

Die Entstehung von Ribosomen als Angriffspunkt für neuartige Antibiotika

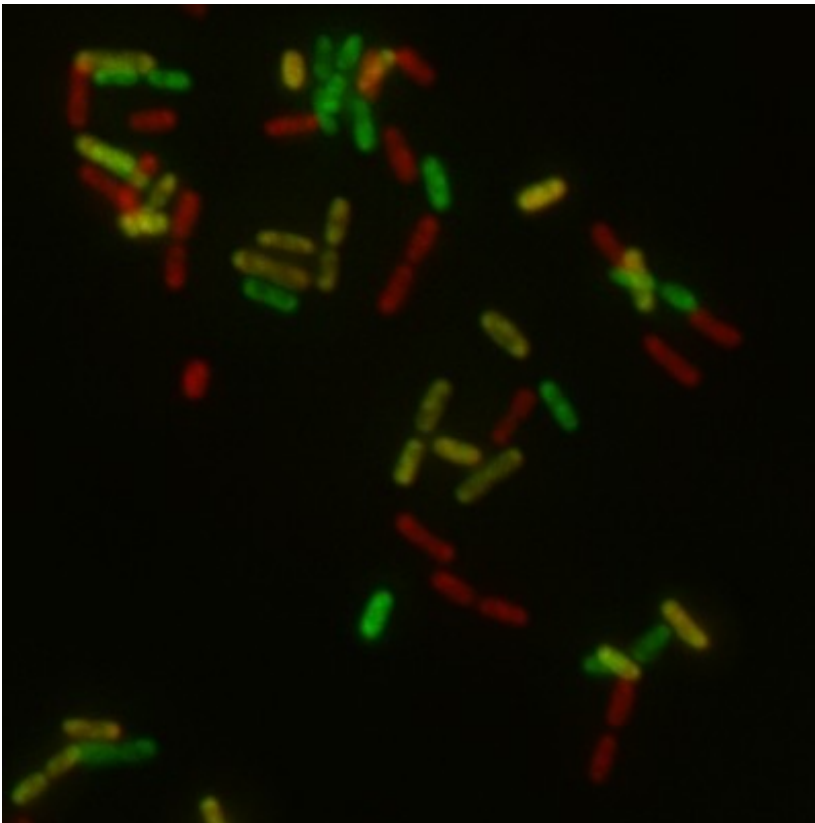
Obwohl bakterielle Ribosomen ein beliebtes Ziel gängiger Antibiotika sind, so gibt es doch keine Medikamente, die gezielt die Ribosomenentstehung angreifen. Bisher fehlte es schlichtweg an einem geeigneten Screening-Verfahren für die Suche nach solchen Wirkstoffen. Prof. Dr. Elke Deuerling und Dr. Rainer Nikolay von der Universität Konstanz ist hier der Durchbruch gelungen. Gemeinsam haben sie eine Methode entwickelt, um Inhibitoren der Ribosomenbiogenese im Hochdurchsatz-Verfahren zu identifizieren. Damit könnten wirksame Antibiotika für die Bekämpfung resistenter Bakterien entwickelt werden.

Ribosomen bilden den zellulären Translationsapparat und sind damit von zentraler Bedeutung für die Proteinbiosynthese. Da sich bakterielle Ribosomen in ihrem Aufbau von denen der höheren Organismen unterscheiden, können sie mit passenden Wirkstoffen spezifisch angegriffen werden. Dies macht sie zu einem idealen Ziel für Antibiotika. „Es gibt viele Antibiotika, die am Ribosom wirken, vor allem solche, die die Aktivität, also die Translation beeinflussen und damit die Proteinbiosynthese hemmen“, erläutert Elke Deuerling, Professorin für Molekulare Mikrobiologie an der Universität Konstanz. In ihrer Forschung beschäftigt sich Deuerling mit Aspekten rund um das Ribosom.

Neben den funktionalen Ribosomen selbst wird auch deren äußerst komplexer Entstehungsprozess seit Jahren von Experten als attraktive Zielscheibe für neuartige antimikrobielle Wirkstoffe betrachtet. Bei der Assemblierung der Ribosomen müssen viele Faktoren wie ribosomale RNAs und ribosomale Proteine räumlich und zeitlich in einer genau abgestimmten Choreographie zu zwei riesigen Untereinheiten zusammengebaut werden. Daran sind sogenannte Assemblierungsfaktoren beteiligt, die bewirken, dass der Prozess geordnet und effizient abläuft. „Jeder Assemblierungsschritt ist theoretisch hemmbar, entweder direkt oder indirekt über einen Assemblierungsfaktor“ erklärt Deuerling. Trotzdem gibt es bisher keine Antibiotika auf dem Markt, die spezifisch die Ribosomenentstehung inhibieren. „Es fehlte einfach ein zielgerichtetes Verfahren, um erfolgreich nach solchen Substanzen fahnden zu können“, erläutert Dr. Rainer Nikolay, Wissenschaftler im Labor von Deuerling.

