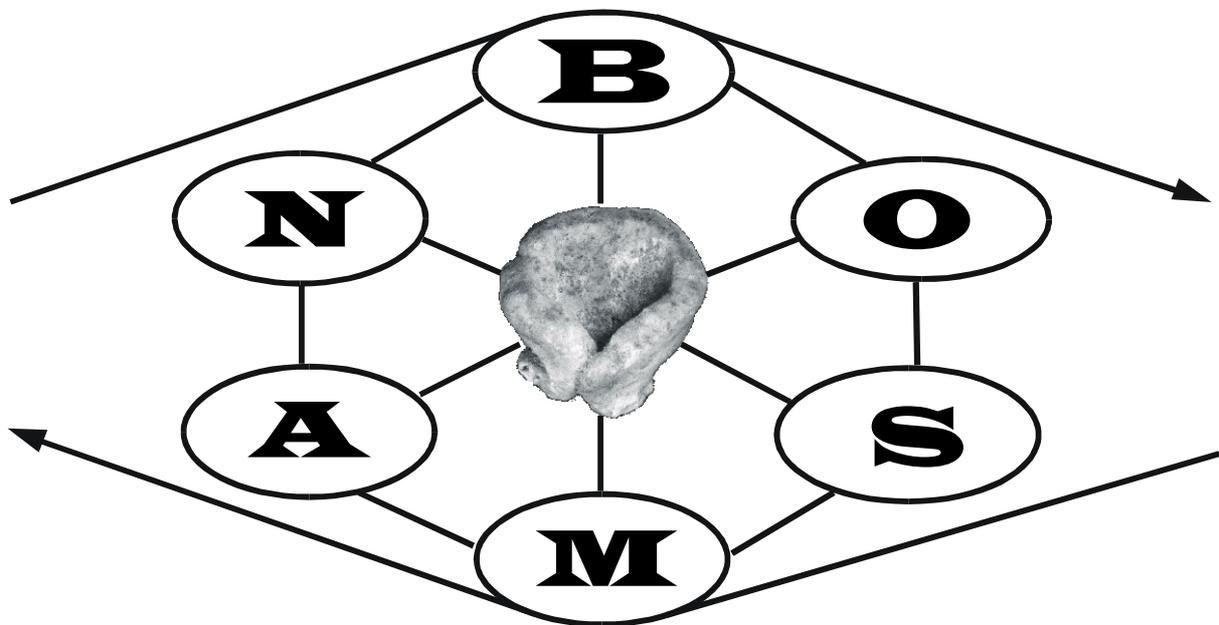


Abschlussbericht zum Verbundprojekt

**Boreale Schwämme
als marine Naturstoffquelle
(BOSMAN II)**



01.04.2002–31.05.2005

BMBF-Schwerpunkt

MARINE NATURSTOFFFORSCHUNG

November 2005

Abschlussbericht zum Verbundprojekt

**Boreale Schwämme
als marine Naturstoffquelle
(BOSMAN)**

KOORDINATION PROF. DR. WALTER MICHAELIS

Universität Hamburg

Institut für Biogeochemie und Meereschemie

Bundesstr. 55

20146 Hamburg

Tel.: 040/42838-5001

Fax: 040/42838-6347

E-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de

BOSMAN-Partner

Teilprojekt 1

Prof. Dr. Walter Michaelis
Institut für Biogeochemie und Meereschemie
Universität Hamburg
Bundesstr. 55
20146 Hamburg
Tel.: 040/42838-5001; Fax: 040/42838-6347
E-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de

Teilprojekt 2

Prof. Dr. Joachim Reitner
Göttinger Zentrum Geowissenschaften,
Abteilung Geobiologie
Universität Göttingen
Goldschmidtstr. 3
37077 Göttingen
Tel.: 0551/39-7950; Fax: 0551/39-7918
E-mail: jreitne@gwdg.de

Teilprojekt 3

Prof. Dr. Gabriele König
Institut für Pharmazeutische Biologie
Universität Bonn
Nussallee 6
53115 Bonn
Tel.: 0228/73-3747; Fax: 0228/73-3250
E-mail: g.koenig@uni-bonn.de

Teilprojekt 4

Prof. Dr. Ulrich Szewzyk
Institut für Technischen Umweltschutz,
Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen
Technische Universität Berlin
Franklinstr. 29
10587 Berlin
Tel.: 030/3147-3460; Fax: 030/3147-3461
E-mail: ulrich.szewzyk@tu-berlin.de

Teilprojekt 5

PD Dr. Hans von Döhren
Max-Volmer-Institut für
Biophysikalische Chemie und Biochemie,
Abteilung Biochemie und Molekulare Biologie
Technische Universität Berlin
Franklinstr. 29
10587 Berlin
Tel.: 030/3142-2697; Fax: 030/3142-7695
E-mail: doehren@chem.tu-berlin.de

Teilprojekt 6

Prof. Dr. Wittko Francke
Institut für Organische Chemie
Universität Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6
20146 Hamburg
Tel.: 040/42838-2866; Fax: 040/42838-3834
E-mail: francke@chemie.uni-hamburg.de

Teilprojekt 7

Novozymes Deutschland GmbH
Eugen Müller
Lerchenbergstr. 7
55127 Mainz
Tel.: 06131/556813; Fax: 06131/556814
E-mail: emue@novozymes.com

Koordination

Walter Michaelis
Thomas Pape

Institut für Biogeochemie und Meereschemie
Universität Hamburg
Bundesstr. 55
20146 Hamburg

Berichtszeitraum: 01.04.2002 – 31.05.2005

Projektlaufzeit: 01.04.2002 – 31.05.2005

Förderkennzeichen: 03F0358A

Inhalt

I.1.	Aufgabenstellung.....	3
I.2.	Voraussetzung, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	3
I.3	Planung und Ablauf des Vorhabens.....	3
I.4.	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	4
I.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	4
II.1.	Erzielte Ergebnisse.....	5
II.1.1.	Probenbeschaffung.....	5
II.1.2.	Koordination der Probenflüsse.....	5
II.1.3.	Arbeitstreffen.....	6
II.1.4.	Öffentlichkeitsarbeit.....	6
II.1.4.1.	Nichtwissenschaftliche Foren.....	6
II.1.4.2.	Wissenschaftliche Foren.....	7
II.1.5.	Übersicht der wichtigsten Ergebnisse des Verbundprojekts.....	7
II.2.	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	8
II.3.	Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	9
II.4.	Erfolgte und geplante Veröffentlichungen.....	9
II.4.1.	Dissertationen.....	9
II.4.2.	Fachartikel und Poster.....	10
	 <u>Erfolgskontrollbericht</u>	
III.1.	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen.....	13
III.2.	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis, erreichte Nebenergebnisse, Erfahrungen.....	14
III.3.	Fortschreibung des Verwertungsplans.....	15
III.3.1.	Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte.....	15
III.3.2.	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende.....	15
III.3.3.	Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende....	15
III.3.4.	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit.....	16
III.4.	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.....	16
III.5.	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer.....	16
III.6.	Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.....	16
IV.	Berichtsblatt.....	17
	 <u>Anhang</u>	
A.1.	Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) e.V.....	
A.2.	Oncotest GmbH.....	

I.1. Aufgabenstellung

Die zentralen Aufgaben der Koordination des Verbundprojektes BOSMAN II umfassten die Organisation aller teilprojektübergreifender Tätigkeiten und Datenflüsse. Im Einzelnen war die Projektkoordination für folgende Aufgaben verantwortlich:

- logistisch-administrative und wissenschaftliche Arbeiten in Zusammenhang mit Forschungsfahrten und der Probenbeschaffung
- Gewährleistung des Probenaustauschs zwischen den Teilprojekten (TP) und den testenden Partnern (Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung e.V., Oncotest GmbH)
- Inventarisierung und Einlagerung von Rückstellmustern getesteter Proben
- Regelung der Kooperationen im Verbundprojekt

- Aufbereitung und Zusammenführung der Daten aus den Teilprojekten
- Bereitstellung von Daten und Gewährleistung des Austauschs zwischen den Teilprojekten
- Abwicklung des Vertragswesens (Kooperationsvertrag, Forschungs- und Entwicklungsvertrag) zwischen den TP bzw. zwischen BOSMAN und den testenden Auftragnehmern

- administrative und wissenschaftliche Vorbereitung und Durchführung von Arbeitstreffen
- Zusammenstellung von Berichten
- Gewährleistung der wirkungsvollen Außendarstellung und Bereitstellung von Darstellungsmaterial für die Teilprojekte

I.2. Voraussetzung, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In der ersten Projektphase (BOSMAN I), die den Zeitraum vom 01.07.1999 bis 30.06.2001 umfasste, waren sechs universitäre Gruppen am Verbundprojekt BOSMAN beteiligt. BOSMAN II begann am 01.04.2002 und schloss die Teilprojekte aus BOSMAN I sowie einen weiteren Partner aus der Industrie, die Novozymes Deutschland GmbH (TP 7), ein. Die neunmonatige Unterbrechung der Förderung zwischen der ersten und zweiten Projektphase führte zu erheblichen wissenschaftlichen und personellen Schwierigkeiten vor allem in der frühen Laufzeit von BOSMAN II. Dies betraf insbesondere die ausgesetzte Finanzierung der neun Doktoranden und Doktorandinnen in der Projektkoordination und den Teilprojekten 1, 2, 4, 6 und 7, die sich in nachhaltigen Verzögerungen der Arbeiten der Projektkoordination und im zeitlichen Fortschritt der Dissertationen niederschlug. Aber auch die laufenden Arbeiten in den Teilprojekten, wie z.B. die Versorgung der Stammsammlung isolierter Bakterien im TP 4 wurden in diesem Zeitraum außerordentlich stark beeinträchtigt. Vielfach mussten begonnene Arbeiten, die mit dem Ende von BOSMAN I zurückgestellt wurden, in BOSMAN II von Grund auf neu aufgenommen werden, was den unnötigen Verbrauch von Ressourcen, wie des Probenmaterials, zur Folge hatte.

Weitere Verzögerungen in der Verfolgung der Projektziele resultierten aus der sehr späten Einbindung von Partnern (in 04/2003), die im Auftrag von BOSMAN Bioassays durchführten. Aufgrund der Vorarbeiten zu Beginn von BOSMAN II konnten den testenden Partner erste Extrakte jedoch bereits im Folgemonat zur Testung zur Verfügung gestellt werden.

Unter Berücksichtigung der Arbeiten und Ergebnisse in BOSMAN I und der Expertise der neuen BOSMAN-Partner lagen insgesamt aber hervorragende technische und personelle Voraussetzungen für die Zielsetzungen von BOSMAN II vor.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Geplant war, im direkten zeitlichen Anschluss an BOSMAN I mit den Arbeiten am 01.07.2001 in BOSMAN II zu beginnen. Dabei sollten die Untersuchungen in BOSMAN II durch den Einbau spezifisch arbeitender Testsysteme der neuen BOSMAN-Partner aus der Industrie, der EleGene AG,

Martinsried, und der Novozymes Deutschland GmbH, stärker auf eine zielgerichtete Wirkstoffsuche ausgerichtet werden. Ein Fortsetzungsantrag wurde im Rahmen der Ausschreibung ‚Marine Naturstoffe‘ mit Abgabefrist beim Projektträger in 03/2001 vorgelegt.

Die Bewilligung einer überarbeiteten Version des Fortsetzungsantrages wurde in 04/2002 erteilt und die Arbeiten in den Teilprojekten unverzüglich aufgenommen. Bereits in 05/2002 schied die EleGene AG aufgrund drohender Insolvenz aus dem Verbundprojekt aus, und es wurden Gespräche mit möglichen neuen Testpartnern aufgenommen. Die Zusammenarbeit wurde mit der IBWF e.V., Kaiserlautern, und der Oncotest GmbH, Freiburg, vereinbart und die benötigten Mittel im Antrag auf Aufstockung in 10/2002 beantragt.

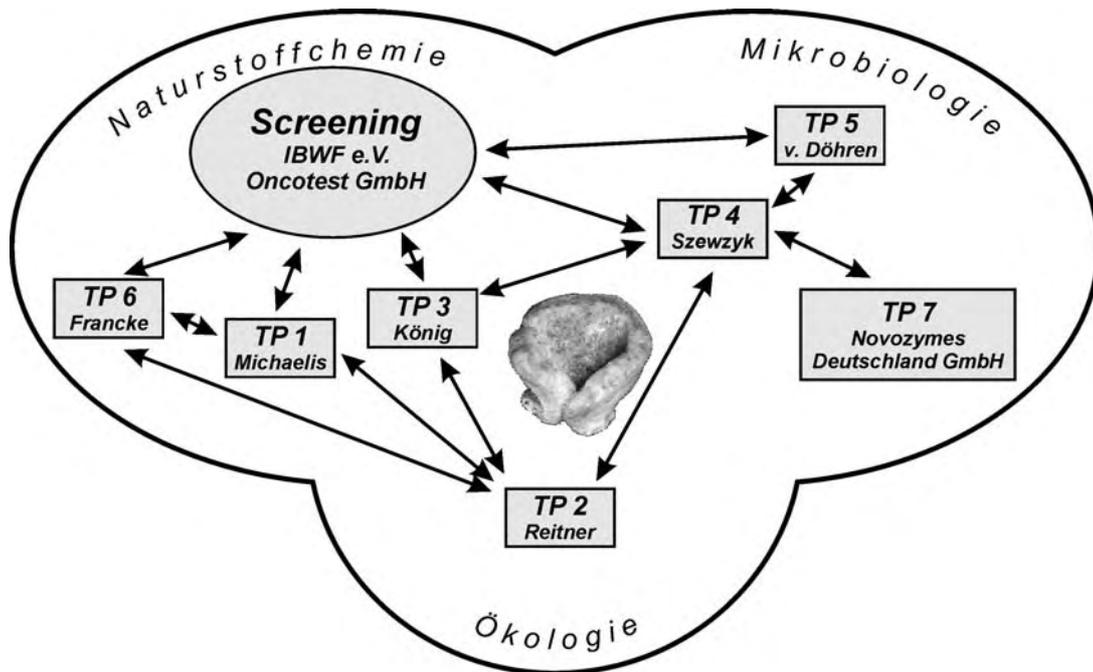


Fig. I.3.1 Zusammensetzung des Verbundprojektes BOSMAN II sowie Richtungen der Proben- und Datenflüsse zwischen den Teilprojekten und testenden Partnern

In 04/2003 wurden die Mittel zur Testung von Extrakten auf zahlreiche pharmakologische Effekte (IBWF e.V.) und auf antitumorale Wirkungen im Speziellen (Oncotest GmbH) bewilligt. Erst ab diesem Zeitpunkt konnte die in BOSMAN II angestrebte gezielte Suche nach potenziellen Wirkstoffen in Extrakten und Fraktionen mit hoher Effizienz durchgeführt werden. Die ersten Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe aus BOSMAN wurden bereits in 05 bzw. 06/2003 bei der Oncotest GmbH und dem IBWF e.V. bearbeitet. In 06/2004 wurde vom Projektträger schließlich die Umverteilung von Projektmitteln zur Beschaffung eines Fraktionensammler für Mikrotiterplatten am IBWF e.V., der eine erhebliche Beschleunigung der Testungen ermöglichte, genehmigt.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Entfällt für die Koordination; siehe Abschlussberichte der Teilprojekte.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Nach dem Ausscheiden der Elegene AG aus dem Verbundprojekt wurde die Zusammenarbeit mit dem IBWF e.V., Kaiserlautern, und der Oncotest GmbH, Freiburg, bezüglich der Testung von Extrakten, Fraktionen und Reinstoffen aus Schwämmen und Bakterien aufgenommen. Beide Institutionen waren Auftragnehmer der BOSMAN-Koordination. Auf dem Gebiet der MALDI-TOF

Massenspektrometrie und der Computer-gestützten Analyse der massenspektrometrischen Daten bestand eine intensive Zusammenarbeit zwischen dem TP 5 und der Fa. Anagnostec, Luckenwalde.

II.1. Eingehende Darstellung der Arbeiten und Ergebnisse

II.1.1. Probenbeschaffung

Die Koordination des Verbundprojekts hat Forschungsfahrten und Feldexpedition zur Beschaffung von Probenmaterial mit Beteiligung von Projektmitgliedern vorbereitet und durchgeführt. Weiteres Probenmaterial wurde von externen Stellen zur Verfügung gestellt.

Ein Großteil der Poriferen-Proben, vornehmlich der Klasse der Demospongiae, wurden in BOSMAN I während der Ausfahrt POS 254 (FS POSEIDON, 07-08/1999) auf dem mittelnorwegischen Schelf geborgen. Weitere nordatlantische Demospongiae-Spezies konnten während zweier Aufenthalte (2000; 2001) an der Marin-Biologischen Station Bergen, Norwegen, im Korsfjord beprobt werden. Ferner wurden etwa 20 Hexactinellida-Spezies, die an verschiedenen atlantischen und pazifischen Tiefseestandorten gesammelt wurden, dem TP 1 vom Harbor Branch Oceanographic Institution in Fort Pierce, Florida, zur Verfügung gestellt.

In BOSMAN II konnte während der Ausfahrt ARK XVIII (FS POLARSTERN, 06-07/2002) das Probeninventar um zahlreiche Demospongiae- und Hexactinellida-Spezies aus der Grönlandsee ergänzt werden. Mehrere Demospongien, die bei der Expedition SO 164 (FS SONNE, 05-06/2002) im karibischen Schelfmeer im Projekt RASTA gesammelt wurden, wurden an BOSMAN weitergegeben. Zur taxonomischen Bestimmung wurden die karibischen Poriferen von der Projektkoordination an Prof. R.W.M. van Soest am Zoologischen Museum in Amsterdam gegeben.

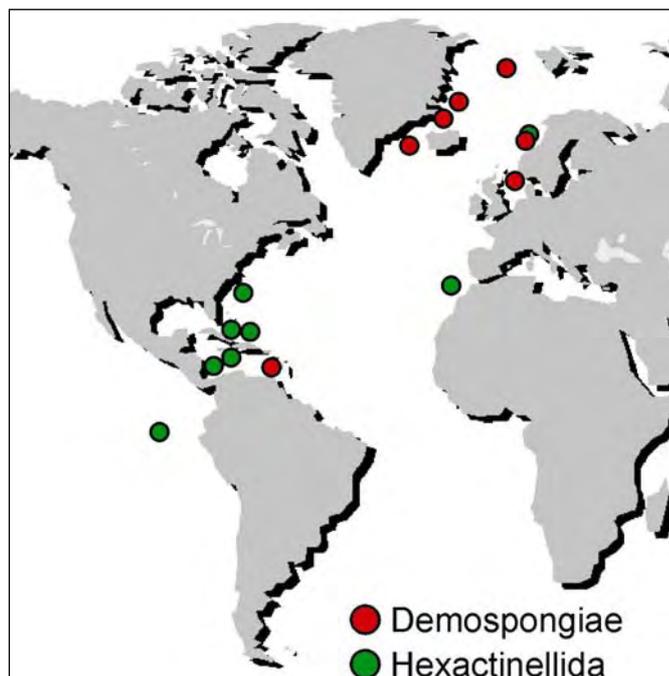


Abb. II.1.1. Lokationen der Poriferen des BOSMAN-Inventars

II.1.2. Koordination der Probenflüsse

Die Auswahl der in BOSMAN II bearbeiteten Poriferen und Bakterien richtete sich im Wesentlichen nach den Testergebnissen und wurde in enger Absprache zwischen den Teilprojekten und den testenden Auftragnehmern getroffen. Die Probenflüsse wurden von der Projekt-Koordination erfasst und dokumentiert. Tabelle II.1.2. gibt eine Übersicht der in BOSMAN II ausgetauschten Proben.

Tab. II.1.2 Probenflüsse in BOSMAN II. Die Zahlen geben die Anzahl der von den Teilprojekten weitergegebenen Anzahl an Poriferen und Bakterienisolate bzw. Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe aus diesen wieder.

Proben von an	IBWF Bakterien, Lyophilisate + Reinstoffe	TP 1 Poriferen- extrakte + -reinstoffe	TP 2 Poriferen	TP 3 Extrakte + Rein- stoffe	TP 4 Bakterien	TP 5 Bakterien- extrakte + -reinstoffe	TP 6 Poriferen- extrakte + -reinstoffe	TP 7 Bakterien	Summe
Koord.	138	-	-	-	-	-	-	-	138
IBWF	-	84	-	130	226	8	80	-	528
Oncotest	-	63	-	99	-	-	72	-	234
TP 1	3	-	19	-	16	-	-	3	41
TP 3	42	-	-	-	-	-	1	-	43
TP 5	120	-	-	-	-	-	-	-	120
TP 6	-	-	18	-	-	-	-	-	18
TP 7	-	-	-	-	400	-	-	-	400

II.1.3. Arbeitstreffen

In BOSMAN II wurden 5 nationale Arbeitstreffen der Teilprojekt-Partner durchgeführt. An den Workshops haben Vertreter aller Teilprojekte teilgenommen.

- Teilprojektleitertreffen am 14.06.2002 in Hamburg mit 9 BOSMAN-Mitgliedern
- Präsentation des Biotechnologie-Unternehmens Evotec OAi, Hamburg
- Teilprojektleitertreffen am 30.08.2002 in Hamburg mit 8 BOSMAN-Mitgliedern
- Auswahl zukünftiger Partner mit Biotest-Systemen
- Arbeitstreffen am 26.02.2003 in Göttingen mit 22 BOSMAN-Mitgliedern
- Präsentation der Ergebnisse aus den Teilprojekten und Vorstellung der neuen Partner mit Biotestsystemen, des IBWF e.V. und der Oncotest GmbH
- Arbeitstreffen am 27. und 28.10.2003 in Bonn mit 25 BOSMAN-Mitgliedern
- Präsentation der Ergebnisse aus den Teilprojekten und Diskussion der Arbeitsstrategie
- Teilprojektleitertreffen am 03.05.2004 in Hamburg mit 13 BOSMAN-Mitgliedern
- Diskussion der weiteren Arbeiten in der Restlaufzeit, geplante Publikationen

II.1.4. Öffentlichkeitsarbeit

Wie auch in BOSMAN I fanden die Arbeiten des Verbundprojektes ein großes Interesse bei deutschen und norwegischen Medienvertretern.

II.1.4.1. Nichtwissenschaftliche Foren

Fernsehen

Berichte über BOSMAN wurden im deutschen und norwegischen TV ausgestrahlt. Im Mittelpunkt der Berichterstattungen standen die Themen „Pharmakologisches Potenzial mariner Invertebraten“, „Durchführung von Bioassays“ und „Chancen der Verwertbarkeit“:

- Magazin „Welt der Wunder“, Pro 7, „Medizin aus dem Meer“, Sendetermin 29.09.2002
- Magazin „Schrødingers Katt“ NRK (Norwegian Broadcasting Company) „Medisin fra havet“, Sendetermin 28.10.2004

Printmedien

Das Verbundprojekt wurde der Öffentlichkeit in nationalen Beiträgen der Printmedien vorgestellt. Zu nennen sind:

- Hamburger Abendblatt, „Die Kalten Korallen“, 15.07.2003
- Internetportal „www.netdoctor.de“ „Neptuns Apotheke“ 26.11.2003
(http://www.netdokter.de/feature/meer_medizin.htm)
- Uniscene Hamburg, „Schwämme, die es in sich haben“, 15.12.2003

II.1.4.2. Wissenschaftliche Foren

Ergebnisse des Verbundprojektes wurden bei Kontaktreisen des Koordinators im Rahmen wissenschaftlicher Vorträge vorgestellt:

- Vortrag an der Universität Hamburg, „Hamburger Unitage“, 15.01.2004
- Vortrag bei den „16. Irseer Naturstofftagen, Irsee, 25. bis 27.02.2004
- Vortrag beim Statusseminar „Marine Naturstoffforschung“, Frankfurt, 18. und 19.05.2004
- Vortrag beim Seminar „Blaue Biotechnologie, die Meer bietet“, Evangelische Akademie der Pfalz, Enkenbach, 02. und 03.07.2004

Von BOSMAN-Mitgliedern wurden bei mehreren nationalen und internationalen Symposien Ergebnisse aus BOSMAN vorgestellt.

II.1.5. Übersicht der wichtigsten Ergebnisse des Verbundprojekts

- Organisation von Forschungsfahrten zur Beprobung von Kalt- und Tiefseeporiferen der nördlichen Hemisphäre und Kultivierung der assoziierten Mikroorganismen
- Taxonomische und lipidchemische Charakterisierung der Kaltwasserporiferen anhand des für den nördlichen und zentralen Atlantik repräsentativen Probenmaterials
- Erstbeschreibung einiger Poriferen-Arten für das Gebiet auf dem mittelnorwegischen Schelf
- Entwicklung und Anwendung von mikroskopischen und lipidchemischen Verfahren zur Charakterisierung der bakteriellen Zelldichte und Diversität in Schwammgewebe
- Erstmalige Aufnahme biochemischer Profile (O_2 , SO_4^{2-}) im Gewebe mittels Mikrosensoren
- Nachweis von Archaeen in verschiedenen Poriferen-Arten und Erstbeschreibung der Archaeen-Dominanz in einer Spezies
- Betrieb von Reaktorsystemen zur kontinuierlichen Kultivierung von Bakteriengemeinschaften aus Poriferen-Gewebe
- Aufbau einer Stammsammlung mit 1.340 Stämmen schwammassoziiierter Bakterien
- Fingerprinting durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur schnellen taxonomischen Einordnung bakterieller Isolate
- 16S rDNA Vergleichsanalysen an BOSMAN-Bakterien zur Auswahl neuer Stämme für weiterführende Analysen
- Phylogenetische (Genomanalyse) und physiologische Beschreibungen neuer kultivierbarer schwammassoziiierter Bakterien
- Etablierung eines PCR-basierten Verfahrens zum Nachweis von PKS- und NRPS-Genfragmenten, sowie der Expression entsprechender Biosynthesegene

- Schnelle und direkte Detektion von Metaboliten durch MALDI-TOF-MS
- Umfassende chemische Strukturaufklärung neuer Naturstoffe in Kaltwasserporiferen
- Aufnahme biologischer Aktivitäten (antibakteriell, antifungisch, herbizid, nematizid, zytotoxisch) in Poriferen und daraus isolierter Bakterien
- Isolierung, Synthese und Strukturidentifizierung neuer, pharmakologisch wirksamer Sekundärmetabolite aus Poriferen-Extrakten
- Isolierung neuer Homoserinlaktone mit ‚Quorum sensing‘-Aktivität und zytotoxischer Wirkung aus kultivierten Bakterien
- Screening der enzymatischen Systeme schwammassoziiertes Bakterien bezüglich ihrer industriellen Verwertung
- Etablierung eines Testsystems basierend auf der überexprimierten Desoxyhypusin Synthase (Dhs) und dem eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF-5A aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* zur Suche von Anti-Malaria-Wirkstoffen

- Einrichtung der Porifera-Datenbank „PORIDAT“
- Publikation von Fachartikeln
- Anmeldung von Patenten

II.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Verbundprojekt BOSMAN II setzte sich aus sieben Gruppen unterschiedlicher Fachrichtungen zusammen, die einen ganzheitlichen methodischen Ansatz zur Aufklärung neuer mariner Naturstoffe in Kalt- und Tiefwasserinvertebraten, erlaubten. Mit Hilfe der interdisziplinären Strategie konnten nicht nur neue biologisch aktive Komponenten aufgeklärt, sondern auch für zukünftige Vorhaben wertvolle Aspekte wie

- I) Allgemeine chemische Merkmale der Sekundärmetabolite in kaltwasseradaptierten Invertebraten
- II) Verteilung bioaktiver Strukturen in marinen Poriferen- und Bakterientaxa
- III) Biodiversität kaltwasseradaptierter Poriferen und assoziierter Bakterien
- IV) Funktion schwammassoziiertes Bakterien für die Sekundärstoffsynthese

untersucht werden. Die Ergebnisse des Verbundprojektes können deshalb im Rahmen eines weiten Spektrums der Grundlagen- und Angewandten Forschung verwertet werden.

Grundlage der effektiven Suche nach Naturstoffen in marinen Organismen ist deren taxonomische Einordnung. In BOSMAN wurde ein umfassendes Inventar kaltwasseradaptierter Poriferen des nördlichen und zentralen Atlantiks taxonomisch bestimmt, ein Standort-Katalog erstellt und Werkzeuge zur raschen Chemotaxonomie von Poriferen entwickelt. Diese Resultate sind hervorragend zur Wiederfindung interessanter Poriferen-Spezies geeignet.

Die chemischen Teilprojekte haben gemeinsam mit den testenden Partnern Bioaktivitäten in Schwammextrakten sowie die Strukturen biologisch aktiver Verbindungen aufgeklärt. Es ist zu vermuten, dass ein Großteil der chemischen Leitstrukturen pharmakologisch interessanter Komponenten im Poriferen-Material erfasst wurde. Aufgrund eingeschränkt verfügbarer Biomasse sind die Arbeiten an einigen Poriferen mit interessanten Strukturen oder Bioaktivitäten aber noch nicht abgeschlossen. Dennoch konnte die Charakterisierung der unter biotechnologischen Aspekten interessanter Schwämme hinreichend vorgenommen werden. Die erzielten Ergebnisse liefern daher wichtige Daten für weiterführende Projekte im Bereich der Naturstoffforschung im Allgemeinen und kaltwasseradaptierter Poriferen im Speziellen.

Bei der pharmazeutischen Forschung besteht eine große Nachfrage nach neuen Naturstoffen. BOSMAN II zeigte, dass kaltwasseradaptierte Poriferen-Bakterien-Gemeinschaften ein den Lebensgemeinschaften in Warmwasserhabitaten vergleichbares Potenzial zur Sekundärstoffsynthese bieten.

Da das Absammeln großer Mengen an Poriferen die sensiblen borealen und polaren Ökosysteme massiv gefährden könnte, die chemische Synthese der Naturstoffe jedoch oft schwierig ist und Schwämme in Aquakulturen langsam oder gar nicht wachsen, muss mittelfristig nach anderen Wegen der Sekundärstoffexploration gesucht werden. Biotechnologische Produktionsverfahren, bei denen Mischkulturen aus Schwamm- und Bakterienzellen zur Naturstoffesynthese stimuliert werden, könnten einen Lösungsansatz bieten. In BOSMAN wurde daher ein Schwerpunkt auf die Erforschung der Interaktionen zwischen Schwamm- und Bakterienzellen, deren Verständnis Grundlage für die Entwicklung solcher Verfahren ist, gelegt.

Ein zentraler Bestandteil der Arbeiten von BOSMAN II waren Bioaktivitäts-Tests an kultivierten schwammassoziierten Bakterien, für die in BOSMAN I und II eine Sammlung mit 1.340 Stämmen angelegt wurde. Für zahlreiche ausgewählte Isolate wurden eine partielle Genomanalyse und ein Fingerprinting mit MALDI-TOF-MS durchgeführt. Die Stammsammlung steht für Folgeprojekte zur wissenschaftlichen Verwertung und für weitere Screenings im Zuge einer wirtschaftlichen Verwertung mit dem Kooperationspartner Novozymes Deutschland GmbH zur Verfügung. Auch die methodischen Strategien zur Isolierung und zur Charakterisierung der phylogenetischen und physiologischen Eigenschaften der Bakterien, sowie deren Ergebnisse sind von erheblichem Nutzen für industrielle marine Erschließungsprojekte.

Die Untersuchungen haben zu einigen neuen bakteriellen Enzymen geführt, die potenziell für industrielle Anwendungen interessant sind. Bislang wurden zwei Patentanmeldungen beim European Patent Office eingereicht, um die neuartigen Enzyme patentrechtlich zu schützen. Alle Enzyme sind in relevanten Produktionstämmen exprimiert, so dass Material für Anwendungsversuche zur Verfügung gestellt werden kann.

In BOSMAN wurden Arbeiten zur Entwicklung eines Bioassays zur Identifizierung von Naturstoffen mit Antimalaria-Aktivität vorangetrieben. Die Untersuchungen haben zur Isolierung und Charakterisierung des plasmodialen *dhs* und *eIF-5A* Gens sowie ihrer Expression in *E. coli* geführt. Es wurde ein Desoxyhypusin Synthase Enzymtest etabliert, mit dem die Aktivitäten der rekombinanten plasmodialen und humanen Desoxyhypusin Synthase unter Verwendung ihrer rekombinanten Protein-substrate, plasmodialem und humanem eIF-5A, bestimmt wurde. Es wurden somit grundlegende Erkenntnisse für die Etablierung eines Anti-Malaria-Wirkstoff-Assays erarbeitet.

Sämtliche BOSMAN-Daten wurden in der projektbezogenen Datenbank PORIDAT systematisch archiviert und verwaltet, so dass sie auch zukünftig leicht zugänglich gemacht werden können.

II.3. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Entfällt für die Projektkoordination; siehe Berichte der Teilprojekte.

II.4. Erfolgte Veröffentlichungen des Verbundprojekts

II.4.1 Dissertationen

Teilprojekt 1

Blumenberg M. (2003) Biomarker aus Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämmen. *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Pape T. (2004) Lipidbiomarker schwammassoziierten Bakterien und Archaeen. *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Holzwarth M. (2005) Untersuchungen zum Primär- und Sekundärstoffinventar von Kaltwasserschwämmen. *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Teilprojekt 2

Hoffmann F. (2003) Microbial sulfate reduction in the tissue of the cold-water sponge *Geodia barretti* (Tetractinellida, Demospongiae). *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. Georg-August-Universität, Göttingen.

Teilprojekt 4

Kaesler I. (2006) Microbial diversity of boreal sponges. *Institut für Technischen Umweltschutz*, Technische Universität, Berlin.

Teilprojekt 6

Sölter S. (2004) Identifizierung und Synthese von Naturstoffen aus borealen Schwämmen. *Institut für Organische Chemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Possner S. (2005) Isolierung und Strukturaufklärung neuer Naturstoffe aus marinen Invertebraten. *Institut für Organische Chemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Fehler K. (2005) Isolierung und Strukturaufklärung von marinen Sekundärmetaboliten aus Kaltwasserschwämmen und Korallen. *Institut für Organische Chemie*. Universität Hamburg, Hamburg.

Teilprojekt 7

Borchert M. S. (2005) Identification, Cloning and Recombinant Expression of Novel Enzymes with Industrial Relevance from a Marine Sponge Associated *Bacillus* Species. *Institut für Technische Mikrobiologie*, Technische Universität Hamburg-Harburg

II.4.2 Fachartikel und Poster (mit BOSMAN-Acknowledgement)

Aus dem Verbundprojekt BOSMAN (I + II) sind folgende Poster und begutachtete Fachartikel veröffentlicht bzw. eingereicht worden:

Nr.	Autor(en)	TP	Titel	Poster, Zeitschrift
1	Schumann-Kindel G., Hoffmann F., Manz W., Reitner J., Szewzyk U.	4	Sponge-associated bacteria in deepwater boreal reefsystems: Part of the BOSMAN project	POSTER - Microbial Aquatic Symbiosis – International Conference, Sept. 1999, Oban, Scotland, UK <i>Sarsia</i> 85, 275-276 (2000)
2	Freiwald A., Mortensen P.B.		The first record of the deep-water coral <i>Stenocyathus vermiformis</i> (Pourtalès, 1868) (Scleractinia, Guyniidae) from Norwegian waters	
3	Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W.	1	A chemical view on ancestral metazoa - biomarker chemotaxonomy of glass sponges	<i>Naturwissenschaften</i> 89, 60-66 (2002) & 89, 233-234 (erratum)
5	Molitor I., Rieck, König G.	3	Deoxyhypusine Synthase - A Potential New Drug Target in <i>Plasmodium falciparum</i>	POSTER - Dechem - Biotechnology – Tagung, Berlin
6	Kaesler I., Wenzel, Graeber I., Schumann-Kindel G., Dieckmann R., von Döhren H., Szewzyk U.	4	Search for natural products in marine environments	POSTER - VAAM – Tagung, Oldenburg,
7	Hühnerbach V., Freiwald A.		Coral Habitat Mapping and Groundtruthing on the Sula Ridge, Norwegian Shelf	EUG XI 'Continental Slope Stability (COSTA) of Ocean Margins, 8-12 April 2001, Strasbourg, France, abstracts, p.748 <i>Journal of Biotechnology</i> 100, 109-118 (2002)
9	Hoffmann F., Rapp H. T., Zöller T., Reitner J.	2	Growth and regeneration in cultivated fragments of the boreal deep water sponge <i>Geodia barretti</i> Bowerbank, 1858 (Geodiidae, Tetractinellida, Demospongiae)	
10	BOSMAN-Projektmitglieder	Koord. (Pape)	Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle	2 POSTER 1. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2001, Frankfurt
11	Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Michaelis W.	1	The steroids of hexactinellid sponges	<i>Naturwissenschaften</i> 89, 415-419 (2002)

Nr.	Autor(en)	TP	Titel	Poster, Zeitschrift
12	Reitner J, Hoffmann F	2	Porifera-Zonierungen in Kaltwasser-Korallenriffen (Sula Rücken, Norwegen)	Biodiversitätsforschung: Die Entschlüsselung der Artenvielfalt in Raum und Zeit, Kleine Senckenberg-Reihe 45. E. Gradstein S.R., Willmann R. Zizka G (Eds.). Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart: 75-87. (2003)
13	Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., Francke W.	6	Barettin, revisited?	<i>Tetrahedron Letters</i> 43, 3385-3386 (2002)
14	von Döhren H., Dieckmann, R.	5	<i>Marine Biotechnology</i>	<i>Euro-Biotech Magazine for Biotechnology</i> , Gentech, Pharmacy, Verlag Büro für Publizistik, Neckarzimmern, Germany, 42-45 (2003)
15	Hoffmann F., Rapp H. T., Pape T., Peters H., Reitner J.	2	Sedimentary inclusions in the deep-water sponge <i>Geodia barretti</i> (Geodiidae, Demospongiae) from the Korsfjord, Western Norway	<i>Sarsia</i> , 89(4), 245-252
16	von Döhren H., Dieckmann R.,	5	Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in the screening for natural products in marine environments	POSTER – Natural products from marine microorganisms - International Conference, Greifswald, Germany, 19-22 June 2002
17	Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Pomponi S., Michaelis W.	1	Lipid specifics of the hexactinellida and the demospongiae - evidence for a close phylogenetic interrelationship?	POSTER - 6 th Sponge Symposium, Genua 2002
18	Pape T., Blumenberg M., Thiel V., Michaelis W.	1	Glycerolethers in marine sponges - biomarkers of Archaea and sulfate-reducing bacteria	POSTER - 6 th Sponge Symposium, Genua 2002
19	BOSMAN - Teilprojekte	Koord. (Pape)	BOSMAN - Boreal sponges as a source of marine natural products	2 POSTER - Statusseminar 2002 - 3 rd ECMNP
20	Sölter S., Fehler K., Possner S., Francke W.	6	New 2-Alkyl-(2H)-furan-3-ones from the Marine Sponge <i>Isops phlegraei</i> SOLLAS	POSTER - Statusseminar 2002 - 3 rd ECMNP
21	Possner S., Fehler K., Sölter S., Rapp T. H., Francke W.	6	New Sesquiterpenes from Deep-Water Invertebrates	POSTER - Statusseminar 2002 - 3 rd ECMNP
23	de Weerd W. H., Hoffmann F., Beglinger E. J.	2	Phylogenetic significance of spined raphides within Haliclona (Haplosclerida, Chalinidae)	POSTER - 6 th Sponge Symposium, Genua 2002 – Abstract p. 210
24	Kaesler I., Graeber I., Szewzyk U.	4	Sponge associated bacteria from boreal sponges	POSTER - 6 th Sponge Symposium, Genua 2002
25	Possner S., Fehler K., Sölter S., Rapp H.T., Francke W.	6	New sesquiterpenes from the marine sponge <i>Phakellia ventilabrum</i>	POSTER - 6 th Sponge Symposium, Genua 2002
26	Bartsch I.		Halacarids (Acari) from coral reefs off Norway, Northern Atlantic: Description of a new <i>Agauopsis</i> species.	<i>Entomologische Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Hamburg</i> 14, 117-123 (2003)
27	Pape T., Blumenberg M., Thiel V., Michaelis W.	1	Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea.	<i>Sponge science in the new millennium</i> , 68 (Ed. by M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi), pp. 509-515. (2003 (2004))
28	Schönberg C., Hoffmann F., Gatti S.	2	Using microsensors to measure sponge physiology	<i>Sponge science in the new millennium</i> , 68 (Ed. by M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi), pp. 593-604. (2003 (2004))
29	Graeber I., Kaesler I., Dieckmann R., von Döhren H., Szewzyk U.	4	Sponge associated bacteria from boreal sponges	<i>Sponge science in the new millennium</i> , 68 (Ed. by M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi), pp. 357-363. (2003 (2004))

Nr.	Autor(en)	TP	Titel	Poster, Zeitschrift
30	Hoffmann F, Janussen D, Dröse W, Arp G, Reitner J	2	Histological investigation of organisms with hard skeletons: a case study of siliceous sponges	<i>Biotechnic and Histochemistry</i> 78 (3-4), 191-199 (2003)
31	Holzwarth M., Trendel J.-M., Albrecht P., Maier A., Michaelis W.	1	Cyclic peroxides derived from the marine sponge <i>Plakortis simplex</i>	<i>Journal of Natural Products</i> (released on-line 22-04-2005)
32	Pape T., Blumenberg M., Seifert R., Michaelis W.	1	Biomarker evidence for a widespread association of Crenarchaeota and ancestral metazoa	POSTER – International Meeting on Organic Geochemistry, Krakau 2003
33	R. Dieckmann, I. Kaesler, I. Graeber, U. Szewzyk and H. von Döhren	5	Rapid screening and dereplication of microbial isolates from marine sponges by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry	POSTER - 16 th International Mass Spectrometry Conference, Edinburgh, Scotland, 2003
34	Fehler K., Rapp H.-T., Francke W.	6	New Sesquiterpenes from the marine Octocoral <i>Primnoa resedaeformis</i> (Gunnerus, 1736)	POSTER International Symposium "Chemistry & Biology of Marine Organisms", Crete, Greece September 2003
35	Possner S., Rapp H.-T., Francke W.	6	New Furanosesquiterpenes from the Octocoral <i>Anthothela grandiflora</i>	POSTER International Symposium "Chemistry & Biology of Marine Organisms", Crete, Greece September 2003
36	Molitor I.M., Knöbel S., Dang C., Spielmann T., Alléra A., König G.M.	3	Translation initiation factor dIF-5A from <i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Molecular and Biochemical Parasitology</i> 137, 65-74 (2004)
37	Hoffmann F., Larsen O., Thiel V., Rapp H.T., Pape T., Michaelis W., Reitner J.	2	An anaerobic world in sponges	<i>Geomicrobiology Journal</i> 22, 1-10 (2005)
38	Hoffmann F., Janussen D., Dröse W., Arp G., Reitner J.	2	Histological investigation of organisms with hard skeleton	POSTER SICB-Meeting, New Orleans, January 2004
39	Fehler K., Possner S., Rapp H.-T., Francke W.	5	Neue Azulene aus marinen Invertebraten	POSTER 16. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V., February 2004
40	Reitner J.	2	Calcifying extracellular mucus substances (EMS) of <i>Madropoa oculata</i> – a first geobiological approach	Freiwald A, Roberts JM (eds), 2005, <i>Cold-water Corals and Ecosystems</i> . Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 731-744
41	R. Dieckmann, I. Kaesler, I. Graeber, U. Szewzyk, H. von Döhren	5	Characterisation of microbial communities isolated from boreal sponges using MALDI-TOF mass spectrometry	POSTER VAAM, Braunschweig, 2004
42	Hoffmann F., Larsen O., Rapp H.-T., Osinga R.	2	Oxygen dynamics in choanosomal sponge explants	<i>Marine Biology Research (in press)</i>
43	Hoffmann F., Larsen O., Thiel V., Rapp H.T., Pape T., Michaelis W., Reitner J.	2	An anaerobic world in sponges	POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt
44	Graeber I., Kaesler I., Dieckmann R., von Döhren H., Szewzyk U.1	4	Sponge Associated Bacteria from Boreal Sponges – Sources of Marine Natural Products	POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt
45	Borchert M., Wilting R., Nielsen P., Antranikian G., Szewzyk U, Schäfer T.	7	Transposon assisted signal trapping - the discovery of secreted proteins in BOSMAN isolate <i>B. gibsonii</i> P203 from <i>Plakortis</i> sponge	POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt
45b	Borchert M., Wilting R., Nielsen P., Antranikian G., Szewzyk U, Schäfer T.	7	Transposon assisted signal trapping - the discovery of secreted proteins in isolate <i>Bacillus sp.</i> P203 from <i>Plakortis simplex</i> sponge	POSTER 'biocat2004', Hamburg
45c	Borchert M., Wilting R., Nielsen P., Antranikian G., Szewzyk U, Schäfer T.	7	Transposon assisted signal trapping - the discovery of secreted proteins in isolate <i>Bacillus sp.</i> isolated P203 from <i>Plakortis simplex</i> sponge	POSTER 'bioperspectives' 2005, Wiesbaden

Nr.	Autor(en)	TP	Titel	Poster, Zeitschrift
46	BOSMAN-members	Koord. (Pape)	BOSMAN – Boreal sponges as sources of marine natural products	2 POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt
47	Kaesler I., Graeber I., Szewzyk U.	4	Microbial Diversity of Boreal Sponges	POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt
48	H. Gross, J. Reitner, G. M. König	3	Isolation and structure elucidation of Azoricasterol, a new sterol of the deep sea sponge <i>Macandrewia azorica</i>	<i>Naturwissenschaften</i> 91:441-446
49	Dieckmann R., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U., von Döhren H.	5	Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS)	<i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> 67 (4), 539-548
50	Hoffmann F., Rapp H.-T., Reitner J.	2	Temporal variation of the microbial community associated with the marine cold-water sponge <i>Geodia barretti</i> during cultivation	<i>Marine Biotechnology</i> (im Druck)
51	Dieckmann R., López-Legentil S., Turon X., von Döhren H.	5	Direct rapid chemotyping of minute samples from tunicates, marine sponges and associated bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry	POSTER - International Symposium on Marine Natural Products, Sorrento – Italy; 04.-09.09.04
53	Huehnerbach V., Blondel P., Huvenne V.A.I., Freiwald A.		Habitat mapping of a deep-water coral reef off Norway, with a comparison of visual and computer-assisted methods to interpret sidescan sonar data	In: B. Todd & H.G. Greene (eds.) - Characterization and Mapping of Seafloor Conditions for the Use of Habitat Delineation Based on the Latest Technologies and Methodologies. Geological Society of Canada, Special Publication (in press)
54	Pape T., Hoffmann F., Queric N.-V., von Juterzenka K., Reitner J., Michaelis W.	1	Dense populations of Archaea associated with the hadromerid demosponge <i>Tentorium semisuberites</i> from polar deep waters	<i>Polar Biology</i> (im Druck)
55	Borchert M., et al.	7	Marine <i>Bacillus plakortidis</i> , sp. nov., and <i>Bacillus murimartini</i> sp. nov., novel members of alkalitolerant rRNA group 6	<i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>

Tab. II.4.2 Übersicht der begutachteten Publikationen und Poster aus der Koordination und den Teilprojekten

	Publikationen (begutachtet)	Poster
Koordination	-	6
TP 1	5	3
TP 2	9	3
TP 3	2	1
TP 4	1	5
TP 5	2	5
TP 6	1	5
TP 7	1	3
Weitere	3	1
	24	32

III. Erfolgskontrollbericht

III.1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Die Ziele des Verbundprojekts ‚BOSMAN – Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle‘ orientierten sich vollständig an den förderpolitischen Zielen des BMBF und des Schwerpunktprogramms ‚Marine Naturstoffforschung‘.

Die **Teilprojekte 1** (*Naturstoffe aus Porifera und assoziierten Mikroorganismen borealer Habitate*) und **6** (*Identifizierung und Synthese biologisch aktiver Sekundärmetabolite aus Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen*) haben einen wesentlichen Beitrag zur Aufnahme biologischer Aktivitäten in borealen Poriferen und zur Strukturaufklärung biologisch wirksamer Komponenten und/oder solchen mit besonderen chemischen Strukturmerkmalen geleistet. Mit der Entwicklung neuer chemischer Methoden und Interpretationsansätzen haben die Teilprojekte zur Erschließung mariner Poriferen, Bakterien und Archaeen als Naturstoffquelle beigetragen.

Der Einsatz der biologischen Testsysteme des **IWBF e.V.** und der **Oncotest GmbH** hat sich dabei als außerordentlich effektives Auswahlverfahren zum Auffinden von Wirkstoffen erwiesen.

Teilprojekt 2 (*Geobiologie und Biodiversität arktischer Porifera*) leistete mit den Arbeiten zur Biodiversität, Taxonomie und Phylogenie der Porifera sowie der Untersuchung von Benthos-Lebensgemeinschaften einen erheblichen Beitrag zur Erforschung der Struktur und Funktion mariner Lebensräume. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Erfassung der Biodiversität mariner Benthosgemeinschaften, worauf im BMBF-Schwerpunkt „Meeresforschung“ hingewiesen wurde. Im zweiten Bewilligungszeitraum wurden die Untersuchungen auf arktische Arten ausgeweitet, was im Programm „Polarforschung“ ausdrücklich angefordert wurde.

Die Untersuchungen und Arbeiten des **Teilprojekts 3** (*Pharmazeutisches Potenzial mikrobieller mariner Naturstoffe*) geben einen Überblick über das pharmazeutische Potential mariner Mikroorganismen, die von borealen Schwämmen isoliert wurden. Endobionten borealer Habitate sind bisher weitgehend unerforscht geblieben. Es konnten einige biologisch aktive Naturstoffe isoliert und charakterisiert werden.

Im **Teilprojekt 4** (*Mikrobiologie von Porifera aus Kaltwasser-Riffsystemen*) wurden im Sinne des Schwerpunktprogramms eine umfangreiche Stammsammlung psychrophiler mariner Bakterien angelegt, die für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Produktion von Naturstoffen bereitstanden und -stehen.

Im **Teilprojekt 5** (*Naturstoffscreening und Syntheseleistungen in Kaltwasser-Porifera und ihren Symbionten*) wurden im Sinne des Schwerpunktes Screening-Verfahren etabliert, die auf der Methodik der MALDI-TOF Massenspektrometrie beruhen.

Das **Teilprojekt 7** (*Identifizierung neuer industriell verwertbarer Enzyme aus schwamm-assoziierten Mikroorganismen*) untersuchte die industrielle Verwertung der bislang unzureichend identifizierten schwammassoziierten Bakterienarten. Dieses Potenzial zur Eignung als wirtschaftliche Quelle wurde durch das Teilprojekt überprüft und teilweise genutzt.

III.2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis, erreichte Nebenergebnisse, Erfahrungen

Die Ergebnisse der Teilprojekte sind ausführlich in Fachartikeln, Patentanmeldungen und Dissertationen dargestellt. An den Zuwendungsgeber wurden die jeweils aktuellen Ergebnisse halbjährlich berichtet und in den vorliegenden Abschlussberichten der Teilprojekte zusammengefasst. Wichtigste wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Verbundprojektes sind:

- Beprobung und taxonomische Einordnung borealer und arktischer Poriferen
- Chemotaxonomische Charakterisierung der Poriferen
- Inventarisierung der biologischen Aktivität in Extrakten, Fraktionen und Reinstoffen aus allen BOSMAN-Poriferen und ausgewählten schwammassoziierten Bakterien
- Charakterisierung der Dichte und der Phylogenie von Mikroorganismen im Gewebe von Poriferen

- Beschreibung der Poriferen-Mikroorganismen-Interaktionen
- Aufbau einer Stammsammlung mariner, psychrophiler Bakterien
- Entwicklung hochsensitiver und rascher Verfahren, die aus wenigen intakten Bakterienzellen sowohl niedermolekulare Substanzen detektieren, wie auch eine phylogenetisch gerichtete Dereplikation ermöglichen
- Isolierung neuer Homoserinlactone aus schwammassoziierten Bakterien
- Klonierung des plasmodialen Desoxyhypusin-Synthase Gens, heterologe Expressierung und Etablierung eines Enzymassays
- Erfassung des Potenzials schwammassoziiertes Bakterien als neue Enzymproduzenten

Wesentliche in den Teilprojekten gesammelte Erfahrungen sind in den jeweiligen Abschlussberichten beschrieben worden.

III.3. Fortschreibung des Verwertungsplans

III.3.1. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Im Rahmen von BOSMAN II sind zwei Patentanmeldungen von Mitarbeitern des TP 7 beim Europäischen Patentamt eingereicht worden:

1. Titel: Polypeptides of strain Bacillus sp P203
Erfinder: Borchert, Nielsen, Wilting
Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10807.000-DK
2. Titel: Novel Subtilases from Bacillus gibsonii like bacilli
Erfinder: Borchert, Nielsen
Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10798.000-DK

III.3.2. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Viele Teilergebnisse des Verbundprojektes sind für eine zukünftige industrielle Nutzung hervorragend geeignet, sodass die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten nach Projektende als sehr gut zu prognostizieren sind. Als wichtigste Beispiele können

- die Aufklärung neuer pharmakologisch interessanter Sekundärstoffe in Schwämmen und Bakterien,
- die Anwendung neuer Strategien zur Kultivierung von Poriferen unter Laborbedingungen,
- die Entwicklung neuer Verfahren zur Kultivierung schwammassoziiertes Bakterien und der Aufbau einer Bakterien-Stammsammlung,
- die Arbeiten zur Etablierung eines Anti-Malaria-Wirkstoff-Assays und
- die Isolierung neuer bakterieller Enzyme mit Anwendungspotenzial bei industriellen Verfahren

genannt werden.

III.3.3. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Für viele wissenschaftliche Aspekte der marinen Naturstoffforschung an Kaltwasserorganismen sind im Verbundprojekt neue Erkenntnisse, die erheblich zum Verständnis der Synthesemechanismen von Sekundärstoffen beitragen, erarbeitet worden. Die wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten nach Projektende von BOSMAN sind daher als günstig anzusehen.

In BOSMAN wurde ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der ökologischen Funktion mariner borealer Tiefseehabitate geleistet. Die Daten bieten sich daher für eine wissenschaftliche Nutzung durch Forschergruppen, die im Bereich der Marinen Naturstoffforschung tätig sind, an. In BOSMAN wurden umfassende Datensätze zu Taxonomie und Habitat von Kaltwasserporiferen, Diversität und Interaktionen assoziierter Mikroorganismen, Strukturen der Sekundärstoffe und Auftreten biologischer Aktivitäten erarbeitet, die als Grundlagen für Konzepte zukünftiger Forschungsprojekte genutzt werden können. Diese Daten sind in der BOSMAN-Datenbank ‚PORIDAT‘ systematisch archiviert und leicht recherchierbar.

Diverse Methoden wurden zur Kultivierung von Poriferen und Bakterien, zur Charakterisierung der mikrobiellen Populationen, zur Bestimmung von Metaboliten und zur Strukturaufklärung von Wirkstoffen entwickelt. Eine umfassende Stammsammlung mariner Bakterien, die auch für zukünftige Untersuchungen zur Verfügung steht, wurde angelegt und für ausgewählte Stämme eine partielle Genomanalyse durchgeführt. Die bei Methodenoptimierungen entwickelte wissenschaftliche Expertise wird auch bei zukünftigen Projekten genutzt.

Infolge der ungebrochenen Nachfrage nach neuen Anti-Malaria-Wirkstoffen sind auch die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten für die Etablierung eines Anti-Malaria-Assays als sehr hoch zu bewerten.

III.3.4. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ist für viele BOSMAN-Ergebnisse gegeben. In den chemischen Teilprojekten sind einige Wirkstoffe isoliert und strukturell aufgeklärt worden, für die die Marktfähigkeit sehr zeitnah überprüft werden soll. Zwar sind die Arbeiten zur Strukturaufklärung von Wirkstoffen in einigen Teilen noch nicht abgeschlossen, aber auf Basis der erzielten Ergebnisse können zukünftig kaltwasseradaptierte Poriferen gezielt gesammelt und bearbeitet werden. Für einige ausgewählte Mikroorganismen bzw. aus ihnen isolierte Sekundärmetabolite und Enzyme ist bereits heute ein hohes Anwendungspotenzial erkennbar. Jedoch kann ein Zeitrahmen für die noch notwendigen Arbeiten nicht prognostiziert werden.

III.4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Entfällt für die Projektkoordination; siehe Teilprojekte.

III.5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Ergebnisse der Teilprojekte wurden und werden in begutachteten Fachartikeln und Dissertationen publiziert und auf nationalen und internationalen Fachtagungen präsentiert. Die relevanten chemischen und mikrobiologischen Ergebnisse sind in der projektbezogenen Datenbank ‚PORIDAT‘ abgelegt.

III.6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die Verzögerungen und zusätzlichen Arbeiten zu Beginn von BOSMAN II konnten in der Projektlaufzeit überwiegend kompensiert werden. Daher konnten der Ausgaben- und der Zeitplan der Koordination und der Teilprojekte entsprechend der Angaben im Projektantrag im Wesentlichen eingehalten werden. Teilweise sind Isolierungsarbeiten und einzelne Test bzw. Analysen für Reinstoffen noch in Bearbeitung. Publikationen zu den physiologischen Eigenschaften neuer schwammassoziierter Bakterien sind noch in Arbeit, da die Experimente an den Isolaten noch nicht abgeschlossen sind. Die Mittel für die Untersuchungen am Korsfjord (Ausfahrten, Unterkunft, Reisekosten, Labornutzung) wurden durch Stipendien der EU bereitgestellt.

A.1. Arbeiten des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung e.V. (IBWF),

Prof. Dr. Heidrun Anke,
Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung e.V.
Erwin-Schrödinger-Str. 56
67663 Kaiserslautern, Germany

A.1.1. Aufgaben des IBWF

1. Testung von Schwammextrakten auf antibakterielle, antifungische, herbizide, nematizide sowie cytotoxischen bzw. cytostatische Wirkungen
2. Testung von Schwammextrakten auf Wirkung in verschiedenen Signaltransduktionswegen: NF- κ B abhängigen Signaltransduktion, IFN- γ abhängigen Signaltransduktion, IL-6 abhängigen Signaltransduktion, IL-4 abhängigen Signaltransduktion, sowie in Reporterassays mit natürlichem humanen TNF- α Promoter und natürlichem humanen COX-2 Promoter.
3. Anzucht mariner Bakterien, Herstellung von Extrakten aus diesen Kulturen sowie Testung der Extrakte auf antibakterielle, antifungische, herbizide, nematizide sowie cytotoxischen bzw. cytostatische Wirkungen
4. Fraktionierung von biologisch aktiven Schwamm- und Bakterien-Extrakten zur schnellen Identifizierung der aktiven Komponenten.

A.1.2. Beschreibung der Testsysteme

1. Antibakterielle Aktivität wurde im Agardiffusionstest mit drei Gram-positiven und zwei Gram-negativen Bakterien getestet. Unter den Teststämmen befanden sich auch pathogene Arten wie *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* und *Acinetobacter calcoaceticus*.
2. Antifungische Aktivität wurde ebenfalls im Agardiffusionstest mit fünf Pilzen ermittelt, darunter humanpathogene wie *Candida albicans* und phytopathogene wie *Fusarium solani*
3. Herbizide/phytotoxische Aktivität wurden im Keimungstest mit einer monokotyloiden Pflanze (*Setaria italica*) und einer dikotyloiden (*Lepidium sativum*) geprüft. An den Keimlingen wurden auch chlorotische Effekte beobachtet.
4. Nematizide Wirkungen wurden im Mikrotiterplattentest mit dem saprophytischen Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* ermittelt, der auch als Modellorganismus für anthelmintische Wirkungen herangezogen werden kann.
5. Cytotoxische/cytostatische Wirkungen wurden mit drei humanen Zell-Linien getestet. HeLa S3-Zellen (Cervixcarcinom), Jurkat-Zellen (akute T-Zell Leukämie) und HepG2-Zellen (Lebercarcinom). Während HeLaS3-Zellen einen Monolayer bilden, wachsen die beiden anderen Zell-Linien als Suspension. Diese drei Zell-Linien werden auch in den Reporterassays eingesetzt.

Reporterassays

1. NF- κ B (nuclear factor κ B) abhängige Signaltransduktion

Indikation: Entzündung, Asthma

Zur Suche nach Inhibitoren der NF- κ B abhängigen Signaltransduktion wurden Vektore konstruiert, die das Reporter SEAP (sekretierbare alkalische Phosphatase) unter der Kontrolle von fünf Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz in HeLa S3 Zellen exprimieren. Der Einfluß von Testsubstanzen auf einzelne Komponenten der an der NF- κ B abhängigen Signaltransduktion kann durch Stimulation mit verschiedenen Induktoren (TPA, TNF- α , LPS, Okadaic acid) in Gelshift-Assays oder Westernblots untersucht werden. Dieses System eignet sich gut für die Untersuchung auch größerer Mengen von Kulturextrakten. In Folgetests kann die Expression einiger an

Entzündungsprozessen beteiligter Enzyme (iNOS, COX-2, cPLA₂, 5-LO) in den entsprechenden Zelllinien (z. B. Jurkat) nachgewiesen werden.

2. IFN- γ (Interferon γ) abhängige Signaltransduktion

Indikation: Entzündung

Zur Suche nach Inhibitoren der IFN- γ abhängigen Signaltransduktion wurden Vektore konstruiert, die das Reportergen SEAP unter der Kontrolle von fünf Kopien der GAS/ISRE (Interferon γ aktivierte Sequenz/Interferon responsive element) Konsensussequenz in HeLa S 3 oder HepG2 Zellen exprimieren. Elektroporation von HeLa S3 Zellen mit diesen Vektoren und Stimulation mit IFN- γ resultiert in einer 8-10-fachen Steigerung der SEAP-Aktivität gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle. Diese Systeme eignen sich gut für die Untersuchung auch größerer Mengen von Kulturextrakten. In Folgetests kann die Phosphorylierung der STAT-Proteine mit Westernblots und die Bindung der STAT-Transkriptionsfaktoren an die DNA mittels Gelshift-Experimenten nachgewiesen werden.

3. IL-6 (Interleukin 6) abhängige Signaltransduktion (STAT3, signal transducer and activator of transcription)

Indikation: Acute phase response

Zur Suche nach Inhibitoren der IL-6 abhängigen Signaltransduktion wurden Vektore konstruiert, die das Reportergen SEAP unter der Kontrolle von acht Kopien der IRF STAT3-Konsensussequenz in HepG2 Zellen exprimieren. Elektroporation von HepG2 Zellen mit diesen Vektoren und Stimulation mit Il-6 resultiert in einer 8-10-fachen Steigerung der SEAP-Aktivität gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle. Diese Systeme eignen sich gut für die Untersuchung auch größerer Mengen von Kulturextrakten.

4. IL-4 abhängige Signaltransduktion (STAT6)

Indikation: Allergien

Zur Suche nach Inhibitoren der IL-4 abhängigen Signaltransduktion wurden Vektore konstruiert, die das Reportergen SEAP unter der Kontrolle von sechs Kopien der N4-C/EBP-Konsensussequenz in HepG2-Zellen exprimieren. Elektroporation von HepG2 Zellen mit diesen Vektoren und Stimulation mit IL-4 resultiert in einer 8-10-fachen Steigerung der SEAP-Aktivität gegenüber der nicht-induzierten Kontrolle. Daneben kann die Expression des Reportergens durch Kotransfektion mit einem Vektor, der für das humane STAT6 Protein kodiert, gesteigert werden. Diese Systeme eignen sich gut für die Untersuchung auch größerer Mengen von Kulturextrakten.

5. NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) abhängige Signaltransduktion

Indication: Immunmodulation

NF-AT steuert die Produktion von IL-2. In diese Signalkette greift z. B. Cyclosporin A ein. Der Reportergenvektor pGE3-NF-AT/IL-2 wurde in Jurkat-Zellen exprimiert. Die Induktion erfolgte mit TPA (12-O-Tetradecanoylphorb-13-acetat) und Ionomycin.

6. Reportergen-Assays mit humanen natürlichen Promotoren

Reportergen-Assays, die das Reportergen (SEAP) unter der Kontrolle des humanen TNF- α (Tumor necrosis factor- α) Promotors und des COX-2 (Cyclooxygenase 2) Promotors in Jurkat-Zellen exprimieren. In Westernblots, RT-PCR und ELISA's kann die Expression entzündungsunterhaltender Cytokine bzw. Enzyme (COX-2, iNOS induzierbare NO-Synthase) nachgewiesen werden.

TNF- α Überexpression spielt bei Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, Morbus Crohn, Psoriasis u.a.), bei Entstehung von Tumoren (T-Zell Leukämie, Lungencarcinom u.a.), bei Infektionskrankheiten (TB, Hepatitis C, Lepra, Sepsis u.a.) sowie bei Asthma, Herzkreislauferkrankungen eine zentrale Rolle.

Cytotoxische Extrakte können zu falsch Positiven im Screening führen. Da in den Reportergeratests relativ geringere Extraktmengen eingesetzt werden, können auch Extrakte mit mäßiger Cytotoxizität, in entsprechender Verdünnung getestet werden. Daher ist es unerlässlich vor diesen Tests die Cytotoxizität der Extrakte zu bestimmen. Daher wurden die ursprünglich mit zwei Zell-Linien geplanten Cytotoxizitätstest auf drei erweitert.

Alle aufgeführten Testsysteme mit Reportergeraten sind bereits am IBWF erfolgreich im Naturstoff-Screening eingesetzt worden und haben zu aktiven Pilzmetaboliten geführt.

A.1.3. Durchgeführte Arbeiten und erzielte Ergebnisse

A.1.3.1. Schwammextrakte

Während des Projektes wurden 139 Proben aus Schwämmen, die von den Arbeitsgruppen Prof. Michaelis und Prof. Franke zur Verfügung gestellt wurden, in allen Testsystemen geprüft. Allerdings konnten stark cytotoxische Extrakte nicht in den Reportergeratassays eingesetzt werden (s. o.). Von den mäßig cytotoxischen Extrakten wurden 1:10 Verdünnungen hergestellt und die verdünnten Proben, die nicht mehr cytotoxisch waren, in die Tests eingesetzt. Extrakte, die keine Cytotoxizität zeigten, wurden unverdünnt getestet.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die cytotoxische Aktivitäten in den Schwammextrakten überwiegen. Dies kommt auch in den durchgeführten Fraktionierungen (s. u.) zum Ausdruck. Von den 17 HPLC-Trennungen mit anschließender biologischer Testung wurden 12 mit Jurkat-Zellen und eine mit HeLa S3-Zellen durchgeführt. Vier Fraktionierungsergebnisse erfolgten mit antifungischen Tests (drei mit *Nematospira coryli* und eine mit *Mucor miehei*). Sehr erfreulich war die gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Cytotoxizitäts-Tests zwischen Oncotest und IBWF.

In den Reportergeratassays zeigten einige nicht cytotoxische Extrakte zunächst interessante Aktivitäten, die leider bei der Aufreinigung verloren gingen. Ob es sich dabei um synergistische Effekte gehandelt hat, läßt sich nicht abschätzen.

Sechs angereicherte Fraktionen von Schwämmen, die durch cytotoxische Aktivitäten auffielen und die im Arbeitskreis von Prof. Franke bearbeitet wurden, wurden mittels HPLC in Mikrotiterplatten fraktioniert und die jeweils 96 Fraktionen erneut auf cytotoxische Wirkungen gegen Jurkat-Zellen getestet. Die cytotoxische Aktivität in den Extrakten konnten definierten „Peaks“ zugeordnet werden. Die Isolierung der detektierten Substanzen wurde im Arbeitskreis Franke durchgeführt.

Für den Arbeitskreis Michaelis wurden insgesamt elf HPLC-Fraktionierungen durchgeführt. Sieben der zu trennenden Fraktionen zeigten cytotoxische und vier antifungische Aktivitäten.

Aus dem Butanol-Extrakt aus *Spongosorites genitrix* wurden mittels präparativer HPLC an RP-18 LiChrosorb drei Verbindungen mit cytotoxischer Aktivitäten isoliert. Die LD₅₀-Werte für HeLa S3-Zellen lagen bei 5 µg/ml (Substanz 1), 10 µg/ml (Substanz 2) und 15 µg/ml (Substanz 3). Substanz 2 zeigte zusätzlich schwache antibakterielle Aktivität.

Mit zwei Fraktionen aus *Plakortis simplex* wurden erste „activity-guided“ Reinigungsschritte durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß selbst nach mehreren HPLC-Schritten die aktiven Fraktionen immer noch mehrere Komponenten enthielten. Da die Substanzmengen der aktiven Fraktionen sehr gering waren, war abzusehen, daß in keinem Fall die für eine chemische und/oder biologische Charakterisierung ausreichende Menge an Reinsubstanz erhalten werden konnte. Daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

Tab. A.1.3.1. Gesamtübersicht im Arbeitspaket „Schwammextrakte“ durchgeführten Tests

Aktivität	Anzahl der durchgeführten Tests	Anzahl der Tests im Angebot
Antibakteriell	676	2500
Antifungisch	953	2500
Nematizide	152	500
Phytotoxisch	139	500
Cytotoxisch	2061	1000
Reportegenassay	988	2500

A.1.3.2 Screening mariner Bakterien

Im Laufe des Projektes wurden 333 Kulturen von Bakterien, die die Arbeitsgruppe von Prof. Szewzyk, Berlin, zur Verfügung gestellt hat, in 2-L Erlenmeyerkolben (1 seitlicher Einstich, 800 ml Inhalt) durchgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug 22 °C, die Schüttelgeschwindigkeit 150 upm. Zusätzlich wurden 58 Kolben zur Reproduktion der gefundenen Aktivitäten angesetzt und 32 Fermentationen im 20-l Maßstab durchgeführt.

Die Bakterien wurden zunächst in drei bis vier verschiedenen Medien angezüchtet und täglich eine Probe genommen, von der die optische Dichte sowie der pH-Wert gemessen wurde. Die Kulturen wurden geerntet sobald der pH-Wert über 8 lag oder die OD nicht mehr zunahm. Die Inkubationszeiten variierten zwischen zwei und neun Tagen. Die Kulturen wurden lyophilisiert und ein Teil des Lyophilisats anderen Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Der Rest wurde extrahiert und der Extrakt auf eine Konzentration von 25 mg/ml (bei Kulturen mit HP21 35 mg/ml) eingestellt und getestet.

Bei einem Teil der Bakterien wurde dem Medium zusätzlich HP21 Adsorberharz zugegeben. Bei diesen Kulturen wurde das Harz am Ende der Fermentation gewaschen und mit Aceton extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde entfernt und der verbleibende wäßrige Rückstand mit Ethylacetat extrahiert und nach Entfernen des Lösungsmittels in Methanol aufgenommen.

Tab. A.1.3.2. Gesamtübersicht im Arbeitspaket „Marine Bakterien“ durchgeführten Tests

Aktivität	Anzahl der durchgeführten Tests	Anzahl der Tests im Angebot	zusätzl. Tests bei der Fraktionierung
Antibakteriell	2406	2500	480
Antifungisch	2395	2500	672
Nematizide	978	500	1056
Phytotoxisch	620	500	0
Cytotoxisch	2240	1000	960

A.1.3.3. Isolierung und Charakterisierung aktiver Substanzen aus Bakterien-Kulturen**Bos-A 154**

BOS A154 wurde in 20-l Fermenter mit und ohne HP21 kultiviert zusätzlich wurden Schüttelkulturen als Vergleich angesetzt. Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat extrahiert und eingengt. Ausbeute an Rohextrakt am Ende der Fermentation: 1.9 g. Der Extrakt zeigte gute

nematizide Aktivität. Der Rohextrakt wurde mittels HPLC fraktioniert und getestet. Die Testung der Fraktionen und MS-Analyse ergaben, daß es sich bei den aktiven Peaks um Myristinsäure und Palmitoleinsäure handelt. Beide Säuren waren schon früher in unserem Screening mit Pilzen durch nematizide Aktivität aufgefallen. Die Aktivität in den Kolben und in den Fermentern (mit und ohne HP21) war auf die gleichen Verbindungen zurückzuführen, lediglich der Gehalt der beiden Säuren war etwas unterschiedlich.

Bos-A94

Im Screening zeigte der Extrakt antibakterielle, antifungische und cytotoxische Aktivität. Fermentation in LB-Medium ergab, daß die antibakterielle Aktivität bereits nach einem Tag zu detektieren ist, während die antifungische Aktivität nicht mehr wiedergefunden wurde. Die Bearbeitung wurde zurückgestellt.

Bos-A125

Der Stamm ist als Produzent von cytotoxischen Substanzen aufgefallen. Der Fermenterextrakt zeigte leider nur ganz geringe Aktivität und wurde daher nicht weiter bearbeitet.

Bos-A158

Extrakte dieses Bakteriums zeigten antifungische Aktivität. Bei der ersten Fermentation konnte die Aktivität nicht wiedergefunden werden. Der Vergleichskolben, der parallel zum Fermenter inkubiert wurde, zeigte auch keine Aktivität. Daher wurde die Bearbeitung zurückgestellt.

Bos-A30

Im Screening zeigten Extrakte dieses Stammes die höchsten Aktivitäten. Sowohl Bakterien, Pilze als auch *Caenorhabditis elegans* und das Wachstum von Zellkulturen wurden gehemmt. Bislang wurden zwei Fermentationen in Medium mit HP21 und zwei in Medium ohne Harz durchgeführt. Parallel wurden acht Erlenmeyerkolben angesetzt. Dabei zeigten nur die Kulturen in Medium mit HP21 antifungische Aktivität. Die Aktivität erscheint sowohl im Kolben als auch im Fermenter erst nach vier bis sechs Tagen. Mit den Rohextrakten aus Kolben wurden verschiedene HPLC-Fraktionierungen vorgenommen und mit Jurkat-Zellen, *C. elegans* und Pilzen getestet.

Bos-A164

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter mit HP21 bei 22 °C mit 150 upm und 4,5 l Luft/min angezogen. Der Fermenter wurde mangels Aktivität nicht aufgearbeitet.

Bos-A151

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und Kolben mit HP21 bei 22 °C angezogen. Die Tagesproben waren aktiv gegen *C. elegans*. Der Fermenter wurde darauf hin aufgearbeitet. Der Kolbenextrakt war zusätzlich noch cytotoxisch. Es wurden mit den Proben aus dem Fermenter und den Kolben Fraktionierungen (*C. elegans* und Jurkat-Zellen) durchgeführt.

Bos-A156

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und in Kolben mit HP21 bei 22 °C angezogen. Es wurden vier Fraktionierungen mit den Proben mit Tests gegen Jurkat-Zellen, *Nematospora corylii* (Kolben- und Fermenterextrakt) und *Bacillus brevis* durchgeführt.

Ein zweiter Fermenter mit den gleichen Bedingungen zeigte Aktivität gegen *B. brevis*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *N. corylii*, *Mucor miehei* und *Fusarium .solani*. Der Extrakt (440 mg) wurde an die Arbeitsgruppe Prof. König nach Bonn geschickt.

Bos-A169

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter (Medium ohne HP21) bei 22 °C mit 150 upm und 4,5 l Luft /min angezogen. Die Tagesproben waren aktiv gegen *C. elegans*. Der Fermenter wurde aufgearbeitet,

als die Aktivität nicht mehr zunahm. Leider war der Extrakt dann nur noch schwach aktiv und die HPLC-Analyse deutete auf Fettsäure hin.

Der Stamm wurde auch im Fermenter mit HP21 bei 22 °C kultiviert. Der Fermenter wurde nicht aufgearbeitet, da die Tagesproben nur ganz schwach aktiv waren.

Bos-A66

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und Kolben ohne HP21 kultiviert. Da keine der Tagesproben aktiv war, wurde der Fermenter nicht aufgearbeitet.

Bos-A127

Auch bei diesem Stamm waren die täglichen Proben aus dem Fermenter und den Kolben nicht aktiv. Der Fermenter wurde verworfen.

Bos-A148

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter mit HP21 und in Kolben bei 22 °C kultiviert. Es wurden vier Fraktionierungen mit Testung gegen *Nematospora corylii* (drei Extrakte) und *C. elegans* durchgeführt. Die Fermenterprobe wurde mittels präparativer HPLC aufgetrennt.

Bos-A175

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter mit HP21 bei 22 °C angezogen. Da die letzte Tagesprobe (nach neun Tagen) des Fermenters nematizide Wirkung zeigte, wurde damit eine Fraktionierung mit Tests gegen *C. elegans* durchgeführt. Die Aktivität war auf mehrere schwach aktive Peaks verteilt. Die Probe wurde mittels präparativer HPLC getrennt, die Mengen in den einzelnen Fraktionen waren zu gering für eine exakte Charakterisierung, die Ergebnisse der analytischen HPLC deuteten jedoch auf Fettsäuren hin. Der Fermenter wurde nicht aufgearbeitet.

Bos-A156

Bei der ersten Fermentation mit HP21 wurde festgestellt, daß die antibakterielle und antifungische Aktivität im Laufe der Fermentation wieder verschwindet. Es wurden drei weitere 20-l Fermentationen mit HP21 durchgeführt, die zu einem früheren Zeitpunkt geerntet wurden. Ausbeuten: F1 → 430 mg, F2 → 350 mg, F3 → 274 mg.

Die Extrakte aus allen drei Fermentern wurden nach Bonn geschickt.

Mit einem der Rohextrakte (F1) wurden zwei Fraktionierungen mit Hela S3-Zellen und mit *C. elegans* durchgeführt, da die Tagesproben zusätzlich cytotoxische und nematizide Aktivitäten zeigten. Bei der Fraktionierung zeigte ein relativ breiter Bereich cytotoxische Aktivität, die nematizide Aktivität konnte nicht mehr detektiert werden. Eventuell verteilte sich die Aktivität auf mehrere Fraktionen.

Erneute Kultivierung im Kolben erbrachte keine cytotoxische oder nematizide Wirkungen.

Bos-A105

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben bei 22 °C kultiviert. Da keine der Tagesproben aktiv war, wurde der Fermenter nicht aufgearbeitet.

Bos-A174

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben bei 22 °C kultiviert. Die letzte Tagesprobe zeigte bei 62,5 µg/ml gegen Jurkat-Zellen schwache cytotoxische Wirkung, der Kolbenextrakt war nur unwesentlich aktiver, der Fermenter wurde daher nicht aufgearbeitet.

Bos-A106

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter mit LBmarin Medium bei 22 °C mit 150 upm und 4,5 l Luft/min angezogen. Der Fermenterextrakt wurde nach Bonn geschickt.

Bos-A106

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben mit HP21 bei 22 °C angezogen. Beide Rohextrakte zeigten cytotoxische (Jurkat- und Hela S3-Zellen) und nematizide Wirkungen. Es wurden zwei Fraktionierungen (Kolben- und Fermenter-extrakt) mit Testung gegen Jurkat-Zellen durchgeführt. Dabei wurde bei einem breiten Bereich im Chromatogramm cytotoxische Aktivität gefunden. In der LC/MS wurden neben mehreren Substanzpeaks ein Indolderivat und verschiedene Fettsäuren identifiziert, letztere waren für die nematizide Wirkung verantwortlich. Der Fermenter wurde zur weiteren Bearbeitung der cytotoxischen Aktivitäten nach Bonn geschickt.

Bos-A107

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben kultiviert. Beide Rohextrakte zeigten keine biologischen Aktivitäten und wurden daher verworfen.

Bos-A162

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben mit HP21 bei 22 °C angezogen. Mit der Probe aus dem Kolben wurde zwei Fraktionierungen mit *Proteus vulgaris* und *Nematospora corylii* gemacht. Bei *P. vulgaris* wurde die Aktivität in einer Fraktion wiedergefunden, der jedoch kein Substanzpeak zugeordnet werden konnte. Die antifungische Aktivität wurde nicht wiedergefunden. Der Fermenter wurde verworfen, da die Tagesproben keine Aktivität zeigten.

