

Antibiotikaforschung

Aktuelle Methoden in der antibakteriellen Naturstoffforschung

HEIKE BRÖTZ-OESTERHELT¹, CHAMBERS HUGHES¹, PETER SASS¹, EVI STEGMANN¹, NADINE ZIEMERT²

¹ MIKROBIELLE WIRKSTOFFE, INTERFAKULTÄRES INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND INFektionsMEDIZIN (IMIT), UNIVERSITÄT TÜBINGEN

² TRANSLATIONALE NATURSTOFFGENOMIK, INTERFAKULTÄRES INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND INFektionsMEDIZIN (IMIT), UNIVERSITÄT TÜBINGEN

Antibacterial natural products with novel chemical structures and unprecedented mechanisms of action inspire antibiotic drug discovery and form valuable tools for studying bacterial physiology. New technologies are being developed and improved to access untapped sources of new compounds, accelerate their biological and chemical characterization, and rapidly dereplicate already known compounds. Nature still holds many unknown antibiotics for us to discover and explore.

DOI: 10.1007/s12268-023-1998-4
© Die Autorinnen und Autoren 2023

■ Antibiotika tragen maßgeblich zur Steigerung unserer Lebenserwartung bei, nicht nur bei bakteriellen Infektionen, sondern auch zum Schutz bei medizinischen Eingriffen. Allerdings bedrohen steigende Antibiotikaresistenzen unseren Therapiestandard und erhöhen den Bedarf an neuen Wirkstoffen [1]. Die meisten Antibiotikaklassen basieren auf mikrobiellen Naturstoffen. Diese von Bakterien und Pilzen produzierten Syntheseprodukte, auch als Sekundärmetabolite, spezielle Metabolite oder vereinfacht mikrobielle Naturstoffe bezeichnet, eignen sich besonders gut als Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Antibiotika. Dies liegt an der seit Jahrtausenden ablaufenden Ko-Evolution zwischen Mikroorganismen, die Naturstoffe synthetisieren, und anderen Mikroorganismen, die durch diese Naturstoffe gehemmt werden. Wir profitieren davon, dass die Natur diese Substanzen bereits in Bezug auf besonders empfindliche Zielstrukturen, die Wirkstärke der Antibiotika und das Eindringen der Substanzen in die Bakterienzellen optimiert hat.

Zwar sind die leicht zugänglichen Naturstoffe längst bekannt, doch sagen Hochrechnungen voraus, dass es noch sehr viele unentdeckte Wirkstoffe gibt. Zur Suche nach

neuartigen Antibiotikaklassen nutzen und entwickeln wir neue Technologien auf allen Ebenen: von der Vorhersage möglicher neuer Wirkstoffe, über deren Produktion, Reinigung, strukturelle und mechanistische Charakterisierung, bis hin zur schnellen Identifizierung der Zielstruktur und dem Abschluss bereits bekannter Substanzen.

Genomik in der Antibiotika-Forschung: datengestützter Ansatz

Die Bioinformatik ermöglicht einen datengestützten Ansatz und beschleunigt die Identifizierung potenzieller Kandidaten und das Verständnis deren Wirkmechanismen. Mittels *Genome Mining* untersuchen wir Genomsequenzen von Mikroorganismen auf das Vorhandensein von Genen zur Synthese von Naturstoffen und identifizieren Biosynthesegencluster (BGCs), die typischerweise die Gene zur Biosynthese, Regulation, Transport und Eigenresistenz enthalten. Durch den Abgleich mit vorhandenen Datenbanken erkennen wir BGCs, die für bereits bekannte Naturstoffe codieren, was Zeit und Ressourcen spart und die Suche auf vielversprechende unbekannte Kandidaten fokussiert [2]. Mit unserer Software können wir Transkriptomdaten für die Vorhersage von Regula-