Messbare Ribosomenentstehung dank Fluoreszenz

Während seiner Zeit als Postdoc in der Pharmaindustrie hatte Nikolay bereits Erfahrungen in der Entwicklung von Testsystemen gesammelt. Diese wollte er anschließend für die Konzeption eines



Mischung aus E.-coli-Zellen, deren kleine ribosomale Untereinheit mit mCherry (rot) und deren große ribosomale Untereinheit mit EGFP markiert ist (grün), sowie Zellen, die sowohl mCherry- und EGFP-markierte Untereinheiten besitzen (gelb).

© Universität Konstanz

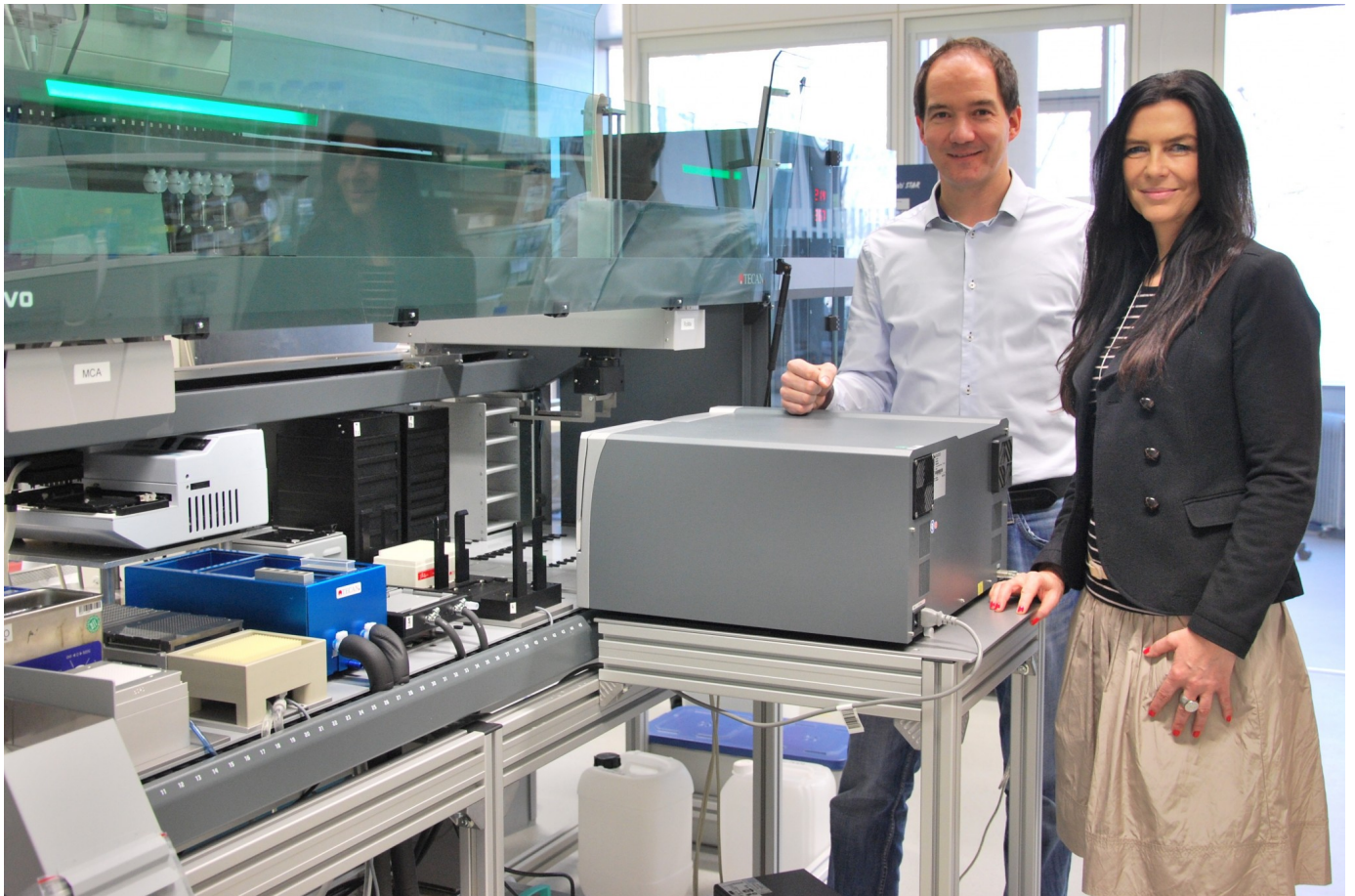
Assay einsetzen, der die Funktionsweise des Ribosoms betrachtet. Als Nikolay 2010 ins Labor von Deuerling kam, hatte er die Idee für eine fluoreszenzbasierte Untersuchung der Ribosomenassemblierung. Die Grundlage für den Ansatz waren Bakterien-Reporterstämme mit Ribosomen, deren zwei Untereinheiten verschiedene Fluoreszenzmarkierungen tragen - die eine rot, die andere grün.

