

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-
Programm

B I O L O G I E

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter den Förderkennzeichen 0315231A und 0315231B sowie des Landes Schleswig-Holsteins unter der Projektnummer 122-08-002 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren".

Forschungsvorhaben: BioIndustrie2021 - Biokatalyse2021.
Verbundprojekt: Isolierung, Charakterisierung und Produktion antimikrobieller Peptide (AMPs) aus marinen Mikroorganismen

Förderkennzeichen: 0315231A, 0315231 B,
Projektnummer: 122-08-002

Zuwendungsempfänger:

Partner PI: PLANTON GmbH, Am Kiel-Kanal 44, 24106 Kiel
(Projektkoordinator)

Partner PII: Leibniz-Institut für Meereswissenschaften, IFM-GEOMAR,
Wischhofstr. 1-3, 24148 Kiel, Prof. Dr. Imhoff

Partner PIII: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel, Prof.
Dr. Cai

Projektkoordination: Herr PD Dr. Kleine, PLANTON GmbH

Laufzeit: 01.07.2008 bis 30.06.2011

BMBF Clusterkonzept
„Nachhaltige Biokatalyse auf neuen Wegen – BIODIVERSITÄT2021“
Abschlussbericht zum Projekt 24

Verbundprojekt	P24
Titel:	Isolierung, Charakterisierung und Produktion antimikrobieller Peptide (AMPs) mariner Mikroorganismen
Verbundpartner	PI: PLANTON GmbH, Am Kiel- Kanal 44, 24106 Kiel PD Dr. Michael Kleine (Geschäftsführer), kleine@planton.de (Projektkoordination) FKZ: 0315231A PII: IFM-GEOMAR Institut für Meereswissenschaften Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel, Prof. Dr. Johannes F. Imhoff, jimhoff@ifm-geomar.de Förderung durch Ministerium für Wissenschaft, Wirtschaft und Verkehr des Landes Schleswig-Holstein: VII304 PIII: CAU Kiel, Lehrstuhl für Molekulare Phytopathologie, Hermann- Rodewald- Str. 9, 24118 Kiel, Prof. Dr. Daguang Cai, dcai@phytomed.uni-kiel.de FKZ: 0315231 B
Berichtszeitraum:	01.07.2008 – 30.06.2011
Projektlaufzeit:	3 Jahre

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung:

Antimikrobielle Peptide (AMPs) bilden eine Klasse von antibiotischen Substanzen mit einem breiten Wirkspektrum gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Pilze und enkapsidierte Viren. In dem vorliegenden Vorhaben soll das in dieser Hinsicht noch weitgehend unbearbeitete marine Habitat erschlossen werden, um AMPs aus marinen Mikroorganismen zu isolieren. Im Rahmen des Projektes sollten die biologische Aktivität von AMPs untersucht, die chemische Struktur aufgeklärt sowie die Gene für ihre Biosynthese und deren Regulation molekularbiologisch untersucht werden. Schließlich sollten Wege zur Produktion und Vermarktung der Substanzen etabliert werden. Dabei stand die Suche nach antibiotisch wirksamen Substanzen für den Bereich der Medizin, Kosmetik, der Nahrungsmittelindustrie und des Pflanzenschutzes im Fokus der Arbeiten.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

PI ist es gelungen, ein pflanzliches Produktionssystem für antimikrobielle Peptide (AMP) zu etablieren. Dazu wurden entsprechende Verfahren und Genkassetten entwickelt. Mit Hilfe dieser Technologie konnte z.B. das humane β -Defensin 2 (HBD-2) in der Kartoffelknolle exprimiert, in hochreiner Form isoliert und damit der klinischen Entwicklung zugeführt werden. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, AMPs rekombinant in großer Menge zu produzieren.

PII hat in den vergangenen Jahren auf verschiedenen Forschungsexpeditionen Sedimentproben erhalten und konserviert, die für die geplanten Arbeiten zur Verfügung standen, um Bakterienisolate für die Isolierung von AMPs zu identifizieren, zu charakterisieren und zu kultivieren. Darüber hinaus wurden in Vorarbeiten Testsysteme etabliert, um in Bakterien- und Pilzkulturen Gene des NRPS-Systems spezifisch nachzuweisen. Außerdem standen diverse biologische Testsysteme inkl. antibiotischer Tests gegen phytopathogene Krankheitserreger zur Verfügung.