Bos-A11

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben mit HP21 bei 22 °C kultiviert. Mit der Probe aus dem Kolben wurden zwei Fraktionierungen mit Jurkat-Zellen durchgeführt. Dabei konnte mehreren Fraktionen Aktivität zugeordnet werden. Keine der Tagesproben des Fermenters zeigte Aktivität. Der Fermenter wurde verworfen und der Stamm erneut in Kolben kultiviert. Von sechs Kolben waren zwei aktiv. Die Ausbeuten (100 mg) waren für eine Aufreinigung der für die Aktivität verantwortlichen Metabolite leider zu gering.

Bos-A10

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter in B-Medium bei 22 °C mit 150 upm und 4,5l Luft/min angezogen. Die ursprüngliche antifungische Aktivität wurde nicht wieder detektiert, dafür wurde phytotoxische Wirkung gefunden. Der Fermenter wurde nicht aufgearbeitet.

Bos-A133

Der Stamm wurde im 20-l Fermenter und im Kolben kultiviert. Die Fermenterproben zeigten nur schwache Aktivität gegen *C. elegans*. Der Fermenter wurde nicht aufgearbeitet.

A.1.3.4 Schüttelkulturen zur Optimierung der Produktion biologisch aktiver Verbindungen

Bei fünf Bakterienstämmen, Bos-A11, Bos-A125, Bos-A148, Bos-A151 und Bos-A160, wurden entweder die Zusammensetzung des Mediums oder die Inkubationszeit variiert, um die Ausbeuten an biologisch aktiven Verbindungen zu erhöhen. Mit den erhaltenen Extrakten wurden sieben Fraktionierungen (vier mit Jurkat-Zellen und drei mit *C. elegans*) durchgeführt. In keinem Fall konnte für die Isolierung der aktiven Verbindungen genügend Rohextrakt erhalten werden. Zum Teil führte auch die Reaktivierung unter gleichen Bedingungen nicht zum Erfolg.

Insgesamt wurden für das Projekt 36 Fermentationen im 20-l Maßstab und 58 Schüttelkulturen im 800 ml Maßstab durchgeführt. Die Differenzen die bei der Anzucht im Kolben im Vergleich zu den Rührfermentern auftraten, könnten zum Einen auf die unterschiedliche Belüftung in den beiden Systemen zurückzuführen sein, zum Andern benötigt man bei der erstmaligen Bearbeitung eines Mikroorganismus immer eine gewisse „Einarbeitungszeit“ bis man den jeweiligen Mikroorganismus in den Griff bekommt, diese Zeit stand im vorliegenden Projekt nicht zur Verfügung. Außerdem hat

sich gezeigt, daß die bearbeiteten Bakterien selbst im parallel angesetzten Schüttelkolben noch unterschiedlich wuchsen bzw. ihr Sekundärstoffwechsel verschieden war.

Bei den biologischen Aktivitäten waren die cytotoxischen vorherrschend. Die nematiziden Aktivitäten waren in den überwiegenden Fällen auf Fettsäure und ihre Derivate zurückzuführen. Während nach unseren Erfahrungen mit Pilzen die Fettsäuren im allgemeinen im Mycel lokalisiert sind, wurden sie von den Bakterien ins Medium ausgeschieden.

A.2. Arbeiten der Oncotest GmbH

Dr. Armin Maier
Oncotest GmbH
Am Flughafen 12-14
D-79108 Freiburg

A.2.1 Beschreibung der Zelllinien

Die Testung auf antitumorale Aktivität bei der Oncotest GmbH fand an permanenten humanen Tumor-Zelllinien statt, die ursprünglich von Patientenmaterial abgeleitet wurden oder von Stammsammlungen erhältlich sind. Das Primärscreening fand an 6 Tumor-Zelllinien statt. Die Testung von Reinfractionen fand an 6 oder 12 Zelllinien, die Testung von Reinsubstanzen an 6 oder 37 Zelllinien statt. Eine Übersicht gibt Tabelle 1. Einzelheiten über die verwendete Methodik wurden bereits veröffentlicht¹.

Tab. A.2.1. Übersicht Zelllinien.

Tumortyp	Name	Herkunft *)	Primärscreen (n = 6)	Testung von Reinfractionen (n = 6-12)	Testung von Reinsubstanzen (n = 6-37)
Blase	BXF 1218L	Xenograft			x
	BXF T24	ATCC			x
Glioblastom	CNXF 498NL	Xenograft			x
	CNXF SF268	NCI			x
Colon	CXF HCT116	NCI			x
	CXF HT29	NCI		x	x
	CXF SW620	NCI			x
Magen	GXF 251L	Xenograft	x	x	x
Lunge	LXF 1121L	Xenograft			x
	LXF 289L	Xenograft			x
	LXF 526L	Xenograft			x
	LXF 529L	Xenograft	x	x	x
	LXF 629L	Xenograft		x	x
	LXF H460	NCI		x	x
Brust	MAXF 401NL	Xenograft	x	x	x
	MAXF MCF7	NCI		x	x
Melanom	MEXF 276L	Xenograft			x
	MEXF 394NL	Xenograft			x
	MEXF 462NL	Xenograft	x	x	x
	MEXF 514L	Xenograft		x	x
	MEXF 520L	Xenograft			x
Ovar	OVXF 1619L	Xenograft			x
	OVXF 899L	Xenograft			x
	OVXF OVCAR3	NCI			x
Pancreas	PAXF 1657L	Xenograft			x
	PAXF PANC1	ATCC			x
Prostata	PRXF 22RV1	ATCC			x
	PRXF DU145	NCI			x
	PRXF LNCAP	DSMZ			x
	PRXF PC3M	NCI			x
Pleuramesotheliom	PXF 1752L	Xenograft			x
Niere	RXF 1781L	Xenograft			x
	RXF 393NL	Xenograft			x
	RXF 486L	Xenograft	x	x	x
	RXF 944L	Xenograft		x	x
	RXF UO31	NCI			x
Uterus	UXF 1138L	Xenograft	x	x	x

*) ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

NCI: National cancer Institute, Bethesda, MD, USA

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland

¹ Dengler WA, Schulte J, Berger DP, Mertelsmann R, Fiebig HH. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. *Anti-Cancer Drugs* 6: 522–532 (1995)

A.2.2 Primärscreen

Im *in vitro* Primärscreen auf antitumorale Aktivität wurden bei der Oncotest zunächst 92 Extrakte mariner Organismen an 6 Tumor-Zelllinien getestet. Bei den Proben handelte es sich um Buthanol-Extrakte aus marinen Schwämmen (27), Dichlormethan- Extrakte aus marinen Schwämmen (38) und Methanol-Extrakte aus marinen Bakterien (28). 15 der 92 Extrakte hemmten das Wachstum von mehr als 3 der 6 Tumor-Zelllinien mit T/C-Werte >70% und wurden daher als potent eingestuft. Die Antitumoraktivität der Proben wurde in einer Dosis-abhängigen Testung reproduziert. Einzelne Proben zeigten eine gewisse Selektivität (d.h. bessere Wirkung an bestimmten Tumorzelllinien), was wiederum bedeutete, dass die Hemmung des Tumor-Zellwachstums nicht auf einer unspezifischen Toxizität beruhte. Bei den aktiven Proben handelte sich vor allem um Dichlormethan-Extrakte aus marinen Schwämmen. Die Methanol-Extrakte aus marinen Bakterien zeigten keine Antitumor-Aktivität.

A.2.2.1 Testung von Reifractionen

Die 15 aktiven Extrakte aus dem Primärscreen wurden weiter aufgereinigt bzw. fraktioniert und 60 daraus resultierende Subfraktionen in Mengen von 0,5 bis 5 mg wurden wiederum der biologischen Testung an humanen Tumorzelllinien zugeführt. Diese Proben wurden zunächst an 6 Zelllinien Dosis-abhängig in 2 Konzentrationen (0,7 µg/ml und 7,0 µg/ml) getestet, die Reproduktion fand unter gleichen Testbedingungen an insgesamt 12 Zelllinien statt. Drei der 60 Proben zeigten eine gute Antitumor-Wirkung, 2 Proben zeigten eine leichte Aktivität und 55 Subfraktionen zeigten keine Antitumor-Aktivität. Bei den Proben mit guter Antitumor-Aktivität handelte sich um Subfraktionen aus Schwämmen der Gattungen *Dendrilla*, *Plakortis* und *Petrosia*, die in der oberen Testkonzentration das Wachstum von 11/12 Zelllinien (*Dendrilla*), 8/12 Zelllinien (*Plakortis*), bzw. 7/12 Zelllinien (*Petrosia*) mit Werten kleiner 30% im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle hemmten (T/C <30%). Für weniger sensitive Zelllinien wie die Nierentumor-Zelllinie RXF 486L wurden in der selben Testkonzentration T/C-Werte von 44% (*Dendrilla*), 76% (*Plakortis*), bzw. 74% (*Petrosia*) bestimmt. Die Subfraktionen mit leichter Antitumor-Aktivität stammten von Schwämmen der Gattungen *Axinella* bzw. *Phakellia*. Hier wurden 6/12 Zelllinien (*Axinella*) bzw. 2/12 Zelllinien (*Phakellia*) im Wachstum mit T/C-Werten zwischen 30% und 50% gehemmt. Die Abnahme der Anzahl an Proben mit antitumorale Aktivität kann damit begründet werden, dass Extrakte in unreinerer Form komplexer in ihrer Zusammensetzung sind und es zur Überlagerung von Aktivitäten kommen kann, die im Screening in der Summe nachgewiesen werden. Bei weiterer Aufreinigung werden nur noch diejenigen Fraktionen als aktiv erkannt, die Hauptkomponenten mit biologischer Aktivität beinhalten.

Insgesamt lagen bei 34 der 60 Proben Mengen von 0,5 mg vor, bei 26 Proben waren mehr als 2 mg vorhanden. Die 26 Proben mit Mengen >2 mg wurden Konzentrations-abhängig in höheren Konzentrationen (3,0 µg/ml und 30,0 µg/ml) an 6 humanen Tumor-Zelllinien nochmals getestet, um etwaige proliferations-hemmende Wirkungen noch sicherer bestimmen zu können. Zusätzlich zu den 5 o.g. aktiven Subfraktionen aus den Gattungen *Dendrilla*, *Plakortis*, *Petrosia* *Axinella* und *Phakellia* wurden 4 Fraktionen mit Antitumor-Aktivität gefunden. Es handelte sich dabei um weitere Proben der Gattungen *Paragorgia*, *Phakellia* und *Petrosia*. Die Proben hemmten in der oberen Testkonzentration das Wachstum von 6/6 Zelllinien (*Paragorgia*), 3/6 Zelllinien (*Phakellia*), bzw. 1/6 Zelllinien (*Petrosia*) mit Werten kleiner 50% im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (T/C <50%).

Insgesamt konnte auf diese Weise in 9 der 60 Reifractionen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Antitumor-Aktivität gefunden werden. Bei den Proben handelte sich um Subfraktionen aus Schwämmen der Gattungen *Dendrilla*, *Plakortis*, *Petrosia*, *Axinella*, *Phakellia* und *Paragorgia*. Für 51 der 60 Proben konnte eine Antitumor-Wirkung ausgeschlossen werden.

Weitere Untersuchungen wurden an Reifractionen des Schwammes *Poecilastra compressa* durchgeführt, der im Primärscreening mit Antitumorwirkung aufgefallen war. 2 Dichlormethan-Extrakte und ein Methanol-Extrakt zeigten gute Antitumorwirkung bei 30,0 µg/ml, 1 Dichlormethan-Extrakt zeigte eine etwas schwächere Wirkung bei 30,0 µg/ml. 6 der 10 Proben zeigten keine Aktivität. Allerdings konnte die Antitumoraktivität bei der weiteren Auffraktionierung der aktiven Proben nicht wieder gefunden werden.

Außerdem wurden weitere 10 Reifractionen eines Schwammes, dessen Extrakte biologische Aktivität gezeigt haben an 6 Tumorzelllinien untersucht, von denen 2 Fraktionen bei 50,0 µg/ml 3 von 6 Zelllinien im Wachstum um mehr als 70% hemmten. Allerdings konnte auch hier die Antitumoraktivität bei der weiteren Auffraktionierung der aktiven Proben nicht wieder gefunden werden.

A.2.2.2 Testung von Reinsubstanzen

Während der Projektlaufzeit wurden insgesamt 8 Reinsubstanzen auf Antitumor-Aktivität getestet. Es handelte sich um 2 Tryptophan-Derivate, 2 neuartige zyklische Peroxide aus *Plakortis simplex*, 2 zyklische Peptide und 2 Homoserinlactone.

Tryptophan-Derivate (1b, 2b)

Die beiden Tryptophan-Derivate (1b und 2b) zeigten keine Antitumorwirkung. Die mittleren T/C-Werte an 6 getesteten Zelllinien wurden bei 8,0 µg/ml mit 104% (1b) bzw. 107% (2b) bestimmt.

Zyklische Peroxide (Peroxid A, Peroxid B)

Die zyklischen Peroxide (Peroxid A und Peroxid B) wurden Konzentrations-abhängig in 5 Konzentrationen (0,001 – 10,0 µg/ml) an 6 humanen Tumor-Zelllinien getestet. Peroxid B zeigte Antitumoraktivität, während Peroxid A bis 10,0 µg/ml das Wachstum von 6 Tumorzelllinien nicht hemmte. Peroxid B zeigte Selektivität gegen Zellen von Magenkrebs (GXF 251L, IC₅₀ = 8,3 µg/ml), nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (LXFL 529L, IC₅₀ = 7,7 µg/ml) und Melanom (MEXF 462NL, IC₅₀ = 7,2 µg/ml), während Zelllinien von Brustkrebs (MAXF 401NL), Uteruskrebs (UXF 1138L) und Nierenkrebs (RXF 486L) weniger empfindlich waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst, und wurden auch bereits veröffentlicht².

Tab.A.2.2. Antitumoraktivität von Peroxid A und Peroxid B.

Tumor cell line	IC ₅₀ [µg/mL]	
	Peroxid A	Peroxid B
GXF 251L	>10.0	8.26
LXFL 529L	>10.0	7.72
MAXF 401NL	>10.0	14.94*
MEXF 462NL	>10.0	7.23
RXF 486L	>10.0	14.35*
UXF 1138L	>10.0	14.11*

* Wert ist extrapoliert.

² Holzwarth M, Trendel J-M, Albrecht P, Maier A, Michaelis W. Cyclic Peroxides Derived from the Marine Sponge *Plakortis simplex*. *J. Nat. Prod.* 68, 759-761 (2005)

Zyklische Peptide (DM4.1, DM4.2)

Die zyklischen Peptide (DM4.1 und DM4.2) wurden Konzentrationsabhängig in 5 Konzentrationen (0,003 – 30,0 µg/ml) an 37 humanen Tumor-Zelllinien getestet. Im Falle von DM4.1 war die Konzentrations-Wirkungsbeziehung relativ steil zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml. Alle Zelllinien wurden bei 3,0 µg/ml mit T/C Werten von <21% im Wachstum gehemmt (Tabelle 3). Die Wirkung ist aber eher unspezifisch zu bewerten, da sie wenig selektiv ausgeprägt war für einzelne Zelllinien.

Tab. A.2.3. Antitumoraktivität von DM4.1 (Konzentrations-Wirkungstabelle).

TUMOR NO.	POS. CTRL (T/C[%]) 5FU VIND	Test/Control (%) at Drug Concentration (µg/ml)				
		.003	.03	.3	3.	30.
BXF						
1218L	* *	124 -	118 -	112 -	6 +++	0 +++
T24	* *	96 -	102 -	67 -	3 +++	2 +++
CNXF						
498NL	* *	105 -	111 -	92 -	6 +++	2 +++
SF268	* *	119 -	125 -	79 -	6 +++	5 +++
CXF						
HCT116	* *	115 -	111 -	59 -	2 +++	3 +++
HT29	* *	115 -	130 -	110 -	1 +++	1 +++
SW620	* *	129 -	138 -	112 -	0 +++	0 +++
GXF						
251L	* *	97 -	102 -	102 -	10 ++	7 +++
LXF						
1121L	* *	91 -	96 -	92 -	2 +++	1 +++
289L	* *	104 -	107 -	94 -	6 +++	2 +++
526L	* *	118 -	120 -	90 -	9 +++	10 ++
529L	* *	103 -	97 -	102 -	5 +++	1 +++
629L	* *	98 -	112 -	114 -	15 ++	2 +++
H460	* *	104 -	105 -	98 -	3 +++	3 +++
MAXF						
401NL	* *	106 -	107 -	106 -	14 ++	2 +++
MCF7	* *	104 -	122 -	116 -	5 +++	5 +++
MEXF						
276L	* *	107 -	108 -	95 -	21 ++	3 +++
394NL	* *	111 -	114 -	92 -	2 +++	2 +++
462NL	* *	102 -	105 -	101 -	3 +++	2 +++
514L	* *	132 -	131 -	113 -	5 +++	3 +++
520L	* *	99 -	96 -	93 -	1 +++	1 +++
OVXF						
1619L	* *	76 -	100 -	94 -	10 ++	6 +++
899L	* *	98 -	105 -	91 -	3 +++	2 +++
OVCAR3	* *	108 -	115 -	108 -	14 ++	2 +++
PAXF						
1657L	* *	100 -	102 -	94 -	7 +++	7 +++
PANC1	* *	109 -	107 -	100 -	3 +++	1 +++
PRXF						
22RV1	* *	110 -	95 -	113 -	12 ++	9 +++
DU145	* *	123 -	96 -	56 -	1 +++	1 +++
LNCAP	* *	90 -	109 -	98 -	11 ++	13 ++
PC3M	* *	113 -	116 -	99 -	1 +++	1 +++
PXF						
1752L	* *	104 -	106 -	102 -	8 +++	2 +++
RXF						
1781L	* *	103 -	106 -	87 -	4 +++	2 +++
393NL	* *	72 -	54 -	104 -	3 +++	2 +++
486L	* *	124 -	116 -	114 -	4 +++	1 +++
944L	* *	120 -	93 -	122 -	6 +++	1 +++
UO31	* *	98 -	105 -	104 -	0 +++	0 +++
UXF						
1138L	* *	111 -	131 -	53 -	7 +++	5 +++

CHEMICAL NAME: DM 4.1 (CYCLISCHE PEPTIDE REINSUBSTANZ), NSC No. not available
 SUPPLIER : KÖNIG, BONN

XF Xenograft Freiburg derived Cell Line | CL Cell Line; BXF Bladder ,CEXF Cervix, CXF Colorectal,
 GXF Gastric, LXF Lung A adeno, L large cell, E epidermoid cell, S small cell;
 MAXF Breast, MEXF Melanoma Xenograft, OVXF Ovarian Cancer Xenograft, PRXF Prostate, PXF Pleuramesothelioma,
 RXF Renal, UXF Uterus Body, XF Miscellaneous Cancer Xenograft
 - (T/C = 50) + (30 <= T/C < 50) ++ (10 <= T/C < 30) +++ (T/C < 10), s single plate result
 ng=No Growth

Dies wird vor allem aus der Mean-Graph-Analyse sichtbar, in der die relative Verteilung der ermittelten IC-Werte relativ zum durchschnittlichen IC-Wert graphisch aufgetragen ist. Die Werte an Zelllinien, bei denen eine Substanz besser wirkt (= niedere IC-Werte), sind in der halblogarithmischen Skala als Balken nach links, die Werte an Zelllinien, bei denen die Substanz weniger wirkt (= hohe IC-Werte), als Balken nach rechts vom Mittelwert abgebildet (Abbildung 1). Die Verbindung erschien für weitere Testungen auf Grund der fehlenden Selektivität nicht geeignet.

TUMOR/ PASSAGE NO.	CTRL FLUOR. UNITS	Distribution of IC70 related to Mean log.scaled axis				IC50 ug/ml	IC70 ug/ml	IC90 ug/ml
		*0.01	*0.1	*10	*100			
			Mean 1.588					
BXF 1218L	2014	1.153	1.781	2.750
T24	2164	0.553	1.135	2.332
CNXF 498NL	4273	0.923	1.577	2.695
SF268	1294	0.748	1.407	2.644
CXF HCT116	4564	0.431	0.968	2.171
HT29	4122	1.065	1.625	2.480
SW620	2152	1.073	1.619	2.442
GXF 251L	3961	1.102	1.818	3.000
LXF 1121L	2658	0.878	1.465	2.444
289L	1556	0.948	1.601	2.701
526L	1606	0.935	1.651	2.915
529L	2967	1.030	1.657	2.664
629L	3148	1.329	2.116	7.273
H460	4292	0.960	1.559	2.531
MAXF 401NL	2287	1.218	2.010	6.463
MCF7	3538	1.179	1.786	2.704
MEXF 276L	920	1.216	2.267	12.252
394NL	1609	0.878	1.465	2.444
462NL	2660	0.994	1.590	2.545
514L	1416	1.149	1.760	2.696
520L	2047	0.880	1.451	2.394
OVXF 1619L	1551	1.002	1.733	3.000
899L	1767	0.877	1.480	2.497
OVCAR3	3404	1.242	2.027	6.463
PAXF 1657L	1410	0.961	1.632	2.771
PANC1	2159	0.983	1.580	2.540
PRXF 22RV1	2995	1.261	1.990	13.924
DU145	2272	0.385	0.890	2.058
LNCAP	2388	1.068	1.814	3.080
PC3M	3837	0.948	1.517	2.428
PXF 1752L	2087	1.072	1.750	2.856
RXF 1781L	1419	0.837	1.458	2.539
393NL	4498	1.027	1.621	2.557
486L	2011	1.145	1.740	2.645
944L	2598	1.252	1.863	2.771
UO31	1767	0.991	1.544	2.404
UXF 1138L	2138	0.348	0.948	2.581
Mean	n=37		1.588			0.936	1.588	3.057

Abb. A.2.1. Antitumoraktivität von DM4.1 (Mean-Graph-Analyse).

Bei der Verbindung DM4.2 war die Antitumoraktivität auch Konzentrations-abhängig, d.h. niedrigere T/C-Werte bei ansteigenden Testkonzentrationen (Tabelle 4). Insgesamt war die Verbindung nicht so potent wie DM4.1. Der gemittelte IC₇₀-Wert betrug 1,588 µg/ml für DM4.1 (Abbildung 1) und 6,038 µg/ml für DM4.2 (Abbildung 2). Allerdings war die Antitumoraktivität bei DM4.2 selektiver ausgeprägt. Besonders empfindlich waren Zelllinien von Lungenkarzinom (LXF 289L, 526L, 529L, H460), Ovarialkarzinom (OVXF 1619L, 899L), Prostatakarzinom (PRXF DU145, PC3M), sowie vereinzelt Blasenkarzinom (BXF T24), Glioblastom (CNXF SF268), Colonkarzinom (CXF HCT116), Melanom (MEXF 520L), Nierenkarzinom (RXF UO31) und Uteruskarzinom (UXF 1138L) (Abbildung 2).

Tab. A.2.4. Antitumoraktivität von DM4.2 (Konzentrations-Wirkungstabelle).

TUMOR NO.	POS. CTRL (T/C[%]) 5FU VIND	Test/Control (%) at Drug Concentration (µg/ml)				
		.003	.03	.3	3.	30.
BXF						
1218L	* *	119 -	107 -	98 -	84 -	1 +++
T24	* *	99 -	108 -	116 -	17 ++	2 +++
CNXF						
498NL	* *	102 -	96 -	106 -	92 -	1 +++
SF268	* *	100 -	122 -	119 -	20 ++	5 +++
CXF						
HCT116	* *	105 -	113 -	103 -	12 ++	2 +++
HT29	* *	133 -	122 -	105 -	72 -	1 +++
SW620	* *	111 -	118 -	159 ^	121 -	0 +++
GXF						
251L	* *	100 -	99 -	104 -	64 -	8 +++
LXF						
1121L	* *	106 -	100 -	108 -	50 -	1 +++
289L	* *	96 -	98 -	108 -	34 +	3 +++
526L	* *	124 -	116 -	122 -	15 ++	9 +++
529L	* *	97 -	96 -	95 -	31 +	1 +++
629L	* *	107 -	107 -	112 -	77 -	3 +++
H460	* *	99 -	106 -	100 -	5 +++	2 +++
MAXF						
401NL	* *	108 -	115 -	126 -	111 -	2 +++
MCF7	* *	110 -	108 -	106 -	99 -	4 +++
MEXF						
276L	* *	108 -	109 -	113 -	67 -	4 +++
394NL	* *	105 -	108 -	107 -	36 +	2 +++
462NL	* *	104 -	100 -	104 -	70 -	1 +++
514L	* *	125 -	140 -	141 -	41 +	3 +++
520L	* *	100 -	97 -	99 -	17 ++	1 +++
OVXF						
1619L	* *	99 -	99 -	99 -	15 ++	8 +++
899L	* *	102 -	98 -	100 -	30 +	2 +++
OVCAR3	* *	103 -	112 -	102 -	91 -	2 +++
PAXF						
1657L	* *	101 -	100 -	101 -	32 +	5 +++
PANCL1	* *	105 -	114 -	114 -	42 +	1 +++
PRXF						
22RV1	* *	109 -	124 -	113 -	105 -	9 +++
DU145	* *	122 -	125 -	115 -	4 +++	1 +++
LNCAP	* *	114 -	110 -	127 -	135 -	13 ++
PC3M	* *	109 -	112 -	112 -	33 +	1 +++
PXF						
1752L	* *	101 -	103 -	103 -	89 -	3 +++
RXF						
1781L	* *	103 -	105 -	103 -	37 +	2 +++
393NL	* *	102 -	104 -	93 -	74 -	2 +++
486L	* *	103 -	140 -	106 -	86 -	2 +++
944L	* *	90 -	67 -	89 -	61 -	2 +++
UO31	* *	100 -	95 -	100 -	8 +++	0 +++
UXF						
1138L	* *	123 -	136 -	123 -	9 +++	6 +++

CHEMICAL NAME: DM 4.2 (CYCLISCHE PEPTIDE REINSUBSTANZ), NSC No. not available
SUPPLIER : KÖNIG,BONN

XF Xenograft Freiburg derived Cell Line | CL Cell Line: BXF Bladder ,CEXF Cervix, CXF Colorectal, GXF Gastric, LXF Lung A adeno, L large cell, E epidermoid cell, S small cell;
MAXF Breast, MEXF Melanoma Xenograft, OVXF Ovarian Cancer Xenograft, PRXF Prostate, PXF Pleuramesothelioma, RXF Renal, UXF Uterus Body, XF Miscellaneous Cancer Xenograft
- (T/C = 50) + (30 <= T/C < 50) ++ (10 <= T/C < 30) +++ (T/C < 10), s single plate result
ng=No Growth

TUMOR/ PASSAGE NO.	CTRL FLUOR. UNITS	Distribution of IC70 related to Mean log.scaled axis				IC50 ug/ml	IC70 ug/ml	IC90 ug/ml
		*0.01	*0.1	Mean	*10			
				6.038				
BXF 1218L T24	2014 2164	.	.		.	7.704 1.392	13.419 2.217	23.371 8.785
CNXF 498NL SF268	4273 1294	.	.		.	8.682 1.493	14.402 2.377	23.890 13.924
CXF HCT116 HT29 SW620	4564 4122 2152	.	.		.	1.146 6.123 11.585	1.902 11.713 16.950	4.754 22.405 24.801
GXF 251L	3961	.	.		.	5.334	12.141	27.631
LXF 1121L 289L 526L 529L 629L H460	2658 1556 1606 2967 3148 4292	.	.		.	3.000 1.823 1.412 1.514 6.950 1.007	7.678 4.037 2.172 3.239 12.949 1.636	19.653 17.836 20.438 15.035 24.128 2.657
MAXF 401NL MCF7	2287 3538	.	.		.	10.883 9.838	16.605 15.974	25.335 25.939
MEXF 276L 394NL 462NL 514L 520L	920 1609 2660 1416 2047	.	.		.	5.584 1.905 5.847 2.438 1.187	11.599 4.503 11.398 5.842 2.082	24.092 17.451 22.217 19.629 8.215
OVXF 1619L 899L OVCAR3	1551 1767 3404	.	.		.	1.149 1.553 8.665	1.988 3.000 14.538	15.538 15.538 24.391
PAXF 1657L PANC1	1410 2159	.	.		.	1.645 2.322	3.557 5.885	19.585 18.097
PRXF 22RV1 DU145 LNCAP PC3M	2995 2272 2388 3837	.	.		.	11.221 1.155 14.922 1.827	18.128 1.749 21.765 3.722	29.289 2.648 31.747 15.698
PXF 1752L	2087	.	.		.	8.523	14.560	24.872
RXF 1781L 393NL 486L 944L UO31	1419 4498 2011 2598 1767	.	.		.	1.906 6.463 8.048 4.608 1.048	4.754 12.252 13.924 10.058 1.729	17.723 23.227 24.092 21.954 2.853
UXF 1138L	2138	.	.		.	1.310	1.962	2.940
Mean	n=37			6.038		3.268	6.038	15.553

Abb. A.2.2. Antitumoraktivität von DM4.2 (Mean-Graph-Analyse).

Homoserinlactone (HSL-281, HSL-295)

Die Homoserinlactone (HSL-281 und HSL-295) wurden Konzentrations-abhängig in 5 Konzentrationen (0,001 – 10,0 µg/ml) an 36 humanen Tumor-Zelllinien getestet. HSL-281 zeigte keine nennenswerte Antitumor-Aktivität. Nur in 2 von 35 getesteten Zelllinien wurden in der höchsten Testkonzentration (10,0 µg/ml) T/C-Werte von 41% (Ovarzelllinie OVXF 1619L) bzw. 49% (Prostatazelllinie PRXF 22RV1) erreicht (Tabelle 5).

Tab. A.2.5. Antitumoraktivität von HSL-281 (Konzentrations-Wirkungstabelle).

TUMOR NO.	POS.CTRL (T/C[%]) 5FU VIND	Test/Control (%) at Drug Concentration (µg/ml)				
		.001	.01	.1	1.	10.
BXF						
1218L	* *	104 -	95 -	93 -	81 -	75 -
T24	* *	110 -	110 -	93 -	92 -	75 -
CNXF						
498NL	* *	109 -	109 -	101 -	114 -	101 -
SF268	* *	100 -	104 -	113 -	107 -	83 -
CXF						
HCT116	* *	94 -	103 -	100 -	98 -	90 -
HT29	* *	97 -	95 -	103 -	97 -	89 -
GXF						
251L	* *	104 -	109 -	102 -	130 -	120 -
HNXF						
536L	* *	102 -	97 -	99 -	100 -	80 -
LXF						
1121L	* *	103 -	100 -	113 -	115 -	96 -
289L	* *	87 -	96 -	95 -	84 -	78 -
526L	* *	118 -	101 -	104 -	114 -	113 -
529L	* *	95 -	101 -	107 -	110 -	111 -
629L	* *	93 -	91 -	96 -	97 -	84 -
H460	* *	99 -	104 -	100 -	99 -	90 -
MAXF						
401NL	* *	99 -	107 -	120 -	145 -	154 ^
MCF7	* *	93 -	104 -	91 -	91 -	71 -
MEXF						
276L	* *	109 -	95 -	95 -	87 -	85 -
394NL	* *	97 -	99 -	100 -	91 -	64 -
462NL	* *	98 -	98 -	94 -	87 -	69 -
520L	* *	107 -	99 -	109 -	97 -	63 -
OVXF						
1619L	* *	97 -	80 -	85 -	74 -	41 +
899L	* *	97 -	101 -	101 -	87 -	85 -
OVCAR3	* *	108 -	99 -	89 -	87 -	90 -
PAXF						
1657L	* *	100 -	96 -	91 -	88 -	75 -
PANCL1	* *	103 -	116 -	93 -	109 -	85 -
PRXF						
22RV1	* *	94 -	91 -	91 -	87 -	49 +
DU145	* *	105 -	103 -	105 -	95 -	80 -
LNCAP	* *	108 -	102 -	103 -	117 -	102 -
PC3M	* *	100 -	98 -	90 -	94 -	73 -
PXF						
1752L	* *	93 -	93 -	95 -	87 -	85 -
RXF						
1781L	* *	103 -	99 -	97 -	88 -	75 -
393NL	* *	103 -	105 -	104 -	95 -	80 -
486L	* *	101 -	101 -	93 -	86 -	74 -
944L	* *	109 -	105 -	109 -	104 -	75 -
UXF						
1138L	* *	97 -	105 -	110 -	114 -	101 -

CHEMICAL NAME: HSL 281, EINFACH UNGESÄTTIGTES ACYL-HOMOSERINLACTON, NSC No. not available
 SUPPLIER : KÖNIG, BONN

XF Xenograft Freiburg derived Cell Line | CL Cell Line: BXF Bladder ,CEXF Cervix, CXF Colorectal, GXF Gastric, LXF Lung A adeno, L large cell, E epidermoid cell, S small cell;
 MAXF Breast, MEXF Melanoma Xenograft, OVXF Ovarian Cancer Xenograft, PRXF Prostate, PXF Pleuramesothelioma, RXF Renal, UXF Uterus Body, XF Miscellaneous Cancer Xenograft
 - (T/C = 50) + (30 <= T/C < 50) ++ (10 <= T/C < 30) +++ (T/C < 10), s single plate result
 ng=No Growth

HSL-295 zeigte eine gewisse Zytotoxizität, mit deutlicher Hemmung bei 10,0 µg/ml (T/C-Werte <30%) (Tabelle 6). Die mittlere IC₅₀ wurde mit 9.119 µg/ml ermittelt. Tumorzelllinien von Blase (BXF 1218L), Glioblastom (CNXF SF268), Kopf-Hals (HNXF 536L), Melanom (MEXF 514L, 520L), Ovar (OVXF 1619L), Prostata (PRXF 22RV1), Niere (RXF 944L), und Uterus (UXF 1138L) waren überdurchschnittlich sensitiv (Abbildung 3).

Tab. A.2.6. Antitumoraktivität von HSL-295 (Konzentrations-Wirkungstabelle).

TUMOR/ NO.	CTRL FLUOR. UNITS	Test/Control (%) at Drug Concentration (µg/ml)				
		.001	.01	.1	1.	10.
BXF						
1218L	2324	94 -	96 -	108 -	108 -	20 ++
T24	2782	94 -	97 -	98 -	101 -	47 +
CNXF						
498NL	3479	101 -	97 -	110 -	98 -	54 -
SF268	1207	97 -	93 -	98 -	96 -	14 ++
CXF						
HCT116	4088	99 -	98 -	108 -	98 -	83 -
HT29	4533	97 -	104 -	98 -	93 -	51 -
GXF						
251L	2627	113 -	111 -	100 -	124 -	98 -
HNXF						
536L	1905	90 -	96 -	97 -	92 -	36 +
LXF						
1121L	2792	93 -	89 -	95 -	92 -	55 -
289L	1969	97 -	94 -	84 -	98 -	76 -
526L	1354	103 -	101 -	103 -	110 -	51 -
529L	2371	93 -	111 -	105 -	96 -	60 -
629L	2606	98 -	101 -	112 -	106 -	66 -
H460	4206	103 -	100 -	96 -	105 -	79 -
MAXF						
401NL	1273	104 -	115 -	128 -	132 -	71 -
MCF7	3288	94 -	100 -	91 -	102 -	55 -
MEXF						
276L	2391	97 -	95 -	103 -	108 -	44 +
394NL	1912	106 -	104 -	100 -	100 -	34 +
462NL	2151	109 -	119 -	115 -	110 -	59 -
514L	2661	107 -	100 -	104 -	99 -	24 ++
520L	1710	98 -	102 -	104 -	101 -	19 ++
OVXF						
1619L	4881	123 -	135 -	83 -	73 -	39 +
899L	2260	97 -	97 -	100 -	93 -	80 -
OVCAR3	2702	108 -	92 -	99 -	88 -	45 +
PAXF						
1657L	1627	96 -	96 -	94 -	97 -	55 -
PANC1	2064	101 -	106 -	95 -	99 -	38 +
PRXF						
22RV1	2034	103 -	99 -	96 -	99 -	10 ++
DU145	2650	107 -	106 -	112 -	107 -	53 -
LNCAP	2996	85 -	94 -	100 -	116 -	70 -
PC3M	3586	98 -	82 -	95 -	84 -	49 +
PXF						
1752L	2595	99 -	95 -	94 -	96 -	75 -
RXF						
1781L	1882	96 -	102 -	104 -	100 -	60 -
393NL	3911	100 -	109 -	108 -	102 -	86 -
486L	2433	109 -	98 -	98 -	101 -	68 -
944L	2349	114 -	88 -	105 -	107 -	24 ++
UXF						
1138L	2242	102 -	93 -	93 -	97 -	30 +

CHEMICAL NAME: HSL 295, EINFACH UNGESÄTTIGTES ACYL-HOMOSERINLACTON, NSC No. not available
 SUPPLIER : KÖNIG,BONN

XF Xenograft Freiburg derived Cell Line | CL Cell Line; BXF Bladder ,CEXF Cervix, CXF Colorectal,
 GXF Gastric, LXF Lung A adeno, L large cell, E epidermoid cell, S small cell;
 MAXF Breast, MEXF Melanoma Xenograft, OVXF Ovarian Cancer Xenograft, PRXF Prostate, PXF Pleuramesothelioma,
 RXF Renal, UXF Uterus Body, XF Miscellaneous Cancer Xenograft
 - (T/C = 50) + (30 <= T/C < 50) ++ (10 <= T/C < 30) +++ (T/C < 10), s single plate result
 ng=No Growth

TUMOR/ PASSAGE NO.	CTRL FLUOR. UNITS	Distribution of IC50 related to Mean log.scaled axis				IC50 ug/ml	IC70 ug/ml	IC90 ug/ml
		*0.01	*0.1	Mean 9.119	*10			
BXF								
1218L	2324	.	.		.	4.561	7.697	12.990
T24	2782	.	.		.	8.799	20.644	>10.000
CNXF								
498NL	3479	.	.		.	12.328	>10.000	>10.000
SF268	1207	.	.		.	3.638	6.380	11.188
CXF								
HCT116	4088	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
HT29	4533	.	.		.	10.563	>10.000	>10.000
GXF								
251L	2627	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
HNXF								
536L	1905	.	.		.	5.623	12.798	29.126
LXF								
1121L	2792	.	.		.	13.650	>10.000	>10.000
289L	1969	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
526L	1354	.	.		.	10.397	22.695	>10.000
529L	2371	.	.		.	18.957	>10.000	>10.000
629L	2606	.	.		.	25.118	>10.000	>10.000
H460	4206	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
MAXF								
401NL	1273	.	.		.	22.093	>10.000	>10.000
MCF7	3288	.	.		.	12.775	>10.000	>10.000
MEXF								
276L	2391	.	.		.	8.058	16.548	>10.000
394NL	1912	.	.		.	5.722	11.497	23.101
462NL	2151	.	.		.	15.013	>10.000	>10.000
514L	2661	.	.		.	4.501	8.317	15.369
520L	1710	.	.		.	4.187	7.342	12.875
OVXF								
1619L	4881	.	.		.	4.747	18.395	>10.000
899L	2260	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
OVCAR3	2702	.	.		.	7.651	22.327	>10.000
PAXF								
1657L	1627	.	.		.	13.153	>10.000	>10.000
PANC1	2064	.	.		.	6.357	13.525	28.775
PRXF								
22RV1	2034	.	.		.	3.552	5.960	10.000
DU145	2650	.	.		.	11.364	26.664	>10.000
LNCAP	2996	.	.		.	27.213	>10.000	>10.000
PC3M	3586	.	.		.	9.363	>10.000	>10.000
PXF								
1752L	2595	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
RXF								
1781L	1882	.	.		.	17.782	>10.000	>10.000
393NL	3911	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
486L	2433	.	.		.	>10.000	>10.000	>10.000
944L	2349	.	.		.	4.861	8.466	14.746
UXF								
1138L	2242	.	.		.	5.029	10.000	19.884
Mean	n=36			9.119		9.119	12.246	16.645

Abb. A.2.3. Antitumoraktivität von HSL-295 (Mean-Graph-Analyse).

Eine grundsätzliche Problematik für biologische Testungen stellte die verfügbare Substanzmenge dar. Dies war in der geringen Ausbeute bei der Substanzisolierung, die wiederum den geringen Substanzgehalt in den untersuchten Organismen reflektiert, begründet. In vivo Untersuchungen würden einen weitaus höheren Substanzbedarf bedeuten, der nur durch aufwändige Nachsammlungen von Schwämmen zu decken wäre. So konnten z.B. die Peroxide nur an 6 Zelllinien getestet werden. Verbindungen, von denen noch Substanz verfügbar ist, werden momentan bei der Oncotest GmbH in Sekundärtests, wie Tumor-Kolonie-Assay (HSL-295), bzw. Tests in Indikationen wie Entzündungshemmung, Immunstimulation/-suppression (DM4.1, DM4.2, HSL-281, HSL-295) getestet.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht
3a. Titel des Berichts Abschlussbericht zum Verbundprojekt ‚Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle (BOSMAN II)‘ - Koordination	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Michaelis, Walter; Pape, Thomas; Anke, Heidrun; Maier, Armin	5. Abschlußdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Hamburg Institut für Biogeochemie und Meereschemie Bundesstrasse 55 20146 Hamburg	7. Form der Publikation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 03F0358A
	11a. Seitenzahl Bericht 37
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben
	14. Tabellen 14
	15. Abbildungen 2
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
<p>18 Kurzfassung</p> <p>Gesamtziel des Verbundprojektes BOSMAN II war die Aufklärung von Leitstrukturen pharmakologisch aktiver Naturstoffe in marinen Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen. An der Durchführung der Arbeiten waren 7 Teilprojekte aus Industrie und Hochschule beteiligt. Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe aus Schwämmen und Mikroorganismen wurden in den Testsystemen zweier Auftragnehmer aus der Industrie auf biologische Aktivitäten überprüft.</p> <p>Die zentralen Aufgaben der Koordination des Verbundprojektes BOSMAN II umfassten die Organisation aller teilprojektübergreifenden Tätigkeiten und Datenflüsse.</p> <p>Wichtigste wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Verbundprojektes sind:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beprobung und taxonomische Einordnung borealer und arktischer Poriferen • Chemotaxonomische Charakterisierung der Poriferen 	

- Inventarisierung der biologischen Aktivität in Extrakten, Fraktionen und Reinstoffen aus allen BOSMAN-Poriferen und ausgewählten schwammassoziierten Bakterien
- Charakterisierung der Dichte und der Phylogenie von Mikroorganismen im Gewebe von Poriferen
- Beschreibung der Poriferen-Mikroorganismen-Interaktionen
- Aufbau einer Stammsammlung mariner, psychrophiler Bakterien
- Entwicklung hochsensitiver und rascher Verfahren, die aus wenigen intakten Bakterienzellen sowohl niedermolekulare Substanzen detektieren, wie auch eine phylogenetisch gerichtete De-replikation ermöglichen
- Isolierung neuer Homoserinlactone aus schwammassoziierten Bakterien
- Klonierung des plasmodialen Desoxyhypusin-Synthase Gens, heterologe Expressierung und Etablierung eines Enzymassays
- Erfassung des Potenzials schwammassoziierter Bakterien als neue Enzymproduzenten

19. Schlagwörter

20. Verlag

21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

**Institut für Biogeochemie und Meereschemie
Universität Hamburg**

Prof. Dr. W. Michaelis

**Abschlussbericht zum BMBF-Projekt BOSMAN II
(Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle)**

Teilprojekt 1

*Naturstoffe aus Porifera und assoziierten Mikroorganismen
borealer Habitate*

Berichtszeitraum: 01.04.2002 – 31.05.2005

Projektlaufzeit: 01.04.2002 – 31.05.2005

Förderkennzeichen: 03F0358A

Inhaltsverzeichnis

I.1.	Aufgabenstellung	2
I.2.	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	2
I.3.	Planung und Ablauf des Vorhabens	2
I.4.	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	3
I.4.1.	Primär- und Sekundärstoffe in borealen und arktischen Poriferen.....	3
I.4.2.	Primär- und Sekundärstoffe schwammassoziierter Mikroorganismen.....	6
I.5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
II.1.	Erzielte Ergebnisse	7
II.1.1.	Präparation der Proben für die biologische Testung.....	7
II.1.2.	Sekundärmetabolite in organischen Extrakten borealer Poriferen.....	14
II.1.2.1.	Korrelation mit biologischen Aktivitäten.....	18
II.1.2.2.	Korrelation mit der Dichte schwammassoziierter Bakterien.....	19
II.1.3.	Lipidchemische Charakterisierung schwammassoziierter Mikroorganismen.....	20
II.1.3.1	Bakterien.....	20
II.1.3.2	Archaeen.....	20
II.2.	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	20
II.3.	Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	21
II.4.	Erfolgte und geplante Veröffentlichungen	21
	<u>Erfolgskontrollbericht</u>	
III.1.	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen	22
III.2.	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis, erreichte Nebenergebnisse, Erfahrungen	22
III.3.	Fortschreibung des Verwertungsplans	22
III.4.	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	22
III.5.	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	23
III.6.	Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung	23
IV.	Berichtsblätt und Document Control Sheets	24

I.1. Aufgabenstellung

Gesamtziel des Teilprojektes 1 (TP 1) in BOSMAN II war die Charakterisierung pharmakologisch wirksamer und strukturell auffälliger Sekundärmetabolite aus Poriferen und schwammassozierten Mikroorganismen (SAM) borealer und arktischer Gewässer. Die Untersuchungen sollten zur Aufklärung chemo-ökologischer Zusammenhänge in sekundärstofftragenden Poriferen und der Relevanz von SAM beitragen. Für die zukünftige Suche nach Naturstoffen sollten Prognosekriterien für Poriferen spezifischer Habitate bzw. taxonomischer Gruppen herausgearbeitet werden. Leitstrukturen sollten definiert und in Zusammenarbeit mit den Partnern aus der Industrie hinsichtlich ihrer kommerziellen Verwertbarkeit überprüft werden.

Die wissenschaftlichen und technischen Arbeitsziele des TP 1 können wie folgt gegliedert werden:

- 1) Inventarisierung strukturell interessanter Verbindungen in organischen Extrakten borealer und arktischer Poriferen
- 2) Strukturaufklärung biologisch aktiver Verbindungen in Poriferen und assoziierten Bakterien
- 3) Charakterisierung von Parametern, die das Auftreten strukturell interessanter und/oder biologisch aktiver Verbindungen in borealen und arktischen Poriferen beeinflussen
- 4) Entwicklung und Optimierung chromatographischer Methoden zur Isolierung von verschiedenen polaren Wirkstoffen

Zur Verfolgung der Ziele wurde die Strategie der 'Bioassay-gesteuerten Fraktionierung' in enger Zusammenarbeit mit den testenden BOSMAN-Auftragnehmern, dem Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) e.V., Kaiserlautern, und der Oncotest GmbH, Freiburg, genutzt. Organische Extrakte wurden aus Poriferen-Gewebe erstellt und zur biologischen Testung weitergereicht. Ein chemisches Screening auf Sekundärstoffe in den Extrakten wurde im TP 1 parallel mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt. Positiv getestete Extrakte und Fraktionen wurden wiederholt chromatographiert und Reinstoffe isoliert. Die Identifizierung von Wirkstoffen erfolgte, in enger Zusammenarbeit mit dem TP 6 und externen Kooperationspartnern, mit kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR).

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Michaelis am Institut für Biogeochemie und Meereschemie bestehen ideale Voraussetzungen zur Aufklärung der Strukturen gering- bis hochmolekularer organischer Verbindungen. Die Arbeitsgruppe ist mit modernen Geräten zur Analyse organischer Komponenten in natürlichen Proben ausgestattet und verfügt über langjährige Erfahrung in der Anwendung verschiedener chemischer Präparationstechniken und der Interpretation der Datensätze. Mit Hilfe einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Photodiode-Array-Detektor (HPLC-DAD; bewilligt in BOSMAN II 04/2003) konnte eine Assay-gesteuerte Trennung von Extrakten und Fraktionen, sowie die Isolierung von Reinstoffen für weiterführende Untersuchungen erreicht werden. Folgende Mitglieder der Arbeitsgruppe waren an den Arbeiten des TP 1 beteiligt:

Prof. Dr. W. Michaelis	Universitätsprofessor C3, Leiter des TP 1
Dr. Thomas Pape	Dipl.-Geologe, wiss. Angestellter, Doktorarbeit in BOSMAN
Dr. Michael Holzwarth	Dipl.-Ing., wiss. Angestellter, Doktorarbeit in BOSMAN
Dr. Martin Blumenberg	Dipl.-Geologe, wiss. Angestellter, Doktorarbeit in BOSMAN
Sabine Beckmann	Technische Angestellte
Frank Boenkendorf	Dipl.-Geologe, Diplomarbeit in BOSMAN
Alexandra Vetter	cand. Dipl.-Geologin, Diplomarbeit in BOSMAN
Birte Oppermann	Dipl.-Geologin
Björn Grudzinski	cand. Dipl.-Geologe

I.3. Planung und Verlauf

Durch die Einbindung der testenden Auftragnehmer und des Partners aus der Industrie (TP 7) konnte in BOSMAN II die Untersuchung organischer Komponenten im Probenmaterial vollständig auf biologisch aktive Verbindungen mit Potenzial für die pharmazeutische Verwertung ausgerichtet werden. Zahlreiche strukturell interessante Sekundärmetabolite im Probenmaterial waren bereits aus BOSMAN I bekannt (siehe Abschlussbericht 12/2001). Durch die Teilnahme von Projektmitgliedern an einer Ausfahrt mit FS 'Polarstern' (2002) und Forschungsaufenthalten an der Marin-Biologischen Station in Espeland, Norwegen (2000, 2001), konnte das in BOSMAN I gesammelte Probenmaterial um zahlreiche weitere Kaltwasserspezies ergänzt werden.

Den Absprachen in BOSMAN gemäß wurden die Poriferen zur Bearbeitung zwischen den TP 1 und TP 6 aufgeteilt. Die Extraktions- und Fraktionierungsarbeiten an den Poriferen erfolgten nach einem für die chemisch arbeitenden TP 1, 3 und 6 vereinheitlichten Protokoll. Unpolare Fraktionen wurden mit Gaschromatographie (GC) und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) vermessen. Die Extrakte wurden zur Testung an das IBWF e.V. und die Oncotest GmbH weiter gegeben. Von Extrakten, die biologische Aktivitäten aufwiesen, wurden nach einer einheitlichen präparativen HPLC-DAD-Methode Fraktionen erstellt. Diese wurden erneut zur biologischen Testung eingereicht und, bei positivem Ergebnis, mit individuell angepassten Methoden zur Anreicherung bzw. Isolierung pharmakologisch interessanter Verbindungen bearbeitet. Reinstoffe wurden zur Struktur-aufklärung mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Die Demospongien *Dendrilla cirsioides*,

Spongosorites genitrix, *Plakortis simplex* und *Axinella rugosa* wurden hinsichtlich des Auftretens äußerst interessanter Strukturen bzw. einer ungewöhnlichen Dichte an Sekundärmetaboliten und des Nachweises starker biologischer Wirkungen besonders intensiv untersucht.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.4.1 Primär- und Sekundärstoffe borealer und arktischer Poriferen

Vor der Etablierung des Projektes BOSMAN in 1999 wurde in der AG Prof. Michaelis das prokaryotische und eukaryotische Lipidinventar in Extrakten ausgewählter Poriferen verschiedener globaler Standorte im Rahmen von DFG-Projekten untersucht. Die Ergebnisse erbrachten starke Hinweise auf ökologische Funktionen der Interaktionen zwischen den Wirtsorganismen und assoziierten Bakterien (Thiel et al., 1996). Im Zuge dieser Arbeiten wurde ebenfalls festgestellt, dass sich Lipidmuster auch für die Beschreibung fossiler Schwamm-Bakterien-Gemeinschaften hervorragend eignen (Thiel, 1997; Thiel et al., 1999).

In der ersten Projektphase von BOSMAN (07/1999 bis 06/2001) wurde das Lipidinventar von etwa 30 Spezies der Demospongiae und untergeordnet der Hexactinellida aus norwegischen Gewässern umfassend aufgeklärt (siehe Abschlussbericht BOSMAN 12/2001). Darüber hinaus wurden dem TP 1 etwa 20 Hexactinellida-Arten verschiedener globaler Tiefseestandorte vom Harbor Branch Oceanographic Institution in Fort Pierce, Florida, für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Anhand dieses umfangreichen und global relevanten Probenmaterials wurden Primärstoffe, wie verschiedene Fettsäuren und Steroidalkohole, hinsichtlich ihrer chemotaxonomischen Aussagekraft für Schwamm- oder Bakteriengruppen beschrieben (Thiel et al., 2002; Blumenberg et al., 2002, Dissertation Blumenberg 2003). Die Dichte assoziierter Bakterien und das Vorkommen von Archaeen in Poriferen wurden anhand diagnostischer Lipidbiomarker charakterisiert.

Die in BOSMAN I begonnenen Arbeiten zur Strukturaufklärung ausgewählter Sekundärmetabolite (z. B. Sölter et al., 2002; Dissertation Blumenberg 2003) in Poriferen ist in BOSMAN II fortgesetzt worden. Allerdings konnten die bereits frühzeitig in BOSMAN I erstellten organischen Extrakte aufgrund der unklaren Stabilität der Zielverbindungen und der unterschiedlichen thematischen Ausrichtungen nicht für die Biotests in BOSMAN II genutzt werden. Zu Beginn von BOSMAN II wurden daher alle Poriferen, von denen noch für Biotests ausreichende Biomasse vorhanden war, erneut extrahiert.

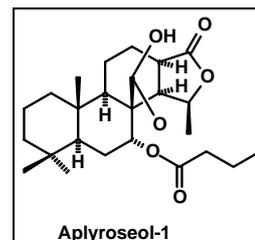
Publikationen aus dem Arbeitskreis mit Bezug zu BOSMAN II

- Thiel V., Reitner J., Michaelis W., (1996) Biogeochemistry of modern porifera and microbialites from Lizard Island (Great Barrier Reef, Australia) and fossil analogues. In: *Global and Regional Controls on Biogenic Sedimentation. I. Reef. Evolution. Research Reports., Sonderband 2* (ed. J. Reitner, F. Neuweiler, F. Gunkel), pp. 129-132. Göttinger Arbeiten zur Geologie und Paläontologie, Göttingen.
- Thiel V., (1997) Organische Verbindungen in Porifera und biogenen Carbonaten. Dissertation Universität Hamburg. *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Hamburg.
- Thiel V., Jenisch A., Wörheide G., Löwenberg A., Reitner J., Michaelis W., (1999) Mid-chain branched alkanolic acids from "living fossil" demosponges: A link to ancient sedimentary lipids? *Organic Geochemistry* 30, 1-14.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W., (2002) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89, 60-66.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W., (2002b) Erratum: A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89, 60-66.
- Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Michaelis W., (2002) The steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89, 415-419.
- Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M., Francke W., (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Letters* 43, 3385-3386.

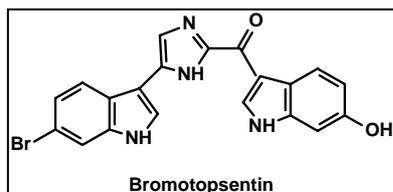
Zu Beginn des Projektes waren Daten zum Primär- und Sekundärstoffinventar borealer und arktischer Poriferen nur eingeschränkt verfügbar – sie wurden überwiegend erst in BOSMAN erarbeitet. Als Referenzliteratur dienten daher vorwiegend Publikationen zu tropischen und mediterranen Invertebraten.

Bei den Analysen der Schwammextrakte in BOSMAN I fielen mehrere chemische Strukturen auf, von denen verwandte Verbindungen aus tropischen und mediterranen Poriferen bekannt waren. Zu den interessanten Poriferen gehörten *Dendrilla cirsioides*, *Spongosorites genitrix*, *Plakortis simplex* und *Axinella rugosa*. Da diese auch bei den Bioassays mit intensiven Effekten hervortraten, wird hier und im Ergebnisteil auf die Taxa, denen die vorgenannten Poriferen angehören, eingegangen.

Angehörige der Gattung *Dendrilla* wurden in vielen Meeresregionen entdeckt und bereits früh als potente Sekundärstoff-Produzenten erkannt. Oftmals wurden verschieden funktionalisierte Diterpenoide beobachtet und Vertreter der Aplyroseole (Bergquist, 1985; Karuso et al., 1986) wurden in hohen Konzentrationen berichtet. Weitere Diterpenoide, wie z. B. Membranolide und Ambliofurane sowie das Dendrinolid und das Dendrinin sind in tropischen und arktischen *Dendrilla*-Arten nachgewiesen worden (Bergquist et al., 1985; Karuso et al., 1986; Fontana et al., 1997; Ankisetty et al., 2004). Antimikrobielle Aktivität für Dihydrogracilin und Membranolid oder im Extrakt der antarktischen Art *Dendrilla membranosa* wurden von Molinski und Faulkner (1987, 1988) und McClintock und Baker (1997) beschrieben.

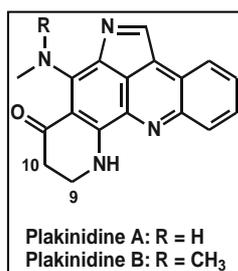


Ebenfalls aus Kalt- und Warmwasserregionen sind Vertreter der Gattung *Spongosorites* bekannt. Von ihnen wurde die Isolierung von Alkaloiden, wie des Dragmacidins (Capon et al. 1998), und zahlreicher Brom-Alkaloide des Topsentin-Typs (Bartik et al., 1987; Shin et al. 1999) beschrieben, für die verschiedene antivirale, antitumorale und entzündungshemmende Wirkungen festgestellt wurden. Capon et al. (2000) isolierten mit dem 1,9-Dimethylhypoxanthin eine methylierte Purinbase aus *Spongosorites* sp., für die jedoch noch keine biologischen Effekte beschrieben wurden.

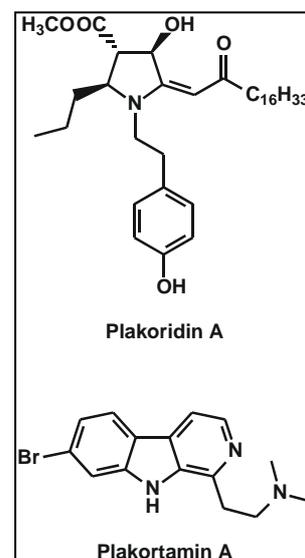


Aus zahlreichen Untersuchungen tropischer Poriferen war bekannt, dass Angehörige der Gattung *Plakortis* reichhaltige Quellen bioaktiver Substanzen sind. Eine in dieser Gattung auffällig häufig auftretende Substanzklasse ist die der cyclischen Peroxide. Seit der Isolation und Strukturaufklärung des Plakortins (Higgs und Faulkner, 1978), wurden mehr als 50 weitere cyclische Peroxide aus verschiedenen Schwämmen verwandter Spezies identifiziert. Die meisten dieser Peroxide erwiesen sich in Bioaktivitäts-Tests als Wirkstoffe, wobei verschiedene Wirkungen wie antifungische (Gunasekera et al., 1990a), antibakterielle (Higgs und Faulkner, 1978) oder zytotoxische (Harrison und Crews, 1998) nachgewiesen wurden. Außerdem haben einige dieser Substanzen spezielle Eigenschaften, wie antiplasmodiale (Gochfeld und Hamann, 2001; Fattorusso et al., 2002), antileishmaniale (Compagnone et al., 1998) oder für die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase aktivierende Effekte (Murayama et al., 1989; Patil et al., 1996a; Patil et al., 1996b). Darüber hinaus wurden aus *Plakortis* sp. viele Vertreter anderer Stoffgruppen, wie Alkaloide (Takeuchi et al., 1994) oder aromatische Ketone und Ester (Ravi et al., 1979) isoliert.

Alkaloide aus Poriferen der Gattung *Plakortis* sind die pentacyclischen



Plakinidine A und B sowie das Plakinidin C, das sich vom Plakinidine A durch eine Doppelbindung zwischen den Positionen 9 und 10 unterscheidet (Inman et al., 1990; West et al., 1990). Weiterhin wurden das Plakoridin A (Takeuchi et al., 1994) sowie das Plakortamin A und drei weitere Plakortamine (B–D) ähnlicher Strukturen (Sandler et al., 2002) aus Schwämmen dieser phylogenetischen Gruppe identifiziert.



Frühere Untersuchungen zeigten weiterhin, dass viele Angehörige der Gattung *Axinella* Quellen isoprenoider Naturstoffe sind. Solche Verbindungen, wie etwa Mono-, Di- und Sesquiterpene sowie deren funktionalisierte Analoga sind bedeutende Naturstoffe in terrestrischen Organismen (Breitmaier, 1999). Sie besitzen oftmals interessante Wirkungen und werden vielfach bereits kommerziell verwertet.

In Schwämmen treten insbesondere Sesquiterpene auf, die unfunktionalisiert sind oder Isocyanid-, Isocyanat- bzw. Isothiocyanatsubstituenten besitzen (z.B. Cafieri et al., 1973; Ciminiello et al., 1987; Capon und MacLeod, 1988). Biologische Aktivitäten wurden beispielsweise für eine Reihe von Metaboliten aus *Acanthella klethra* nachgewiesen. Angerhofer et al. (1992) berichteten von einigen Sesquiterpenisocyaniden und -isothiocyanaten mit toxischen Wirkungen für kultivierte Stämme des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*.

Publikationen mit Bezug zu Sekundärmetaboliten in den Poriferen *Axinella rugosa*, *Dendrilla cirsioides*, *Plakortis simplex* und *Spongosorites genitrix*

- Angerhofer C.K., Pezzuto J.M. (1992) Antimalarial Activity of Sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *Journal of Natural Products* 55, 1787-1789.
- Ankisetty S., Amsler C.D., McClintock J.B., Baker B.J., (2004) Further membranolid diterpenes from the Antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. *Journal of Natural Products* 67, 1172-1174.
- Bartik K., Braekmann J.-C., Daloze D., Stoller C., Huysecom J., Vandevyver G., Ottinger R., (1987) Topsentins, new toxic bis-indole alkaloids from the marine sponge *Topsentia genitrix*. *Canadian Journal of Chemistry* 65, 2118-2121.
- Bergquist P.R., Karuso P., Cambie R.C., (1985) Taxonomic relationships within the Dendroceratida: A biological and chemotaxonomic appraisal. In: K. Rützler (Ed.), *New perspectives in sponge biology*, pp. 72-78. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. London.
- Breitmaier E. (1999) *Terpene*. Teubner Verlag, Stuttgart.
- Cafieri F., Fattorusso E., Magno S., Santacroce C., Sica D. (1973) Isolation and structure of Axisonitrile-1 and Axisothiocyanate-1 two unusual sesquiterpenoids from the marine sponge *Axinella cannabina*. *Tetrahedron* 29, 4259-4262.
- Capon R.J., MacLeod J.K. (1988) New isothiocyanate sesquiterpenes from the Australian marine sponge *Acanthella pulcherrima*. *Australian Journal of Chemistry* 41, 979-983.
- Capon R.J., Rooney F., Murray L.M., Collins E., Sim A.T.R., Rostas J.A.P., Butler M.S., Carroll A.R., (1998) Dragmacidins: New protein phosphatase inhibitors from a southern Australian deep-water marine sponge, *Spongosorites* sp. *Journal of Natural Products* 61, 660-662.
- Capon R. J., Rooney F., Murray L. M. (2000) 1,9-Dimethylhypoxanthine from a southern Australian marine sponge *Spongosorites* species. *Journal of Natural Products* 63, 261-262.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S., Mayol L. (1987) New nitrogenous sesquiterpenes based on alloaromadendrane and *epi-eudesmane* skeletons from the marine sponge *Axinella cannabina*. *Canadian Journal of Chemistry* 65, 518-522.
- Compagnone R.S., Piña I.C., Rangel H.R., Dagger F., Suárez A.I., Venkata Rami Reddy M., Faulkner D.J. (1998) Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*. *Tetrahedron* 54, 3057-3068.
- Fattorusso E., Parapini S., Campagnuolo C., Basilico N., Tagliatela-Scafati O., Taramelli D. (2002) Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxide compounds obtained from the sponge *Plakortis simplex*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 883-888.
- Fontana, A., Scognamiglio, G., Cimino, G., (1997) Dendrinolide, a new degraded diterpenoid from the Antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. *Journal of Natural Products* 60, 475-477.
- Gochfeld D.J., Hamann M.T. (2001) Isolation and biological evaluation of Filiformin, Plakortide F, and Plakortone G from the Caribbean sponge *Plakortis* sp. *Journal of Natural Products* 64, 1477-1479.
- Gunasekera S.P., Gunasekera M., Gunawardana G.P., McCarthy P., Burren N. (1990a) Two new bioactive cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. *Journal of Natural Products* 53, 669-674.
- Harrison B., Crews P. (1998) Cyclic polyketide peroxides and acyclic diol analogues from the sponge *Plakortis lita*. *Journal of Natural Products* 61, 1033-1037.

- Higgs M.D., Faulkner D.J. (1978) Plakortin, an antibiotic from *Plakortis halichondrioides*. *Journal of Organic Chemistry* 43, 3454-3457.
- Inman W.D., O'Neill-Johnson M., Crews P. (1990) Novel marine sponge alkaloids. 1. Plakinidine A and B, anthelmintic active alkaloids from a *Plakortis* sponge. *Journal of the American Chemical Society* 112, 1-4.
- Karuso P., Bergquist P.R., Cambie R.C., Buckleton J.S., Clark G.R., Rickard C.E.F., (1986) Terpenoid constituents of morphologically similar sponges in the family Aplysillidae. *Australian Journal of Chemistry*, 39, 1643-1653.
- McClintock J.B., Baker, B.J., (1997) A review of the chemical ecology of Antarctic marine invertebrates. *American Zoologist*, 37, 329-342.
- Molinski T. F., Faulkner D. J. (1987) Metabolites of the antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. *Journal of Organic Chemistry* 52, 296-298.
- Molinski, T.F., Faulkner, D.J., (1988) An antibacterial pigment from the sponge *Dendrilla membranosa*. *Tetrahedron letters*, 29, 2137-2138.
- Murayama T., Ohizumi Y., Nakamura H., Sasaki T., Kobayashi J. (1989) Plakorin, a potent Ca²⁺-ATPase activator from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. *Experientia* 45, 898-899.
- Patil A.D., Freyer A.J., Bean M.F., Carte B.K., Westley J.W., Johnson R.K., Lahouratate P. (1996a) The plakortones, novel bicyclic lactones from the sponge *Plakortis halichondrioides* : Activators of cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase. *Tetrahedron* 52, 377-394.
- Patil A.D., Freyer A.J., Carte B., Johnson R.K., Lahouratate P. (1996b) Plakortides, novel cyclic peroxides from the sponge *Plakortis halichondrioides*: Activators of cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase. *Journal of Natural Products* 59, 219-223.
- Ravi B.N., Armstrong R.W., Faulkner D.J. (1979) Some aromatic compounds from the Marine sponge *Plakortis halichondrioides*. *Journal of Organic Chemistry* 44, 3109-3113.
- Sandler J.S., Colin P.L., Hooper J.N.A., Faulkner D.J. (2002) Cytotoxic β -Carbolines and cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis nigra*. *Journal of Natural Products* 65, 1258-1261.
- Shin J., Seo Y., Cho K. W., Rho J.-R., Sim C. J. (1999) New bis(indole) alkaloids of the Topsentin class from the sponge *Spongisorites genitrix*. *Journal of Natural Products* 62, 647-649.
- Takeuchi S., Ishibashi M., Kobayashi J. (1994) Plakoridine A, a new tyramine-containing pyrrolidine alkaloid from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. *Journal of Organic Chemistry* 59, 3712-3713.
- West R.R., Mayne C.L., Ireland C.M., Brinen L.S., Clardy J. (1990) Plakinidines: Cytotoxic alkaloid pigments from the fujian sponge *Plakortis* sp. *Tetrahedron Letters* 31, 3271-3274.

1.4.2 Primär- und Sekundärstoffe schwammassoziierter Mikroorganismen

Neben den Untersuchungen zu bioaktiven Sekundärmetaboliten in Extrakten aus Poriferen wurden die in BOSMAN I begonnenen Arbeiten zur Relevanz assoziierter Mikroorganismen für die Metabolitsynthese weitergeführt. Literatur, die sich mit den in BOSMAN bearbeiteten schwammassoziierten Prokaryotenstämmen beschäftigte, lag nicht vor.

Die Resultate der lipidchemischen Untersuchungen an Isolaten schwammassoziierter Bakterien wurden im Abschlussbericht BOSMAN I in 12/2001 dargestellt. Das Auftreten von Archaeen in Poriferen, das vor unseren Untersuchungen nur äußerst selten beobachtet wurde, wurde im TP 1 in vielen Hexactinellida und einigen Angehörigen der Demospongiae nachgewiesen (Thiel et al., 2002; Pape et al., 2003).

- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W., (2002a) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften*, 89, 60-66.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W., (2002b) Erratum: A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften*, 89, 60-66.
- Pape T., Blumenberg M., Thiel V., Michaelis W., (2003) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. In: M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi (Eds.), *Sponge science in the new millennium*, 68, pp. 509-515.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen von BOSMAN bestand gemäß den Vorgaben des Leitantes vom November 2001 eine enge Zusammenarbeit mit allen im Verbundprojekt tätigen Arbeitsgruppen. Darüber hinaus wurde mit international erfahrenen Arbeitsgruppen hinsichtlich der Strukturaufklärung von Primär- und Sekundärstoffen und auf nationaler Ebene mit Mitarbeitern des AWI, Bremerhaven, auf dem Gebiet der Chemo-Ökologie arktischer Schwämme kooperiert.

Prof. Dr. Pierre Albrecht und Dr. Jean-Michel Trendel, Laboratoire de Géochimie Bioorganique, Université Louis Pasteur, Strasbourg, Frankreich.

Ein- und Zweidimensionale (^1H - und ^{13}C -)NMR, HRFABMS, CIMS (NH_4^+)

Dr. Paul Farrimond und Dr. Helen M. Talbot, School of Civil Engineering and Geosciences, University of Newcastle upon Tyne, Großbritannien

Flüssigchromatographie-APCI-Massenspektrometrie

Dr. Karen von Juterzenka und Dipl.-Biol. Nadia-Valérie Quéric

Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven

II.1. Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse

II.1.1. Präparation der Proben für die biologische Testung

Während des Berichtszeitraums bestand ein Schwerpunkt der Arbeiten im Teilprojekt I in der Extraktion borealer Schwämme, einer Fraktionierung der Extrakte, sowie der Isolierung und Strukturaufklärung bioaktiver Reinstoffe. Für diese Zielsetzung geeignete Proben, die in den Laufzeiten von BOSMAN I und BOSMAN II eigens gesammelt oder von anderen Gruppen zur Verfügung gestellt wurden, lagen von vier Tief- und Kaltwasserstandorten vor. Im Einzelnen wurden für die biologische Testung Poriferen folgender Standorte genutzt:

- Sula-Ridge (Mittelnorwegisches Schelfgebiet), Ausfahrt mit FS ‚POSEIDON‘, 1999
- Korsfjord (Marin-Biologische Station Espeland, Universität Bergen, Norwegen), 2000 und 2001
- Arktis (Grönland-See), FS ‚POLARSTERN‘, 2002
- Karibik, FS ‚SONNE‘, 2002

Der überwiegende Teil des Schwammmaterials entstammte dem mittelnorwegischen Schelf (siehe auch Berichte des TP 2). Abbildung II.1.1.1. gibt das konventionelle Präparationsschema in BOSMAN II für Poriferen-Extrakte, das auf alle Proben des TP 1 Anwendung fand, wieder.

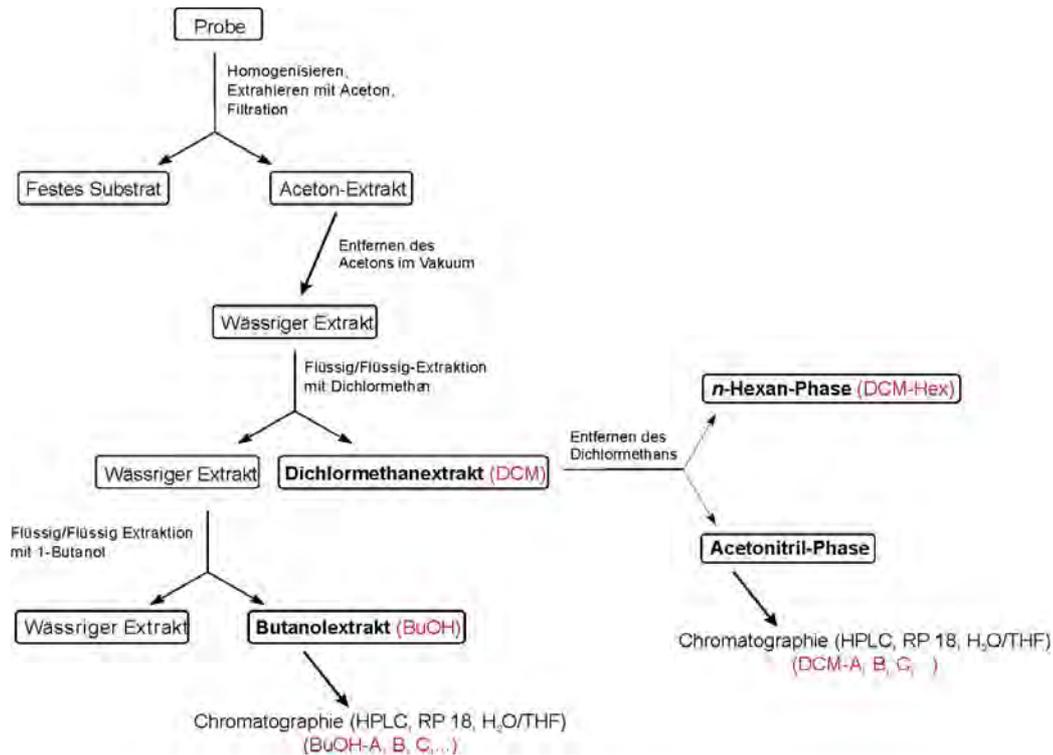


Abb. II.1.1.1. Präparationsschema von Extrakten und Unterfraktionen in BOSMAN

Das Gewebe von Poriferen, die mit ausreichender Biomasse vorlagen (> 2 g nass, optimal 20 g nass) wurde mit Aceton extrahiert. Die Resultate der Voruntersuchungen an einzelnen Individuen ließen erwarten, dass der Einsatz dieser Biomasse üblicherweise ausreicht, um für die biologischen Testungen ausreichende Extraktmengen zu gewinnen. Der Aceton-Extrakt wurde in den relativ unpolaren Dichlormethan(DCM)-Extrakt und den polaren Butanol(BuOH)-Extrakt getrennt. Zur Übersicht der Inhaltsstoffe wurden alle DCM-Extrakte und ausgewählte BuOH-Extrakte nach Derivatisierung mit GC und GC-MS vermessen.

Allgemein wurden sehr unterschiedliche Ausbeuten für die Extrakte im Vergleich aller Poriferen festgestellt. Geringste Ausbeuten wurden für den hexactinelliden *Caulophacus arcticus* mit 0,015 % (DCM) und 0,003 % (BuOH) des Nassgewichts festgestellt. Höchste Extraktkonzentrationen fanden sich für die ceractinomorphen Demospongien *Cladorhiza gelida* (1,566 Gew.-%, DCM) und *Clathria barleii* (0,315 Gew.-%, BuOH). Somit lagen jeweils zwischen 2,9 und 315,5 mg DCM- und zwischen 0,6 und 10,4 mg BuOH-Extrakt für weiterführende Untersuchungen vor. Unter Berücksichtigung der von den testenden Institutionen benötigten Extraktmengen war sichergestellt, dass mehrere Poriferen mit für ‚Assay-gesteuerte‘ Fraktionierungsarbeiten ausreichender Biomasse im BOSMAN-Probenbestand vorlagen.

Die Auszüge wurden in definierten Mengen (zwischen 3 und 5 mg) zur biologischen Testung an das IBWF e.V. und die Oncotest GmbH verschickt. Eine Beschreibung der eingesetzten Testsysteme findet sich in den jeweiligen Berichten beider BOSMAN-Partner. Im Berichtszeitraum wurden aus 20 Schwammindividuen DCM- bzw. BuOH-Extrakte zur biologischen Testung weitergereicht. An positiv getesteten Extrakten wurden weiterführende Arbeiten zur Fraktionierung und Strukturaufklärung der Komponenten im TP 1 durchgeführt. Die Inhaltsstoffe der DCM-Extrakte wurden in unpolare *n*-Hexan- und semipolare Acetonitril-lösliche Komponenten getrennt. Die semipolaren Acetonitril-Subextrakte und polaren BuOH-Extrakte wurden mittels HPLC-DAD an RP18-Phase in Fraktionen getrennt. Die Aufteilung in Unterfraktionen wurde dabei an Anzahl und Retentionszeitbereich signifikanter Peaks im DAD-Chromatogramm ausgerichtet. Ihre Kennzeichnung (A, B, C, ...) erfolgte gemäß ihrer Elutionsreihenfolge mit abnehmender Polarität des Elutionsmittels. Alle HPLC-Fractionen wurden in die biologische Testung gegeben. Es hat sich bei der Analyse des umfangreichen Probeninventars gezeigt, dass biologische Effekte am häufigsten durch Verbindungen der semipolaren

Fraktion verursacht wurden. Aber auch für Komponenten der unpolaren *n*-Hexan- und der polaren Butanol-Fraktion wurden vereinzelt Aktivitäten bestimmt.

Tab. II.1.1.1. Übersicht der im Teilprojekt 1 erstellten Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe aus Poriferen, die am IBWF e.V. und von der Oncotest GmbH auf biologische Aktivitäten getestet wurden (Probenkürzel: POS = mittelnorwegischer Schelf 1999, ‚FS POSEIDON‘ POS 254; BRA = Korsfjord, Bergen, Norwegen, 2001, FS ‚Hans Brattström‘; PS = Grönlandsee 2002, ‚FS POLARSTERN‘ ARK18/1; SO = Karibik 2002, ‚FS SONNE‘ SO 164).

Positiv getestete Proben (= **pos.**) wurden in Fraktionen getrennt und getestet. Die Fraktionierungsarbeiten wurden eingestellt, sofern das **Testergebnis negativ** (= **neg.**) ausfiel oder **keine ausreichende Menge** (= **verbr.**) des Extrakts bzw. der Fraktion zur Testung zur Verfügung gestellt werden konnte. Falls sich bei der Bearbeitung der Unterfraktionen die zusätzliche Extraktion von Gewebe als notwendig erwies, wurde der neu erstellte Extrakt ebenfalls auf biologische Aktivität getestet.

