

Link

www.biochemie.ch.tum.de/eisenreich/weisenreich2010.html



Nächster Halt: Aminosäure

Der Chemiker Wolfgang Eisenreich liest in den verschlungenen Wegen des Stoffwechsels wie in einem Fahrplan. Sein Fahrziel: die dort ablaufenden Reaktionen aufklären und die Stammstrecke in einzelnen Stoffwechselsystemen aufspüren

Es geht um die Stammstrecke. Die Strecke, auf der am meisten los ist. Diese Strecke will er finden: Dr. Wolfgang Eisenreich. Der Wissenschaftler vom Lehrstuhl für Biochemie der TUM in Garching untersucht allerdings keine Streckennetze öffentlicher Verkehrsmittel, sondern das recht ähnlich gestrickte Netzwerk des Stoffwechsels. Seine Trassen sind Reaktionswege, auf denen biochemische Produkte entstehen.

Wie im Linienplan von Bus und Bahn verläuft auch im Metabolismus der Verkehr kreuz und quer, aber immer strikt geregelt und nach Plan. Ständig wird Materie auf-, um- und abgebaut, Neues zusammengefügt und wieder in Einzelteile zerlegt. Zudem zeichnet sich der Stoffwechsel durch äußerste Dynamik aus und passt sich rasch an veränderte Bedingungen an – was ihn vom öffentlichen Nahverkehr unterscheidet. Je nach Ernährungssituation, Temperatur oder verfügbarer Energie ändern sich die Stoffflüsse und es entstehen anders zusammengesetzte Zwischenprodukte (Metaboliten) in anderen Mengenverhältnissen. ▶





Dr. Wolfgang Eisenreich untersucht die metabolen Netzwerke in seltenen kaukasischen Pflanzen (hier: *Thymus transcaucasicus*). Zunächst werden die Pflanzen in einer Kammer mit ^{13}C -markiertem Kohlendioxid kultiviert. Dann bereitet der Wissenschaftler die Proben für Isotopologie Profiling vor



„Die Metaboliten bilden zu jedem Zeitpunkt die jeweiligen Lebensvorgänge des betreffenden Organismus ab“, erklärt Wolfgang Eisenreich. Der Chemiker kennt sich mit den verschlungenen Wegen des Stoffwechsels bestens aus. Er liest in ihnen wie in einem Fahrplan. Und sein Ziel ist es, im Metabolismus ganz verschiedener Organismen viel benutzte „Trampelpfade“ zu finden und die dort ablaufenden Reaktionen aufzuklären. „Wir suchen sozusagen die Stammstrecken in einzelnen Stoffwechselsystemen und zu unterschiedlichen Bedingungen. Sind die bekannt, kann man manipulierend eingreifen und so Abläufe in den Organismen steuern. Entweder fördern – bei gewünschten Reaktionen – oder aber hemmen. Im Fall infektiöser Bakterien hätte man damit beispielsweise ein neues Antibiotikum.“

Markierte Moleküle

Einzelne Reaktionsabläufe im Dickicht des Stoffwechsels zu verfolgen, ist jedoch kompliziert. Es braucht Marker, die man immer wiederfindet im Gewirr. Was im Verkehr etwa auffällige Sonderwagen der Tram sind,

In einer Kooperation mit Dr. Artur Manukyan vom Wissenschaftszentrum Weihenstephan untersucht der Lehrstuhl für Biochemie kaukasischen Thymian. Im Labor werden die ^{13}C -markierten Pflanzen präpariert. Im Anschluss wollen die Wissenschaftler mittels Gaschromatografie und Massenspektrometrie Metabolite isolieren

sind im Metabolismus stabile Isotope. Ganz exakt sind es Isotopologe, auf denen die Analysen beruhen: Moleküle, in denen der natürlich vorkommende Kohlenstoff mit der Massenzahl 12 (^{12}C) ganz oder teilweise durch den ein winziges bisschen schwereren Kohlenstoff mit der Massenzahl 13 (^{13}C) ersetzt ist. Mittlerweile kann man solche markierten Verbindungen kaufen: Glucose etwa, Glycerin oder Acetat, die an einer, an mehreren oder allen C-Positionen ^{13}C -markiert sind. Organismen verwenden in ihrem Stoffwechsel beide Kohlenstoffarten ohne wesentliche Unterschiede. So dienen die ^{13}C -Verbindungen als auffallende Tram-Sonderwagen, die sich im metabolischen Streckennetz als Ganzes oder in Teilen wiederfinden lassen – sofern man die passende Methode dafür hat.

