

# Wirkstoff-Forschung aktuell: Funktionelle Genomforschung zur Suche und Optimierung neuer Antibiotika

Seit gut 60 Jahren sind mycelartig wachsende grampositive Bodenbakterien aus der Gruppe der Aktinomyceten eine der wichtigsten Quellen für bioaktive Naturstoffe. Diese Naturstoffe dienen als Grundlage für viele Antibiotika und Cytostatika. Während in den siebziger Jahren noch Hoffnung bestand, schwere Infektionskrankheiten durch den Einsatz von Antibiotika weltweit auszurotten, hat sich die Lage inzwischen dramatisch verschlechtert: Das vermehrte Auftreten multi-resistenter Keime, die mit Standardtherapien kaum noch bzw. nicht mehr therapierbar sind, stellt inzwischen in vielen Krankenhäusern ein großes Problem dar. So sind z.B. in vielen südeuropäischen Ländern mehr als 25 % der klinischen *Staphylococcus aureus* Isolate resistent gegen das Antibiotikum Methicillin (MRSA), welches normalerweise zur Behandlung der Infektion eingesetzt wird (European Centre for Disease Prevention and Control, 2008). Obwohl diese Entwicklung absehbar war, wurden im den letzten Jahrzehnt nur sehr wenige neue Substanzklassen, die auch gegen multiresistente Erreger wirksam sind, zu medizinisch einsetzbaren Antibiotika entwickelt und in den Markt eingeführt. Deshalb besteht ein dringender Handlungsbedarf bei der Suche und Entwicklung neuer Antiinfektiva.

Tilmann Weber und Wolfgang Wohlleben

Die meisten derzeit im klinischen Einsatz befindlichen Antibiotika auf Naturstoffbasis wurden über einen klassischen Screening-Ansatz identifiziert, bei dem potentielle Antibiotikaproduzenten aus Bodenproben isoliert, unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und die jeweiligen Biosyntheseprodukte auf ihre Wirkung getestet wurden. Inzwischen wurde dieses Screening auch auf Isolate, die aus ungewöhnlichen Lebensräumen wie der Tiefsee oder Höhlensystemen isoliert wurden, erweitert. Oft werden jedoch nicht die ursprünglichen Naturstoffe als Medikament eingesetzt, sondern Derivate, die durch chemische Modifizierung entstanden sind. In den letzten Jahren hat nun der Ansatz des „Genetic Screenings“ und der anschließenden Möglichkeit zum „Genetic Engineering“ bei der Auffindung und Optimierung neuer Naturstoffe zunehmend an Bedeutung gewonnen.

## Biosyntheseprinzipien von Naturstoffen

Obwohl die Strukturvielfalt der Naturstoffe immens ist, erfolgt deren Synthese sehr häufig nach ähnlichen biochemischen Prinzipien: Als Grundbausteine der Antibiotika dienen Metabolite wie z.B. Aminosäuren, Acetyl-CoA oder Zucker, die entweder direkt aus dem Primärmetabolismus entnommen oder spezifisch für die Antibiotikabiosynthese von der Bakterienzelle gebildet werden.

In einem zweiten Schritt werden diese Grundeinheiten dann durch hochspezialisierte Enzyme verknüpft. Im Falle von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden, wie z.B. Vancomycin, oder komplexen Polyketiden wie z.B. Erythromycin, erfolgt die Verknüpfung durch modular aufgebaute Megaenzyme zu linearen Biosyntheseintermediaten. Mit Molekulargewichten, die in Extremfällen 2 Mio. Da überschreiten, gehören diese Enzyme zu den größten und komplexesten Enzymsystemen der Natur. Im letzten Schritt der Biosynthese können diese Intermediate dann vielfältig durch Halogenierungen, Methylierungen, oxidative Modifizierungen

oder intramolekulare Ringschlüsse verändert werden. Diese Ähnlichkeit der Biosyntheseprinzipien vieler Antibiotika auf Enzym-Ebene ermöglicht eine gezielte Suche nach deren Biosynthesegenen.

Hierzu werden Gensonden aus konservierten Bereichen dieser Enzyme abgeleitet, die dann zum Screening von Genombibliotheken dienen. Durch den Einsatz von Automatisierungstechnik konnte dieses Verfahren während der letzten Jahre im industriellen Einsatz für die Hochdurchsatz-Analyse optimiert werden. Die isolierten Gencluster stellen wiederum die Grundlage für die heterologe Expression der Biosynthesewege sowie deren „Engineering“ dar.

