

---

## Kapitel 1.2

# Mikroorganismen als biologische Quelle neuer Wirkstoffe\*

Hartmut Laatsch

---

### 1.2.1 Einleitung

Von einer Beherrschung der Infektionskrankheiten sind wir derzeit weiter entfernt als noch vor 20 Jahren. Die bedrohliche Resistenzentwicklung zwingt die Wissenschaft inzwischen zu einer immer schnelleren Entwicklung neuer Wirkstoffe [1]. Auch wenn dazu heute viele neue Werkzeuge zur Verfügung stehen, empfindliche Analysetechniken, Datenbanken zur Dereplikation, das Hochdurchsatz-Screening oder die kombinatorische Synthese, um nur einige zu nennen: Eile ist geboten, um einen Rückfall in das prä-antibiotische Zeitalter zu verhindern!

Bemerkenswerterweise spielen Naturstoffe bei diesem Wettlauf in der Pharmaentwicklung wieder eine wichtige Rolle [2], wofür allerdings nicht nur Resistenzprobleme, sondern auch neue Indikationen im Zusammenhang mit Krebs, HIV oder der Organtransplantation verantwortlich sind. Aus der Suche nach Sekundärstoffen entwickelte sich im Grenzgebiet zwischen Chemie, Mikrobiologie, Pharmakologie und Medizin auf diese Weise ein ganzer Wissenschaftszweig, die Antibiotikaforschung.

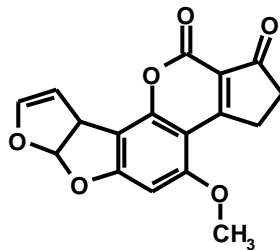
Bakterien und Pilze bilden eine Fülle niedermolekularer Stoffwechselprodukte ( $M \leq 2000$ ), die eine selektive Toxizität für andere Mikroorganismen zeigen: Sie wirken bakterio- statisch, bakterizid, fungitoxisch, nematizid usw. und werden dann als Antibiotika bezeichnet. Ausnahmslos handelt es sich hierbei um sog. **Sekundärmetabolite**; um Stoffe also, die im

---

\* Herrn Prof. Dr. W. Lüttke zum 80. Geburtstag gewidmet

Produzenten nicht an den zur Erhaltung der Lebensfunktionen beteiligten Prozessen (dem Primärstoffwechsel) beteiligt sind und ihm keine unmittelbar erkennbaren Vorteile erbringen. Auch partialsynthetisch modifizierte Derivate der natürlichen Grundstrukturen werden heute als Antibiotika bezeichnet, nicht jedoch reine Syntheseprodukte, wie etwa die antifungischen Triazole. Antibiotische aktive Naturstoffe aus Mikroorganismen werden häufig durch die Endung 'mycin' kenntlich gemacht; die Endung 'micin' ist dagegen Wirkstoffen aus Micromonospora-Arten und anderen seltenen Actinomyceten vorbehalten. Bei Syntheseprodukten sollte man auf eine derartige Benennung unbedingt verzichten.

Von den zwischen 1983 und 1994 neu zugelassenen Medikamenten sind im Bereich der Antibiotika 78 % natürlichen Ursprungs, und 61 % der Zytostatica leiten sich von Naturstoffen ab. Von 299 Entwicklungskandidaten in der Krebstherapie waren 50 natürlichen Ursprungs, 48 **semi-synthetisch** und 30 auf der Basis von Naturstoffen entwickelt; 32 stammten aus Mikroorganismen, 9 aus dem Meer.



**Aflatoxin B1**

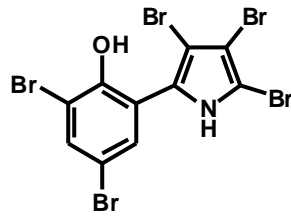
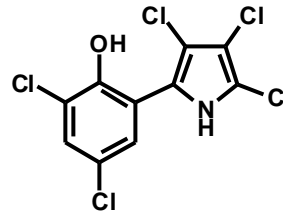
Außer den Antibiotika werden noch viele andere Wirkstoffe gebildet, die durch besondere pharmakologische Aktivitäten auffallen: Manche von ihnen greifen selektiv in den Zellzyklus ein und sind zytotoxisch, hemmen bestimmte Enzyme oder wechselwirken mit dem Nerven- und Immunsystem und beeinflussen dadurch die Verdauung, den Blutdruck, die Herzaktivität, die Schmerzempfindung usw. Daneben gibt es in großer Zahl weitere Inhaltsstoffe, die inaktiv sind, oder besser: für die wir in Ermangelung geeigneter Tests bisher keine Wirkung nachweisen konnten; wieder andere sind potente Gifte und wie die kanzerogenen Aflatoxine aus Schimmelpilzen (*Aspergillus flavus*) für Anwendungen in der Medizin ungeeignet.

Allgemein zeichnen sich Sekundärstoffe durch die Beschränkung ihres Vorkommens auf Ordnungen, Familien, Gattungen oder Arten aus, was die Grundlage der Chemotaxonomie bildet. Sie sind strukturell außerordentlich heterogen und weisen vielfach auch noch eine Mikroheterogenität auf, d. h. von einer Grundstruktur existieren zahlreiche Varianten, die sich nur minimal, z. B. durch die Länge einer Seitenkette oder ihre Verzweigung, unterscheiden.

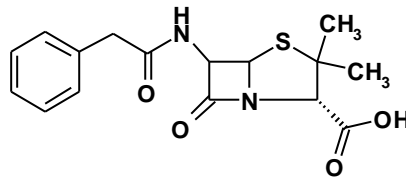
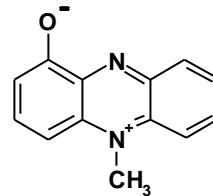
Nicht immer ist allerdings die Trennlinie zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel einfach zu ziehen: Citronensäure z. B. ist ein ubiquitärer Bestandteil des Krebs-Zyklus, tritt in der Zelle jedoch normalerweise nicht in nennenswerten Konzentrationen auf. In bestimmten Organismen (Zitrone, *Aspergillus niger*) kann sie allerdings in ungewöhnlich hohen Konzentrationen vorkommen und die Eigenschaften eines Sekundärmetaboliten annehmen. Auch bei den Lipiden der Zellwand erkennen wir einen breiten Übergangsbereich, und schließlich sind auch die Eisentransportverbindungen nicht eindeutig dem Primär- oder Sekundärstoffwechsel zuzuordnen.

Für die Existenz von Sekundärmetaboliten wurden verschiedene Erklärungen herangezogen, die Zähler zusammengefaßt hat [3]. Vielleicht sind es Vorläufer der hochmolekularen Proteine, die im Laufe der Evolution zu Rudimenten wurden; möglicherweise sind sie auch - wie Müller vermutet [4]- Beispiele einer fortwährenden Evolution. Gegen beide Hypothesen spricht die Existenz komplexer Enzymkaskaden zu ihrer Synthese. Williams [5] sieht in ihnen einen Ersatz für das Immunsystem höherer Lebensformen, und nach Zähler selbst ist die in Screening-Systemen beobachtbare Aktivität eher zufällig: *"Die Natur experimentiert auf einer 'Spielwiese', bis Verbindungen entstehen, die dem Produzenten als Eisenchelator, chemische Waffe, Radikalfänger usw. schließlich Vorteile erbringen und im Wechselspiel zwischen Evolution und Selektion bestehen bleiben oder wieder vergehen. Überraschend ist dennoch nicht die Vielfalt der Sekundärmetabolite, sondern die Einheitlichkeit des Primärstoffwechsels!"*

Ob die aus zum Teil völlig verschiedenen Organismen isolierten identischen Verbindungen (z. B. Penicillin aus Pilzen und Streptomyceten) Produkte einer unabhängigen Optimierung sind oder die jeweilige Synthesekapazität lediglich durch horizontalen Gentransfer übertragen wurde, ist nicht immer bekannt. Ein offensichtliches Beispiel einer funktionellen Redundanz ist allerdings das Vorkommen von Pentabrompseudilin in dem marinen Bakterium *Alteromonas luteoviolaceus* und von Pentachlorpseudilin in *Actinoplanes* sp. ATCC 33002. Trotz der unübersehbaren Ähnlichkeit entstehen diese beiden hochaktiven Antibiotika auf unterschiedlichen Biosynthesewegen: Während Pentabrompseudilin auf dem Shikimisäure-Weg und aus dem Aminosäure-Pool gebildet wird, ist Pentachlorpseudilin offenbar ein Acetogenin [6]!

**Pentabrompseudilin****Pentachlorpseudilin**

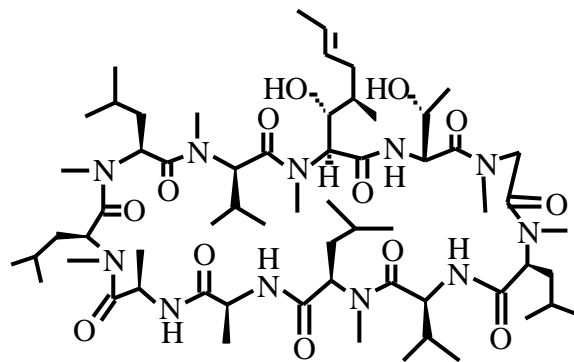
Die Entdeckung des Penicillins 1928 wird meist als die Geburtsstunde der Antibiotikatherapie angesehen, obwohl das 1898 von Emmerich aus *Bacterium pyocyaneum* (*Pseudomonas aeruginosa*) isolierte Phenazinderivat Pyocyanin bereits um die Jahrhundertwende als "Pyocyanase" medizinisch erprobt wurde und selbst die Maya oder vor 2500 Jahren die Chinesen kultivierte Schimmelpilze zur Wundbehandlung einsetzten. Seitdem wurden etwa 20 000 Inhaltsstoffe aus Mikroorganismen beschrieben [7], von denen ca. 8 000 antibiotisch oder zytotoxisch wirken. Eine medizinische Anwendung haben allerdings kaum mehr als 150 Substanzen gefunden. Die anderen sind zu toxisch, zu wenig wirksam, zu teuer, werden nicht resorbiert, zu schnell abgebaut oder versagen aus anderen Gründen in der medizinischen Anwendung.

**Penicillin G****Pyocyanin**

Fast alle gegen Infektionskrankheiten einsetzbaren Antibiotika wurden vor 1970 entdeckt. Weil bakterielle Infektionen mit den seitdem verfügbaren Medikamenten beherrschbar erschienen, wurde seitdem kaum mehr nach neuen Antibiotika in der Natur gesucht; lediglich die vorhandenen natürlichen Vorbilder wurden synthetisch optimiert, was z. B. die Penicilline der sog. zweiten und dritten Generation hervorbrachte, die gegen enzymatischen Abbau wesentlich stabiler als Penicillin G oder Cephalosporin sind und auch gegen zahlreiche 'Problemkeime' wirken.

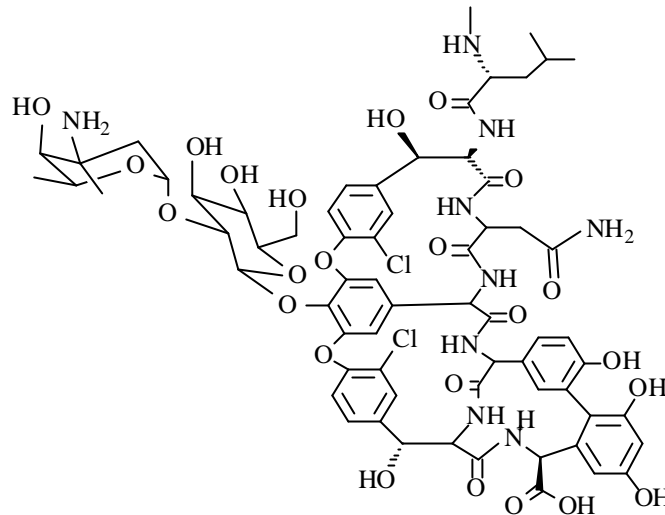
In den letzten 30 Jahren hatte sich die medizinisch ausgerichtete Naturstoffforschung stattdessen auf die Suche nach Wirkstoffen zur Tumorbehandlung, zur Bekämpfung von Hypercholesterinämie und Übergewicht, zur Anwendung in der Transplantationsmedizin usw.

konzentriert und hierbei große Erfolge erzielt: Beispiele sind die Entdeckung des immunsuppressiv wirkenden Cyclosporin C aus dem Bodenzpilz *Tolypocladium inflatum*, durch das Transplantationen in großem Stil überhaupt erst möglich wurden. Cyclosporin hemmt die Freisetzung von Interleukin-1 aus Makrophagen und Interleukin-2 aus T-Helferzellen; es bindet spezifisch an Cyclophiline und Calmodulin. In der Tumorthherapie knüpfen sich große Hoffnungen an Inhaltsstoffe aus Weichkorallen und Meeresschwämmen, deren Metabolite wie das extrem wirksame Bryostatin aber vielleicht symbiotischen Bakterien zu verdanken sind.



