

Bakterien im Einsatz für die Wirkstoffsuche: Genomics meets Microfluidics – Entwicklung mikrofluidischer Chips für die Wirkstoffsuche

Infektionskrankheiten stellen nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar und sind aufgrund der Zunahme von Antibiotikaresistenzen auch in Europa auf dem Vormarsch. Es besteht daher ein dringender Bedarf, neue und effektive Wirkstoffe gegen die Erreger zu entwickeln. Einen wesentlichen Beitrag zur Wirkstofffindung kann die Analyse genomischer Daten liefern, indem Mikroorganismen mit dem Potential zur Produktion neuartiger Antibiotika identifiziert werden. Durch den Einsatz von mikrofluidischer Technologie lässt sich ein langwieriges und kostenintensives Screening nach den betreffenden Verbindungen vermeiden.

Markus Nett, Martin Roth und Thomas Henkel

In den letzten 15 Jahren haben wir eine rasante Entwicklung in der Sequenzier Technologie erlebt. Die Einführung leistungsfähiger Sequenzierplattformen, zu nennen sind hier u.a. die 454- und Illumina-Technologie, hat nicht nur den Zeitaufwand für Sequenzierungen drastisch reduziert, sondern auch die damit verbundenen Kosten. In der Folge ist die Zahl der in öffentlichen Datenbanken hinterlegten Genomsequenzen exponentiell angestiegen, und ein Ende dieser Entwicklung ist nicht in Sicht. Die Kenntnis des Erbguts eines Organismus kann helfen, viele grundlegende Fragen zu seinem Metabolismus und Lebenszyklus zu beantworten. In der postgenomischen Ära stellt sich zunehmend die Frage, wie sich die gewonnene, enorme Datenmenge für die angewandte Forschung nutzbringend erschliessen lässt.

Auf der Suche nach neuen Antibiotika

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Ausbreitung antibiotikaresistenter Krankheitserreger kommt der Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen große Bedeutung zu. Die meisten Antibiotika, die sich heute auf dem Markt befinden, werden entweder aus Mikroorganismen direkt gewonnen oder sind strukturelle Abkömmlinge genuiner Naturstoffe. Die immense Bedeutung von Naturstoffen in der Behandlung von Infektionskrankheiten ist zum einen auf ihre strukturelle Diversität, zum anderen auf ihre im Verlauf der Evolution optimierte Affinität zu biologischen Zielstrukturen zurückzuführen. In Bakterien und Pilzen finden sich die Gene für die Biosynthese eines Naturstoffes i.d.R. auf einem zusammenhängenden DNA-Abschnitt, einem sog. Cluster. Viele der mikrobiellen Biosynthesesysteme sind modular aufgebaut und arbeiten

