

02.11.2010

## **Bioassays für die Wirkstoffsuche aus dem Meer**

### **Biologische Testsysteme zur Charakterisierung neuer Wirkstoffe**

**Die erfolgreiche Suche nach neuen anwendungsrelevanten Wirkstoffen ist abhängig von der Verfügbarkeit aussagekräftiger Bioassays. Im Kieler Wirkstoff-Zentrum (KiWiZ) am IFM-GEOMAR werden zur Charakterisierung isolierter, mariner Naturstoffe sowohl zellbasierte Testsysteme, die den Einfluss auf die metabolische Aktivität von Bakterien, Pilzen oder Krebszellen analysieren, als auch Target-spezifische Enzymaktivitätsassays verwendet.**

### **Die Bedeutung mariner, mikrobieller Wirkstoffe**

Von den bisher beschriebenen 120.000-150.000 biologisch aktiven, niedermolekularen Naturstoffen stammen ungefähr 22.500 aus niederen Pilzen oder Bakterien [1]. Prominente mikrobielle Wirkstoffproduzenten sind die zu den Gram-positiven Bakterien gehörenden Aktinomyceten oder Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, die z.B. Antibiotika (Tetracyclin, Chloramphenicol, Penicillin), Immunsuppressiva (Cyclosporin, Rapamycin) oder Zytostatika (Doxorubicin) synthetisieren können. Marine Mikroorganismen stellen eine hoffnungsvolle Quelle für die Gewinnung neuartiger, pharmakologisch aktiver Naturstoffe dar. Der überwiegende Teil der bisher identifizierten etwa 18.000 marinen Substanzen wurde aus sessilen, niederen Wirbellosen wie Schwämmen, Hohl- oder Manteltieren, Moostierchen und Weichkorallen isoliert [2; 3]. Jedoch konnten in den letzten Jahren eine Reihe von symbiotisch lebenden Mikroorganismen als Wirkstoffproduzenten charakterisiert werden [4]. Ein prominentes Beispiel ist das im Moostierchen *Bugula neritina* beheimatete  $\gamma$ -Proteobakterium „*Candidatus Endobugula sertula*“, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Biosynthese des antitumoral wirksamen Bryostatins verantwortlich ist [5]. Die etwa 4000 bisher beschriebenen marinen, mikrobiellen Naturstoffe weisen aufgrund der hohen Diversität mariner Mikroorganismen häufig ungewöhnliche Strukturen ohne Analogien zu bekannten terrestrischen Verbindungen auf.

### **Bioassays in der marinen Wirkstoffforschung**

Im Kieler Wirkstoff-Zentrum am IFM-Geomar wird das faszinierende Potential mariner Mikroorganismen, basierend auf einer Stammsammlung von etwa 15.000 Stämmen und zusätzlich ständig neu gewonnenen Isolaten aus interessanten Meeresstandorten, untersucht.



Neben der Isolierung, Identifizierung und Fermentation mariner Bakterien und Pilze sowie der Extraktion und Strukturaufklärung stellt die Bestimmung biologischer Aktivitäten der isolierten Substanzen einen wesentlichen Aspekt der Forschungsarbeiten dar. Mit Hilfe eines breiten Spektrums von Bioassays werden die isolierten Wirkstoffe charakterisiert. Dabei stehen antimikrobielle, antivirale, antiproliferative oder antioxidative Eigenschaften sowie ihre Wirksamkeit in Enzymaktivitätstests im Zentrum des Interesses. Eine Ergänzung der Testsysteme erfolgt durch Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen. Im Rahmen einer Kooperationen mit dem Europäischen Screening Port in Hamburg werden isolierte marine Naturstoffe z.B. hinsichtlich potentieller Enzym-modulierender Aktivitäten untersucht, wobei der Fokus auf der Identifizierung von Kinase-, Histondeacetylase- und Protease-Inhibitoren liegt. Diese sind wichtige Bestandteile von Medikamenten zur Verbesserung von Krebstherapien. Die besondere Rolle der Naturstoffe bei der Bekämpfung von Tumoren spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass 50% der krebshemmenden Medikamente auf natürlichen Leitstrukturen basieren [6].