Am **IBWF e.V.** getestete Extrakte, Subextrakte und Fraktionen aus Poriferen des TP 1

Probenkürzel	Spezies	Extrakt	Subextrakt	HPLC-Fraktion
POS 30J1-8	<i>Antho dichotoma</i>	DCM pos.	<i>n</i> -Hexan neg. Acetonitril pos.	
POS 30J1-13	<i>Axinella infundibuliformis</i>	DCM pos., verbr. BuOH neg.		
BRA 3 1-4, BRA 3 1-5	<i>Axinella rugosa</i>	DCM pos. BuOH pos., verbr.	<i>n</i> -Hexan pos. Acetonitril pos.	Acetonitril D pos. Acetonitril C neg. Acetonitril B pos. Acetonitril A pos.
	<i>Caulophacus arcticus</i>	BuOH neg.	<i>n</i> -Hexan neg. Acetonitril 1 pos. Acetonitril 2 neg.	
POS 26J1-14	<i>Chlathria barleii</i>	DCM pos., verbr. BuOH neg.		
PS 62/180+182/1	<i>Cladorhiza gelida</i>	DCM neg. BuOH neg.		
POS 28J2-2a, POS 32J2-3	<i>Dendrilla cirsioides</i>	DCM pos. BuOH pos., verbr.	<i>n</i> -Hexan pos., verbr.	Acetonitril C pos., verbr. Acetonitril B pos., verbr. Acetonitril A pos., verbr.
PS 62/024-1/12	<i>Eurypon</i> sp.	DCM pos., verbr.		
POS 26J1-9	<i>Forcepia forcipis</i>	DCM pos. BuOH neg.	<i>n</i> -Hexan neg. Acetonitril neg.	
PS 62/023-4/2	<i>Geodia mesotriaena</i>	DCM neg. BuOH pos., verbr.		
POS 18J1-6A	<i>Haliclona</i> sp.1	DCM pos. BuOH pos., verbr.	<i>n</i> -Hexan neg.	Acetonitril C neg. Acetonitril A neg.
POS 18J1-8	<i>Haliclona</i> sp. 2	DCM pos.	<i>n</i> -Hexan neg.	Acetonitril C neg. Acetonitril B pos., verbr.
POS 30J1-5	<i>Hymeniacidon</i> aff. <i>fallax</i>	DCM neg.		

Abschlussbericht zum BMBF-Projekt BOSMAN II

Teilprojekt 1: 'Naturstoffe aus Porifera und assoziierten Mikroorganismen borealer Habitate'

		BuOH	neg.		
PS 62/180+182/6	<i>Lissodendoryx</i> sp.	DCM	pos., verbr.		
		BuOH	pos., verbr.		
POS 24J2-4	<i>Plakortis simplex</i>	DCM	pos.	<i>n</i> -Hexan	pos.
		BuOH	pos.		Acetonitril D pos. Acetonitril C pos. Acetonitril B neg. Acetonitril A neg. Butanol C neg. Butanol B pos. Butanol A neg.
PS 62/60-AGT2	<i>Polymastia sol</i>	DCM	pos., verbr.		
POS 20J2-7c	<i>Spongosorites genitrix</i>	DCM	pos.	<i>n</i> -Hexan	neg.
		BuOH	pos.	Acetonitril	pos.
					Acetonitril G neg. Acetonitril F neg. Acetonitril E neg. Acetonitril D pos. Acetonitril C pos. Acetonitril B pos. Acetonitril A neg. Butanol D neg. Butanol C pos. Butanol B pos. Butanol A neg.
BRA I 1-2, BRA 2-1	<i>Tentorium semisuberites</i>	DCM	pos., verbr.	<i>n</i> -Hexan	neg.
		BuOH	pos., verbr.	Acetonitril	pos., verbr,
PS 62/60-AGT1	<i>Thenea</i> cf. <i>abyssorum</i>	DCM	pos., verbr.		
		BuOH	neg.		
SO 164-59	<i>Xestospongia muta</i>	DCM	pos.	<i>n</i> -Hexan	pos.
		BuOH	pos.	Acetonitril	pos.
Summe	20 (Spezies)		35		29

getestete Proben = 84

Bei der **Oncotest GmbH** getestete Extrakte, Subextrakte und Fraktionen aus Poriferen des TP 1

Probenkürzel	Spezies	Extrakt	Subextrakt	HPLC-Fraktion
POS 30J1-8	<i>Antho dichotoma</i>	DCM neg.		
POS 30J1-13	<i>Axinella infundibuliformis</i>	DCM neg. BuOH neg.		
BRA 3 1-4, BRA 3 1-5	<i>Axinella rugosa</i>	DCM pos. BuOH neg.	<i>n</i> -Hexan pos.	Acetonitril D neg. Acetonitril C neg. Acetonitril B neg.
POS 26J1-14	<i>Chlathria barleii</i>	DCM neg. BuOH pos.		
PS 62/180+182/1	<i>Cladorhiza gelida</i>	DCM neg. BuOH neg.		
POS 28J2-2a, POS 32J2-3	<i>Dendrilla cirsioides</i>	DCM pos.	<i>n</i> -Hexan neg.	Acetonitril B pos.
PS 62/024-1/12	<i>Eurypon</i> sp.	DCM pos.		
POS 26J1-9	<i>Forcepia forcipis</i>	DCM neg. BuOH neg.		
PS 62/023-4/2	<i>Geodia mesotriaena</i>	DCM neg.		
POS 18J1-6A	<i>Haliclona</i> sp.1	DCM pos. BuOH neg.	<i>n</i> -Hexan neg.	Acetonitril C neg. Acetonitril B neg. Acetonitril A neg.
POS 18J1-8	<i>Haliclona</i> sp.2	DCM pos.	<i>n</i> -Hexan neg.	
POS 30J1-5	<i>Hymeniacidon</i> aff. <i>fallax</i>	DCM neg.		
PS 62/180+182/6	<i>Lissodendoryx</i> sp.	DCM neg.		
POS 24J2-4	<i>Plakortis simplex</i>	DCM pos.	<i>n</i> -Hexan neg.	Acetonitril D neg. Acetonitril C pos. Acetonitril B neg.
	Reinsubstanz (Peroxid 1)	neg.		
	Reinsubstanz (Peroxid 2)	pos.		
	Reinsubstanz (Tryptophan-Amid 1)	neg.		
	Reinsubstanz (Tryptophan-Amid 2)	neg.		
PS 62/60-AGT2	<i>Polymastia sol</i>	DCM neg.		
POS3 20J2-7c	<i>Spongosorites genitrix</i>	DCM pos.	<i>n</i> -Hexan neg.	

		BuOH	pos.		Acetonitril G	neg.
					Acetonitril F	neg.
					Acetonitril E	neg.
					Acetonitril D	neg.
					Acetonitril C	neg.
					Acetonitril B	neg.
					Acetonitril A	neg.
					Butanol D	neg.
					Butanol C	neg.
					Butanol B	neg.
					Butanol A	neg.
BRA 1 1-2, BRA 2-1	<i>Tentorium semisuberites</i>	DCM	neg.			
		BuOH	neg.			
PS 62/60-AGT1	<i>Thenea cf. abyssorum</i>	DCM	pos.			
So 164-59	<i>Xestospongia muta</i>	DCM	pos.	<i>n</i> -Hexan	neg.	
					Acetonitril D	neg.
					Acetonitril C	neg.
					Acetonitril B	neg.
					Acetonitril A	neg.
		BuOH	neg.			
Summe	19 (Spezies)		31	7		25

gestestet Proben = 63

Zur Anreicherung oder Isolierung spezifischer semipolarer bis polarer Komponenten mussten diverse neue HPLC-Methoden etabliert oder bestehende Techniken auf die Komponenteneigenschaften ausgerichtet werden. Es stellte sich in einigen Fällen heraus, dass die Extraktmenge nach mehreren Testschritten für die Isolierung biologisch aktiver Einzelkomponenten nicht mehr ausreichte. Für einige Proben wurden Aktivitäten nicht in den Subextrakten bzw. Fraktionen bestätigt. Die Strukturen von Reinstoffen mit vermuteter biologischer Wirksamkeit wurden mit NMR-Spektroskopie bestimmt.

II.1.2. Sekundärmetabolite in organischen Extrakten borealer Poriferen

– Korrelation mit biologischen Aktivitäten

Strukturell auffällige Verbindungen wurden bereits in BOSMAN I aufgenommen und teilweise in der Dissertation von Blumenberg (2003) beschrieben. Diese Arbeiten wurden in BOSMAN II fortgesetzt. Die jeweils aktuellen Testergebnisse des IBWF e.V. und der Oncotest GmbH für Extrakte und Fraktionen aus Poriferen des TP 1 wurden in den halbjährlichen Zwischenberichten eingehend dargestellt. Für mehrere Poriferenspezies wurden im Vergleich zu anderen Arten auffällige Aktivitäten in den eingesetzten Testsystemen festgestellt. Am häufigsten wurden für die Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe zytotoxische Effekte beobachtet, während signifikante antibakterielle, nematizide oder herbizide Wirkungen vergleichsweise selten auftraten. Da in spezifischen Poriferen verschiedene Wirkungen in Fraktionen verschiedener Polaritäten festgestellt wurden, war zu vermuten, dass mehrere Wirkstoffe vorlagen. Als besonders interessant erwiesen sich die Demospongien *Dendrilla cirsioides*, *Spongosorites genitrix*, *Plakortis simplex*, und *Axinella rugosa*, für die in Fraktionen (Stoffgemischen) starke Bioaktivitäten beobachtet wurden (siehe Abschlussberichte des IBWF e.V. und der Oncotest GmbH).

Dendrilla cirsioides (Dendroceratida, Darwinellidae, Merejkowsky 1879)

Dendrilla cirsioides ist eine kleinwüchsige, dendroide Porifere, die im Rahmen von BOSMAN erstmals in der Region um den Sula-Rücken aufgefunden wurde (siehe Abschlussbericht TP 2, BOSMAN I, 12/2001)). Nichtboreale Angehörige der Gattung sind als Quellen einer Vielzahl von Wirkstoffen bekannt (siehe I.4). Aufgrund der geringen Größe ihrer Individuen konnten für BOSMAN lediglich geringe Mengen geborgen werden. Im TP 1 lagen etwa 5 g Nassgewebe vor.

Sowohl bei der Oncotest GmbH als auch beim IBWF e.V. wurden starke zytotoxische Wirkungen für den DCM-Extrakt aus *D. cirsioides* bestimmt. Diese Effekte wurden bei beiden Institutionen auch in einer semipolaren, als ‚Acetonitril B‘ bezeichneten HPLC-Fraktion des DCM-Extrakts festgestellt (Abb. II.1.1.2.), während sie in der *n*-Hexan-Fraktion und den begleitenden HPLC-Fractionen ‚Acetonitril-A und Acetonitril-C‘ fehlten.

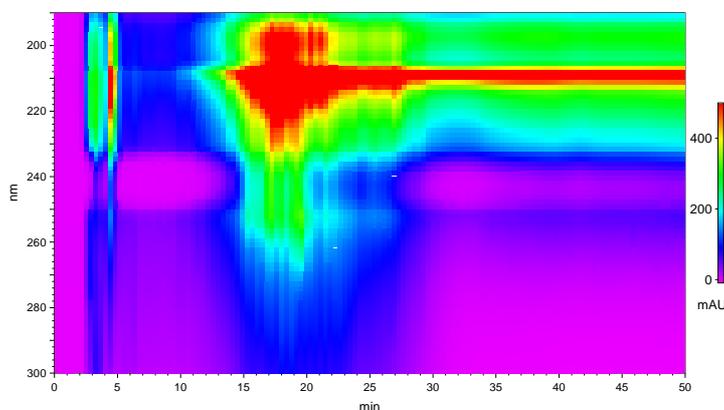


Abb. II.1.1.2. HPLC-DAD-Chromatogramm des Acetonitril-Subextraktes (DCM-Extrakt) aus *Dendrilla cirsioides*. Chromatographische Bedingungen: RP18 LiChrosphere, 250x10mm, 100µm, H₂O/THF-Gradient)

Wie Abb. II.1.1.2. zeigt, wurden die Komponenten des Acetonitril-Subextraktes mit den gewählten Bedingungen der präparativen HPLC nicht vollständig aufgelöst. Bei diskreten Wellenlängen des Diode-Array-Detektors werden im Chromatogramm der Fraktion ‚Acetonitril-B‘ vereinzelte Peaks innerhalb des nicht aufgelösten Stoffgemisches sichtbar. Aufgrund der äußerst geringen verfügbaren Substanzmenge (9,4 mg) wurde diese Fraktion zur weiteren Bearbeitung vollständig an das IBWF e.V. abgegeben. Hier konnten mit dem in BOSMAN II in 06/2004 bewilligten HPLC-Mikrotiterplatten-System mit gekoppeltem DAD und APCI-MS weiterführende Ergebnisse bei geringstem Substanzverbrauch erzielt werden.

Auch beim Einsatz dieses Verfahrens wurde mit den gewählten HPLC-Konditionen (RP18 LiChrospher 100, 125x4 mm, 5µm, H₂O/Actonitril-Gradient) keine hinreichend aufgelöste Chromatographie erreicht. Allerdings wurden zytotoxische Aktivitäten gegen Jurkat-Zelllinien in einer vollständigen Serie von 20 Mikrotitervials, die den weiten Retentionszeitbereich von 15,8 bis 20,8 min abdeckten, bestimmt. Es ist daher zu vermuten, dass eine Vielzahl von Verbindungen zytotoxische Effekte in *D. cirsioides* hervorrufen. Diese Annahme wird durch simultan aufgenommene APCI-MS- und UV-Spektren unterstützt. Aufgrund des Substanzmangels konnte die Strukturaufklärung der Verbindungen nicht verfolgt werden, so dass die Arbeiten an dieser hinsichtlich der Zielsetzungen des TP sehr interessanten Porifere eingestellt werden mussten.

Spongosorites genitrix (Halichondrida, Halichondriidae Vosmaer, 1887)

Spongosorites genitrix ist eine inkrustierende Porifere, die mit Hilfe des Tauchbootes ‚JAGO‘ mit großer Biomasse am Sula-Rücken geborgen wurde.

Für *S. genitrix* wurden starke zytotoxische Wirkungen am IBWF e.V. sowohl im DCM- als auch im BuOH-Extrakt beobachtet, während diese Effekte bei den Testungen der Oncotest GmbH im DCM-Extrakt und nur moderat im BuOH-Extrakt auftraten. In den anschließenden Testungen der Subextrakte und HPLC-Fractionen (*n*-Hexan, Acetonitril-A bis -G, Butanol-A bis -D) wurden bei der Oncotest keine Wirkung festgestellt. Am IBWF e.V. wurden die Aktivitäten erneut in den HPLC-Fractionen Acetonitril-B bis -D und Butanol-B und -C gefunden. Stärkste zytotoxische Effekte wurden für Butanol-B aufgeklärt. Zur raschen Strukturaufklärung der Wirkstoffe wurde der gesamte BuOH-Extrakt am IBWF e.V. mit HPLC-Mikrotitersystem bearbeitet, wodurch die Isolierung von drei gegen HeLa S3-Zellen zytotoxische Komponenten gelang (siehe Bericht IBWF e.V.). Substanz 2 zeigte neben der Zytotoxizität schwach antibakterielle Wirkungen.

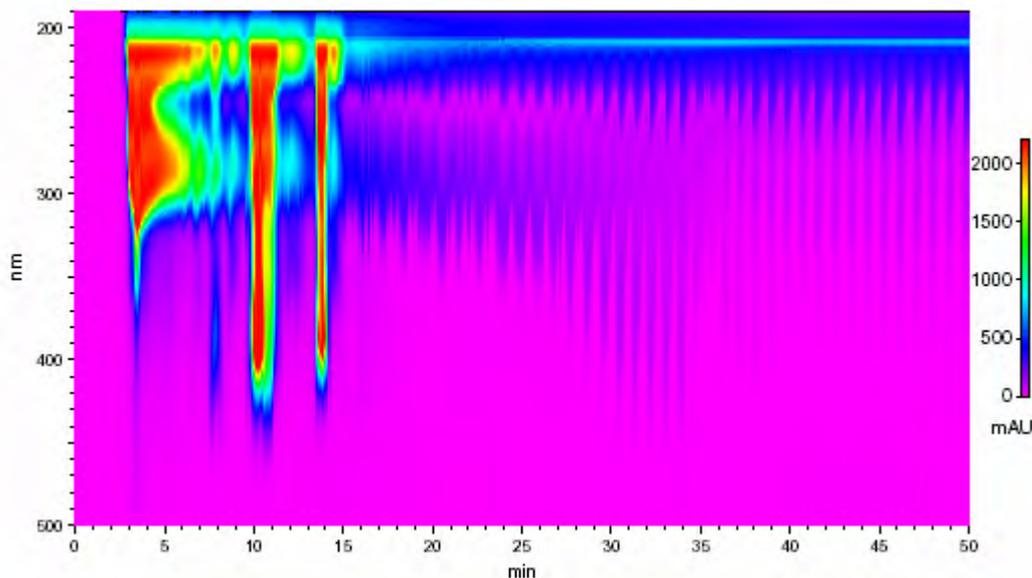


Abb. II.1.1.3. HPLC-DAD-Chromatogramm des Butanol-Extrakts aus *Spongosorites genitrix*. Chromatographische Bedingungen wie oben.

Die Arbeiten zur Strukturaufklärung der Komponenten mittels NMR-Spektroskopie sind noch nicht abgeschlossen. Auf Grundlage der UV- und NMR-Spektren können sie jedoch bereits der Substanzklasse der Tropsentine zugeordnet werden. Eine weitere Verwertung der Ergebnisse durch das TP 1 ist vorgesehen. Im Allgemeinen scheint *S. genitrix* ein sehr erfolgversprechender Kandidat bei der Suche nach marinen, biologisch aktiven Verbindungen zu sein.

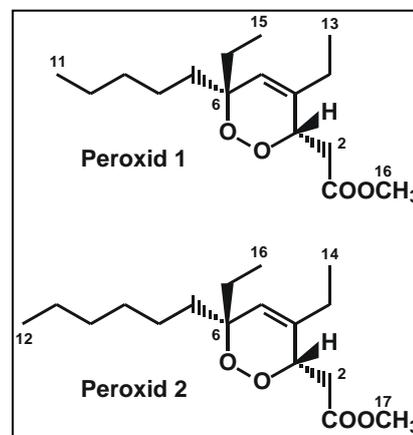
Plakortis simplex (Homosclerophorida, Plakinidae; Schulze, 1880)

Poriferen der inkrustierenden Spezies *Plakortis simplex* sind im Gebiet des Sula-Rückens äußerst häufig und mit hoher Biomasse präsent. Insbesondere in den Randbereichen mit Korallen-Riffschutt sind sie sehr stark vertreten. Taxonomisch nimmt *P. simplex* als einziger Vertreter der Ordnung Homosclerophoridae (Klasse Demospongiae) im BOSMAN-Probenmaterial eine außergewöhnliche Stellung ein. Die chemischen Voruntersuchungen zeigten, dass diese borealen Vertreter von *P. simplex* ein mannigfaltiges Inventar ungewöhnlicher Substanzen aufweisen. Aufgrund des weiten Komponenten-Spektrums wurde *P. simplex* im TP 1 umfassend untersucht und das organische Inventar von M. Holzwarth in seiner Dissertation (2005) eingehend beschrieben.

Bereits in den Extrakten aus BOSMAN I wurden auffällige chemische Strukturen in *P. simplex* entdeckt und intensiv bearbeitet. So wurden in der Fraktion unpolarer Inhaltsstoffe neben einigen Sesquiterpenen Vertreter der Substanzklasse der Hopanoide in auffällig hohen Konzentrationen nachgewiesen. Diese sind das Neohop-13(18)-en, das Hop-22(29)-en (Diplopten), das Hop-17(21)-en, das 32,35-Anhydrobacteriohopan-32,33,34,35-tetrol und die 17 β (H),21 β (H)-bishomo-Hopansäure. Hopanoide sind Biomarker von Bakterien, weshalb sich aus den vorliegenden Ergebnissen eine hohe Bakterienpopulation der untersuchten Spezies ableiten lässt. Mikrobiologische Untersuchungen der TP 2, 4 und 7 bestätigen diese Annahme. So wurde vom TP 4 ein mariner Vertreter der Bacillus-Gruppe isoliert, für den vom TP 7 ein möglicherweise industriell nutzbares Enzymsystem aufgeklärt wurde (siehe Bericht TP 7). Eine gemeinsame Publikation zur physiologischen Charakterisierung des Bakteriums (Borchert et al.) ist in Vorbereitung.

In Extraktfraktionen höher polarer Inhaltsstoffe wurden einige Substanzen festgestellt, für die die Struktur cyclischer Peroxide angenommen wurde. Mittels präparativer HPLC wurden die beiden Hauptkomponenten dieser Stoffgruppe in *P. simplex* als Reinsubstanzen isoliert. Weiterführende Untersuchungen, insbesondere solche auf der Basis von GC-MS und NMR, führten zur Strukturaufklärung der Substanzen. Es sind dies die Verbindungen (3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-ensäuremethylester (Peroxid 1) und (3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylester (Peroxid 2).

Beide Reinsubstanzen wurden von der Oncotest GmbH mit sechs verschiedenen Krebszelllinien auf antitumorale Wirkungen untersucht (siehe auch Abschlussbericht Oncotest GmbH). Die eingesetzten Targets waren Magen- (GXF 251L), nicht kleinzellige Bronchial- (LXFL 529L), Brust- (MAXF 401NL), Haut- (MEXF 462NL), Nieren- (RXF 486L) und Gebärmutterkrebszellen (UXF 1138L). Bei den Tests zeigte das Peroxid 2 moderate Aktivitäten gegenüber allen sechs Zelllinien, wogegen das Peroxid 1 keine Hemmung der Zellvermehrung bewirkte. Gegenüber den Magen-, den nicht kleinzelligen Lungen- sowie den Hautkrebszellen zeigte Peroxid 2 selektive Hemmwirkungen mit IC₅₀ unter der maximal getesteten Konzentration von 10 μ g/mL. Für die drei weiteren Zelllinien wurden die IC₅₀ extrapoliert. Die Testergebnisse sind Tabelle II.1.1.2. zu entnehmen und wurden im Journal of Natural Products publiziert (Holzwarth et al., 2005).



Krebszell-typen	Peroxid 1						Peroxid 2					
	T/C [%] bei Testkonzentrationen					IC ₅₀ ^a [µg/mL]	T/C [%] bei Testkonzentrationen					IC ₅₀ ^a [µg/mL]
	von [µg/mL]						von [µg/mL]					
0,001	0,01	0,1	1	10	0,001	0,01	0,1	1	10			
GXF 251L	99	107	106	111	94	> 10	100	103	108	98	41	8,26
LXFL 529L	96	100	96	103	99	> 10	98	104	105	100	24	7,72
MAXF 401NL	105	107	102	122	104	> 10	107	122	143	142	34	14,94 ^b
MEXF 462NL	94	99	95	98	94	> 10	113	89	94	99	23	7,23
RXF 486L	117	113	117	122	113	> 10	111	111	110	112	71	14,35 ^b
UXF 1138L	114	119	113	117	111	> 10	112	110	117	105	70	14,11 ^b

Tabelle II.1.1.2. In-vitro-Aktivitäten von Peroxid 1 und Peroxid 2 gegenüber menschlichen Tumorzelllinien in Monolayer-Assays (Oncotest GmbH, Freiburg)

T/C (Test/Control) = relatives Zellwachstum gegenüber einer Referenz ohne Wirkstoffexposition

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration (50 % inhibitory concentration)

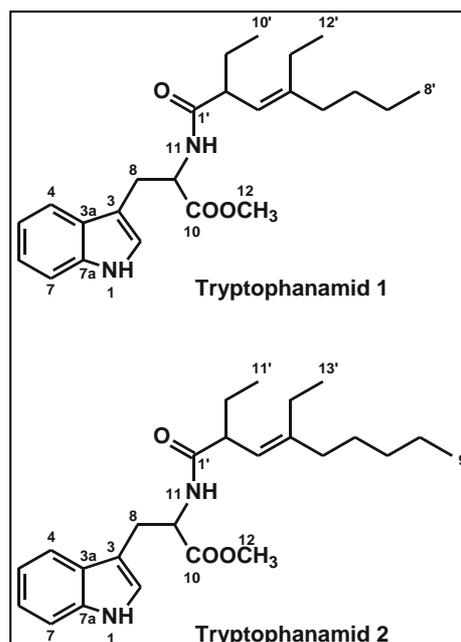
^a publizierte Werte (Holzwarth et al., 2005)

^b extrapolierter Wert

Weitere Sekundärstoffe, die mit den o.g. Methoden als Reinsubstanzen isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt werden konnten, sind zwei Tryptophanamide *N*-(2,4-Diethyloct-3-enyl)tryptophanmethylester und *N*-(2,4-Diethyl-non-3-enyl)tryptophanmethylester. Sie gehören zu den Indolalkaloiden, welche eine bedeutende Naturstoffgruppe darstellen. Die Identifikation dieser Komponenten ist der erste Nachweis von Indolalkaloiden in der untersuchten Spezies. Bioassays der Oncotest GmbH mit den äußerst geringen Substanzausbeuten der isolierten Verbindungen konnten keine antitumorale Wirkung dieser Metaboliten nachweisen. Die Biotests des IBWF e.V. mit angereicherten Extraktfraktionen, die Tryptophanamide enthielten, zeigten allerdings starke antibakterielle und zytotoxische Aktivitäten.

Neben diesen, an ungewöhnlichen Strukturen ausgerichteten Arbeiten, wurde parallel die ‚Assay-gesteuerte‘ Fraktionierung der Extrakte aus *P. simplex* verfolgt. Dabei wurden im Vergleich zu den anderen untersuchten Poriferen außergewöhnlich starke antibakterielle und zytotoxische Wirkungen der DCM- und BuOH-Extrakte beobachtet, die am IBWF e.V. für den *n*-Hexan-Subextrakt und für die HPLC-Fractionen Acetonitril-C und -D sowie Butanol-B bestätigt wurden. Der *n*-Hexan-Subextrakt und die HPLC-Fraktion Acetonitril-C wurden anschließend mit dem HPLC-Mikrotiter-system bearbeitet. Diese Arbeiten wurden aufgrund nicht zufriedenstellender Aufreinigungsergebnisse eingestellt (siehe Abschlussbericht IBWF e.V.).

Wie das weite Wirkspektrum und die weitreichende Verteilung von Aktivitäten in Fraktionen verschiedener Polarität zeigen, ist *P. simplex* ein viel versprechender Kandidat für die zukünftige Suche nach marinen Naturstoffen. Es ist zu vermuten, dass noch eine Reihe ungeklärter Wirkstoffe in *P. simplex* vorliegt.



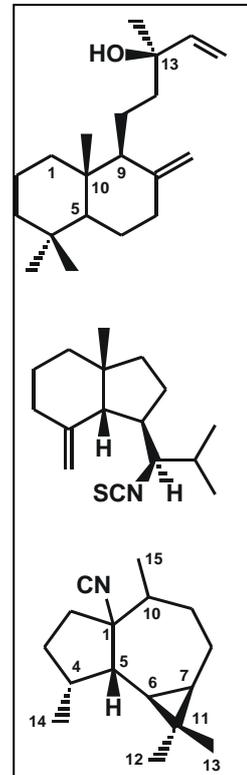
Axinella rugosa (Ordnung Halichondrida, Familie Axinellidae, Schmidt, 1975)

Mehrere Individuen von *Axinella rugosa* wurden im Gebiet des Korsfjords geborgen, so dass eine vergleichsweise große Biomasse vorlag. *A. rugosa* wies ein für axinellide Poriferen typisches Lipidmuster mit hohen Konzentrationen an langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, den 'demospongiac acids' und ihren bromierten Strukturanaloga auf (siehe auch Dissertation Blumenberg, 2003). Darüber hinaus wurden mehrere Terpene als Inhaltsstoffe des organischen Gesamtextrakts von *A. rugosa* identifiziert. Eine detaillierte Beschreibung des Lipidinventars von *A. rugosa* findet sich in der Dissertation von Holzwarth (2005).

Im Zuge dieser Arbeiten wurden das Labda-8(17),13-dien-12-ol und das (4S*,5R*,6S*,7S*)-1-Isocyanoaromadendran mit Hilfe eines präparativen GC des TP 6 isoliert. Die Strukturaufklärung wurde durch den Einsatz von MS, ein- und zweidimensionaler NMR- sowie Infrarotspektroskopie erreicht. Die Identifikation des Axisothiocyanat-1 wurde auf der Basis von MS und vergleichenden GC-MS-Untersuchungen mit authentischem Referenzmaterial durchgeführt.

Bioaktive Effekte in Form zytotoxischer Wirkungen wurden für diese Porifere für den DCM-Auszug bei beiden testenden Institutionen festgestellt, während für den BuOH-Auszug keine Aktivitäten auftraten. Am IBWF e.V. wurde zudem eine geringfügige antibakterielle Wirkung im DCM-Auszug entdeckt. Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass die Zytotoxizität im Wesentlichen durch unpolare Inhaltsstoffe der *n*-Hexan-Fraktion und untergeordnet der HPLC-Fraktionen Acetonitril-A und -B verursacht wurde.

Diese Befunde wurden beim Einsatz des HPLC-Mikrotiterplattensystem am Acetonitril-Subextrakt bestätigt. Wie das Auftreten von Aktivitäten gegen Jurkat-Zelllinien im weiten Retentionszeitbereich zwischen 11,8 und 24,0 min andeutet, sind mehrere semipolare bis unpolare Wirkstoffe in *A. rugosa* vorhanden. Es ist davon auszugehen, dass ein Großteil dieser Komponenten bereits mit den Methoden am TP 1 strukturell erfasst wurden. Tests zur endgültigen Nachweise der biologischen Aktivität an den Reinstoffen oder ihren synthetischen Analoga sind noch in Arbeit. Moderate Wirkungen in relativ polaren HPLC-Fraktionen legen die Vermutung nahe, dass weitere, funktionalisierte Wirkstoffe in *A. rugosa* vorliegen.

**Fazit II.1.2.1. Sekundärmetabolite in organischen Extrakten borealer Poriferen – Korrelation mit biologischen Aktivitäten**

Die Arbeiten des TP 1 in BOSMAN II zeigten eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse für die eingesetzten Methoden – chemisches Screening und Bioassays - zur Suche nach Naturstoffen mit biologischer Aktivität. Eine Gegenüberstellung der bei den jeweiligen Verfahren auffälligen Poriferen gibt (Tab. II.1.1.3.).

Tab. II.1.1.3 Liste der Poriferen des TP 1, die hinsichtlich ihres Sekundärstoffinventars (Chemisches Screening) und ihrer biologischen Aktivität (Bioassays) auffielen.

Chemisches Screening - Naturstoffe	Bioassays - Aktivität
<i>Plakortis simplex</i>	<i>Plakortis simplex</i>
<i>Axinella rugosa</i>	<i>Axinella rugosa</i>
<i>Spongosorites genitrix</i>	<i>Spongosorites genitrix</i>
<i>Dendrilla cirsioides</i>	<i>Dendrilla cirsioides</i>
	<i>Haliclona</i> sp. 1
	<i>Haliclona</i> sp. 2

Dennoch wurde für vereinzelte Poriferen mit hohen Konzentrationen an Sekundärmetaboliten keine Aktivität bei den eingesetzten Biotestsystemen beobachtet. Für wenige andere Spezies wurden dagegen Wirkungen festgestellt, während Sekundärmetabolite nur untergeordnet auftraten bzw. der Analyse nicht zugänglich waren. Diese Beobachtungen lassen den in BOSMAN gewählten methodischen Parallelansatz auch für die zukünftige Suche nach Naturstoffen sinnvoll erscheinen.

Zwischen dem Vorkommen auffälliger Strukturen bzw. biologischer Aktivitäten und dem Habitat der interessanten Poriferen wurde kein Bezug festgestellt. So wurden Sekundärstoffe und/oder verschiedene Aktivitäten in Vertretern aller untersuchten Standorte festgestellt (siehe Tab. II.1.1.1.). Gleichmaßen wurden Sekundärstoffe und Bioaktivitäten in nahezu allen Poriferenordnungen bestimmt. Auffallend ist aber, dass sehr starke Wirkungen bei zwei inkrustierenden Poriferen, *Plakortis simplex* und *Spongosorites genitrix*, auftraten.

Insgesamt scheinen die Kontrollfaktoren der Sekundärstoffsynthese vielfältig und erst im Ansatz verstanden zu sein. Dennoch konnte im TP 1 auf Basis des umfangreichen Probenmaterials und zusammen mit Literaturdaten für Poriferen anderer Habitate eine Bibliothek der für spezifische Taxa typischen Strukturen erstellt werden. Als zeitsparende Methode zur phylogenetischen Zuordnung unbekannter Poriferen dient die Chemotaxonomie, die in BOSMAN I etabliert wurde. Die im TP 1 erarbeitete umfassende biochemische Inventarisierung zusammen mit der Beschreibung lipidchemischer Merkmale eignet sich daher hervorragend für die rasche Auswahl von Spezies bei zukünftigen Arbeiten an Schwämmen als marine Naturstoffquelle.

II.1.2.2. Korrelation mit der Dichte schwammassoziierter Bakterien

Arbeiten zu Wirkstoffen in Isolaten schwammassoziierter Mikroorganismen wurden nicht aufgenommen, da in der Projektlaufzeit nur für wenige der am IBWF e.V. angezogenen und getesteten Bakterien deutliche biologische Aktivitäten festgestellt wurden (siehe Abschlussberichte IBWF e.V. und TP 3). Interessierende Bakterien wurden nach Absprache in BOSMAN II von den TP 3, 5 und 7, aufgearbeitet und analysiert. In diesen Teilprojekten lagen optimale Laborkapazitäten hinsichtlich der Anzucht und der Verarbeitung großer Mengen Bakterienzellmaterials vor. Im TP 1 wurden daher die chemischen Arbeiten zur Strukturaufklärung und der Korrelation mit bioaktiven Fraktionen aus Poriferen intensiviert.

Bereits in BOSMAN I wurde festgestellt, dass sich das lipidchemischen Inventar der Poriferen zur Charakterisierung der Zelldichte der assoziierten Bakterienpopulation in Poriferengewebe eignet. Diese Arbeiten wurden in BOSMAN II fortgesetzt und in der Dissertation von Pape (2004) beschrieben. Tab. II.1.1.4. gibt die Bakterienzeldichte und die Präsenz von Sekundärstoffen in ausgewählten BOSMAN-Poriferen wieder.

Tab. II.1.1.4. Bakterienzeldichte und Sekundärstoffauftreten in BOSMAN-Poriferen. Gekennzeichnet sind Individuen mit hoher Bakterienzellzahl (o) und auffälligen Sekundärstoffstrukturen (+).

	Bak.	Sek.		Bak.	Sek.
<u>Homoscleromorpha</u>			<u>Ceractinomorpha</u>		
<i>Plakortis simplex</i>	o	+	<i>Hymedesmia</i> sp.		+
			<i>Mycale lingua</i>		
<u>Tetractinomorpha</u>			<i>Oceanapia robusta</i>	o	
<i>Stryphnus ponderosus</i>	o		<i>Haliclona</i> sp. 1	o	
<i>Dragmastra normanii</i>	o		<i>Haliclona</i> sp. 2		
<i>Geodia barretti</i>	o	+	<i>Haliclona urceolus</i>		
<i>Isops phlegraei</i>	o		<i>Petrosia crassa</i>	o	
<i>Pachymatisma johnstonia</i>	o		<i>Phakellia ventilabrum</i>		+
<i>Tentorium semisuberites</i>			<i>Axinella rugosa</i>		+
			<i>Axinella infundibuliformis</i>		
			<i>Spongosorites genitrix</i>	o	+
			<i>Hymeniacidon</i> aff. <i>fallax</i>		
			<i>Dendrilla cirsioides</i>		+

Wie die Ergebnisse in Tab. II.1.1.4. zeigen, wurde kein Zusammenhang zwischen dem Bakteriengehalt und dem Sekundärstoffvorkommen in den BOSMAN-Poriferen beobachtet. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Bakteriendichte kein wesentlicher Kontrollfaktor der Sekundärstoffsynthese in borealen Poriferen ist.

II.1.3 Lipidchemische Charakterisierung schwammassoziierter Mikroorganismen

II.1.3.1. Bakterien

Im Teilprojekt 1 wurde die Konzentration und das Muster bakterieller Fettsäuren, die die Dichte und phylogenetische Diversität von Bakterien im Gewebe spezifischer Poriferen anzeigen, für alle Poriferen von BOSMAN I erfasst (Dissertation Pape, 2004). Zur Zuordnung bakterieller und eukaryotischer Verbindungen, wurde das Fettsäure-Inventar in zahlreichen Isolaten schwammassoziierter Bakterien unterschiedlicher phylogenetischer Position aufgenommen.

In BOSMAN II wurden die Arbeiten zum Fettsäure-Inventar an den neuen Poriferen (FS Polarstern, FS Sonne, Bergen-Marin-Biologische Station, Karibik) und an isolierten schwammassozierten Bakterien fortgesetzt. Die Ergebnisse dienen der physiologischen Beschreibung der neuen Bakterien und werden mit den Resultaten der TP 4, TP 5 und TP 7 publiziert. Im Abschlußbericht des TP 4 findet sich eine detaillierte mikrobiologische Beschreibung der Bakterienkulturen.

II.1.3.2. Archaeen

Auch die lipidchemischen Untersuchungen zu schwammassozierten Archaeen wurden weitergeführt. Es zeigte sich, dass die mit FS Polarstern in 2002 gesammelte Porifere *Tentorium semisuberites* in weiten Teilen des Gewebes über eine ungewöhnlich hohe Dichte an Archaeen-Zellen verfügt. Diese Daten werden gemeinsam mit Kollegen aus dem TP 2 und einer externen Kooperation veröffentlicht (Pape et al., 2005). Untersuchungen zur Taxonomie und Funktion der Archaeen werden an anderer Stelle weitergeführt.

II.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Teilprojektes sind entweder in Fachzeitschriften publiziert, oder in den Zwischen- und Abschlussberichten ausführlich dargestellt worden. Ferner wurden Ergebnisse bei Vorträgen auf Fachkongressen vorgestellt. Ausführliche Beschreibungen des Primär- und Sekundärstoffinventars in den BOSMAN-Poriferen und ihrer Nutzung für chemotaxonomische, mikrobiologische und pharmakologische Fragestellungen finden sich in den Dissertationen von Blumenberg M. (2003), Pape T. (2004) und Holzwarth M. (2005) sowie den Diplomarbeiten von Boenkendorf F. (2003) und Vetter A. (2004). Die Verwertbarkeit der Ergebnisse ist daher gegeben.

Im TP 1 sind anhand des umfangreichen Probenmaterials Parameter zur raschen Charakterisierung der taxonomischen Zugehörigkeit von Schwämmen der Klasse Hexactinellida und Demospongiae und der Zelldichte assoziierter Bakterien erstellt worden. Ein Vergleich mit den für Poriferen tropischer Standorte publizierten chemischen Daten führt zu der Vermutung, dass diese Verfahren und Resultate auch auf Individuen anderer Habitat übertragen werden können und möglicherweise für das Phylum der Porifera allgemein genutzt werden können.

Eine Reihe von Kaltwasserporiferen mit interessanten Strukturen, deren biologische Aktivität aufgrund unzureichender Menge der Reinstoffe noch nicht überprüft wurde, konnte vom TP 1 dokumentiert werden. Auch sind für einige Poriferen verschiedene Bioaktivitäten, denen noch keine chemischen Strukturen zugeordnet werden konnten, festgestellt worden. In beiden Fällen eignen sich die Daten des TP 1 hervorragend als Grundlage für eine Neubearbeitung des Naturstoffinventars borealer Poriferen. Ferner sind im Teilprojekt neue methodische Strategien zur Isolierung mariner Naturstoffe entwickelt worden. Die erzielten Ergebnisse liefern daher wichtige Daten für weiterführende Projekte im Bereich der Naturstoffforschung im Allgemeinen und kaltwasseradaptierte Hexactinellida und Demospongiae im Speziellen. Besonders erwähnenswert sind die aus den Spezies *Plakortis simplex* und *Spongosorites genitrix* isolierten neuen Strukturen, die sich in den Biotests als hochwirksam herausgestellt haben. Die Überprüfung ihrer Marktfähigkeit wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

II.3. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Das Potenzial von Wirkstoffen in marinen Invertebraten ist seit einigen Jahren im Fokus wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesses. Wie aus den verfügbaren Publikationen hervorgeht, stehen und standen für Poriferen insbesondere Flachwasser- und/oder Warmwasserarten im Mittelpunkt der Untersuchungen. Dabei wurden zahlreiche interessante Strukturen mit vielfältigen biologischen Wirkweisen veröffentlicht. Für Sekundärmetabolite aus Kalt- oder Tiefwasserschwämmen liegen immer noch sehr wenige Informationen von anderen Stellen vor, was die Relevanz des Projektes BOSMAN auf diesem Gebiet unterstreicht.

II.4. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der Arbeiten im TP 1 sind bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht. Sämtliche Publikationen liegen dem Bericht bei. Autoren des TP 1 sind hervorgehoben.

Dissertationen und Diplomarbeiten

- Blumenberg M.** (2003) Biomarker aus Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämmen, Dissertation Universität Hamburg, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Hamburg.
- Pape T.** (2004) Lipidbiomarker schwammassoziiierter Bakterien und Archaeen. Dissertation Universität Hamburg, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*. Hamburg.
- Holzwarth M.** (2005) Untersuchungen zum Primär- und Sekundärstoffinventar von Kaltwasserschwämmen. Dissertation Universität Hamburg, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Hamburg.
- Boenkendorf F.** (2002) Biomarker für Mikroorganismen in Schwämmen. Diplomarbeit Universität Hamburg, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Hamburg.
- Vetter A.** (2004) Lipidbiomarker und Chemotaxonomie nordatlantischer Tiefseeschwämme. Diplomarbeit Universität Hamburg, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Hamburg.

Fachartikel

- Freiwald A. and Mortensen P.B. (2000) The first record of the deep-water coral *Stenocyathus vermiformis* (Pourtales, 1868) (Scleractinia, Guyniidae) from Norwegian waters. *Sarsia* 85, 275-276.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W.,** (2002) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89, 60-66.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G., Michaelis W.,** (2002) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges – ERRATUM *Naturwissenschaften* 89, 233-234.
- Sölter S., Dieckmann R., **Blumenberg M.**, and Francke W. (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Letters* 43, 3385-3386.
- Blumenberg M., Thiel V., Pape T., Michaelis W.,** (2002) The steroids of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* 89, 415-419.
- Pape T., Blumenberg M., Thiel V., Michaelis W.,** (2003) Biphytanes as biomarkers for sponge associated Archaea. In: M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi (Eds.), *Sponge science in the new millennium*, 68, pps. 509-515.
- Hoffmann F., Rapp H.T., Peters H., **Pape T., Reitner J.** (2004) Sedimentary inclusions in the deep-water sponge *Geodia barretti* (Geodiidae, Demospongiae) from the Korsfjord, Western Norway. *Sarsia* 89, 1-8.
- Holzwarth M., Trendel J.-M., Albrecht P., Maier A., Michaelis W.** (2005) Cyclic peroxides derived from the marine sponge *Plakortis simplex*. *Journal of Natural Products* 68, 759-761.
- Hoffmann F., Larsen O., Thiel V., Rapp H.T., **Pape T., Michaelis W., Reitner J.** (2005) An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiology Journal* 22, 1-10.
- Pape T., Hoffmann F., Queric N.-V., von Juterzenka K., Reitner J., Michaelis W.** (accepted) Dense populations of Archaea associated with the hadromerid demosponge *Tentorium semisuberites* from Arctic deep waters. *Polar Biology* (im Druck)

Geplante Veröffentlichungen

- Borchert M.S., Nielsen P., Schäfer T., Kaesler I., Szewzyk U., **Pape T., Michaelis W.**, Antranikian G., Marine *Bacillus plakortiensis*, sp. nov., and *Bacillus greeniensis* sp. nov., novel members of alkalitolerant rRNA group 6. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., **Pape T.**, Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., **Michaelis W.**, Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Isops phlegraei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Kaesler I., Graeber I., Borchert M., **Pape T.**, Dieckmann R., Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., **Michaelis W.**, Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Geodia baretii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Graeber I., Kaesler I., Borchert M., **Pape T.**, Dieckmann R., Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., Michaelis W., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Haliclona* sp.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., **Pape T.**, Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., **Michaelis W.**, Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., marine bacteria isolated from the boreal sponge *Phakellia ventilabrum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Holzwarth M.**, Francke W., **Michaelis W.**, Two novel tryptophanamides in the marine sponge *Plakortis simplex*. *Journal of Natural Products*.

III.1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen

Die Ziele des Verbundprojekts ‚BOSMAN – Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle‘ orientierten sich vollständig an den förderpolitischen Ziele des BMBF und des Schwerpunktprogramms ‚Marine Naturstoffforschung‘. Hierbei hat das Teilprojekt 1 einen wesentlichen Beitrag zur Aufnahme biologischer Aktivitäten in borealen Schwämmen und zur Strukturaufklärung biologisch wirksamer Komponenten und/oder solchen mit besonderen chemischen Strukturmerkmalen geleistet. Mit der Entwicklung neuer chemischer Methoden und Interpretationsansätze hat das Teilprojekt zur Erschließung mariner Poriferen, Bakterien und Archaeen als Naturstoffquelle beigetragen.

III.2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis und gesammelte Erfahrungen

Die Ergebnisse sind ausführlich in Fachartikeln, Dissertationen und Diplomarbeiten sowie Berichte an den Zuwendungsgeber dargestellt. Umfangreiche Erfahrungen wurden im Teilprojekt bei der Präparation von Naturstoffen aus komplexen Stoffgemischen in natürlichen Proben und der Interpretation der Datensätze gesammelt.

III.3. Fortschreibung des Verwertungsplans

Entfällt.

III.4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Sämtliche Arbeiten des TP 1 führten zu Ergebnissen. Jedoch konnten aufgrund der begrenzten Biomasse einzelner Poriferen-Spezies oder unzureichender Konzentrationen der Zielkomponenten in einigen Fällen keine ausreichenden Extraktmengen für die biologische Testung zur Verfügung gestellt werden. Für einige Spezies konnten daher die Strukturen biologisch aktiver Verbindungen nicht ermittelt werden.

III.5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die wesentlichen Ergebnisse des Teilprojektes 1 wurden in mehreren Fachartikeln und in drei Dissertationen publiziert, sowie nationalen und internationalen Fachtagungen vorgetragen.

III.6. Einhaltung des Ausgaben- und Zeitplans

Der Ausgabenplan wurde den Angaben im Projektantrag entsprechend eingehalten. Der Zeitplan wurde im Wesentlichen eingehalten. Die Mittel für die Untersuchungen am Korsfjord (Ausfahrten, Unterkunft, Reisekosten, Labornutzung) wurden durch Stipendien der EU bereitgestellt. Publikationen zu den lipidchemischen Eigenschaften neuer schwammassoziiierter Bakterien sind noch in Vorbereitung, da die mikrobiologischen Arbeiten des TP 4 und des IBWF e.V. an den Isolaten noch nicht abgeschlossen sind.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht
3a. Titel des Berichts Naturstoffe aus Porifera und assoziierten Mikroorganismen borealer Habitate	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Michaelis, Walter; Pape, Thomas; Holzwarth, Michael	5. Abschlußdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Hamburg Institut für Biogeochemie und Meereschemie Bundesstrasse 55 20146 Hamburg	7. Form der Publikation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 03F0358A
	11a. Seitenzahl Bericht 23
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben 55
	14. Tabellen 4
	15. Abbildungen 10
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18 Kurzfassung <p>Gesamtziel des Teilprojektes 1 (TP 1) in BOSMAN II war die Charakterisierung pharmakologisch wirksamer und strukturell auffälliger Sekundärmetabolite aus Poriferen und schwammassoziierten Mikroorganismen (SAM) borealer und arktischer Gewässer. Für die zukünftige Suche nach Naturstoffen sollten Prognosekriterien für Poriferen spezifischer Habitate bzw. taxonomischer Gruppen herausgearbeitet werden. Dabei wurde das chemische Screening auf Sekundärmetabolite mit der Erfassung biologischer Aktivitäten in Extrakten, Fraktionen und Reinstoffen kombiniert.</p> <p>Die wissenschaftlichen und technischen Arbeitsziele des TP 1 können wie folgt gegliedert werden:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Inventarisierung strukturell interessanter Verbindungen in organischen Extrakten borealer und arktischer Poriferen 2) Strukturaufklärung biologisch aktiver Verbindungen in Poriferen und assoziierten Bakterien 3) Charakterisierung von Parametern, die das Auftreten strukturell interessanter und/oder biologisch aktiver Verbindungen in borealen und arktischen Poriferen beeinflussen 4) Entwicklung und Optimierung chromatographischer Methoden zur Isolierung von verschiedenen polaren Wirkstoffen 	

Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe aus Poriferen und SAM wurden erstellt und ihr organisch-chemisches Inventar charakterisiert. Die Proben wurden weiterhin an die Projektpartner mit biologischen Testsystemen gegeben. Für mehrere Poriferenspezies konnten im Vergleich zu anderen Arten auffällige Aktivitäten in den eingesetzten Testsystemen festgestellt werden. Als besonders interessant erwiesen sich einzelne Demospongien, wie *Plakortis simplex*, für die in Fraktionen (Stoffgemischen) starke Bioaktivitäten beobachtet wurden. Am häufigsten wurden für die Extrakte, Fraktionen und Reinstoffe zytotoxische Effekte beobachtet, während signifikante antibakterielle, nematizide oder herbizide Wirkungen vergleichsweise selten auftraten. Da in spezifischen Poriferen verschiedene Wirkungen in Fraktionen verschiedener Polaritäten festgestellt wurden, war zu vermuten, dass mehrere Wirkstoffe vorlagen.

Aus *P. simplex* wurden die beiden Verbindungen (3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-ensäuremethylester und (3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylester, von denen eine zytotoxische Aktivitäten aufwies, isoliert.

Für vereinzelte Poriferen mit hohen Konzentrationen an strukturell auffälligen Sekundärmetaboliten wurden keine Aktivitäten bei den eingesetzten Biotestsystemen beobachtet. Für wenige andere Spezies wurden dagegen Wirkungen festgestellt, während Sekundärmetabolite nur untergeordnet auftraten bzw. der Analyse nicht zugänglich waren. Diese Beobachtungen lassen den in BOSMAN gewählten methodischen Parallelansatz von chemischen Screening und der Anwendung von Biotestsystemen auch für die zukünftige Suche nach Naturstoffen sinnvoll erscheinen.

19. Schlagwörter

Schwämme, Porifera, schwammassoziierte Mikroorganismen, Sekundärstoffe, Naturstoffe, Wirkstoffe, Metabolite, Biosynthese, Peroxide

20. Verlag

21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart
3a. Titel des Berichts	
3b. Titel der Publikation	
Biomarker aus Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämmen : Phylogenie, Chemotaxonomie und chemische Ökologie der Demospongiae und der Hexactinellida	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n))	5. Abschlußdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Blumenberg, Martin	6. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Hamburg Institut für Biogeochemie und Meereschemie Bundesstrasse 55 20146 Hamburg	7. Form der Publikation Dissertation
9. Ber. Nr. Durchführende Institution	10. Förderkennzeichen *) 03F0358A
11a. Seitenzahl Bericht	11b. Seitenzahl Publikation 165
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. Literaturangaben
14. Tabellen	15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18 Kurzfassung <p>In der vorliegenden Arbeit wurden organo-geochemische Methoden angewandt, um vielfältige Fragestellungen zur Chemotaxonomie, Phylogenie und Chemoökologie rezenter Kieselschwämme (Klassen Demospongiae und Hexactinellida) im Vergleich mit der Klasse Calcarea zu beleuchten. Diese Verfahren liefern anhand von Lipidbestandteilen (molekulare Marker; Biomarker) Aussagen, die mit Hilfe anderer Analysen nur unzureichend oder gar nicht zu erzielen sind. Zudem bilden die Lipiduntersuchungen rezenter Organismen die Basis zur Definition sog. 'Chemofossilien', die der Charakterisierung fossiler Lebensräume (Faunenzusammensetzung, Lebensbedingungen, etc.) dienen. Schwämme (Porifera) wurden als Modellorganismen ausgewählt, da ihr erdgeschichtliches Vorkommen weit in das Proterozoikum reicht und sie als älteste Metazoen überhaupt gelten. Mehr noch, ihr 'Bauplan' hat sich seit ihrer Entstehung nicht grundlegend geändert, so dass Untersuchungen an rezenten Formen dieser sessilen Invertebraten zu Einblicken in die Zellorganisation ursprünglichen vielzelligen Lebens führen. Aus diesem Grund und insbesondere der nachgewiesenen Potenz der Porifera zur Synthese pharmakologisch interessanter Naturstoffe sind sie seit langem Studienobjekt chemisch orientierter Arbeitsgruppen.</p> <p>Dennoch beschränkten sich die bisher durchgeführten Untersuchungen – aufgrund deren großer Verbreitung – nahezu ausschließlich auf tropische Vertreter der Demospongiae und Calcarea. Das dieser Studie zugrunde liegende Probenmaterial beinhaltet eine repräsentative Zahl an hexactinelliden Schwammarten (n = 23) und Kaltwasserdemospongien (n = 32), die derart umfassend chemisch bislang nicht untersucht worden sind. Somit schließen die erzielten Ergebnisse eine entscheidende Lücke der bisherigen Datenlage, um u.a. die kontrovers diskutierten phylogenetischen Zusammenhänge der drei rezenten Schwammklassen hinreichend beschreiben, aber auch, um eine Abschätzung borealer Lebensräume als Quelle von Naturstoffen vornehmen zu können.</p>	

Die Daten aus der in dieser Arbeit erstmalig durchgeführten lipidchemischen Analyse hexactinellider Schwämme wurden genutzt, um sie in die bestehenden widersprüchlichen Hypothesen zur Phylogenie der Porifera zu integrieren. So fassen einige Autoren, aus Gründen der Zellstruktur, die Demospongiae mit den Calcarea (Pinacophora bzw. Cellularia) – unter Ausschluss der Hexactinellida (Symplasma) – zusammen. Andere gliedern dagegen die Calcarea aufgrund ihrer Skelettchemie und der Larvalentwicklung von den Kieselschwämmen (Demospongiae und Hexactinellida) ab. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse demonstrieren eindeutig eine enge verwandtschaftliche Beziehung von Hexactinellida und Demospongiae. So synthetisieren alle untersuchten Vertreter der Hexactinellida, unabhängig von Fundort und Lebensraum, langkettige polyungesättigte Fettsäuren, die strukturell denen der Demospongiae entsprechen (LCFA 5,9; sog. 'demospongiac acids'). Dagegen fehlen diese Verbindungen in den Calcarea. Die Synthese dieser spezifischen Biomarker setzt ein differenziertes Fettsäure-Enzymsystem voraus, das offensichtlich in beiden Klassen der Kieselschwämme aktiv ist. Dennoch, trotz deutlicher Übereinstimmungen in der Grundstruktur der Lipidsäuren wurden auch Unterschiede innerhalb der Kieselschwämme nachgewiesen. So werden die Fettsäuren nahezu aller hexactinelliden Schwämme von Verbindungen einer Kettenlänge dominiert und auch bezüglich Verzweigungen (endständig und mittkettig) und Substitutionen (Brom, -Methoxy, -Hydroxy) wurde bei den Demospongiae eine deutlich größere Variabilität beobachtet. Vergleichbare grundsätzliche Divergenzen zwischen beiden Klassen sind bei der Untersuchung der Steroidinventare festgestellt worden. Diesbezüglich zeigte sich, dass auch innerhalb dieser Verbindungsklasse bei den Demospongiae strukturelle Abweichungen vom Cholesterolgrundgerüst auftreten, die in den Hexactinellida nicht nachgewiesen werden konnten. Zurückgeführt wurden diese Differenzen auf verschiedene Biosyntheseprozesse in den beiden Gruppen. Offensichtlich sind Demospongiae zur progressiveren Synthese von Sterolen in der Lage (*de novo*), hingegen nutzen die Hexactinellida eher Steroide aus der Nahrung, um diese in die eigenen Lipide einzulagern. Abschließend wurde so, unter Einbeziehung lipidchemischer Daten, ein phylogenetischer Versuch unternommen, der eine enge Beziehung zwischen Hexactinellida und Demospongiae vorsieht, in der die Hexactinellida, aufgrund ihres konservativen Lipidmetabolismus, die ursprünglichere Position einnehmen. Zusätzlich zur Determinierung phylogenetischer Grundzüge innerhalb des Phylums Porifera wurden mit Hilfe von Biomarkern chemotaxonomische Merkmale auf höherem verwandtschaftlichen Level erarbeitet. Hierzu zählen beispielsweise innerhalb der Demospongiae seltene langkettige bromierte Fettsäuren (6-Br-LCFA 5,9) in den Ordnungen Halichondrida und Haplosclerida, stickstoffhaltige Sesquiterpenoide in den Halichondrida, Diterpenfurane in den Dendroceratida, Cyclopropylsterole in den Haplosclerida sowie Steroidketone (3-Stanone) und Triacenta-5,9,21-triensäure (30 5,9,21) in Vertretern der Klasse Hexactinellida. Im Zuge dieser detaillierten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass, entgegen gegensätzlicher Annahmen, Kaltwasserporifera eine Quelle komplexer, pharmakologisch relevanter Naturstoffe sind. Diese Ergebnisse bilden eine wichtige Basis weiter gehender naturstoffbezogener Studien und steigern darüber hinaus die Bedeutung der weit verbreiteten Kaltwasserhabitats innerhalb dieses Zweiges der Forschung. Der zweite Teil der Arbeit fokussiert auf chemoökologische Funktionen spezieller Zellmembrankomponenten in kalten Habitaten und auf die Zusammenhänge verschiedener Verbindungsklassen in einem weit verbreiteten Schwamm des Nordostatlantiks (*Phakellia ventilabrum*). Durch den Vergleich mit tropischen Vertretern wurde gezeigt, dass Schwämme, vergleichbar den Mikroorganismen, strukturelle Modifikationen ihrer Fettsäuren nutzen, um eine ausreichende Permeabilität und Fluidität ihrer Zellmembranen zu gewährleisten. Als ungewöhnliches diesbezügliches Merkmal wurde die Bromierung vorgeschlagen, die offensichtlich überproportional häufig von Kaltwasserdemospongiae durchgeführt wird. Außerdem wurden mehrere Kriterien wie endständige und mittkettige Methylverzweigungen und Polyunsättigungen in einem Faktor integriert, der die lipidstrukturellen Unterschiede zwischen tropischen und borealen Porifera zusammenfasst. Des Weiteren wurden unterschiedliche Ansätze konzipiert und durchgeführt, die die Analyse stabiler Kohlenstoffisotopenverhältnisse (^{13}C -Werte) nutzen, um biosynthetische Abläufe in einem Schwamm aufzuklären zu können. Es wurden natürlich auftretende Fraktionierungen nachgewiesen und zur Charakterisierung von Edukt-Produkt-Beziehungen in einem Schwamm herangezogen. Dieses Verfahren wurde am Beispiel zweier Verbindungsklassen (bromierte Fettsäuren, Sesquiterpenoide) vollzogen, und so konnten wertvolle Informationen zu den ablaufenden Mechanismen – und damit zum Enzymsystem – in dem Organismus gewonnen werden. Zudem haben die Ergebnisse gezeigt, dass die vergleichsweise einfache Analyse von ^{13}C -Werten spezifischer Komponenten in rezenten Organismen ein nützliches Werkzeug bei entsprechenden Fragestellungen ist. Ein großes Interesse jüngerer Arbeiten liegt auf der Assoziation von Schwämmen mit internen Mikroorganismen. Insbesondere die Domäne der Archaea rückt diesbezüglich immer mehr in den Vordergrund, wenn auch die Art der Beziehung immer noch unklar ist. Aus diesem Grund wurde einem Schwamm, während eines *in vitro*-Versuches, ^{13}C -markiertes Archaeol (*sn*-2,3-di-*O*-Phytanylglycerol) zugeführt, um einen eventuellen Zusammenhang zu den in einigen Schwämmen weit verbreiteten isoprenoidalen Fettsäuren (insbesondere Phytansäure) zu überprüfen. Anhand von ^{13}C -Analysen wurde gezeigt, dass in dem untersuchten Schwamm ein Eintrag der ^{13}C -markierten, ethergebundenen Kohlenstoffkette in die estergebundene Phytansäure stattgefunden hat. Deshalb wurde Phytansäure in Schwämmen als möglicher Biomarker für die Assoziation von Archaea mit Schwämmen vorgeschlagen. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum grundsätzlichen Verständnis der ältesten Metazoen – den Porifera – bei. Es konnten spezifische Verbindungen (Biomarker) nachgewiesen und auf bestimmte taxonomische Gruppen eingegrenzt werden, die in zukünftigen Studien eine Zuordnung diagenetischer Abbauprodukte (Chemofossilien) zum Produzenten, zum Habitat sowie zu einer Archaea-Invertebraten-Assoziation zulassen. Des Weiteren wurden wichtige Informationen gewonnen, die für weiter gehende Naturstoffuntersuchungen an Kaltwasserschwämmen fundamental sind.

19. Schlagwörter

Glasschwämme, Gemeinchwämme, Phylogenie, Chemotaxonomie

20. Verlag

21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart
3a. Titel des Berichts	
3b. Titel der Publikation Lipidbiomarker schwammassoziierter Bakterien und Archaeen	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n))	5. Abschlußdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Pape, Thomas	6. Veröffentlichungsdatum 01.06.2004
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Hamburg Institut für Biogeochemie und Meereschemie Bundesstrasse 55 20146 Hamburg	7. Form der Publikation Dissertation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 03F0358A
	11a. Seitenzahl Bericht
	11b. Seitenzahl Publikation 239
	12. Literaturangaben
	14. Tabellen 21
	15. Abbildungen 66
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18 Kurzfassung <p>Sponges (class porifera) are considered to be the earliest metazoans. Various sponge species are known to host dense populations of specific microorganisms which may contribute significantly to the total biomass (Vacelet, 1975). Sponge-microbe associations constructed reef buildings during various episodes of the earth history (Brunton & Dixon, 1994; Riding & Zhuravlev, 1995). Thus, the characterisation of the source organisms and the diagenetic fate of molecular cell constituents of sponges are of great interest. Recent studies have shown, that sponges and/or associated microorganisms are prominent producers of so-called secondary metabolites (Pawlik, 1993; Haygood et al., 1999). However, since the majority of microbes eluded isolation so far, the discrete source organisms of biotechnological interesting compounds often remain unknown. Although recent gene sequence surveys contributed much to the understanding of microbial compositions in sponges (Hentschel, 2002), specific prokaryotes occurring in low densities might not have been aquired.</p>	

The present thesis deals with the qualitative and semiquantitative characterisation of microorganisms associated with boreal sponges. Applying lipid biomarker analysis, the main objective of this work was to establish a data basis for the investigation of specific sponge-associated microorganisms and their constituents. About 50 species of the sponge classes Hexactinellida and Demospongiae of worldwide distributed cold and deep-water habitats were analysed for their inventory of lipids attributed to Archaea and Bacteria. The results of hydrochemical studies, which were performed simultaneously during the sampling of most demosponges, hint for annual stable water conditions at the mid Norwegian shelf.

For comparison, about 50 cultivates of sponge-associated bacteria affiliated to the proteobacteria or the firmicutes group were analysed with regard to fatty acids (FA). α - and γ -proteobacteria predominantly synthesized saturated and monounsaturated linear C12- to C19-FA in genus specific distribution patterns, whereas terminal methylbranched FA prevail in the bacillus species. Various compounds, like hexadecenoic and octadecenoic acids were found in numerous bacterial taxa. In this study it was found, that the C16:1/C18:1 ratio allows for a taxonomical assignment of α - and γ -proteobacteria.

Based on numerical analysis of bacterial FA in sponges, the traditional classification of bacteriosponges and non-bacteriosponges (*sensu strictu* Reiswig) was differentiated. In particular for demosponges it was observed, that the density of bacterial cells is linked to the habitus of the host organisms. With few exceptions vast amounts of bacterial FA were observed in species of various Demospongiae-families comprising high biomass and dense tissues respectively. For the sponges examined, it was found, that the *n*-C16:0/*n*-C18:0 ratio might be used for an estimation of the bacterial density in sponge tissues.

All bacteriosponges comprise diverse FA and hopanoids often found in Gram-negative and -positive bacteria. Moreover, components presumably of bacterial origin or solely known from bacteria of other biotopes, were observed in partially high concentrations. In bacteriosponges complex isomeric mixtures of mid chain branched (mcb-)FA are prevailing. Regarding their structural peculiarities, relatives of sulfate-reducing δ -proteobacteria, β - or γ -proteobacteria, or actinomycetes are assumed as source organisms of these components. The spatial distribution of the mcb-FA within the tissue of *Geodia barretti* signifies, that they are synthesized by (facultative) anaerobic bacteria. Since mcb-FA are regarded as features of evolutionary primitive bacteria, the pronounced presence of these compounds may mirror the coevolution of sponges and associated bacteria. Moreover, compound specific analysis of stable carbon isotopes for *G. barretti* indicated the utilisation of mcb-FA for the synthesis of "demospongiac acids".

In bacteriosponges the appearance of non-isoprenoidal glycerol mono ether lipids suggests the presence of sulfate-reducing δ -proteobacteria or clostridia while long chain dicarboxylic acids most probably originate from anaerobic clostridia. Thus several lipid classes indicate the presence of oxygen-depleted compartments within the tissues of these sponges.

For the first time the association between Archaea and numerous hexactinellids and several demospongiae was established by lipid biomarker analysis. The distribution of etherbound acyclic biphytanes and homologues with up to three cycloalkylrings hints for the dominance of crenarchaeota. However, compared to the crenarchaeotal sponge symbiont *Cenarchaeum symbiosum* previously described (Preston et al., 1996, DeLong et al. 1998), a higher relative abundance of the acyclic biphytanes was found in the sponges studied, suggesting an additional contribution by euryarchaeotes. Archaea were predominantly observed in sponges poor in bacteria. For the axinellid non-bacteriosponge *Phakellia ventilabrum* the biomass of sponge-associated Archaea was estimated based on nominal cell weight. Compared with the bacterial cell density in *P. ventilabrum* calculated by others using DAPI staining and microscopic counting, it may be assumed that Archaea – though most probably existing in various sponge taxa – in *P. ventilabrum* constitute a relatively small fraction of sponge-associated microbial community.

The results of this thesis may serve as a basis for microbiological studies regarding the search for novel biotechnological interesting compounds. Lipid biomarker analysis proved to be an effective tool for a qualitative and quantitative evaluation of sponge-associated microorganisms. Using this concept specific endobiotic groups like Archaea, clostridia, sulfate-reducing proteobacteria or actinomycetes, which lack profound documentation so far, were detected in the sponges investigated. Thus, the relevance of the biomarker analysis of sponges for the specific search for secondary metabolites could be evidenced.

19. Schlagwörter

20. Verlag

21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart
3a. Titel des Berichts	
3b. Titel der Publikation	
Untersuchungen zum Primär- und Sekundärstoffinventar von Kaltwasserschwämmen	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n))	5. Abschlußdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Holzwarth, Michael	6. Veröffentlichungsdatum 10.08.2005
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)	7. Form der Publikation Dissertation
Universität Hamburg Institut für Biogeochemie und Meereschemie Bundesstrasse 55 20146 Hamburg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen *) 03F0358A
	11a. Seitenzahl Bericht
	11b. Seitenzahl Publikation 153
13. Fördernde Institution (Name, Adresse)	12. Literaturangaben
Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF)	14. Tabellen
53170 Bonn	15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18 Kurzfassung <p>Two selected demospongiae from the North Atlantic, <i>Plakortis simplex</i> (order Homosclerophorida, family Plakinidae; Schulze, 1880) and <i>Axinella rugosa</i> (order Halichondrida, family Axinellidae; Schmidt, 1975) are investigated and discussed with respect to their inventory of cell membrane lipids and secondary metabolites. <i>A. rugosa</i> contains fatty acids with chain lengths from C24 to C26 and double bonds at the positions 5 and 9, which are typical lipids of the demospongiae and hexactinellida. Moreover, brominated 5,9-dien fatty acids of the same carbon chain lengths have been identified. The lack of those long chain fatty acids in <i>P. simplex</i> refers to the exceptional position of the homosclerophorida within the demospongiae. The detection of two midchain methyl branched and double unsaturated fatty acids (C20 and C21) in <i>P. simplex</i> is interesting as their natural occurrence has not been documented before. Further constituents of <i>P. simplex</i> are hopanoids, which are known biomarkers for bacteria. The particular high concentrations of distinct hopanoids could be correlated with high densities of bacterial populations found in <i>P. simplex</i>. From the total organic extract of <i>A. rugosa</i> Axisothiocyante-1 has been identified. Moreover, two further constituents ((4S*,5R*,6S*,7S*) 1-Isocyanoaromadendrane and Labda-8(17),13-dien-12-ol) have been isolated and characterised by means of mass spectrometry (MS), one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and infrared spectroscopy. Four previously undescribed secondary metabolites have been isolated from the total organic extract of <i>P. simplex</i>. Investigations by MS and NMR led to the identification of these compounds as two peroxides (Methyl (3R*,6S*,Z)-4,6-diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-enoate and Methyl (3R*,6S*,Z)-4,6-diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-enoate) and two tryptophane amides (Methyl N-(2,4-diethyloct-3-enoyl)tryptophanate and Methyl N-(2,4-diethylnon-3-enoyl)tryptophanate). For one of the peroxides, in-vitro activity tests with six different human cancer cell lines showed a cytotoxic effect with 50%-inhibitory concentrations (IC50) between 7 and 15 µg/mL (Holzwarth et. al., J. Nat. Prod. 68 (2005), 759-761). Identification of the tryptophan amides represents the first proof of indol alkaloids from the investigated species. The similarity of their aliphatic acid substructure with the cyclic peroxides suggests a biosynthetic relationship between the two substance classes.</p>	
19. Schlagwörter	
Schwämme , Meeresschwämme , Wirbellose , Naturstoffchemie, marine Naturstoffe , Invertebraten , Plakortis , Axinella	
20. Verlag	21. Preis

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Biphytanes as Biomarker for sponge-associated Archaea		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2003 (2004)
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Pape, Thomas; Blumenberg, Martin; Thiel, Volker; Michaelis, Walter	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry University of Hamburg Bundesstrasse 55 D-20146 Hamburg	9. Originator's Report No.	
	10. Reference No. 03F0358A	
	11a. No. of Pages Report	
	11b. No. of Pages Publication 7	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 24	
	14. No. of Tables 1	
	15. No. of Figures 2	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <p>Various sponges of the classes Hexactinellida and Demospongiae were studied for the presence of archaeal biomarkers. In several species four ether-bound isoprenoids of the biphytane series (C₄₀), which are known as abundant lipid constituents of Archaea, were detected. The lack of these biomarkers in some sponges implies that a prominent influence of dietary plankton can be excluded, and gives evidence that associations of Archaea and specific sponge taxa are more common than previously thought. The highest concentrations of biphytanes were found in the hexactinellid <i>Aulosaccus</i> cf. <i>mitsukuri</i> and the demosponge <i>Phakellia ventilabrum</i>. The distributions of the biphytanes imply that these compounds are of crenarchaeotal and euryarchaeotal origin.</p>		
19. Keywords Biphytanes, Crenarchaeota, Hexactinellida, Demospongiae, biomarker.		
20. Publisher Bollettino dei Musei e degli Istituti biologici dell'Università di Genova, 68, 509-515	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Sedimentary inclusions in the deep-water sponge <i>Geodia barretti</i> (Geodiidae, Demospongiae) from the Korsfjord, Western Norway.		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date February 2004
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F, Rapp HT, Peters H, Pape T, Reitner J	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry University of Hamburg Bundesstrasse 55 D-20146 Hamburg	9. Originator's Report No.	
	10. Reference No. 03F0358A	
	11a. No. of Pages Report	
	11b. No. of Pages Publication 8	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 33	
	14. No. of Tables 0	
	15. No. of Figures 7	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract In various specimen of the deep-water sponge <i>Geodia barretti</i> , inclusions consisting of siliciclastic sediment were found, with spicules of <i>G. barretti</i> as main clasts. The inclusions were clearly separated from the surrounding tissue by a cortex of microscleres. Some were entirely surrounded by sponge tissue, while others were connected to the sponge surface. Lipid biomarker analysis showed significant differences between inclusions and the choanosome indicating that the inclusions are separate bodies within the sponge tissue. Microscopic examination showed that the cortex surrounding the inclusions had been generated in choanosomal tissue. We discuss possible hypotheses of the genesis of these structures, and conclude that they are most probably the remnants of surface injuries caused by predators, which have subsequently filled with sedimenting particles. To protect the injured tissue from fouling, the sponge reacted with complex healing processes: A tissue barrier was created, new spicules were produced in the choanosome and a new cortex was generated. Encapsulation diminished contact of hurt surface to the water and prevented further accumulation of foreign material. It remains an open question how these complex immune response mechanisms are coordinated in the sponge tissue.		
19. Keywords Cortex, regeneration, predation, defence, Hanleya nagelfar, immune response, sediment incorporation, Porifera		
20. Publisher SARSIA, 89: 245-252	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Two cyclic peroxides derived from the marine sponge <i>Plakortis simplex</i>		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Holzwarth, Michael, Trendel, Jean-Michel, Albrecht, Pierre, Maier, Armin, Michaelis, Walter,	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry University of Hamburg Bundesstrasse 55 D-20146 Hamburg	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0358A
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References	14. No. of Tables 1
	15. No. of Figures 1	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract Two new cyclic peroxides, 2 and 3 , were isolated from a sample of the Norwegian sponge <i>Plakortis simplex</i> . Their structures including relative stereochemistry were elucidated by interpretation of MS and NMR data. Compound 3 exhibited moderate in vitro activity against six solid human tumor cell lines with IC ₅₀ values in the range 7-15 μ g/mL.		
19. Keywords		
20. Publisher Journal of Natural Products 68, 759-761	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication An anaerobic world in sponges		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2005
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann Friederike, Larsen Ole, Thiel Volker, Rapp Hans Tore, Pape Thomas, Michaelis Walter, Reitner Joachim	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry University of Hamburg Bundesstrasse 55 D-20146 Hamburg	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0358A
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 10
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 85	14. No. of Tables 3
	15. No. of Figures 5	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract Associated microorganisms have been described in numerous marine sponges. Their metabolic activity, however, has not yet been investigated in situ. We quantified for the first time microbial processes in a living sponge. Sulfate reduction rates of up to 1200 nmol cm ⁻³ d ⁻¹ were measured in the cold-water bacteriosponge <i>Geodia barretti</i> . Oxygen profiles and chemical analysis of sponge tissue and canal water revealed steep oxygen gradients and a rapid turnover of oxygen and sulfide, dependent on the pumping activity of the sponge. Identification of the microbial community with fluorescently labelled oligonucleotide probes (FISH) indicates the presence of SRB belonging to the Desulfoarculus/Desulfomonile/Syntrophus-cluster in the choanosome of this sponge. Analysis of carboxylic biomarkers indicates biomass transfer from associated SRB or other anaerobic microbes to sponge cells. These results show the presence of an anoxic micro-ecosystem in the sponge <i>G. barretti</i> and imply mutualistic interactions between sponge cells and anaerobic microbes. Understanding the importance of anaerobic processes within the sponge/microbe system may help to answer unsolved questions in sponge ecology and biotechnology.		
19. Keywords <i>Geodia barretti</i> , microelectrodes, oxygen profiles, Porifera, sponge associated microbes, sulfate reduction rates, SRR, symbiosis		
20. Publisher Geomicrobiology Journal, 22: 1-10	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article
3a. Report Title	
3b. Title of Publication Dense populations of Archaea associated with the hadromerid demosponge <i>Tentorium semisuberites</i> from Arctic deep waters	
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Pape Thomas, Hoffmann Friederike, Quéric Nadia-Valérie, Juterzenka Karen von, Reitner Joachim, Michaelis Walter	6. Publication Date in press
	7. Form of Publication Journal Article
8. Performing Organization(s) (Name, Address) Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry University of Hamburg Bundesstrasse 55 D-20146 Hamburg	9. Originator's Report No.
	10. Reference No. 03F0358A
	11a. No. of Pages Report
	11b. No. of Pages Publication
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References
	14. No. of Tables
	15. No. of Figures
16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date)	
18. Abstract The associated microbial community of the arctic deep-water sponge <i>Tentorium semisuberites</i> (Hadromerida, Tetractinellida, Demospongiae) is dominated by Archaea. This finding is a result of a study combining analysis of microbial lipid biomarkers and differential fluorescence in situ hybridisation (FISH) using universal probes for Eubacteria and Archaea on sponge sections. We hereby present the first description of a sponge microbial community clearly dominated by Archaea, which inhabit the entire choanosome (= inner part of the sponge body) of this species. Archaea in these high densities have never been described in an arctic deep-sea hadromerid sponge, nor in any other species. The distribution of C ₄₀ isoprenoids of the biphytane series suggests that affiliates of both major archaeal kingdoms, the Crenarchaeota and the Euryarchaeota, are present in the choanosome of <i>T. semisuberites</i> . Ongoing investigation will elucidate the phylogenetic affiliation of the associated Archaea as well as the importance of this association for arctic deep-sea benthic ecosystems.	
19. Keywords	
20. Publisher Polar Biology (in press)	21. Price

Schlussbericht zu Nr. 3.2

I	Kapitel I.....	2
I.1	Aufgabenstellung	2
I.1.1	Gesamtziel des Vorhabens.....	2
I.1.2	Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele.....	2
I.2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	2
I.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	2
I.3.1	Taxonomie und Phylogenie	2
I.3.2	Vorbereitung und Durchführung einer Ausfahrt in die Grönlandsee	3
I.3.3	Auswahl relevanter Arten.....	3
I.3.4	Umfassende Charakterisierung der Schwamm-Bakterien-Interaktion ausgewählter Arten: Mikronischen-Gemeinschaften.....	3
I.3.5	Weiterführung der PORIDAT	4
I.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	4
I.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	5
II	Kapitel II.....	6
II.1	Erzielte Ergebnisse.....	6
II.2	Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	6
II.3	Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	7
II.4	Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse.....	7
III	Kapitel III: Erfolgskontrollbericht	9
III.1	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms	9
III.2	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis und gesammelte Erfahrungen	9
III.3	Fortschreibung des Verwertungsplans	9
III.4	Arbeiten, die zu keiner Lösung führten	9
III.5	Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	9
III.6	Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.....	9

I Kapitel I

1.1 Aufgabenstellung

1.1.1 Gesamtziel des Vorhabens

Beschreibung der Biodiversität und Geobiologie arktischer und borealer Porifera sowie des Zusammenspiels zwischen Porifera und assoziierter prokaryoter Mikroflora. Archivierung und Dokumentation der Daten aller TP in der Datenbank PORIDAT.

