

Abschlussbericht zum Projekt „Dermacozine: neuartige Phenazinderivate aus
marinen *Dermacoccus*-Isolaten aus dem Marianengraben“

Die aus dem Marianengraben isolierten Stämme *Dermacoccus abyssi* MT 1.1 und *D. sp.* MT 1.2 sind als Produzenten von sieben neuartigen Phenazin-Derivaten, den Dermacozinen A - G, bekannt. Bei Kultivierung von *Dermacoccus sp.* MT 1.2 wurden neun weitere Substanzen identifiziert, die aufgrund ihrer UV-Vis-Spektren ebenfalls den Phenazinen zugeordnet wurden. Die Produktion dieser Metabolite konnte im Rahmen dieses Projekts deutlich erhöht werden, indem das Kultivierungsmedium und die Fermentationsbedingungen optimiert wurden. Dabei stellte sich der Zusatz von Glucose und CaCO₃ als besonders effektiv heraus. Im 10 Liter-Bioreaktor zeigte sich, dass die Verwendung von Vorkulturen, die zunächst unter Schütteln und anschließend stehend inkubiert worden waren, nicht nur die sonst übliche Schaumbildung herabsetzten, sondern auch die Produktion aller Zielsubstanzen verdoppelte. Die Dermacozine K, L, P, W, Z, RT 2.3, RT 3.37, RT 4.6 und RT 6.8 wurden als Reinsubstanzen isoliert. Des Weiteren konnte die chemische Struktur von Dermacozin K, L, Z und RT 3.37 durch die Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. Marcel Jaspars, Department of Chemistry, University of Aberdeen aufgeklärt werden.

In biologischen Aktivitätstests, die in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Johannes Imhoff (KiWiz, Kiel) und Prof. Dr. Julie Frearson (School of Life Sciences, University of Dundee) durchgeführt wurden, stellte sich heraus, dass einige der isolierten Substanzen sehr gute antioxidative Eigenschaften aufweisen, wohingegen nur geringe bzw. gar keine antibakterielle, antifungische, antitumorale bzw. enzymhemmende Wirkungen festgestellt wurden.

Zur Identifizierung der für die Dermacozin-Produktion verantwortlichen Biosynthesegene wurde eine Cosmid-Genbibliothek von *Dermacoccus sp.* MT 1.2 hergestellt und erfolgreich nach zwei essentiellen Grundgenen des Phenazin-Genclusters durchsucht. Die vollständige Sequenzierung eines ausgewählten Cosmids führte zu dem Ergebnis, dass das ca. 40 kb große Insert 30 offene Leserahmen beinhaltet, wovon 19 aufgrund von bioinformatischen Analysen zum Sekundärstoffwechsel zugeordnet wurden. Es konnten dabei alle essentiellen Phenazin-Grundgene *phzB*, *phzC*, *phzD*, *phzE*, *phzF* und *phzG* identifiziert werden, allerdings sind diese in einer anderen Reihenfolge angeordnet als in anderen Phenazin-Genclustern (vgl. Abbildung 1). Zum anderen wurde zwischen *phzC* und *phzD* kein Stoppcodon gefunden, was darauf hin deutet, dass diese beiden Gene ein Fusionsprotein codieren.

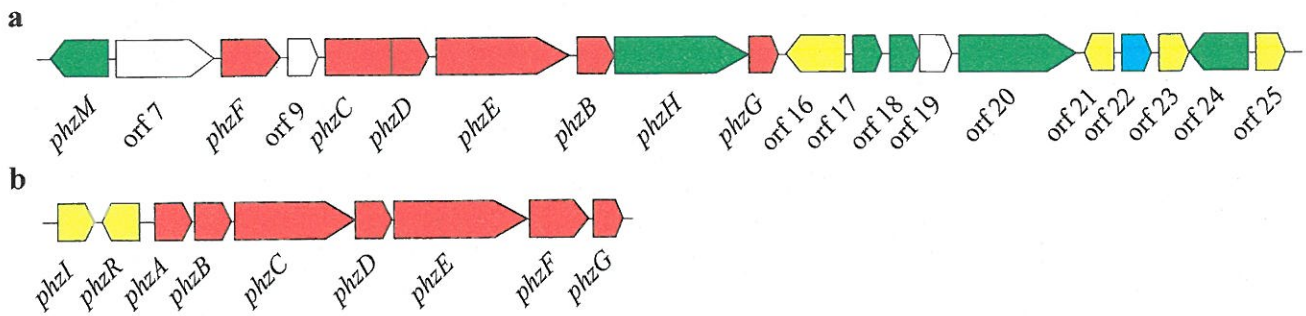


Abbildung 1: Genkarte eines möglichen Dermacozin-Biosynthese-Genclusters aus *Dermacoccus sp. MT 1.2* (a) im Vergleich zum Phenazin-1-Carbonsäure-Gencluster aus *Pseudomonas fluorescens* (b). Rot: Grundgene, gelb: regulatorische Gene, grün: modifizierende Gene, hellblau: Transport- oder Resistenzgene.

Zudem wurden sechs weitere Gene, die vermutlich an der Modifikation des Phenazin-Grundkörpers beteiligt sind, identifiziert. Darunter befanden sich u. a. *phzH* und *phzM*, die in anderen Phenazin-Produzenten eine Rolle bei der Modifikation von Phenazin-1-Carbonsäure bzw. Phenazin-1,6-Dicarbonsäure spielen. Des Weiteren wurden vier mögliche regulatorische und ein potentiell Resistenz- bzw. Exportgen identifiziert.

Allerdings konnte mittels heterologer Expression in *Streptomyces lividans* nicht verifiziert werden, dass es sich um das für die Dermacozin-Biosynthese verantwortliche Gencluster handelt, da die Exokonjuganten keine Phenazine produzierten. Dies wurde selbst durch Klonierung eines konstitutiven Promotors vor das erste Phenazin-Grundgen nicht erreicht.

Herr Wagner beendete seine Arbeit an diesem Projekt mit dem erfolgreichen Abschluss seiner Doktorarbeit am 30.05.2012.

Literatur:

Abdel-Mageed, W.M., Milne, B.F., Wagner, M., Schumacher, M., Sandor, P., Pathom-aree, W., Goodfellow, M., Bull, A.T., Horikoshi, K., Ebel, R., Diedrich, M., Fiedler, H.-P. and Jaspars, M. (2010). Dermacoazines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. *Org. Biomol. Chem.* 8, 2352-2362.

Wagner M., Abdel-Mageed W.M., Ebel, R., Bull, A.T., Goodfellow, M., Fiedler, H.-P. and Jaspars, M. Dermacoazines H-K, novel members of the dermacozine family isolated from deep-sea strain *Dermacoccus abyssi* from a Mariana Trench sediment. 2012, in Bearbeitung.