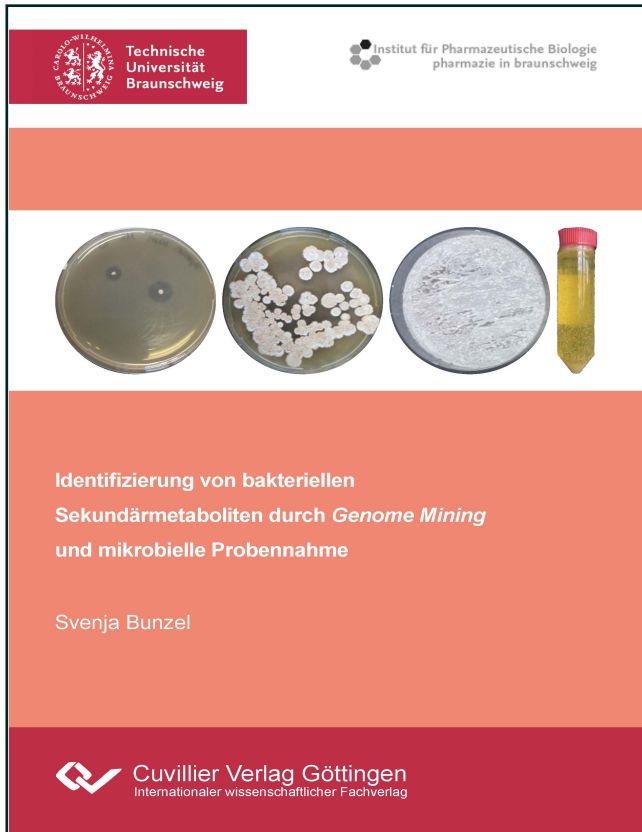




Svenja Bunzel (Autor)
**Identifizierung von bakteriellen
Sekundärmetaboliten durch Genome Mining und
mikrobielle Probennahme**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8733>

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

1.1 Bodenbakterien als Lieferanten für neue Wirkstoffe

1.1.1 Bedarf an neuen Antibiotika

Resistenzen gegen Antibiotika sind allgegenwärtig. Laut dem Bericht des CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) aus dem Jahr 2019 erkrankten jedes Jahr 2,8 Millionen Menschen allein in den USA an antibiotikaresistenten Keimen (CDC 2019). Die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) nennt die Resistenzen gegen Antibiotika schon 2014 eine der größten Gefährdungen für die weltweite Gesundheit (WHO 2014). Ursache für die Entstehung und Ausbreitung von Resistenzen ist u. a. die große Anpassungsfähigkeit von Bakterien und der Selektionsdruck durch die breite Anwendung von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin (Martens und Demain 2017).

Die bakterielle Resistenz wird in zwei Formen unterteilt: die natürliche (auch primäre oder intrinsische) Resistenz und die weitaus gefährlichere sekundäre (erworbene) Resistenz (Bonev und Brown 2019). Der Erwerb der Resistenz kann durch zwei Mechanismen erfolgen: Mutation oder horizontaler Gentransfer. Mutationen erfolgen nach dem Zufallsprinzip. Nur unter dem Selektionsdruck durch das Antibiotikum wird eine Mutation, die eine Resistenz auslöst, erhalten und verschafft dem Bakterienstamm einen Selektionsvorteil.

Der horizontale Gentransfer führt zur Übertragung einer bakteriellen Resistenz auf andere Bakterien. Dabei unterscheidet man drei Mechanismen: Konjugation, Transduktion und Transformation. Bei der Konjugation werden Plasmide, die Gene für eine Antibiotikaresistenz enthalten können, mittels cytoplasmatischer Verbindung auf andere Bakterien übertragen. Bei der Transduktion wird ein Resistenzgen mittels Bakteriophagen übertragen. Bei der Transformation nehmen Bakterien DNA aus der Umgebung, z. B. von zuvor lysierten Bakterienzellen, auf (Tenover 2006).

Das zunehmende Auftreten resistenter Bakterienstämme erschwert die Therapie von bakteriellen Infektionen. Durch das Versagen gängiger Antibiotika kann sich aus einer banalen Infektion eine nicht mehr kontrollierbare systemische Infektion entwickeln, die tödlich endet. Es besteht daher ein großer Bedarf an neuen Wirkstoffen zur Behandlung von bakteriellen Infektionen.

