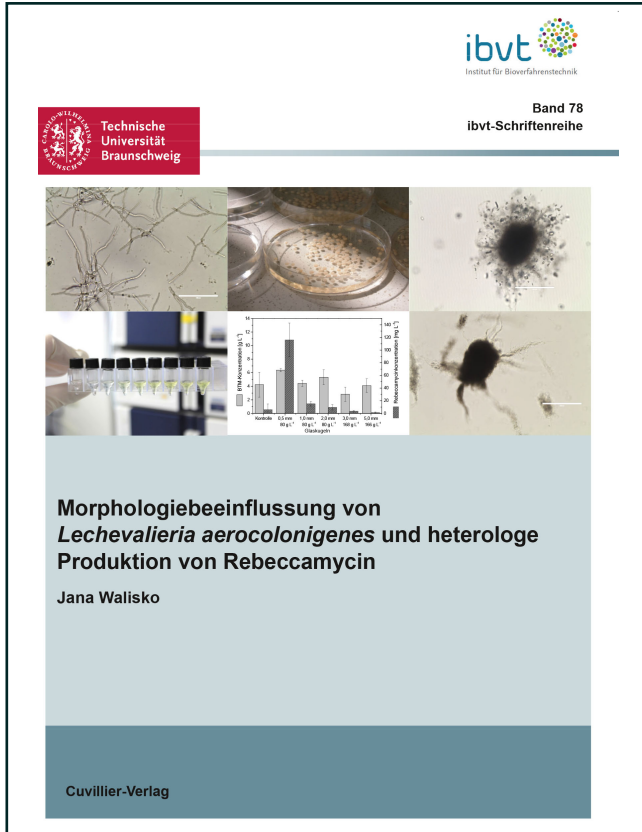




Jana Walisko (Autor)

Morphologiebeeinflussung von *Lechevalieria aerocolonigenes* und heterologe Produktion von Rebeccamycin



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7495>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1 Einleitung und Zielsetzung

Actinomyceten stellen eine bedeutende Gruppe der Antibiotikaproduzenten dar. Zwei Drittel aller mikrobiellen Antibiotika werden von Actinomyceten produziert [1]. Bei Actinomyceten handelt es sich um eine Gruppe von Bakterien, die pilzähnliche Eigenschaften zeigen. Sie sind in der Lage, Sporen zu bilden und prägen myzel- oder pelletartige Strukturen aus.

Rebecamycin und seine Analoga stellen eine interessante Gruppe von Zytostatika dar. Sie wirken als Topoisomerasehemmer und greifen somit in die DNA-Replikation der Zellen ein [2, 3]. Isoliert werden sie aus dem natürlichen Produzenten *Lechevalieria aerocolonigenes*, einem filamentösen Bakterium. Becatecarin, ein Analogon des Rebecamycins, wurde bereits in klinischen Studien der Phase I und II eingesetzt. Dabei wurde es gegen verschiedene Krebsarten von Dickdarm-, Lungen- und Brustkrebs getestet [4–6]. Schwandt et al. [6] setzten Becatecarin gegen Lungenkrebs in einer klinischen Studie Phase II ein. Dabei wurde eine Clinical Benefit Rate (CBR) von 40 % erreicht. Damit wurden zwar die vorher festgelegten Ziele erreicht, allerdings fand keine Fortsetzung der Studie statt, da die Arzneimittelbereitstellung unzufriedenstellend war. Es gibt nur wenig bzw. keine Studien, die sich mit der Optimierung der Rebecamycinproduktion und einer Ausbeutesteigerung bzw. dem Zusammenhang zwischen Produktivität und Morphologie beschäftigen [2].

