



**A**  
IM **B**  
**M**ETAGENOM

**N**  
**T**  
**E**  
**U**  
**R**

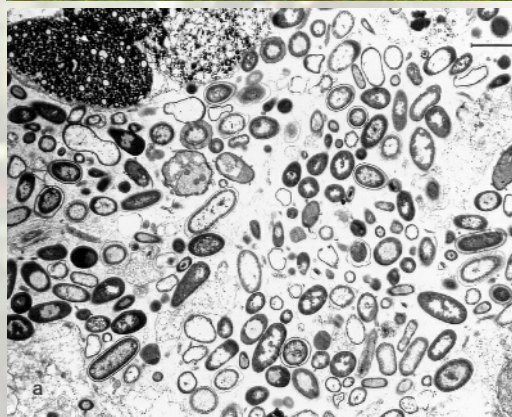
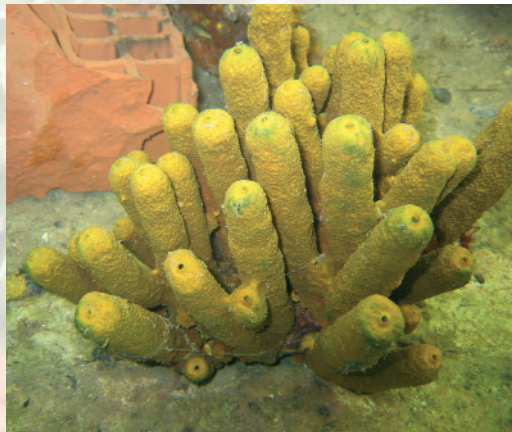
NICHT KULTIVIERTE  
BAKTERIEN - DIE  
VERSTECKTE VIELFALT

**M**ikroorganismen sind die ältesten zellulären Organismen auf diesem Planeten. Über fast zwei Milliarden Jahre hinweg waren sie die alleinigen Herrscher und konnten sich an eine beispiellose Vielfalt von Lebensräumen anpassen, die von den Eiswüsten der Antarktis bis zu den Temperaturhöhlen der Tiefseevulkane reichen. Die Vielseitigkeit des mikrobiellen Stoffwechsels spiegelt sich auch wider in einer breiten Palette an Arzneimitteln, die in den letzten 50 Jahren ausgehend von Sekundärstoffwechselprodukten aus Bakterien-Kulturen von Naturstoff-Chemikern entwickelt wurden. Für die Gewinnung neuer Wirkstoffe werden die Mikroorganismen üblicherweise auf Labormedien angezogen und Extrakte ihrer Kulturen auf biologische Aktivität hin durchmustert. Bei positiven Befunden werden die entsprechenden Bakterien in so genannten Fermentern oder Bioreaktoren im Maßstab von 10 bis 200 Litern angezogen, um ausreichend Biomasse für die Isolierung und Strukturaufklärung der Wirkprinzipien zu erhalten. Auf diese Weise konnte in der Vergangenheit eine Vielzahl an neuen Wirkstoffen aus Bakterien-Kulturen gewonnen werden.

Inzwischen zeichnet sich jedoch ab, dass die Strukturvielfalt der Naturstoffe aus den gut kultivierbaren Bakterien begrenzt ist und der Forschungsaufwand zur Identifizierung neuartiger Wirkstoffe - insbesondere neuer Antibiotika - stetig steigt mit dem Ergebnis, dass immer mehr Pharmaunternehmen das Interesse an bakteriellen Naturstoffen verlieren. Dies ist alarmierend, denn es gibt zurzeit keine überzeugende Alternative, um den wachsenden Resistenzraten infektiöser Mikroorganismen gegenüber gebräuchlichen Antibiotika zu begegnen.

