

atrop-Abyssomicin C als Inhibitor der 4-Amino-4-desoxychorismat-Synthase PabB**

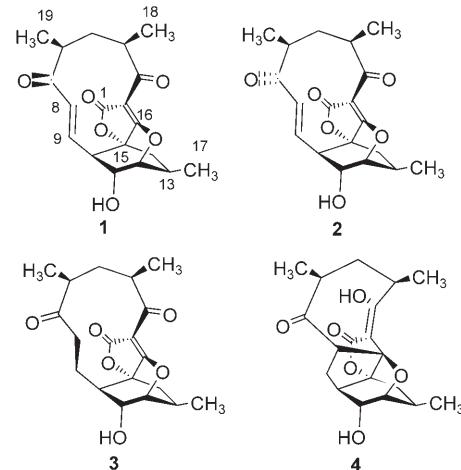
Simone Keller, Heiko S. Schadt, Ingo Ortel und Roderich D. Süßmuth*

Professor Günther Jung zum 70. Geburtstag und Professor Hans-Peter Fiedler zum 60. Geburtstag gewidmet

Das letzte gemeinsame Zwischenprodukt der Arenbiosynthese ist die Chorisminsäure, bevor sich die Biosynthesewege zu den aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr und Phe und zur *p*-Aminobenzoësäure (*p*ABA) verzweigen.^[1] Die *p*-Aminobenzoësäure ist Bestandteil der Folsäure, die von vielen Mikroorganismen und Parasiten synthetisiert werden kann, vom Menschen aber als Vitamin aufgenommen werden muss. Dies macht die Folsäure-Biosynthese zu einem interessanten Ziel für die Suche nach antiinfektiven Wirkstoffen. Bekannte synthetische Inhibitoren des Tetrahydrofolat-Biosynthesewegs sind die Sulfonamide und Trimethoprim.^[2]

Ein gerichtetes Screening von bakteriellen Extraktten nach Inhibitoren der Arenbiosynthese führte zur Isolierung der Abyssomicine B, C (1) und D (4),^[3,4] die vom marinem Gram-positiven Actinomyceten *Verrucosipora* AB-18-032 produziert werden (Schema 1) und die *p*ABA-Biosynthese inhibieren. Von diesen drei Metaboliten weist nur Abyssomicin C (1) eine antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien einschließlich pathogener *Staphylococcus-aureus*-Stämme auf. Die strukturelle Komplexität der Abyssomicine führte dazu, dass mehrere Arbeitsgruppen die Totalsynthese dieser Naturstoffe untersucht haben.^[5-8] Bislang wurden zwei erfolgreiche Totalsynthesen veröffentlicht, die erste von der Gruppe um Sorensen,^[5] die zweite von Nicolaou und Harrisson.^[6,8]

Neben Abyssomicin C (1) beschrieben Nicolaou und Harrisson die Synthese des Isomers atrop-Abyssomicin C (2),^[6] das eine höhere antibiotische Aktivität als Abyssomicin C (1) aufweist. Das atrop-Abyssomicin C (2) wurde auch in Fermentationen von *Verrucosipora* AB-18-032 gefunden und ist das hauptsächlich synthetisierte Abyssomicin, während Abyssomicin C (1) ein Nebenprodukt ist, dessen Bildung aus 2 durch saure Bedingungen gefördert wird.^[6,9]



Schema 1. Strukturen von Abyssomicin C (1), atrop-Abyssomicin C (2), Abyssomicin H (3) und Abyssomicin D (4).

Rückschlüsse auf den molekularen Wirkort und den Wirkmechanismus wurden bislang durch Strukturanalyse und aus Agarplattendiffusionstests gezogen.^[3,4] Nach unseren Recherchen sind Abyssomicin C (1) und atrop-Abyssomicin C (2) die ersten natürlichen Inhibitoren der *p*ABA-Biosynthese.

Hier beschreiben wir die molekulare Grundlage der Wirkung des Schlüsselmetaboliten von *Verrucosipora* AB-18-032, des atrop-Abyssomicins C (2). Interessanterweise zeigen die Strukturen von 1 und 2 – genauer gesagt das Oxabicyclooctan-Ringsystem – eine erstaunliche Ähnlichkeit zu einer Lösungskonformation des Chorismats.^[10] Auch die strukturelle Verwandtschaft zu Übergangszustandanaloga der Chorisminsäure ist offensichtlich.^[11] Dies lässt darauf schließen, dass 1 und 2 Substratmimetika sind. Ein augenscheinlicher Unterschied zwischen den antibakteriellen Derivaten 1 und 2 und dem inaktiven Derivat Abyssomicin H (3) ist ein α,β -ungesättigtes Keton in unmittelbarer Nähe zum Oxabicyclooctan-System (Schema 1).^[19] Dies spricht dafür, dass das Michael-System eine entscheidende Rolle für die antibiotische Aktivität spielt.