Gleichzeitig gewinnt die biologische Rebecamycinproduktion aufgrund seiner komplexen Molekülstruktur im Vergleich zur chemischen Synthese immer mehr an Bedeutung, da sie vermeintlich die kostengünstigere Alternative darstellt [7]. Filamentöse Organismen stellen eine besondere Herausforderung an die Kultivierungstechnik dar. Ihre submerse Kultivierung hängt von der Vielzahl an komplexen Wechselwirkungen zwischen u.a. der Zusammensetzung des Kultivierungsmediums, des pH-Werts, der Osmolalität sowie der Methode der Inokulation (u.a. mit Sporen oder bereits ausgewachsenen dispersen Myzelagglomeraten), den Betriebsbedingungen im Bioreaktor (u.a. fluiddynamische Beanspruchung bzw. Energiedissipationsrate, Sauerstofftransfer) sowie der Gegenwart an (Mikro-)Partikeln mit spezifischen Oberflächeneigenschaften ab, die die wichtigsten Prozessparameter zur Morphologiebeeinflussung darstellen. Durch myzelartiges Wachstum und der damit verbundenen erhöhten apparenten Viskosität ist eine Optimierung des mechanischen Energieeintrags und Gelöstsauerstoffkonzentration erforderlich [8, 9]. Das pelletartige Wachstum zieht in den meisten Fällen eine Nährstoff- und Sauerstofflimitierung im Inneren des Pellets nach sich, sodass zur optimalen Nährstoffversorgung der richtige Pelletdurchmesser eingestellt werden muss



[8, 9]. Bei pelletartigem Wachstum ist eine Nährstoff- und Sauerstofflimitierung im Inneren des Pellets die Folge [10]. Ziel einer optimalen Produktionsstrategie sollte es daher sein, ein Prozessfenster für die Kultivierung zu wählen, mit dem man möglichst geringe Leistungseinträge und Viskositäten einstellt bei Sicherstellung einer homogenen nicht-limitierten Substratverteilung innerhalb des biologischen Systems. Weiterhin wird je nach Organismus eine andere Morphologie zur optimalen Produktivität bevorzugt [11–13]. Vor- und Nachteile der jeweiligen Morphologien, der Prozessbedingungen sowie Produktivitäten müssen also sorgfältig gegeneinander abgewogen werden.

Eine ganze Reihe von Methoden wurde in den letzten Jahren entwickelt, um die Morphologie zielgerichtet einzustellen und kontrollieren zu können. So können z. B. Inokulumgröße, Typ und Alter des Inokulums, genetische Faktoren, Medienzusammensetzung, Biosynthese oder Zugabe von Polymeren, Tenside und Chelatbildner, Scherkräfte, Temperatur, Druck, pH-Wert, Viskosität, Sauerstoffkonzentration und Reaktorgeometrie als Stellgrößen genutzt werden, um die Morphologie in eine für die Produktbildung optimale Ausprägung zu dirigieren [13–15]. Eine simple Methode zur Beeinflussung der Morphologie ist die Zugabe von Mikropartikeln. Hierbei müssen keine weiteren Parameter geändert werden. Für *Aspergillus niger* und andere Pilze konnten die Produkttiter um ein Vielfaches durch den Einsatz von Mikropartikeln erhöht werden [16, 17]. Für Prokaryoten wurde ebenfalls schon in Ansätzen ein Einfluss nachgewiesen [16]. Das Prinzip der Morphologiebeeinflussung zur Erhöhung der Produktivität mit Hilfe von Mikropartikeln soll in dieser Arbeit auf das Bakterium *Lechevalieria aerocolonigenes* übertragen werden und der quantitative Zusammenhang zwischen euklidischer Morphologieparameter und Produktivität untersucht werden.

In den letzten Jahrzehnten konnten enorme Fortschritte im Bereich des Metabolic engineering erzielt werden, sodass auch Produktionen in heterologen Systemen ermöglicht wurden [18]. Um die Problematik der Morphologie oder die ineffiziente Produktion von natürlichen Produzenten zu umgehen, können die Gene zur Biosynthese von Wirkstoffen in andere Organismen übertragen werden. Die heterologe Expression ermöglicht die Biosynthese in Organismen, deren Stoffwechselforgänge und Wachstumsbedingungen gut erforscht sind. *Escherichia coli* ist ein Organismus, der seit langem in der Biotechnologie verwendet wird und sehr gut charakterisiert ist [19]. Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, die Produktion von Rebeccamycin auch mittels heterologer Expression in *E. coli* zu optimieren.

