Tabelle 9). Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,4 min bzw. 3,5 min.

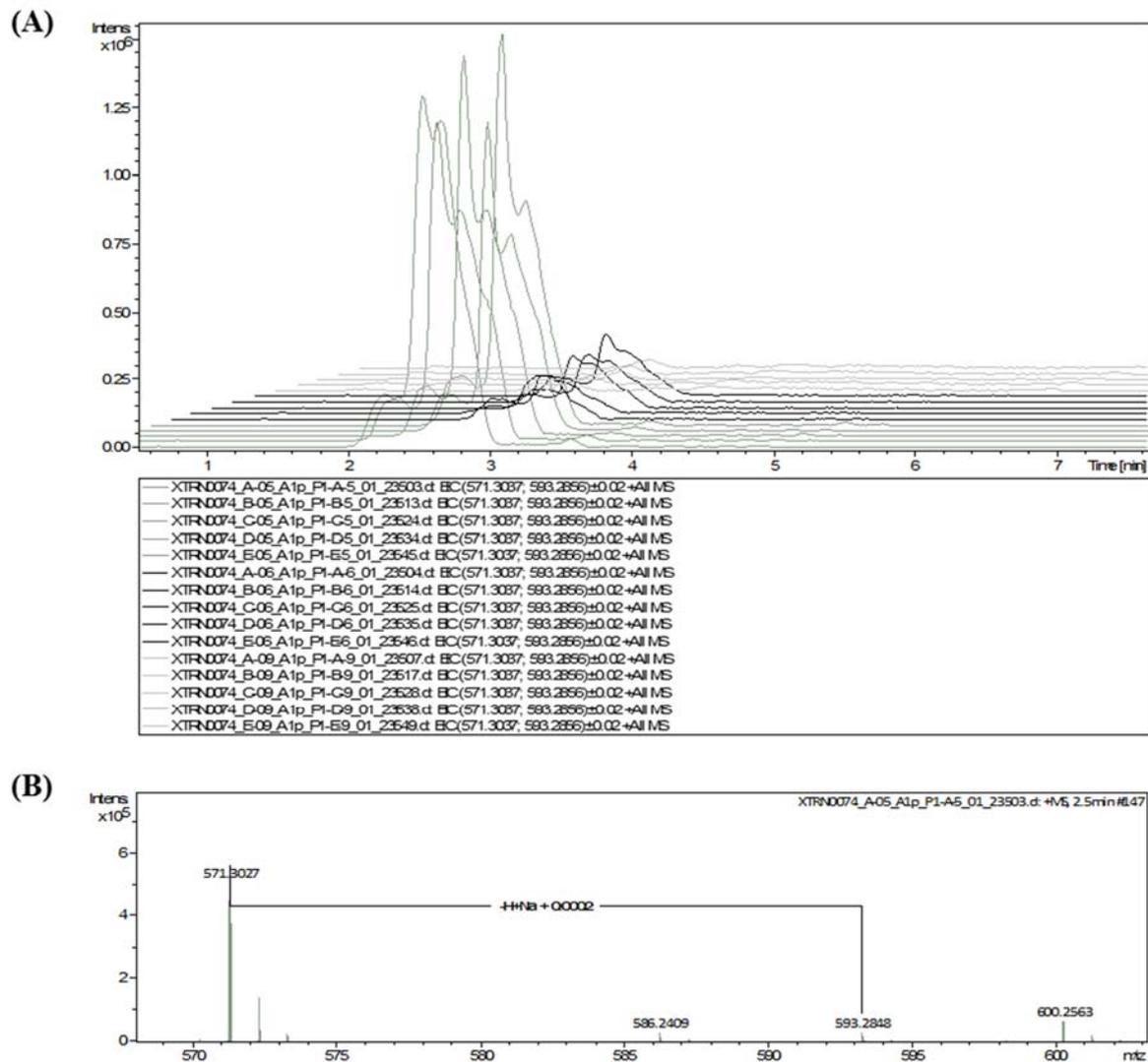


Abbildung 39: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH) Bucket 7_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikate. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Hiermit sollten Buckets auffindig gemacht werden, die nur oder in höherer Konzentration in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) vorkamen. Bucket 7_M: (2,52 min: m/z 571.3037 [M+H]⁺) erfüllte dieses Kriterium. Dargestellt sind die Ergebnisse der UPLC-HR-MS-Analyse dieses Buckets. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 571.3037 [M+H]⁺ und m/z 593.2856 [M+Na]⁺) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Bucket 7_M eingesetzt (Abbildung 24, Tabelle 9). Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 2,5 min.

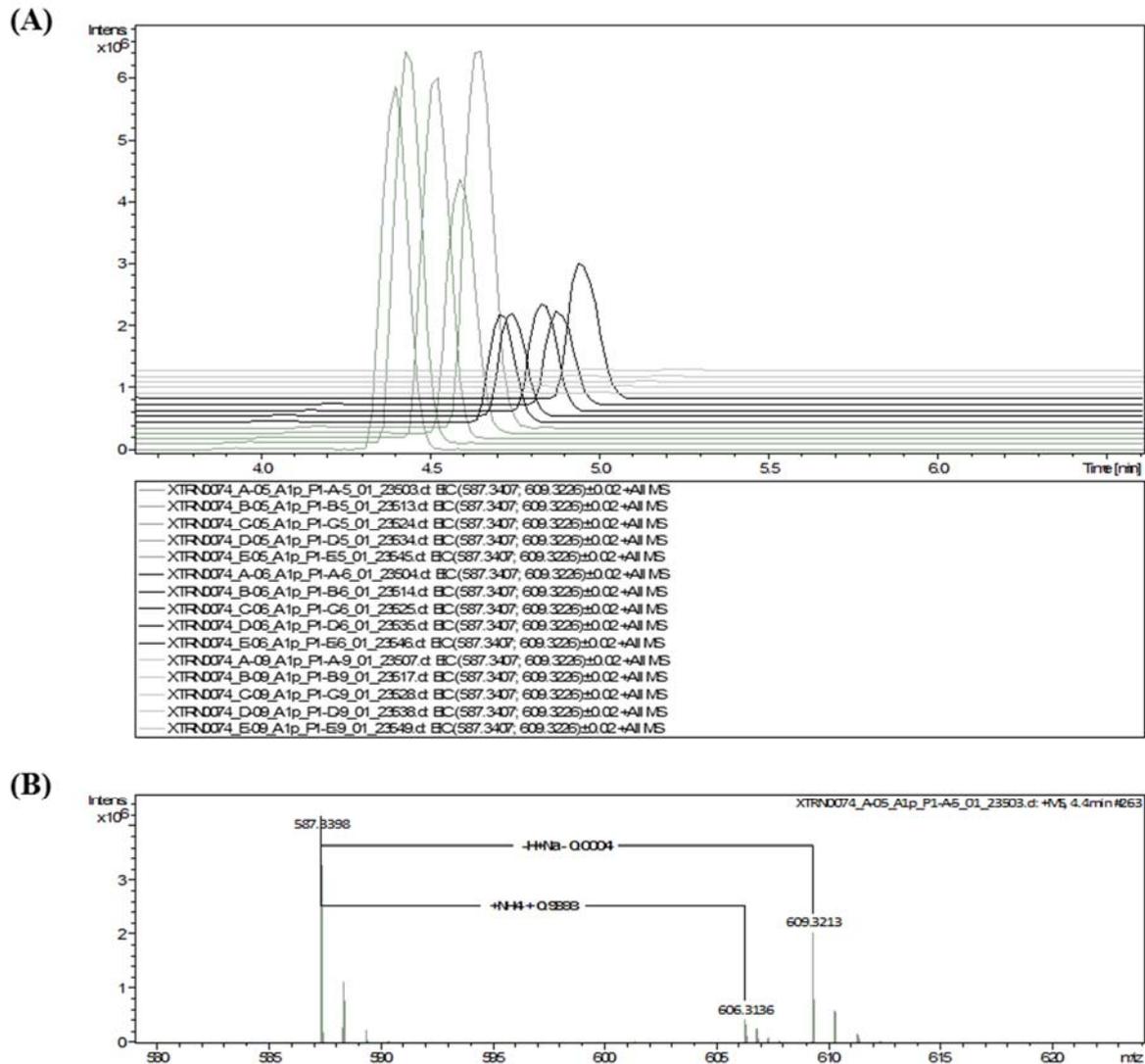


Abbildung 40: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Bucket 8_M. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikat. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Es wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. Ausgehend von den UPLC-HR-MS-Daten wurde eine PCA-basierte Metabolomanalyse durchgeführt. Hiermit sollten Buckets ausfindig gemacht werden, die nur oder in höherer Konzentration in den Extrakten von ST136450 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von ST136450 (- GlcNAc) vorkamen. Bucket 8_M: (4,40 min; m/z 587.3407 $[M+H]^+$) erfüllte dieses Kriterium. Dargestellt sind die Ergebnisse der UPLC-HR-MS-Analyse dieses Buckets. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 587.3407 $[M+H]^+$ und m/z 609.3226 $[M+Na]^+$) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Bucket 8_M eingesetzt (vgl. Abbildung 24, Tabelle 9). Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 4,4 min.

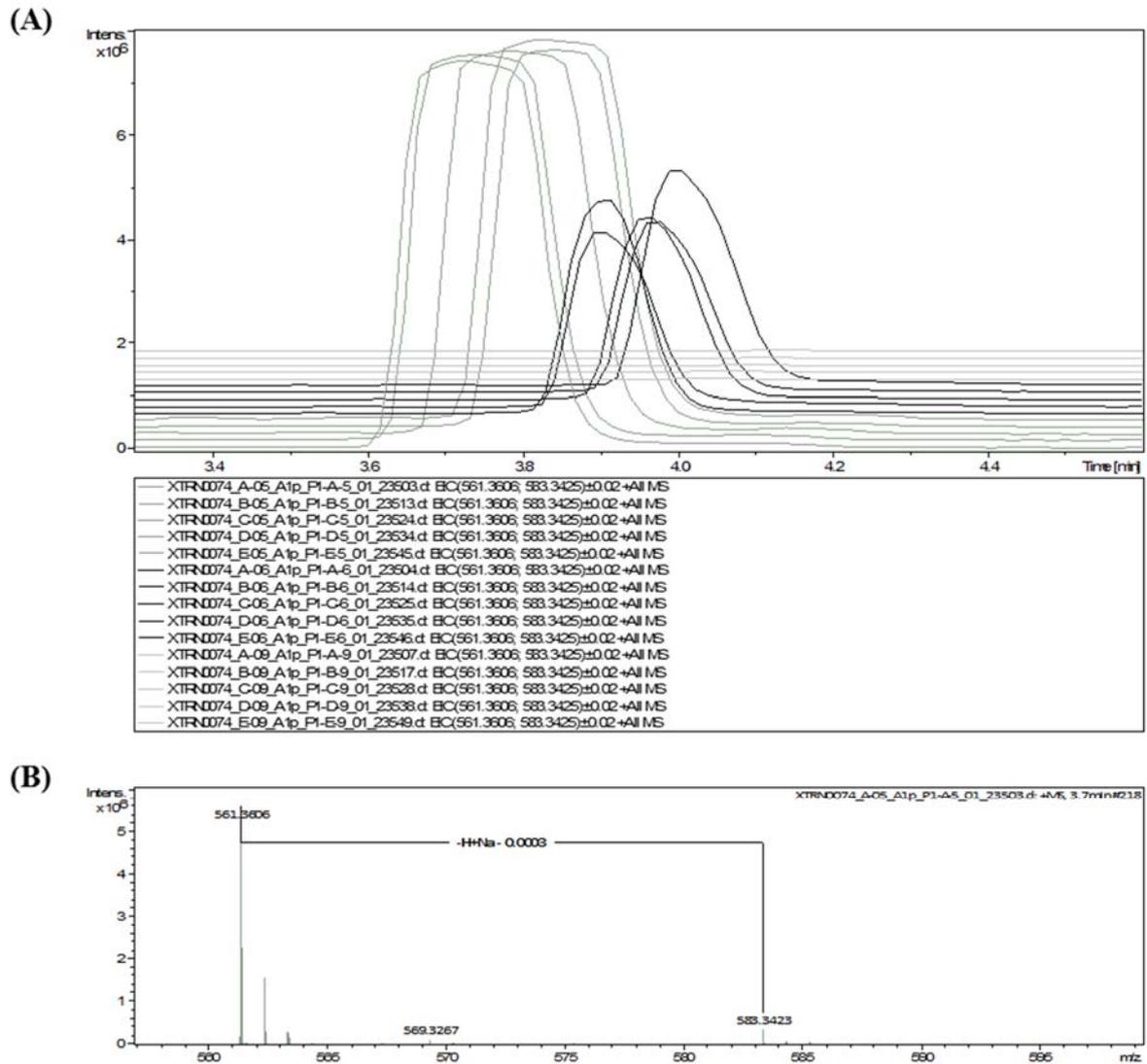


Abbildung 41: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH) Desferrioxamin B. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikate. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Zur Detektion von Desferrioxamin B ($m/z_{\text{theoretisch}} 561.3606 [M+H]^+$) wurden die Extrakte durch UPLC-HR-MS analysiert. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus $m/z 561.3606 [M+H]^+$ und $m/z 583.3425 [M+Na]^+$) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,7 min. (C): Da in (A) eine Übersättigung des Massendetektors auftrat, wurden die Chromatogramme aus (C) zur relativen Quantifizierung von Desferrioxamin B herangezogen (vgl. Abbildung 24). Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme von $m/z 562.3636$ (zweitgrößter Isotopenpeak von $[M+H]^+$). Probenzuordnung in (A) und (C): Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle.

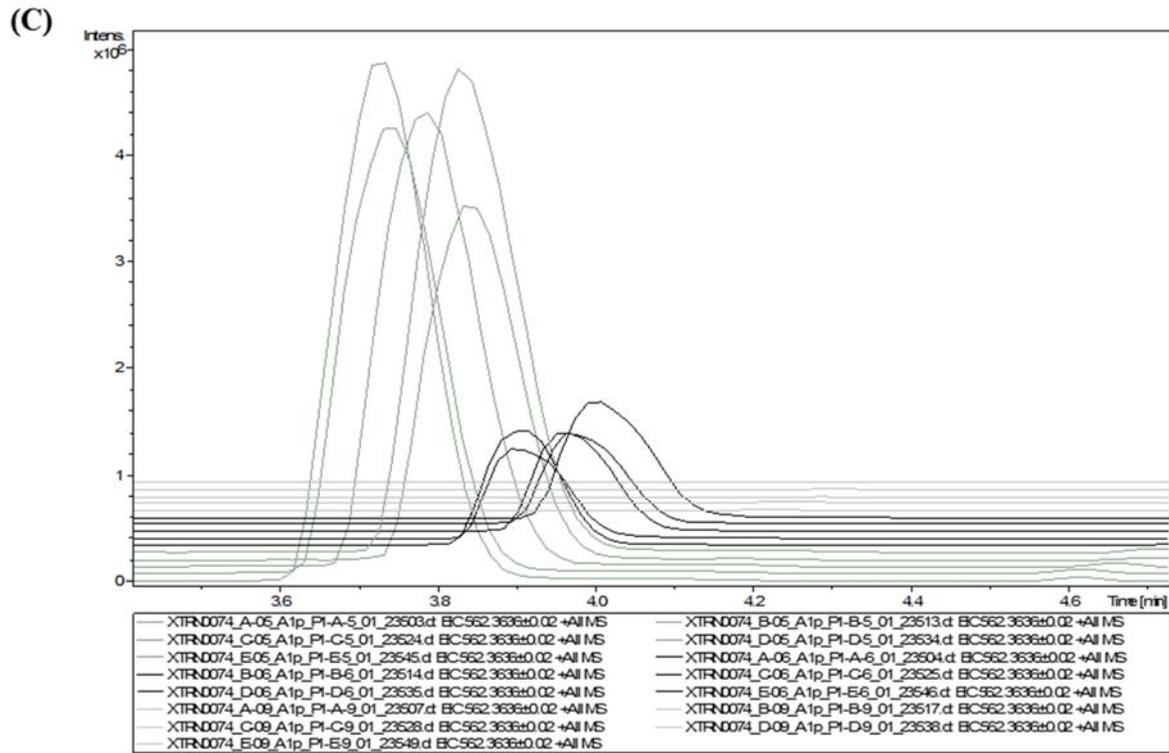


Abbildung 41: Fortsetzung.

