

GENOMXPRESS

SONDERAUSGABE

September 2005

Highlights aus der Genomforschung
an Mikroorganismen

GenoMik 2001–2005

Inhalt

Vorwort 3

GenoMik-Kompetenznetzwerk Bielefeld

Vier Jahre Genomforschung an Bakterien zum Schutz der Umwelt, für eine nachhaltige Landwirtschaft und für die biotechnologische Produktion von Feinchemikalien und Therapeutika 4

Die Bielefelder Softwaresuite für bakterielle Genomforschung 5

Leben in Gräsern: Kooperation zwischen Pflanzen und Bakterien für einen nachhaltigeren landwirtschaftlichen Anbau 7

Genexpressionsanalysen erlauben die Aufklärung komplexer bakterieller Differenzierungsprozesse in der Rhizobien-Leguminosen Symbiose 9

Der Beginn einer ertragreichen Partnerschaft: *Bradyrhizobium japonicum* und Sojabohne tauschen Signale aus 10

Auf dem Weg zum maßgeschneiderten Pflanzenschutz? 11

Identifizierung einer Genomregion von *Clavibacter*, die die Ausprägung der bakteriellen Welke der Tomate beeinflusst 12

Wie unterscheiden Pflanzen zwischen Krankheitserregern und nützlichen Mikroorganismen? 13

Genomsequenz von *Alcanivorax borkumensis* – einem universellen Öl-abbauenden, marinen Bakterium 14

Kontrolle über den C-Fluss – Zwei neu entdeckte Proteine könnten die Aminosäureproduktion von *Corynebacterium glutamicum* steigern 16

Identifizierung und Charakterisierung des globalen Regulators der Stickstoffkontrolle in *Corynebakterien* 17

Streptomyceten – eine unerschöpfliche Quelle für neue Wirkstoffe 18

Neue Wirkstoffe – Concanamycin A ein interessant "garniertes" Polyketid 19

Mikroben mit Mega-Genom: multizelluläre Lebensweise, biologisch aktive Naturstoffe und 10.000 Gene bei Myxobakterien 21

GenoMik-Kompetenznetzwerk Göttingen

BiotechGenoMik auf dem Weg ins fünfte Jahr seiner Arbeit 22

Gene, die als Marker für Stress dienen, helfen, die Effizienz des Waschmittelenzym-Produzenten *Bacillus licheniformis* zu steigern 23

Dünger aus Mikroben – Gene in *Bacillus amyloliquefaciens* entdeckt, die Pflanzen besser wachsen lassen 25

„Made by *Ralstonia*“ – Entwicklung neuer Produktionsstämme für eine auf Wasserstoff basierende Biotechnologie 26

Abfallstoffe als Nahrung – Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Butanol aus billigem Synthesegas 28

Genomsequenz enthüllt das Potenzial von *Gluconobacter oxydans* für Biotransformationen 29

Gluconobacter oxydans: Produzent industriell relevanter Biomoleküle 30

Umweltgenomik (Metagenomik) als nahezu unerschöpfliche Quelle für neue Biokatalysatoren, Stoffwechselwege und Wirkstoffe 32

Die Sequenzierung und funktionelle Analyse des Genoms des säure- und hitzebeständigen Archaeons *Picrophilus torridus* liefert die Information für neuartige Biokatalysatoren 34

GenoMik-Kompetenznetzwerk Würzburg

Genomforschung an pathogenen Mikroorganismen – PathoGenoMik 36

Die erste Genomsequenz einer apathogenen Staphylokokkenspezies als Grundlage für die Identifizierung neuer Virulenzfaktoren 37

Mit Gen-Chip-Analysen und Proteom-Untersuchungen den Ursachen von chronischen, Therapie-refraktären Infektionen auf der Spur 38

Wie werden Bakterien antibiotikaresistent? Pneumokokken als Gendiebe 39

Vergleichende Genomanalyse des Genus *Listeria* 40

Entdeckung neuer Impf- und Diagnostika-Antigene bei der Tuberkulose 41

Entschlüsselung des Genoms des krebserregenden Bakteriums *Helicobacter hepaticus* 42

Spuren der Menschheitsgeschichte in den Genen eines Krankheitserregers 43

Neisseria meningitidis: harmloser Kommensale und gefährliches Pathogen 44

Umweltkeime – ein genetisches Reservoir für Virulenzfaktoren von Krankheitserregern? 45

Neue Diagnostikverfahren zur Erkennung gefährlicher Colibakterien 46

Funktionelle Genomik und Dynamik pathogener *Escherichia coli*: Variabilität und Migration von krankheitsverursachenden Faktoren 47

Genotypisierung von ESBL verursachenden β -Laktamasen mittels DNA-Chips zur Schnelldiagnose mikrobieller Antibiotikaresistenzen in der Medizin 48

Oligonukleotidarray für die Diagnostik von Staphylokokken und von Enterokokken 49

Die Evolution der Chlamydien – Einblicke in die Entwicklungsgeschichte bedeutender bakterieller Krankheitserreger 50

Vorwort

Liebe Leserinnen und Leser,

Die signifikante Verknappung von Ressourcen und Energie, ein steigender Bedarf an Nahrungsmitteln und eine weitere Belastung der Umwelt durch den anthropogenen Eintrag von Schadstoffen sind globale Trends, die die weltweite Lage auf den Gebieten Gesundheit, Ernährung und Umwelt immer stärker beeinflussen. Darüber hinaus bedrohen Infektionskrankheiten die menschliche Gesundheit, die nicht zuletzt aufgrund der zunehmenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen nur noch eingeschränkt und unter hohen Kosten therapierbar sind. Um den sich abzeichnenden Problemen zu begegnen, bedarf es einer frühzeitigen Entwicklung von Lösungsstrategien.

Mikroorganismen sind Teil dieser Problemlage, insbesondere im Hinblick auf die von ihnen ausgelösten Infektionskrankheiten, denen jährlich ca. 17 Millionen Menschen zum Opfer fallen. Darüber hinaus verursachen sie in der Landwirtschaft durch Pflanzen- und Tierkrankheiten einen immensen volkswirtschaftlichen Schaden.

Gleichzeitig bietet die Erforschung und Nutzung der Mikroorganismen jedoch eine noch weitgehend ungenutzte Chance, um diesen globalen Trends entgegenzuwirken und Lösungsansätze z.B. in den Bereichen der Verbesserung der menschlichen Gesundheit, der Sicherstellung einer nachhaltigen Ernährungsgrundlage für Mensch und Nutztiere, der Vorbeugung und Beseitigung von Umweltschäden und der Etablierung einer energie- und ressourcenschonenden biobasierten Wirtschaft der Zukunft zu finden und umzusetzen.

Mit der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Jahr 2001 gestarteten Forschungs- und Förderinitiative „Genomforschung an Mikroorganismen – GenoMik“ wurden die strukturellen und inhaltlichen Voraussetzungen für die Nutzung des Potentials von Mikroorganismen durch globale genombasierte Forschungsansätze geschaffen. In Deutschland entstanden vernetzte, international wettbewerbsfähige Kompetenzkerne der Genomforschung an Mikroorganismen. Die Forschung in diesen Kompetenznetzen gruppiert sich um drei Themen: Genomforschung an

Bakterien für den Umweltschutz, die Landwirtschaft und die Biotechnologie, für die Analyse der Biodiversität und ihre Nutzung zur Entwicklung neuer Produktionsverfahren und für die Bekämpfung menschlicher Infektionskrankheiten. Jedes der drei Kompetenznetze wird von einer Universität koordiniert (Universitäten Bielefeld, Göttingen und Würzburg). An den Kompetenznetzen sind insgesamt mehr als 80 Arbeitsgruppen und 10 Unternehmen beteiligt.

In der vorliegenden Sonderausgabe des GenomXPress sind beispielhaft einige der Forschungsergebnisse dokumentiert, die in den letzten Jahren von den drei Kompetenznetzen erzielt wurden. Gemeinsames Anliegen war es, die genomische Sequenz wissenschaftlich, klinisch und wirtschaftlich bedeutsamer Bakterien zu entschlüsseln und darauf aufbauend die funktionelle Genomanalyse mit dem Ziel voranzubringen, nutzbringende Forschungsergebnisse auf den verschiedensten Anwendungsfeldern zu erzielen. Die Sequenzierung von 28 bakteriellen Genomen hat dafür eine wertvolle Wissensbasis geschaffen. Aus der Vielzahl der sich daraus ergebenden spannenden Forschungsergebnisse werden hier 35 exemplarisch vorgestellt. Es geht z.B. um die Entwicklung neuer Strategien für den Pflanzenschutz und den Umweltschutz, um die Gewinnung neuer Proteine und die Entwicklung neuer biotechnologischer Produktionsprozesse oder neuer Strategien zur Diagnostik und Therapie bakterieller Infektionskrankheiten.

Diese Forschungsergebnisse belegen eindrucksvoll die internationale Wettbewerbsfähigkeit der Genomforschung an Mikroorganismen in Deutschland. Dies spiegelt sich nicht zuletzt in der großen Resonanz auf die von den drei Kompetenznetzen gemeinsam organisierten europäischen Konferenzreihe „European Conference on Prokaryotic Genomes - PROKAGEN“ wider, die in diesem Jahr zum zweiten Mal in Göttingen stattfindet.

Die in der Forschungs- und Förderinitiative „GenoMik“ erzielten Erfolge müssen verstetigt und auf eine nachhaltige Grundlage gestellt werden. Deshalb wird das BMBF im kommenden Jahr die Fördermaßnahme „GenoMik-Plus“ starten. In „GenoMik-Plus“ sollen die etablierten Kompetenzkerne der Genomfor-



schung an Mikroorganismen erhalten, in ihren Forschungszielen fokussiert und für weitere Partner geöffnet werden. Dabei sollen insbesondere solche Forschungsziele berücksichtigt werden, die bereits zur internationalen Wettbewerbsfähigkeit des Förderschwerpunkts „GenoMik“ beigetragen haben. Von ganz wesentlicher Bedeutung ist es, dass interessierte Wirtschaftsunternehmen einen „Industrieverbund mikrobielle Genomforschung“ gegründet haben, der seine Aufgabe vor allem in der Begleitung der Forschungs- und Förderinitiative durch die Beförderung des Technologietransfers gemeinsam mit Forschern aus „GenoMik-Plus“ sieht. Diese noch stärkere Anwendungsnähe der Forschung im Rahmen von „GenoMik-Plus“ ist ein ganz wesentliches Ziel der vom BMBF verfolgten Forschungs- und Förderpolitik auf dem Gebiet der Lebenswissenschaften.

Zur noch stärkeren Vernetzung der bakteriellen Genomforschung in Deutschland mit den europäischen Nachbarn wird das BMBF darüber hinaus im kommenden Jahr europäische Forschungs- und Förderaktivitäten zur Systembiologie an Bakterien und zur Erforschung humanpathogener Bakterien auf den Weg bringen. Diese Fördermaßnahmen werden flankierend zu „GenoMik-Plus“ die transnationale Zusammenarbeit auf wichtigen Forschungsfeldern stärken.

Es bleibt zu hoffen, dass diese Maßnahmen in ihrer Gesamtheit ein positives Umfeld für die weitere erfolgreiche Entwicklung der Genomforschung an Mikroorganismen in Deutschland schaffen. Die erste, hier präsentierte Zwischenbilanz jedenfalls kann sich sehen lassen. Eine spannende Lektüre wünscht Ihnen

Reinhard Junker

*Leiter der Abteilung Gesundheit,
Biowissenschaften, Nachhaltigkeit im BMBF*

GenoMik-Kompetenznetzwerk Bielefeld

Vier Jahre Genomforschung an Bakterien zum Schutz der Umwelt, für eine nachhaltige Landwirtschaft und für die biotechnologische Produktion von Feinchemikalien und Therapeutika



Alfred Pühler und Werner Selbitschka

Das Kompetenznetzwerk "Genomforschung an Bakterien für den Umweltschutz, die Landwirtschaft und die Biotechnologie" widmet sich seit seinem Start im Jahre 2001 der Genomforschung an ausgesuchten Bakterien, die auf den genannten Gebieten wichtige ökologische oder ökonomische Aufgaben erfüllen. Generelles Ziel ist dabei, die Forschung an vorderster Front voranzutreiben und die erzielten Ergebnisse einer wirtschaftlichen Nutzung zuzuführen.

Das Kompetenznetzwerk bündelt gegenwärtig deutschlandweit die Expertise von 22 Forschungsgruppen, die an 11 Universitäten, drei Forschungszentren und in zwei Industriefirmen arbeiten. Als zentrale koordinierende Einheit des Netzwerks wurde an der Universität Bielefeld ein Kompetenzzentrum installiert. Es besteht aus einem administrativen Netzwerkmanagement und einer Plattform für Technologien der bakteriellen Genomforschung. Die Technologieplattform hält die für bakterielle Genomforschung nötige Infrastruktur und Expertise auf den Gebieten DNA-Sequenzanalyse, Bioinformatik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik vor und stellt diese den Netzwerkpartnern zur Verfügung.

Nach vier Jahren Forschungsarbeit, in deren Mittelpunkt die Entzifferung der genetischen Information von insgesamt fünf verschiedenen Bakterienstämmen stand, ergeben sich nun erste faszinierende Einblicke in das genetische Potential dieser Organismen. Einen zweiten Schwerpunkt der Arbeiten des Netzwerks bildeten Postgenomanalysen bei Bakterien, deren Genomsequenzen bereits vorlagen. Hier wurden insbesondere Studien durchgeführt, mit deren Hilfe die Aktivität aller Gene eines Organismus in Abhängigkeit von Umweltbedingungen ermittelt werden kann. Diese genomweiten Analysen mittels Microarrays zeigen, welche Gene unter

gegebenen Bedingungen von dem bakteriellen Organismus an- oder abgeschaltet werden und liefern somit wichtige Anhaltspunkte über die Bedeutung der jeweiligen Genfunktionen unter definierten Umweltbedingungen.

Auf dem Sektor Landwirtschaft wurden die Genome von Bakterien analysiert, die den Ertrag von Nutzpflanzen entscheidend beeinflussen. Dabei ist zwischen Pflanzenwuchsfördernden Bakterien und Pflanzenwuchsschädigenden Bakterien zu unterscheiden. Bodenbakterien wie *Sinorhizobium meliloti* oder *Bradyrhizobium japonicum* können eine Lebensgemeinschaft mit wichtigen Nutzpflanzen wie Sojabohne oder Luzerne eingehen, die das Pflanzenwachstum von Stickstoffdüngung befreit. Das im Netzwerk bearbeitete Bakterium *Azoarcus sp.* kann die bedeutende Nutzpflanze Reis-pflanze endophytisch besiedeln und stimuliert auf diese Weise deren Wachstum. Im Gegensatz hierzu sind pflanzenwuchsschädigende Bakterien wie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* bzw. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* für eine Ertragsminderung bei Nutzpflanzen verantwortlich. Beide Organismen verursachen weltweit signifikante Ernteaufälle bei der Tomate.

Auf dem Gebiet Umwelt stand ein schadstoffabbauendes Bakterium im Mittelpunkt des Interesses. Hierbei handelt es sich um *Alcanivorax borkumensis*, ein vor der Insel Borkum in der Nordsee isoliertes Bakterium, das in der Lage ist Öl abzubauen.

Im Bereich der Biotechnologie standen Bakterien im Fokus, die seit langer Zeit anwendungsorientiert eingesetzt werden. So wird beispielsweise das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* zur fermentativen Aminosäureproduktion eingesetzt. Aminosäuren werden

hauptsächlich als Futtermittelzusatz in der Tiermast verwendet. Bakterien der Gattung *Streptomyces* sind dagegen als potente Produzenten von Antibiotika bekannt. Diese biologisch wirksamen Substanzen sind bei der Krankheitsbekämpfung bei Mensch, Tier und Pflanze nicht mehr wegzudenken. Ein bisher noch weitgehend unerschlossenes Potential liegt bei Myxobakterien. Bakterien dieser Gruppe wie *Sorangium cellulosum* sind besonders als potente Produzenten von Naturstoffen bekannt, die auch bei Tumorerkrankungen Verwendung finden.

Bei allen im Netzwerk bearbeiteten Bakterien ist die Kenntnis der Genomsequenz der Schlüssel zum Verständnis der jeweiligen charakteristischen Stoffwechselleistungen. Die aus den Genomanalysen resultierenden Erkenntnisse legen somit die Grundlagen dafür, das Wertungspotential der Bakterien nutzbringend auszuschöpfen. Die im folgenden beschriebenen Forschungsergebnisse werfen ein Schlaglicht auf den gegenwärtigen Stand der Forschung. Sie sollen aufzeigen, auf welchen Gebieten sich nutzbringende Anwendungen in nächster und naher Zukunft ergeben können.

Kontakt

Prof. Dr. A. Pühler
[GenoMik-Kompetenznetz Bielefeld](#)
[Lehrstuhl für Genetik](#)
 Postfach 100 131, D-33501 Bielefeld
 E-Mail: Puehler@Genetik.Uni-Bielefeld.DE

Geschäftsstelle
 Dr. Werner Selbitschka
 E-Mail: Werner.Selbitschka@Genetik.Uni-Bielefeld.DE

www.genomik.uni-bielefeld.de

Die Bielefelder Softwaresuite für bakterielle Genomforschung

Alexander Goesmann, Daniela Bartels, Thomas Bekel, Kai Runte und Folker Meyer

Der Einsatz moderner Hochdurchsatzmethoden der bakteriellen Genomforschung liefert eine große Datenfülle in kurzer Zeit. Zur Datenverarbeitung, ihrer Analyse und Integration wird eine Vielzahl Computer-gestützter Methoden eingesetzt. Die Anforderungen für die Bioinformatik liegen daher sowohl in der Softwareentwicklung als auch in einer geeigneten Hardware-Infrastruktur. Darauf basierend besteht die Konzeption der Bioinformatik des Bielefelder Netzwerks auf der In-house Entwicklung von Software zur Unterstützung bakterieller Genomprojekte.

Verarbeitung der Rohdaten

Zu Beginn der Computer-gestützten Auswertung großer Datenmengen steht zunächst die sichere Speicherung und Verwaltung der Rohdaten. Zugleich muss der Fortgang der Experimente überwacht werden, um auftretende Probleme schnell zu erkennen. Im Bereich der Genomsequenzierung wurden zu diesem Zweck die Softwarepakete BioMake, BACCardl und SAMS entwickelt. BioMake dient der Speicherung und Überwachung von Sequenzdaten. Detaillierte und stets aktuelle Informationen zum Stand der Sequenzierungen der Genome werden Projektpartnern über die Web-Oberfläche der BioMake-Software präsentiert. Inzwischen wurde mit dem SAMS Programmpaket (Sequenzanalyse und Management System) eine wesentlich verbesserte und im Funktionsumfang deutlich erweiterte Software implementiert. Es ist nun auch möglich, Methoden aus dem Bereich der eukaryotischen Sequenzanalyse bioinformatisch zu unterstützen.

Die genetische Information bakterieller Genome wird heute üblicherweise mit dem sogenannten *Whole Genome Shotgun* Verfah-

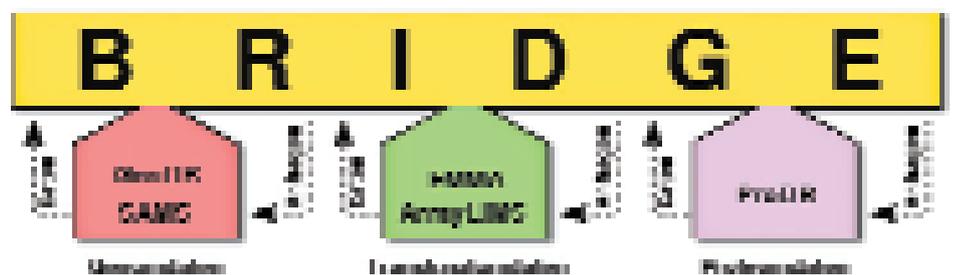


Abb. 1: Der BRIDGE-Layer integriert die drei spezialisierten Softwarekomponenten GenDB, EMMA und ProDB. Heterogene Datensätze werden miteinander verknüpft, so dass domänenübergreifende Abfragen möglich sind.

ren bestimmt. Die bei der anschließenden Assemblierung des Genoms erzielten Ergebnisse können noch unvollständig oder fehlerhaft sein und müssen daher in der anschließenden Lückenschluß-Phase bearbeitet und validiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Software zur automatischen Generierung von BAC- bzw. Fosmid-Karten (BACCardl) für die Validierung und Unterstützung des Lückenschluß-Prozesses entwickelt (1).

Genomannotation

Liegt die Genomsequenz eines Bakteriums vollständig entschlüsselt vor, müssen funktionstragende Elemente in der Sequenz identifiziert werden. Diese Aufgabe wird von dem in Bielefeld entwickelten Annotationssystem GenDB (2) wahrgenommen. Dazu werden zunächst in einem Genvorhersage-Schritt Regionen identifiziert und gemäß ihrer strukturellen Eigenschaften zu Genen, tRNAs etc. klassifiziert. Diesen Regionen werden dann im Funktionsvorhersageschritt ihre wahrscheinlichen Funktionen zugewiesen. Das aktuelle GenDB-Annotationssystem 2.2 erlaubt aufgrund der derzeitig vorhandenen Rechnerkapazitäten eine weitgehend automatische Annotation

eines bakteriellen Genoms durchschnittlicher Größe innerhalb von ein bis zwei Tagen. Für die manuelle Annotation steht den Benutzern ein Web-Interface mit vollem Funktionsumfang zur Verfügung, wodurch Projektpartnern weltweit Zugang zu ihren Daten ermöglicht wird.

Bioinformatische Unterstützung von Transkriptom- und Proteomforschung

Bei der Analyse des Transkriptoms von Bakterien mittels der Microarray-Technik wird eine kurze, für das jeweilige Gen charakteristische DNA-Sequenz (Oligonukleotid) verwendet, um die Transkription dieses Gens beispielsweise unter verschiedenen Umweltbedingungen zu messen. Mit dem Programm Oligo-Designer wurde in Bielefeld ein effizientes, Web-basiertes Werkzeug zur Berechnung der Oligonukleotide für genomweite Microarrays entwickelt.

Mit den Softwarepaketen ArrayLIMS und EMMA (3) wurde eine Plattform zur Speicherung und Analyse von Microarray-Experimentdaten etabliert. Die zentrale Datenerfassung über die ArrayLIMS-Komponente zur Ver-

arbeitung der Microarray-Rohdaten erlaubt eine strukturierte Speicherung der experimentellen Arbeitsschritte und Parameter. Die Analyse der experimentellen Daten beinhaltet neben einer Rohdaten-Normalisierung Methoden zur Identifizierung von regulierten Genen und Gruppen von gemeinsam regulierten Genen. Durch die Kompatibilität zum MAGe-OM (Microarray Gene Expression – Object Model)-Standard wird der flexible Datenaustausch zwischen verschiedenen Orten und Software-Systemen ermöglicht.

Für die Unterstützung der Proteomik wurde ebenfalls ein umfangreiches System entwickelt (ProDB; 4). Die Software bietet die grundlegenden Funktionen und Anforderungen zur Erfassung und Auswertung von Daten aus Proteomexperimenten und kann über eine benutzerfreundliche Web-Oberfläche bedient werden. ProDB beinhaltet eine Komponente zur Speicherung von experimentellen Arbeitsabläufen sowie Bild- und Messdaten. Weiterhin wird der Benutzer über eine Web-basierte Oberfläche bei der Analyse von 2D Gelen unterstützt und es erfolgt eine weitgehende Automatisierung der verschiedenen Arbeitsschritte (z.B. Datenbanksuche zur Spot-Identifikation).

Integration der Softwarepakete

Ein wichtiges Konzept der Bielefelder Softwaresuite ist die Integration der einzelnen Komponenten zu einem Gesamtsystem, das aufgrund der umfangreichen Datengrundlage Zugang zu neuen Analysekonzepten bietet. Eine technische Integration der entwickelten Softwarekomponenten wurde mittels des BRIDGE Systems (Abb. 1; 5) erreicht, so dass auch komplexe und bereichsübergreifende Anfragen auf Gesamtsystem-Ebene auf einfache Weise ermöglicht werden. So wird zum Beispiel beim Zugriff auf die Annotation eines Gens aus einer Microarray-Analyse immer gewährleistet, dass dem Benutzer stets die aktuellen Annotationsinformationen des Gens aus dem GenDB-System präsentiert werden. Gleichzeitig ermöglicht BRIDGE domänenübergreifende Abfragen, etwa nach Genen eines bestimmten Stoffwechselweges, deren Genprodukte bereits in einem 2D Gel identifiziert wurden und die unter spezifischen Bedingungen beispielsweise verstärkt exprimiert werden. Mit dem BRIDGE-Konzept ist es auch möglich, neue Software zu integrieren, um die Software-Suite zu komplettieren. Ein Beispiel wäre die Integration einer Metabolom-Komponente, die sich der bioinformatischen Auswertung von Metabolomdaten widmet.

Literatur

1. Bartels et al. (2005) BACCardl – A tool for the validation of genomic assemblies, assisting genome finishing and intergenome comparison. *Bioinformatics* 2: 853-9.
2. Meyer et al. (2003) GenDB – an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31: 2187-95.
3. Dondrup et al. (2003) EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.* 106: 135-46.
4. Wilke et al. (2003) Bioinformatics support for high-throughput proteomics. *J. Biotechnol.* 106: 147-56.
5. Goesmann et al. (2003) Building a BRIDGE for the integration of heterogeneous data from functional genomics into a platform for systems biology. *J. Biotechnol.* 106: 157-67.

Kontakt

Dr. Alexander Goesmann
Universität Bielefeld, CeBiTec/BRF
E-Mail: Alexander.Goesmann@
CeBiTec.Uni-Bielefeld.DE

Leben in Gräsern: Kooperation zwischen Pflanzen und Bakterien für einen nachhaltigeren landwirtschaftlichen Anbau

Barbara Reinhold-Hurek und Thomas Hurek

Die Atmosphäre als Reservoir für Stickstoff-Dünger

Eine anscheinend paradoxe Situation: Pflanzen wachsen in einem „Ozean“ aus Stickstoff, und dennoch ist der Mangel an Stickstoff einer der wichtigsten Faktoren, die das Pflanzenwachstum begrenzen. Pflanzen können nämlich das Stickstoffgas der Atmosphäre nicht verwerten, sondern benötigen ihn in Form anderer Verbindungen wie Ammonium oder Nitrat. Das industrielle Haber-Bosch-Verfahren liefert Stickstoff als Dünger, ist aber sehr energieaufwendig. Einige Bakterien sind in der Lage, mit Hilfe des biochemischen Prozesses der Stickstofffixierung, Luftstickstoff in eine verwertbare Form umzuwandeln. Mit Leguminosen zum Beispiel können Bakterien (Rhizobien) eine Symbiose bilden, in der für eine effiziente Versorgung der Pflanze mit Stickstoff spezielle bakterienhaltige Strukturen, Knöllchen, entstehen.

Stickstoff-fixierende Endophyten im Wurzelinnern von Gräsern und Getreiden

Die weltweit wichtigsten Nutzpflanzen, Reis, Weizen und Mais, bilden wie die anderen Gräser keine spezifischen symbiotischen Strukturen aus und gehen auch keine stickstofffixierende Symbiose mit Rhizobien ein. Trotzdem läßt sich vermutlich das Potential von Bakterien für Pflanzenwachstumsförderung und Stickstofffixierung auch bei Gräsern und Getreiden nutzen. Für einige Modellgräser ist bekannt, dass ein großer Teil des pflanzlichen Stickstoffs aus biologischer Stickstoff-Fixierung stammt. Zum Beispiel konnten Forscher der Universität Bremen, Thomas Hurek und Barbara Reinhold-Hurek, zeigen, dass Bakterien der Gattung *Azo-*

arcus ihre Wirtspflanze Kallargras mit reduziertem Luftstickstoff versorgen können (1). Dabei sind sie nur sehr schwer aus den Pflanzenwurzeln in Laborkultur zu bringen, obwohl sie in der Pflanze sehr aktiv sind, wie mRNA-Analysen gezeigt haben (1). Die Lebensweise dieser Bakterien ist endophytisch: Sie können nicht nur die Wurzeloberfläche, die Rhizoplane, besiedeln (Abb. 1, links). Sie dringen auch tief in das Pflanzengewebe ein, vorzugsweise in Wurzeln, wo sie das Wurzelinnere im Apoplasten, also zwischen den Pflanzenzellen, dicht besiedeln können (Abb. 1, rechts). Ähnlich wie Krankheitserreger breiten sie sich in der Pflanze aus, führen aber nicht zur Ausbildung spezifischer Strukturen wie Knöllchen oder zu Symptomen von Pflanzenkrankheiten (2). Damit erinnert ihr Lebensstil an Symbionten, aber

auch an pathogene Bakterien. Anders als zum Beispiel Rhizobien sind diese Endophyten keine typischen Bodenbakterien; sie konnten bisher nicht aus wurzelfreiem Boden isoliert oder dort mit molekularbiologischen Methoden detektiert werden. Daher scheinen sie in ökologischer Hinsicht eng von Wirtspflanzen abzuhängen. Dies ist um so erstaunlicher, als verwandte Arten der gleichen Gattung *Azoarcus* als typische Boden- und Sedimentbewohner bekannt sind.

Modell für endophytische Interaktionen: Reis - *Azoarcus*

Obwohl das Isolat *Azoarcus* sp. BH72 aus Wurzeln von Kallargras stammt, können diese Bakterien interessanterweise im Labor auch in Reiswurzeln eindringen (Abb. 1). An

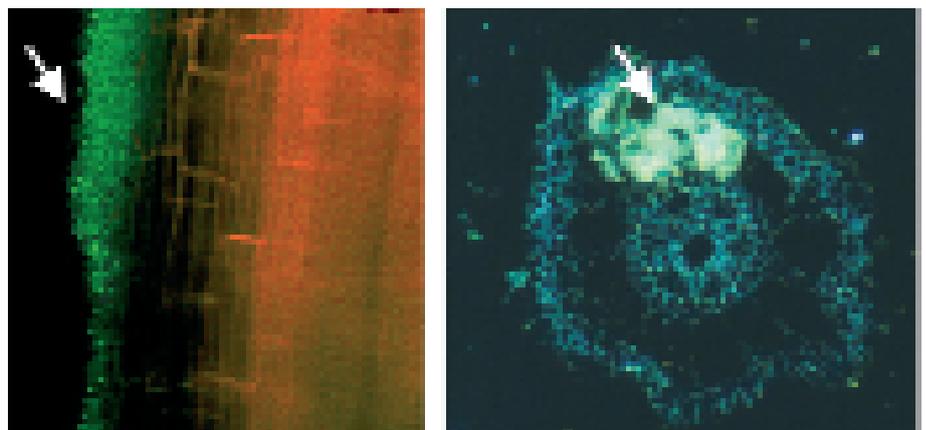


Abb. 1. Besiedlung von Reiswurzeln durch stickstofffixierende endophytische Bakterien, *Azoarcus* sp. BH72, in Laborkultur. Links, Besiedlung der Wurzeloberfläche durch Bakterien, die mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) markiert sind (Fluoreszenzbeleuchtung) (2). Rechts, Mikrokolonie von *Azoarcus* sp. BH72 (Pfeil) im Wurzelinnern (Dunkelfeldbeleuchtung), Abbildung aus (3).

