

Streptomyces: Mikrobe des Jahres 2016

Streptomyceten: Relevanz für Ökologie, Medizin und Biotechnologie

HILDGUND SCHREMPF¹, ULLRICH KELLER²

¹FACHBEREICH BIOLOGIE/CHEMIE, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

²INSTITUT FÜR CHEMIE, TU BERLIN

Streptomycetes are differentiated members of actinobacteria with huge abundance in soils, rhizosphere, and marine sediments. In addition to main roles in a free-living style, they are relevant in multiple interactions and specialized symbioses. Their sophisticated enzyme-repertoire is essential to recycle organic matter in nature and to detoxify harmful compounds. The immense gene pool for an amazing repertoire of bio-active compounds is an outstanding source for drugs to combat diseases.

DOI: 110.1007/s12268-016-0651-x
© Springer-Verlag 2016

■ Der Nobelpreis für Medizin 2015 zeichnet auch Streptomyceten aus: Sie synthetisieren viele Wirkstoffe einschließlich Avermectin, das Satoshi Omura als einer der Nobelpreisträger entdeckte und mit William Campbell zum Antiparasitikum Ivermectin insbesondere zur Bekämpfung tropischer Krankheiten weiterentwickelte [1]. Bei Vergabe des Nobelpreises an Selman Waskman standen Streptomyceten bereits 1952 im Rampenlicht, da sie das zur Tuberkulose-Behandlung eingesetzte Streptomycin herstellen [2]. Seit ihrer Entdeckung vor 125 Jahren stehen *Streptomyces*-Spezies aufgrund ihrer ökologischen Bedeutung und des nahezu unerschöpflichen Wirkstoff-Repertoires zunehmend im Mittelpunkt innovativer Forschungen.

Große Genome, genetische Vielfalt und komplexer Lebenszyklus

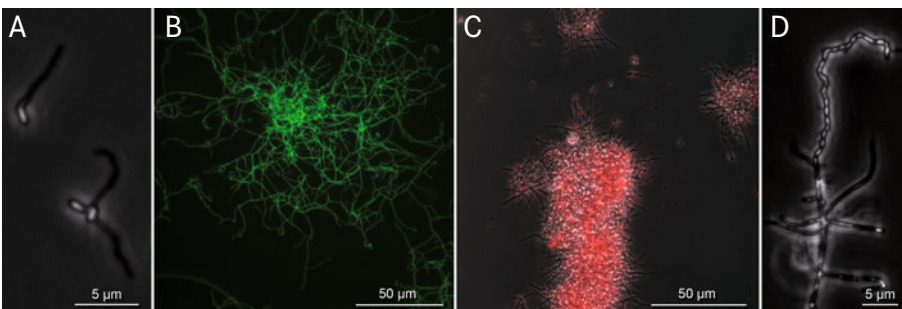
Die Familie der Gram-positiven Streptomycetaceae umfasst etwa 600 Spezies [3]. Das Guanin- und Cytosin(G+C)-reiche Genom analysierter Stämme variiert zwischen 6,4 bis 12,7 Millionen Basenpaaren (Mb) mit 6.200 bis 10.000 Genen. Die zentrale Region des linearen Chromosoms (5 bis 7,5 Mb) trägt dominant Gene für essenzielle Stoffwechsel-Funktionen. Insbesondere die flankierenden chromosomalen Enden variieren von Spezies zu Spezies und codieren für Exoenzyme, Abbauelemente, sekundäre Metabolite sowie für zahlreiche unbekannte Eigenschaften. Deletionen, Amplifikationen und Umlagerungen führen zu genomischen Veränderungen und somit

zu großer Stamm-Variabilität [4]. Lineare und zirkuläre Plasmide tragen metabolische Zusatzfunktionen und werden effizient zwischen Spezies übertragen.