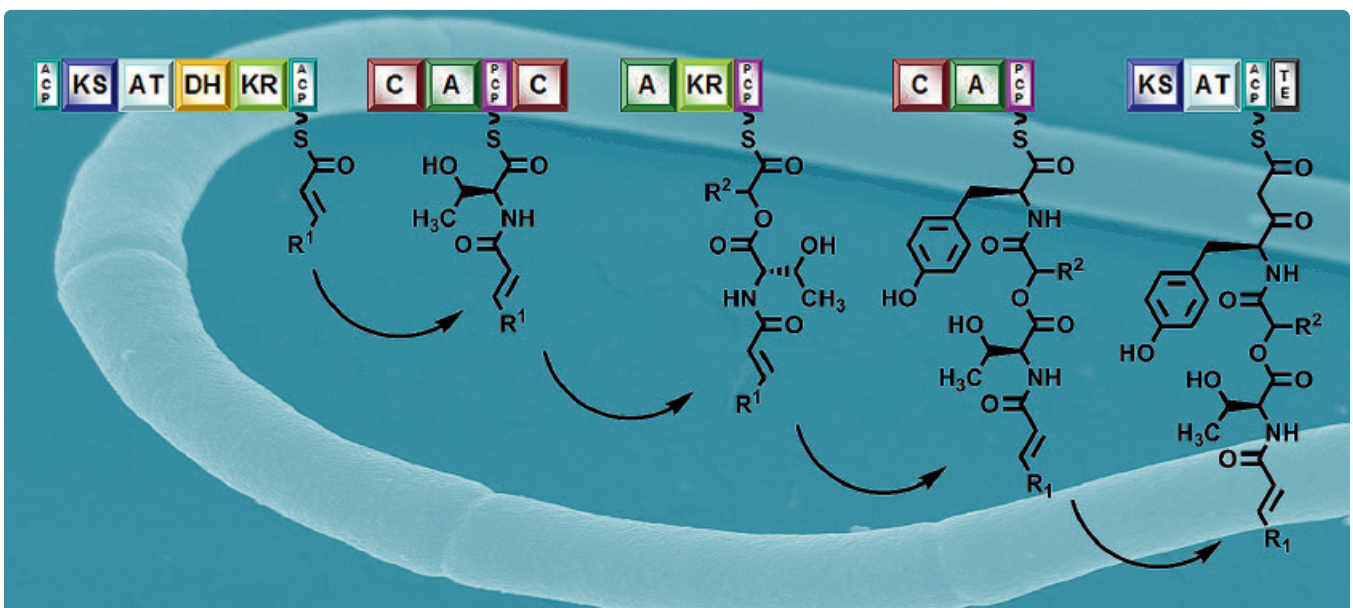


Abb. 1: Raster-Elektronenmikroskopaufnahme eines filamentösen Bakteriums und eine chromosomal kodierte Assemblierungslinie für die Produktion eines Naturstoffes.

Arbeitsmaterial

Modul 4 Mikrobielle Systeme

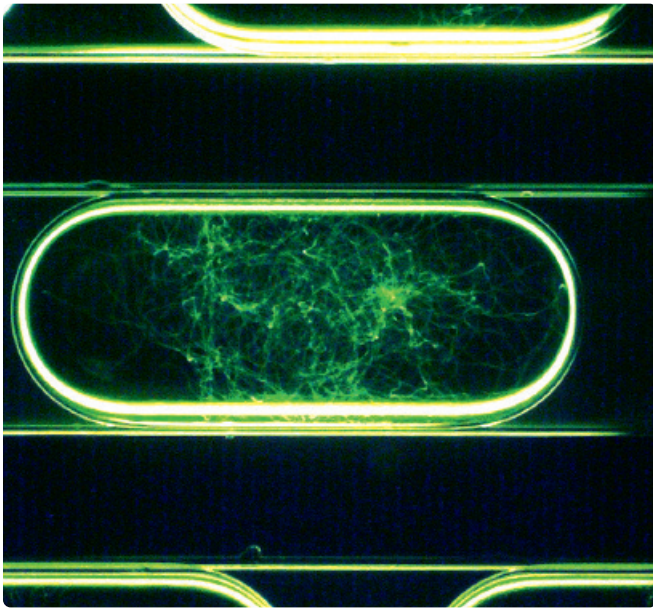


Abb. 2: Mikrokompartiment-Kultur des filamentösen Bakteriums aus Abb. 1.

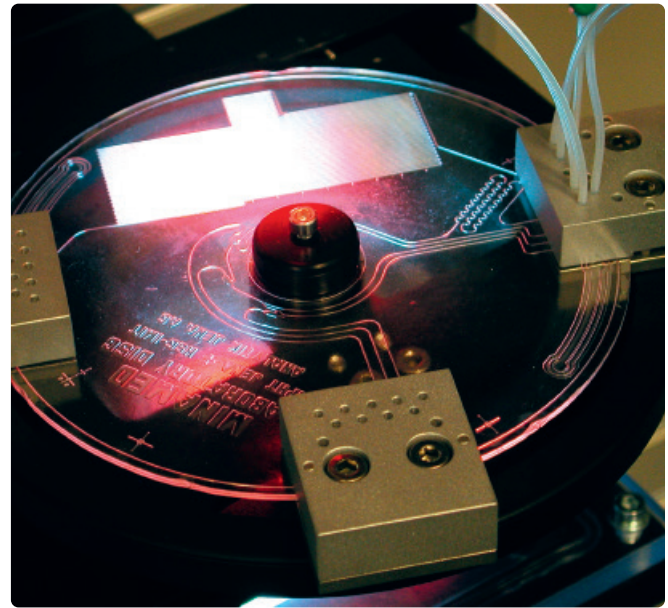


Abb. 3: Mikrofluidischer Polycarbonat-Chip im CD-Format.