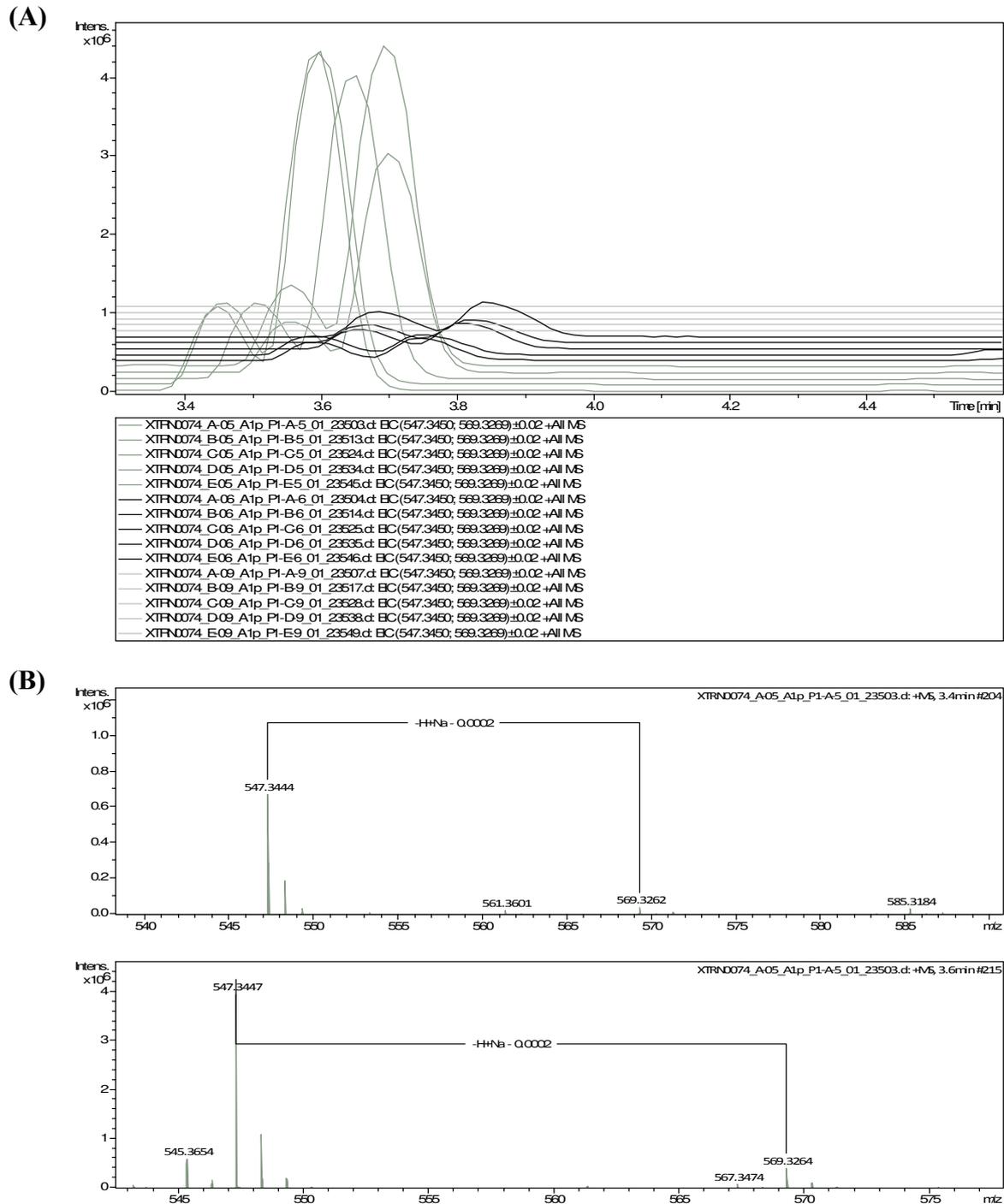


Abbildung 42: UPLC-HR-MS-Analyse von ST136450 (MeOH)_Desferrioxamine 547. Der Stamm ST136450 wurde auf ISP2-Medium kultiviert, welches keine Zusätze (- GlcNAc) bzw. 20 mM GlcNAc (+ GlcNAc) enthielt. Die Kultivierung erfolgte als fünffaches Replikat. Nach sechstägigem Wachstum des Stammes erfolgte eine Extraktion der Kulturen mit Methanol. Zur Detektion aller Desferrioxamine mit $m/z_{\text{theoretisch}} 547.3450 [M+H]^+$ wurden die Extrakte durch UPLC-HR-MS analysiert. (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus $m/z 547.3450 [M+H]^+$ und $m/z 569.3269 [M+Na]^+$) aller fünf Methanol-Extrakt-Replikate. Gemäß der Analyse in Abbildung 21 resultierten die beiden detektierten Peaks aus der Anwesenheit eines Gemisches von mindestens drei verschiedenen Desferrioxamin-A₁-Isomeren. Auf Basis der extrahierten Ionen-Chromatogramme wurde eine relative Quantifizierung des Substanzgemisches vorgenommen (Summe der Peakflächen von Peak 1 und Peak 2) (vgl. Abbildung 24, Tabelle 9). Dunkelgrau (vorne): ST136450 (+ GlcNAc); schwarz (Mitte): ST136450 (- GlcNAc); hellgrau (hinten): GlcNAc-haltige Medienkontrolle. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extrakt-Replikates von ST136450 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,4 min bzw. 3,6 min.

8.4 UPLC-HR-MS/(MS)-Analytik zu FH1286, DSM40229 und DSM40149

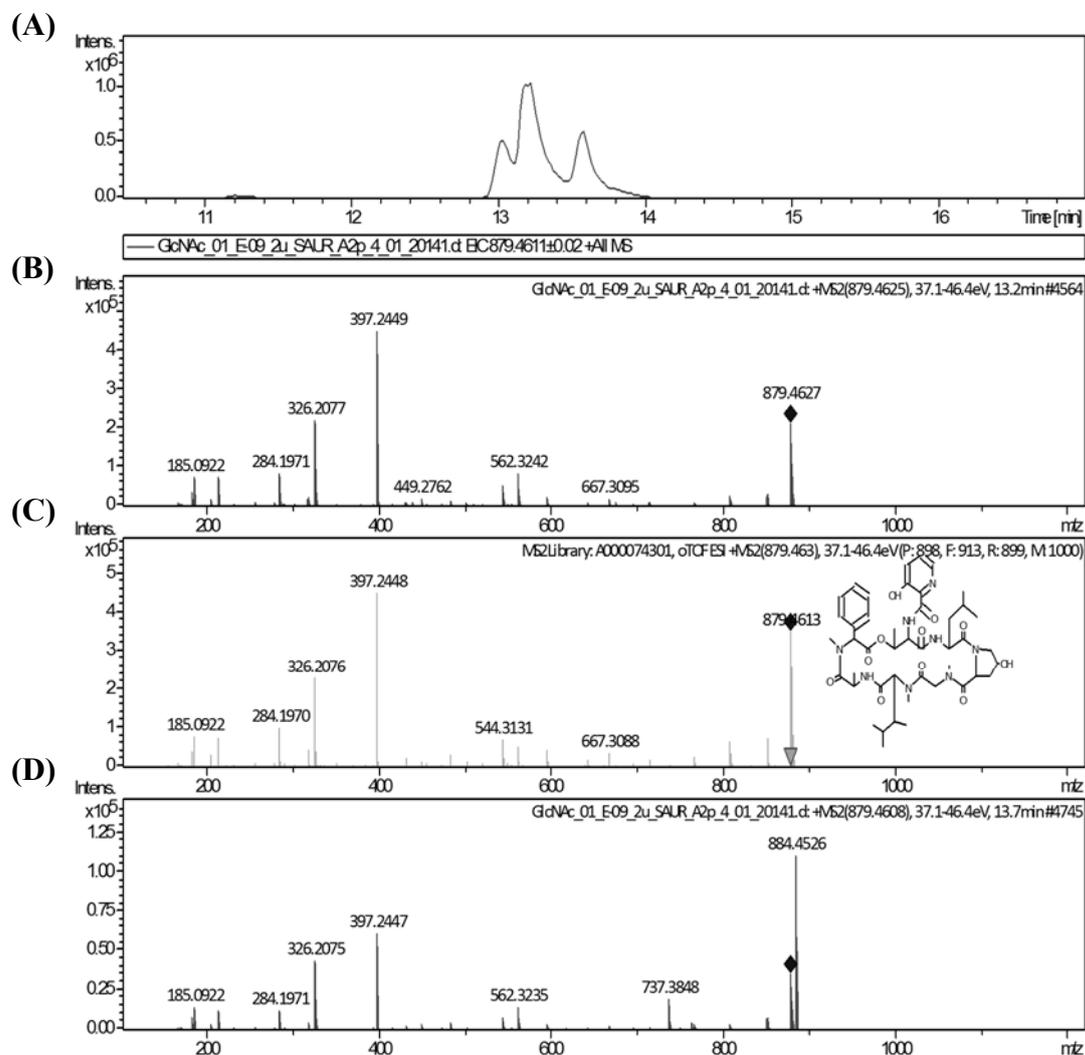


Abbildung 43: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von FH1286-Kulturextrakten – Identifizierung von Viridogrisein I. Zur Identifizierung von Viridogrisein I ($m/z_{\text{theoretisch}}$ 879.4611 $[M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von FH1286 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)/(B)/(D). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 879.4611. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 879.4625 $[M+H]^+$, RT = 13,2 min. (C): MS/MS-Fragmentierungsmuster von Viridogrisein I (Reinsubstanz) (m/z 879.463 $[M+H]^+$) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). (D): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 879.4608 $[M+H]^+$, RT = 13,7 min. Das Fragmentierungsmuster in (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster in (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Viridogrisein I. Anmerkung: In der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank wurde für Viridogrisein I (Reinsubstanz) unter gleichen Messbedingungen eine Retentionszeit von 11,24 min angegeben. Abweichend hiervon betrug die Retentionszeit der im Kulturextrakt von FH1286 als Viridogrisein I identifizierten Verbindung 13,2 min. Mitgeführte UPLC-HR-MS/MS-Messungen einer Referenzsubstanz (Qualitätskontrolle) zeigten, dass die Retentionszeitverschiebung auf kurzzeitige technische Probleme zurückzuführen war. Die MS/MS-Fragmentierungsmuster in (C) und (D) waren sehr ähnlich, jedoch nicht identisch. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei der in (D) analysierten Verbindung um ein Viridogrisein-I-Isomer handeln könnte. Der Peak in (A) mit einer Retentionszeit von 13 min steht nicht im Zusammenhang mit Viridogrisein I.

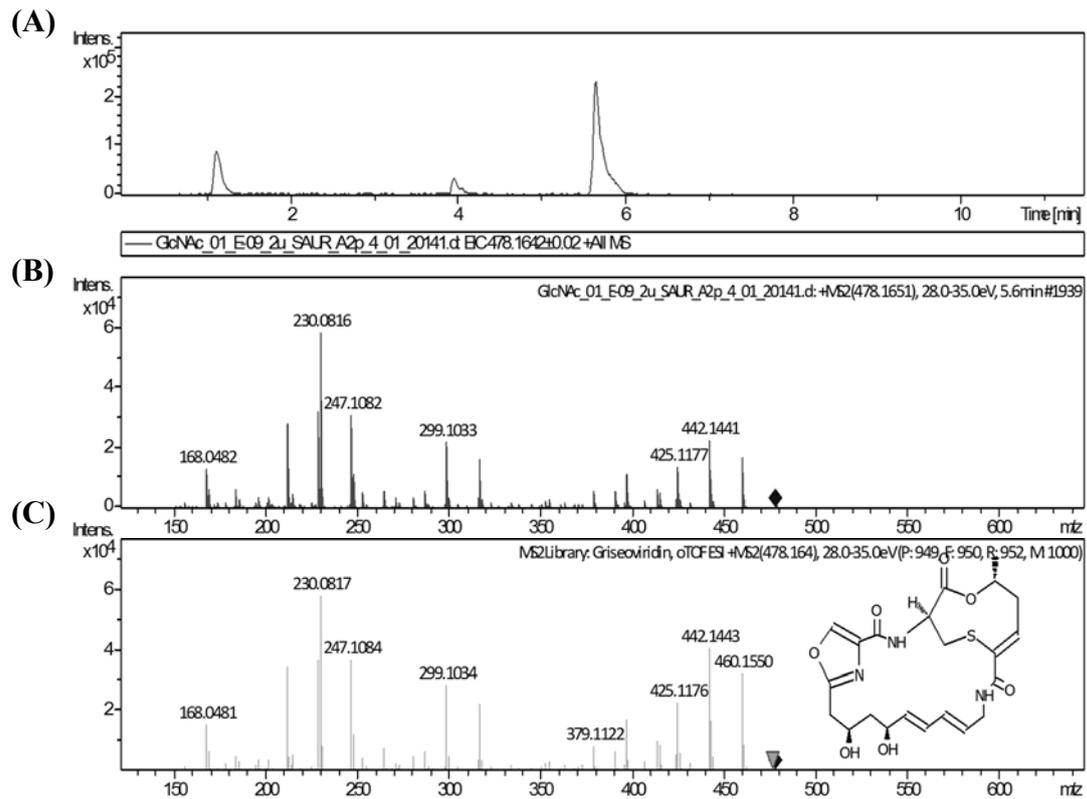


Abbildung 44: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von FH1286-Kulturextrakten – Identifizierung von Griseoviridin. Zur Identifizierung von Griseoviridin ($m/z_{\text{theoretisch}} 478.1651 [M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von FH1286 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert. (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 478.1642. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 478.1651 [M+H]⁺, RT = 5,6 min. (C): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von Griseoviridin (Reinsubstanz). Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Griseoviridin (m/z 478.164 [M+H]⁺) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). Das Fragmentierungsmuster in (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster in (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Griseoviridin.

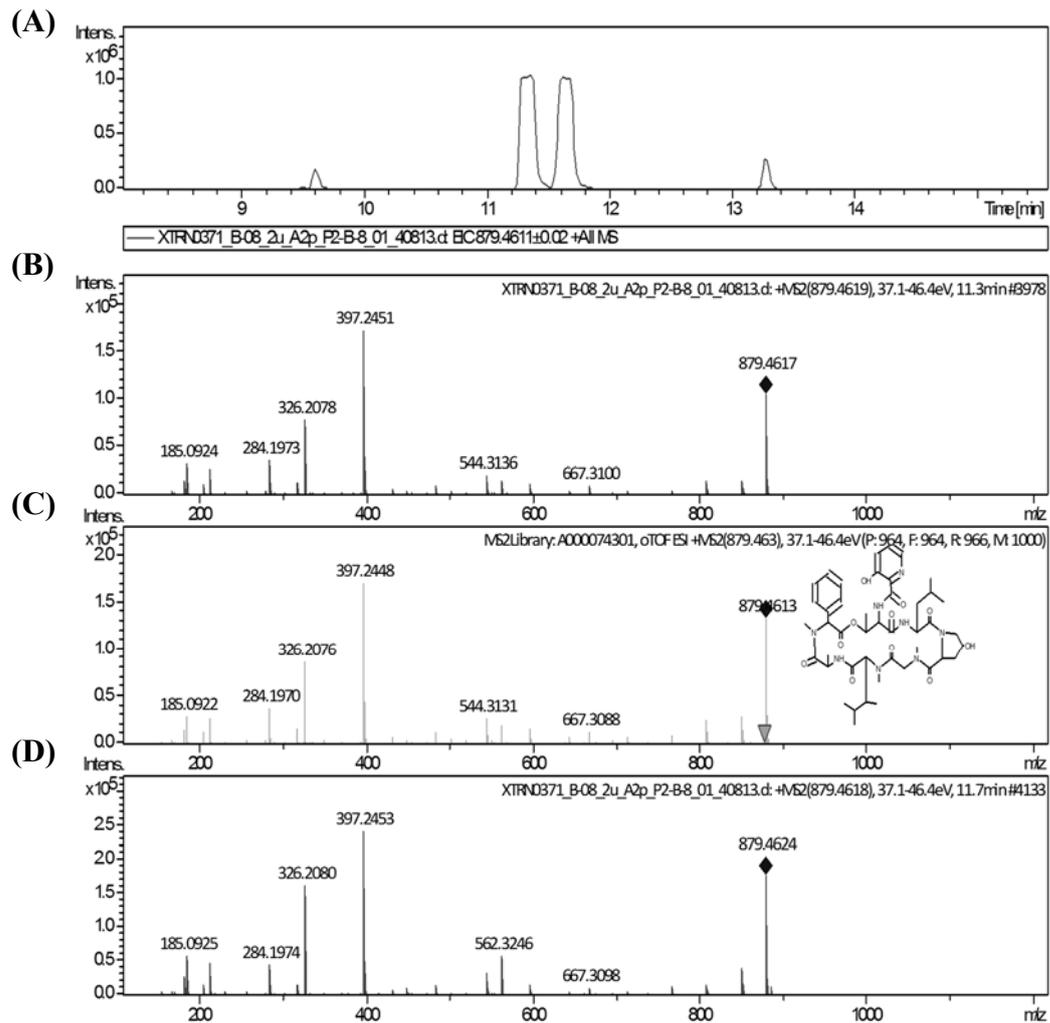


Abbildung 45: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von DSM40149-Kulturextrakten – Identifizierung von Viridogrisein I. Zur Identifizierung von Viridogrisein I ($m/z_{\text{theoretisch}} 879.4611 [M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von DSM40149 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)/(B)/(D). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei $m/z 879.4611$. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 879.4619 [M+H]^+$, RT = 11,3 min. (C): MS/MS-Fragmentierungsmuster von Viridogrisein I ($m/z 879.463 [M+H]^+$) (Reinsubstanz) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). (D): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 879.4618 [M+H]^+$, RT = 11,7 min. Das Fragmentierungsmuster in (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster in (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Viridogrisein I. Die MS/MS-Fragmentierungsmuster in (D) und (C) waren ebenfalls sehr ähnlich. Es traten lediglich Abweichungen bezüglich des Intensitätsverhältnisses einzelner Fragmente auf. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der in (D) analysierten Verbindung um ein Viridogrisein-I-Isomer handelte.