Reiskeimlingen zeigen sie ähnliche Infektionsorte und Besiedlungsmuster wie im Wirt Kallargras (2). Sowohl Kallargras als auch Reis sind überflutungstolerante Pflanzen, die Gasräume in der Wurzel ausbilden, das sogenannte Aerenchym (Abb. 1), das zur „Belüftung“ wie ein Kamin Sauerstoff in den Wurzelraum führt. Wie in Kallargras bietet auch in Reis dieses Gewebe geeignete Bedingungen für den Prozeß der Stickstofffixierung. Das sauerstoffempfindliche Schlüsselenzym der Stickstoff-Fixierung, die Nitrogenase, wird nur bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen und der Abwesenheit alternativer Stickstoffquellen wie Ammonium und Nitrat gebildet. Seine Genexpression konnte nicht nur in Kallargras, sondern auch im Aerenchym von infizierten Reiskeimlingen gefunden werden (3). Zudem fördert Stamm BH72 in Laborkultur auch das Pflanzenwachstum von Reiskeimlingen. Damit stellt das System *Azoarcus* ein gutes Modellsystem dar, um erste Schritte der Interaktion und des molekularen Zwiegesprächs der Partner zu untersuchen (4). Reis ist nicht nur eine der weltweit wichtigsten Nahrungspflanzen, sondern auch genetisch transformierbar; die Genomsequenz verschiedener Kulturstypen konnte bereits entschlüsselt werden, so dass *Oryza* die ideale Wirtspflanze für funktionelle Genomanalyse beider Partner darstellt.

Das *Azoarcus* sp. BH72 Genomprojekt

Von der Forschergruppe Reinhold-Hurek und Hurek wird in Zusammenarbeit mit dem Kompetenzzentrum der Universität Bielefeld das Genom von *Azoarcus* sp. Stamm BH72 als Modellbakterium für stickstofffixierende Grasendophyten entschlüsselt. Erste Sequenzanalysen weisen bereits darauf hin, dass einige Ähnlichkeiten, aber auch viele Unterschiede in der Genausstattung zwischen diesen Bakterien und symbiontischen Rhizobien bzw. phytopathogenen Bakterien bestehen. Inzwischen liegt auch die Genomsequenz einer verwandten Art

der Gattung *Azoarcus* vor (5), Stamm EbN1, der als nicht-pflanzenassoziierter Bodenbewohner einen anderen Lebensstil repräsentiert. Erste Analysen zeigten etliche Unterschiede in der Genausstattung und relativ geringe Synthese beider Genome (6). Genomvergleiche, Analysen der Genexpression während der Stickstofffixierung und während des Zusammenlebens mit Reiskulturen, sowie gezielte Mutationsanalysen von Kandidatengenen, die für die Interaktion von Bedeutung sein können, sollen es ermöglichen, das molekulare Zwiegespräch der Partner besser zu verstehen. Dies kann als Grundlage zur Entwicklung und Optimierung von bakteriellen „Biodüngern“ für verbessertes Pflanzenwachstum und Kunstdüngereinsparung dienen.

Literatur

1. Hurek et al. (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:233-242.
2. Reinhold-Hurek, B., and T. Hurek (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6:139-144.
3. Egener et al. (1999) Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:813-819.
4. Hurek, T., and B. Reinhold-Hurek (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* 106:169-178.
5. Rabus et al. (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Archives of Microbiology* 183:27-36.
6. Battistoni et al. (2005) Physical map of the *Azoarcus* sp. strain BH72 genome based on a bacterial artificial chromosome (BAC) library as a platform for genome sequencing and functional analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*: In press.

Kontakt

Prof. Dr. Barbara Reinhold-Hurek
*Laboratorium für Allgemeine Mikrobiologie
Universität Bremen*
E-Mail: breinhold@uni-bremen.de

Genexpressionsanalysen erlauben die Aufklärung komplexer bakterieller Differenzierungsprozesse in der Rhizobien-Leguminosen Symbiose

Anke Becker

Freilebende oder in Symbiose mit Pflanzen lebende Bakterien leisten einen wichtigen Beitrag zur biologischen Bindung molekularen Luftstickstoffs. Hierbei tragen insbesondere Rhizobien in der Symbiose mit Pflanzen aus der Familie der Leguminosen mit ca. 300 kg Stickstoff pro Hektar und Jahr zur globalen Stickstoff-Fixierung bei. In dieser Symbiose induzieren die Bakterien die Bildung eines neuen Pflanzenorgans und besiedeln dieses. In der Pflanzenzelle differenzieren die Bakterien zu einem nicht mehr teilungsfähigen Bakteroidstadium, das auch als transientes Organell angesehen werden kann. Erst in diesem Stadium sind die Bakterien in der Lage, Stickstoff zu fixieren. Die Etablierung und Aufrechterhaltung dieser Symbiose erfordert eine genaue Feinabstimmung zwischen Rhizobien und Pflanze.

An der Universität Bielefeld ist es zum ersten Mal gelungen, durch Microarray-Experimente globale Expressionsprofile des endosymbiontischen Bakteroidstadiums und eines freilebenden Stadiums des Modellrhizobiums *Sino-*

rhizobium meliloti zu vergleichen (1). Die Genomsequenz dieses Rhizobiums ist vollständig bekannt. Sie enthält ca. 6200 Protein-kodierende Gene. Die Microarray-Experimente haben nun gezeigt, dass sich die Genexpressionsprofile von Bakteroiden und den in Minimalmedium kultivierten Bakterien drastisch unterscheiden.

Unter den 982 differentiell exprimierten Genen wurden 19 stark induzierte Regulatorgene identifiziert, unter ihnen 14 Gene, die bislang noch gar nicht oder nicht im Zusammenhang mit der Symbiose untersucht wurden. Insbesondere diese Gene sind von großem Interesse, da sie für die Steuerung der Differenzierungsprozesse, die Aufrechterhaltung und den speziellen Metabolismus des Bakteroidstadiums von Bedeutung sein könnten.

Darüber hinaus wurde die Expression von 167 Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, im Bakteroidstadium induziert. Auch diese bisher noch nicht näher analysierten Gene sind von besonderem Interesse, um sich dem Ziel eines umfassenden Verständnisses der

symbiontischen Interaktion zwischen Rhizobien und ihren Wirtspflanzen weiter zu nähern. Aufgrund des Modellcharakters, den das Rhizobien/Leguminosen-System für Bakterien-Pflanzen Interaktionen hat, ist die Analyse dieses Systems von großer Bedeutung für die zukünftige, anwendungsorientierte Nutzung in der Landwirtschaft. Die erste Beschreibung des Genexpressionsprofils von *S. meliloti* Bakteroiden stellt somit einen wichtigen Schritt in diese Richtung dar.

Literatur

1. Becker et al. (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:292-303.

Kontakt

HD Dr. Anke Becker
 Universität Bielefeld
 Fakultät für Biologie
 E-Mail: Anke.Becker@Genetik.Uni-Bielefeld.DE

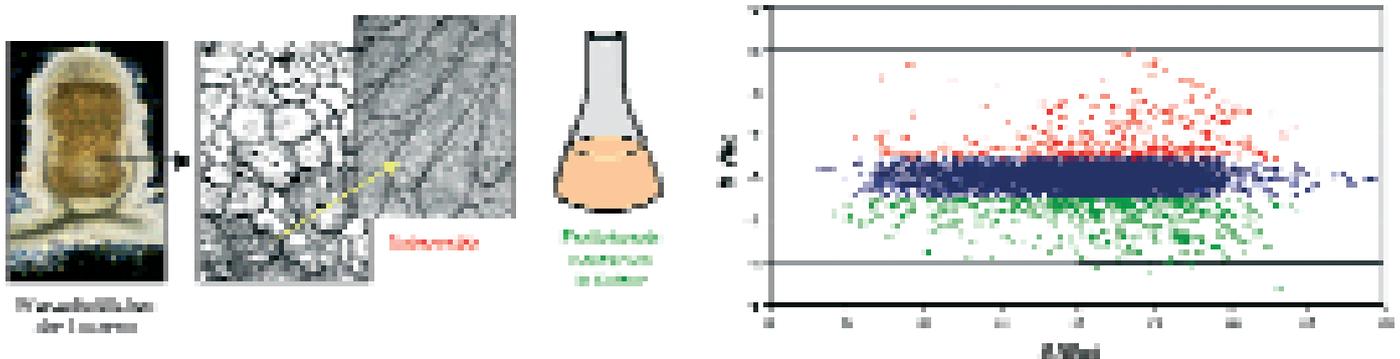


Abb. 1: Microarray-Experiment zum Vergleich der Genexpression in Bakteroiden und freilebenden Zellen von *S. meliloti*. Microarray-Experiment zum Vergleich des Genexpressionsprofils von Bakteroiden (Cy5-markierte cDNA; rote Fluoreszenzmarkierung) und freilebenden, in Minimalmedium kultivierten Zellen (Cy3-markierte cDNA; grüne Fluoreszenzmarkierung) von *S. meliloti*. Die kombinierten Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle (A-Wert) wurden auf einer logarithmischen Skala (\log_2) gegen den Logarithmus (\log_2) des Verhältnisses der Intensitäten in beiden Kanälen (M-Wert) aufgetragen. Rot markiert sind Gene, die in Bakteroiden induziert wurden; grün markiert sind Gene, die in freilebenden Zellen induziert wurden. Blau markiert sind Gene, deren Expression sich im freilebenden und Bakteroid-Zustand nicht unterscheidet.

Der Beginn einer ertragreichen Partnerschaft: *Bradyrhizobium japonicum* und Sojabohne tauschen Signale aus

Michael Göttfert

Das Bakterium *Bradyrhizobium japonicum* ist in der Lage, seine Wirtspflanzen, darunter Sojabohne, in Symbiose mit Stickstoff zu versorgen. Es wird deshalb beim Sojabohnenanbau häufig zur Beimpfung des Saatguts eingesetzt. Das verringert den Düngemittelbedarf und vermeidet auch die ökologisch bedenkliche Überdüngung mit Stickstoff. Ein optimierter Einsatz in der Landwirtschaft erfordert jedoch eine detaillierte Kenntnis der Symbiose.

Die Symbiose wird durch einen gegenseitigen Signalaustausch eingeleitet. Die Pflanze setzt über ihr Wurzelsystem Flavonoide frei, bei der Sojabohne ist dies unter anderem Genistein. *Bradyrhizobium japonicum* hat zwei verschiedene Regulationssysteme, NodD1 und NodVW, die das Signal erkennen und die Gene für die Knöllchenbildung (*nod*-Gene) aktivieren. Die Nod-Proteine produzieren ihrerseits ein Signalmolekül, das aus der Bakterienzelle ausgeschleust wird und bei der Pflanze die Bildung der Wurzelknöllchen in Gang setzt (Abb. 1). Die Bakterien können Zellen des Wurzelknöllchens besiedeln und darin Luftstick-

stoff fixieren, der in gebundener Form der Pflanze zu Gute kommt. Im Gegenzug erhalten die Bakterien Nährstoffe und eine geschützte ökologische Nische.

Um herauszufinden, welche Gene bei den Bakterien durch Genistein angeschaltet werden, ist bei Genomen mit bekannter Nucleotidsequenz die Microarray-Analyse die Methode der Wahl. Unter Verwendung eines an der ETH in Zürich entwickelten Genom-Chips fanden wir heraus, dass von den rund 8300 Genen des Bakteriums etwa 100 Gene innerhalb von vier Stunden nach Genisteinzugabe verstärkt exprimiert werden. Die Herausforderung ist jetzt, für einige dieser Gene die Funktion zu ermitteln.

Die NodD1- und NodVW-Proteine sind auch für die Expression eines weiteren Regulators, des TtsI-Proteins wichtig (Abb. 2; 1). Es kontrolliert eine zweite Regulationsebene, bei der vermutlich noch ein weiteres, bisher unbekanntes Signal eine Rolle spielt. TtsI aktiviert bei Vorhandensein von Genistein mehrere Gene, die für ein Typ III-Sekretionssystem kodieren. Die Identifizie-

rung der zum TtsI-Regulon gehörenden Gene ist gegenwärtig eines unserer Hauptziele.

Typ III-Sekretionssysteme wurden zunächst in tier- und pflanzenpathogenen Bakterien identifiziert. Es handelt sich um spezialisierte Transportsysteme, die Proteine zum Teil bis in die Pflanzenzelle einschleusen. Diese Proteine spielen für die Pathogenität der entsprechenden Bakterien eine wichtige Rolle. Mittlerweile wurden diese Systeme auch in einigen Rhizobien, beispielsweise in dem von uns untersuchten *B. japonicum*-Stamm, gefunden. Abhängig vom Wirtssystem können die Typ III-Sekretionssysteme die Symbioseleistung positiv oder negativ beeinflussen. Uns interessieren die durch dieses System sekretierten Proteine. Dazu haben wir Bakterien mit oder ohne Genistein angezogen, die Proteine aus dem Überstand isoliert und mittels 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das gleiche Verfahren wurde mit einem Stamm durchgeführt, bei dem das Typ III Sekretionssystem durch eine Mutation ausgeschaltet wurde. Tatsächlich konnten wir einige Proteine darstellen, die Genistein-abhängig sekretiert werden und auf ein funktionsfähiges Typ III-Sekretionssystem angewiesen sind. Diese Proteine werden gegenwärtig mittels Massenspektrometrie in Zusammenarbeit mit dem Bielefelder Kompetenzzentrum analysiert.

Die von uns gewählten genomischen Transkriptom- und Proteomansätze geben uns einen bisher nicht gekannten Überblick über die bei der Symbioseentstehung beteiligten Gene und bringen uns dem Ziel eines umfassenden Verständnisses der Rhizobien/Pflanzen-Interaktion einen wichtigen Schritt näher.



Abb. 1. Sojabohnenwurzel mit Knöllchen (links), aufgeschnittenes Wurzelknöllchen (oben rechts) und infizierte Pflanzenzellen (unten rechts). Die rote Farbe des aufgeschnittenen Knöllchens stammt vom Leghämoglobin, das für eine optimale Sauerstoffkonzentration sorgt.

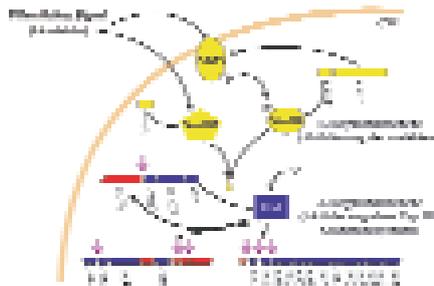


Abb. 2. Modell der Regulationskaskade des *tts*-Genclusters in *B. japonicum*. Offene Leserahmen (ORFs), die bisher nur in *B. japonicum* gefunden wurden, sind rot dargestellt. *nod*-Gen-Regulatoren sind gelb markiert. Blau gekennzeichnete ORFs zeigen entweder Ähnlichkeit zu Genen, die bei pathogenen Bakterien ein Typ III-Sekretionssystem kodieren oder sind bei anderen Rhizobien konserviert. Die gelbe Pfeilspitze weist auf die Position einer *nod*-Box hin. Die Pfeile zeigen das Vorhandensein von konservierten Sequenzmotiven in möglichen Promotorregionen an. Cm: Cytoplasmamembran.

Literatur

1. Krause et al. (2002) Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:1228-1235.

Kontakt

Prof. Dr. Michael Göttfert
 Institut für Genetik, TU Dresden
 E-mail: mgoettfe@rcs.urz.tu-dresden.de

Auf dem Weg zum maßgeschneiderten Pflanzenschutz?

Oliver Kirchner, Frank Thieme und Ulla Bonas

Pflanzenkrankheiten ziehen trotz Anbaus optimierter Sorten von Nutzpflanzen und der Verwendung von Pflanzenschutzmitteln jährlich weltweit enorme Ernteverluste nach sich. Gemeinsames Ziel vieler aktueller Forschungsprojekte ist es daher, die Infektionsstrategien der Pathogene aufzuklären, um dadurch gezielt Pflanzen besser schützen zu können.

Im Rahmen der GenoMik-Initiative wurde das Genom des Gram-negativen Bakteriums *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), dem Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit von Paprika und Tomate, sequenziert. Es weist eine Größe von etwa 5,4 Millionen Basenpaaren auf. Xcv ist ein Modellorganismus aus der großen Familie der Xanthomonaden, die insgesamt etwa 400 verschiedene Kulturpflanzen und Wildarten befallen können. Unabdingbar für die Auslösung der Krankheit ist ein Typ III-Proteinsekretionssystem, das in den meisten bakteriellen Pflanzen- sowie Tierpathogenen wie *Yersinia pestis*, dem Erreger der Pest, oder *Salmonella* Arten, Erregern von Durchfallerkrankungen und Typhus, konserviert ist. Über dieses wie eine molekulare Spritze arbeitende System werden Effektorproteine in die Wirtszelle injiziert. Die Funktion dieser Effektorproteine ist in vielen Fällen noch nicht abschließend geklärt, vermutlich besitzen sie eine wichtige Funktion in der Unterdrückung von Abwehrmechanismen und der Umprogrammierung des Stoffwechsels der Wirtszelle zum Vorteil des Bakteriums. Das Effektorprotein AvrBs3 etwa wird nach seiner Injektion in der Wirtszelle in den Kern transportiert und verändert dort die pflanzliche Genexpression.

Homologievergleiche weiterer durch das *Xanthomonas* Typ III-Proteinsekretionssystem sekretierter Effektorproteine haben interessante Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede zu den Tierpathogenen ergeben. So gibt es in Xcv neben konservierten Effektorproteinen - die in vielen Pathogenen mit Typ III-Proteinsekretionssystem vorzukommen scheinen, wie XopJ, einer Protease mit Ähnlichkeit zu YopJ aus *Yersinia* - zahlreiche weitere Effektoren, die vermutlich jeweils spezifisch auf die Interaktion mit dem Wirt zugeschnitten sind.

Vergleiche der vollständigen Genomsequenzen von nunmehr vier verschiedenen Xanthomonaden - *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X.*

campestris pv. *campestris* (Xcc), *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) und *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) - zeigen, dass die Genome von Xcv, Xcc und Xac in großen Bereichen ähnlich aufgebaut sind. Xoo hingegen besitzt eine vollkommen andere Organisation. Alle Genome besitzen eine große Plastizität, es zeigen sich viele Hinweise auf den Austausch genetischer Information über Artgrenzen hinweg durch horizontalen Gentransfer. Das Vorkommen endogener Plasmide ist sehr unterschiedlich: Xcv enthält vier Plasmide, Xac zwei, die beiden anderen enthalten keine. Neben Genen für Konjugationssysteme enthalten die Plasmide unter anderem Gene für Virulenzfaktoren und tragen so, zusammen mit durch horizontalen Gentransfer erworbenen Genregionen, wahrscheinlich zur Adaptation an den jeweiligen Wirt bei. Jedes der Pathogene zeichnet sich durch spezifische Genregionen aus, die nur in einem der Genome vorkommen. Ob dies der Schlüssel zur Festlegung der Wirtsspezifität ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Neben neuen Effektorproteinen werden weitere potentielle Virulenzfaktoren gesucht. Die Annotation des Genoms von Xcv hat viele Ähnlichkeiten zu den anderen Xanthomonaden aufgezeigt. So zeichnen sich alle Xanthomonaden durch eine ungewöhnlich große Zahl von Transportproteinen für eine Vielzahl verschiedener Substanzen aus. Eine sehr große Anzahl verschiedener Regulatoren scheint der Anpassung an diverse Umweltbedingungen zu dienen. Auffällig ist, dass Xcv alle bisher für Gram-negative Bakterien beschriebenen Protein-Sekretionssysteme besitzt. Das Vorhandensein aller Protein-Sekretionssysteme wurde bisher nur in den Pflanzenpathogenen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* und *Ralstonia solanacearum* beschrieben.

Eine Besonderheit besteht darin, dass Xcv neben dem Vir/Tra-Typ IV-Sekretionssystem als einziges Pflanzenpathogen ein mutmaßliches Icm/Dot-Typ IV-Sekretionssystem besitzt, welches in den Humanpathogenen *Legionella pneumophila* (Erreger der Legionärskrankheit) und *Coxiella burnetii* (Erreger des Q-Fiebers) charakterisiert wurde.

Ein Zeichen besonderer Anpassung an das Habitat "Pflanze" stellt sicherlich die große Anzahl an sekretierten, Pflanzenzellwand-ab-



Abb. 1: Vereinfachtes Modell der Interaktion von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* mit der Wirtszelle.

bauenden Enzymen dar. Dazu gehören Zellulasen (neun Kandidaten), Glukosidasen (fünf Kandidaten), Pektatlyasen (vier Kandidaten) und Xylanasen (fünf Kandidaten), die es *Xanthomonas* erlauben, die Makromoleküle der pflanzlichen Zellwand abzubauen, und als Energiequelle zu nutzen.

Die biologische Bedeutung vieler der genannten Befunde ist bisher noch unklar und Teil intensiver Studien.

Durch die nun vollständige Annotation der Genomsequenz und die derzeit laufenden molekularen und genetischen Untersuchungen hoffen wir, ein besseres Verständnis der Interaktion zwischen Pflanzenpathogenen und ihrem Wirt im Allgemeinen und der Pathogenitätsmechanismen von *Xanthomonas* im Speziellen zu bekommen. Dies ist Voraussetzung, um langfristig neue Strategien im Pflanzenschutz entwickeln zu können.

Literatur

1. Büttner et al. (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J. Biotechnol.* 106:203-214.
2. Noël et al. (2003) XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 185:7092-7102.
3. Thieme et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.*: in press

Kontakt

Prof. Dr. Ulla Bonas
 Institut für Genetik
 Universität Halle-Wittenberg
 E-Mail: Bonas@Genetik.Uni-Halle.DE

Identifizierung einer Genomregion von *Clavibacter*, die die Ausprägung der bakteriellen Welke der Tomate beeinflusst

Rudolf Eichenlaub

Am Lehrstuhl für Gentechnologie/Mikrobiologie der Universität Bielefeld wird das Gram-positive pflanzenpathogene Bakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* untersucht. Das Bakterium verursacht die bakterielle Welke der Tomate, eine weltweit verbreitete Krankheit, die zu hohen Ernteaufällen mit entsprechenden finanziellen Verlusten für die Landwirtschaft führen kann.

Das Bakterium dringt über Wunden oder kontaminiertes Saatgut in die Tomate ein und breitet sich im Xylemgefäßsystem in der ganzen Pflanze aus. Typische Symptome wie Welkeerscheinungen der Blätter oder Läsionen des Sprosses treten etwa zwei bis drei Wochen nach der Infektion auf (Abbildung 1). Je nach Zeitpunkt und Stärke der Infektion kann die Krankheit zum Absterben der Tomate führen. Es treten jedoch auch latente Infektionen auf, bei denen die Tomate noch zur Fruchtbildung kommt. Derartige Früchte bilden eine der Hauptinfektionsquellen der bakteriellen Welke, da *Clavibacter* in die Samen eindringt und mit diesen weiterverbreitet wird. Da bisher keine resistenten Tomatenkultivare vorhanden sind, ist eine Zertifizierung des Saatguts, das heißt ein Test auf *Clavibacter*, vorgeschrieben und wesentlich für die Bekämpfung der Krankheit.

Die im Rahmen des GenoMik-Projektes fertiggestellte Genomsequenz von *Clavibacter* erlaubt nun erstmals über Vergleiche des virulenten Bakteriums mit nicht-virulenten Stämmen, die entweder aus Tomatenfeldern isoliert oder im Labor über die Konstruktion von Mutanten erzeugt wurden, die Identifizierung von Genen, die für den erfolgreichen Befall der Tomate notwendig sind. So wurde zum Beispiel eine Deletionsmutante erzeugt, die avirulent ist und somit die Tomate nicht mehr erfolgreich besiedeln kann. In dieser Mutante fehlt eine etwa 120 kb große chromosomale Region. Diese Region enthält eine Reihe von Genen, die für unterschiedliche Proteasen kodieren, sowie viele Gene, deren Produkte am Abbau von Zuckern beteiligt sind. Die gesamte Region erinnert in mehreren strukturellen Merkmalen an sogenannte Pathogenitätsinseln Gram-negativer Bakterien, die wichtige Faktoren für die Ausbildung von Krankheiten kodieren. Durch gezielte Mutation einzelner Gene innerhalb dieser Region und die anschließende Untersuchung des Phänotyps dieser Mutanten konnten bereits drei Gene, die alle für Proteasen kodieren, identifiziert werden, deren Ausfall zur Störung der Kolonisationsfähigkeit der Bakterien führt. Ein weiteres Gen in dieser

Region ist für den Abbau von Tomatin, einer pflanzlichen Verbindung, die zur Abwehr von Bakterien und Pilzen dient, verantwortlich.

Aufgrund der vorliegenden Genomsequenz ist auch eine Charakterisierung von Freilandisolaten möglich. Über Southern Hybridisierungen mit DNA-Proben aus der Virulenzregion konnte gezeigt werden, dass auch in avirulenten Feldisolaten die oben erwähnten Gene fehlen. Somit ist es erstmalig gelungen, eine Genregion und erste einzelne Gene zu identifizieren, die für die Besiedlung der Tomate essentiell sind. In zukünftigen Arbeiten sollen weitere Gene, die für die Ausbreitung der Bakterien in der Pflanzen nötig sind, identifiziert und genauer untersucht werden.

Diese Arbeiten zum Mechanismus der Entstehung der bakteriellen Welke der Tomate können in Zukunft neuartige Ansätze zur Entwicklung resistenter Tomatensorten ermöglichen und zur Verbesserung der Saatgutdiagnostik beitragen.

Kontakt

Prof. Dr. Rudolf Eichenlaub
Lehrstuhl Gentechnologie/Mikrobiologie
Universität Bielefeld
E-Mail: eichenlaub@uni-bielefeld.de

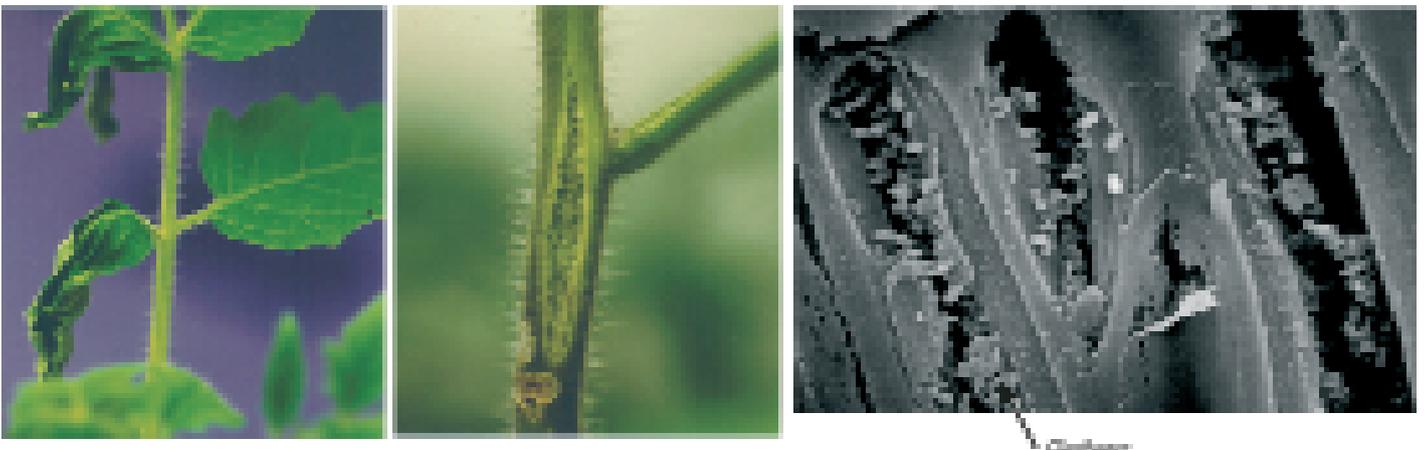


Abb. 1 Typische Symptome der durch *Clavibacter* ausgelösten Welkekrankheit der Tomate. Links ein Beispiel der unifaciale Fiederblattwelke, in der Mitte eine Sproßläsion und im rechten Bild infizierte Leitbündel der Tomate, die von *Clavibacter* besiedelt wurden (Fotos: H. Jahr, R. Eichenlaub)

Wie unterscheiden Pflanzen zwischen Krankheitserregern und nützlichen Mikroorganismen?

Steven Watt, Thomas Patschkowski und Karsten Niehaus

Pflanzen müssen sich permanent wehren. Sowohl in ihrer natürlichen Umwelt als auch in den vom Menschen angelegten Kulturen müssen sie dem ständigen Angriff von Krankheitserregern standhalten. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen jedoch effektive Abwehrmechanismen erworben. Neben einer präformierten Abwehr, wie Wachsschichten auf Blättern oder resistenten Zellwänden, gibt es eine Reihe von induzierten Abwehrreaktionen. Dazu gehört etwa die schnelle Bildung von Sauerstoffradikalen und die Synthese von antimikrobiellen Substanzen, den Phytoalexinen. Als *ultima ratio* kann die Pflanzenzelle in einer so genannten hypersensitiven Reaktion (HR) den eigenen Tod beschließen und so dem Krankheitserreger die Grundlage zur Infektion entziehen.

Neben Krankheitserregern ist die Pflanze aber auch mit symbiontischen Mikroorganismen konfrontiert. So leben etwa 80 Prozent aller Landpflanzen in Gemeinschaft mit Mykorrhizapilzen. Viele Leguminosen wie Klee, Luzerne, Sojabohnen und Bohnen verdanken ihren hohen Eiweißgehalt und das gute Wachstum auf stickstoffarmen Böden der Symbiose mit Bodenbakterien der Gattung *Rhizobium*. Würde die Pflanze jede Infektion durch Mikroben unterbinden, wäre dies sicherlich ein ebenso gravierender Nachteil, wie wenn sie sich nicht gegen Pathogene zur Wehr setzen würde. Entscheidend für die Gesundheit der Pflanze ist ein frühzeitiges Erkennen und eine sichere Identifikation der jeweiligen Mikroorganismen.

Offensichtlich verlassen sich Pflanzen bei der Erkennung von Mikroorganismen nicht auf ein einzelnes Merkmal. Das Muster der von der Pflanze erkannten Merkmale wird als pathogen associated molecular pattern (PAMP) bezeichnet. In den letzten Jahren wurde das PAMP des Krankheitserregers *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), der an Kohlpflanzen die Schwarzaderfäule hervorruft, genauer charakterisiert.

Zunächst zeigte sich, dass ähnlich wie bei der Erkennung Gram-negativer humanpathogener Bakterien durch das menschliche Immunsystem, Oberflächenpolysaccharide von der Pflanze erkannt werden. Speziell die mit der

bakteriellen Zellhülle verbundenen Lipopolysaccharide (LPS) werden von Pflanzen, die eine Resistenz gegen Xcc besitzen, erkannt und führen zur Induktion einer massiven Pflanzenabwehr. Dank bakterieller Mutanten, deren LPS-Biosynthese gestört ist, konnten die an der Erkennung beteiligten Zuckerstrukturen identifiziert werden (1). Interessanterweise werden die LPS, vergleichbar den Vorgängen in einer tierischen Zelle, von der Pflanze aufgenommen und in Vesikeln zur Vakuole transportiert (2).

Ein weiterer Erkennungsfaktor wird erst in der Interaktion mit der Pflanze generiert. Wie viele phytopathogene Bakterien scheidet auch Xcc ein Enzym aus, das die Pektine der pflanzlichen Zellwand abbaut. Diese Pektatlyase setzt dabei jedoch Bruchstücke des Pektins frei, die von der Pflanze erkannt werden und so die Abwehr auslösen. Mit diesem Mechanismus kann die Pflanze sehr sensitiv einen Angriff auf die eigene Zellwand detektieren. Offensichtlich spielen gerade die extrazellulären Proteine von Xcc eine wesentliche Rolle in dieser Interaktion.

