



Mikrobielle Duftstoffe

Neue bioaktive Naturstoffen

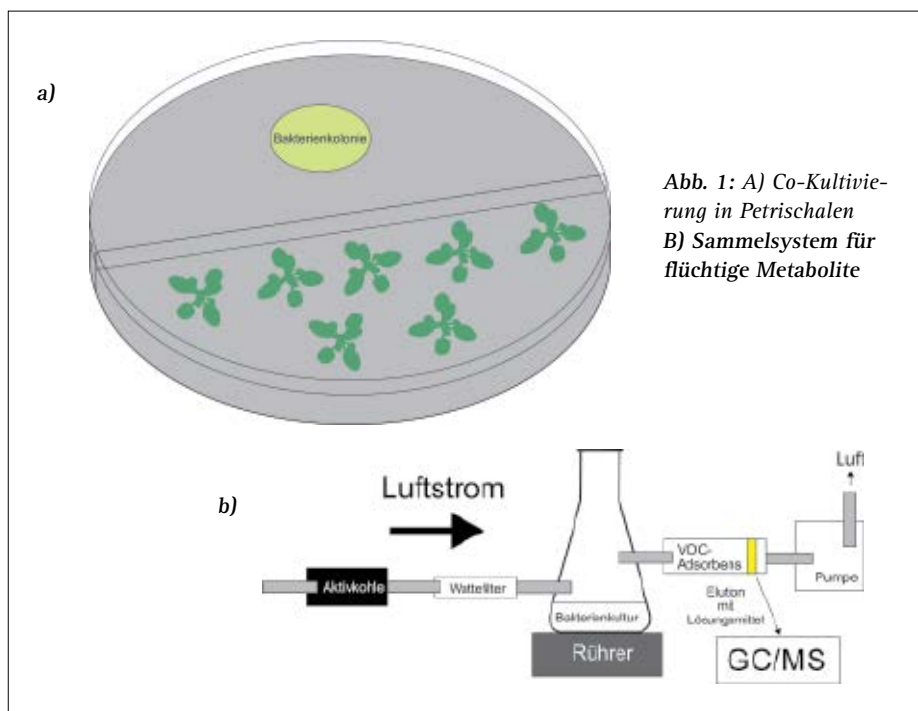
B. Piechulla und M. Kai

Mikroorganismen kommen universell vor, in extremen wie auch unspektakulären Habitaten, in und auf Tieren, Menschen und Pflanzen, im Boden und in der Luft [1]. Diese weite Verbreitung ist möglich, weil Mikroorganismen außergewöhnliche Stoffwechselleistungen entwickelt haben, um Kohlenstoff- und Energiequellen für sich nutzbar zu machen. Andererseits ist eine Überlebensstrategie notwendig, die die Präsenz anderer Organismen im gleichen Habitat unter Kontrolle hält, sodass der eigenen Population mehr Raum verbleibt.

Um dieses Ziel zu erreichen, produzieren Mikroorganismen Sekundärmetabolite, z.B. Toxine und Antibiotika, die sie alleine, in Zellgemeinschaften oder durch Interaktionen mit anderen Organismen in den diversen Habitaten einsetzen. Eine Fülle von sehr unterschiedlichen chemischen Strukturen ist so im Laufe der Evolution entstanden. Pharma-Industrien erkannten das Potential und haben in systematischen Screening- und high throughput-Verfahren nach immer neuen Leitstrukturen gesucht. Der Bedarf an neuen antibiotisch

wirkenden Substanzen ist insbesondere durch die starke Zunahme der resistenten Keime im medizinischen Bereich immer noch sehr hoch und ein aktuelles Thema. Die Suche nach neuen Naturstoffen mit neuen und anderen Eigenschaften hält somit weiter an. Während sich die bisherigen Isolierungsverfahren auf feste und lösliche Substanzen konzentriert haben, ist die Suche nach flüchtigen Naturstoffen von Mikroorganismen in den Kinderschuhen stecken geblieben. Diese flüchtigen Metabolite zeichnen sich durch besondere Eigenschaften aus, sie sind unter Normaltemperatur und -druck leicht flüchtig (niedriger Siedepunkt, hoher Dampfdruck), haben ein niedriges Molekulargewicht (< 300D) und sind i.d.R. lipophil. Durch diese Eigenschaften sind sie geeignete Infochemikalien, die sich in der Atmosphäre aber auch im Luftraum des Bodens über kurze und lange Distanzen ausbreiten können und dann von anderen Organismen wahrgenommen werden können. In den letzten 10 Jahren haben die flüchtigen mikrobiellen Metabolite eine Renaissance erfahren. Eine wichtige Voraussetzung war, dass die Technologien zur Sammlung und Analyseverfahren weiter