Im Rahmen eines Verbundprojekts innerhalb der vom BMBF geförderten Netzwerk-Initiative GenoMik-Plus (Genomforschung an Mikroorganismen für industrielle Produktion, Ernährung, Umwelt und Gesundheit) arbeiten verschiedene Arbeitsgruppen aus Deutschland (Prof. Dr. A. Bechthold, Universität Freiburg, Prof. Dr. S. Grond, Universität Tübingen, Prof. Dr. C. Hertweck, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung, Jena, Prof. Dr. A. Pühler, Universität Bielefeld, Prof. Dr. D. Schwartz / Prof. Dr. R. Biener, Hochschule Esslingen, Dr. U. Wehmeier, Universität Wuppertal, Prof. Dr. W. Wohlleben / Dr. T. Weber, Universität Tübingen) zusammen an der Weiterentwicklung dieser Technologien und deren praktischen Einsatz für Aktinomyceten.

## Das Ziel der Tübinger Mikrobiologen

um Prof. Wohlleben und Dr. Weber war es, im Genom des Aktinomyceten *Streptomyces collinus* Tü 365 Gene zu identifizieren, die für die Biosynthese des Antibiotikums Kirromycin verantwortlich sind und das daraus gewonnene Wissen zur Optimierung der Produktion einzusetzen. Das Antibiotikum Kirromycin führt durch die Bindung an den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese. Durch einen „Genetic Screening-

