

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 Ernteauffälle 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-

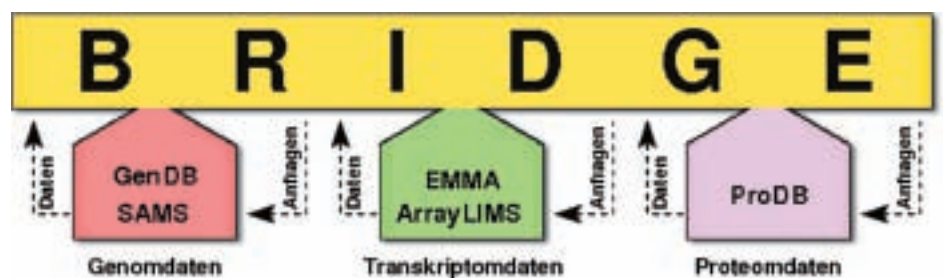


Abb. 1: Der BRIDGE-Layer integriert die drei spezialisierten Softwarekomponenten GenDB, EMMA und ProDB. Heterogene Datensätze werden miteinander verknüpft, so dass domänenübergreifende Abfragen möglich sind.

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

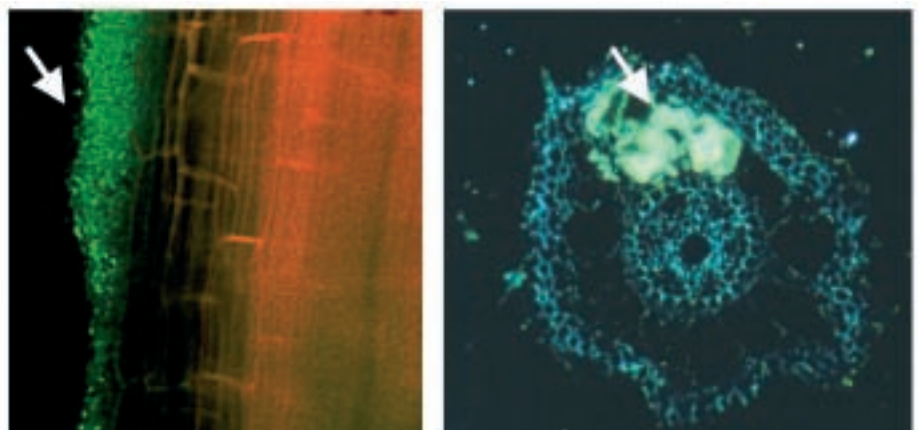


Abb. 1. Besiedlung von Reiswurzeln durch stickstofffixierende endophytische Bakterien, *Azoarcus* sp. BH72, in Laborkultur. Links, Besiedlung der Wurzeloberfläche durch Bakterien, die mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) markiert sind (Fluoreszenzbeleuchtung) (2). Rechts, Mikrokolonie von *Azoarcus*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