Ausgehend von Chorismat benötigt die *p*ABA-Biosynthese zwei Enzyme: Die 4-Amino-4-desoxychorismat(ADC)-Synthase, die die Reaktion von Chorismat und Glutamin zu ADC und Glutamat katalysiert,^[12] und die ADC-Lyase, die anschließend die Eliminierung von Pyruvat unter Aromatisierung katalysiert, was zur Bildung von *p*ABA führt. Die ADC-Synthase ist ein Heterodimer aus zwei nicht-identischen Untereinheiten, PabA und PabB. PabA fungiert als

[*] Dr. S. Keller, H. S. Schadt, Dr. I. Ortel, Prof. Dr. R. D. Süßmuth
Technische Universität Berlin, Institut für Chemie
Straße des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-314-24783
E-Mail: suessmuth@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://www.chemie.tu-berlin.de/Suessmuth>

[**] Die Autoren danken Dr. U. Keller (TU Berlin), Prof. H. P. Fiedler, Dr. S. Patzer und Prof. V. Braun (Universität Tübingen) für hilfreiche Diskussionen sowie Dr. M. Groll (Charité, Berlin) für die Schenkung von Plasmidkonstrukten. Die Arbeit wurde unterstützt durch Forschungsgelder der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SUV239/7-1) und der Schering AG.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Glutaminamidotransferase, während PabB die Substitution der 4-Hydroxygruppe des Chorismats durch eine Aminogruppe unter Retention der Konfiguration katalysiert.

Zur Untersuchung der Interaktion von **2** mit der ADC-Synthase wählten wir die ADC-Synthase des Abyssomicin-sensitiven Bakteriums *Bacillus subtilis* aus, die wir heterolog in *E. coli* überexprimierten und aufreinigten, im Falle von PabA nativ, im Falle von PabB über einen N-terminalen His₆-Tag. Zur Quantifizierung des gebildeten ADC wurde ein Testsystem auf der Basis der Elektrospray-Massenspektrometrie durch MRM (multiple reaction monitoring) entwickelt. Die Hemmkinetik wurde bei konstanten Chorismatkonzentrationen (5 mM) und 100 mM Ammoniumsulfat durchgeführt. Eine Präinkubation von ADC-Synthase (PabA und PabB) mit **2** führte zu einer zeitabhängigen Abnahme der Enzymaktivität (Hintergrundinformationen). Die Zugabe von PabA war wegen der Instabilität von PabB erforderlich. Hierbei hatte die Präinkubation von PabA mit **2** keinen inhibitorischen Effekt auf die ADC-Bildung. Anschließend wurde eine Serie von Experimenten mit variierender Inhibitorkonzentration (50–500 µM) bei konstanter Enzymkonzentration und unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Trägt man die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} als Funktion der Inhibitorkonzentration auf, so erhält man eine hyperbole Kurve, die charakteristisch für irreversible Inhibitoren ist und auf eine kovalente Bindung des Inhibitoren an das Protein hindeutet. Für atrop-Abyssomicin (**2**) wurde ein $K_{\text{i}}^{\text{app}}$ von etwa 390 µM und ein k_{inact} in der Größenordnung von 0.8 min⁻¹ ermittelt. Weitere Inhibitionsexperimente mit Abyssomicin C (**1**) belegen, dass **1** im Vergleich zu atrop-Abyssomicin (**2**) PabB in signifikant geringerem Ausmaß inhibiert (Hintergrundinformationen).

Um die Bindestelle von atrop-Abyssomicin C im Protein zu lokalisieren, wurde PabB mit **2** inkubiert. Durch Verdau von PabB mit Endoproteinase GluC wurde mit HPLC-ESI-Massen-

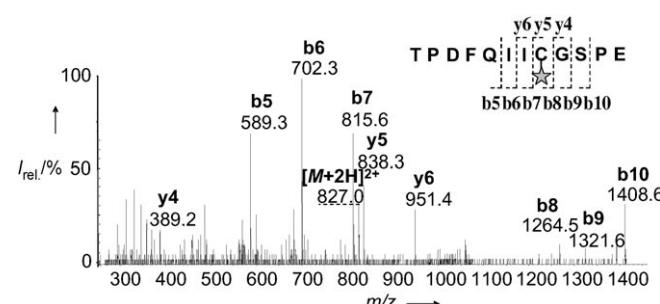
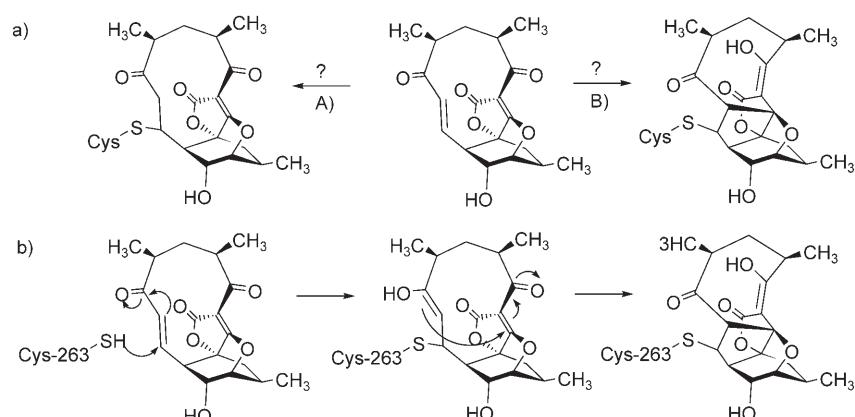


