

Abschlussbericht:

Development of novel Bacillus polyketide antibiotics for agriculture and medicine

Subproject 2: Secondary metabolite investigations by LC-ESI-MS and 2D-NMR analytics

Prof. Dr. R.D. Süssmuth / TU Berlin
Institut für Chemie
Strasse des 17. Juni 135, TC2
10623 Berlin-Charlottenburg

FKZ: 0313805_U

I.1 Aufgabenstellung

Die Aufgabe bestand in der Dekodierung und Zuordnung der Biosynthesegene bzw. synthetisierten Sekundärmetaboliten des ökologisch und ökonomisch bedeutenden Modellorganismus *Bacillus amyloliquefaciens*. Damit sollte ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Interaktion von *B. amyloliquefaciens* mit Pflanzen und bakteriellen Pathogenen wie z.B. dem Erreger des Feuerbrands (*Erwinia amylovora*) auf der Basis von chemischen Signalstoffen geliefert werden, um eine verbesserte wirtschaftliche Nutzung des Bacillus-Stammes im Bereich Pflanzenschutz und Pflanzenstärkungsmittel zu erreichen.

I.2 Voraussetzungen für das Vorhaben

Die Voraussetzungen für die Bearbeitung des Projekts waren gegeben. Insbesondere die erforderliche analytische gerätetechnische und personelle Ausstattung war durch die Projektförderung gesichert.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Einstellung von entsprechend qualifiziertem wissenschaftlichem Personal sowie die Beschaffung der Geräte verlief problemlos und konnte wie geplant durchgeführt werden. Die Arbeitspakete waren wie folgt gegliedert:

	Arbeitspaket (WP)	Zeitraum [Monat]	Projektstand
WP1	Isolierung und Strukturaufklärung von Bacillaen und strukturellen Subtypen	1-12	☑
WP2	Isolierung und Strukturaufklärung des pks2-Produkts	1-12	☑
WP3	Isotopen-Markierung von pks2 und Bacillaen	12-18	☑
WP4	Entwicklung von Isolierungsstrategien für Bacillaen und pks2 in präparativen Mengen	12-24	⊗ / ☑
WP5	Chemische Derivatisierung von Bacillaen und pks2	21-33	⊗
WP6	Vergleichende Metabolomanalytik	21-33	☑
WP7	Monitoring von Metabolitenprofilen	21-36	☑ / ~
WP8	Bacillus-Screening nach neuen Biosynthesegenclustern	21-36	☑ / ~

☑ erreicht; ~ wird über die Förderperiode fortgesetzt, ⊗ aufgegeben.

I.4 Anknüpfung an den wissenschaftlichen Stand

Zu Beginn der Arbeiten an *B. amyloliquefaciens* war wenig zu Sekundärmetaboliten aus *Bacillus* und zu deren Biosynthesegenclustern bekannt. Insbesondere das Wissen zu Polyketid-Antibiotika war äußerst gering. Der Übersichtsartikel von T. Stein (Mol Microbiol. **2005**) fasst im Wesentlichen die damals bekannten Daten zu Seundärstoffen, Peptide, Polyketide und *small molecules* aus *Bacillus* zusammen. Dies steht im Gegensatz zur Bekanntheit und breiten Verwendung von Stämmen des Genus *Bacillus*. Nicht nur im Hinblick auf eine wirtschaftliche Verwertung sondern auch im Bezug auf neue Erkenntnisse in der Grundlagenforschung war daher die Bearbeitung des Projekts von besonderem Interesse.

Literatur:

Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* **2005** May;56:845-857.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

1	Prof. Dr. Rainer Borriss, Institut für Biologie, HU Berlin.	Bacillus-Genetik und Mikrobiologie
2	Prof. Dr. Roderich Süßmuth, Institut für Chemie, TU Berlin.	Strukturaufklärung und Biologische Chemie
3	Dr. H. Junge Abitep GmbH Berlin	Fermentation und Produktherstellung
4	Dr. S. Kunz, Bio-Protect GmbH Konstanz	Freilandversuche und Applikation

II.1 Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse Zeitraum 1.6.2006 bis 31.5.2009

	Milestone	Projektstand
M1	Isolierung und Strukturaufklärung von Bacillaen und strukturellen Subtypen	☑
M2	Isolierung und Strukturaufklärung des pks2-Produkts	☑
M3	Isotopen-Markierung von pks2 und Bacillaen	☑
M4	Entwicklung von Isolierungsstrategien für Bacillaen und pks2 in präparativen Mengen	⊗ / ☑
M5	Chemische Derivatisierung von Bacillaen und pks2	⊗
M6	Vergleichende Metabolomanalytik	☑
M7	Monitoring von Metabolitenprofilen	☑ / ~
M8	Bacillus-Screening nach neuen Biosynthesegenclustern	☑ / ~

- 1.1 Sequenzierung des Genoms von *B. amyloliquefaciens* und Zuordnung von sechs NRPS und drei PKS Biosynthesegenclustern (in Kooperation mit der AG Borriss).
- 1.2 Identifizierung und Zuordnung von drei Polyketidsynthase (PKS)-Produkten die alle zum Typ-I-PKS zuzurechnen sind:
pks1 ist Bacillaen, pks2 ist Macrolactin und pks3 ist Difficidin [Chen et al. 2007, Schneider et al. 2007].