**Cyclosporin C**

Die einseitige Verlagerung der Indikationen zeigt nun allerdings bedrohliche Auswirkungen: Mit der schnellen Replikation ist bei Mikroorganismen auch eine hohe Mutationsrate verbunden, die unter evolutionärem Druck - eben auch dem Einsatz von Antibiotika in subletaler Dosierung - rasch zu einer Ausbildung von Resistenzen führt, wie erstmals 1940 für Penicillin berichtet wurde [8]: Während sensitive Stämme gegenüber Penicillin minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von 0,05 µg/mL aufweisen, beobachtet man bei Resistenzen eine MHK von 600 bis über 1000 µg/mL! Inzwischen findet man bei Hospitalkeimen häufig sogar Methicillin-resistente Staphylokokken (erstmal 1961) oder mehrfach-resistente Erreger mit bis zu 10 Resistenzgenen, die sich oft nur noch mit einem einzigen Antibiotikum, z. B. dem "Reserveantibiotikum" Vancomycin, bekämpfen lassen. Im Jahre 1988 wurde erstmals über Enterokokken (VRE) berichtet, die auch gegen dieses Antibiotikum sowie gegen alle anderen verfügbaren Medikamente resistent waren und zum Tod durch Sepsis führten. Ausgelöst wurde diese fatale Entwicklung durch die Verwendung des mit Vancomycin verwandten Avoparcins in der Tiermast!



**Vancomycin**

Schwerwiegende Probleme entstehen weiterhin durch Verschiebungen im Pathogenitätsspektrum der Erreger, durch früher unbedeutende opportunistische Keime im Zusammenhang mit HIV oder Organtransplantationen, durch eine starke Zunahme von Pilzinfektionen und selbst durch einen "Import" von Erregern infolge des globalen Tourismus.

Die 150 heute verfügbaren Mittel greifen leider nur in sechs Schlüsselfunktionen der Bakterienzelle ein, was Kreuzresistenzen häufig werden läßt. Zähler hat geschätzt, daß die massive Ausbreitung resistenter Stämme und die begleitenden therapeutischen Probleme vermieden würden, wenn alle 8-10 Jahre neue Antibiotika mit neuen Angriffspunkten verfügbar wären [9]; dies ist jedoch nicht der Fall. Nach einer Untersuchung von Drews [10] entwickelt die Pharmaindustrie im Durchschnitt pro Unternehmen deutlich weniger als eine Verbindung pro Jahr, während mindestens zwei bis drei zur Kostendeckung der Forschung und für eine tragfähige Entwicklung nötig wären; Drews bezeichnet dies als Innovationsdefizit der Industrie.

Strukturell sind Naturstoffe nicht definierbar; fast alle Strukturelemente sind vertreten, die auch aus der Synthesechemie bekannt sind. Statistische Erhebungen haben dennoch gezeigt, daß sich die strukturelle Diversität der Naturstoffe von der der Syntheseprodukte grundlegend unterscheidet und nur zu 50 % Überlappungen auftreten. Naturstoffe im Verein mit neuen Schlüsseltechnologien wie der Gentechnik, der kombinatorischen Synthese, zellulären Assays und dem Hochdurchsatzscreening werden daher auch weiterhin einen wichtigen Beitrag zur medizinischen Versorgung liefern.

---

## 1.2.2 Prinzipien der Wirkstoffsuche

### 1.2.2.1 Wirkstoffquellen

Die überwiegende Mehrzahl aller Naturstoffe stammt aus Pflanzen, die jedoch nur wenige hochwirksame Antibiotika hervorbringen; letztere sind eine Domäne der Mikroorganismen. Jährlich werden für die Suche nach neuen Wirkstoffen aus Bodenbakterien und Pilzen vermutlich mehr als eine Million Kulturen untersucht und weltweit mehr als 9 Milliarden US \$ ausgegeben. Dennoch sind unsere Kenntnisse der mikrobiellen Diversität [11] immer noch sehr lückenhaft: Von den mindestens 40 000 Bakterienspezies kennt man bisher nur etwa 5 000 (12 %), und die 69 000 bekannten Pilzspezies machen erst 5 % der auf 1,5 Millionen geschätzten Gesamtheit aus.

Die Sekundärstoffforschung hat sich in der Vergangenheit an dem Leitsatz orientiert, daß die Taxonomie der Bakterien und Pilze sowie ihre metabolischen Leistungen eng miteinander verknüpft sind. Tatsächlich stammt die Mehrzahl der bakteriellen Metabolite aus einer einzigen Gruppe grampositiver Bodenbakterien der Ordnung *Actinomycetales*: Vor allem Streptomyceten haben sich als die beste Quelle antibakterieller Verbindungen erwiesen, während Pilze eher Verbindungen mit zytotoxischer oder kardiovaskulärer Wirkung produzieren. Überhaupt findet man in Sporenbildnern generell eine höhere metabolische Vielfalt als in nicht sporulierenden Organismen. Auch die Fähigkeit, ungewöhnliche Substrate zu verwerten, spiegelt sich häufig in einer größeren chemischen Produktvielfalt wider.

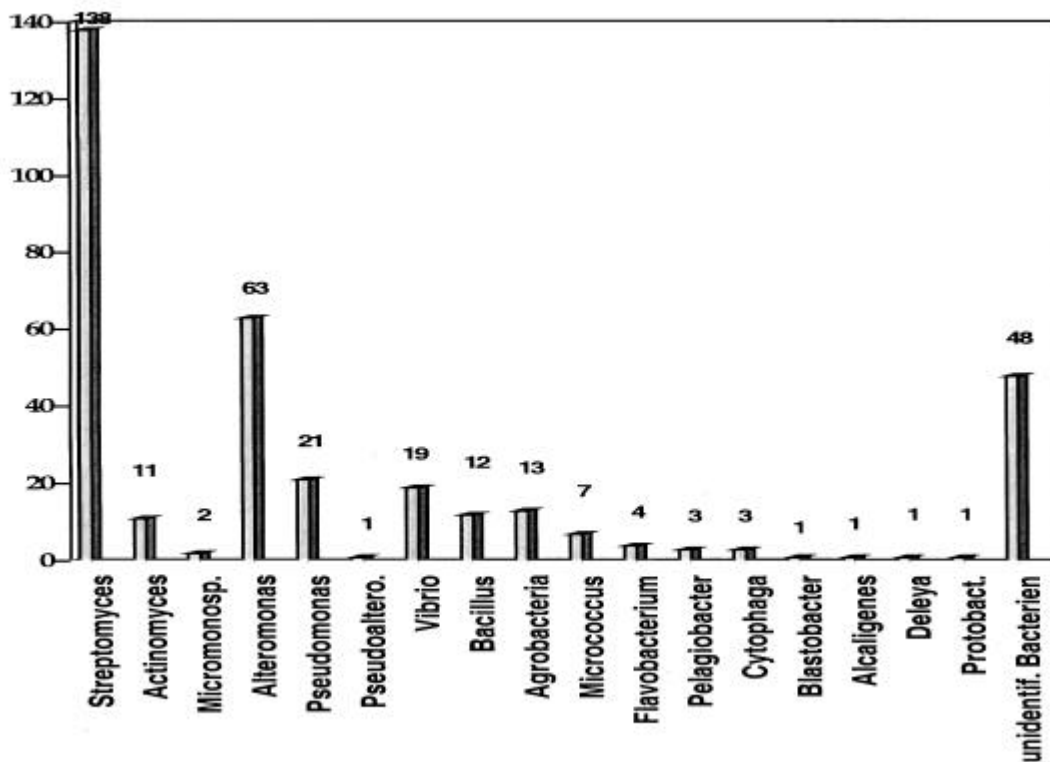
Insgesamt ist die Fähigkeit zur Sekundärstoffbildung bei Mikroorganismen aber nicht gleichmäßig über die Gattungen verteilt, sondern läßt bestimmte Häufungen erkennen. Bei Meeresbakterien<sup>1</sup> stammen die meisten Strukturen aus Streptomyceten und seltenen Actinomyceten; auch Alteromonaden erwiesen sich als ergiebig (Abb. 1). Bei den weit besser bekannten terrestrischen Bakterien ist die Situation ganz ähnlich.

Bei Eukaryonten findet man zahlreiche Produzenten unter den imperfekten Pilzen (*Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*), aber auch den Basidiomyceten. In bestimmten Gattungen (z. B. *Escherichia*, *Salmonella*) hat man trotz intensiver Untersuchungen dagegen bisher

---

<sup>1</sup> Nach der allgemeinen Definition von W. Fenical sind Meeresbakterien Organismen, die aus marinen Habitaten isoliert wurden und sich unter typisch marinen Bedingungen vermehren und Stoffwechselprodukte bilden können.

kaum Sekundärmetabolite gefunden. Für eine endgültige Aussage sind unsere Kenntnisse allerdings noch unzureichend, da systematische Untersuchungen bisher fehlen.



**Abb. 1: Taxonomische Aufschlüsselung der bis 1999 aus marinen Bakterien isolierten Verbindungen**

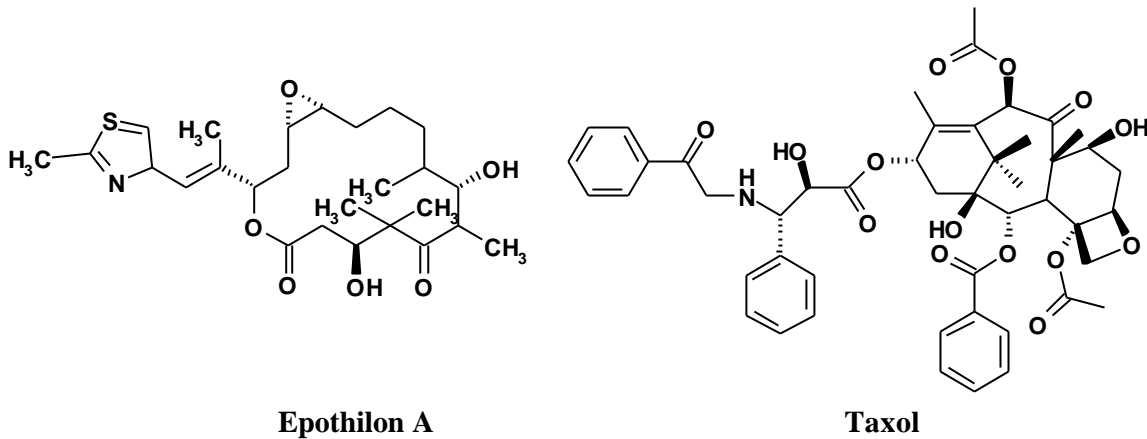
Ein Beispiel für eine erst in der jüngeren Vergangenheit vor allem von Reichenbach [12] und Höfle erschlossene Gruppe von Mikroorganismen ist die der Myxobakterien. Aus diesen chemisch ganz außerordentlich ergiebigen Organismen wurden z. B. die Epothilone isoliert, die wie Paclitaxel (Taxol) aus der pazifischen Eibe ihre extreme Zytotoxizität einer Inhibierung der Zell-Proliferation durch Stabilisierung der Microtubuli verdanken [13], gegenüber Taxol jedoch entscheidende Vorteile aufweisen.