1.1.2 Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele

- 1) Taxonomie, phylogenetische Stellung und Diversitätsanalyse der gesammelten Porifera
- 2) Vorbereitung und Durchführung einer Ausfahrt in die Grönlandsee
- 3) Umfassende Charakterisierung der Schwamm-Bakterien-Interaktion ausgewählter Arten mit histologischen, molekularbiologischen und ultrastrukturellen Methoden sowie Untersuchungen an lebenden Porifera
- 4) Weiterführung und Pflege der PORIDAT

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In der Abteilung Geobiologie unter Leitung von Prof. Dr. Reitner an der Universität Göttingen bestanden und bestehen ideale Voraussetzung zur Durchführung dieses und ähnlicher Projekte. Laborausstattung für die oben genannten Techniken steht entweder in der Abteilung selber zur Verfügung, oder kann in Absprache mit anderen Abteilungen und Instituten genutzt werden. Folgende Mitglieder der Abteilung Geobiologie waren an der Durchführung des BOSMAN-Projektes beteiligt:

Prof. Dr. Joachim Reitner	Universitätsprofessor C4, Universität Göttingen, Leiter von Teilprojekt 2
Dr. Friederike Hoffmann	Dipl. Biol. , wiss. Angestellte, Universität Göttingen, Doktorarbeit im Rahmen von BOSMAN
Dr. Thomas Bode	Dipl. Geol., wiss. Angestellter, Universität Göttingen
Dr. Andreas Reimer	Wiss. Angestellter, Universität Göttingen
Dr. Gabriela Schumann	Wiss. Angestellte, Universität Göttingen
Dr. Gernot Arp	Wiss. Angestellter, Universität Göttingen
Claudia Kamcke	Dipl. Biol., Diplomarbeit im Rahmen von BOSMAN
Wolfgang Dröse	Techn. Angestellter, Universität Göttingen

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

1.3.1 Taxonomie und Phylogenie

Taxonomie und Phylogenie sind der Schlüssel für eine gezielte Suche nach Naturstoffen in marinen Organismen. Eine eindeutige taxonomische Bestimmung der untersuchten Schwammarten bildet die Grundvoraussetzung für die Reproduzierbarkeit der im Verbundprojekt geplanten Arbeiten. Für die Untersuchung neuer und bisher wenig untersuchter Arten, wie es im BOSMAN - Projekt überwiegend der Fall war, ist die sichere taxonomische Einordnung notwendig zur Literaturrecherche auf Gattungs- und Familienniveau. Ziel ist die vollständige Bestimmung sämtlicher im Rahmen von BOSMAN

gesammelter Poriferen sowie das Aufspüren und Beschreiben neuer Arten. Auf der Ausfahrt im Sommer 2002 wurden arktische Porifera aus der Grönlandsee gesammelt und weitestgehend an Bord des Schiffes bestimmt. Kritische Spezies und neue Arten erforderten eine intensivere Nachbearbeitung. Die AG Reitner verfügt über gute Kenntnisse in der Taxonomie rezenter und fossiler Porifera (Reitner 1993; Reitner & Mehl 1996, u.v.a.). Für die Beschreibung neuer Arten und die Bearbeitung kritischer Spezies allerdings ist die Zusammenarbeit mit weiteren namhaften Porifera-Experten unerlässlich (s. unter I.5).

I.3.2 Vorbereitung und Durchführung einer Ausfahrt in die Grönlandsee

Um das Artenspektrum der Porifera und damit das Naturstoffspektrum von BOSMAN zu erweitern, wurden in BOSMAN II arktische Arten einbezogen. Seit über 10 Jahren wird der AG Reitner u.a. an borealen und arktischen Porifera gearbeitet. Eingehende Untersuchungen an arktischen Porifera wurden während der Ausfahrt ARKVII/1 1990 mit FS „Polarstern“ durchgeführt.

Aufgabenstellung der Arktis-Ausfahrt sind im folgenden aufgelistet:

- Aufsammeln und Klassifizierung arktischer Porifera - Gemeinschaften und assoziierter Makrofauna
- Klassifizierung gesammelter Porifera an Bord, Bioscreening, Vorbereitung zur Weitergabe an TPs
- Fotografische und filmische Dokumentation der gesammelten Arten

I.3.3 Auswahl relevanter Arten

Eine Auswahl relevanter Arten für nachfolgenden Untersuchungen war unbedingt erforderlich, da es nahezu unmöglich ist, das gesamte Porifera-Inventar zu erfassen. Besonderes Augenmerk wurde in diesem Projektabschnitt den arktischen Hexactinellida gewidmet, sowie arktischen Vertretern der naturstoffreichen Demospongien - Familien *Geodiidae* und *Axinellidae*. Die übrigen Arten wurden durch das oben erwähnte Bioscreening auf ihren potentiellen Naturstoffgehalt hin untersucht. Wenn sich diese ersten Einschätzungen durch Nachweis von Sekundärmetaboliten bestätigten, folgten eingehendere Gewebeuntersuchungen. Im ersten Bewilligungszeitraum wurden nach diesem Vorgehen *Geodia barretti* und *Phakellia ventilabrum* Gegenstand folgender Untersuchungen, die auch im zweiten Bewilligungszeitraum fortgeführt wurden.

I.3.4 Umfassende Charakterisierung der Schwamm-Bakterien-Interaktion ausgewählter Arten: Mikronischen-Gemeinschaften

I.3.4.1 Aufspüren chemischer Mikronischen durch den Einsatz von Mikrosensoren

Durch den Einsatz von Mikrosensoren ist eine hochsensitive Auflösung chemischer Gradienten *in situ* und somit eine zweidimensionale Charakterisierung des chemischen Milieus im Schwammgewebe ausgewählter Arten möglich. Die temporale Stabilität der Mikronischen kann durch wiederholte Messungen am gleichen Organismus untersucht werden.

Bei einem Feldaufenthalt in der Meeresbiologischen Station der Universität Bergen, Norwegen, im Oktober 2001 wurden diese Versuche an Explantaten und ganzen Individuen von *Geodia barretti* durchgeführt. Diese Art produziert interessante Naturstoffe und wurde im Rahmen von BOSMAN auch von TP 1, 4 und 6 untersucht.

In der AG Reitner existieren Erfahrung mit dieser Methode durch enge Zusammenarbeit mit Ole Larsen vom MPI für Marine Mikrobiologie Bremen (AG Prof. Jörgensen).

I.3.4.2 Nachweis der Aktivität sulfatreduzierender Bakterien

Anaerobe SAB (schwammassoziierte Bakterien) wurden in Rahmen von BOSMAN erstmals systematisch erfasst. Ziel unserer Untersuchungen ist es, ihren Beitrag zur Stoffwechselaktivität des Schwammes aufzuklären. Der erstmalige Nachweis von *in situ* Sulfatreduktionsraten im Gewebe von *Geodia barretti* gelang Mitarbeiter/innen der AG Reitner im Sommer 2000 (siehe Zwischenbericht). Die Vermutung liegt nahe, dass die Aktivität der anaeroben SAB im direkten Zusammenhang mit der Pumpaktivität des Schwammes steht, sie also von niedriger Pumprate profitieren. Osinga et al. (2001) vermuten sogar einen aktiven Einfluss des Schwammes: durch Reduzieren der Pumpaktivität rege dieser den Metabolismus seiner anaeroben Symbionten an. Die Überprüfung dieser Überlegungen ist durch kombinierte Messung von Filtrationsrate, Sauerstoffgradienten und Sulfatreduktionsrate möglich. Die Methode zur Messung von Sulfatreduktionsraten mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ wurde von Mitarbeiter/innen der AG Reitner bereits im ersten Bewilligungszeitraum erfolgreich auf Schwämme angewendet, und im zweiten Bewilligungszeitraum fortgeführt. Analysen und Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der AG Jörgensen des MPI für Marine Mikrobiologie in Bremen

I.3.4.3 Arbeit mit fixiertem Material: Kombination von histologischen, molekularbiologischen und ultrastrukturellen Methoden sowie Auswertung durch computergestützte Bildanalyse

Durch langjährige Arbeit existiert in der AG Reitner breite Erfahrung in der histologischen, molekularbiologischen und ultrastrukturellen Bearbeitung unterschiedlicher Porifera. Im ersten Bewilligungszeitraum von BOSMAN wurden zahlreiche histologische Methoden modifiziert und teilweise neu entwickelt (s. Zwischenbericht). Erst die Kombination unterschiedlicher Methoden ergibt ein umfassendes Bild des Schwammgewebes und der assoziierten Bakterien.

Folgende Arbeiten waren geplant und wurden entsprechend realisiert:

- Histologische Charakterisierung ausgewählter Porifera
- Klassifizierung der SAB durch molekularbiologische Methoden
- Ultrastrukturelle Untersuchung relevanter Gewebebereiche
- Quantitative Bildanalyse

I.3.5 Weiterführung der PORIDAT

In der Datenbank PORIDAT werden sämtliche im BOSMAN-Projekt erarbeiteten Daten gesammelt und in einer Form dargestellt, die eine schnelle Recherche für alle Mitarbeiter/innen der Teilprojekte erlaubt. Eine genaue Darstellung der Struktur von PORIDAT findet sich im Zwischenbericht 2001.

Die Datenbankimplementierung der Taxonomie ist bereits abgeschlossen. Im zweiten Bewilligungszeitraum wurden die Teilbereiche „Chemie“ sowie „Mikrobiologie“ ausgearbeitet und eingerichtet.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Im Rahmen mehrerer DFG-Projekte (Re 665/1,4,5,8,12) wurden vom Antragsteller und seinen Mitarbeiter/innen seit 1983 umfangreiche Arbeiten zur Phylogenie der Porifera und zur Rolle ihrer Symbionten durchgeführt (Reitner 1992; Reitner 1993; Reitner 1996; Reitner & Mehl 1996; Manz et al. 2000). Dazu gehörten auch zahlreiche Ausfahrten in die Arktis (ARKVII/1) und den Nordatlantik (Meteor 21/4; Meteor 26/2). Desweiteren wurde direkt an

die Ergebnisse des ersten Bewilligungszeitraums des Projektes (BOSMAN I) angeknüpft. Eine ausführliche Beschreibung der Ergebnisse von TP 2 sowie eine umfassende Übersicht über den derzeitigen Stand der Wissenschaft bei Projektbeginn wurde im Zwischenbericht 2001 aufgeführt.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen von BOSMAN bestand eine enge Zusammenarbeit mit allen im Verbundprojekt tätigen Arbeitsgruppen. Zur Realisierung einiger Versuche (Messung von Sulfatreduktionsraten im Schwammgewebe, Arbeiten mit Mikroelektroden - s. unter I. 3.4.) ist eine Kooperation mit Dr. Ole Larsen, Mitarbeiter der AG Jörgensen am MPI für Marine Mikrobiologie, Bremen, etabliert worden.

Intensive Kontakte bestehen an die Universität Bergen, Norwegen, zur AG „Benthosökologie“ (Prof. Torleif Brattegard) am Institut für Meeresbiologie (IMB). Mit Dr. Hans Tore Rapp, Mitarbeiter der AG „Benthosökologie“, hat sich im Rahmen der Norwegen-Aufenthalte von Mitarbeitern aus 4 Teilprojekten von BOSMAN im Sommer 2000 sowie Herbst 2001 eine enge Zusammenarbeit entwickelt, die durch gemeinsame laufende Versuche fortgeführt wurde und wird.

Enge Zusammenarbeit besteht mit Prof. Rob van Soest und Dr. Walentina de Weerd an der Universität Amsterdam (NL) zur Taxonomie der Porifera. Zu Fragen der Schwamm-Kultivierung besteht Austausch mit Dr. Ronald Osinga an der Universität Wageningen (NL).

Zitierte Literatur (Autoren aus TP 2 hervorgehoben):

- Henrich R., Hartmann M., **Reitner J.**, Schäfer P., Freiwald A., Steinmetz S., Dietrich P. & Thiede J. (1992) Facies Belts and communities of the arctic Vesterisbanken seamount (central Greenland Sea). *Facies* **27**, 71-104.
- Manz W., **Arp G.**, **Schumann-Kindel G.**, Szewzyk U. & **Reitner J.** (2000) Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence in situ hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *Journal of Microbiological Methods* **40**, 125-134.
- Osinga R., Armstrong E., Burgess JG, **Hoffmann F**, **Reitner J**, **Schumann-Kindel G** (2001) Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 461: 55-62
- Reitner J.** (1996) Paläobiologie und Taphonomie von Porifera Akkumulation auf submarinen Kuppen und verbundenen Becken. DFG Abschlussbericht Re 665/5.
- Reitner J.** (1993) Modern cryptic microbialite/metazoan facies from Lizard Island (Great Barrier Reef, Australia) Formation and Concepts. *Facies* **29**, 3-40.
- Reitner, J.** (1992): Coralline Spongien. Der Versuch einer phylogenetisch-taxonomischen Analyse. - Berliner geowiss. Abh., Reihe E, **1**, 352 p.
- Reitner J.** & Mehl D. (1996) Monophyly of the Porifera. *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg* **36**, 5-32.

II Kapitel II

II.1 Erzielte Ergebnisse

Sämtliche wissenschaftliche Ergebnisse sind in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht (s. Kap. II.4). Im Rahmen der Arbeiten für das TP2 wurden in der AG Reitner eine Doktorarbeit (Dr. Friederike Hoffmann) sowie eine Diplomarbeit (Dipl. – Biol. Claudia Kamcke) erfolgreich abgeschlossen (s. Kap. II.4).

II.2 Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die effektive wissenschaftliche Verwertung sämtlicher BOSMAN-Daten ist durch deren Publikation in renommierten Fachzeitschriften, der Präsentation auf wissenschaftlichen Kongressen sowie der systematische Archivierung und Verwaltung in der Datenbank PORIDAT gegeben.

Wirtschaftliche Verwertung der BOSMAN-Daten wird durch Zusammenarbeit mit den Industriepartnern realisiert.

Für die pharmazeutische Forschung wird bald ein großer Bedarf an den gefundenen Naturstoffen entstehen. Da das Absammeln von Schwämmen in großen Mengen die sensiblen Lebensgemeinschaften der Arktis massiv gefährdet, die rein chemische Synthese der Naturstoffe jedoch oft schwierig ist und Schwämme in Aqualkulturen langsam oder gar nicht wachsen, muss lang- und mittelfristig nach anderen Wegen der Produktion gesucht werden. Eine Lösung bieten biotechnologische Produktionsverfahren, wo Mischkulturen aus Schwamm- und Bakterienzellen die Naturstoffe synthetisieren (siehe auch TP 4). Grundlage für die Entwicklung solcher Systeme ist das umfassende Verständnis biologischer Zusammenhänge: Die Aufklärung der Interaktion zwischen Schwamm- und Bakterienzelle, die Rolle der SAB für Sekundärstoffmetabolismus und Kenntnisse über das chemische Milieu im Schwammgewebe. Hier liegt eine direkte Verzahnung von Forschungs- und Produktionsinteressen vor.

Um die sensiblen Lebensgemeinschaften der Arktis nicht zu zerstören, sondern ihr genetisches und naturstoffchemisches Potential nachhaltig nutzen zu können, muss parallel zur Suche nach neuen Naturstoffen die Entwicklung biotechnologischer Produktionsverfahren stehen.

Die Forschungsergebnisse von TP 2, insbesondere die Publikationen Hoffmann et al (submitted), Pape et al (accepted), Hoffmann et al. (2005a und b), Schönberg et al (2004), und Hoffmann (2003) bieten neuartige Erkenntnisse zum Verständnis der Schwamm-Bakterien-Interaktionen sowie zu Mikronischen-Gemeinschaften. Biodiversität sensibler Kaltwasser-Poriferengemeinschaften wurde in der Publikation Reitner & Hoffmann (2003) sowie Hoffmann et al (2003b) beschrieben. In den Publikationen Hoffmann et al (2003a) sowie Reitner et al (2004) werden Techniken zur histologischen Untersuchung von Schwämmen beschrieben, wie sie im Rahmen von BOSMAN in der AG Reitner neu entwickelt wurden. Die Publikationen Hoffmann et al (2003c), Hoffmann et al (2004) sowie Osinga et al (2001) liefern neuartige Erkenntnisse zu Heilungsprozessen im Schwammgewebe und zur Kultivierung von „Bacteriosponges“. Das hier produzierte Wissen steht nunmehr zur technologischen Umsetzung zur Verfügung.

II.3 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Nicht bekannt

II.4 Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Arbeiten im TP2 sind bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht. Sämtliche Publikationen liegen dem Bericht bei. Autoren des TP 2 sind hervorgehoben.

Zur Veröffentlichung eingereicht

Hoffmann F, Rapp HT, **Reitner J** (submitted) Monitoring microbial community composition by fluorescence in situ hybridisation during cultivation of the marine cold-water sponge *Geodia barretti*. Marine Biotechnology

Zur Veröffentlichung angenommen

Pape T, **Hoffmann F**, Queric N-V, Juterzenka Kv, **Reitner J**, Michaelis W (accepted) Dense populations of Archaea associated with the hadromerid demosponge *Tentorium semisuberites* from Arctic deep waters. Polar Biology

2005

Hoffmann F, Larsen O, Rapp HT, Osinga R (2005a) Oxygen dynamics in choanosomal sponge explants. Marine Biology Research 1: 160-163

Hoffmann F, Larsen O, Thiel V, Rapp HT, Pape T, Michaelis W, **Reitner J** (2005b) An anaerobic world in sponges. Geomicrobiology Journal 22: 1-10

2004

Gross, H., **Reitner, J.**, König, G.M. (2004): Isolation and structure elucidation of azoricasterol, a new sterol of the deepwater sponge *Macandrewia azorica*.- Naturwissenschaften, 91, 441-446

Hoffmann F, Rapp HT, Peters H, Pape T, **Reitner J** (2004) Sedimentary inclusions in the deep-water sponge *Geodia barretti* (Geodiidae, Demospongiae) from the Korsfjord, Western Norway. Sarsia 89: 1-8

Reitner J, **Hoffmann F**, **Dröse W** (2004) Workshop Geo-Histologie. In: Reitner J, Reich M, Schmidt G (eds) Geobiologie 2 - 74. Jahrestagung der Paläontologischen Gesellschaft in Göttingen 02. bis 08. Oktober 2004. Universitätsdrucke Göttingen, Göttingen, pp 211-227

Schönberg CHL, **Hoffmann F**, Gatti S (2004) Using microsensors to measure sponge physiology. Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università di Genova 68: 593-604

2003

Hoffmann F (2003) Microbial sulfate reduction in the tissue of the cold-water sponge *Geodia barretti* (Tetractinellida, Demospongiae). Ph. D. thesis. Dep. of Geosciences, Göttingen

Hoffmann F, Janussen D, **Dröse W**, **Arp G**, **Reitner J** (2003a) Histological investigation of organisms with hard skeletons: a case study of siliceous sponges. Biotechnic and Histochemistry 78: 191-199

- Hoffmann F, Kamcke C, Kaesler I** (2003b) Geobiology and biodiversity of Porifera from Arctic autochthonous spiculite mats and abyssal soft bottom sediments. *Berichte zur Polar- und Meeresforschung* 446: 59-61
- Hoffmann F, Rapp HT, Zöller T, Reitner J** (2003c) Growth and regeneration in cultivated fragments of the boreal deep water sponge *Geodia barretti* Bowerbank, 1858 (Geodiidae, Tetractinellida, Demospongiae). *Journal of Biotechnology* 100: 109-118
- Kamcke C (2003)** Untersuchungen zur molekularen Systematik hexactinellider Schwämme.- 75 p. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- Reitner J, Hoffmann F** (2003) Porifera-Zonierungen in Kaltwasser-Korallenriffen (Sula Rücken, Norwegen. In: Gradstein SR, Willmann R, Zizka G (eds) *Biodiversitätsforschung: Die Entschlüsselung der Artenvielfalt in Raum und Zeit, Kleine Senckenberg-Reihe 45. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, pp 75-87*

2002

- Hoffmann F, Larsen O, Kaesler I, Szewzyk U, Reitner J** (2002) *Geodia barretti* (Geodiidae, Demospongiae): an anoxic ecosystem? *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università die Genova* 66-67: 93
- Weerdt WHd, **Hoffmann F, Beglinger EJ** (2002) Phylogenetic significance of spined raphides within Haliclona (Haplosclerida, Chalinidae). *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università die Genova* 66-67: 210

2001

- Osinga R, Armstrong E, Burgess JG, **Hoffmann F, Reitner J, Schumann-Kindel G** (2001) Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 461: 55-62

III Kapitel III: Erfolgskontrollbericht

III.1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Das BOSMAN-Projekt in seiner Gesamtheit erfüllte in genauer Übereinstimmung die Ziele des BMBF-Schwerpunkts „Marine Naturstoffe: Suche nach neuen Wirkstoffen für Medikamente und Pharmazie“. Ein wesentliches Ergebnis des Projektes ist die neuartige Erkenntnis, dass boreale und arktische Porifera ein interessantes und bisher wenig beachtetes Naturstoffpotential darstellen.

Teilprojekt 2 leistete mit den Arbeiten zur Biodiversität, Taxonomie und Phylogenie der Porifera sowie der Untersuchung von Benthos-Lebensgemeinschaften einen erheblichen Beitrag zur Erforschung der Struktur und Funktion mariner Lebensräume. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Erfassung der Biodiversität von marinen Benthosgemeinschaften, worauf im BMBF-Schwerpunkt „Meeresforschung“ hingewiesen wird. Im zweiten Bewilligungszeitraum wurden die Untersuchungen auf arktische Arten ausgeweitet, was im Programm „Polarforschung“ ausdrücklich angefordert wird.

Die Ergebnisse der histologischen, molekularbiologischen und experimentellen Untersuchungen der Porifera sind wichtig zum grundlegenden Verständnis der Schwamm-Bakterien-Interaktion, welche wiederum Voraussetzung ist für die Interpretation der in den chemischen und mikrobiologischen Teilprojekten gewonnenen Daten und damit für die Möglichkeit zur biotechnologischen Produktion der Naturstoffe. Hier eröffnen sich Möglichkeiten zur nachhaltigen Nutzung mariner Ressourcen, worauf ebenfalls im Schwerpunkt „Meeresforschung“ ausdrücklich hingewiesen wird.

III.2 Wissenschaftlich-technisches Ergebnis und gesammelte Erfahrungen

Sämtliche wissenschaftliche Ergebnisse sind in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht (s. Kap. II.4)

III.3 Fortschreibung des Verwertungsplans

Der Verwertungsplan wurde entsprechend den Angaben in Kapitel II.2 fortgeschrieben.

III.4 Arbeiten, die zu keiner Lösung führten

Sämtliche Arbeiten führten zu einer Lösung, wie die umfangreiche Publikationsliste eindrucksvoll beweist.

III.5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Für dieses Vorhaben nicht relevant

III.6 Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Der Ausgaben- und Zeitplan wurde entsprechend der Angaben im Projektantrag eingehalten.

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article
3a. Report Title	
3b. Title of Publication Monitoring microbial community composition by fluorescence in situ hybridization during cultivation of the marine cold-water sponge <i>Geodia barretti</i>	
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F, Rapp H T, Reitner J	6. Publication Date submitted for publication
	7. Form of Publication Journal Article
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.
	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report
	11b. No. of Pages Publication
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References
	14. No. of Tables 2
	15. No. of Figures 2
16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date)	
18. Abstract <i>In order to determine the stability and specificity of microbes associated with the marine cold-water sponge <i>Geodia barretti</i> during cultivation, we compared the microbial community of freshly retrieved specimens to that of cultivated explants by fluorescence in situ hybridisation (FISH). <i>G. barretti</i> hosts a specific homogenous microbial community in its mesohyl, which is maintained during a cultivation period of 8 months. In 10 days old explants, bright colonies of unusually large bacterial cells, located predominantly at canal walls, were observed in addition to the common bacteria. Bacteria of the aberrant type included both lineages present in whole sponges and foreign ones, notably numerous genera of sulphate-reducing bacteria. We assume that these represent infectious bacteria which eluded the innate immune system of the sponge. Explants which resist these microbial attacks during the critical phase of cultivation eliminate infectious bacteria. The intrinsic microbial community of <i>G. barretti</i> is not affected by these infections and remains persistent over a cultivation period of at least several months.</i>	
19. Keywords explant culture, infection, sponge associated microbes, sponge cultivation, sulphate-reducing bacteria	
20. Publisher Marine Biotechnology	21. Price

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article		
3a. Report Title			
3b. Title of Publication Dense populations of Archaea associated with the hadromerid demosponge <i>Tentorium semisuberites</i> from Arctic deep waters			
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))		5. End of Project May 2005	6. Publication Date accepted for publication
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Pape T, Hoffmann F , Queric N-V, Juterzenka Kv, Reitner J , Michaelis W		7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen		9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn		11a. No. of Pages Report	
		11b. No. of Pages Publication	
		12. No. of References	
14. No. of Tables		15. No. of Figures	
16. Supplementary Notes			
17. Presented at (Title, Place, Date)			
18. Abstract <i>The associated microbial community of the arctic deep-water sponge <i>Tentorium semisuberites</i> (Hadromerida, Tetractinellida, Demospongiae) is dominated by Archaea. This finding is a result of a study combining analysis of microbial lipid biomarkers and differential fluorescence in situ hybridisation (FISH) using universal probes for Eubacteria and Archaea on sponge sections. We hereby present the first description of a sponge microbial community clearly dominated by Archaea, which inhabit the entire choanosome (= inner part of the sponge body) of this species. Archaea in these high densities have never been described in an arctic deep-sea hadromerid sponge, nor in any other species. The distribution of C₄₀ isoprenoids of the biphytane series suggests that affiliates of both major archaeal kingdoms, the Crenarchaeota and the Euryarchaeota, are present in the choanosome of <i>T. semisuberites</i>. Ongoing investigation will elucidate the phylogenetic affiliation of the associated Archaea as well as the importance of this association for arctic deep-sea benthic ecosystems.</i>			
19. Keywords			
20. Publisher Polar Biology		21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Oxygen dynamics in choanosomal sponge explants		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	
	6. Publication Date February 2005	
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F, Larsen O, Rapp HT, Osinga R	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	
	10. Reference No. 03F0256A-D	
	11a. No. of Pages Report	
	11b. No. of Pages Publication 4	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 40	
	14. No. of Tables	
	15. No. of Figures 1	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>Oxygen microprofiles were measured over the boundary layer and into the tissue of 10 days old cultivated tissue fragments (explants of 2-4 cm³) from the choanosome of the cold-water sponge <i>Geodia barretti</i> with oxygen sensitive Clark-type microelectrodes. At this time of cultivation, the surface tissue and the aquiferous system of the explants is regenerating, which makes oxygen and nutrient supply by pumping activity impossible. Oxygen profiles showed a parabolic shape, indicating oxygen flux over a diffusive boundary layer and into the tissue. Oxygen was always depleted only 1 mm below the sponge surface, leaving the major part of the explants anoxic. Diffusive oxygen flux into the explant was calculated from three oxygen profiles using Fick's 1st law of diffusion and revealed 9 μmol O₂ cm⁻³ day⁻¹, which is in the lower range of in situ oxygen consumption of whole sponges. The ability of <i>G. barretti</i> to handle continuous tissue anoxia enables choanosomal explants to survive the critical first weeks of cultivation without a functional aquiferous system, when oxygen is supplied to the sponge explant by molecular diffusion over its surface.</i>		
19. Keywords Sponge cultivation, oxygen consumption, <i>Geodia barretti</i> , microelectrodes, oxygen profiles		
20. Publisher Marine Biology Research 1: 160-163	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication An anaerobic world in sponges		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2005
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F , Larsen O, Thiel V, Rapp HT, Pape T, Michaelis W, Reitner J	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 10
	12. No. of References 85	14. No. of Tables 3
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	15. No. of Figures 5	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>Associated microorganisms have been described in numerous marine sponges. Their metabolic activity, however, has not yet been investigated in situ. We quantified for the first time microbial processes in a living sponge. Sulfate reduction rates of up to 1200 nmol cm⁻³ d⁻¹ were measured in the cold-water bacteriosponge Geodia barretti. Oxygen profiles and chemical analysis of sponge tissue and canal water revealed steep oxygen gradients and a rapid turnover of oxygen and sulfide, dependent on the pumping activity of the sponge. Identification of the microbial community with fluorescently labelled oligonucleotide probes (FISH) indicates the presence of SRB belonging to the Desulfoarculus/Desulfomonile/Syntrophus-cluster in the choanosome of this sponge. Analysis of carboxylic biomarkers indicates biomass transfer from associated SRB or other anaerobic microbes to sponge cells. These results show the presence of an anoxic micro-ecosystem in the sponge G. barretti, and imply mutualistic interactions between sponge cells and anaerobic microbes. Understanding the importance of anaerobic processes within the sponge/microbe system may help to answer unsolved questions in sponge ecology and biotechnology.</i>		
19. Keywords Geodia barretti , microelectrodes, oxygen profiles, Porifera, sponge associated microbes, sulfate reduction rates, SRR, symbiosis		
20. Publisher Geomicrobiology Journal, 22: 1-10	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Isolation and structure elucidation of azoricasterol, a new sterol of the deepwater sponge <i>Macandrewia azorica</i>		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2004
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Gross H, Reitner J , König GM	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	
	10. Reference No. 03F0256A-D	
	11a. No. of Pages Report	
	11b. No. of Pages Publication 6	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References	
	14. No. of Tables	
	15. No. of Figures	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract		
19. Keywords		
20. Publisher Naturwissenschaften 91: 441-446	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Sedimentary inclusions in the deep-water sponge <i>Geodia barretti</i> (Geodiidae, Demospongiae) from the Korsfjord, Western Norway.		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date February 2004
Hoffmann F, Rapp HT, Peters H, Pape T, Reitner J	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 8
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 33	14. No. of Tables 0
	15. No. of Figures 7	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>In various specimens of the deep-water sponge Geodia barretti, inclusions consisting of siliciclastic sediment were found, with spicules of G. barretti as main clasts. The inclusions were clearly separated from the surrounding tissue by a cortex of microscleres. Some were entirely surrounded by sponge tissue, while others were connected to the sponge surface. Lipid biomarker analysis showed significant differences between inclusions and the choanosome indicating that the inclusions are separate bodies within the sponge tissue. Microscopic examination showed that the cortex surrounding the inclusions had been generated in choanosomal tissue. We discuss possible hypotheses of the genesis of these structures, and conclude that they are most probably the remnants of surface injuries caused by predators, which have subsequently filled with sedimenting particles. To protect the injured tissue from fouling, the sponge reacted with complex healing processes: A tissue barrier was created, new spicules were produced in the choanosome and a new cortex was generated. Encapsulation diminished contact of hurt surface to the water and prevented further accumulation of foreign material. It remains an open question how these complex immune response mechanisms are coordinated in the sponge tissue.</i>		
19. Keywords Cortex, regeneration, predation, defence, Hanleya nagelfar, immune response, sediment incorporation, Porifera		
20. Publisher SARSIA, 89: 245-252	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Workshop Geo-Histologie		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date Oktober 2004
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Reitner J, Hoffmann F, Dröse W,	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 15
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 4	14. No. of Tables 2
	15. No. of Figures 8	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>The aim of this workshop is to give an introduction to histological and optical methods which view the connection between organic and inorganic parts in rocks, biominerals and microbial mats. The methods include different techniques for fixation, embedding and histological stains. Cutting of samples on rotation microtome and circular saw will also be trained. In addition, fluorescence in situ hybridisation (FISH), a modern molecular method for investigation of microbial diversity in natural samples, and different microscopic techniques (e.g. fluorescence microscopy) will be introduced.</i>		
19. Keywords		
20. Publisher Paläontologischen Gesellschaft, Universitätsdrucke Göttingen, pp 211-227	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Using microsensors to measure sponge physiology		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2004
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Schönberg CHL, Hoffmann F , Gatti S	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	11a. No. of Pages Report	
	11b. No. of Pages Publication 12	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 26	
	14. No. of Tables 0	
	15. No. of Figures 4	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>Microsensors effectively measure a wide variety of parameters such as chemical concentrations, temperature, light levels and flow. Based on successful investigations of microscale phenomena in sponges we conclude that microsensors are a promising tool for sponge science. We would like to encourage their wider use in sponge physiology (e.g. to measure respiration, pumping activity and its regulation), and of the metabolism of associated microorganisms (e.g. photosynthesis, nitrification, sulfate reduction). We describe our experiences with liquid ion exchange microsensors, Clarke-type microsensors and microoptodes to provide recommendations for their use on sponges. Possible problems include: 1. Sponge texture impeding sensor insertion (due to a strong cortex or spongin). 2. With endolithic or encrusting sponges a sensor can break upon touching the underlying substrate. 3. Respiration/photosynthesis measurements may be biased by adhering or fouling plant/animal tissue. 4. Contraction/expansion of sponge tissue altering the reference depth during measurements. 5. Pumping/different flow regimes causing strong variation of data. 6. Ruptured cells may influence chemical properties under investigation. 7. Heterogeneity of the sponge body can result in patchiness of data. Some problems can either be overcome by adjustments to the equipment (1, 2) or by preparing the investigated sponge for the intended study (1, 3, 4). Other problems require great care in the recording process and good knowledge of adequate replication (5, 6, 7).</i>		
19. Keywords Microsensors, method, physiology, metabolism, Porifera		
20. Publisher Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università die Genova 68: 593-604	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Ph. D. Thesis
3a. Report Title	
3b. Title of Publication Microbial sulfate reduction in the tissue of the cold-water sponge <i>Geodia barretti</i> (Tetractinellida, Demospongiae)	
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F	6. Publication Date May 2003
	7. Form of Publication Thesis
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.
	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report
	11b. No. of Pages Publication 48
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 350
	14. No. of Tables 5
	15. No. of Figures 20
16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date)	

18. Abstract

Metabolic rates, community structure and the chemical micro-environment of sulfate-reducing bacteria (SRB) within the tissue of the boreal demosponge *Geodia barretti* were examined, and implications for biological-chemical and sponge-bacteria interactions are discussed. To enable these investigations, histological, molecular biological and biogeochemical methods were combined, new methods were developed and established methods were modified. Sponges represent the very base of metazoan evolution and can be regarded as the oldest animal phylum still alive. Fossil records indicate that the family Geodiidae has been existing since the early Cambrian. *Geodia barretti* hosts vast amounts of associated microorganisms in its intercellular matrix ("bacteriosponge"). This species is extremely rich in siliceous spicules, with a pronounced cortex of microscleres at the sponge surface. Various methods in sponge histotechnology were developed and evaluated which allow preparation of tissue sections without removing the spicules. These sections are applicable for examination of the microbial community by fluorescence in situ hybridization (FISH) as well as for histological investigations. A cultivation method for fragments of *G. barretti* was also developed. Cultivated fragments served as experimental units for microelectrode studies. Histological investigations over a cultivation period of 8 months showed the ability of this sponge to grow and regenerate from a random piece of tissue. FISH on tissue sections showed that *G. barretti* contains $2.23 \cdot 10^{10}$ SRB cm⁻³ tissue, which represent 7.6 % of the bacterial community. The SRB community was found to be different from that in marine sediments. The predominant genus was *Desulfovibrio*, which comprises specialized feeders favoured by high substrate concentrations. SRB were evenly distributed throughout the choanosomal tissue, but were absent in and directly beneath the cortex. Repeated measurements with oxygen-sensitive microelectrodes showed that in a pumping *G. barretti*, the cortex and the subcortical spaces were well oxygenated. In the choanosome, oxygen decreased rapidly and was always depleted 4-6 mm below the sponge surface. When the sponge stopped pumping, diffusive oxygen consumption in the overlying water could be observed. Oxygen profiles in cultivated fragments showed a nearly parabolic shape and anoxic conditions already 500µm below the surface, indicating that oxygen supply was solely due to molecular diffusion with no pumping activity involved. Sulfate reduction rates (SRR) in sponge tissue ranged from 1-1200 nmol SO₄²⁻ cm⁻² d⁻¹ with strong variations within the same sponge. Time series with tissue slurry showed strong dependence of SRR on incubation time with SO₄²⁻. This indicates a rapid sulfide reoxidation, and thus a direct coupling between sulfate reduction and sulfide oxidation. Even the highest rates measured may still underestimate true SRR, which were estimated to be up to 5000 nmol cm⁻² d⁻¹. From these rates, cell specific SRR (csSRR) up to 0.22 fmol cell⁻¹ d⁻¹ were calculated, which are in a reasonable range for natural environments. My results indicate the presence of an endosymbiotic sulfur cycle in the tissue of *G. barretti*, driven by the activity of SRB and by oxic/anoxic cycles in the tissue due to varying pumping activity of the sponge. Tissue anoxia may arise due to the active metabolism of sponge cells and aerobic associated bacteria under low pumping activity. Under these conditions, sponge cells will switch their metabolism to fermentation. Fermentation products serve as substrates for SRB, which can be consumed by sponge cells ("bacterial farming"). In the presence of oxygen, the sulfur cycle within the sponge tissue is completed by oxidation of sulfide to sulfate. The involvement of sulfide-oxidizing bacteria in this step is very likely. My results indicate the relevance of anaerobic metabolic processes in the intercellular matrix of *G. barretti*, with sulfate-reducing bacteria as putative key players in sponge metabolism and nutrition. The possibility of an ancient origin of the symbiosis between SRB and sponges or sponge precursors remains a matter of discussion. However, this efficient system of internal nutrient recycling by symbiotic partners may be the reason for the success of *Geodia* and other bacteriosponges through earth history until today.

19. Keywords**20. Publisher**

University of Göttingen

21. Price

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Histological investigation of organisms with hard skeletons: a case study of siliceous sponges		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date June 2003
Hoffmann F, Janussen D, Dröse W, Arp G, Reitner J	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 9
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 39	14. No. of Tables 3
	15. No. of Figures 5	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>Siliceous and calcareous sponges are commonly treated with acid to remove the spicules prior to embedding and cutting for histological investigations. Histology of spiculated sponge tissue represents a challenging problem in sponge histotechnology. Furthermore, fluorescence in situ hybridization (FISH), a key method to study sponge associated microbes, is not possible after acid treatment. For a broad range of siliceous sponge species, we developed and evaluated methods for embedding in paraffin, methylmetacrylat resins, LR White resin and cryomatrix. Different methods for cutting of tissue blocks as well as mounting and staining of the sections were also tested. The aim was to enable histological investigations and FISH without prior removal of the spicules. To obtain an overview of tissue and skeleton arrangement, we recommend embedding of tissue blocks with LR White resin combined with en bloc staining techniques for large individuals with thick and numerous spicules, but paraffin embedding and subsequent staining for whole small specimens. For FISH on siliceous sponges, we recommend Histocryl embedding if spicule content is high, but paraffin embedding if it is low. For detailed tissue examinations, classical histological techniques are the method of choice. Until now, a standard method suitable for all histological attempts on siliceous sponges is not available. Methods should be chosen according to the aim of investigation and the properties of the examined species.</i>		
19. Keywords embedding, FISH, histology, LR White resin, methylmethacrylate resin, paraffin, Porifera, spicules		
20. Publisher Biotechnic and Histochemistry 78: 191-199	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Geobiology and biodiversity of Porifera from Arctic autochthonous spiculite mats and abyssal soft bottom sediments		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2003
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F, Kamcke C, Kaesler I	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 3
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 0	14. No. of Tables 1
	15. No. of Figures 0	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract		
19. Keywords		
20. Publisher Berichte zur Polar- und Meeresforschung 446: 59-61	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Growth and regeneration in cultivated fragments of the boreal deep water sponge <i>Geodia barretti</i> Bowerbank, 1858 (Geodiidae, Tetractinellida, Demospongiae)		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date April 2002
Hoffmann F, Rapp HT, Zöller T, Reitner J	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 10
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 35	14. No. of Tables 2
	15. No. of Figures 5	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>A cultivation method has been developed for the boreal deep-water sponge Geodia barretti (Demospongiae, Geodiidae), a species which is common in the deep Norwegian fjords. The species is known to contain secondary metabolites which are biologically active.</i> <i>Choanosomal fragments of 2 4cm³ (: 3 7 g) were kept in half-open systems. Cicatrisation and regeneration processes were surveyed by histological examination during 8 months of cultivation. During the first weeks, the weight of the fragments decreased. However, after about 6 weeks the weight equalled the original weight, and after 1 year the weight had increased by about 40% compared to the original weight. The initial decrease was due to complex healing processes and the regeneration of the cortex, a sterrastral layer typical for the family of the Geodiidae. We document, for the first time, the complete cortex reconstruction in an adult G. barretti, as well as the development of egg cells during cultivation. Our study represents the first attempt at biotechnological production of boreal sponge tissue. For successful farming of G. barretti and other boreal and arctic sponges, however, further investigation is needed on factors stimulating growth and secondary metabolite production in the target species.</i>		
19. Keywords Geodia barretti, Cicatrisation, Reproduction, Regeneration, Cortex, Half-open system		
20. Publisher Journal of Biotechnology 100: 109-118	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Diploma thesis
3a. Report Title	
3b. Title of Publication Untersuchungen zur molekularen Systematik hexactinellider Schwämme	
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Kamcke C	6. Publication Date 2003
	7. Form of Publication Diploma thesis
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.
	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report
	11b. No. of Pages Publication 75
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References
	14. No. of Tables
	15. No. of Figures
16. Supplementary Notes	
17. Presented at (Title, Place, Date)	
18. Abstract	
19. Keywords	
20. Publisher University of Göttingen, Dep. Of Geosciences, Geobiology	21. Price

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Porifera-Zonierungen in Kaltwasser-Korallenriffen (Sula Rücken, Norwegen)		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Reitner J, Hoffmann F	6. Publication Date 2003	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	
	10. Reference No. 03F0256A-D	
	11a. No. of Pages Report	
	11b. No. of Pages Publication 13	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12. No. of References 28	
	14. No. of Tables 1	
	15. No. of Figures 18	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract		
19. Keywords		
20. Publisher Biodiversitätsforschung: Die Entschlüsselung der Artenvielfalt in Raum und Zeit, Kleine Senckenberg-Reihe 45: pp 75-87	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article		
3a. Report Title			
3b. Title of Publication <i>Geodia barretti</i> (Geodiidae, Demospongiae): an anoxic ecosystem?			
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))		5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2002
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Hoffmann F, Larsen O, Kaesler I, Szewzyk U, Reitner J		7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen		9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
		11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 1
		12. No. of References	
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn		14. No. of Tables 0	
		15. No. of Figures 0	
16. Supplementary Notes			
17. Presented at (Title, Place, Date)			
18. Abstract			
19. Keywords			
20. Publisher Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università die Genova 66-67: 93		21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Phylogenetic significance of spined raphides within Haliclona (Haplosclerida, Chalinidae)		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2001
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Weerdt WHd, Hoffmann F , Beglinger EJ	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 8
	12. No. of References 44	14. No. of Tables 2
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	15. No. of Figures 3	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract		
19. Keywords		
20. Publisher Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università die Genova 66-67: 210	21. Price	

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. Type of Report Journal Article	
3a. Report Title		
3b. Title of Publication Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering		
4a. Author(s) of the Report (Family Name, First Name(s))	5. End of Project May 2005	6. Publication Date 2002
4b. Authors of the Publication (Family Name, First Name(s)) Osinga R, Armstrong E, Burgess JG, Hoffmann F, Reitner J, Schumann-Kindel G	7. Form of Publication Journal Article	
8. Performing Organization(s) (Name, Address) BOSMAN TP 2 Universität Göttingen Fachbereich Geowissenschaften Abt. Geobiologie Goldschmidtstr. 3 37077 Göttingen	9. Originator's Report No.	10. Reference No. 03F0256A-D
	11a. No. of Pages Report	11b. No. of Pages Publication 1
	12. No. of References 2	14. No. of Tables 0
13. Sponsoring Agency (Name, Address) Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	15. No. of Figures 0	
16. Supplementary Notes		
17. Presented at (Title, Place, Date)		
18. Abstract <i>In recent years, a large diversity of sponge-microbe associations has been described: sponges can harbour archaea, eubacteria (including cyanobacteria), microalgae, fungi and probably also protozoa. The current paper gives a brief overview of the different types of associations and describes the potential influence of symbiotic micro-organisms on bioprocess design for the biotechnological production of sponge-associated natural compounds. It is concluded that the presence of microsymbionts may further complicate the already tedious development of sponge culturing techniques.</i>		
19. Keywords symbiosis, sponges, biotechnology		
20. Publisher Hydrobiologia 461: 55-62	21. Price	

Institut für Pharmazeutische Biologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Prof. Dr. Gabriele M. König

Absender: Prof. Dr. G. M. König
Institut für Pharmazeutische Biologie
Nußallee 6
D-53115 Bonn

Tel.: ++49228733194
Fax: ++49228733250
email: g.koenig@uni-bonn.de

30.09.2005

Abschlußbericht zum BMBF-Projekt

BOSMAN II

Teilprojekt 3:

Pharmazeutisches Potential mikrobieller mariner Naturstoffe

Berichtszeitraum: 01.04.2002 – 31.05.2005,
Projektlaufzeit: 01.04.2002 – 31.05.2005
Förderkennzeichen: 03F0358D

Inhaltsverzeichnis

I	Kurze Darstellung	1
1	Aufgabenstellung	1
2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	2
3	Planung und Ablauf des Vorhabens.....	3
4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	5
5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	11
II	Ergebnisse	12
1	Naturstoffchemische Untersuchungen	12
1.1	Naturstoffchemische Arbeiten marine Bakterien	12
1.2	Naturstoffchemische Arbeiten Schwämme und marine Pilze.....	19
2	Molekularbiologische Untersuchung von marinen Bakterien	22
3	Entwicklung eines Bioassays zur Identifizierung von Naturstoffen mit Antimalaria-Aktivität	28
4	Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	36
5	Veröffentlichungen	36
III	Erfolgskontrollbericht.....	38
1	Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen	
2	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis, erreichte Nebenergebnisse, Erfahrungen	
3	Fortschreibung des Verwertungsplans	
4	Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	
5	Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung	
IV	Berichtsblatt	40

I. Kurze Darstellung

1 Aufgabenstellung

- **Naturstoffchemische Untersuchung von marinen Bakterien**

Im Rahmen des naturstoffchemischen Teiles unseres Projektes sollten aus marinen Organismen biologisch aktive Naturstoffe isoliert und charakterisiert werden. Hierbei standen die schwamm-assoziierten Bakterien aus BOSMAN I und II im Vordergrund. Die biologischen Test sowie die Isolierung und Charakterisierung der marinen Bakterien werden hauptsächlich von drei Projektpartnern (TP 4 / Prof. Szewczyk; IBWF / Prof. Anke; Oncotest GmbH) durchgeführt. Die Kultivierung sollte wahlweise in unserer Arbeitsgruppe oder auch bei Projektpartnern erfolgen.

Durch das Zusammenarbeiten kompetenter Projektpartner mit Erfahrungen auf dem Gebiet der marinen Mikrobiologie sollten durch gezielte Auswahl außergewöhnlicher mariner Bakterien aus teilweise bisher wenig erforschten Regionen Substanzen mit relevanten biologischen Aktivitäten identifiziert und deren pharmazeutisches Potential evaluiert werden.

- **Molekularbiologische Untersuchung von marinen Bakterien**

Hauptziel der molekularbiologischen Arbeiten in unserem Teilprojekt war die Untersuchung der mit borealen Schwämmen assoziierten Bakterien auf ihr Potenzial zur Naturstoffbiosynthese. Es handelte sich hierbei meist um Stämme, die taxonomisch den Proteobakterien zugeordnet werden können. Diese Bakterien wurden auf potenzielle Polyketidsynthase- (*pks*), Nonribosomale Peptidsynthetase- (*nrps*) und Tryptophan-Halogenase (*prnA*)-Genfragmente geprüft.

- **Entwicklung eines Bioassays zur Prüfung von Naturstoffen auf Anti-Malaria-Aktivität**

Zunehmende Resistenzentwicklungen gegenüber diversen Anti-Malaria-Wirkstoffen erfordern die Auffindung von neuen, aktiven Naturstoffen. Zur Auffindung derartiger Naturstoffe sind geeignete Testsysteme zur Aktivitätsprüfung notwendig. Die Etablierung von einem Testsystem basierend auf der überexprimierten Desoxyhypusin Synthase (*Dhs*) und dem eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF-5A (*eIF-5A*) aus dem Malariaerreger *Plasmodium*

falciparum war daher Teil dieses Projekts. Eine der spezifischsten posttranslationalen Modifikationen ist die Spermidin abhängige Bildung von Hypusin am eIF-5A. Die Desoxyhypusin Synthase katalysiert den ersten Schritt dieses Biosynthese-Wegs. Hypusin-Bildung am eIF-5A scheint essentiell für dessen Aktivität und als Konsequenz für die eukaryontische Zellproliferation zu sein. Daher ist die Desoxyhypusin Synthase ein idealer Kandidat für die Inhibierung der Zellproliferation von *P. falciparum*.

Die Entwicklung eines solchen Bioassays erforderte nach der Isolierung, Sequenzierung und Charakterisierung der plasmodialen *dhs*- und *eIF-5A*-Sequenzen ihre Expression in einem geeigneten Expressionssystem und eine anschließende Überprüfung der enzymatischen Aktivitäten dieser rekombinanten Enzyme. Neben den plasmodialen Genen sollten auch die entsprechenden humanen Gene exprimiert werden, um parallel einen Bioassay basierend auf den humanen rekombinanten Enzymen zu etablieren. Hierdurch wird eine Identifizierung von Naturstoffen, die eine spezifische Hemmung der plasmodialen Desoxyhypusin Synthase bewirken, ermöglicht.

2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Unsere Arbeitsgruppe hat langjährige Erfahrungen mit der Isolierung, Strukturaufklärung und biologischen Prüfung von Naturstoffen aus marinen Organismen und ist mit sämtlichen für das Vorhaben benötigten Methoden vertraut.

Zur Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten sowohl im Rahmen der Identifizierung mariner bakterieller Naturstoffproduzenten als auch im Rahmen der Bioassay-Entwicklung zur Identifizierung von Naturstoffen mit Anti-Malaria-Aktivitäten stehen unserer Arbeitsgruppe modern eingerichtete S1-Labore zur Verfügung.

Das Institut bietet alle notwendigen räumlichen und apparativen Voraussetzungen zur Durchführung des Projektes.

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

- **Naturstoffchemische und molekularbiologische Untersuchung von marinen Bakterienstämmen**

Die Projektpartner stellten nach vorheriger Absprache Probenmaterial zur Verfügung. Hierbei handelt es sich entweder um marine Bakterienisolate, Medienlyophilisate oder Extrakte. Innerhalb unseres Teilprojektes wurden folgende Tätigkeiten durchgeführt:

- Anzucht und Extraktion der zur Verfügung gestellten Organismen und eigener Proben
- Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Extrakte
- Massenspektrometrische und NMR spektroskopische Untersuchung der Extrakte hinsichtlich auffälliger Inhaltsstoffe
- Biologisches Screening der Extrakte: Prüfung auf antibakterielle, antifungale und antialgale Wirkung in Agardiffusionsassays
- Chromatographische Auftrennung aktiver Extrakte (u.a. VLC, HPLC)
- Strukturaufklärung von Reinstoffen mittels spektroskopischer Methoden (u.a. MS, NMR)
- Durchmusterung der Schwamm-assoziierten Bakterien mit *pks*-, *nrps*- und *prnA*-Primern
- Phylogenetische Analyse der *pks*-Gefragmente
- Durchmusterung von Myxobakterien mit *pks*-, *nrps*- und *prnA*-Primern
- Kultivierungsoptimierung der *pks*-positiven marinen Stämme zur Induktion des Sekundärmetabolismus
- Expressionsanalyse der *pks*-Gene in den *pks*-positiven marinen Bakterienstämmen
- Erstellung einer Cosmid-Bank von dem Bakterienstamm *Halovibrio* sp. ORS-BMM-1

- **Bioassay-Entwicklung**

Eine cDNA-Bank des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* Stamm Dd2 wurde uns vom Malaria Resource Center (MR4, Manassas, VA) und ein Expressionskonstrukt mit dem humanen *dhs* Gen wurde uns von der Arbeitsgruppe von M. H. Park (NIH, Bethesda, MD) zur Verfügung gestellt.

Die Etablierung eines Testsystems zur Identifizierung von Naturstoffen mit Desoxyhypusin Synthase inhibierenden Eigenschaften sowie die Untersuchung einer stadienspezifischen Expression des *dhs* und *eIF-5A* Gens im erythrocytären Lebenszyklus von *P. falciparum* erforderte die Durchführung folgender Arbeitsschritte:

- Klonierung und Sequenzierung des *dhs* und *eIF-5A* Gens aus *Plasmodium falciparum* Dd2
- Klonierung des humanen *eIF-5A* Gens
- Expression des plasmodialen und humanen *eIF-5A* Gens mit aminoterminalen His-Tag in *Escherichia coli* M 15 [pREP4]
- Expression des humanen und plasmodialen *dhs* Gens mit carboxyterminalem His-Tag in *E. coli* Rosetta gami
- Reinigung der rekombinanten Proteine über Ni-NTA-Affinitätschromatographie
- Aktivitätsbestimmungen der rekombinanten Desoxyhypusin Synthasen
- Stadienspezifische Expressionsratenbestimmung des plasmodialen *dhs* und *eIF-5A* Gens über Real-time PCR

4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

- **Bioassay-Entwicklung zur Detektion von Naturstoffen mit Anti-Malaria-Aktivitäten**

Naturstoffe wie Chinin und Artemisinin haben in der Anti-Malaria-Wirkstoffforschung signifikant zur Entwicklung von neuen Anti-Malaria-Therapeutika beigetragen. Zunehmende Resistenzentwicklungen gegenüber diversen Anti-Malaria-Wirkstoffen erfordern die Auffindung von neuen, aktiven Naturstoffen. Das marine Habitat stellt hier eine interessante neue Quelle zur Auffindung derartiger Naturstoffe dar. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits diverse Naturstoffe aus marinen Organismen isolieren, die Anti-Malaria-Aktivitäten aufwiesen (König et al., 1998; Wright et al., 2001; Wright et al., 2002).

Zur Identifizierung derartiger Naturstoffe sind geeignete Testsysteme zur Aktivitätsprüfung notwendig. Diese Testsysteme basieren auf Targetstrukturen aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Potentielle Targestrukturen sollten eine essentielle Funktion im Lebenszyklus des Malariaerregers haben und parasitenspezifische Eigenschaften besitzen, durch die sie sich von den Wirtsenzymen unterscheiden (Olliaro und Wirth, 1997).

Polyamine sind wichtige Regulatoren für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Im Folgenden soll kurz dargestellt werden, welche entscheidende Rolle Polyamine spezifisch für die Entwicklung von *P. falciparum* spielen und weshalb daher ein polyaminabhängiges Enzym eine geeignete Targetstruktur darstellt. Die Polyaminbiosynthese erreicht nach Studien von Assaraf et al. (1984) Spitzenwerte während des frühen Trophozitenstadiums, während Nucleinsäure- und Proteinbiosynthese später im reifen Trophoziten stattfinden. Hemmung der entscheidenden Enzyme der Polyaminbiosynthese, der Ornithin Decarboxylase (ODC) und der S-Adenosylmethionin Decarboxylase (SAM-DC), blockierte die erythrocytäre Schizogenie von *P. falciparum* in Kultur und reduzierte *P. berghei* in infizierten Mäusen (Bitonti et al., 1987). Difluormethylornithin (DFMO), ein Inhibitor der ODC, interferierte nicht mit der Merozoiteninvasion und der Ring-Ausbildung in Erythrocyten, aber verhinderte die Umwandlung von Trophoziten in Schizonten. Gleichzeitig wurden Protein- und Nucleinsäuresynthese inhibiert. Zugabe von Putrescin zu DFMO behandelten Kulturen induzierte die Synthese von bestimmten Proteinen in *P. falciparum*, weiterhin konnte ein sofortiger Anstieg der RNA-Synthese

festgestellt werden. Außerdem wurde durch Putrescin die total inhibierte DNA-Synthese nach 10 h erneut induziert und erreichte ein Maximum nach 18 h (Assaraf et al. 1987). Bachrach et al. (1990) stellte fest, daß Polyamine die Aktivität spezifischer Enzyme beeinflussen können. Sowohl die Aktivität der DNA-Polymerase aus *P. falciparum* wird durch Polyamine positiv beeinflusst als auch die Translation der mRNA erfordert Polyamine. Müller et al. (2000) haben die Expression der ODC/AdoMet-DC während des erythrocytären Lebenszyklus von *P. falciparum* untersucht. Es konnte eine stadiumspezifische Expression mit einem hohen Gehalt an ODC/AdoMet-DC mRNA im späten Trophozoitenstadium durch Northern Blot nachgewiesen werden.

Diese Untersuchungen zeigen, daß Polyamine auf diversen Ebenen als Regulatoren für Enzyme bzw. für die Transkription ihrer Gene und Translation der entsprechenden mRNAs verantwortlich sind. Da die Deoxyhypusin Synthase die spezifischste bisher bekannte polyamin-abhängige Modifikation eines Proteinfaktors katalysiert, der eine entscheidende Rolle im RNA-Metabolismus der Zelle spielt, wurde sie als eine neue Targetstruktur definiert. Dieses Enzym ist verantwortlich für den ersten Schritt in der Biosynthese der ungewöhnlichen Aminosäure Hypusin am eIF-5A. Dieses Enzym katalysiert den Transfer einer 4-Aminobutylgruppe vom Polyamin Spermidin auf die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Restes im eIF-5A-Vorläuferprotein (Lee und Park, 2000). Die Einführung einer Hydroxylgruppe und damit die Umwandlung zum fertigen Hypusin werden durch ein weiteres Enzym, die Deoxyhypusin Hydroxylase, katalysiert. Hierdurch wird der eIF-5A in seine katalytisch aktive Form überführt. Spezifische Funktionen konnten ihm als essentieller Cofaktor sowohl für das Rev- als auch für das Rex-Protein von HIV und HTLV zugeschrieben werden (Elfgang et al., 1999). Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass der eIF-5A für den Transport von spezifischen mRNA-Typen aus dem Zellkern in das Cytoplasma verantwortlich ist. Diese mRNA-Typen kodieren für Schlüsselproteine in der DNA-Replikations-Initiation (Hanauske et al., 1995). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß der eIF-5A am Turnover von mRNA in Hefe beteiligt ist (Zuk und Jacobson, 1998). Eine weitere vorgeschlagene Funktion ist eine Beteiligung des eIF-5A an der Regulation der Ribosomen-Biosynthese (Valentini et al., 2002) sowie eine Interaktion mit dem ribosomalen Protein L5, was auf eine Verbindung zwischen dem eIF-5A und dem Translationsprozess hinweist (Schatz et al., 1998). Diese diversen beschriebenen Funktionen weisen auf die essentielle Funktion des eIF-5A in der

Zelle hin und sprechen ihm eine entscheidende Rolle im RNA-Metabolismus der Zelle zu. Selektive Inhibitoren des Hypusinilierungsschrittes am eIF-5A in *P. falciparum*, der durch die plasmodiale Desoxyhypusin Synthase katalysiert wird, sollten daher die Parasitenproliferation hemmen.

Die Deoxyhypusin Synthesen aus Mensch und Hefe sind bereits genau untersucht worden. Es handelt sich bei diesen Enzymen um Homotetramere mit einer Untereinheitengröße von 40 – 43 kDa (Klier et al., 1995). Als Cofaktor dient dem Enzym NAD. In Hefe konnte durch Unterbrechung des *dhs*-Gens und durch spezifische Mutagenesen gezeigt werden, dass das von diesem Gen kodierte Enzym notwendig für die Teilungsfähigkeit der Zelle ist (Park et al., 1998). Studien mit Wildtyp- und transformierten Zelllinien ergaben, dass diverse Mono- und Bisguanyl Diamine, die strukturell dem Spermidin verwandt sind, effektive Inhibitoren der Desoxyhypusin Synthase darstellen und antiproliferative Effekte zeigen, indem sie die eIF-5A Hypusinilierung verhindern (Park et al., 1994; Shi et al., 1996; Nishimura et al., 2004). In der Literatur wurde basierend auf der humanen Desoxyhypusin Synthase bereits die Entwicklung eines Testsystems zur Detektion von antiproliferativen Verbindungen beschrieben (Sommer et al., 2004). Zudem ist die humane Desoxyhypusin Synthase als eine neue Targetstruktur für antiretrovirale Therapien definiert worden (Hauber et al., 2005). Die Bedeutung dieses Enzyms als potenzielle Targetstruktur zur Behandlung von Malaria wird vor dem Hintergrund dieser Studien noch deutlicher.

Assaraf, Y. et al. (1984) *Biochem. J.* **222**, 815 - 819.

Assaraf, Y. et al. (1987) *Biochem. J.* **242**, 221 - 226.

Bachrach, U. et al. (1990) *Eur. J. Biochem.* **191**, 633 - 637.

Bitonti, A. J. et al. (1987) *Exp. Parasitol.* **64**, 237 - 243.

Elfgang, C. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6229 - 6234.

Hauber, I. et al. (2005) *J. Clin. Invest.* **115**, 76 - 85.

Hanuske-Abel, H. M. et al. (1995) *FEBS Lett.* **366**, 92 - 98.

Joe, Y. A. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22386 - 22392.

Klier, H. et al. (1995) *FEBS Lett.* **364**, 207 - 210.

König, G. M. et al. (1998) *Planta Med.* **64**, 443 - 447.

Lee, C. H. und M. H. Park (2000) *Biochem. J.* **352**, 851 - 857.

Müller, S. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8097 - 8102.

- Olliaro, P. und D. Wirth. (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 29 - 33.
- Park, M. H. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27827 - 27832.
- Schatz, O. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 1607 - 1612.
- Shi, X. P. et al. (1996) *Biochim Biophys Acta.* **1310**:119 -126.
- Sommer, M. N. et al. (2004) *J. Biomol. Screen.* **9**, 434 - 438.
- Valentini, S. R. et al. (2002) *Genetics* **160**, 393 - 405.
- Wright, A. D. et al. (2001) *J. Med. Chem.* **44**, 873 – 885.
- Wright, A. D. et al. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 3067 - 3072.
- Zuk, D und A. Jacobson. (1998) *EMBO J.* **17**, 2914 - 2925.

- **Boreale marine Bakterien als neue Naturstoffquelle**

Marine Organismen stellen eine immense Quelle für die Isolierung neuer, interessanter Naturstoffe dar (Blunt, J.W. et al, 2005). Einen Überblick über die Strukturvielfalt der marinen Naturstoffe läßt sich der Datenbank MARINLIT entnehmen, einen Überblick über Naturstoffe mikrobiellen Ursprungs bietet die Datenbank ANTIBASE. Für einen Großteil der marinen Substanzen werden biologische Aktivitäten beschrieben, einige davon hochwirksam, so dass sie sich in der klinischen bzw. präklinischen Phase befinden (Jimeno, J. M. et al., 2004).

Von einer Anzahl dieser Verbindungen wird vermutet, dass sie von assoziierten oder symbiontischen Mikroorganismen produziert werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu mikrobiellen Metaboliten, der relativ geringen Menge an produzierten Verbindungen und da ähnliche Verbindungen in Makroorganismen auftreten, die nicht nahe miteinander verwandt sind (Haygood et al., 1999). Diese Art der Assoziation oder Symbiose von Invertebraten mit Mikroorganismen, die ein vielseitiges Sekundärmetabolitspektrum aufweisen, ist für eine Vielzahl von Phyla, wie den Porifera, den Mollusken, den Crustaceen, den Schwämmen und den Bryozoen, beschrieben worden. Die mit diesen Makroorganismen assoziierten Bakterien scheinen vielseitige biochemische Möglichkeiten zur Adaptation an die entsprechenden Umweltbedingungen in oder an diesen verschiedenen Wirten zu besitzen und stellen daher ein bisher kaum untersuchte Quelle an Naturstoffen dar.

Einige interessante Lebensgemeinschaften von marinen Makroorganismen und ihren bakteriellen Mitbewohnern sollen im Folgenden vorgestellt werden. Das cytotoxisch wirkende, makrozyklische Polyketid Swinholid A und das antifungal wirkende, bizyklische Glycopeptid Theopalauamid wurden aus dem marinen Schwamm

Theonella swinhoei isoliert (Kobayashi et al., 1990). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass im Fall des Swinholids A ein unizelluläres Bakterium für die Biosynthese verantwortlich ist und dass das Theopalauamid ebenfalls von einem Prokaryonten, in diesem Fall einem filamentösem Bakterium, produziert wird (Bewley et al., 1996). Das Antibiotikum Andrimid wurde aus einem *Vibrio* sp. Stamm isoliert, der als assoziiertes Bakterium von einem *Hyatella* sp. Schwamm an der Küste von Oshima, Japan gesammelt wurde (Oclarit et al., 1994). Marine Bryozoen wiederum sind Quelle einer gesamten Familie von cytotoxischen Makroliden, den Bryostatinen (Pettit et al., 1982). Diese Verbindungen bilden eine Gruppe komplexer Polyketide, deren Strukturen auf einem Bryopyran-System basieren, welches auffallende Ähnlichkeit zu bestimmten bakteriellen Sekundärmetaboliten aufweist. Davidson et al. (2001) wiesen in der Bryozoe *Bugula neritina* den Symbionten „Candidatus Endobugula sertula“ nach, ein γ -Proteobakterium, welches eine Polyketid Synthase (Typ I) bildet, die an der Bryostatin-Biosynthese beteiligt sein könnte.

Die oben genannten Beispiele zeigen, dass marine Invertebraten eine interessante ökologische Nische für Bakterien bieten und dass diese Bakterien vermutlich dem von ihnen bewohnten Makroorganismus wiederum durch eine entsprechende Produktion von biologisch aktiven Naturstoffen einen Standortvorteil verschaffen.

Derartige Symbiosen bzw. Lebensgemeinschaften sind bisher aus borealen Meeresregionen nicht bekannt. Somit ist es sinnvoll, diesen marinen Lebensräumen zunehmende Beachtung zu schenken und interessante Mikro-Makro-Organismus-Beziehungen zu entdecken. Neuartige bakterielle Naturstoffproduzenten, die durch ihr Sekundärmetaboliten-Spektrum dem entsprechenden Makroorganismus an diesem borealen Standort einen Selektionsvorteil bieten können, sollen durch unsere molekularbiologischen Untersuchungen identifiziert, die biologischen Aktivitäten der produzierten Naturstoffe ermittelt und die entsprechenden Strukturen aufgeklärt werden.

In Anbetracht des zeitaufwendigen biologischen und chemischen Screenings, erscheint die Etablierung einer effektiveren Methode angebracht. Daher wurde von uns ein molekularbiologischer Ansatz zur spezifischen Detektion von potenziellen Naturstoffproduzenten, der auf einem PCR Screening basiert, verfolgt. Unsere Untersuchungen sollten sich auf den Nachweis von Polyketid- (*pks*) und non-ribosomalen Peptid-Biosynthese-Genen (*nrps*) konzentrieren. Polyketide und non-ribosomale Peptide stellen zwei grosse Gruppen an komplexen Naturstoffen dar, die

eine extreme strukturelle Diversität und ein vielseitiges Wirkungsspektrum aufweisen (Walsh, 2004). Besonders drei prokaryontische Gruppen haben sich als besonders ergiebige Produzenten dieser Sekundärmetabolite erwiesen, die Actinomyceten, die Cyanobakterien und die Myxobakterien. Letztere Gruppe hat in den vergangenen 30 Jahren immer wieder neue biologisch aktive Verbindungen geliefert mit mehr als 80 verschiedenen Grundstrukturen und 450 verschiedenen strukturellen Varianten (Reichenbach, 2001). Aufgrund dieses Biosynthesepotenzials und der Verfügbarkeit einer myxobakteriellen Stammsammlung in unserer Arbeitsgruppe wurden diverse myxobakterielle Stämme als Kontrollgruppe in unser PCR-Screening mit einbezogen, um die Anwendbarkeit und Effektivität unseres Vorgehens zu überprüfen. Derartige PCR-Screening-Ansätze wurde bereits für das terrestrische Habitat zur Untersuchung von *Streptomyces*-Stämmen auf das Vorkommen von Polyketid-Biosynthese-Genclustern (Typ II) gewählt (Metsa-Ketelä et al., 1999) sowie zur Durchmusterung von Metagenombänken auf neuartige *pks*-Genfragmente (Courtois et al., 2003). Auch zur Untersuchung der Verbreitung von *nrps*-Biosynthese-Genen in Cyanobakterien haben sich solche PCR-Studien als sehr effektiv erwiesen (Christiansen et al., 2001).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche biologisch aktive Sekundärmetabolite aus marinen Bakterien isoliert. Dies wird in vielen Reviews zu diesem Thema deutlich (Blunt et al. 2003; Fenical, 1993; Fenical und Jensen, 1993; Jensen und Fenical, 1994/1996/2000; Davidson, 1995; König und Wright, 1996/1999; Bernan et al., 1997).

Bernan, V. S. et al. (1997) *Adv. Appl. Microbiol.* **43**, 57-90

Bewley, C. A. et al. (1995) *Experientia* **52**, 716 - 22.

Bewley, C. A.; Faulkner, D. J. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2162-2178

Blunt, J. W. et al. (2003) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 1-48

Blunt, J. W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., et al. (2005) *Nat. Prod. Rep.* **22** (1): 15-61

Blunt, J. W.; Munro, M.H.G. (2002) MarinLit (Marine Literature DataBase) Vers. 11.1

Christiansen, G. et al. (2001) *Arch. Microbiol.* **176**, 452 - 458.

Courtois, S. et al. (2003) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 49 – 55.

Davidson, B. S. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 284-291

Davidson, S. K. et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4531 - 4537.

Faulkner, D. (2002) *J. Nat. Prod. Rep.*, **19**, 1-48

- Fenical, W. (1993) *Chem. Rev.* **93**, 1673-1683
- Fenical, W.; Jensen, P. R. (1993) *In Marine Biotechnology*, Vol. 1 (Attaway, D. H.; Zaborsky, O. R., Hrsg.). *Plenum Press, New York*. 419-457
- Haygood, M. G. et al. (1999) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 133 - 143.
- Jensen, P. R. und Fenical, W. (1994) *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 559 - 584.
- Jimeno J. et al., (2004) *Anticancer Drugs*. Apr;15(4):321-9.
- Kobayashi, M. et al. (1990) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **38**, 2960 - 2966.
- König, G. M.; Wright, A. D. (1996). *Planta Med.* **62**, 193-211
- König, G. M.; Wright, A. D. (1999) *In Drug Discovery from Nature* (Grabley, S.; Thiericke, R., Hrsg.). *Springer Verlag, Berlin*. 180-187
- Laatsch, H. (2003) ANTIBASE (Datenbank)
- Metsa-Ketelä, M. et al. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 1 - 6.
- Oclarit, J. M. et al. (1994) *Microbios.* **78**, 7-16.
- Pettit, G. R et al. (1982) *Nat. Prod.* **45**, 272 - 276.
- Reichenbach, H. (2001) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 149 - 156.
- Walsh, C. T. (2004) *Science* **303**:1805 - 1810.

5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt beinhaltete eine enge, interdisziplinäre Kooperation mit verschiedensten Projektpartnern, die auf den Gebieten der Mikrobiologie und Ökologie arbeiten. Die Probung erfolgte durch Projektpartner aus Teilprojekt 1 und 2. Bereits auf dem Schiff wurden durch Projektpartner aus Teilprojekt 4 Schwamm assoziierte Bakterien isoliert, die unserem Teilprojekt für molekularbiologische und naturstoffchemische Untersuchungen zur Verfügung standen. Eigene Screeningergebnisse wurden mit MALDI TOF-Ergebnissen / TP 5 verglichen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte teilweise beim IBWF, die Extrakte wurden dann in unserem Teilprojekt aufgearbeitet. Die biologischen Tests wurden von den beteiligten industriellen Partnern (IBWF; Oncotest GmbH) durchgeführt.

II Ergebnisse

1. Naturstoffchemische Untersuchungen

1.1 Naturstoffchemische Arbeiten marine Bakterien

- **Chemisches und biologisches Screening der Bakterien BOS A2 bis A12**

12 der ersten während der Arktis-Exkursion 2002 isolierten Bakterienstämme wurden untersucht. Bakterienlyophilisate wurden vom IBWF/Kaiserslautern hergestellt. 40 Proben (BOS A2 bis A5 (jew. 3 Medien) und A6 bis A12 (jew. 4 Medien)) als Lyophilisat (Medium und Pellet zusammen) wurden jeweils dreimal mit 200 mL Aceton und anschließend mit jeweils dreimal 200 mL MeOH (1% CH₃COOH) extrahiert. Diese Proben wurden unterschiedlichen Screeningmethoden unterzogen.

Die Acetonextrakte wurden folgendermaßen analysiert:

- ¹H NMR in d₆-Aceton
- DC-Chromatographie auf Kieselgel/PE/Ac/EtOAc
 - ⇒ BOS **A2**, BOS **A6** und BOS **A12** auffällige Spots
- LCMS-Analyse RP₁₈, MeOH/H₂O-Gradient (positiv und negativ)
- Agardiffusionstest
- Artemia-Test (nur BOS A2 bis A5)

Die Methanolextrakte wurden folgendermaßen analysiert:

- ¹H NMR in d₄-MeOH
- DC-Chromatographie auf Kieselgel/Aceton und RP/Me/H₂O
- LCMS-Analyse RP₁₈, MeOH/H₂O-Gradient (positiv und negativ),
- Agardiffusionstest
- Artemia-Test

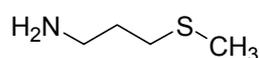
Die Ergebnisse der LCMS-Untersuchungen wurden mit MALDI-TOF-MS-Untersuchungen der AG van Dören/Uni Berlin abgeglichen. Die LCMS-Bedingungen wurden daraufhin weiter optimiert. Besonders der Massenbereich wurde stark erweitert. Der Stamm BOS A2 wies in beiden MS-Methoden eine auffällige und interessante Substanz mit m/z 804 auf. Die Anzucht in großem Maßstab wurde zugunsten biologisch aktiver Extrakte zurückgestellt. Der Stamm BOS A11 wurde aufgrund der LCMS Ergebnisse aufgearbeitet (s.u.).

- **Screening von BOS A20, 27, 31, 33 und 38**

Im Weiteren wurden nur noch einzelne Proben aufgrund von phylogenetischen Daten bzw. biologischen Aktivitäten einem reduzierten Screening unterzogen. Die Medienlyophilisate der Proben BOS A20, 27, 31, 33 und 38 wurden jeweils dreimal mit 200 mL Aceton extrahiert. Diese Extrakte wurden mittels LCMS untersucht. Der Stamm BOS A20 zeigte interessante LCMS Ergebnisse.

- **BOS A20, *Zobellia uliginosa***

Der Bakterienstamm BOS A20 (Ph-CSA-02k) war in Kaiserlautern/IBWF/Prof. Anke durch zytotoxische Aktivitäten gegenüber zwei Zelllinien (HeLa S3, Jurkat) aufgefallen. Die phylogenetische Analyse (TP 4/Prof. Szewzyk) ergab die Einordnung als *Cellulophaga* sp. bzw. *Zobellia uliginosa*. Es handelt sich um ein schwarmbildendes Bakterium, eng verwandt mit Myxobakterien, zu dem bisher keine Veröffentlichungen über Naturstoffe bekannt sind. Der Lyophilisat-Screening-Extrakt BOS A20 wurde über HPLC mit RP₁₈-Phase/Methanol/Wasser-Gradient fraktioniert. Die erhaltenen acht Fraktionen zeigten interessante ¹H NMR Spektren, aber keine Aktivitäten. In den Fraktionen konnten Uracil und 3-Methylthiopropylamin (Dalgaard, L. et al Phytochemistry, 1977 (16), S. 931-932) identifiziert werden.



3-Methylthiopropylamin

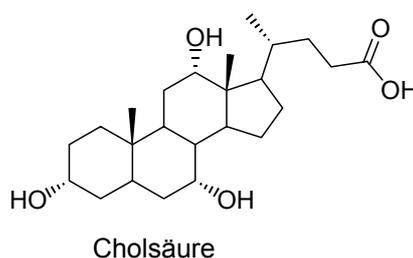
Aus dem Originalisolat (TP 4/Prof. Szewzyk) wurde nach Vorkultur der Stamm in 20 L LBmarin-Flüssigmedium bei 22°C mit Amberlite-Zusatz (2 %) 8 Tage kultiviert. Zellen und Amberlite wurden geerntet und mit Aceton und nachfolgend mit Methanol erschöpfend extrahiert. Die noch sehr salzhaltigen Extrakte wurden mittels Vacuum Liquid Chromatography fraktioniert. Ein Teil des Überstandes (Medium) wurde mit Ethylacetat extrahiert. Insgesamt 13 Fraktionen bzw. Extrakte wurden erneut einem Zytotoxizitätstests (IBWF) unterzogen. Es konnten keine signifikanten Aktivitäten in diesen Proben festgestellt werden. Die ¹H NMR spektroskopischen Untersuchungen und die LCMS Analysen der Bakterienfraktionen zeigten jedoch Hinweise auf interessante Naturstoffe. Drei VLC Fraktionen des Acetonextraktes (A4, A6 und A7) wurden erneut mittels VLC fraktioniert. Sechs Fraktionen hiervon wurden weiter teils mehrfach fraktioniert. Hierbei kamen sowohl RP-HPLC als auch Sephadex Trennungen zum Einsatz. Ein Teil der interessanten NMR Signale konnte identifiziert

werden, und der Substanz Tryptamin zugeordnet werden. 1D und 2D NMR spektroskopische Untersuchungen von einzelnen Fraktionen lieferten Hinweise auf möglicherweise zyklische, teils ungesättigte Lactame mit hoch methylierten Kohlenstoffketten. Die massenspektrometrischen Untersuchungen deuten auf einen Massenbereich von ca. 600 Da hin. Datenbanksuchen lieferten keine Ähnlichkeiten mit bekannten Naturstoffen. Aufgrund von geringer Fraktionsmenge konnte jedoch kein reiner Naturstoff isoliert werden.

Die zweite Massen-Kultivierung des *Zobellia*-Stammes erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Die in Wasser suspendierten Aceton- bzw. Methanolextrakte des der Kultur zugesetzten Amberlites wurden sukzessive mit DCM, DCM/HCl, Ethylacetat und Butanol ausgeschüttelt. Sowohl bei Oncotest als auch beim IBWF konnte zytotoxische Aktivität in der DCM-Fraktion des Acetonextraktes festgestellt werden. Nach Fraktionierung mittels VLC (Kieselgel/DCM/Aceton/MeOH) zeigten die beiden DCM/Aceton-Fractionen zytotoxische Aktivitäten. Die weitere Fraktionierung der noch sehr komplexen Fraktionen (ca. 250 und 850 mg) konnte während der Projektlaufzeit nicht mehr durchgeführt werden.

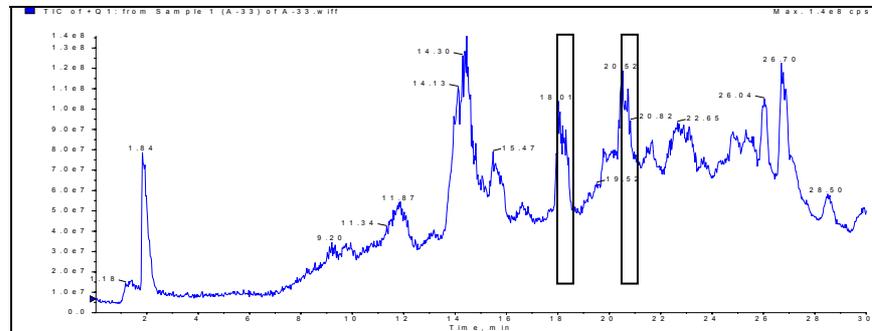
- **BOS A7**

Die biologischen Testergebnisse vom IBWF/Kaiserslautern wiesen für den Acetonextrakt BOS A7 MB (*Pseudomonas marginalis*) signifikante zytotoxische Wirkungen gegen zwei Zelllinien (HeLa S3, Jurkat) auf. Dieser Stamm wurde auf 10 L MB-Medium 3 Tage bei 22°C unter Schütteln angezogen. Pellet und Medium wurden nach Zentrifugation getrennt extrahiert. Die Biomasse wurde mit Aceton, DCM und Methanol extrahiert. Das Medium wurde erst mit Amberlite/Aceton extrahiert und anschließend mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nur im Ethylacetatextrakt des Mediums konnte Aktivität gefunden werden. Mehrere HPLC-Trennungsschritte führten zu zwei zytotoxischen Fraktionen. Die Strukturaufklärung mittels spektroskopischen Daten, insbesondere 2D NMR, ergab, dass es sich um die Gallensäuren Cholsäure und Desoxycholsäure handelt.

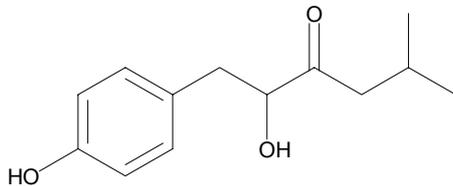


- **BOS A11**

Die Extrakte von BOS A11 (*Bacillus gibsonii*) wiesen im LCMS Screening zwei interessante Peaks auf.