Die Aufarbeitung stellt neben der Kultivierung einen wichtigen Produktionsschritt dar. Bis zu 80 % der Produktionskosten können durch die Aufarbeitung verursacht werden [20, 21]. Hydrophobe Produkte, zu denen auch Rebeccamycin gehört, werden größten-



teils über Chromatografie oder Extraktion isoliert. Neben der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln können durch Zugabe von Polymeren wässrige Extraktionen durchgeführt werden. Organische Lösungsmittel sind oft toxisch und besonders bei der Bioproduktaufarbeitung sollte das Extraktionsmittel das Produkt nicht schädigen [22]. Wässrige Systeme bilden hier eine gute Alternative. Durch kontinuierliche Extraktion kann darüber hinaus eine negative Feedbackregulation verhindert werden [23]. Dies sollte an verschiedenen hydrophoben Produkten u. a. Rebeccamycin getestet werden. Die Herausforderungen dieser Arbeit lassen sich in folgende Ziele unterteilen:

- Verfahrenstechnische Optimierung der Kultivierung des filamentösen wachsenden Actinomyceten *Lechevaleria aerocolonigenes* sowie die Morphologiebeeinflussung und -charakterisierung durch die Zugabe von (Mikro-)Partikeln,
- Heterologe Expression von Rebeccamycin in *E. coli* und
- Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode zur wässrigen Extraktion von hydrophoben Produkten (u.a. Rebeccamycin).



2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Lechevaleria aerocolonigenes*

Der Stamm *Lechevaleria aerocolonigenes* DSMZ 44217 gehört zur Klasse der Actinobakterien und wurde in Panama aus der Erde isoliert. Es handelt sich um ein Gram-positives Bakterium mit hohem Guanin (G)-Cytosin (C)-Gehalt und ähnelt morphologisch den Pilzen. *L. aerocolonigenes* ist in der Lage, sowohl als myzel- als auch in pelletartiger Form zu wachsen und bildet darüber hinaus Sporen. Als Produkte wurden Rebeccamycin, Bromorebeccamycin, 4'-deschlororebeccamycin, 1,11-Dideschlororebeccamycin, BMY-41219 und Fluoroindolocarbazole (A, B, C) gefunden [2, 24–28]. Ursprünglich wurde diese Spezies der Gattung *Streptomyces sp.* zugeordnet [29]. Im Laufe der Zeit wurde das Bakterium jedoch von *Streptomyces* (1959), über *Nocardia* (1970) [30], *Saccharothrix* (1986) [31] und schließlich zu *Lechevaleria sp.* (2001) [32] neu kategorisiert.

2.2 Rebeccamycin

Als Hauptprodukt von *Lechevaleria aerocolonigenes* wurde das Antibiotikum Rebeccamycin (1,11-Dichlor-12-(4-O-methyl- β -D-glucopyranosyl)-12,13-dihydro-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-5,7(6H)-dion) gefunden. Benannt wurde dieses nach der Tochter des Entdeckers [3]. Es handelt sich hierbei um ein Carbazolgerüst mit zwei Chlor- und einem über eine N-glykosidische Bindung verknüpften Methylglucosesubstituenten. Rebeccamycin ist eine gelbliche Substanz, die löslich in organischen Lösungsmitteln und unlöslich in Wasser ist. Es wirkt als Tumorantibiotikum, unterdrückt das Wachstum einiger Tumorzelllinien und zeigt antibakterielle Wirkung gegen einige Gram-positive Bakterien [2].

Bei dem Rebeccamycinanalagon Becatecarin (1,11-Dichloro-6[2-(diethylamino)ethyl]-12,13-dihydro-12-(4-O-methyl-beta-D-glucopyranosyly)-5H-indolo-[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]-carbazole-5,7(6H)-dion) bzw. NSC-655649 (oder BMY-27557-14, BMS-181176, XL119) wurde eine Aminoalkylgruppe chemisch an das Rebeccamycin angefügt [49], sodass dieses Derivat eine verbesserte Wasserlöslichkeit, Pharmakokinetik und darüber hinaus ähnliche Antikrebseigenschaften aufzeigt [28]. Die Strukturen beider Verbindungen sind in **Abbildung 2.1** dargestellt.