Die TUM Wissenschaftler haben sie: Isotopologue Profiling heißt das Verfahren, mit dem sie das Schicksal der mit ^{13}C -Atomen bestückten Moleküle nachverfolgen. Es verbindet zwei höchst empfindliche Analysemethoden: einerseits Massenspektrometrie (MS), meist direkt gekoppelt mit Gaschromatografie (GC), andererseits Ma-

gnetransonanzspektroskopie (NMR). Das GC/MS-System trennt die im Stoffwechsel entstandenen Moleküle nach ihren Massen auf und unterscheidet dabei zwischen ^{13}C -markierten Molekülen und solchen mit normalen ^{12}C -Atomen. Die NMR erfasst über spezifische Frequenzsignale in einem starken Magnetfeld exakt, welche Positionen in den Molekülen ^{13}C -besetzt sind. Es entsteht ein typisches Muster, das zeigt, an welchen Stellen welcher Metaboliten ^{13}C -Atome eingebaut wurden und auch, über welche Schritte es dazu kam. Die Wissenschaftler können zum Beispiel nachvollziehen, an welchem Atom ein Enzym wie ansetzt.

Meilenstein für die Stoffwechselforschung

So machen die modernen Hightech-Geräte die Dynamik des metabolischen Netzwerks und seine Reaktionen mit der jeweiligen Umwelt sichtbar. Man erkennt, wie aus den markierten Vorläufersubstanzen über Stoffwechselwege wie den Citratzyklus, die Glykolyse oder den Pentosephosphatzyklus metabolische Produkte entstehen. „Die Möglichkeit, metabolische Flüsse unter natürlichen ▶

Bedingungen und am lebenden Objekt zu charakterisieren, ist ein Meilenstein für die Stoffwechselforschung“, schwärmt Eisenreich. Noch steht die Grundlagenforschung im Mittelpunkt der Arbeiten, doch fallen dem Chemiker auf Anhieb jede Menge Anwendungsmöglichkeiten ein, sei es für medizinische, landwirtschaftliche oder lebensmitteltechnische Zwecke.

Wie ernähren sich Bakterien?

Ein derzeitiger Schwerpunkt ist die Arbeit an infektiösen Bakterien mit dem mittelfristigen Ziel, neue Antibiotika zu entwickeln. Denn bakterielle Infektionen durch Krankenhauskeime wie den berühmten *Staphylococcus aureus* fordern viele Opfer; mehrere Hunderttausend Patienten infizieren sich jährlich in deutschen Krankenhäusern, Tausende sterben daran. Grund: Immer mehr Bakterien sind mittlerweile gegen Antibiotika resistent. Vor diesem Hintergrund startete die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 2009 das Schwerpunktprogramm „Wirtsadaptierter Metabolismus von bakteriellen Infektionserregern“. 15 Forscherteams an Universitäten in Deutschland und der Schweiz sind daran beteiligt, darunter die Gruppe um Eisenreich.

Eigentlich ist der Stoffwechsel von Bakterien längst erforscht – aber nur unter Laborbedingungen. Dieses Wissen ist wichtig; wichtiger aber ist es, zu erkennen, wie Bakterien sich in ihren natürlichen Lebensräumen verhalten. Will man wirksam in den Stoffwechsel im Infektionsverlauf eingreifen, muss man das metabole Geschehen an oder in der Wirtszelle kennen, das Wechselspiel von bakteriellem und zellulärem Stoffwechsel. Wie ernähren und vermehren sich die Erreger im Wirtsorganismus, wie verhalten sie sich dort, wo sie eine ganz andere Umwelt als in Petrischalen oder Fermentern vorfinden? Mit welchen Tricks schaffen sie es, ihren Metabolismus rasch und flexibel auf die Abwehrreaktionen des Wirts antworten zu lassen? Zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Metaboliten herzustellen – diese Fähigkeiten sind ausschlaggebend für die Pathogenität und den Verlauf der Infektion. Hier möchte der DFG-Schwerpunkt einhaken. Finden die Wissenschaftler

Durch Einfrieren („Quenchen“) mit flüssigem Stickstoff stoppen die Wissenschaftler die Stoffwechselforgänge in den Pflanzen. So können Sie die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandenen Stoffwechselprodukte untersuchen

spezifische, für die Infektion relevante Stoffwechselreaktionen und dagegen gerichtete Hemmsubstanzen, kann die Infektion gestoppt oder gar verhindert werden.