Streptomyceten bilden Sporen als Dauerformen, die unter geeigneten Bedingungen auskeimen (**Abb. 1A**). Es entstehen polar wachsende, später sich verzweigende, vegetative Substrathyphen. Diese haben selten positionierte Septen, sodass nach wiederholten Replikationsrunden zahlreiche Kopien des Genoms in größeren zellulären Kompartimenten vorliegen. Die Hyphen bilden ausgedehnte Netzwerke (Myzel, **Abb. 1B**), die kompakte Aggregate formen können (**Abb. 1C**). Nährstoff-Reduktion führt zu einer Signalkaskade, die in der Transkription von Genen für die physiologische und morphologische Differenzierung mündet. Als Resultat entstehen sekundäre Stoffwechsel-Metabolite und Lufthyphen, in deren entstehenden Kompartimenten jeweils eine Kopie der genomischen DNA vorliegt. Weitere Differenzierungen resultieren in Ketten (**Abb. 1D**) mit Sporen, die mit hydrophoben Proteinen ummantelt sind und weitere Oberflächen-Komponenten sowie Pigmente aufweisen [5].

Überlebenskünstler, Partner und Antagonist

Streptomyceten stellen oft den Hauptanteil der Bakterien (10^4 bis 10^7 /g) in terrestrischen Habitaten, in denen sie Hyphen-Netzwerke an und zwischen Boden-Partikeln (**Abb. 2A**) und in der Rhizosphäre ausprägen. Zu ihrem Bouquet flüchtiger, derzeit intensiv analysierter Substanz-Klassen gehört Geosmin, das wir bereits in sehr geringen Konzentrationen als „typischen Erdgeruch“ wahrnehmen [3]. Als Nahrungsquellen nutzen sie unterschiedliche Spektren von niedermolekularen Zuckern, Aminosäuren und Makromolekülen. Mit ihrem enormen Exoenzym-Repertoire hydrolysieren sie Cellulose, Lignocellulose, Xylane, Pektine, Chitin, Chitosan oder hochmolekulare Proteine zu niedermolekularen Verbindungen, die sie über spezifische Transporter als Nährstoffe aufnehmen. Die-

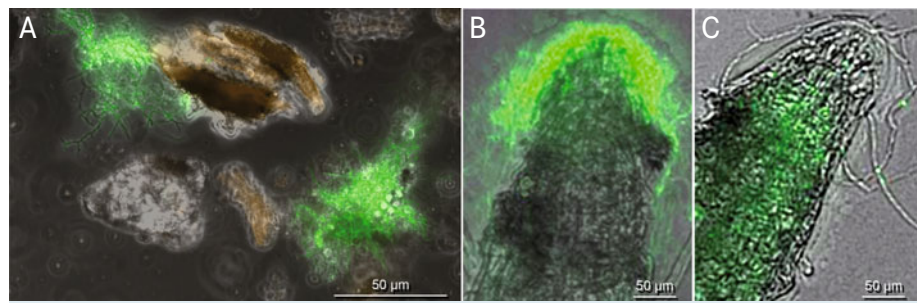


▲ **Abb. 1:** Entwicklungsstadien eines Streptomyceten. Auskeimende Sporen (A), Geflecht von Substrathyphen, behandelt mit einem grün-fluoreszierenden Farbstoff (B), kompakte Hyphen-Aggregate, die rot fluoreszierende Prodiginine (Undecylprodiginosin und Streptorubin B, s. Abb. 4) produzieren (C) und Lufthyphye, in deren oberen Teil Sporen vorliegen (D).

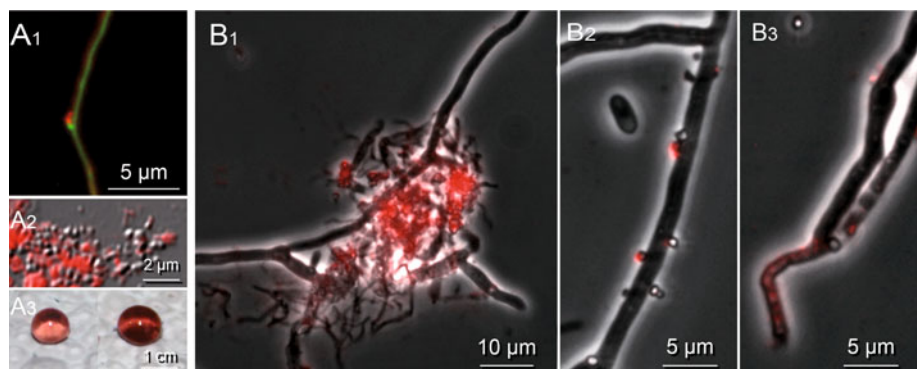
se Fähigkeiten führen zur Nutzung abgestorbener Pflanzenreste, Exoskeletten von Arthropoden oder Zellwänden verschiedener Mikroben und insbesondere zur Humusbildung. Toxische Verbindungen (Xenobiotika) transformieren sie zu weniger schädlichen Abkömmlingen [4].

