

Wirkstoffe aus dem Kühlschrank der Natur

Hartmut Laatsch

Institut für Organische und Biomolekulare Chemie

Wirkstoffe aus Mikroorganismen – Antibiotica – sind ein unverzichtbarer Bestandteil der modernen Medizin. Die rasche Entwicklung von Resistenzen zwingt uns, nach immer neuen Medikamenten in immer ausgefalleneren Habitaten zu suchen. Gibt es diese Stoffe nur in den tropischen Regenwäldern und warmen Meeren? Wir haben im ewigen Eis der Polargebiete gesucht und sind auch dort fündig geworden!

Die Polargebiete zählt man mit Recht zu den lebensfeindlichsten Regionen der Erde. Im Winter sinkt die Temperatur an der Oberfläche unter $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, und eisige Orkane toben über die Weiten. Abseits der offenen See begegnet man nicht einmal mehr Pinguinen oder Eisbären, höchstens noch Polarforschern. In den Packeisregionen, in denen die Eisdecke auf dem Wasser schwimmt und nur wenige Meter dick ist, ändert sich diese Situation jedoch



Abb. 1: Polarforscher bei der Entnahme von Eis-Bohrkernen

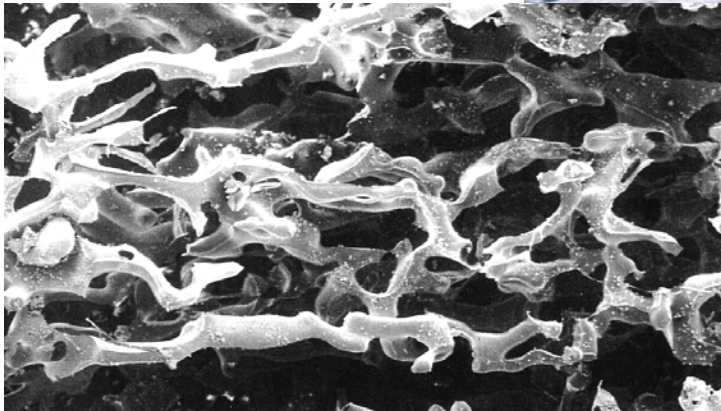


Abb. 2: Kunstharzausguß von Meereis unter dem Rasterelektronenmikroskop¹.

ser fallen dagegen zuerst Eiskristalle aus reinem Süßwasser aus, und der Salzgehalt im verbleibenden flüssigen Anteil steigt, wodurch dessen Gefrierpunkt sinkt. Der Eisbrei verdichtet sich schließlich zu einer schwammartigen Struktur, deren Kanäle mit Salzwasser gefüllt und nach unten zum Meer hin offen sind (Abb. 2). Die konzentrierte und schwere Lösung mit bis zu 14 % Salzgehalt läuft langsam aus und wird im unteren Bereich durch die Wellenbewegung durch frisches Meerwasser ersetzt. Geschmolzenes Packeis erreicht dadurch nur einen Salzgehalt von $<1\%$, während polares Meerwasser eine Salinität von etwa 3.4 % hat.

Die Solekanäle des polaren Packeises bilden einen Lebensraum besonderer Art. Trotz der lebensfeindlichen Bedingungen an der Oberfläche herrschen im Inneren

dramatisch, wenn auch unsichtbar für den Beobachter an der Oberfläche. Dies hängt mit den besonderen Eigenschaften von Salzwasser zusammen: Wenn Süßwasser gefriert, so entsteht eine homogene porenfreie Eisschicht. In Salzwasser



Abb. 3: Eisbohrungen in der Antarktis. Im Hintergrund das Forschungsschiff Polarstern

recht ausgeglichene Temperaturen, die zwischen -14 im Kern und >0 °C an der Eis-Unterseite pendeln. Entgegen jeder Erwartung dringt das spärliche Sonnenlicht mehrere Meter tief in das Eis ein und erhält eine üppige Algenvegetation am Leben, die jede Algenblüte des offenen Meeres übertrumpft: Während man dort nur maximal 50 mg Chlorophyll/ m^3 Wasser findet, sind es im Polareis bis zu 2000 mg/ m^3 , die die Eis-Bohrkerne lebhaft gelb bis tiefgrün färben können^{1,2} (Abb. 5). Auf den Algen siedeln sich wiederum Bakterien an, und trotz extremer Bedingungen bilden sich im Eis schließlich arten- und individuenreiche Lebensgemeinschaften aus, in denen auf engstem Raum auch höher organisierte Vielzeller wie Nematoden, Rotatorien und selbst kleine Nacktschnecken zusammenleben.