Stoffwechselforgänge nachvollziehbar machen

Die Garchingler sind für die Schlüsseltechnologie im Forschungsverbund zuständig, das Isotopologue Profiling. In den Hochsicherheitslaboratorien der Partnergruppen werden pathogene Bakterien unter relevanten Bedingungen mit Isotop-markierten Vorstufen gefüttert, aus denen die Mikroben anschließend Zucker, Fette und Proteine aufbauen. Häufig verwendet wird ^{13}C -markierte Glucose, weil Bakterien wie die meisten Lebewesen diesen Zucker als Kohlenstoff-Quelle nutzen. Zur Untersuchung von intrazellulär lebenden Mikroben stehen Wissenschaftlern zwei Versuchsdesigns zur Verfügung: Einmal werden dem Kulturmedium der Wirtszellen, menschlichen Immun- oder Epithelzellen, unmarkierte Bakterien und ^{13}C -markierte Glucose gleichzeitig zugesetzt. In diesem Fall wird der Zucker sowohl in den Wirts- wie in den bakteriellen Stoffwechsel eingeschleust. Finden sich später in den Mikroben ^{13}C -markierte essenzielle Aminosäuren, die der Wirt nicht selbst herstellen kann, müssen diese vom bakteriellen Stoffwechsel stammen. Über welche Routen sie aus der ^{13}C -Glucose zusammengebaut werden, zeigt das Isotopologue Profiling. Oder: Das Medium der Wirtszellen enthält zunächst nur ^{13}C -markierte Glucose, die die Zellen aufnehmen. Dann tauscht man das Medium gegen ein ^{13}C -freies und fügt Bakterien hinzu. So lässt sich der Transfer von Substanzen aus dem Wirt in die Bakterien verfolgen.

Bahnbrechende Arbeiten als Grundlage

In jedem Fall stoppen die Forscher die Reaktion nach rund sechs Stunden, trennen Wirtszellen und Bakterien voneinander und gewinnen stabile Metaboliten, beispielsweise Aminosäuren. Aus ganz Deutschland wandern diese Proben anschließend nach Garching zur Bioanalyse. „In dem Bereich der Isotope war die TUM immer stark“, betont Eisenreich. „Vor allem die Arbei- ▷





Gelöste Metabolite in NMR-Röhrchen zur Bestimmung der Isotopologieverteilung mittels Kernresonanzspektroskopie. Hier messen die Forscher die genauen Positionen der ¹³C-Markierung

ten der Emeriti Helmut Simon, Hanns-Ludwig Schmidt und Adelbert Bacher waren bahnbrechend. Davon profitieren wir heute und bauen mit modernster Technik darauf auf. Gerade in der Analytik hat sich in den letzten zehn Jahren sehr viel getan. Die Empfindlichkeit heutiger Geräte ist enorm, wenige Bakterien reichen für die Messungen aus. Und unsere Ausstattung ist hervorragend; so hat uns die DFG für die Studien ein eigenes GC/MS-System gestellt, das rund um die Uhr Isotopologie vermisst. Daneben ist die NMR-Ausrüstung in Garching überragend.“

Stammstrecke der Metaboliten

In den Daten des Isotopologue Profiling suchen die TUM Biochemiker nun nach den Reaktionen, die zu einem zentralen Metaboliten führen – zu einem Produkt, dessen Fehlen das Bakterium nicht überlebt. Die Isotopologen-Muster weisen den Weg aller Reaktionen, die zur Biosynthese des Metaboliten geführt haben. Da man zudem die Ausgangssubstanzen kennt, lässt sich aus den Ergebnissen ein Gesamtfahrplan für den Stoffwechsel des Organismus unter den gegebenen Bedingungen erstellen. Eisenreich vergleicht das gern mit dem Streckennetz der Münchener Verkehrsbetriebe: „Es gibt viele Linien – Reaktionen von A zu B – und Stationen, Metaboliten. Über Stationen wie den Marienplatz verlaufen mehrere Linien bzw. Stoffwechselwege. Wir schauen, welche Linien es gibt und wie viele Züge dort verkehren, wie wichtig also der Weg ist. Letztlich suchen wir nach der Stammstrecke für zentrale und hoch vernetzte Metaboliten. Fällt eine solche Stammstrecke aus, wirkt das bis in die Peripherie, das ganze System kollabiert. Genau das wollen wir bei der Entwicklung von Antibiotika erreichen.“