Mit weiteren Enzym-Typen modifizieren sie Sekundärmetabolite, Steroide oder Vitamine (Biotransformation). Besonders important ist die Synthese von antagonistischen Verbindungen mit hoher struktureller Variationsbreite. Diese werden primär als ausgeklügeltes „Waffen-Arsenal“ der Streptomyces betrachtet; jedoch sind *in situ*-Funktionen wegen der Komplexität der natürlichen Habitate kaum analysiert. Streptomyces haben vielseitige Resistenz-Prinzipien, darunter enzymatische Modifikationen chemisch unterschiedlicher Antibiotika. Die Rolle der resultierenden Substanz-Varianten in natürlichen Habitaten ist jedoch unbekannt; Funktionen als mögliche Signal-Moleküle werden diskutiert [6].

Während der Ko-Kultivierung von unterschiedlichen *Streptomyces*-Spezies oder von diesen mit anderen Bakterienarten kann das produzierte antagonistische Repertoire erweitert sein [5]. Ein ausgewählter Streptomycet etabliert sich effizient an Wurzelspitzen einer Modell-pflanze (**Abb. 2 B, C**) und inhibiert einen phytopathogenen Pilz (*Verticillium*) durch erhöhte Produktion zytotoxischer Prodiginine (Streptorubin B und Undecylprodigiosin, **Abb. 4, [7]**). Die Ko-Kultivierung von Pilzen (*Aspergillus*, *Verticillium*) mit getesteten Streptomyceten und dessen Mutanten zeigt, dass neu identifizierte Proteine für die Interaktion essenziell sind. Diese bewirken Hyphen-Aggregate (z. B. HyaS, Streptomyceten-spezifische Aminoxidase), Erkennung (z. B. CHBs, Chitin-bindende Proteine) und enzymatischen Abbau pilzlicher Zellwände oder die Hydrolyse Phosphat-haltiger Verbindungen (MptS, Streptomyceten-spezifischer Metallophosphatase-Typ). An lokalen Hyphen-Positionen, die zu später Wachstumsphase eine reduzierte Murein-Quervernetzung aufweisen, können Vesikel in großen Mengen freigesetzt werden, die als Exsudate auf sporulierenden Streptomyceten erscheinen (**Abb. 3A**). Die Vesikel-Populationen enthalten ein Repertoire an Enzymen sowie Bindepoteine für anorganische und niedermolekulare organische Substrate, die sowohl die autonome als auch die mutualistische Bakterien-Proliferation fördern könnten. Interessanter-



▲ **Abb. 2:** Streptomyceten-Hyphen nach Behandlung mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff an Boden-Partikeln (A), an Wurzelspitzen (B), an denen sie proliferieren und das Wachstum von Pilzhypen (*Verticillium*) unterdrücken, und Kontrolle einer Wurzel, die durch den Pilz geschädigt ist (C).



▲ **Abb. 3:** Ausstülpung (rot, Mitte) an einer Streptomyceten-Hyphe (A1), die Vesikel (A2) enthält, und Tropfen-ähnliche, Vesikel-enhaltene Exsudate (A3). Während der Ko-Kultivierung (B1) mit einem Pilz (*Verticillium*) sekretieren die *Streptomyces*-Hyphen (kleiner als die des Pilzes) auch Vesikel, die Prodiginine (Undecylprodigiosin und Streptorubin B, s. Abb. 4) enthalten und rot fluoreszieren. Vesikel assoziieren an Pilzhypen (B2) und bewirken deren Schädigung (B3).