- 1.3 Detaillierte Untersuchung der Macrolactin-Biosynthese, u.a. mit ^{13}C -Acetat-Fütterungsstudien und Aufstellung eines Biosynthesemodells [Schneider et al, 2007].
- 1.4 PCR-Sonden und massenspektrometrischer Nachweis der Genprodukte Difficidin, Macrolactin und Bacillaen in einer Vielzahl von Bacillus-Stämmen [Schneider et al, 2007].
- 1.5 Aufklärung wichtiger Schritte der Biosynthese von Bacillaen und Erstellung eines Isolierungsprotokolls für Bacillaen [Moldenhauer et al. 2010].

Sechs von sieben NRPS-Biosynthesegenclustern konnten einem Genprodukt eindeutig zugeordnet werden [**Milestone 1-3**]. Eine Vergleichende Metabolomanalytik bzw. Monitoring von Metabolitprofilen wurde insbesondere anhand der Mutanten von Biosynthesegenclustern durchgeführt [**Milestone 6/7**]. Der siebte Metabolit, das sog. *nrs*-Gencluster, das auf einer nicht-ribosomalen Peptidsynthese beruht, hat sich bisherigen Analysen bzw. Isolierungsversuchen entzogen. Versuche zu Isolierung und Strukturaufklärung laufen derzeit in der Arbeitsgruppe außerhalb einer Förderung weiter, sind aber sehr schwierig und zeitaufwendig durchzuführen. Die Arbeiten sind notwendig um eindeutig die Beiträge der Sekundärmetaboliten zu den pflanzenprotektiven Effekten zuzuordnen. Ein Screening nach weiteren Sekundärmetaboliten in Bacillus [**Milestone 8**] wird unabhängig von einer Förderung durch das BMBF in unserem Arbeitskreis weitergeführt. Diese neben dem durch das *nrs*-Gencluster synthetisierten fehlenden Metabolite werden ausschließlich ribosomal produziert; diese zeigen nur schwache antibakterielle Aktivität, sind jedoch strukturell und biosynthetisch von hohem Interesse.

Einige Ziele konnten erst jetzt in nicht mehr durch das BMBF geförderten Arbeiten realisiert werden, wie die Entdeckung eines Lantibiotikums das sog. Plantathiazolicin (s. Scholz et al. Manuskript in Vorbereitung) genannt wurde. Darüberhinaus ist die Struktur der durch das *nrs*-Cluster synthetisierten Verbindung immer noch nicht bekannt, da kein Metabolit identifiziert werden konnte, der mit dieser Verbindung korreliert. Arbeiten hierzu werden fortgesetzt.

Verschiedene Wege zur Probenpräparation, zur Untersuchung von Mutantenstämmen und zur Analyse der Sekundärmetabolite, insbesondere zur Quantifizierung der von *B. amyloliquefaciens* synthetisierten Pflanzenhormone Indoleessigsäure (IAA) und Gibberellinsäure werden ebenfalls weitergeführt.

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Im Hinblick auf die Personalmittel wurden zwei Doktoranden für die Dauer von drei Jahren beschäftigt. Darüberhinaus wurden zwei Geräte beantragt und genehmigt, von denen die *centrifugal-partition-chromatograph* (Gegenstromverteilungschromatographie)-Anlage in Kombination mit den genehmigten UV-Detektor für die Isolierungsversuche der Polyketidantibiotika eingesetzt wurde. Diese beiden Geräte erwiesen sich prinzipiell als richtige Anschaffungen, da zumindest geringe Mengen an Bacillaen und der anderen polyketidischen Naturstoffe mit ihnen angereichert werden konnte.

II.3 Notwendigkeit der Arbeit

Das Gesamtgenom-Projekt zu *Bacillus amyloliquefaciens* unter der Leitung von Prof. Borriss in Kombination mit den beteiligten Partnerfirmen hat zu neuen und tiefen

Einblicken in die synthetisierten Sekundärmetabolite von *Bacillus amyloliquefaciens* geführt. Ohne die Kenntnis des Bakteriengenoms und der synthetisierten Sekundärstoffe ist eine Bearbeitung des Bakterienstammes auf optimierte Eigenschaften, hier insbesondere Eigenschaften als Pflanzenstärkungsmittel und Verwendung gegen den Feuerbrand, heute nicht mehr zeitgemäß.