## Arbeitsmaterial

## Modul 4 Mikrobielle Systeme

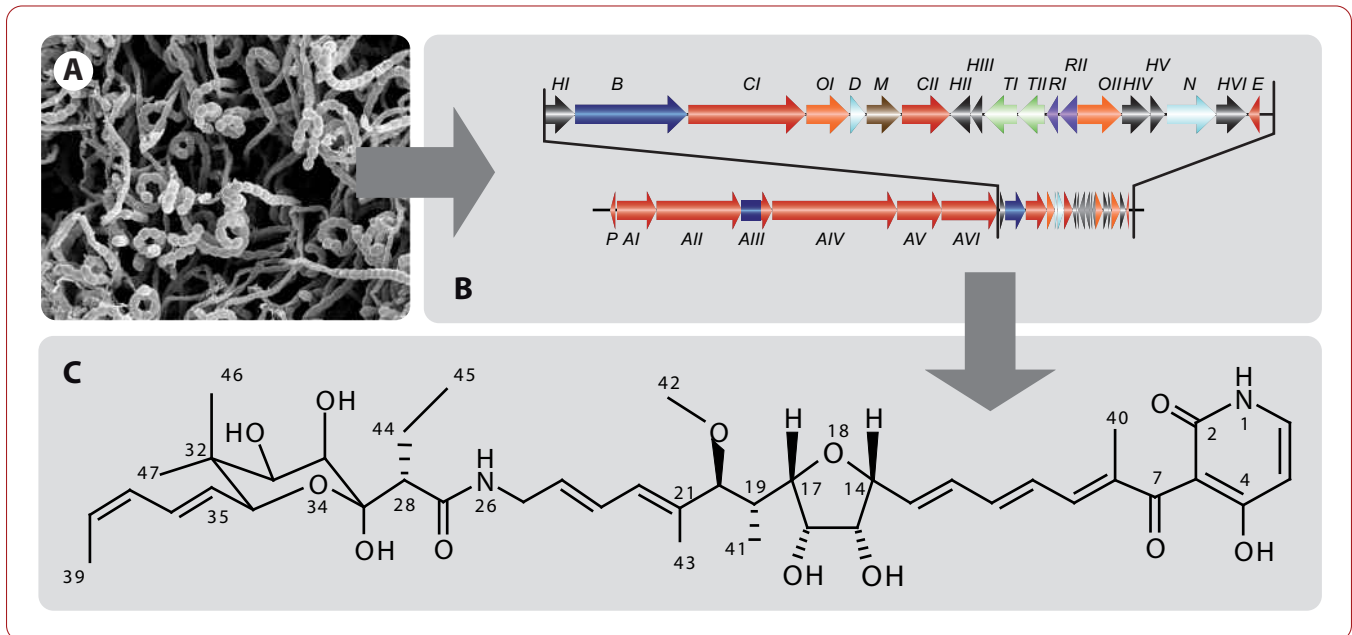


Abb. 1: Von der DNA-Sequenz zum Antibiotikum: Grundlegende Schritte bei der Identifizierung und Auswertung von Sekundärmetabolit-Biosynthese Genclustern, wie sie beim Genetic Screening oder Gesamtgenom-Sequenzierungsansätzen anfallen. Über einen Genetic Screening-Ansatz wurde das Kirromycin-Biosynthesegencluster aus dem Produzentenstamm *S. collinus* (A; Rasterelektronen-Mikroskop-Aufnahme) identifiziert. Es enthält 36 Gene mit einer Größe von insgesamt 82 kb (B). Über Computeranalysen kann aus diesen Sequenzdaten ein Biosynthesemodell vorgeschlagen werden, wie Kirromycin (C) in dem Bakterium gebildet wird.

Ansatz“ konnte das Kirromycin-Biosynthese-Gencluster, eine 82 kb umfassende Region im Genom des Produzenten, identifiziert und isoliert werden. Das Cluster enthält alle Gene, die für die Biosynthese benötigt werden. Mithilfe der Sequenzdaten und Funktionsvorhersagen der Gene konnte ein Biosyntheseweg durchgeführt werden: So konnte z.B. durch die Inaktivierung eines Transkriptions-Repressors die Produktionsrate von Kirromycin im Vergleich zum Wildtyp-Stamm verdoppelt werden.

### Genomforschung als Mittel zur Identifizierung neuer Antibiotika-Biosynthese-Gencluster

Die Entwicklung von „Next Generation Sequencing“ Technologien und die damit verbundene Kosteneinsparung bei der Sequenzierung bakterieller Gesamtgenome eröffnen auch neue Chancen zur Identifizierung und Isolierung neuer Antibiotika-Biosynthesewege. Während es noch vor kurzem unumgänglich war, in einem arbeits- und zeitaufwändigen Verfahren Genombibliotheken herzustellen, die als Basis für das Genetic Screening benötigt werden,

## Zusatzinfo

### Tübinger Mikrobiologen isolieren komplexen Gencluster aus *Streptomyces*-Bakterien.

Antibiotika sind Substanzen, die von Mikroorganismen produziert werden und die das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder sie töten können. Das macht man sich in der Medizin zunutze, da unter den Bakterien etliche Krankheitserreger des Menschen sind. Einige Gruppen von Mikroorganismen wie zum Beispiel die Bodenbakterien der Gattung *Streptomyces* bilden besonders viele verschiedene Antibiotika. Bereits 1972 haben Tübinger Mikrobiologen entdeckt, dass ein bestimmter Stamm namens *Streptomyces collinus* Tü 365 das Antibiotikum Kirromycin produziert. Es hat ein vergleichsweise enges Wirkungsspektrum und schädigt zum Beispiel Erreger wie Streptokokken und *Haemophilus influenzae*, die eine Reihe von Ent-

zündungskrankheiten verursachen können, sowie *Neisseria gonorrhoeae*, den Erreger der Geschlechtskrankheit Gonorrhoe. Bisher wird das Antibiotikum Kirromycin noch nicht als Medikament genutzt. Doch wäre es prinzipiell für die Medizin interessant, da ein enges Wirkungsspektrum einen gezielten Einsatz bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen ermöglichen könnte. Dr. Tilmann Weber, Dr. Kristina Laiple, Eva Pross und Prof. Wolfgang Wohlleben vom Mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen haben in Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern der Universität Göttingen und einer Berliner Biotechnologiefirma auf genetischer Ebene die verschlungenen Wege erforscht, auf denen das kompliziert gebaute Molekül Kirromycin in den *Streptomyces*-Bakterien hergestellt wird. Über ihre Forschungsergebnisse berichteten sie in der Fachzeitschrift *Chemistry & Biology*.

Kirromycin bringt in empfänglichen Bakterien die Proteinherstellung zum Stillstand, indem es an den so genannten Elon-

## Arbeitsmaterial

## Modul 4 Mikrobielle Systeme



*Streptomyceten sind wichtige Produzenten von Antiinfektiva. Foto: Pelzer, S et al. (2004) Prokaryotic and eucaryotic cells in biotech production. In: Kayser, O., Müller, R.H. (eds.) Pharmaceutical Biotechnology, Drug Discovery and Clinical Applications. Wiley-VCH-Weinheim, 9-33. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.*

ist es jetzt bei vergleichbarem Finanzeinsatz innerhalb viel kürzerer Zeit möglich, die Biosynthesegencluster direkt in Draft-Genomsequenzen zu identifizieren und zu analysieren.