Der Rohextrakt wurde auf einer RP₁₈-Säule mit einem Methanol/Wasser-Gradient chromatographisch getrennt. Hierbei konnte Hydroxysattabacin als Reinstoff isoliert werden (Lampis, G. et al. *J. Antibiotics* 1995 **48**: 967-972). Sattabacin konnte aufgrund der LCMS-Ergebnisse derepliziert werden. Beide Substanzen sind laut Literaturangaben sowohl zytotoxisch als auch antiviral wirksam.



Hydroxysattabacin

- ***Halovibrio* sp. Stamm ORS-BMM-1**

Der *pks*-Gen-positive Stamm *Halovibrio* sp. wurde im 10 L Maßstab auf MB-Medium mit Amberlite-Zusatz (2%) bei 22°C kultiviert. Unter diesen Kultivierungsbedingungen konnte eine Expression von *pks*-Genen nachgewiesen werden. Zellen und Amberlite wurden geerntet und zunächst mit Aceton und nachfolgend mit Methanol extrahiert. Aufgrund des hohen Medienanteils wurde dieser Extrakt nochmals mit DCM gegen Methanol/Wasser ausgeschüttelt. Der erhaltene Methanol/Wasser-Extrakt wurde über eine RP₁₈-Phase mittels Vacuum Liquid Chromatography in vier Fraktionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden im Agardiffusionstest auf antimikrobielle Aktivität getestet. Es wurde keine antimikrobielle Aktivität in den vier Methanol bzw. in den zwei DCM Extrakten gefunden. Die DCM Extrakte wurden nochmals mittels Normal Phase Vacuum Liquid Chromatography in vier Fraktionen aufgetrennt. ¹H NMR spektroskopische Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf interessante Naturstoffe. Die Extrakte wurden nicht weiter bearbeitet.

- **BOS A156, *Mesorhizobium* sp.**

Der Stamm BOS A156 fiel im biologischen Screening (IBWF) durch antibakterielle Wirkung gegen *Bacillus brevis* auf und zytotoxische Aktivität gegen zwei Zelllinien (HeLa S3, Jurkat) auf. Dieser Stamm wurde insgesamt viermal in einem 20 L Fermenter (IBWF) kultiviert und extrahiert (IBWF). Die Aufarbeitung des Amberlite Extraktes erfolgte über RP-Chromatographie mit Gradientenelution (ACN/Wasser) mithilfe von DAD-Detektor und Fraktionssammler. Teilweise wurden die Fraktionen über RP₁₈-Phasen weiterfraktioniert.

Es konnten zwei neue Naturstoffe und mehrere Substanzgemische charakterisiert werden. HSL 281 und HSL 295 besitzen jeweils C12-Ketten und ein Doppelbindung zwischen C5' und C6'. HSL 295 besitzt an C-3' eine weitere Carbonylfunktion (Strukturen s.u.). Mittels diverser 1D und 2D NMR Daten und ESIMS Experimenten konnte die Struktur aufgeklärt werden. Die Konfiguration der Doppelbindung konnte mittels homonuklearer Entkopplungs-NMR-Messungen eindeutig als *cis* bestimmt werden. Die Stereochemie im Lactonring konnte mittels Messung der optischen Drehung mithilfe von Vergleichssubstanzen bestimmt werden. Kohlenstoffatom C-3 besitzt (L) bzw. (S)-Konfiguration.

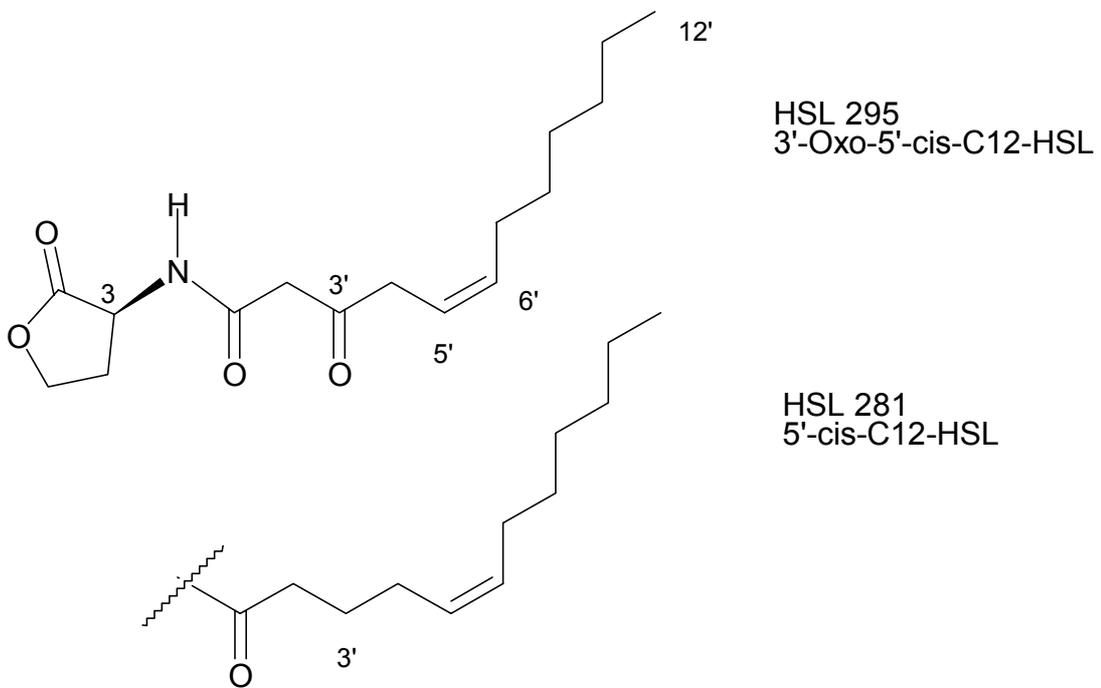
Bei den isolierten neuen Naturstoffen handelt es sich um Acylhomoserinlactone (AHL). Acylhomoserinlactone (AHL) sind bekannt für ihre Signalwirkung bei gram-negativen Bakterien. Diese Substanzen regulieren die interzelluläre Kommunikation der Bakterien. Dieser Prozess wird als Quorum Sensing bezeichnet und ist z.B. für die Biolumineszenz des marinen Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* verantwortlich (Reviews siehe: Eberl, L. *System. Appl. Microbiol.* 1999 22: 493-506; Whitehead, N.A. et al. *FEMS Microbiol Rev.* 2001 25: 365-404. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Eberl/TU Zürich konnte für beide Homoserinlactone Quorum-Sensing Aktivität nachgewiesen. HSL 295 zeigt zusätzlich schwache antibakterielle Aktivität gegenüber *Bacillus brevis* und zytotoxische Aktivität. Bei Oncotest wurde in einem Panel von 35 Zelllinien ein mittlerer IC50-Wert von 7.1 µg/mL für HSL 295 gemessen. Hierzu sind weitere Sekundäruntersuchungen im Gange. HSL 281 zeigte weder antimikrobielle noch zytotoxische Aktivitäten.

Auffallend ist die außergewöhnlich große Gesamtausbeute an Signalsubstanzen im Rohextrakt, welche bei ca. 5 mg Homoserinlactone pro Liter Kulturmedium liegt. Beide neuen Homoserinlactone konnten im mg-Maßstab isoliert werden. Strukturell ungewöhnlich ist zusätzlich die ungesättigte Seitenkette. Die bekannten HSL

variieren in der Kettenlänge und in der Substitution in Position 3'. Bis heute sind nur zwei HSL mit Doppelbindung beschrieben (Schripsema, J, de Rudder, KE, van Vliet, TB, Lankhorst, PP, de Vroom, E, Kijne, JW, van Brussel, AA *J. Bacteriol.* 1996 **178**: 366-371; Puskas, A, Greenberg, EP, Kaplan, S, Schaefer, AL *J. Bacteriol.* 1997 **179**: 7530-7537).

Bislang ist wenig über Quorum-sensing von schwamm-assoziierten Bakterien bekannt.

[paper in preparation: Sponge-associated marine bacterium *Mesorhizobium* sp. produces new N-acyl-L-homoserine lactones; Anja Krick, Stefan Kehraus, Leo Eberl, Kathrin Riedel, Heidrun Anke, Prof. Szewzyk and Co-workers and Gabriele M. König]



1.2 Naturstoffchemische Arbeiten Schwämme und marine Pilze

• *Monodictys putredinis* (mariner Pilz)

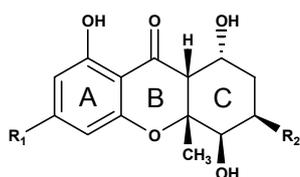
Von einer nicht identifizierten Grünalge, gesammelt auf Teneriffa/Spanien, wurde der Pilzstamm (AGKÖ187) *Monodictys putredinis* isoliert. Der Stamm wurde 4 Monate bei Raumtemperatur auf 5 L Biomalz-Agar kultiviert. Nach Homogenisierung wurden Biomasse und Agar erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde mittels VLC (Gradientenelution PE - EtOAc - Aceton - MeOH) in 11 Fraktionen unterteilt. Die erhaltenen Fraktionen wurden ¹H NMR spektroskopisch untersucht und im internen Agardiffusionsassay getestet. Die beiden größten Fraktionen 187-4 und 187-5 zeigten sehr vielversprechende NMR Spektren sowie LCMS Fingerprint Chromatogramme. Zusätzlich wiesen beide Fraktionen moderate Wachstumshemmungen gegenüber *Eurotium repens* auf. Die HPLC-Fraktionierung von 187-4 mittels RP/MeOH/H₂O Trennsystemen ergab die Isolierung von 10 Reinsubstanzen. Die Strukturaufklärung mittels 1D und 2D NMR spektroskopischen Methoden, UV, IR Spektroskopie, Bestimmung der optischen Aktivität sowie massenspektrometrischen Analysen ergab die Identifizierung fünf neuer monomerer Xanthone (1-5) und drei dimerer Strukturen (6-8). Die relative Stereochemie der Hydroxanthane (1-3) konnte mithilfe von NOE-Messungen eindeutig bestimmt werden. Die Röntgenstrukturanalyse eines Einkristalls von Verbindung 1 bestätigte die mittels NMR-Daten gefundene relative Stereochemie. Bei den dimeren Strukturen 6 und 7 handelt es sich ebenfalls um neue Naturstoffe. Zur Bestimmung der Stereochemie wurden von Verbindung 7 diverse Kristallisationsversuche unternommen. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde das p-Bromobenzoyl-Derivat synthetisiert. Mit dem per HPLC aufgereinigtem Derivat sind Kristallisationsexperimente noch in Bearbeitung.

Neben den sieben neuen xanthonartigen Strukturen wurden Ascochrome (8) und zwei ubiquitäre Furanmetabolite (9, 10) isoliert.

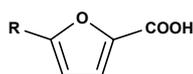
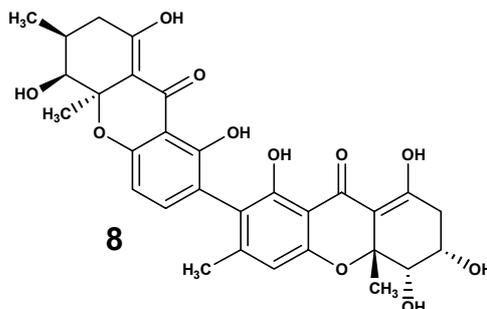
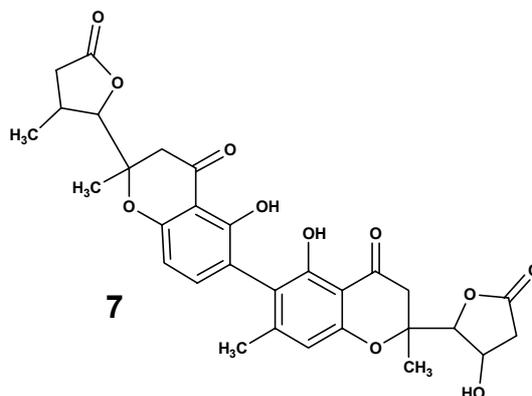
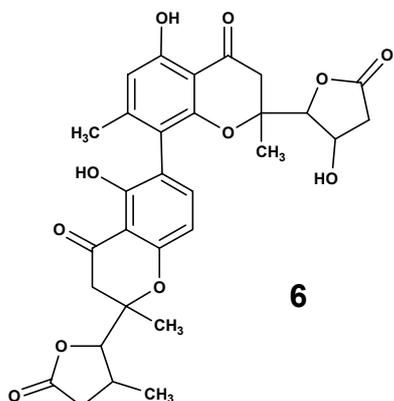
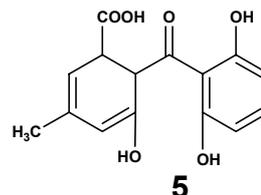
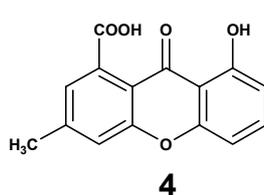
Die Überprüfung der biologischen Aktivitäten ist zum Teil noch in Arbeit. Bislang konnten moderate Aktivitäten in Krebs-chemopreventiven Bioassays (DKFZ Heidelberg) gefunden werden. Xanthon 4 besitzt mit einem IC₅₀-Wert von 7,6 µmol die beste Enzymhemmung von CYP1A1. Die im Extrakt gefundene antimikrobielle Wirkung konnte für Substanz 8, Ascochrome, bestätigt werden. Ascochrome zeigte im Agardiffusionstest deutliche Hemmungen (~ 10 mm, 5 µg) gegen *Bacillus brevis*,

Proteus vulgaris, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida albicans*, *Nematospora coryli*,
Mucor miehei und *Penicillium notatum*.

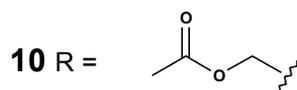
[paper in preparation: New Monomeric and Dimeric Xanthone Derivatives from the
Marine Algicolous Fungus *Monodictys putredinis*, Anja Krick, Stefan Kehraus, and
Gabriele M. König]



- 1** $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{OH}$
2 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$
3 $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$



- 9** $R = \text{H}$



- ***Poecillastra compressa* (Schwamm)**

Bei Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Francke fiel unter anderen. der Dichlormethan-Extrakt des Schwammes *Poecillastra compressa* positiv auf. Dieser zeigte in verschiedenen Zelllinien-Tests der Firma Oncotest Aktivität. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden aus *Poecillastra compressa* keine Naturstoffe isoliert (Datenbank: Marinlit).

Der Schwamm wurde uns innerhalb des Projektes für die Isolierung und Identifizierung biologisch aktiver Inhaltsstoffe überlassen. Das Trockengewicht des Schwammes betrug 45 g. Der Schwamm wurde erschöpfend mit Methanol und Dichlormethan extrahiert. Der Methanol-Extrakt wurde anschließend zwischen Methanol/Wasser (1/1) und Dichlormethan verteilt und die Dichlormethanphasen vereinigt. Eine Auftrennung des Dichlormethan-Extraktes (386 mg) in 4 Fraktionen erfolgte mittels Vacuum-Liquid-Chromatography (VLC) an Kieselgel-Material mit einem Gradienten von Dichlormethan über Aceton nach Methanol.

Der Methanol-Extrakt (1.24 g; hoher Salzanteil) wurde ebenfalls in 4 Fraktionen aufgetrennt. Hierfür wurde eine VLC an RP₁₈-Material mit einem Gradienten von Wasser nach Methanol durchgeführt. Die erhaltenen Extrakte und Fraktionen wurden zwecks Überprüfung der Aktivität zu Oncotest geschickt und ergaben zwei zytotoxische Fraktionen. Diese wurden mittels RP-HPLC weiterfraktioniert. Die entsprechenden Unterfraktionen zeigten weder signifikante cytotoxische Aktivität noch interessante ¹H NMR Spektren.

2. Molekularbiologische Untersuchung von marinen Bakterien

2.1 PCR Studien mit Schwamm-assoziierten Bakterien

Zur Amplifizierung spezifischer Biosynthese-Genfragmente wurden zunächst degenerierte Primer von konservierten Aminosäurebereichen der Ketosynthase-Domäne der Polyketid Synthasen (PKS), der Adenylierungs-Domäne der Nonribosomalen Peptid Synthetasen (NRPS) und von konservierten Bereichen der Tryptophan-Halogenasen (PrnA) abgeleitet. Nach aufwendiger Optimierung der PCR (polymerase chain reaction) konnte diese Methode zur Untersuchung unserer Bakterienstämme auf ihr genetisches Potenzial, Polyketide und nonribosomale Peptide sowie halogenierte Verbindungen zu bilden, genutzt werden.

Amplifizierte DNA-Fragmente der erwarteten Größe wurden in *E. coli* kloniert und sequenziert, um durch den Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit Datenbankeintragen die potenziellen Funktionen dieser Proteinsequenzen zu ermitteln.

2.2 PCR Studien mit Myxobakterien und marinen Bakterien

Um unser methodisches Vorgehen auf seine Eignung zur Auffindung neuer Naturstoffproduzenten zu überprüfen, wurden Myxobakterien, welche als herausragende Naturstoffbildner bekannt sind, mit dieser Methode untersucht. Aus 20 der 30 untersuchten myxobakteriellen Stämme konnten dabei *pk*s-Genfragmente amplifiziert werden. Weiterhin konnten in diesen Stämmen neun potenzielle *nrps*-Genfragmente identifiziert werden (Abb. 1).

Anzahl der
Stämme

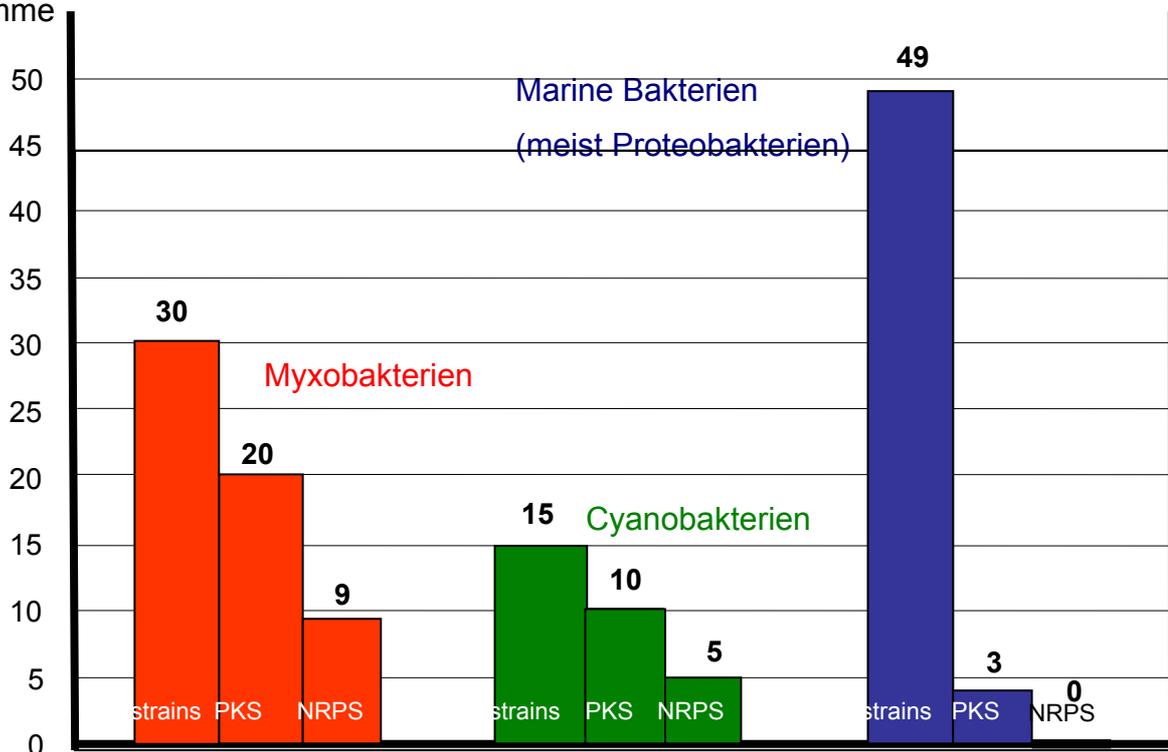


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung von *pk*s- und *nrps*-Fragmenten in Myxobakterien, Cyanobakterien und marinen Bakterien.

Unsere Experimente zeigten, dass unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen lediglich drei von 49 untersuchten marinen Bakterienstämmen identifiziert werden konnten, die das genetische Potenzial besitzen, Polyketide zu synthetisieren (Abb. 1). In den 49 marinen Bakterienstämmen konnten wir bislang keine *nrps*- und Halogenase-Genfragmente nachweisen.

Aus einigen dieser *pk*s- und *nrps*-Genfragmente wurden Sonden für Southern Blot- und Plaque-Hybridisierungen hergestellt. Mit diesen Sonden ist eine effizientere Durchmusterung bakterieller Stämme auf entsprechende Biosynthese-Gene möglich.

2.3 Phylogenetische Analyse der *pks*-Genfragmente

Es wurde eine phylogenetische Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *pks*-Genfragmenten aus den Stämmen *Halovibrio* sp. (ORS-BMM-1), *Cytophaga* sp. (PSK-BMo-1) und *Sulfitobacter delitiae* (4/5.2.1) durchgeführt (Abb. 2). Die miteinbezogenen cyanobakteriellen und myxobakteriellen Ketosynthase-Sequenzen entstammen entweder GenBank-Einträgen oder Arbeiten unserer Arbeitsgruppe.

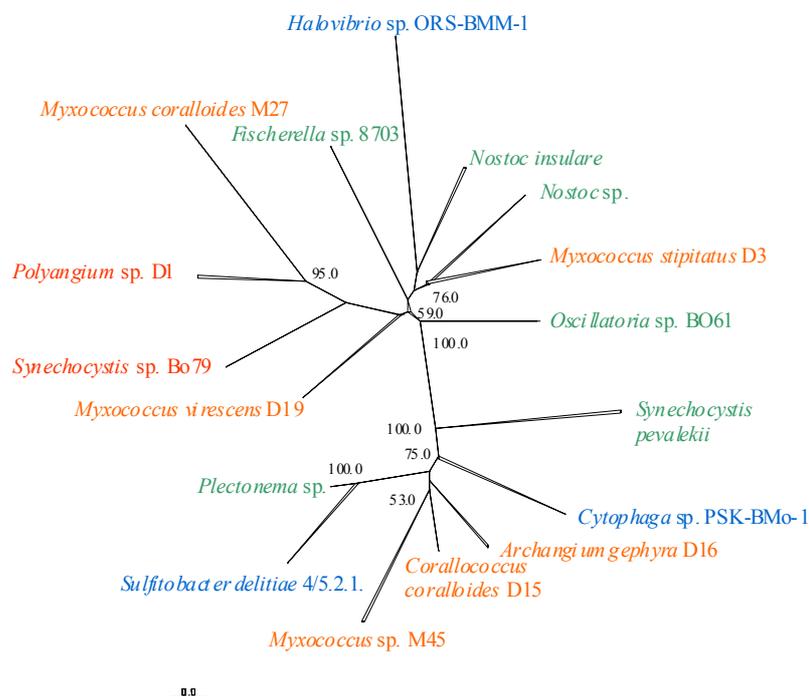


Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum erstellt aus einem Homologievergleich abgeleiteter Aminosäuresequenzen von Ketosynthase-Domänen aus myxo- und cyanobakteriellen sowie marinen bakteriellen Stämmen. Bootstrap-Werte grösser als 50 sind an den Verzweigungen angegeben und wurden aus 100 Neuberechnungen ermittelt. Der Längenstandard gibt 0.1 Substitutionen pro Aminosäure an.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Ketosynthase-Domänen nicht innerhalb bestimmter phylogenetischer Gruppen konserviert sind. Das Auftreten ähnlicher Ketosynthase-Domänen in phylogenetisch weit voneinander entfernten Bakterienstämmen kann durch Ereignisse wie lateralen Gentransfer erklärt werden.

2.4 Kultivierungsoptimierung der *pks*-positiven Bakterien zur Induktion des Sekundärmetabolismus

Die *pks*-positiven Bakterien wurden auf 14 verschiedenen Kohlenstoffquellen (Inulin, Sorbit, Glucose, Mannose, Turanose, Saccharose, Furanose, Mannit, Tagarose, Xylose, Raffinose, Maltose, Lactose, Trehalose) in Mikrotiterplatten kultiviert. Diese Minikulturen wurden nachfolgend auf ihre antimikrobielle Wirkung im Agardiffusionstest untersucht. Erste Kultivierungsversuche weisen auf eine Korrelation zwischen dem Auffinden biologischer Aktivitäten und der Verwendung einer bestimmten Kohlenstoffquelle hin. So konnte für den ORS-BMM1-Stamm (*Halovibrio* sp.) eine antimykotische Wirkung gegenüber *Microbotryum violaceum* bei Anzucht auf Sorbit festgestellt werden.

2.5 Expressionsanalyse der *pks*-Gene in den Bakterienstämmen *Halovibrio* sp. Stamm ORS-BMM-1, *Sulfitobacter delitiae* Stamm 4/5.2.1 und *Cytophaga* sp. Stamm PSK-BMo-1

Die potenziell *pks*-positiven Bakterien wurden hinsichtlich der Transkription ihrer *pks*-Biosynthesegene untersucht. Zu diesem Zweck wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Nach Kultivierung der Bakterienstämme auf MB-Medium wurde eine Total-RNA-Isolierung durchgeführt. Vor der reversen Transkription wurden die RNA-Proben zur Entfernung von DNA-Kontaminationen mit DNase I hydrolysiert. Mittels reverser Transkriptase wurden anschließend die DNA-freien mRNA-Proben mit sequenzspezifischen Primern in einzelsträngige komplementäre cDNA umgeschrieben. Um die Sensitivität dieser PCR-Reaktion zu erhöhen, wurde die cDNA einer RNase H-Behandlung unterzogen, so dass nur noch der komplementäre cDNA-Strang vorlag. Als Matritze für die PCR wurde jeweils ein Aliquot der cDNA eingesetzt. Durch einen nachfolgenden PCR-Schritt mit degenerierten *pks*-genspezifischen Primern wurde die Expression der entsprechenden *pks*-Biosynthesegene in den marinen Bakterien unter den von uns ausgewählten Kulturbedingungen überprüft. Die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Ansätze der Bakterienstämme *Cytophaga* sp. PSK-BMo-1 und *Sulfitobacter delitiae* 4/5.2.1 wiesen keine potentiellen *pks*-Genfragmente auf. Von der *Halovibrio* sp. ORS-BMM-1 cDNA konnte ein potenzielles 700 bp *pks*-Genfragment amplifiziert werden. Zur Überprüfung wurde das erhaltene *pks*-PCR-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert und anschließend sequenziert. Ein über BLAST Search durchgeführter Vergleich der

erhaltenen PCR-Fragment-Sequenz mit in GenBank veröffentlichten *pks*-DNA-Sequenzen ergab eine eindeutige Homologie. Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen wurde somit das untersuchte *pks*-Biosynthese-Gen in *Halovibrio* sp. ORS-BMM-1 exprimiert.

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen während der Kultivierung auf die Expression der *pks*-Biosynthese-Gene in den drei Bakterienstämmen *Sulfitobacter delitiae* 4/5.2.1., *Cytophaga* sp. PSK-BMo-1 und *Halovibrio* sp. ORS-BMM-1 untersucht. Hierzu wurden die marinen Bakterienstämme auf MB-Medium kultiviert und nach Waschen mit 2% NaCl in 1/5 MB-Minimalmedium suspendiert. Die Bakterien wurden anschließend in Mikrotiterplatten auf 14 verschiedenen Kohlenstoffquellen (Inulin, Sorbit, Glucose, Mannose, Turanose, Saccharose, Furanose, Mannit, Tagarose, Xylose, Raffinose, Maltose, Lactose, Trehalose) kultiviert. Im folgenden Schritt wurde eine Total-RNA Isolierung und eine DNase I-Behandlung durchgeführt. Die isolierte mRNA wurde durch Reverse Transkriptase unter Verwendung von Hexamer-Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Die hierbei synthetisierte cDNA diente in einer nachfolgenden PCR mit *pks*-genspezifischen Primern als Matrize.

Für *Sulfitobacter delitiae* 4/5.2.1 konnten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Amplifikate keine potentiellen *pks*-Genfragmente in den verschiedenen Proben nachgewiesen werden. PCRs mit *Cytophaga* sp. PSK-BMo-1 cDNA als Matrize führten hingegen zur Amplifikation von 700 bp PCR Produkten bei 11 der 14 Proben. PCRs mit *Halovibrio* sp. cDNA als Matrize führten zur Amplifikation von 700 bp PCR Produkten auf neun Kohlenstoffquellen (Inulin, Sorbit, Glucose, Mannose, Turanose, Saccharose, Furanose, Mannit, Trehalose). Auf den anderen fünf Kohlenstoffquellen (Tagarose, Xylose, Raffinose, Maltose, Lactose) konnte keine Expression der *pks*-Gene nachgewiesen werden. Es konnte durch unsere Kultivierungsversuche gezeigt werden, dass die Kohlenstoffquelle vermutlich einen Einfluss auf die Expression der untersuchten *pks*-Gene hat. Weitere Kultivierungsoptimierungen müssten angestrebt werden, um eine für die Naturstoffanalyse ausreichenden Polyketid-Biosynthese zu erzielen.

2.6 Erstellung einer Cosmid-Bank von dem Bakterienstamm *Halovibrio* sp.

Zur vollständigen Sequenzierung der *pks*-Gene aus *Halovibrio* sp. wurde das Genom dieses Bakterienstammes in Form einer Cosmid-Bank kloniert. Für die Erstellung der Cosmid-Bank mussten zunächst der Verdau der genomischen DNA sowie die Präparation und die anschließende Restriktion des SuperCos I-Vektors optimiert werden. Die Ligation erfolgte mit restringierter genomischer DNA und dem restringierten Vektor. Ein Aliquot dieses Ligationsansatzes wurde nachfolgend in Phagenköpfe verpackt, mit welchen *Escherichia coli* XL1-Blue MR Zellen infiziert wurden. Diese infizierten Bakterien wurden auf LB-Ampicillin-Medium zum Erhalt von Cosmid-Klonen vereinzelt.

Zur Durchmusterung der Cosmid-Bank wurde eine whole-cell-PCR durchgeführt, um nach *pks*-Gen-enthaltenden Cosmiden zu suchen. Bisher konnten keine solchen Cosmide identifiziert werden. Da nach Fraktionierung in dem Stamm *Halovibrio* sp. ORS-BMM-1 durch ¹H NMR spektroskopische Untersuchungen keine Hinweise auf interessante Naturstoffe erhalten werden konnten (s. 1.1), wird keine weitere Durchmusterung der Cosmidbank erfolgen.

3. Entwicklung eines Bioassays zur Identifizierung von Naturstoffen mit Antimalaria-Aktivität

3.1 Isolierung, Klonierung und Sequenzierung des plasmodialen *dhs* und *eIF-5A* Gens

Eine BLAST-Recherche in den vorläufigen Sequenzdaten des *Plasmodium falciparum* Genom-Projekts führte zur Identifizierung *dhs*- und *eIF-5A*-homologer Sequenzen. Wir haben von den 5'- und 3'-Enden des potenziellen *dhs* und *eIF-5A* Gens homologe Primerpaare abgeleitet. Unter Verwendung einer cDNA-Bank von *P. falciparum* Stamm Dd2 als Matrize konnten in einer PCR das *dhs* und das *eIF-5A* Gen amplifiziert werden. Beide Gene wurden kloniert und sequenziert. Das *dhs*-Gen besteht aus einer 1491 bp langen kontinuierlichen codierenden Sequenz mit einem AT-Gehalt von 74.3 %, während das *eIF-5A*-Gen mit einer 486 bp langen kontinuierlichen codierenden Sequenz einen Gesamt-AT-Gehalt von 67.5 % besitzt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden Gene wurden mit den entsprechenden Sequenzen vom Menschen, von *Saccharomyces cerevisiae*, von *Senecio vernalis*, von *Methanobacterium thermoautotrophicum* und im Fall des *eIF-5A* Gens auch noch mit der Sequenz von *Cryptosporidium parvum* verglichen (Abb. 3 und 4).

Homologievergleich von verschiedenen Desoxyhypusin Synthasen (Dhs)

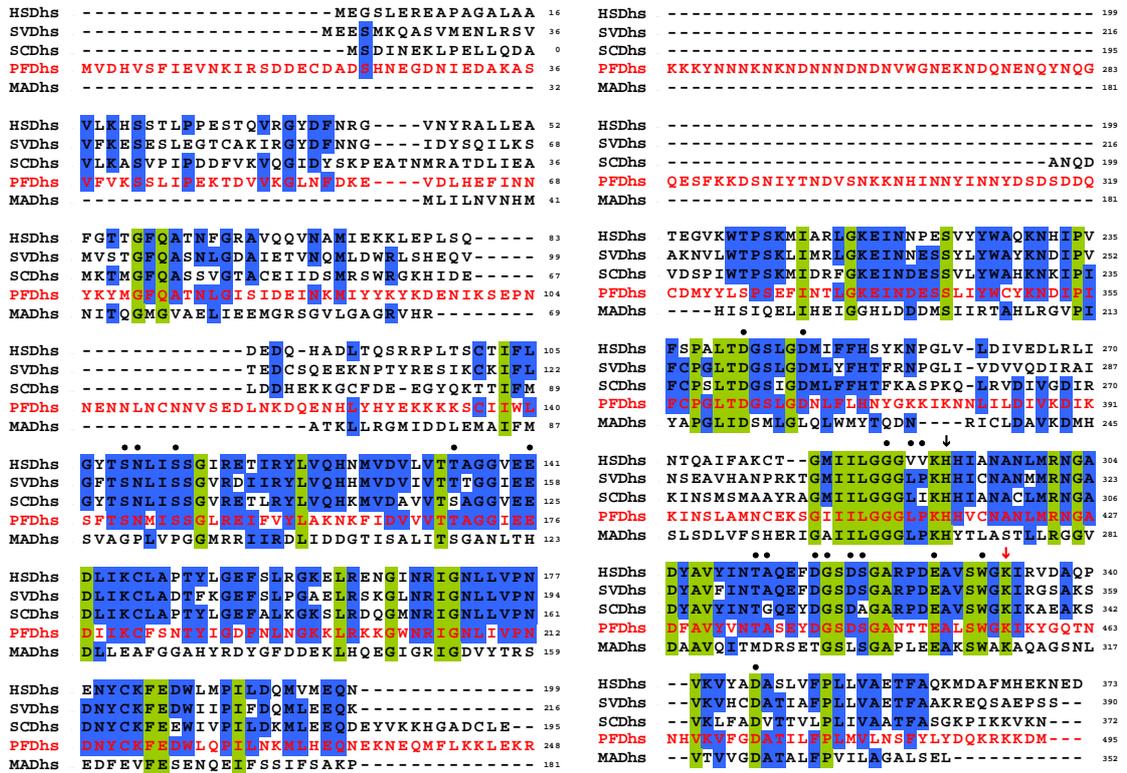


Abb. 3 : Desoxyhypusin Synthase-Homologievergleich. HSDhs, Dhs aus *Homo sapiens*; SVDhs, Dhs aus *Senecio vernalis*; SCDhs, Dhs aus *Saccharomyces cerevisiae*; PFDhs, Dhs aus *Plasmodium falciparum*; MADhs, Dhs aus *Methanothermobacter thermoautotrophicum*.

Die aminoterminalen Regionen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *dhs* Gene zeigen einen geringen Homologiegrad zueinander, während über die gesamte Länge der restlichen Sequenz mit Ausnahme von zwei Regionen in der plasmodialen Sequenz (Aminosäuren 100 – 117 und 235 – 320) und einer Region in der Hefesequenz (Aminosäuren 199 – 210) ein hoher Identitätsgrad in allen eukaryontischen Organismen vorzufinden ist. Ein spezifischer Lysin-Rest, Lys-329 in der menschlichen Desoxyhypusin Synthase, ist an der Ausbildung eines kovalenten Enzym-lmin-Intermediates, das bei der Übertragung der 4-Aminobutylgruppe vom Spermidin auf den eIF-5A gebildet wird, beteiligt. Dieser Lysin-Rest ist auch bei den in diesen Vergleich miteinbezogenen Organismen konserviert und entspricht dem Lys-457 in *P. falciparum* (Abb. 3, markiert durch ↓). Einer weiteren Aminosäure, dem His-288 in der humanen Deoxyhypusin Synthase, konnte eine Funktion in der NAD-abhängigen Dehydrogenierung von Spermidin zugesprochen werden. Auch dieser Aminosäure-Rest ist in allen fünf Organismen konserviert und entspricht dem His-416 in der plasmodialen Sequenz (Abb. 3, markiert durch ↓). Röntgenkristallographische

Untersuchungen am humanen Enzym haben gezeigt, daß mehrere Aminosäuren an der NAD- und Spermidin-Bindung beteiligt sind (markiert durch schwarze Punkte in Abb. 3). Viele dieser Aminosäuren sind in den anderen Dhs-Sequenzen konserviert. Ein einzigartiges Charakteristikum der plasmodialen Sequenz sind zwei Asparaginreiche Abschnitte (Aminosäuren 100 – 117 und 235 – 320), die in keiner weiteren Dhs-Sequenz vorhanden sind. Diese Abschnitte verleihen dem plasmodialen Enzym sicherlich einzigartige strukturelle Eigenschaften, die uns zur Auffindung von spezifischen Inhibitoren der plasmodialen Desoxyhypusin Synthase dienen sollten.

Ein Homologievergleich der *eIF-5A* kodierten Peptide zeigt signifikante Identität der Sequenzen zueinander (Abb. 4). Der zu Hypusin modifizierte Lys-Rest (Lys-50 * in HseIF-5A und PfeIF-5A in Abb. 4) ist von einem Bereich aus 12 konservierten Aminosäuren umgeben, der anscheinend aufgrund seiner fundamentalen Funktion für die Zelle während der Evolution erhalten wurde.

Homologievergleich verschiedener eIF-5A-Sequenzen

HseIF-5A	M A D D - L D F E T - G D A G A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P C K I V E M	43
SceIF-5A	M S D E E H T F E T - A D A G S S A T Y P M Q C S A L R K N G F V V I K S R P C K I V D M	44
PfeIF-5A	M S D - - H E M Y D N I D A G A S Q T Y P V Q A G A I K K N G H V M L K E H P C K V V D Y	43
SveIF-5A	M S D E E H Q F E S K A D A G A S K T Y P Q Q A G T I R K G G H I V I K N R A C K V V E V	45
CceIF-5A	M S D E D H T F E S - T D A G A S A T Y P Q Q A G E I R K G S Y L M I K G R P C K C I E V	44
MaaIF-5A	- - - - - - - - - - - - - - - M S K K V V E V K T L K V G K Y V I L D G E A S K I T N I	29
*		
HseIF-5A	S T S K T G K H G H A K V H L V G I D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K R N D	88
SceIF-5A	S T S K T G K H G H A K V H L V A I D I F T G K K L E D L S P S T H N M E V P V V K R N E	89
PfeIF-5A	S T S K T G K H G H A K A H I V G I D I F T G R K Y E D I C P T S H N M D V P V V K R T E	88
SveIF-5A	S T S K T G K H G H A K C H F V A I D I F N G K K L E D I V P S S H N C D V P H V N R T D	90
CceIF-5A	S T S K T G K H G H A K A H I V A L D I F S G K K Y E D L C P T S H N L D V P F V K R T E	89
MaaIF-5A	S T S S P G K H G S A K A R V E A V G I F D N Q K R S F V K P V D S K V D I P I I D K R T	74
HseIF-5A	F Q L I G I - Q D G Y L S L L Q D S G E V R E D L R L P E G - - - - - D L G K	121
SceIF-5A	Y Q L L D I - D D G F L S L M N M D G D T K D D V K A P E G - - - - - E L G D	122
PfeIF-5A	L Q L I D I T E D G F V S L L Y D N G D T K D D L S L P K D T E G N L - - - - - D E V A K	128
SveIF-5A	Y Q L I D I S E D G F V S L L T E N G N T K D D L K L P T D - - - - - D A L L T	125
CceIF-5A	Y L L T - - - A D G T L A R A C D G - - H K D D L N L P T V V K V G E P T D R D K K V T A	129
MaaIF-5A	A Q V I A I - M G G D V Q L M D L E T Y E T F E T P I P - - - - - - - - - - - D	102
HseIF-5A	E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M T E E A A V A I K A M A K - -	154
SceIF-5A	S L Q T A F D E G K D L M V T I I S A M G E E A A I S F K E A A R T D	157
PfeIF-5A	Q I R N L F D N G K S V L V S V L S A C G Q E K I I A A K E L S S - -	161
SveIF-5A	Q I K D G F G E G K D L V S V M S A M G E E Q I C A L K D I G P K -	159
CceIF-5A	E I L E S V E K G T T I F V I V Q A A S G E E K I I Q T K T T S G - -	162
MaaIF-5A	E L S E Q L V E G - - V E V E Y I E A L G Q R K L M R T K G - - - - -	130

Abb. 4 : eIF-5A-Homologievergleich. HseIF-5A, eIF-5A aus *Homo sapiens*; SceIF-5A, eIF-5A aus *Saccharomyces cerevisiae*; PfeIF-5A, eIF-5A aus *Plasmodium falciparum*; SveIF-5A, eIF-5A aus *Senecio vernalis*; CceIF-5A, eIF-5A aus *Cryptosporidium parvum*; MaaIF-5A, eIF-5A aus *Methanothermobacter thermoautotrophicum*.

3.2 Heterologe Expression der plasmodialen und humanen *dhs* und *eIF-5A* Gene

In dem geplanten Testsystem sollten neben der plasmodialen auch die humane Desoxyhypusin Synthase eingesetzt werden. Daher wurden parallel zu den plasmodialen Genen auch die humanen Gene heterolog exprimiert. Da die humanen Enzyme sich laut Literaturdaten in einem *Escherichia coli* Expressionssystem exprimieren lassen (Joe, Y.A. et al. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, S. 22386-223892) und sich für diverse plasmodiale Enzyme *E. coli* als ein geeignetes Expressionssystem erwiesen hat, beschlossen wir ebenfalls *E. coli* als Expressionssystem zu verwenden.

Zunächst wurden die plasmodialen und humanen Gene mit homologen Primern, die bestimmte Restriktionsschnittstellen an den 5'-Enden aufweisen, amplifiziert. Anschließend wurden die Enden der erhaltenen Amplifikate mit entsprechenden Restriktionsenzymen restringiert und in einen ebenfalls derart restringierten Vektor kloniert. Das plasmodiale sowie das humane Expressionskonstrukt HseIF-5A-pQE30 und PflIF-5A-pQE30 lieferte nach Transformation in den Wirtstamm *E. coli* M15 (pREP4) und induzierter Expression Fusionsproteine, die aminoterminal einen 6xHis-Tag aufweisen, über den eine effiziente Reinigung der Proteine über eine NiNTA-Matrix möglich ist.

Das plasmodiale *dhs* Gen wurde in den Expressionsvektor pET22 b kloniert und anschließend in *E. coli* Rosetta gami heterolog exprimiert. Ein *hDS*-pET11a-Plasmid, welches das humane *dhs*-Gen enthält, wurde uns von der Arbeitsgruppe M. H. Park et al. (NIH, USA) zur Verfügung gestellt. Das humane *dhs* Gen wurde nach Umklonierung in den Expressionsvektor pET22b ebenfalls in *E. coli* Rosetta gami heterolog exprimiert. Beide rekombinanten Enzyme besitzen einen carboxyterminalen His-Tag, der sich nicht störend auf den Reaktionsmechanismus auswirken sollte.

Eine Überprüfung der heterologen Expression der vier Gene in *E. coli* erfolgte durch SDS-PAGE. Das humane eIF-5A-Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 16.8 kDa und das plasmodiale eIF-5A-Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 17.3 kDa waren im SDS-Gel als deutliche Banden bei ca. 20 kDa erkennbar (Abb. 5).

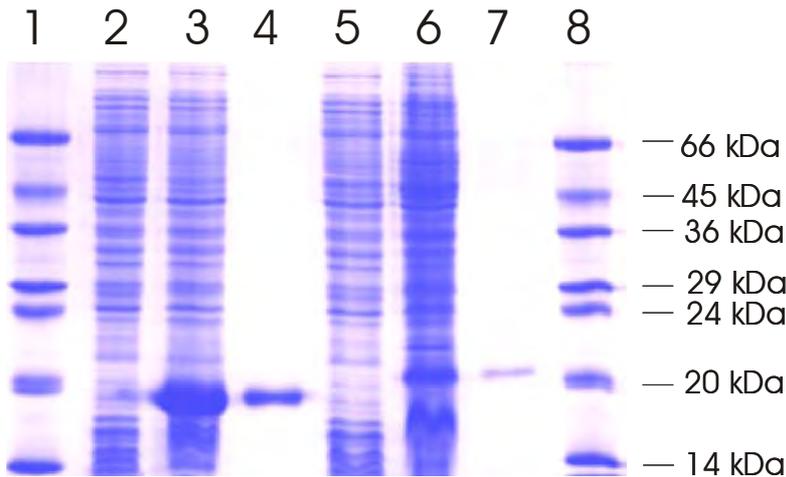


Abb. 5: Heterologe Expression des plasmodialen und humanen eIF-5A in *Escherichia coli* und Reinigung der rekombinanten Proteine. Coomassie Blau gefärbte Polyacrylamid-Gele: (1, 8) Proteinstandard; (2-4) Expression des humanen eIF-5A; (5-7) Expression des plasmodialen eIF-5A; (2,5) nicht induziertes bakterielles Lysat (15 µg pro Bahn); (3,6) bakterielles Zelllysat nach 4 h Induktion mit 1 mM IPTG (15 µg pro Bahn); (4,7) über NiNTA gereinigte eIF-5As (2 und 0.7 µg).

Die rekombinanten humanen und plasmodialen Dhs-Translationsprodukte waren als Banden bei 41 kDa und 57 kDa nachweisbar (Abb. 6A und B).

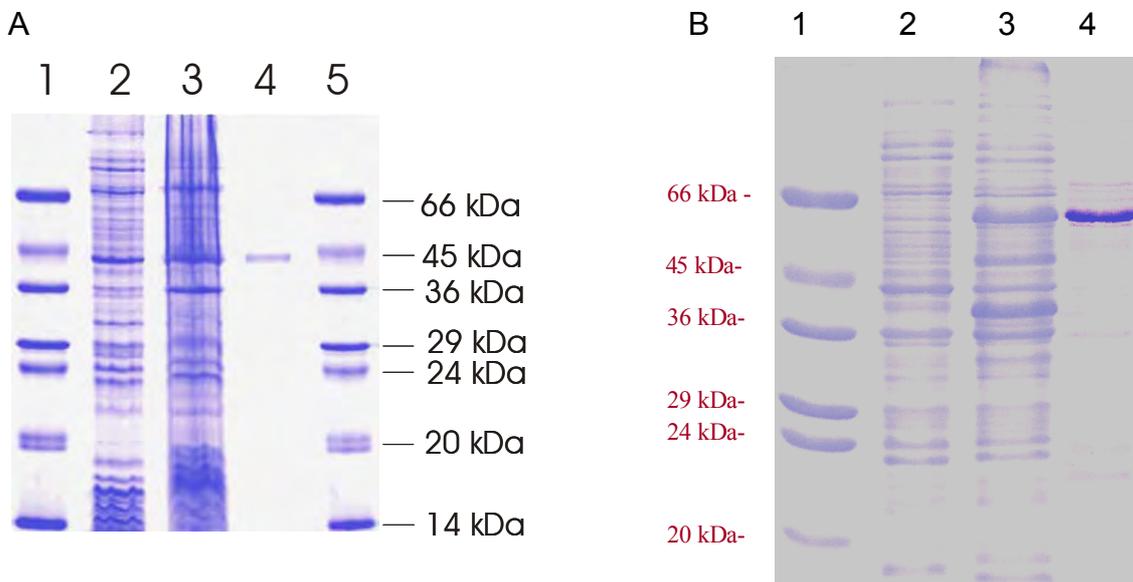


Abb. 6: Heterologe Expression der humanen und plasmodialen Desoxyhypusin Synthase in *Escherichia coli* und Reinigung der rekombinanten Proteine. Coomassie Blau gefärbte Polyacrylamid-Gele: (1, 5) Proteinstandard; (2-4) Expression der humanen und plasmodialen Desoxyhypusin Synthasen; (2) nicht induziertes bakterielles Lysat (15 µg pro Bahn); (3) bakterielles Zelllysat nach 4 h Induktion mit 1 mM IPTG (15 µg pro Bahn); (4) über NiNTA gereinigte Desoxyhypusin Synthasen (1 und ca. 5 µg).

3.3 Desoxyhypusin Synthase-Enzymtest

Die rekombinanten Desoxyhypusin Synthasen und eIF-5A-Präkursoren wurden in einen modifizierten Desoxyhypusin Synthase-Test (Sasaki et al. *FEBS Lett* 1996, 384 (2), S. 151-154). eingesetzt. Für die rekombinante humane Desoxyhypusin Synthase konnte unter Verwendung des humanen eIF-5A-Vorläuferproteins eine spezifische Aktivität von 29000 u/mg und unter Verwendung des plasmodialen eIF-5A-Vorläuferproteins eine spezifische Aktivität von 11000 u/mg bestimmt werden (1 u entspricht der Menge Enzym, welche die Bildung von 1 pmol Desoxyhypusin in 2 h katalysiert).

Die spezifische Aktivität der rekombinanten Desoxyhypusin Synthase aus *P. falciparum* betrug unter Verwendung des humanen eIF-5A als Substrat 3400 u/mg und bei Einsatz von plasmodialem eIF-5A als Substrat wurde eine spezifische Aktivität von 5600 u/mg gemessen.

Unsere Arbeiten haben somit zur Isolierung und Charakterisierung des plasmodialen *dhs* und *eIF-5A* Gens sowie ihrer Expression in *E. coli* geführt. Weiterhin haben wir einen Desoxyhypusin Synthase Enzymtest etabliert, mit welchem wir die Aktivitäten der rekombinanten plasmodialen und humanen Desoxyhypusin Synthase unter Verwendung ihrer rekombinanten Proteinsubstrate, plasmodialem und humanem eIF-5A, bestimmt haben. Die Schwierigkeiten bei der Expression der plasmodialen Desoxyhypusin Synthase lassen sich auf den hohen AT-Gehalt des *dhs* Gens zurückführen. Dieser Umstand kann zu Fehlern bei dem Aminosäure-Einbau während der Expression in *E. coli* führen, wodurch sich die geringere Aktivität der plasmodialen Desoxyhypusin Synthase im Vergleich zum humanen Enzym erklären lässt. Die gemessene geringe Aktivität der plasmodialen Desoxyhypusin Synthase mit dem eigenen eIF-5A kann ebenfalls mit dem Einbau falscher Aminosäuren in den plasmodialen eIF-5A erklärt werden. Einige der in *P. falciparum* häufig benutzten Codons sind in *E. coli* unterrepräsentiert und werden zudem von nicht vollständig komplementären tRNAs erkannt, was zu Fehlern bei der Translation führt.

Eine Optimierung der Testparameter, eine Untersuchung enzymkinetischer Eigenschaften sowie der Einsatz synthetischer Desoxyhypusin Synthase Inhibitoren in das Testsystem sind noch ausstehende Arbeiten, die aber in der Projektlaufzeit nicht mehr erfolgen konnten.

3.4 Expressionsratenbestimmung des *dhs* und *eIF-5A* Gens während der erythrocytären Schizogenie in *Plasmodium falciparum*

Der komplexe intraerythrocytäre Lebenszyklus von *P. falciparum* beginnt mit der Invasion von Erythrocyten durch Merozoiten, die gerade Hepatocyten verlassen haben. Der Parasit entwickelt sich im Erythrocyten vom Ring-Stadium zum Trophozoitenstadium. Ungefähr 32 - 36 Stunden nach Infektion des Erythrocyten entwickelt sich der vielkernige Schizont und nach ungefähr 48 Stunden bricht der Erythrocyt auf und entlässt Merozoiten, mit welchen der Zyklus neu beginnt. Quantitative Real-time PCR wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob das *dhs* oder *eIF-5A* Gen stadienspezifisch induziert oder konstitutiv exprimiert werden. Hierzu mussten Primer- und Sondenkonzentrationen so angepasst werden, dass der niedrigst mögliche „treshhold“ Zyklus (C_t) und der höchste reduzierte normalisierte Fluoreszenz-Wert (ΔR_n) erzielt wurden. cDNA aus gemischtem erythrocytären Stadium im Mengenbereich von 1 - 1000 ng wurde zur Erstellung von Standardkurven benutzt. Diese Standardkurven wurden berechnet aus den C_t -Werten aufgetragen gegen den Logarithmus an eingesetzter Menge gemischter erythrocytärer cDNA (ng). Unter Verwendung dieser Standardkurven wurde die relative Transkripthäufigkeit von *eIF-5A* und *dhs* Transkripten in den stadienspezifischen Proben bestimmt und in ng cDNA angegeben.

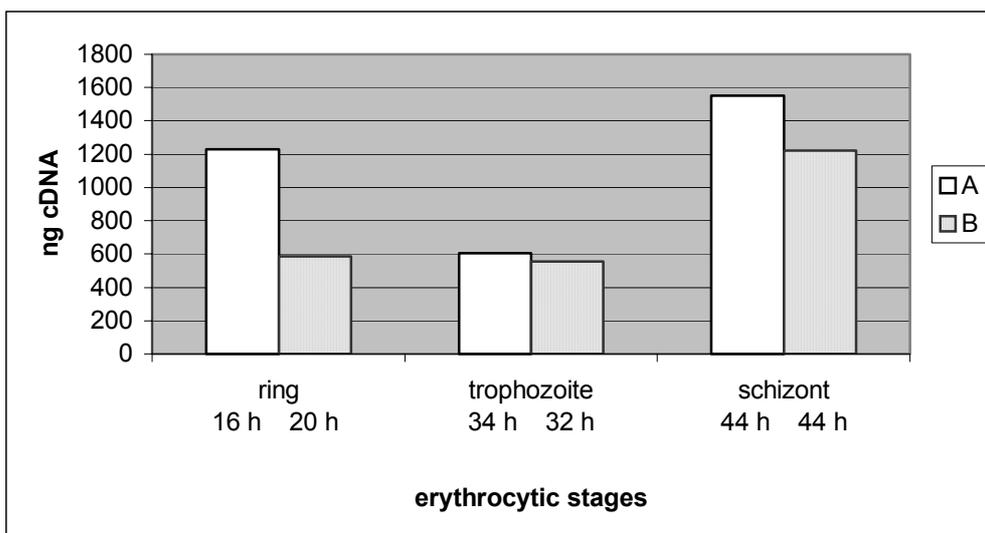


Abb. 7: Stadienspezifische Expression des *eIF-5* Gens in zwei synchronisierten Kulturen A und B von *P. falciparum* während des erythrocytären Lebenszyklus. Die Zeitpunkte (in Stunden nach Infektion der Erythrocyten), an welchen die Zellen geerntet wurden, sind an der x-Achse angegeben.

Hierzu wurden die C_t -Werte für Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium bestimmt, indem 50 ng cDNA von jedem Stadium als Matrize in die Real-time PCR eingesetzt wurden. Mit den resultierenden C_t -Werten konnten die entsprechend korrespondierenden Konzentrationen an gemischter erythrocytärer cDNA in ng aus den Standardkurven interpoliert werden. Obwohl für das *eIF-5A* Gen eine verminderte Transkript-Häufigkeit im Trophozoitenstadium festgestellt werden konnte, wurde keine wirklich signifikante Zu- oder Abnahme der *eIF-5A* Transkripte in Form einer mehrfachen Induktion der *eIF-5A* Expression in einem der erythrocytären Stadien festgestellt (Abb. 7). Auch für das *dhs* Gen konnte keine stadienspezifisch induzierte Expression festgestellt werden. Bemerkenswert ist allerdings die auffallend niedrige Transkripthäufigkeit des *dhs* Gens im Vergleich zum *eIF-5A* Gen.

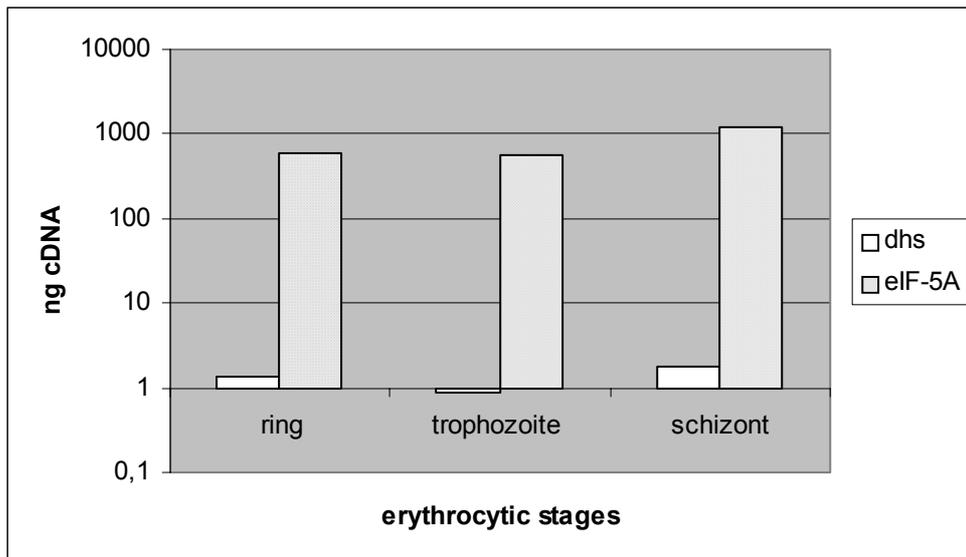


Abb. 8: Stadienspezifische Expression des *dhs* Gens im Vergleich zur *eIF-5A* Expression in Ring-, Trophozoiten- und Schizontenstadium.

Bei Einsatz der gleichen Matrizen-Konzentration wurde für das *eIF-5A*-Amplikon ein C_t -Wert von 16-18 gemessen werden, während für das *dhs*-Amplikon ein C_t -Wert von 25-27 bestimmt wurde. *dhs*-Transkripte waren somit 400 - 700-fach je nach untersuchtem erythrocytären Stadium weniger häufig als *eIF-5A*-Transkripte (Abb. 8). Bei beiden Genen handelt es sich somit eher um konstitutiv exprimierte Gene mit einem hohen Expressionsgrad bei dem *eIF-5A* Gen und einem niedrigen Expressionsgrad bei dem *dhs* Gen. Unter der Annahme, dass die Transkriptmenge mit der Menge an translatiertem Protein korrespondiert, sollten potenzielle Desoxyhypusin Synthase Inhibitoren somit in jedem erythrocytären Stadium wirksam

die posttranslationale Modifikation des eIF-5A und damit die Zellproliferation inhibieren.

4 Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse für weiterführende Projekte im Bereich der marinen Forschung, insbesondere im Hinblick auf neue mikrobielle Naturstoffe, Etablierung eines Anti-Malaria-Wirkstoff-Assays und die Bakterienkommunikation von Schwamm-assoziierten Bakterien. Der größte Teil des erzielten Ergebnisses konnte bereits in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht werden. Ein Teil der Veröffentlichungen steht noch aus.

5 Veröffentlichungen

Teilergebnisse führten bislang zur Veröffentlichung von zwei Zeitschriftentbeiträgen. Drei weitere Veröffentlichungen sind in Bearbeitung. Außerdem wurden Ergebnisse in Form von Posterpräsentationen auf verschiedensten wissenschaftlichen Tagungen bzw. Konferenzen vorgestellt. Neun Posterpräsentationen sind in der unten angegebenen Tabelle aufgelistet.

	Autoren	Titel der Publikation	Zeitschrift/Buch [Erscheinungsdatum]
1	Molitor I.M., Knöbel S., Dang C., Spielmann T., Alléra A., König G.M.	Translation initiation factor dIF-5A from <i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Molecular and Biochemical Parasitology</i> 137, 65–74 (2004)
2	Gross H., Reitner J., König G.M.	Isolation and structure elucidation of Azoricasterol, a new sterol of the deep sea sponge <i>Macandrewia azorica</i>	<i>Naturwissenschaften</i> 91:441-446 (2004)
3	Krick A., Kehraus S., König G.M.	New Monomeric and Dimeric Xanthone Derivatives from the Marine Algicolous Fungus <i>Monodictys putredinis</i>	paper in preparation
4	Krick A., Kehraus S., Eberl L., Riedel K., Anke H., Szewzyk U., König G M.	Sponge-associated marine bacterium <i>Mesorhizobium</i> sp. produces new N-acyl-L-homoserine lactones	paper in preparation
5	Molitor I.M., Knöbel, S., Dang C., Spielman T., Rieck B., Daufeldt S., König G. M.	Deoxyhypusine synthase from <i>Plasmodium falciparum</i>	paper in preparation

- | | | | |
|----|---|--|---|
| 6 | Molitor I., Rieck B., König G.M. | Deoxyhypusine Synthase - A Potential New Drug Target in <i>Plasmodium falciparum</i> | POSTER - Dechem - Biotechnology – Tagung, Berlin 2002 |
| 7 | Akkermann D., Noeske A., Pukall R., Müller R., König G.M., Molitor I.M. | An efficient PCR based screening approach for the assessment of secondary metabolite producing marine bacteria | POSTER Annual Meeting of VAAM, Göttingen, 24-27 March 2002, |
| 8 | Noeske A., Akkermann D., Pukall R., Müller R., König G.M., Molitor I.M. | Identification of homologous regions in marine bacteria using specific halogenase, polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene probes | POSTER Natural products from marine microorganisms - International Conference, Greifswald, Germany, 19-22 June 2002 |
| 9 | Noeske A., Müller D., König G.M., Molitor I.M. | Distribution of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in bacterial strains from different phylogenetic groups | POSTER Annual Meeting of VAAM, Berlin, 23-26 March 2003 |
| 10 | Noeske A., Müller D., König G.M., Molitor I.M. | Occurrence of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in bacteria | POSTER Jahrestagung der DPhG, Würzburg, 8-12 October 2003 |
| 11 | Molitor I.M., Noeske A., Müller D., König G.M. | Investigation of the genetic potential for secondary metabolite production in myxobacterial, cyanobacterial and marine proteobacterial strains | POSTER 104 th General Meeting of the American Society for Microbiology (ASM), New Orleans, USA, 23-27 May 2004 |
| 12 | Molitor I.M., Noeske A., Müller D., König G.M. | Genetic potential for secondary metabolite production in myxobacterial, cyanobacterial and marine proteobacterial strains | POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt |
| 13 | Krick A., Kehraus S., König G.M. | New Monomeric and Dimeric Xanthon Metabolites from the Marine Algicolous Fungus <i>Alternaria</i> sp. | POSTER 3. Statusseminar 'Marine Naturstoffforschung' 2004, Frankfurt |
| 14 | König G.M., Kehraus S., Krick A. | New Monomeric and Dimeric Xanthon Metabolites from the Marine Algicolous Fungus <i>Alternaria</i> sp. | POSTER 2004-International Congress on Natural Products Research, Phoenix, Arizona USA, August 2004 |

III Erfolgskontrollbericht

1 Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Das Projekt BOSMAN II ist Bestandteil des Forschungsschwerpunkts "Marine Naturstoffforschung" im Rahmen der Programme Meeresforschung und Polarforschung des BMBF. Die durchgeführten Untersuchungen und Arbeiten des Teilprojekts 3 geben einen Überblick über das pharmazeutische Potential mariner Mikroorganismen, welche von borealen Schwämmen, die bisher weitgehend unerforscht sind, isoliert wurden. Es konnten einige biologisch aktive Naturstoffe isoliert und charakterisiert werden.

2 Wissenschaftlich-technisches Ergebnis, erreichte Nebenergebnisse, Erfahrungen

Die erzielten Ergebnisse sind ausführlich im Schlussbericht zusammengefasst. Besonders die isolierten Homoserinlactone weisen interessante Aspekte auf. Bislang ist wenig über die Kommunikation von schwamm-assoziierten Bakterien bekannt.

3 Fortschreibung des Verwertungsplans

Die erzielten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse für weiterführende Projekte im Bereich mariner Naturstoffforschung insbesondere der marinen Bakterien aus extremen Habitaten. Eine konkrete industrielle Umsetzung der Ergebnisse wurde nicht erzielt.

4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Trotz mehrfacher Anzuchten konnte aus dem *Zobellia*-Stamm kein Naturstoff isoliert werden. Die Arbeiten am *Halovibrio*-Stamm und an dem Schwamm *Poecilestra* wurden eingestellt, da bei der Aktivitäts-geführten Fraktionierung keine Aktivitäten mehr festgestellt werden konnten.

5 Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Die Kostenplanung wurde eingehalten. Der Zeitplan wurde im Wesentlichen auch eingehalten. Teilweise sind Isolierungsarbeiten und einzelne Test bzw. Analysen für die Reinsubstanzen noch in Bearbeitung, so dass deren Ergebnisse nicht mehr in diesen Bericht einfließen konnten.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht
3a. Titel des Berichts Pharmazeutisches Potential mikrobieller mariner Naturstoffe	
3b. Titel der Publikation	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) König, Gabriele Maria; Molitor, Ilka; Krick, Anja	5. Abschlussdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Pharmazeutische Biologie Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Nussallee 6 53115 Bonn	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen ^{*)} 03F0358D
	11a. Seitenzahl Bericht 41
	11b. Seitenzahl Publikation
	12. Literaturangaben 50
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	14. Tabellen 1
	15. Abbildungen 14
16. Zusätzliche Angaben	Folgebericht zu BOSMAN I
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung <p>Marine Sekundärmetabolite sind als pharmakologische Wirkstoffe von grossem Interesse. Das Ziel dieses Teilprojektes war die Erfassung des Biosynthesepotenzials mariner, Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen. Zu diesem Zweck wurden die von Projektpartnern zur Verfügung gestellten Mikroben durch chemisches, biologisches und molekularbiologisches Screening untersucht. Für die molekularbiologische Untersuchung wurde ein PCR-basiertes Verfahren zum Nachweis von PKS- und NRPS-Genfragmenten, sowie der Expression entsprechender Biosynthesegene, etabliert.</p> <p>Die naturstoffchemischen Arbeiten führten zur Isolierung von neuen Homoserinlaktonen mit Quorum sensing Aktivität und zytotoxischer Wirkung aus dem Bakterium <i>Mesorhizobium</i> sp.. Aus dem endophytischen Pilz <i>Monodictys putredinis</i> wurden strukturell neue, teils dimere, Xanthonderivate erhalten.</p> <p>Malariainfektionen können möglicherweise durch die Hemmung der plasmodialen Desoxyhypusin-Synthase therapiert werden. Um Hemmstoffe für dieses Enzym zu finden wurde das entsprechende plasmodiale Gen kloniert, heterolog exprimiert und ein Enzymassay etabliert.</p>	
19. Schlagwörter Marine Naturstoffforschung; biologische Aktivitäten; Strukturanalytik	
20. Verlag	21. Preis

^{*)} Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Abschlussbericht

Teilprojekt 4: Mikrobiologie von Porifera aus Kaltwasser-Riffsystemen

I. Kurze Darstellung

I. 1. Aufgabenstellung

Die Aufgaben dieses Teilprojekts bestanden vorrangig in der Kultivierung, Isolierung, Charakterisierung und Bereitstellung von Bakterienisolaten aus borealen Schwämmen für die Kooperationspartner. Die Bakterienstämme wurden in eine Stammsammlung überführt und standen somit über das laufende Projekt zur Verfügung. Zusätzlich sollte für ausgewählte Schwammarten die bakterielle Diversität mit kultivierungsunabhängigen Methoden bestimmt werden.

I. 2. Voraussetzungen

In der Arbeitsgruppe bestanden langjährige Erfahrungen in der Isolierung von Umweltbakterien. Insbesondere lagen Kenntnisse zur Anreicherung und Isolierung von Bakterien unter limitierenden Bedingungen vor, sowie zur Handhabung und Kultivierung anaerober Arten. Erfahrungen mit verschiedenen kontinuierlichen Reaktoren lagen vor.

Im Rahmen eines DFG-Projekts wurde die mikrobielle Besiedlung des Mittelmeerschwamms *Chondrosia reniformis* untersucht. Hierbei kamen vor allem Kultivierungsansätze zum Einsatz, so dass schon Erfahrungen zur Aufarbeitung von Schwammgewebe bezüglich der Extraktion von Bakterien vorlagen.

I. 3. Planung und Verlauf

Innerhalb des Projektes wurden die in der Arbeitsgruppe etablierten Methoden für das zu bearbeitende Thema der Untersuchung von Bakterien aus Kaltwasserschwämmen adaptiert, wie die Kultivierung psychrophiler Arten und der Aufbau von kontinuierlichen Durchflussreaktoren im Kühlraum. Dabei musste das erhöhte Risiko der Kontamination durch Kondenswasserbildung im Kühlraum und die evtl. auftretende folgende Verpilzung verhindert werden. Ebenfalls musste ein Langzeitbetrieb der Anlagen aufgrund des langsamen Wachstums der Bakterien in der Kälte durchgeführt werden.

Aufgrund des großen Zeitaufwands für die Kultivierung, Isolierung und Aufnahme der Bakterien in die Stammsammlung, sowie zur Bereitstellung für die Kooperationspartner wurde auf die in situ Hybridisierung verzichtet. Aus der umfangreichen Stammsammlung resultieren auch Bakterien, die aufgrund ihrer phylogenetischen Stellung für eine Isolatbeschreibung geeignet sind.

I. 4. Stand an den angeknüpft wurde

Es bestanden Erfahrungen aus Vorarbeiten zur Untersuchung mariner Schwämme aus dem Mittelmeer, auf die aufgebaut werden konnten. Als Referenzliteratur wurden die verfügbaren Publikationen zu tropischen und mediterranen Invertebraten herangezogen. Für boreale Arten gab es zu Beginn des Vorhabens wenig verfügbare Literatur und Daten.

I. 5. Zusammenarbeit

In enger Kooperation mit dem Projektpartner AG von Döhren wurde mittels MALDI-TOF-MS die Produktion von bakteriellen Naturstoffen überprüft. Außerdem konnte aufbauend auf die Stammsammlung eine Datenbank für MALDI-Spektren erstellt werden, mit deren Hilfe die taxonomische Einordnung der Isolate erfolgen konnte.

Für die chemisch arbeitenden Partner wurden entweder Reinkulturen oder Kulturüberstände bereitgestellt und versandt. Novozymes übernahm ca. 400 Stämme in ihre eigene firmeninterne Stammsammlung, die in zukünftigen Screenings mitbearbeitet werden. Bei der phylogenetischen Einordnung der Stammkulturen sowie bei den Arbeiten zu den Isolatbeschreibungen gab es eine enge Zusammenarbeit mit Novozymes und der AG Michaelis. Bei der Bearbeitung der Schwämme wurde die taxonomische Einordnung durch die AG Reitner zugrunde gelegt.

Aufgrund der vorliegenden phylogenetischen Daten und MALDI-TOF-MS Analysen wurden 230 Stämme ausgewählt für eine weitergehende Untersuchung hinsichtlich der Bildung biologisch aktiver Substanzen. Dazu wurden diese Stämme an das IBWF Kaiserslautern verschickt.

II. 1. Eingehende Darstellung des erzielten Ergebnisses

Die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgten an marinen Schwämmen aus 3 verschiedenen Kaltwassergebieten:

1. Sula-Rücken (Norwegisches Küstengewässer), 1999
2. Korsfjord (bei Bergen, Norwegen), 2001
3. Arktis (Nähe Grönland), 2002

Bakterien aus verschiedenen Schwämmen wurden dabei mit unterschiedlichen Medien und Anreicherungsmethoden kultiviert und isoliert. Eine Auswahl der Stämme erfolgte anhand morphologischer Aspekte wie Koloniemorphologie und mikroskopischer Analysen sowie ihrer Wachstumsgeschwindigkeit. Damit konnte ein breites Spektrum an verschiedenen Bakterien erfasst werden. Zur schnellen Übersicht über die Diversität der Stämme wurde ein Grossteil mit MALDI-TOF-MS gruppiert und die Gruppenvertreter der 16S rDNA Sequenzierung unterworfen. Anschließend erfolgte die taxonomische Zuordnung der Bakterien durch Vergleich mit Sequenzen der Genbank.

1. Probenahme Sula-Rücken

Die Probenahme in diesem Gebiet erfolgte in Wassertiefen von 300-400m mit Hilfe eines Tauchbootes. Diese Probenahme stellte eine sehr schonende Entnahme der Proben dar, da die Schwämme einzeln mit Hilfe eines Greifers abgeerntet werden konnten. Aus der Vielzahl der gesammelten Schwämme wurden für unsere mikrobiologischen Untersuchungen 11 Schwämme verwendet: *Isops phlegraei*, *Haliclona* sp. 1, *Hemigellius pumiceus*, *Mycale lingua*, *Oceanapia robusta*, *Pachastrella* sp., *Petrosia crassa*, *Phakellia ventilabrum*, *Plakortis* sp., *Polymastia sol*, *Thenea muricata*, sowie einige weitere marine Proben (Sediment, Koralle *Madripora oculata*, Außenschicht bzw. Aufwuchs auf *Geodia macandrewii* und *Polymastia sol*, Umgebungswasser).

1.1 Batch-Kulturen

Zur Analyse der Schwamm-assoziierten Bakterien wurden die Probenhomogenisate auf Agarplatten mit verschiedenen Medien kultiviert. Dabei wurde vorrangig das Vollmedium MBA (Difco) zur Isolierung schnell wachsender Bakterien verwendet, um möglichst schnell Isolate an die Projektpartner weitergeben zu können. Daneben wurde aber auch auf CSA (Casein-Stärke-Agar), CDC 1494, BMo (Basal Medium of Baumann and Baumann) sowie auf BMo mit Methanol kultiviert. Die Subkultivierung bis zur Reinkultur wurde auf MBA durchgeführt.

Diese aeroben Anreicherungen resultierten in 593 Bakterienisolaten aus Schwämmen und 96 Isolaten aus anderen marinen Proben. Die phylogenetische Charakterisierung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Teilprojekt 5. Dazu wurden alle Isolate mit Hilfe der MALDI-TOF-MS-Analyse untersucht und anschließend gruppiert. Vertreter dieser Gruppen wurden dann innerhalb unseres Projektes auf Grundlage der 16S rDNA-Sequenzierung phylogenetisch eingeordnet. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Isolate und die taxonomische Diversität aus den verschiedenen Schwämmen und marinen Proben.

Das Taxonomiespektrum aller Isolate umfasst 5 phylogenetische Klassen und 26 Gattungen. Gammaproteobacteria treten am häufigsten auf und mit der größten Anzahl von Gattungen, gefolgt von Alphaproteobacteria, Bacilli, Actinobacteria und Sphingobacteria. Vergleicht man die Diversität innerhalb der Klasse der Gammaproteobacteria, so zeigte sich, dass bei den meisten Schwämmen ein Schwerpunkt bei *Pseudoalteromonas* und *Pseudomonas* liegt. Andere mengenmäßig häufig isolierte Gattungen dieser Klasse treten selektiver auf, z.B. *Vibrio* bei *Isops phlegraei* und *Alteromonas* bei *Haliclona*. Bei der Klasse der Alphaproteobacteria wurden *Erythrobacter* am häufigsten isoliert, sie sind jedoch nicht so universell bei allen Schwämmen vertreten (in 6 von 11 Schwämmen).

Tab. 1: Isolatübersicht und taxonomische Diversität der Bakterien aus verschiedenen Schwämmen und marinen Proben (Probenahmestelle Sula-Rücken)

Schwämme		Anzahl Schwamm-assozi. Bakterien	<i>Isops phlegraei</i>	<i>Haliclona sp.1</i>	<i>Hemigellius pumiceus</i>	<i>Mycale lingua</i>	<i>Oceanapia robusta</i>	<i>Pachastrella sp.</i>	<i>Petrosia crassa</i>	<i>Phakellia ventila-brum</i>	<i>Plakortis sp.</i>	<i>Polymastia sol</i>	<i>Thenea muricata</i>	versch. marine Proben
Nächste Verwandte der Isolate	Klasse													
Gammaproteobacteria: 470		34	1	33										1
	<i>Acinetobacter</i>	2										2		
	<i>Alcanivorax</i>	4		1						3				1
	<i>Alteromonas</i>	16	2	11			1		2					1
	<i>Halovibrio</i>													1
	<i>Halomonas</i>													7
	<i>Marinobacter</i>	22	1	4		6			2	5	4			
	<i>Pseudoalteromonas</i>	291	72	84			3		1	101	24	4	2	36
	<i>Pseudomonas</i>	76		16	5	2	6	1		6	34	6		9
	<i>Psychrobacter</i>													3
	<i>Shewanella</i>	4								1			3	1
	<i>Stenotrophomonas</i>													3
	<i>Vibrio</i>	21	8					3		2		4	4	3
Alphaproteobacteria: 96		2										2		1
	<i>Erythrobacter</i>	46		19	3		4	1				15	4	10
	<i>Paracoccus</i>	13								13				
	<i>Rhodococcus</i>													1
	<i>Rhodobacter</i>	7								7				2
	<i>Roseobacter</i>	6		3						1		1	1	3
	<i>Sphingomonas</i>	3		2			1							
	<i>Sulfitobacter</i>	19	2	2						14		1		
Bacilli 15														
	<i>Bacillus</i>	9				3					6			
	<i>Marinococcus</i>	6		6										
Sphingobacteria: 3														
	<i>Cytophaga</i>	3		2								1		1
Actinobacteria: 9														
	<i>Agrococcus</i>	1				1								3
	<i>Arthrobacter</i>	3	2							1				
	<i>Dietzia</i>													9
	<i>Kokuria</i>	5				5								
Anzahl Bakterien aus Schwämmen		593	88	183	8	17	15	5	5	154	68	36	14	
Anzahl der Isolate		689												96

Weniger häufig traten *Sulfitobacter* und *Paracoccus* auf, wobei die letzte Gattung nur bei *Phakellia ventilabrum* nachzuweisen war. Die verschiedenen Gattungen der Bacilli, Sphingobacteria und Actinobacteria konnten jeweils nur aus 1-2 Schwämmen isoliert werden. Bei den verschiedenen marinen Proben zeigte sich insgesamt eine ähnliche Mengenverteilung der Klassen.

Vergleicht man, auf welchen Medien die Mikroorganismen isoliert wurden, so ergab sich ein präferentielles Wachstum einzelner Bakteriengattungen auf bestimmten Medien. Das Vollmedium MBA war geeignet, das Wachstum von vielen Bakteriengattungen zu unterstützen, die jedoch häufig zu den schnellwachsenden Gattungen gehören und reichhaltige Medien bevorzugen. Dazu zählen vor allem die Pseudoalteromonaden der Klasse der Gammaproteobacteria. Das Selektivmedium CSA begünstigte die Anreicherung von Alphaproteobacteria, insbesondere die Vertreter der Gattung *Erythrobacter*. Die Kultivierung auf BMo-Medium mit Methanol unterstützte ebenfalls vermehrt das Wachstum von Alphaproteobacteria, dabei meist *Paracoccus* und *Sulfitobacter*.

Basierend auf den Erfahrungen mit diesen Medien wurden für die mikrobiologischen Untersuchungen des marinen Materials aus den weiteren Beprobungsgebieten sowohl zusätzliche Medien mit anderen Schwerpunkten eingesetzt als auch weiterführende Kultivierungsansätze entwickelt.

1.2 Versuche zur Beeinflussung der Sekundärmetabolitproduktion bei Bakterien mittels Gradientenplatten

An ausgewählten Isolaten wurden Versuche zur Beeinflussung der Sekundärmetabolitproduktion durchgeführt. Dazu wurde ein gelstabilisiertes Gradientensystem mit unterschiedlichen pH-Werten und NaCl-Konzentrationen etabliert. Die Bakterien wurden auf diesen Gradientenplatten angezogen und anschließend in Kooperation mit TP 5 mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Analyse untersucht. Diese Methode stellt ein schnelles und zuverlässiges System zur gleichzeitigen Variation zweier Faktoren gegeneinander dar, um die Reaktion bzw. Anpassung der Bakterien an die jeweiligen Bedingungen zu untersuchen. An den getesteten Bakterien konnten jedoch keine Unterschiede in der Sekundärmetabolitproduktion festgestellt werden.