kolinear, was eine strukturelle Vorhersage der kodierten Verbindungen anhand von Präzedenzfällen ermöglicht (Abb. 1). Die genom-basierte Suche nach solchen genetischen Bauplänen brachte die Erkenntnis, dass das Potential von Mikroorganismen, Antibiotika zu produzieren, bei weitem nicht ausgeschöpft ist. Auf den Genomen sind weitaus mehr mögliche Naturstoffe kodiert als bisher Substanzen isoliert wurden. So besitzt der Produzent des Antituberkulosemittels Streptomycin die Fähigkeit, mindestens 36 unterschiedliche Naturstoffe zu produzieren. Bekannt sind aber nur neun. Im Fall des Bakteriums *Saccharopolyspora erythraea*, welches für die industrielle Gewinnung des Antibiotikums Erythromycin eingesetzt wird, ist diese Diskrepanz sogar noch größer (Nett, M. *et al.*, 2009). Die Gründe für dieses Missverhältnis sind vielfältig. Eine häufige Beobachtung ist, dass die betreffenden Naturstoffgene still sind – das heißt, sie werden unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen nicht transkribiert.

Wie können wir stille Gene aktivieren?

Die Beantwortung dieser Frage wird eine der großen Herausforderungen der Forschung in den kommenden Jahren sein, und das nicht nur im Bereich des wirkstoff-orientierten Genome Minings. Es gilt, allgemeine Konzepte zu entwickeln, mit denen das brachliegende metabolische Potential von Mikroorganismen besser genutzt und das vorhandene weiter optimiert werden kann, z.B. im Hinblick auf maximale Produktbildung. Die Anforderungen an ein solches Konzept sind vielfältig: es muss für eine breite Palette an Organismen zugänglich sein, es sollte möglichst einfach und kostengünstig sein und zudem nur einen geringen Zeitaufwand erfordern. Sehr vielversprechend im Zusammenhang mit der Wirkstoffsuche, v.a. in solchen Bakterien und Pilzen, für die kein genetisches System zur Verfügung steht, erscheint daher die sog. OSMAC-Strategie (OSMAC: one strain – many compounds). Bei dieser Methode werden die Kultivierungsparameter kontinuierlich variiert bis Änderungen im metabolischen Profil des Mikroorganismus zu Tage treten (Bode, H. B. *et al.*, 2002). OSMAC beruht auf dem bekannten Prinzip, dass externe Stimuli, wie z.B. eine Phosphatli-

mitation oder eine Änderung des pH-Wertes, Auswirkungen auf transkriptioneller Ebene nach sich ziehen und so zur Aktivierung ruhender Gene führen können. Aufgrund ihres empirischen Ansatzes wurde die OSMAC-Strategie bislang überwiegend in Fallstudien eingesetzt, also bei einzeln ausgewählten Organismen. Zudem war die Anzahl der getesteten Kultivierungsbedingungen limitiert.

Kontrolliertes Wachstum auf kleinstem Raum

Fortschritte in der Mikrofluidik haben eine Anzucht von Bakterien und Pilzen auf engstem Raum, in sog. Mikrokompartimenten, möglich gemacht. Der miniaturisierte Maßstab bei einer solchen Kultivierung reduziert den Zeit- und Kostenaufwand im Vergleich zu einer klassischen Fermentation erheblich und erlaubt eine systematische Evaluierung des Einflusses verschiedener Kultivierungsparameter auf die Naturstoffproduktion. Wurde in vorangegangenen Arbeiten der Nachweis des Wachstums von Bakterien und Pilzen in PTFE-Kapillaren erbracht (Martin, K. *et al.*, 2003), so konnte jetzt erstmalig eine Kultivierung von Antibiotika-produzierenden Bakterien in mikrofluidischen Chips realisiert werden. Initiale Untersuchungen bestätigen, dass das Wachstum der Mikroorganismen grundsätzlich mit dem in klassischen Schüttelkulturen vergleichbar ist, auch können ähnliche Zelldichten erzielt werden. Der Einsatz der am Institut für Photonische Technologien in Jena konzipierten und gefertigten Chips ist dabei nicht auf einzellige Organismen beschränkt. Vielmehr können auch filamentöse oder myzelbildende Bakterien in den Mikrokompartimenten kultiviert werden (Abb. 2).