#### 1.2.2.2 Probennahme

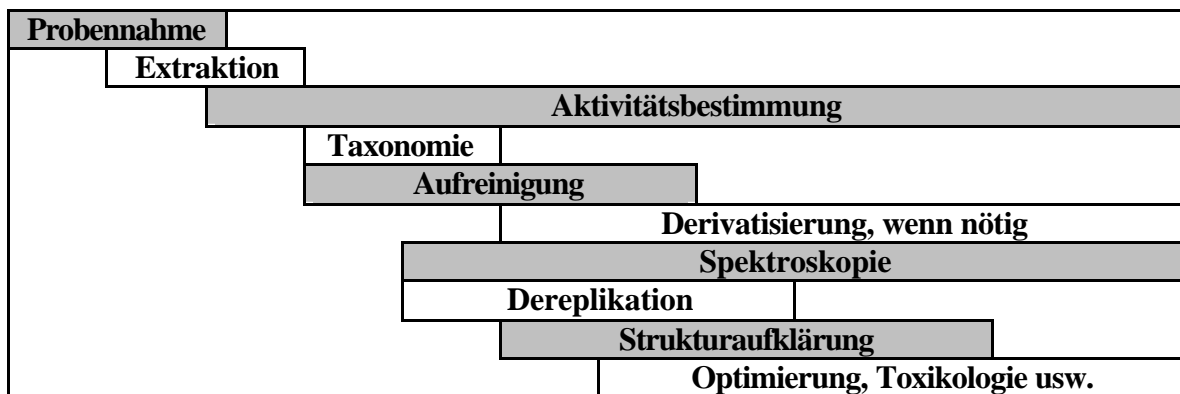
Inhaltsstoffe aus Mikroorganismen werden nach einem Ablaufschema isoliert, wie es ähnlich auch für Pflanzen gebräuchlich ist (Abb. 2). Der Hauptunterschied liegt im Sammeln des Untersuchungsmaterials, wobei Erfahrung und Intuition besonders wichtig sind. Habitate mit schwachem Selektionsdruck zeigen gewöhnlich die größte Artenvielfalt: Gebiete mit einer Megadiversität der Makro-Flora und -Fauna sind meist auch in der mikrobiellen Besiedelung besonders ergiebig. Neue Mikroorganismen findet man allerdings nicht nur an exotischen



Plätzen, sondern überall; sie sind in jeder Boden- oder Wasserprobe enthalten und bilden oft äußerst sensible Lebensgemeinschaften. Bodenproben sollten daher so schnell wie möglich analysiert werden, um Verschiebungen zu vermeiden; auch sollten vom selben Ort mehrere Proben entnommen werden, ggf. auch zu verschiedenen Jahreszeiten.



Für die Isolierung von Reinkulturen aus Umweltproben existieren zahlreiche Verfahren. Im einfachsten Falle werden die Proben mit sterilen Medien verdünnt und auf Universal- oder Selektivagar ausplattiert. Durch Zusatz von Hemmstoffen oder geeignete Wahl des pH-Wertes lassen sich unerwünschte Organismen (z. B. Pilze) oftmals unterdrücken (Anreicherungsmedien). Dieser Vorgang wird mit den Einzelkolonien bis zur Homogenität wiederholt.



**Abb. 2: Wichtige Arbeitsschritte bei Naturstoffisolierungen**

Hauptproblem bei dieser Vorgehensweise sind die ganz unterschiedlichen Anforderungen der einzelnen Organismenarten an Nährstoff- und Wachstumsbedingungen. So weiß man z. B.

von Meeresbakterien, daß sie Glucose häufig nicht tolerieren, spezifisch "marine" Zusätze (Algenextrakte, Fischöl, Chitin) zur Vermehrung benötigen, nur unter hohem Druck oder wie die Meeresbakterien bei sehr niedriger Temperatur wachsen; unter Standardbedingungen sind diese Organismen oft nicht kultivierbar. Daher ist es wichtig, die Kulturbedingungen an den Umweltbedingungen der Herkunft zu orientieren und lange zu inkubieren, um auch langsam wachsende Organismen zu erfassen. Bisher nicht gelöst ist leider die Handhabung symbiontischer Bakterien, die vor allem in Meeresschwämmen zumindest für einen Teil der Metabolite verantwortlich zu sein scheinen [14].

### 1.2.2.3 Aufbewahrung

Verschiedene Antibiotika-Bildner produzieren autotoxische Substanzen, die die Lebensdauer der Kultur begrenzen und häufiges Überimpfen erfordern. Dies jedoch begünstigt Mutationen oder die Selektion chemischer Rassen mit veränderten Merkmalen. Wenn irgend möglich, werden von den Reinkulturen daher lagerfähige Dauerpräparate hergestellt. Mehrere Verfahren sind dazu im Gebrauch. Als sicherste Methode gilt die Gefriertrocknung, bei der eine Bakteriensuspension z. B. in steriler Magermilch lyophilisiert und schließlich im Vakuum oder unter Stickstoff abgeschmolzen wird. Die Präparate sind in flüssigem Stickstoff über Jahrzehnte lagerfähig. Alternativ können Kulturen auch unmittelbar in Suspension eingefroren und in Flüssig-Stickstoff gelagert werden. Hierbei sind der Probe 10–20 % Glycerin oder Dimethylsulfoxid als Zellschutz zuzusetzen; die Keimungsrate ist deutlich niedriger als bei der Gefriertrocknung. Sporenbildner wie Pilze, Bazillen und Streptomyceten können mit sehr gutem Erfolg auch als Erdkultur gelagert werden. Dazu läßt man eine Suspension der Organismen unter sterilen Bedingungen auf Heilerde eintrocknen, wobei sich die Dauerformen bilden, die selbst bei 0 °C über Jahrzehnte lebensfähig bleiben.

Aus den Dauerkonserven können bei Bedarf jederzeit neue Kulturen angezüchtet werden. In jedem Fall vorzuziehen ist aber die Verwendung einer frischen, möglichst wenig überimpften Originalkultur.

### 1.2.2.4 Anzucht der Mikroorganismen

Zur Selektion geeigneter Produzenten und zur Beurteilung ihrer metabolischen Leistung führt man zunächst ein Primärscreening durch, bei dem nicht die Aufklärung der chemischen Struktur, sondern der Nachweis metabolischer Leistungen im Vordergrund steht.

Pigmentierten Organismen sieht man die Sekundärstoffbildung unmittelbar an. Vielfach zeigt sich dann, daß neben den Pigmenten auch noch weitere Metabolite gebildet werden. Ganz

---

überwiegend ist das metabolische Potential aber erst nach einer geeigneten Aufarbeitung erkennbar. Dazu werden Bakterien meist als Submerskulturen, Pilze auf festen Substraten im 50-200 mL-Maßstab angezogen. Bei flüssigen Kulturen sorgt man durch Schütteln in Schikanekolben für eine ausreichende Belüftung.

Die Anforderungen an die Medienzusammensetzung sind weit gespannt. Standardmedien setzen sich meist aus Hefeextrakt, Malzextrakt und Glucose zusammen (YMG-Medium) und können daneben Salze und Spurenelemente enthalten. Andere komplexe Medien enthalten Pepton, Sojamehl oder Haferflocken.

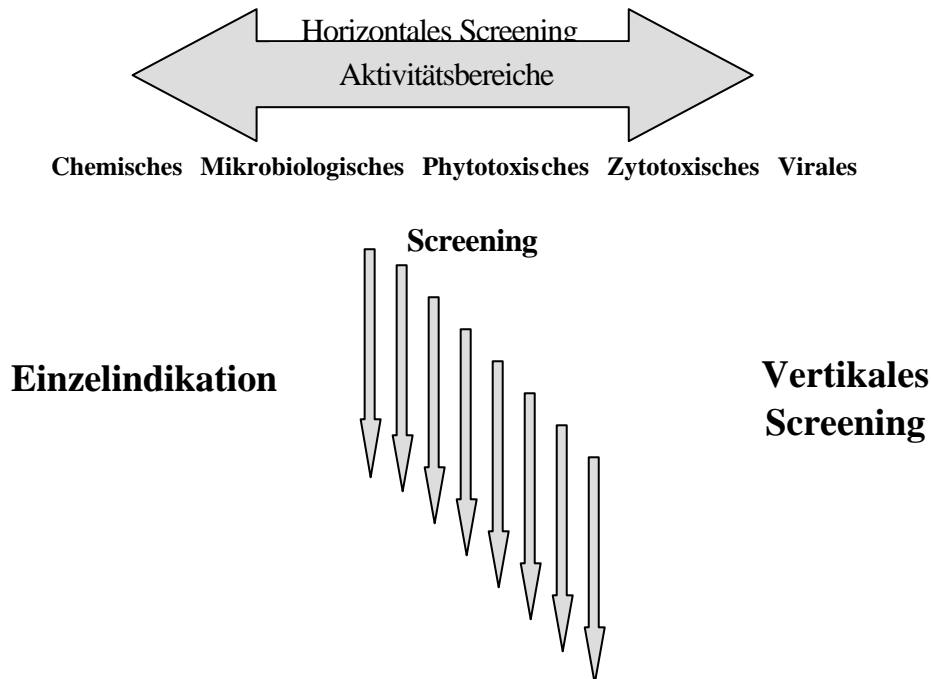
Gute Ausbeuten an Sekundärstoffen erhält man vielfach auch auf sog. definierten Medien, die sich z. B. aus Aminosäuren als C/N-Quelle, aus Nitrat und Glucose oder anderen chemisch eindeutig charakterisierten Komponenten zusammensetzen und ggf. noch Vitamine enthalten. Auch Streßfaktoren (Sauerstoff-Überdruck, Licht, erhöhte Temperatur, Schwermetalle oder organische Zusätze) können das Produktspektrum erheblich verschieben.

Bakterien benötigen 3–4 Tage Fermentationsdauer, Pilze meist erheblich länger. Die Sekundärstoffe werden vielfach erst gegen Ende des Wachstums in der stationären Phase (Idiophase) bei Nährstofflimitierung gebildet und in der Zelle akkumuliert oder auch in das Medium abgegeben. Eine Trennung in Mycel und Überstand ist in dem nun folgenden Teil des Screenings aber zunächst entbehrlich. Vielmehr versetzt man die gesamte Kultur mit Ethylacetat, wobei unpolare und mittelpolare Stoffe vollständig extrahiert und gleichzeitig die Zellen abgetötet werden. Höher polare Stoffe können anschließend durch Butanol extrahiert werden; Reihenversuche habe jedoch gezeigt, daß dieser Schritt meist entbehrlich ist. Sehr polare Komponenten - Aminosäuren, Zuckerderivate, Carbonsäuren usw. - erfordern Spezialverfahren, wobei man bei ionischen Verbindungen gewöhnlich Ionenaustauscher einsetzt. Effektiver als die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist allerdings die Gefriertrocknung und die anschließende Extraktion des Rückstandes mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität. Auch hier ist Ethylacetat für die unpolaren und mittelpolaren Komponenten am besten geeignet, stärker polare Anteile werden mit Methanol extrahiert.

#### 1.2.2.5 Primärscreening

Zur Auffindung neuer Wirkstoffe in den so gewonnenen Rohextrakten existieren verschiedene Vorgehensweisen [15]. Allen ist gleich, daß die biologische, chemische oder physikalische Wechselwirkung von zu prüfenden Substanzen mit Testmodellen qualitativ und quantitativ bewertet wird; dies ist das eigentliche Screening.

Man unterscheidet das wirkungsbezogene biologische Screening mit lebenden Organismen oder Rezeptormodellen und das von Umezawa [16] eingeführte und von Zähler weiterentwickelte chemische Screening [17], in dem chemische und physikalische Parameter bestimmt werden. Beide Methoden können mit sehr niedriger Selektivität durchgeführt werden und dementsprechend eine hohe Responstrate ergeben; mit hochselektiven Testsystemen ist die Trefferzahl dagegen klein. Man kann dies als **horizontales** bzw. **vertikales** Screening bezeichnen (Abb. 3).