Aufgrund der räumlichen Enge und der hohen Individuendichte herrscht jedoch ein hoher Konkurrenzdruck, der spezifische Schutz- und Abwehrstrategien von den Organismen erwarten läßt, um sich durchzusetzen und zu behaupten. Niedrige Bakterien-Grazerraten deuten darauf hin, daß sich Meereisbakterien Standortvorteile verschaffen können, die chemischer Natur sein dürften. Wir sind zwar noch weit davon entfernt, die Grammatik dieser chemischen Kommunikation zu verstehen, sehr wohl aber in der Lage, einige Vokabeln dieser Sprache zu entschlüsseln, also die chemische Struktur der Verbindungen aufzuklären. Dabei ist die Neugier nicht nur grundsätzlicher Natur: Zahlreiche Stoffe des chemischen Kommunikationssystems von Mikroorganismen können Nahrungskonkurrenten vertreiben oder andere Mikroorganismen sogar abtöten: Wir bezeichnen und nutzen sie dann als "Antibiotica", wenn wir auch ihre wahre Bedeutung meist noch nicht kennen!

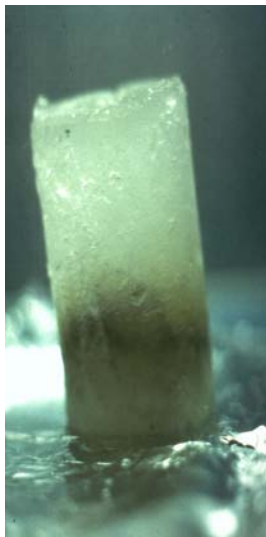


Abb. 5: Bohrkern mit Algen

Wir sind nun interessiert, ob polare Eisbakterien neue und andere Stoffe bilden, die sie von den bereits gut untersuchten terrestrischen Bakterien unterscheiden und die vielleicht sogar praktisch nutzbar sind: Lassen sich Wirkstoffe für die Anwendung in Medizin und Forschung aus diesem Kühlschrank der Natur gewinnen? Mit Förderung des BMBF konnte unsere Arbeitsgruppe am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen dieser Frage gemeinsam mit der Mikrobiologin Elisabeth Helmke vom Alfred Wegener-Institut in Bremerhaven nachgehen.

Die meisten Meereisbakterien haben ein Wachstumsoptimum zwischen -5 und $+5$ °C, viele sterben sogar oberhalb von 15 °C ab: sie sind obligat psychrophil, und ihr Transport von den Fundorten zu den Laboratorien mußte über eine Kühlkette erfolgen. Die genauen taxonomischen Untersuchungen der Ausbeuten von Sammelfahrten in den Arktischen und Antarktischen Ozean im Heimatlabor brachte Überraschungen: Zur Abschätzung der genetischen Vielfalt der Meereisbakteriengemeinschaften hat E. Helmke zwei kultivierungsunabhängige Methodiken eingesetzt: die Clonierung und die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH). Entgegen vielen anderen Untersuchungen mit marinem Probenmaterial z.B. aus der Wassersäule fand sie eine gute Übereinstimmung zwischen Sequenzdaten von Clonen und kultivierbaren Bakterien, die wir auf den sehr hohen Prozentsatz (deutlich über 10%) kultivierbarer Bakterien im Meereis zurückführen.