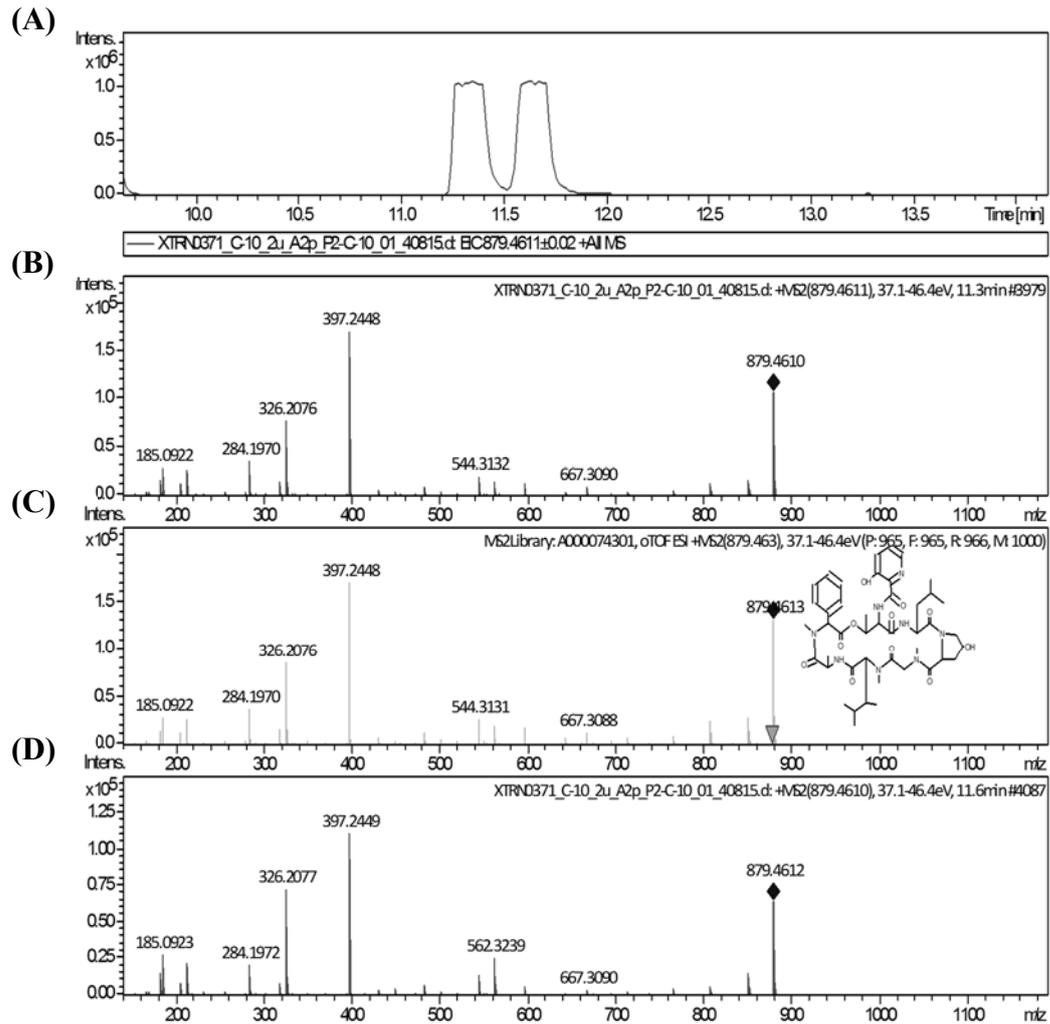


Abbildung 46: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von DSM40229-Kulturextrakten – Identifizierung von Viridogrisein I. Zur Identifizierung von Viridogrisein I ($m/z_{\text{theoretisch}} 879.4611 [M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von DSM40229 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)/(B)/(D). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei $m/z 879.4611$. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 879.4611 [M+H]^+$, RT = 11,3 min. (C): MS/MS-Fragmentierungsmuster von Viridogrisein I ($m/z 879.463 [M+H]^+$) (Reinsubstanz) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). (D): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 879.4610 [M+H]^+$, RT = 11,6 min. Das Fragmentierungsmuster in (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster in (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Viridogrisein I. Die MS/MS-Fragmentierungsmuster in (D) und (C) waren ebenfalls sehr ähnlich. Es traten lediglich Abweichungen bezüglich des Intensitätsverhältnisses einzelner Fragmente auf. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei der in (D) analysierten Verbindung um ein Viridogrisein-I-Isomer handelte.

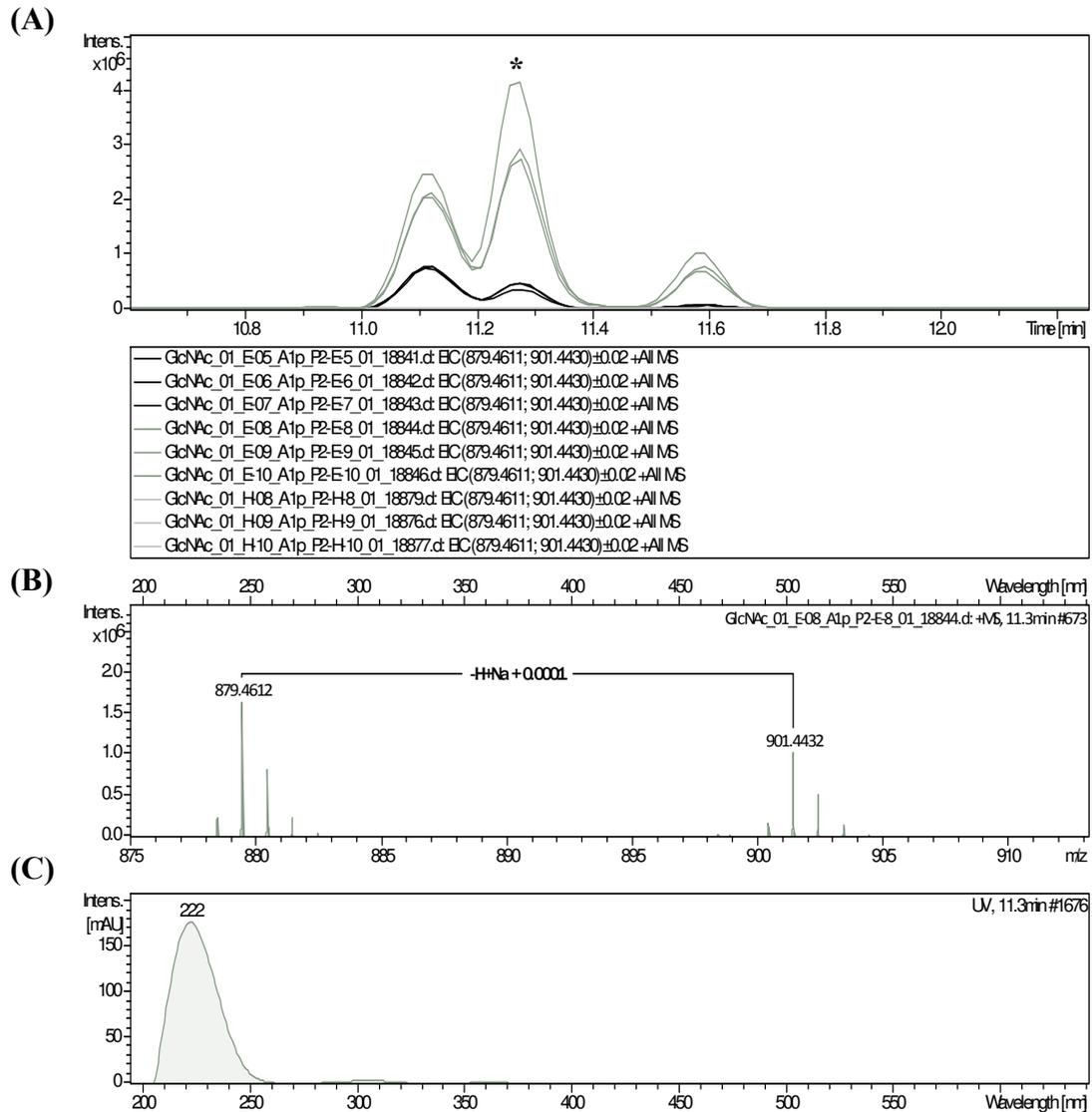


Abbildung 47: UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von FH1286 (+ GlcNAc) und FH1286 (- GlcNAc). Der Stamm FH1286 wurde in Medium kultiviert, welches 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc enthielt. Die Kultivierung erfolgte im Triplikate. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Es folgte eine UPLC-HR-MS-Analyse der Extrakte zur Detektion von Viridogrisein I ($m/z_{\text{theoretisch}}$ 879.4611 [M+H]⁺). (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 879.4611 [M+H]⁺ und m/z 901.4430 [M+Na]⁺) der Methanol-Extrakte von FH1286 (+ GlcNAc) (dunkelgrau), von FH1286 (- GlcNAc) (schwarz) und der GlcNAc-haltigen Medienkontrolle (hellgrau). * kennzeichnet Viridogrisein I. In den Extrakten der Medienkontrollen war kein Viridogrisein I detektiert. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Viridogrisein I eingesetzt (vgl. Abbildung 28). (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von FH1286 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 11,3 min. (C): UV-Spektrum bei einer Retentionszeit von 11,3 min.

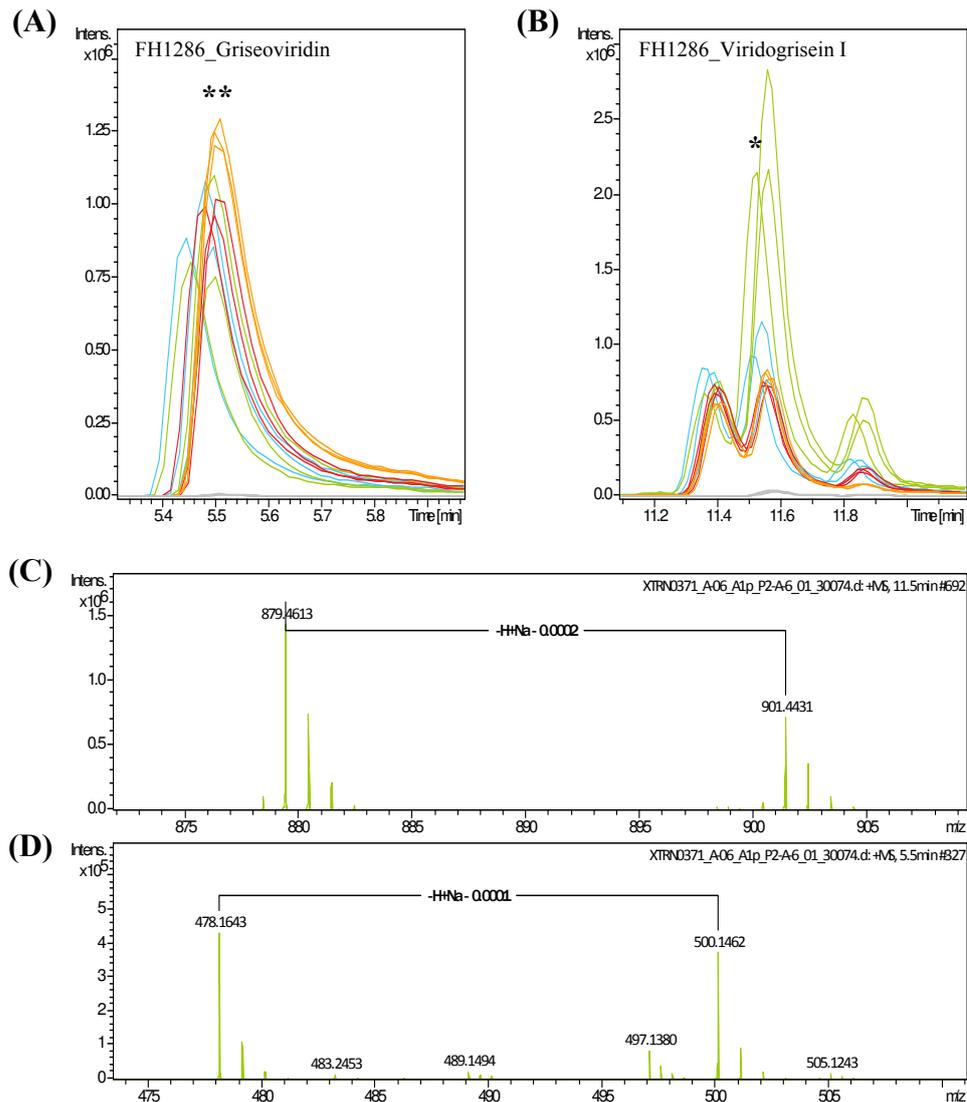


Abbildung 48: Detektion von Viridogrisein I und Griseoviridin in Kulturextrakten von FH1286, DSM40149 und DSM40229. Die Stämme FH1286, DSM40149 und DSM40229 wurden im Triplikate in ISP2-Medium kultiviert, das mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen supplementiert wurde. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur Detektion von Viridogrisein I ($m/z_{\text{theoretisch}} 879.4611 [M+H]^+$) und Griseoviridin ($m/z_{\text{theoretisch}} 478.1642 [M+H]^+$) wurde eine UPLC-HR-MS-Analyse der Extrakte durchgeführt. (A): Detektion von Griseoviridin in den Extrakten von FH1286. Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z 478.1642 [M+H]^+$ und $m/z 500.1462 [M+Na]^+$. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Griseoviridin eingesetzt (vgl. Abbildung 29). (B)/(E)/(G): Detektion von Viridogrisein I in den Extrakten von FH1286 (B), DSM40149 (E) bzw. DSM40229 (G). Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z 879.4611 [M+H]^+$ und $m/z 901.4430 [M+Na]^+$. Die extrahierten Ionen-Chromatogramme wurden für die relative Quantifizierung von Viridogrisein I eingesetzt (vgl. Abbildung 29). (C)/(F)/(H): Detektion von Viridogrisein I in einem Extrakt von FH1286 (+ 20 mM GlcNAc) (C), DSM40149 (+ 20 mM GlcNAc) (F) bzw. DSM40229 (+ 20 mM GlcNAc) (H). Dargestellt sind Ausschnitte eines Massenspektrums. (D): Detektion von Griseoviridin in einem Extrakt von FH1286 (+ 20 mM GlcNAc). Dargestellt sind Ausschnitte eines Massenspektrums. Die einzelnen Farben geben an, welche Zusätze das Kultivierungsmedium enthielt: blau: ISP2 ohne Zusätze; grün: ISP2 + 20 mM GlcNAc; rot: ISP2 + 2 mM GlcNAc; orange: ISP2 + 20 mM Glucose; grau: Medienkontrolle (ISP2 + 20 mM GlcNAc). *: Viridogrisein I, **: Griseoviridin. Die Viridogrisein-I-Produktion wurde in FH1286, nicht aber in DSM40149 und DSM40229 durch Zugabe von 20 mM GlcNAc positiv beeinflusst.

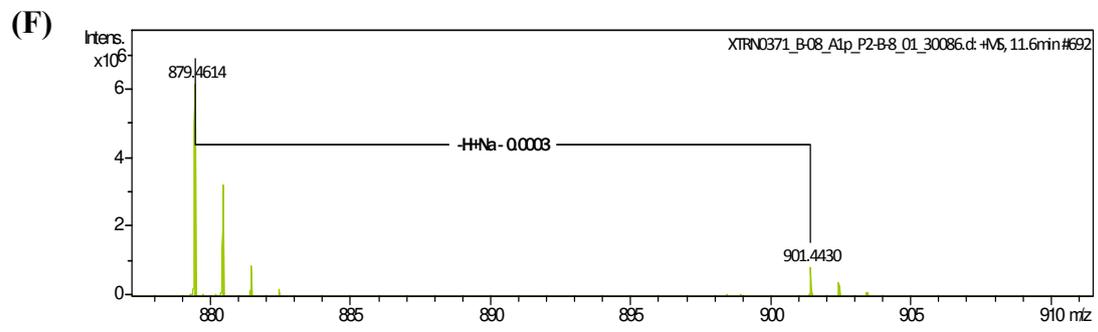
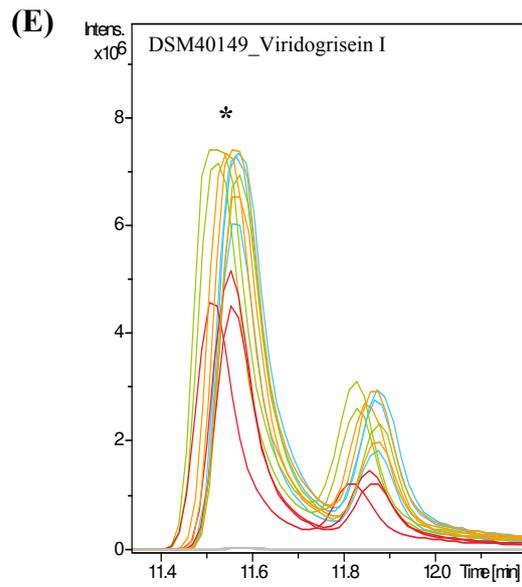


Abbildung 48: Fortsetzung.

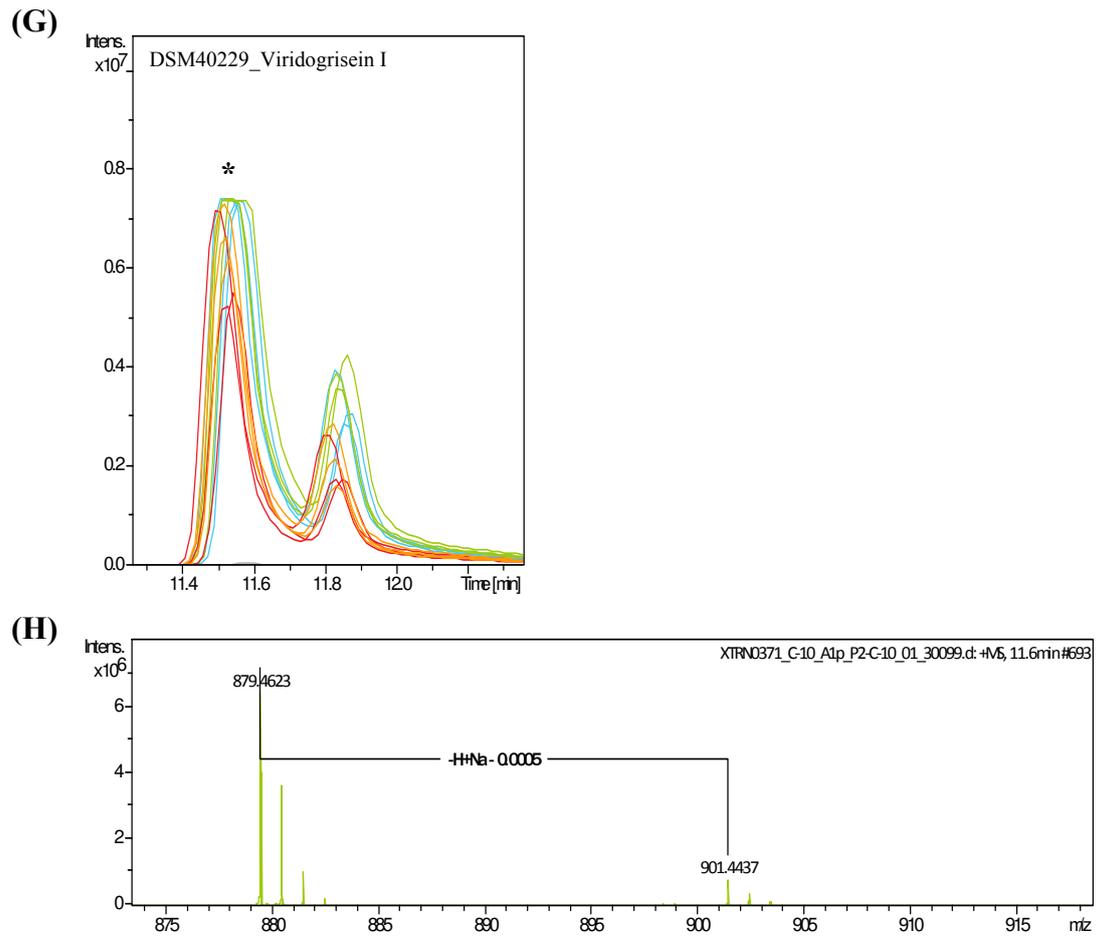


Abbildung 48: Fortsetzung.