Im Rahmen von GenoMik wurde nun das extrazelluläre Proteom von Xcc systematisch erfasst und in der Interaktion mit der Pflanze charakterisiert. Zunächst wurden Methoden erarbeitet, um die extrazellulären Proteine in ausreichender Reinheit zu gewinnen. Dies ist bei Xcc ein nicht gerade einfacher Prozess, da das Bakterium bis zu 15 Gramm Polysaccharid pro Liter Bakterienkultur produziert. Nach optimierter Reinigung wurden die Proteine mit Hilfe der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese (2D-GE) aufgetrennt und mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie identifiziert. Mit dieser auf der Xcc-Genomsequenz aufbauenden Methode konnten 87 extrazelluläre Proteine identifiziert werden (3). Unter den Proteinen fanden sich auffallend viele abbauende Enzyme, die offensichtlich für die pathogene Interaktion charakteristisch sind, denn bei dem symbiontischen Bodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* waren diese kaum nachweisbar. Neben den abbauenden Enzymen wurden aber auch in anderen Systemen als Induktoren der Abwehr bekannte Proteine gefunden. Dazu gehören

das Flagellin und der bakterielle Translations-Elongationsfaktor Eftu (4). Als besonders interessant stellte sich jedoch die bakterielle Superoxiddismutase (SOD) heraus. Die SOD dient den Bakterien zur Entgiftung von Sauerstoffradikalen, die als Nebenprodukt der Atmungskette anfallen. Alle aeroben Bakterien besitzen eine SOD, deren Aminosäuresequenz gut konserviert ist. Gleichzeitig dient die SOD von pathogenen Bakterien aber auch der Entgiftung von Sauerstoffradikalen, die von der Pflanze als Abwehr gebildet werden. Untersuchungen in Zellkulturen von Tabak zeigten, dass die SOD von der Pflanze erkannt wird und zu einer massiven Pflanzenabwehr führt. Hier zeigt sich eine „Logik“ in der Ko-Evolution von phytopathogenen Bakterien und Pflanzen. Die Pflanzen erkennen also gerade jenen Faktor, der von dem infizierenden Pathogen gebildet wird, um sich vor der Pflanzenabwehr zu schützen. In weiterführenden Arbeiten soll nun das Muster der von der Pflanze erkannten Pathogenitätsfaktoren erstellt werden.

Literatur

1. Braun et al. (2005) Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharides substructures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* :in press
2. Groß et al. (2005) Endocytosis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Lipopolysaccharides in non-host plant cells of *Nicotiana tabacum* *New Phytologist* 165: 215-226.
3. Watt et al. (2005) Comprehensive proteome analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Proteomics* 5: 153-167
4. Kunze et al. (2004) The N-terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 496-507.

Kontakt

Prof. Dr. Karsten Niehaus

Universität Bielefeld

Proteom- und Metabolomforschung

E-Mail:

karsten.niehaus@genetik.uni-bielefeld.de

Genomsequenz von *Alcanivorax borkumensis* – einem universellen Öl-abbauenden, marinen Bakterium

Vitor A. P. Martins dos Santos, Kenneth N. Timmis und Peter N. Golyshin

Ölverschmutzungen stellen eine ernsthafte Bedrohung für marine und küstennahe Gewässer dar. Ein erheblicher Anteil des Rohöls, das in die Umwelt gelangt, wird zwar durch Mikroorganismen abgebaut, allerdings ist die Abbaurrate nicht hoch genug, um ökologischen Schaden zu vermeiden. Unsere Gruppe entdeckte kürzlich ein neues, weltweit verbreitetes Bakterium, *Alcanivorax borkumensis*, das in großen

Mengen in överschmutzten Meereswasser vorkommt. Das Bakterium baut ein breites Spektrum von Kohlenwasserstoffen ab. Dazu produziert es ein potentes Oberflächentensid, das Öl emulgiert und so die Abbaurrate erhöht (1). Der neuentdeckte Organismus spielt eine wichtige Rolle dabei, Öl aus marinen Habitaten zu entfernen und hat großes Potential zur Entwicklung neuer Strategien bei der Bekämpfung von

Ölverschmutzungen (2, 3). Die Nutzbarmachung dieses Potentials erfordert allerdings eine genaue Kenntnis der einzigartigen Physiologie dieses Bakteriums. Die Genomanalyse bietet den erforderlichen Schlüssel dazu. Das Genom von *A. borkumensis* wurde nun sequenziert und annotiert. Es umfasst 3.120.143 Basenpaare. Insgesamt wurden 2767 offene Leseraster identifiziert, 70 Prozent davon konnte eine Funktion zugeordnet werden, 20 Prozent gehörten zur Familie der „conserved hypothetical proteins“ und 10 Prozent stellen neue, hypothetische Proteine dar. Bezüglich der ökologisch relevanten physiologischen Aktivitäten ergab die Bioinformatik-Analyse folgende Besonderheiten des *A. borkumensis* Genoms:

Biofilmbildung an der Öl-Wasser Interphase:

Alcanivorax borkumensis baut Öl an Öl/Wasser-Phasengrenzen ab (Abb 1). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung an diesen Phasengrenzen ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Es wurden Gene für die Produktion von Exopolysacchariden, Alginat und anderen Polymeren identifiziert, die möglicherweise eine Biofilm-Matrix produzieren. Weiterführende Arbeiten unseres Labors mit entsprechenden Mutantenstämmen haben ergeben, dass einige dieser neuidentifizierten Gene essentiell für die Ausbildung eines Biofilms sind.

Breites Spektrum und hohe metabolische Aktivität des Kohlenwasserstoff-Abbaus:

A. borkumensis kann gewöhnliche Kohlenstoffquellen wie Glukose oder Fruktose nicht verwerten (1), sein Genom weist daher auch eine vergleichsweise geringe Anzahl an Genen für die Energiegewinnung auf. Einige dieser Gene spielen aber offenbar eine Rolle im Kohlenwasserstoff-Metabolismus von *A. borkumensis* und spiegeln somit die Spezialisierung

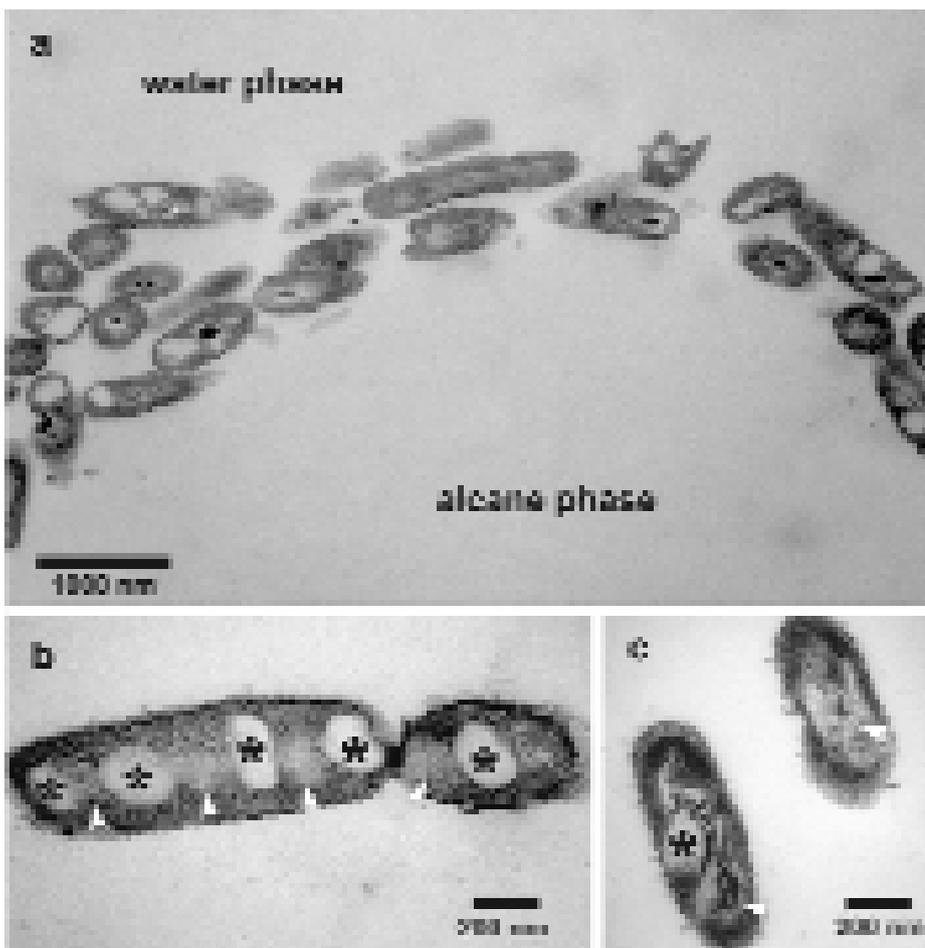


Abb1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *A. borkumensis* Bakterienzellen an der Öl-Wasser (oil/water) Interphase (H. Lünsdorf, GBF; A). B und C: Aufnahmen individueller Bakterienzellen. Sterne weisen auf Speicherpolymere hin. nm = Nanometer

dieses Organismus für den Ölabbau wider. *Alcanivorax* besitzt zwei Gencluster zum Abbau von Kohlenwasserstoffen und einige weitere Gene, die für Oxidoreduktasen und P450 Cytochrome kodieren. Auch sie sind wahrscheinlich an der Ölverwertung beteiligt. Beide Gencluster zum Abbau von Kohlenwasserstoffen sind in der Nähe des chromosomalen Replikationsursprungs lokalisiert. Dies legt eine entsprechend starke Expression der Gene aufgrund eines Gen-Dosis Effekts nahe.

Aufnahme von Nährstoffen:

A. borkumensis verfügt über eine große Anzahl von Genen für die Wahrnehmung und Aufnahme von Nährstoffen und Oligoelementen (N, P, Fe, Mg, Co, etc.). Besonders zahlreich und divers sind Transportsysteme für die Aufnahme von Stickstoff-haltigen Verbindungen sowie Eisen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass *Alcanivorax* durch diese Kombination aus Generalismus in Bezug auf Ernährung und der bemerkenswerten Fähigkeit zum Alkanabbau über einen überlegenen Selektionsvorteil in ölverschmutzten Lebensräumen verfügt.

Eigenschaften des marinen Lebensstils:

Das Genom von *A. borkumensis* enthält auch eine große Anzahl von Genen, die seine Anpassung an den marinen Lebensraum nahelegen. Viele der Transport- und Energiegewinnungssysteme sind Natrium-abhängig wie die NADH-Quinone Dehydrogenase, die *A. borku-*

menensis in die Lage versetzt, den Natriumgradienten als Energielieferant bei der Aufnahme von Nährstoffen zu nutzen. Darüber hinaus konnte eine Vielzahl anderer möglicher Gene identifiziert werden, die vor nischenspezifischen Stressfaktoren schützen (z.B. UV-Strahlung oder osmotischer Stress).

"Mining" im Alcanivorax Genom:

Die Entschlüsselung des Genoms bereitet den Weg für die Nutzung der biotechnologisch wichtigen Fähigkeiten dieses Organismus mittels funktioneller Genomanalysen. Eine Transposonmutantenbibliothek mit etwa 4000 Mutanten wurde bereits generiert. Die Mutanten wurden auf verschiedene habitatspezifische Parameter wie z. B. UV-Strahlung, osmotischer Stress, Temperatur und Adhäsion an Kohlenwasserstoffen untersucht, wobei insgesamt 40 Mutanten gegenüber dem Wildtyp einen veränderten Phänotyp aufwiesen. Im Zuge dieser Analysen wurden beispielsweise Gene identifiziert, die für einen bisher unbekanntem Adaptationsmechanismus bei der Anpassung dieses Bakteriums an Kälte kodieren.

Eine weitere wichtige Entdeckung ist die Identifizierung neuartiger Esterasen, die bisher bekannten Enzymen aufweisen. Die enzymatische Aktivität einer neuentdeckten Esterase liegt beispielsweise etwa zwei Größenordnungen über der Aktivität typischer Esterasen/Lipasen. Das weite Substratprofil, die er-

staunliche Enantioselektivität sowie die chemische Resistenz dieser Esterase weisen auf ein beträchtliches Potential für biokatalytische Anwendungen wie der Auflösung chiraler Mixturen hin.

Das entschlüsselte *Alcanivorax borkumensis* Genom erlaubt nun neue Einblicke in den marinen Lebensstil dieses Öl-abbauenden Bakteriums und seine faszinierende Physiologie. Die nun verfügbare Genomsequenz markiert einen Meilenstein bei der Entwicklung neuer Strategien zur Vermeidung ökologischer Schäden wie sie bei Ölverschmutzung in marinen Systemen auftreten.

Literatur

1. Yakimov et al. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 : 339-348.
2. Harayama et al. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 63-70.
3. Kasai et al. (2001) Molecular detection of marine bacterial communities on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ. Microbiol.* 3: 246-255.

Kontakt

Prof. Dr. Kenneth N. Timmis
Abteilung Umweltmikrobiologie
im Bereich Mikrobiologie
GBF Braunschweig mbH
E-Mail: Kti@Gbf.DE

Kontrolle über den C-Fluss – Zwei neu entdeckte Proteine könnten die Aminosäureproduktion von *Corynebacterium glutamicum* steigern

Bernhard Eikmanns

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram-positives Bodenbakterium mit überragender Bedeutung in der Biotechnologie. Es wird vor allem für die fermentative Herstellung von L-Aminosäuren für den "Feed"- und "Food"-Bereich eingesetzt. Die wichtigsten Aminosäure-Biosynthesen und die Vorstufenbereitstellung durch den Zentralstoffwechsel wurden in den letzten Jahren mit molekulargenetischen Methoden und mit detaillierten Flussanalysen untersucht. Zur Vervollständigung des metabolischen Modells von *C. glutamicum* werden nun im GenoMik-Netzwerk Bielefeld die zentralen Regulationsnetzwerke, die die Physiologie in Wachstums- und Produktionsphase kontrollieren, analysiert. Die genomweite Untersuchung globaler metabolischer Regulationsnetzwerke in *C. glutamicum* mit Hilfe von DNA-Chips beschreibt die wichtigsten Stimulons und erbringt wichtige Hinweise für die Optimierung von industriellen Produktionsstrategien und Verfahren.

Die Kohlenstoffquelle beeinflusst das genomweite Transkriptionsprofil

In der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Ulm werden die zellulären Antworten von *C. glutamicum* auf die Verfügbarkeit von verschiedenen Kohlenstoff-(C-) Substraten mit Hilfe verschiedenster Techniken und aufbauend auf der corynebakteriellen Genomdatenbank der Degussa AG identifiziert und charakterisiert. *C. glutamicum* kann mit verschiedenen Zuckern, Alkoholen und organischen Säuren wachsen und aus diesen Substraten Aminosäuren produzieren. In Zusammenarbeit mit den Kooperationspartnern Degussa AG, dem Forschungszentrum Jülich und dem Kompetenzzentrum Bielefeld wurden genomweite Transkriptionsprofile von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose, Glucose/Acetat-Gemisch, Acetat und auf Ethanol erstellt und vergleichend analysiert (1). Die DNA-Chip-Experimente zeigten, dass die Verfügbarkeit von Acetat und von Ethanol zu vielfältigen transkriptionellen Reaktionen in den zentralen Stoffwechselwegen der Glycolyse, des Zitro-

nensäurezyklus und der Gluconeogenese von *C. glutamicum* führen und sie erlauben die Beschreibung eines Acetat- und eines Ethanol-Stimulons. Außerdem konnten Gene identifiziert werden, die in Abhängigkeit der C-Quelle in ihrer Expression außerordentlich stark reguliert werden, deren Funktion jedoch bisher nicht bekannt ist und die bisher nicht im Zusammenhang mit der Verstoffwechslung der eingesetzten Substrate gesehen wurden.

Zwei neuartige Regulatorproteine für die Kontrolle des Zentralstoffwechsels

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeiten in Ulm ist die Identifizierung der an der Umstellung des Zentralstoffwechsels beteiligten Regulatorproteine und die Aufklärung der Regulationsmechanismen. Aufgrund der Genomanalyse und auf Basis der Analyse gezielt hergestellter Mutanten von *C. glutamicum* kann davon ausgegangen werden, dass die globalen Regulationsprozesse bei der Verwertung unterschiedlicher C-Quellen grundsätzlich anders verläuft als in den in dieser Hinsicht gut untersuchten Modellorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Durch Identifizierung und Lokalisierung von Operatorregionen vor durch die C-Quelle regulierten Genen, DNA-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF-Analysen wurden zwei neuartige Regulatorproteine identifiziert, die RamA und RamB (Regulator of acetate metabolism A und B) genannt wurden und die Expression von Genen für Schlüsselenzyme des Zentralstoffwechsels kontrollieren (2). Diese Gene umfassen einen Teil der Gene des Acetatstimulons, jedoch auch weitere Gene des Zentralstoffwechsels. Außerdem kontrollieren die beiden Regulatorproteine ihre eigene Synthese und unterliegen damit einer Autoregulation. Kürzlich konnten die Erkennungssensoren für RamA und RamB vor mehreren von den beiden Regulatorproteinen kontrollierten Genen lokalisiert und charakterisiert werden. Damit steht nun die Möglichkeit offen, die von RamA und/oder RamB kontrollierten Gene

gezielt in ihrer Expressions-Regulation zu modifizieren und damit den C-Fluss im Zentralstoffwechsel umzulenken.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Substrat-abhängige Regulation von zentralen Stoffwechselwegen in *C. glutamicum* lassen sich direkt für die Optimierung der Aminosäureproduktion von diesem Organismus verwenden. Die beiden Regulatorproteine haben signifikanten Einfluss auf den C-Fluss in für die Lysinproduktion wichtigen Stoffwechselwegen und es lässt sich absehen, dass die Modifikation des C-Flusses im Zentralstoffwechsel zu einer signifikanten Verbesserung der Lysinproduktion führt.

Die Brücke zur Pathogenese von *Mycobacterium tuberculosis*

Da die globalen Regulationsmechanismen unter den *Corynebacteriaceae* wahrscheinlich hochkonserviert sind, ist die in Ulm untersuchte Regulation des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum* auch für die Aufklärung von Regulationsvorgängen im nahe verwandten *Mycobacterium tuberculosis* von Bedeutung. Dies gilt besonders, weil die beiden in *C. glutamicum* gefundenen Regulatorproteine die Gene für den Glyoxylatzyklus regulieren und der Glyoxylatzyklus in *M. tuberculosis* für die Persistenz in Makrophagen und damit für den Krankheitsverlauf der chronischen Tuberkulose notwendig ist.

Literatur

1. Gerstmeir et al. (2003) Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104: 99-122.
2. Gerstmeir et al. (2004) RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186: 2798-2809.

Kontakt

Prof. Dr. Bernhard Eikmanns
Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie
Universität Ulm
E-Mail: Bernhard.Eikmanns@Uni-Ulm.DE

Identifizierung und Charakterisierung des globalen Regulators der Stickstoffkontrolle in Corynebakterien

Reinhard Krämer und Andreas Burkovski

Das Element Stickstoff ist von zentraler Bedeutung für alle lebenden Zellen. Es ist Bestandteil der Bausteine für Proteine, Zellwand und Erbmateriale, ohne die ein Überleben oder Wachstum unmöglich ist. Für jeden Organismus ist daher eine sichere und an den Bedarf angepasste Versorgung mit Stickstoffquellen von essentieller Bedeutung.

Identifizierung und Funktion eines globalen Stickstoff-Regulators

Im Rahmen eines BMBF-geförderten GenoMik-Programms wurde die globale Regulation des Stickstoffmetabolismus auf Ebene der Genexpression, die Stickstoffkontrolle, in *Corynebacterium glutamicum* untersucht (1). In einer Kooperation mit der Degussa AG, dem Kompetenzzentrum der Universität Bielefeld und anderen Partnern wurde dabei der zentrale Regulator der Stickstoffkontrolle in *C. glutamicum*, AmtR (2), identifiziert und funktionell charakterisiert. Die Ergebnisse von DNA-Microarray-Experimenten (3) und bioinformatischen Ansätzen zeigten, dass AmtR essentiell für die Antwort der Zelle auf eine limitierte Stickstoffversorgung ist. Der Befund, dass AmtR dabei die Expression von mehr als 30 Genen kontrolliert, unterstreicht seine zentrale Bedeutung für die Stickstoffkontrolle.

Neue Transportproteine für die Aufnahme von Stickstoffquellen wie Ammonium, Creatinin, Aminosäuren und Harnstoff werden gebildet. Damit einhergehend wird auch die enzymatische Ausstattung der Zelle zur Nutzung dieser Stickstoffquellen aktiviert (Abb. 1).

Stickstoffkontrolle in anderen Corynebakterien

AmtR ist nicht nur von zentraler Bedeutung für die Anpassung von *C. glutamicum* an Mangelbedingungen, ein homologes Protein wurde auch in der Genomsequenz des neu isolierten Aminosäureproduzenten *Corynebacterium efficiens* und in der des pathogenen Bakteriums *Corynebacterium diphtheriae* gefunden. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass AmtR auch in *C. diphtheriae* das globale Netzwerk der Stickstoffregulation und damit die Anpassung an Stickstoffmangel kontrolliert.

AmtR-regulierte Antwort auf Stickstoffmangel

Um Stickstoffmangelbedingungen zu bewältigen, muss die Zelle gezielt neue Proteine bilden. Dazu werden verschiedene Gene AmtR-reguliert abgelesen und in Folge neue Proteine synthetisiert. Auffällig ist, dass *C. glutamicum* dabei mehrere, miteinander vernetzte Anpassungsstrategien verfolgt: So wird die Zahl von Signalproteinen erhöht, vermutlich um die Signalweiterleitung zu beschleunigen.

Stickstoffmangel

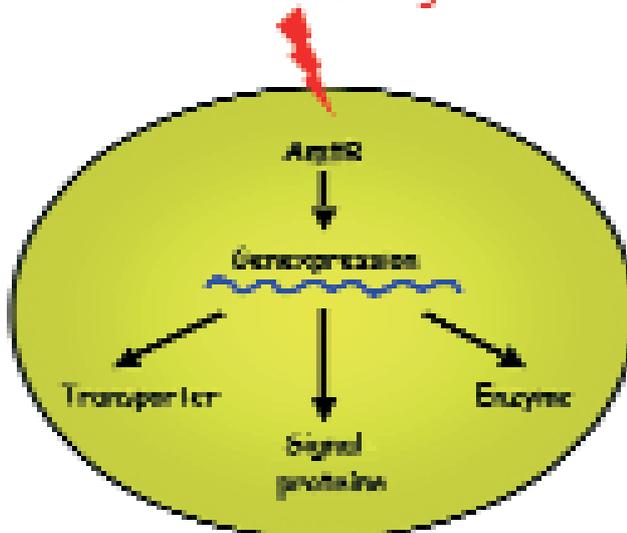


Abb. 1: Der globale Transkriptionsregulator AmtR kontrolliert die Antwort auf Stickstofflimitation. Durch Regulation der Genexpression werden in Mangelsituationen Signalproteine, Transporter und verwendende Enzyme koordiniert neu gebildet.

Literatur

1. Burkovski, A. (2003) I do it my way: Regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. Arch. Microbiol. 179:83-88.
2. Jakoby et al. (2000) AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. 37:964-972.
3. Silberbach et al. (2005) Adaption of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation : A global analysis using transcriptome and proteome techniques. Appl. Environ. Microbiol. 71:2391-2402.

Kontakt

Prof. Dr. Andreas Burkovski
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
E-Mail: aburkov@biologie.uni-erlangen.de

Streptomyceten – eine unerschöpfliche Quelle für neue Wirkstoffe

Stefan Pelzer und Andreas Vente

Naturstoffe sind aus historischer Sicht die bedeutendste Quelle für neue Wirkstoffe mit medizinischer Relevanz. Nach einer vor kurzem veröffentlichten Studie leiteten sich 61 Prozent der 877 Substanzen, die zwischen 1981 und 2002 als Medikamente auf den Markt kamen, aus Naturstoffen ab (1). Hierbei waren durchaus auch Substanzen, die sehr große Märkte adressieren, vertreten: Neun der 20 auf kleinen Molekülen basierenden Medikamente mit dem größten Umsatz weltweit beruhen auf Naturstoffen oder sind Naturstoffe.

Naturstoffe, die auch als Sekundärmetabolite bezeichnet werden, werden insbesondere aus Pflanzen und Bakterien isoliert. Bodenbakterien der Gattung *Streptomyces* zeichnen sich dabei durch die Synthese außergewöhnlich vieler biologisch aktiver Naturstoffe aus. Hierbei leitet sich die enorme Vielfalt der in Streptomyceten gebildeten Naturstoffe vor allem aus den Genen des Sekundärmetabolismus ab. Diese Gene sind in sogenannten Clustern organisiert, die für die Enzyme und regulatorischen Proteine kodieren, welche für die Naturstoffbiosynthese benötigt werden. Meist sind in diesen Clustern auch die Resistenzmechanismen kodiert, die den Organismus vor der biologischen Wirkung seiner eigenen Sekundärmetabolite schützen. Der Abschluss zweier Streptomyceten-Genomprojekte (*Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces avermitilis*) in den

letzten Jahren zeigte, dass das genetische Potential dieser Bakterien für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten sogar noch weit über das bisher bekannte Maß hinausgeht. In jedem dieser Organismen wurden erstaunlicherweise 20 bis 30 Gencluster identifiziert, die größtenteils für die Biosynthese bislang noch unbekannter Naturstoffe verantwortlich sind. Arbeiten an anderen Organismen zeigen, dass bei diesen Bakterien dieses enorme Potential zur Produktion verschiedenster Naturstoffe eher die Regel ist.

Im Rahmen der BMBF Fördermaßnahme „Genomforschung an Mikroorganismen – GenoMik“ gelang es Wissenschaftlern aus Universitäten, Instituten und Firmen in einem gemeinsamen systematischen Ansatz, die Biosynthesegencluster für eine Vielzahl unterschiedlicher Naturstoffe mit medizinischer Relevanz aus der Klasse der Polyketide zu identifizieren. Die Sequenz dieser Gencluster wurde entschlüsselt und es konnten neue Erkenntnisse zur Biosynthese der Polyketide gewonnen werden (2). Substanzen wurden aufgereinigt, teilweise derivatisiert und befinden sich derzeit in präklinischen Testungen. Die strukturelle Vielfalt dieser Substanzen wird durch die Modifikationen der Grundstrukturen unter anderem mit Hilfe von Enzymen aus der Klasse der Methylasen, Oxygenasen, Halogenasen, Glykosyltransferasen erzeugt, wie am Beispiel der

Polyketide durch Rix et al beschrieben (3). In verschiedenen Arbeiten wurde bereits nachgewiesen, dass sich diese sogenannten modifizierende Enzyme mit Enzymen der Grundgerüstbiosynthese aus verschiedenen Biosynthesen kombinieren lassen und dadurch neue Wirkstoffe synthetisiert werden können. Dieses Prinzip der sogenannten „Kombinatorischen Biosynthese“ wird nun auch auf die neu gefundenen Polyketid-Biosynthesegencluster angewendet, um neue Wirkstoffe zu erzeugen, oder bekannte Wirkstoffe zielgerichtet zu verbessern (4).

Literatur

1. Newman et al. (2003) *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*. *J. Nat. Prod.* 66:1022-37.
2. Weber et al. (2003) *Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes*. *J. Biotechnol.* 106:221-32.
3. Rix et al. (2002) *Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis*. *Nat. Prod. Rep.* 19:542-80.
4. Pelzer et al. (2005) *Novel natural compounds obtained by genome-based screening and genetic engineering*. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 8:228-38.

Kontakt

Dr. Andreas Vente
Combinature Biopharm AG
E-Mail: vente@combinature.com

Neue Wirkstoffe – Concanamycin A ein interessant "garniertes" Polyketid

Udo Wehmeier

Viele Polyketide sind vor allem als Antibiotika oder Wirkstoffe der Krebstherapie in Gebrauch oder Entwicklung. Concanamycin A (Con-A), ein 1981 erstmals beschriebenes, aus dem Göttinger Naturstoffscreening hervorgegangenes Beispiel eines in Struktur und Wirkung interessanten Polyketides, wird von uns zusammen mit der Arbeitsgruppe S. Grond (Universität Göttingen) untersucht. Concanamycin A ist ein starker Inhibitor von V-Typ ATPasen (Abb. 1), die eine wichtige Rolle beim Abbau von Knochenmaterial spielen. Dieser Abbau ist bei Osteoporose-Patienten verstärkt. Ein Einsatz von Concanamycin A führt zur Inhibierung dieses Abbauprozesses und somit kann Con-A zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden. Das natürliche Biosyntheseendprodukt hat jedoch noch toxische Nebenwirkungen, so dass ein Einsatz als Medikament zur Zeit noch nicht möglich ist. Durch die Aufklärung der Biosynthese auf Basis der DNA-Sequenz des Concanamycin A (*con*) –Biosynthesegenclusters sollen Möglichkeiten zur Modifizierung und Verbesserung der Verträglichkeit erarbeitet werden.

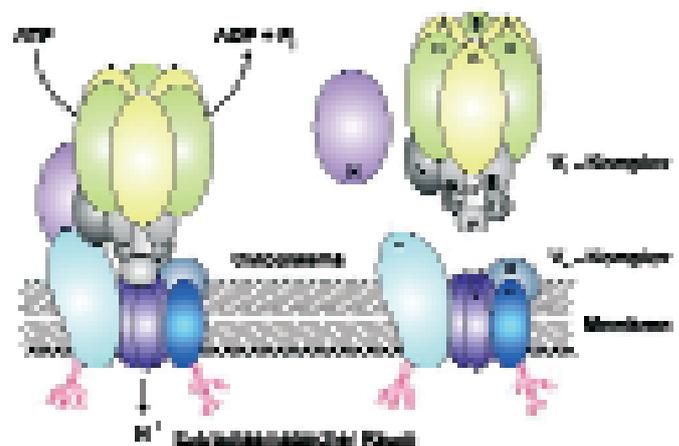
Concanamycin A (Abb. 2) wird von dem Stamm *Streptomyces* sp. Gö22/15 produziert, der daher ins genomische Screening des Actinomyceten-Netzwerks im Rahmen des GenoMik-Verbundprojektes einbezogen wurde. Der endständige Zucker des Con-A (s. Abb. 2), eine 2,6-Dideoxy-4-O-carbamoylglucose, stellt eine neue Modifikation ("Garnitur") durch chemische Gruppen in komplexen Naturstoffen dieses Typs (Makrolide; Typ1 Polyketide) dar und ist möglicherweise, wie bei vielen anderen glykosylierten Wirkstoffen, auch für das Wirkprofil entscheidend. Daher eignen sich solche Glykosylreste aus mehreren Gründen für biokombinatorische Ansätze, d.h. die biochemische Veränderung bekannter Wirkstoffe, insbesondere anderer makrozyklischer Polyketide wie etwa den weltweit pharmazeutisch

oder landwirtschaftlich verwendeten Erythromycin, Avermectin und Polyenmakroliden. In dem Polyketidanteil von Concanamycin A fallen zudem zwei „ungewöhnliche“ C2-Einheiten auf. In der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners (S. Grond, Universität Göttingen) konnte mittlerweile gezeigt werden, dass diese C2-Einheit ausgehend von Glycerin-3-Phosphat synthetisiert wird. Dies ist in den Biosynthesen von Polyketiden eher eine Ausnahme, da die Polyketidsynthasen normalerweise Carbonsäuren wie Acetat, Butyrat oder Propionat in aktivierter Form als Vorstufen verwenden.

