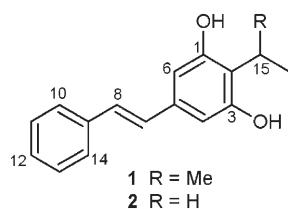


Biosynthese eines multipotenten bakteriellen Stilbens**

Susan A. Joyce, Alexander O. Brachmann, Itamar Glazer, Lea Lango, Gertrud Schwär, David J. Clarke* und Helge B. Bode*

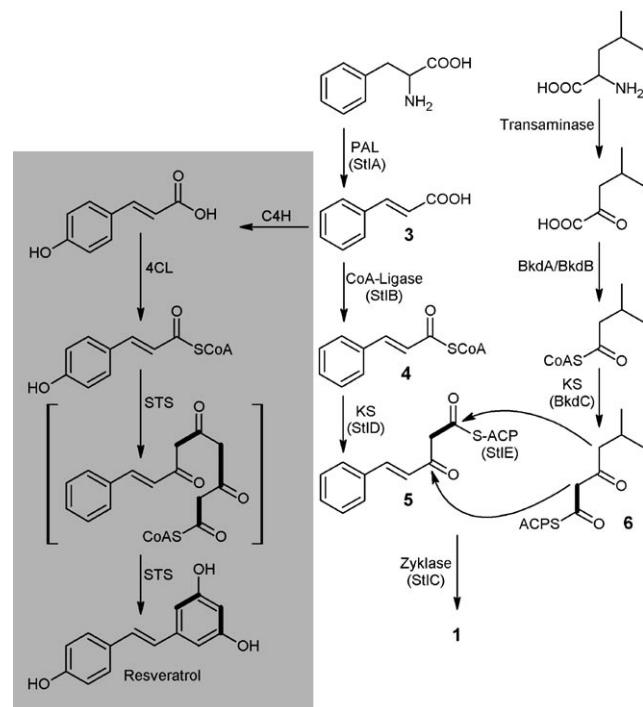
Die Biosynthese von Stilbenen ist in Pflanzen weitverbreitet. Außerhalb des Pflanzenreichs ist der einzige bekannte Produzent dieser Substanzklasse das Gram-negative Bakterium *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae).^[1] *Photorhabdus* ist insektenpathogen und produziert während der post-exponentiellen Wachstumsphase in Komplexmedium und in Insektenlarven Isopropyl-5-[*(E*)-2-phenylvinyl]benzol-1,3-diol (**1**) und kleine Mengen von 2-Ethyl-5-[*(E*)-2-phenylvinyl]benzol-1,3-diol (**2**).^[2,3]



Photorhabdus kommt nicht freilebend vor, sondern lebt immer in Symbiose mit Nematoden der Gattung *Heterorhabditis*. Die Bakterien besiedeln dabei den Darm der Nematoden im Dauerlarven-Stadium. Dauerlarven leben frei im Boden und suchen nach Insektenlarven. Nachdem sie in diese eingedrungen sind, wandern die Dauerlarven in die Hämolymphe (das kombinierte Blut-Lymphsystem der Insekten) und setzen die *Photorhabdus*-Bakterien frei. Die Bakterien

beginnen exponentiell zu wachsen und töten die Insektenlarve schließlich analog einer Sepsis innerhalb von drei Tagen. Die Nematoden ernähren sich von den wachsenden Bakterien und bilden nach mehreren Generationen schließlich neue Dauerlarven, die wiederum *Photorhabdus* im Darm tragen und den Insektenkadaver verlassen.^[4] Stilben **1** hat antibiotische Aktivität, und es wurde vermutet, dass es den Insektenkadaver vor Fraßfeinden (vor allem im Boden lebenden Bakterien und Pilzen) schützt.^[1,5-7] Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass **1** auch ein Virulenzfaktor ist, der die Phenoloxidase der Insekten hemmt. Diese wiederum ist eine Hauptkomponente des Immunsystems der Insekten.^[8]

In Pflanzen entstehen Stilbene durch schrittweise Verlängerung von Zimtsäure-CoA-Thioester (**4**) oder Cumarsäure-CoA-Thioester mit drei Malonyl-CoA-Verlängerungseinheiten. Diese Reaktion wird durch Stilben-Synthasen (STS) katalysiert, die zu den Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ III gehören (Schema 1). Aus dem so gebildeten Tetrake-



Schema 1. Stilben-Biosynthese in Pflanzen (grau unterlegt) und in *P. luminescens*. Intakte Acetateinheiten sind fett gezeichnet. PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase; StlA), CoA-Ligase (StlB), KS (Cinnamoyl-CoA-kondensierende Ketosynthase [StlD]) und Isovaleryl-CoA-kondensierende Ketosynthase [BkdC]), ACP (StlE und FS-ACP), Zyklase (StlC), Bkd (verzweigtkettige Ketosäure-Dehydrogenase; BkdA, BkdB), C4H (Zimtsäure-4-Hydroxylase), 4CL (4-Cumaroyl-CoA-Ligase).