Die Vorarbeiten des GenoMikPlus-Netzwerks und weiterer internationaler Arbeitsgruppen, die sich über Jahrzehnte mit den Biosynthesemechanismen beschäftigten, ermöglichen es, direkt aus den Sequenzdaten Rückschlüsse auf die putativen Biosyntheseprodukte zu ziehen. Unter Zuhilfenahme phylogenetischer und anderer Merkmale können im Fall von modularen PKS oder NRPS

Vorhersagen zu den eingebauten Substraten getroffen werden.

So ist es z.B. möglich, aus dem Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein bestimmter funktioneller Einheiten in den PKS-Megaenzymen auf das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit funktionaler Gruppen in den gebildeten Polyketiden zu schließen. Fast alle diese Methoden basieren ursprünglich auf manueller Sequenzanalyse. Deshalb entwickelten die Tübinger Wissenschaftler in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Bioinformatik Tübingen (Prof. Huson/Prof. Kohlbacher) Softwaretools, die diese Analyseschritte

gationsfaktor EF-Tu bindet. Dieser wird gebraucht, um die Grundbausteine der Proteine aneinanderzufügen. Da der bakterielle Elongationsfaktor anders aufgebaut ist als der äquivalente Elongationsfaktor höherer Organismen stellt er eine sehr interessante Ansatzstelle für Antibiotika dar, die derzeit nicht klinisch genutzt wird. Daher sind Kirromycin und verwandte Stoffe neben wichtigen Werkzeugen in der Proteinbiosyntheseforschung auch interessante Kandidaten für die Medikamentenentwicklung. In der neuen Veröffentlichung berichten die Wissenschaftler über ihre Arbeiten, die sie im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts GenoMik-Plus (Genomforschung an Mikroorganismen für industrielle Produktion, Ernährung, Umwelt und Gesundheit) durchgeführt haben. Im Genom des *Streptomyces*-Bakteriums konnten sie die Gene identifizieren, die die Bauanleitung des Kirromycins enthalten. Indem sie einzelne Gene gezielt ausgeschaltet haben – woraufhin die Kir-

romycin-Herstellung ausgesetzt war – konnten sie zeigen, dass die richtigen Gene aufgefunden wurden. Kirromycin ist ein sehr komplexes Molekül: Es besitzt eine Art langgestrecktes Rückgrat aus Kohlenstoffatomen. Die Analyse der DNA-Sequenzdaten zeigte den Forschern, dass die Biosynthese von Kirromycin einige neue, bislang nicht auf molekularer Ebene verstandene Schritte enthält. Diese illustrieren, so schreiben Tilmann Weber und seine Kollegen in ihrer Veröffentlichung, wie groß das Potenzial für die Herstellung von chemisch extrem komplexen Stoffen in den *Streptomyces*-Bakterien ist. Ihre Forschungsergebnisse bilden notwendige Grundlagen, um zu verstehen, wie das Antibiotikum Kirromycin und Stoffe ähnlichen Typs in Mikroorganismen synthetisiert werden. Erst dadurch hat man die Möglichkeit, die Substanz durch molekularbiologische Techniken zu verbessern.