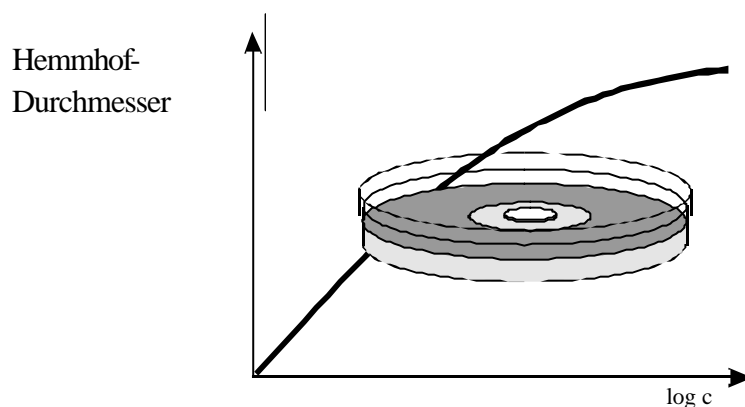


**Abb. 3: Prinzipien des Wirkstoff-Screenings mit spezifischen oder unspezifischen Testmethoden**

Im chemischen Screening verzichtet man bewußt auf eine frühe Korrelation von Substanznachweis und biologischer Wirkung und versucht vielmehr, möglichst die Gesamtheit *aller* gebildeten Metabolite zu detektieren. Im einfachsten Falle werden Dünnschichtchromatogramme der Extrakte bei Tages- und UV-Licht sowie nach Anfärbung mit Sprühreagenzien [18] bewertet. Weit leistungsfähiger sind Kombinationen von HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie) und UV-, NMR- oder Massenspektrometrie, die über die reine Detektion hinaus Aussagen zu Strukturmerkmalen bis hin zu vollständigen Strukturaufklärungen gestatten. Die Bestimmung der biologischen Wirkung erfolgt im chemischen Screening vor allem an den später isolierten Reinsubstanzen; sie muß nicht notwendigerweise mit der ursprünglich an der Probe beobachteten Aktivität identisch sein. Im chemischen Screening steht die Struktur im Vordergrund; die biologische Wirkung ist nicht Hauptziel der Untersuchungen.

Spurenkomponenten werden im chemischen Screening trotz einer eventuell vorhandenen hohen biologischen Aktivität leicht übersehen. Diese Gefahr besteht dagegen im biologischen Screening nicht, in dem jedoch im jeweiligen Test inaktive Stoffe nicht erkannt werden, selbst wenn sie Hauptkomponenten sind; beide Methoden ergänzen sich daher ideal und werden selten für sich allein angewandt.

Im klassischen biologischen Screening durch Agar-Diffusion imprägniert man Filterpapierplättchen mit der zu untersuchenden Substanzmischung (z. B. einem Extrakt) und legt die Scheibchen auf Agar-Schichten, die zuvor mit einem Testorganismus homogen beimpft wurden. Der Wirkstoff diffundiert in den umgebenden Agar und hemmt das Wachstum des Indikator-Organismus in einem von der Konzentration, der jeweiligen biologischen Aktivität und den physikalischen Eigenschaften (Löslichkeit, Diffusionskonstante) der Substanz abhängenden Abstand. Es bildet sich ein nicht bewachsener klarer Hemmhof aus (Abb. 4).



**Abb. 4:** Abhängigkeit von Hemmhofkonzentration  $c$  und Hemmhofdurchmesser bei Wirkstoffprüfungen auf antibiotische Aktivität im Agar-Diffusionstest

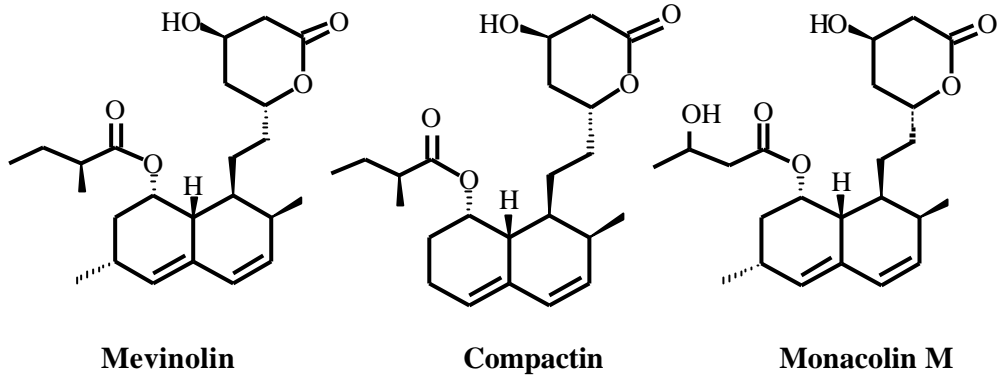
Der Agar-Diffusionstest läßt sich auf elegante Weise mit einer dünnschichtchromatographischen Trennung verbinden. Dazu wird das entwickelte Chromatogramm für ein bis zwei Stunden mit der Schicht nach unten auf eine beimpfte Agarplatte gelegt und dann abgezogen. Man kann die Folie auch mit der Schicht nach oben auf sterilen Agar legen und mit einer zweiten Agarschicht bedecken, oder eine Sporensuspension unmittelbar auf das Chromatogramm sprühen und dort inkubieren. Mit allen diesen Methoden läßt sich eine antibiotische Aktivität rasch der betreffenden Zone im Chromatogramm zuordnen (Bioautographie). Hier wie auch bei allen anderen Aktivitätsbestimmungen ist darauf zu achten, daß der pH-Wert ggf. auf einen für den Testorganismus verträglichen Wert eingestellt wird und bioaktive Lösungsmittel zuvor restlos entfernt werden. Im Plattendiffusionstest geschieht letzteres durch einstündiges Trocknen der Plättchen bzw. der Chromatogramme an der Luft.

Aktivitätsbestimmungen über Hemmhoftests sind quantifizierbar, billig und einfach in der Durchführung, haben aber meist relativ lange Meß- und Beobachtungsdauern, weisen eine große Streubreite auf, sind weniger empfindlich und lassen selten Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus zu; ihre Aussage ist daher beschränkt. Wird z. B. in komplexen Systemen (an Säugerzellen, lebenden Bakterien, Pflanzen usw.) auf zytotoxische, antibiotische oder phytotoxische Aktivität geprüft, so werden alle Wechselwirkungen mit vermutlich mehr als 5 000 lebenswichtigen Prozessen in der Zelle zu positiven Ergebnissen führen.

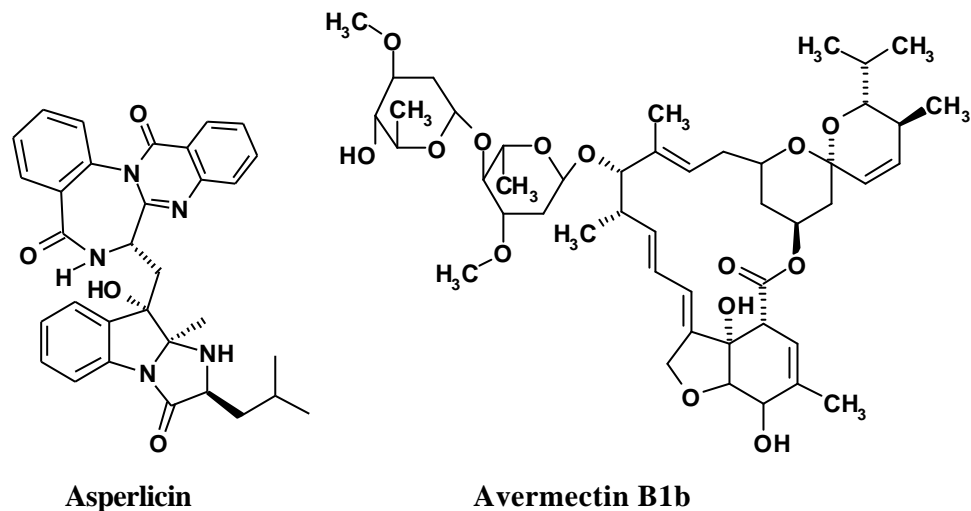
Diese Nachteile werden im modernen target-orientierten biologischen oder im selektiven chemischen Hochdurchsatz-Screening durch einen extrem hohen Probendurchsatz kompensiert: Krankheiten oder Stoffwechselvorgänge werden hier auf isolierte Enzymsysteme, Rezeptoren, Ionenkanäle oder spezifische Nachweisreaktionen reduziert und schließlich durch Farbreaktionen, Fluoreszenz, Radioaktivität usw. meßbar gemacht. So lassen sich Antikörper z. B. mit Galactosidase koppeln, die anschließend aus einem Glycosid enzymatisch Indoxyl freisetzt, das an der Luft in blauen Indigo übergeht.

Der Einsatz von Laborrobotern, die Tausende von Proben pro Tag bewältigen, fängt die abnehmende Trefferrate durch erhöhten Durchsatz auf (Hochdurchsatz-Screening, eingeführt etwa 1995) [19]. Ergänzt wird diese Verbesserung durch die Verwendung hochselektiver Testmodelle, die empfindlich und robust sind und reproduzierbare Resultate ergeben. Und schließlich wird das unselektive Durchmusterung statistisch verteilter Proben mehr und mehr durch ein "intelligentes Screening" ersetzt, in dem nicht nur die Tests, sondern auch die zu prüfenden Organismen nach ganz bestimmten Kriterien ausgewählt werden.

Bei der Verwendung enzymatischer Tests werden nur Substanzen mit genau definierbarem Wirkmechanismus gefunden, wobei mit Hitraten von 1:10 000 und weniger zu rechnen ist. In Screens gegen 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzym A-Reduktase wurden die Polyketide Mevinolin (aus *Aspergillus terreus*), Compactin (aus *Penicillium brevicompactum*) und Monacolin (*Monascus ruber*) gefunden, die das Enzym bereits im nanomolaren Bereich hemmen. Dadurch wird die Mevalonsäuresynthese behindert, was zu einer Verringerung der Cholesterin-Biosynthese führt. Die genannten Naturstoffe werden daher präventiv gegen Arteriosklerose eingesetzt.



Im Gegensatz zu diesen Mode of Action-Screens sucht man in Rezeptor-Ligand-Bindungsassays Agonisten und Antagonisten der neuronalen und humoralen Signaltransduktion. Wechselwirkungen mit dem 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor lassen z. B. eine zentralnervöse Aktivität erwarten. Eines der Resultate war die Entdeckung von Asperlicin aus *Aspergillus alliaceus*, das eine hohe Affinität zum Cholecystokinin-Rezeptor aufweist. Die Avermectine sind Antagonisten des GABA-Rezeptors (blockieren die durch  $\gamma$ -Aminobuttersäure vermittelte Neurotransmission) und werden in der Veterinärmedizin gegen parasitäre Invertebraten eingesetzt.



### 1.2.2.6 Dereplikation

Obwohl der Zahl möglicher Naturstoffe von der Kapazität der beteiligten Enzyme kaum Grenzen gesetzt sind [3], ist ihre Anzahl in der Realität doch limitiert. Als Folge einer mehr und mehr erschöpfenden Erforschung stößt man daher zunehmend häufig - zu über 90 % bei terrestrischen Streptomyceten - auf bereits bekannte Verbindungen, und in der Regel müssen Zehntausende von Kulturen geprüft werden, bis ein neuer klinisch einsetzbarer Wirkstoff oder gar eine neue Leitstruktur entdeckt wird. Letztere definiert im günstigsten Falle ein neues

Wirkprinzip, das (partial)synthetisch schließlich zum eigentlichen Medikament optimiert werden kann. Die Suche nach neuen bioaktiven Verbindungen wird daher häufig auch als Leitsubstanzscreening bezeichnet.

Auch mit modernen Methoden ist die *de novo*-Strukturaufklärung eines Naturstoffs immer noch zeitraubend und teuer. Daher ist es unumgänglich, bereits in einem möglichst frühen Stadium der Suche schon bekannte Verbindungen zu erkennen und auszumustern; diesen Vorgang nennt man Dereplikation. Dabei geht man stets so vor, daß leicht zugängliche Eigenschaften mit Literaturdaten verglichen werden. Dies können z. B. mikrobiologische Hemmspektren sein, also die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Testkeime gegen den Wirkstoff. Viel genutzt wird auch der Vergleich von MS- oder UV-Spektren [20] und Retentionszeiten mit einschlägigen Datenbanken. Und schließlich existieren Datensammlungen, in denen man nach NMR-Daten, Substrukturen, Drehwerten und einer Fülle weiterer Eigenschaften suchen kann [7, 21]. Die Schnittmenge weniger Detailinformationen führt oft bereits zu einer eindeutigen Identifizierung und selbst bei neuen Verbindungen fast immer zu einer Eingrenzung auf die betreffende Substanzklasse, wie nachfolgend für eine Suche mit der Datenbank AntiBase [7] gezeigt wird.