entwickelt und verfeinert wurden. Flüchtige Verbindungen können direkt aus dem Luftraum (Headspace) angereichert werden, indem sie über Adsorbensmaterial (Super Q, Porapak, Tenex o.ä.) geleitet und gebunden werden. Die gebundenen Substanzen können entweder thermisch oder mit einem Lösungsmittel gelöst und anschließend mittels Gaschromatographie voneinander getrennt, und im Folgenden in einem Massenspektrometer ionisiert und detektiert werden. Alternativ können auch massenspektrometrische Verfahren, wie z.B. die Protonen-Transfer-Massenspektrometrie (PTR-MS) oder die Selected Ion Flow Tube-Massenspektrometrie (SIFT-MS) verwendet werden. Zusätzlich wurden einfache experimentelle Setups genutzt, um die biologische Relevanz der flüchtigen Metabolite zu testen. Diese Informationen sind unerlässlich, um weitreichende und detaillierte Überblicke über die bakterielle VOC-Welt zu erlangen. Eine umfassende Literaturrecherche unserer Arbeitsgruppe führte dazu, die flüchtigen Naturstoffe in einer Datenbank zusammenzufassen (mVOC: <http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>) [6].



Derzeit sind ca. 1100 mikrobielle ‚volatile organic compounds‘ (mVOCs) von ca. 250 Bakterien und 100 Pilzen in dieser Datenbank eingetragen. Bedenkt man, dass bis heute ca. 10.000 Bakterienspezies beschrieben wurden und vermutet wird, dass mehr als 1 Millionen Bakterienspezies auf der Erde leben, ist abzuschätzen, dass hier eine enorm große und wichtige Ressource mit viel Potenzial schlummert.

In unserer Arbeitsgruppe haben wir uns zunächst darauf konzentriert, die VOC-Spektren von sogenannten Rhizobakterien zu untersuchen. Diese Bakterien leben bevorzugt in der Rhizosphäre (Raum nahe der Wurzel), da durch die Abgabe von Wurzelexsudaten relativ viel Kohlenstoffquellen (hauptsächlich Malat, weitere organische Säuren und Aminosäuren) zur Verfügung stehen. Es wurde untersucht, ob diese Mikroorganismen nur durch die Abgabe von flüchtigen Substanzen das Wachstum von Pflanzen beeinflussen können. In einer geteilten Petrischale, in dem die Bakterien auf der einen und der Testorganismus auf der anderen Seite wuchsen (Abb. 1A), konnten die Effekte der mVOCs auf Pilze, Pflanzen, Nematoden und Bakterien nachgewiesen werden [2]. Es wurden abhängig von den Organismenkombinationen und auch Testsystemen, sowohl wachstumsfördernde als auch wachstumshemmende Effekte festgestellt. Das nächste Ziel war es, die chemischen Strukturen dieser flüchtigen Metabolite festzustellen. Dazu wurden die bakteriellen Duftstoffe im VOC-Sammelssystem (Abb. 1B) an ein Adsorbensmaterial gebunden, mit Dichlormethan eluiert und gaschromatographisch analysiert. Die Duftspektren der verschiedenen Bakterien sind sehr

unterschiedlich (Abb. 2), sie können somit u.a. auch zur Klassifizierung („fingerprinting“) von Bakterien herangezogen werden [7]. Besonders eindrucksvoll ist das VOC-Spektrum von *Serratia plymuthica* 4Rx13, eine bakterielle Spezies, die bis zu 100 mVOCs abgeben kann [4]. Die Hauptkomponente von *S. plymuthica* 4Rx13 stellte sich zudem als ein neuer, bis dahin unbekannter Naturstoff heraus (Sodorifen) [3]. Die Struktur dieses flüchtigen Metaboliten ist einmalig und sehr ungewöhnlich – es ist ein polymethylierter Bicyclus, der kein Heteroatom besitzt – und die Biosynthese ist noch ungeklärt. Dieses Beispiel verdeutlicht das große Potenzial der flüchtigen Naturstoffe von Mikroorganismen. In Abb. 3 sind einige häufig vorkommende flüchtige Metabolite von Mikroorganismen dargestellt.