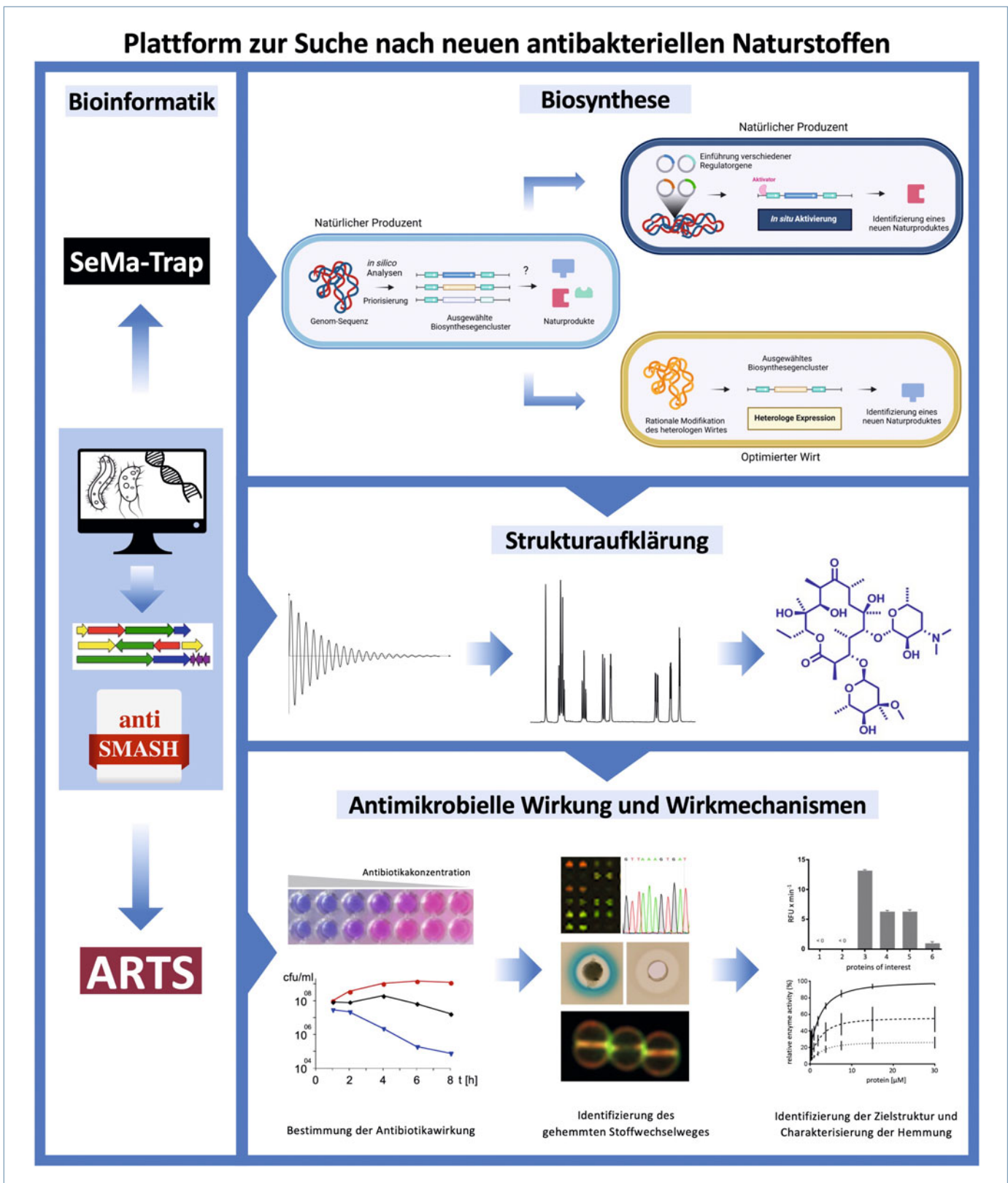
tionsmechanismen nutzen und damit die Produktion der Naturstoffe fördern [3]. Strukturvorhersagen helfen uns, die chemische Aufreinigung der produzierten Moleküle zu beschleunigen. Mithilfe unserer Software ARTS können wir Eigenresistenzvermittelnde Gene in den BGCs identifizieren [4] und dadurch wichtige Hinweise auf mögliche Zielstrukturen der codierten Wirkstoffe erhalten.

Biosynthetische Herstellung und Modifikation

Nach der *in silico*-Identifizierung interessanter BGCs besteht die Herausforderung darin, die entsprechenden Naturstoffe in ausreichender Menge für die weitere Charakterisierung zu gewinnen. Häufig werden Naturstoffe von den natürlichen Produzenten unter Laborbedingungen nur in geringen Mengen oder gar nicht produziert. Um die Transkription solcher BGCs zu aktivieren, exprimieren wir z. B. eine Bibliothek diverser Aktivatorgene in potenziellen Naturstoffproduzenten [5]. Die heterologe Expression von BGCs ist eine weitere Methode zur Optimierung der Produktion. Heterologe Wirte sind an die Naturstoffsynthese angepasst und genetisch leicht zugänglich. Durch ihre gezielte Manipulation können wir Produktionsraten oft deutlich einfacher verbessern als bei natürlichen Produzenten [6]. Ein wesentlicher Engpass bei der Naturstoffproduktion ist die Verfügbarkeit von Bausteinen aus dem Primärstoffwechsel. Durch die Umleitung der primären Stoffwechselwege mittels *Metabolic Engineering* erhöhen wir die Produktivität [7].