1.1.2 Mikroorganismen aus dem Boden als Quelle neuer Naturstoffe

Das Erdreich enthält die meisten mikrobiellen Organismen der Welt (Torsvik et al. 1990). Ein Teil des Erdreichs ist die Rhizosphäre. Diese ist definiert als die Region, die direkt durch die Wurzel beeinflusst wird (Hiltner 1904). Sie zeichnet sich durch eine hohe Dichte der mikrobiellen Besiedlung aus. Ein Grund dafür ist die Sekretion von organischen Stoffen durch die Wurzeln der Pflanzen, sie bilden die Nahrungsquelle für das Mikrobiom (Solaiman und Anawar 2015). Dabei ist die bakterielle Komposition wichtig für das Überleben der Pflanze, da Bakterien z. B. antibiotische und antimykotische Stoffe bilden können, die die Pflanze schützen. Die Bakterien bilden Stoffe wie Indol-3-essigsäure und Siderophore, die der Pflanze zum Wachstum und zur Nährstoffaufnahme dienen (Khamna et al. 2009). Es ist bekannt, dass jeder Pflanzenspezies ein spezifisches Mikrobiom zugeordnet werden kann, das jedoch in Abhängigkeit von Umweltbedingungen und Entwicklungsstadium variiert (Smalla et al. 2001). Zum Beispiel wird das Mikrobiom von Feuchtigkeit und Temperatur der Erde, dem Gesund-

heitszustand der Pflanze sowie dem Klima und der Jahreszeit beeinflusst (Berg und Smalla 2009). Manche Bakterien sind ubiquitär in der Rhizosphäre vorhanden, z. B. *Bacillus*-Arten (Berg et al.). Die Rhizosphäre von Arzneipflanzen gilt als besonders interessant, da ihr Mikrobiom hochspezifisch zu sein scheint (Karthikeyan et al. 2008). Eine Hypothese ist, dass die hohe Spezifität des Mikrobioms von Arzneipflanzen der Produktion von strukturell vielfältigen Sekundärmetaboliten durch die Pflanze zuzuschreiben ist (Qi et al. 2012). So besitzen einige chinesische Arzneipflanzen, wie *Stellera chamaejasme* (Thymelaeaceae), eine spezifische actinobakterielle Gemeinschaft (Zhao et al. 2012). Diese Actinomyceten produzieren antimikrobielle und antitumorale Stoffe und sind damit pharmazeutisch relevant.

Eine der wichtigsten Annahmen für die Entdeckung neuer Naturstoffe ist, dass taxonomische Diversität chemischer Diversität entspricht (Bull und Stach 2007). Für taxonomische Diversität müssen neue Stämme aus bisher wenig untersuchten Habitaten isoliert werden. Dabei sind besonders Extremhabitats, wie Wüsten, von großer Bedeutung (Mohammadipanah und Wink 2015). Durch Nährstoffmangel in der Nicht-Rhizosphäre erhöht sich die Dichte der Bakterien in der Rhizosphäre. Aufgrund von Selektionsdruck weist die Sekundärmetabolitproduktion eine hohe Vielfalt auf und bildet damit eine Quelle für neue Naturstoffe mit pharmakologischer Relevanz (Goodfellow und Fiedler 2010).

Die Isolierung neuer Naturstoffe aus Bodenbakterien setzt die Kultivierung der Produzentenstämmen unter Laborbedingungen voraus. Es wird jedoch angenommen, dass nur 1 % der Bakterien im Boden momentan kultivierbar sind. Um Naturstoffe nicht kultivierbarer Bakterien nutzbar zu machen, kann deshalb ein metagenomischer Ansatz verfolgt werden. Beim metagenomischen Ansatz wird die genomische DNA direkt aus einer Bodenprobe, nicht aus einem Stamm extrahiert, und daraus eine metagenomische Bibliothek erstellt. Diese Bibliotheken können nach Sequenzierung genutzt werden, um mittels *Genome Mining* (siehe 1.3.2) nach neuen Genclustern für die Biosynthese von neuen Naturstoffen zu suchen (Singh und Macdonald 2010).