[*] Dipl.-Biol. A. O. Brachmann,^[1] G. Schwär, Dr. H. B. Bode
Institut für Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes, 66123 Saarbrücken (Deutschland)

Fax: (+49) 681-302-5494

E-Mail: h.bode@mx.uni-saarland.de

Dr. S. A. Joyce,^[3] L. Lango,^[3] D. J. Clarke^[5]

Department of Biology and Biochemistry
University of Bath, Bath BA2 7AY (Großbritannien)
E-Mail: david.clarke@ucc.ie

Prof. I. Glazer

Department of Nematology, Nematology Division, ARO
The Volcani Center, Bet Dagan, 50250 (Israel)

[§] Aktuelle Adresse: Department of Microbiology
University College Cork, Cork (Irland)

[+] A.O.B. und S.A.J. haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] A.O.B., G.S. und H.B.B. danken Rolf Müller für die Unterstützung sowie der Universität des Saarlandes für finanzielle Unterstützung in der Anfangsphase dieses Projekts. S.A.J. und D.J.C. danken dem BBSRC (EGA16183) für finanzielle Unterstützung.

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

tid entsteht dann durch Cyclisierung und Decarboxylierung das fertige Stilben.^[9] Wie wird nun **1** in *Photorhabdus* hergestellt? Wie in Pflanzen ist auch hier der erste Schritt die Produktion von Zimtsäure (**3**) durch StlA (Schema 1).^[10] Für die folgenden Biosyntheseschritte muss **3** durch eine Coenzym-A-Ligase zum entsprechenden Thioester **4** aktiviert werden. Das entsprechende Gen konnte relativ einfach identifiziert werden, da nur zwei CoA-Ligasen im Genom von *Photorhabdus*^[11] vorkommen (*plu2134* und *plu0760*), die nicht mit der Fettsäure- oder Siderophor-Biosynthese assoziiert sind. Nach Plasmidinsertion in beide Gene zeigte nur die *plu2134*-Mutante (umbenannt in *stlB*) den Verlust der Produktion von **1** und die erwartete Akkumulation von **3** im Medium (Abbildung 1b). Die Struktur von **1** ist ungewöhnlich, da sie eine Isopropylgruppe an der 2-Position trägt. Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Verbindungen^[12] (oder ¹²C-markierten in einem ¹³C-Hintergrund^[13]) bestätigen, dass zwei Acetateinheiten (vermutlich als Malonyl-CoA) in **1** eingebaut werden, von denen eine decarboxyliert wird, um den zweiten aromatischen Ring zu bilden (siehe Tabellen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Die Isopropylgruppe stammt aus Isovaleryl-CoA (IV-CoA), das durch Leucin-Abbau entstanden ist, da sowohl Leucin als auch Isovalerat eingebaut werden (siehe Tabelle S2). Ausgehend von einer hypothetischen Biosynthese wie in Pflanzen könnte **1** durch STS-katalysierte schrittweise Verlängerung von **4** mit Malonyl-CoA, Isopropylmalonyl-CoA (entstanden aus IV-CoA) und schließlich Malonyl-CoA entstehen. STS akzeptieren jedoch in der Regel nur Malonyl-CoA als Verlängerungseinheiten,^[9] und die Verwendung von zwei unterschiedlichen Verlängerungseinheiten ist sehr ungewöhnlich. Dementsprechend konnte auch kein Gen im Genom von Stamm TT01 identifiziert werden, das für eine STS codiert. STS (und alle Typ-III-PKS) verwenden freie CoA-Thioester als Starter- und Verlängerungseinheit, während sowohl Typ-I- als auch Typ-II-PKS an Acylcarrierprotein (ACP) gebundene Vorstufen und Intermediate verwenden. Die inaktive Apoform des ACP wird durch Phosphopantetheinyltransferasen (PPT) in die aktive Cofaktor-tragende Holoform überführt. In *Photorhabdus* konnte bereits gezeigt werden, dass eine PPT (codiert durch *ngrA*) für die Biosynthese von **1** notwendig ist, was auf eine Beteiligung einer Typ-I- oder Typ-II-PKS-Aktivität hindeutet.^[14] Ein Biosynthese-Gencluster, der an der Biosynthese von **1** beteiligt sein könnte, wurde jedoch nicht im Genom von Stamm TT01 gefunden.