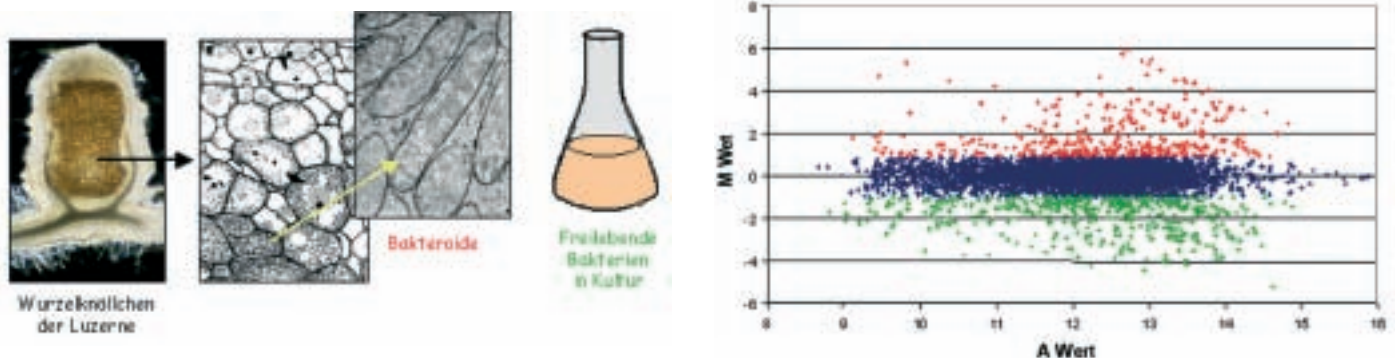


Abb. 1: Microarray-Experiment zum Vergleich der Genexpression in Bakteroiden und freilebenden Zellen von *S. meliloti*. Microarray-Experiment zum Vergleich des Genexpressionsprofils von Bakteroiden (Cy5-markierte cDNA; rote Fluoreszenzmarkierung) und freilebenden, in Minimalmedium kultivierten Zellen (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.

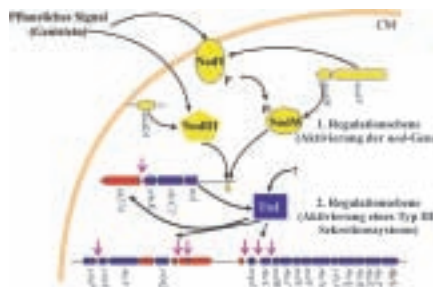


Abb. 2. Modell der Regulationskaskade des *tts*-Genclusters in *B. japonicum*. Offene Leserahmen (ORFs), die bisher nur in *B. japonicum* gefunden wurden, sind rot dargestellt. *nod*-Gen-Regulatoren sind gelb markiert. Blau gekennzeichnete ORFs zeigen entweder Ähnlichkeit zu Genen, die bei pathogenen 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-

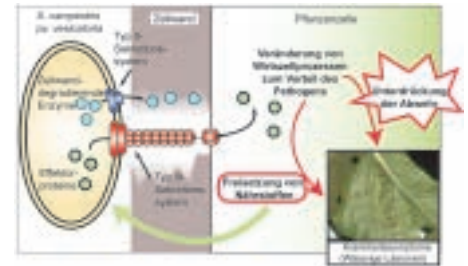


Abb. 1: Vereinfachtes Modell der Interaktion von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* mit der Wirtszelle.

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

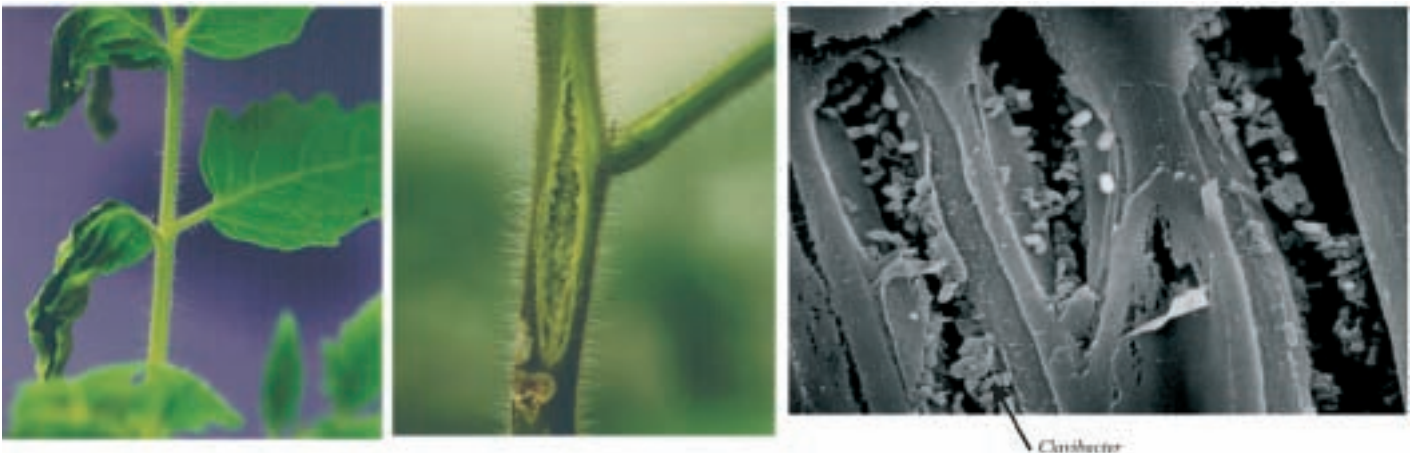


Abb. 1 Typische Symptome der durch *Clavibacter* ausgelösten Welkekrankheit der Tomate. Links ein Beispiel der unifaciale Fiederblattwelke, in der Mitte eine Sproßbläsion und im rechten Bild infizierte Leitbündel der Tomate, die von *Clavibacter* besiedelt wurden (Fotos: H. Jahr, R. Eichenlaub)