Abbildung 2. MS/MS-Sequenzierung des Abyssomicin-gebundenen Zielpeptids aus PabB (m/z 827.0) nach GluC-Verdau. Cys 263 wurde kovalent durch atrop-Abyssomicin C modifiziert.

spektrometrie ein Peptid bei m/z 827.0 [$M = 1651.7$] beobachtet, das im Kontrollverdau ohne Inhibitor nicht detektiert wurde (Abbildung 1). Durch massenspektrometrische Fragmentierung (ESI-MS/MS) konnte gezeigt werden, dass atrop-Abyssomicin C kovalent an die Sulfhydrylseitenkette von Cys 263 im Peptid TPDFQIICGSPE gebunden hatte (Abbildung 2).



Schema 2. Funktion von atrop-Abyssomicin C als Michael-Akzeptor. a) Einfache Michael-Addition (Weg A) und Michael-Addition mit anschließender Umlagerung in ein zu Abyssomicin D analogen Derivat (Weg B). b) Vorgeschlagener Mechanismus der Reaktion von atrop-Abyssomicin C mit Cys 263 auf der Grundlage der Ergebnisse der Reaktionen mit den S-Nucleophilen 2-Sulfanylethanol und N-Acetylcystein.

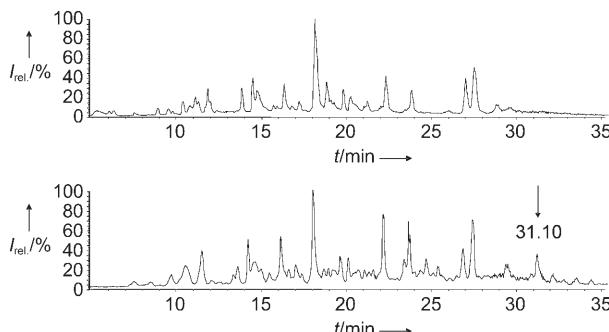


Abbildung 1. HPLC-ESI-MS-Chromatogramm der Peptide aus dem GluC-Verdau von unbehandeltem PabB und PabB nach Inkubation mit atrop-Abyssomicin C. Letzteres weist einen zusätzlichen Peak bei $R_t = 31.1$ min auf.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass atrop-Abyssomicin (**2**) an die Seitenkette von Cys 263 bindet, stellt sich die Frage, ob eine einfache Michael-Addition stattfindet, oder ob analog der Hydridaddition an **2**^[8,9] eine Umlagerung zu einer Struktur ähnlich der von Abyssomicin D folgt (Schema 2). Um diese Hypothese zu validieren, untersuchten wir Reaktionen von **2** mit S-Nucleophilen. Hierzu wurde **2** mit 2-Sulfanylethanol oder mit *N*-Acetylcystein in Tetrahydrofuran inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch präparative HPLC aufgereinigt und mit 2D-NMR-Spektroskopie analysiert. Sowohl der nucleophile Angriff der Sulfhydrylgruppe von 2-Sulfanylethanol als auch von *N*-Acetylcystein führte zur Umwandlung von **2** in ein zum Abyssomicin D analogen Derivat (Hintergrundinformationen).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir nachweisen, dass PabB der ADC-Synthase von *B. subtilis* ein molekulares Target von atrop-Abyssomicin C (**2**) ist. Letzteres bindet kovalent an die Seitenkette von Cys263, das in der Nähe des aktiven Zentrums von PabB lokalisiert ist.^[13] Eine kovalente Bindung an andere potenziell nucleophile Seitenketten von PabB wie Ser, Thr und Lys wurde unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen nicht beobachtet. Der mikromolare Bereich der Inhibitionskonstante K_I^{app} (390 μM) ist für irreversible Inhibitoren nicht ungewöhnlich. Aspirin, das zweifelsohne ein wirksames Medikament ist, weist einen K_I^{app} von 14 mM auf.^[14] Auch der bislang wirksamste bekannte Inhibitor der ADC-Synthase aus *E. coli*, das von Abell und Mitarbeitern beschriebene 2-Fluorchorismat, zeigt einen K_I von 130 μM und einen k_i von 1.0 min^{-1} ^[15] und liegt damit in derselben Größenordnung wie atrop-Abyssomicin C. Im Vergleich zu atrop-Abyssomicin C hat Abyssomicin C eine deutlich geringere Fähigkeit, die ADC-Biosynthese in vitro zu hemmen. Dieser Befund geht einher mit dem stärkeren antibakteriellen Effekt von **2** verglichen mit **1** in MIC-Tests (minimum inhibitory concentration).^[6,9] Eine Erklärung hierfür ist, dass **2** ein stärkerer Michael-Akzeptor ist als **1**, wie bereits von Harrison und Nicolaou diskutiert wurde.^[6] Unterschiede in der Konformation von **1** und **2**, die deren Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms verändern, könnten ebenfalls eine Rolle spielen. Die In-vitro-Reaktion von **2** mit S-Nucleophilen zu einer Struktur ähnlich der von Abyssomicin D lässt den Schluss zu, dass die Reaktion von **2** mit PabB analog verläuft (Schema 2). Möglicherweise induziert die Verzerrung der Abyssomicinstruktur eine konformativ Änderung des Zielproteins. Derzeitige Experimente unserer Arbeitsgruppe sind auf die Untersuchung anderer ADC-Synthasen sowie auf die Kristallstrukturanalyse von ADC-Synthase im Komplex mit atrop-Abyssomicin C gerichtet.