### Die mikrobiologische Revolution

Den Entwicklungen der letzten Jahre ist es zu verdanken, dass sich unser Bild von Bakterien grundlegend gewandelt hat. Molekulare Methoden wie *16S-rRNA-Analyse* und *in situ-Hybridisierung* erlaubten es erstmals, Mikroorganismen zu studieren, ohne sie vorher zu kultivieren. Die Arbeiten enthüllten eine völlig unerwartete, spektakuläre Vielfalt. Es wurde schnell deutlich, dass in jedem beliebigen Lebensraum gewaltige Zahlen neuartiger Mikroben entdeckt werden können, gegen die der Anteil kultivierter Vertreter verschwindend gering ist. Man schätzt heute, dass in Bodenhabitaten 99,9% der mikrobiellen Arten bislang nicht kultivierbar sind. Damit müssen nicht nur die bislang angenommenen Daten zur Biodiversität, sondern auch unsere Vorstellungen über die mikrobielle Biomasse erheblich korrigiert werden: Untersuchungen von Tiefseebohrkernen führten zu der Erkenntnis, dass Mikroorganismen wahrscheinlich den größten Teil der Biomasse unserer Erde ausmachen.



Der mediterrane Schwamm *Aplysina aerophoba* (oben) und mit ihm assoziierte mikrobielle Symbionten (unten, elektronenmikroskopische Aufnahme). Die meisten Vertreter dieses hochdiversen Bakterienkonsortiums sind bisher nur aus Schwämmen bekannt.

Angesichts der Tatsache, dass Mikroorganismen unter allen Organismen über den variationsreichsten Metabolismus verfügen, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass wir möglicherweise den Sekundärstoffwechsel bislang noch nicht einmal ansatzweise erforscht haben. Dass bisher nicht kultivierbare Mikroorganismen tatsächlich eine aussichtsreiche Quelle für neuartige Wirkstoffklassen sein können, lässt sich durch eine Reihe von Arzneimittel-Kandidaten untermauern, die aus niederen Tieren wie zum

### *16S-rRNA-Genanalyse*

Eine Methode zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse von Mikroorganismen. Die 16S-rRNA-Gensequenz dient dabei als Verwandtschaftsmarker.

### *In situ-Hybridisierung*

Bei dieser Methode werden Bakterien mit einer Fluoreszenz-markierten Sonde hybridisiert und spezifisch und kultivierungsunabhängig in einer Originalprobe sichtbar gemacht.

### *Sekundärstoffwechsel*

Synthetische Prozesse, deren Endprodukte, die Sekundärmetabolite, keine direkte Rolle in der Ökonomie der lebenden Zelle haben. Während der Primärmetabolismus in allen lebenden Organismen mehr oder weniger konserviert ist, ist der Sekundärmetabolismus oft limitiert auf niedere Lebensformen und dann auch stammspezifisch.

**Expressionswirt**

Ein kultivierbares Bakterium, das zur Expression von rekombinanten Genen verwendet wird.

**Funktionsbasiertes Screening**

Das Durchmustern oder „Screenen“ einer DNA-Bibliothek nach biologischen Aktivitäten und anderen Eigenschaften.

**Klon**

Durch ungeschlechtliche Vermehrung entstandene und somit genetisch identische Nachkommenschaft eines einzelnen Individuums.

**Metagenom**

Gesamtheit des genetischen Materials von Organismen, die nicht in Kultur gebracht werden können, z.B. aus Erde oder aus anderen mikrobiellen Vergesellschaftungen.

**Metagenom-Bank / Metagenom-Bibliothek**

Sammlung von Klonen, die verschiedene Abschnitte eines Metagenoms als Fremd-DNA tragen.

Beispiel marinen Schwämmen und Manteltierchen isoliert wurden und für die bakterielle Symbionten als die tatsächlichen Produzenten wahrscheinlich sind. Die frühere Annahme, dass mit der Erschöpfung des Naturstoff-Reservoirs einiger weniger Mikroorganismen-Gruppen Bakterien nun „leergeforscht“ seien, erweist sich damit immer mehr als unbegründet. Die Erschließung des bislang noch nicht abzuschätzenden chemischen Potenzials ist jedoch nicht einfach, sondern erfordert neuartige kultivierungs-unabhängige Techniken, die hier vorgestellt werden sollen.