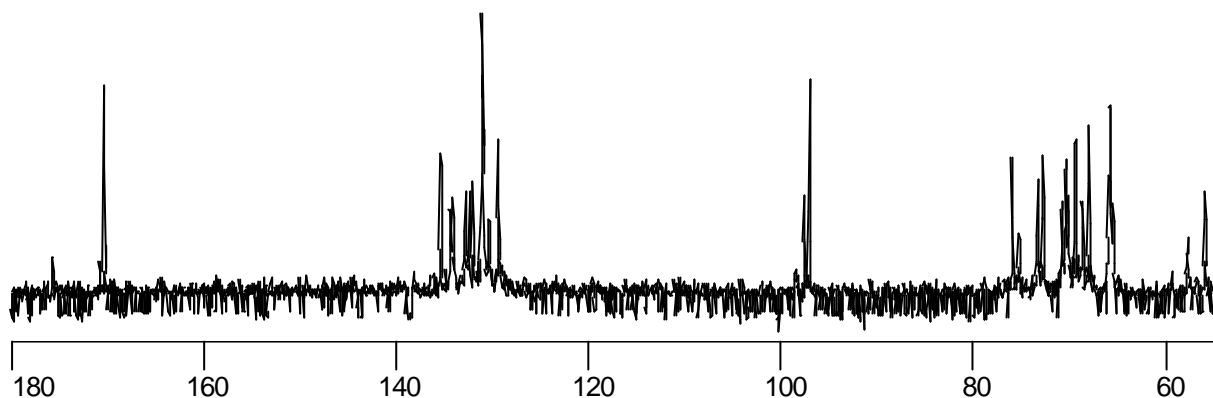
Das in Abb. 5 wiedergegebene schlecht aufgelöste  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum einer technischen Nystatin-Probe ist auch für den Fachmann zunächst wenig ergiebig. Nach näherem Hinsehen kann man allerdings vermuten, daß keine Aromaten enthalten sind, daß Methylgruppen an Heteroatomen oder Doppelbindungen fehlen und daß wenigstens vier  $\text{CH-CH}_3$ -Gruppen enthalten sind. Von 22 500 Einträgen in AntiBase bleiben nach entsprechenden Substruktursuchen nur noch 430 übrig. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt auch ohne tiefeschürfende Interpretation, daß wenigstens eine Säure- oder Estergruppe enthalten ist, Ketone oder Aldehyde aber fehlen. Ein  $\text{CH}$ -Signal bei  $\delta = 97$  zeigt eine Acetalgruppe und damit möglicherweise einen Zucker an; diese Informationen reduzieren die Auswahl auf 39.

Die gelbe Farbe der Probe sowie  $^{13}\text{C}$ -Signale zwischen  $\delta = 129 - 136$  weisen auf Doppelbindungen hin, die nach dem charakteristischen UV-Spektrum mit drei Maxima bei 290, 300 und 320 nm in Konjugation stehen müssen. Dies reduziert die Auswahl auf vier Verbindungen, drei Nystatine und Amphotericin A. Die vier Suchergebnisse sind sich strukturell außerordentlich ähnlich und gehören alle der Gruppe der Polyenmakrolide an. Eine Änderung der Suchstrategie führt zum gleichen Resultat, das damit weitgehend abgesichert wird. Eine weitere Eingrenzung würde über die Massenspektren gelingen, eine Unterscheidung zwischen



dem verbleibenden Amphotericin A und Nystatin A1 aber nur über detaillierte NMR-Untersuchungen oder den direkten Vergleich mit authentischen Proben gelingen.

A)



B)

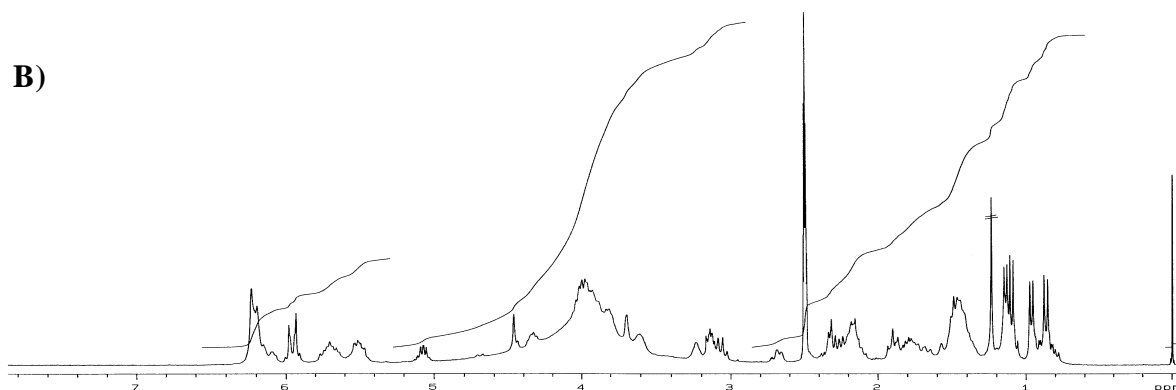


Abb. 5: A)  $^{13}\text{C}$ -NMR- und B)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von technischem Nystatin in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$  bei 75 bzw. 300 MHz

Die Probe wurde in diesem Fall als 'schon bekannt' charakterisiert. Aber auch mit noch nicht beschriebenen Verbindungen gelingt analog häufig eine Eingrenzung auf den Strukturtyp, da neue Grundgerüste äußerst selten sind und sich meist Parallelen zu bekannten Verbindungen finden lassen.

Eine besonders elegante Methode ist die MALDI-TOF-Massenspektrometrie, bei der Inhaltsstoffe ohne Extraktion selbst in intakten Bakterienzellen nachgewiesen und in günstigen Fällen durch MS/MS-Techniken eindeutig charakterisiert werden können [22]. Besonders für Peptide und andere polare Verbindungen ist diese Methode gut geeignet.

Durch innovative Techniken in der Geräteentwicklung haben Online-Methoden weiter an Bedeutung gewonnen. HPLC/MS und vor allem HPLC/NMR-Kopplungen erlauben die Wiedererkennung, zum Teil sogar die vollständige Strukturaufklärung von Komponenten komplexer Gemische ohne vorherige präparative Trennung, was dramatische Zeit- und Kosteneinsparun-

gen ermöglicht. Inzwischen sind NMR-Messungen auch in normalen, nicht-deuterten Lösungsmitteln möglich. Die Optimierung zur Routinemethode durch eine Reduktion der Kosten und eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit ist daher nur eine Frage der Zeit. Dies gilt auch für die Synchrotron-Massenspektrometrie, durch deren Weiterentwicklung in der Naturstoffchemie ein Quantensprung zu erwarten ist.

### 1.2.3 Fermentation im präparativen Maßstab

Bei den von uns bearbeiteten marinen Streptomycceten findet man zu über 80 % biologische oder pharmakologische Aktivitäten, jeder zweite Extrakt ist im Chromatogramm auffällig, wenn auch nur etwa 10 Prozent wirklich bearbeitenswert sind (Abb. 6). Eine Inhibition der Chitin-Synthase fand sich zu 3 % und selektive algizide Aktivität zu etwa 2 %; Tests auf spezielle pharmakologische Aktivitäten, etwa antidiabetische Wirkung, sprechen nur im Promille-Bereich an.

Ohne Optimierung produzieren Streptomycceten im Durchschnitt etwa 1–10 mg Inhaltsstoff pro Liter, andere Bakterien auch deutlich weniger. Strukturaufklärungen sind daher nur nach einem Upscaling möglich, das wie im Vorscreening in einer größeren Zahl von Schüttelkolben durchgeführt werden kann, besser aber in Fermentern geeigneter Größe erfolgt. Wegen der Einzelheiten muß auf die umfangreiche Spezialliteratur verwiesen werden, die in Kap. 1.4 referiert wird.

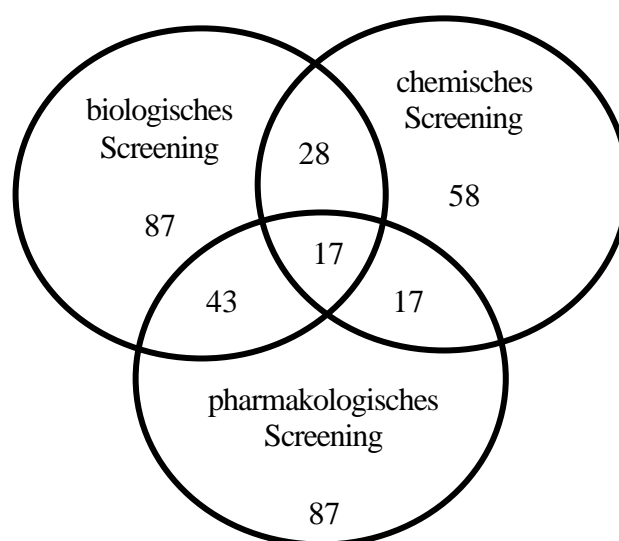


Abb. 6: Aktivitätsverteilung in Prozent (n = 268) bei Extrakten mariner Streptomycceten

---

Die Extraktion der Kulturansätze erfolgt ähnlich wie im analytischen Maßstab durch Extraktion mit Lösungsmitteln oder Adsorberharzen, wobei jetzt allerdings eine vorhergehende Separation in Zellmasse und Filtrat sinnvoll sein kann. Dazu setzt man den Kulturbrühen ca. 50 g/L Kieselgur zu und filtriert über eine mit einer 2-3 cm hohen Schicht Kieselgur beschickte Nutsche. Im Technikumsmaßstab werden auch Durchlaufzentrifugen oder Membranfilter eingesetzt. Das Filtrat wird mit Lösungsmitteln wie Essigester, Butanol oder Butylacetat ausgeschüttelt. Den Filtrerrückstand extrahiert man am besten mit Methanol oder Aceton.

Auch durch Festphasenextraktion an Aktivkohle oder anderen lipophilen Trägern (unterschiedliche Polystyrolharze oder Polyacrylamide) lassen sich unpolare und selbst auch polare Verbindungen extrahieren und reinigen (hydrophobe Interaktions-Chromatographie). Dabei werden Fermentationsbrühen oder auf andere Weise gewonnene Extrakte als wäßrige Lösung durch ein Harzbett perkoliert und schließlich durch einen Methanol/Wasser-Gradienten eluiert. Auf diese Weise lassen sich Extraktion und Vorfraktionierung in einem Schritt vereinen und gleichzeitig Zeit und Kosten sparen. Neuerdings wird zur Extraktion von Zellsuspensionen auch die Floating Bed-Chromatographie angewandt, bei der das Adsorbens von unten durchströmt wird. Zelltrümmer werden bei dieser Technik ausgeschwemmt. Das beladene Adsorbens wird anschließend in Gegenrichtung mit Methanol oder Aceton eluiert.

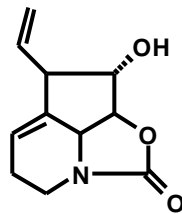
Die aus den Adsorber-Eluaten oder unmittelbar aus den organischen Phasen erhaltenen Extrakte werden in Methanol aufgenommen und mit Cyclohexan entfettet; letzteres ist Petroleumäther oder Hexan wegen der größeren Reinheit und der geringeren Toxizität unbedingt vorzuziehen.

In den meisten Fällen verbleibt die biologisch aktive oder im chemischen Screening detektierte Verbindung in der Methanolphase und kann daraus durch eine Kombination der verschiedenen Trennverfahren - vor allem durch Chromatographie an Normal- und Umkehrphasen oder Ionenaustauschern, Ausschlußchromatographie an Dextranen (Sephadex<sup>®</sup> der Firma Pharmacia) oder Gegenstromverteilung - als Reinsubstanz isoliert werden.

Die Aufarbeitung läßt sich erheblich vereinfachen, wenn bereits Vorstellungen über die chemischen Eigenschaften der erwarteten Produkte existieren, wenn also z. B. Säuren oder Alkaloide isoliert werden sollen oder der zu isolierende Stoff bereits aus anderen Quellen bekannt ist. Wenn dies nicht zutrifft, prüft man die Löslichkeit in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln oder bei verschiedenen pH-Werten. Man stellt fest, ob die Aktivität an

Ionenaustauscher, Harzadsorber oder RP-Kieselgele bindet oder ob sie besser an Normalphasen- oder Umkehrphasen-Kieselgele getrennt wird.