Neben der Aufklärung von neuen chemischen Strukturen wird es künftig eine große Herausforderung sein die biologischen Funktionen dieser ‚neuen‘ Naturstoffe zu entschlüsseln [5]. Einige Beispiele der vielseitigen Funktionen seien hier genannt. Wenn Pflanzen, die Methylester der Salizylsäure und Jasmonsäure enthalten, mVOCs ausgesetzt sind, verändern sie ihre Genexpression; Acetoin und 2,3 Butandiol, emittiert von *Bacillus*-Spezies, beeinflussen den Hormonstoffwechsel der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*; das Sesquiterpen Thujopsen wird vom Ectomycorrhizapilz *Cenococcum* sp. abgegeben und verändert die Wurzelarchitektur von Pflanzen. Es gibt ebenso Hinweise, dass die Sporenkeimung von Pilzen inhibiert wird, dass Bewegungen von Nematoden beeinflusst werden, sich das Fressverhalten von Insekten ändert oder predatori-

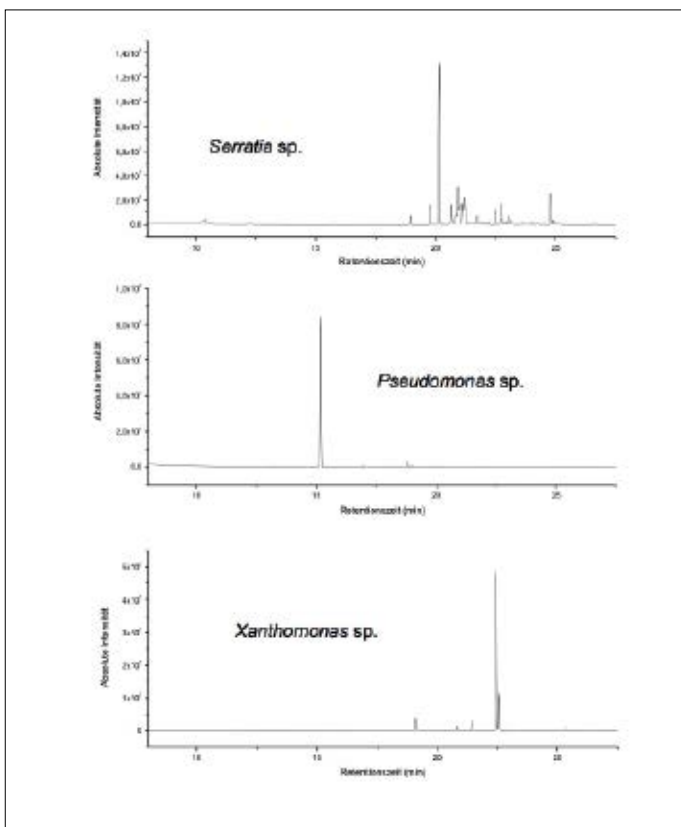


Abb. 2: Typische VOC-Spektren von drei Bakterienspezies, *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., und *Xanthomonas* sp.