Die mit Hilfe der FISH-Technik untersuchten Meereiskernabschnitte zeigten in Abhängigkeit von der Eiskerntiefe deutlich unterschiedlich zusammengesetzte Bakteriengemeinschaften. Im

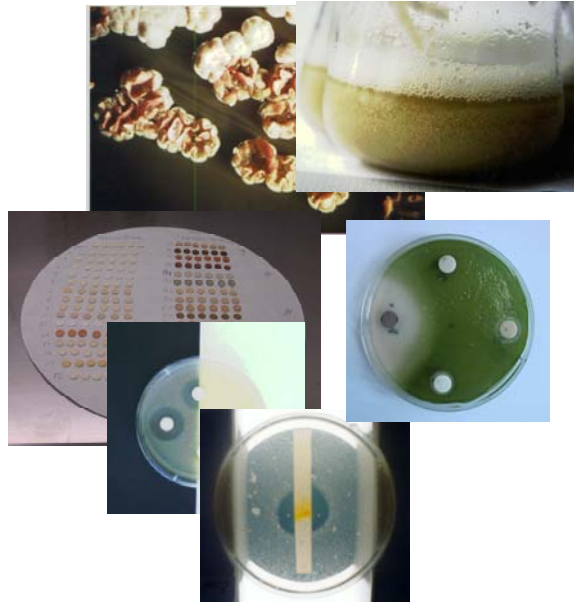


Abb. 4: Briefmarke von 2001 "100 Jahre Antarktisforschung" zur Erinnerung an den Polarforscher Georg von Neumayer

Die mit Hilfe der FISH-Technik untersuchten Meereiskernabschnitte zeigten in Abhängigkeit von der Eiskerntiefe deutlich unterschiedlich zusammengesetzte Bakteriengemeinschaften. Im

oberen Bereich mit seinen über den Jahresverlauf extrem schwankenden Temperaturbedingungen dominierten Bakterien der Cytophaga-Flavobakteriengruppe, während im unteren Eisschollenbereich, mit über den Jahresverlauf eher moderaten Temperaturen, insbesondere γ -Proteobakterien gefunden wurden. In den Schmelztümpeln an der Oberfläche herrschten β -Proteobakterien vor. Mit den Archaeobakteriensonnen wurden keine Hybridisierungen erhalten. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß für einen extremen Standort eine außergewöhnlich hohe Diversität im Meereis existiert.

Der Vergleich der Bandenmuster der antarktischen und arktischen Stämme auf der Basis der



16S rDNA-Daten zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Meereisgemeinschaften der beiden Polarmeere. Nur in wenigen Clustern wurden Vertreter beider Polarmeere gefunden, in der Regel bildeten die Vertreter einer Polarregion eigene abgeschlossene Cluster. Die Untersuchungen zeigen weiterhin, daß die arktischen Meereisgemeinschaften diverser sind. Bei einem hohen Prozentsatz der Stämme handelt es sich zumindest um neue Spezies. Da die Ähnlichkeit im Vergleich zu bisher bekannten Stämmen häufig deutlich unter 97% liegt, gehören viele der Stämme wahrscheinlich sogar neuen Gattungen an².

Abb. 6: Verschiedene Stufen des biologischen Screenings durch Agar-Diffusionstests

Die chemische Bewertung der Bakterienisolate erfolgte in einem sog. Screening in Göttingen. Wir haben dazu 1-l-Kulturen mit Lösungsmitteln extrahiert und die stark aufkonzentrierten Extrakte im Agar-Diffusionstest (Abb. 6) auf ihre Aktivität oder chromatographisch (Abb. 7) auf ihre Zusammensetzung überprüft.

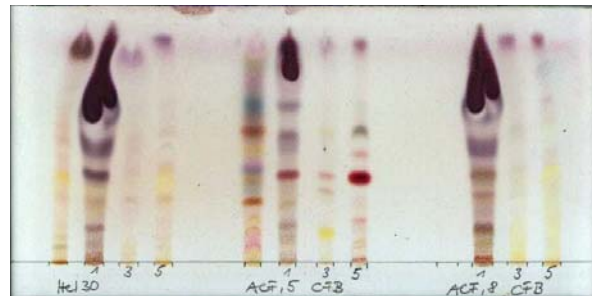


Abb. 7: Dünnschicht-Chromatogramm verschiedener Bakterienextrakte im chemischen Screening

Überraschenderweise fanden sich bei den Extrakten der antarktischen Stämme nur geringe Aktivitäten gegenüber Algen und Hefen. Während bakterizide Wirkungen sich als sehr gleichförmig erwiesen, waren die Effekte gegenüber Nematoden und Salinenkrebse unregelmäßig und z.T. sehr hoch. Bei einer auffallend hohen Anzahl der Stämme (20%), insbesondere auch bei Vertretern neuer Bakterientypen, zeigte sich darüber hinaus eine cytotoxische Wirkungen und bei 10% sogar eine differenzierte cytotoxische Aktivität.