Stattdessen wurde nach ACP-codierenden Genen gesucht, die nicht benachbart oder Teile von Genen sind, die für nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) oder NRPS/PKS-Hybride codieren. So konnten drei ACPs identifiziert werden: *plu2834* als Teil der normalen Fettsäure(FS)-Biosynthese, *plu0765* als Teil eines ungewöhnlichen Biosynthese-Genclusters und *plu2165* als Teil eines Drei-Gen-Operons, *plu2163–plu2165* (umbenannt in *stlC*, *stlD* und *stlE*). Die anderen Gene dieses Operons codieren für eine Ketsynthase (codiert durch *plu2164* (*stlD*)) und ein Protein (codiert durch *plu2163* (*stlC*)) mit Homologie zu einer postulierten Zykklase aus *Pseudomonas aurantiaca* (Abbildung 2).^[15] Diese Zykklase ist an der Biosynthese von 2,5-Dialkylresorcinolen beteiligt, die große Ähnlichkeit zum phenolischen Ring von **1** aufwei-

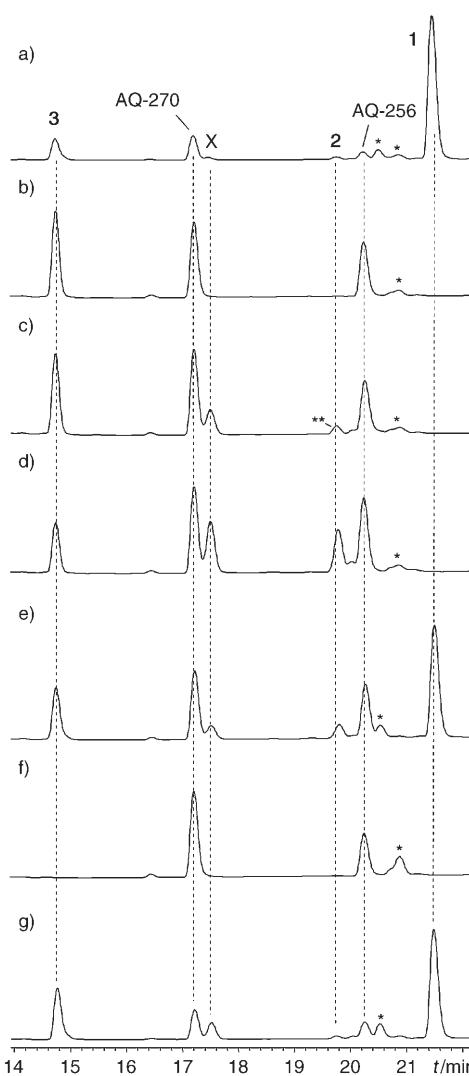


Abbildung 1. HPLC-UV-Chromatogramme ausgewählter *P. luminescens*-Stämme. Detektionswellenlänge 200–350 nm. a) TT01 (Wildtyp), b) *stlB::Cat*, c) *stlC::Cat*, d) *ΔbkdA*, e) *ΔbkdA + iso15:0*, f) *stlA::Kn*, g) *stlA::Kn + 3*. Signale von **1**, **2** und **3** sind bezeichnet. AQ-270 und AQ-256 sind die Haupt-Anthachinone aus Stamm TT01.^[12] X ist ein bisher unbekanntes Derivat von **3**; weitere unbekannte Verbindungen sind durch ein Sternchen (*) markiert. Zwei Sternchen (**) markieren in (c) eine unbekannte Substanz, die die gleiche Retentionszeit wie **2** (siehe (d) und (e)) aufweist, sich aber sowohl im UV-Spektrum als auch in den MS-Daten unterscheidet. Alle Chromatogramme sind im selben Maßstab gezeigt.

sen. Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass strukturell verwandte Dihydrocumarene mithilfe einer gentechnisch veränderten iterativen Typ-I-PKS aus einem Pilz erzeugt werden können.^[16] Die Beteiligung von *stlCDE* an der Biosynthese von **1** konnte durch Plasmidinsertion in *stlC* bzw. *stlD* bestätigt werden, da dabei nur Stilben-negative Mutanten erhalten wurden, die große Mengen an **3** akkumulieren (siehe Abbildung 1c).