Von großer Bedeutung ist es, die Anreicherung der Substanzen auf jeder Trennstufe z.B. durch Messung der biologischen Aktivität zu kontrollieren. Übermäßig hohe Verluste deuten darauf hin, daß sich die Aktivität auf mehrere Wirkstoffe oder aber durch mangelhafte Trennbedingungen über die ganze Säule verteilt. Auch Zersetzungsreaktionen können die Ausbeute senken. So polymerisiert Streptazolin selbst bei schonendem Eindampfen seiner Lösung bei Raumtemperatur sehr rasch.



**Streptazolin**

Fermentationen im Technikums-Maßstab werden wegen des hohen Aufwandes gewöhnlich nur bei anwendungsorientierten Zielsetzungen durchgeführt, bei denen Milligramm-Ausbeuten nicht mehr ausreichen. Hier werden vielmehr Produktkonzentrationen von 5 g/L und mehr angestrebt, was eine sorgfältige Fermentationsoptimierung und für eine Maximierung der Gen-Expression im allgemeinen auch genaue Kenntnisse der Biogenese und der Biosynthese als Basis für gezielte Verbesserungen erfordert. Meist sind zusätzlich genetisch veränderte Organismen notwendig, die durch Mutagenese oder zielgerichtet durch genetic engineering erzeugt werden und günstigere Eigenschaften als der Wildstamm aufweisen: z. B. autoresistent gegen das gebildete Antibiotikum sind, ein engeres Produktspektrum aufweisen und genetisch stabil sind.

Ein schönes Beispiel ist die Ausbeuteoptimierung von Penicillin, die durch die Isolierung von Hochleistungsstämmen (*Penicillium chrysogenum*) und die Fütterung von Biosynthesevorstufen (z. B. Phenyllessigsäure) von ursprünglich 1 mg/L auf über 50 g/L gesteigert werden konnte [23]!

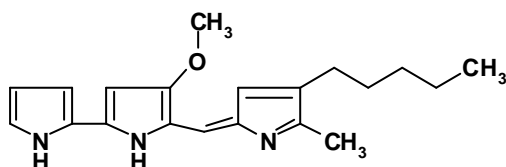
#### **1.2.4 Strukturaufklärungen**

In der Mehrzahl der Fälle erfolgt die Strukturaufklärung von Naturstoffen heute ausschließlich durch spektroskopische Verfahren oder durch Kristallstrukturanalyse. Derivate oder gar Abbaureaktionen sind anders als früher nur noch für spezielle Fragestellungen

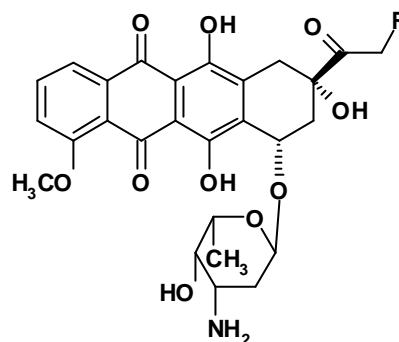
erforderlich, gelegentlich z. B. für die Bestimmung der absoluten Konfiguration. Dennoch darf nicht übersehen werden, daß bereits einige wenige Elementarreaktionen wichtige Rückschlüsse auf die Struktur zulassen.

Von den derzeit bekannten mikrobiellen Naturstoffen enthalten 39 % Doppelbindungen und 47 % aromatische Systeme oder beides. Die Fluoreszenzlöschung an Kieselgel bei Anregung mit UV-Licht (254 nm) ist daher ein Hinweis auf derartige Chromophore. Eine Fluoreszenz bei 366 nm zeigt schließlich ein starres chromophores System an, wie es meist nur in Aromaten gefunden wird. Etwa 80 % der Naturstoffe aus Mikroorganismen sind farblos. Farbe ist daher ein wichtiger Hinweis auf ganz bestimmte Substanzklassen, besonders, wenn noch Tüpfelreaktionen hinzugezogen werden.

Leuchtend rote Zonen geringer Polarität im Chromatogramm ( $R_f = 0,8$  in Chloroform/Methanol 95:5 (V/V), die beim Antüpfeln mit Natronlauge gelb werden, zeigen die Gegenwart von Prodigiosinen an. Diese in Hefen und Streptomyceten weit verbreitete Substanzgruppe wirkt immunsuppressiv und ist gegen Malaria-Erreger aktiv. Bei der Aufarbeitung sind Prodigiosine durch ihre große Lipophilie und die dadurch bedingte hohe Affinität zu Adsorberharzen und RP-Materialien störend.



**Prodigiosin**



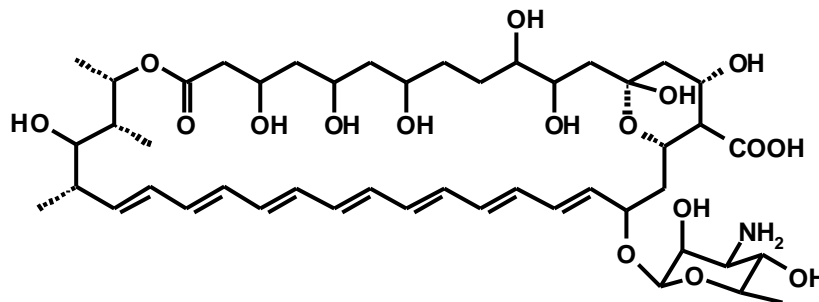
**Doxorubicin (R = OH)**

**Daunorubicin (R = H)**

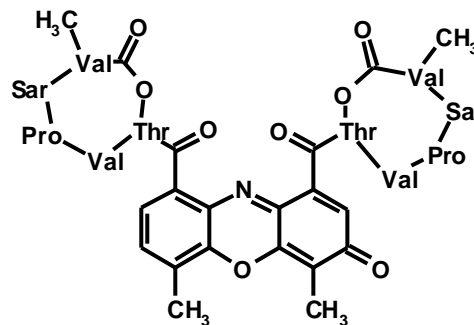
Gelbe, orange oder rote Zonen, die durch Natronlauge nach Rot, Blau oder Violett umfärben, enthalten stets Hydroxychinone mit mindestens einer chelierten Hydroxygruppe. Aus Bakterien und Pilzen wurden bisher mehr als 1 700 dieser Verbindungen isoliert. Wichtige Beispiele sind das in der Tumorthherapie eingesetzte Doxorubicin (Adriamycin) sowie Daunorubicin.

Erfolgt bei gelben oder orangen Verbindungen dagegen keine Farbänderung mit Basen, könnten Polyene vorliegen. Diese Verbindungen erkennt man an ihren typischen UV-Spektren und bei einer genügend langen konjugierten Kette (eine sichtbare Gelbfärbung erfordert bereits 5

konjugierte Doppelbindungen) an ihrem Verhalten gegen konzentrierte Schwefelsäure: Carotinoide oder ähnliche Polyene werden beim Antüpfeln dunkelblau oder grün. Labilere Polyene, z. B. das zur Behandlung systemischer Pilzinfektionen äußerst wichtige Amphotericin B, werden dunkelbraun.



**Amphotericin B**

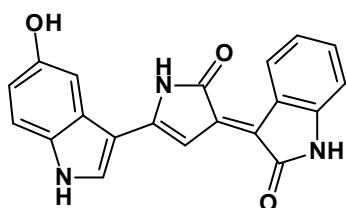
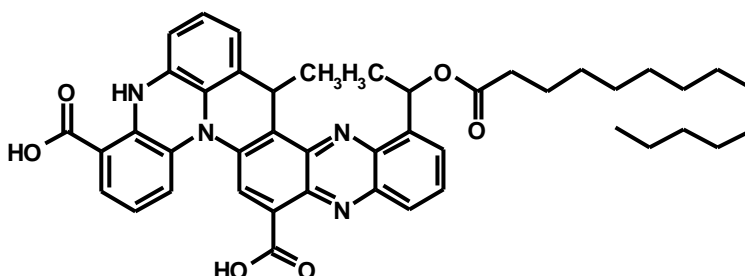


**Actinomycin D**

Intensiv gelbe oder orange Zonen, die sich weder mit Schwefelsäure noch mit Lauge verfärben, enthalten meistens Actinomycine. Diese in die DNA interkalierenden Chromopeptide verdanken ihre Farbe dem Phenoxazinon-Chromophor und zeigen meist eine hohe Zytotoxizität und starke antibiotische Wirkung; mehr als 40 sind strukturaufgeklärt.

Vom pH-Wert unabhängige violette, blaue und besonders grüne Pigmente sind in Mikroorganismen äußerst selten; meist ist die blaue Farbe lediglich auf Salzbildung von Hydroxychinonen zurückzuführen. Ein pH-unabhängig blaues Pigment ist das aus Meeresbakterien (*Alteromonas luteoviolaceus*) isolierte Violacein. Auch Indigo oder Indigoderivate wurden gefunden. Aus *Streptomyces antibioticus* Tü 2706 wurde das dunkelgrün lösliche Esmeraldin isoliert [24].

Farbreaktionen mit Sprühreagenzien sind meist wesentlich schwieriger zu interpretieren. Ausnahmen bilden die roten, blauen und violetten Farbtöne von Indolderivaten mit *p*-N,N-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs Reagenz).

**Violacein****Esmeraldin A**

Keinen Rückschluß auf die Struktur lassen dagegen die zahlreichen Farbnuancen beim Ansprühen mit Anisaldehyd-Reagenz zu. Hier sollte man sich jedoch das Verhalten typischer Verunreinigungen und Störkomponenten einprägen: die blau fluoreszierende Zone der Anthranilsäure wird gelb, UV-löschende Phthalsäureester, die bei Kontakt mit Plastikmaterialien eingeschleppt werden, färben sich blaugrau, Daidzein und Genistein aus Soja-Nährmedien werden gelblich (fluoreszieren aber nicht, sondern löschen die Fluoreszenz) usw.

Für die eigentliche Strukturaufklärung stehen heute zahlreiche spektroskopische Verfahren zur Verfügung, für deren Anwendung die Probe allerdings eine Reinheit von wenigstens 95 % haben sollte. Zweckmäßigerweise versucht man zunächst, massenspektrometrisch durch Hochauflösung die Molmasse zu bestimmen. Bei kleineren Molekülen gelingt dies meist durch Stoßionisation (EI), die an den moderneren Geräten auch eine Bestimmung der Summenformel durch Hochauflösung zuläßt. Bei komplexeren Naturstoffen sind dagegen chemische Ionisation oder besser Elektrospray-Ionisation ergiebiger, die sich inzwischen beide leicht mit HPLC-Trennungen kombinieren lassen.

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren ergeben die Zahl der C-Atome und erlauben über die chemische Verschiebung eine Aufschlüsselung in  $\text{sp}^2$  und  $\text{sp}^3$ -Zentren sowie Aussagen über die chemische Umgebung. Methyl-, Methylen- und Methingruppen sowie quartäre C-Atome werden durch APT- oder DEPT-Spektren unterschieden. Aus chemischer Verschiebung und Multiplizität gelingt eine Abschätzung der Protonenzahl.

Protonenspektren liefern darüber hinaus Aussagen über Substitutionsmuster, elektronische Einflüsse und sterische Faktoren. Zur Strukturaufklärung komplexerer Naturstoffe sind jedoch meist zweidimensionale NMR-Messungen erforderlich, in erster Linie H,H- und C,H-Korrelationen (COSY, HMQC), bei genügend großen Substanzmengen auch C,C-Korrelationen

(INADEQUATE). Eine große Bedeutung haben HMBC-Spektren ( $^n$ J-Korrelationen), durch die Kohlenstoffverknüpfungen auch über quartäre Kohlenstoffe oder Heteroatome hinweg verfolgt werden können. NOESY-Spektren schließlich erlauben Aussagen über die sterische Anordnung von Substituenten. Zu diesen Themen existiert eine umfangreiche Spezialliteratur.