2. Probenahme Korsfjord

Die Probenahme am Korsfjord in der Nähe von Bergen erfolgte im Oktober 2001 in der Tiefe von 200-300 m mit Hilfe einer Dredge. Die Probenahme, die Benutzung von Schiff, Besatzung und Ausrüstung sowie der Aufenthalt wurde von dem Improving Human Potential Programme der EU, (Contract No. HPRI-CT-1999-00056) Bergen Marine, Norwegen, ermöglicht und finanziert.

Die mikrobiologischen Untersuchungen konzentrierten sich an diesem Standort auf zwei verschiedene Schwammarten von Demospongiae, *Geodia baretii* und *Phakellia ventilabrum*, die in diesem Gewässer häufig anzutreffen sind. Von diesen Schwämmen wurden die Bakterien mit unterschiedlichen mikrobiologischen und molekularbiologischen Ansätzen analysiert. Zunächst wurden vor Ort Batch-Ansätze durchgeführt sowie anschließend durch Kühltransport der Schwämme nach Berlin kontinuierliche Kulturen angesetzt. Zusätzlich wurde *Phakellia ventilabrum* 4 Tage in Bergen gehältert und anschließend untersucht.

2.1 Batch-Kulturen von *Phakellia ventilabrum* und *Geodia baretii*

Als Medien für die Agarplatten wurden CSA, BMo, MBA und Actinomycetenmedium (Difco) eingesetzt, sowie Medien mit natürlichen Substraten, die im marinen Milieu häufig anzutreffen sind, wie z.B. Chitin und Laminaria. Alle Isolierungen fanden ab dem zweiten Überführungsschritt auf MBA statt. Die isolierten Stämme wurden entweder mit MALDI-TOF-MS (durch TP5) vorgruppiert oder sie wurden von uns bzw. in Zusammenarbeit mit Novozymes (TP7) ansequenziert. Die Zuordnung zum phylogenetischen Baum aus bekannten Gattungen und Arten erfolgte durch Vergleich mit den Sequenzen der Genbank. Auf diese Weise konnten 367 aerobe Bakterienstämme aus den beiden Schwämmen isoliert und charakterisiert werden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Isolate und deren phylogenetische Verwandtschaft.

Tab. 2: Isolatübersicht und taxonomische Diversität der Bakterien aus *Phakellia ventilabrum* und *Geodia baretii*

Nächste Verwandte der Isolate:			Batch-Kulturen, Korsfjord		Kontinuierliche Kulturen, Korsfjord		
Phylum	Klasse	Gattung	<i>Phakellia ventilabrum</i>	<i>Geodia baretii</i>	<i>Phakellia ventilabrum</i>	<i>Phakellia ventilabrum</i> 4 Tage Hält.	<i>Geodia baretii</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria gesamt:		183	26	33	21	131
	Gammaproteobacteria				2		2
		<i>Acinetobacter</i>	1				
		<i>Alteromonas</i>	1		1		
		<i>Brevundimonas</i>	2				
		<i>Glaciecola</i>			4	9	15
		<i>Halomonas</i>	1		12	2	14
		<i>Pseudoalteromonas</i>	5	4	12	10	95
		<i>Pseudomonas</i>	97	2	1		
		<i>Psychrobacter</i>	4	20	1		
		<i>Rheinheimera</i>	36	1			
		<i>Shewanella</i>	18				5
		<i>Stenotrophomonas</i>	6				
		<i>Vibrio</i>	12				
	Alphaproteobacteria gesamt:		68	22	83	8	24
	Alphaproteobacteria		45	4	18		11
		<i>Erythrobacter</i>	1				
		<i>Loktanella</i>			15	2	2
		<i>Mesorhizobium</i>			1		
		<i>Paracoccus</i>		4	13	3	
		<i>Rhodobacter</i>	4				
		<i>Roseobacter</i>	13		7		
		<i>Sphingomonas</i>	3		2		
		<i>Staleyia</i>		1	1		
		<i>Sulfitobacter</i>	2	13	26	3	11
Firmicutes	Bacilli gesamt:		9	1	0	0	2
		<i>Bacillus</i>	5				2
		<i>Paenibacillus</i>	4				
Bacteroidetes gesamt:			31	3	108	7	47
Bacteroidetes					44	7	6
	Sphingobacteria		1				1
		<i>Algoriphagus</i>	6				
		<i>Cyclobacteria</i>	6	1			
		<i>Flectobacillus</i>	7				
	Flavobacteria		2		20		17
		<i>Cellulophaga</i>			13		
		<i>Gelidibacter</i>					4
		<i>Maribacter</i>			17		19
		<i>Mesonina</i>		1	2		
		<i>Polaribacter</i>			1		
		<i>Winogradskyella</i>			8		
		<i>Zobellia</i>	9		3		
Actinobacteria gesamt:			23	1	0	0	0
	Actinobacteria		13				
		<i>Agrococcus</i>	1				
		<i>Arthrobacter</i>	1				
		<i>Microbacterium</i>	6				
		<i>Micrococcus</i>	1				
		<i>Nocardioides</i>	1	1			
Bacteria							1
Gesamtanzahl Isolate: 832			314	53	224	36	205

Es konnten insgesamt Bakterien aus 4 Phyla isoliert werden: Proteobacteria (Gamma- und Alphaproteobacteria), Firmicutes, Bacteroidetes und Actinobacteria. Sie enthalten Vertreter von 6 Klassen mit unterschiedlich häufig auftretenden Gattungen. Für *Phakellia ventilabrum* zeigte sich, daß die Mehrheit der Isolate den Gammaproteobacteria zugeordnet werden konnten, hier war auch das Spektrum der auftretenden Gattungen am größten. Am häufigsten wurde in dieser Gruppe *Pseudomonas* isoliert, gefolgt von *Rheinheimera*, *Shewanella* und *Vibrio*. Ebenfalls häufig wurden Bakterien aus der Klasse der Alphaproteobacteria isoliert, wobei der größte Teil nicht bis zur Gattungsebene bestimmt werden konnte, daneben war *Roseobacter* am häufigsten. Bacteroidetes, Actinobacteria und Bacilli traten weniger häufig auf. Bei *Geodia baretii* waren die Klassen der Gamma- und Alphaproteobacteria am häufigsten vertreten, die weiteren Phyla nur gering.

2.2 Kontinuierliche Kulturen

Der Ansatz der kontinuierlichen Kulturen wurde durchgeführt, um eine Verschiebung des bakteriellen Artenspektrums zu erreichen. Dazu wurden Reaktoren mit Schwammstücken und Medien niedriger Substratkonzentration befüllt und kontinuierlich bei 8°C betrieben. Es kamen verschiedene oligotrophe Medien sowie natürliche Zusätze wie z.B. Laminaria und Chitin zum Einsatz. Alle Isolierungen fanden ab dem zweiten Überführungsschritt auf MBA statt. Der Einsatz kontinuierlicher Kulturen führte wie erwartet zu einer Verschiebung des isolierten bakteriellen Artenspektrums.

Anhand der Tabelle 2 ist ersichtlich, dass innerhalb der Gammaproteobacteria die Gattung *Glaciecola* neu dazukam sowie die Anzahl von Isolaten der Gattungen *Pseudoalteromonas* und *Halomonas* erhöht wurde. Innerhalb der Alphaproteobacteria kamen Isolate der Gattung *Loktanella* hinzu. Am auffälligsten war die Verschiebung des Isolatspektrums zu den Bacteroidetes, dabei insbesondere zur Klasse der Flavobacteria. Alle Gattungen innerhalb der Flavobacteria sind durch Anreicherung mit Hilfe der kontinuierlichen Kulturen neu dazu gekommen.



Abb. 1: Versuchsaufbau der kontinuierlichen Kulturen

2.3 Anaerobe Ansätze

Aufgrund der Struktur und Physiologie der Schwämme wird vermutet, dass es auch anaerobe Zonen im Schwamm und damit assoziierte anaerobe Bakterien gibt. Deshalb wurde im Rahmen einer Projektarbeit versucht, diese Populationen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst in Bergen anaerobe Flüssigkulturen mit natürlichen Substraten wie z.B. Laminaria, Gelatine und Chitin angesetzt, in die Schwammstücke gegeben wurden. Die Isolierung erfolgte dann in Berlin mit Hilfe der anaeroben Hungate-Technik. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, konnte trotz der Verwendung unterschiedlicher Medien nur ein sehr eingeschränktes Spektrum an Bakterien isoliert werden. So wurden aus *Geodia baretti* fast ausschliesslich Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* isoliert. Nur ein Isolat gehörte zu den Bacteroidetes. Bei *Phakellia ventilabrum* konnten außer *Desulfovibrio* auch Bakterien der Gattung *Shewanella* isoliert werden.

Tab. 3: Anaerobe Isolate und deren phylogenetische Zuordnung aus zwei borealen Schwämmen

Nächste Verwandte der Isolate:			anaerobe Isolate	
Phylum	Klasse	Gattung	<i>Phakellia ventilabrum</i>	<i>Geodia baretti</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria			
		<i>Shewanella</i>	10	
	Deltaproteobacteria			
		<i>Desulfovibrio</i>	12	26
Bacteroidetes				1
Gesamtanzahl: 49			22	27

2.4 16S rDNA Klonierung

Zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität in Schwämmen wurden auch kultivierungsunabhängige Ansätze durchgeführt. Die Gesamt-DNA der Schwämme wurde isoliert, mit Hilfe universeller Bakterienprimer oder Archaea-spezifischer Primer die entsprechenden 16S rRNA Genregionen amplifiziert und die PCR-Produkte der erwarteten Größe in einen Bakterienvektor kloniert. Von den erhaltenen Klonen wurden 343 Klone partiell sequenziert und phylogenetisch mit Hilfe des ARB-Programms (Ludwig *W et al.* 2004) unter Abgleich mit den Sequenzen der NCBI Genbank analysiert. Für die eubakteriellen Sequenzen von *Phakellia ventilabrum* ergab sich eine Zuordnung zu 10 Phyla, für *Geodia baretti* zu 9 Phyla mit jeweils vielen verschiedenen Sequenzprofilen. Von Vertretern dieser Phyla mit ihren Untergruppen wurde die gesamte 16S rDNA sequenziert (63 Klone für *Phakellia*, 49 für *Geodia*), um eine möglichst genaue phylogenetische Zuordnung zu erreichen. Die phylogenetischen Gruppen, zu denen die Klone gehören, unterscheiden sich in großen Teilen bei den beiden Schwämmen (siehe Tab. 4). Die Mehrzahl der Sequenzen aus *Phakellia* zeigen eine Verwandtschaft mit Gamma- und Alphaproteobacteria, sowie Planctomycetes, während die von *Geodia* in der Hauptsache bei Acidobacteria und Chloroflexi liegen. Überschneidungen der Sequenzen aus beiden Schwämmen finden sich bei den Alpha-, Gamma- und Deltaproteobacteria, sowie bei Nitrospirae. Die Klone von *Geodia* zeigen eine enge Verwandtschaft zu bisher veröffentlichten Klonen aus anderen Schwämmen. Die Klone korrespondieren nicht mit den isolierten Bakterien aus beiden Schwämmen.

Die 25 Archaea-Klone von *Phakellia* erwiesen sich als identisch, die Sequenzen ordnen sich in der Nähe von unkultivierten Crenarchaeota ein. Bei *Geodia* konnten die Sequenzen zu 2 verschiedenen Gruppen von Crenarchaeota eingeordnet werden, sie unterscheiden sich von den *Phakellia*-Klonen.

Tab. 4: Übersicht über die phylogenetische Diversität der Klone aus *Phakellia ventilabrum* und *Geodia baretii*

Phylogenetische Zuordnung zu:	Klone aus	
	<i>Phakellia ventilabrum</i>	<i>Geodia baretii</i>
Gammaproteobacteria	58	1
Betaproteobacteria	1	
Alphaproteobacteria	72	1
Deltaproteobacteria	4	8
Bacteroidetes	7	
unkult. Gruppe zwischen Planctomycetes/Fibrobacteria		3
Planctomycetes	66	
Verrucomicrobia	1	
TM6	2	
Nitrospirae	3	2
Nitrospina-OP8		1
Acidobacteria		44
Cyanobacteria	3	
diverse Bakt. zwischen Spiroch./Cyanobact.		2
Chloroflexi		31
Archaea	25	8
Gesamtzahl der Klone:	242	101

3. Probenahme Arktis

Die Probenahme fand während einer Polarstern-Expedition in der Nähe von Grönland im Juli 2002 statt. Die Proben wurden aus 150 bis 3000 m Tiefe mit Hilfe eines Backengreifers entnommen. Es wurden an diesem Standort verschiedene Demospongiae sowie Sediment, eine Ascidie und eine Seeanemone mikrobiologisch untersucht (siehe Tabelle 5).

Tab. 5: Isolatübersicht aus marinen Proben der Arktis

Nächste Verwandte der Isolate: Klasse Gattung		marine Schwämme									Ascidie	Seeanemone	Sediment
		<i>Aphysilla sulfurea</i>	<i>Dragmastra normanii</i>	<i>Geodia</i> oder <i>Pachymatisma</i>	<i>Haliclona</i> sp.	<i>Pseudosuberites hyalinus</i>	<i>Stryphnus ponderosus</i>	<i>Tetilla</i>	<i>Thenea abyssorum</i>				
Gammaproteobacteria	52												
<i>Pseudoalteromonas</i>	9				4						5		
<i>Pseudomonas</i>	26		1	6	8	2	1		3	4			
<i>Psychrobacter</i>	14			3			2		1				6
<i>Stenotrophomonas</i>	3			1							2		
Betaproteobacteria	1	1											
Bacilli	16												
<i>Bacillus</i>	13				2		7	1	2				1
<i>Paenibacillus</i>	1												1
<i>Planococcus</i>	1												1
<i>Sporosarcina</i>	1				1								
Actinobacteria	3								3				
	72												

Die verwendeten Medien waren das substratarme Trinkwassermedium R2A sowie herkömmliches MBA. Die Kultivierung wurde vorrangig zum Erhalt von Bacilli durchgeführt, dazu wurden die Probenhomogenisate 10 min bei 70°C erhitzt und auf MBA aufgebracht. Anhand der Tabelle ist der Kultivierungserfolg von Bacilli ersichtlich. Das Betaproteobacterium wurde von R2A isoliert. Zusätzlich konnten verschiedene Gammaproteobacteria und Actinobacteria isoliert werden.

4. Koloniehybridisierung

Als Methode zur schnellen Einordnung der Bakterien auf den ersten Anreicherungsplatten sollte die Koloniehybridisierung eingesetzt werden. Sie beinhaltet den Transfer der Bakterienkolonien auf Nylonmembranen mit nachfolgender Hybridisierung mit spezifischen Bakteriensonden, dadurch wird der spezifische Nachweis bestimmter Bakterienklassen ermöglicht. Sehr gut funktioniert diese Methode, wenn die Kolonien einheitliche Oberflächeneigenschaften (Feuchtigkeit, Viskosität, Lyseverhalten) aufweisen. In unserem System mit völlig heterogenen Bakteriengesellschaften ergaben sich aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Zelloberflächen und der Zellwände Probleme beim gleichzeitigen und gleichmäßigen Aufschluß der Zellen. Die Methode war daher für unsere Fragestellung der gleichzeitigen Bestimmung der Klassenzugehörigkeit der Bakterien auf den Kultivierungsplatten nicht routinemäßig einsetzbar.

5. Isolatbeschreibungen

Aufgrund morphologischer Gesichtspunkte, phylogenetischer Daten, Besonderheiten des MALDI-Spektrums oder auch biologischer Daten wurden 39 Bakterienisolate ausgewählt für eine genauere Analyse. Nach 16S rDNA Vollsequenzierung in Zusammenarbeit mit Novozymes (TP 7) und erneuter phylogenetischer Zuordnung konnten aufgrund des enormen Zeitaufwands nur 6 Isolate, die aus verschiedenen Gründen am vielversprechendsten waren, für eine vollständige Beschreibung ausgewählt werden. Es sind jedoch noch einige phylogenetisch interessante Bakterien in unserer Stammsammlung vorhanden, die in möglichen Folgeprojekten einer Stammbeschreibung unterzogen werden könnten. Für die ausgewählten 6 Stämme wurden Untersuchungen zu Wachstumsverhalten und physiologischen Aktivitäten durchgeführt. Die Beschreibung erfolgt von 2 Isolaten mit neuer Gattung innerhalb der Bacteroidetes sowie 3 Isolaten mit neuer Gattung und einem Isolat mit neuer Art innerhalb der Gammaproteobacteria. Die Isolatbeschreibungen wurden anstelle der ursprünglich geplanten FISH-Untersuchungen durchgeführt, da die wissenschaftlichen Erfolgsaussichten sowie der Bedarf unserer Kooperationspartner nach beschriebenen Isolaten höher waren.

6. Biologische Aktivitäten

189 Isolate wurden anhand von phylogenetischen Daten und MALDI-TOF-MS ausgesucht und folgenden biologischen Testverfahren unterworfen: Tests auf antimikrobielle Aktivität im Agardiffusionstest mit den Indikatorstämmen *Bacillus brevis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* und *Acinetobacter calcoaceticus*, Tests auf fungizide Wirkung mit den Stämmen *Candida albicans*, *Nematospora coryli*, *Mucor miehei*, *Penicillium notatum* und *Fusarium solani*, Cytotoxizitätstests erfolgten mit den Zellkulturen HeLa S3 und Jurkat, Nematodeninhibitionstests wurde mit *Caenorhabditis elegans* durchgeführt und Phytotoxizitätstests mit *Lepidium sativum*. Die Isolate wurden auf Agarplatten verschickt und die Tests durch das Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung Kaiserslautern durchgeführt.

Bei 72% der Bakterienstämme konnten biologische Aktivitäten nachgewiesen werden (siehe Tab. 6).

Tab.6: Zusammenfassung der biologischen Tests

Proben	gesamt	positiv getestet	negativ getestet	% positiv	anti- microb.	anti- fungal	Cyto- tox.	Phyto- tox.	Nemato- dentox.	mehrfach positiv
Sula-Rücken	26	19	7	73%	7	8	12	3	4	9 mehrfach
Korsfjord, Batch- Kulturen, gesamt	87	54	33	62%	8	18	34	16	8	23 mehrfach
Korsfjord, kontinuierliche Kulturen, gesamt	47	41	6	87%	22	19	29	8	14	32 mehrfach
Arktis	29	22	7	76%	5	15	11	5	0	12 mehrfach
Umgebungswasser	1	1			1		1			
gesamt	190	137	53	72%						

Die höchste Trefferrate für biologische Aktivitäten konnten bei den Isolaten aus den kontinuierlichen Kulturen verzeichnet werden, aber auch die untersuchten Isolate von den anderen Standorten zeigten sehr häufig biologische Aktivitäten. Unsere Auswahlkriterien führten somit zum Erfolg.

7. Stammsammlung

Der Aufbau der Stammsammlung erfolgte kontinuierlich von Anfang des Projekts an. Von insgesamt 1642 im BOSMAN-Projekt isolierten und phylogenetisch charakterisierten Bakterienstämmen sind 1340 Isolate in unserer Stammsammlung hinterlegt. Dies erfolgte durch mehrmaliges Überführen der Kulturen zur Qualitätskontrolle mit anschließender Überführung in flüssigen Stickstoff oder in Glycerin bei -80°C bzw. Aufbewahrung in lyophilisierter Form.

Die dauerhaften Serviceleistungen für das Gesamtprojekt bestanden aus der Bereitstellung (Anzucht und Versand) von Bakterienkulturen und Lyophilisaten für die Kooperationspartner (Teilprojekte 1, 3, 5 und 7). Die dauernde Verfügbarkeit der Isolate wurde damit gewährleistet.

II.2 Verwertungsplan

Die von uns angelegte Stammsammlung von 1340 Stämmen steht für mögliche Folgeprojekte zur wissenschaftlichen Verwertung zur Verfügung.

Durch die Weitergabe von mehreren hundert Stämmen an den Kooperationspartner Novozymes stehen diese Bakterien für weitere firmeninterne Screenings im Zuge einer wirtschaftlichen Verwertung zur Verfügung.

II.3 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens

Die mikrobiologische Untersuchung von Schwämmen ist von großem wissenschaftlichen Interesse. So sind in den letzten Jahren neben kultivierungsabhängigen Ansätzen (Olson JB und McCarthy PJ, 2005; Sfanos K et al., 2005) verstärkt kultivierungsunabhängige Ansätze wie z.B. Klonierung (Hentschel U et al., 2002), DGGE (Olson JB und McCarthy PJ, 2005; Thoms C et al., 2003), RFLP (Lee EY et al., 2003) und FISH-Untersuchungen (Fieseler L et al., 2004) zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität durchgeführt worden. Auch die Suche nach Sekundärmetaboliten ist auf molekularbiologischer Ebene verstärkt worden, durch z.B. Metagenomanalyse (Schirmer A et al., 2005) und die Analyse von Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (Salomon CE et al., 2004).

Fast alle Untersuchungen sind jedoch nach wie vor an Warmwasserschwämmen durchgeführt worden. Unseres Wissens nach gab es während der Projektphase nur eine Arbeit, die die mikrobielle Diversität mittels Klonierung an antarktischen Schwämmen untersucht hat (Webster NS et al., 2004) sowie eine weitere Arbeit zu Untersuchungen an Schwämmen der gemäßigten Klimazone (Erpenbeck D et al.,

2002). Die von uns produzierten Ergebnisse zur mikrobiologischen Zusammensetzung von Schwämmen der borealen und arktischen Zone sind somit noch alleinstehend. Ebenso sind uns keine Veröffentlichungen zur Kultivierung von schwammassoziierten Bakterien mittels kontinuierlicher Kulturen bekannt. Ausserhalb unseres Verbundprojektes wurde während der Projektzeit auch nur eine Arbeit zur Kultivierung von anaeroben Mischkulturen mit anschließender molekularbiologischer Analyse, also ohne Isolierung der Bakterien, veröffentlicht (Ahn YB et al., 2003). Somit sind auch unsere Daten zur anaeroben Isolierung von Bakterien aus Schwämmen bisher alleinstehend.

II.4. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Erfolgte Veröffentlichungen:

Graeber I., Kaesler I., Dieckmann R., von Döhren H., Szewzyk U., Sponge associated bacteria from boreal sponges. In: M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi (ed) Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università di Genova. Sponge science in the new millennium (2003/2004) 68: 357-363

Dieckmann R., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U., von Döhren H., Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). Applied Microbiology and Biotechnology (2005) 67: 539-548

Geplante Veröffentlichungen:

Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., Michaelis W., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Isops phlegraei*

Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Pape T., Dieckmann R., Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., Michaelis W., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Geodia baretti*

Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Pape T., Dieckmann R., Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., Michaelis W., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Haliclona* sp.

Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., Lurz R., von Döhren H., Michaelis W., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., marine bacteria isolated from the boreal sponge *Phakellia ventilabrum*

Kaesler I., Graeber I., Dieckmann R., von Döhren H., Szewzyk U.:
Cultivable microbes associated with boreal sponges from the Sula Ridge

Kaesler I., Graeber I., Dieckmann R., Borchert M., Nielsen P., Schäfer T., von Döhren H., Szewzyk U.: Continuous culture: a new enrichment method with oligotrophic conditions to isolate sponge-associated bacteria from *Geodia baretti*

Graeber I., Kaesler I., Dieckmann R., Borchert M., Nielsen P., Sjöholm C., von Döhren H., Szewzyk U.: Combining batch cultures and continuous cultures for culturing bacteria from the marine sponge *Phakellia ventilabrum*

Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U.:
Bacterial diversity in *Phakellia ventilabrum*: a culture independant approach

Kaesler I., Graeber I., Rapp H.T., Szewzyk U.:
Microbial diversity in the marine sponge *Geodia baretti*

Literatur:

Ahn YB, Rhee SK, Fennell DE et al. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69:4159-4166.

Erpenbeck D, Breeuwer JAJ, van der Velde HC et al. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *Marine Biology* 2002;141:377-386.

Fieseler L, Horn M, Wagner M et al. Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70:3724-3732.

Hentschel U, Hopke J, Horn M et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology* 2002;68:4431-4440.

Lee EY, Lee HK, Lee YK et al. Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea. *Biomolecular Engineering* 2003;20:299-304.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lussmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32 (4): 1363-1371

Salomon CE, Magarvey NA, Sherman DH. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Natural Product Reports* 2004;21:105-121.

Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71:4840-4849.

Sfanos K, Harmody D, Dang P et al. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic and Applied Microbiology* 2005;28:242-264.

Thoms C, Horn M, Wagner M et al. Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Marine Biology* 2003;142:685-692.

Olson JB, McCarthy PJ. Associated bacterial communities of two deep-water sponges. *Aquatic Microbial Ecology* 2005;39:47-55.

Webster NS, Negri AP, Munro MMHG et al. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environmental Microbiology* 2004;6:288-300.

III. Erfolgskontrollbericht

III. 1 Beitrag zu förderpolitischen Zielen

Im Rahmen des BMBF Schwerpunktes „Marine Naturstoffe“ leistete das Verbundprojekt BOSMAN einen wesentlichen Beitrag durch die Erschließung der borealen Invertebraten. Im Teilprojekt Mikrobiologie wurden im Sinne des Schwerpunktes eine umfangreiche Stammsammlung psychrophiler mariner Bakterien angelegt, die für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Produktion von Naturstoffen bereitstanden und -stehen.

III. 2 Ergebnis

Siehe ausführliche Beschreibung in Abschnitt II.

Als Ergebnis, das auch über das Projektende hinaus reicht, ist der Aufbau einer umfangreichen Stammsammlung mariner, psychrophiler Bakterien zu verbuchen. Die Isolate wurden phylogenetisch eingeordnet und in der Stammsammlung in Form von Lyophilisaten und gefrorenen Proben hinterlegt. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass der Einsatz von kontinuierlich durchströmten Reaktoren eine deutliche Verschiebung des Artenspektrums erbrachte. Diese Erfahrung kann in die Optimierung von Anreicherungs- und Kultivierungsstrategien zukünftiger Projekte einmünden.

III. 3 Verwertungsplan

Wirtschaftlich:

Aufgrund der engen Zusammenarbeit mit dem TP 5 und der damit angeschlossenen Firma Anagnostec konnte diese Firma ihr Programm zur taxonomischen Einordnung von Isolaten mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Analyse weiterentwickeln. Dieses unter Verwendung unserer Stammsammlung erweiterte Programm wird von Anagnostec für weitere Projekte eingesetzt bzw. kommerziell angeboten.

Durch die Weitergabe von mehreren hundert Stämmen an den Kooperationspartner Novozymes stehen diese Bakterien für weitere firmeninterne Screenings zur Verfügung.

Wissenschaftlich:

In diesem Projekt wurden wesentliche Ergebnisse erzielt hinsichtlich der Diversität schwammassoziierter Bakterien. Die in der Stammsammlung hinterlegten Bakterien wurden phylogenetisch und z.T. physiologisch charakterisiert. Damit wurde ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis mariner borealer Tiefseehabitate geleistet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Publikationen in referierten Zeitschriften veröffentlicht.

III. 4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die angestrebte frühzeitige Identifizierung von bakteriellen Kolonien auf ersten Vereinzlungsplatten mittels Koloniehybridisierung konnte durchgeführt werden, wenn die Kolonien einheitliche Oberflächeneigenschaften (Feuchtigkeit, Viskosität, Lyseverhalten) aufwiesen. Da in den meisten Fällen die Kolonien jedoch zu heterogen waren, konnte diese Methode nicht routinemäßig angewendet werden.

III. 5 Präsentationsmöglichkeiten

Die wissenschaftlichen Ergebnisse des Projekts werden in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht.

III. 6 Einhaltung des Ausgaben- und Zeitplans

Der Zeitplan und der Finanzrahmen wurden eingehalten.

Die Untersuchungen am Korsfjord (Ausfahrten, Unterbringung, Reisekosten, Labornutzung) wurde durch ein zusätzliches EU-Projekt finanziert.

IV. Berichtsblatt (Kurzfassung des fachlichen Inhalts)

Zuwendungsempfänger: TU Berlin Fakultät III FG Umweltmikrobiologie	Förderkennzeichen: 03F0358B
Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: BOSMAN I und II; Teilprojekt 4: Mikrobiologie von Porifera aus Kaltwasser-Riffsystemen	
Laufzeit des Vorhabens: BOSMAN I: 01.07.1999 – 30.06.2001 BOSMAN II: 01.04.2002 – 31.05.2005	
Berichtszeitraum: 01.07.1999 – 31.05.2005	

1. Wichtigste wissenschaftlich-technische Ergebnisse und andere wesentliche Ereignisse.

- 1593 aerobe bakterielle Isolate aus Schwämmen und anderen marinen Proben (Standorte: Sula-Rücken, Korsfjord, Arktis), Verwendung von Batch-Ansätzen und kontinuierlichen Kulturen, charakterisiert durch MALDI-TOF-MS (Kooperation mit TP5) oder Sequenzierung (z.T. Kooperation mit TP7)
- davon 1340 Isolate in die Stammsammlung aufgenommen
- 49 anaerobe Isolate aus den Schwämmen *Geodia baretii* und *Phakellia ventilabrum*
- 16S rRNA Teilsequenzierung von 343 klonierten DNA Fragmenten aus *Geodia baretii* und *Phakellia ventilabrum*, davon 112 Klone vollsequenziert
- Abgabe von 190 Isolaten an das IBWF zur Testung von biologischen Aktivitäten
- 6 Isolate ausgewählt für die Isolatbeschreibung

2. Vergleich des Stands des Vorhabens mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des Zuwendungsgebers geänderten) Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung.

- Arbeitsplanung: Alle vorgesehenen Arbeitsziele wurden erreicht: Isolierung und phylogenetische Charakterisierung von schwammassoziierten Bakterien; Kontinuierliche Systeme: Aufbau und Betrieb der Reaktoren mit borealen Schwämmen, Kultivierung, Charakterisierung der Bakterien; Bereitstellung neuer Isolate für Kooperations- und Industriepartner; PCR-Adaptierung an Schwamm-Bakterien-Homogenisate; Klonierung und phylogenetische Charakterisierung der Klone aus Schwammmaterial; Beschreibung ausgewählter Isolate; Aufbau einer Stammsammlung
- Zeitplanung: befand sich im Rahmen der Planung.
- Ausgabenplanung: befand sich im Rahmen der Planung.

3. Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Ausgabenzeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung?)

- Aussichten haben sich nicht geändert
- vorrangige Ziele wurden erreicht

4. Sind inzwischen von dritter Seite Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

- keine relevanten Ergebnisse bekannt

5. Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig?

- es waren keine Änderungen notwendig

6. Fortschreibung des Verwertungsplans.

- wirtschaftliche Erfolgsaussichten: angelegte Stammsammlung steht als Grundlage für weitere Analysen durch die Teilprojekte und Industriepartner zur Verfügung, nach Identifizierung von Isolaten als Sekundärstoffproduzenten bzw. Enzymbildner können die Isolate in beliebiger Menge kultiviert werden und die analysierten Verbindungen wirtschaftlich verwertet bzw. gegebenenfalls patentiert werden
- wissenschaftliche Erfolgsaussichten: relevante Ergebnisse liegen zur Veröffentlichung vor
- wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit: aufgrund der Anwendung neuer Kultivierungsstrategien können potenzielle Sekundärmetabolitproduzenten effizienter angereichert und isoliert werden; Isolate der Stammsammlung können zur wirtschaftlichen Verwendung an Industriepartner weitergegeben werden

**Abschlussbericht
Teilprojekt 5:**

**Naturstoffscreening und Syntheseleistungen in Kaltwasser-Porifera und
ihren Symbionten**

- 1 Aufgabenstellung**
- 2 Voraussetzung bzgl. Durchführung des Vorhabens**
- 3 Planung und Ablauf**
- 4 Wissenschaftlicher und technischer Stand**
- 5 Zusammenarbeit**
- 6 Erzielte Ergebnisse**
- 7 Verwertbarkeit der Ergebnisse**
- 8 Fortschritt anderer Stellen auf diesem Gebiet**
- 9 Veröffentlichungen**

1 Aufgabenstellung

Gegenstand des Verbundprojektes BOSMAN (Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle) war die Untersuchung mariner Porifera borealer Habitats im Hinblick auf ihre potentielle Nutzung als Quellen neuer Naturstoffe. Schwerpunkte lagen in der Analyse von Porifera, sowie in der Isolierung schwammassoziiierter Mikroorganismen und in der Entwicklung und Optimierung von Test-Systemen und Screeningmethoden für deren Charakterisierung. Dabei sollten neuartige Screeningmethoden basierend auf der MALDI-TOF Massenspektrometrie intakter Zellen etabliert und optimiert werden. Die zu entwickelnde Methodik zur Klassifizierung und Charakterisierung von Porifera und ihren assoziierten Mikroorganismen sollte ausgehend von geringsten Mengen an Biomaterial durchführbar, schnell, automatisierbar und hochdurchsatzfähig sein. Zur Selektion und Dereplizierung von Porifera und ihren assoziierten Mikroorganismen sollte eine Referenzdatenbank von Massenspektren aufgebaut werden. Das massenspektrometrische Screening sollte an der Schnittstelle zwischen Mikrobiologie und chemisch-biologischer Analyse etabliert werden. Als Werkzeug zur schnellen Beurteilung der Diversität der unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Sammlungen von Mikroorganismen sollte die Methodik über die Rückkopplung zur Mikrobiologie die Möglichkeit einer wissensbasierten Optimierung der Isolierungsstrategien und Produktionsbedingungen eröffnen, sowie über die Dereplizierung von Mehrfachisolaten zu einer möglichst diversen Sub-Kollektion von Organismen führen, für die eine erhöhte Hitrate in den weiterführenden chemisch-biologischen Tests erwartet werden konnte.

2 Voraussetzungen bzgl. Durchführung

- Kooperation mit den Teilprojekten des Verbundprojekts BOSMAN
- Nutzung der Ergebnisse aus der ersten Projektphase BOSMAN
- Nutzung von Institutsressourcen der Grundausstattung
- Nutzung des MALDI-TOF Massenspektrometers und Dienstleistungen bei der Firma Anagnostec GmbH, eines Spin-Offs unserer Arbeitsgruppe.

3 Planung und Ablauf

Massenspektrometrische Analysen von Schwammproben und isolierten Bakterien wurden wie vorgesehen in Kooperation mit der Firma AnagnosTec GmbH durchgeführt. Die Messung sogenannter Fingerprint-Spektren der Bakterienisolate erwies sich als wertvoll und zeitsparend gegenüber den in TP 4 auch eingesetzten Methoden der phylogénomischen Charakterisierung. Verfahren der Schwammdeintegration und der direkten Detektion von Biosynthesegenen durch PCR (vgl. auch TP 3) wurden nach anfänglichen Versuchen als problematisch eingeschätzt und nicht weiter verfolgt.

4 **Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Frühere Studien an Schwämmen und deren Begleitbakterien deuteten auf eine hohe Komplexität dieser Systeme hin, für deren Untersuchung Analysemethoden erforderlich sind, die einerseits mit komplexen Proben umgehen, andererseits aus Gründen der ökologischen Nachhaltigkeit mit geringsten Probenmengen auskommen sollten. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass Parameter der Umgebung, wie Tiefe oder Lichtexposition die Metabolitenkomposition sowie Form und Pigmentierung von Schwämmen wie *Rhopaloeides odorabile* beeinflussen (Thompson et al., 1987). In einer brasilianisch-französischen Studie an vier Spezies von *Plakina* Schulze konnten Muricy et al. (1999) durch Ultrastrukturuntersuchungen auf spezifische Kombinationen symbiotischer Bakterien schließen, deren Bestimmung taxonomisch wertvoll sein könnte. In Kooperation des Australischen Institute of Marine Science mit dem Center of Marine Biotechnology Baltimore wurde eine Bestandsaufnahme des bakteriellen Inventars von *Rhopaloeides odorabile* aus dem Bereich des Great Barrier Reefs durchgeführt (Webster et al., 2001^{a,b}). Von 70 mit 16S-rDNA Primern identifizierten Klonen zeigten 34 unabhängige und bisher unidentifizierte Sequenzen. Ebenso konnte die Zahl der kultivierbaren Bakterien durch Zusatz von Schwammextrakten erheblich gesteigert werden. In einer Studie unserer Würzburger Kollegen wurde durch in situ Hybridisierung die Bakterienpopulation von *Aplysina cavernicola* grob charakterisiert (Friedrich et al., 1999) und dabei dominante Typen identifiziert, wie delta- und gamma-Proteobakterien, während Archae, alpha- und beta-Proteobakterien und der Cytophaga-Flavobakterium-Cluster fehlten. Demgegenüber fanden Magnino et al. (1999) in *Theonella swinhoei* (Rotes Meer, indischer Ozean) dominierend die Beggiatoa-Gruppe, sowie Cyanobakterien.

Die direkte Bestimmung von Sekundärmetaboliten aus Zellen oder Extrakten wird noch immer als ungelöstes Problem betrachtet, wenn es um mögliche Hochdurchsatz-Screening Technologien geht. Obwohl einige Beispiele für effiziente Detektionen von Metaboliten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie publiziert wurden (s.u.), wurde überwiegend an etablierten LC-MS-Verfahren festgehalten. Auch Firmen wie Eli Lilly, die die Optimierung von Fermentationsbedingungen bearbeiten, gingen hier noch recht aufwändige Wege einschliesslich der Extraktion und Adsorption vor Einsatz von ES-MS (Higgs et al., 2001;

Zahn et al., 2001). Für Anwendungen wie die Detektion spezifischer Stoffklassen wie mikrobielle Peptide (Neumann et al., 2000; Robillot et al., 2000; Mikkola et al., 2000), Muropeptide (Bacher et al., 2001), Lipide (Petkovic et al., 2001; Waltermann et al., 2000), sulfatierte Mannane (Erra-Basels et al., 2000) oder kleiner rekombinanter Proteine (Winkler et al., 2000) hat sich die MALDI-MS bewährt. Die hohe Sensitivität ermöglichte Analysen von Mengen, die weit unterhalb einer Bakterienkolonie liegen, so z.B. bei der Analyse von Pigmenten und Proteinen von Chlorosomen des grünen Schwefelbakteriums *Chlorobium tepidum* (Persson et al., 2000) oder der Analyse von Peptiden in Vesikeln aus exokrinen Drüsen der Schnecke *Aplysia californica* (Rubakhin et al., 2000). Die Detektion einer großen Zahl spezifischer Signale ermutigte zunehmend Anwendungen zur Identifizierung von Organismen, insbesondere in der klinischen Forschung (Holland et al., 1999, Lay, 2000; van Baar, 2000), wie die Diskriminierung von Methicillin-resistenten und –sensitiven Staphylokokken (Edwards-Jones et al., 2000) und Helicobacter und Campylobacter spezie (Winkler et al., 1999), Cryptosporidien Oocysten (Magnuson et al., 2000), Bakterien- oder Pilzsporen (Li et al., 2000; Rhyzov et al., 2000; Welham et al., 2000). Diese Arbeiten zeigten, dass die MALDI-TOF Massenspektrometrie ein vielseitiger und nützlicher Ansatz für die Arbeiten der Metaboliten- und Organismen-identifizierung in Schwämmen sein konnte.

Literatur (Stand der Wissenschaft und Technik)

Bacher, G., Korner, R., Atrih, A., Foster, S.J., Roepstorff, P., und Altmaier, G. (2001) Negative and positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and positive ion nano-electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry of peptidoglycan fragments isolated from various <i>Bacillus</i> species, J. Mass Spectrom. 36, 124-139.
Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J., und Gordon, D.B. (2000) Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> by intact cell mass spectrometry. J. Med. Microbiol. 49, 295-300.
Erra-Basels, R., Kolender, A.A., Matulewicz, M.C., Nonami, H., und Cerezo, A.S. (2000) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated mannans from the red seaweed <i>Nothogenia fastigata</i> . Carbohydrate Res. 329, 157-167.
Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. und Hentschel, U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge <i>Aplysina cavernicola</i> (formerly <i>Verongia cavernicola</i>) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). Marine Biol. 134, 461-470.
Higgs, R.E., Zahn, J.A., Gygi, J.D., und Hilton, M.D. (2001) Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. Appl. Environ. Microbiol. 67,

371-376.
Holland, R.D., Duffy, C.R., Rafii, F., Sutherland, J.B., Heinze, T.M., Holder, C.L., Vorhees, K.J., und Lay, J.O., Jr. (1999) identification of bacterial proteins observed in MALDI-TOF mass spectra from whole cells. <i>Anal. Chem.</i> 71, 3226-3230.
Lay, J.O. (2000) MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. <i>Trends Anal. Chem.</i> 19, 507-516.
Li, T.Y., Liu, B.H., und Chen, Y.C. (2000) Characterization of <i>Aspergillus</i> spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <i>Rapid Comm. Mass Spectrom.</i> 14, 2393-2400.
Magnino, G., Sara, A., Lancioni, T., und Gaino, E. (1999) Endosymbionts of the coral reef sponge <i>Theonella swinhoei</i> (Porifera, Demospongiae). <i>Invertebrate Biol.</i> 118, 213-220.
Magnuson, M.L., Owens, J.H., und Kelty, C.A. (2000) Characterization of <i>Cryptosporidium parvum</i> by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 66, 4720-4724.
Mikkola, R., Kolari, M., Andersson, M.A., Helin, J., und Salkinoja-Salonen, M.S. (2000) Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of <i>Bacillus licheniformis</i> . <i>Eur. J. Biochem.</i> 267, 4068-4074.
Muricy, G., Bezac, C., Gallissian, M.F., und Boury-Esnault, N. (1999) Anatomy, cytology and symbiotic bacteria of four Mediterranean species of <i>Plakina</i> Schulze, 1880 (Demospongiae, homosclerophorida) <i>J. Nat. Hist.</i> 33, 159-176.
Neumann, U., Campos, V., Cantanero, S., Urritia, H., Heinze, R., Weckesser, J., und Erhard, M. (2000) Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (mycrocystin) peptides in a bloom of <i>Microcystis</i> sp. from a Chilean lake. <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> 23, 191-197.
Persson, S., Sonksen, C.P., Frigaard, N.U., Cox, R.P., Roepstorff, P., und Miller, M. (2000) Pigments and proteins in green bacterial chlorosomes studied by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <i>Eur. J. Biochem.</i> 267, 450-456.
Petkovic, M., Schiller, J., Müller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., und Arnhold, J. (2001) Detection of individual phospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. <i>Anal. Biochem.</i> 289, 202-216.
Robillot, C., Vinh, J., Puisseux-Dao, S., und Hennion, M.C. (2000) Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7820. <i>Env. Sci. & Technol.</i> 34, 3372-3378.
Rubakhin, S.S., Garden, R.W., Fuller, R.R., und Sweedler, J.V. (2000) Measuring peptides in individual organelles with mass spectrometry. <i>Nature Biotechnol.</i> 18, 172-175.
Rhyzov, V., Hathout, Y., und Fenselau, C. (2000) Rapid characterization of <i>Bacillus cereus</i> group bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 66, 3828-3934.
Thompson, J.E., Murhy, P.T., Bergquist, P.R., und Evans, E.A. (1987) Environmentally induced variation in diterpene composition of the marine sponge <i>Rhopaloeides odorabile</i> . <i>Biochem. Syst. Ecol.</i> 15, 595-606.
Van Baar, B.L.M. (2000) Characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <i>FEMS Microbiol. Rev.</i> 24, 193-219.
Waltermann, M., Luftmann, H., Baumeister, D., Kalscheuer, R., und Steinbüchel, A. (2000) <i>Rhodococcus opacus</i> strain PD630 as a new source of high-value single cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids. <i>Microbiology (UK)</i> 146, 1143-1149.
Webster, N.S., Hill, R.T. (2001 ^a) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge <i>Rhopaloeides odorabile</i> is dominated by an α -Proteobacterium. <i>Mar. Biol.</i>

138, 843-851.
Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L., und Hill, R.T. (2001 ^b) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge <i>Rhopaloeides odorabile</i> . Appl. Environ. Microbiol. 67, 434-444.
Welham, K.J., Domin, M.A., Johnson, K., Jones, L., und Ashton, D.S. (2000) Characterization of fungal spores by by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Comm. Mass. Spectrom. 14, 307-310.
Winkler, M.A., Hickman, R.K., Golden, A., und Aboleneen, H. (2000) Analysis of recombinant protein expression by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of bacterial colonies. Biotechniques 28, 890.
Winkler, M.A., Uher, J., und Ceba, S. (1999) Direct analysis and identification of helicobacter and campylobacter species by MALDI-TOF mass spectrometry. Anal. Chem. 71, 3416-3419.
Zahn, J.A., Higgs, R.E., und Hilton, M.D. (2001) Use of direct-infusion electrospray mass spectrometry to guide empirical development of improved conditions for expression of secondary metabolites from Actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 67, 377-386.

5 Zusammenarbeit

Das vorliegende Projekt wurde wie im Leitantrag beschrieben durch die abgestimmte Arbeitsteilung zwischen den Teilprojektpartnern ermöglicht. Das TP 5 kooperierte mit allen anderen Teilprojekten vor allem durch den analytischen Einsatz der MALDI-TOF Massenspektrometrie. Eine intensive Zusammenarbeit bestand mit TP4. Eine Auswahl an bakteriellen Isolaten, Extrakten oder HPLC-Fractionen wurde an die Teilprojekte 1 und 6 zur Durchführung chemischer Analysen, sowie an das IBWF, Kaiserslautern zur Durchführung biologischer Tests weitergegeben. Im Verlauf der Arbeiten dieser Gruppen angefallenen Proben sind ebenfalls mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie vermessen worden. Auf dem Gebiet der MALDI-TOF MS und der Computer-gestützten Analyse der MS Daten bestand eine intensive Zusammenarbeit mit der Firma Anagnostec, Luckenwalde.

6 Erzielte Ergebnisse

Untersuchungsgegenstände waren im marine Schwämme und andere marine Proben und deren assoziierte Mikroorganismen aus drei Kaltwassergebieten (Sula-Rücken (Norwegisches Küstengewässer, 1999), Korsfjord (bei Bergen, Norwegen, 2001) und Arktis (2002)). Die Bakterien wurden von TP4 mit unterschiedlichen Medien und Anreicherungsverfahren kultiviert und isoliert und an uns weitergegeben. In einem Screening-Projekt wie BOSMAN und allgemein in Prozessen, die sich mit der Wirkstoffsuche aus natürlichen Systemen befassen, ist es ausserordentlich wichtig, vorher untersuchte Proben zu identifizieren und aus dem Screening-Prozess zu eliminieren (Dereplizierung) und sich auf neuartige Mikroorganismen mit interessantem Naturstoffpotential zu konzentrieren. In diesem Projekt zeigte sich, dass grosse Anzahlen an Bakterienisolaten akkumuliert wurden, für die eine schnelle Charakterisierung und Klassifizierung erforderlich war. Insbesondere zeigte sich, dass je nach angewandter Isolierungsstrategie eine grosse Anzahl von Bakterien vielfach isoliert wurden. Um potentiell interessante Isolate oder bisher wenig erforschte Gruppen von Mikroorganismen und bekannte oder mehrfach isolierte Mikroorganismen in einer frühen Phase des Screeningsprozesses diskriminieren zu können, wurde im BOSMAN-Projekt eine neuartige massenspektrometrische Methode etabliert, die es ausgehend von geringsten Mengen an Biomasse (weit weniger als eine Bakterienkolonie auf Isolierungs-Agarplatten, Abb.1) erlaubt, Mikroorganismen bis auf Stammebene anhand ihrer charakteristischen MALDI-TOF Massenspektren zu klassifizieren und identifizieren. Abb. 2 zeigt typische MALDI-TOF MS-Spektren von Bakterien aus marinen Schwämmen, so genannte „Fingerprint“-Spektren, die charakteristische Pattern von Proteinen kleinen Molekulargewichts (2.000 Da-20.000 Da) enthalten. Durch Mehrfachanalysen einer Vielzahl von Isolaten konnten wir zeigen, dass diese Methodik reproduzierbar und robust über die gesamte Projektlaufzeit war. Zur Auswertung der Spektren bezüglich der Klassifizierung der Mikroorganismen wurden die Massendaten auf die wesentlichen Informationen reduziert und statistischen Auswertungen zugeführt.

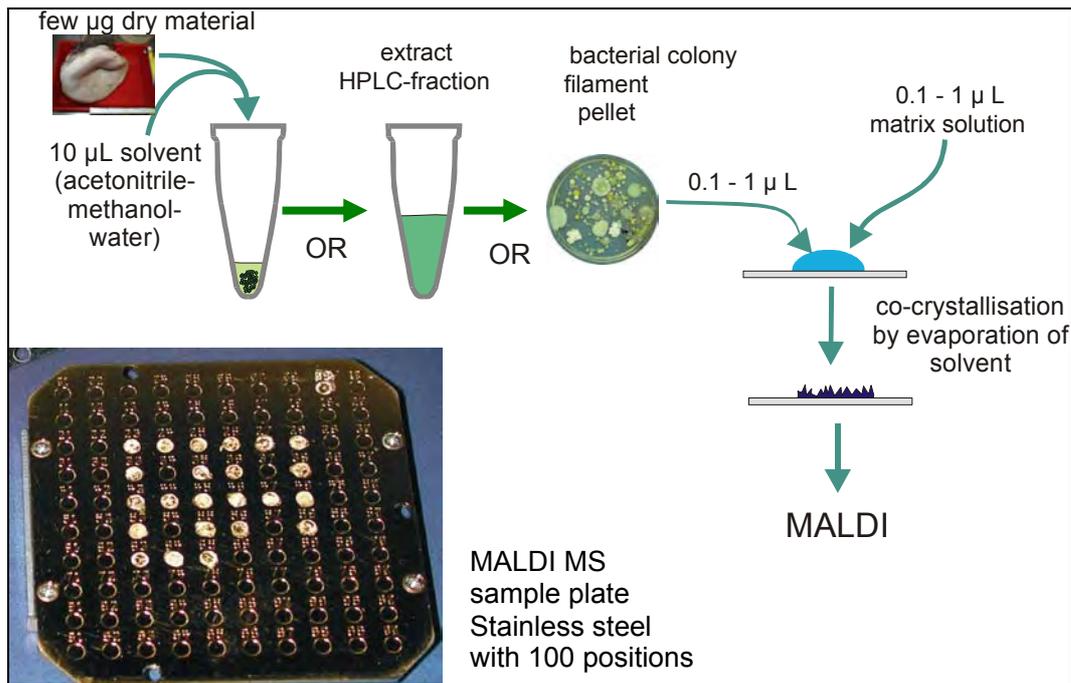


Abb. 1 Typische Probenvorbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie intakter Zellen, Extrakten oder HPLC-Fractionen.

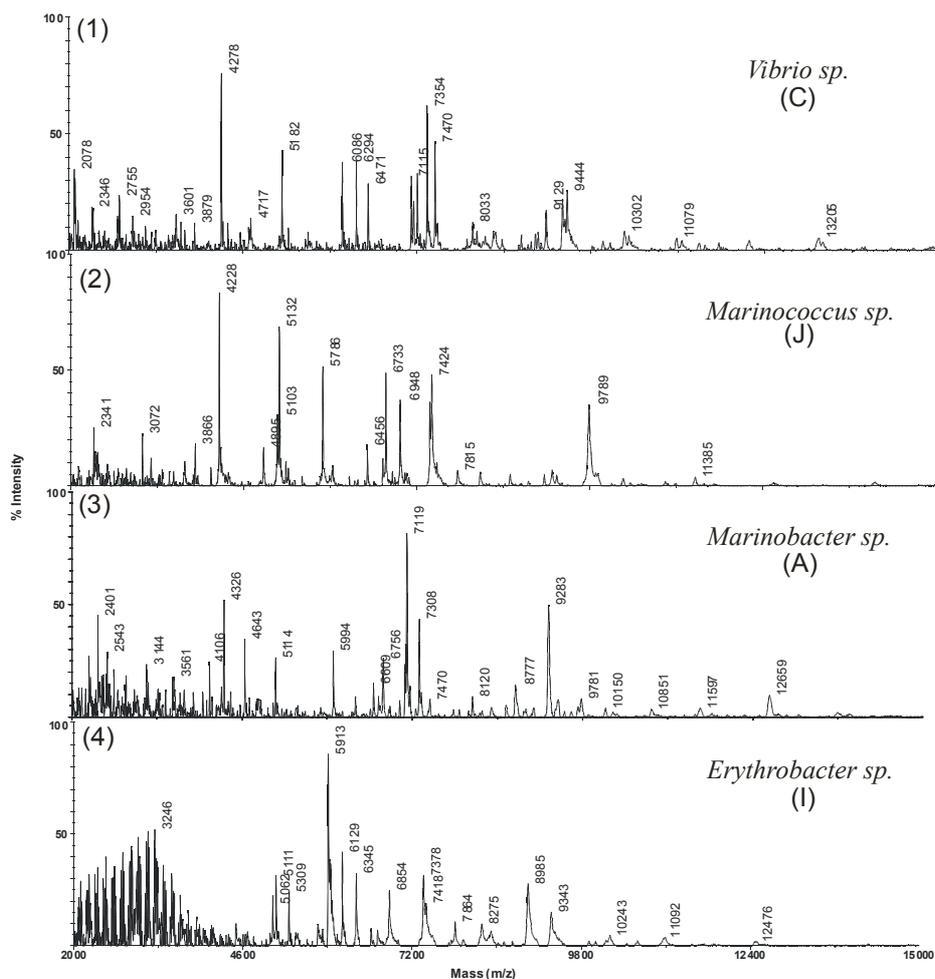


Abb. 2 Beispiele von MALDI-TOF Massenspektren intakter Zellen ausgewählter schwamm-assoziiertes Bakteriengattungen. Die phylogenetische Zuordnung erfolgte durch 16S rDNA Sequenzierung.

Detaillierte Analysen der Massendaten ausgewählter Gattungen, für die nach Isolierung einer grossen Anzahl von Isolaten eine entsprechend grosse Datenbasis vorlag, ergab, dass mit Hilfe der Methodik selbst sehr nahe verwandte Spezies zuverlässig unterschieden werden konnten. Abb. 3 zeigt Massenspektren dreier Isolate der Gattung *Pseudoalteromonas* und zum Vergleich ein Isolat der Gattung *Alteromonas*. Hierbei konnten innerhalb der Gattung *Pseudoalteromonas* sowohl übergeordnete, gruppenspezifische Biomarker (z.B. m/z 4235, 6075, 9920) als auch spezies-spezifische Biomarker identifiziert werden, während keine Übereinstimmungen zwischen den Gattungen *Pseudoalteromonas* und *Alteromonas* gefunden wurden. Abb. 4 veranschaulicht die Diskriminierungsfähigkeit der Methode in Form eines Scatter-Plots und setzt die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse in Beziehung zur molekularbiologischen Einordnung durch Vergleich der 16S rDNA Sequenzen. Als Referenz wurden drei *Pseudoalteromonas*-Stämme von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) vermessen. Die Analyse zeigte, dass selbst Mikroorganismen, die sehr nahe verwandt sind (über 99% Identität der 16S rDNA Sequenzen) diskriminiert werden können. Um Mikroorganismen in diesem Verwandtschaftsbereich mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zu unterscheiden, sind aufwändige 16S rDNA Sequenzierungsstrategien (Mehrfachsequenzierungen längerer Sequenzbereiche) erforderlich, um Sequenzierungsfehler auszuschliessen und entsprechende Sequenzunterschiede zu detektieren.

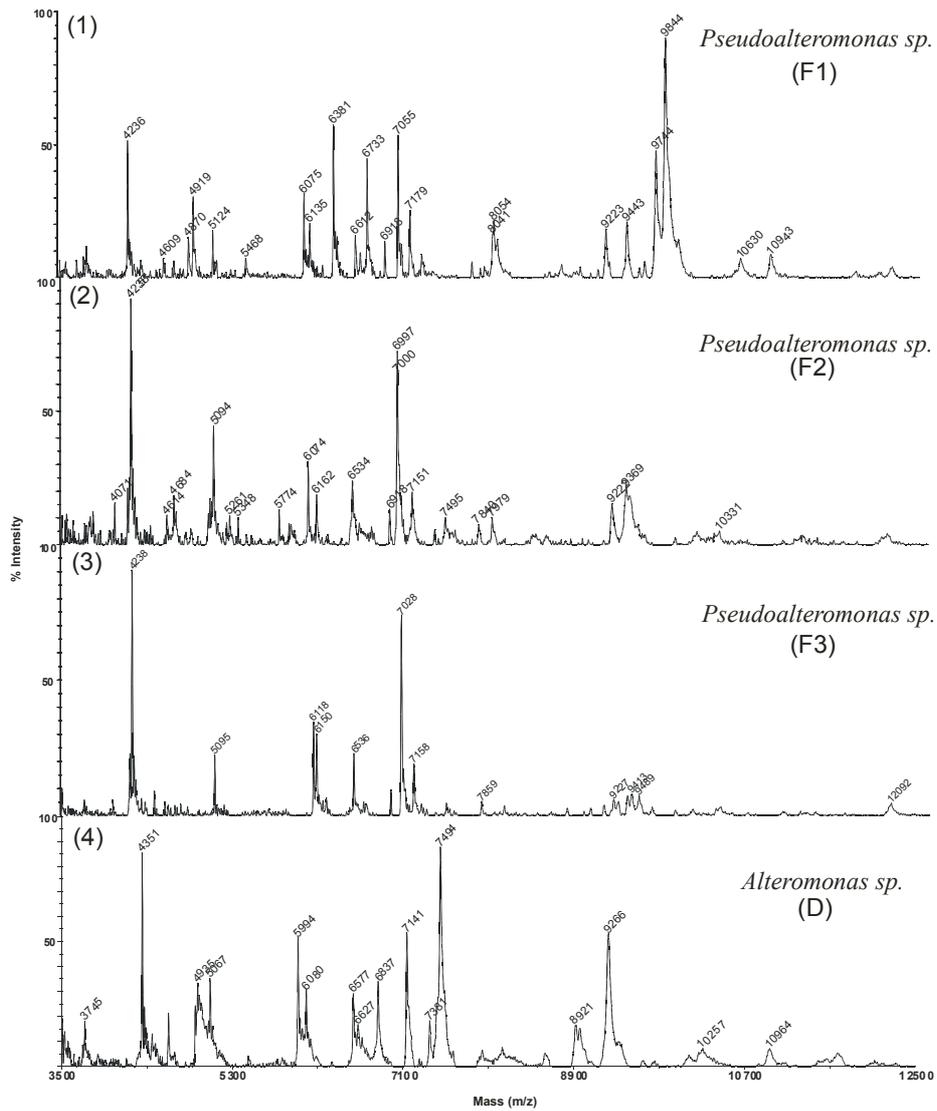


Abb. 3 MALDI-TOF MS Fingerprintanalysen verschiedener bakterieller Isolate der Gattung *Pseudoalteromonas* und *Alteromonas*.

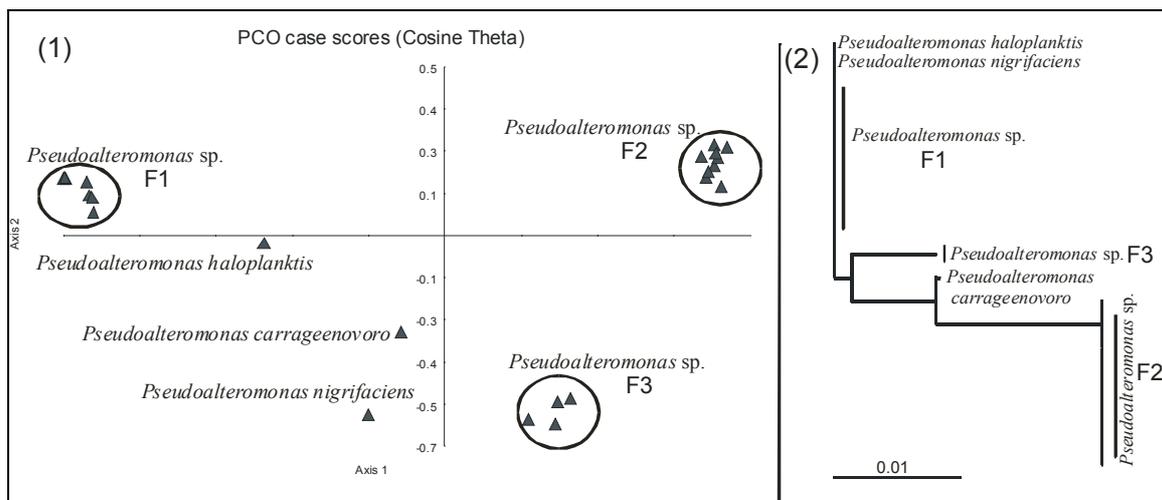


Abb. 4 (1) Scatter-Plot basierend auf der PCO-Analyse von Biomarker-Sets ausgewählter *Pseudoalteromonas* Isolate und Referenzstämmen (2) Phylogenetischer Stammbaum der die Verwandtschaft der *Pseudoalteromonas* Spezies veranschaulicht.

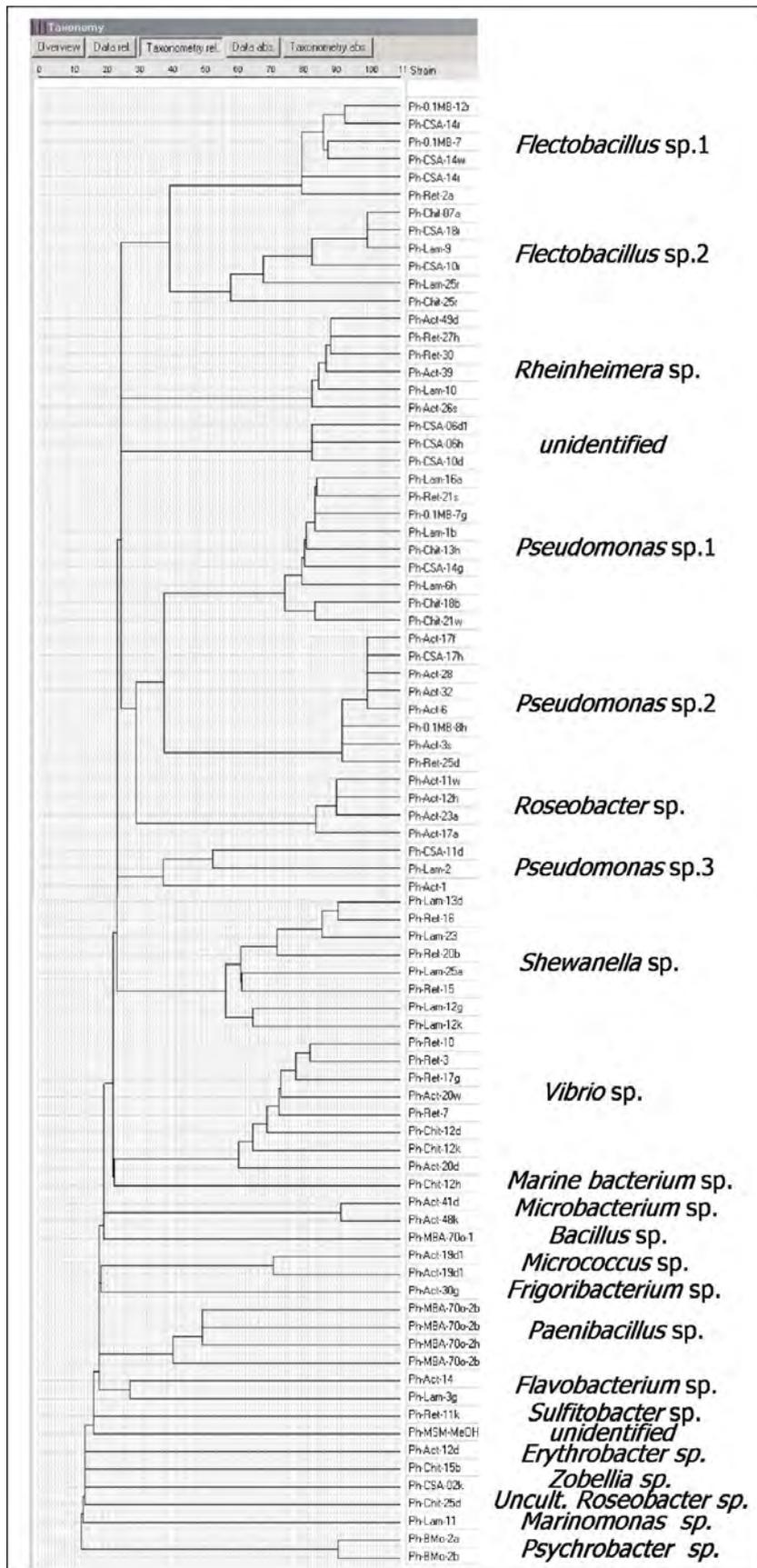


Abb. 5 MALDI-TOF MS-basiertes Dendrogramm eines Subsets der Stammsammlung von Begleitbakterien des Schwammes *Phakellia ventilabrum*. Das Dendrogramm wurde mit Hilfe des Taxonomy features der Anagnostec Saramis Software erstellt.

Mit Hilfe der Clusterung der MS-Daten unterschiedlichster Gattungen, wie am Beispiel eines Subsets der Stammsammlung aus *Phakellia ventilabrum* gezeigt (Abb.5), konnten Mehrfachisolate rasch identifiziert werden und seltene Isolate (im unteren Teil des Dendrogramms) identifiziert werden. Die Untergruppen stimmten dabei mit entsprechenden Clustern aus 16S rDNA Sequenzanalysen überein. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass durch diese Art der Vorgehensweise und Darstellung keine phylogenetischen Zusammenhänge ermittelt werden. Die relative Orientierung der MALDI-Gruppen zueinander reflektiert auf diesem Niveau nicht ihre evolutionäre Verwandtschaft, so dass bei Bedarf die phylogenetische Positionierung unbekannter Cluster mit Hilfe z.B. der 16 S rDNA Sequenzierung ausgewählter Gruppenrepräsentanten erfolgen muss.

Zur Identifizierung der Fingerprint-Signale und Zuordnung zu bekannten Proteinen wurden Referenzstämme genomsequenzierter Mikroorganismen massenspektrometrisch untersucht und durch Suche in Sequenzdatenbanken mögliche Proteintargets identifiziert. Dabei zeigte sich, wie an den Beispielen von *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt (Abb.6), dass die meisten der signifikanten zuordbaren Biomarker bei der Intakt-Zellen-MALDI-TOF Massenspektrometrie ribosomalen Proteinen zugeordnet werden können, während keine Biomarker aus der Membranproteinfraktion detektierbar waren. Ribosomale Proteine machen einen grossen Teil des Gesamtproteingehalts bakterieller Zellen aus, und viele dieser Proteine liegen im untersuchten Massenbereich und sind relativ basisch - eine Eigenschaft, die ihr Protonierung und massenspektrometrische Detektion fördert. Präparationen der Ribosomenfraktion von *E.coli* wiesen entsprechend einen Grossteil der bei der Intaktzellen-MALDI-TOF Massenspektrometrie detektierten Marker auf. Die gezielte Fraktionierung der Biomarkerproteinen mariner Mikroorganismen gelang nach Filtrationskonzentrierung durch Microcon-YM-3 Filter (Amicon, 3 kDa cutoff) und anschliessender HPLC-offline MALDI Detektion.

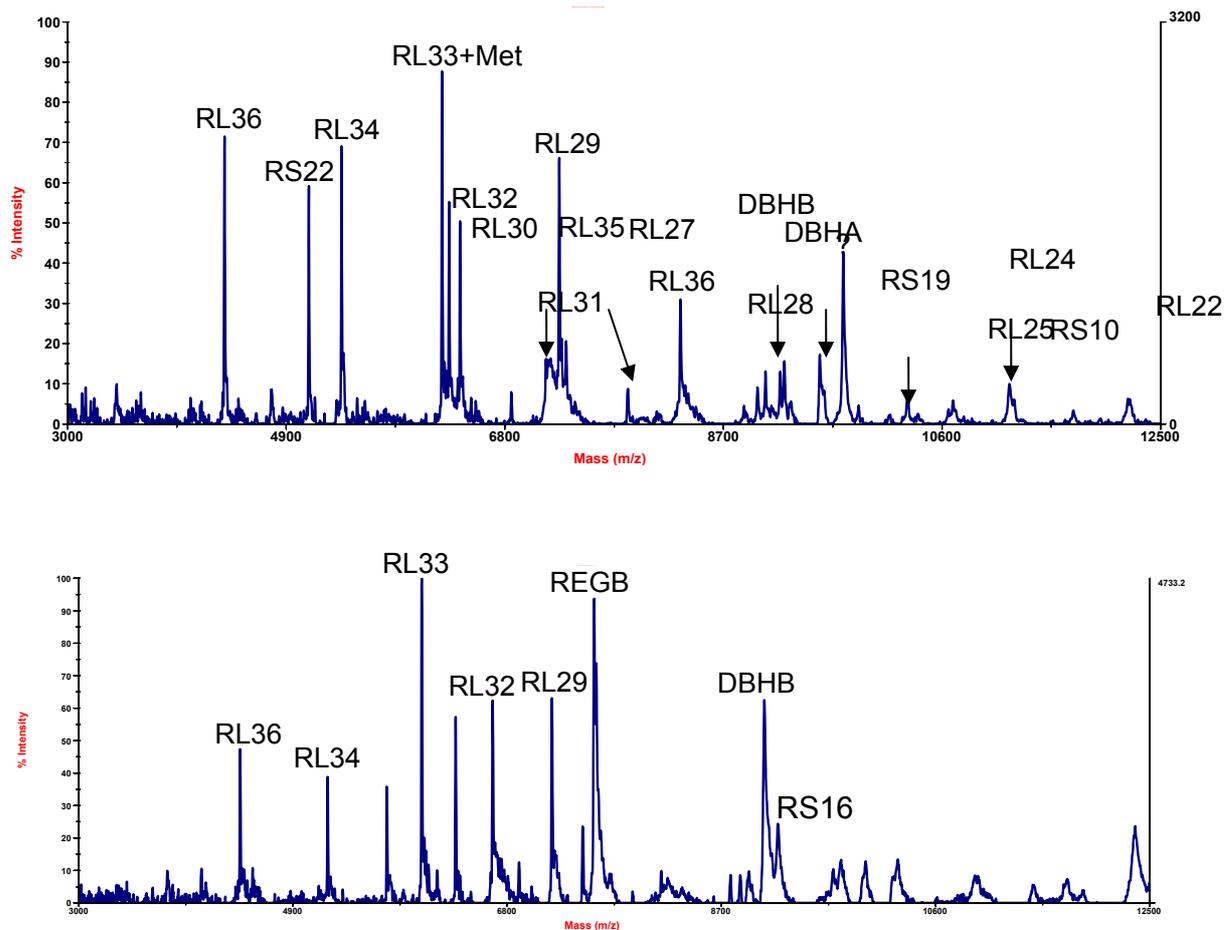


Abb. 6 MALDI-TOF MS Spektren von *Escherichia coli*- (oben) und *Pseudomonas aeruginosa* Zellen (unten) mit Zuordnung der Biomarkerproteine zu bekannten ribosomalen Proteinen der grossen (50S,RL) und kleinen (30S, RS) Untereinheiten. (DBH:DNA-Binding-Protein HU)

Die massenspektrometrische Analyse von komplexem Schwammmaterial unterschiedlicher Spezimen deutet darauf hin, dass die Methode auch zur Identifizierung komplexer Systeme geeignet ist (Abb. 7). Die geringere Datenbasis erlaubte hier jedoch noch keine verallgemeinernden Aussagen.

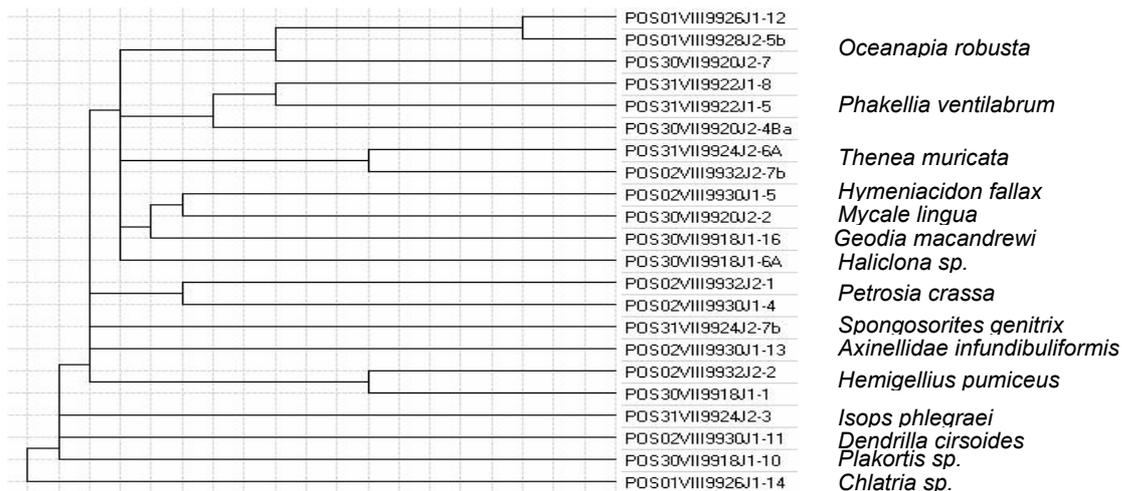
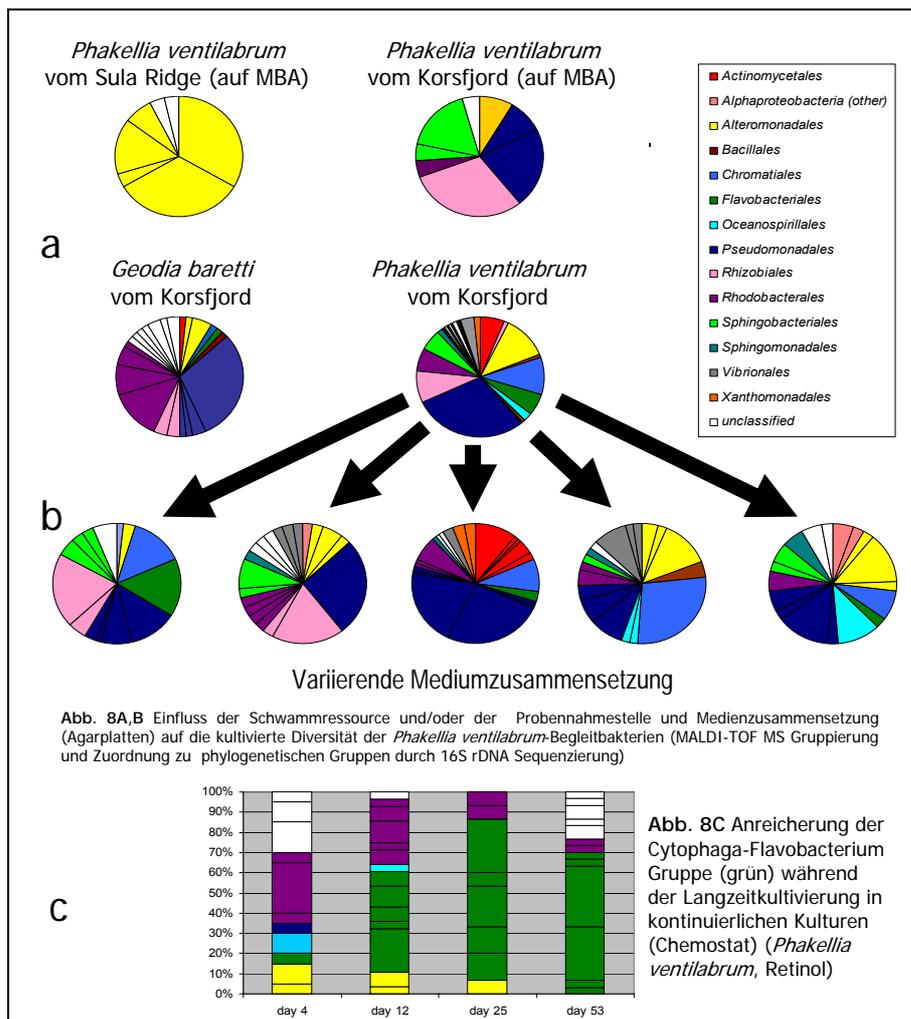


Abb. 7 MALDI-TOF MS Gruppierung mariner Schwämme

Die massenspektrometrische Charakterisierung schwamm-assoziiierter Mikroorganismen und der Aufbau einer MS Datenbank erlaubte eine schnelle Beurteilung der Diversität der kultivierbaren Mikroorganismen in Bezug auf Kriterien wie Isolierungsbedingungen und –strategien, Schwammressourcen, geographische Lage, Meerestiefe, Bioaktivitäten etc. Dies ist anhand einiger Beispiele in Abb. 8 exemplarisch verdeutlicht. Auf Basis dieser Analysen konnten somit Aussagen über die isolierte mikrobielle Diversität unterschiedlicher Schwämme bzw. Probennahmenstellen getroffen (Abb. 8a) und Isolierungsstrategien (z.B. Medienzusammensetzungen) innerhalb des Projekts beurteilt und optimiert und werden (Abb. 8b). So führte die Kultivierung in kontinuierlichen Kulturen zu einer Anreicherung der Cytophaga-Flavobakterien-Gruppe, die zur Isolierung einer Reihe von Mikroorganismen mit interessantem Naturstoffpotential führte (Abb. 8c). Die Auswirkungen der unterschiedlichen Isolierungsstrategien werden am deutlichsten an der Gruppe der Pseudoalteromonaden, die in der ersten Projektphase mit fast 50% der Isolate stark dominierten, während sie in der zweiten Projektphase nur noch mit unterhalb von 5% der Isolate vertreten waren. Verbunden mit der erhöhten mikrobiellen Vielfalt und dem Auftreten von in der ersten Phase nicht isolierter Gattungen (wie Rheinheimera, Psychrobacter, Rhodobacter) war auch eine erhöhte Anzahl von Isolaten mit auffälliger Naturstoffproduktion zu verzeichnen (2-5 %). Eine ausführliche Darstellung der mikrobiellen Zusammensetzung der Schwamm-Bakterienökosysteme und der Isolierungsstrategien erfolgte in Zusammenarbeit mit Teilprojekt 4 und wird dort gesondert behandelt.



Die Erfassung mariner Metabolite aus Porifera und ihren Begleitorganismen erfolgte routinemässig im Zuge der Analyse des Fingerprint-Bereichs aller isolierter Mikroorganismen und verfügbarer Schwammproben. Abb. 9 zeigt Metabolitenspektren einer Auswahl von marinen Mikroorganismen. Einige Isolate gleicher Gattung zeigten ähnliche Spektren, wobei sich die Intensitäten einzelner Peaks unterscheiden können, aber auch ihre Präsenz. Substanzpeaks mit ausreichender Intensität wurden durch PSD/CID-Fragmentierung analysiert, um erste Strukturinformationen zu erhalten (Abb. 10). Diese Analysen ermöglichten das Wiederfinden typischer Strukturmerkmale unbekannter Verbindungen wie die Detektion von Aminosäurebausteinen von Peptiden (Abb. 10, oben) die Identifikation von strukturverwandten Substanzpeaks (Abb.10, Mitte und unten), sowie die Verifizierung bekannter Substanzpeaks mit Hilfe von Datenbank-Suchen (Dictionary of natural Products, MarinLit). Damit ermöglichte der Vergleich der Spektren eine Vorselektion von Stämmen. Stämme wurden anhand ihrer Gruppenzuordnung und der Beurteilung ihrer

niedermolekularen Metaboliten-Pattern, sowie anhand ihrer Zugehörigkeit zu interessanten phylogenetischen (Kooperation mit TP4) für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die MS-Daten wurden computergestützt ausgewertet, zunächst mit verfügbaren Programmen, die für andere Zwecke konzipiert waren, später komfortabler mit der eigens für diese Anwendung zeitlich parallel zum BOSMAN-Projekt entwickelten Software Anagnostec SARAMIS (Spectral ARchiving and Microbial Identification System, Anagnostec GmbH, Luckenwalde). Die so erstellte MS-Datenbank mariner Mikroorganismen aus Schwämmen enthält zur Zeit Daten von ca. 1800 mikrobiellen Proben und beinhaltet etwa 6000 Spektren.