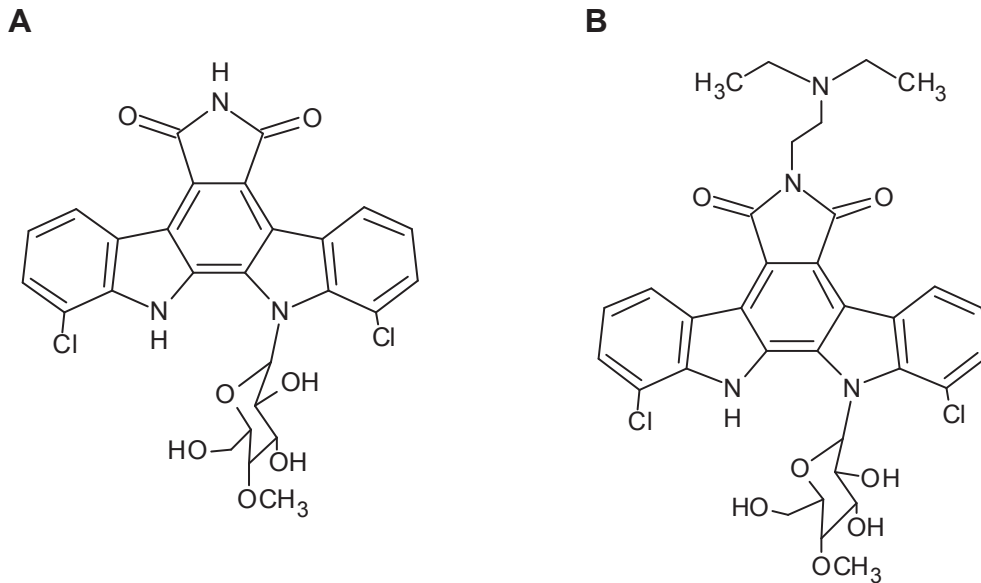


Abbildung 2.1: Struktur von (A) Rebeccamycin und (B) Becatecarin.

2.2.1 Biosynthese von Rebeccamycin

An der Biosynthese von Rebeccamycin sind 11 Gene beteiligt [33]. Das erste identifizierte Gen im Rebeccamycincluster war *rebG* (*ngt*). Es fungiert als N-Glykosyltransferase und überträgt den Zuckerrest [34]. Sánchez et al. [33] identifizierten 2002 das vollständige Cluster. Sie fanden 11 Gene, die im Zusammenhang mit der Biosynthese von Rebeccamycin stehen. **Abbildung 2.2** stellt dieses Cluster von ca. 20 kbp (Basenpaare) grafisch da.

Auf Grund der unterschiedlichen Codierungsrichtungen der Gene und dem Abstand der Gene zueinander lassen sich vier Transkriptionseinheiten unterscheiden: *rebG*, *rebODCPM*, *rebRFUH* und *rebT*.

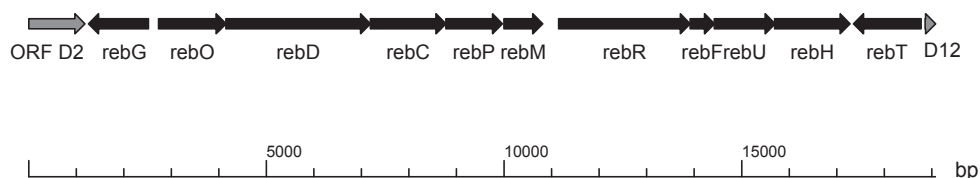


Abbildung 2.2: Rebeccamycincluster.

Abbildung 2.3 stellt die Biosynthese von Rebeccamycin schematisch dar. Sanchez et al. [33] unterscheiden fünf katalytische Stufen in der Rebeccamycinsynthese:



- (I) Tryptophanhalogenierung durch RebH. RebF und RebH bilden hierbei ein Zwei-komponenten-Halogenasesystem. RebH ist $FADH_2$ -abhängig. Die Reduktion des $FADH_2$ erfolgt durch die NAD(P)H-abhängige Flavinreduktase RebF,
- (II) Dimerisierung durch RebO und RebD. RebO, eine FAD-abhängige L-Tryptophanoxidase wandelt 7-Chloro-L-Tryptophan zu 7-Chloro-dehydrotryptophan mit Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt um. Zwei Moleküle von 7-Chloro-dehydrotryptophan werden von RebD zu 11,11'-Dichlorochromopyrrolsäure umgewandelt,
- (III) Ringschluss durch Decarboxylierung mittels RebC (Cytochrom-P450-enzym) und RebP (Monooxygenase),
- (IV) Glycolysierung des Rebeccamycinaglycons durch RebG sowie
- (V) Methylierung der Glucose an der 4-Hydroxyposition durch RebM [35, 36]. Der Zuckerrest wird aus D-Glucose und Methionin gebildet [35, 37].