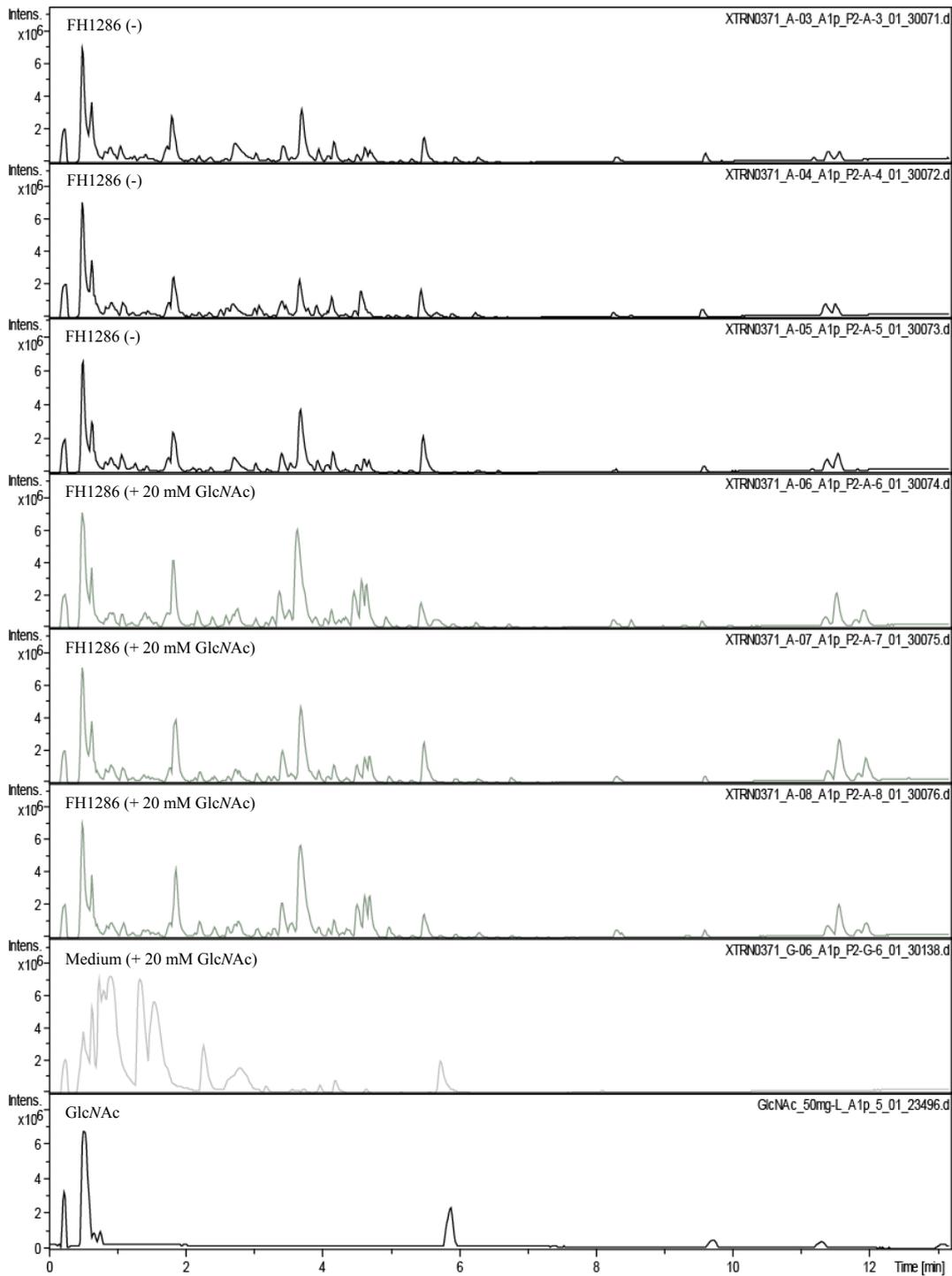


Abbildung 49: UPLC-HR-MS-Analyse von Kulturextrakten des Stammes FH1286 – Basispeak-Chromatogramme. Der Stamm FH1286 wurde im dreifachen Replikat in Medium kultiviert, das 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc enthielt. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden durch UPLC-HR-MS analysiert. Dargestellt sind die Basispeak-Chromatogramme von jeweils drei Extrakt-Replikaten. FH1286 (+ 20 mM GlcNAc): FH1286 wurde in Medium kultiviert, das 20 mM GlcNAc enthielt; FH1286 (-): Der Stamm wurde in Medium ohne GlcNAc kultiviert; Medium (+ 20 mM GlcNAc): Medienkontrolle mit 20 mM GlcNAc.

8.5 UPLC-HR-MS/(MS)-Analytik zu HAG010252

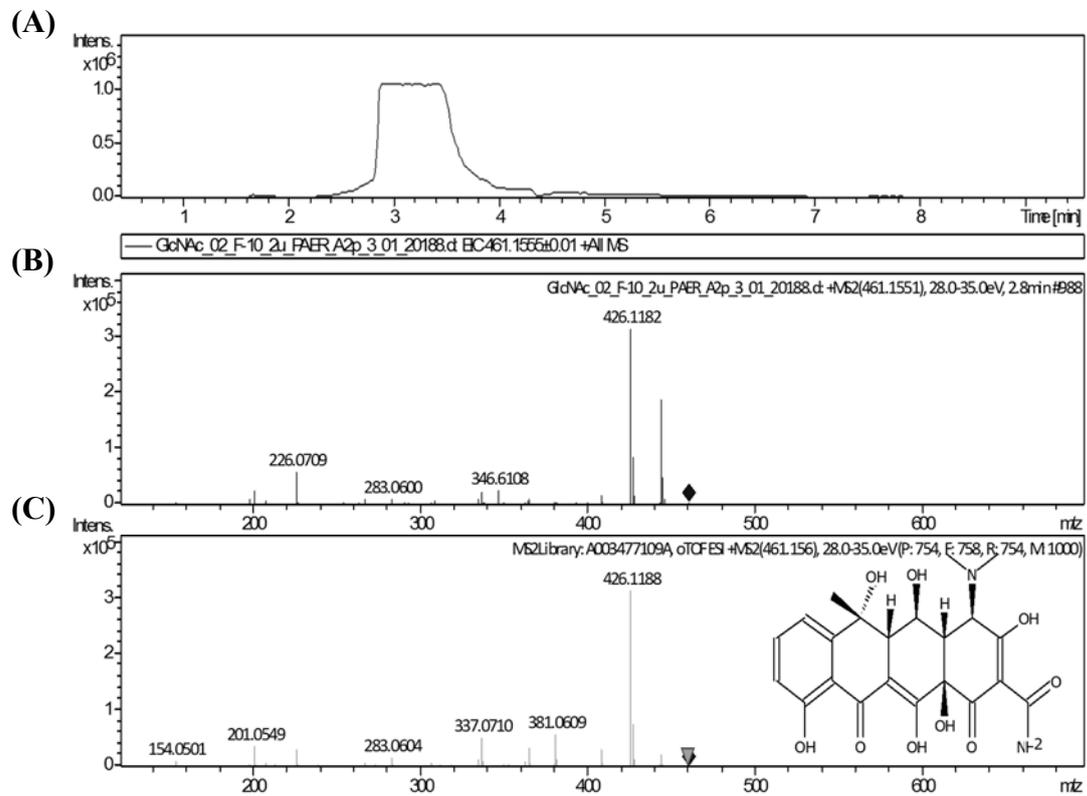


Abbildung 50: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010252-Kulturextrakten – Identifizierung von Oxytetracyclin. Zur Identifizierung von Oxytetracyclin ($m/z_{\text{theoretisch}} 461.1555 [M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert (A)-(B). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei $m/z 461.1555$. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 461.1551 [M+H]^+$, RT = 2,8 min. (C): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von Oxytetracyclin (Reinsubstanz) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Oxytetracyclin ($m/z 461.156 [M+H]^+$). Das Fragmentierungsmuster von (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster von (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Oxytetracyclin.

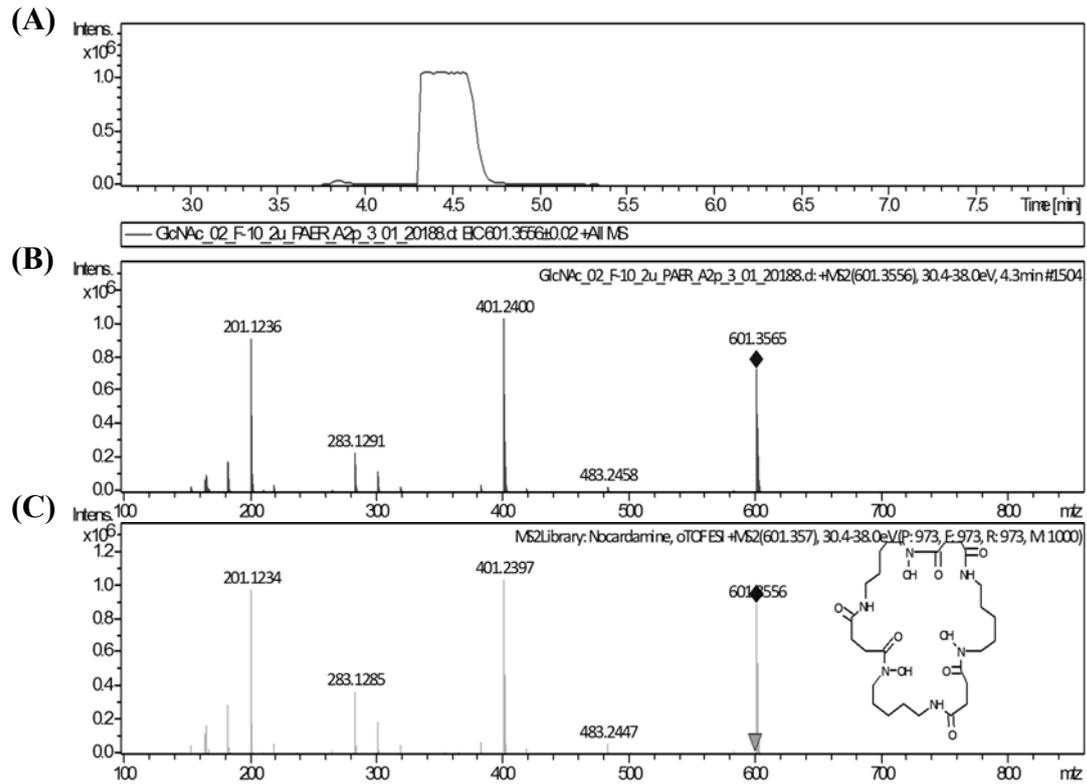


Abbildung 51: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010252-Kulturextrakten – Identifizierung von Desferrioxamin E. Zur Identifizierung von Desferrioxamin E ($m/z_{\text{theoretisch}}$ 601.3556 [M+H]⁺) wurde ein Methanol-Extrakt von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert. (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 601.3556. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 601.3556 [M+H]⁺, RT = 4,3 min. (C): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von Desferrioxamin E (Reinsubstanz) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin E (m/z 601.357 [M+H]⁺). Das Fragmentierungsmuster von (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster von (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Desferrioxamin E.

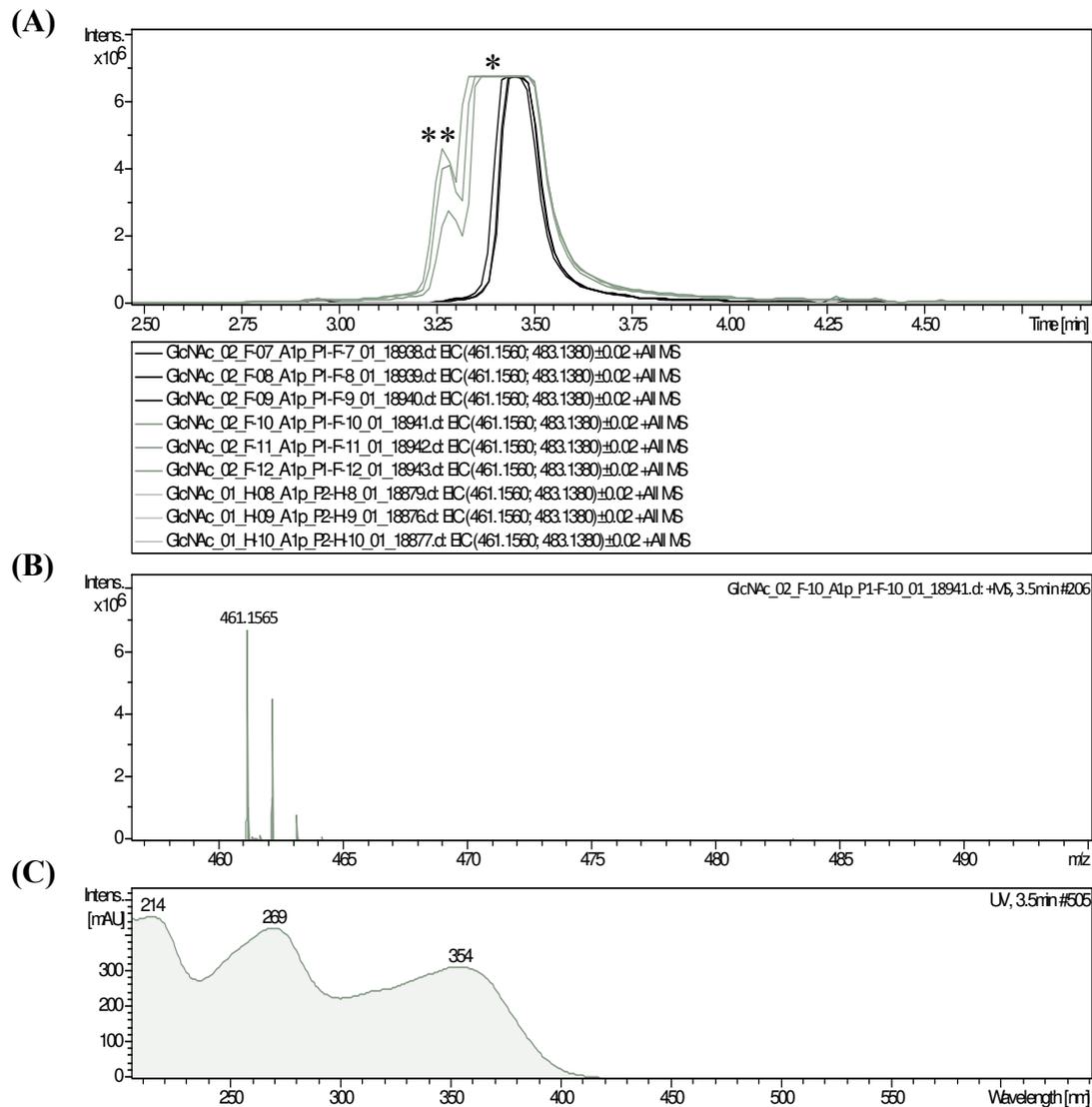


Abbildung 52: UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von HAG010252 (+ GlcNAc) und HAG010252 (- GlcNAc). Der Stamm HAG010252 wurde in Medium kultiviert, welches 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc enthielt. Die Kultivierung erfolgte im Triplikate. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Es folgte eine UPLC-HR-MS-Analyse der Extrakte zur Detektion von Oxytetracyclin ($m/z_{\text{theoretisch}} 461.1560 [M+H]^+$). (A): Summe der extrahierten Ionen-Chromatogramme von $m/z 461.1560 [M+H]^+$ und $m/z 483.1380 [M+Na]^+$ in den Extrakten von HAG010252 (+ GlcNAc) (dunkelgrau), von HAG010252 (- GlcNAc) (schwarz) und der GlcNAc-haltigen Medienkontrolle (hellgrau). * kennzeichnet Oxytetracyclin, ** ein potentielles Oxytetracyclin-Isomer. (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010252 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,5 min. (C): UV-Spektrum eines Methanol-Extraktes von HAG010252 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,5 min. (D): Bei den extrahierten Ionen-Chromatogrammen aus (A) deutete die Form einiger Peaks auf das Erreichen der Detektorsättigung hin. Daher wurden zur relativen Quantifizierung von Oxytetracyclin in den Proben HAG010252 (+ GlcNAc) und HAG010252 (- GlcNAc) extrahierte Ionen-Chromatogramme des zweitgrößten Isotopenpeaks von $[M+H]^+$ eingesetzt ($m/z 462.1587$) (vgl. Abbildung 30). Die extrahierten Ionen-Chromatogramme in (D) haben dieselbe Farbzuordnung wie in (A). Die relative Oxytetracyclin-Konzentration war in den Extrakten von HAG010252 (+ GlcNAc) höher als in den Extrakten von HAG010252 (- GlcNAc). Das potentielle Oxytetracyclin-Isomer wurde nur in den Extrakten von HAG010252 (+ GlcNAc), nicht aber in den Extrakten von HAG010252 (- GlcNAc) detektiert. In den Extrakten der Medienkontrollen wurde kein Oxytetracyclin und kein potentielles Oxytetracyclin-Isomer detektiert.