Wirkstoffsuche in mikrofluidischen Chips

Im Rahmen eines Verbundprojektes innerhalb der vom BMBF geförderten Netzwerk-Initiative GenoMik-Transfer entwickeln drei Arbeitsgruppen aus Jena (Dr. T. Henkel, Institut für Photonische Technologien, Dr. M. Roth, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Dr. M. Nett, Nachwuchsgruppe am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie) eine mikrofluidische Screening-Plattform für die Suche

nach neuen Antibiotika. Dabei sind drei Herausforderungen zu bewältigen. (i) Um die zu testenden Mikroorganismen zur Produktion von interessanten Naturstoffen anzuregen, muss – entsprechend der OSMAC-Konzeption – die Möglichkeit gegeben sein, verschiedene Kultivierungsbedingungen zu simulieren. Durch die Implementierung zusätzlicher Anschlüsse auf den Chips, über die Nährstoffe und/oder Effektoren den generierten Kulturkompartimenten zudosiert werden können, konnte diese Anforderung bereits erfüllt werden. (ii) Im Vergleich zu den üblicherweise im Milliliter- bis Liter-Maßstab durchgeführten Schüttelkulturen sind die gebildeten, absoluten Antibiotikamengen bei einer mikrofluidischen Kultivierung natürlich gering. Für die Detektion wurde daher ein fluoreszenz-basierter Ganzzellassay adaptiert, mit dem sich geringe Antibiotika-Konzentrationen nachweisen lassen. (iii) Für den breiten Einsatz dieser Technologie müssen die verwendeten Chips kostengünstig und allgemein verfügbar sein. Aus diesem Grund werden derzeit unterschiedliche Materialien und Fertigungsmethoden evaluiert, die eine Bereitstellung von Einweg-Chips ermöglichen (Abb. 3).

Das Zusammenbringen von Genomik und Mikrofluidik

Bei der Auswahl der zu testenden Stämme setzen die Jenaer Wissenschaftler mehr auf Klasse statt auf Masse. Auf der Grundlage von genomischen Daten werden mikrobielle Stämme ausgewählt, die besonders vielversprechend für die Produktion neuartiger Naturstoffe sind. Grundlage für diese Analysen sind Homologie-basierte, z.T. automatisierte Sequenzanalysen auf Proteinebene unter Verwendung von Bibliotheken mit konservierten Domänen verschiedener Biosyntheseenzyme. Dabei beschränken sich die Wissenschaftler nicht nur auf Arten, deren Potential zur Produktion von Antibiotika bereits bekannt ist, sondern schließen bewusst auch bislang nicht oder nur wenig beachtete taxonomische Gruppen mit ein. Gerade diese Stämme bergen oft die Fähigkeit zur Produktion von strukturell ungewöhnlichen Verbindungen, vorausgesetzt dass die geeigneten Kultivierungsbedingungen identifiziert werden (Winter, J. M. *et al.*, 2011). Gelegentlich erlaubt die bioinformatische Analyse von Naturstoffbiosynthese-Clustern auch Rückschlüsse auf Faktoren, die sich limitierend auf eine Produktion der kodierten Verbindungen auswirken. Diese Information kann dann direkt für entsprechende Kultivierungsstudien genutzt werden. Im Anschluss an die strukturelle Charakterisierung neuer antimikrobieller Wirkstoffe ermöglicht die Kenntnis der genomischen Sequenz des mikrobiellen Produzenten weitergehende molekularbiologische Arbeiten mit dem Ziel, die gebildeten Verbindungen durch selektive Beeinflussung einzelner Biosynthese-Schritte strukturell zu diversifizieren.

Referenzen

Nett, M. *et al.* (2009) *Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes*. *Nat. Prod. Rep.* 26:1362-1384 • Bode, H. B. *et al.* (2002) *Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity*. *ChemBioChem* 3:619-627 • Martin, K. *et al.* (2003) *Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices*. *Lab Chip* 3:202-207 • Winter, J. M. *et al.* (2011) *Genomics-inspired discovery of natural products*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15:22-31.

Kontakt

Dr. Markus Nett, Dr. Martin Roth
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut, Jena
 E-Mail: markus.nett@hki-jena.de
 E-Mail: martin.roth@hki-jena.de

Dr. Thomas Henkel
Institut für Photonische Technologien e.V., Jena
 E-Mail: thomas.henkel@ipht-jena.de

Arbeitsaufträge

1. **Informieren Sie sich über verschiedene Antibiotika (Wirkung, Gewinnung, Einsatz). Recherchieren Sie dazu im Internet oder in entsprechender Fachliteratur!**
2. **Stellen Sie dar, warum die Suche nach anderen, neuen Antibiotika notwendig und möglich ist.**
3. **Erklären Sie den molekularen Weg von der Erbinformation bis zum fertigen Genprodukt (Proteinbiosynthese).**
4. **Geben Sie an, was man unter stillen bzw. stummen Genen versteht und stellen Sie die Vorgehensweise der Wissenschaftler zur Aktivierung der stillen Gene als Fließschema dar.**
5. **Erläutern Sie die Ziele bei der Wirkstoffsuche in mikrofluidischen Chips.**