Mithilfe einer Tn5-Transposonmutagenese konnte eine weitere Mutante identifiziert werden, die **1** auch nach Zugabe von **3** nicht bilden kann. Das betroffene Gen *plu1884* ist Teil des Drei-Gen-Operons *plu1883–1885* (umbenannt in *bkdA*,

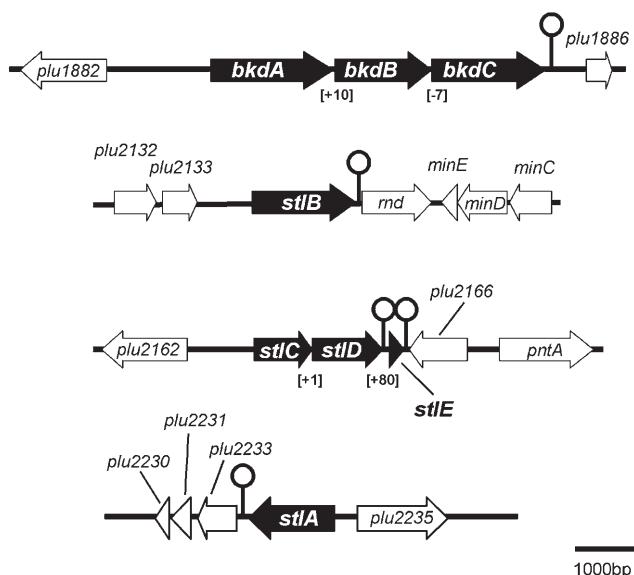


Abbildung 2. Organisation der an der Stilben-Biosynthese beteiligten Gene in *Photorhabdus*. Direkt beteiligte Gene sind schwarz, die übrigen Gene weiß dargestellt. In Klammern stehen die Abstände zwischen den einzelnen Gene (in bp). Mögliche Terminatoren sind ebenfalls gezeigt. Für eine detailliertere Beschreibung siehe die Hintergrundinformationen.

bkdB und *bkdC*) (Abbildung 2). Markerlose Deletionen der einzelnen Gene führte in allen drei Fällen zu Mutanten, die **1** nicht mehr produzierten (Abbildung 1d und unveröffentlichte Ergebnisse). Stattdessen akkumulierte in allen Mutanten Stilben **2**, das im Unterschied zu **1** eine Ethyl- statt einer Isopropylgruppe aufweist.

Die Gene *bkdA* und *bkdB* codieren für die E1- und E2-Untereinheiten des verzweigtkettenigen Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexes (branched-chain ketoacid dehydrogenase; Bkd), während *bkdC* für eine ungewöhnliche Ketosynthase (KS) codiert. Der Bkd-Komplex ist am Abbau der verzweigtkettenigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin zu Isovaleryl(IV)-, 2-Methylbutyryl- und Isobutyryl-CoA zuständig, und wir konnten durch Fütterungsexperimente nachweisen, dass Leucin und Isovalerat an der Biosynthese von **1** beteiligt sind (siehe Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). IV-CoA ist die Startereinheit für die Biosynthese von ungeradzahligen iso-FS, die die dominierenden FS in *Photorhabdus* sind. Eine Analyse der FS-Profiles der $\Delta bkdA$ -, $\Delta bkdB$ - und $\Delta bkdC$ -Mutanten belegt, dass diese Mutanten auch nicht mehr in der Lage sind, iso-FS zu produzieren (siehe Tabelle S3). Die Produktion von **1** bis zur Menge des Wildtyps konnte in diesen drei Mutanten durch Zugabe von Isovalerat (das auch teilweise das FS-Profil wieder herstellt (Tabelle S3)) oder iso15:0, der Haupt-FS in *Photorhabdus* (siehe Abbildung 1e), komplementiert werden. Insbesondere die Komplementation durch iso15:0 deutet darauf hin, dass auch die β -Oxidation Bausteine für die Biosynthese von **1** bereitstellen kann.

Ausgehend von diesen Daten postulieren wir, dass der Schlüsselschritt in der Biosynthese von **1** in *P. luminescens* die StlC-katalysierte Kondensation von (4E)-3-Oxo-5-phenyl-