Dafür wurden Gene, die für fluoreszierende Proteine kodieren, mit bestimmten Genen fusioniert, die für Proteine der großen oder kleinen ribosomalen Untereinheit kodieren. „Entscheidend waren dabei die Auswahl der richtigen ribosomalen Gene und die anschließende sorgfältige Prüfung der generierten Reporterstämme, um unerwünschte Nebenwirkungen durch die Manipulation am Ribosom auszuschließen“, erklärt Nikolay. Es gelang ihm, Reporterstämme zu konstruieren, deren Wachstumseigenschaften nahezu denen des Wildtyp-Stamms entsprechen und bei denen Assemblierung und Aktivität des Translationsapparates nicht beeinträchtigt werden.

Mit diesen Bakterienstämmen konnten im nächsten Schritt auftretende Störungen in der Ribosomenbiogenese untersucht werden. „Beide Untereinheiten der Ribosomen werden natürlicherweise in einem bestimmten Verhältnis hergestellt und in einem hoch komplexen und streng regulierten Prozess assembliert“, erläutert Deuerling. Da jede Untereinheit mit einer Fluoreszenz-Markierung versehen ist, kann das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz in Gegenwart der zu testenden Substanz mit dem Verhältnis im unbehandelten Bakterienstamm verglichen werden. Daraus lässt sich ablesen, ob beide Untereinheiten gleichermaßen hergestellt werden oder ob die Assemblierung einer Untereinheit gestört ist. Nachdem die Funktionalität der Methode im Labor bestätigt werden konnte, wurde das Verfahren noch an ein Hochdurchsatzverfahren-taugliches Format angepasst. Dazu wurde die Methode für die Nutzung

von Mikrotiter-Platten optimiert und standardisiert, um ein automatisiertes Screening zu ermöglichen. So können mit dem Verfahren mittels High-Throughput-Screening (HTS) Substanzbibliotheken nach möglichen Inhibitoren für die Ribosomenassemblierung durchsucht werden.

Patentierte Methode für die industrielle Wirkstoffsuche



Dr. Rainer Nikolay und Prof. Dr. Elke Deuring vor der Screening-Workstation (Roboter) des Konstanzer Screening Center SCen, in dem gerade der erste Screen durchgeführt wird.

© Universität Konstanz

Die auf diese Weise identifizierten, möglichen neuartigen Wirkstoffe wären ideale Kandidaten für Antibiotika. „Ohne Ribosomen können keine Proteine synthetisiert werden, sodass sich die Hemmung der Ribosomenassemblierung zunächst in einer Hemmung des Wachstums bemerkbar macht“, schildert Deuring. Langfristig sterben derart gehemmte Bakterien auch ab, da alle lebenswichtigen Funktionen zum Erliegen kommen. „Um Resistenzbildung zu vermeiden, könnten auch mehrere solcher Wirkstoffe kombiniert eingesetzt werden“, erklärt sie die Vorteile.

Um das zum Patent angemeldete Screening-Verfahren in Zukunft zur Anwendung bringen zu können, führen die Forscher in Zusammenarbeit mit Kollegen aus der Chemischen Biologie und dem Screening Center SCen der Universität Konstanz einen ersten Screening-Ansatz selbst durch. „Dabei können wir unser neuartiges Verfahren verglichen mit industriellen Maßstäben im kleinen Stil erproben und mit etwas Glück vielleicht sogar schon interessante Wirkstoffe aufspüren“, hofft Nikolay. Für die weitere Vermarktung und Anwendung des Screenings sind Deuring und ihre Arbeitsgruppe sehr an Kooperationen mit Firmen und Investoren interessiert. „Mit Sicherheit brauchen wir hier in Zukunft weitere Partner, um dieses Verfahren wirklich auf den Weg „from

Bench-to-Bedside“ zu bringen“, urteilt Deuerling.

Neue Werkzeuge für die Grundlagenforschung

Neben der gezielten Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen eröffnet das Screening auch in der Grundlagenforschung weitere Anwendungsmöglichkeiten, zum Beispiel zur wissenschaftlichen Untersuchung der Ribosomenassemblierung. „Chemische Substanzen, die wir mittels des Screenings identifizieren, könnten verwendet werden, um Fragen zur Biogenese von Ribosomen zu beantworten, die vielfach noch ungeklärt sind“, schildert Deuerling. Der Ansatz könnte auch weiter verfeinert werden, um gezielt einzelne Schritte der Ribosomenassemblierung sichtbar zu machen. „Wir sehen hier ein großes Potenzial“, schließt sie.

Fachbeitrag

10.06.2014

Bettina Baumann

BioLAGO

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

Prof. Dr. Elke Deuerling

Lehrstuhl für Molekulare Mikrobiologie

Fachbereich Biologie

Universität Konstanz

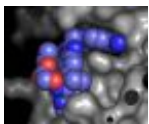
Tel.: 07531/882647

E-Mail: elke.deuerling@uni-konstanz.de

► [Index:](#)

[Antibiotika](#)

Der Fachbeitrag ist Teil folgender Dossiers



Wirkstoffscreening - Höher, schneller, weiter durch Automatisierung

Universität Konstanz