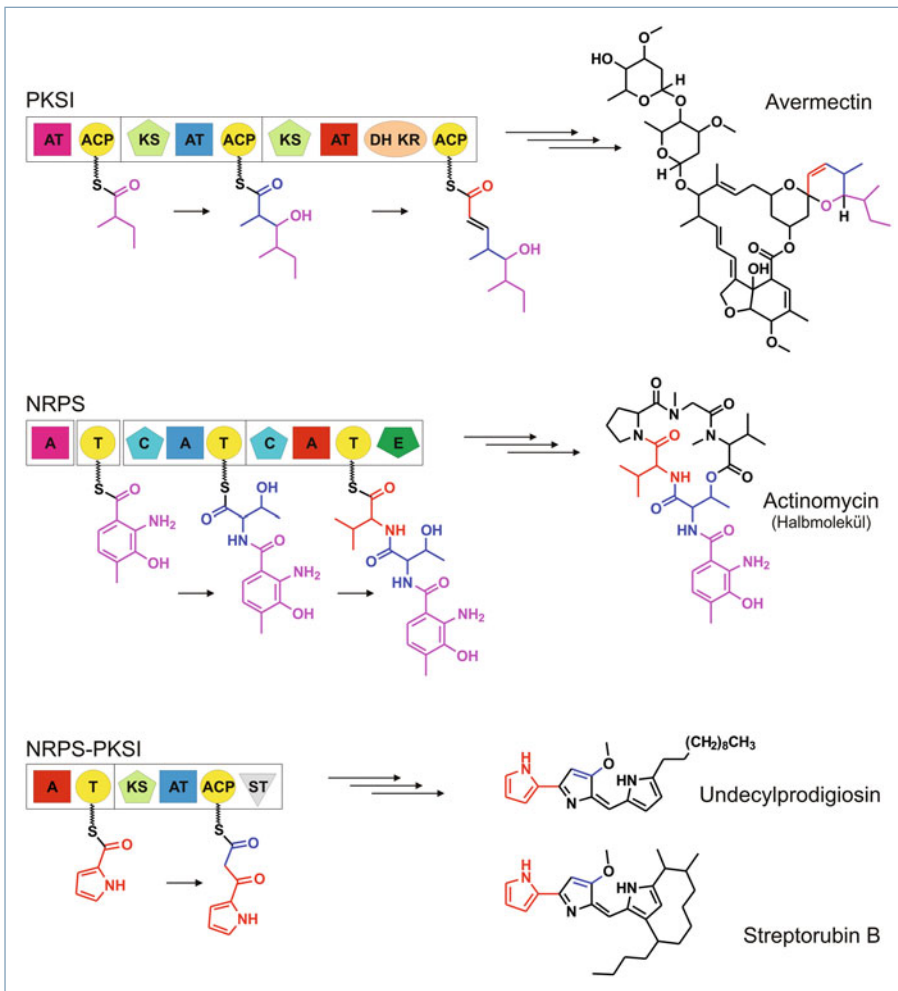
weise gehören dazu auch Enzyme zur Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies sowie antagonistische Sekundärmetabolite oder Enzyme zur chemischen Modifikation derselben [8]. Applizierte Vesikel heften sich an Pilzhypen und führen zu deren Schädigung; Prodiginine (**Abb. 4**) der Vesikel lassen sich fluoreszenzmikroskopisch verfolgen (**Abb. 3B**).

Ein Auxofuran-produzierender *Streptomyces*-Stamm begünstigt die Proliferation von Ektomykorrhiza und somit das Wachstum einer Pinien- oder Eichenart. Neben anderen Actinobakterien sind *Streptomyces*-Spezies als Endophyten insbesondere in Mangroven zu finden. In Korallen sowie in Schwämmen sind zusammen mit anderen Bakterien oft auch Streptomyceten nachzuweisen. Streptomyceten mit hoher Cellulase-Aktivität können aus dem Verdauungsapparat von Invertebraten (Termiten, Regenwürmer) isoliert werden [3]. Ein applizierter Streptomycet etabliert sich im Verdauungstrakt einer Ringelwurm-Art und hydrolysiert mittels einer Chitinase Chitin in Pilzhypen als Nahrungsquelle *in situ*

[4]. Weibchen von solitären Grabwespen kultivieren einen Streptomyceten als Symbionten, dessen antibakterielle und antifungale Verbindungen auf den Kokons der Nachkommen nachzuweisen sind. [5]. Zunehmend werden Streptomyceten auch in anderen Invertebraten gefunden. Die Mechanismen zur Etablierung mutualistischer oder symbiontischer Interaktionen müssen zukünftig aufgeklärt werden.