1.1.3 Die Gattung *Streptomyces* als Antibiotikalieferant

1.1.3.1 Streptomyceten

Ein großer Teil der Antibiotika und Chemotherapeutika, die heute auf den Markt sind, wurden von Gram-positiven Bodenbakterien der Gattung *Streptomyces* isoliert. So stammen etwa 70 % der Antibiotika von dieser Gattung (Watve et al. 2001). Dazu gehört auch Streptomycin, das erste Antibiotikum gegen Tuberkulose (Schatz und Waksman 1944). Streptomyceten sind aerobe Gram-positive Bakterien der Ordnung Actinobacteriae. Der erste Vertreter entwickelte sich vor ca. 450 Millionen Jahren (Chater 2006). Insgesamt besteht die Familie der Streptomyceten aus 600 Arten (Antony-Babu et al. 2017). Sie besitzen die Fähigkeit Pflanzenabfälle zu verdauen und spielen somit eine große Rolle beim Abbau von totem organischem Material. Sie wachsen hauptsächlich im Boden. Ihr Genom zeichnet sich nicht nur durch einen hohen GC-Gehalt (mehr als 70 %) aus, sondern auch durch sein lineares Vorliegen. Zusätzlich zum Genom können lineare oder zirkuläre Plasmide vorkommen. Eine weitere Besonderheit der Streptomyceten ist ihre Genomgröße. Diese reicht von 8,7 bis 10 Millionen Basenpaare, mit 7000 - 9000 Genen, die teilweise zu Genclustern organisiert sind (Seipke et al. 2012). Das Wachstum von Streptomyceten erinnert durch das Bilden eines Mycel an das von Pilzen, was ihnen ihren Gattungsnamen einbrachte. Dieser wurde von Selman Waksman 1942 aus den griechischen Silben „*streptos*“ für gewunden und „*mykes*“ für Pilz zusammengesetzt (Woodruff 2014).

Obwohl die Wachstumszeit zwischen den unterschiedlichen Streptomycceten variieren kann, zeigen sie doch einen ähnlichen Lebenszyklus (Abbildung 1). Findet eine freie Streptomycceten-Spore günstige Lebensbedingungen, beginnt sie auszukeimen und ein fadenartiges Mycel zu bilden. Dies erfolgt meist durch Spitzenwachstum mit gelegentlichen Verzweigungen. Sind die löslichen Nährstoffe im Boden aufgebraucht, bildet sich das Luftmycel. Dabei wachsen Bakterienstränge senkrecht in die Luft. Mit Verdopplung des Genoms werden Querwände ausgebildet. Mit Verdickung der Zellwand und Einlagerung von Pigmenten differenzieren sich die Zellen zu Sporen. Die Sporen dienen als Dauerformen zur Überbrückung ungünstiger Lebensbedingungen. (Angert 2005, Flärdh und Buttner 2009, Seipke et al. 2012).



Abbildung 1: Lebenszyklus von Streptomycceten.

Die morphologische Differenzierung ist meist assoziiert mit einer physiologischen Differenzierung. Durch die Differenzierung werden statt Stoffen für das Wachstum Stoffe des Sekundärmetabolismus gebildet. Diese dienen den Streptomycceten u. a. zum Schutz vor Fraßfeinden und zur Kommunikation (Seipke et al. 2012). Der Sekundärmetabolismus von Streptomycceten ist von großer pharmakologischer Bedeutung. Sie produzieren unter anderem Antibiotika wie Tetracyclin, Erythromycin und Daptomycin sowie Fungizide wie Amphotericin B oder Zytostatika wie Bleomycin (Lima Procópio et al. 2012). Unter ihren Sekundärmetaboliten sind nahezu alle Biogeneseklassen, darunter Aminoglykoside, Terpene, nicht-ribosomale Peptide und Polyketide, vertreten, wobei die letzten zwei Klassen sich durch hohe pharmazeutische Relevanz auszeichnen. Damit die Vielzahl der produzierten Stoffe für das Bakterium selbst nicht toxisch werden, unterliegt die Expression der Cluster strikten Kontrollen. Die Biosynthese der Antibiotika beginnt meist erst mit Beginn der Sporulation. Zudem hängt das Produktionslevel von Umweltbedingungen und Nährstoffen ab (van Wezel und McDowall 2011). Die Produktion wird durch Regulatorproteine gesteuert. Dabei kann zwischen Stoffwechselregulatoren und Clusterregulatoren unterschieden werden. Ein Beispiel für einen Stoffwechselregulator sind die γ -Butyrolactone. Diese fungieren als Autoinduktor. Sobald genug davon in der Zelle vorhanden sind, binden diese an den Repressor und die Transkription der Gene wird gestartet (Du et al. 2011) (1.1.3.2). Dabei können γ -Butyrolactone mehrere Cluster gleichzeitig beeinflussen. Clusterregulatoren kontrollieren hingegen die Transkription eines Clusters. Dazu gehören auch die Regulatorproteine für die Antibiotikaproduktion. Ein Beispiel dafür ist der transkriptionale Repressor der TetR-Superfamilie (Cuthbertson und

Nodwell 2013, Ramos et al. 2005) oder der ATP-abhängige Aktivator der LuxR-Familie (Schrijver und Mot 1999).