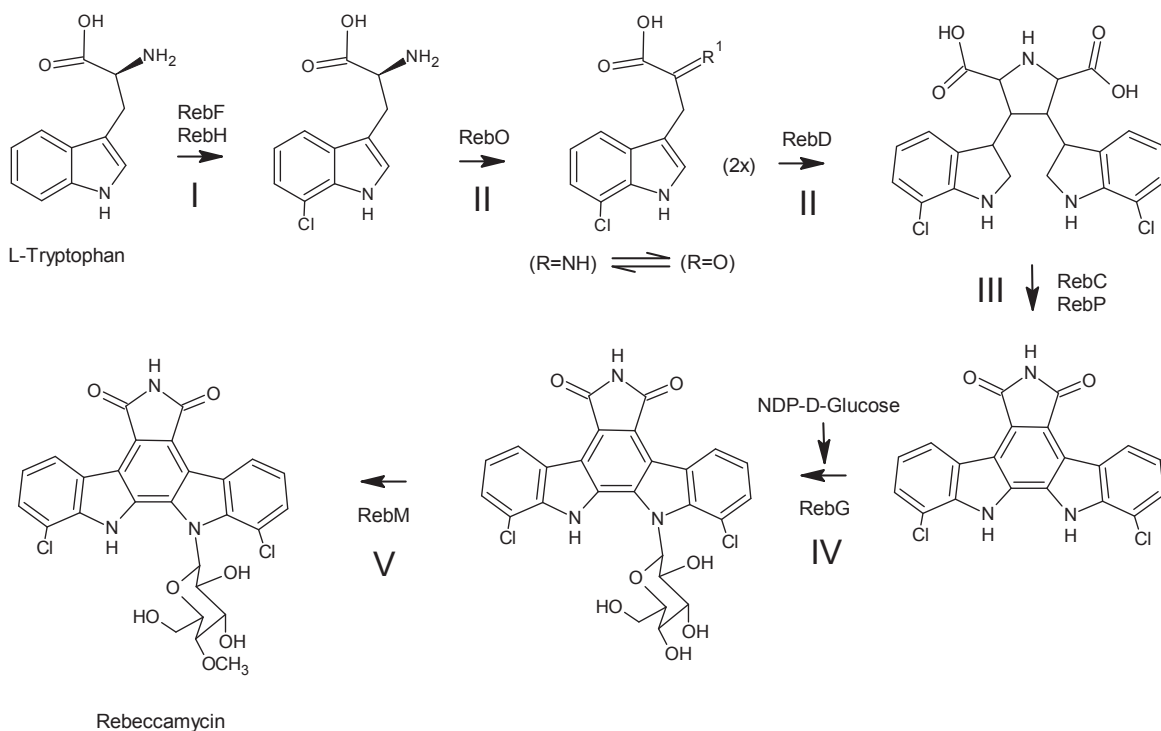


Abbildung 2.3: Biosynthese von Rebeccamycin (modifiziert nach [36]). I Tryptophanhalogenierung. II Dimerisierung. III Ringschluss. IV Glycolysierung. V Methylierung.

Die Namen der beteiligten Gene und ihre enzymatische Funktion sind in **Tabelle 2.1** zusammengefasst.


Tabelle 2.1: Namen und enzymatische Funktionen der Rebeccamycingene.

Gen	Enzym	Funktion
<i>rebG</i>	N-glycosyltransferase	Anhängen des Zuckerrestes
<i>rebO</i>	L-Tryptophan-oxidase	Umwandlung 7-chloror-L-Tryptophan zu 7-chloror-dehydrotryptophan
<i>rebD</i>	Oxidase	Katalase und Dichlororchromopyrrolatsynthase
<i>rebC</i>	FAD-monoxygenase	Beteiligt an Indolopyrrolcarbozol-Ringschluss
<i>rebP</i>	Cytochrom P-450 Enzym	Oxidation
<i>rebM</i>	Demethylrebeccamycin-D-glucose O-methyltransferase	Methylierung des Zuckerrestes
<i>rebR</i>	Transkriptionsregulator	Regulation
<i>rebF</i>	Flavinreduktase	Reduktion von FAD
<i>rebU</i>	Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	Transport
<i>rebH</i>	Halogenase	Chlorierung von Tryptophan
<i>rebT</i>	Mutmaßlich Transmembrantransporter	Transport