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 ölverschmutzten 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

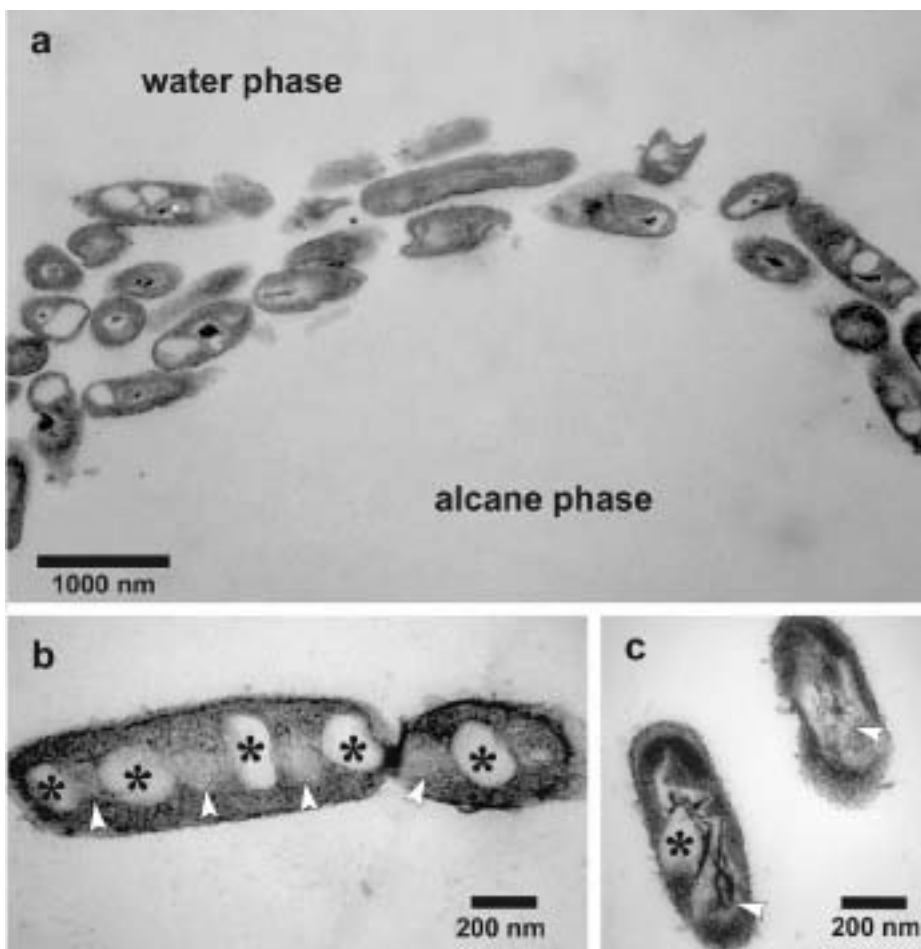


Abb1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *A. borkumensis* Bakterienzellen an der Öl-Wasser (alcano/wasser) Interphase (H. Lünsdorf, GBF; A). B und C: Aufnahmen individueller Bakterienzellen. Sterne weisen auf Speicherpolymere hin. nm = Nanometer

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 weniger als 50 Prozent Sequenzhomologien zu 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.

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.

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.