Reinigung und Strukturaufklärung von Naturstoffen

Im Bereich der chemischen Analytik und Identifizierung von Verbindungen in komplexen Extrakten wurden dank moderner Methoden wie Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (HPLC-MS) bedeutende Fortschritte erzielt. So genügen oft geringe Substanzmengen zur Charakterisierung. Allerdings sind die MS-basierten Anno-



▲ **Abb. 1:** Die Plattform zur Suche nach neuen antibakteriellen Naturstoffen im Tübinger Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin. **Bioinformatik:** *In silico*-Vorhersage von Strukturelementen der codierten Naturstoffe, Regulationsmechanismen und mögliche Wirkmechanismen mittels bioinformatischer Programme. **Biosynthese:** Aktivierung der Naturstoffsynthese im natürlichen Produzenten oder heterologen Wirt. **Strukturaufklärung:** Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) als maßgebliche Methode zur Lösung komplexer Naturstoffstrukturen. **Antimikrobielle Wirkung und Wirkmechanismen:** Zunächst Bestimmung der antimikrobiellen und zytotoxischen Aktivität, danach Identifizierung gehemmter Stoffwechselwege mittels OMICS-Technologien, Bioreporter-Induktion und Mikroskopie-basierter Profilierung, gefolgt von molekularen Assays zur Identifizierung der Zielstruktur sowie Ermittlung der molekularen Bindungs- und Hemmparameter.

tationsraten immer noch niedrig, wodurch die meisten Komponenten in einem Extrakt unbekannt bleiben. Zur erleichterten Identifizierung von (Teil-)Strukturen in Extrakten nutzen wir die Chemische Markierung [8]. Hierbei verwenden wir chemische Sonden, bestehend aus einem markanten *UV-MS-Tag* und einem chemoselektiven Reagenz, um Naturstoffe zu markieren, die ein bestimmtes Pharmakophor oder eine funktionelle Gruppe enthalten. Die resultierenden Derivate können wir dann mittels HPLC-MS leicht nachweisen und für eine *de novo*-Strukturaufklärung reinigen. Die Strukturen der Derivate klären wir mittels NMR-Spektroskopie auf. Da die Markierung die biologischen Eigenschaften des Naturstoffes beeinflussen kann, gewinnen wir den unmarkierten Naturstoff entweder durch Entfernen der Markierung aus dem gereinigten Derivat oder durch direktes Isolieren des Naturstoffes aus dem unmarkierten Extrakt.

Antibakterielle Wirkung und Aufklärung des Wirkmechanismus

Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung und zum Wirkmechanismus entscheiden über das Potenzial des neuen Naturstoffes. Die Kenntnis des Wirkmechanismus ist wichtig, um unerwünschte Zielstrukturbezogene Nebenwirkungen vorherzusagen und die Bindeaffinität des Wirkstoffes für seine Zielstruktur rational optimieren zu können. Zur Identifizierung der betroffenen Stoffwechselprozesse konstruierten wir zahlreiche Bioreporter-Stämme, die auf die Störung einer spezifischen Zellstruktur mit einer charakteristischen Stressantwort reagieren und sich durch eine spezifische Promotorinduktion auslesen lassen [9]. Promotorfusionen mit verschiedenen Reporter-Genen (z. B. β -Galactosidase, Luciferase oder einem fluoreszierenden Protein) erlauben uns die Anwendung auf Agarplatten, in Flüssigkultur oder mittels Mikroskopie. RNA-Sequenzierung, Proteomics und Metabolomics liefern molekulare Einblicke. Genomweite Bibliotheken mit deletierten oder regulierbaren Genen sowie spezifische, molekulare Assays zur Bestimmung der Aktivität möglicher Zielstrukturen erlauben uns schließlich eine schnelle Bestätigung von Hypothesen der Antibiotikawirkung.

Fortschritte im Bereich der Mikroskopie, die uns heute Hochdurchsatz-, Zeitraffer- und supraauflösende Mikroskopie mit räumlicher Auflösung im Nanometerbereich und zeitlicher Auflösung im Millisekundenbereich

ermöglichen, führen zu wichtigen Erkenntnissen auf dem Gebiet der bakteriellen Zellbiologie, einem Feld, das zuvor aufgrund der geringen Größe von Bakterien schwierig war [10]. So konnten wir z. B. zeigen, dass eine neue Antibiotikaklasse die bakterielle Zellteilung mittels eines ungewöhnlichen Mechanismus hemmt [11] und mithilfe dieses Antibiotikums die Rolle des zentralen Zellteilungsproteins FtsZ näher charakterisieren [12]. Fluoreszenzmikroskope der neuesten Generation erreichen optische Auflösungen über die klassische Beugungsgrenze hinaus und ermöglichen automatische Fokus-Stabilisierung, Klimaregulierung und Mikrofluidik. In Kombination mit verbesserten Fluorophoren zur differenziellen Markierung zellulärer Strukturen erhalten wir tiefe Einblicke in die räumlich-zeitliche Dynamik der Antibiotikawirkung in lebenden Bakterienzellen.