II.4 Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit

Die Arbeiten sind auch von Bedeutung für alle anderen Bakterienstämme des Genus *Bacillus* und geben einen Eindruck von dem noch in Zukunft zu erwartenden Biosyntheserepertoire dieser Bakterienklasse. Für die beteiligten Partnerfirmen ergaben sich interessante Einblicke in die Struktur der Verbindungen, die die gewünschten antibakteriellen und antifungalen Eigenschaften von *B. amyloliquefaciens* begründen. Mit dieser Erkenntnis und noch weiteren wissenschaftlichen Erkenntnissen, die im nach Ablauf der Projektförderung hinzugekommen sind, kann nun auf die Produktion von bestimmten Biosynthesemetaboliten besser optimiert werden.

Was leider bisher noch fehlt und in einem weiteren Förderantrag leider nicht gefördert wurde sind Arbeiten zum einfachen Nachweis der Polyketide und Peptidantibiotika, die es den beteiligten Firmen erleichtern würden diese Metabolite mit einfacher Laborausstattung durchzuführen.

Für eine Schilderung der wirtschaftlichen Verwertung der gewonnenen Erkenntnisse wird auf den Abschlußbericht der Partnerfirmen verwiesen.

II.5 Ergebnisse von dritter Seite

Forschungsaspekte

Das Forschungsfeld ist unter den Gesichtspunkten der Grundlagenforschung äußerst kompetitiv, sodass mehrere Publikationen in hochrangigen Zeitschriften von Konkurrenzgruppen publiziert wurden, insbesondere an dem verwandten Bakterienstamm *Bacillus subtilis*, der teilweise über dieselben Biosynthesegencluster verfügt. Folgende Publikationen in hochrangigen Zeitschriften sind hierzu erschienen:

Calderone, C.T.; Bumpus, S.B.; Kelleher, N.L.; Walsh, C.T.; Magarvey, N.A. A ketoreductase domain in the PksJ protein of the bacillaene assembly line carries out both α - and β -ketone reduction during chain growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, 105:12809-12814.

Butcher, R. A.; Schroeder, F. C.; Fischbach, M. A.; Straight, P. D.; Kolter, R.; Walsh, C. T.; Clardy, J. The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007**, 104:1506-1509.

Straight PD, Fischbach MA, Walsh CT, Rudner DZ, Kolter R. A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2007**, 104:305-310.

Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsdorf H, Häußler S, Santosa DA, Timmis KN, Molinari G. 7-O-Malonyl mclolactin A, a new mclolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 1701-1709.

Patentrechtliche Aspekte

Hierzu liegen uns keine Informationen vor. Es wird in dieser Frage auf die Abschlußberichte der Kooperationspartner Dr. Junge (Firma ABITEP) und Dr. Kunz (Bio-Protect) verwiesen, da diese als Hauptnutzer der Produktentwicklung auch die aktuelle Lage hinsichtlich konkurrierender Firmen kennen. Die Entdeckung, dass Macrolactin eines der Biosyntheseprodukte von *Bacillus amyloliquefaciens*, ist ließ sich patentrechtlich nicht verwerten, da Macolactin ein bereits bekanntes Polyketid mit antibiotischen Eigenschaften ist.

II.6 Publikationen die aus der Projektförderung hervorgegangen sind (2006-2010)

1. Moldenhauer, J, Götz D, Albert C, Bischof S, Schneider K, Engeser M, Gross H, Süssmuth RD, Bringmann G, Piel J. The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: Direct evidence for β,γ -dehydration by a *trans*-acyltransferase polyketide synthase. *Angew. Chem.* **2010**, 122:1507-1509.
2. Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Piel J, Borriss R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* **2009**, 140:27-37.
3. Schneider K, Chen XH, Vater J, Franke P, Nicholson G, Borriss R, Süssmuth RD. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70:1417-1423.
4. Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süssmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnol.* **2007**; 25:1007-1014.
5. Chen XH, Vater J, Piel J, Franke P, Scholz R, Schneider K, Koumoutsis A, Hitzeroth G, Grammel N, Strittmatter AW, Gottschalk G, Süssmuth RD, Borriss R. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J Bacteriol.* **2006**:188:4024-4036.

Publikation in Vorbereitung:

Scholz R, Molohon K, Nachtigall J, Vater J, Süssmuth RD, Mitchell DA, Borriss R. Plantathiazolicin, a novel microcin/streptolysin-like bacteriocin of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, **2010**, in preparation (Einreichung vorraussichtlich März 2010).

Sofern es der AG Süssmuth gelingt ein tragfähiges Isolierungsprotokoll zu erarbeiten um ausreichend Mengen für eine Strukturanalyse zu erhalten, soll auch die chemische Struktur von Plantathiazolicin publiziert werden.



Berlin, den 14. Februar 2010

Prof. Dr. Roderich Süssmuth