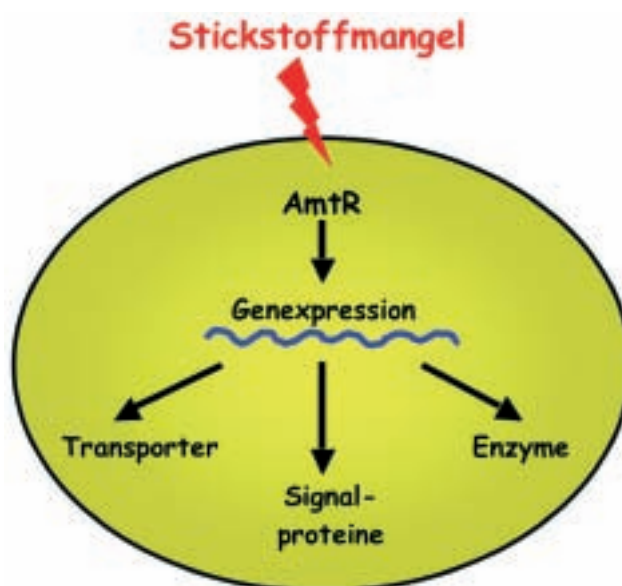
Literatur

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

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



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 Biosyntheseprodukt 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; Typ 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

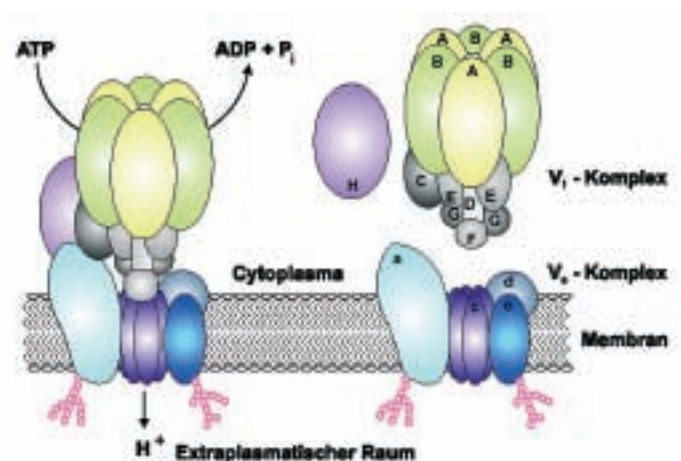


Abb. 1 Modell von V-Typ-ATPasen, dem Angriffspunkt von Concanamycin A

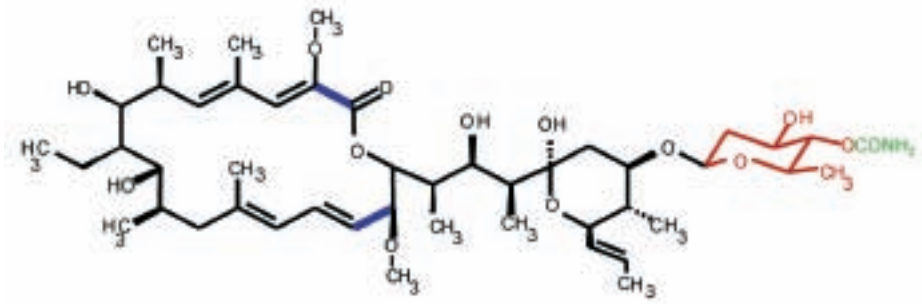


Abb. 2 Struktur von Concanamycin A. Die „ungewöhnliche“ C2-Einheit ist in blau hervorgehoben, der Zucker in rot, die daran angefügte Carbamoylgruppe grün

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 Polyketidsynthetasen (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

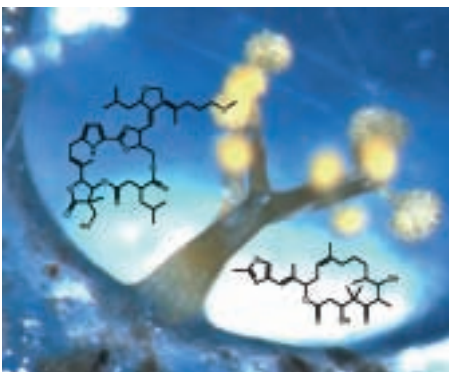


Abb. 1: Fruchtkörper von *Chondromyces crocatus* mit Strukturen des Fungizids Leupyrrin (links) und des Cytostatikums Epothilon (rechts; Foto: K. Gerth)