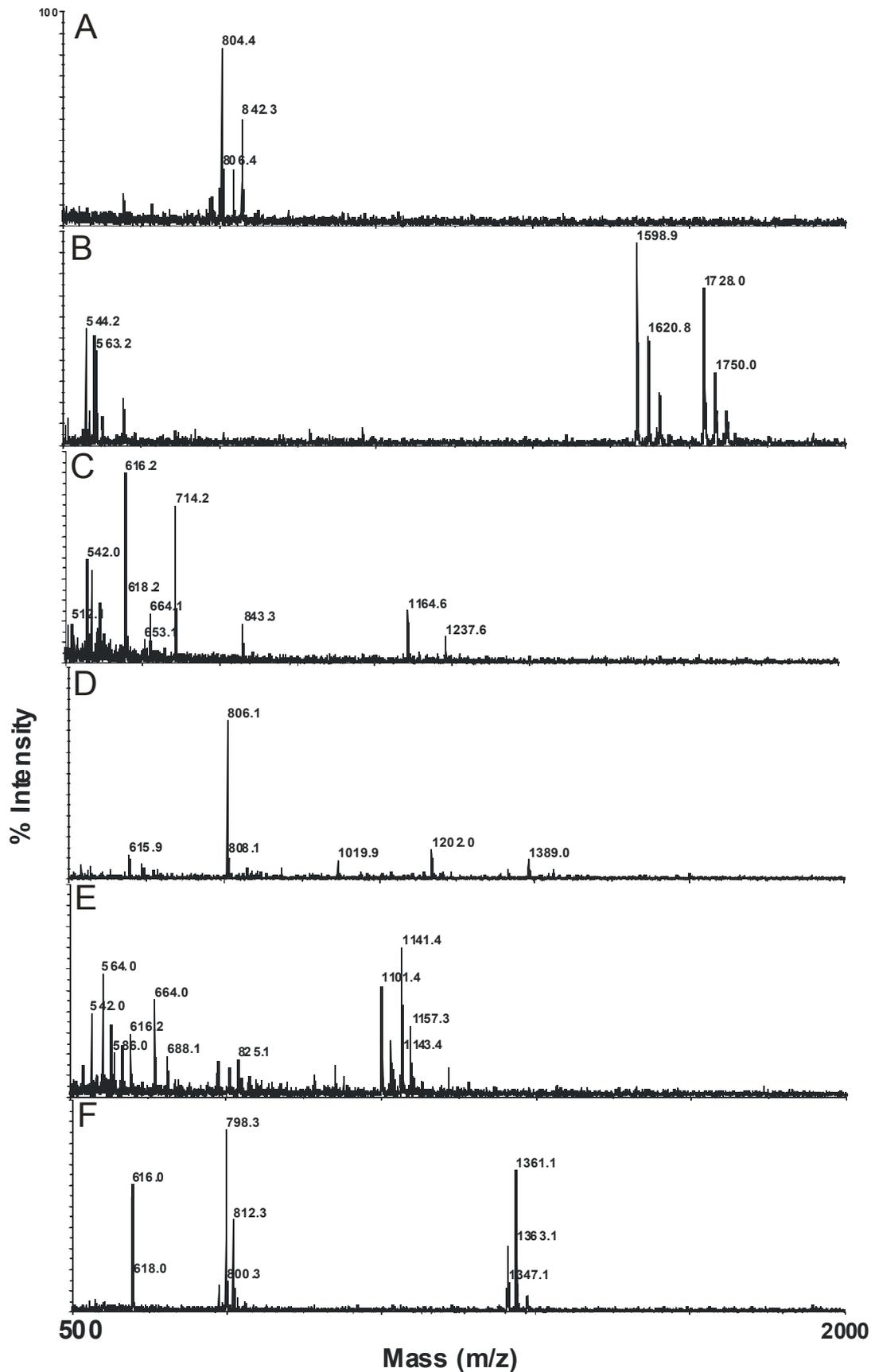


Abb. 9 MALDI-TOF MS Spektren mariner schwamm-assoziiierter Mikroorganismen (Sekundärmetabolitbereich): A: *Bacillus* sp., Arktis; B: *Psychroserpens* sp., *Phakellia ventilabrum*, Reaktoranzucht; C: *Rheinheimera* sp., *Phakellia ventilabrum*; D: *Paenibacillus* sp., *Phakellia ventilabrum* nach 70°C Hitzeschock; E: *Cyclobacterium* sp., *Phakellia ventilabrum*; E: *Paenibacillus* sp., *Phakellia ventilabrum* nach Frostschock.

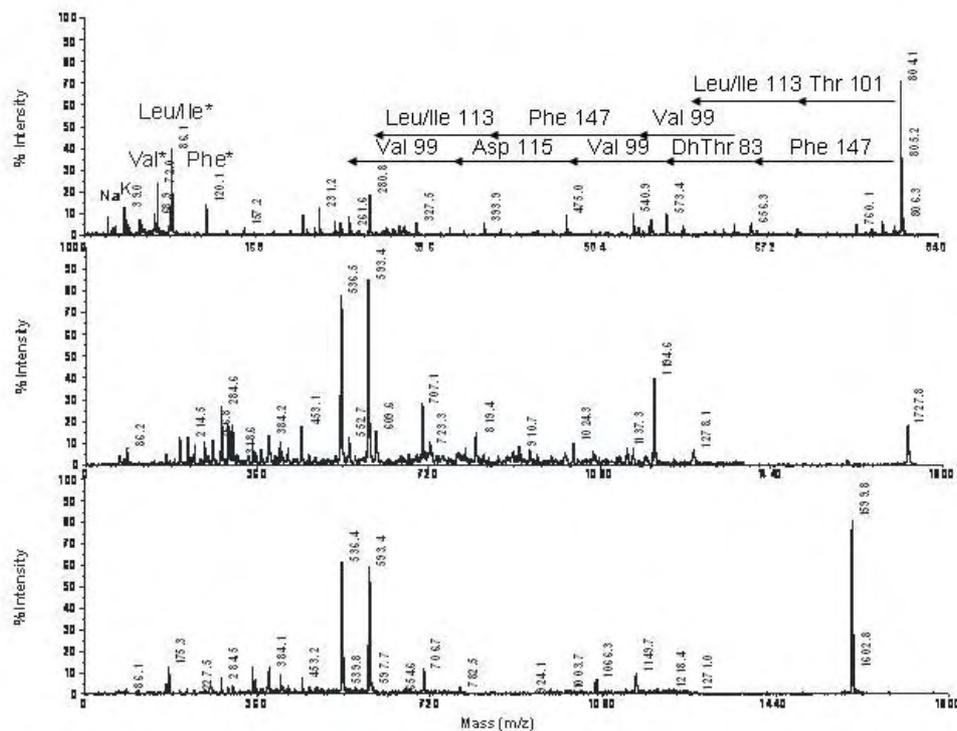


Abb. 10 MALDI-TOF-PSD (Post-Source-Decay) Spektren ausgewählter Substanzpeaks aus *Bacillus* sp., Arktis (oberes Spektrum) und *Psychroserpens* sp., *Phakellia ventilabrum*, Reaktoranzucht (vgl. Abb.9 A-B).

Für die biologische Testung wurden 189 Isolate anhand von phylogenetischen und MALDI-TOF MS Daten ausgesucht durch die Kooperationspartner (IBWF, Kaiserslautern) und die Firma Onkogen biologischen Tests unterworfen, darunter Tests auf antimikrobielle Aktivität, fungizide Wirkung, Cytotoxizitätstests, Nematodeninhibitionstests, sowie Phytotoxizitätstests. Die Hitrate in den biologischen Tests war im Vergleich zu vergleichweisen Screenings durch Methoden der Vorauswahl stark erhöht. Insgesamt konnten in ca 72% der getesteten Bakterienstämme biologische Aktivitäten nachgewiesen werden. Ausgewählte Isolate wurden anschliessend durch chemische Teilprojektpartner (TP6) der Naturstoffisolierung und –aufklärung unterzogen. Abb. 11 zeigt eine Verteilung der auf Basis der MALDI-TOF MS Daten klassifizierten und durch 16S rDNA Analyse taxonomisch eingeordneten bakteriellen Ordnungen der Isolate zu gefundenen Bioaktivitäten.

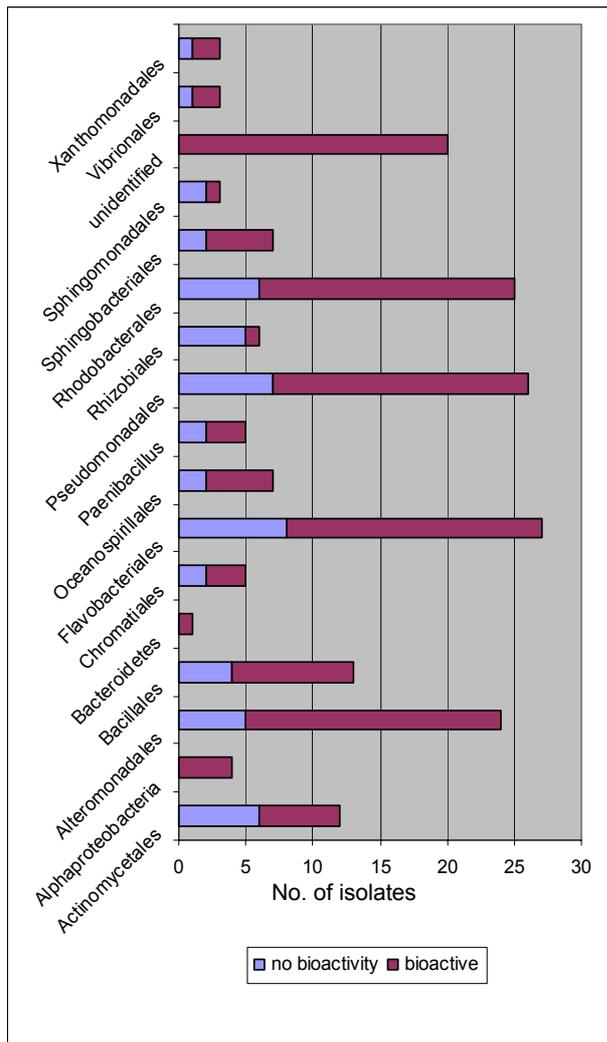


Abb. 10 Verteilung der Bioaktivitäten mikrobieller Extrakte auf taxonomische Ordnungen.

- Aufgrund phylogenetischer Daten, Biotestergebnissen und MALDI-TOF MS Charakterisierung wurden 39 Bakterienisolate für genauere Analysen ausgewählt. In Zusammenarbeit mit TP5 wurden die bakteriellen Isolate in Flüssigmedien angezogen und das Wachstumsverhalten von sechs ausgewählten Isolaten untersucht und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie verfolgt, darunter ein bioaktives Isolat der Gattung *Psychroserpens*, dessen MALDI-TOF Analyse in Abb. 9b und 10 gezeigt ist. Die Ergebnisse gehen in geplante Veröffentlichungen zur Isolatbeschreibung ein (siehe Geplante Veröffentlichungen). Extrakte aus grösseren Anzuchten wurden mittels MALDI-TOF MS unter Verwendung des Post-Source-Decay-Fragmentierungs-Modus, sowie mittels ESI-MS(n)-Analysen nach chromatographischer Fraktionierung durch HPLC analysiert.

Die Anwendbarkeit der analytischen Methode konnten wir auch bei marinen Organismen wie Tunikaten demonstrieren. So wurde die Alkaloidverteilung in vier verschiedenen Farbvarianten der Ascidie *Cystodytes dellechiaiei* mittels MALDI-TOF MS analysiert, um den Zusammenhang zwischen Sekundärmetabolitproduktion und intra-spezies Variabilität zu beleuchten. Verschiedene Chemotypen wurden gefunden, die unterschiedliche Zusammensetzungen von Schwefel-enthaltenden Pyridoacridinen wie Shermilamine B (m/z 391) und Kuanoniamine D (m/z 361) und deren de-azetylierten Derivaten oder C10-unsubstituierte Pyridoacridine wie Ascididemin (m/z 286) und 11-Hydroxyascididemin (m/z 301) enthalten (Abb. 11). Die chemischen Unterschiede legen eine Neueinordnung des taxonomischen Status dieser Spezies nahe und zeigen, dass bei der Naturstoffsuche aus marinen Organismen eine detaillierte Beschreibung der Morphotypen wichtig ist

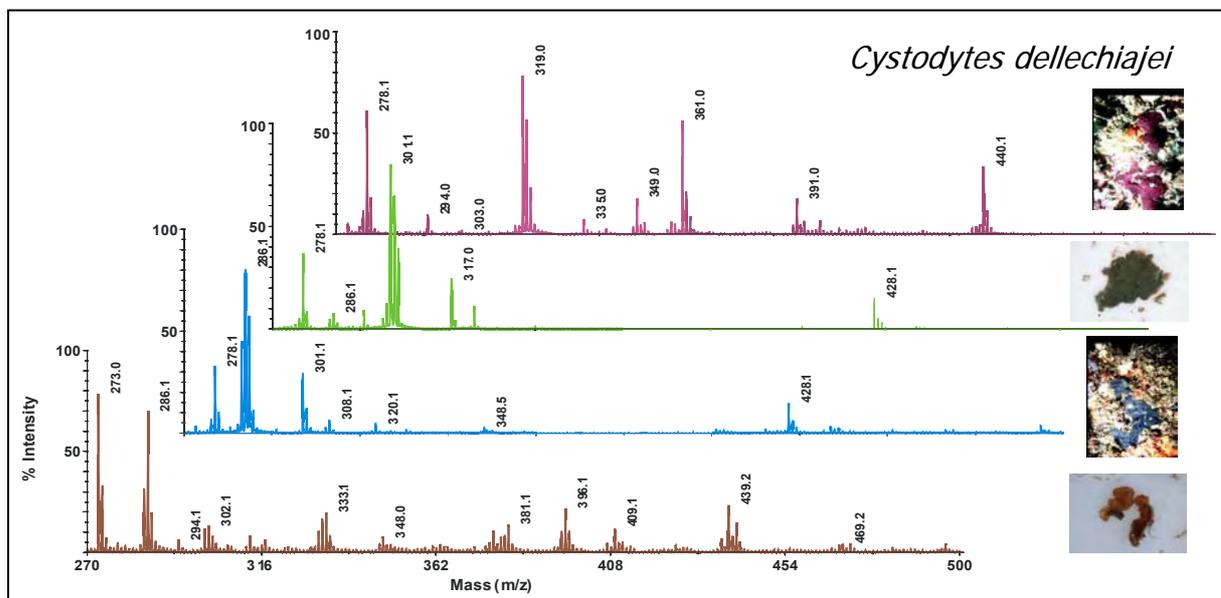


Abb. 11 „Intaktzellen“-MALDI-TOF MS Naturstoffpattern verschiedener Farbvarianten der Ascidie *Cystodytes dellechiaiei*

Demgegenüberergab die Untersuchung zweier *Axinella* Spezies (*Axinella damicornis* und *A. verrucosa*) identische Naturstoffpattern. Beide Schwämme produzieren Verbindungen mit Peakpattern, die charakteristisch für halogenierte Verbindungen sind (z.B. Hymenialdisine (m/z 324) and Oroidin (m/z 388)) (Abb. 12).

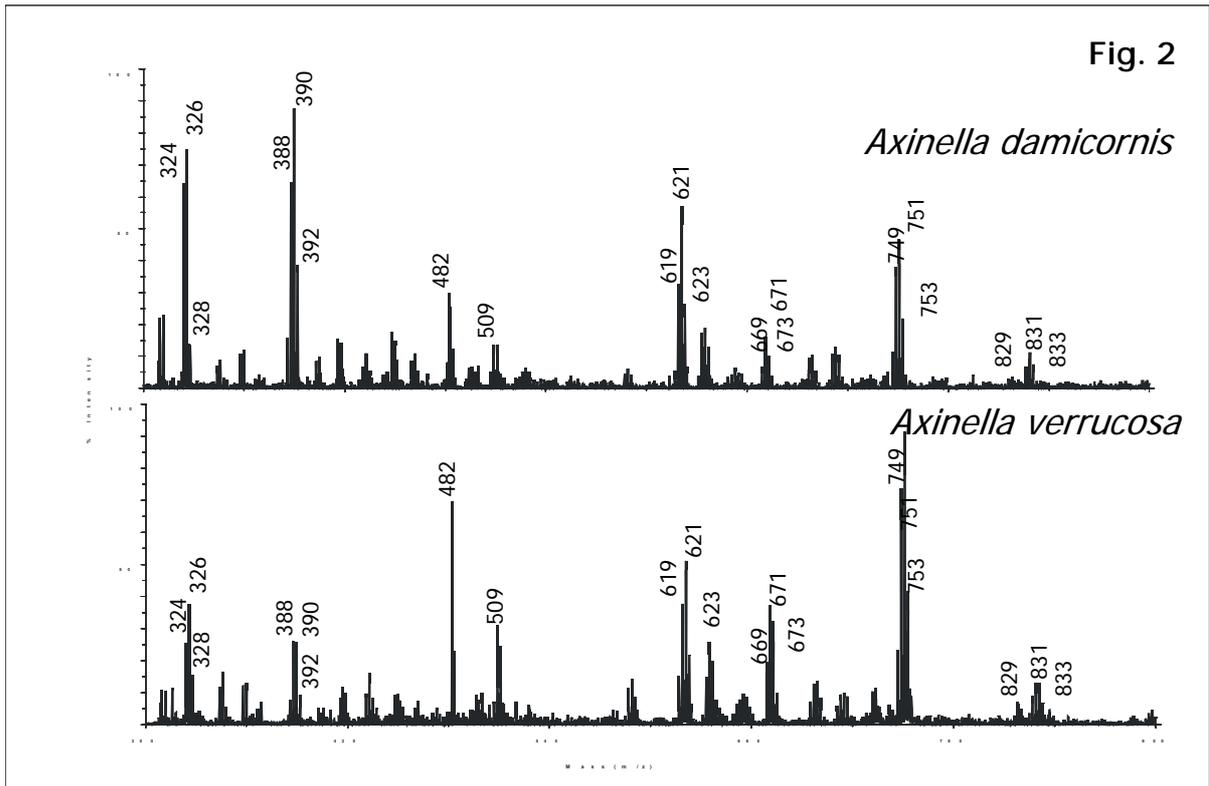
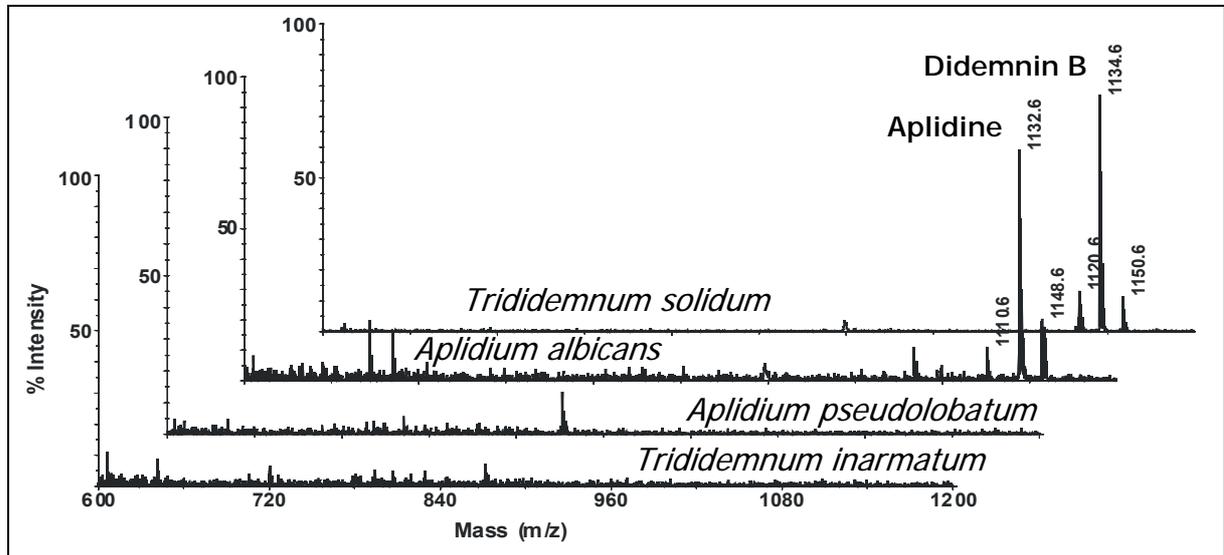


Abb. 12 „Intaktzellen“-MALDI-TOF MS Naturstoffpattern von *Axinella damicornis* und *A. verrucosa*.

Die Analyse verschiedener Spezies der Gattungen *Aplidium* und *Trididemnum* ermöglichte das Screening nach strukturverwandten Peptiden der Aplidinklasse in marinen Tunikaten mittels MALDI-TOF MS in Kombination mit Post-Source-Decay-Fragmentierung ausgewählter Substanzpeaks (Abb.13a,b).

A)



B)

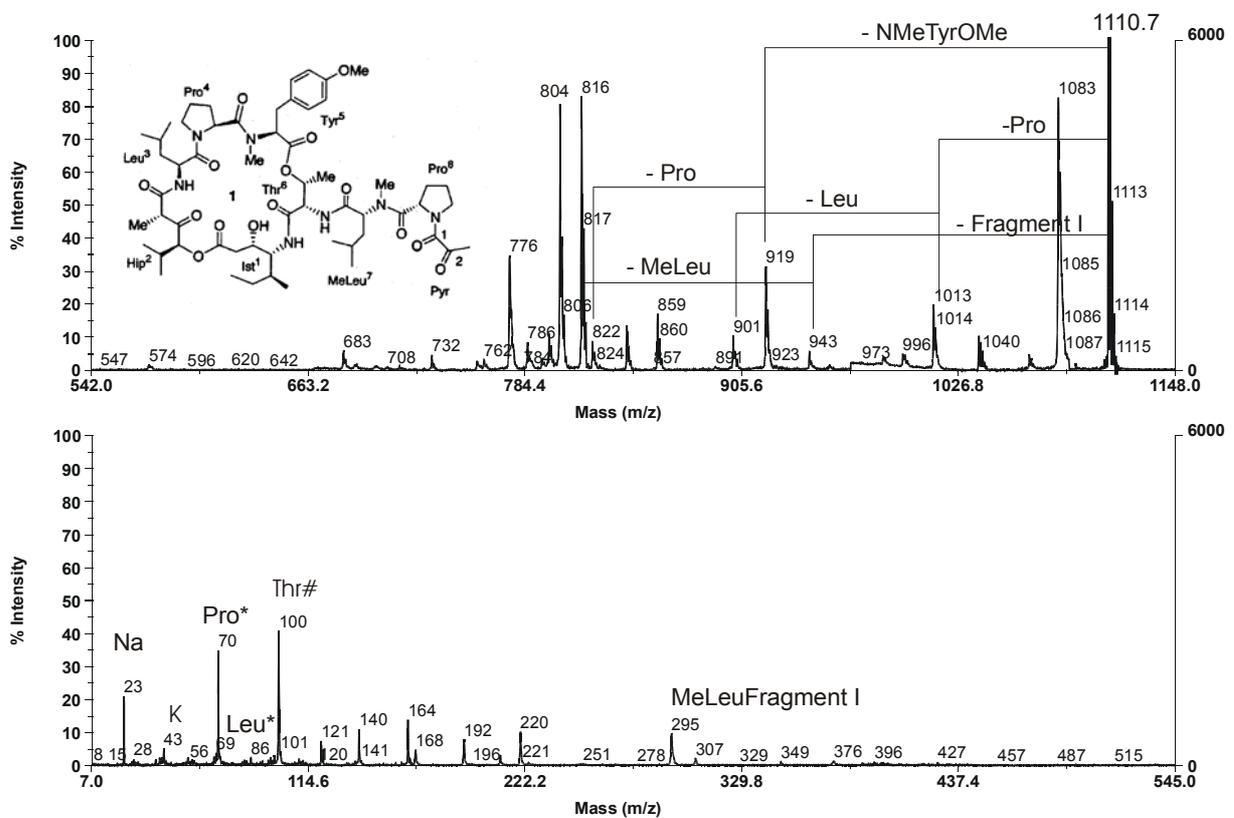


Abb. 13 „Intaktzellen“-MALDI-TOF MS Naturstoffmuster von Tunikaten der Gattungen *Aplidium* und *Trididemnum* (A) und PSD-Fragmentierung von *Aplidium* (m/z 1110; (M+H)⁺)

Verwertbarkeit der Ergebnisse

Durch die Arbeiten wurden eine grosse Anzahl an partiell charakterisierten Schwammextrakten und Bakterienisolaten erschlossen, die für weitere Screenings zur Verfügung gestellt werden können. Solche Screenings betreffen sowohl Wirkstoffe als auch Enzyme, aber auch andere Inhaltsstoffe, wie z.B. Polymere. Durch das Projekt wurden insbesondere auch methodische Strategien entwickelt, die für industrielle marine Erschliessungsprojekte von erheblichem Nutzen sind. Die Identifizierung von Mikroorganismen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie, wie auch die schnelle und direkte Detektion von Metaboliten können neben der Anwendung in der Naturstoffisolierung auch für Dienstleistungsunternehmen in der medizinischen Diagnostik und Toxinanalytik von Bedeutung sein. Die Firma Anagnostec, ein Spin-Off unserer Arbeitsgruppe, hat vor kurzem ein Softwarepaket auf den Markt gebracht, mit dessen Hilfe die grossen massenspektrometrischen Datenmengen sowohl verwaltet als auch bezüglich der Klassifizierung der Mikroorganismen ausgewertet werden können.

Fortschritt anderer Stellen auf diesem Gebiet

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie gehört zu den wichtigsten Analyseverfahren komplexer biologischer und medizinischer Fragestellungen. Im Berichtszeitraum haben auch eine Reihe anderer Labors wesentliche Beiträge zur Intaktzellen- MALDI-TOF Massenspektrometrie (ICMS) erarbeitet, sowohl zur Identifizierung von Prokaryonten als auch zur Bestandsaufnahme deren Inhaltsstoffe. Grundlegende Fragestellungen wie der Einfluß von Kultivierungsparametern (Valentine et al., 2005, Wunschel et al., 2005a), und der Vergleich unterschiedlicher Massenspektrometer (Wunschel et al., 2005b) wurden erneut diskutiert. Immer mehr Untersuchungen bestätigen die Reproduzierbarkeit und Robustheit der ICMS bei der Identifizierung kleinster Mengen von Bakterien (ab 100 bis 1000), die damit vielfältige Anwendungen in ökologischen Fragestellungen (Pabel et al, 2003, Welker et al., 2004, Ruelle et al., 2004), mikrobiologischen Arbeiten (Krader et al 2004) bis hin zur Detektion potentieller Biowaffen (Dickinson et al 2004a,b) gefunden hat. Die Korrelation von Bakterien-Fingerprints mit phylogenetischen Daten hat inzwischen auch zum Einsatz der ICMS in Stammsammlungen geführt (Stackebrandt et al 2005, Kroppenstedt et al 2005). Die Verbesserung von Auswerteverfahren der Massenspektren durch Standardisierung und Biomarkerselektion (Wang et al 2002, Pineda et al 2003, Satten et al 2004) wird in absehbarer Zeit zum Einsatz in klinischer Diagnostik führen (Key et al 2004). Der Einsatz selektiver Adsorptions- und Trennverfahren ermöglicht die Analytik von Mischkulturen (Lin et al 2005, Madonna et al 2003). Weitere Verbesserungen sind durch Fourier transform massenspektrometrische Techniken möglich (Jones et al. 2003, 2004). Auch in der Metabolit-Detektion wurde ICMS erfolgreich eingesetzt, wobei diese Arbeiten weitgehend auf Fingerprints und phylogenetische Zusammenhänge verzichten (Hindre et al 2003, Sobolevskaya et al 2003, Jones et al 2004, Madonna et al 2003, Ishida et al 2002). Der erfolgreiche Einsatz von ICMS in Metabolit-Screenings an terrestrischen Bacilli wurde ebenfalls beschrieben (Vater et al 2003).

ICMMS Reproduzierbarkeit , Spezifität, Methodisches
Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, Valentine NB, Wahl KL, Schauki D, Jackman J, Nelson CP, White E 5th. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. J Am Soc Mass Spectrom. 2005 Apr;16(4):456-62.
Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2005 Jan;71(1):58-64.

<p>Wunschel DS, Hill EA, McLean JS, Jarman K, Gorby YA, Valentine N, Wahl K. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization whole cell protein fingerprints. <i>J Microbiol Methods</i>. 2005 Sep;62(3):259-71.</p>
<p>Demirev PA. Enhanced specificity of bacterial spore identification by oxidation and mass spectrometry. <i>Rapid Commun Mass Spectrom</i>. 2004;18(22):2719-22.</p>
<p>ICMMS aus Mixture</p>
<p>Lin YS, Tsai PJ, Weng MF, Chen YC Affinity capture using vancomycin-bound magnetic nanoparticles for the MALDI-MS analysis of bacteria. <i>Anal Chem</i>. 2005 Mar 15;77(6):1753-60.</p>
<p>Madonna AJ, Van Cuyk S, Voorhees KJ. Detection of Escherichia coli using immunomagnetic separation and bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. <i>Rapid Commun Mass Spectrom</i>. 2003;17(3):257-63.</p>
<p>ICMMS zur Detektion von niedermolekularen Verbindungen</p>
<p>Hindre T, Didelot S, Le Pennec JP, Haras D, Dufour A, Vallee-Rehel K. Bacteriocin detection from whole bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. <i>Appl Environ Microbiol</i>. 2003 Feb;69(2):1051-8.</p>
<p>Sobolevskaya MP, Smetanina OF, Speitling M, Shevchenko LS, Dmitrenok PS, Laatsch H, Kuznetsova TA, Ivanova EP, Elyakov GB. Controlling production of brominated cyclic depsipeptides by <i>Pseudoalteromonas maricaloris</i> KMM 636T. <i>Lett Appl Microbiol</i>. 2005;40(4):243-8.</p>
<p>Jones JJ, Stump MJ, Fleming RC, Lay JO Jr, Wilkins CL. Strategies and data analysis techniques for lipid and phospholipid chemistry elucidation by intact cell MALDI-FTMS. <i>J Am Soc Mass Spectrom</i>. 2004 Nov;15(11):1665-74.</p>
<p>Vater J, Gao X, Hitzeroth G, Wilde C, Franke P. "Whole cell"--matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, an emerging technique for efficient screening of biocombinatorial libraries of natural compounds-present state of research. <i>Comb Chem High Throughput Screen</i>. 2003 Sep;6(6):557-67. Review.</p>
<p>Madonna AJ, Voorhees KJ, Taranenko NI, Laiko VV, Doroshenko VM. Detection of cyclic lipopeptide biomarkers from <i>Bacillus</i> species using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. <i>Anal Chem</i>. 2003 Apr 1;75(7):1628-37.</p>
<p>Ishida Y, Madonna AJ, Rees JC, Meetani MA, Voorhees KJ. Rapid analysis of intact</p>

phospholipids from whole bacterial cells by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry combined with on-probe sample pretreatment. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(19):1877-82.

ICMMS zur Charakterisierung und Klassifizierung von Bakterien

Stackebrandt E, Pauker O, Erhard M. Grouping myxococci (*Corallocooccus*) strains by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI TOF) mass spectrometry: comparison with gene sequence phylogenies. *Curr Microbiol.* 2005 Feb;50(2):71-7. Epub 2005 Feb 3.

Kroppenstedt RM, Mayilraj S, Wink JM, Kallow W, Schumann P, Secondini C, Stackebrandt E. Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 2005 Jun;28(4):328-39.

Auswertung Bioinformatics

Pineda FJ, Antoine MD, Demirev PA, Feldman AB, Jackman J, Longenecker M, Lin JS. Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal Chem.* 2003 Aug 1;75(15):3817-22.

Satten GA, Datta S, Moura H, Woolfitt AR, Carvalho Mda G, Carlone GM, De BK, Pavlopoulos A, Barr JR. Standardization and denoising algorithms for mass spectra to classify whole-organism bacterial specimens. *Bioinformatics.* 2004 Nov 22;20(17):3128-36. Epub 2004 Jun 24.

Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004 Sep;4(3):221-42.

Wang Z, Dunlop K, Long SR, Li L. Mass spectrometric methods for generation of protein mass database used for bacterial identification. *Anal Chem.* 2002 Jul 1;74(13):3174-82.

Instrumental

Jones JJ, Stump MJ, Fleming RC, Lay JO Jr, Wilkins CL. Investigation of MALDI-TOF and FT-MS techniques for analysis of *Escherichia coli* whole cells. *Anal Chem.* 2003 Mar 15;75(6):1340-7. Erratum in: *Anal Chem.* 2004 May 15;76(10):2981

Environmental Microbiology

Ruelle V, Moualij BE, Zorzi W, Ledent P, Pauw ED. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(18):2013-9.

Welker M, Brunke M, Preussel K, Lippert I, von Dohren H. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. *Microbiology*. 2004 Jun;150(Pt 6):1785-96.

Krader P, Emerson D. Identification of archaea and some extremophilic bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Extremophiles*. 2004 Aug;8(4):259-68. Epub 2004 Mar 20.

Pabel CT, Vater J, Wilde C, Franke P, Hofemeister J, Adler B, Bringmann G, Hacker J, Hentschel U. Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar Biotechnol (NY)*. 2003 Sep-Oct;5(5):424-34.

Klinische Mikrobiologie und Biowaffen

Dickinson DN, La Duc MT, Satomi M, Winefordner JD, Powell DH, Venkateswaran K. MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores. *J Microbiol Methods*. 2004 Jul;58(1):1-12. K.

Dickinson DN, La Duc MT, Haskins WE, Gornushkin I, Winefordner JD, Powell DH, Venkateswaran K. Species differentiation of a diverse suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry-based protein profiling. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Jan;70(1):475-82.

Veröffentlichungen im Berichtszeitraum

S. Sölter, R. Dieckmann, M. Blumenberg, W. Francke (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.*, 43, 3385-3386.

H. von Döhren, R. Dieckmann, I. Kaesler, W. Wenzel, I. Graeber, T. Schwecke, T. Neuhof, M. Erhard, U. Szewzyk. Search for natural products in marine environments, IXth ESMB conference on Marine Biotechnology Nantes, Frankreich, 2002.

H. von Döhren, R. Dieckmann, I. Kaesler, T. Schwecke, M. Erhard, W. Wenzel, I. Graeber, U. Szewzyk. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in the screening for natural products in marine environments. Natural Products from marine microorganisms, Greifswald, 2002.

H. von Döhren and R. Dieckmann (2003) Marine Biotechnology. In *Euro-Biotech Magazine for Biotechnology, Gentech, Pharmacy*, Verlag Büro für Publizistik, Neckarzimmern, Germany, 42-45.

R. Dieckmann, I. Kaesler, I. Graeber, U. Szewzyk and H. von Döhren. Rapid screening and dereplication of microbial isolates from marine sponges by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry. 16th International Mass Spectrometry Conference, Edinburgh, Schottland, 2003.

I. Graeber, I. Kaesler, R. Dieckmann, H. von Döhren, U. Szewzyk (2003/2004) Sponge associated bacteria from boreal sponges. In: M. Pansini, R. Pronzato, G. Bavestrello, G. Manconi (ed) *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell' Università di Genova*. Sponge science in the new millennium, 68: 357-363.

A. Etchegaray, E. Rabelo, R. Dieckmann, D.H. Moon, M.F. Fiore, H. von Döhren, S.M. Tsai, B.A. Neilan (2004) Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella sp.* CENA 19. *J. Appl. Phycol.* 16 (3): 237-243.

W. Kallow, R. Dieckmann, M. Erhard, S. Sauermann (2004) Method for the identification of microorganisms by mass spectrometry. *Eur. Pat. Appl.*, 26 pp. CODEN: EPXXDW EP 1437673 A1 20040714.

R. Dieckmann, I. Kaesler, I. Graeber, U. Szewzyk, H. von Döhren. Characterisation of microbial communities isolated from boreal sponges using MALDI-TOF mass spectrometry. VAAM Jahrestagung, Braunschweig, 2004 and 3. Statusseminar "Marine Naturstoffforschung" des BMBF, Frankfurt, 2004.

I. Graeber, I. Kaesler, R. Dieckmann, H. von Döhren, U. Szewzyk. Sponge associated bacteria from boreal sponges – Sources of marine natural products. 3. Statusseminar "Marine Naturstoffforschung" des BMBF, Frankfurt, 2004.

R. Dieckmann, S. López-Legentil, X. Turon, H. von Döhren. Direct rapid chemotyping of minute samples from tunicates, marine sponges and

associated bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry. XI International Symposium on Marine Natural products, Sorrento, Italien, 2004.

R. Dieckmann, I. Graeber, I. Kaesler, U. Szewzyk, H. von Döhren. Sponge associated bacteria from boreal sponges – sources of marine natural products. VAAM Meeting “Biology of bacteria producing natural products”, Jena, 2004.

S. López-Legentil, R. Dieckmann, X. Turon. The usefulness of genetics and secondary chemistry in assessing intraspecies variability: the colonial ascidian *Cystodytes dellechiajei*. XIII Iberian Symposium on Marine Benthos. Canary Islands, Spanien, 2004.

R. Dieckmann, I. Kaesler, I. Graeber, U. Szewzyk, H. von Döhren (2005) Rapid screening and dereplication of microbial isolates from marine sponges by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67(4):539-48.

T. Neuhofer, P. Schmieder, K. Preussel, R. Dieckmann, H. Pham, F. Bartl, H. von Döhren (2005) Hassalidin, a glycosylated Lipopeptide with antifungal activity from the cyanobacterium *Hassalia* sp., *J. Nat. Prod.*, 68: 695-700.

S. López-Legentil, R. Dieckmann, N. Bontemps-Subielos, X. Turon and B. Banaigs (2005) Chemical Variation in Alkaloids among colour morphs of *Cystodytes* (Ascidiacea) *Biochemical Systematics and Ecology*, im Druck.

H. von Döhren. Invited lecture: Mass spectrometric applications in natural product discovery, 4th European conference on marine natural products, Paris, 2005.

I. Kaesler, I. Graeber, M. Erhard, R. Dieckmann, U. Szewzyk H. von Döhren. Sponge Sponge-associated bacteria from boreal sponges, VAAM Jahrestagung, Göttingen, 2005.

Geplante Veröffentlichungen:

Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Isops phlegraei*

Kaesler I., Graeber I., Pape T., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Geodia baretii*

Graeber I., Kaesler I., Pape T., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Haliclona* sp.

Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov.,

sp. nov., marine bacteria isolated from the boreal sponge *Phakellia ventilabrum*

Kaesler I., Graeber I., Dieckmann R., von Döhren H., Szewzyk U.:
Cultivable microbes associated with boreal sponges from the Sula Ridge

Kaesler I., Graeber I., Dieckmann R., Borchert M., Nielsen P., Schäfer T., von Döhren H., Szewzyk U.: Continuous culture: a new enrichment method with oligotrophic conditions to isolate sponge-associated bacteria from *Geodia baretii*

Graeber I., Kaesler I., Dieckmann R., Borchert M., Nielsen P., Sjöholm C., von Döhren H., Szewzyk U.: Combining batch cultures and continuous cultures for culturing bacteria from the marine sponge *Phakellia ventilabrum*

Weitere Veröffentlichungen im Berichtszeitraum:

W. Kallow, M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. von Döhren (2002) Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS) - Evidence for a Second ATP-Binding Site, *Biochim. Biophys. Acta*, 1601, 93-99.

R. Dieckmann and T. Schwecke (2003) Modular Polyketide Synthases. In: *Biopolymers, Vol. 9: Miscellaneous Biopolymers and Biodegradation of Synthetic Polymers*, A. Steinbüchel, S. Matsumura (eds.) Wiley-VCH, Weinheim, 89-111.

M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. von Döhren (2004) ATPase activity of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, 83-91.

V. Bucevic-Popovic, R. Dieckmann, S. Orhanovic, M. Pavela-Vrancic (2004) Metal-Ion Induced Conformational Changes in Alkaline Phosphatase from *E.coli* Assessed by Limited Proteolysis and MALDI-TOF Analysis. *Biochimie*, 86, 351-423.

A. Berg, A. Härtl, B. Schlegel, C. Kubicek, W. Kallow, R. Dieckmann, M. Erhard, T. Neuhof, (2004) Neue Peptaibole mit neuroleptischer Wirkung. Appl. DE 10238697 A1 2004.03.11.

V. Bucevic-Popovic, M. Pavela-Vrancic, R. Dieckmann, H. von Döhren (2005) The Relationship Between Activating and Editing Functions of the Adenylation Domain of apo-Tyrociclin Synthetase 1 (apo-TY1), *Biochimie, im Druck*.

III. Erfolgskontrollbericht

III. 1 Beitrag zu förderpolitischen Zielen

Im Rahmen des BMBF Schwerpunktes „Marine Naturstoffe“ leistete das Verbundprojekt BOSMAN einen wesentlichen Beitrag durch die Erschließung der borealen Invertebraten. Im Teilprojekt *Naturstoffscreening und Syntheseleistungen in Kaltwasser-Porifera und ihren Symbionten* wurden im Sinne des Schwerpunktes Screening-Verfahren etabliert, die auf der Methodik der MALDI-TOF Massenspektrometrie beruhen.

III. 2 Ergebnis

Siehe ausführliche Beschreibung in Abschnitt II.

Als wesentliches Ergebnis wurden Verfahren erschlossen, die aus wenigen intakten Bakterienzellen sowohl niedermolekulare Substanzen detektieren, wie auch eine phylogenetisch gerichtete Dereplikation ermöglichen. Diese physikalischen massenspektrometrischen Methoden sind an Sensitivität und Geschwindigkeit allen bisher verwendeten Verfahren überlegen, und können in umfangreichen Bestandsaufnahmen in chemisch-biologischen wie auch ökologischen Projekten Anwendungen finden.

III. 3 Verwertungsplan

Wirtschaftlich:

Aufgrund der engen Zusammenarbeit mit der angeschlossenen Firma Anagnostec konnte diese Firma ihr Programm zur taxonomischen Einordnung von Isolaten mit Hilfe der MALDI-TOF-MS Analyse weiterentwickeln. Diese weiter entwickelte Software wird von Anagnostec für weitere Projekte eingesetzt bzw. kommerziell angeboten. Die Ergebnisse bezüglich bisher nicht weiterentwickelter Stämme der Stammsammlung (sh. Bericht Teilprojekt 4) stehen für weitere Verwertungen zur Verfügung.

Wissenschaftlich:

In diesem Projekt wurden wesentliche Ergebnisse erzielt hinsichtlich der Diversität schwammassoziierten Bakterien und ihrer Syntheseleistungen als vorläufig unidentifizierte Naturstoffe. Damit wurde ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis mariner borealer Tiefseehabitats geleistet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Publikationen in referierten Zeitschriften veröffentlicht.

III. 4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die angestrebte Identifizierung von relevanten Biosynthese-Genen durch PCR-Amplifizierung verlief eher unbefriedigend, und wurde nicht weiter verfolgt.

III. 5 Präsentationsmöglichkeiten

Die wissenschaftlichen Ergebnisse des Projekts werden in wissenschaftlichen Fachzeitschriften und auf entsprechenden internationalen Tagungen veröffentlicht bzw. präsentiert.

III. 6 Einhaltung des Ausgaben- und Zeitplans

Der Zeitplan und der Finanzrahmen wurden eingehalten.

IV. Berichtsblatt (Kurzfassung des fachlichen Inhalts)

Zuwendungsempfänger: TU Berlin Fakultät II Institut für Chemie FG Biologische Chemie	Förderkennzeichen: 03F0358B
Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: BOSMAN I und II; Teilprojekt 5: Naturstoffscreening und Syntheseleistungen in Kaltwasser-Porifera und ihren Symbionten	
Laufzeit des Vorhabens: BOSMAN I: 01.07.1999 – 30.06.2001 BOSMAN II: 01.04.2002 – 31.05.2005	
Berichtszeitraum: 01.07.1999 – 31.05.2005	

1. Wichtigste wissenschaftlich-technische Ergebnisse und andere wesentliche Ereignisse.

- 1328 aerobe bakterielle Isolate aus Schwämmen und anderen marinen Proben (Standorte: Sula-Rücken, Korsfjord, Arktis), Verwendung von Batch-Ansätzen und kontinuierlichen Kulturen) wurden durch MALDI-TOF-MS bezüglich Identifizierungs-Fingerprint und Syntheseleistungen charakterisiert.
- Fingerprint-Spektren wurden mit phylogenetischen Daten korreliert
- von ca. 100 detektierten Naturstoffen wurden durch PSD-Spektren weitere Fragmente charakterisiert

2. Vergleich des Stands des Vorhabens mit der ursprünglichen (bzw. mit Zustimmung des Zuwendungsgebers geänderten) Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung.

- Arbeitsplanung: Alle vorgesehenen Arbeitsziele wurden im wesentlichen erreicht: Aufnahme von MALDI-TOF Massenspektren von Schwämmen und anderen marinen Naturstoffquellen, sowie schwerpunktmäßig von Schwamm-assoziierten Bakterien, weitere Charakterisierung detektierter Naturstoffe durch Fragmentierung, Analyse und phylogenetische Korrelation von Bakterien-Fingerprint-Spektren, Ausbau einer vorhanden Datenbank
- Zeitplanung: befand sich im Rahmen der Planung.
- Ausgabenplanung: befand sich im Rahmen der Planung.

3. Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Ausgabenzeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert (Begründung?)

- Aussichten haben sich nicht geändert
- vorrangige Ziele wurden erreicht

4. Sind inzwischen von dritter Seite Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

- keine relevanten Ergebnisse bekannt

5. Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig?

- es waren keine Änderungen notwendig

6. Fortschreibung des Verwertungsplans.

- wirtschaftliche Erfolgsaussichten: eine weiter ausgebaut Prokaryonten-Datenbank massenspektrometrischer Biomarker sowie eine weiterentwickelte Software stehen beim Spinoff AnagnosTec GmbH zur Verfügung, und können von unserer Seite in weiteren Projekten genutzt werden.
- wissenschaftliche Erfolgsaussichten: relevante Ergebnisse liegen zur Veröffentlichung vor
- wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit: Durch schnelle massenspektrometrische Detektierungsverfahren können potenzielle Sekundärmetabolitproduzenten effizienter erfasst werden; die massenspektrometrische Methodik wird sowohl in Stammsammlungen als auch zur Dereplikation eingesetzt werden.

**Abteilung Organomeereschemie und Institut für Organische Chemie
Fachbereich Chemie
Universität Hamburg**

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke

**Abschlussbericht zum BMBF-Projekt BOSMAN II
(Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle)**

Teilprojekt 6

*Identifizierung und Synthese biologisch aktiver Sekundärmetabolite
aus Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen*

Berichtszeitraum: 01.04.2002 – 31.05.2005

Projektlaufzeit: 01.04.2002 – 31.05.2005

Förderkennzeichen: 03F0358A TP6

Inhaltsverzeichnis

I.1 Einleitung	3
I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
I.3 Planung und Verlauf der Untersuchungen	3
I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	3
I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	4
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	4
II.1 Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse	4
a) Extraktionsschema	5
b) Azulenderivate aus <i>Hymedesmia paupertas</i>	6
c) Mittelpolare Verbindungen aus <i>Aplysilla sulphurea</i>	7
d) Alkaloide aus <i>Aplysilla sulphurea</i>	8
e) (15Z)-Docosenal aus <i>Mycale lingua</i>	9
f) Sesquiterpenderivate aus <i>Phakellia ventilabrum</i>	10
g) 2-Alkyl-2,3-dihydro-2H-furan-3-onen aus <i>Isops phlegraei</i>	12
h) Struktur von Baretin aus <i>Geodia barretti</i>	14
i) Glycolipide aus <i>Pachymatisma johnstonia</i>	15
j) Ein neues Sesquiterpenskelett aus <i>Primnoa resedaeformis</i>	17
k) Neue Sesquiterpenfurane aus <i>Anthothela grandiflora</i>	18
l) Neue Isochinolinchinone aus <i>Ascidia virginea</i>	19
II.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	20
II.3 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	20
II.4 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen	20
III. Erfolgskontrollbericht	
III.1 Beiträge zu förderpolitischen Zielen	21
III.2 Wissenschaftlich-technisches Ergebnis und gesammelte Erfahrungen	21
III.3 Fortschreibung des Verwertungsplans	22
III.4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben	22
III.5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer	22
III.6 Einhaltung des Ausgaben- und Zeitplans	22

I.1 Im Mittelpunkt des Teilprojekts 6 (TP6) im Verbund BOSMANN II stand die Isolierung und Strukturaufklärung sowie ggf. Synthese von Sekundärmetaboliten aus marinen Organismen, insbesondere aus Schwämmen. Die erzielten Resultate sollten Beiträge zur Kenntnis des chemischen Inventariums der untersuchten Spezies liefern sowie Abschätzungen über deren Potential als Quellen mariner Wirkstoffe ermöglichen. Synthetische Arbeiten sollten die Untersuchungen ergänzen, da hierdurch einerseits die Verifizierung unvollständig charakterisierter Verbindungen ermöglicht wird und andererseits synthetische Naturstoffe oder deren Analoga zu Testzwecken zur Verfügung gestellt werden können. Ferner war es Aufgabe von TP6, Verbundpartner im Rahmen von „in-aide-support“ bei deren analytischen Untersuchungen zu unterstützen.

I.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke ist zur Untersuchung komplexer Gemische organisch chemischer Substanzen bzw. zur Strukturaufklärung sehr kleiner Mengen unbekannter Verbindungen bestens vorbereitet: Sie verfügt über moderne Geräte zur Trennung von Vielstoffgemischen (Kapillar GC einschl. enantioselektiver GC und HPLC) sowie Kombinationen von Gaschromatographie und (hochauflösender) Massenspektrometrie, Kombination von Gaschromatographie und Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie, Kombination von HPLC und Massenspektrometrie und Hochfeld-NMR-Spektroskopie. Es liegen 35 Jahre an Erfahrung vor, die in bisher 340 Publikationen zusammengefasst sind.

Folgende Mitglieder der Arbeitsgruppe waren an den Arbeiten im TP6 beteiligt:

Prof. Dr. Wittko Francke, Universitätsprofessor C4, Leiter des TP6

Dr. Stefan Franke, Dipl. chem., Dauerstelle, Massenspektrometrie

Frau Melanie Mosler, Dauerstelle, Technische Assistenz

Dr. Susanne Sölter, Dipl. chem., Promotion in BOSMAN II

Dr. Sven Possner, Dipl. chem., Promotion in BOSMAN II

Dr. Karsten Fehler, Dipl. chem., Promotion in BOSMAN II

I.3 Planung und Verlauf der Untersuchungen

Obwohl aus BOSMAN I noch Proben, Rohextrakte und Fraktionen zur weiteren Untersuchung zur Verfügung standen, wurde in Kooperation mit Verbundpartnern und Mitgliedern der Universität Bergen weiteres Material gesammelt. Nach einer Anlaufphase lagen Proben aus folgenden Bereichen vor:

1. Sula Ridge (Mittelnorwegisches Schelfgebiet)
2. Korsfjord (Marin-Biologische Station Espeland der Universität Bergen)
3. Arktis (Grönland See)

Absprachegemäß wurden die Proben zur analytischen Bearbeitung zwischen TP6 und TP1 aufgeteilt; Sekundärstoffe von Mikroorganismen, die aus marinen Organismen isoliert worden waren (s. TP4), wurden in TP3 und TP5 untersucht.

Folgende Organismen wurden im Rahmen von TP6 im Hinblick auf die Strukturen von Sekundärmetaboliten näher untersucht:

Die Schwämme *Hymedesmia paupertas* (Bowerbank), *Aplysilla sulfurea* (Schulze), *Mycale linua* (Bowerbank), *Phakellia ventilabrum* Pallas, *Isops phlegraei* Sollas, *Geodia barretti* (Bowerbank) und *Pachymatisma johnstonia* (Bowerbank), die Octokoralle *Primnoa resedaeformis* Gunnerus, die Lederkoralle *Anthothela grandiflora* Sars und die Tunicate *Ascidia virginea* Müller. Darüber hinaus wurden über 150 Rohextrakte, Fraktionen und Reinsubstanzen (vorwiegend von Schwämmen angefertigt und den Projektpartnern IBWF und Oncotest für biologische Testungen zur Verfügung gestellt (s. dort).

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Zu Beginn der BOSMAN-Projekte waren die Kenntnisse über Sekundärmetabolite der untersuchten Arten relativ gering. Spezielle Erkenntnisse wurden im Rahmen von BOSMAN I gewonnen. Als Referenzliteratur dienten Originalliteratur¹, jährlich erscheinende Übersichtsartikel², elektronische Medien³ und Monographien⁴.

¹ Lidgren, G., Bohlin, L. *Tetrahedron Lett.* 28 (1986) 3283-3284

Johnson, A.L., Bergmann, J., Sjögren, M., Bohlin, L., *Tetrahedron* 60 (2004) 961-965

² Faulkner, D.J. *Marine Natural Products in: Natural Prod. Rep.* 1 (1984) 251-280 und 551-598; 3 (1985) 1-33; 4 (1986) 539-576; 5 (1987) 613-663; 7 (1989) 269-309; 8 (1990) 97-147; 9 (1991) 323-364; 10 (1992) 497-539; 11 (1994) 355-394; 12 (1995) 223-269; 13 (1996) 75-126; 14 (1997) 259-302; 15 (1998) 113-158; 16 (1999) 155-198; 17 (2000) 7-56; 18 (2001) 1-49; 19 (2002) 1-48; Blunt, J.W. Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., and Prinsep, M.R. 20 (2003) 1-48; 21 (2004) 1-49; 22 (2005) 15-61

³ Munro, M.H.G. and Blunt, J.W. *Marin Lit* (Marine Literature Data Base), Univ. of Canterbury, Christchurch, New Zealand, Electronic Medium. Updated twice a year

⁴ Pietra, F. *A Secret World*, Birkhäuser Verlag 1990

Scheuer, P.J. (ed.) *Bioorganic Marine Chemistry*, Vol. 1-6, Springer Verlag 1987 – 1992

Kobayashi, J. und Ishibashi: *Marine Natural Products and Marine Chemical Ecology in:*

Comprehensive Organic Chemistry, Vol. 8, K. Mori (ed.) Elsevier Science Ltd. Oxford 1999

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des BOSMAN Verbundes erfolgte besonders intensive Zusammenarbeit mit TP1, aber auch mit den anderen Partnern. Externe Kooperation fand statt auf biologischem Sektor (Materialbeschaffung, Taxonomie) mit Dr. H.-T. Rapp, Universität Bergen, Marin-Biologische Station Espeland.

II.1 Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse

Da die im TP6 erzielten Ergebnisse in den unter II.4 aufgeführten drei Dissertationen ausführlich dargestellt sind, werden auf den folgenden Blättern nur die wesentlichen wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Arbeit in Form von Grafiken (Formelbilder) gezeigt, die zum besseren Verständnis jeweils erläutert werden.

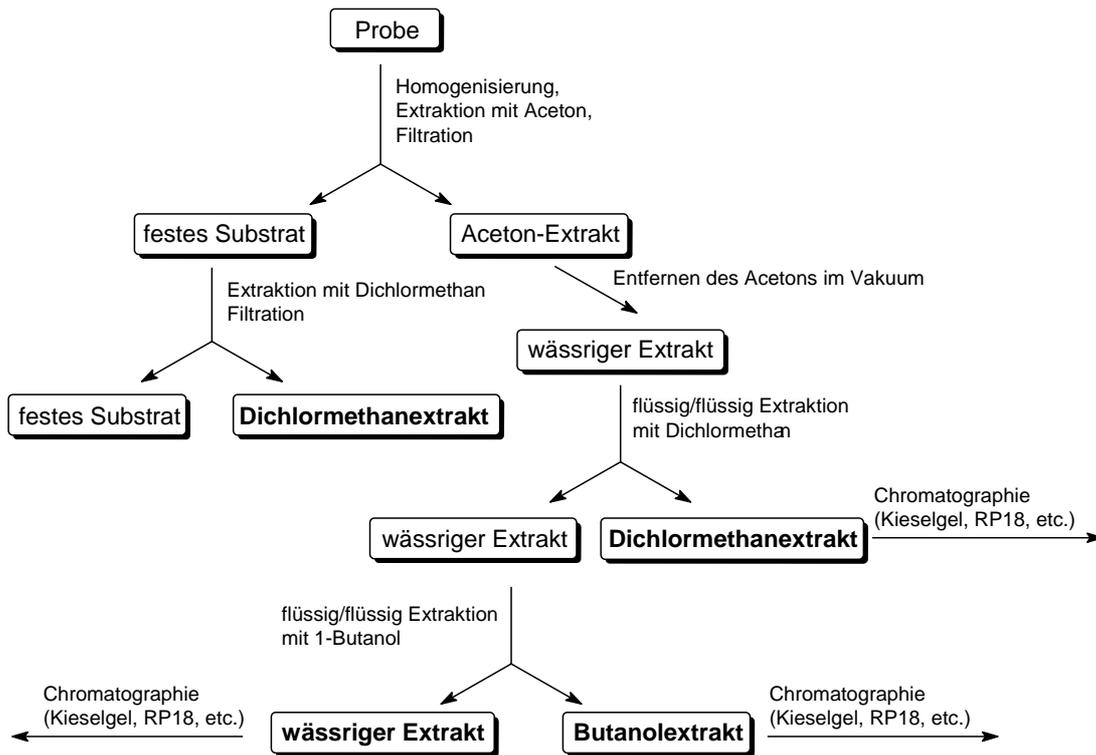


Abb. 1: Extraktionsschema zur Herstellung von Extrakten aus marinen Invertebraten

Das in Abb. 1 gezeigte Aufarbeitungsschema wurde gemeinsam mit TP1 entwickelt und von beiden Arbeitsgruppen verwandt, um die erhaltenen Fraktionen im Hinblick auf die Polarität der jeweiligen Inhaltsstoffe möglichst vergleichbar machen zu können. Die (stark Wasserhaltigen) Proben wurden mit Aceton extrahiert, sodass zunächst ein organisch-wässriger Extrakt und ein festes Substrat erhalten wurden. Letzteres war weitgehend wasserfrei und konnte mit Dichlormethan extrahiert werden; der feste Rückstand wurde verworfen. Der Acetonextrakt wurde im Vakuum eingedunstet und die verbleibende, weitgehend acetonefreie, wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Der Dichlormethanextrakt (mit der Hauptmenge der unpolaren und mittelpolaren organischen Inhaltsstoffe der Probe) wurde nun an Kieselgel bzw. an RP18-Phasen weiter aufgetrennt. Diese Trennungen wurden meist gaschromatographisch verfolgt. Die gemäß Schema erhaltene wässrige Phase mit vorwiegend polaren Verbindungen wurde mit n-Butanol extrahiert. Die Inhaltsstoffe der beiden dadurch erhaltenen Lösungen (Butanolextrakt und wässriger Rückstand) konnten auf chromatographischem Weg separat weiter aufgetrennt werden.

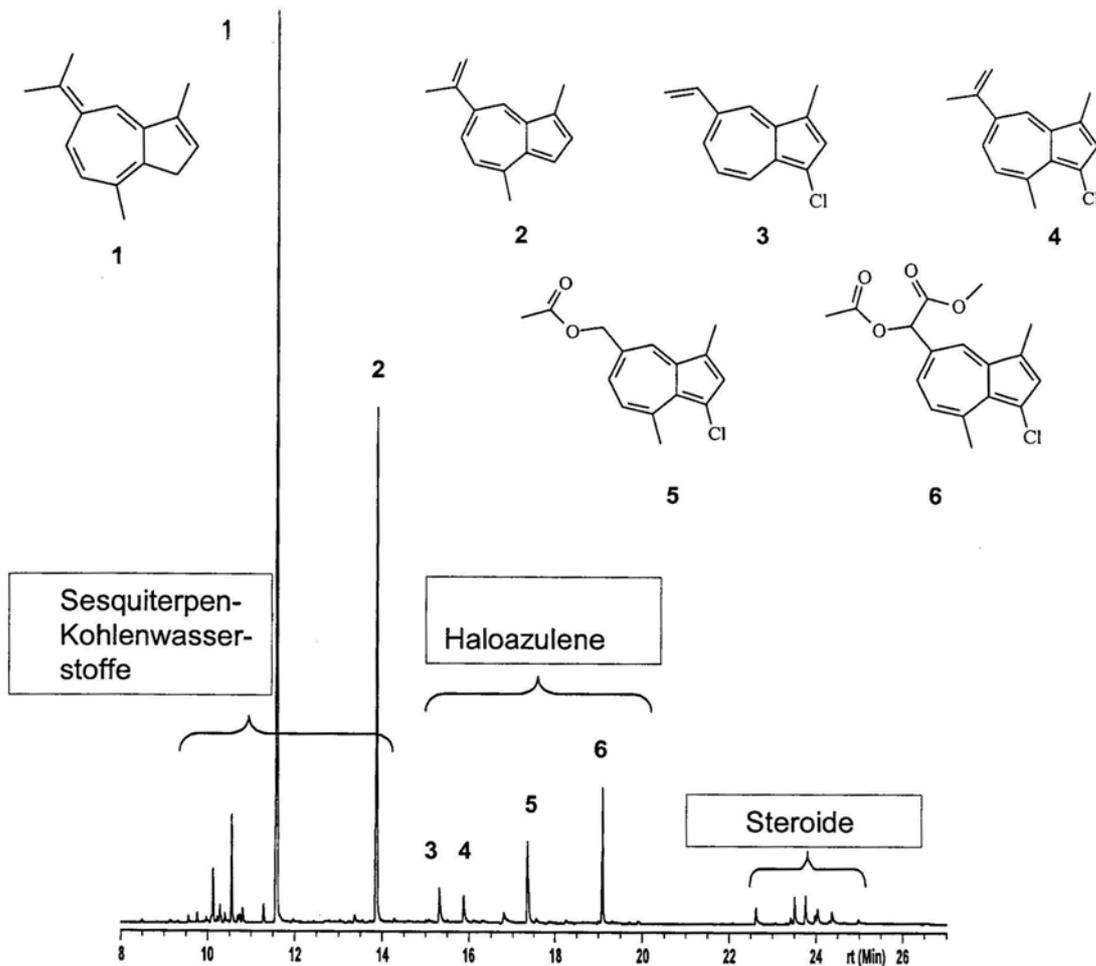


Abb. 2: Azulenderivate aus dem inkrustierenden Schwamm *Hymedesmia paupertas* Bowerbank

Abb. 2 zeigt das Gaschromatogramm einer aus dem Schwamm *Hymedesmia paupertas* gewonnenen Fraktion. Die Verbindungen 1 - 6 konnten isoliert und ihre Strukturen durch NMR-Spektroskopie bewiesen werden. Verbindung 4 konnte aus isoliertem 2 synthetisiert werden, was als zusätzlicher Strukturbeleg gelten mag. Bis auf 2 (Lactarazulen) handelt es sich um neue Naturstoffe. Neben den neuen Chlorazulenen, 3 – 6 wurden eine ganze Reihe weiterer Haloazulene mit Chlor- bzw. Bromsubstituenten in Position 3 und oxygenierter Isopropylgruppe gefunden. Die Strukturen dieser Verbindungen sind hier nicht aufgeführt, da sie nicht explizit durch NMR-Spektroskopie abgesichert sind. Die Biogenese dieser Substanzen dürfte, wie auch die von 3, 5 und 6, von 2 über das 3-Chlorderivat 4 verlaufen und dann verschiedene oxidative Vorgänge umfassen.

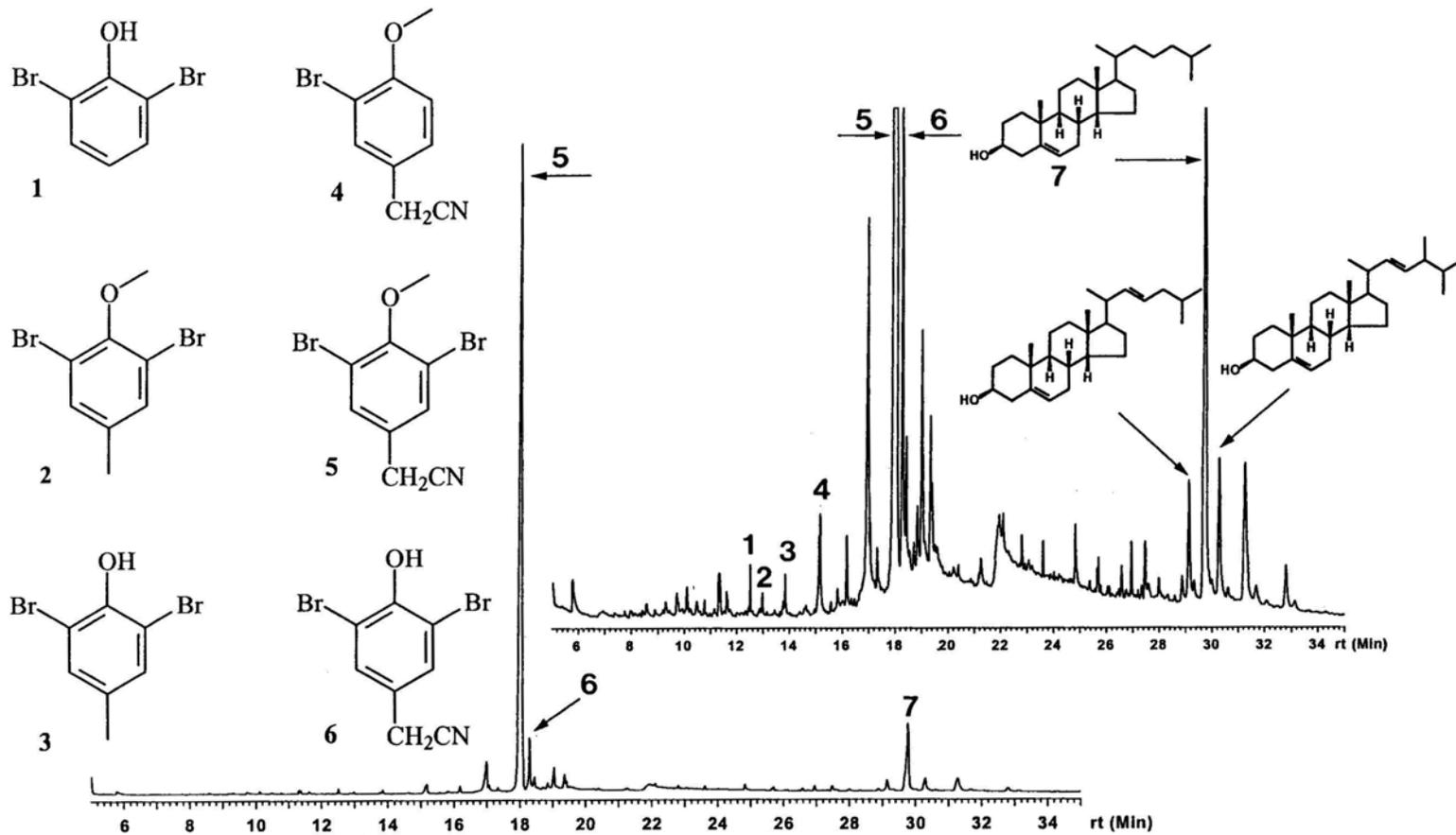


Abb. 3: Gaschromatogramm der mittelpolaren Fraktion des Schwamms *Aplysilla sulphurea* (Schulze)

Abb. 3 zeigt das Gaschromatogramm einer durch 3,5-Dibrom-4-methoxybenzylcyanid und das zugehörige Phenol sowie durch Steroide geprägte Fraktion eines Extrakts von *Aplysilla sulphurea*. Spuren verschiedener Bromaromaten wurden ebenfalls nachgewiesen. Strukturzuordnungen erfolgten auf der Basis von GC/MS-Untersuchungen unter Verwendung synthetischer Vergleichssubstanzen

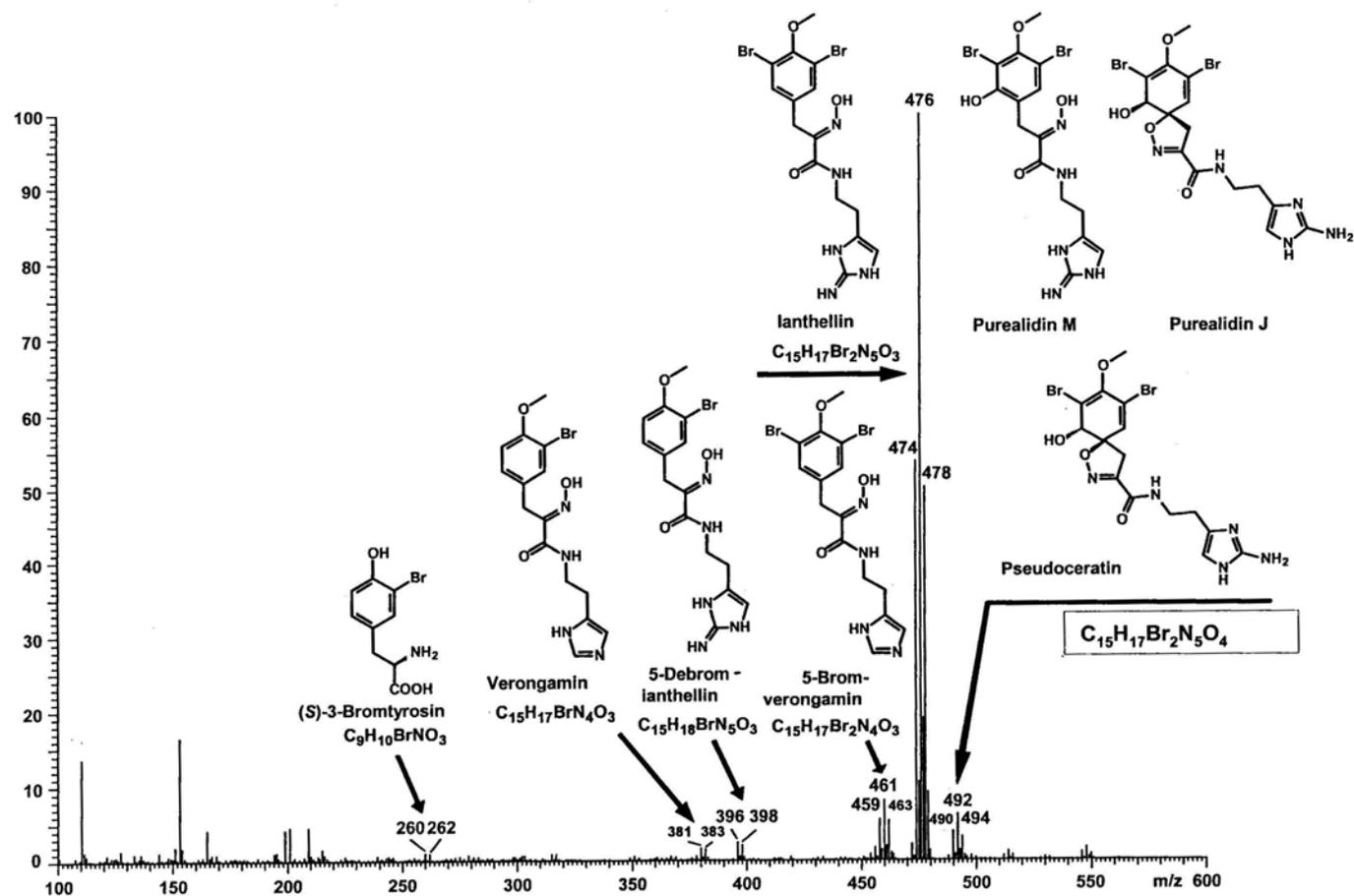


Abb. 4: ESI- und APC-MS, Hoचाуflösungsdaten einer alkaloidhaltigen Fraktion aus dem Schwamm *Aplysilla sulphurea* (Schulze)

Abb. 4 zeigt die Leistungsfähigkeit moderner massenspektrometrischer Methoden bei der Identifizierung höher molekularer Verbindungen in komplexen Gemischen; die Strukturen der Verbindungen müssen allerdings bekannt sein! Im vorliegenden Fall war die Hauptkomponente, Ianthellin, isoliert und durch NMR-Spektroskopie bereits zugeordnet worden. Die in der Fraktion auftretenden Nebenkomponenten wurden als strukturverwandt angesehen, sodass auch hier Literatur-bekannt Strukturen angegeben wurden, sofern sie den gefundenen Molekulargewichten entsprachen. Die Alkaloide Puralidin J, Puralidin M und Pseudoceratin konnten daher nicht eindeutig identifiziert werden, da sie alle die gleiche Summenformel $C_{15}H_{17}Br_2N_5O_4$ erfüllen.

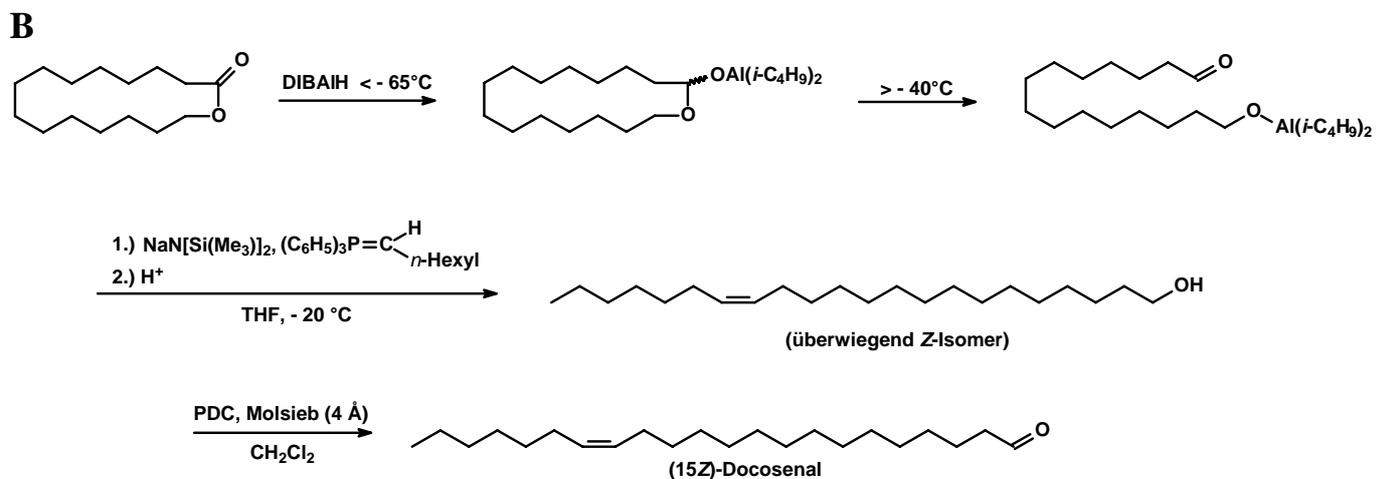
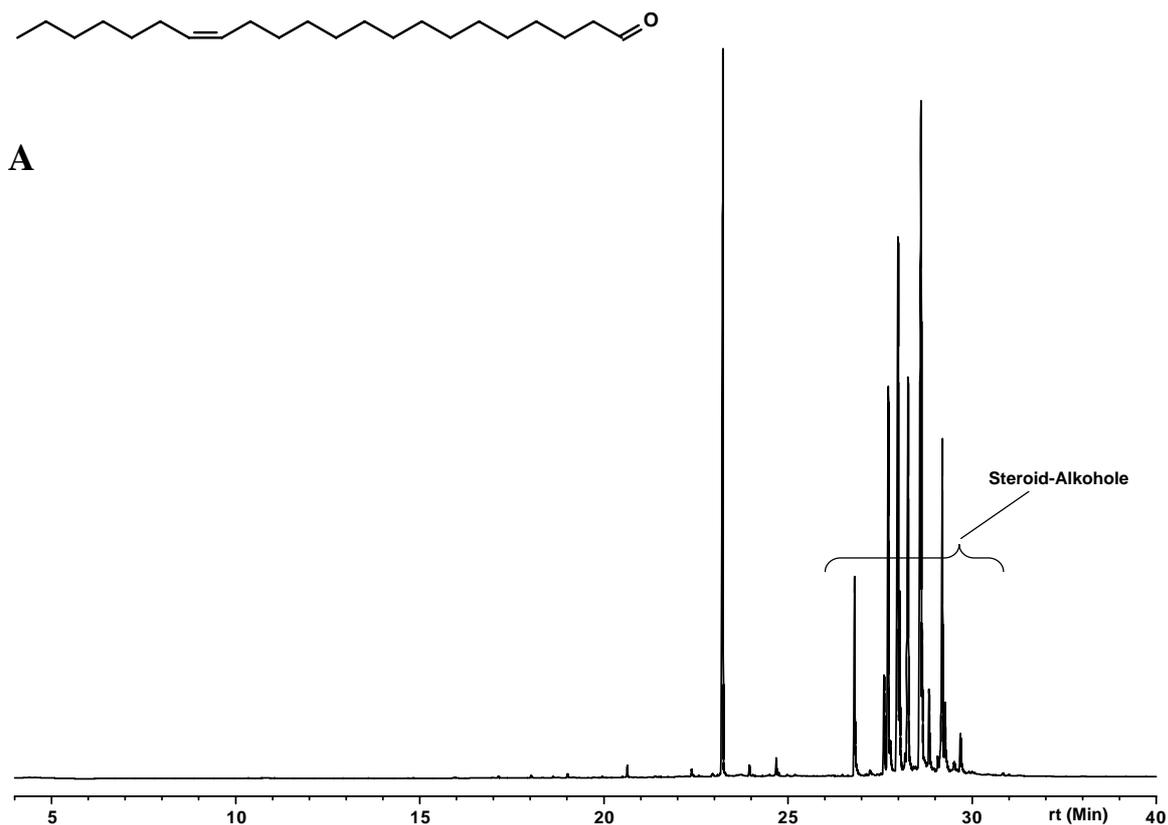


Abb. 5: Isolierung, Strukturzuordnung und Synthese von (15Z)-Docosenal, eines neuen Naturstoffs aus dem Schwamm *Mycale lingua* (Bowerbank)

Bei GC/MS-Untersuchungen der mittelpolaren Lipide aus *Mycale lingua* (Abb. 5 A) fiel ein langkettiger Aliphat auf. Die Substanz ließ sich katalytisch hydrieren und anschließend mit Lithiumalanat zu n-Docosanol reduzieren. Das Massenspektrum des DMDS-Addukts bewies die Existenz einer Doppelbindung in Position 15. Die zum Strukturbeweis notwendige Synthese (Abb. 5 B) ging von käuflichem Pentadecanolid aus. Reduktion mit Diisobutylaluminiumhydrid und direkte Umsetzung des Aluminiumsalzes in einer Wittig-Reaktion¹ führte zu einem Gemisch der E-/Z-Isomere des Docosenals, das zum Aldehyd oxidiert wurde. Das bei dieser Sequenz als Hauptkomponente anfallende (15Z)-Docosenal stimmte in allen analytischen Daten mit dem neuen Naturprodukt überein.