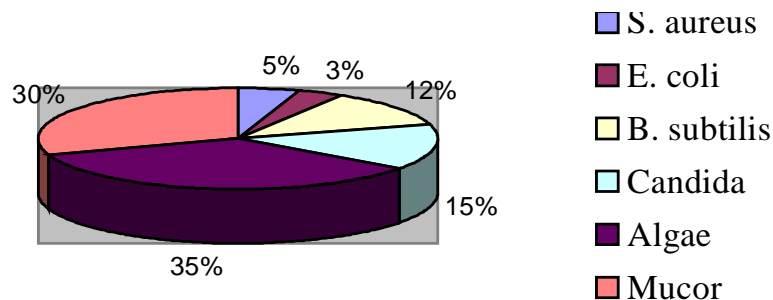


Abb. 8: Aktivitätsspektrum von arktischen Meereisbakterien (n = 51)

Im Unterschied zu den antarktischen Bakterien zeigen die arktischen Bakterien sehr häufig algizide und fungizide Eigenschaften, wobei diese Effekte aber keiner spezifischen Bakteriengruppe zuzuordnen sind. Insbesondere die Algenhemmung ist bei einigen arktischen Stämmen sehr ausgeprägt (Abb. 8).



Die für die chemische Untersuchung ausgewählter Stämme erforderliche Massenkultur war zwar ein Geduldsspiel, aber kaum schwieriger als die Anzucht terrestrischer Bakterien. Nach 4-6 Wochen im Kühlraum (Abb. 9) konnten die Kulturen geerntet und in einer Folge von zahlreichen chromatographischen Arbeitsschritten zu Reinsubstanzen getrennt werden. Zum Schluß blieben winzige Substanzmengen übrig, im Durchschnitt in Ausbeuten von 0.2 mg/l, selten

Abb. 9: 40 l-Fermentation von Meereisbakterien im Kühlraum

mehr als 1 mg/l.

Derzeit kennen wir mehr als 30.000 Naturstoffe aus Mikroorganismen. Es war daher davon auszugehen und hat sich später auch bestätigt, daß viele der isolierten Verbindungen bereits literaturbekannt waren. Zum Aussieben – der Dereplikation – dieser bekannten Substanzen bedienen wir uns der Rasterfahndung, die auch bei der Polizei üblich ist: Bestimmte, leicht meßbare Eigenschaften wurden per Computer mit unserer eigens für diesen Zweck aufgebauten Datensammlung verglichen, wobei gewöhnlich schnell eine Eingrenzung auf wenige Hits möglich war: Was nicht in den Datensammlungen gefunden wurde, war vermutlich neu und daher interessant und wurde in einer Kombination von Massenspektrometrie und NMR-Techniken untersucht: Trotz der winzigen Menge lässt sich auf diese Weise die chemische Struktur der Proben aufklären. Meist ist sogar noch genügend Substanz übrig, um die biologische Aktivität zu bestimmen, z.B. die Cytotoxizität gegen Krebs-Zelllinien oder die antibiotische Wirkung gegen Mikroorganismen.