Durch Klonierung einzelner Genen in *Escherichia coli* und *Streptomyces albus* bzw. gezielte Inaktivierung einzelner Gene in *Lechevalieria aerocolonigenes* konnten die Funktionen der einzelnen Enzyme genauer untersucht und Intermediate identifiziert werden [33, 38–42]. Bei RebU und RebT handelt es sich vermutlich um integrale Membrantransporter, die für den Schutz der Zelle bzw. die Sekretion von Rebeccamycin zuständig sind [33, 43]. Mutanten ohne *rebT* produzierten unverändert Rebeccamycin. Somit ist dieses Gen wahrscheinlich nicht an der Biosynthese beteiligt [43]. RebR stellt vermutlich einen transkriptionalen Aktivator da [33, 43].

Es finden sich deutliche Parallelen zwischen der Synthese von Rebeccamycin und Staurosporin, das ebenfalls zur Gruppe der Alkaloide zählt und von *Streptomyces staurosporeus* gebildet wird. RebO, RebD, RebP entsprechen StaO, StaD, StaP in der Staurosporinsynthese. Ähnlichkeiten finden sich auch zwischen *rebD* und *vioB*, das an der Synthese von Violacein in *Chromobacterium violaceum* beteiligt ist [35, 36, 43].

2.2.2 Chemische Synthese

Rebeccamycin kann mittels chemischer Synthese erzeugt werden. Kaneko und Hong (1985) [44] veröffentlichten hierzu die ersten Ergebnisse. Sie konnten Rebeccamycin innerhalb von sechs Synthesestufen darstellen und entwickelten zwei unterschiedliche Synthesewege [44]. Gallant et al. [45] publizierten 1993 ebenfalls eine Vollsynthese von Rebeccamycin in 13 Synthesestufen. Die vierte Methode wurde von Faul et al. 1999 [46] beschrieben, die den Vorteil bietet, verschiedene Analoga ausgehend von



dem Zwischenprodukt Bisindolylmaleimide zu synthetisieren. Rebeccamycin konnte mit dieser Syntheseroute in 12 Stufen und einer Gesamtausbeute von 12 % synthetisiert werden.

2.2.3 Produktion von Rebeccamycin

Bush et al. [2] testeten 1987 verschiedene Medienzusammensetzungen, um eine hohe Produktausbeute zu erreichen. Im 30 L-Bioreaktor (batch) wurde eine Rebeccamycin-konzentration von 663 mg L^{-1} nach 8,5 d mit dem Kultivierungsmedium G134 erreicht. Bei dem Medium G134 handelt es sich um ein komplexes Medium bestehend aus Glucose (10 g L^{-1}), Maisstärke (75 g L^{-1}), Leinsamenmehl (15 g L^{-1}), Hefeextrakt (5 g L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (1 g L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g L^{-1}), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 g L^{-1}) und CaCO_3 (10 g L^{-1}).

Um die verantwortlichen Gene für die Rebeccamycinbiosynthese zu untersuchen, erstellten Sánchez et al. [33] eine Cosmidbibliothek aus der genomischen DNA von *L. aerocolonigenes* und transformierten ein Cosmid mit dem gesamten Rebeccamycincluster in *Streptomyces albus*. Dieser war in der Lage, Rebeccamycin erfolgreich und sogar in größeren Mengen als der ursprüngliche Organismus, zu produzieren. Hyun et al. [42] erstellten ebenfalls eine Cosmidbibliothek aus genomischer *L. aerocolonigenes*-DNA und transduzierten die Cosmide in *E. coli*. Nach Screening von 400 entstandenen Klonen wurde ein Stamm mit vollständigem Rebeccamycincluster identifiziert. In diesem konnte eine heterologe Expression von Rebeccamycin in nur sehr geringen Mengen zwischen $0,3$ und $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ nachgewiesen werden.