Zur Identifizierung der Biosynthesegene wurden in unserer Arbeitsgruppe Gensonden entwickelt. Diese sollten spezifisch jene Gene detektieren, welche für die Enzyme kodieren, die die Synthese und Modifikation des Zuckers katalysieren. Im Falle des Concanamycin A Genclusters gelang die Identifikation mit einer neuen DNA-Sonde, die das Gen für die Carbamoyltransferase (*conN*-Gen) identifizierte. Mit dem so identifizierten Gen *conN* wurde dann eine Cosmidgenbank des Stammes *Streptomyces* Gö22/15 nach den Cosmiden durchforstet, welche die entsprechen-

den genomischen Regionen des Genclusters enthielten. Mittlerweile wurden von vier überlappenden Cosmiden die klonierte DNA (ca. 90.000 Basenpaare) sequenziert und damit das Gencluster fast komplettiert. Lediglich die DNA-Informationen der ersten drei PKS-Module fehlen noch und werden gerade identifiziert. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse erbrachten, dass die spezifischen Gene für die "Garnierungs"-Reaktionen am Con-A Molekül auf einem gemeinsamen Subcluster neben den Polyketidsynthase-Genen liegen und für folgende Funktionen (in der genannten Reihenfolge) kodieren: dTDP-2,6-Dideoxyglucose Glycosyltransferase (ConO), dTDP-6-Desoxyhexose 2,3-Dehydratase (ConF), dTDP-3,4-Keto-6-desoxyhexose 2,3-Reduktase (ConG), dTDP-4-Keto-2,6-dideoxyhexose 4-Ketoreduktase (ConH), dTDP-2,6-Dideoxyglucose 4-Carbamoyltransferase (*conN*), dTDP-Glucose Synthase (ConD), dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase (ConE). Zudem folgen in diesem Subcluster noch Gene für eine Transposase (ConT), eine O-Methyltransferase (ConM, benötigt für die O-Methylierung des Macrolidgerüsts nahe der „ungewöhnlichen“ C2-Einheit, Abb. 1), eine Thioesterase (ConB), eine

Abb. 1 Modell von V-Typ-ATPasen, dem Angriffspunkt von Concanamycin A



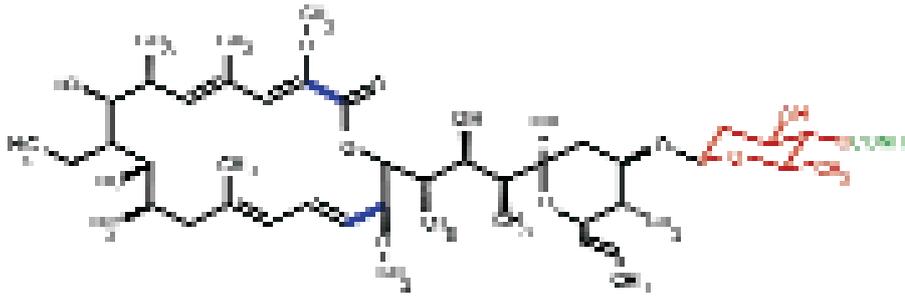


Abb. 2 Struktur von Concanamycin A. Die „ungewöhnliche“ C2-Einheit ist in blau hervorgehoben, der Zucker in rot, die daran angefügte Carbamoylgruppe grün

unbekannte Funktion (ConX), eine Phospho-panthetheinyltransferase (ConI) und einen möglichen Regulator (ConR). In der postulierten Biosynthese des Con-A wird zuerst das Makrolidgerüst mit Hilfe der Polyketidsynthasen (13 PKS-Module) synthetisiert, parallel dazu, ausgehend von Glucose-1 Phosphat, der Desoxyzucker, anschließend wird der Zucker an das Makrolidgerüst übertragen und danach erfolgt die Carbamoylierung. Auf der Basis dieser neuen Erkenntnisse kann nun z.B. durch Ausschalten des in der Biosynthese spät benutzten Gens *conN* das ebenfalls aktive Con-C (Descarbamoyl-Concanamycin A) hergestellt werden, dem die Carbamoylgruppe fehlt. Eine Übertragung des *conN* Gens oder des gesamten Subclusters *conOFGHNDE* auf Bakterienstämme, die andere ähnliche Metabolite produzieren, würde so zu völlig neuen Wirkstoffklassen führen können, wenn der Zucker auf diese Wirkstoffe übertragen wird. Da die hierfür benötigten Gene auf einem isolierten Cosmid zusammen kloniert vorliegen, sind diese Ansätze relativ einfach durchführbar. Sowohl die H₂NCOO-Gruppe (O-Carbamoylierung; ConN) als auch die Beseitigung des Sauerstoffs in Position 2 (2-Desoxygenierung; ConDEFGH) des Zuckerbestandteils sind dabei wertvolle neue Handwerks-

zeuge, die auch für die Modifikation anderer Wirkstoffe eingesetzt werden könnten. Da Carbamoylgruppen durch ihre starke chemische Ladung die Eigenschaften eines Moleküls stark beeinflussen, kann die Carbamoyltransferase auch für Modifikationen anderer Wirkstoffe eingesetzt werden, vorausgesetzt, das Enzym erkennt andere Wirkstoffe als Substrat. Um die Zugänglichkeit der Carbamoyltransferase und anderer nutzbarer Modifikationsenzyme zu ermöglichen, werden diese Proteine heterolog überproduziert und biochemisch charakterisiert.

Zusammenfassend können wir feststellen, dass ohne die erworbenen Kenntnisse aus den ersten Phasen der GenoMik-Projekte die jetzt begonnenen Arbeiten nicht möglich wären. Die gewonnenen Sequenzinformationen erlauben uns nun gezielte Wirkstoffmodifikationen, die Ergebnisse lassen sich auf andere Wirkstoffe in der Zukunft übertragen.

Kontakt

PD Dr. Udo Wehmeier
 Bergische Universität Wuppertal
 Fachbereich C, Chemische Mikrobiologie
 E-Mail: wehmeier@uni-wuppertal.de

Mikroben mit Mega-Genom: multizelluläre Lebensweise, biologisch aktive Naturstoffe und 10.000 Gene bei Myxobakterien

Rolf Müller

Myxobakterien unterscheiden sich in einer Vielzahl von Eigenschaften von dem, was man typischerweise von Bakterien erwartet. Sie bewegen sich gleitend in Schwärmen über ebene Oberflächen und scheiden diverse Enzyme aus, mit denen sie Nahrungsquellen aufschließen. Myxobakterien können sogar als „Raubbakterien“ andere Mikroorganismen abtöten und „auffressen“. Am auffälligsten jedoch ist ihre Eigenschaft, unter Hungerbedingungen so genannte multizelluläre Fruchtkörper zu bilden, von denen einige Zellen in Dauerformen umgewandelt werden, den Myxosporen. Die zum Teil baumartigen Fruchtkörper können mehrere 100 µm groß sein und werden aufgrund ihrer Formvielfalt zur Klassifizierung der Bakterien herangezogen (siehe Abbildung 1). Die meisten Vertreter dieser ungewöhnlichen Gram-negativen Bakterien werden aus Bodenproben, morschem Holz, Tierdung, Kompost oder von Baumrinden isoliert.

Weil sie so viele biologisch aktive Substanzen produzieren können, darunter Antibiotika und potenzielle Krebstherapeutika, sind Myxobakterien für den Menschen überaus nützlich. So konnten bereits rund 100 Naturstoffe mit etwa 500 Strukturderivaten aus Myxobakterien isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Manche dieser Substanzen zeigen neue und überaus interessante Wirkmechanismen und einige myxobakterielle Wirkstoffe befinden sich wegen ihrer viel

versprechenden therapeutischen Eigenschaften bereits in klinischen Testphasen.

Bemerkenswert sind myxobakterielle Naturstoffe, die mit dem Tubulin- oder dem Aktinskelett eukaryontischer Zellen interagieren. Sie wirken ähnlich wie die Pflanzensekundärstoffe und Krebsmedikamente Taxol® oder Vinblastin. Während Tubulysin und Disorazol derzeit noch in präklinischen Studien untersucht werden, befindet sich ein semisynthetisches Derivat des myxobakteriellen Naturstoffs Epothilon bereits in klinischer Phase III als Krebsmedikament. Darüber hinaus produzieren Myxobakterien auch eine Reihe von antibiotisch und fungizid wirksamen Substanzen. Die Bedeutung dieser Wirkstoffgruppe kann vor dem Hintergrund der brisanten Resistenzproblematik und dem Auftreten neuer und wiederkehrender Infektionskrankheiten in unseren Krankenhäusern kaum hoch genug eingeschätzt werden.

Die genannten Eigenschaften machen Myxobakterien als Naturstoffproduzenten sowohl für die medizinische Forschung als auch für den Einsatz in der Biotechnologie überaus wertvoll. Etwa 80% der klinisch verwendeten Antibiotika und der Krebstherapeutika basieren auf eben solchen Naturstoffen, die meist aus Bakterien, Pilzen oder Pflanzen gewonnen werden.

Im Rahmen der GenoMik Förderinitiative des BMBF wird derzeit in einer Zusammenarbeit der Universität Bielefeld mit der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig und der Universität des Saarlandes ein funktionales Genomprojekt des Modell-Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56 durchgeführt. Bislang kennt man etwa 2500 Isolate von *S. cellulosum*, die für die Produktion von etwa der Hälfte aller bekannten myxobakteriellen Naturstoffe, wie eben Epothilone und Disorazole, verantwortlich sind. Durch das Genomprojekt wird nun ein umfassendes Verständnis der Biologie dieser Organismen ermöglicht. So besitzt *S. cellulosum* nicht nur das bei weitem größte bekannte bakterielle Genom, sondern auch eine wesentlich höhere genetische Kapazität zur Naturstoff-Bildung als bislang ausgenutzt wird. Die bisherigen Arbeiten ergaben, dass *S. cellulosum* So ce56 mehr als

10.000 Gene besitzt (was in etwa der Zahl der Gene der Fruchtfliege und ungefähr einem Drittel der Zahl der Humangene entspricht!). Mit mehr als 13 Millionen Basenpaaren ist das Genom etwa viermal so groß wie das eines typischen Bakteriums. Dies spiegelt die Komplexität des Organismus wider und entsprechend vielfältig sind die Regulationsmechanismen, die interessanterweise häufig denjenigen sehr ähneln, die man allgemein als typisch für Eukaryonten erachtet. Ebenfalls erstaunlich groß ist die Zahl der Gene, die an der Bildung von Naturstoffen beteiligt sind.

Zielsetzung der anstehenden Untersuchungen ist die Herstellung neuer oder veränderter Naturstoffe sowie die Produktionsoptimierung mit Hilfe von genetischen Methoden. Genom-, Transkriptom- und Proteomanalytik werden etabliert, um die der Naturstoff-Produktion zugrundeliegenden genetischen und biochemischen Prozesse in den Produzenten detailliert zu analysieren. Die beteiligten Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit den molekularen Mechanismen, die den geschilderten Phänomenen zugrunde liegen, um die Bildung und die Regulation der Biosynthese von Naturstoffen in Myxobakterien zu optimieren.

Literatur

1. Reichenbach, H. (1999) *The ecology of the myxobacteria*. *Environ. Microbiol.*, 1:15-21.
2. Reichenbach, H., and Höfle, G. (1999) *Myxobacteria as producers of secondary metabolites in Drug discovery from nature* (Eds.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Berlin, pp. 149-179.
3. Gerth, K., et al. (2003) *Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus Sorangium.*, *J. Biotechnol.* 106:233-253.
4. Bode, H. B. and Müller, R. (2005) *The impact of bacterial genomics on natural product research*. *Angew. Chem. Int. Ed. in press.*

Kontakt

Prof. Dr. Rolf Müller
Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
 E-Mail: rom@mx.uni-saarland.de

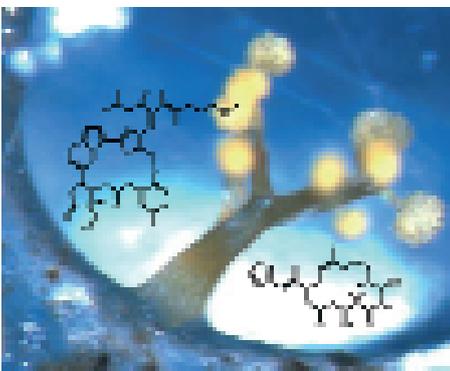


Abb. 1: Fruchtkörper von *Chondromyces crocatus* mit Strukturen des Fungizids Leupyrrin (links) und des Cytostatikums Epothilon (rechts; Foto: K. Gerth)

GenoMik-Kompetenznetzwerk Göttingen

BiotechGenoMik auf dem Weg ins fünfte Jahr seiner Arbeit



Das GenoMik-Kompetenznetzwerk „Genomforschung an Bakterien für die Analyse der Biodiversität und die Nutzung zur Entwicklung neuer Produktionsverfahren“ mit dem Zentrum an der Georg-August-Universität Göttingen wurde im Sommer 2001 gegründet. Da sein Titel zwar zutreffend, aber sehr lang ist, nennen wir es jetzt „BiotechGenoMik“; darunter sind zur Zeit 22 Projektgruppen angesiedelt, die an 12 Universitäten bzw. Forschungszentren arbeiten. Es war und ist das Ziel von BiotechGenoMik, Mikroorganismen zu untersuchen, die für biotechnische Produktionsprozesse interessant sind bzw. interessant zu werden versprechen. Darüber hinaus war und ist es das Ziel, wenigstens einen Teil der biotechnisch interessanten Schätze zu heben, die nicht über kultivierbare Mikroorganismen zugänglich sind und nur über Genbibliotheken direkt aus der Natur erfasst und untersucht werden können.

In den ersten Jahren des Bestehens von BiotechGenoMik standen Erfolge in der vollständigen Sequenzierung von Genomen z.B. von *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Picrophilus torridus*, *Gluconobacter oxydans* und *Ralstonia eutropha* im Vordergrund. Indem diese Sequenzen genutzt und DNA-Microarrays verfügbar wurden sowie bestimmte Enzymsysteme in Kenntnis der Sequenz isoliert und untersucht werden konnten, verschob sich das Spektrum herausragender Resultate, und ein Beleg dafür sind die Highlights aus der Arbeit von BiotechGenoMik, die hier präsentiert werden. Sie dokumentieren, dass der Weg von der Genomsequenz zum Produkt, freilich über eine Reihe von Schritten, der Richtige ist. Mit den heutigen Möglichkeiten der bioinformatischen Analyse von Sequenzen lässt sich das für eine Mikroorganismenart charakteristische Eigenschafts- und Leistungsprofil beschreiben und für experimentelle Vorgehensweisen mit dem Ziel der Verbesserung und Entwicklung von Produktionsorganismen nutzen.

Funktionelle Genomanalyse bedeutet Kooperation, da ein ganzes Spektrum von analytischen, biochemischen, physiologischen und bioinformatischen Methoden zur Anwendung kommen muss, um die erforderlichen Daten zu gewinnen. Es wird als ein großer Vorteil gewertet, dass sich innerhalb von BiotechGenoMik eine Reihe von sehr produktiven Kooperationen entwickelt hat. So fließen die erwähnten Methoden zusammen, bei der Bearbeitung von *Bacillus licheniformis* durch Arbeitsgruppen in Greifswald, Göttingen und Düsseldorf; das aus drei Replikons bestehende Genom von *Ralstonia eutropha* wird in Berlin, Göttingen und Münster bearbeitet; Arbeitsgruppen in Berlin, Göttingen und Jülich dringen in die vielfältigen Oxidationsgeheimnisse von *Gluconobacter oxydans* ein; die Folgen der extremen Säuretoleranz von *Picrophilus torridus* für die Beschaffenheit seiner Proteine werden in Hamburg-Harburg und Göttingen ermittelt. So können Fragenstellungen, wie beispielsweise die zur Regulation der Proteinsekretion durch eingehende Analyse der Genomsequenz verbunden mit Transkriptions- und Proteomprofilen beantwortet werden. Entsprechende Untersuchungen werden an kontinuierlich wachsenden Kulturen bzw. solchen, die möglichst industrienahe im Batch-Verfahren gezüchtet werden, durchgeführt.

In den 80er Jahren erfuhren Prozesse wie die Aceton-Butanol-Gärung, die in Ländern mit hoher Maisstärke-Produktion bis 1945 in großem Umfang zur Versorgung der chemischen Industrie mit Ausgangsmaterialien beigetragen hatte, eine Renaissance. Trotz erheblicher Fortschritte im Verständnis dieser Prozesse und bei ihrer Optimierung konnten sie im Licht der damaligen Rohölpreise nicht auf eine wirtschaftlich vertretbare Grundlage gestellt werden. Angesichts einer Verdopplung der Rohölpreise kann man jetzt an ein „zurück zur Zukunft“ denken. In diesem Zusammenhang

wird der Entwicklung eines Prozesses zur Herstellung von Butanol aus billigem Synthesegas große Bedeutung beigemessen, weil dadurch die Tür geöffnet werden könnte, auch an die Weiterentwicklung von Prozessen auf Maisstärkebasis zu denken. Die hier zu lösenden Probleme sind andere als die für die Produktion von Enzymen, biologisch abbaubaren Polymeren oder unvollständigen Oxidationsprodukten, die oben erwähnt wurden. Sie sind aber ein wichtiger Bereich innerhalb von BiotechGenoMik, das sich eben noch mit anderen Problemen auseinandersetzen hat als der funktionellen Genomanalyse, so beispielsweise mit der Auffindung von Bakterien mit einer hohen Toleranz gegenüber Kohlenmonoxid.

Schließlich wäre unser Netzwerk BiotechGenoMik nicht umfassend genug, wenn wir den Teil mikrobieller Komplexität ausgeklammert ließen, der sich nicht durch Isolierung und Kultur von Mikroorganismen erschließen lässt. Durch Metagenomik kann man in das Unbekannte vorstoßen; man muss jedoch das richtige Methodenrepertoire anlegen, um an Produkte zu kommen, auf die gewartet wird, oder an solche, die gegenüber verfügbaren Produkten Vorteile besitzen. Hier liegt ein großes Entwicklungspotenzial, das bei einer Fortsetzung der GenoMik-Initiative in Form von GenoMik-Plus noch größeres Gewicht erhalten soll.

Wir hoffen, dass unsere diesjährigen Highlights Ihr Interesse finden.

Kontakt

Prof. Dr. Gerhard Gottschalk,
Kordinator von BiotechGenoMik
BiotechGenoMik Netzwerk Göttingen
Institut für Mikrobiologie und Genetik
Georg-August-Universität Göttingen
Grisebachstr. 8, 37077 Göttingen
Internet: www.genomik.uni-goettingen.de

Gene, die als Marker für Stress dienen, helfen, die Effizienz des Waschmittelenzym-Produzenten *Bacillus licheniformis* zu steigern

Michael Hecker, Thomas Schweder, Birgit Voigt, Le Thi Hoi, Britta Jürgen, Karl-Heinz Maurer, Stefan Evers, Armin Ehrenreich, Gerhard Gottschalk

Das Bakterium *Bacillus licheniformis* ist einer der wichtigsten Produktionsorganismen der so genannten „weißen Biotechnologie“. Er wird weltweit als Stamm für die Herstellung extrazellulärer Enzyme, insbesondere Proteasen und Amylasen, eingesetzt. Für die industrielle Produktion von Enzymen werden an einen Wirtstamm sehr hohe Anforderungen gestellt: Er soll hohe Enzymausbeuten in kurzen Fermentationszeiten liefern und dabei auf möglichst kostengünstigen Nährmedien wachsen. Er sollte Enzyme in großen Mengen ins Medium sekretieren können. Zudem sollten wenig störende Nebenprodukte wie andere extrazelluläre Enzyme, Toxine oder Schleimstoffe gebildet werden. Als Produktionsorganismus kommt *B. licheniformis* diesen Anforderungen sehr nahe. Die funktionelle Genomanalyse wird dazu beitragen, die Produktivität dieses bedeutenden industriellen Mikroorganismus weiter zu verbessern sowie neue Verfahren zu etablieren. Um die physiologischen Vorgänge während der industriellen Fermentation von *B. licheniformis* auf molekularer Ebene umfassend charakterisieren zu können, war die Entschlüsselung der Genomsequenz durch die Göttinger Gruppe von entscheidender Bedeutung (1).

Diese Sequenzinformation dient nun als Grundlage für die funktionelle Genomanalyse in Greifswald, die in enger Kooperation mit der Göttinger Arbeitsgruppe sowie der Henkel KGaA durchgeführt wird. So wurde in Göttingen ein DNA-Microarray hergestellt, mit dem man die Transkription von 95% aller in der Genomsequenz von *B. licheniformis* annotierten Gene unter verschiedensten Bedingungen messen kann. Die Göttinger Gruppe konzentriert sich auf Untersuchungen zu prozessrelevanten Eigenschaften des Energie- und Zentralmetabolismus von *B. licheniformis*, der sich in einigen wichtigen Aspekten vom Stoffwechsel des gut untersuchten Modellorganismus *B. subtilis* unterscheidet: So kann *B. licheniformis*

die Endprodukte der für diese Organismen charakteristischen unvollständigen Oxidation von Glucose – Acetat und 2,3-Butandiol – in einer zweiten Wachstumsphase verwerten. Außerdem kann dieser Organismus fermentativ unter anaeroben Bedingungen gut wachsen. Diese Eigenschaften könnten entscheidend für die gute Kultivierbarkeit von *B. licheniformis* in Hoch-Zelldichte-Fermentationen sein.

In der Greifswalder Arbeitsgruppe wurden mit Hilfe der Proteomanalyse über die zweidimensionale Gelelektrophorese kombiniert mit MALDI-ToF Massenspektrometrie zunächst Grundzüge des Stoffwechsels von *B. licheniformis* unter verschiedenen Modellbedingungen sowie unter Fermentationsbedingungen analysiert. Diese dadurch erhaltenen Untersuchungen unterstreichen, dass das Wissen um das Erbgut zwar zeigt, was die Zellen prinzipiell leisten können, die Techniken der funktionellen Genomuntersuchungen dagegen

sichtbar machen, was physiologisch in den Zellen wirklich passiert. Der Greifswalder Gruppe gelang es im Verlauf ihrer Proteom-Untersuchungen mehr als 500 Proteine der wachsenden Zellen zu identifizieren, unter ihnen die Mehrzahl der Enzyme, die an den grundlegenden metabolischen Routen beteiligt sind. Damit konnten viele Enzyme und Stoffwechselverläufe, die bereits auf der Genomsequenz basierend postuliert wurden, bestätigt werden. Die umfassende Proteominformation macht es möglich, die Stoffwechselforgänge und ihre Regulation vollständiger metabolischer Sequenzen in ihrer Gesamtheit zu studieren, was modellhaft für die Regulation der Glykolyse und des Tricarbonsäurecyclus (TCC) erfolgreich abgeschlossen wurde (2).

Im Mittelpunkt des Interesses der Greifswalder Gruppe stehen die Identifizierung und detaillierte Analyse von prozesskritischen Markergenen. Prozesskritische Situationen

Abb. 1: Color coding Image (Delta2D, www.decodon.de) des extrazellulären Proteoms von *B. licheniformis* unter Phosphat-, Glukose- und Stickstoff-Hungerbedingungen (aus Voigt et al., 2005).



können beispielsweise durch Nährstofflimitationen (z.B. Sauerstoff-, Stickstoff-, oder Phosphatmangel) sowie Sekretionsstress bzw. physikalische Stressbedingungen (z.B. Hitzestress, oxidativer oder osmotischer Stress) ausgelöst werden. Durch die Kombination von Proteomics und Transkriptomanalyse kann die Gesamtheit der Gene identifiziert werden, die spezifisch durch ein bestimmtes Umweltsignal reguliert werden. Dieser umfassende Blick auf die Physiologie der Zellen erlaubt es, die Gene/Proteine herauszufiltern, die als Indikatoren für prozesskritische Situationen dienen könnten. Diese Gene/Proteine bezeichnen wir als Markergene oder -proteine. In Abbildung 1 sind potentielle extrazelluläre Markerproteine von *B. licheniformis* für drei ausgewählte Nährstofflimitationen farblich dargestellt (3).

Die Kenntnis dieser Markergene bzw. -proteine erlaubt nun eine bessere Überwachung von industriellen Fermentationsprozessen. Durch den Einsatz geeigneter Analysemethoden können prozesskritische Situationen wie z.B. Nährstofflimitationen in dem Fermentationsprozess schnell erkannt werden. Allerdings muss dann durch Änderung der Fermentationsbedingungen zeitnah darauf reagiert werden. Elektrische DNA-Chips, die mit Sonden für prozesskritische Gene beladen sind (4), könnten in Zukunft für derartige Prozesskontrollen eingesetzt werden (5). Darüber hinaus ist die Identifizierung von streng regulierten Markergenen mit starken Promotoren für die Entwicklung neuer Expressionssysteme für *B. licheniformis* von Interesse.

Literatur

1. Veith et al. (2004) *The complete genome sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential.* *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7: 204-211
2. Voigt et al. (2004) *A proteomic view of cell physiology of Bacillus licheniformis.* *Proteomics* 4: 1465-1490
3. Voigt et al. (2005) *The extracellular proteome of Bacillus licheniformis grown in different media and under different nutrient starvation conditions.* *Proteomics, (im Druck)*
4. Jürgen et al. (2005) *Application of an electrical DNA-chip for the expression analysis of bioprocess-relevant marker genes of Bacillus subtilis.* *Biotechnol. & Bioengin. (im Druck)*
5. Feesche et al. (2003) *DNA chips used for bioprocess control.* *PCT/EP2003/009979*

Kontakt

Prof. Dr. Thomas Schweder und
Prof. Dr. Michael Hecker
[Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald](http://www.uni-greifswald.de)
E-Mail: schweder@uni-greifswald.de

Dünger aus Mikroben – Gene in *Bacillus amyloliquefaciens* entdeckt, die Pflanzen besser wachsen lassen

Rainer Borriss

Bakterien der Gattung *Bacillus* können durch Bildung von resistenten Sporen auch unter ungünstigen Bedingungen in der Umwelt nahezu unbegrenzt überdauern und sind in großer Zahl im Boden und in der pflanzlichen Wurzelzone verbreitet. Durch die Sekretion extrazellulärer Enzyme können sie sich auch makromolekulare Nährstoffe (Kohlenhydrate, Proteine) außerhalb der Zelle erschließen; durch die Produktion antibakterieller und antifungalier Wirkstoffe werden konkurrierende Mikroorganismen unterdrückt. Diese „natürlichen“ Eigenschaften werden von der Industrie für die Produktion wirtschaftlich wichtiger Exoenzyme (Proteasen, Amylasen, Glucanasen), Antibiotika und Vitamine genutzt.

In dem letzten Jahrzehnt wurden *Bacillus*-Stämme entdeckt, die sowohl das Wachstum von Nutzpflanzen („plant growth promotion“) als auch die pflanzlichen Abwehrreaktionen gegen phytopathogene Organismen („induzierte Systemresistenz“) fördern (Abb. 1).

So werden heute langlebige Sporenpräparate, z.B. von *Bacillus amyloliquefaciens*, mit Erfolg für die Ertragssteigerung im Gemüse- und Gartenbau sowie für Kartoffeln, Getreide und andere landwirtschaftliche Nutzpflanzen

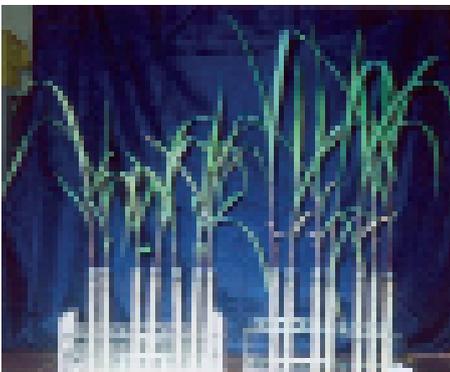


Abb. 1: Pflanzenwuchsfördernder Effekt von *Bacillus*-Stämmen: Wachstum von Maiskeimlingen ohne (links) bzw. mit (rechts) Kulturfiltrat von *B. amyloliquefaciens*

eingesetzt. Der ökologische Vorteil dieser biologischen Formulierungen, die die Einsparung beträchtlicher Mengen chemischer Dünger sowie von Herbiziden und Insektiziden erlaubt, ist offensichtlich. Heute erlebt der Einsatz derartiger Präparate in der Landwirtschaft, insbesondere in den U.S.A., einen regelrechten Boom. Leider sind die komplexen, molekularen Mechanismen, die diese Effekte in der Bakterienzelle regulieren, immer noch wenig verstanden. Ausgehend von einer strukturellen Genomanalyse gibt uns heute die Anwendung des von der Genomforschung entwickelten Methodenspektrums die Möglichkeit, die globalen Reaktionsnetze zellulärer Antworten in ihrer Gesamtheit zu untersuchen. Auf dieser Basis können neue hochproduktive Stämme für den jeweiligen Anwendungszweck entwickelt werden.

Die Genomsequenz des direkt aus der pflanzlichen Wurzelzone isolierten *Bacillus amyloliquefaciens*-Stammes, der mit Erfolg für die Förderung des Pflanzenwachstums eingesetzt wird, wurde mit der bekannten Sequenz eines verwandten „Modell“-Organismus, *Bacillus subtilis* 168, der seit ca. 150 Jahren im Labor kultiviert wird, verglichen. Es zeigte sich, dass das genetische Potential des „Wildisolats“ dem des Laborstammes überlegen ist. So wurden im *B. amyloliquefaciens*-Genom große DNA-Bereiche identifiziert, die für die Produktion von antifungalen und antibakteriellen Wirkstoffen verantwortlich und nicht im – möglicherweise „degenerierten“ – Laborstamm anzutreffen sind. Beispielsweise produziert *B. amyloliquefaciens* die cyclischen Lipopeptide Bacillomycin D und Fengycin, die Pflanzen vor phytopathogenen Pilzen in der Wurzelzone schützen (1), fördert durch die Synthese des Pflanzenhormons Indol-3-Essigsäure das Pflanzenwachstum (2) und erlaubt durch die Sekretion einer spezifischen Phosphatase („Phytase“) die Erschließung neuer Nährstoffquellen (3).

Die Verfügbarkeit der kompletten Genomsequenz erlaubt die Identifizierung aller an der Exoenzym-Synthese und der für die Interaktion mit der pflanzlichen Rhizosphäre beteiligten Wirkstoffe und ebnet damit den Weg für die Optimierung von hochproduktiven *Bacillus*-Produktionsstämmen. Ein besonderer Vorteil des untersuchten *B. amyloliquefaciens* Stammes ist seine Fähigkeit, DNA auf natürlichem Wege aufzunehmen („Kompetenz“), eine Eigenschaft, die nicht nur die funktionelle Analyse mit Gen-„knock-out“-Mutanten ermöglicht, sondern auch die Etablierung eines Methodenspektrums für die weitere Untersuchung der komplexen Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Wurzelbakterien in einer Weise erlauben wird, wie es exemplarisch für die bakterielle Grundlagenforschung mit den Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* seit Jahrzehnten existiert.