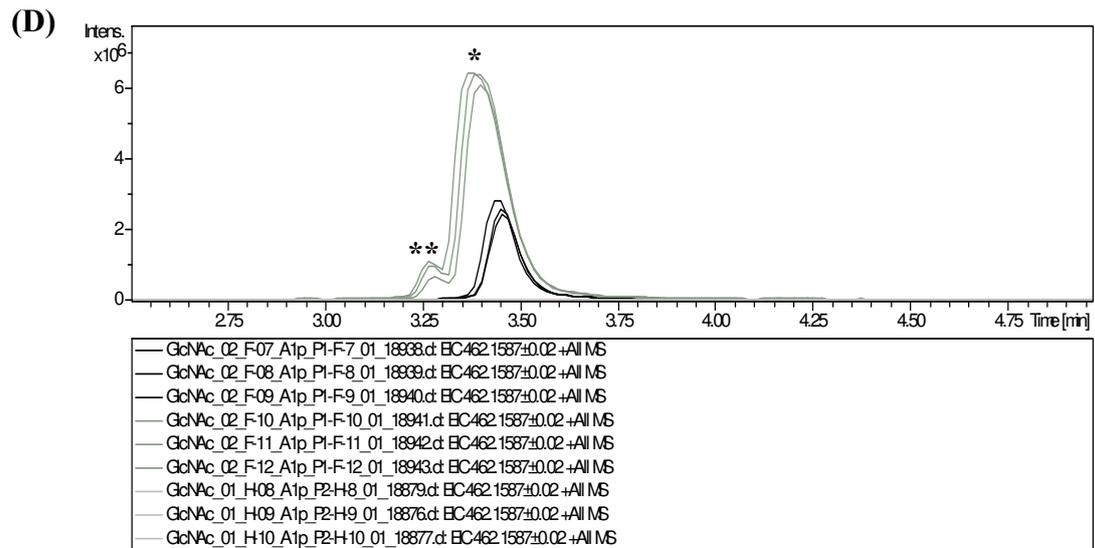


Abbildung 52: Fortsetzung.

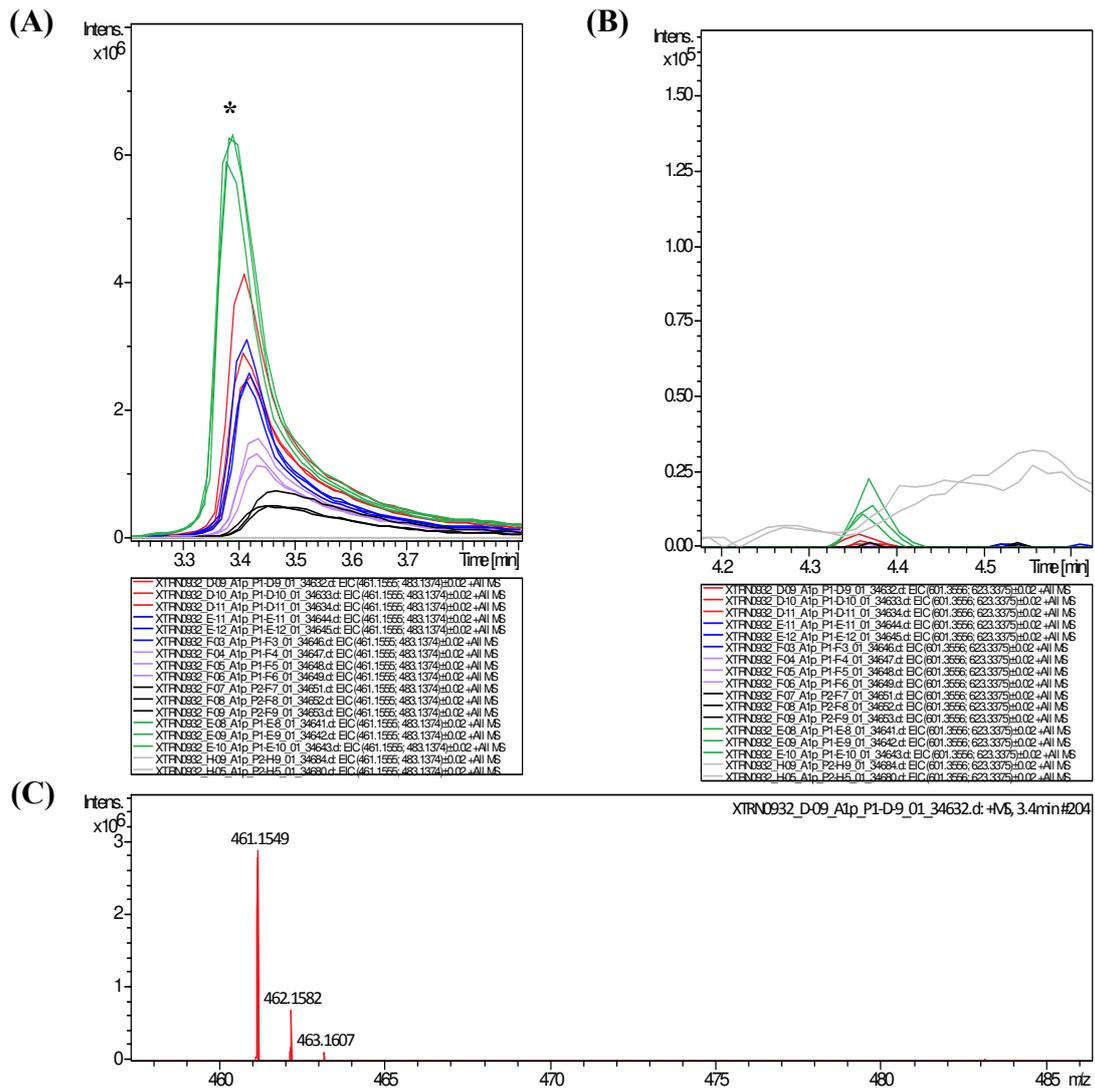


Abbildung 53: Einfluss von Eisen(III)-citrat und Glucose auf die Produktion von Desferrioxamin E und Oxytetracyclin in HAG010252. Der Stamm HAG010252 wurde jeweils im Triplikate in ISP2-Medium mit verschiedenen Zusätzen kultiviert. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Desferrioxamin E (m/z 601.3556 [M+H]⁺) und Oxytetracyclin (m/z 461.1555 [M+H]⁺) wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. (A): Detektion von Oxytetracyclin. Dargestellt ist die Summe der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z 461.1555 [M+H]⁺ und m/z 483.1374 [M+Na]⁺ (jeweils Molekülionenpeak). (B): Detektion von Desferrioxamin E. Dargestellt ist die Summe der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z 601.3556 [M+H]⁺ und m/z 623.3375 [M+Na]⁺ (jeweils Molekülionenpeak). (C): Detektion von Oxytetracyclin. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010252 (kultiviert in ISP2-Medium ohne Zusätze). Da in einigen Proben des Datensets Anzeichen einer Detektorsättigung erkennbar waren (vgl. Abbildung 54 (A)/(B)), wurde die relative Quantifizierung der Verbindungen auf Basis der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z [M+H]⁺ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität) durchgeführt (D)/(E). (D): Detektion von Oxytetracyclin. Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z 462.1587 [M+H]⁺ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität). (E): Detektion von Desferrioxamin E. Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei m/z 602.3585 [M+H]⁺ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität). Verwendete Kultivierungsmedien: rot: ISP2 ohne Zusätze; dunkelblau: ISP2 + 0,03 mg/mL Eisen(III)-citrat; lila: ISP2 + 0,06 mg/mL Eisen(III)-citrat; schwarz: ISP2 + 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat; grün: ISP2 + 20 mM Glucose; grau: Medienkontrollen (ISP2 + 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat bzw. ISP2 + 20 mM Glucose); *: Oxytetracyclin. Desferrioxamin E konnte in keiner der Proben detektiert werden. Die Zugabe von Eisen(III)-citrat zum Medium führte zu einer Abnahme der relativen Oxytetracyclin-Konzentration im Vergleich zu den unsupplementierten Proben. Die Zugabe von 20 mM Glucose zum Medium hatte einen schwach positiven Effekt auf die relative Oxytetracyclin-Konzentration im Vergleich zu den unsupplementierten Proben.

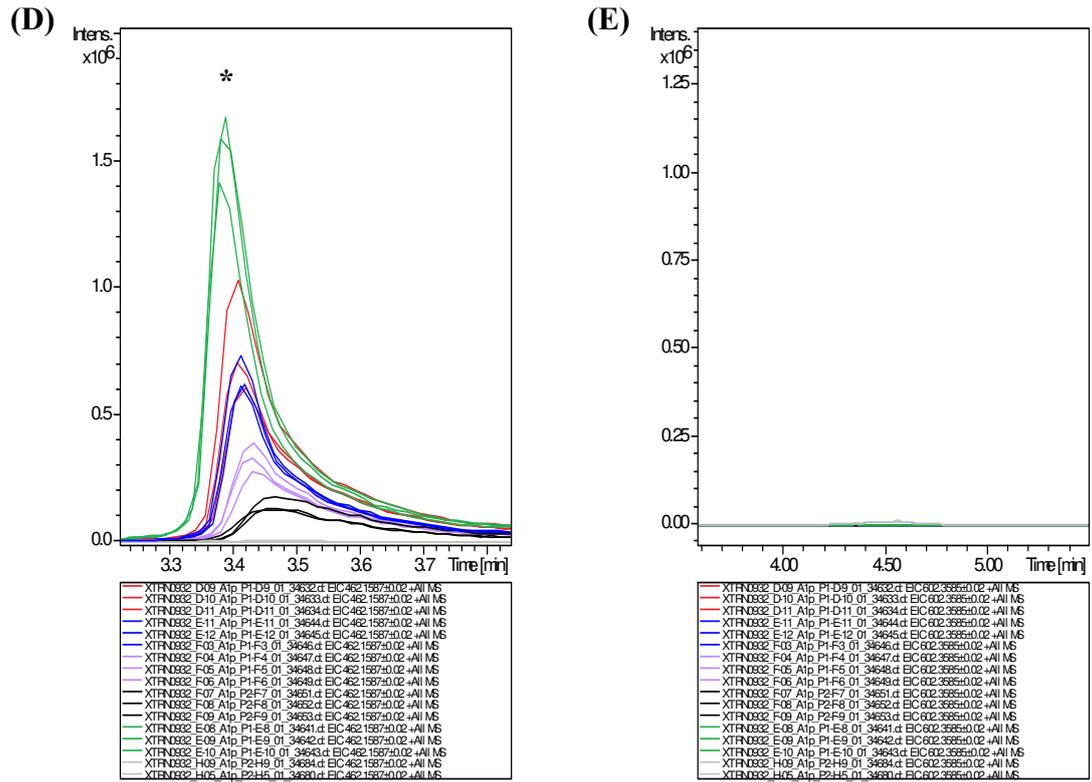


Abbildung 53: Fortsetzung.

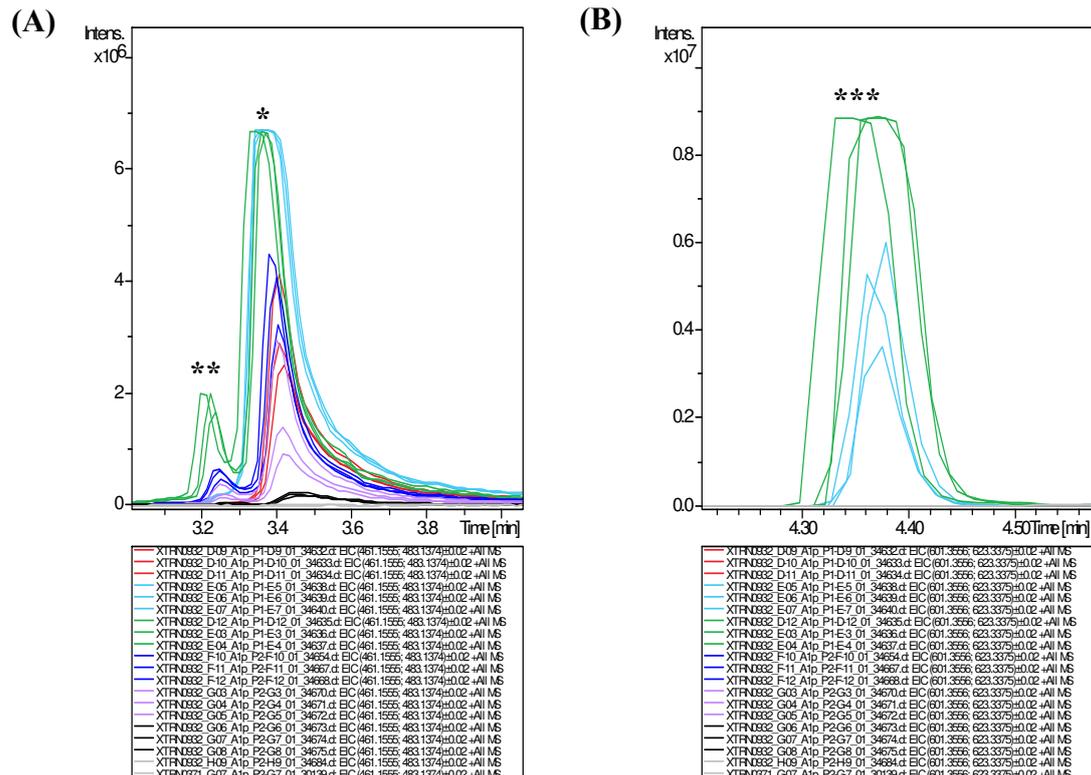


Abbildung 54: Einfluss von GlcNAc und Eisen(III)-citrat auf die Produktion von Desferrioxamin E, Oxytetracyclin und ein potentielles Oxytetracyclin-Isomer in HAG010252. Der Stamm HAG010252 wurde jeweils im Triplikate in ISP2-Medium mit verschiedenen Zusätzen kultiviert. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Zur relativen Quantifizierung von Desferrioxamin E ($m/z_{\text{theoretisch}} 601.3556 [M+H]^+$), Oxytetracyclin ($m/z_{\text{theoretisch}} 461.1555 [M+H]^+$) und einem potentiellen Oxytetracyclin-Isomer ($m/z 461.1555 [M+H]^+$) wurden UPLC-HR-MS-Messungen der Extrakte durchgeführt. (A): Detektion von Oxytetracyclin (*) und einem potentiellen Oxytetracyclin-Isomer (**). Dargestellt ist die Summe der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z 461.1555 [M+H]^+$ und $m/z 483.1374 [M+Na]^+$ (jeweils Molekülionenpeak). (B): Detektion von Desferrioxamin E (***). Dargestellt ist die Summe der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z 601.3556 [M+H]^+$ und $m/z 623.3375 [M+Na]^+$ (jeweils Molekülionenpeak). (C): Detektion von Oxytetracyclin. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,3 min. (D): Detektion eines potentiellen Oxytetracyclin-Isomers. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,2 min. (E): Detektion von Desferrioxamin E. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010252 (+ 20 mM GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 4,4 min. Da in (A) und (B) Anzeichen einer Detektorsättigung erkennbar waren, wurde die relative Quantifizierung der Verbindungen auf Basis der extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z [M+H]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität) durchgeführt (F)/(G). (F): Detektion von Oxytetracyclin. Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z 462.1587 [M+H]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität). (G): Detektion von Desferrioxamin E. Dargestellt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme bei $m/z 602.3585 [M+H]^+$ (Isotopenpeak mit zweithöchster Intensität). Verwendete Kultivierungsmedien: rot: ISP2 ohne Zusätze; hellblau: ISP2 + 2 mM GlcNAc; grün: ISP2 + 20 mM GlcNAc; dunkelblau: ISP2 + 20 mM GlcNAc + 0,03 mg/mL Eisen(III)-citrat; lila: ISP2 + 20 mM GlcNAc + 0,06 mg/mL Eisen(III)-citrat; schwarz: ISP2 + 20 mM GlcNAc + 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat; grau: Medienkontrollen (ISP2 + 0,12 mg/mL Eisen(III)-citrat bzw. ISP2 + 20 mM GlcNAc). *: Oxytetracyclin; **: potentielles Oxytetracyclin-Isomer; ***: Desferrioxamin E. Die Zugabe von 20 mM GlcNAc zum Medium hatte einen positiven Effekt auf die Produktion des potentiellen Oxytetracyclin-Isomers sowie auf die Produktion von Oxytetracyclin und Desferrioxamin E. Durch Zugabe von Eisen(III)-citrat wurde der positive Effekt von GlcNAc auf die Produktion der drei Substanzen teilweise oder vollständig aufgehoben.

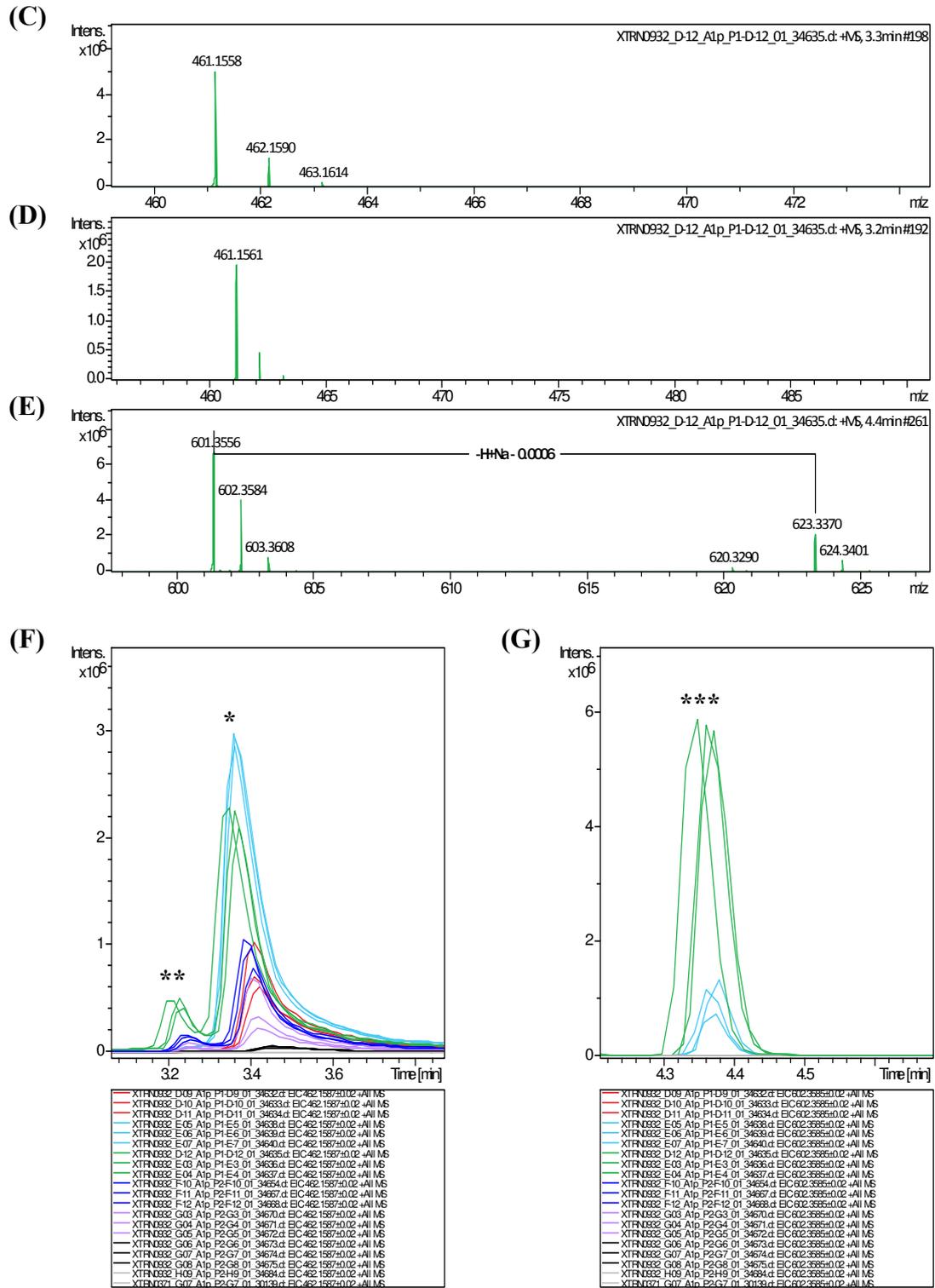


Abbildung 54: Fortsetzung.