PIII hat Techniken für die Genklonierung aus komplexen Genomen, für die funktionelle Analyse eines Gens sowie für die phänotypische Charakterisierung (Infektions- und Resistenztests) etabliert. Insbesondere verfügt die Arbeitsgruppe über eine Reihe unterschiedlicher Transformationssysteme zur Herstellung von transgenen Pflanzen. Darüber hinaus wurde eine degenerierte Primer-gestützte PCR Klonierungsstrategie zur Klonierung eines homologen Gens aus komplexen Genomen in der AG erfolgreich angewendet.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde in drei Arbeitspaketen geplant und durchgeführt:

Paket 1: Determination von Kandidaten-Mikroorganismen und Identifizierung von AMPs.

Zunächst wurden die vorhandenen Mikroorganismen verschiedener geographischer Regionen der Weltmeere auf ihre Potenziale zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden untersucht. Kandidaten Mikroorganismen wurden ausgewählt und die entsprechenden Kultivierungsbedingungen für die erfolgreiche Extraktion von AMPs optimiert. Die Protokolle für diverse Bioassays, für die Peptid-Extraktion, Fraktionierung und Aufreinigung wurden etabliert.

Paket 2: Klonierung und Charakterisierung von AMP-Genen

Kandidaten AMPs wurden identifiziert und charakterisiert. Die antimikrobielle Aktivität der Peptide wurde mit Hilfe weiterer Bioassays gegen ein breites Spektrum von Pathogenen untersucht. Die ersten Sequenzen und Strukturen der Kandidaten-Gene und Gencluster wurden aufgeklärt. Darüber hinaus sollte versucht werden, die Synthesewege und die regulatorischen Mechanismen der Kandidaten-NRPS aufzuklären. Erste Genkonstrukte sowohl für das homologe als auch für das heterologe Produktionssystem sollten erstellt werden.

Paket 3: Entwicklung von Produkten

Neue AMPs wurden identifiziert und deren Wirkspektren festgestellt. Die Produktion von Peptiden sollte im homologen/heterologen System im Pilotmaßstab realisiert werden, so dass zum Ende des Projektes die ersten marktrelevanten AMPs hätten produziert werden sollen.

Der geplante Verlauf des Projektes wurde in Form einer Meilensteinplanung festgelegt (Tab. 1). Anhand der o.g. definierten Arbeitspakete wurden die einzelnen Fragestellungen systematisch bearbeitet.

Drei der vier Meilensteine des Projektes wurden erfolgreich abgeschlossen (Tab. 2). Damit wurden wesentliche Projektziele, nämlich die Isolierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Peptide aus marinen Mikroorganismen realisiert. Der letzte Meilenstein – die Produktion der charakterisierten neuen AMPs konnte im vorliegenden Vorhaben nicht umgesetzt werden. Dazu ist ein Folgeprojekt geplant, um diesen wichtigen letzten Schritt vor der Vermarktung zu erreichen.

Tabelle 1: Planung und Ablauf des Projektvorhabens

P/MS-Nr.	Bezeichnung der Arbeitspakete	2008				2009				2010				2011			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
P1,P2	Isolierung, Identifizierung																
P2,P3	PCR-Screening (NRPS und AMPs)																
P2	Auswahl der Isolate																
P2	Kultivierung																
P2	Bioassays																
MS1	Auswahl von 10-20 Mikroorganismen																
P3	Genklonierung und Charakterisierung																
P2	Stimulierungsexperimente mit Peptidnachweis																
MS2	1 neues AMP im Bioassay selektiert																
	Evaluation durch den Lenkungsausschuss																
P1,2,3	Peptidcharakterisierung, chemische Analyse, Gene und Gencluster																
P3	Expression und Regulation von Genen																
MS3	5-20 neue AMPs charakterisiert																
P1,2,3	Entwicklung der Produktionsverfahren																
P1,P2	Scale up homologe Produktion																
P1	Entwicklung der Vermarktungsstrategien																
MS4	Marktrelevante AMPs produziert																