### **1.2.5 Strukturtypen mikrobieller Wirkstoffe**

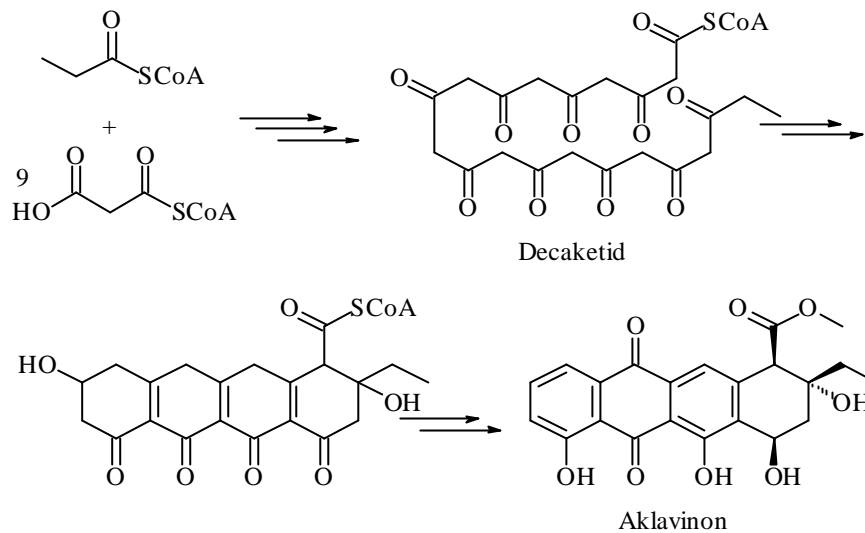
Die verwirrende Vielfalt der Sekundärstoffe ist ohne ein Ordnungsprinzip kaum noch zu überblicken. Eine Klassifizierung nach der pharmakologischen Aktivität oder dem zellulären Angriffsort ist bei Wirkstoffen zwar naheliegend, aus chemischer Sicht aber unbefriedigend. Bakteriostatische, bakterizide, fungizide, antivirale, karzinostatische oder zytotoxische Verbindungen, Zellwand-aktive Substanzen, Enzyminhibitoren usw. gibt es in großer Zahl, wobei ihre Strukturen bei gleicher Aktivität, oftmals sogar gleichem Wirkort, jedoch keinerlei Gemeinsamkeiten aufweisen müssen. Aus der Wirkung läßt sich nicht auf die Struktur rückschließen!

Umgekehrt findet man gewisse Strukturelemente allerdings häufig mit ähnlichen Aktivitäten gepaart. En-diene und häufig auch Epoxide oder Michael-Akzeptoren wirken zytotoxisch, viele  $\beta$ -Lactame wirken antibakteriell, bei Polyenen häufen sich antifungische Wirkungen. Die Klassifizierung nach chemischen Merkmalen verbindet die Chemie mit medizinisch-pharmakologischen Kriterien und ist daher besonders übersichtlich; sie wird hier für die nachfolgenden Beispiele benutzt.

Eine Einteilung nach dem Biosyntheseweg ist zweifellos die umfassendste und damit sinnvollste, weil hier nicht womöglich oberflächliche strukturelle Ähnlichkeiten, sondern ursächliche Zusammenhänge zur Untergliederung genutzt werden. Leider sind Aussagen über den Biosyntheseweg aber erst nach aufwendigen Untersuchungen möglich, so daß diese Einteilung namentlich bei neuen Naturstoffen nicht immer praktikabel ist.

Zucker sind die Biosynthesebausteine von mindestens 3000 mikrobiellen Glycosiden, Aminoglycosiden, Oligosacchariden und Nucleinsäuren, gehen über Phosphoenolpyruvat oder den Pentosecyclus aber auch in zahlreiche Aromaten, Alkaloide oder aromatische Aminosäuren über. Acetat, Propionat und Malonat schließlich sind die Bausteine für die große Gruppe der Polyketide (Acetogenine), zu deren Aufbau zunächst enzymatisch Polycarbonylverbindungen synthetisiert und schließlich zu den unterschiedlichsten Strukturen gefaltet werden. Ebenfalls aus Acetat entstehen die besonders in Pflanzen häufigen Isoprenoide, zu denen z.B. die große Gruppe der Carotinoide gehört.





Die von Acetat oder Zuckern ausgehenden Hauptstoffwechselwege werden gewöhnlich noch weiter untergliedert und durch Nebenwege ergänzt. Zu bedenken ist, daß häufig durchaus auch mehrere Stoffwechselwege an einem Naturstoff beteiligt sein können, z. B. können an Polyketide Zucker oder isoprenoide Seitenketten angehängt werden. Ein weiteres Beispiel ist die oben erwähnte Biosynthese des Pentabrompseudilins. Auf Einzelheiten kann an dieser Stelle verzichtet werden, da bereits ausführliche Monographien zur Biosynthese von Antibiotika existieren [25].

### 1.2.6 Ausgewählte Antibiotika

Das erste System einer chemischen Klassifizierung der Naturstoffe stammt von Berdy, der in seinem "Handbook of Antibiotic Compounds" eine Einteilung in 10 Hauptgruppen mit jeweils zahlreichen Untergruppen vorgenommen hat. Aus Platzgründen können hier allerdings nur wenige Beispiele (Tab. 1) herausgegriffen werden; ausführlichere Zusammenstellungen listet Gräfe auf [25].

Penicillin G und seine zahllosen partialsynthetischen Derivate sind Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese. Als Einzelheiten über den Wirkmechanismus bekannt wurden, konnte man gezielt nach Hemmstoffen der D-Ala-D-Ala-Carboxypeptidase und Transpeptidase suchen. Ergebnisse sind die wichtigen Entdeckungen der Carpenimycine, Thienamycine, zahlreicher Cephalosporine, der Tabtoxine, Monobactame und unzähliger semisynthetischer  $\beta$ -Lactame. Der große Wert dieser Verbindungsklasse gründet sich auf die

meist<sup>3</sup> sehr gute Verträglichkeit, den leichten Zugang zu Verbindungen mit verändertem Wirk- und Resistenzspektrum und die günstigen pharmakodynamischen Eigenschaften moderner Derivate.

**Tab. 1: Wichtige Antibiotika-Typen und Beispiele**

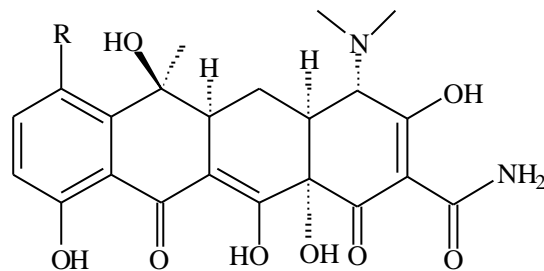
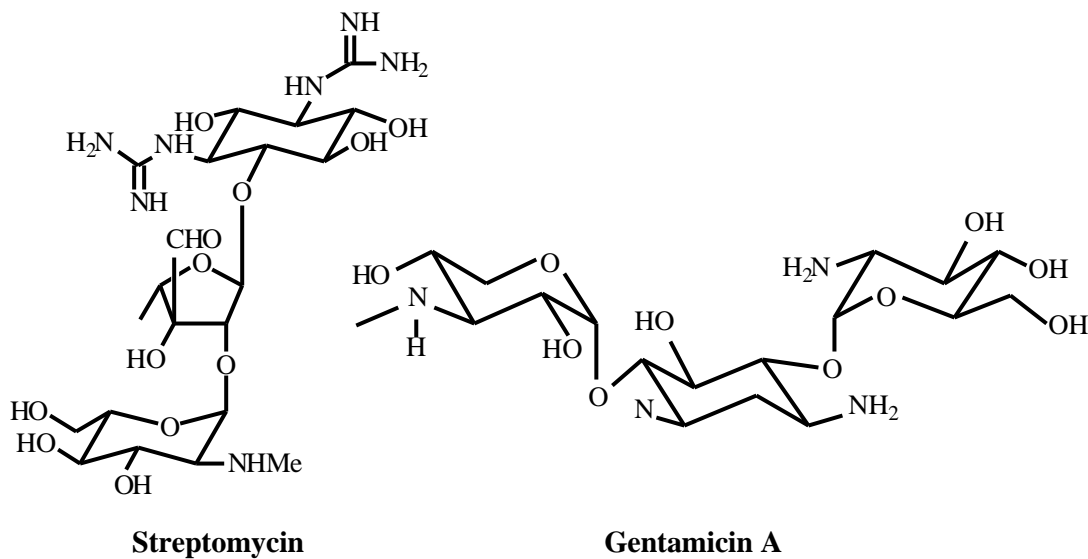
<b>β-Lactam-Antibiotika</b>	Penicilline, Cephalosporine, Monobactame	<b>Anthracycline</b>	Rhodomyacin, Daunomycin, Aclacinomycine
<b>Ansamycine</b>	Rifamycin, Mycotrienin	<b>Peptid-Antibiotika</b>	Gramicidin, Bacitracin
<b>Aminoglykoside</b>	Streptomycin, Kanamycin	<b>Polyen-Antibiotika</b>	Amphotericin B, Nystatin
<b>Nukleosid-Antibiotika</b>	Nikkomycine, Polyoxine	<b>Polyether</b>	Alborexin, Monensin
<b>Tetracycline</b>	Chlortetracyclin, Doxycyclin	<b>Terpenoide Antibiotika</b>	Pentalenolacton, Fusidinsäure
<b>Makrolid-Antibiotika</b>	Erythromycin, Olean- domycin	<b>Endiin-Antibiotika</b>	Calicheamicin, Esperamicin, Kedarcidin

Die bei Penicillin G schon früh beobachtete erworbene Resistenz wird u.a. durch Veränderungen an den Zellwandsyntheseenzymen [26], vor allem aber durch eine Inaktivierung durch β-Lactamase bewirkt. Alle Penicilline der sogenannten III. Generation, wie etwa das Cloxacillin sind Derivate der 6-Aminopenicillansäure, die ihrerseits durch enzymatische Spaltung von Penicillin G gewonnen wird; sie sind zwar gegen β-Lactamase stabil, können aber durch andere Mechanismen inaktiviert werden.

Die große Gruppe der aus Bacillen, Streptomyceten und *Micromonospora*-Arten isolierten Aminoglykosid-Antibiotika wurde 1944 mit dem von Waksman entdeckten Streptomycin eröffnet. Kanamycin, Gentamicin (aus *Micromonospora purpurea*), Neomycin und viele weitere Beispiele dieses Strukturtyps sind breitspektral gegen zahlreiche gramnegative Organismen sowie die meisten grampositiven Keime wirksam, deren Proteinbiosynthese sie auf der Ebene der Ribosomen hemmen. Im Gegensatz zu den für Warmblüter nahezu

<sup>3</sup> gelegentlich treten Allergien auf, die zum anaphylaktischen Schock führen können

ungiftigen Penicillinen ist Streptomycin jedoch ototoxisch (neurotoxische Wirkung auf den Gehörnerv) und kann daher nur für kurze Zeit verabreicht werden.



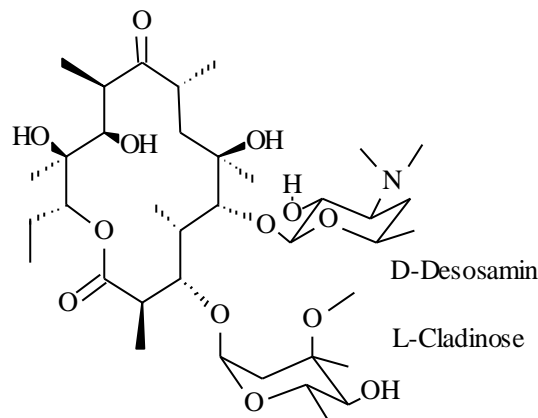
**Chlortetracyclin (R = Cl)**  
**Tetracyclin (R = H)**

Chlortetracyclin (Aureomycin, 1947) und ein Jahr später Tetracyclin waren die ersten Beispiele aus einer Gruppe tetracyclischer Polyketide mit breitspektraler Wirkung, die durch ihre orale Anwendbarkeit zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika gehören. Leider wurden diese Verbindungen wegen ihres nutritiven Effekts eine Zeit lang auch in der Tiermast eingesetzt, was die Resistenzentwicklung außerordentlich begünstigt hat. Alle natürlichen und partialsynthetischen Tetracycline inhibieren den Elongationsschritt der bakteriellen Protein-Biosynthese.