2.2.4 Medizinischer Einsatz

Rebeccamycin wirkt als Topoisomerase I-Hemmer, interkaliert in Abwesenheit von Topoisomerasen in die DNA und bewirkt DNA-Strangbrüche [2]. Topoisomerasen spielen eine wichtige Rolle im DNA-Metabolismus. Topoisomerase I führt zu vorübergehenden Einzelstrangbrüchen, während Topoisomerase II zu vorübergehenden Doppelstrangbrüchen in Eukaryoten führt und u.a. an der Replikation und Transkription beteiligt ist [47]. Aus diesem Grund sind Topoisomerasehemmer interessante Ansatzpunkte für Krebsantibiotika und Zytostatika [48]. Durch die geringe Wasserlöslichkeit ist Rebeccamycin nur bedingt als Antibiotikum einsetzbar. Aus diesem Grund wurden eine Reihe von Derivaten aus Rebeccamycin entwickelt [28]. Über 150 Derivate wurden erzeugt u.a. mit Veränderungen am Imid, Indol und Zuckerrest [49], so z. B. auch Becatecarin, das verbesserte Wasserlöslichkeit, Pharmakokinetik und Antikrebs-eigenschaften zeigt [28]. Aufgrund seiner chemisch angefügten Aminoalkylgruppe wurde auch die Funktionalität des Rebeccamycinanaloges geändert; so wirkt es nunmehr als Topoisomerase II-Hemmer [3, 50].



Becatecarin wurde in zahlreichen klinischen Studien Phase I und II getestet. Gegen verschiedenste Krebsarten wie Dickdarm-, Lungen- und Brustkrebs [4–6, 51–57]. Je nach Studie wurden unterschiedliche Mengen Becatecarin eingesetzt. Lengevin et al. [55] setzten bei krebserkrankten Kindern $650 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ alle 3 Wochen über 16 Zyklen ein. Schwandt et al. [6] behandelten Patienten mit Lungenkrebs mit $140 \text{ mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ fünf Tage hintereinander mit einer Wiederholung alle 3 Wochen und insgesamt 6 Zyklen. Dabei wurde eine Clinical Benefit Rate (CBR) von 40 % erreicht, welche den vorher festgesetzten Zielen entsprach. Eine Fortsetzung der Studie fand allerdings nicht statt, da die Arzneimittelbereitstellung unzufriedenstellend war.

2.3 Morphologie von Prokaryoten

Filamentöse Mikroorganismen stellen eine besondere Herausforderung in der Kultivierung und Produktion dar. Neben Pilzen gibt es verschiedene Bakterien, die filamentös wachsen und Sporen bilden können. Besonders die Klasse der Actinobakterien, zu denen u.a. *Streptomyces sp.*, *Actinomycetes sp.* und *Lechevalieria sp.* zählen, sind hier hervorzuheben. Trotz der höheren Ansprüche sind die Actinomyceten von außerordentlichem industriellem Interesse, denn diese produzieren zwei Drittel der bekannten mikrobiellen Antibiotika [1]. Des Weiteren sind sie Lieferanten für Immunsuppressiva, Krebstherapeutika und andere biologisch aktive Substanzen [58].

Für viele Organismen wurde ein klarer Zusammenhang zwischen Morphologie und Produktivität festgestellt [11–13]. Eine myzelartige Struktur ist zum Beispiel für die Produktion von Geldamycin in *S. hygroscopicus* und Tylosin in *S. fradiae* förderlich [59, 60]. *S. tendae* und *S. avermitilis* produzieren hingegen mehr Nikkomycin bzw. Avermectin in Pelletform [14, 61]. Dazwischen gibt es noch eine Gruppe, die keine Morphologieform bevorzugt und in verschiedenen Ausprägungen die gleichen Produktivitäten zeigen, wie z. B. *S. clavuligerus* und *S. virginiae* mit Clavulanic bzw. Virginiamycin [62, 63].

Streptomyceten, die größte Gruppe der Antibiotikaproduzenten, beginnen mit der Produktion von Antibiotika im Allgemeinen wachstumsphasenabhängig mit Eintritt in die stationäre Phase [1].

2.3.1 Entstehung von Morphologie

Der Lebenszyklus von Actinomyceten beginnt mit der Auskeimung von Sporen und wird gefolgt von der Bildung von zunächst vegetativem Myzel und anschließend dem reproduzierenden Myzel. Bei Streptomyceten ist der Lebenszyklus sehr gut erforscht. Die Keimung kann hier in drei Phasen eingeteilt werden: Verdunkelung, Quellung und Bildung des Keimschlauches. Die Verdunkelung der Sporen ist abhängig von der Ge-



genwart exogener, divalenter Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Fe^{2+}) sowie von endogenen Stoffwechselprozessen, die Energie zur Verfügung stellen. Für das Anschwellen der Sporen, d.h. der Rehydratation des Zytoplasmas [64], werden exogene Kohlenstoffquellen benötigt. Die Bildung des Keimschlauches ist abhängig von verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen [65]. Kurz nach Eintritt in die Auskeimungsphase beginnt die Synthese von Makromolekülen. Diese beginnt mit der Entstehung von RNA, gefolgt von Protein- und DNA-Synthese. Die DNA-Synthese markiert den Beginn der Bildung des Keimschlauches [64]. In **Abbildung 2.4** ist die Auskeimung der Sporen von *L. aerocolonigenes* exemplarisch dargestellt.