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Im Rahmen des vorliegenden Vorhabens konnten insgesamt 631 Mikroben-Isolate von Fischhäuten und aus marinen Sedimenten isoliert, charakterisiert und als Stammkulturen angelegt werden (Tab. 2). Insgesamt wurden 544 Isolate in Bioassays gescreent und 290 relevante Isolate auf antimikrobielle Aktivität und NRPS selektiert. Für die weitergehende Isolierung und Charakterisierung von antimikrobiellen Peptiden wurden davon 24 Isolate verwendet. Mittlerweile konnten 4 AMPs mit antibakterieller Aktivität und 1 AMP mit cytotoxischer Wirkung gegen eine humane Leberzellkarzinomzelllinie isoliert werden. Darüber hinaus wurden 13 ribosomale AMP Kandidatengene identifiziert. Die AMPs und die AMP-Kandidatengene stammen aus zwei Bakterienisolaten (*Streptomyces champavatii* „PP-C42“ und *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii „PP-gt P20b“), dessen Genome im Rahmen des Projektes P24 sequenziert wurden. Diese Arbeiten konnten bereits publiziert werden.

Tabelle 2: Projektergebnis der Arbeitspakete (n.b. = nicht bestimmt)

Bezeichnung der Arbeitspakete	Meilensteine	Projektergebnis
Isolierung, Identifizierung Mariner Mikroorganismen		631
Kultivierung		581
PCR-Screening (NRPS und AMPs)		581
Bioassays (klinisch verwandt und phytopathogene Testorganismen, z.T. Cytotox und Enzyminhibition)		544 (nur Screening)
Interessante Isolate aufgrund Bioaktivität und NRPS		290
Auswahl der Isolate	10 – 20	24
Genklonierung und Charakterisierung		13
Stimulierungsexperimente mit Peptidnachweis		erfolgt
Neues AMP im Bioassay selektiert	1	1
Peptidcharakterisierung, chemische Analyse, Gene und Gencluster		erfolgt
Expression und Regulation von Genen (Genomsequenzierung)		erfolgt
Neue AMPs charakterisiert	5 – 20	6
Entwicklung der Produktionsverfahren		Versuche gestartet
Scale up homologe Produktion		n.b.
Entwicklung der Vermarktungsstrategien		n.b.
Marktrelevante AMPs produziert	5	0

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in Form eines Verbundvorhabens mit drei Partnern durchgeführt: zwei akademische Partner (IFM-GEOMAR, CAU Kiel) und ein KMU (PLANTON GmbH). Die unterschiedlichen Expertisen, die unter I.1. dargestellt wurden, erzeugten entsprechende Synergien, die zu einem erfolgreichen Abschluss des Projektes geführt haben. Leider konnte das für das KMU wichtige Ziel der Vermarktung der neuen AMPs nicht realisiert werden. Aus diesem Grunde ist ein Folgeprojekt geplant, um dieses Ziel zu realisieren.

Unterauftragnehmer im vorliegenden Vorhaben:

- Institut für Infektionsmedizin mit dem Medizinaluntersuchungsamt Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK-SH) in Kiel. Arbeitsgruppe Dr. Sabine Schubert: AMP-Extrakte auf antimikrobielle Aktivität untersucht.
- Institut für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts Universität zu Kiel: DNA Sequenzierung des PCR-amplifizierten 16S rRNA Gens zur Identifizierung der Bakterienisolate.
- Institut für Organische Chemie, Christian-Albrechts Universität zu Kiel. Arbeitsgruppe Prof. Dr. Frank Sönnichsen: NMR-Analysen der aufgereinigten Peptide.
- Institut für Organische Chemie, Technische Universität Berlin. Arbeitsgruppe Prof. Roderich Süßmuth: Analyse der Stereochemie neuer Peptide durch Synthese von Di- und Tripeptide.
- Zhejiang Universität, China. Arbeitsgruppe Prof. Longjiang Fan: Genomsequenzierung der beiden Stämme *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* PP-gt P20b und *Streptomyces* sp. PP-C42.