Literatur

1. Koumoutsis et al. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* 186: 1084-1096
2. Idris et al. (2004) Screening and detection of plant-growth promoting substances produced by *Bacillus subtilis*/*Bacillus amyloliquefaciens*. *Plant Disease Protection* 111: 583-597
3. Idris et al. (2002) Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097-2109

Kontakt

Prof. Dr. Rainer Borriss
Institut für Biologie
Humboldt-Universität Berlin
E-Mail: rainer.borriss@rz.hu-berlin.de

„Made by *Ralstonia*“ – Entwicklung neuer Produktionsstämme für eine auf Wasserstoff basierende Biotechnologie

Botho Bowien, Bärbel Friedrich und Alexander Steinbüchel

Der Einsatz von Wasserstoff (H_2) als umweltfreundlicher Energieträger wird gegenwärtig intensiv vorangetrieben. H_2 kann nicht nur im technischen Bereich verwendet werden, wie etwa in Synthesegas oder als alternativer Kraftstoff für Fahrzeuge, sondern ist auch eine hervorragende Energiequelle für viele Mikroorganismen. So kann eine Vielzahl autotropher Bakterien diese Energie zur Assimilation von Kohlendioxid (CO_2) als alleinige Kohlenstoffquelle zum Aufbau ihrer Biomasse nutzen. Das Gramnegative, fakultativ chemolitho-autotrophe Bakterium *Ralstonia eutropha* Stamm H16 ist einer der am besten untersuchten Organismen

aus der Gruppe dieser sogenannten Knallgasbakterien. Es oxidiert H_2 in Gegenwart von Sauerstoff, wobei unterschiedliche Hydrogenasen für die Aktivierung des Gases verwendet werden. Ähnlich wie in Pflanzen und Algen wird CO_2 über die Reaktionen des Calvin-Benson-Bassham (CBB)-Cyclus fixiert. Neben H_2 - CO_2 verwertet es auch eine Fülle organischer Substrate als Kohlenstoff- und Energiequellen. Nicht zuletzt hat es sich über die mittlerweile mehr als vier Jahrzehnte seiner wissenschaftlichen Erforschung als physiologisch äußerst flexibel und robuster Organismus erwiesen. Biotechnologisch ist *R. eutropha* H16 bereits als

Produzent von Polyhydroxyalkanoaten (PHA) etabliert. Diese thermoplastischen Polyester werden als Speicherstoff in den Zellen angehäuft und liegen dort in Form von Granula vor. PHA finden als biokompatible und biologisch abbaubare Plastikstoffe in der Medizin und als Verpackungsmaterial Verwendung, wenn auch gegenwärtig aus Kostengründen in noch sehr geringem Umfang.

Die Perspektiven für eine weitergehende biotechnologische Nutzung von *R. eutropha* H16 sind somit vielversprechend. Zu deren grundsätzlicher Einschätzung wurde die Genomsequenzierung des Organismus im Rahmen des BMBF-Förderprogramms "Genomforschung an Mikroorganismen", Kompetenznetzwerk Göttingen (BiotechGenoMik), in Zusammenarbeit mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse (Leiter: Prof. Dr. Gerhard Gottschalk) durchgeführt. Sie hat zum Ziel, biotechnologische Anwendungen dieses Stammes auf eine rationale genetische Grundlage zu stellen. Davon ausgehend soll das physiologische Gesamtpotential von *R. eutropha* H16 neu bewertet werden.

Ein besonderes Augenmerk zukünftiger Anwendungen des Stammes wird auf der Produktion weiterer Biopolymere wie Cyanophycin, Polyglutamat und Polyaspartat sowie von Metaboliten wie organischen Säuren und Aminosäuren liegen, die für die chemisch-pharmazeutische Industrie von Interesse sind (AG

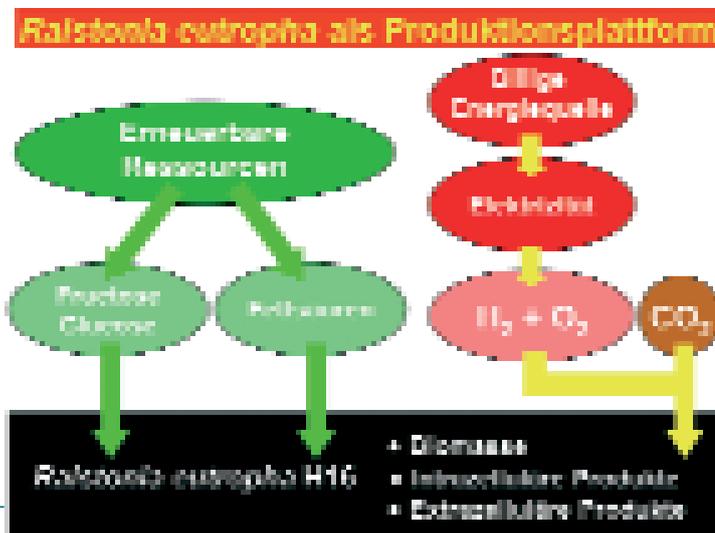


Abb. 1: Konversion von nachwachsenden Rohstoffen und von Wasserstoff mit Hilfe von *R. eutropha* H16 als Produktionsplattform.

Steckbrief: *Ralstonia eutropha* H16 (β -Proteobacteria, Familie Burkholderiaceae)

Das Genom des Stammes hat eine Größe von 7,45 Mb und besteht aus drei sich unabhängig voneinander replizierenden, ringförmigen DNA-Molekülen (1). Die Sequenz des kleinsten Replikons, des Megaplasmids pHG1 (0,452 Mb), wurde bereits aufgeklärt (2). Das Megaplasmid ist für die Lithoautotrophie des Organismus mit H_2 essentiell, weil darauf seine Hydrogenasen codiert sind. Außerdem trägt es Gene des CBB-Cyclus sowie Gene für die anaerobe Respiration und die Reduktion von Ribonucleotiden (2, 3). Nahezu alle Gene des Grundstoffwechsels befinden sich auf Chromosom 1 (4,1 Mb). Dagegen codiert Chromosom 2 (2,9 Mb) vor allem zusätzliche Stoffwechsellösungen und hat damit eher Plasmidcharakter. Es weist Duplikationen der Genregionen des CBB-Cyclus und der Nitratreduktion auf.



Abb. 2: Bioreaktor (500 L-Fermenter) im Biotechnikum des Instituts für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Münster zur Anzucht von *R. eutropha*. Insert: Zelle des Stammes H16 mit eingelagerten PHA-Grana (Aufnahme: A. Steinbüchel).

Steinbüchel). Lithoautotroph kultivierte Produktionsstämme bieten die Möglichkeit, hochreine Produkte zu erhalten. Seine Lithoautotrophie macht *R. eutropha* H16 auch zu einem besonders geeigneten Organismus für Markierung und Produktion von Biomolekülen mit stabilen Isotopen (^2H , ^{13}C , ^{15}N), die zunehmend in spektroskopischen Strukturanalysen sowie bei metabolischen Untersuchungen in der Medizin zur Anwendung kommen. Der Industriepartner Silantes GmbH, München, schaffte dazu die technologischen Voraussetzungen durch die Entwicklung sicherer Fermentersysteme, die für die Anzucht von *R. eutropha* mit H_2 unter Produktionsbedingungen unerlässlich sind.

Der gegenwärtige Stand des Projekts erlaubt bereits die Identifizierung einer Reihe interessanter Gene in der Genomsequenz von *R. eutropha* H16. So wurden neue, an der Bil-

dung von PHA-Grana beteiligte Gene entdeckt, deren gezielte Kontrolle die Produktion von PHA-Grana definierter Größe ermöglichen und somit eine Chance zur Anwendung dieser Grana in der Nanotechnologie eröffnen. Auch sind an Biosynthese und Wiederverwertung von PHA ganz offensichtlich wesentlich mehr Proteine beteiligt als bisher bekannt. Dies betrifft nicht nur die Polymerisation und Depolymerisation von PHA selbst, sondern auch die Überführung von Intermediären des Zentralstoffwechsels in Substrate der PHA-Synthase. Die Kenntnisse der entsprechenden Gene ist unabdingbare Voraussetzung, um durch 'metabolic engineering' zu verbesserten Produktionsverfahren für bereits bekannte Polymere oder gar zu neuen Polymeren wie den kürzlich entdeckten Polythioestern zu gelangen (AG Steinbüchel) (4, 5). Für das Verständnis der autotrophen CO_2 -Fixierung und des allgemeinen CO_2 -Stoffwechsels in *R. eutropha* ist das Auffinden verschiedener Gene von Carboanhydrasen von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wird nach mutmaßlichen Transkriptionsregulatoren der beiden *cbb*-Operone von *R. eutropha* H16 gesucht. Gene dieser Operone codieren Enzyme des CBB-Cyclus (AG Bowien).

Bereits erfolgreich abgeschlossen wurde die Sequenzierung des Megaplasmiids pHG1, auf dem die Gene für die Synthese der drei H_2 -oxidierenden NiFe-Hydrogenasen des Organismus lokalisiert sind. Diese Hydrogenasen sind durch eine hohe Toleranz gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid gekennzeichnet. Damit besitzen sie Eigenschaften, die für den technologischen Einsatz dieser Enzyme von Bedeutung sind, z. B. für die photobiologische Produktion von H_2 und die Entwicklung einer biologischen Brennstoffzelle. Basierend auf der Sequenzbewertung wurden außerdem molekularbiologische Arbeiten zur Etablierung von Expressionssystemen und zur Stammentwicklung für geplante Produktionsverfahren durchgeführt (AG Friedrich). Darüber hinaus wurde ein Abhängigkeitssystem zur stabilen Expression von Fremdgenen in *R. eutropha* H16 bei

hohen Zelldichten entwickelt, welches auf einer Mutante mit defekter 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG)-Aldolase und einem Expressionsvektor mit intakter KDPG-Aldolase beruht (AG Steinbüchel).

Literatur

1. Schwartz et al. (2001) A physical map of the megaplasmid pHG1, one of the three genomic replicons in *Ralstonia eutropha* H16. *FEMS Microbiol. Lett.* 201: 213-219
2. Schwartz et al. (2003) Complete nucleotide sequence of pHG1. A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H_2 -based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J. Mol. Biol.* 332: 369-383
3. Bowien et al. (2002) Genetics and control of CO_2 assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* 178: 85-93.
4. Steinbüchel A. (2001) Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol. Bioscience* 1: 1-24.
5. Lütke-Eversloh et al. (2001) Biosynthesis of a new class of biopolymer: Bacterial synthesis of a sulfur containing polymer with thioester linkages. *Microbiology* 147: 11-19.

Kontakt

Prof. Dr. Botho Bowien
 Institut für Mikrobiologie und Genetik
 Georg-August-Universität Göttingen
 E-Mail: bbowien@gwdg.de

Abfallstoffe als Nahrung – Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses zur Herstellung von Butanol aus billigem Synthesegas

Peter Dürre

Der Einsatz von Fermentationen zur Synthese von Grundchemikalien, die bislang kostengünstig nur auf petrochemischer Basis herzustellen waren, eröffnet völlig neue Perspektiven. Die Abhängigkeit von Erdöl wird reduziert, und in industriellen Verfahren häufig anfallende Abfallprodukte wie Schlämme, Maischen oder auch Synthesegas werden in den Produktionsprozess zurückgeführt. Die modernen Möglichkeiten des „metabolic engineering“ erlauben es, Mikroorganismen für diese Aufgabe zu optimieren.

Die Ulmer Arbeitsgruppe erarbeitet derzeit ein biotechnologisches Verfahren zur einstufigen Erzeugung von Butanol aus Synthesegas. Dieses könnte das bisher übliche 2-stufige, chemisch-technische Verfahren zur Butanolsynthese auf Erdölbasis ersetzen (Abb. 1).

Synthesegas ist eine Mischung aus etwa gleichen Teilen Kohlenmonoxid (CO) und Wasserstoff (H₂) mit Spuren anderer Gase. Es entsteht beispielsweise aus Steinkohle oder beim Thermorecycling von Abfällen und ist ein

seit langem eingesetztes, weil in großen Mengen vorhandenes und billiges Ausgangssubstrat für viele Syntheseprozesse.

Nach aufwendigen Screening-Programmen ist es gelungen, einen anaeroben Organismus zu finden, der das hochtoxische Kohlenmonoxid im Synthesegas sehr gut als Substrat verwerten kann. In dieser Tatsache liegt aber wiederum die besondere Eleganz dieses Ansatzes: Energieaufwendige Sterilisationsprozesse wären für einen derartigen Prozess wahrscheinlich nicht notwendig, da „normale“ Mikroorganismen die eingesetzten CO-Konzentrationen nicht überleben würden. Aufschluss über die biochemischen Details, die die hohe Toleranz gegenüber CO ermöglichen, liefert die momentan im Göttinger Laboratorium für Genomanalyse durchgeführte Sequenzierung des entsprechenden bakteriellen Genoms.

Durch den Ansatz des „metabolic engineering“ wird ein Stoffwechselweg für die Synthese von Butanol konstruiert und in das CO-verwertende Bakterium eingebracht. Die

entsprechenden Arbeiten zur Übertragung und Expression des Butanolsynthese-Operons stehen kurz vor Beendigung. Parallel werden weitere Bakterien wie beispielsweise *Butyribacterium methylotrophicum* und auch Umweltgardenbanken bezüglich der Gene zur Butanolsynthese untersucht. Ziel ist es, eine Butanoldehydrogenase mit hoher Aktivität zu finden, um die Butanol-Ausbeuten in einem späteren Produktionsprozess zu steigern.

Der schnelle Transfer der entwickelten Stämme aus dem Labor in einen Produktionsprozess soll durch Kooperation mit der Firma European Oxo GmbH sichergestellt werden, die ein großes Interesse an den Möglichkeiten des Verfahrens hat.

Kontakt

Prof. Dr. Peter Dürre

*Mikrobiologie und Biotechnologie,
Universität Ulm*

E-Mail: peter.duerre@biologie.uni-ulm.de

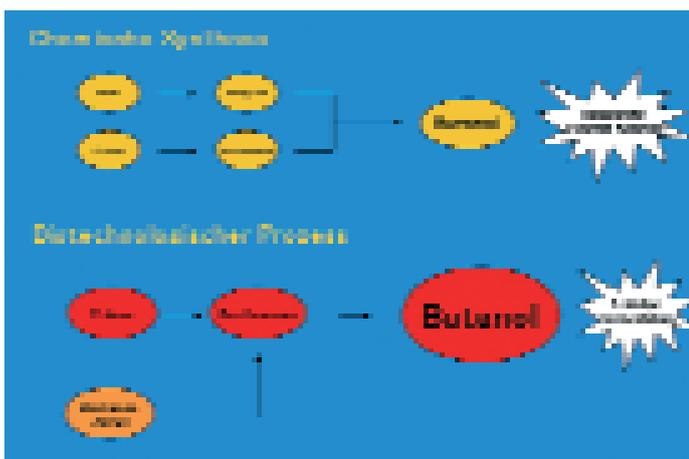


Abb. 1: Chemische und biotechnologische Butanolproduktion

Genomsequenz enthüllt das Potenzial von *Gluconobacter oxydans* für Biotransformationen

Armin Ehrenreich, Marc Hoffmeister, Birgit Veith, Tina Prust, Uwe Deppenmeier

Essigsäurebakterien wie *Gluconobacter oxydans* dienen den Menschen seit Jahrtausenden, bereits die alten Babylonier und Ägypter nutzten sie unwissentlich. Sie ließen Wein und Bier einfach offen stehen, mischten ein paar Kräuter hinzu und wie von selbst versäuerten die Getränke zu Essig. Heute weiß man, dass keinesfalls die Kräuter oder überirdische Mächte für die Verwandlung verantwortlich sind. Essigsäurebakterien sind auf pflanzlichem Material weit verbreitet, daher genügen ein paar Kräuter um die so genannte oxidative Fermentation



Abb. 1: Austretende, stark zuckerhaltige Pflanzensäfte an Früchten sowie Nektar oder der Darm von Bienen sind die typischen Habitate von *Gluconobacter*, dessen Zellen (siehe kleines Bild oben) eine charakteristische, zitronenförmige Morphologie aufweisen. Das Genom dieser Organismen (siehe kreisförmige Darstellung) codiert für eine Vielzahl von stereo- und regioselektiven Dehydrogenasen.

zuverlässig zu starten. In ihrem Verlauf wird Ethanol nicht zu Kohlendioxid sondern zu Essigsäure oxidiert – eine unvollständige Oxidation.

Die Einsatzmöglichkeiten der unvollständigen Oxidationen der Essigsäurebakterien wie *G. oxydans* beschränken sich jedoch nicht auf die Essigproduktion. Unvollständige Oxidationsprozesse von Zuckern und Alkoholen, die von *G. oxydans* durchgeführt werden, sind in der chemischen und pharmazeutischen Industrie von großem wirtschaftlichem Interesse. *G. oxydans* kann nicht nur Ethanol zu Acetat, sondern auch eine sehr große Zahl von Zuckern und anderen Polyolen regio- und stereoselektiv zu den entsprechenden Zuckersäuren oder Ketonen oxidieren. Der Organismus ist daher gleichsam als lebender, hochspezifischer Katalysator für eine unüberschaubare Zahl von Oxidationsreaktionen anzusehen. So wird *G. oxydans* inzwischen vermehrt für die Produktion von Feinchemikalien oder zur Synthese von Zwischenprodukten bei der Herstellung von Pharmazeutika eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von L-Sorbose aus D-Sorbit, das als wichtige Zwischenstufe zur Herstellung von Vitamin C verwendet wird.

Um den höchst außergewöhnlichen Stoffwechsel der Essigsäurebakterien zu verstehen und ihr ganzes Potential für Oxidationsreaktionen abschätzen zu können, wurde das Genom von *G. oxydans* durch die Arbeitsgruppe von Uwe Deppenmeier in enger Zusammenarbeit mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse vollständig sequenziert. Die Kenntnis der Genomsequenz trägt zum grundlegenden Verständnis des ungewöhnlichen Metabolismus der Essigsäurebakterien bei und ist Grundlage für eine funktionelle Genomanalyse. Darauf

aufbauend kann eine gezielte Veränderung des Stoffwechsels durch so genanntes „metabolic engineering“ vorgenommen werden. Dabei sollen vorhandene, auf Essigsäurebakterien beruhende Produktionsprozesse verbessert und vor allem neue biotechnologische Einsatzgebiete für diese Organismen erschlossen werden.

Die bisherigen Untersuchungen ergaben eine ganze Reihe von Überraschungen in Bezug auf den Energie- und Biosynthesestoffwechsel dieses Bakteriums. Besonders wichtig für die Arbeiten, die im Verbund mit den Arbeitsgruppen um Hermann Sahm (Jülich) und Helmut Görlich (Berlin) durchgeführt werden, sind die neuartigen Erkenntnisse über Proteine, die die erwähnten unvollständigen Oxidationen von Glukose und vieler anderer Substrate steuern. So konnten allein 75 Gene identifiziert werden, die für biochemisch nicht charakterisierte Dehydrogenasen kodieren. Die Kenntnis dieser Gene erlaubt die Entwicklung neuartiger Strategien zur maßgeschneiderten Konstruktion von besonders geeigneten Produktionsstämmen, woran das Unternehmen BASF AG (Ludwigshafen), welches diese Untersuchungen finanziell gefördert hat, besonders interessiert ist.

Literatur

1. Prust et al. (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat. Biotechnol.* 23:195-200

Kontakt

Dr. Armin Ehrenreich
 Institut für Mikrobiologie und Genetik
 Georg-August-Universität Göttingen
 E-Mail: aehrenr@gwdg.de

Steckbrief *Gluconobacter oxydans* 621H (α -Proteobacteria, Familie: Acetobacteraceae)

Das Genom von *G. oxydans* 621 H besteht aus einem ringförmigen Chromosom von 2,7 Mb Größe, sowie fünf Plasmiden von 163 kb, 26,6 kb, 14,5 kb, 13,2 kb und 2,7 kb Größe. Auf dem Genom sind insgesamt 2.668 Gene identifiziert worden.

Gluconobacter oxydans: Produzent industriell relevanter Biomoleküle

Ute Herrmann, Tina Hölscher, Helmut Görisch und Hermann Sahn

Gluconobacter oxydans, ein auf Blumen und Früchten lebendes Essigsäurebakterium, ist ein so genannter „unvollständiger Oxidierer“. Die Besonderheit dieses Organismus liegt darin, dass er so verschwenderisch mit den zur Verfügung stehenden Nährstoffen umgeht und nur wenig für sein eigenes Wachstum verwendet. Eine Vielzahl der Stoffwechselprodukte, die er ausscheidet, sind Biomoleküle, die wegen ihrer Wirksamkeit als Vitamine oder Arzneimittelbestandteile von großem wirtschaftlichem und medizinischem Interesse sind. Neben Dihydroxyaceton (Bräunungsmittel) aus Glycerin und Glukonsäure (Spülmittelzusatz) aus Glukose wird *G. oxydans* auch zur Herstellung von Aminosorbose (diabetisches Therapeutikum) aus Aminosorbit eingesetzt.

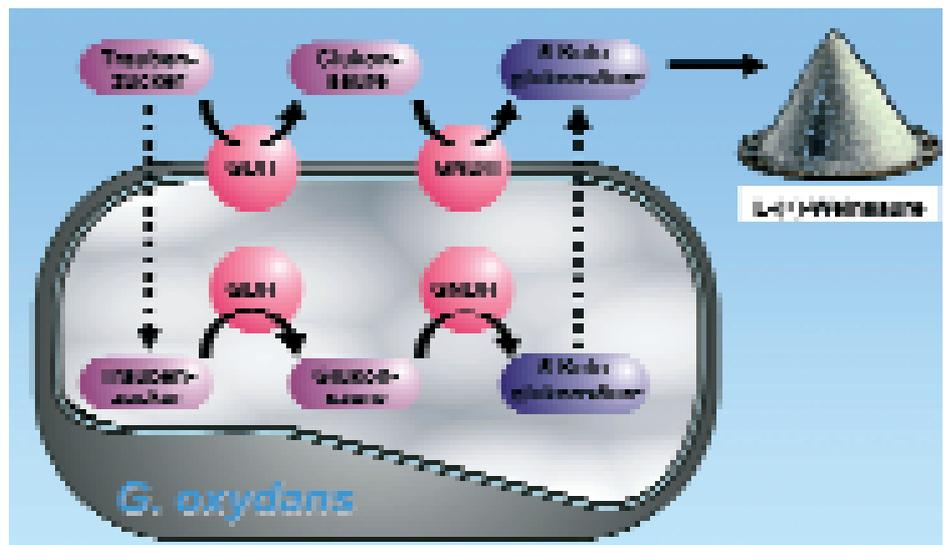


Abb. 1: Produktion von Weinsäure mit Hilfe von *Gluconobacter oxydans*

Weinsäure

Durch unvollständige Oxidation kann *G. oxydans* aus Traubenzucker 5-Ketoglukonsäure, ein Vorläufer der Weinsäure, bilden. Weinsäure ist ein gefragtes Säuerungsmittel für Fruchtsäfte, Bonbons und andere Lebensmittel, eignet sich zudem als Säure und Reduktionsmittel beim Färben und Drucken und wird in der Glasversilberung eingesetzt.

Zwei separate Enzymsysteme regeln den Umbau von Traubenzucker in 5-Ketoglukonsäure: Eines arbeitet im Inneren der Bakterienzellen, das andere ist in die Zellmembran integriert (Abb. 1). Die Gene, welche für die beteiligten Enzyme kodieren, untersuchen Her-

mann Sahn und Kollegen vom Institut für Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich sowie Helmut Görisch und Mitarbeiter vom Institut für Biotechnologie der TU Berlin. Die Arbeitsgruppen versuchen *G. oxydans* so zu verändern, dass 5-Ketoglukonsäure im Übermaß gebildet wird (1,2). Neben der erwünschten 5-Ketoglukonsäure produziert *G. oxydans* jedoch auch noch eine weitere Säure aus dem Traubenzucker, die verwandte 2-Ketoglukonsäure. Um das zu verhindern, wurde das Gen, dessen Protein für die Bildung der 2-Ketoglukonsäure notwendig ist, im Genom von *G. oxydans* inaktiviert. Auf diese Weise wurde tatsächlich die 2-

Ketoglukonsäurebildung vollständig unterbunden und die Produktion der 5-Ketoglukonsäure begünstigt, weil sich der Produktstrom nicht mehr auf zwei Wege verteilt (2). Im Anschluss wurde die Synthese der Proteine für die 5-Ketoglukonsäure-Bildung verstärkt, so dass die 5-Ketoglukonsäure-Konzentration auf bis zu 60 g/l stieg.

Für die Industrie sind diese Ergebnisse deshalb so interessant, weil bislang Weinsäure ausschließlich aus Weinstein (Rückstand bei der Weinherstellung) hergestellt wird und daher nur beschränkt verfügbar ist. Dabei entstehen außerdem organisch verunreinigter Gips

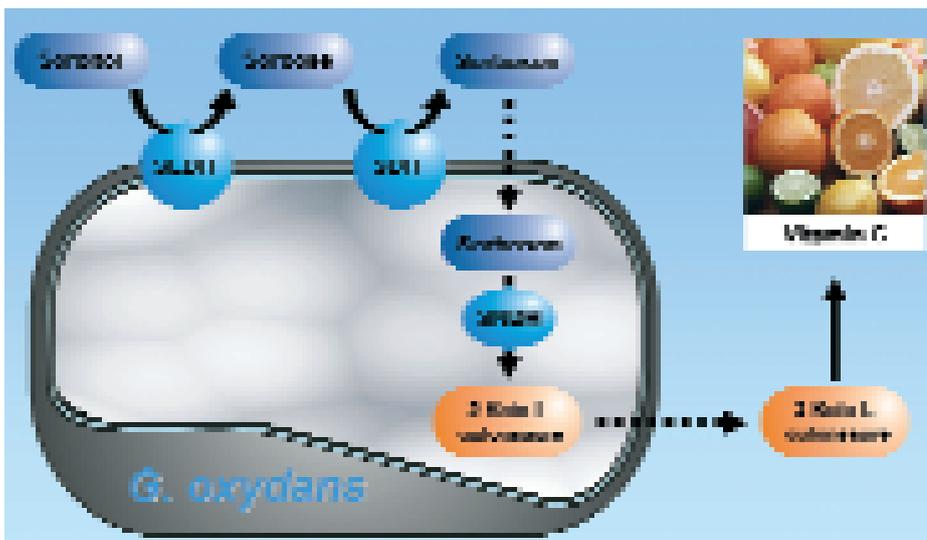


Abb. 2: Produktion von Vitamin C mit Hilfe von *Gluconobacter oxydans*

und organische Abfälle aus der Weinhefeaufbereitung, die als Sondermüll entsorgt werden müssen.

Vitamin C & PQQ

Nach erfolgreichem Abschluss des Weinsäure-Projektes wird in Jülich derzeit ein *G. oxydans*-Stamm entwickelt, der D-Sorbit, bzw. Traubenzucker zu einem direkten Vorläufer des Vitamin C, der 2-Ketogulonsäure, umsetzt. An der Umsetzung von D-Sorbit zu 2-Ketogulonsäure sind drei Enzyme beteiligt. Hermann Sahn und Mitarbeitern ist es mittlerweile gelungen einen *G. oxydans*-Stamm zu kon-

struieren, der alle für die Umsetzung von Sorbit zu 2-Keto-L-gulonsäure essentiellen Gene funktionell exprimiert.

In Berlin hingegen steht das neue Vitamin Pyrrolochinolinchinon (PQQ), das als Kofaktor vieler Quinoprotein-Dehydrogenasen dient, im Zentrum der Untersuchungen (3). Erste Ergebnisse zur Überexpression des *pqq*-Genclusters waren erfolgreich und führten nach Kultivierung der rekombinanten *G. oxydans*-Stämme zur Anreicherung von PQQ im Medium.

Literatur

- Herrmann U, et al. 2004. Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:86-90.
- Elfari M, et al. 2005. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:668-674.
- Kay CW, et al. 2005. Substrate-binding in quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* studied by electron paramagnetic resonance at 94 GHz. *J. Am. Chem. Soc.* 127:7974-7975.

Kontakt

Hermann Sahn
 Institut für Biotechnologie 1,
 Forschungszentrum Jülich GmbH
 E-Mail: h.sahn@fz-juelich.de

Umweltgenomik (Metagenomik) als nahezu unerschöpfliche Quelle für neue Biokatalysatoren, Stoffwechselwege und Wirkstoffe

Wolfgang Streit, Karl-Erich Jaeger, Rolf Daniel und Ken Timmis

Es sind nicht die Menschen, die Tiere oder – wie man vielleicht annehmen möchte – die Insekten, die die Welt dominieren – die Wahrheit ist mikroskopisch klein. Mikroorganismen dominieren die Biosphäre und besitzen eine erstaunlich hohe physiologische, metabolische und genetische Vielfalt. Die Gesamtzahl der verschiedenen prokaryotischen Arten auf der Erde wird auf etwa 1 bis 100 Millionen geschätzt, wobei bisher jedoch nur ein Bruchteil (<1%) dieser Mikroorganismen mit Standardmethoden kultiviert werden kann. Dies liegt unter anderem daran, dass die meisten Organismen unter Laborbedingungen nicht wachsen, da ihre Nährstoffansprüche zu komplex sind. Die Forscher im Netzwerk verlassen sich daher nicht länger auf die etwa 6.000 Mikroorganismen, die in den letzten 100 Jahren Biologie in den Labors kultiviert wurden, oder die 600 Einzelorganismen, deren Genome bisher entschlüsselt wurden. Vielmehr haben die Autoren hier einen eigenen Weg entwickelt, um die Vielfalt der Mikroorganismen zu erschließen. Die Forscher im Netzwerk nutzen die **Metagenomik** als eine neue Stufe der Genomforschung, um die Vielfalt der Mikroorganismen in mikrobiellen Habitaten zu erschließen. Die biologi-

sche Vielfalt, die dabei genutzt werden kann, ist nahezu unerschöpflich und auch kaum vorstellbar: Wie groß diese biologische Diversität tatsächlich ist, lässt sich am Besten abschätzen, wenn man sich das Leben in einem Gramm Gartenerde anschaut. Man muss davon ausgehen, dass in einem Gramm Erde einige tausend unterschiedliche prokaryotische Mikroorganismen leben. Dies bedeutet im Vergleich deutlich mehr Gesamtgenominformation in einem Gramm Erde als im menschlichen Genom. Diese enorme Informationsfülle war wegen fehlender Kultivierungstechniken bisher jedoch nicht oder nur geringfügig für biotechnologische oder pharmazeutische Fragestellungen nutzbar. Dieses Problem konnte im Wesentlichen durch die konsequente Anwendung und Weiterentwicklung von Metagenomtechnologie gelöst werden.

Der Trick, den die Metagenomik anwendet, ist, dass sie die Genominformation – also das Erbgut aller Mikroorganismen eines Standortes – erschließt ohne diese zu kultivieren. Dazu wird die gesamte DNA direkt aus Umweltproben, Biofilmen oder Anreicherungskulturen isoliert und als Genbibliothek in heterologen Wirten – typischerweise dem Darmbakterium *Escherichia coli* – hinterlegt. Bei der Auswahl der Umweltproben sind die Forscher sehr wählerisch und scheuen auch keine Kosten und Mühen, um an viel versprechende Probenmaterialien von allen Teilen der Erde zu gelangen. Die Umweltproben, die bisher bearbeitet wurden, reichten von einfachen Trinkwasserbiofilmen, Proben aus Gartenteichen, Gletschereis von der Zugspitze, über eher exotische Proben aus Erzabbaugebieten oder heißen Quellen, bis hin zu Sedimentproben aus dem Wattenmeer. Im Idealfall enthält eine Metagenombank den Hauptanteil der gesamten genomischen Information der analysierten mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Die so hinterlegte Erbinformation kann dann beliebig vermehrt, untersucht und letztendlich auch wirtschaftlich genutzt werden.