Zudem schützen sich die Produzentenstämme durch Selbstresistenzen, z. B. durch die Modifikation des Antibiotikums. So versetzt *S. griseus* Streptomycin durch eine 6-Phosphotransferase in seine inaktive Vorstufe (Shinkawa et al. 1985). Aber auch eine Veränderung der Targets durch Methylierung ist möglich. Dies wird erreicht durch eine S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase. Dabei wird z. B. die Aminosäure A2058 der 23S rRNA in Makrolid-produzierenden Actinomyceten, wie dem Tylosin-Produzent *S. fradiae*, methyliert (Zalacain und Cundliffe 1990, 1989). Ein weiterer wichtiger Schutzmechanismus ist der antibiotische Efflux. Hierbei werden Antibiotika durch ABC-Transporter aus der Zelle geschleust. Ein Beispiel dafür sind Daunorubicin und Doxorubicin aus *S. peucetius* (Guilfoile und Hutchinson 1991).

Durch diese besonderen Eigenschaften und die Produktion wertvoller Naturstoffe wurden die Streptomycceten zur Mikrobe des Jahres 2016 gewählt (Dingermann und Zündorf 2016). Auch heute noch gelten Streptomycceten als vielversprechende Quelle neuer bioaktiver Naturstoffe. Im Zuge des *Genome Minings* wurden Genome vieler Streptomycceten sequenziert und analysiert. Dabei wurde eine Vielzahl biosynthetischer Gencluster mit großem Potential für neue bioaktive Naturstoffe entdeckt. Jedoch sind viele der Gencluster ruhend (kryptische oder stille Gencluster) und nicht alle Faktoren, die die Aktivatoren und Repressoren steuern, sind bekannt (Onaka 2017). Eine gezielte Induktion ruhender Gencluster ist daher oft schwierig. Man kennt von vielen Clustern weder den Aktivierungsmechanismus noch das gebildete Produkt. Die Aktivierung dieser Gencluster und die Produktisolierung sind Gegenstand der heutigen Forschung.

1.1.3.2 Aktivierungs- und Regulationsmechanismen der Sekundärmetabolite in Streptomycceten

Die Sekundärmetabolitproduktion kann u. a. durch eine Verringerung der Wachstumsrate in Folge von Stickstoffmangel ausgelöst werden. Dabei spielt vor allem das hoch phosphorylierte (p)ppGpp (Guanosintetra- bzw. Guanosinpentaphosphat) eine entscheidende Rolle. PpGpp entsteht, indem sich unbeladene tRNA an die Akzeptor-Stelle des Ribosoms anlagert. Dadurch wird das *relA*-Genprodukt aktiviert. RelA ist ein Ribosom-assoziiertes Protein (Martínez-Costa et al. 1998). Dieses Enzym katalysiert die Übertragung eines Pyrophosphatrestes von ATP auf GTP bzw. GDP (Wendrich und Marahiel 1997). PpGpp löst wiederum die Antibiotikaproduktion aus. Dies konnte unter Stickstoffmangel am Beispiel von Cephamycin C in *S. clavuligerus* und im Fall von Undecylprodigiosin und Actinorhodin in *S. coelicolor* gezeigt werden (Jin et al. 2004, Chakraburty und Bibb 1997, 1997).

Die Sekundärstoffproduktion von Streptomycceten kann aber auch durch extrazellulär vorkommende Stoffe wie die γ -Butyrolactone ausgelöst werden. Ein gut charakterisiertes γ -Butyrolacton ist der A-Faktor (2-Isocapryloyl-3R-hydroxymethyl- γ -butyrolacton) aus *S. griseus* (Bibb 2005). Dieser Faktor ist sowohl an der morphologischen Differenzierung als auch an der Produktion von Streptomycin beteiligt (Abbildung 2). Dabei bindet der A-Faktor an das cytosolische Protein ArpA, wodurch die Transkription von *adpA* gestartet wird. AdpA aktiviert die Transkription von *strR*, das für den stoffwechselspezifischen Transkriptionsaktivator der Streptomycin-Biosynthese kodiert (Kato et al. 2004, Higo et al. 2011).