Experimentelles

Die NMR-Spektren wurden auf einem DRX500-NMR-Spektrometer (Bruker) mit einem inversen Breitbandprobenkopf (5 mm) mit z -Gradienten gemessen. Die Spektren wurden in $[\text{D}_4]\text{Methanol}$ aufgenommen und referenziert ($\delta = 3.30$; $\delta = 49.0 \text{ ppm}$). Die 2D-COSY-, NOESY-, HMQC- und HMBC-Experimente wurden mit Bruker-Standardparametern (XWinNMR 3.2) gemessen. Die LC-MS-Spektren wurden auf einem 2000Q-Trap-Massenspektrometer (Applied

Biosystems/MDS Sciex), das an ein Agilent-1100-HPLC-System (Agilent) gekoppelt war, gemessen.

Eingegangen am 25. April 2007,
veränderte Fassung am 4. Juli 2007
Online veröffentlicht am 20. September 2007

Stichwörter: Aminobenzoësäure · Antibiotika · Enzyminhibitoren · Michael-Addition · Naturstoffe

- [1] C. T. Walsh, J. Liu, F. Rusnak, M. Sakaitani, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1105–1129.
- [2] U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum, Heidelberg, **1992**, Kap. 5.
- [3] B. Bister, D. Bischoff, M. Ströbele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A. T. Bull, H. Zähner, H.-P. Fiedler, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2628–2630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2574–2576.
- [4] J. Riedlinger, A. Reicke, H. Zähner, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R. D. Süßmuth, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 271–279.
- [5] C. W. Zapf, B. A. Harrison, C. Drahla, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6691–6695; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6533–6537.
- [6] K. C. Nicolaou, S. T. Harrison, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3334–3338; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3256–3260.
- [7] a) J.-P. Rath, S. Kinast, M. E. Maier, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3089–3092; b) A. L. Zografas, A. Yiotakis, D. Georgiadis, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4515–4518; c) B. B. Snider, Y. Zou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4939–4941; d) E. A. Couladouros, E. A. Bouzas, A. D. Magos, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5272–5279.
- [8] K. C. Nicolaou, S. T. Harrison, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 429–440.
- [9] S. Keller, G. Nicholson, C. Drahla, E. J. Sorensen, H.-P. Fiedler, R. D. Süßmuth, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 391–394.
- [10] S. D. Copley, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5008–5013.
- [11] a) P. A. Bartlett, Y. Nakagawa, C. R. Johnson, S. H. Reich, A. J. Luis, *Org. Chem.* **1988**, *53*, 3195–3210; b) M. C. Kozlowski, N. J. Tom, C. T. Seto, A. M. Seifler, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2128–2140.
- [12] a) V. K. Viswanathan, J. M. Green, B. P. Nichols, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5918–5923; b) B. P. Nichols, A. M. Seibold, S. Z. Doktor, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8597–8601; c) Q. Z. Ye, J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9391–9395.
- [13] J. F. Parsons, P. Y. Jensen, A. S. Pachikara, A. J. Howard, E. Eisenstein, J. E. Ladner, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2198–2208.
- [14] L. H. Rome, W. E. M. Lands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4863–4865.
- [15] E. M. Bulloch, M. A. Jones, E. J. Parker, A. P. Osborne, E. Stephens, G. M. Davies, J. R. Coggins, C. Abell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9912–9913.