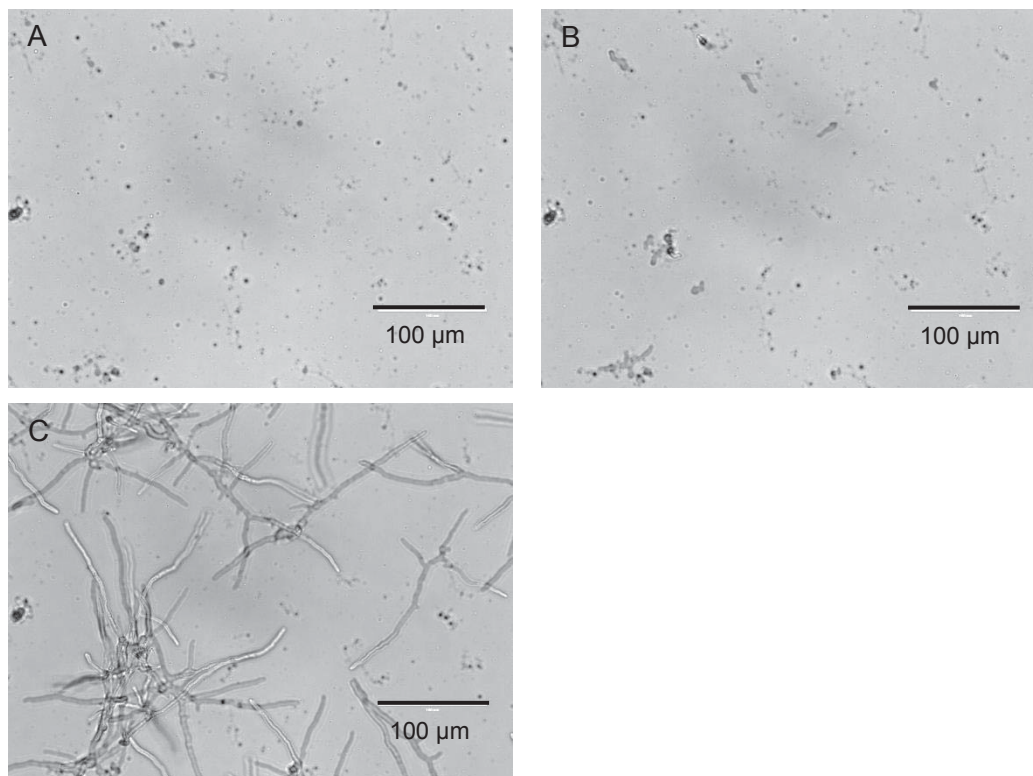


Abbildung 2.4: Auskeimung der Sporen von *L. aerocolonigenes* in GYM-Medium: (A) Sporen nach 10 h, (B) Bildung des Keimschlauches nach 15 h sowie (C) Wachstum und Verzweigung nach 25 h.

Auf Agarplatten und festen Oberflächen werden zwei Typen von Myzel unterschieden: vegetatives (*substrate*) Myzel und reproduzierendes (*aerial*) Myzel [66]. Nach der Auskeimung beginnt das Wachstum der Hyphen und die Hyphenverzweigung. Neue Zellwände werden ausschließlich an der Hyphenspitze gebildet [67]. Genauere Analysen des Wachstums von *Streptomyces spp.* führten zur Unterscheidung weiterer Schritte in der Myzelreifeung. Kompartimentiertes neugebildetes Myzel mit sehr dünnen, gewölbten Septen unterläuft eine Phase des programmierten Zelltods. Das überlebende Myzel differenziert anschließend zu einem multinuklearen, sekundären Myzel aus, das durch vereinzelte und einschichtige Septen unterteilt wird [68–70]. Einige dieser Hyphen wachsen in die Luft, sind von einer hydrophoben Schicht umgeben und entwickeln sich