Spezifische Angriffspunkte für Antibiotika

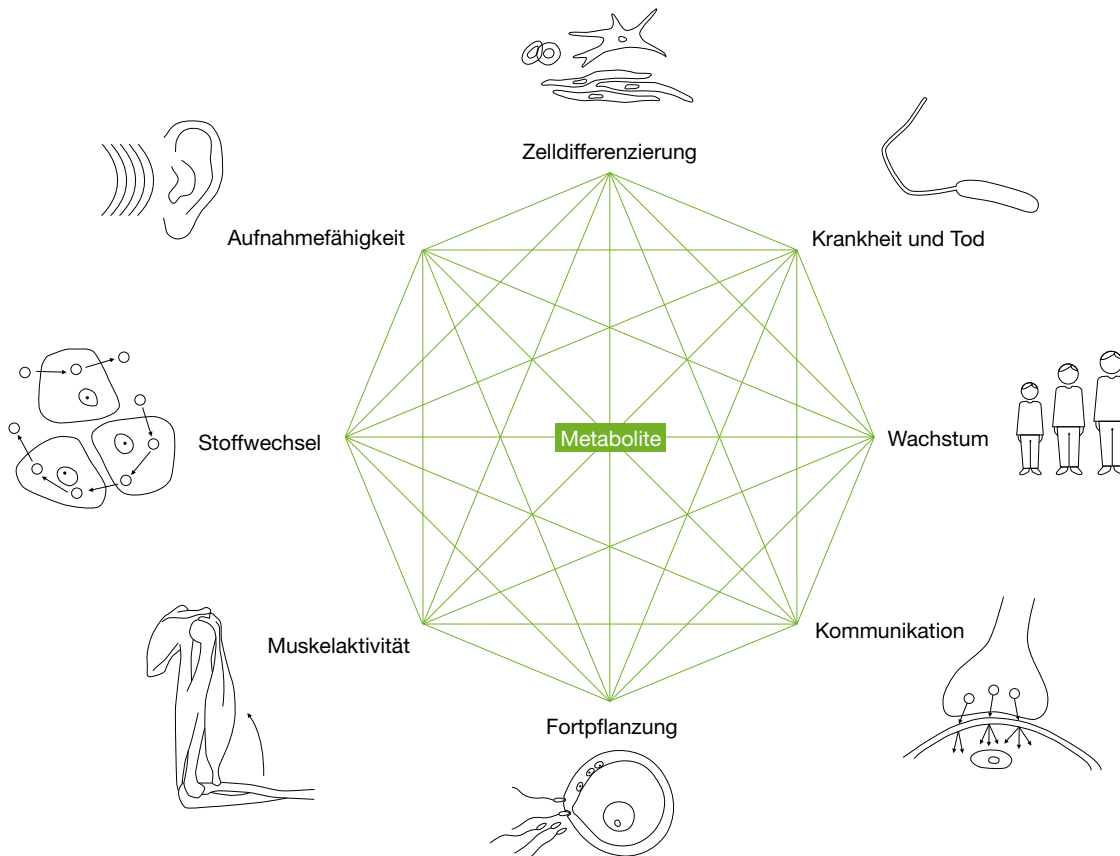
Jedoch die eine Stammstrecke, die alle Bakterien benutzen, gibt es nicht. Leider? Nein, widerspricht Eisenreich: „Denn dann hätte eine Resistenz besonders fatale Folgen. Gezielt auf Stoffwechselreaktionen der jeweiligen Pathogene wirkende Antibiotika sind besser als

unspezifische Breitband-Antibiotika. Außerdem werden nützliche Bakterien in unserem Darm geschont.“ Erste potenzielle Stammstrecken wurden bereits aufgespürt: Gemeinsam mit Kollegen vom TUM Wissenschaftszentrum Weihenstephan und dem Pettenkofer-Institut in München klärten die Garching Biochemiker auf, wie sich der Stoffwechsel von Listerien an den des Wirtsorganismus anpasst. Diese Bakterien rufen Lebensmittelvergiftungen hervor, die für geschwächte Personen tödlich sein können. Wesentlicher metaboler Prozess ist die Bildung von Oxalessigsäure durch die Pyruvatcarboxylase, ein Enzym, das CO₂ an Pyruvat anlagert; dieses Salz der Brenztraubensäure ist eine wichtige Schaltstelle im Stoffwechsel.