Die bisher in dieser Forschungsrichtung durchgeführten Arbeiten belegen, dass in der Klonierung von Umwelt-DNA und der anschließenden Durchmusterung der daraus resultierenden Metagenombanken ein enormes Potential zur Entdeckung von neuartigen Biokatalysatoren und Wirkstoffen liegt. Bisher wurden durch diese Art der Arbeiten in den Labors der Autoren eine Reihe von sehr außergewöhnlichen und für eine Industrieanwendung viel versprechende Enzyme isoliert. Beste Beispiele hierfür sind die Identifizierung von Lipasen und alkaliphilen Proteasen, die als Waschmittelzusatz zur Entfernung von Fett- bzw. Eiweißverschmutzungen eingesetzt werden können. Einige der bisher gefundenen Lipasen und Esterasen zeichnen sich darüber hinaus auch durch hochinteressante Substratspektren aus und werden derzeit vom Industriepartner, der BRAIN AG (Zwingenberg), auf eine mögliche Verwertung hin geprüft. Eine der gefundenen Esterasen könnte beispielsweise für die Herstellung von Parfums Verwendung finden oder für die Gewinnung des Pfefferminzgeschmackstoffs im Kaugummi. Eine große ökonomische Bedeutung und einen breiten Anwendungsbereich haben auch die isolierten amylolytischen Enzy-

me. Die bisher in dieser Forschungsrichtung durchgeführten Arbeiten belegen, dass in der Klonierung von Umwelt-DNA und der anschließenden Durchmusterung der daraus resultierenden Metagenombanken ein enormes Potential zur Entdeckung von neuartigen Biokatalysatoren und Wirkstoffen liegt. Bisher wurden durch diese Art der Arbeiten in den Labors der Autoren eine Reihe von sehr außergewöhnlichen und für eine Industrieanwendung viel versprechende Enzyme isoliert. Beste Beispiele hierfür sind die Identifizierung von Lipasen und alkaliphilen Proteasen, die als Waschmittelzusatz zur Entfernung von Fett- bzw. Eiweißverschmutzungen eingesetzt werden können. Einige der bisher gefundenen Lipasen und Esterasen zeichnen sich darüber hinaus auch durch hochinteressante Substratspektren aus und werden derzeit vom Industriepartner, der BRAIN AG (Zwingenberg), auf eine mögliche Verwertung hin geprüft. Eine der gefundenen Esterasen könnte beispielsweise für die Herstellung von Parfums Verwendung finden oder für die Gewinnung des Pfefferminzgeschmackstoffs im Kaugummi. Eine große ökonomische Bedeutung und einen breiten Anwendungsbereich haben auch die isolierten amylolytischen Enzy-

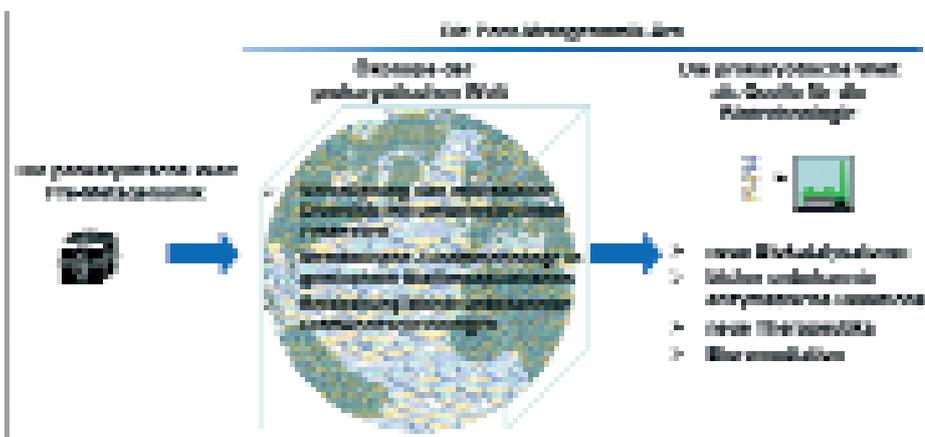


Abb 1.: Metagenomik erhellt die "black box" der prokaryotischen Welt. Dabei bezeichnet der Begriff 'Metagenom' die gesamte Erbinformation aller Mikroorganismen eines Standortes.

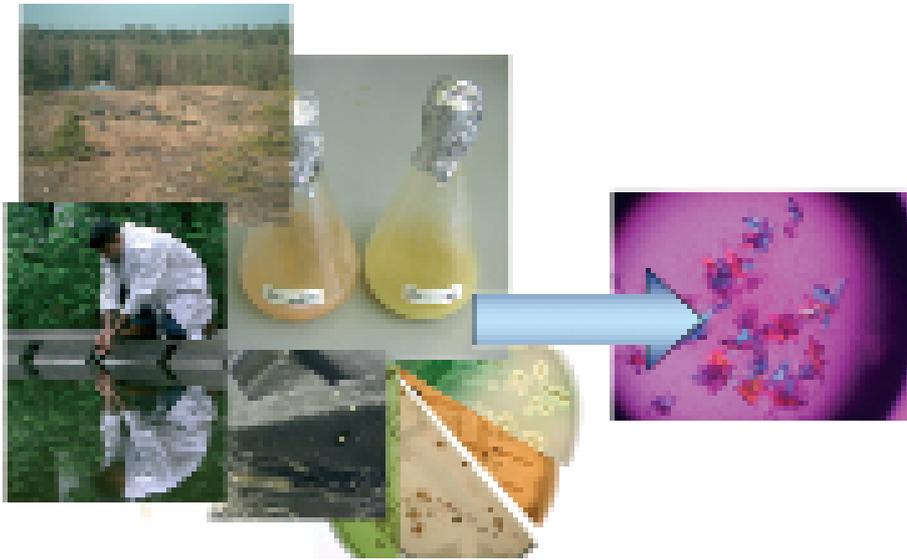


Abbildung 2: Neue Biokatalysatoren und Wirkstoffe aus Umweltproben, Biofilmen und Anreicherungen.

me, die in der Stärkeverzuckerung, im Brauwesen, in der Alkoholproduktion und in der Textilindustrie verwendet werden können. Hier sind sehr temperaturstabile und salztolerante Enzyme gefunden worden, deren Einsatz derzeit unter extremen und industriennahen Bedingungen getestet wird. Darüber hinaus eröffnen die in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner isolierten Oxidoreduktasen und Hydratasen den Zugang zur Synthese von industriell-relevanten chiralen Alkoholen, die mit Hilfe der organischen Chemie nur schwer herstellbar sind.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die verwendeten metagenomischen Verfahren in Kombination mit effektiven Durchmusterungstechnologien zur Isolierung von neuen robusten Biokatalysatoren mit hohem Anwendungspotential führen. Diese Vorgehensweise wird sich daher in den kommenden Jahren als Standardmethode für die Suche nach neuen industriell-relevanten Biokatalysatoren und Verbindungen durchsetzen.

Zusätzlich zu diesen schon fast klassischen Durchmusterungen der Umweltgenbanken nach Biokatalysatoren machen sich die Autoren nun auch auf die Suche nach neuarti-

gen Wirkstoffen und Therapeutika. Dabei sind die Autoren sehr daran interessiert, Wirkstoffe bzw. neue Gene für Wirkstoffe zu finden, die zur Vermeidung von mikrobiellen Biofilmen genutzt werden können. Biofilme, sind mikrobielle Aufwüchse, die ubiquitär vorkommen, jedoch in unserem unmittelbaren Umfeld unerwünscht sind. In industriellen Prozessen stören sie meist Produktionsprozesse und im klinischen Bereich sind sie häufig Auslöser von Infektionen und müssen daher frühzeitig erkannt und bekämpft werden. Ein Problem dabei ist jedoch, dass Mikroorganismen in Biofilmen sehr resistent gegenüber klassischen Antibiotika und Bioziden sind. Daher möchten die Metagenomforscher nun neue Wirkstoffe aus Metagenomen gewinnen. Da Biofilmwachstum als solches sehr geordnet abläuft und Mikroorganismen miteinander kommunizieren, um im Biofilm zu wachsen, suchen die Forscher jetzt mit Hilfe der Metagenomik nach Möglichkeiten, die Kommunikation von Mikroorganismen zu stören. Dieses Wissen wollen die Wissenschaftler dann einsetzen, um gezielt Wirkstoffe zur Vermeidung der Biofilmbildung zu entwickeln.

Neben der Isolierung von neuen Biokatalysatoren und Anti-Biofilmwirkstoffen wur-

den auch neue molekulare Werkzeuge und Methoden entwickelt, die eine effiziente und schnelle Durchmusterung von Genbanken mit hoher Komplexität erlauben. Dazu gehört beispielsweise die Nutzbarmachung neuer Wirtstämme für das Anlegen der Metagenom-Genbanken. Hier arbeiten die Autoren mit Hochdruck an zwei neuen Wirten: *Escherichia blattae* und *Burkholderia glumae*. Für diese Arbeiten wurden die kompletten Genome beider Organismen entschlüsselt, und für beide Organismen werden derzeit Vektoren und andere genetische Werkzeuge erstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Metagenomik als neue und junge Forschungsrichtung bereits heute eine Schlüsseltechnologie darstellt, die schon jetzt bewiesen hat, dass sie brauchbare Lösungen für biotechnologische und darüber hinausgehende Fragestellungen liefern kann.

Literatur

1. Daniel, R. (2005) *The metagenomics of soil*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 470-478
2. Steele et al. (2005) *Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology*. *FEMS Microbiol. Lett.* 247: 105-111
3. Streit et al. (2004) *Metagenomics - the key to the uncultured microbes*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 492-498
4. Daniel, R. (2004) *The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 199-204
5. Streit et al. (2004) *Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 285-290
6. Voget et al. (2003) *Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6235-6242

Kontakt

Prof. Dr. W. Streit
 AG Molekulare Enzymtechnologie,
 FB Chemie, Universität Duisburg-Essen
 E-Mail: wolfgang.streit@uni-due.de

Die Sequenzierung und funktionelle Analyse des Genoms des säure- und hitzebeständigen Archaeons *Picrophilus torridus* liefert die Information für neuartige Biokatalysatoren

Wolfgang Liebl und Garo Antranikian

Manche prokaryotische Mikroorganismen (Bakterien und Archaeen) können unter höchst erstaunlichen, aus menschlicher Sicht extremen Bedingungen gedeihen: etwa in extrem saurem oder alkalischem Milieu (um pH 0 bzw. bis etwa pH 13, Acidophile bzw. Alkaliphile), bei hohen Salzkonzentrationen (Halophile), bei extrem hohem Druck (Piezophile) oder bei sehr tiefen oder hohen Temperaturen (nahe 0°C bzw. bis etwa 110°C, Psychrophile bzw. extrem Thermophile). Die molekularen Mechanismen, die es erlauben, unter derart widrigen Bedingungen

zu leben, beinhalten spezifische Anpassungen auf den Ebenen von

- Struktur und Funktion von Biomolekülen und (sub)zellulären Strukturen,
- Physiologie und Stoffwechsel
- Regulation von Genexpression und Bewahrung der Integrität der genetischen Information.

Der Wunsch, die Mechanismen der extremophilen Anpassung zu verstehen, sowie die Suche nach neuen, stabilen Biokatalysatoren für biotechnologische Anwendungen sind die Triebfe-

dern der derzeitigen Forschung an extremophilen Mikroorganismen.

Im Rahmen des Göttinger BiotechGenoMik-Netzwerkes führen wir Genomsequenzbasierte Untersuchungen an *Picrophilus torridus* durch, einem Organismus, der gleich zwei Extreme in sich vereint, nämlich extreme Acidophilie und (moderate) Thermophilie. Dieses Archaeon wächst optimal bei pH 0,7 und damit am äußersten Rande des pH-Spektrums des Lebens und ist gleichzeitig mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 60°C auch noch

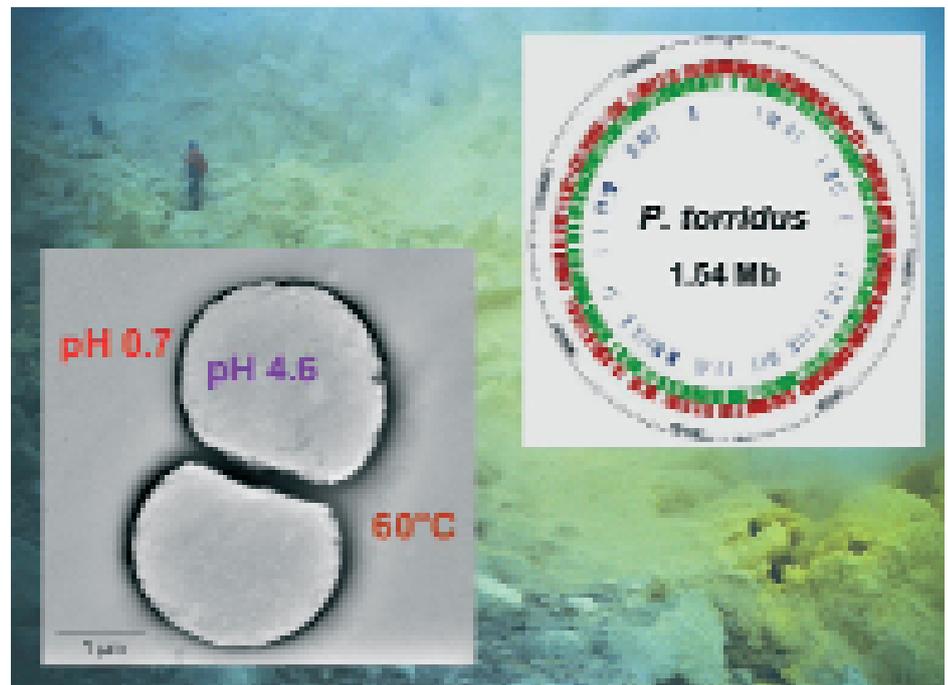


Abb. 1: Heißer, saurer Standort beim Vulkan Mount Yo, Japan, nahe der Stelle, an der *Picrophilus torridus* (elektronenmikroskopische Aufnahme von in Teilung befindlichen Zellen unten links) erstmals isoliert wurde. Fotos: C. Schleper, M. Hoppert.

Steckbrief *Picrophilus torridus* (Archaeon, Ordnung Thermoplasmatales, Familie Picrophilaceae)

Das ringförmige Genom von *P. torridus* besitzt eine Größe von 1.545.900 Basenpaaren mit einem G+C-Gehalt von 36% und einer Gesamtzahl von 1539 ORFs. 92% des Genoms stellen kodierende Sequenzen dar, womit *P. torridus* die höchste Kodierungsdichte unter den Genomen von Thermoacidophilen besitzt.

thermophil. Das intrazelluläre Milieu in *Picrophilus*-Zellen weist mit pH 4,6 sogar den niedrigsten pH-Wert auf, der je in lebenden Zellen gefunden wurde.

Gemeinsam mit dem Göttinger Labor für Genomanalyse (G2L) wurde die vollständige Nukleotidsequenz des Genoms von *P. torridus* ermittelt (1). Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden editiert und umfassend annotiert, um den aufgefundenen offenen Leserahmen (ORFs) mögliche Funktionen zuzuordnen und die wesentlichen Stoffwechselwege postulieren zu können.

Möglicherweise haben die extremen Lebensbedingungen im Fall von *Picrophilus* im Laufe der Evolution zu einem relativ kleinen Genom mit hoher Informationsdichte geführt. Aus der Genomanalyse ergaben sich diverse weitere Hinweise auf mögliche Strategien der thermoacidophilen Anpassung dieses Archaeons. Einen Schwerpunkt des Projektes bildet die Untersuchung von ausgewählten *P. torridus* Proteinen. Vor allem Enzyme mit niedrigem pH-Optimum und hoher Stabilität sind für die Lebensmittelindustrie (z.B. Proteasen, Polysaccharid- und Oligosaccharid-abbauende Enzyme) und für die chemische Industrie (z. B. Esterasen, Lipasen, Dehydrogenasen) von Interesse. Ein beeindruckendes Beispiel für ein extrem angepasstes Enzym von *P. torridus* ist dessen Glucoamylase, die optimal bei pH 2 arbeitet und zudem bei hohen Temperaturen aktiv und stabil ist (2). Für die rekombinante Herstellung von *P. torridus* Enzymen werden

verschiedene heterologe Expressionssysteme erprobt. Dabei werden nicht nur diverse Expressionsvektoren sondern auch andere Wirtsorganismen als *E. coli* wie Hefe, *Sulfolobus*, *Thermus*, *Gluconobacter*, *Corynebacterium* oder *Bacillus* einbezogen. Verschiedene Gene für Glycosidasen, Esterasen und Dehydrogenasen (3) konnten inzwischen erfolgreich exprimiert werden, die entsprechenden Biokatalysatoren werden derzeit biochemisch charakterisiert, um anschließend in Kooperation mit Industriepartnern ihr biotechnologisches Potential ausloten zu können.

Literatur

1. Fütterer et al. (2004) Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 9091-9066
2. Serour et al. (2002) Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 73-83
3. Angelov et al. (2005) Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*. *FEBS J (Eur J Biochem)* 272: 1054-62

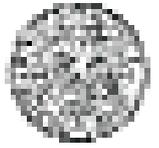
Kontakt

Prof. Dr. Wolfgang Liebl
Institut für Mikrobiologie und Genetik,
Georg-August-Universität
E-Mail: wliebl@gwdg.de

GenoMik-Kompetenznetzwerk Würzburg



Competence Network
PathoGenoMik
Carolo Wilhelms-Universität Würzburg



GenoMik-Kompetenznetzwerk Würzburg: Genomforschung an pathogenen Mikroorganismen – PathoGenoMik

Werner Goebel und Michael Kuhn

Bakterien sind allgegenwärtige Begleiter des Menschen und von nicht zu unterschätzender Bedeutung für die verschiedensten Aspekte menschlichen Lebens. Bakterien sind die Ursache für eine nach wie vor riesige Zahl von Krankheits- und Todesfällen weltweit und können – wie die verheerenden Pestepidemien im Europa des ausgehenden Mittelalters gezeigt haben – durchaus zur Verwüstung und Entvölkerung ganzer Landstriche beitragen.

Im Mittelpunkt der Forschung des von der Universität Würzburg koordinierten Kompetenznetzwerks „Genomforschung an pathogenen Mikroorganismen – PathoGenoMik“ stehen eine ganze Reihe von Bakterien die – trotz aller Fortschritte der modernen Medizin – nach wie vor bedeutende Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit haben. Gerade auch durch das immer häufigere Auftreten von bakteriellen Krankheitserregern die gegen die heute vorhandenen Antibiotika resistent geworden sind, werden pathogene Bakterien auch in Zukunft eine Herausforderung für die medizinische Forschung darstellen. Als zwei Beispiele aus der langen Liste der im Rahmen von PathoGenoMik bearbeiteten pathogenen Bakterien seien hier nur *Mycobacterium tuberculosis* und *Helicobacter pylori* genannt. *M.*

tuberculosis, der Erreger der Tuberkulose, ist ein schon sehr lange bekanntes Bakterium, das nach wie vor etwa ein Drittel aller Menschen weltweit infiziert und für weit mehr als eine Million Todesfälle jährlich verantwortlich ist und auch bei uns in den vergangenen Jahren wieder verstärkt aufgetreten ist. *H. pylori*, ein Bakterium, das etwa die Hälfte der Weltbevölkerung infiziert, wurde erst vor zwei Jahrzehnten entdeckt. *H. pylori* ist ein Besiedler der Magenschleimhaut, deren Infektionen zunächst relativ mild verlaufen, aber nach Jahrzehnten der Persistenz schließlich Magengeschwüre und sogar Magenkarzinome verursachen können.

Um dem nach wie vor aktuellen Problem der bakteriellen Infektionserkrankungen zukünftig noch besser begegnen zu können, sollen die von den Wissenschaftlern des Kompetenznetzes PathoGenoMik gemachten Entdeckungen nicht nur der Grundlagenforschung dienen. Es ist ein besonderes Ziel aller Netzwerke, durch eine enge Kooperation mit kleinen und großen Industrieunternehmen, diese Ergebnisse gezielt und rasch einer praktischen Verwertung zuzuführen und somit nicht nur den Forschungsstandort sondern auch den Wirtschaftsstandort Deutschland nachhaltig zu fördern.

Die folgenden vierzehn Highlights geben einen Überblick über das in der ersten und zweiten Förderphase vom Netzwerk PathoGenoMik bisher Erreichte. In der jetzt laufenden zweiten Förderperiode soll ganz besonders die Verwertung der bisher erzielten Erkenntnisse intensiviert werden, um neben dem schon jetzt sichtbaren wissenschaftlichen auch den medizinischen und wirtschaftlichen Erfolg der Initiative zu belegen. Im Rahmen einer erwarteten zukünftigen Förderung der Genomforschung an Bakterien durch das BMBF innerhalb der Initiative „GenoMik-Plus“ wird auch die weitere Erforschung pathogener Bakterien und die Nutzbarmachung der zu erwartenden Ergebnisse eine zentrale Rolle spielen.

Kontakt

Prof. Dr. Werner Goebel, Sprecher
[Lehrstuhl für Mikrobiologie](#)
[Universität Würzburg](#)
E-mail: goebel@biozentrum.uni-wuerzburg.de

PD Dr. Michael Kuhn, Geschäftsführer
[Kompetenzzentrum PathoGenoMik](#)
[Universität Würzburg](#)
E-mail: kuhn@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Die erste Genomsequenz einer apathogenen Staphylokokkenspezies als Grundlage für die Identifizierung neuer Virulenzfaktoren.

Ralf Rosenstein, Christiane Nerz, Alexandra Resch, Guenter Raddatz, Stephan C. Schuster und Friedrich Götz

Innerhalb der Gattung *Staphylococcus* kommen mit *S. aureus* und *S. epidermidis* zwei der prominentesten Verursacher nosokomialer Infektionen vor. Die Bekämpfung dieser Erreger durch Antibiotika wird durch die rasche Ausbreitung multiresistenter Keime zunehmend schwieriger. Damit zeichnet sich eine äußerst bedrohliche Situation ab, die die Suche nach neuen Antiinfektiva und alternativen Möglichkeiten der Behandlung von durch Staphylokokken verursachten Infektionen zu einem dringlichen Ziel macht. Die Grundlage für die Identifizierung neuer Angriffspunkte für Antiinfektiva liegt in einer umfassenden Charakterisierung der Faktoren, die an der Ausprägung der Virulenz beteiligt sind.

Dies erklärt, warum die Staphylokokken bei den bis dato publizierten bakteriellen Genomsequenzen überproportional häufig vertreten sind: mittlerweile sind die Genome von sechs *S. aureus*-Stämmen, zwei Vertretern der Spezies *S. epidermidis* und von *S. haemolyticus* sequenziert worden. Trotz dieser großen Datenbasis wurde eine umfassende Lokalisierung von Kandidaten für neue Pathogenitätsgene durch komparative Analysen bislang dadurch verhindert, dass ausschließlich Genomsequenzen virulenter Staphylokokken bekannt waren.

Deshalb haben wir uns entschlossen, erstmals die Genomsequenz einer apathogenen Spezies zu bestimmen. Die Wahl fiel mit *Staphylococcus carnosus* TM300 auf einen Stamm, der als GRAS – für „generally recognized as safe“, als allgemein als sicher bekannter Organismus klassifiziert wurde (1). Die Sequenzierung des Genoms wurde im Rahmen des PathoGenomik-Netzwerkes finanziert und in Kooperation mit der MWG Biotech AG durchgeführt.

Das Genom von *S. carnosus* TM300 umfasst 2,56 Millionen Basenpaare und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 34,6% auf. In der Sequenz wurden 2474 offene Leseraster (ORF) lokalisiert. Der Vergleich der abgeleiteten Genprodukte ergab, dass ca. 30% der im Genom von *S. aureus* N315 kodierten Proteine keine homologen Äquivalente in *S. carnosus* TM300 aufweisen, und dass in dieser Gruppe nahezu 80% aller für *S. aureus* annotierten Virulenzfaktoren vorkommen. Dies belegt die Validität der differentiellen Genomanalyse von pathogenen und apathogenen Arten. In der Gruppe der für *S. aureus* N315 spezifischen Genprodukte finden sich mehr als ein Drittel der in dieser Spezies gefundenen hypothetischen Proteine. Diese sind damit vorrangig als Kandidaten für bis dato unentdeckte Virulenzfaktoren anzusehen.

Die Adhäsion an medizinische Implantate kann zu chronischen, Polymer-assoziierten Infektionen durch Biofilm-bildende *S. aureus*- oder *S. epidermidis*-Stämme führen. Damit stellt die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen ein prominentes Pathogenitätsmerkmal dar und steht im Fokus der Entwicklung neuer Antiinfektiva.

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse durchgeführt, um herauszufinden, welche Gene von *S. aureus* während der Bildung von Biofilmen signifikant stärker exprimiert werden (2). Von diesen während der Biofilmbildung induzierten Genen fallen 11 in die Gruppe der durch unsere Genomvergleiche postulierten Kandidatengene für neue Virulenzfaktoren und sind somit besonders interessant bezüglich der experimentellen Aufklärung ihrer Rolle bei der Biofilmbildung sowie ihrer Eignung als mögliche Targets für neue Behandlungsverfahren.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung von komparativen Genomvergleichen auf der Basis des *S. carnosus*-Genoms als nützliches Werkzeug für die Vorauswahl von Virulenz-assoziierten Kandidatengenen, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antiinfektiva darstellen können.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung von komparativen Genomvergleichen auf der Basis des *S. carnosus*-Genoms als nützliches Werkzeug für die Vorauswahl von Virulenz-assoziierten Kandidatengenen, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antiinfektiva darstellen können.

Dieses Beispiel zeigt die Bedeutung von komparativen Genomvergleichen auf der Basis des *S. carnosus*-Genoms als nützliches Werkzeug für die Vorauswahl von Virulenz-assoziierten Kandidatengenen, die neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Antiinfektiva darstellen können.

Literatur

- Götz. (1990) *Staphylococcus carnosus*: a new host organism for gene cloning and protein production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19: 495-535
- Resch et al. (2005) Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2663-2676.

Kontakt

Prof. Dr. Fritz Götz
Lehrstuhl für Mikrobielle Genetik
Universität Tübingen
E-mail: friedrich.goezt@uni-tuebingen.de

Mit Gen-Chip-Analysen und Proteom-Untersuchungen den Ursachen von chronischen, Therapie-refraktären Infektionen auf der Spur

Susanne Engelmann, Michael Hecker und Christof von Eiff

Nach bisherigem Verständnis ist der Erreger *Staphylococcus aureus* ein sich primär extrazellulär vermehrender Erreger mit hohem pathogenen Potential und verantwortlich für eine große Bandbreite von akuten Infektionen. *S. aureus*-Infektionen können jedoch auch ausgeprägt chronisch-persistierend mit begrenzter Entzündungsreaktion verlaufen. Durch die Beobachtung, dass bestimmte Infektionsverläufe mit der Isolierung phänotypischer Varianten, sogenannter „Small Colony Variants“ (SCVs), assoziiert sind, konnte ein neues Konzept im Verständnis chronisch-persistierender Staphylokokken-Infektionen erarbeitet werden.

Aufgrund ihres atypischen Aussehens, inklusive veränderter biochemischer Reaktionen, werden SCVs im mikrobiologischen Labor oft nicht als solche erkannt und werden deshalb vermutlich in ihrer Bedeutung und Häufigkeit unterschätzt. Da die zur intrazellulären Persistenz befähigten SCVs häufig eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika zeigen und sich der Wirtsimmunabwehr entziehen können, tragen Fehl- und Mißidentifizierung der SCVs zu einem möglichen Therapieversagen bei. Unter bestimmten Umständen revertieren SCVs wieder zum virulenten Wildtyp, wodurch sie experimentellen Untersuchungen schwer zugänglich sind.

Im Rahmen des PathoGenoMik-Netzwerkes untersuchen wir die Ursachen der SCV-Entstehung. Wir nutzen dazu DNA-Chips und

Proteom-Analysen, um einen Einblick in die molekularen Vorgänge zu gewinnen, die charakteristisch für SCVs sind. So konnten wir zeigen, dass eine Mutante im *hemB*-Gen, die alle sichtbaren Eigenschaften eines SCV-Phänotyps zeigt, ein gutes Modell zum Studium der Physiologie der SCVs darstellt (1). Mit Hilfe des Proteomansatzes wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen der *hemB*-Mutante und dem isogenen Wildtyp herausgearbeitet. Dabei zeigte sich, dass in der Mutante glykolytische Enzyme sowie Enzyme des Fermentationsstoffwechsels verstärkt synthetisiert werden, während Proteine des Tricarbonsäure-Zyklus kaum nachweisbar waren. Da die Mutante aufgrund des ausgeschalteten *hemB*-Gens keine funktionelle Atmungskette besitzt und weder Sauerstoff noch Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen kann, kann ATP nur über Substratphosphorylierung in der Glykolyse synthetisiert werden, was sich in deutlich niedrigeren ATP-Konzentrationen widerspiegelt. Analysen der Fermentationsprodukte zeigten, dass in der Mutante hauptsächlich Laktat gebildet wird. Trotz der Anwesenheit der Pyruvat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Formiat-Lyase waren weder Ethanol noch Acetat in signifikanten Mengen nachweisbar. Weiterhin war in der Mutante eine deutliche Induktion der Arginin-Deiminase und der Ornithin-Carbonyltransferase festzustellen. Diese beiden Enzyme sind am fermentativen Abbau von Argi-

nin beteiligt, der eine weitere Möglichkeit zur ATP-Gewinnung für die Mutante darstellt. Untersuchungen zum extrazellulären Proteom zeigten außerdem, dass eine Vielzahl von Virulenzfaktoren nicht oder kaum gebildet wurden.

Mit der Nutzung der DNA-Chip- und Proteom-Technologie ist es erstmals gelungen, ein umfassendes Bild der veränderten Stoffwechsellage dieser besonderen Lebensform von Staphylokokken aufzuzeigen. Die Identifizierung einzelner Enzyme und Synthesewege ist der erste Schritt, für die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen diese Bakterien.

Literatur

1. Kohler et al. (2003) Characterization of a Heme-Deficient Mutant of *Staphylococcus aureus* by a Proteomic Approach. *J. Bacteriol.* 185: 6928-6937.

Kontakt

Prof. Dr. Michael Hecker
Dr. Susanne Engelmann
*Institut für Mikrobiologie
Universität Greifswald*
Susanne.Engelmann@uni-greifswald.de

Prof. Dr. Christof von Eiff
*Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Münster*
eiffc@uni-muenster.de

Wie werden Bakterien antibiotikaresistent? Pneumokokken als Gendiebe

Regine Hakenbeck

Der Vormarsch antibiotikaresistenter Bakterien, der in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen hat, fordert schnelle Testsysteme zum Erfassen der Resistenzmuster, um eine gezielte Therapie möglichst schnell zu erlauben. Bei einer Meningitis sind resistente Keime besonders gefährlich, da sich im Gehirn längst nicht so hohe Konzentrationen der Wirkstoffe erzielen lassen wie in anderen Organen. Pneumokokken, die für ein ganzes Arsenal von Krankheitsbildern verantwortlich sind wie Hirnhautentzündung, Mittelohr- und Lungenentzündung, sind eines der Paradebeispiele für diese Entwicklung: waren 1970 noch alle Isolate weltweit als sensitiv gegen Penicillin eingestuft (dem Antibiotikum, das gerade gegen Pneumokokken besonders gut wirkt), sind die Zahlen derzeit auf 30 bis über 50 % resistente Isolate in europäischen Ländern wie Spanien, Frankreich und Ungarn, und in allen anderen Kontinenten – den USA, Südafrika, Taiwan, Japan – angestiegen. Rätselhaft war diese Entwicklung zunächst schon, da sich der Trend in Laborversuchen so schnell gar nicht nachvollziehen ließ.