Die Biosynthese der Anthracycline geht wie die der Tetracycline von Polyketiden aus, die jedoch nicht an C-6 methyliert werden und dadurch in Chinone übergehen können. Anders als bei Tetracyclinen erhalten die auf diesem Wege zunächst entstehenden Anthracyclinone ihre antibiotische oder cytotoxische Aktivität erst durch die Verknüpfung mit Zuckern, von denen

der erste meist eine 3-Aminohexose ist. Die Produkte sind wegen ihres Chromophors orange oder rote bis violette Substanzen. Sie wurden in der Natur zwar wegen ihrer Wirkung auf grampositive Organismen entdeckt, werden für die Therapie von Infektionskrankheiten heute aber nicht mehr eingesetzt. Von großer Bedeutung ist vielmehr ihre zum Teil extreme tumorigene Wirkung, die ihre Ursache in einer spezifischen Interkalation in die DNA hat. Leider zeigen die inzwischen in die Anwendung gelangten Anthracycline wie Daunorubicin oder Doxorubicin, eine erhebliche Kardiotoxizität, die einer Monotherapie Grenzen setzt.

Makrolide sind Lactone mit Ringgrößen von zehn und mehr C-Atomen. Sind zusätzlich mehr als zwei Doppelbindungen im Ring vorhanden, so spricht man von Polyen-Makroliden, zu denen auch das schon genannte Amphotericin B gehört.



**Erythromycin A**

Eins der wichtigsten Makrolide ist das 1952 aus *Streptomyces erythreus* isolierte Erythromycin A, von dem inzwischen verschiedene semisynthetische Varianten existieren. Sie sind als Inhibitoren der ribosomalen Protein-Biosynthese peroral gegen ein breites Spektrum gram-positiver und gram-negativer Bakterien, Actinomyceten, Spirochäten, Rickettsien und einige Viren wirksam und gelten als sehr sichere Antibiotika.

Im Gegensatz zu den einfachen Macroliden wirken die Polyen-Macrolide nicht auf Bakterien, sondern auf Pilze: Sie gehen Wechselwirkungen mit den Sterolen der Zelle ein, vor allem mit dem in tierischen Zellen nicht vorkommenden Ergosterol in Pilzen, und destabilisieren dadurch deren Zellmembran. Amphotericin B ist eins der wenigen systemisch wirkenden Fungizide; das strukturell sehr ähnliche Nystatin wird wegen seiner Toxizität derzeit nur lokal angewandt. Amphotericin B wird zur Behandlung systemischer Mykosen und parasitärer Infektionen (Leishmaniasis) als liposomale Infusion gegeben, hingegen wird Nystatin nur lokal im Verdauungstrakt als Tablette oder dermal auf der Haut angewandt.

Die Gruppe der Peptid-Antibiotika (zu der auch die  $\beta$ -Lactame gezählt werden) umfaßt mehr als 2000 Beispiele. Die höhermolekularen Vertreter unter ihnen (mehr als 30 Aminosäuren) werden durch ribosomale Proteinsynthese aufgebaut und bestehen ausschließlich aus den proteinogenen Aminosäuren, die jedoch in Folgeschritten enzymatisch prozessiert werden können. Zu ihnen gehören Nisin, das zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt wird, das ebenfalls aus Bazillen isolierte und strukturell verwandte Subtilin sowie die Microcine aus verschiedenen *Escherichia coli*-Stämmen.

Polypeptid-Antibiotika mit noch höheren Molmassen (über 7 000) und einer lytischen Aktivität gegen andere Stämme der gleichen Art bezeichnet man als Bacteriocine. Bacteriocin-bildende *E. coli*-Stämme können z.B. die normale *E. coli*-Population überwuchern und so zu gastro-intestinalen Störungen führen. Andere Bacteriocine werden in der Lebensmittelverarbeitung genutzt.

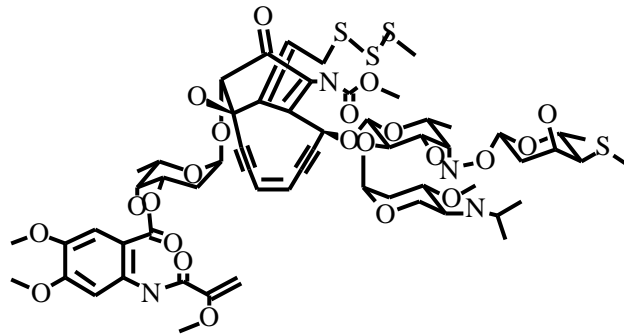
Strukturell interessanter ist die Vielzahl kleinerer cyclischer und linearer Peptide, die überwiegend nicht-peptidogene Aminosäuren und häufig auch zusätzliche Strukturen, wie Fettsäuren oder Chromophore, enthalten. Bekannte Beispiele sind die stark zytotoxischen Actinomycine (s. o.), aber auch Amanitin und Phalloidin aus dem tödlich giftigen Knollenblätterpilz. Bacitracin, Gramacidin S, Tyrocidin oder die Polymyxine aus Mikroorganismen haben auch medizinische Bedeutung erlangt.

### 1.2.7 Ausblick

Die Untersuchung von Mikroorganismen zeigt nach wie vor aufregende Ergebnisse. Die Entdeckung des Naturstoffs FK-506 oder von Endiinen wie den Esperamicinen haben zu neuen Einsichten in das Immunsystem der Wirbeltiere geführt und neue Methoden der Krebsbehandlung ermöglicht; sie widerlegen gleichzeitig den Eindruck, daß alle Metabolite Antibiotika sind: Wenn man gezielt screent, findet man immer die entsprechende Wirkung, die Natur hält auf jede Frage eine Antwort bereit. Dies ist gleichzeitig richtungsweisend für die zukünftige Entwicklung in der Naturstoffchemie, in der nach umweltverträglichen Lösungen gesucht wird. Naturstoffe sind immer auch biologisch abbaubar; wenn dies nicht so wäre, hätte die Natur sich längst selbst vergiftet.

Neue Anwendungen werden sich wegen des hohen Preises von Naturstoffen auch weiterhin auf die Medizin konzentrieren. Dennoch gewinnen auch außerhalb dieses traditionellen Gebiets Anwendungen im Pflanzenschutz, in der Tierzucht, als abbaubare Kunststoffe

(Polyhydroxybuttersäure) und selbst in der Technik zum Entrosten von Stahl (Siderophore) an Bedeutung.



**Esperamicin A1**

Man darf erwarten, daß der Stellenwert der Naturstoffe durch Veränderungen der Produkte mit biochemischen Methoden, durch kombinatorische Biosynthese oder den Focus auf neue Organismen und neue Nachweismethoden weiter erhöht werden wird.

Nach Prelog tragen die Naturstoffe eine Botschaft, und es ist Aufgabe der Chemie, sie zu entschlüsseln.

## Literatur

- [1] Verhoef, J. (1994) Worldwide resistance against antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 4/3, 141-2.
- Wiedemann, B. (1996) Die Epidemiologie antibiotikaresistenter Bakterien und die Notwendigkeit, validierte und qualitätskontrollierte Testergebnisse zu verwenden. *GIT LaborMedizin* 5/96, 217-226
- [2] Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M. (1997) Natural Products in Drug Discovery and Development. *J. Nat. Prod.* 60, 52-60
- [3] Zähner, H., Zeeck, A. (\*\*) Mikrobieller Sekundärstoffwechsel, in \*\* S. 93
- [4] Müller, E. (1947) Secondary Metabolism and Co-evolution. Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle/Saale, 123
- [5] Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R., Rahman, S. K. (1989) Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.* 52, 1189-208
- [6] Laatsch, H., Floss, G. G., Hanefeld, U. (1994) Biosynthesis of the Marine Antibiotic Penta bromopseudilin - Part I: The Benzene Ring. *J. Org. Chem.* 59, 3604-3608. Peschke, J. (1998) Biosynthesen mariner Naturstoffe - Untersuchungen zur Bildung des Phenylpyrrols Pentabrompseudilin. Dissertation im math.-nat. Fachbereich der Universität Göttingen
- [7] Laatsch, H (1994 und jährliche Updates) Naturstoffdatenbank AntiBase, Chemical Concepts, Weinheim
- [8] Abraham, E.P., Chain, E. (1949) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837
- [9] Zähner, H., Fiedler, H.-P. (1995) The need for new antibiotics: possible ways forward, in: Fifty years of antimicrobials: Past, Perspectives and Future Trends. Hunter, P.A., Darby, G.K., Russell, N. J. (Herausg.), University Press, Cambridge
- [10] Drews, J. (1998) Innovation deficit revisited: reflections on the productivity of pharmaceutical R&D. *DDT* 3, 491-494
- [11] Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J. H. (1992) Biodiversity as a Source of Innovation in Biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 219-52
- [12] Reichenbach, H., Höfle, G. (1999) Myxobacteria as producers of secondary metabolites, in: *Drug Discovery Nat.*, Grabley, S., Thiericke, R. (Herausg.), Springer, Berlin, 149-179

- 
- [13] Mühlradt, P. F. (1997) Epothilone B stabilizes microtubuli of macrophages like taxol without showing taxol-like endotoxin activity. *Cancer Res.* 57, 3344-3346
- [14] Bewley, C. A., Faulkner, D. J. (1998) Steinschwämme: Stars unter den Naturstoffproduzenten oder Wirte der Stars? *Angew. Chemie* 110, 2280-2297
- [15] Omura, S. (1992) *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*. Springer, New York, 1. Aufl.
- [16] Umezawa, S., Tsuchiya, T., Tatsuta, K., Horiuchi, Y., Usui, T., Umezawa, H., Hamada, M., Yagi, A. (1970) A New Antibiotic, Dienomycin. I Screening Method, Isolation and Chemical Studies. *J. Antibiot.* 23, 20-27
- [17] Zähner, H., Drautz, H., Fiedler, H.-P., Grote, R., Keller-Schierlein, W., König, W.A., Zeeck, A. (1988) Ways to new metabolites from Actinomycetes in: *Biology of Actinomycetes*, Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H. (Herausg.), Japan Scientific Soc. Press, Tokyo, 171-77. Zähner, H., Drautz, H., Weber, W. (1982) Novel approaches to metabolite screening, in: *Bioactive Secondary Metabolites: Search and Discovery*, Bu'Lock, J.D., Nisbet, L.J., Winstanley, D.J. (Herausg.), Academic Press, London, 51-70
- [18] York, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. (1989) *Dünnschicht-Chromatographie Band 1a*, VCH, Weinheim, 1. Aufl.
- [19] GlaxoWellcome (1996) Redesigning drug discovery, *Nature* 384, 1 und folgende Artikel
- [20] Fiedler, H.-P. (1993) Screening for secondary metabolites by HPLC and UV-visible absorbance spectral libraries. *Nat. Prod. Lett.*, 2, 119-128
- [21] Buckingham, J., Thompson, S. (1997) The Dictionary of Natural Products and Other Information Sources for Natural Products Scientists, in: *Phytochemical Diversity - A Source of New Industrial Products*, The Royal Society of Chemistry, 53-67
- [22] Erhard, M., von Doehren, H., Jungblut, P. R. (1998) MALDI-TOF-mass spectrometry. Fast-screening and structure analysis of secondary metabolites. *BIOspektrum*, 4, 42-46. Leenders, F., Stein, T. H., Kablitz, B., Franke, P., Vater, J. (1999) Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of intact cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 943-949
- [23] Eine detaillierte Beschreibung der Penicillin-Entwicklung findet man bei Bocker, H., Thrum, H. (1987) *Antibiotika - woher, wofür?* Urania-Verlag, Leipzig
- [24] Keller-Schierlein, W., Geiger, A., Zaehner, H., Brandl, M. (1988) The esmeraldines A and B, green pigments from *Streptomyces antibioticus*, strain Tu 2706. *Helv. Chim. Acta* 71, 2058-70
- [25] Gräfe, U. (1992) *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum, Heidelberg
- [26] Hakenbeck, R. (1989) Intrinsische Penicillinresistenz beruht auf veränderten Penicillin-bindenden Proteinen. *Forum Mikrobiologie* 5, 241- 250

## **Anschrift**

### **Prof. Dr. Hartmut Laatsch**

Georg August Universität

Institut für Organische Chemie

Tammannstraße 2

37077 Göttingen

E-Mail: hlaatsc@gwdg.de

WWW: [www.gwdg.de/~ucoc/laatsch/](http://www.gwdg.de/~ucoc/laatsch/)