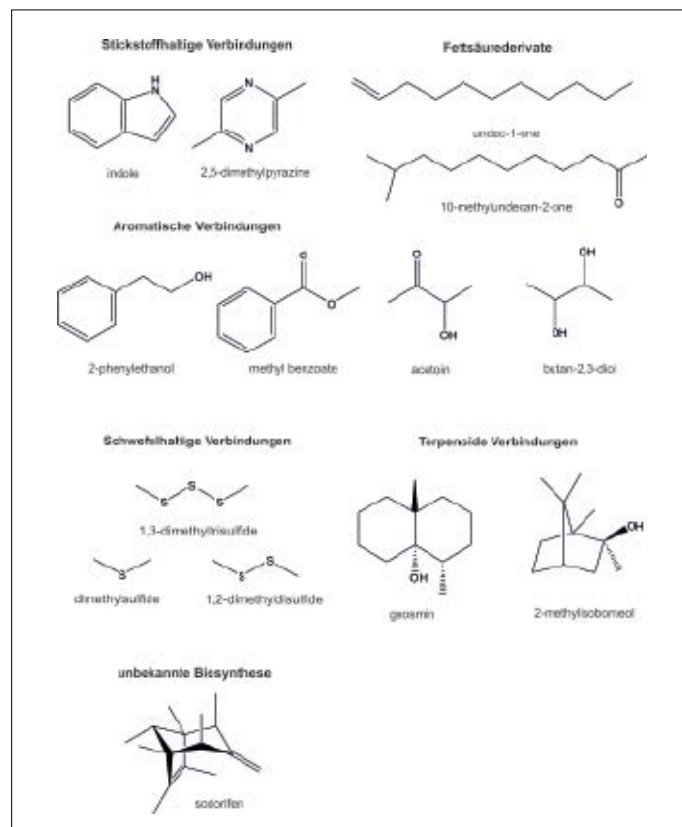


Abb. 3: Typische bakterielle flüchtige Metabolite.

sche Fliegen durch mVOCs angelockt werden. Bakterien kommen auch im (z.B. Darm, Lunge) und auf (Haut, Mund) dem Menschen vor. Aktuell werden die verschiedenen humanen Microbiome kartiert. Diese Analysen spiegeln die große Diversität der mikrobiellen Populationen wider. Welche Bedeutung die Emission von mikrobiellen flüchtigen Metaboliten im gesunden wie auch kranken Menschen hat, ist derzeit völlig unklar. Prinzipiell besteht die Möglichkeit die mVOCs zu nutzen, um z.B. Bakterien im Körper aufzuspüren, sowohl 'the goods' also auch 'the bads'. Methylnicotinat, das von *Mycobacterium tuberculosis* emittiert wird, wäre möglicherweise ein geeigneter 'fingerprint'-Metabolit, um Tuberkulose schnell zu entdecken.

Fazit

Noch sind die Beispiele von bioaktiven mikrobiellen Einzelsubstanzen rar, aber die genannten Wirkungs-Beispiele deuten an, wie variationsreich und vielfältig die Funktionen dieser kleinen Moleküle z.B. in den Interaktionen zwischen verschiedenen Orga-

nismen oder auch in den Ökosystemen sein können. Es ist ein neues Forschungsfeld ins Rollen gekommen und es ist zu erwarten, dass einerseits neue Naturstoffe mit ungewöhnlichen und besonderen chemischen Strukturen in der Zukunft gefunden werden, und andererseits die biologische und ökologische Relevanz dieser Naturstoffe, die bisher fast vollständig unbeachtet und unentdeckt geblieben ist, mit in viele Interpretationen von Ergebnissen einbezogen werden müssen, denn Mikroorganismen sind (fast) überall präsent! Spannend wird zukünftig sein zu prüfen, ob die mikrobiellen flüchtigen Metabolite geeignet für Anwendungen sind. Denkbar ist, dass mit Hilfe von 'fingerprint'-Metaboliten der Nachweis und das Aufspüren von pathogenen (und auch guten) Mikroorganismen schneller gelingen könnte, oder neue Naturstoffe ihren Einsatz als Antibiotika finden bzw. Leitstrukturen für neue Antibiotika-Entwicklungen darstellen können. Die Anwendung von diesen biologischen Substanzen als 'biological control agents' oder als Wachstums promotoren in der Landwirtschaft könnte ebenfalls in Betracht werden.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die Unterstützung bei der Universität Rostock und der DFG.

Literatur

- [1] Gottschalk G: Welt der Bakterien. Die unsichtbaren Beherrscher unseres Planeten. Wiley-VCH Verlag, (2009)
- [2] Kai M. et al.: Appl Microbiol Biotech 81: 1001- 1012, (2009)
- [3] von Reuss S. et al.: Angew Chemie 122: 2053-2054, (2010)
- [4] Kai M. et al.: Appl Microbiol Biotech 88: 965-976, (2010)
- [5] Effmert U. et al.: J. Chem. Ecol. 38: 665-703, (2012)
- [6] Lemfack M.C. et al.: Nucl Acid Res, Vol. 42, (2014)
- [7] Peñuelas J. et al.: Plant Cell Environ, 37: 1866-1891, (2014)

KONTAKT

Prof. Birgit Piechulla
Institut für Biochemie
Universität Rostock
Rostock
Birgit.piechulla@uni-rostock.de



Datenbank flüchtiger
Naturstoffe: <http://bit.ly/GIT-mVOC>



Mehr zum Nachweis flüchtiger
Verbindungen: <http://bit.ly/fl-Verb>