Bald gab es Hinweise, dass die genetischen Veränderungen, die für Penicillinresistenz wichtig sind, sich gar nicht durch Mutationen in den Bakterien selber erklären lassen, sondern man vermutete, dass veränderte Gene aus anderen, nahe verwandten Bakterien diejenigen der sensitiven Pneumokokken ersetzt haben. Dieser Prozess ist bei Pneumokokken durchaus möglich, da sie – wie auch andere verwandte Streptokokken, zu denen sie gehören – über eine perfekte Maschinerie verfügen, die es ihnen erlaubt fremde DNA aufzu-

nehmen und in ihr eigenes Chromosom zu integrieren. Unsere Abteilung an der TU Kaiserslautern, beschäftigt sich mit Antibiotikaresistenzen, dem Gentransfer zwischen verschiedenen Bakterien, und der Regulation von bakteriellen Komponenten, die für die Auslösung von Krankheiten von Bedeutung sind. Dafür bietet die Genomforschung jetzt völlig neue Perspektiven.

Inzwischen konnten die Forscher der TU Kaiserslautern im Rahmen des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik weitere Beweise für diese Strategie darlegen. Interessanterweise werden von den Krankheitserregern Bakterien als 'Spender' der Gene benützt, die als harmlose Besiedler in jedem Menschen vorkommen und dort auch ständig nachweisbar sind. Eben diese Bakterien sind aber jeglicher Antibiotikatherapie ausgesetzt, die ihr Wirt durchmacht, und stehen somit unter permanent wiederholtem Selektionsdruck. Kein Wunder, dass diese Bakterien, die in den Kliniken keine Beachtung finden und deren Resistenzspektrum auch nie in Routine-tests erfasst werden, ein umfassendes Arsenal potenter Resistenzgene angesammelt haben.

Die gesamte Information eines solchen multipel und hoch Antibiotika-resistenten harmlosen, 'kommensalen' Bakteriums *Streptococcus mitis* wurde in Kooperation mit der Firma AGOWA (Berlin) von den Forschern in Kaiserslautern – der Abteilung Mikrobiologie in enger Kooperation mit dem Nano-Bio-Center der TU Kaiserslautern – im Rahmen des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik analysiert. Die Anzahl von Resistenzgenen, die in dem Genom des harmlosen *Streptococcus* von ihnen gefunden wurde, zeigt neuartige raffinierte Strategi-

en, möglichst viele solcher Resistenzgene als kompaktes Paket zu versammeln und auch möglichst effizient in andere Bakterien einschleusen zu können, zeigen aber auch gleichzeitig das breite Arsenal an Abwehrmechanismen, die den Pneumokokken zur Verfügung stehen. Die Herkunft der Gene in dem Genom des *S. mitis* Stammes läßt auf ein ungeahnt breites Spektrum von Bakterien schließen, deren Gene sich die Streptokokken einverleiben können,

Der Vergleich der Genominformation eines Krankheitserregers mit dem eines harmlosen engen Verwandten eröffnet ganz neue Perspektiven. So können 'eigene' und 'fremde' Gene in einer Bakterienart differenziert werden, Ergebnisse, die dazu beitragen spezifische Sonden zu entwickeln, mit denen eindeutig Sonden zu entwickeln, mit denen eindeutig sowohl die Bakterienart als auch deren Antibiotikaresistenzen innerhalb kurzer Zeit getestet werden können. Außerdem kann die Genominformation für epidemiologische Untersuchungen ausgenutzt werden, die helfen Ausbreitung und Resistenzentwicklung in Krankheitserregern verfolgen zu können. Die Forscher versprechen sich auch über die Identifikation der Gene, die für die Virulenz von Pneumokokken verantwortlich sind, also in den harmlosen Keimen nicht vorkommen, die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung des Krankheitserregers.

Kontakt

Prof. Dr. Regine Hakenbeck
Abteilung für Mikrobiologie
Technische Universität Kaiserslautern
E-mail: hakenb@rhrk.uni-kl.de

Vergleichende Genomanalyse des Genus *Listeria*

Michael Kuhn und Torsten Hain

Das Genus *Listeria* umfasst sechs Arten, von denen zwei krankheitserregend (pathogen) sind. Von den in der Natur weit verbreiteten Listerien infiziert *Listeria ivanovii* vorwiegend Tiere wie Rinder und Schafe; *Listeria monocytogenes* kann auch den Menschen befallen und ist hier für relativ seltene, aber häufig tödlich verlaufende Erkrankungen verantwortlich. Mit den Bakterien kontaminierte Lebens- oder Futtermittel lösen immer wieder kleinere Listeriose-Epidemien aus. Das Krankheitsbild reicht dabei von milden Magen-Darbeschwerden bis hin zu Entzündungen des Gehirns und der Hirnhäute, die vor allem bei Neugeborenen und immungeschwächten Patienten oft tödlich verlaufen. Meist wird die Verunreinigung von Lebensmitteln mit Listerien rechtzeitig, das heißt vor Auslieferung an den Verbraucher, erkannt; die dann notwendigen Rückrufaktionen führen jedoch zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten. Außer den genannten Krankheitserregern umfasst das Genus *Listeria* noch die Arten *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* und *L. grayi*, alles harmlose (apathogene) Umweltkeime.

Um zu verstehen, welche Eigenschaften die Listerien zu gefährlichen Lebensmittel- oder harmlosen Umweltkeimen machen, hat ein Team aus Forschergruppen aus Gießen, Würzburg und Braunschweig zusammen mit dem Institut Pasteur in Paris und einigen weiteren europäischen Gruppen bereits die gesamten Erbinformationen von *L. monocytogenes* und der nahe verwandten, aber harmlosen Art *L. innocua* entschlüsselt und veröffentlicht (1, 2). Im Rahmen des Kompetenznetzes PathoGenoMik werden nun von den Gruppen in Gießen, Würzburg, Braunschweig und Paris die Genome von fünf weiteren Vertretern der Gattung *Listeria* komplett sequenziert. Die Sequenzierungen von *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. seeligeri* sind bereits abgeschlossen, die Auswertung der Daten hat begonnen und die Publikation der Sequenzen wird gegenwärtig vorbereitet. Die Sequenzierung von *L. grayi* – an letzterer ist auch das Kompetenznetz mit Zentrum in Göttingen beteiligt – und eines weiteren *L. mono-*

cytogenes Stammes des Serovars 4a befindet sich in der Endphase.

Nach Abschluss der Arbeiten werden damit erstmals überhaupt die Genomsequenzen aller Mitglieder einer Bakteriengattung bei Gram-positiven Bakterien bekannt sein. Zusätzlich wird neben den Vergleich der einzelnen Listerienarten untereinander auch eine Analyse der drei Hauptgruppen der Spezies *L. monocytogenes* vertreten durch die Serovare 1/2a, 4a und 4b durchgeführt, um art- wie auch stammspezifische Markergene des humanpathogenen Erregers zu identifizieren.

Die umfassende Auswertung der Genomdaten wird die weitere Erforschung der Pathogenitätsmechanismen von *L. monocytogenes* – und besonders das Verständnis deren stammesgeschichtlicher Entwicklung – einen großen Schritt nach vorne bringen und schließlich auch eine bessere Kontrolle dieses relativ seltenen, aber sehr gefährlichen Bakteriums erlauben.

In der laufenden zweiten Förderperiode von PathoGenoMik sollen nun die erzielten Forschungsergebnisse dazu benutzt werden, neue Identifizierungsverfahren durch Verwendung von diagnostischen DNA-Chips zu entwickeln,

die sowohl eine schnelle und sichere Unterscheidung zwischen harmlosen und pathogenen Listerienarten erlauben und zusätzlich dazu eingesetzt werden, um neue Targets für Medikamente zu finden, die eine schnelle Bekämpfung von Infektionen mit *L. monocytogenes* ermöglichen.

Literatur

1. Glaser et al. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
2. <http://genolist.pasteur.fr/ListiList/index.html>
3. Ghai et al. (2004) GenomeViz: visualizing microbial genomes. *BMC Bioinformatics* 5:198.

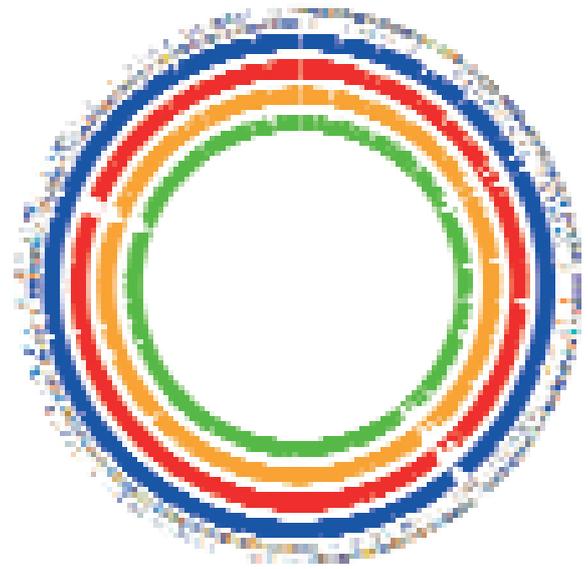
Kontakt

PD Dr. Michael Kuhn
Kompetenzzentrum PathoGenoMik
Universität Würzburg
E-mail: kuhn@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Dr. Torsten Hain

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universität Gießen
E-mail:
torsten.hain@mikrobio.med.uni-giessen.de

Abb: Gesamtgenom-Alignments des Erbguts von fünf *Listeria*-Arten. Von außen nach innen betrachtet: *L. monocytogenes* EGDe Serovariante 1/2a COG Kategorien (beide äußere Ringe), *L. monocytogenes* F6854 Serovariante 1/2a (blau, 133 Contigs), *L. monocytogenes* F2365 Serovariante 4b (rot, Gesamtgenom), *L. monocytogenes* H7858 Serovariante 4b (orange, 180 Contigs) und *L. innocua* (grün, Gesamtgenom). Alle Genome wurden einzeln in Bezug auf *L. monocytogenes* EGDe mit dem Software-Paket AVID angeordnet (3). Die Sequenzdaten der Stämme *L. monocytogenes* F6854 und H7858 wurden vom Institute for Genomic Research erhalten.



Entdeckung neuer Impf- und Diagnostika-Antigene bei der Tuberkulose

Stefan H. E. Kaufmann und Helmy Rachman

Forscher aus der Abteilung Immunologie des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie in Berlin konnten neue Erkenntnisse zur Aufklärung der Lungentuberkulose auf molekularer Ebene gewinnen. Gegenwärtig erfolgt die Verwertung der Ergebnisse zur Identifikation neuer Impf- und Diagnostika-Antigene sowie neuer, chemotherapeutisch wirksamer Stoffklassen und Substanzen.

Die Entschlüsselung der Erbinformation von *Mycobacterium tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose, im Jahr 1998 ermöglichte die chemische Synthese von kurzen Abschnitten der durch Computeranalyse vorhergesagten Gene. Durch die Verwendung genspezifischer Primer-Paare und der isolierten Erbsubstanz – der chromosomalen DNA – aus *M. tuberculosis* H37Rv wurden über 99% der vorhergesagten offenen Leseraster mittels Polymerase-Kettenreaktion als ca. 300 Basenpaar lange Genabschnitte synthetisiert und anschließend damit DNA-Arrays hergestellt. Mit den Arrays wurden Genomvergleiche zwischen *M. tuberculosis* und anderen Mykobakterienarten unterschiedlicher Pathogenität durchgeführt. So konnten Gene identifiziert werden, die nur im Tuberkulose-Erreger vorkommen und in allen anderen untersuchten Mykobakterienarten fehlen. Diese Gene kodieren wahrscheinlich nicht nur wichtige Pathogenitätsfaktoren, sondern auch potenzielle Impf- und ganz besonders Diagnostik-Antigene.

Außerdem wurden ausführliche Transkriptom-Analysen des Tuberkulose-Erregers durchgeführt. Hierzu wurde Lungenmaterial von Tuberkulosepatienten verwendet, die an multiresistenter Tuberkulose leiden und daher einer chirurgischen Lungenresektion unterzogen werden mussten. Auf diese Weise konnten diejenigen Gene von *M. tuberculosis* identifiziert werden, die während der Lungentuberkulose differenziell reguliert werden. Zahlreiche dieser Gene mit bislang unbekannter Funktion wurden mit Hilfe computergestützter bioinformatischer Analysen in Proteinnetzwerke einge-

ordnet. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die wahrscheinliche Funktion der Gene im Infektionsprozess. Diese Untersuchungen ermöglichten die Erstellung von Signaturen des Tuberkulose-Erregers während der Infektion und bilden daher die Grundlage für die Identifizierung neuer Impfantigene und von Zielstrukturen für neue Chemotherapeutika.

Weiter wurde am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Kooperation mit Combinate Biopharm AG der Einfluss chemotherapeutischer Substanzen auf die Expression mykobakterieller Gene zur Identifizierung potenzieller Zielstrukturen und neuer chemotherapeutisch wirksamer Stoffklassen untersucht. Hierzu wurde ein Verfahren etabliert, mit welchem Substanzen aus vermutlich Antibiotika produ-

zierenden Actinomyceten-Stämmen parallel auf antibakterielle Aktivität analysiert werden konnten. Mit Hilfe dieses Untersuchungsverfahrens konnte aus der Vielzahl von ca. 1000 Testsubstanzen eine Gruppe von etwa 40 Kandidaten-Substanzen eingeeengt werden. Diese Substanzen werden nun mittels der Transkriptom-Analyse mit den zurzeit in der Tuberkulose-Therapie verwendeten Antibiotika verglichen, um die molekularen Wirkmechanismen aufzuklären.

Kontakt

Prof. Dr. Stefan H.E. Kaufmann
 Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
 Berlin
 E-mail: kaufmann@mpiib-berlin.mpg.de

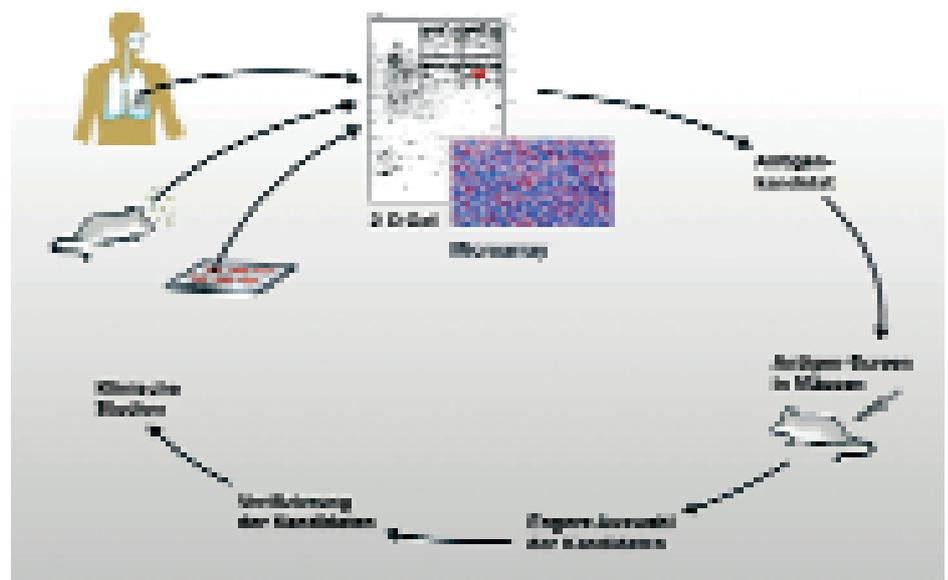


Abb: Strategische Vorgehensweise bei der Entdeckung neuer Impf- und Diagnostika-Antigene bei der Tuberkulose. Aufbauend auf Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen werden differenziell exprimierte Proteine des Tuberkulose-Erregers identifiziert und dann in einem sequenziellen Durchsatzverfahren ihr Wert als Impf- und Diagnostika-Antigene ermittelt.

Entschlüsselung des Genoms des krebserregenden Bakteriums *Helicobacter hepaticus*

Sebastian Suerbaum

Helicobacter pylori ist der zweithäufigste Krankheitserreger des Menschen. Die Infektion mit diesem Bakterium erhöht das Risiko, an Magenkrebs oder bösartigen Magenlymphomen zu erkranken und *H. pylori* ist daher seit 1994 als Krebserreger eingestuft. Aber *H. pylori* ist nicht das einzige Bakterium, das Krebserkrankungen hervorrufen kann. *Helicobacter hepaticus* ist ein mit *H. pylori* eng verwandtes Bakterium, das bei Mäusen Leberentzündungen (Hepatitis), Leberkrebs und entzündliche Darmerkrankungen hervorruft. Gemeinsam mit Wissenschaftlern vom Massachusetts Institute of Technology, USA, der deutschen Firma MWG

GeneData nicht realisierbar gewesen. Die Zusammenarbeit hat unsere langjährige Expertise auf dem Gebiet der pathogenen Helicobacterarten mit der industriellen Kompetenz von MWG Biotech und GeneData auf den Gebieten der Hochdurchsatzsequenzierung und Bioinformatik zusammengebracht und war dadurch außerordentlich fruchtbar. Es bleibt zu hoffen, dass solche Zusammenarbeiten in der Zukunft Schule machen, weil sie für alle Beteiligten – universitäre Partner und Industrieunternehmen – von großem Vorteil sein können.

Literatur

1. Suerbaum et al. (2003) The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7901-7906.

Kontakt

Prof. Dr. Sebastian Suerbaum
 Institut für Medizinische Mikrobiologie
 und Krankenhaushygiene
 Medizinische Hochschule Hannover
 E-mail: suerbaum.sebastian@mh-hannover.de



Abb. 1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *Helicobacter hepaticus* (copyright: C. Josenhans)

Biotech AG und der Schweizer Bioinformatikfirma GeneData® hat meine Arbeitsgruppe die komplette Genomsequenz dieses Bakteriums entschlüsselt (1).

Da jetzt sowohl das Genom des bakteriellen Krankheitserregers als auch das des Wirtsorganismus (Maus) vollständig bekannt sind, eröffnet die Genomsequenz von *H. hepaticus* die Möglichkeit, die Ursachen der karzinogenen Potenz dieses Bakteriums im Mausmodell systematisch zu untersuchen. Von besonderem Interesse sind hierbei zum einen Gemeinsamkeiten mit *H. pylori* und außerdem eine neue Gruppierung von Virulenzgenen, eine sogenannte „Pathogenitätsinsel“, die die Forscher im Genom von *H. hepaticus* entdeckten.

Dieses Projekt wäre ohne das erhebliche Engagement der Firmen MWG Biotech und

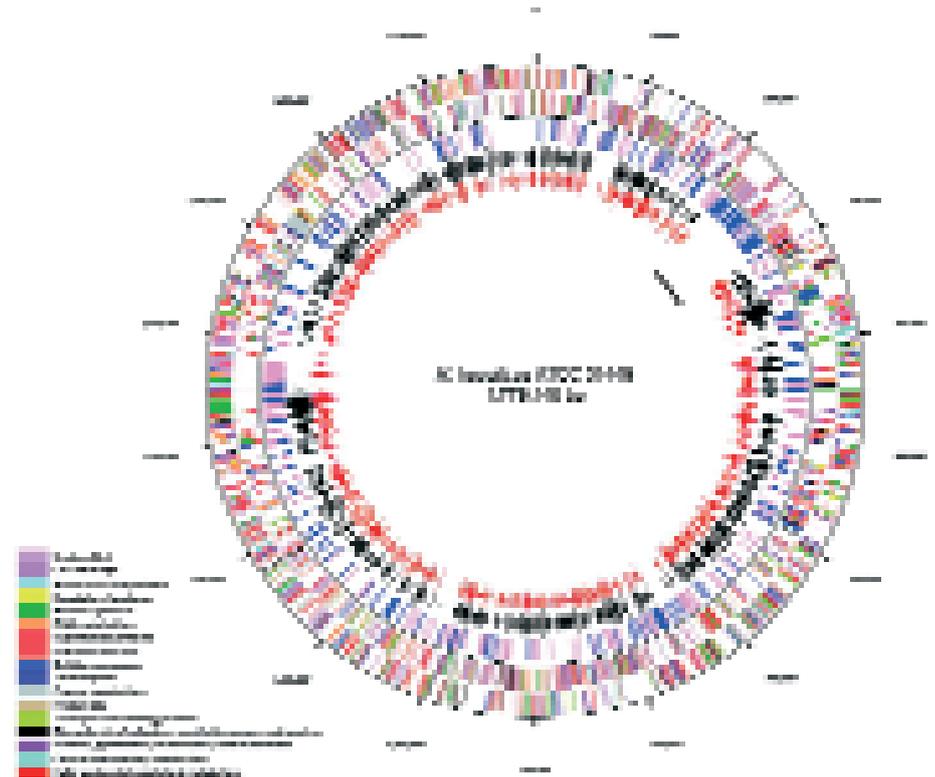


Abb. 2: Zirkuläre Darstellung des *H. hepaticus* Genoms und seine Beziehung mit den Genomen von *H. pylori* und *Campylobacter jejuni*. Von außen nach innen repräsentieren die ersten beiden Ringe die Positionen der codierenden Sequenzen die mit oder gegen den Uhrzeigersinn transkribiert werden. Die Farben repräsentieren die funktionalen Kategorien der codierten Proteine. Der dritte Ring stellt Regionen des Chromosoms dar, die einen mehr als 5% höheren (pink) oder niedrigeren (blau) G+C Gehalt aufweisen. Der vierte und der fünfte Ring repräsentieren Genes mit Orthologen in *H. pylori* (schwarz) und *C. jejuni* (rot). Die Länge der Linien welche die Orthologen darstellen ist proportional zur Sequenzähnlichkeit. Die Position der HHG11 genomischen Insel ist auf dem innersten Ring vermerkt. (aus Suerbaum et al., 2003).

Spuren der Menschheitsgeschichte in den Genen eines Krankheitserregers

Sebastian Suerbaum und Mark Achtman

Das im Magen des Menschen lebende pathogene Bakterium *Helicobacter pylori* offenbart, auf welchen Wegen unsere Vorfahren die Welt besiedelt haben (1).

Helicobacter pylori besiedelt die Magenschleimhaut von mehr als der Hälfte der Weltbevölkerung. Dies kann oft über Jahrzehnte andauern und zu Magen- und Zwölffingerdarm-Geschwüren führen, wenn keine Behandlung erfolgt. Durch die Infektion erhöht sich außerdem das Risiko, an bösartigen Magentumoren zu erkranken, *H. pylori* ist als Krebserreger (Karzinogen) anerkannt. Das Bakterium wird vorwiegend innerhalb von Familien übertragen und verbreitet sich nicht epidemisch. Es zeichnet sich durch eine sehr starke genetische Diversität aus, die etwa fünfzig Mal höher ist als beim Menschen. Seine DNA-Sequenzen sind in Abhängigkeit von der geographischen Region, in der die Bakterien isoliert wurden, sehr unterschiedlich.

Zusammen mit unseren Kooperationspartnern von sechs weiteren Universitäten in den USA und Frankreich konnten wir zeigen, dass *Helicobacter* den Menschen bereits seit Urzeiten bei seinen Wanderungen begleitet. Wir untersuchten den Krankheitserreger in 27 Menschengruppen unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit und geographischer Herkunft und klärten seine weltweite Populationsstruktur mit genetischen Methoden auf.

Die detaillierte Analyse des Erbguts

ergab, dass sich die Bakterien sieben Gruppen und Untergruppen zuordnen lassen. Dann entwickelten wir eine neue mathematische Methode, um die Vorfahren zu rekonstruieren und kamen auf vier *Helicobacter*-Populationen, die ihren Ursprung in Afrika und dem Nahen Osten sowie in Zentral- und Ostasien hatten. Durch den Vergleich zwischen diesen und den heutigen Populationen lässt sich nun rekonstruieren, wie das Magenbakterium sich zusammen mit dem Menschen auf der Erde verbreitet hat.

Jeder heutige *Helicobacter* Typ trägt die Spuren seiner Vorfahren. Denn treffen im Magen verschiedene *Helicobacter*-Stämme aufeinander, dann können sie untereinander Erbinformationen austauschen. So sind die heute in Europa nachweisbaren Bakterien das Ergebnis einer genetischen Verschmelzung zweier Populationen, die unabhängig voneinander aus Zentralasien und dem Nahen Osten nach Europa eingewandert sind. Andere Populationen entwickelten sich während der mehrere tausend Jahre langen Isolation der Polynesier im Pazifik, der Wanderung der sibirischen Vorfahren der Indianer über die Beringstraße nach Amerika oder der Expansion der Bantu in Afrika.

In vielen Gegenden der Erde herrscht heute durch die Vermischung der Bevölkerungsgruppen eine heftige Konkurrenz zwischen den ursprünglich ansässigen Bakterien und solchen, die in den vergangenen Jahrhunderten einwanderten. Zu Stande kam diese

Situation beispielsweise durch die von Europa ausgegangene Kolonialisierung von Nord- und Südamerika oder durch den Sklavenhandel.

Unsere Forschungsergebnisse haben möglicherweise auch wichtige Auswirkungen auf die Behandlung von Infektionen mit *Helicobacter*. Der Grund: Genetische Unterschiede können eine unterschiedliche Aggressivität der Erreger zur Folge haben. Sie können auch die Effizienz von Antibiotika beeinflussen. Außerdem müssen diese Unterschiede bei der Entwicklung eines Impfstoffs in Betracht gezogen werden, wenn dieser Schutz gegen *Helicobacter*-Stämme aus allen Regionen der Welt verleihen soll.

Literatur

1. Falush et al. (2003) *Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. Science* 299:1582-1585.

Kontakt

Prof. Dr. Sebastian Suerbaum
Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Krankenhaushygiene
Medizinische Hochschule Hannover
E-mail: suerbaum.sebastian@mh-hannover.de

PD Dr. Mark Achtman
Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie
Berlin
E-mail: achtman@mpiib-berlin.mpg.de

Neisseria meningitidis: harmloser Kommensale und gefährliches Pathogen

Matthias Frosch

Meningokokken (*Neisseria meningitidis*) kommen ausschließlich beim Menschen vor. Sie können als Kommensalen die Schleimhaut des Nasen-Rachen-Raumes für Tage bis Monate besiedeln ohne eine Erkrankung auszulösen. Die Keimträgerraten schwanken altersabhängig und können mehr als 30% betragen. Die eigentliche Erkrankung beginnt erst, wenn die Meningokokken die Schleimhautbarriere überwunden haben und sich über die Blutbahn ausbreiten. Invasive Meningokokken-Erkrankungen treten in Form von Hirnhautentzündungen, Blutvergiftungen oder Mischformen auf und sind wegen der schweren Verläufe, der nicht seltenen Todesfälle (10%) und der Spätschäden von erheblicher Bedeutung. Besonders gefährdet sind Säuglinge, Kleinkinder und Jugendliche. Mittels molekularer Feintypisierungsmethoden ist es möglich, die genetische Verwandtschaft von Meningokokkenisolaten zu bestimmen und diese in sogenannte klonale Gruppierungen einzuteilen. Klonale Gruppierungen, die bei Erkrankten gefunden werden, sind äußerst selten bei gesunden Keimträgern zu finden.

Ziel der Meningokokken-Arbeitsgruppe im Kompetenznetzwerks PathoGenoMik ist es daher, durch vergleichende und funktionelle Genomanalysen infektiologisch relevante Genfunktionen bei Meningokokken zu identifizieren.

Im ersten Schritt wurden hierfür in Kooperation mit der Firma MWG Biotech

(Ebersberg) Genomsequenzen ausgewählter apathogener Meningokokkenisolate erstellt. Es handelte sich um einen konstitutiv unbekapselten Stamm ohne Kapselsynthesegene (*cnf*) des Sequenztyps (ST) 53 (1, 2) sowie um einen bekapselten Stamm der Serogruppe B (ST-136). Stämme dieser Sequenztypen wurden bisher nahezu ausschließlich von Trägern isoliert (3). Für den ST-53 Stamm wurde nach dem Ringchluss der Sequenz eine Annotation mit Hilfe des Programmes GenDB in Kooperation mit dem Zentrum für Biotechnology (CeBiTec) der Universität Bielefeld durchgeführt. Basierend auf dieser Annotation wurde in Kooperation mit der Firma Operon (Köln) ein auf 70mer-Oligonukleotiden basierender Meningokokken-Microarray konzipiert und produziert, der Oligonukleotide für die publizierten pathogenen Meningokokkengenome und den apathogenen ST-53 Stamm umfasst. Dieser Array ist kommerziell erhältlich und wird derzeit von uns für vergleichende Genomhybridisierungen eingesetzt, die Meningokokkenstämme aus mehreren klonalen Komplexen umfassen.

Der Vergleich der ST-53 Sequenz mit den bereits publizierten Genomsequenzen pathogener Meningokokkenisolate zeigte, dass das Genom des apathogenen ST-53 Stammes mit 2146 kb deutlich kleiner ist und dass im Vergleich zu den publizierten Sequenzen mehrere Gene fehlen. Hierzu zählen Gene, die zu gravierenden Veränderungen der äußeren

Struktur der Bakterien führen, und auch Gene, die für die Adhäsion der Meningokokken an humane Zellen unerlässlich sind. Es ist anzunehmen, dass das Zusammenspiel dieser und ggf. weiterer Faktoren von Bedeutung für die Attenuierung apathogener Meningokokken ist.

Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche werden zu neuen Erkenntnissen über die Pathogenität der Meningokokken führen. Die Sequenzinformationen können die Basis für neue diagnostische Ansatzpunkte, aber auch für die Entwicklung neuer Impfstoffe sein. Solche Impfstoffe werden dringend benötigt, da eine umfassende Impfung gegen alle Meningokokken zurzeit noch nicht möglich ist. Eine Publikation der Genomsequenz ist in Vorbereitung.

Literatur

1. Claus et al. (2002) Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 148:1813-1819.
2. Claus et al. (2005) Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J. Infect. Dis.* 191:1263-1271.
3. <http://pubmlst.org/neisserial>

Kontakt

Prof. Dr. Matthias Frosch
Institut für Hygiene und Mikrobiologie
Universität Würzburg
E-mail: mfrosch@hygiene.uni-wuerzburg.de

Umweltkeime – ein genetisches Reservoir für Virulenzfaktoren von Krankheitserregern?

Roy Gross

Einer der wichtigsten Fortschritte der Menschheit in der Neuzeit lag sicherlich in der Erkenntnis, dass einfache hygienische Maßnahmen, wie zum Beispiel die Bereitstellung von sauberem Trinkwasser, den Gesundheitszustand der Bevölkerung drastisch verbessern konnten. Tatsächlich führte eine verbesserte Hygiene bereits vor der Einführung von Antibiotika zu einem deutlichen Rückgang von durch infektiöse Keime verursachter Morbidität bzw. Mortalität. Allerdings führte dies in weiten Teilen der Bevölkerung auch zur falschen Ansicht, dass Bakterien generell gefährlich seien und deswegen immer und überall bekämpft werden müssten.