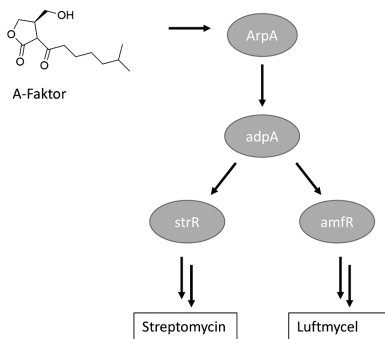


Abbildung 2: Darstellung der A-Faktorkaskade in *S. griseus*. ArpA: Rezeptor für A-Faktor, adpA und amfR: Transkriptionsfaktoren, strR: Regulatorprotein für die Streptomycin-Biosynthese. Modifiziert nach (Higo et al. 2011).

Die Aktivierung von stillen Genclustern kann durch mehrere Ansätze erreicht werden, wobei zwischen zwei wesentlichen Strategien unterschieden wird, dem peliotropischen und dem stoffwechselspezifischen Ansatz (Liu et al. 2013, Rutledge und Challis 2015). Beim stoffwechselspezifischen Ansatz wird ein biosynthetisches Gencluster spezifisch aktiviert. Mithilfe der Bioinformatik werden clusterspezifische Regulatoren identifiziert und manipuliert, um die Sekundärmetabolitproduktion zu aktivieren oder zu steigern. Im Gegensatz dazu werden beim peliotropischen Ansatz mehrere Gencluster gleichzeitig aktiviert, weshalb diese Methode auch OSMAC (*one strain many compounds*) bezeichnet wird (Rebets et al. 2014).

Ein Beispiel für einen peliotropischer Ansatz ist die Veränderung der Wachstumsbedingungen. Die Veränderung der Kultivierungsbedingungen (z. B. Medienkomposition, Belüftung, pH-Wert und Temperatur) führt zur Veränderung der Sekundärmetabolitproduktion und somit zur Bildung potenziell neuer Substanzen. Dies zeigt das Beispiel von *S. leeuwenhoekii* (1.1.3.3). Es wurde auch gezeigt, dass die Zugabe von seltenen Elementen wie Scandium und Lanthan die Produktion verschiedener Antibiotika in Streptomyceten steigern kann (Kawai et al. 2007). Diese Methode ist jedoch limitiert durch die Anzahl an Kultivierungsbedingungen, unter denen ausreichend Wachstum erfolgt. Außerdem ist der Effekt schwer vorauszusagen (Rutledge und Challis 2015).

Ein weiteres Beispiel für den peliotropischen Ansatz ist die Co-Kultivierung von Streptomyceten mit anderen Mikroorganismen, um eine kompetitive Umgebung zu schaffen und damit die Sekundärmetabolitproduktion zu steigern. Durch die Co-Kultivierung von *S. endus* mit *Tsukamurella pulmois* konnte z. B. das neue Antibiotikum Alchivemycin A isoliert werden (Onaka et al. 2011). Auch die Undecylprodigiosin-Produktion von *S. coelicolor* lässt sich durch Co-Kultivierung mit *E. coli* steigern (Luti und Mavituna 2011b).

Die Bildung neuer Sekundärmetabolite wird ebenfalls durch eine Veränderung des Transkriptions- und Translationsapparates erreicht. So wurde durch eine Mutation im S12-Protein in *S. lividans* die Produktion des Actinorhodins erreicht. Das S12-Protein ist Teil der 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und an der Initiation der Translation beteiligt (Shima et al. 1996).

Ein weiteres Beispiel für den peliotropischen Ansatz ist die Transformation von Mikroorganismen mit bereits bekannten Regulatorgenen wie dem *absA*. Das *absA* Gen codiert für eine Kinase (AbsA1) und für einen *response*-Regulator (AbsA2). Zusammen aktivieren sie mehrere biosynthetische Gencluster in *S. coelicolor*. Durch das Transformieren von

S. flevopericus mit *absA* wurde die Produktion von Pulvomycin ausgelöst (McKenzie et al. 2010). Pulvomycin war zwar bekannt, aber es war nicht bekannt, dass *S. flevopericus* Pulvomycin produziert (Rutledge und Challis 2015). Dies zeigt den Nachteil des peliotropischen Ansatzes: er kann zur Isolierung bereits bekannter Naturstoffe führen.