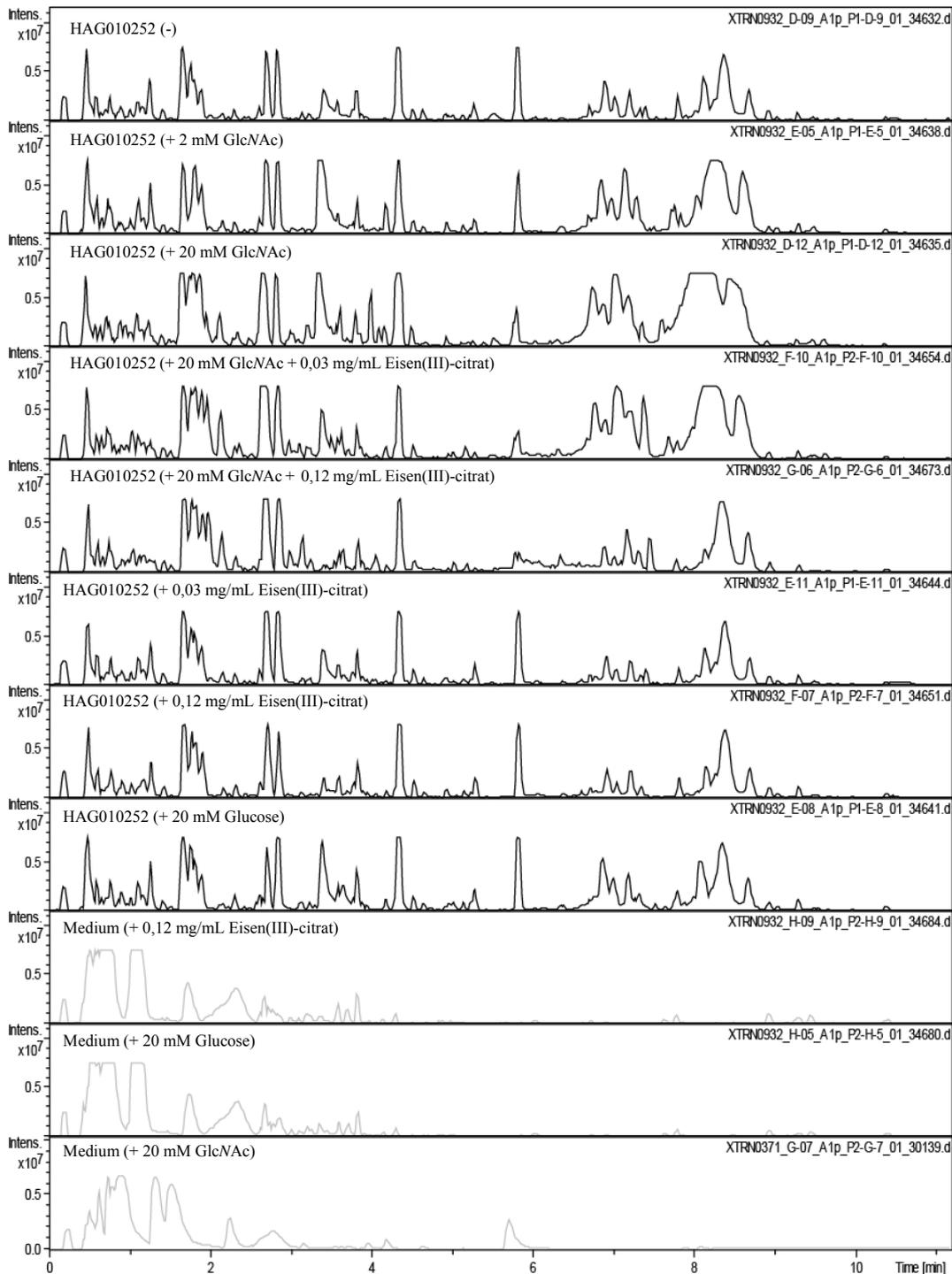


Abbildung 55: UPLC-HR-MS-Analyse von Kulturextrakten des Stammes HAG010252 – Basispeak-Chromatogramme. Der Stamm HAG010252 wurde im dreifachen Replikat in acht verschiedenen Medien kultiviert. Grundbestandteil aller Medien war ISP2. Die Medien unterschieden sich durch Supplemente (Eisen(III)-citrat; GlcNAc; Glucose). Nach sieben Tagen Wachstum von HAG010252 wurden die Kulturen gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden durch UPLC-HR-MS analysiert. Dargestellt sind die Basispeak-Chromatogramme von jeweils einem Extrakt-Replikat. HAG010252 (-): HAG010252 wurde in ISP2 ohne Zusätze kultiviert.

8.6 UPLC-HR-MS/(MS)-Analytik zu HAG010024

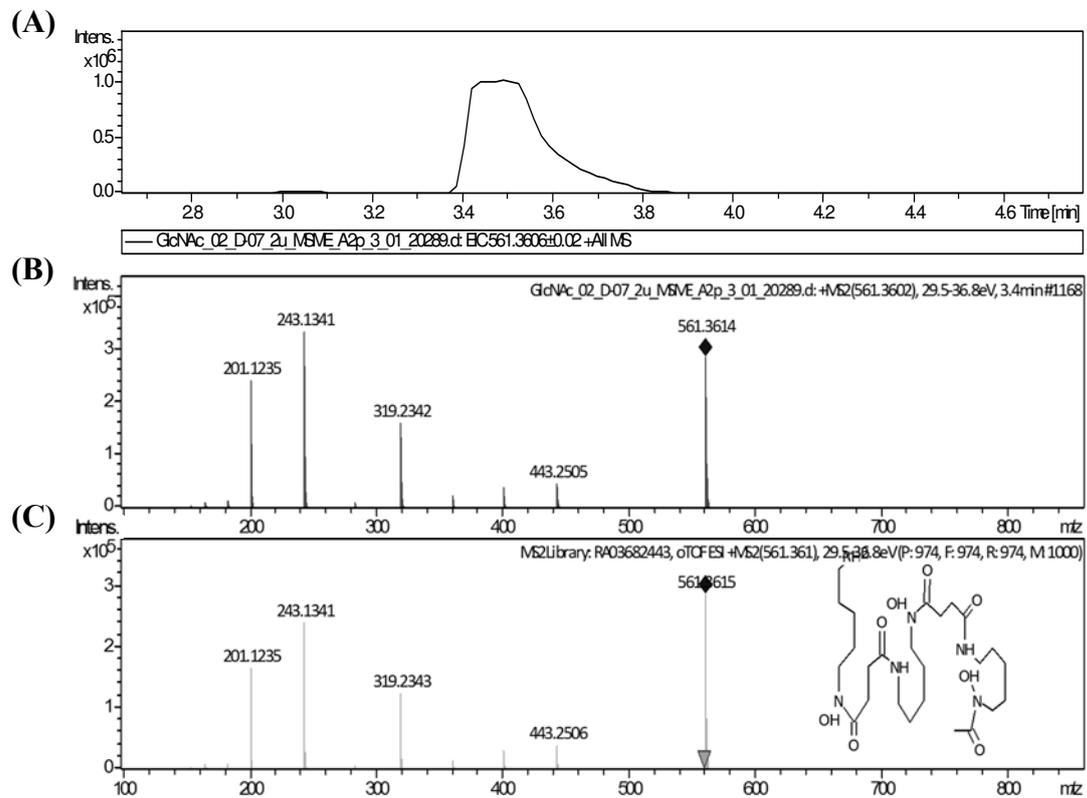


Abbildung 56: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010024-Kulturextrakten – Identifizierung von Desferrioxamin B. Zur Identifizierung von Desferrioxamin B ($m/z_{\text{theoretisch}} 561.3606 [M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von HAG010024 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert ((A)-(B)). (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei m/z 561.3606. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit m/z 561.3602 $[M+H]^+$, RT = 3,4 min. (C): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von kommerziellem Desferrioxamin B (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin B (m/z 561.361 $[M+H]^+$). Das Fragmentierungsmuster von (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster von (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Desferrioxamin B.

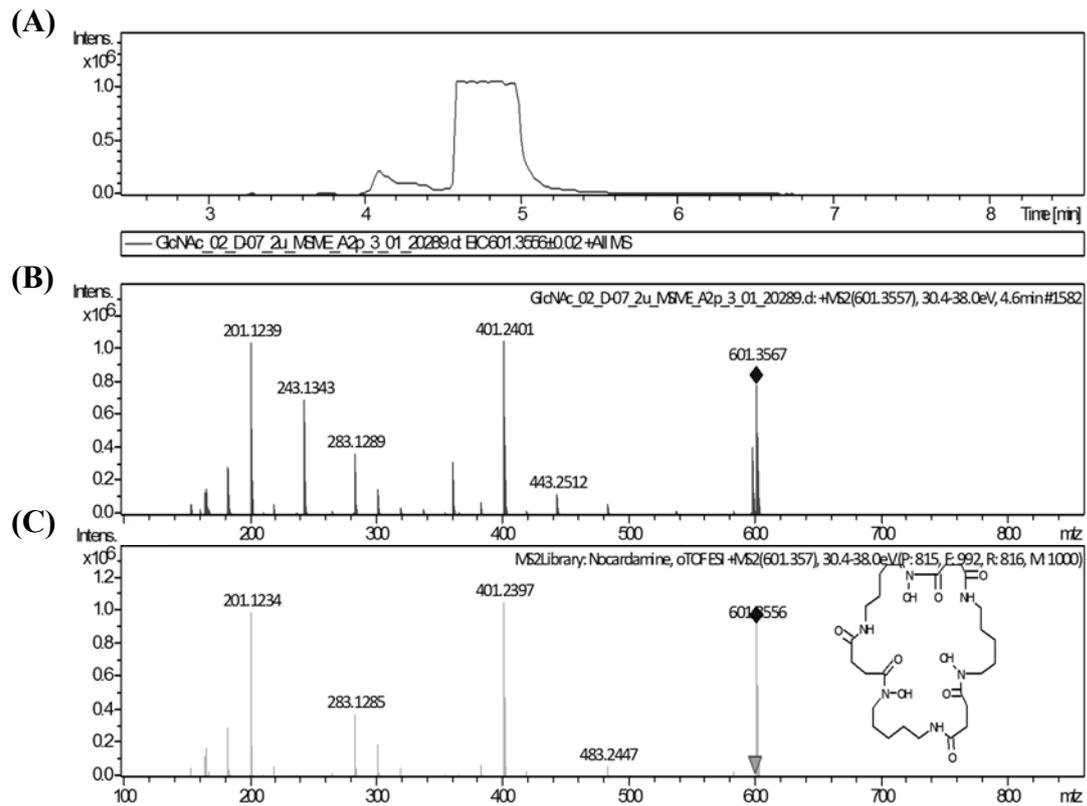


Abbildung 57: UPLC-HR-MS/MS-Analyse von HAG010024-Kulturextrakten – Identifizierung von Desferrioxamin E. Zur Identifizierung von Desferrioxamin E ($m/z_{\text{theoretisch}} 601.3556 [M+H]^+$) wurde ein Methanol-Extrakt von HAG010024 (+ 20 mM GlcNAc) durch UPLC-HR-MS/MS analysiert. (A): Extrahiertes Ionen-Chromatogramm bei $m/z 601.3556$. (B): MS/MS-Fragmentierungsmuster einer Substanz mit $m/z 601.3557 [M+H]^+$, RT = 4,6 min. (C): UPLC-HR-MS/MS-Analyse von Desferrioxamin E (Reinsubstanz) (entnommen aus der hausinternen UPLC-HR-MS/MS-Datenbank). Dargestellt ist das MS/MS-Fragmentierungsmuster von Desferrioxamin E ($m/z 601.357 [M+H]^+$). Das Fragmentierungsmuster von (B) zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster von (C). Somit handelte es sich bei der in (B) analysierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Desferrioxamin E.

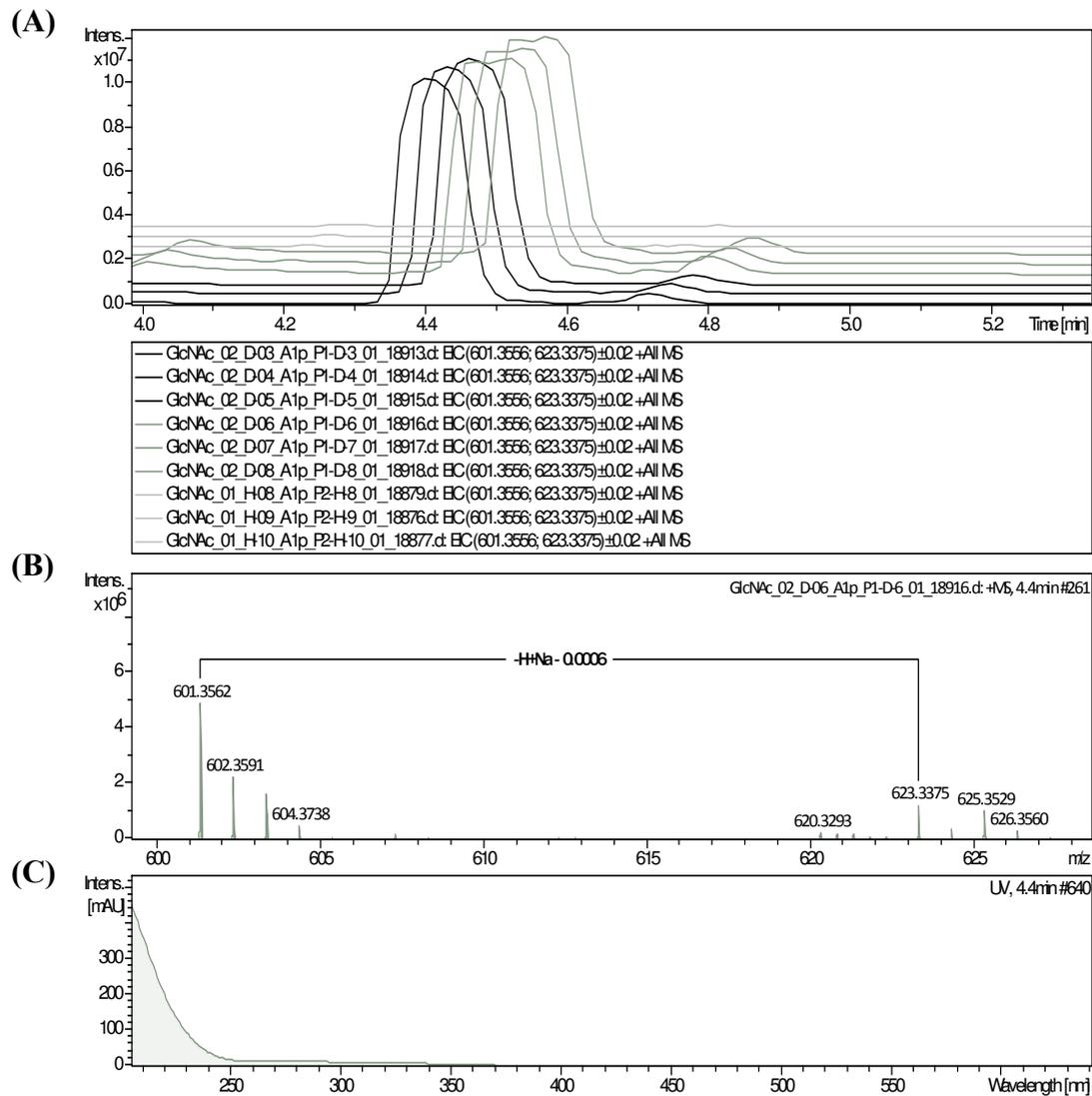


Abbildung 58: UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von HAG010024 (+ GlcNAc) und HAG010024 (- GlcNAc) – Desferrioxamin E. Der Stamm HAG010024 wurde in Medium kultiviert, welches 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc enthielt. Die Kultivierung erfolgte im Triplikate. Nach sieben Tagen Kultivierungsdauer wurden die Kulturen gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Es folgte eine UPLC-HR-MS-Analyse der Extrakte zur Detektion von Desferrioxamin E ($m/z_{\text{theoretisch}}$ 601.3556 [M+H]⁺). (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus m/z 601.3556 [M+H]⁺ und m/z 623.3375 [M+Na]⁺) in den Extrakten von HAG010024 (+ GlcNAc) (dunkelgrau), von HAG010024 (- GlcNAc) (schwarz) und der GlcNAc-haltigen Medienkontrolle (hellgrau). (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010024 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 4,4 min. (C): UV-Spektrum bei einer Retentionszeit von 4,4 min. (D): Bei den extrahierten Ionen-Chromatogrammen aus (A) deutete die Form einiger Peaks auf das Erreichen der Detektorsättigung hin. Daher wurden zur relativen Quantifizierung von Desferrioxamin E in den Proben HAG010024 (+ GlcNAc) und HAG010024 (- GlcNAc) die UV-Chromatogramme beim Absorptionsmaximum von Desferrioxamin E (211 nm) herangezogen. Die UV-Chromatogramme in (D) haben dieselbe Farbzurordnung wie in (A). Die Desferrioxamin-E-Konzentration war in den Extrakten von HAG010024 (+ GlcNAc) im Vergleich zu den Extrakten von HAG010024 (- GlcNAc) leicht erhöht. In den Medienkontrollen wurde kein Desferrioxamin E detektiert.