¹ W. Boland, P. Ney, L. Jaenicke, *Synthesis* **1980**, 1015-1017

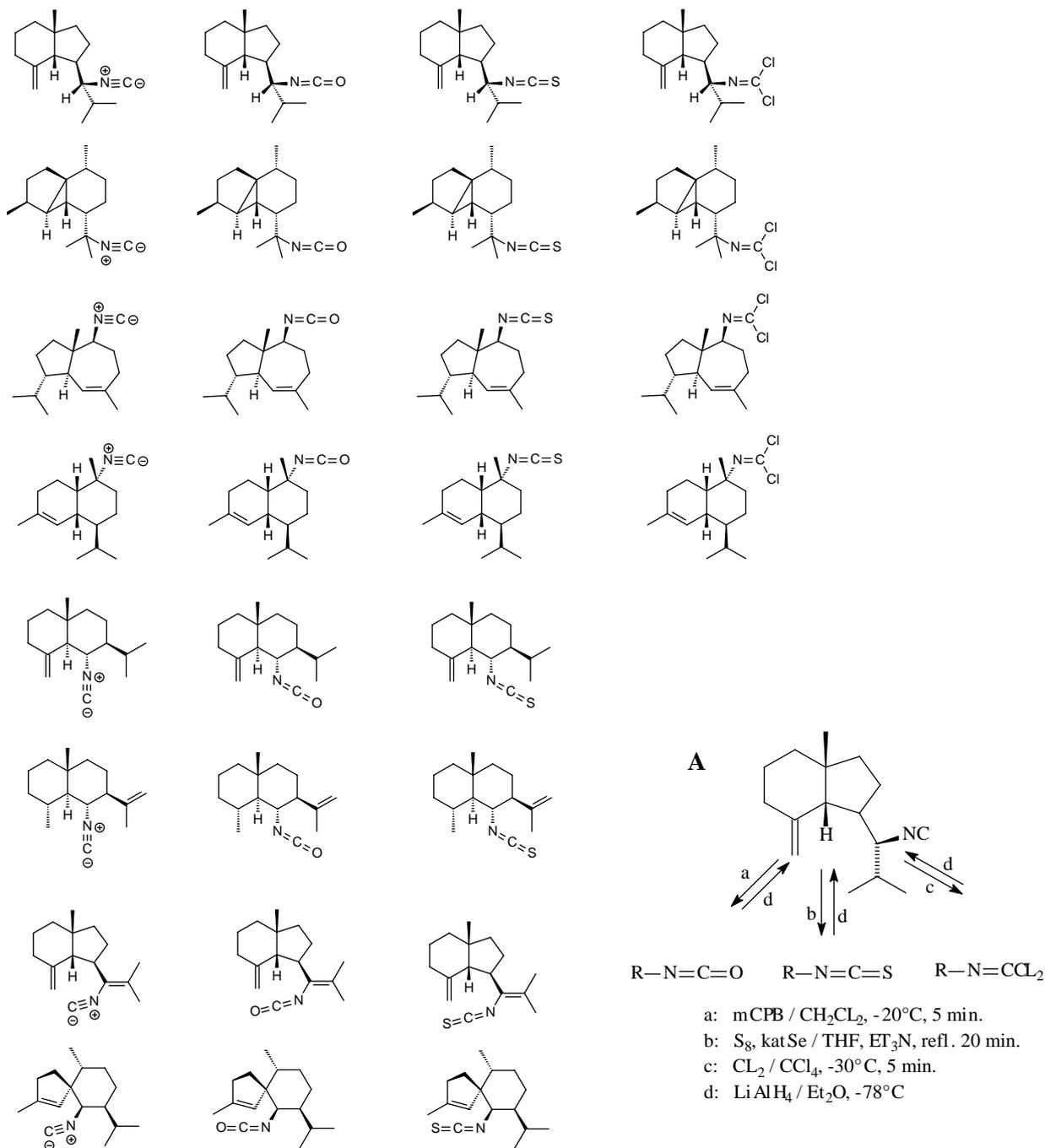


Abb. 6: Eine Suite von Sesquiterpenderivaten aus dem Schwamm *Phakellia ventilabrum* Pallas

Aus *Phakellia ventilabrum* konnte das bekannte Axisonitril I isoliert und charakterisiert werden (Struktur siehe Kasten A, Abb. 6). Auffällige Massenspektren von Substanzen, die in der gleichen Fraktion vorkamen, wiesen auf Isoncyanat- bzw. Isothiocyanat –Strukturen und Dichlorimine hin. Das isolierte Axisonitril I konnte durch einfache Mikroreaktionen in solche Derivate umgewandelt und aus diesen wieder zurück gewonnen werden (siehe Kasten A). Die konsequente Anwendung dieser Sequenzen mit isolierten Reinsubstanzen und Gemischen führte zur Identifizierung von Trios und Quartetten von Sesquiterpenen, die jeweils das gleiche Kohlenstoffskelett aufwiesen, aber unterschiedliche funktionelle Gruppen tragen. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die entsprechenden Strukturen und das zugehörige Gaschromatogramm. Fast alle diese Substanzen sind neue Naturstoffe.

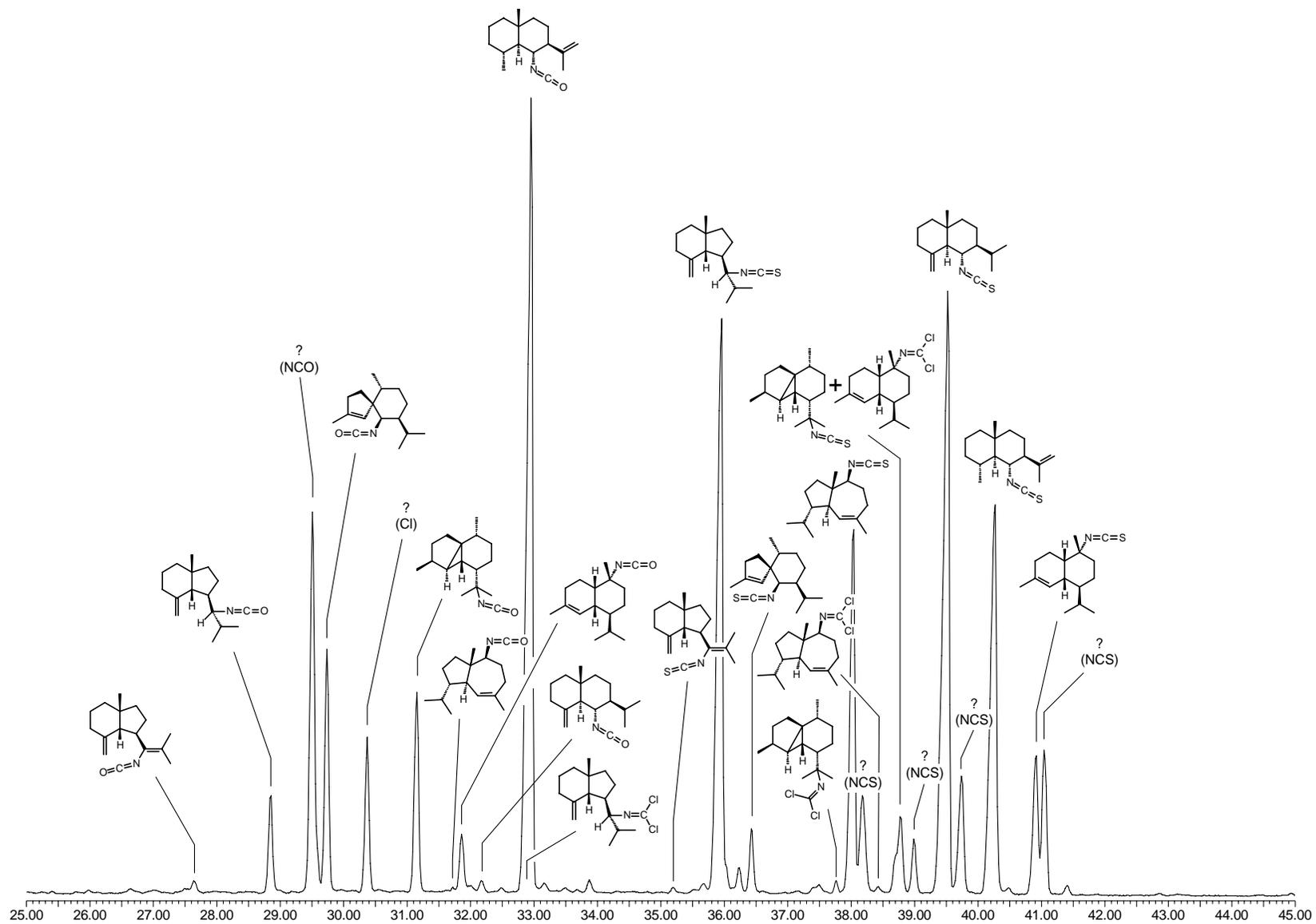


Abb. 7: Gaschromatogramm und Strukturen neuer Sesquiterpene aus *Phatallia ventilabrum*

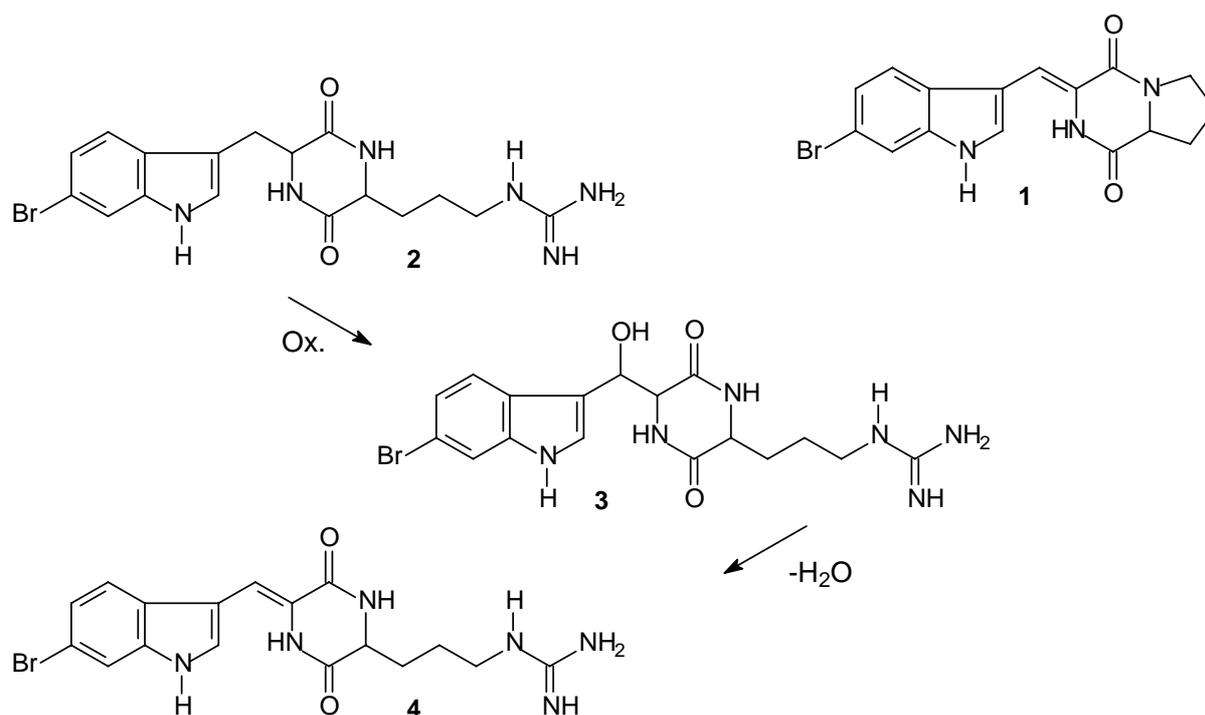


Abb. 10: Revision der veröffentlichten Struktur von Baretin aus dem Schwamm *Geodia barretti* Bowerbank

Vor ca. 20 Jahren isolierten Lidgren und Bohlin ein Alkaloid aus *Geodia barretti*, das sie Baretin nannten.¹ Sie beschreiben dessen Struktur als die des Tryptophanderivates **1**, doch wurde dies von Lieberknecht et al. auf der Basis einer unabhängigen Synthese widerlegt.² Im Verlauf der Untersuchungen im TP6 wurde *Geodia barretti* erneut untersucht, wobei als Hauptkomponente unter den polaren Verbindungen eine Substanz isoliert wurde, die ähnliche analytische Daten lieferte, wie sie für Baretin beschrieben waren. Eingehende spektroskopische Untersuchungen der isolierten Verbindung führten jedoch zu der Struktur **4**, die sich von **1** dadurch unterscheidet, dass sie lediglich tricyclisch ist und die sehr polare Guanidinstruktur in der Seitenkette trägt. Diese ist im NMR-Spektrum extrem schlecht zu sehen und wird im Massenspektrometer sofort abgespalten, sodass angesichts der vorliegenden Teilstrukturen unter Fixierung der Ladung ein Ion entsteht, das **1** entspricht (nur Spezialisten können dies sehen!). Es gelang uns ferner, die Verbindungen **2** (das Diketopiperazin aus Tryptophan und Arginin) und das hydroxylierte Diketopiperazin **3** nachzuweisen. Ein nahe liegender biogenetischer Zusammenhang zwischen **2**, **3** und Baretin geht aus Abb. 10 hervor. Inzwischen wurde die Struktur von Baretin durch Synthese eindeutig als **4** bewiesen.³

¹ G. Lidgren, L. Bohlin; *Tetrahedron Lett.* **28** (1986) 3283-3284

² A. Lieberknecht, H. Griesser; *Tetrahedron Lett.* **29** (1987) 4275-4278

³ A.-L. Johnson, J. Bergman, M. Sjögren, L. Bohlin; *Tetrahedron* **60** (2004) 961-965

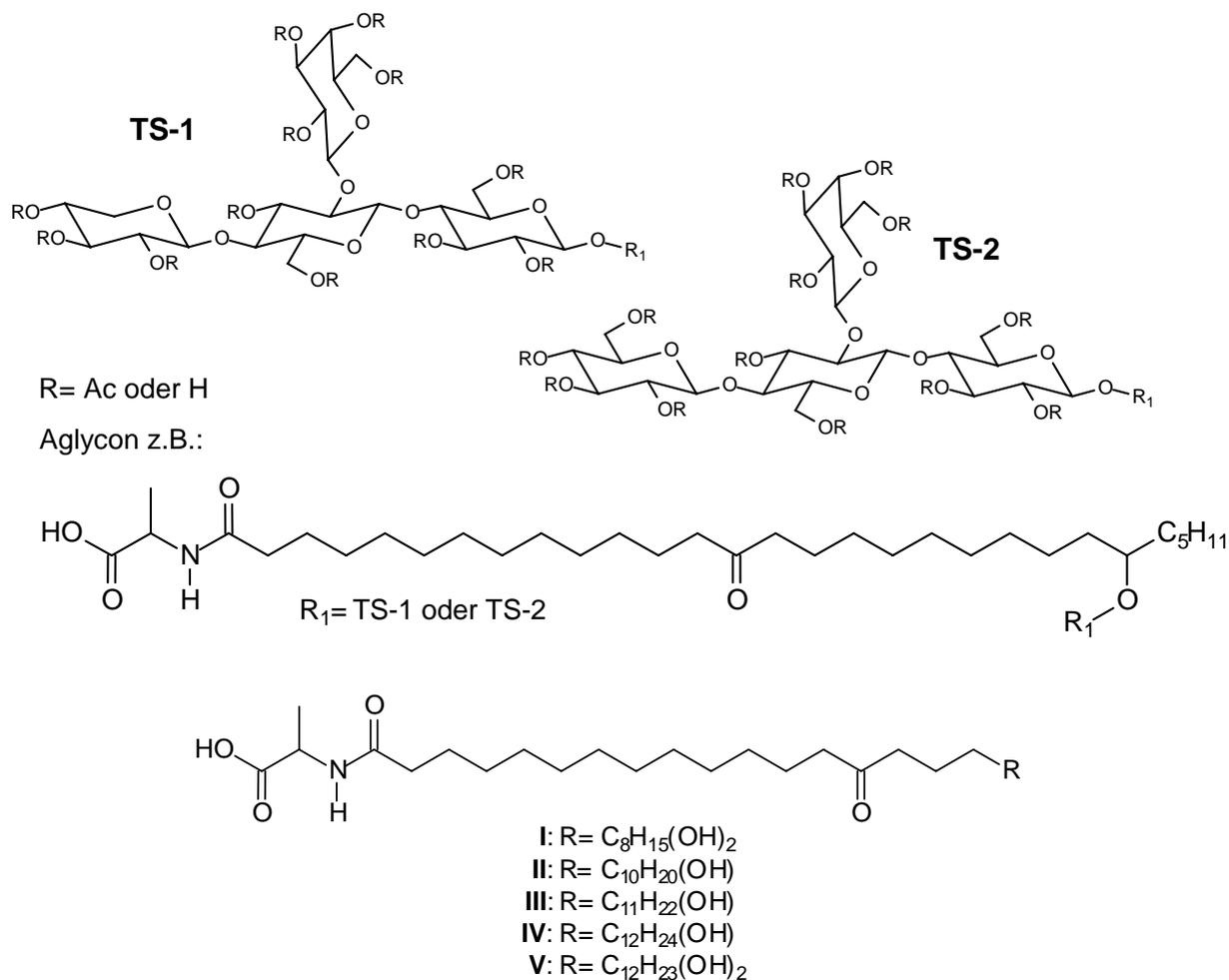
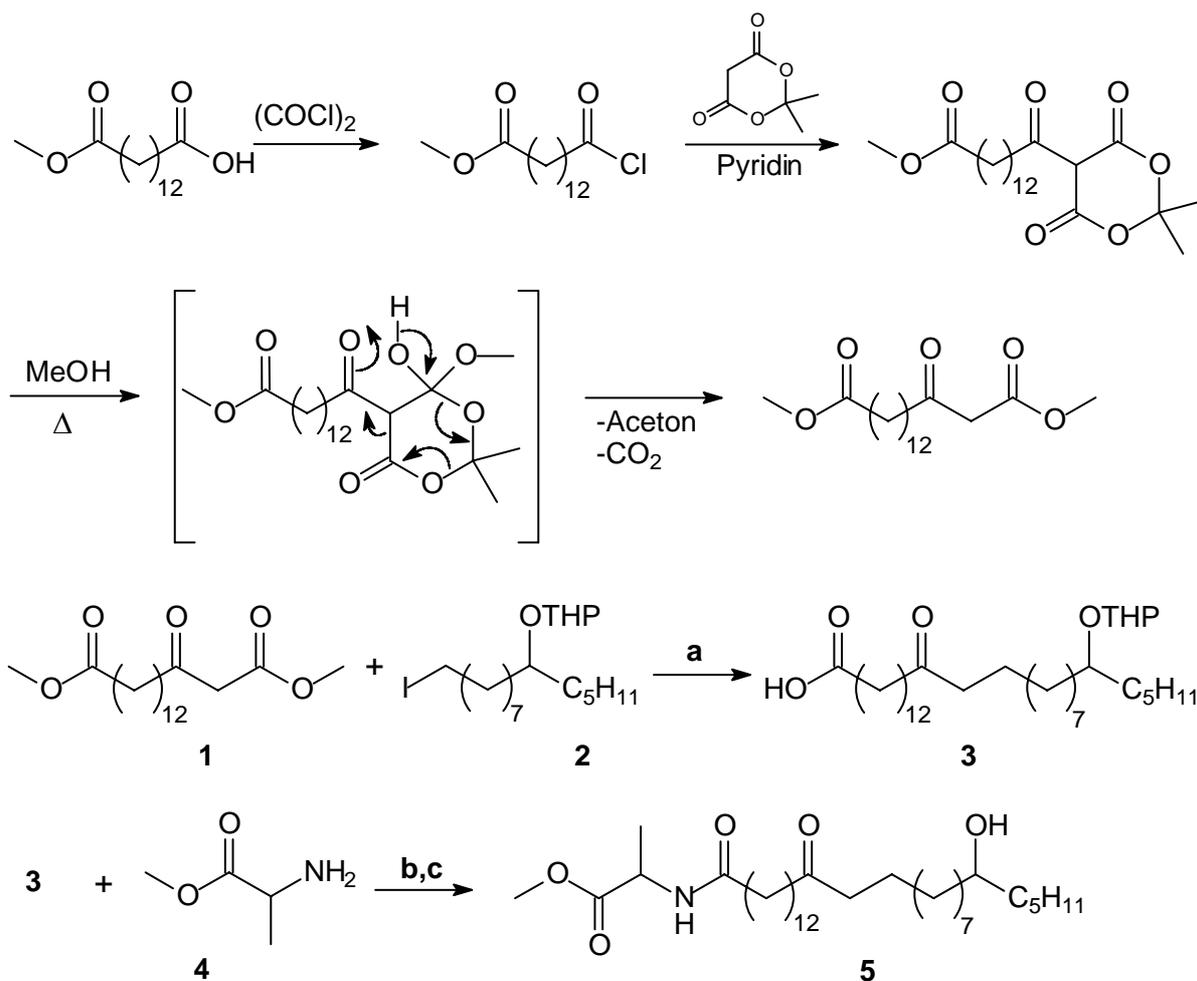


Abb. 11: Eine natürliche Glycolipid-Bibliothek aus dem Schwamm *Pachymatisma johnstonia* Bowerbank

Der n-Butanolextrakt aus dem Schwamm *Pachymatisma johnstonia* enthielt ein komplexes Gemisch aus Glycolipiden. Massenspektrometrische Untersuchungen (ESI-, APCI-MS, HPLC) sowie mehrdimensionale NMR-spektrometrische Analyse am intakten Produktgemisch sowie nach Spaltung der glycosidischen Verknüpfung und getrennter Untersuchung von Zuckerteil und Aglycon ergab sich folgendes Bild (Abb. 11):

Die Zucker sind stets unterschiedlich stark acetylierte Tetrasaccharide, die aus zwei Glucoseeinheiten, Galactose und Xylose (TS-1) bzw. aus drei Glucoseeinheiten und Galactose (T-2) bestehen. Die Aglyca bestehen aus einer längerkettigen 13-Oxocarbonsäure, die stets mit Alanin amidisch verknüpft ist und dadurch eine relativ polare Kopfgruppe trägt. Der Alkylteil der 13-Ketocarbonsäure ist mindestens 25 Kohlenstoffatome lang und trägt eine Hydroxylgruppe, die mit dem Zucker verbunden ist. Die Vielfältigkeit des Gemisches und die Hoffungslosigkeit, dies trennen zu können, gehen aus Abb. 1 hervor.



a) 1) K_2CO_3 , Aceton/DMF 2) 3% wässrige KOH, MeOH; b) DCC, CH_2Cl_2 ; c) MeOH, *p*-TsOH

Abb. 12: Synthese eines Aglycons der Glycolipid-Bibliothek von *Pachymatisma johnstonia*

Um wenigstens Teilstrukturen durch unabhängige Synthese beweisen zu können, wurde das postulierte Aglycon der Hauptkomponente synthetisiert (Abb. 12). Der Halbester von Tetradecondisäure wurde in das Säurechlorid umgewandelt und dieses mit Meldrums Säure umgesetzt. Der daraus erhaltenen β -Ketosäuremethylester (**1**) wurde mit dem geschützten Iodalkanol **2** verlängert, wobei gleichzeitig eine Decarbomethoxylierung unter Bildung von **3** stattfand. Die Kondensation von **3** mit dem Methylester von Alanin liefert nach Deblockierung den Methylester des gewünschten Aglycons, der in allen analytischen Daten mit denen des methylierten Naturstoffs übereinstimmte.

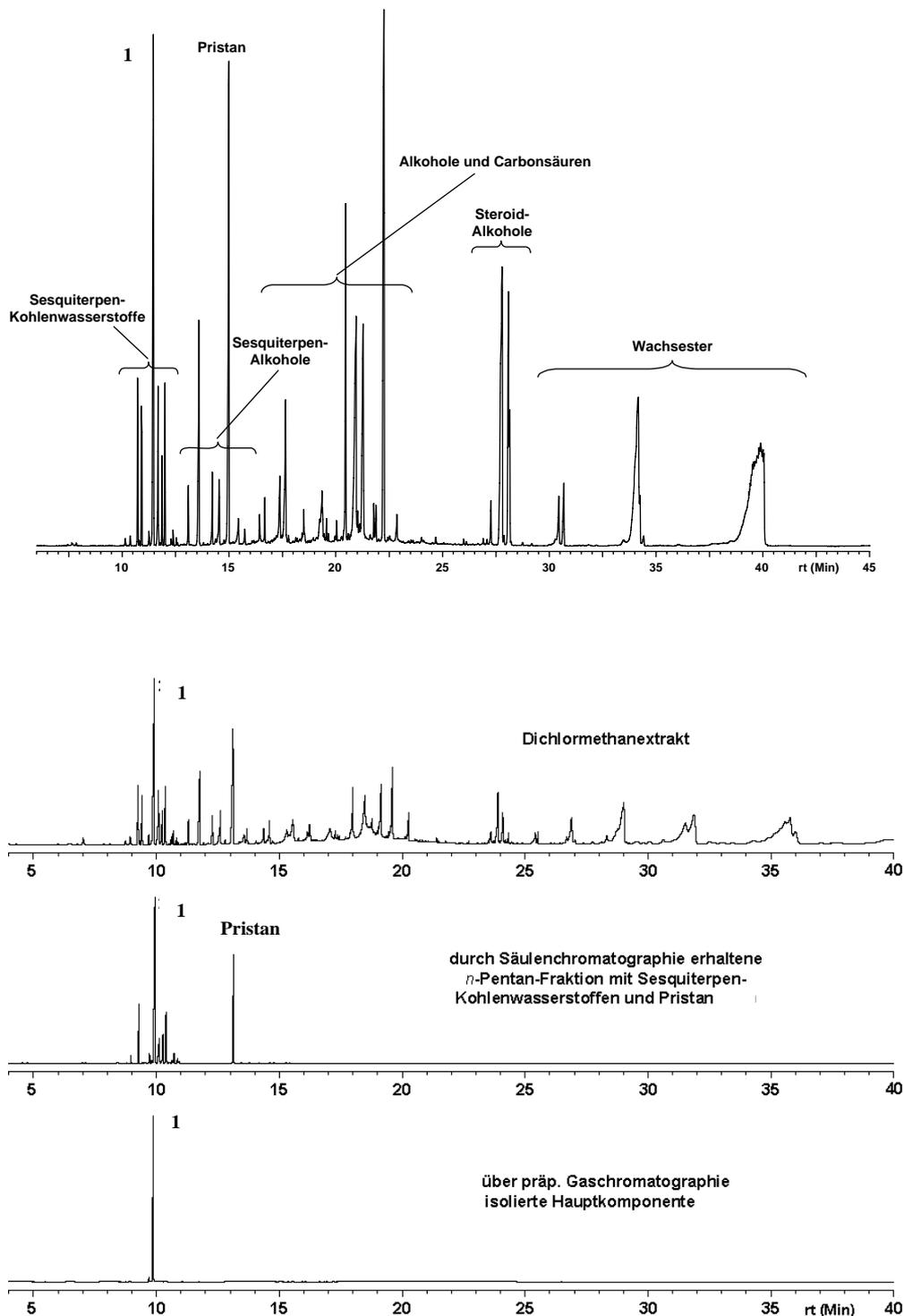


Abb. 13: Isolierung eines Sesquiterpens mit neuem Kohlenstoffskelett aus der Oktokoralle *Primnoa resedaeformis* (Gunnerus)

Abbildung 13 zeigt exemplarisch die schrittweise Anreicherung einer Zielverbindung aus einem komplexen Gemisch von Substanzen mittlerer Polarität. Neben zahlreichen bekannten Verbindungen konnte 4,8-Dimethyl-2-(1-methylethenyl)[5.3.0]dec-2-en (**1**) als Sesquiterpen mit einem neuen Kohlenstoffskelett isoliert werden. Die Ringe sind *cis*-verknüpft, doch wurden die Konfigurationen der stereogenen Zentren nicht bestimmt. Die Strukturzuordnung erfolgte nach NMR-Untersuchungen.

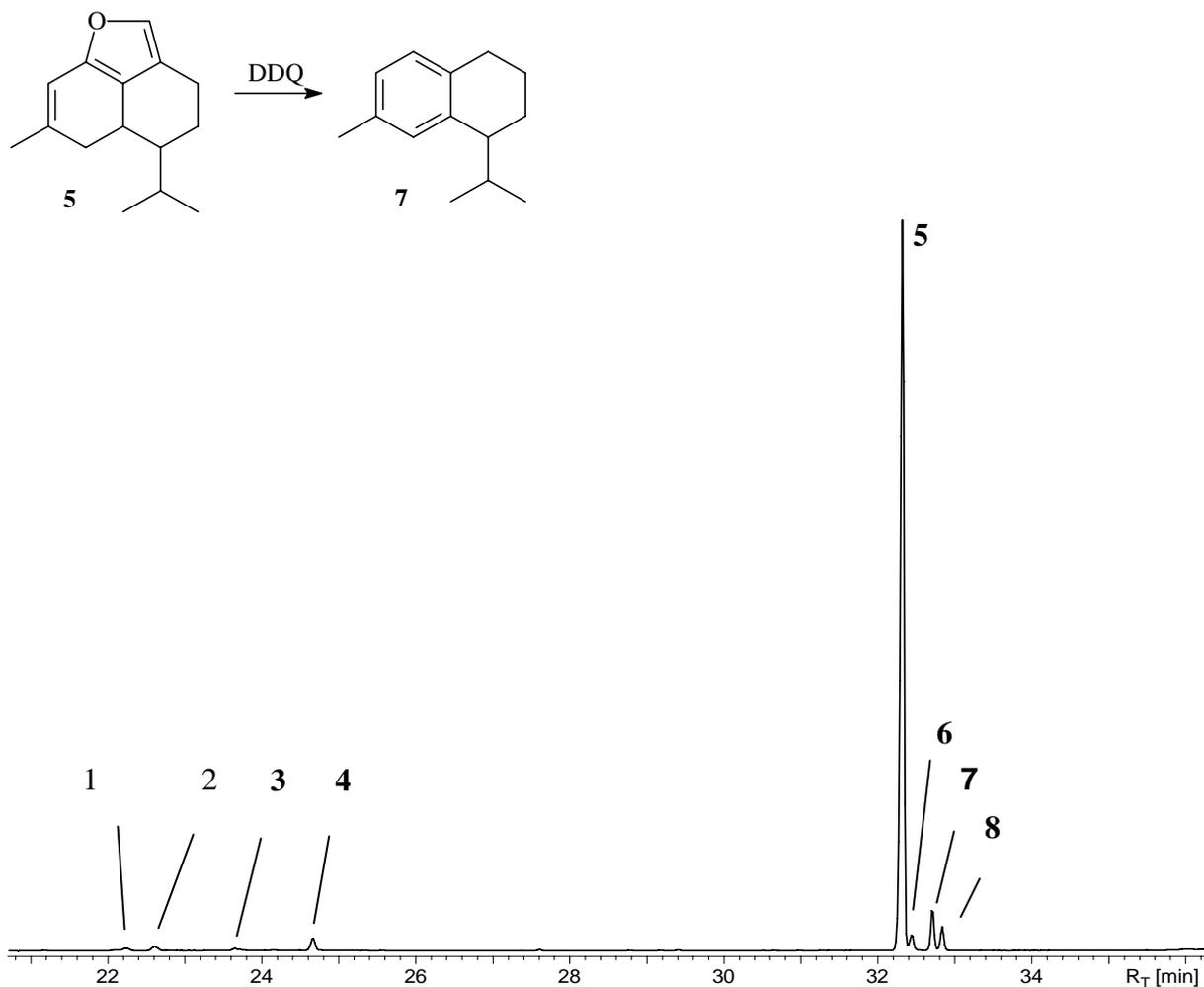


Abb. 14: Neue Sesquiterpenfurane aus der Lederkoralle *Anthothela grandiflora* Sars

Die Sesquiterpen-Fraktion aus *Anthothela grandiflora* ergab das in Abb. 14 gezeigte Gaschromatogramm. Die Substanzen **1** – **4** erwiesen sich als Aristolen, Calaren, *allo*-Aromadendren und δ -Cadinen. Die Verbindungen **5** - **8** sind neue Furanosesquiterpene mit Cadinan-Skelett. Die Verbindungen **5**, **6** und **8** werden unter Einwirkung von 2,3-Dichlor-5,6-dicyanochinon (DDQ) zu **7** dehydriert. Nach Isolierung und NMR-Analyse konnte der Hauptkomponente die abgebildete Struktur **5** zugeordnet werden. Die Struktur der Komponente **7** erwies sich als trisubstituiertes Benzofuran. Substanz **6** ist Dihydro-**5**, während **8** ein nicht näher charakterisierbares Doppelbindungsisomer von **5** sein dürfte.

II.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die gesamten im Teilprojekt 6 erzielten Ergebnisse sind in den Dissertationen von S. Sölter (2004), S.T. Possner (2005) und K. Fehler (2005) ausführlich niedergelegt. Diese Arbeiten sind auch über das Internet zugänglich. Teilergebnisse wurden als Fachartikel, Kongressabstracts (auf den entsprechenden Veranstaltungen in Form von Vorträgen oder Postern vorgestellt) sowie in Zwischen- und Abschlussberichten veröffentlicht.

Im Teilprojekt 6 sind effiziente Verfahren entwickelt worden, mit deren Hilfe unpolare und mittelpolare Sekundärmetabolite aus komplexen Matrices angereichert werden können. Die erhaltenen Vielstoffgemische können weiter aufgetrennt werden, sodass schließlich Einzelkomponenten erhalten werden. Das publizierte Aufarbeitungsschema wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen übernommen. Im Rahmen der im Teilprojekt 6 durchgeführten analytischen Untersuchungen wurden zahlreiche neue Naturstoffe mit z. T. völlig neuen Strukturen identifiziert. Die Kenntnis dieser Verbindungen erweitert das allgemeine Wissen über das chemische Inventar von Kaltwasserorganismen erheblich und kann als Basis für weiterführende Projekte dienen. Nach der neuen Strukturzuordnung von Baretin konnten z. B. Arbeiten an dem Schwamm *Geodia baretii* in anderen Laboratorien (Schweden) erfolgreich beendet werden. Die aus *Ascidia* isolierten arylierten neuen Isochinolinchinone könnten ebenso als Modellverbindungen zur Synthese potenziell biologisch aktiver Naturstoffanaloge dienen wie die in *Isops* gefundenen neuen 2-Alkyl-2,3-dihydro-2H-furan-3-one. Ob diese Substanzen als Leitstrukturen zur Entwicklung von neuen Pharmaka oder Pflanzenschutzmitteln geeignet sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

II.3 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Sekundärmetaboliten aus marinen Organismen stehen weltweit im Mittelpunkt wissenschaftlicher Aktivitäten in zahlreichen Laboratorien. Dort werden insbesondere Organismen aus tropischen Flachwasser-Regionen untersucht. Dagegen sind die Kenntnisse über Naturstoffe aus Kaltwasser- oder Tiefwasser-Regionen noch relativ gering. Abgesehen von dem Schwamm *Geodia baretii* (zunächst von schwedischen Kollegen bearbeitet, Struktur des isolierten Naturstoffs jedoch falsch und im Rahmen des Teilprojekts 6 korrigiert) wurde von anderen Arbeitsgruppen über keine der im Teilprojekt 6 untersuchten Arten berichtet – wohl aber über verwandte Arten.

II.4 Erfolge und geplante Veröffentlichungen

Dissertationen

1. S. Sölter (2004) Identifizierung und Synthese von Naturstoffen aus borealen Schwämmen, Hamburg
(<http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/2004/DissertationSoelter.pdf>)
2. S.T. Possner (2005) Isolierung und Strukturaufklärung neuer Naturstoffe aus marinen Invertebraten, Hamburg
(<http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/2005/DissertationPossner.pdf>)
3. K. Fehler (2005) Isolierung und Strukturaufklärung von marinen Sekundärmetaboliten aus Kaltwasserschwämmen und Korallen, Hamburg
(<http://www.chemie.uni-hamburg.de/bibliothek/2005/DissertationFehler.pdf>)

Publikationen

1. S. Sölter, R. Dieckmann, M. Blumenberg, W. Francke
Barettin, revisited?
Tetrahedron Lett. 43 (2002) 3385-3386
2. S. Sölter, K. Fehler, S. Possner, W. Francke
New 2-alkyl-2*H*-furan-3-ones from the marine sponge *Isops phlegraei* Sollas
3rd European Conference on Marine Natural Products, München 2002
3. S.T. Possner, K. Fehler, S. Sölter, T.H. Rapp, W. Francke
New sesquiterpenes from deep-water invertebrates
3rd European Conference on Marine Natural Products, München 2002
4. S.T. Possner, K. Fehler, S. Sölter, H.T. Rapp, W. Francke
New sesquiterpenes from the marine sponge *Phakellia ventilabrum*
Poster – 6th Sponge Symposium, Genua 2002
5. K. Fehler, H.T. Rapp, W. Francke
New sesquiterpenes from the marine octocoral *Primnoa resedaeformis* (Gunnerus 1736)
Poster – Intern. Symp. on Chemistry and Biology of Marine Organisms, Kreta 2003
6. S.T. Possner, H.T. Rapp, W. Francke
New furanosesquiterpenes from the octocoral *Anthothela grandiflora*
Poster – Intern. Symp. on Chemistry and Biology of Marine Organisms, Kreta 2003
7. K. Fehler, S.T. Possner, H.T. Rapp, W. Francke
Neue Azulene aus marinen Invertebraten
Poster – 16. Irseer Naturstofftage, DECHEMA, 2004

Geplante Veröffentlichungen

1. S.T. Possner, F.C. Schroeder, H.T. Rapp, H. Anke, V. Sinnwell, S. Franke, W. Francke
Novel isoquinoline quinones from the ascidian *Ascidia virginea*
J. Nat. Prod. submitted, under review
- 2.-7. "Full Papers" in referierten Fachzeitschriften, inhaltlich den publizierten Postern 2-7 (s.o.) entsprechend
8. Mit S. Sölter über die Glycolipide aus *Pachymatisma johnstonia*

III. Erfolgskontrollbericht

III.1 Beiträge zu förderpolitischen Zielen

Die Ziele des Verbundprojekts „BOSMAN - Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle“ orientierten sich vollständig an den förderpolitischen Zielen des BMBF und des Schwerpunktprogramms „Marine Naturstoffforschung“. Das Teilprojekt hat in diesem Zusammenhang wesentliche Beiträge durch die Strukturaufklärung zahlreicher neuer Sekundärmetabolite, insbesondere aus Schwämmen, aber auch aus Korallen und Manteltierchen geliefert, und damit die derzeitigen Kenntnisse über das Naturstoffinventar dieser Organismen (einschließlich assoziierter Mikroorganismen) wesentlich erweitert.

III.2 Wissenschaftlich-technisches Ergebnis und gesammelte Erfahrungen

Die erzielten Ergebnisse wurden in 3 umfangreichen Dissertationen, in Fachjournalen, anlässlich wissenschaftlicher Kongresse (Abstracts, Vorträge und Poster) sowie in Berichten an den Zuwendungsgeber ausführlich dargestellt. Technische Erfahrungen wurden insbesondere bei der (chromatographischen) Isolierung und Reinigung der Naturstoffe aus den bei der Präparation der marinen Organismen anfallenden komplexen Vielstoffgemischen gesammelt. Auch diese Erfahrungen wurden veröffentlicht.

III.3 Fortschreibung des Verwertungsplans

- a) Die Strukturen der identifizierten Naturstoffe könnten von anderen Arbeitsgruppen bei chemisch-taxonomischen Untersuchungen genutzt werden. Sie könnten ferner die Strukturaufklärung ähnlicher, bisher unbekannter Substanzen erleichtern.
- b) Einige der neuen Naturstoffe enthalten Strukturmerkmale (chemisch aggressive Teilstrukturen wie Keto-enoether), die darauf hinweisen, dass die entsprechenden Organismen sie zur Abwehr von Fraßfeinden bzw. allgemein als Wehrsubstanzen nutzen. Diese Verbindungen könnten als Leitstrukturen zur Entwicklung von neuen Pharmaka oder Pflanzenschutzmitteln dienen und in diesem Zusammenhang andere Arbeitsgruppen zur Synthese von Analoga anregen.

III.4 Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Nicht alle der bei verschiedenen Kampagnen gesammelten Organismen fielen in hinreichender Menge an, um mit Aussicht auf Erfolg aufgearbeitet werden zu können. Andererseits wurden in einigen Fällen nur derart kleine Mengen an Reinsubstanzen gewonnen, dass keine Strukturaufklärung möglich war. Ferner ergaben sich mitunter Gemische strukturell sehr ähnlichen Verbindungen, die nicht getrennt werden konnten, so dass eine sichere Strukturzuordnung der einzelnen Komponenten unmöglich war. Naturgemäß konnte nach Beendigung der finanziellen Förderung des Projekts eine Reihe von Rohextrakten und Fraktionen nicht weiter bearbeitet werden.

III.5 Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Alle wesentlichen Ergebnisse wurden publiziert. Dissertationen und Fachartikel sind über das Internet der Öffentlichkeit zugänglich.

III.6 Einhaltung des Ausgaben- und Zeitplans

Der Ausgabenplan entsprach dem für das Projekt bewilligten Umfang. Das Projekt wurde allerdings von vornherein durch erhebliche Personalmittel aus institutioneller Quelle unterstützt. Der Zeitplan wurde eingehalten.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht	
3a. Titel des Berichts Identifizierung und Synthese biologisch aktiver Sekundärmetabolite aus Schwämmen und assoziierten Mikroorganismen		
3b. Titel der Publikation		
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Francke, Wittko		5. Abschlussdatum des Vorhabens Mai 2005
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n))		6. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität Hamburg Abteilung Organomeereschemie Institut für Organische Chemie Martin-Luther-King-Platz 6 20146 Hamburg		7. Form der Publikation
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		9. Ber. Nr. Durchführende Institution
		10. Förderkennzeichen ^{*)} 03Fo358A TP6
		11a. Seitenzahl Bericht 22
		11b. Seitenzahl Publikation
		12. Literaturangaben 44
		14. Tabellen
		15. Abbildungen 15
16. Zusätzliche Angaben -		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -		
18. Kurzfassung Der Schwerpunkt des Projekts lag bei der Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese von Sekundärmetaboliten aus 7 borealen Schwämmen. Darüber hinaus wurden 2 Korallenarten und ein Manteltierchen untersucht. Voraussetzung für die Bearbeitung war die erfolgreiche Entwicklung eines möglichst breit anwendbaren Verfahrens zur Extraktion, Anreicherung und Trennung relevanter Naturstoffe. Eine Kombination aus sukzessiver Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, Verteilungsvorgängen, Kieselgel-Chromatographie und RP18-HPLC oder präparative Gaschromatographie erwies sich als Methode der Wahl. Strukturbeweise für die Zielverbindungen erfolgten durch NMR-Spektroskopie (NMR), Massenspektrometrie (MS) – auch in Hochauflösung und CI-mode -, häufig in Kombination mit der Gaschromatographie und Fourier-transform Infrarot-Spektroskopie ebenfalls in Kopplung mit der Gaschromatographie (FT-IR). Die Ergebnissen von Mikroreaktionen mit den Naturstoffen und unabhängige Synthesen dienten ebenfalls als Strukturbeweise. siehe S. 2		
19. Schlagwörter Schwamm, Porifera, Sesquiterpene, Chlorazulene, Dihydrofuranone, Glycolipide, Koralle, Manteltierchen, Tunicate, Isochinolinchinone		
20. Verlag		21. Preis

^{*)} Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Im Einzelnen wurden folgende Substanzen identifiziert:

1. Schwamm - *Hymedesmia paupertas* Bowerbank:
3,7-Dihydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethyliden)azulen und Lactarazulen (Hauptkomponenten) sowie 3-Chlorlactarazulen und zahlreiche 3-Chlor- und 3-Bromderivate mit oxygenierter Isopropylgruppe (Neben- und Spurenkomponenten). Bis auf Lactarazulen sämtlich neue Naturstoffe; Strukturbeweise durch NMR, MS und Teilsynthese.
2. Schwamm - *Aphysilla sulfurea* (Schulze):
3,5-Dibrom-4-methoxyphenylacetonitril (Hauptkomponente unter den flüchtigen Verbindungen) neben verschiedenen strukturverwandten Bromisolen und Bromphenolen. Ferner das bereits bekannte Dibromtyrosinalkaloid Ianthellin (Hauptkomponente unter den polaren, nicht-flüchtigen Verbindungen) und eine Reihe strukturverwandter Verbindungen u.a. das neue Monobromderivat; Strukturbeweise durch NMR und MS.
3. Schwamm – *Mycale lingua* (Bowerbank):
(15Z)-Docosenal (Hauptkomponente unter den Lipiden) neuer Naturstoff, Strukturbeweis durch FT-IR, MS, Derivatisierung und unabhängige Synthese; bereits bekannte Steroidalkohole als Nebenkomponenten.
4. Schwamm – *Phakellia ventilabrum* Pallas:
Cluster bekannter Sesquiterpenkohlenwasserstoffe begleitet von Quartetten aus Isocyaniden, Isocyanaten, Isothiocyanaten und Dichloriminen mit jeweils gleichen Kohlenstoffskeletten wie die zugehörigen Sesquiterpenkohlenwasserstoffe. Die meisten dieser Verbindungen sind neue Naturstoffe; Strukturbeweise durch NMR, MS und Mikroreaktionen.
5. Schwamm – *Isops phlegraei* Sollas
2-Alkyl-2,3-dihydro-2H-furan-3-one; erste Vertreter einer neuen Klasse von Naturstoffen; Strukturbeweise durch GC/MS und unabhängige Synthese.
6. Schwamm – *Geodia barretti*, Bowerbank:
Berichtigung der publizierten Struktur von Baretin als das Diketopiperazin aus 2',3'-Didehydrotryptophan und Arginin; verschiedene Derivate dieser Substanz wie Dihydrobaretin (Diketopiperazin aus Tryptophan und Arginin) und Hydroxydihydrobaretin; Strukturbeweise durch NMR und MS.
7. Schwamm – *Pachymatisma johnstonia* Bowerbank:
Eine Suite von Glycolipiden aus zwei verschieden stark acetylierten Tetrasacchariden und einem mono- bzw. dihydroxylierten Aglycon aus einer 14-Oxocarbonsäure, die amidisch mit Alanin verknüpft ist. Eine neue natürliche Glycolipid-Bibliothek, Strukturbeweise durch NMR und MS, Mikroreaktionen und Teilsynthese.
8. Octokoralle – *Primnoa resedaeformis* (Gunnerus)
Zahlreiche bekannte Sesquiterpenkohlenwasserstoffe und z.T. bekannte oxygenierte Sesquiterpene. 3,7-Dimethyl-1-(1-methylethenyl)bicyclo[5.5.0]dec-1-en ein Kohlenwasserstoff mit neuem Sesquiterpenskelett; Strukturbeweise durch NMR und MS.
9. Lederkoralle – *Anthothela grandiflora* (Sars.)
Verschiedene bekannte Sesquiterpene, zwei neue oxygenierte Sesquiterpene mit Cadinan-Skelett und Naphthofuran- bzw. Dihydronaphthofuran-Struktur; Strukturbeweise durch NMR, MS und Mikroreaktionen.
10. Manteltierchen – *Ascidia virginea* Müller
Arylierte, dihydroxylierte Isochinolinchinone sowie Monojod-, Dijod- und Bromjod-Derivate; ein völlig neues 2-Azanaphthochinon-System; Strukturbeweise durch NMR, MS und Mikroreaktionen.

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.

Thomas Schaefer, Martin Borchert

1.1.Aufgabenstellung in TP7 war die phylogenetische Analyse der Isolate aus Bosman I und II in enger Kooperation mit TP4/Prof. Szewzyk, TU Berlin, und das Screening der Isolate nach industrieller Relevanz mit Bezug auf Enzyme. Im Detail sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- 1) phylogenetische Analyse der Isolate des Bosman Projektes von TP4
- 2) Screening der Isolate nach industriell relevanter Enzymproduktion
- 3) Entwicklung relevanter Assays
- 4) Teilsequenzierung der Genome/Sekretome der selektierten Enzymproduzenten mit Hilfe der TAST Technologie
- 5) Sekundäres Screening zur Charakterisierung der Enzyme
- 6) PCR klonierung selektierter Gene
- 7) Sequenzanalyse der Gene und Klone
- 8) Expression ausgewählter Enzyme in industriell relevanten Produktionsstämmen

1.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde: Aus Bosman I war bekannt, dass eine grosse Anzahl verschiedener Prokaryoten aus den marinen Schwämmen isoliert werden konnten. Für das industrielle Screening nach neuen Enzymen für industrielle Anwendungen ist es relevant, diese Isolate auf ihre Diversität zu überprüfen, um das Auffinden immer gleicher Enzyme zu vermeiden. Nach der Analyse der Isolate wurde gezielt ein Isolat im Detail untersucht.

Novozymes ist Weltmarktführer im Bereich industrieller Enzyme. Mit über 4000 Patenten und über 3000 Mitarbeitern weltweit produziert Novozymes Enzyme in den Bereichen technische Enzyme (z.B. Waschmittel, Textilien, Stärkeverzuckerung), Food und Animal Feed. Mit etwa 43 % Marktanteil ist Novozymes der grösste Hersteller von Enzymen. Zu den technologischen Kernkompetenzen gehört das Screening neuer Isolate nach industriell relevanten Enzymen mit den Technologien, die oben beschrieben sind.

Die Arbeiten wurden von Martin Borchert im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Ein wesentlicher Teil der praktischen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Antranikian an der TU Hamburg-Harburg durchgeführt, da Novozymes Deutschland keine eigene Forschungsabteilung in Deutschland besitzt. Die Arbeiten wurden betreut von Wissenschaftlern von Novozymes A/S, mit Sitz der Hauptforschungsaktivitäten in Dänemark. Martin Borchert war mehrmals und zum Teil über einen Zeitraum von mehreren Wochen im Forschungszentrum in Dänemark, um die relevanten Technologien inklusiver der Bioinformatik Infrastruktur kennenzulernen. Herr Borchert hat im August 2005 seine Doktorarbeit mit der Doktorprüfung erfolgreich abgeschlossen.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens wurden im wesentlichen wie in 1.1 beschrieben durchgeführt.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand:

Die Arbeiten wurden unter dem neuestem wissenschaftlichen und technischem Stand durchgeführt. Insbesondere für die Genomanalyse des selektierten Isolates wurde eine neuartige Methode benutzt, die speziell für diese Zwecke von Novozymes entwickelt und auch zum Patent angemeldet wurde.

Für Literatur und Patente siehe : [1], [2]

Für die bioinformatischen Analysen wurden Programme benutzt, die von Experten bei Novozymes speziell für diesen Zweck entwickelt wurden. Die Expressionstudien wurden in industriell relevanten Produktionsstämmen durchgeführt (Bacillus subtilis, E. coli), um Enzyme zur Charakterisierung zu gewinnen und ein potentiell Scale up zu gewährleisten.

Für Literatur siehe: [3], [4]

Für allgemeine Literatur siehe [5]

1. Becker F, Schnorr K, Wilting R, Tolstrup N, Bendtsen JD, Olsen PB: Development of in vitro transposon assisted signal sequence trapping and its use in screening Bacillus halodurans C125 and Sulfolobus solfataricus P2 gene libraries. *J.MICROBIOL.METHODS* 2004, 57:123-133.
2. Duffner F, Wilting R, Schnorr K. Signal Sequence Trapping. Edited by Novozymes A/S. WO 01/77315, 1-48. 2001. 22-3-2001.
Ref Type: Patent
3. Sloma AP, Widner WR: Bacterial donor cell useful in conjugation. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents* 121:1637-1998.
4. Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R, Sloma A: Development of marker-free strains of Bacillus subtilis capable of secreting high levels of industrial enzymes. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 2000, 25:204-212.
5. Schaefer T, Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC, Pedersen S, Salmon S, Olsen HS, Deinhammer R, Lind H: Enzymes for technical applications. In *Biopolymers*. Edited by Steinbuechel A. Wiley VCH; 2002.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Hauptkooperationspartner war die AG von Prof Dr. U. Szewzyk, TU Berlin, die für die Isolierung der Prokaryoten aus marinen Schwämmen verantwortlich zeichnete. Um die Koordinierung möglichst effektiv zu gestalten, wurden im Laufe des Projekts regelmässige (etwa 5) Treffen in Berlin durchgeführt, in denen der jeweilige Stand der Forschung von TP 4 und TP 7 beschrieben wurde und in denen die nächsten experimentellen Schritte diskutiert und geplant wurden. An diesen Treffen nahmen auch Wissenschaftler und Betreuer der Forschungsgruppe in Dänemark teil. Ausserdem verbrachte Martin Borchert einige Tage in der AG von Prof. Dr. Szewzyk.

Diese Treffen fanden zusätzlich zu den Bosman Projekttreffen statt, an denen alle Partner teilnahmen.

2: Eingehende Darstellung des erzielten Ergebnisses:

2.1. ...des erzielten Ergebnisses

Das Screening nach neuen Enzymen ist in der vorliegenden Arbeit an marinen bakteriellen Isolaten aus Bosman I und II durchgeführt worden. Dreihundert Isolate wurden in Vorarbeiten aus Tiefseeschwämmen vom Norwegischen Schelf isoliert und für diese Arbeit von TP α , Prof Dr U Szewzyk zur Verfügung gestellt. Ein Stamm zeigte im Screening herausragendes Potential als Enzymproduzent und wurde einer genaueren Analyse unterzogen. Der Stamm P203 wurde physiologisch charakterisiert, phylogenetisch klassifiziert und als neue Spezies der Gattung *Bacillus* beschrieben. *Bacillus* sp. P203 gehört zur alkaliphilen rRNA Gruppe 6 und zeichnete sich durch das Wachstum bei 4 bis 30 °C, 0 bis 12% NaCl und bei pH 7 bis pH 10 als psychrotoleranter, moderat halophiler und alkalitoleranter Organismus aus, der perfekt an die marine Umgebung angepaßt ist. Zusätzlich wurde der phylogenetische Nachbar des Stammes P203, *Bacillus* sp. LMG21005, ein bisher unbeschriebener Stamm taxonomisch eingeordnet. *Bacillus* sp. LMG21005 war nicht halotolerant; Wachstum konnte nur bis max. 4% NaCl beobachtet werden. Die Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierung zeigten, daß *Bacillus* sp. P203 und *Bacillus* sp. LMG21005 nur 32.5% Ähnlichkeit aufwiesen. Ein Vergleich der Fettsäurezusammensetzung (durchgeführt vom Projektpartner Prof. Michaelis), des G+C Gehaltes und ausgewählter biochemischer Parameter unterstrichen die Klassifizierung von *Bacillus* sp. P203 und *Bacillus* sp. LMG21005 als zwei neue Spezies, für die die Namen *Bacillus plakortiensis* und *Bacillus greeniensis* vorgeschlagen werden.

Das Genom des marinen *Bacillus* sp. P203 wurde mit einem von der Novozymes entwickelten Verfahren nach extrazellulären Enzymen durchsucht. In das Kulturmedium sekretierte Proteine haben den wesentlichen Vorteil, leichter aus dem Kulturüberstand gereinigt werden zu können. Expressionsmethoden, bei denen die gewünschten Enzyme in dieser Art erhalten werden, sind in der industriellen Enzym- und Proteinchemie von sehr großer Bedeutung. Das am *Bacillus* sp. P203 durchgeführte Genomscreening lieferte insgesamt über 1.000 DNA Sequenzen, die Gene enthielten, die für ein oder mehrere putativ extrazelluläre Enzyme kodierte. Die DNA Sequenzen wurden mit bioinformatischen Methoden analysiert und in Proteinsequenzen übersetzt.

In den fünfzig Proteinsequenzen konnten insgesamt zwölf industriell relevante Enzyme identifiziert werden. Diese waren eine Arabinogalactosidase, eine Xylosidase, eine Xylanase, zwei Carboanhydrasen, eine Rhamnogalacturonan Lyase, zwei beta-Glucosidasen, eine beta-Galactosidase, zwei Proteasen und eine Peptidase.

Der überwiegende Teil der neu entdeckten DNA- bzw. Proteinsequenzen hatte nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten Polypeptiden anderer Prokaryonten (ca. 40-70% Aminosäureidentität). Ein Vergleich der neuen Proteinsequenzen mit Genomsequenzen von sechs phylogenetisch benachbarten *Bacillus* Stämmen zeigte eine Ähnlichkeit zu den industriell genutzten *Bacillus* Stämmen *Bacillus clausii* (durchschnittlich 52% Proteinsequenzähnlichkeit), *Bacillus licheniformis* (43%), *Bacillus halodurans* (48%) und *Bacillus subtilis* (42%). Die Sekretionswege der ca. 50 neu entdeckten Proteinsequenzen von *Bacillus* sp. P203 wurden bioinformatisch vorhergesagt. Zwanzig Proteine wurden dem Sec Sekretionsweg zugeordnet, drei Proteine waren vermutlich TAT-abhängig. Vierzehn Protein Sequenzen hatten ein Lipobox Motiv. Aufgrund ihrer industriellen Relevanz, ihrer Aminosäureidentität zu bereits bekannten Proteinen anderer Organismen und aufgrund der Vorhersage des Sekretionswegs wurden zwei Gene für weitere Klonierungs- und Expressionsversuche ausgewählt.

Eine alpha-Carboanhydrase (EC 4.2.1.1) aus *Bacillus* sp. P203 wurde kloniert (Gen caaP203) und heterolog in *Escherichia coli* und einem industriellen Produktionsstamm (*Bacillus subtilis* TH1, Novozymes) überexprimiert. In *E. coli* wurde die Carboanhydrase ins Periplasma sekretiert. Im *B. subtilis* erfolgte die Sekretion ins Kulturmedium. Der Reinigung zur Homogenität mittels hochspezifischer Affinitätschromatographie folgte die Charakterisierung des Enzyms. Carboanhydrase CaaP203 katalysierte die reversible Umsetzung von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure bei 4 °C und war bis 30 °C stabil. Inhibierungsstudien zeigten einen I₅₀-Wert von 500 µM für Azidionen und 0.09 µM für den spezifischen Carboanhydrase Inhibitor Azetazolamid. Desweiteren konnte Esteraseaktivität von CaaP203 nachgewiesen werden. CaaP203 ist die erste beschriebene Carboanhydrase einer *Bacillus* Art.

Ein weiteres Enzym aus *Bacillus* sp. P203 wurde ebenfalls in *E. coli* und *B. subtilis* TH1 kloniert und heterolog überexprimiert. Bei der Expression der Arabinogalactan endo-beta-1,4-Galactosidase AGP203 in *B. subtilis* TH1 konnte die enzymatische Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Im Falle von *E. coli* lag das rekombinante Protein zellgebunden vor. Das Aktivitätsprofil des rekombinanten Proteins war dem des Wildtypenzym sehr ähnlich. Maximale Aktivität wurde bei pH 7 und 40 °C detektiert. Arabinogalactosidasen (EC 3.2.1.89) finden Anwendung in der Futtermittelherstellung, da die Enzyme in der Lage sind, Zuckerseitenketten von Pflanzenzellwand-Polymeren abzuspalten und somit die Verdaubarkeit von pflanzlichem Futter zu erhöhen. Die durchgeführten Arbeiten am Stamm P203 verdeutlichen das enorme Potential mariner, alkaliphiler Mikroorganismen in der industriellen Enzymproduktion.

Im Anhang sind Tabellen gelistet, die die hier beschriebenen Ergebnisse im Detail darstellen. Es wird hiermit darauf hingewiesen, dass der Anhang aus patentrechtlichen Gründen vertraulich zu behandeln ist und nicht verbreitet werden darf.

2.2. ... des vorraussichtlichen Nutzens

Die Arbeiten haben zu einigen neuen Enzymen geführt wie in 2.1. beschrieben wurde. Alle diese Enzyme sind potentiell für industrielle Anwendungen interessant. Entsprechend der Ergebnisse wurden 2 Patentanmeldungen beim EPO eingereicht, um die neuartigen Enzyme patentrechtlich zu schützen:

Titel: Polypeptides of strain Bacillus sp P203

Erfinder: Borchert, Nielsen, Wilting

Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10807.000-DK

Zusätzlich wurde die gefundene Protease in eine Patentanmeldung aufgenommen, die auch andere Proteasen aus Screeningsprozessen innerhalb von Novozymes enthalten:

Titel: Novel Subtilases from Bacillus gibsonii like bacilli

Erfinder: Borchert, Nielsen

Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10807.000-DK

Alle Enzyme sind in relevanten Produktionstämmen exprimiert, so dass Material für Anwendungsversuche zur Verfügung gestellt werden kann, und diese ein Scale up durchlaufen können.

Es wurde bereits im Antrag darauf hingewiesen, dass es nicht auszuschliessen ist, dass keines der Enzyme, die in dem Arbeitsplan gefunden wurden, zu einem Produkt führen wird. Der geplante und durchgeführte Arbeitsplan entspricht einem industriellen Screeningverlauf, der aufgrund unserer Erfahrung nicht immer zu marktfähigen Produkten führt.

Das Marktpotenzial ist schwierig abzuschätzen, da die Produktkandidaten für verschiedene Märkte benutzt werden können. Es besteht ein grosser Unterschied zwischen Enzymen im Bereich Waschmittel (z.B. Protease) und im Bereich Food (z.B. Arabinogalactanase). Innerhalb von Novozymes werden die verschiedenen neuen Enzyme in den nächsten Jahren in einer Reihe verschiedener Anwendungsversuche getestet werden, um das Anwendungspotential zu studieren.

2.3. ... des Fortschritts beim anderen Stellen

Da die Technologie, die für die Analyse des Secretoms benutzt wurde, von Novozymes entwickelt und patentrechtlich geschützt wurde, hat keine andere Arbeitsgruppe nach unserem Wissensstand diese Technologie benutzt. Insbesondere Konkurrent im Bereich der Industriellen Enzyme verfügen über keine entsprechende Technologie. Die Enzyme, die in dieser Arbeit gefunden wurden, sind patentier-

bar (siehe unten) d.h. andere Stellen haben während der Durchführung dieser Arbeiten keine entsprechenden Enzyme gefunden.

2.4 ... der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen

Geplante Veröffentlichungen:

1. Martin S. Borchert, Preben Nielsen, Thomas Schäfer, Ines Kaesler,; Ulrich Szewzyk, Thomas Pape, Garabed Antranikian, Marine *Bacillus plakortiensis*, sp. nov., and *Bacillus greeniensis* sp. nov., novel members of alkalitolerant rRNA group 6
2. Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Isops phlegraei*
3. Kaesler I., Graeber I., Pape T., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Geodia baretii*
4. Graeber I., Kaesler I., Pape T., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge *Haliclona* sp.
5. Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Arname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., marine bacteria isolated from the boreal sponge *Phakellia ventilabrum*
6. Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U.: Continuous culture: a new enrichment method with oligotrophic conditions to isolate sponge-associated bacteria from *Geodia baretii*
7. Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U.: Combining batch cultures and continuous cultures for culturing bacteria from the marine sponge *Phakellia ventilabrum*

Poster:

1. Transposon Assisted Signal Sequence Trapping – the Discovery of Secreted Proteins in Marine *Bacillus* sp. P203 Isolated from *Plakortis* Sponge, Abstracts and Poster publications at the “International Congress on Biocatalysis”, Hamburg, Germany 2004 ; “Bioperspectives2005”, Wiesbaden,

Germany, 2005

Patentanmeldungen:

Titel: Polypeptides of strain Bacillus sp P203

Erfinder: Borchert, Nielsen, Wilting

Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10807.000-DK

Titel: Novel Subtilases from Bacillus gibsonii like bacilli

Erfinder: Borchert, Nielsen

Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10798.000-DK

3. Erfolgskontrollbericht

3.1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen

Das Vorhaben durch Novozymes lehnte sich eng an das Schwerpunktförderprogramm "Marine Naturstoffforschung" und den Teilaspekt "Das Meer als Ressourcenquelle" des BMBF an. Insbesondere die industrielle Verwertung der bislang unzureichend identifizierten Arten an Bakterien gilt auch heute noch als ungenutzte wirtschaftliche Quelle. Dieses Potenzial wurde durch das Vorhaben teilweise genutzt.

3.2. wissenschaftlich-technische Ergebnis

Alle im Antrag beschriebenen Arbeiten wurden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zum Teil in Patentanmeldungen aufgenommen, zum Teil werden diese in Zusammenarbeit mit TP4, Prof. Dr. U Szewzyk publiziert. Zu den Erfahrungen zählen wir, dass die Zusammenarbeit mit anderen Partnern wissenschaftlich stimulierend ist und zu publikationsfähigen Ergebnissen und damit Erkenntnissen führt, die ohne dieses Forschungsvorhaben nicht erreicht worden wären.

Herr Martin Borchert hat im Rahmen dieser Arbeit seine Promotion erfolgreich durchgeführt und hat sich Expertisen im Bereich des industriellen Screenings, insbesondere in den Bereichen Secretomanalyse, Bioinformatik und Expression von Enzymen in industriell relevanten Produktionsstämmen angeeignet.

Im Anschluss an seine Doktorarbeit wurde Herr Martin Borchert in der Forschung bei Novozymes in Dänemark eingestellt.

3.3 Fortschreibung des Verwertungsplanes

Im Rahmen des Bosman II Projektes sind von Novozymes 2 Patentanmeldungen beim EPO, also auch in Deutschland eingereicht worden:

Titel: Polypeptides of strain Bacillus sp P203

Erfinder: Borchert, Nielsen, Wilting

Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10807.000-DK

Titel: Novel Subtilases from Bacillus gibsonii like bacilli

Erfinder: Borchert, Nielsen

Prioritätsdatum: 16.08.2005, interne Nummer: 10798.000-DK

Es wurde bereits im Antrag darauf hingewiesen, dass es nicht auszuschliessen ist, dass keines der Enzyme, die in dem Arbeitsplan gefunden wurden, zu einem Produkt führen wird. Der geplante und durchgeführte Arbeitsplan entspricht einem industriellen Screeningverlauf, der aufgrund unserer Erfahrung nicht immer zu marktfähigen Produkten führt und die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten damit begrenzt sind. Das Marktpotenzial ist schwierig abzuschätzen, da die Produktkandidaten für verschiedene Märkte benutzt werden können. Es besteht ein grosser Unterschied zwischen Enzymen im Bereich Waschmittel (z.B. Protease) und im Bereich Food (z.B. Arabinogalactanase). Alle Enzyme sind in relevanten Produktionsstämmen exprimiert, so dass Material für Anwendungsversuche zur Verfügung gestellt werden kann, und diese ein Scale up durchlaufen können. Innerhalb von Novozymes werden die verschiedenen neuen Enzyme in den nächsten Jahren in einer Reihe verschiedener Anwendungsversuche getestet werden, um das Anwendungspotential zu studieren.

Entsprechend dieser Versuche und der zu erwartenden Ergebnisse kann nicht eindeutig Stellung genommen werden zu einer potentiellen Markteinführung der verschiedenen Enzyme. Im optimalen Fall schliesst sich an die Aufgaben dieses Vorhaben, das Downstream Processing an. Dies bedeutet, dass die Produktionsstämme eventuell in Bezug auf Ausbeute verbessert werden, diese Stämme im Labor-, im Pilot Plant- und im Produktionsmassstab gezüchtet werden und Verfahren zur Darstellung, Aufreinigung und Formulierung des Enzymproduktes entwickelt werden müssen. Der Zeitrahmen für diese Schritte liegt im optimalen fall bei ca. 3 Jahren.

Reference List

1. Becker F, Schnorr K, Wilting R, Tolstrup N, Bendtsen JD, Olsen PB: **Development of in vitro transposon assisted signal sequence trapping and its use in screening *Bacillus halodurans* C125 and *Sulfolobus solfataricus* P2 gene libraries.** *J.MICROBIOL.METHODS* 2004, **57**:123-133.
2. Duffner F, Wilting R, Schnorr K. Signal Sequence Trapping. Edited by Novozymes A/S. WO 01/77315, 1-48. 2001. 22-3-2001.
Ref Type: Patent
3. Sloma AP, Widner WR: **Bacterial donor cell useful in conjugation.** *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents* **121**:1637-1998.
4. Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R, Sloma A: **Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes.** *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 2000, **25**:204-212.
5. Schaefer T, Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC, Pedersen S, Salmon S, Olsen HS, Deinhammer R, Lind H: **Enzymes for technical applications.** In *Biopolymers*. Edited by Steinbuechel A. Wiley VCH; 2002.

Berichtsblatt:

<p>1. ISBN oder ISSN:</p> <p>7 geplante Veröffentlichungen:</p>	<p>2: Berichtsart: Schlussbericht</p>
<p>3a) Titel des Berichts: Projekt MN III: Bosman II: Identifizierung neuer industriell verwertbarer Enzyme aus schwammassoziierten Mikroorganismen“ /Förderkennzeichen 03F0358F</p>	
<p>3b) genauer Titel der Publikationen:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Martin S. Borchert, Preben Nielsen, Thomas Schäfer, Ines Kaesler,; Ulrich Szewzyk, Thomas Pape, Garabed Antranikian, Marine <i>Bacillus plakortiensis</i>, sp. nov., and <i>Bacillus greeniensis</i> sp. nov., novel members of alkalitolerant rRNA group 6 2. Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge <i>Isops phlegraei</i> 3. Kaesler I., Graeber I., Pape T., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge <i>Geodia baretii</i> 4. Graeber I., Kaesler I., Pape T., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from the boreal sponge <i>Haliclona</i> sp. 5. Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., Pape T., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., (Gattungs- und Artname in Bearbeitung) gen. nov., sp. nov., marine bacteria isolated from the boreal sponge <i>Phakellia ventilabrum</i> 6. Kaesler I., Graeber I., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U., Continuous culture: a new enrichment method with oligotrophic conditions to isolate sponge-associated bacteria from <i>Geodia baretii</i> 7. Graeber I., Kaesler I., Borchert M., Dieckmann R., Nielsen P., von Döhren H., Szewzyk U.: Combining batch cultures and continuous cultures for culturing bacteria from the marine sponge <i>Phakellia ventilabrum</i> 	
<p>4a) Autoren des Berichts: Schäfer, Thomas; Borchert Martin</p>	<p>5. Abschlussdatum des Vorhabens: Mai 2005</p>
<p>4b) Autoren der Publikationen: Borchert Martin, Nielsen Preben, Schäfer Thomas, Kaesler Ines; Szewzyk Ulrich, Pape Thomas, Antranikian Garabed, von Döhren Hans.</p>	<p>6. Veröffentlichungsdatum: geplant</p>
	<p>7. Form der Publikation: Fachzeitschriften</p>
<p>8) durchführende Institutionen:</p>	<p>9. Ber Nr. Durchführende Institution</p>

a) Novozymes A/S b) Technische Universität Hamburg Harburg, Kasernenstrasse 12, D-21073 Hamburg, Germany c) Technische Universität Berlin, Franklinstrasse 29, D-10587 Berlin, Germany d) Universität Hamburg, Institute of Biogeochemistry and Marine Chemistry, Bundesstrasse 55, D-20146 Hamburg, Germany	
	10. Förderkennzeichen: 03F0358F
	11a Seitenzahl Bericht: 4
	11b Seitenzahl Publikation: n.n.
13. Fördende Institution: Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) 53170 Bonn	12: Anzahl der Literaturangaben im Bericht: 1
	14. Tabellen: keine
	15. Abbildungen: keine
16. Zusätzliche Angaben: keine	
17. Vorgelegt bei: nicht relevant	
18. Kurzfassung: <p><u>1) Derzeitiger Stand von Wissenschaft und Technik:</u></p> Für die Beschreibung neuer prokariotischer Isolate: 16S rDNA Analyse sowie DNA/DNA Hybridisierungen Für die Sekretomanalyse prokariotischer Genome: transposon gestütztes Signal Trapping oder vollstaendige Genomsequenzierung gefolgt von spezifischen Bioinformatischen Methoden wie SignalP Signal Sequenz Vorraussagen, transmembranlokalisierungs Vorraussagen (Literatur: Becker F, Schnorr K, Wiltig R, Tolstrup N, Bendtsen JD, Olsen PB: Development of in vitro transposon assisted signal sequence trapping and its use in screening Bacillus halodurans C125 and Sulfolobus solfataricus P2 gene libraries. <i>J.MICROBIOL.METHODS</i> 2004, 57:123-133.) <p><u>2) Begründung der Untersuchung:</u></p> Neuartige Isolate aus marinen Schwämmen sind neue Quellen für innovative Enzyme, die für industrielle Anwendungen benutzt werden können. <p>3) <u>Methoden:</u> s.18.1</p> <p>4) <u>Ergebnis:</u></p> Das Screening nach neuen Enzymen ist an marinen bakteriellen Isolaten aus Bosman I und II durchgeführt worden. Dreihundert Isolate wurden in Vorarbeiten aus Tiefseeschwämmen vom Norwegischen Schelf isoliert und für diese Arbeit von TP 4, Prof Dr U Szewzyk zur Verfügung gestellt. Alle Stämme wurden mit Hilfe der 16S rDNA Sequenz auf ihre phylogenetische Zuordnung analysiert. Ausserdem wurden alle Stämme einem Enzymfringerprint unterworfen, um gute Enzymproduzenten zu selektieren. Ein Stamm zeigte im Screening herausragendes Potential als Enzymproduzent und wurde einer genaueren Analyse unterzogen. Der Stamm P203 wurde physiologisch charakterisiert, phylogenetisch klassifiziert und als neue Spezies der Gattung <i>Bacillus</i> beschrieben. <i>Bacillus</i> sp. P203 gehört zur alkaliphilen rRNA Gruppe 6 und zeichnete sich durch das Wachstum bei 4 bis 30 °C, 0 bis 12% NaCl und bei pH 7 bis pH 10 als psychrotoleranter, moderat halophiler und alkalitoleranter Organismus aus, der perfekt an die marine Umgebung angepaßt ist. Zusätzlich wurde der phylogenetische Nachbar des Stam-	

mes P203, *Bacillus* sp. LMG21005, ein bisher unbeschriebener Stamm taxonomisch eingeordnet. *Bacillus* sp. LMG21005 war nicht halotolerant; Wachstum konnte nur bis max. 4% NaCl beobachtet werden. Die Ergebnisse der DNA-DNA Hybridisierung zeigten, daß *Bacillus* sp. P203 und *Bacillus* sp. LMG21005 nur 32.5% Ähnlichkeit aufwiesen. Ein Vergleich der Fettsäurezusammensetzung (durchgeführt vom Projektpartner Prof. Michaelis), des G+C Gehaltes und ausgewählter biochemischer Parameter unterstrichen die Klassifizierung von *Bacillus* sp. P203 und *Bacillus* sp. LMG21005 als zwei neue Spezies, für die die Namen *Bacillus plakortiensis* und *Bacillus greeniensis* vorgeschlagen werden.

Das Genom des marinen *Bacillus* sp. P203 wurde mit einem von der Novozymes entwickelten Verfahren nach extrazellulären Enzymen durchsucht. In das Kulturmedium sekretierte Proteine haben den wesentlichen Vorteil, leichter aus dem Kulturüberstand gereinigt werden zu können. Expressionsmethoden, bei denen die gewünschten Enzyme in dieser Art erhalten werden, sind in der industriellen Enzym- und Proteinchemie von sehr großer Bedeutung. Das am *Bacillus* sp. P203 durchgeführte Genomscreening lieferte insgesamt über 1.000 DNA Sequenzen, die Gene enthielten, die für ein oder mehrere putativ extrazelluläre Enzyme kodierten. Die DNA Sequenzen wurden mit bioinformatischen Methoden analysiert und in Proteinsequenzen übersetzt.

In den fünfzig Proteinsequenzen konnten insgesamt zwölf industriell relevante Enzyme identifiziert werden. Diese waren eine Arabinogalactosidase, eine Xylosidase, eine Xylanase, zwei Carboanhydrasen, eine Rhamnogalacturonan Lyase, zwei beta-Glucosidasen, eine beta-Galactosidase, zwei Proteasen und eine Peptidase.

Der überwiegende Teil der neu entdeckten DNA- bzw. Proteinsequenzen hatte nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten Polypeptiden anderer Prokaryonten (ca. 40-70% Aminosäureidentität). Ein Vergleich der neuen Proteinsequenzen mit Genomsequenzen von sechs phylogenetisch benachbarten *Bacillus* Stämmen zeigte eine Ähnlichkeit zu den industriell genutzten *Bacillus* Stämmen *Bacillus clausii* (durchschnittlich 52% Proteinsequenzähnlichkeit), *Bacillus licheniformis* (43%), *Bacillus halodurans* (48%) und *Bacillus subtilis* (42%). Die Sekretionswege der ca. 50 neu entdeckten Proteinsequenzen von *Bacillus* sp. P203 wurden bioinformatisch vorhergesagt. Zwanzig Proteine wurden dem Sec Sekretionsweg zugeordnet, drei Proteine waren vermutlich TAT-abhängig. Vierzehn Protein Sequenzen hatten ein Lipobox Motiv. Aufgrund ihrer industriellen Relevanz, ihrer Aminosäureidentität zu bereits bekannten Proteinen anderer Organismen und aufgrund der Vorhersage des Sekretionswegs wurden zwei Gene für weitere Klonierungs- und Expressionsversuche ausgewählt.

Eine alpha-Carboanhydrase (EC 4.2.1.1) aus *Bacillus* sp. P203 wurde kloniert (Gen caaP203) und heterolog in *Escherichia coli* und einem industriellen Produktionsstamm (*Bacillus subtilis* TH1, Novozymes) überexprimiert. In *E. coli* wurde die Carboanhydrase ins Periplasma sekretiert. Im *B. subtilis* erfolgte sie Sekretion ins Kulturmedium. Der Reinigung zur Homogenität mittels hochspezifischer Affinitätschromatographie folgte die Charakterisierung des Enzyms. Carboanhydrase CaaP203 katalysierte die reversible Umsetzung von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure bei 4 °C und war bis 30 °C stabil. Inhibierungsstudien zeigten einen I₅₀-Wert von 500 µM für Azidionen und 0.09 µM für den spezifischen Carboanhydrase Inhibitor Azetazolamid. Desweiteren konnte Esteraseaktivität von CaaP203 nachgewiesen werden.

CaaP203 ist die erste beschriebene Carboanhydrase einer *Bacillus* Art.

Ein weiteres Enzym aus *Bacillus* sp. P203 wurde ebenfalls in *E. coli* und *B. subtilis* TH1 kloniert und heterolog überexprimiert. Bei der Expression der Arabinogalactan endo-beta-1,4-Galactosidase AGP203 in *B. subtilis* TH1 konnte die enzymatische Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Im Falle von *E. coli* lag das rekombinante Protein zellgebunden vor. Das Aktivitätsprofil des rekombinanten Proteins war dem des Wildtypenzym sehr ähnlich. Maximale Aktivität wurde bei pH 7 und 40 °C detektiert. Arabinogalactosidasen (EC 3.2.1.89) finden Anwendung in der Futtermittelherstellung, da die Enzyme in der Lage sind, Zuckerseitenketten von Pflanzenzellwand-Polymeren abzuspalten und somit die Verdaubarkeit von pflanzlichem Futter zu erhöhen.

Schlussfolgerung:

- a) es konnten neuartige Bakteriengattungen und -spezies aus marinen Schwämmen isoliert und beschrieben werden.
- b) Es konnten neue Enzyme beschrieben werden.
- c) Die durchgeführten Arbeiten am Stamm P203 verdeutlichen das enorme Potential mariner, alkaliphiler Mikroorganismen in der industriellen Enzymproduktion.

19. Schlagwörter: n.n.

20. Verlag: n.n.

Preis: n.n.