Untersuchungen an weiteren Krankheitserregern wie Salmonellen, Staphylokokken, Streptokokken, Yersinien, Legionellen oder Chlamydien belegen die erstaunliche Anpassungsfähigkeit des mikrobiellen Metabolismus an die wechselnden Bedingungen der jeweiligen Wirtszellen. „Es finden sich nur wenige Schwachstellen, wo man ansetzen kann“, weiß Eisenreich inzwischen. „Aber diese Achillesfersen kann und muss man nutzen und Medikamente entwickeln, die genau dort angreifen. Dafür liefern unsere Studien die Grundlage.“ Die tatsächliche Entwicklung neuer Medikamente aber sprengt den universitären Rahmen, dazu sind industrielle Partner nötig. „Leider gestaltet sich die Suche nach solchen Partnern schwierig“, bedauert Eisenreich. „An dem Gebiet der Anti-Infektiva sind Pharmafirmen in der Regel nicht sehr interessiert.“

Weiteres Forschungsthema: allergenfreier Latex

Einen Schritt weiter ist das botanische Projekt „LaKa-Zell“, das die Deutsche Bundesstiftung Umwelt fördert. Ziel der Kooperation mit der Universität Münster und der Phytowelt GreenTechnologies GmbH ist ein biotechnologisches Verfahren zur Produktion von allergenfreiem Latex. Grundlage sind Zellkulturen des russischen Löwenzahns, der in den Wurzeln Latex bildet. Anders als aus Gummibäumen gewonnener Latex löst Löwenzahn-Latex keine Allergien aus, weil ihm be- ▷



Bei zahlreichen ganz unterschiedlichen Vorgängen des Lebens sind Metabolite – hochvernetzte Stoffwechselprodukte – an der Kontrolle und Steuerung der Abläufe beteiligt

stimmte Proteine fehlen. Da Gummibäume zudem, ökologisch ungünstig, in Monokultur gezogen werden und obendrein seit einiger Zeit ein Pilz die Plantagenbäume zerstört, scheint die Gewinnung von Latex aus Löwenzahn sinnvoll. Synthetischer Kautschuk kann wegen seiner chemischen Eigenschaften Latex nicht vollständig ersetzen. Wie die Pflanze den Latex-Saft produziert, woher sie ihren Kohlenstoff bezieht, soll erneut Isotopologue Profiling abklären. Schließlich will man durch Zufuhr notwendiger Bausteine die Zellen zu vermehrter Produktion anregen.

Im „LaKaZell“-Projekt kümmern sich die Garchinger nur um die analytische Aufarbeitung der Proben im Labor. Ab und zu reisen sie aber auch selbst zu den biologischen Objekten, beispielsweise in die Lüneburger Heide. Dort geht es um Ginseng und Ginsenoside, die wirksamen Inhaltsstoffe dieser traditionellen chinesischen Heilpflanze. Die Firma FloraFarm baut den bis zu 60 cm hohen Ginseng kommerziell auf großen mit Netzen überspannten Feldern an, und einzelne Pflanzen dienen nebenbei der Wissenschaft: Ihnen führen die

Biochemiker ^{13}C -markiertes CO_2 zu. Im Zuge der Photosynthese bauen die Pflanzen daraus ^{13}C -Zucker auf. Das durch Isotopologue Profiling gemessene Mosaik aus ^{12}C und ^{13}C lässt erkennen, wie Ginsenoside in der Pflanze auf dem Feld zusammengebaut werden und wo man fördernd in die Bildung der wertvollen Substanzen eingreifen kann. Auch für zahlreiche andere moderne Fragestellungen der Pflanzenwissenschaften kann das Verfahren des Isotopologue Profiling Antworten geben. Aktuelle Forschungsobjekte sind Lavendel, Thymian und Tabak. Selbst Flechten werden damit unter die biochemische Lupe genommen. „Das Einsatzspektrum dieser höchst sensitiven Methode ist äußerst breit gefächert“, sagt Wolfgang Eisenreich. „Immer aber geht es darum, Katalysewege zu klären, metabolische Prozesse zu verfolgen, um dann produktive Schritte gezielt zu stärken und hemmende Barrieren abzubauen. Im Bereich der Pflanzenwissenschaften ist das Fernziel, eines Tages über diese neuen Kenntnisse landwirtschaftliche Erträge zu steigern oder Pflanzen tauglich zu machen für veränderte Umweltbedingungen.“ *Sibylle Kettembeil*