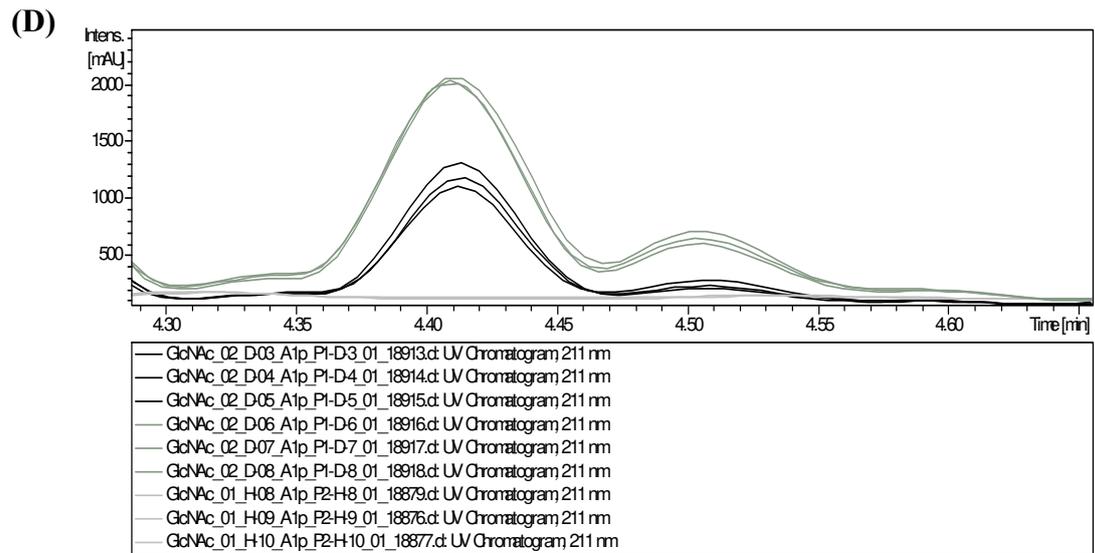


Abbildung 58: Fortsetzung.

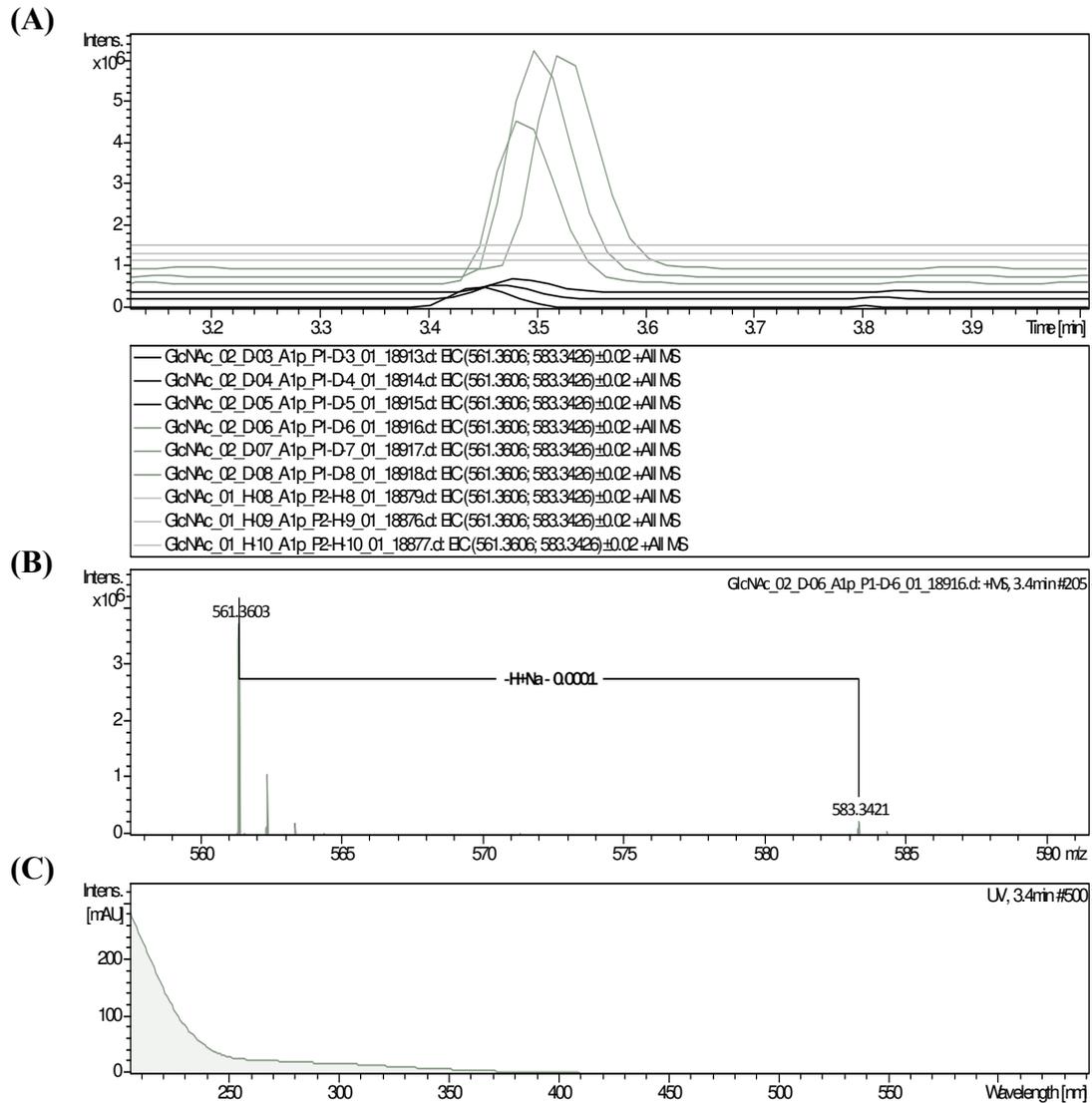


Abbildung 59: UPLC-HR-MS-Analyse der Methanol-Extrakte von HAG010024 (+ GlcNAc) und HAG010024 (- GlcNAc) – Desferrioxamin B. Der Stamm HAG010024 wurde in Medium kultiviert, welches 20 mM GlcNAc bzw. kein GlcNAc enthielt. Die Kultivierung erfolgte im Triplikate. Die gefriergetrockneten Kulturen wurden mit Methanol extrahiert. Es folgte eine UPLC-HR-MS-Analyse der Extrakte zur Detektion von Desferrioxamin B ($m/z_{\text{theoretisch}} 561.3606 [M+H]^+$). (A): Extrahierte Ionen-Chromatogramme (Summe aus $m/z 561.3606 [M+H]^+$ und $m/z 583.3426 [M+Na]^+$) in den Extrakten von HAG010024 (+ GlcNAc) (dunkelgrau), von HAG010024 (- GlcNAc) (schwarz) und der GlcNAc-haltigen Medienkontrolle (hellgrau). (B): Ausschnitt des Massenspektrums eines Methanol-Extraktes von HAG010024 (+ GlcNAc) bei einer Retentionszeit von 3,4 min. (C): UV-Spektrum bei einer Retentionszeit von 3,4 min. Die Desferrioxamin-B-Konzentration war in den Extrakten von HAG010024 (+ GlcNAc) höher als in den Extrakten von HAG010024 (- GlcNAc). In den Medienkontrollen wurde kein Desferrioxamin B detektiert.

8.8 BOX-Fingerprints

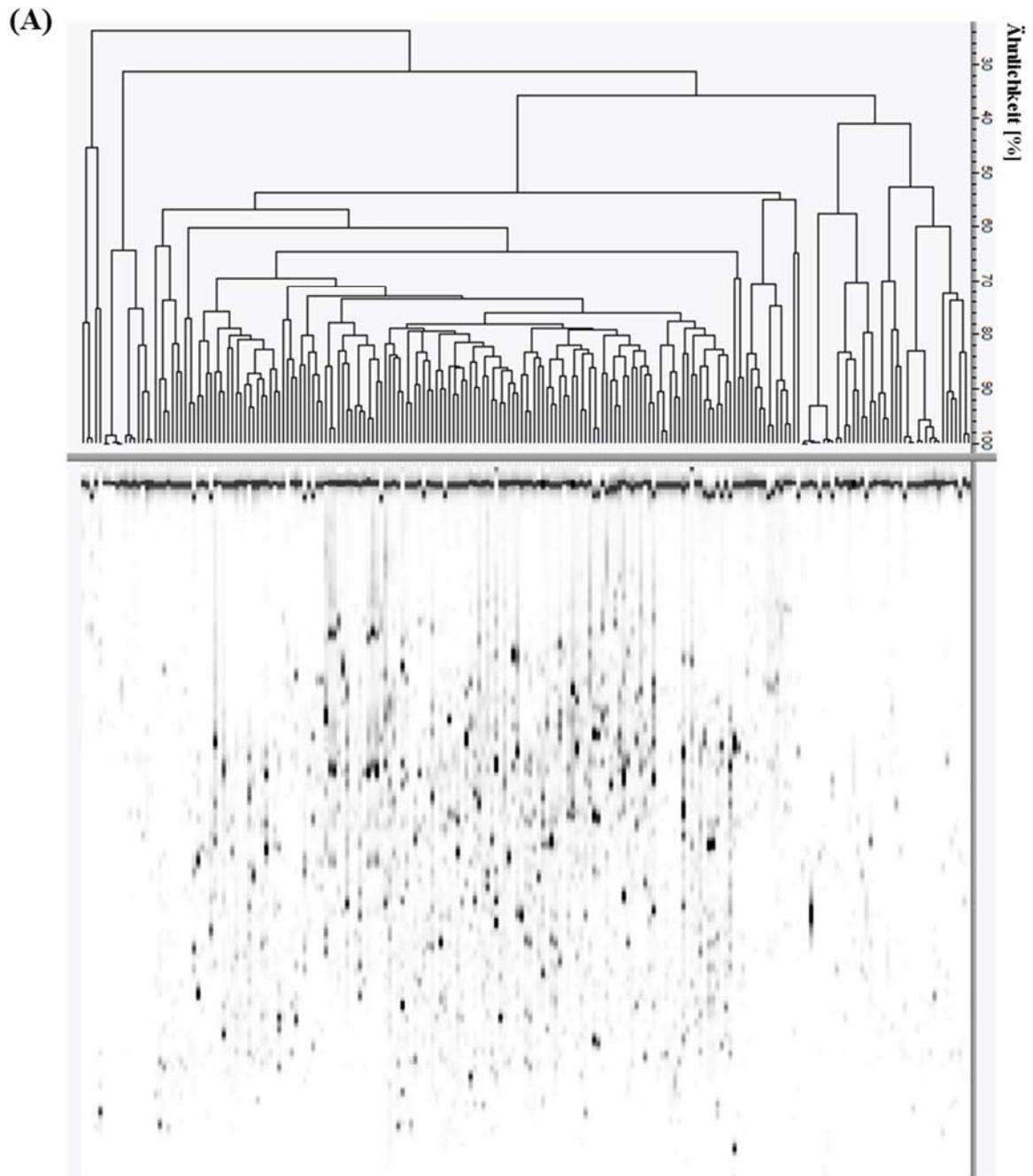
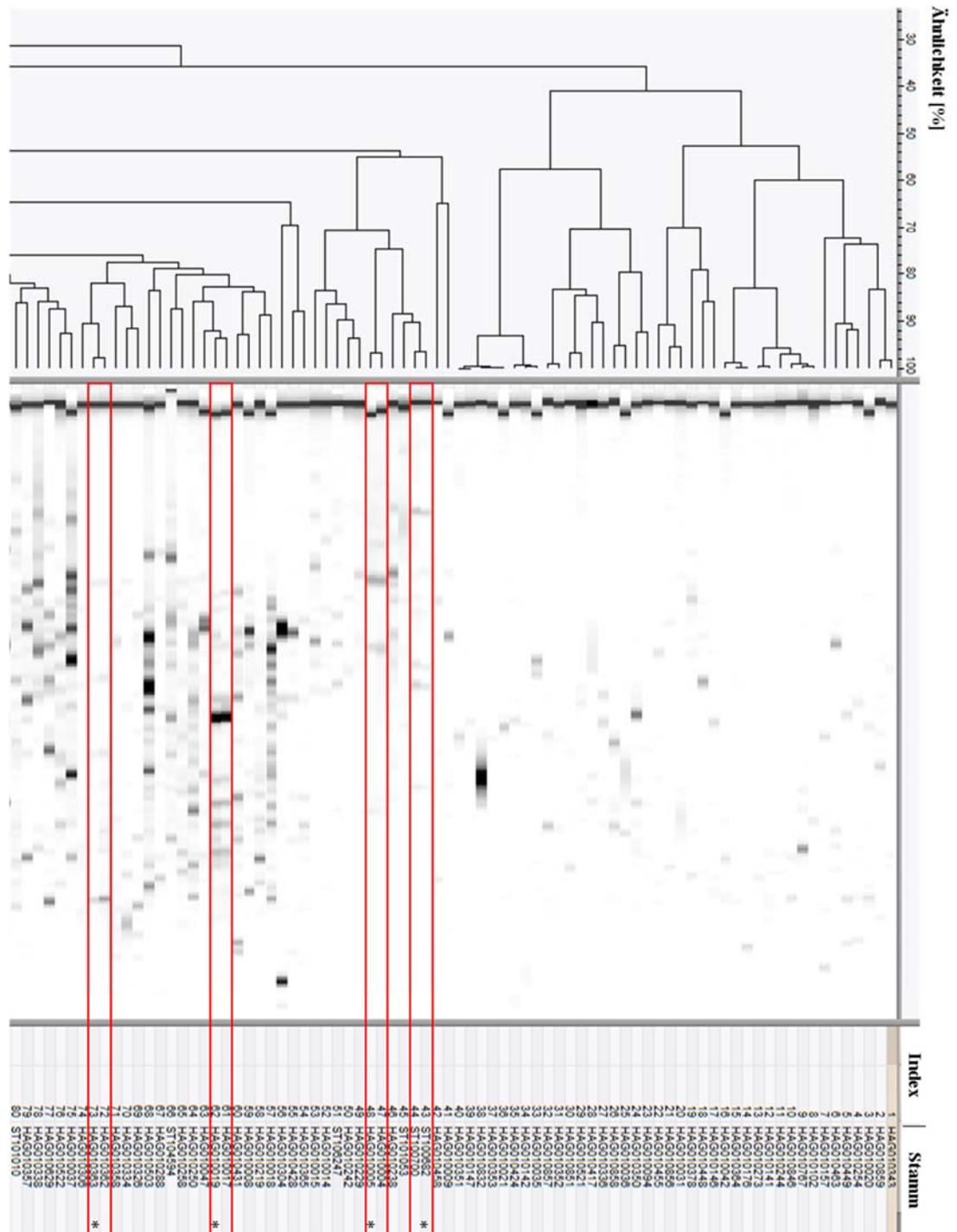
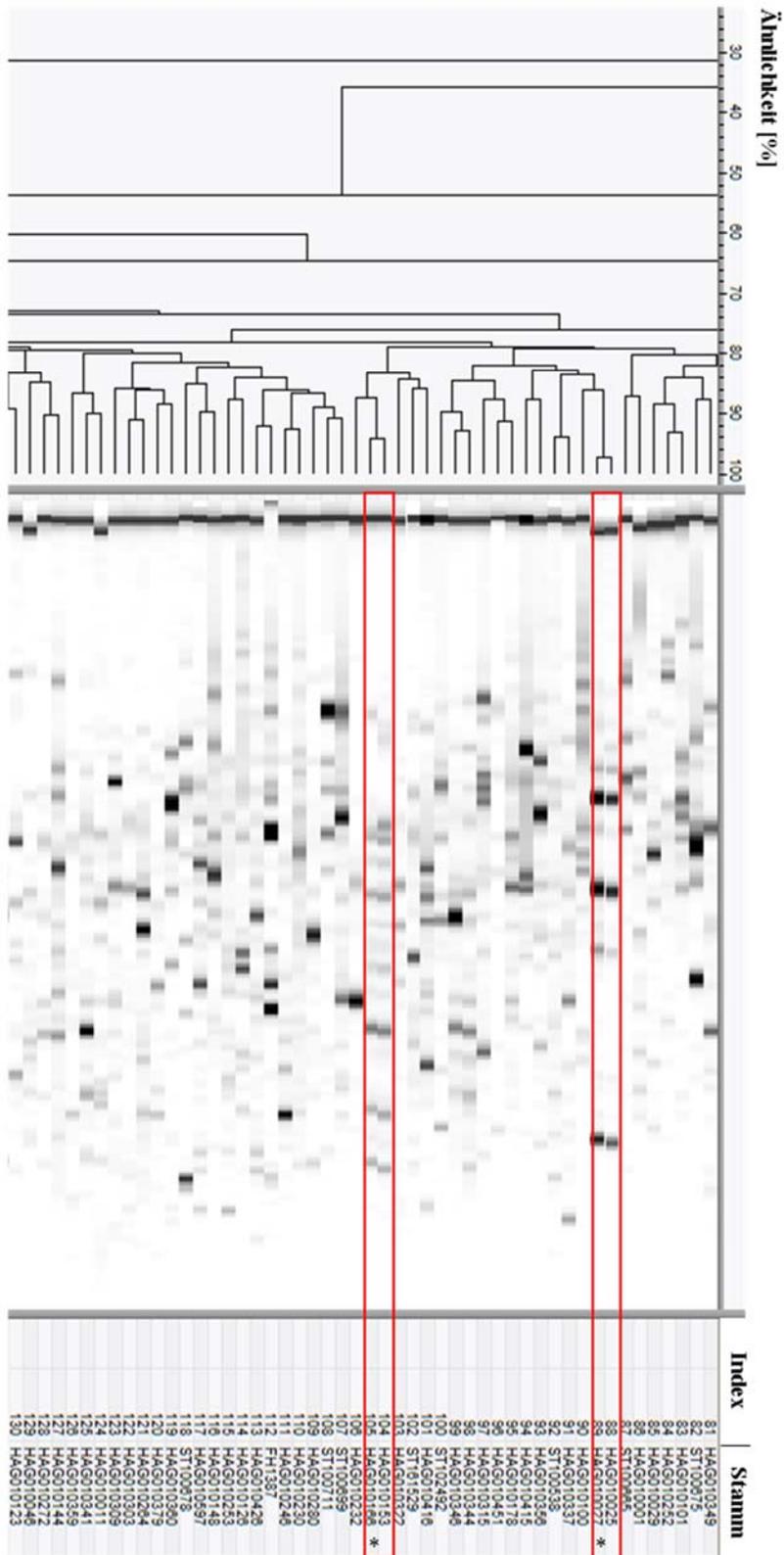