Antibakterielle Wirkstoffe helfen Bakterien zu verstehen

Neue antibakterielle Naturstoffe bieten nicht nur die Chance auf neue Kandidaten für die Medikamentenentwicklung, sondern sind auch wertvolle Werkzeuge, um wissenschaftliche Grundlagen der Bakterienphysiologie zu erforschen, einschließlich der natürlichen Funktion der Zielstrukturen von Antibiotika, des Ablaufs der beteiligten Biosyntheseprozesse sowie der Mechanismen der bakteriellen Stressantwort und Resistenzbildung. Die gleichzeitige Betrachtung von Antibiotikawirkung und Antibiotikaproduktion erzeugt Synergie in den Forschungsarbeiten, da der Produzent oft selbst ein Bakterium ist.

Danksagung

Wir danken unseren Arbeitsgruppen für ihren stetigen Einsatz für die Antibiotikaforschung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem BMBF, dem Land Baden-Württemberg, der Europäischen Union und dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) für die Finanzierung unserer Forschung. Unser Dank gilt dem Cluster of Excellence CoE 2124 "Controlling Microbes to Fight Infection" für infrastrukturelle Unterstützung. ■

Literatur

- [1] World Health Organization (2021) Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. ISBN: 9789240047655.
- [2] Terlouw BR, Blin K, Navarro-Muñoz JC et al. (2023) MIBiG 3.0 a community-driven effort to annotate experimentally validated biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 51: D1, D603–D610

- [3] Mungan MD, Harbig TA, Hernandez Perez N et al. (2022) Secondary Metabolite Transcriptomic Pipeline (SeMa-Trap), an expression-based exploration tool for increased secondary metabolite production. *Nucleic Acids Res*, gkac371
- [4] Yılmaz TM, Mungan MD, Berasategui A et al. (2023) FunARTS, the Fungal bioActive compound Resistant Target Seeker, an exploration engine for target-directed genome mining in fungi. *Nucleic Acids Res*, gkad386
- [5] Mingyar E, Mühling L, Kulik A et al. (2021) A regulator based „semi-targeted“ approach to activate silent biosynthetic gene clusters. *Int J Mol Sci* 22: 7567
- [6] Botas A, Eitel M, Schwarz PN et al. (2021) Genetic engineering in combination with semi-synthesis leads to a new route for gram-scale production of the immunosuppressive natural product brasilicardin A. *Angew Chem Int Ed Engl* 60: 13536–13541
- [7] Goldfinger V, Spohn M, Rodler JP et al. (2023) Metabolic engineering of the shikimate pathway in *Amycolatopsis* strains for optimized glycopeptide antibiotic production. *Metab Eng* 78: 84–92
- [8] Hughes CC. (2021) Chemical labeling strategies for small molecule natural product detection and isolation. *Nat Prod Rep* 38: 1684–1705
- [9] Wex KW, Saur JS, Handel F et al. (2021) Bioreporters for direct mode of action-informed screening of antibiotic producer strains. *Cell Chem Biol* 28: 1242–1252
- [10] Matos de Opitz CL, Sass P (2023) Microscopy-based multiwell assay to characterize disturbed bacterial morphogenesis upon antibiotic action. *Methods Mol Biol* 2601: 171–190
- [11] Sass P, Josten M, Famulla K et al. (2011) Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17474–17479
- [12] Silber N, Mayer C, Matos de Opitz CL, Sass P (2021) Progression of the late-stage divisome is unaffected by the depletion of the cytoplasmic FtsZ pool. *Commun Biol* 4: 270

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt
 Mikrobielle Wirkstoffe
 Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin (IMI)
 Universität Tübingen
 Auf der Morgenstelle 28
 D-72076 Tübingen
 heike.broetz-oesterhelt@uni-tuebingen.de

ARBEITSGRUPPE



Suche nach neuen antibakteriellen Naturstoffen im Interfakultären Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Universität Tübingen. Abteilung Translationale Naturstoffgenomik: Nadine Ziemert (links), Abteilung Mikrobielle Wirkstoffe: Heike Brötz-Oesterhelt (2. v. l.) und Peter Sass (2. v. r.), Wirkmechanismenanalyse; Evi Stegmann (Mitte), Biosyntheseoptimierung; Chambers Hughes (rechts), Naturstoffchemie.