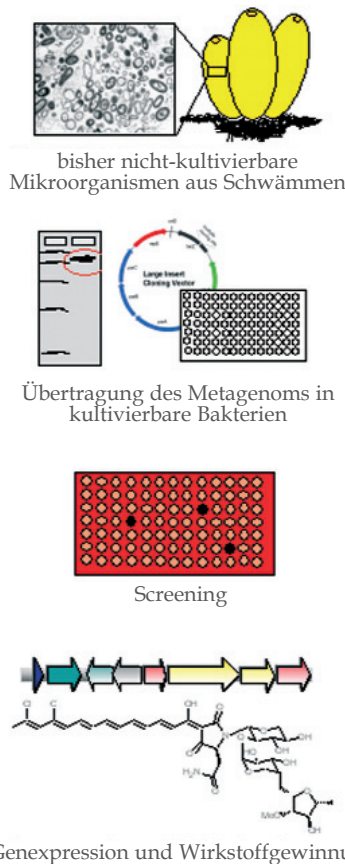
**Das Metagenom**

Das grundlegende Prinzip der meisten Techniken zur Erschließung der bakteriellen Vielfalt ist die Isolierung der Gesamt-DNA - des sogenannten **Metagenoms** - einer Umweltprobe und ihre Übertragung in kultivierbare Bakterien. Falls die transferierte Erbinformation die Anweisung zum Zusammenbau ei-

nes Wirkstoffs enthält, kann der neue Wirtsorganismus dieser „Umwelt-DNA“ anschließend für die Produktion der Substanz in Bioreaktoren gezüchtet werden. Allerdings sind die technischen Herausforderungen dieser Strategie gewaltig: Umweltproben enthalten gewöhnlich eine sehr große Anzahl unterschiedlichster Organismen, aus deren Genomen immer nur relativ kurze Abschnitte in das Zielbakterium übertragen werden können. Das Aufspüren der gewünschten Wirkstoffgene gleicht daher der sprichwörtlichen Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Der Standardvorgehensweise folgend legt man zunächst **Metagenom-Bibliotheken** an, große Sammlungen von **Klonen** des Wirtes, die jeweils unterschiedliche Abschnitte des Metagenoms beherbergen. Zur Identifizierung des korrekten Klons können die DNA-Bibliotheken anschließend unterschiedlichen Auswahlverfahren oder Screenings unterzogen werden.

**Funktionsbasierte Screenings**

Über **funktionsbasierte Screenings** können zum Beispiel neue Antibiotika gefunden werden: Wenn ein Klon mit Hilfe der eingebrachten Fremd-DNA eine antibakterielle Substanz produziert, so bilden sich Wachstumshemmhöfe um diesen Klon, wenn er auf ein Medium gesetzt wird, in das ein bakterieller Testkeim eingesät wurde. Dieser Weg hat schon zur Isolierung neuer Vertreter aus der Familie der Turbomycine geführt, allerdings müssen für einen erfolgreichen Durchbruch noch eine Reihe methodischer Probleme aus dem Weg geräumt werden. So enthalten die Metagenom-Bibliotheken gewöhnlich nur eine geringe Anzahl positiver Klone. Auch sind die bisher isolierten Substanzen strukturell einfach aufgebaut, da sie nur in sehr kurzen Biosynthese-Sequenzen gebildet werden. Eine der Ursachen dafür ist, dass bisher hauptsächlich *E. coli* als **Expressionswirt** verwendet wurde. *E. coli* ist zwar von allen Bakterien molekularbiologisch am besten charakterisiert und gentechnisch am leichtesten zu handhaben, für die Biosynthese von pharmakologisch wichtigen Substanzklassen wie zum Beispiel Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden ist er aber ungeeignet. Dieser Nachteil sollte allerdings in Zukunft durch die Wahl zusätzlicher Expressionswirte aus unterschiedlichen taxonomischen Gruppen gelöst werden. Weiterhin ist die maximale Größe der



Die Suche nach Wirkstoffen in nicht-kultivierten Bakterien. Nach Extraktion aus Umweltproben, hier z.B. einem Meeresschwamm, wird die DNA in geeignete Vektoren kloniert und in ein kultivierbares Bakterium übertragen. Anschließend werden entweder Klone mit veränderten Eigenschaften (Farbe, antibiotische Aktivität, usw.) ausgewählt oder über Sequenzanalyse nach spezifischen Genklassen gesucht.