*Quelle: Pressemitteilung der Universität Tübingen vom 25.02.2008*



## Arbeitsmaterial

## Modul 4 Mikrobielle Systeme

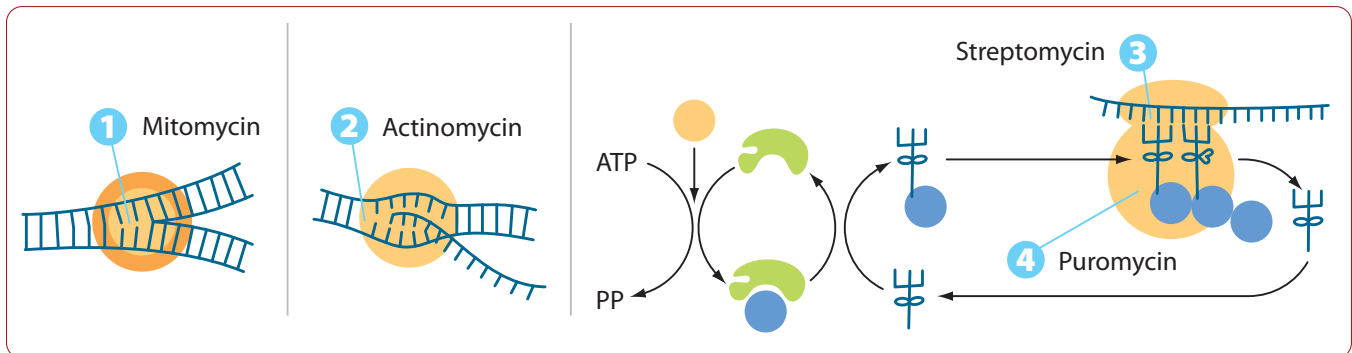


Abb. 3: Das Schema der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese zeigt Angriffspunkte verschiedener Antibiotika an der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese. 1. Mitomycin reagiert mit Guanin und Cytosin zu einem Komplex. 2. Actinomycin bindet an Guanin in der DNA. 3. Streptomycin bindet an die kleine Untereinheit der Ribosomen von Bakterien, nicht aber von Eukaryonten. 4. Puromycin enthält eine freie Aminogruppe

weitgehend automatisieren. Mit Hilfe der Software NRPSpredictor (Rausch, C. *et al.*, 2005), die sowohl als eigenständiges Programm als auch über eine benutzerfreundliche Webseite ([www-ab.informatik.uni-uebingen.de/software/NRPS\\_predictor](http://www-ab.informatik.uni-uebingen.de/software/NRPS_predictor)) verfügbar ist, können Spezifitätsvorhersagen für NRPS-Enzyme gemacht werden. CLUSEAN (Weber, T. *et al.*, 2009) ist eine Pipeline, mit der Sekundärmetabolit-Biosynthesegencluster automatisiert mit unterschiedlichen Tools (Domänenidentifizierung, Spezifitätsvorhersage) untersucht werden können. Die Software erlaubt es, auch große Mengen an Sequenzdaten innerhalb kurzer Zeit auszuwerten und so Gencluster zu identifizieren, die für potentielle Wirkstoff-Biosynthesen codieren.

Diese Technologie wird, so die Tübinger Forscher, in den nächsten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnen. Zukünftig wird

sich das in silico-Screening nach potentiell interessanten Biosynthesegenclustern in Gesamtgenomsequenzen als Alternative und Ergänzung zum biologisch-/chemischen Screening etablieren

#### Quellen und Artikel

Tilmann Weber, Kristina Juliane Laiple, Eva Karoline Pross, Adriana Textor, Stephanie Grond, Katrin Welzel, Stefan Pelzer, Andreas Vente, and Wolfgang Wohlleben: *Molecular Analysis of the Kirromycin Biosynthetic Gene Cluster Revealed,  $\beta$ -Alanine as Precursor of the Pyridone Moiety*. In: *Chemistry & Biology*; Vol 15, 175-188, 22 February 2008; doi: 10.1016/j.chembiol.2007.12.009.

**Infos über Kirromycin:** Biosynthesis of the polyketide antibiotic kirromycin

**Kirromycin-Datenblatt:** PubChem Substance ID 24896207;

## Arbeitsaufträge

**Lesen Sie die Arbeitsmaterialien und beantworten Sie die folgenden Aufgaben:**

- 1. Mikroorganismen kommen überall auf der Erde vor. Die Basiskonzepte Variabilität und Vielfalt sowie „Angepasstheit“ lassen sich bei den Bakterien anwenden. Begründen Sie diese Aussage.**
- 2. Wiederholen Sie, bzw. recherchieren Sie in der Literatur oder im Internet die folgenden Themen: Metagenom, Metagenomanalyse, Transkriptom und Proteom. Welche Ziele verfolgt man bei der Metagenomanalyse von Umweltproben?**
- 3. Analysieren Sie das Schema in Abb.3 der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese. Benennen und beschreiben Sie kurz die Vorgänge, die sich an den bezeichneten Stellen (1 bis 4) normalerweise abspielen.**  
Das Schema in Abbildung 3 zeigt Angriffspunkte verschiedener Antibiotika an der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese.
- 4. Entwickeln Sie Arbeitshypothesen über die Hemmwirkung der Antibiotika, deren spezielle Eigenschaften in Aufgabe 3 aufgeführt sind. Begründen Sie, weshalb Mitomycin und Actinomycin Tumorwachstum eindämmen können, nicht aber Streptomycin.**
- 5. Ordnen Sie das Antibiotikum Kirromycin in das Schema (Abbildung 3) begründet ein.**
- 6. Kennzeichnen Sie die Rolle der Genomforschung bei der Identifizierung der Antibiotika.**