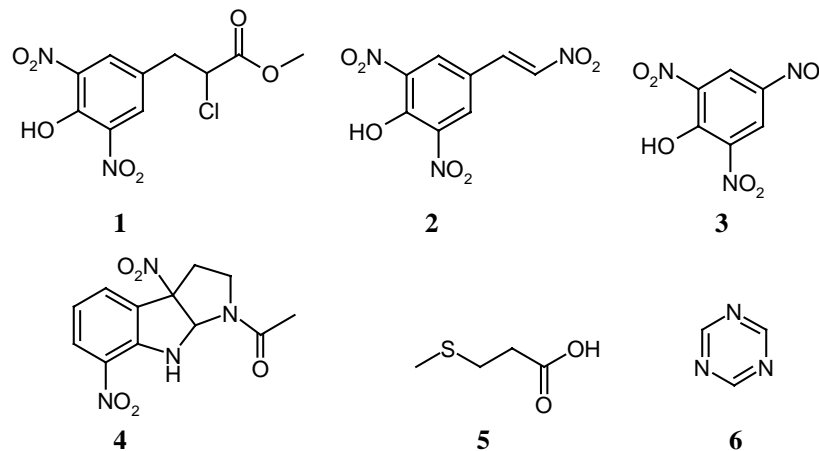


Abb. 10: Einige Verbindungen aus Bakterien der Polargebiete

Nach langjährigen Erfahrungen mit den hochkomplexen Strukturen aus Streptomyceten hat uns das verhältnismäßig einfache Vokabular der Meereisbakterien doch überrascht. Fast alle Verbindungen leiten sich aus dem Aminosäure-Stoffwechsel ab und sind zum Beispiel Diketopiperazine, gegen Algen wirksame einfache Amide oder antibiotische Indolderivate. Gelegentlich beobachteten wir jedoch auch Glanzleistungen der Natur, die in dieser Form bisher

unbekannt waren. *Salegentibacter* sp. T436 z.B. produzierte eine Mischung aus mehr als 20 Nitro-, Dinitro- und Trinitroverbindungen, darunter auch solche, wie sie bisher nie in der Natur gefunden wurden (Abb. 10): Einige davon dürften sich sogar als Sprengstoff eignen, wie z.B. das Nitrostyrol **2**, das eine große Ähnlichkeit mit der im 1. Weltkrieg in Granaten verschossenen Pikrinsäure (**3**) aufweist. Das Pyrroloindol **4** ist offenbar in einer ungewöhnlichen kationischen Cyclisierung von Acetyltryptamin entstanden, und die einfache Schwefelverbindung **5** wird leicht als Ursprung des bei Fäulnisprozessen entstehenden Dimethylsulfid erkannt, eines der Geruchsstoffe von Harzer Käse. s-Triazin (**6**) schließlich hat als heteroanaloges Benzol viel Aufmerksamkeit bei Theoretikern gefunden, ist als neuer Naturstoff jedoch eine ausgesprochene Kuriosität.

Kälteadaptierte Bakterien aus den Polargebieten haben ähnlich wie ihre terrestrischen Verwandten also ebenfalls spezielle metabolische Fähigkeiten, die sich in erstaunlichen Resultaten äußern; ob sie typisch für ihren Lebensraum sind, bedarf sicher weiterer Untersuchungen, bei denen wir noch manche Überraschung erwarten. Am meisten gewundert hat uns allerdings der Befund, daß wir "Chemische Keulen" in Form hochwirksamer Antibiotica oder Cytostatica bisher nicht gefunden haben. Die Meereisbakterien setzen in ihrem begrenzten Lebensraum eher auf Kommunikation als auf Konfrontation. Ist die Natur auch hier unser Lehrmeister?

Für die Abbildungen 1-3 möchte ich mich herzlich bei meiner langjährigen Kooperationspartnerin, Dr. Elisabeth Helmke (Alfred Wegener-Institut Bremerhaven) bedanken.

¹ M. Spindler, G. S. Dieckmann, Das Meereis als Lebensraum, Spektrum der Wissenschaft 1991 (2) 48-57; Abdruck mit freundlicher Genehmigung aus J. Weissenberger, G. Dieckmann, R. Gradinger, M. Sindler, Limnology and Oceanography 37 (1992) 179-183, Abb.3

² E. Helmke im gemeinsamen Abschlußbericht zum BMBF-Projekt 03F0233b (2001), Produktion biologisch aktiver Sekundärmetabolite durch marine Pilze und Meereisbakterien in Abhängigkeit von ihrer Biodiversität und Kultivierung