Strategien für Wirkstoffe und Biokatalysatoren

Die Datenbank StreptomeDB 2.0 annotiert von 2.500 Streptomyceten-Stämmen etwa 4.000 sekundäre Metabolite. Viele haben antibakterielle, fungizide, antiparasitäre, herbizide, zytostatische oder immunsuppressive Wirkung. Sie hemmen viele Prozesse wie Zellwandsynthesen bei Bakterien und Pilzen, Replikation von DNA, Transkription und Proteinsynthese, Apoptose, Kinase-Kaskaden, ATP-Spiegel sowie Biogenese von Viren und stellen somit den höchsten Anteil medizinisch relevanter, mikrobieller Wirkstoffe.



▲ **Abb. 4:** *Streptomyces*-Megasyntasen mit PKS I-, NRPS- oder NRPS-PKS I-Modulen. Diese kondensieren monomere Bausteine (kleine Carbonsäure oder Aminosäure) in definierter Abfolge. Autonome Domänen der Module katalysieren den Acyltransfer (AT), die Esterkondensation (KS), die kovalente Substratbindung (ACP oder T), die Aminosäureaktivierung (A) und die Peptidkondensation (C). Optionale Domänen bewirken zahlreiche Modifikationen der kovalent gebundenen Zwischenstufen, u. a. Reduktion (DH und KR), Epimerisierung (E) oder Freisetzung durch Kondensation (ST). Gezeigt sind für jeden der Wirkstoffe die ersten Schritte der Polymerisation sowie die jeweilige Gesamt- oder Teilstruktur.

Zu den Substanzgruppen gehören Aminoglykoside, Glycopeptide, nicht-ribosomale Peptide und Polyketide [9]. Besonders strukturdiverse Verbindungen werden durch nicht-ribosomale Peptid-Synthasen (NRPS), Polyketid-Synthasen (PKS I, PKS II oder seltener PKS III), NRPS-PKS I sowie weitere Enzyme synthetisiert (**Abb. 4**). Zu Wirkstoffen mit NRPS-abhängiger Synthese gehören Actinomycin, Daptomycin und Vancomycin. Beispiele für von PKS I bzw. PKS II generierte Substanzen sind Avermectin sowie Nystatin bzw. Actinorhodin und Jadomycin. NRPS-PKS I bewerkstelligen Synthesen für Antimycin oder Rapamycin. Die Biosynthesegene in Kombination mit entsprechenden Resistenzgenen sind oft in Genclustern organisiert, die evolutionär durch Rekombination z. T. unter

Beteiligung mobiler Elemente entstanden [10].

Heute können gezielt veränderte Gen-Cluster erstellt und in transformierbare oder konjugierbare Vektoren so kloniert werden, dass diese für neue Analoga codieren. Als Wirtssysteme eignen sich insbesondere *Streptomyces*-Spezies, die natürlicherweise ein relativ kleines Genom haben (*S. albus*) oder gezielt erstellte Mutanten mit umfangreichen Genom-Deletionen (*S. coelicolor* A3(2), *S. ambofaciens*, *S. avermitilis*). Methoden für das Genome Editing finden steigenden Einsatz. Da inzwischen Sequenzierungen von sehr G+C-reicher DNA kostengünstig sind, werden derzeit explosionsartig Genome annotiert. In etwa 150 bekannten Genomen kommen jeweils 20 bis 50 Cluster für postulierte sekundäre Meta-