### **Zellbasierte Assays**

Als ein zelluläres Modellsystem stellt die Proliferations- und Zytotoxizitätsbestimmung von Zellen in Zellkultur eine Möglichkeit zur Charakterisierung der Wirksamkeit von Naturstoffen und zur Vorhersage von möglichen *in vivo* Toxizitäten dar. Die Zytotoxizitäts- und Proliferationsmessungen werden im KiWiZ mittels des Resazurin-basierten CellTiter-Blue Viability Assays u.a. in den Fibroblastenzelllinien NIH-3T3 und WS1, der Leberkarzinomzelllinie

HepG2 und der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29 durchgeführt. Eine starke zytotoxische Wirkung wird durch den Nachweis der Aktivierung apoptotischer Enzyme wie Caspasen oder die Bestimmung der Membranintegrität näher charakterisiert. Einige der in unserer Arbeitsgruppe isolierten Substanzen wie ein neues Angucyclinon oder die bereits patentierten Scopularide zeigen eine vielversprechende antiproliferative Wirkung oder Selektivität gegenüber bestimmten Krebszelllinien [7; 8].

Die Suche nach neuen Antibiotika erfordert aufgrund der zunehmenden Ausprägung von multiplen Antibiotikaresistenzen sowie des Anstieges an Infektionskrankheiten, z.B. in Folge des Klimawandels, besondere Anstrengungen. Deshalb dienen im KiWiZ enge Verwandte klinisch relevanter Problemkeime als Referenzorganismen für die Durchführung antimikrobieller Assays. Um antimykotisch wirksame Substanzen zu identifizieren, dient *Candida glabrata* als Verwandter des wichtigsten, fakultativ pathogenen Erregers *Candida albicans* als Teststamm. Zudem ist die Wirkstoffsuche gegen phytopathogene Erreger (z.B. *Phytophthora sp.*, *Septoria tritici*, *Erwinia amylovora*) und Erreger von Hauterkrankungen (z.B. *Propionibacterium acnes*, *Trichophyton rubrum*) von Bedeutung. Der Nachweis der biologischen Aktivität erfolgt in 96well-Mikrotiterplatten mittels des Redoxfarbstoffes Resazurin. Die durch Dehydrogenasen katalysierte Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin ist nur in lebenden Zellen nachweisbar und reflektiert die metabolische Aktivität der Zellen.

### ***In vitro* Enzymaktivitätstests**

Die Modulation krankheitsrelevanter Zielmoleküle - wie Enzyme, Rezeptoren, Ionenkanäle und Transporter - kann mittels *in vitro* Enzymaktivitätstests untersucht werden. Dabei werden Substanzen gesucht, die spezifisch an das krankheitsauslösende Target binden und durch eine damit einhergehende Hemmung eine therapeutische Wirkung im Krankheitsverlauf erzielen. Im KiWiZ wird z.B. nach Inhibitoren für die pharmazeutisch relevanten Proteine Acetylcholinesterase (AChE), Glycogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), Reverse Transkriptase (HIV-1-RT), Phosphodiesterase 4 (PDE4) und Proteintyrosinphosphatase 1B (PTP 1B) gesucht. Die ausgewählten Enzyme sind an der Regulation von Schlüsselreaktionen häufig auftretender Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, Alzheimer, AIDS oder chronischen Entzündungen beteiligt. Zur Etablierung von Enzymaktivitätsassays sind spezifische Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Aufgrund der höheren Sensitivität und Linearität über einen großen Bereich ist die Detektion mittels Lumineszenz dem Farbnachweis vorzuziehen. Bisher durchgeführte Enzymtests resultierten bereits in interessanten Hits. In Zusammenarbeit z.B. mit den Arbeitsgruppen von Prof. P. Fiedler und Dr. T.

Paululat wurde eine neue angucyclinartige Verbindung aus *Streptomyces sp.* als potenter, irreversibler PTP1B Inhibitor charakterisiert [9]. Aus dem marinen Schwamm *Suberea sp.* wurden die Verbindungen Subereaphenol B und K isoliert, die das Enzym PDE-4 hemmen [10].

## **Literatur**

- [1] Demain L. und Sanchez S.: J Antibiot 62, 5-16 (2009)
- [2] Hentschel U. und Bringmann G.: Pharm Unserer Zeit 39, 62-66 (2010)
- [3] Molinski T. *et al.*: Nat Rev Drug Discov. 8(1) 69-85. (2009)
- [4] Piel J. *et al.*: Proc Natl Acad Sci 101, 16222-16227 (2004)
- [5] Sudek S. *et al.*: J Nat Prod 70, 67-74 (2007)
- [6] Newman D. *et al.*: J Nat Prod 66, 1022-1037 (2003)
- [7] Yu Z. *et al.*: J Nat Prod 71, 1052-1054 (2008)
- [8] Imhoff J.F. *et al.*: Herstellung und Verwendung antitumoraler Cyclodepsipeptide. DE 102008005097A1 und PCT/DE2008/001915.
- [9] Paululat P. *et al.*: Angew Chem Int Ed, in press (2010)
- [10] Shaker K. *et al.*: Chem Biodivers, in press (2010)

## **Kontaktieren**

- [Firmen Homepage](#)