Screening nach neuen Funktionen oder Verbindungen als Ausgangspunkt neuer Verfahrensentwicklungen

Umwelt-DNA-Fragmente bisher auf ca. 80 KB beschränkt. **Biosynthese-Gencluster** strukturell hochkomplexer Wirkstoffe sind jedoch häufig wesentlich größer und können gegenwärtig noch nicht vollständig funktionell exprimiert werden. Die Entwicklung neuartiger Verfahren zur Isolierung, Klonierung und stabilen Expression hochmolekularer Umwelt-DNA ist daher eine wichtige Aufgabe, die mit Hilfe innovativer molekularbiologischer Ansätze gelöst werden muss.

### Sequenzbasierte Screenings

Der Großteil bakterieller Wirkstoffe wird von nur wenigen unterschiedlichen Enzymfamilien erzeugt. Beispiele für solche Enzyme sind Polyketidsynthetasen, die zu Naturstoffen wie Erythromycin, Avermectin oder Doxorubicin führen, und nichtribosomale Peptidsynthetasen, mit deren Hilfe ***β-Lactam-Antibiotika***, Vancomycin oder Bleomycin gebildet werden. **Sequenzbasierte Screenings** von Metagenombibliotheken, die auf Sequenzhomologien zu solchen Enzymen beruhen, können daher zur gezielten Isolierung potenzieller Wirkstoff-Gene führen. Besonders vielversprechend ist dieser Ansatz bei metagenomischer DNA aus wirbellosen Tieren, da diese häufig mit einer Vielzahl an Bakterien assoziiert leben. Beispielsweise können bei Mee-

resschwämmen bis zu 40% der Biomasse aus Mikroorganismen bestehen. Daher können diese Tiere auch als „mikrobielle Fermenter“ betrachtet werden, deren genetisches und biotechnologisches Potenzial es auszuloten gilt. Insbesondere aus wirbellosen marinen Tieren sind schon eine Reihe vielversprechender, hochkomplexer Wirkstoffe isoliert worden, die als Kandidaten für eine klinische Entwicklung in Frage kommen, falls denn genügend Substanz-Mengen verfügbar wären. Wenn nun - wie in vielen Fällen vermutet - die tatsächlichen Produzenten der Zielsubstanzen bislang nicht kultivierbare Bakterien sind, sollten die Wirkstoffe durch die gezielte Klonierung der Biosynthese-Gene und ihre Expression in einem kultivierbaren Bakterium in praktisch unbegrenzten Mengen im Bioreaktor hergestellt werden können. Damit sind Lösungen für eine ökologisch nachhaltige Produktion in greifbarer Nähe gerückt, denn bislang gibt es kaum Beispiele, wie aus Tieren isolierte Wirkstoffe ohne Schäden für die Umwelt in größeren Mengen zugänglich gemacht werden können - es sei denn durch chemische Synthese. Dieser Ausweg kommt für hochkomplexe Wirkstoffe unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten aber nicht in Betracht.

Wie begründet die Hoffnung ist, aus Tieren isolierte pharmakologisch vielversprechende Substanzen durch Fermentation zugänglich machen zu können, zeigt das folgende



### ***β-Lactam-Antibiotika***

Verbindungsklasse mit charakteristischem Strukturelement, die die Bakterienzellwandbildung inhibieren.

### ***Biosynthese-Gencluster***

Gruppe von benachbarten Genen, die für die an der Synthese eines Naturstoffes beteiligten Proteine codieren.

### ***KB (Kilobasen)***

Einheit zur Beschreibung der Größe von DNA.

### ***Sequenzbasiertes Screening***

Das Durchmustern oder „Screenen“ einer DNA-Bibliothek nach bestimmten Gensequenzen.

Moderne Bioreaktoren ermöglichen die nachhaltige Produktion von Grund- und Feinchemikalien.



Der Kurzflügelkäfer *Paederus fuscipes* (links) setzt Pederin zur Verteidigung gegen Feinde ein. Diese Substanz, ein hochaktiver Antitumorwirkstoff, wird von bisher nicht-kultivierbaren symbiontischen Bakterien produziert, die im Inneren des Käfers leben. Ähnliche bioaktive Substanzen werden auch von Bakterien des Meeresschwamms *Theonella swinhoei* (rechts) gebildet. Metagenomische Studien haben zur Isolation der Gene geführt, die für die Produktion der Naturstoffe codieren.