Heute wissen wir, dass nur ein verschwindend kleiner Teil aller Mikroben für uns Menschen gefährlich werden kann, während die meisten Mikroorganismen für uns harmlos oder sogar nützlich sind. Andererseits sind viele Krankheitserreger wie zum Beispiel der vor allem für Kleinkinder so gefährliche Erreger des Keuchhustens *Bordetella pertussis* eng mit harmlosen Umweltkeimen wie dem kürzlich von uns erstmals beschriebenen Bakterium *Bordetella petrii* (1) verwandt. Diese enge Verwandtschaft von Krankheitserregern und harmlosen Umweltbak-

terien bietet uns durch den sorgfältigen Vergleich der Eigenschaften dieser Bakterien die Möglichkeit zu erforschen, warum der eine Mikroorganismus gefährlich ist, der andere aber nicht.

In unserem Projekt im Rahmen des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik haben wir deshalb die vollständige genetische Information des Umweltkeims *B. petrii* entziffert, um sie mit der kürzlich entschlüsselten Genominformation von *B. pertussis* und anderen pathogenen Bordetella-Arten zu vergleichen. Erste Ergebnisse unserer Untersuchungen ergaben überraschenderweise, dass auch der Umweltkeim *B. petrii* über eine ganze Reihe wichtiger Eigenschaften des gefährlichen Keims verfügt. So kann er Faktoren produzieren, die essentiellen Virulenzfaktoren des Keuchhustenerregers sehr ähneln, wie z.B. das sog. Filamentöse Hämagglutinin, die Fimbrien, das Tracheale Zytotoxin und das virulenzregulatorische BvgAS Signaltransduktionssystem. Zudem finden sich weitere Gene mit Ähnlichkeiten zu Virulenzfaktoren anderer Pathogene, deren Funktion noch nicht bekannt ist.

Das bedeutet, dass Umweltkeime ein genetisches Reservoir für wichtige Virulenzfak-

toren darstellen können, und dass sie bereits zur Evolution von Krankheitserregern wie z.B. *B. pertussis* beigetragen haben oder künftig an der Entstehung neuartiger Krankheitserreger Anteil haben könnten. Die Charakterisierung von eng mit Krankheitserregern verwandten apathogenen Keimen bzw. Umweltbakterien stellt deshalb ein wichtiges neues Arbeitsgebiet dar, das unser Verständnis von bakterieller Pathogenität erheblich erweitern, wichtige Beiträge zur Risikoabschätzung von bislang noch wenig charakterisierten Bakterien leisten und zur Entwicklung von neuen diagnostischen, präventiven und therapeutischen Ansätzen führen wird.

Literatur

1. von Wintzingerode et al. (2001). *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1257-1265.

Kontakt

Prof. Dr. Roy Gross

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Universität Würzburg

E-mail: roy@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Neue Diagnostikverfahren zur Erkennung gefährlicher Colibakterien

Sören Schubert

Das Darmbakterium *Escherichia coli* gehört zur normalen Darmflora des Menschen. Dennoch werden eine Vielzahl bedrohlicher Infektionskrankheiten, wie Harnwegsinfekte, Hirnhautentzündungen und Blutvergiftungen, aber auch schwere Durchfallerkrankungen bei Kindern von Colibakterien verursacht. Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden jährlich weltweit ca. 200 Mio. Erkrankungen von *E. coli* verursacht.

Während der letzten Dekade hat die molekularbiologische Analyse von *E. coli* aus Patientenproben deutlich gemacht, dass die „*E. coli*-Familie“ sich aus einer großen „Mannschaft von Spezialisten“ zusammensetzt, die nicht nur Menschen sondern ganz unterschiedliche Wirte infizieren und unterschiedliche Krankheiten verursachen können. Diese „Spezialisten“ können anhand des charakteristischen Profils ihrer krankheitsverursachenden Faktoren (Pathogenitäts-faktoren), bzw. des zugehörigen Gen-Repertoires verschiedenen Pathotypen zugeordnet werden. Bislang kennt man von diesen Gen-Repertoire nur die Spitze des Eisbergs (1). So ist eine Unterscheidung von harmlosen und gefährlichen *E. coli* Bakterien und eine Differenzierung nach Pathotypen durch konventionelle Methoden bisher nicht möglich gewesen.

In diesem von BMBF geförderten Forschungsverbund werden durch Einsatz moder-

ner molekularer Methoden (DNA-Arrays) erstmals die verschiedenen genetischen Ausstattungen, die für die unterschiedlichen Erkrankungen verantwortlich sind, umfangreich erfasst und zudem neue Pathogenitätsgene charakterisiert.

Die Arbeiten zeigen, dass den harmlosen und pathogenen *E. coli* eine genetische Basisausstattung gemeinsam ist. Etwa ein Drittel des genomischen Bauplans ist aber variabel und genau dort liegt die Grundlage der pathogenen Eigenschaften von *E. coli* (2). Die Analyse dieser genetischen Zusatzausstattung zeigte den interessanten Aspekt, dass ein Instrument zur Schädigung der Wirtszellen - der molekulare Injektionsapparat „Typ III-Sekretionssystem“ – gleichartig bei vielen Pathotypen vorhanden ist, dass jedoch diese molekulare „Spritze“ bei den verschiedenen Pathotypen mit unterschiedlichen Effektorproteinen „geladen“ wird (3, 4). Offensichtlich bestimmen die Eigenschaften dieser „injizierten“ Effektorproteine das Krankheitsbild.

Die Kenntnis dieser molekularen Grundlagen ermöglicht die Entwicklung eines schnellen, hochspezifischen und differenzierten Diagnostikverfahrens auf der Basis neuartiger molekularer DNA-Chips, die eine umfassende Risikobewertung von *E. coli* Isolaten erlauben. Auf diese Art können *E. coli* Isolate aus so verschiedenen Bereichen wie Umwelt, Nahrung

und Gesundheit charakterisiert werden, um „Nützlinge“ von „Ganoven“ zu unterscheiden. Zusätzlich können so erstmals vorausschauende Untersuchungen von Proben bei Risikopatienten durchgeführt werden, um mögliche Infektionsrisiken bereits im Vorfeld zu erkennen und ausschalten zu können.

Literatur

1. Dobrindt et al. (2003) Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* 185:1831-1840.
2. Sorsa et al. (2004). Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 230:203-208.
3. Gärtner and Schmidt. (2004) Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72:6722-6728.
4. Herold et al. (2004) Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:115-121.

Kontakt

Dr. S. Schubert

Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Mikrobiologie
Universität München

E-mail: schubert@pk-i.med.uni-muenchen.de

Die Projektgruppe 7 des PathoGenoMik Netzwerks:

Die Arbeitsgruppen von S. Schubert (München) und U. Dobrindt (Würzburg) setzen sich mit den *E. coli* Erregern von Blutvergiftung (Sepsis) und Harnwegsinfektionen auseinander während in Münster Durchfall-*E. coli* in den Arbeitsgruppen von H. Karch (enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)) und M. A. Schmidt (enteropathogene *E. coli*: persistierende Durchfälle) untersucht werden.

Funktionelle Genomik und Dynamik pathogener *Escherichia coli*: Variabilität und Migration von krankheitsverursachenden Faktoren

M. Alexander Schmidt und Helge Karch

Die meisten Menschen kennen *Escherichia coli* als harmlosen Vertreter der normalen Darmflora. Leider wird häufig übersehen, das Angehörige der Art *E. coli* für eine Vielzahl lebensbedrohlicher Infektionskrankheiten verantwortlich sein können, wie z.B. Hirnhautentzündungen (Meningitiden), Sepsis, Harnwegsinfekte, aber auch schwere Durchfall-erkrankungen, die zum Teil auch mit akutem Nierenversagen einhergehen können. Molekularbiologische Analysen haben es in den letzten Jahren ermöglicht, den 'Werkzeugkasten' der Erreger, der zur Entwicklung der speziellen Krankheitsbilder beiträgt, mit einiger Genauigkeit zu beschreiben.

Durch die Verwendung moderner molekularer Methoden konnten Wissenschaftler des Kompetenznetzwerks PathoGenoMik erstmals auch die Dynamik der jeweiligen genetischen Ausstattungen erfasst, die für die verschiedenen Krankheitsbilder verantwortlich zeichnen.

Enterohämorrhagische *E. coli* können eine hämorrhagische Kolitis und das sich extraintestinal manifestierende hämolytisch – urämische Syndrom (HUS) hervorrufen. Das HUS, ist die häufigste Ursache des akuten Nierenversagens im Kindesalter. Eine kausale Therapie der durch EHEC verursachten Krankheitsbilder gibt es bisher nicht und Impfstoffe sind nicht verfügbar. Antibiotika, die während der Durchfallerkrankung verabreicht werden, erhöhen das Risiko, ein HUS zu entwickeln. Wegen der Schwere der Erkrankungen ist die Diagnostik der EHEC/EPEC und die Klärung der Ätiopathogenese, des Erregerreservoirs und der Übertragungswege sowie die Identifizierung weiterer Virulenzfaktoren von sehr großer Be-

deutung. Die bisherigen Arbeiten zeigen, dass eine an beiden intestinalen Krankheitsbildern essentiell beteiligte Pathogenitätsinsel (LEE: 'locus of enterocyte effacement') in Aufbau, Organisation und Abfolge der Gene hoch konserviert ist. Proteine, die zum charakteristischen Sekretions- und Injektionsapparat gehören, zeigen eine weitgehende Übereinstimmung, während sezernierte und injizierte Effektorproteine eher variabel erscheinen (1-3). Die häufig ausgedehnten flankierenden Bereiche der eigentliche Insel geben gewissermaßen als 'Reisesouvenir' Aufschluß über die zurückliegenden 'Wanderungen' der Pathogenitätsinsel etwa durch andere Erreger und Wirte.

Diese Untersuchungen führten bereits zur Entwicklung eines ersten einfachen und schnellen Verfahrens zur diagnostischen Identifizierung von Durchfall-erregenden *Escherichia coli*. Darüber hinaus wurden zahlreiche neue potentielle Virulenzgene bei EHEC – Stämmen identifiziert und charakterisiert. Hierzu zählen Adhäsine, Varianten der Shiga Toxine, die Pathogenitätsinsel SRL (Shigella Resistance Locus) und ein neues, phagenkodiertes Toxin aus der Familie der „Cytotolethale distending Toxins (4-6). Durch Genomvergleiche im Pathoarray konnte eine Kombination verschiedener EHEC-spezifischer Determinanten identifiziert werden, die eine schnelle und sichere Diagnostik erlauben. Diese Determinanten werden bereits jetzt als molekulare Targets bei der klinisch-mikrobiologischen Untersuchung von EHEC herangezogen. Hierdurch konnten wir innerhalb der EHEC verschiedene Subtypen mit unterschiedlicher Assoziation zum Schweregrad des Krankheitsbildes nachweisen.

Literatur

1. Ide et al. (2003) Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71:1725-1732.
2. Knappstein et al. (2004) a1-Antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 72:4344-4350.
3. Gärtner and Schmidt. (2004) Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 72:6722-6738.
4. Janka et al. (2003) Cytotolethale distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. *Infect. Immun.* 71:3634-3638.
5. Friedrich et al. (2004) Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J. Clin. Microbiol.* 42:4697-4701.
6. Zhang et al. (2005) Transcriptional analysis of genes encoding Shiga toxin 2 and its variants in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:558-561.

Kontakt

Prof. Dr. M. Alexander Schmidt
ZMBE, Institut für Infektiologie
Universität Münster
E-mail: infekt@uni-muenster.de

Prof. Dr. Helge Karch
Institut für Hygiene
Universität Münster
E-mail: hkarch@uni-muenster.de

Die Projektgruppe 7 des PathoGenoMik Netzwerks:

Die Arbeitsgruppen von S. Schubert (München) und U. Dobrindt (Würzburg) setzen sich mit den *E. coli* Erregern von Blutvergiftung (Sepsis) und Harnwegsinfektionen auseinander während in Münster Durchfall-*E. coli* in den Arbeitsgruppen von H. Karch (enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)) und M. A. Schmidt (enteropathogene *E. coli*: persistierende Durchfälle) untersucht werden.

Genotypisierung von ESBL verursachenden β -Laktamasen mittels DNA-Chips zur Schnelldiagnose mikrobieller Antibiotikaresistenzen in der Medizin

Till T. Bachmann, Verena Grimm, Milorad Susa, Cornelius Knabbe und Rolf D. Schmid

Neue Genomdaten in Kombination mit der DNA-Chipanalyse ermöglichen völlig neue Ansätze in der mikrobiellen Diagnostik. Während der Nachweis mikrobieller Antibiotikaresistenzen in der klinischen Routine in der Regel über kulturabhängige, mehrere Tage dauernde Verfahren erfolgt, sind molekularbiologische Verfahren schneller und zuverlässiger. Ein Beispiel hierfür sind die diagnostischen Genotypisierungs-Chips der Projektgruppe 8 des Patho-GenoMik Netzwerkes. Diese liefern Testergebnisse in weniger als vier Stunden und benötigen prinzipiell keine Kultivierung oder Isolation der Mikroorganismen. Sie ermöglichen damit eine prospektive Therapie und geben darüber hinaus wertvolle Daten für die Epidemiologie und Kontrolle der Antibiotikaresistenz. Die Resistenz von Enterobakterien gegenüber Cephalosporinen der neusten Generationen (z.B. Cefotaxim) ist eine der folgenschwersten Antibiotikaresistenzen und wird durch bakterielle β -Laktamasen mit einem erweiterten Spektrum

(extended spectrum beta lactamase (ESBL)) verursacht. ESBLs entstehen hauptsächlich durch Punktmutationen in den Genen der β -Laktamasen mit Namen TEM, SHV, CTX-M und OXA. In vielen Kliniken wird gegenwärtig ein Anstieg der ESBL-Nachweise beobachtet. Damit verbunden treten vermehrt therapeutische wie krankenhaushygienische Probleme auf mit der Folge verlängerter Patientenliegezeiten und zusätzlicher Kosten.

Unsere Forschergruppe hat eine ganze Serie neuer DNA-Chips zur Genotypisierung von β -Laktamasen entwickelt und erreicht damit wesentliche Meilensteine in der Komplettierung eines gesamten ESBL-Chips, welcher durch den Industriepartner Eppendorf AG verwertet werden soll. Die DNA-Chips für den ESBL-Nachweis verwenden die so genannten Single Nucleotid Polymorphism (SNP)-spezifische Oligonukleotidsonden, die in einem 30-minütigen allelspezifischen Hybridisierungsansatz eine Aussage über die Sequenz einer fluoreszenzmarkierten Ziel-DNA zulassen. Die Stärke dieser Antibiotikaresistenzbestimmung liegt auch darin, dass in klinischen Proben gleichzeitig sensitive und resistente Bakterien identifiziert und mehrere Resistenzgene parallel nachgewiesen werden können. In Mischungsversuchen wurde gezeigt, dass dies je nach Variante bis zu einem zehn- bis hundertfachen Überschuss möglich ist.

Zur Evaluierung der DNA-Chips wurden klinische Isolate des Robert Bosch-Krankenhauses Stuttgart sowie von Kliniken in Moskau und Zadar (Kroatien) untersucht und die Ergebnisse mit Standardmethoden der Resistenzbestimmung und DNA-Sequenzierung validiert. In allen 79 klinischen Isolaten konnten die vorhandenen TEM und SHV Gene mittels DNA-Chip identifiziert werden. Dabei wurden TEM-

1, -2, -3, -7, -8 und -116 sowie SHV-1, -2, -3, -4, -5, -7 und SHV-8 Gene nachgewiesen. Interessanterweise konnten neben Einzelresistenzen auch SHV-5 oder SHV-12 Varianten in Gegenwart der parentalen SHV-1 nachgewiesen und bestätigt werden.

In unseren laufenden Chip-Entwicklungen greifen wir verstärkt auf die wachsende Menge von Genominformationen zurück und integrieren neben Resistenz- und Spezies-Markern auch Virulenzgene auf diagnostischen Chips. Darüber hinaus wird das zukünftige Ziel die vollständige Integration der einzelnen Arbeitsschritte in ein Komplettsystem sein, das dann einen erfolgreichen Einzug in die Routine der klinischen Mikrobiologie findet.

Literatur

1. Leinberger et al. (2005) Development of a DNA Microarray for the detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.* (im Druck).
2. Yu et al. (2004) Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42:4083-4091
3. Grimm et al. (2004) Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* 42:3766-3774

Kontakt

PD Dr. Till T. Bachmann
 Institut für Technische Biochemie
 Universität Stuttgart
 E-mail: till.bachmann@itb.uni-stuttgart.de

Prof. Dr. Cornelius Knabbe
 Robert-Bosch-Krankenhaus
 Stuttgart
 E-mail: Cornelius.Knabbe@rbk.de

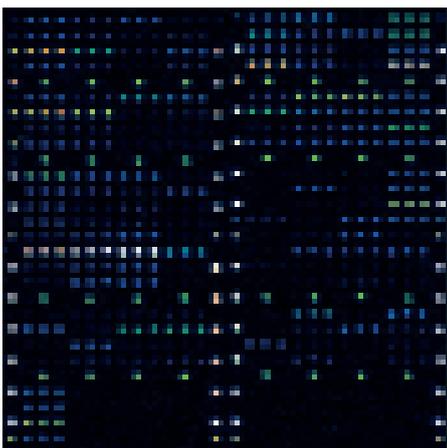


Abb: Beispiel eines TEM-8 Nachweises (ESBL) mit dem TEM-Chip

Derzeit sind DNA-Chips zur Genotypisierung von TEM (~ 650 Spots), SHV (~ 600 Spots) und CTX-M β -Laktamasen (~ 500 Spots) verfügbar und wurden bereits zu einem Gesamtchip inklusive einer Multiplex-PCR integriert. Weitere DNA-Chips für AmpC und OXA vermittelte Resistenzen gegen β -Laktamantibiotika sind derzeit in der Entwicklung.

Oligonukleotidarray für die Diagnostik von Staphylokokken und von Enterokokken

Birgit Strommenger, Guido Werner, Ulrich Nübel und Wolfgang Witte

Beide Erregergruppen, Staphylokokken und Enterokokken, stehen an vorderer Stelle bei Krankenhausinfektionen und haben besondere Bedeutung wegen ihrer Antibiotikaresistenz (methicillinresistente *S. aureus* [MRSA] und glykopeptidresistente Enterokokken [GRE]). Hinzu kommt die zunehmende Verbreitung von com-

munity MRSA mit besonderer Invasivität außerhalb von Krankenhäusern. Die schnelle Diagnostik senkt Kosten durch Verkürzung von Krankenhausaufenthalten sowie die Letalität bei schweren Infektionsverläufen.

Auf der Basis der Kenntnis aus der Genom-Sequenzierung wäre theoretisch mittels DNA-Mikroarrays (3000-4000 Oligocapture probes) das Erstellen umfassender Erregerprofile möglich. Hier setzt jedoch die Zielstellung der Entwicklung von Mikroarrays für die klinisch-bakteriologische Diagnostik Grenzen, da bisherige Verfahren der Markierung von Gesamtzell-DNA nicht die dafür erforderliche Sensitivität (Erfassen von 10^3 - 10^4 -Bakterien) erreichen. Dies ist aber möglich durch eine Markierung ausgewählter Resistenz- und Virulenz assoziierter Gene mittels Multiplex-PCR und nachfolgender random-primed PCR mit high-prime labelling.

Die Array-Module für Staphylokokken enthalten verschiedene DNA-Sonden um genau die Gene zu detektieren, die für die Resistenz gegen verschiedene Antibiotika verantwortlich sind. Außerdem wurden solche Sonden hinzugefügt, die in Beziehung zu verschiedenen Krankheiten stehen und auch solche die für

eine eindeutige Bestimmung der Bakterienart notwendig sind.

Bei den Arrays, mit denen die Enterokokken auf Resistenzen geprüft werden sollen, werden neben den für die verschiedenen Antibiotikaresistenzen verantwortlichen Genen, wiederum auch solche aufgenommen, die eine Bestimmung der Bakterienart erlauben und ein weiteres Gen, das Stämme mit einer besonderen Epidemizität charakterisiert.

Literatur

1. Strommenger et al. (2003) Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4089-4094
2. Werner et al. (2004) Molecular detection of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* by use of 5'nuclease real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4327-4331

Kontakt

Prof. Dr. Wolfgang Witte
Robert Koch Institut
Wernigerode
E-mail: WitteW@rki.de

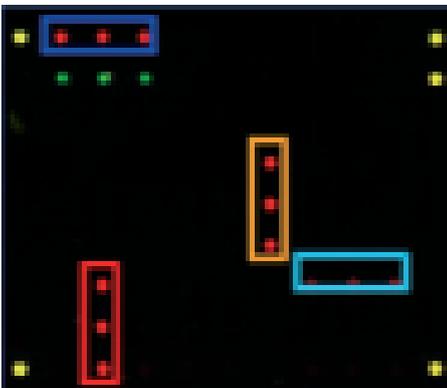


Abb: Beispiel für das Mikroarray-Modul für die Empfindlichkeitsprüfung von Staphylokokken gegen Antibiotika und dem Ergebnis mit Signalen der Hybridisierung. Positive Signale für *mecA* (Methicillinresistenz), *ermC* (MLS-Resistenz) und die Punktmutation in *gyrA* (Chinolonresistenz).

Konzeption der Staphylokokken-Maikroarrays

Die Array-Module (Oligo-arrays mit capture probes von 22 – 26 Basenpaaren) für Staphylokokken enthalten neben capture probes für 16S rDNA weitere Sonden (probes) für folgende Resistenzgene: *mecA* (Methicillinresistenz), *ermA*, *ermB*, *ermC* (Makrolid-Lincosamidin-Streptogramin-B-Resistenz), *aacA-aphD* (Aminoglykosidresistenz), *vatA*, *vatB*, *vatC* (Streptogramin-A-Resistenz), *tetK*, *tetM* (Oxytetracyclinresistenz), *mup* (Mupirocinresistenz), *fur1* (Fusidinsäureresistenz) sowie für SNP's in *rpoB* (Resistenz gegen Rifampicin), in der V-loop der 23S rRNA (Linezolidresistenz) und in *gyrA* (Chinolonresistenz). Weiterhin wurden Multiplex-PCR und Arraymodule für folgende Virulenz-assoziierten Gene etabliert, bei denen eine Beziehung zu bestimmten Krankheitsbildern (prädiktive Aussage) erwiesen ist: *tst* (Toxic-Schock-Syndrom), *eta*, *etb* (exfoliative Dermatitis), *lukS-lukF* (Panton-Valentin-Leukozidin bei nekrotisierenden Infektionen).

Konzeption der Enterokokken-Maikroarrays

Die Array-Module für Enterokokken enthalten taxonomisch-relevante Sonden für die Species-Identifizierung (D-Ala-D-Ala-Ligasen), sowie für die folgenden Resistenzgene: *vanA*, *vanB* (Glykopeptidresistenz), *ermB* (Streptogramin-B-Resistenz), *vatD*, *vatE* (Streptogramin-A-Resistenz), *aacA-aphD* (Aminoglykosid-Hochresistenz), *aadE* (Aminoglykosidresistenz), SNP's in der V-loop der 23S rRNA (Linezolidresistenz) sowie die Virulenz-assoziierten Gene *esp* (enterococcal surface protein) und *hyl* (Hyaluronidase). Als Marker für die CC17-Population mit besonderer Epidemizität (definiert über Multilocus-Sequenz-Typisierung) wurde das *purK-1*-Allel aufgenommen.

Die Evolution der Chlamydien – Einblicke in die Entwicklungsgeschichte bedeutender bakterieller Krankheitserreger

Matthias Horn und Michael Wagner

Chlamydien gehören mit jährlich über 60 Millionen Infektionen zu den bedeutendsten bakteriellen Krankheitserregern. Deren erst kürzlich entdeckten, nächsten Verwandten leben als Symbionten in frei lebenden Amöben und teilen ihren einzigartigen, intrazellulären Entwicklungszyklus. Die vergleichende und phylogenetische Untersuchung des Genoms eines dieser Chlamydien-verwandten Symbionten erlaubte nun neue Einblicke in die Evolution der Chlamydien und deren intrazellulären Lebensstils (1).

Symbiotische Chlamydien besitzen mit 2,4 Mb im Vergleich zu pathogenen Chlamydien (1-1,2 Mb) ein deutlich größeres Genom, das keine Anzeichen eines andauernden Prozesses der Reduktion der Genomgröße und - mit einer Ausnahme - keine Hinweise auf den kürzlichen Erwerb neuer Gene aufweist. Daher erlaubt der Vergleich des Genoms symbiotischer Chlamydien mit den Genomen der humanpathogenen Chlamydien Rückschlüsse auf die genetische Ausstattung und somit den Lebensstil des letzten gemeinsamen Vorfahren aller Chlamydien, der im Präkambrium, vor etwa 700 Millionen Jahren, gelebt haben dürfte.

Auffällig erscheint zunächst die große Zahl an im Genom symbiotischer Chlamydien codierter Proteine, die Ähnlichkeit zu Proteinen von pflanzlichen Plastiden oder Cyanobakterien aufweisen (9,4% aller Proteine). Diese deutet auf eine komplexe evolutionäre Beziehung zwischen Chlamydien und Cyanobakterien (oder Plastiden) hin und lässt vermuten, dass Chlamydien im Laufe ihrer Evolution – zumindest vorübergehend - mit Pflanzen assoziiert waren.

Trotz des größeren Genoms fehlen den symbiotischen wie den pathogenen Chlamydien Gene zur Durchführung einer Reihe essentieller Stoffwechselwege. Daher sind sie auf die Aufnahme entsprechender Metabolite (Nukleotide, einige Aminosäuren und Kofaktoren) aus ihren eukaryotischen Wirtszellen angewiesen, ein Schicksal, das moderne Chlamydien offenbar mit ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren teilen, der, wie phylogenetische Untersuchungen belegen, bereits an intrazel-

luläres Leben in frühen Eukaryoten angepasst war. Bezüglich einiger Aspekte (wie etwa dem Zitronensäurezyklus und der oxidativen Phosphorylierung) war der letzte gemeinsame Vorfahre der Chlamydien jedoch deutlich unabhängiger von seiner Wirtszelle.

Neben speziellen Membranproteinen, die den Import von ATP (im Austausch gegen ADP) in die Bakterienzelle katalysieren (2), waren bereits weitere Mechanismen zur Interaktion mit eukaryontischen Wirtszellen im gemeinsamen Vorfahren der symbiotischen und pathogenen Chlamydien angelegt. So stammt unter anderem das Typ-III-Sekretionssystem, eine Art molekulare Spritze, die Effektorproteine in die Wirtszelle schleust, aus dieser Zeit. Auch eine spezifische Protease, mit deren Hilfe pathogene Chlamydien die Signalkaskade der Wirtszelle zur MHC-Expression unterbrechen, findet sich im Genom der symbiotischen Chlamydien und war bereits im Genom des Chlamydien-Urahnen codiert. Grundlegende Strategien intrazellulärer Bakterien zur Interaktion mit eukaryotischen Wirtszellen wurden also lange vor der Entstehung höherer Tiere und Pflanzen im Zusammenspiel mit frühen Einzellern entwickelt. Dieselben Mechanismen werden noch heute von modernen pathogenen Chlamydien bei der Infektion des Menschen verwendet.

Die vergleichende und phylogenetische Genomanalyse von humanpathogenen Bakterien und deren apathogenen Verwandten lieferte am Beispiel der Chlamydien neue Einblicke in die Evolution dieser bedeutenden Krankheitserreger. Wie das durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung der Bundesrepublik Deutschland im Rahmen des Kompetenznetzes Pathogenomik geförderte Projekt zeigt, bieten sich Chlamydien-verwandte Symbionten frei lebender Amöben als hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung der Interaktion zwischen intrazellulären Bakterien und ihren Wirtszellen an. So bildeten diese Untersuchungen unter anderem die Grundlage für die kürzliche Entdeckung und Charakterisierung des ersten Membranproteins, das intaktes NAD+

importiert und somit integraler Bestandteil einer einzigartigen Anpassung symbiotischer Chlamydien an ihren intrazellulären Lebensstil ist (3).

Literatur

1. Horn et al. (2004) *Illuminating the evolutionary history of chlamydiae*. *Science* 304:728-730.
2. Schmitz-Esser et al. (2004) *ATP/ADP translocases: a common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to chlamydiae and rickettsiae*. *J. Bacteriol.* 186:683-691.
3. Haferkamp et al. (2004) *A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to chlamydiae*. *Nature* 432:622-625.

Kontakt

Dr. Matthias Horn
 Department für Mikrobielle Ökologie
 Universität Wien
 E-mail: horn@microbial-ecology.net

Prof. Dr. Michael Wagner
 Department für Mikrobielle Ökologie
 Universität Wien
 E-mail: wagner@microbial-ecology.net

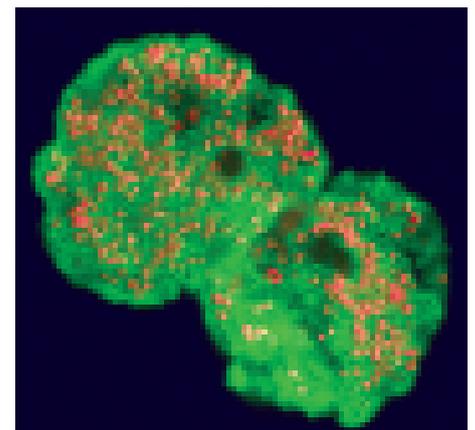
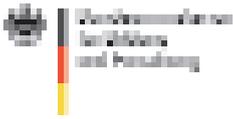


Abb: Symbiotische Chlamydien innerhalb ihrer natürlichen Wirtszellen, frei lebenden Amöben. Chlamydien und Amöben wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und spezifischen Sonden angefärbt; dargestellt ist ein optischer Schnitt durch die Wirtszelle (© Science/AAAS).



DFG
Forschungsbereich
Genetik und
Evolution



BiG



Impressum

GenomXPress Sonderausgabe · September 2005

Herausgeber

Die wissenschaftlichen Koordinierungsstellen
des Förderprogramms Genomforschung an
Mikroorganismen (GenoMik)

Redaktion

Dr. Werner Selbitschka (**GenoMik Bielefeld**)
Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Genetik
Postfach 100131, 33501 Bielefeld
werner.selbitschka@genetik.uni-bielefeld.de

Dr. Petra Ehrenreich (**GenoMik Göttingen**)
Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie
und Genetik
Grisebachstrasse 8, 37077 Göttingen
pehrenr@gwdg.de

Dr. Dietrich Trzeciok (**GenoMik Göttingen**)
Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie
und Genetik
Grisebachstrasse 8, 37077 Göttingen
dtrzeci@gwdg.de

PD Dr. Michael Kuhn (**PathoGenoMik Würzburg**)
Universität Würzburg, Biozentrum
Am Hubland, 97074 Würzburg
kuhn@biozentrum.uni-wuerzburg.de

Elena Strzelczyk, (**GABI Geschäftsstelle**)
c/o Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie
Am Mühlberg 1, 14476 Golm
strzelczyk@mpimp-golm.mpg.de

Der Inhalt von namentlich gezeichneten Artikeln liegt in Verantwortung des jeweiligen Autors.

ISSN 1617-562X Dieser Newsletter wird aus Mitteln des BMBF gefördert.
Layout & Satz: Dirk Biermann, biermann@potsdam.de · Druck: sd:k Satz & Druck, Teltow