Biosynthetische Gencluster enthalten in der Regel auch Gene, die für stoffwechselspezifische Regulatoren codieren. Die Manipulation dieser Gene zur Aktivierung eines biosynthetischen Gencluster ist Teil des stoffwechselspezifischen Ansatzes. Diese clusterspezifischen Regulatoren werden in SARP (*streptomyces antibiotic regulatory protein*), LAL (*large ATP-binding regulators of the LuxR family*) und LysR eingeteilt (Bibb 2005). Diese Regulatoren fungieren als Aktivatoren oder Repressoren (Abbildung 3). In einem Gencluster können mehrere clusterspezifische Regulatoren vorkommen. Diese können aktivierend, inhibierend oder aktivierend und inhibierend wirken, was die Nutzung dieser Regulatoren für die Aktivierung stiller Gencluster erschwert (Rutledge und Challis 2015).

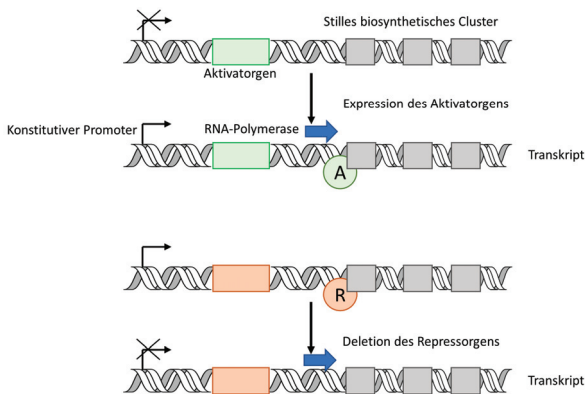


Abbildung 3: Stoffwechselspezifische Strategien zur Aktivierung stiller biosynthetischer Cluster. Dies kann durch die Überexpression eines Aktivatorgens (oben, grün) oder durch Deletion eines Repressorgens erfolgen (unten, orange). Modifiziert nach (Rutledge und Challis 2015).

Die SARP-Regulatoren kommen ausschließlich in Actinomyceten vor und dabei vorrangig in Streptomyceten. Sie enthalten ein N-terminales Helix-turn-Helix-Motiv sowie eine bakterielle Transkriptionsaktivierungsdomäne. Durch diese binden sie an die Promotorregion des zu aktivierenden Gens und initiieren die Transkription (Wietzorrek und Bibb 1997, Yeats et al. 2003). Ein Beispiel für ein SARP-Regulatorgen ist das *redD* aus *S. coelicolor* (Fernández-Moreno et al. 1991).

Die LAL-Regulatorproteine enthalten ein C-terminales Helix-turn-Helix-Motiv und ein N-terminales Nukleotidbindemotiv (Bibb 2005). Der genaue Mechanismus dieser Regulatorproteine ist nicht bekannt, aber eine Überexpression des *samR0484* in *S. ambofaciens* führte zur Entdeckung der Stambomycine (Laureti et al. 2011).

Die LysR-Regulatoren enthalten ein C-terminales Helix-turn-Helix-Motiv sowie eine Substratbindungsdomäne (Maddocks und Oyston 2008). Sie benötigen zusätzlich einen Co-Faktor (Schell 1993). Ein Beispiel für ein LysR-Regulatorprotein ist das ClAR aus dem Clavulansäure-Cluster von *S. clavuligerus* (Pérez-Redondo et al. 1998).

Ein Beispiel für einen Repressor ist SC03201 aus *S. coelicolor*. Dieser gehört zu der TetR Familie. Eine Überexpression von SC03201 führte zu einer deutlich verminderten Produktion von CDA (*Calcium dependent antibiotics*), Undecylprodigiosin und Actinorhodin (Xu et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit ein stilles biosynthetisches Cluster zu aktivieren, ist die heterologe Expression unter Kontrolle eines starken Promotors. So konnte z. B. das Lassopeptid Leepeptin heterolog in *S. coelicolor* exprimiert und identifiziert werden (1.1.3.3).