Beispiel: Pederin und Pederin-verwandte Antitumor-aktive Wirkstoffe wurden sowohl in Käfern der Gattung *Paederus* als auch in Meeresschwämmen gefunden. Die Klonierung und Sequenzierung der Biosynthese-Gene legt nahe, dass in beiden Fällen bisher nicht kultivierbare bakterielle Symbionten die Wirkstoffe erzeugen. Weder für Pederin, dessen Strukturaufklärung seinerzeit die Extraktion von 25 Millionen Käfern forderte, noch für die übrigen Vertreter dieser Substanzgruppe existieren zurzeit nachhaltige Herstellungsverfahren. Damit sind die nächsten Arbeitsschritte klar vorgegeben: Es gilt, die Wirkstoff-Gene in einem leicht kultivierbaren Bakterium funktionell zu exprimieren, um Wirkstoffmengen in die Hand zu bekommen, die eine pharmakologische Evaluation ermöglichen.

Wirkstoffen aus der nahezu unerschlossenen Organismenvielfalt unseres Planeten zu nutzen.

.....  
Ute Hentschel und Jörn Piel

Eine gezielte Isolierung bestimmter Biosynthese-Genfamilien könnte aber auch zur Entdeckung ganz neuer Wirkstoffe aus Umwelt- oder Symbionten-DNA führen, denn die Sequenzierung der isolierten Gene erlaubt Rückschlüsse darauf, ob sie die Biosynthese eines bereits bekannten Naturstoffs kodieren, zu einem neuen Vertreter einer pharmakologisch wichtigen Substanzfamilie gehören oder sogar für einen völlig neuartigen Strukturtyp stehen. Die Entwicklung von Hochdurchsatz-Verfahren für sequenzbasierte Screenings, effiziente Genanalysen und die Etablierung neuartiger Systeme für die Routine-Expression von Genen aus exotischen Bakterien-Gruppen werden in Zukunft ermöglichen, das bislang noch versteckte Potenzial zur Synthese von neuen

## Weiterführende Literatur

---

Piel J: Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals (2006), *Curr Med Chem.* **13**(1), 39-50

Piel J: Bakterielle Wirkstoff-Fabriken in Tieren (2005), *Naturw. Rundsch.* **58**, 5-11

Schmidt EW: From chemical structure to environmental biosynthetic pathways: navigating marine invertebrate-bacteria associations (2005), *Trends Biotechnol.* **23**(9), 437-440

König GM, Kehraus S, Seibert SF, Abdel-Lateff A, Müller D: Natural products from marine organisms and their associated microbes (2006), *Chembiochem.* **7**(2), 229-238

Salomon CE, Magarvey NA, Sherman DH: Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery (2004), *Nat Prod Rep.* **21**(1), 105-121

Scheuermayer M, Pimentel-Elardo S, Fieseler L, Grozdanov L, Hentschel U: Microorganisms of sponges: phylogenetic diversity and biotechnological potential. In: *Biotechnology of Marine Natural Products* (2006), Proksch P, Müller WEG (Hrsg.), Horizon Bioscience, Norfolk (England) pp. 289-312

## Internetlinks

---

The Science Creative Quarterly  
[www.scq.ubc.ca/?p=509](http://www.scq.ubc.ca/?p=509)

Diversa Corp.  
[www.diversa.com/Pages/Technology/Overview/TechOverview.html](http://www.diversa.com/Pages/Technology/Overview/TechOverview.html)

Zentrum für Infektionsforschung - Institut für Molekulare Infektionsbiologie  
[www.infektionsforschung.uni-wuerzburg.de/hentschel/hentschel.htm](http://www.infektionsforschung.uni-wuerzburg.de/hentschel/hentschel.htm)

Universität Bonn - Arbeitskreis Prof. Dr. Jörn Piel  
[www.chemie.uni-bonn.de/oc/ak\\_piel/index-de.html](http://www.chemie.uni-bonn.de/oc/ak_piel/index-de.html)

Health Science Center der University of Utah  
[www.pharmacy.utah.edu/medChem/faculty/schmidt/index.html](http://www.pharmacy.utah.edu/medChem/faculty/schmidt/index.html)