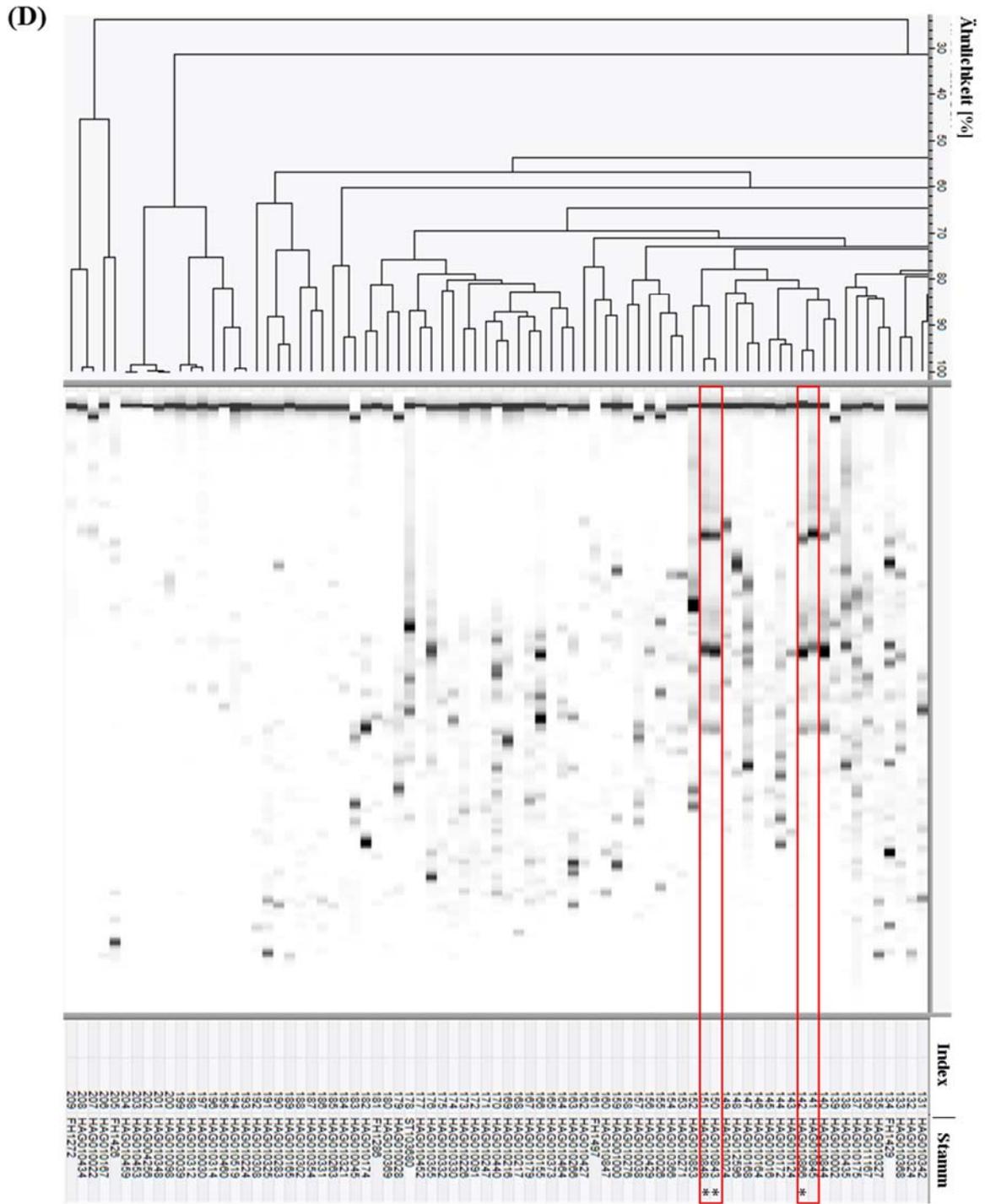
Abbildung 60: BOX-Fingerprints zur Stammauswahl. Für ein Kultivierungsprojekt sollten Actinobakterien aus der internen Stammsammlung eingesetzt werden. Um Kapazitäten einzusparen, wurde vor Beginn dieses Projektes überprüft, ob sich unter den 209 ausgewählten Bakterien Stammgruppen mit identischen oder sehr nah verwandten Stämmen befinden. Aus jeder dieser Stammgruppen sollte nur ein Stamm für das Kultivierungsprojekt eingesetzt werden. Um Stammgruppen mit nah verwandten/identischen Stämmen zu identifizieren, wurden BOX-Fingerprints durchgeführt. Mithilfe des Programms GelCompar II wurden die Fingerprints anhand ihrer Ähnlichkeit geclustert. Insgesamt wurden sieben Stammgruppen mit identischen/nah verwandten Stämmen identifiziert (rote Umrandung). Neun Stämme, die mit einem „*“ gekennzeichnet sind, wurden auf Basis ähnlicher Fingerprints aussortiert. Im Falle von 68 Stämmen hatten die Fingerprints eine sehr schwache Intensität oder bestanden aus einzelnen Banden. Jene Fingerprints wurden als nicht auswertbar gewertet. (A): Übersicht aller Fingerprints. (B)/(C)/(D): Ausschnitte von (A). Die Stammbezeichnungen sind angegeben.

(B)



(C)





8.9 Strukturen und vorhergesagte MS/MS-Fragmentierungsmuster

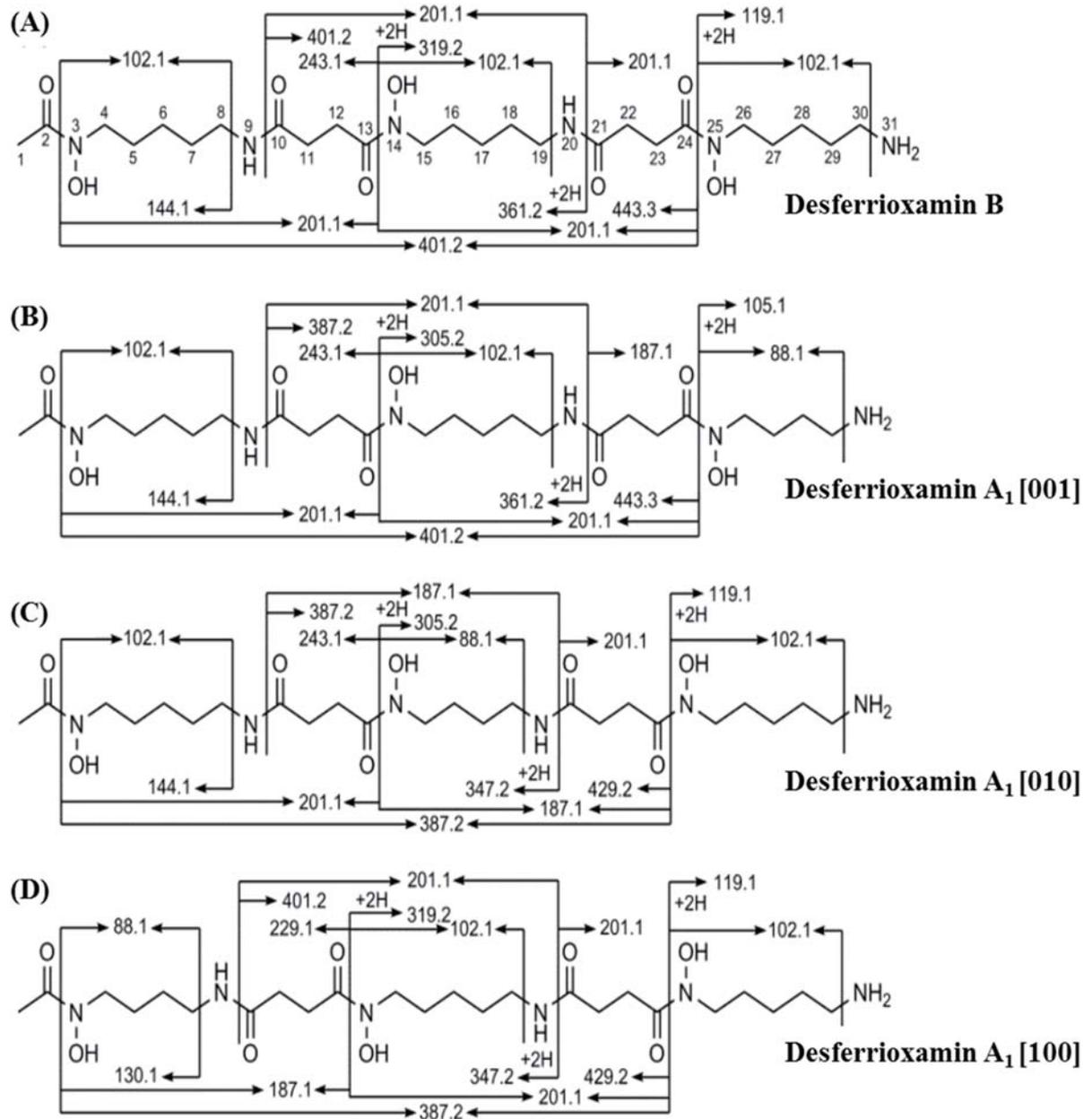


Abbildung 61: Strukturen und vorhergesagte MS/MS-Fragmente von Desferrioxamin B sowie der Desferrioxamin-A₁-Isomere Desferrioxamin A₁ [001], Desferrioxamin A₁ [010] und Desferrioxamin A₁ [100]. Dargestellt sind jene MS/MS-Fragmente, die auf Basis wahrscheinlicher Bindungsbrüche vorhergesagt wurden. (A): Desferrioxamin B, (B): Desferrioxamin A₁ [001], (C): Desferrioxamin A₁ [010], (D): Desferrioxamin A₁ [100]. Die Zeichnungen wurden aus Telfer *et al.* (2016) entnommen.

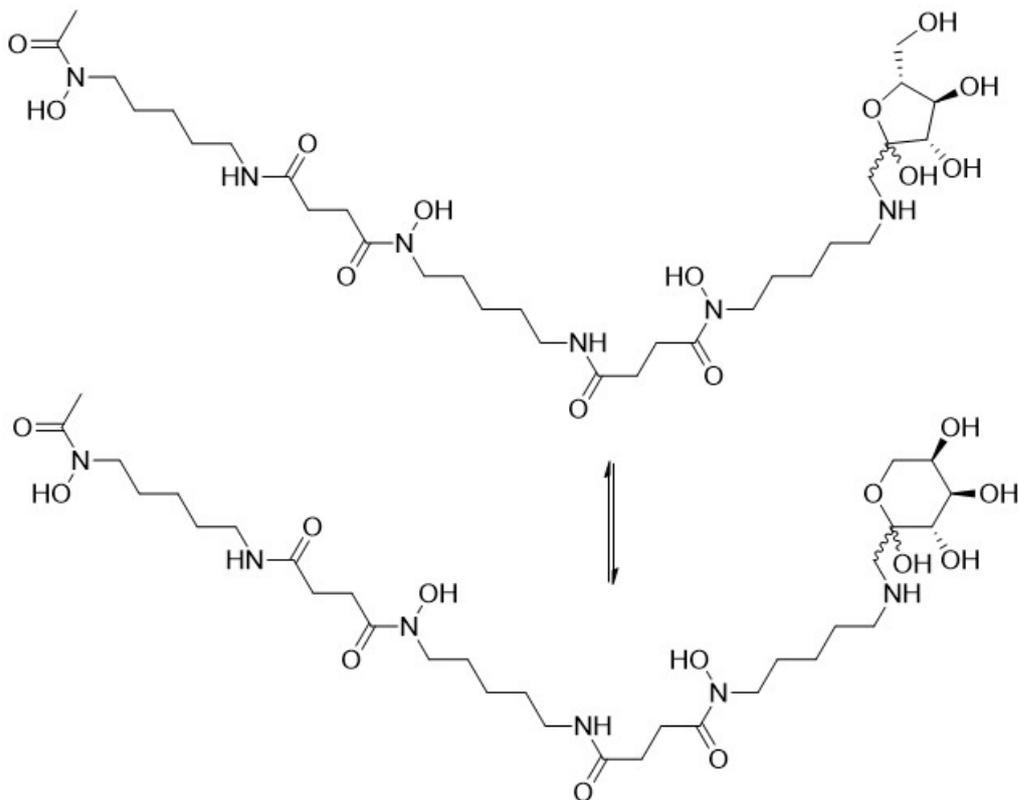


Abbildung 62: Struktur des von Sekurova *et al.* (2016) beschriebenen Fructosyl-Glykoderivats von Desferrioxamin B.

9 Projektbeiträge

An Projekt 3 dieser Arbeit („Detaillierte Betrachtung des Effekts von GlcNAc auf die Produktion einzelner Sekundärmetabolite in Actinobakterien“) waren neben mir diverse weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe beteiligt. Die Entscheidung, GlcNAc in Projekt 3 als Signalmolekül auszuwählen, basierte auf meinen Ergebnissen in Projekt 2 („Bestimmung von Signalmolekülen, deren Zugabe ins Wachstumsmedium die Bioaktivität von Actinobakterien steigert“). Weiterhin bestand mein Anteil an diesem Projekt in der Auswertung von UPLC-HR-MS/(MS)-Daten (anteilig) und der Darstellung und Interpretation der Ergebnisse.

Folgende weitere Personen waren an Projekt 3 beteiligt:

Dr. Armin Bauer, Dr. Damir Druzinec, Dr. Jens Glaeser, Prof. Dr. Peter Hammann, Dr. Benedikt Leis, Michael Marner, Dr. Rajendra Maskey, Dr. Sanja Mihajilovic, Dr. Maria Patras, Dr. Alberto Plaza, Dr. Marius Spohn, Dr. Luigi Toti, Dr. Jochen Wiesner und Dr. Florian Zubeil.

Laborarbeiten wurden durch Kirsten Bommersheim, Hamid Keyvani Hafshejani, Christoph Hartwig, Jennifer Kuhn, Marina Strack, Nora Zereini und Nadine Zucchetto durchgeführt.

UPLC-HR-MS/(MS)-Messungen, die für diese Doktorarbeit benötigt wurden, wurden von Christoph Hartwig durchgeführt.

10 Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. Jens Glaeser, Prof. Dr. Peter Hammann und Prof. Dr. Andreas Vilcinskas für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bzw. das Institut und die Möglichkeit, an einem sehr anwendungsorientierten und interessanten Forschungsthema zu arbeiten. Bei PD Dr. Jens Glaeser möchte ich mich außerdem für die Übernahme des Erstgutachtens, die fachliche Betreuung und die stete Hilfsbereitschaft bei auftretenden Fragen bedanken. Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Herrn Prof. Dr. Peter Hammann danke ich für die Bereitschaft, als Prüfer an der Verteidigung meiner Doktorarbeit teilzunehmen sowie die interessanten Einblicke in die industrielle Antibiotikaforschung. Herrn Prof. Dr. Schäberle danke ich für die Teilnahme an der Verteidigung meiner Doktorarbeit als Prüfer.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Marius S. richten, der einen Großteil dieser Arbeit korrekturgelesen hat und mir sehr wertvolle Verbesserungsvorschläge gemacht hat. Danke, dass du so viel Zeit und Mühe in das Korrekturlesen meiner Arbeit investiert hast!

Christoph H., Michael M. und Maria P. bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mir bei allen Fragen rund um die Analytik geholfen haben. Michael danke ich zusätzlich auch für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit.

Weiterhin ein großes Dankeschön an alle Kollegen, die am „GlcNAc-Prozess“ beteiligt waren! Jenny, dir möchte ich für die „Labor-Infos“ während der Schreibphase danken.

Sven Griep (AG Prof. Dr. Goesmann) danke ich für die Hilfe bei der bioinformatischen Auswertung von Sequenzierdaten. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern von PacBio bedanken, die mich bei der Etablierung der 16S-ITS-Sequenzierung unterstützt haben (Richard Hall, Cheryl Heiner, Steve Oh und Ralph Vogelsang). Mein Dank gilt weiterhin allen Kollegen aus den Bereichen IT, Verwaltung, Einkauf und Projektmanagement.

Was ich an der Arbeitsgruppe ganz besonders geschätzt habe, war die Hilfsbereitschaft unter den Kollegen. Jeder Kollege hat mir in irgendeiner Art und Weise während meiner Doktorarbeit geholfen. Sei es durch fachliche Diskussionen, die Zusammenarbeit im Labor, organisatorische Hilfe oder durch aufmunternde Worte, wenn es mal nicht so gut lief. Dafür danke ich jedem Einzelnen!

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an meine Eltern, Geschwister, Großeltern und Freunde richten. Danke, dass ihr immer für mich da seid! Gerrit, dir bin ich unheimlich dankbar für's Zuhören, Diskutieren und Aufmuntern und für deine Geduld!