1.1.3.3 *Streptomyces leeuwenhoekii* und seine Sekundärmetabolite

S. leeuwenhoekii C34, C38, C58 und C79 wurde aus der Laguna Chaxa der Atacama-Wüste in Chile isoliert (Busarakam et al. 2014). In dieser Arbeit wurde mit *S. leeuwenhoekii* C34 gearbeitet. C34 besitzt ein lineares Chromosom mit einer Größe von 7,86 MBp. Zudem besitzt es zwei extrachromosomale Plasmide, das zirkuläre pSLE1 (86 kBp) und das lineare pSLE2 (132 kBp) (Gomez-Escribano et al. 2015). *Genome Mining* mit antiSMASH 2.0 (*antibiotics and secondary metabolite analysis shell*) zeigt 35 biosynthetische Gencluster (Busarakam et al. 2014). Der Stamm bildet in Abhängigkeit vom Medium verschiedene Antibiotika-Gemische. Ein Beispiel sind vier naphthalenische 22-gliedrige Makrolid-Polyketide. Sie wurden nach dem Entdeckungsort des Stammes mit Chaxamycin A - D (Abbildung 4) benannt. Alle Chaxamycine zeigen Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*, wobei Chaxamycin D die höchste Aktivität besitzt. Die Chaxamycine A - C zeigen mäßige Inhibierung der ATPase-Aktivität des humanen Chaperons *heat shock Protein 90* (Hsp90), wodurch sie potenziell Anwendung in der Chemotherapie finden könnten (Rateb et al. 2011a, Castro et al. 2018).

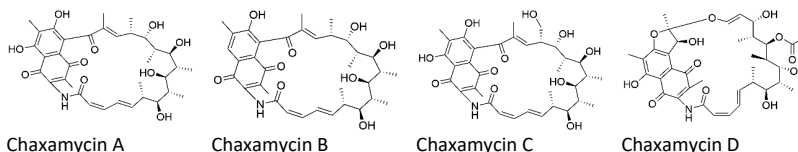


Abbildung 4: Strukturen der Chaxamycine. Isoliert aus *S. leeuwenhoekii* C34 (Rateb et al. 2011a).

Bei Kultivierung in einem definierten Medium wurden die Chaxalactine A - C sowie das Siderophor Desferrioxamin E (Abbildung 5) von Rateb et al. 2011 isoliert. Die Chaxalactine gehören zu den 22-gliedrigen Makrolid-Polyketiden. Sie zeigen Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie *S. aureus*, *L. monocytogenes* und *B. subtilis*. Chaxalactin B weist eine höhere Aktivität gegen *S. aureus* als Chaxalactin A und C auf. Alle Chaxalactine zeigten keine Aktivität gegen Gram-negative Bakterien (Rateb et al. 2011b).

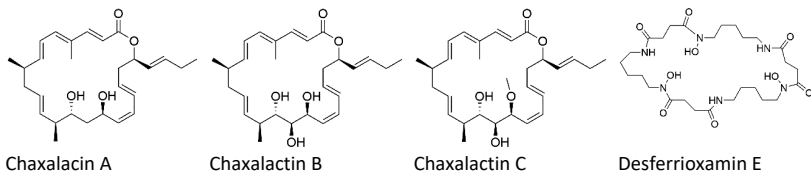


Abbildung 5: Strukturen der Chaxalactine sowie Desferrioxamin E. Isoliert aus *S. leeuwenhoekii* C34 (Rateb et al. 2011b).

Bei Verwendung von ISP3-Medium konnten Hygromycin A und sein Derivat 5''-Dihydrohygromycin A (Abbildung 6) isoliert werden (Rateb et al. 2011b). Von allen genannten Makroliden wurde nur Chaxamycin A in allen getesteten Medien detektiert. Es wird somit als chemischer Marker für den Stamm angesehen (Castro et al. 2018).

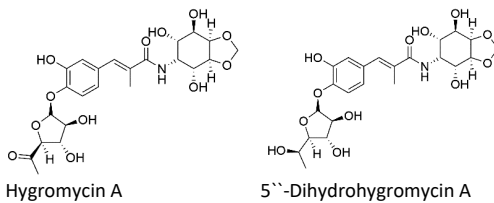


Abbildung 6: Struktur von Hygromycin A und seines Derivats 5''-Dihydrohygromycin A. Isoliert aus *S. leeuwenhoekii* C34 (Rateb et al. 2011b).