bolite vor und umfassen bis zu 3 Mb. Prognostiziert werden 100.000 Verbindungen, von denen nur drei Prozent eine vorhersagbare Struktur haben [9]. Um dieses enorme Repertoire zu nutzen, ist es notwendig Bedingungen zu etablieren, unter denen insbesondere kryptisch annotierte Gene aktiviert werden. Aktuelle Erkenntnisse versprechen Erfolge durch Ko-Kultivierungen mit anderen Mikroorganismen, Stressbedingungen oder nach Klonierungen in optimierte Expressionsstämme. Weitere Strategien umfassen die Nutzung von Stämmen mit Mutationen in Promotor-Regionen, in Regulator-Proteinen, Zwei-Komponenten-Systemen und/oder Sigma-Faktoren. Mutanten mit Veränderungen der Transkription (unter der Kontrolle variiert RNA-Polymerasen) oder Translation (z. B. *ribosome engineering*) erfahren zunehmend Beachtung. In Folge können mit verschiedenen Analyse-Systemen Substanzen selektiert und deren Strukturen aufgeklärt werden. Für Untersuchungen von generierten Produzenten werden vergleichende Transkriptom-, Proteom- und Metabolom-Studien und Bioinformatik essenziell. Die Studien werden zu neuen Substanzen führen, von denen diejenigen, die multi-resistente Pathogene inhibieren, besonders im Blickfeld stehen.

Insbesondere *S. lividans* sowie dessen Mutanten werden genutzt, um homologe und heterologe Proteine in größeren Mengen zu gewinnen [11]. Erfolgreich war nach Klonierung die Sekretion extrazellulärer Streptomyceten-Enzyme (z. B. Glucose-Isomerase, Xylanasen) mit hoher Ausbeute. Unter Einbeziehung der riesigen Palette hydrolytischer und anderer Enzyme für Biotransformationen ist das nutzbare Streptomyceten-Arsenal für die Biotechnologie sehr umfangreich.

Danksagung

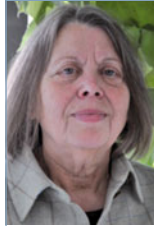
Wir danken Marc Schulte für die kompetente Bearbeitung mikroskopischer Bilder und Ivana Crnovcic für ihre Mitarbeit bei der schematischen Darstellung. ■

Literatur

- [1] Omura S (2008) Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int J Antimicrob Agents* 31:91–98
- [2] Schatz A, Wasmann, SA (1944) Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exptl Biol Med* 57:244–248
- [3] Kutzner, HJ (1981) The family Streptomycetaceae. In: *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Starr MP, Stolp H, Trüper HG et al. (Hrsg). Springer, Berlin, 2028–2090
- [4] Schrepf H (2007) The family of Streptomycetaceae: part II molecular biology. In: *The Prokaryotes*, Vol. 3. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E et al. (Hrsg), Springer, Berlin, 605–622

- [5] Chater KF, Biro, S. Lee KJ et al. (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol Rev 34:171–198
- [6] Yim G, Wang HH, Davies J (2007) Antibiotics as signalling molecules. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 362:1195–1200
- [7] Meschke H, Walter S, Schrempf H (2012). Characterization and localization of prodiginines from *Streptomyces lividans* suppressing *Verticillium dahliae* in the absence or presence of *Arabidopsis thaliana*. Environ Microbiol 14: 940–952
- [8] Schrempf H, Merling P (2015) Extracellular *Streptomyces lividans* vesicles: composition, biogenesis and antimicrobial activity. Microb Biotechnol 8: 644–658
- [9] Baltz RH (2015) Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. J Ind Microbiol Biotechnol, im Druck
- [10] Keller U, Lang M, Crnovcic I, et al. (2010) The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. J Bacteriol 192:2583–2595
- [11] Anné J, Vrancken K, Van Mellaert L et al. (2014) Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. Biochim Biophys Acta 1843:1750–1761

AUTOREN



Hildgund Schrempf

1983–1984 Associate Professor for Biotechnology and Molecular Biology, Dalhousie University, Halifax, Kanada. 1984–1989 Professorin für Mikrobiologie, LMU München, seit 1989 Professorin für Angewandte Genetik der Mikroorganismen, Universität Osnabrück.



Ullrich Keller

1985–1991 Habilitation und Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, TU Berlin. 1991–2013 Hochschuldozent für Biochemie, TU Berlin, seit 2013 Wissenschaftlicher Berater und Gutachter in Gremien.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Hildgund Schrempf
 FB Biologie/Chemie
 Universität Osnabrück
 Barbarastraße 13
 D-49069 Osnabrück
 Tel.: 0541-969-2985
 schrempf@biologie.uni-osnabrueck.de