Zudem wurde Chaxapeptin in *S. leeuwenhoekii* C34 und C58 identifiziert (Abbildung 7). Dieses Lassozeptid hat eine schwache Wirkung gegen die Gram-positiven Bakterien *S. aureus* und *B. subtilis*. Gegen Gram-negative Bakterien zeigte Chaxapeptin keine Wirkung (Elsayed et al. 2015). Insgesamt wurden in *S. leeuwenhoekii* C34 drei Gencluster für Lassozeptide gefunden. Allerdings konnte nur Chaxapeptin in *S. leeuwenhoekii* C34 produziert und detektiert werden. Das Gencluster für das Lassozeptid Looeptin wurde heterolog in *S. coelicolor* exprimiert, was die Identifizierung des Lassozeptids ermöglichte (Abbildung 7). Das dritte vorhergesagte Lassozeptid wurde weder in *S. leeuwenhoekii* C34 noch heterolog in *S. coelicolor* nachgewiesen (Gomez-Escribano et al. 2019).

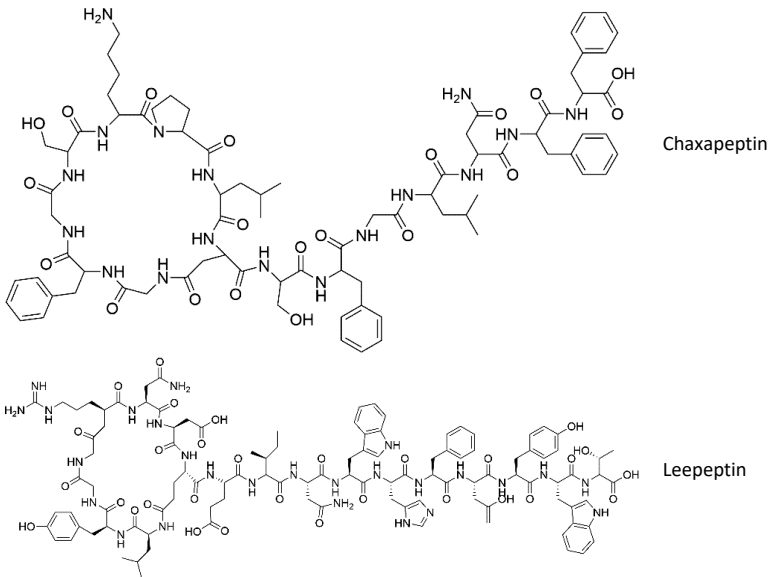


Abbildung 7: Strukturen von Chaxapeptin und LEEPteptin. Identifiziert aus *S. leeuwenhoekii* C34 (Elsayed et al. 2015).

S. leeuwenhoekii C38 produziert die Atacamycine A - C (Abbildung 8). Diese wurden aus dem Mycelium extrahiert. Die Atacamycine gehören wie die Chaxamycine zu den 22-gliedrigen Makroliden. Sie zeigen leichte Aktivität gegen das phytopathogene Bakterium *Ralstonia solanacearum*. Atacamycin A und B wurden gegen 42 Krebszelllinien getestet. Dabei zeigte Atacamycin A die höchste zytotoxische Aktivität gegen Darmkrebs-, Brustkrebs- und Uteruskrebs-Zelllinien. Atacamycin B zeigte hingegen die höchste zytotoxische Aktivität gegen die Darmkrebszelllinie RKO (Nachtigall et al. 2011).

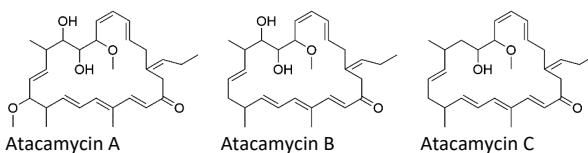


Abbildung 8: Struktur der Atacamycine. Isoliert aus *S. leeuwenhoekii* C38 (Nachtigall et al. 2011).

1.1.3.4 *Streptomyces fragilis* und seine Sekundärmetabolite

Über die Art *S. fragilis* ist wenig bekannt. 2017 wurde aus dem *S. fragilis*-Stamm DA7-7 eine thermostabile α -Amylase aufgereinigt und charakterisiert (Nithya et al. 2017). Außerdem ist bekannt, dass *S. fragilis* Azaserin (Abbildung 9) produziert (Bartz et al. 1954). Azaserin hemmt die γ -Glutamyltranspeptidase. Diese katalysiert den Transfer eines γ -Glutamyl-Restes auf Aminosäuren oder Peptide, was zu einer Reduktion der Synthesebausteine der Bakterien-

zellwand führt. Die γ -Glutamyltranspeptidase ist aber auch an der Metastasierung von Krebszellen beteiligt. Azaserin ist somit ein zytotoxisches Antibiotikum (Wada et al. 2008).

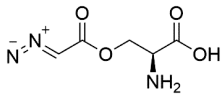


Abbildung 9: Struktur von Azaserin.