pent-4-enoyl(3OPPE)-Thioester (**5**) mit 5-Methyl-3-oxohexanoyl(5MOH)-Thioester (**6**) ist. Demnach ist der größte Unterschied zu den bereits erwähnten Biosynthesen von Di-alkylresorcin^[15] und Dihydrocumarin,^[16] dass **5** anstatt eines aliphatischen Thioesters verwendet wird, was schließlich zu einer neuartigen Stilben-Biosynthese führt. Zurzeit ist nicht klar, ob **5** und **6** ACP-gebunden oder als freie CoA-Ester verwendet werden (siehe Schema 1). Thioester **5** stammt letztendlich aus Phenylalanin, das mithilfe von StlA und StlB zu **3** bzw. **4** umgesetzt wird. Das ACP StlE wird mithilfe einer Acyltransferase mit Malonyl-CoA beladen und durch StlD mit **4** verknüpft. Analog entsteht **6** durch die BkdC-katalysierte Kondensation von IV-CoA (aus dem Abbau von Leucin durch BkdA und BkdB) mit Malonyl-ACP. Kann **6** nicht gebildet werden (z.B. in einer *bkdA*-, *bkdB*- oder *bkdC*-Mutante), entsteht **2** anstatt **1** – vermutlich durch die Kondensation von **5** mit 3-Oxohexanoyl(3-OH)-Thioester. 5MOH-ACP/CoA ist ein Intermediat der iso-FS-Biosynthese/Abbau während 3-OH-ACP/CoA ein Zwischenprodukt der Biosynthese unverzweigter FS ist. Dies zeigt die Wechselwirkung zwischen der Produktion von **1** und dem FS-Stoffwechsel. Wir vermuten deshalb, dass das ACP der normalen FS-Biosynthese auch an der Biosynthese von **6** und damit auch **1** beteiligt ist. Zudem konnte kein anderes entsprechendes Gen im Genom von TT01 identifiziert werden. Analog vermuten wir, dass die fehlende Acyltransferase für die Biosynthese von **5** und **6** auch das entsprechende FabD-Protein aus dem FS-Stoffwechsel ist, die ACP und StlE mit Malonyl-CoA belädt.

Da **1** einer der dominierenden Sekundärstoffe in allen *Photorhabdus*-Stämmen ist, die bisher analysiert wurden (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen), wollten wir herausfinden, ob **1** auch eine Rolle bei der Interaktion zwischen Nematode und Bakterium spielt. Der erste Schritt im Lebenszyklus der Nematoden nach der Infektion ist die Entwicklung zu Hermaphroditen ausgehend vom Dauerlarven-Stadium. Für diesen Schritt sind entweder Signale aus der Hämolymph der Insekten oder alternativ aus dem Bakterium selbst notwendig.^[17] Die Entwicklung von Dauerlarven zu Hermaphroditen auf BMM901-Zellen (Stilben-negativ; *stlA::Kn*) entspricht nur 5–15 % der entsprechenden Entwicklung auf TT01(Wildtyp)-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass **1** zumindest ein Teil des bisher unbekannten bakteriellen Signals darstellt (Abbildung 3). Dementsprechend konnte dieser Entwicklungsdefekt auch durch Zugabe von **3** oder **1** oder einer intakten Kopie von *stlA* (auf pBMM901) komplementiert werden. Die Nematoden entwickeln sich jedoch nicht, wenn entweder **1** oder die Bakterien selbst fehlen (unveröffentlichte Ergebnisse). Dies verdeutlicht, dass neben dem Vorhandensein von **1** noch andere Bedingungen für eine erfolgreiche Nematoden-Entwicklung erfüllt sein müssen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Stilbene in *Photorhabdus* auf einem neuen Biosyntheseweg synthetisiert werden, der sich vermutlich unabhängig von der bekannten pflanzlichen Biosynthese entwickelt hat. Darüber hinaus wurde **1** als multipotentes Molekül identifiziert, das nicht nur antibiotisch und als Inhibitor des Immunsystems in Insekten wirkt, sondern auch als Signal zwischen verschiedenen Organismenreichen fungiert und für die normale Entwicklung

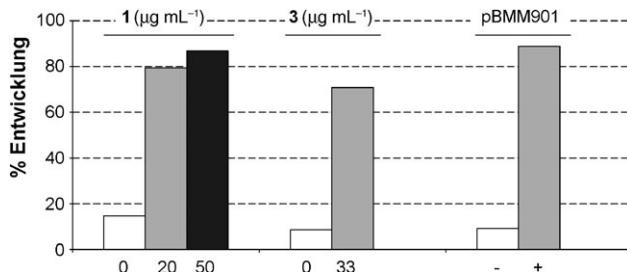


Abbildung 3. Entwicklung der Nematoden (in %) mit und ohne Stilben. 40 Dauerlarven von *H. bacteriophora* wurden mehrfach (n) auf Lipid-Agarplatten inkubiert, die mit Stamm BMM901 (*stlA::Km*) bewachsen waren. Die Zahl der zu Hermaphroditen entwickelten Dauerlarven wurde nach vier Tagen bestimmt und mit der Entwicklung auf Wildtyp-Zellen (100%) verglichen. Der Lipid-Agar wurde mit den gezeigten Konzentrationen an **1** ($n=12$) oder **3** ($n=7$) versetzt. Alternativ wurden die Dauerlarven auf BMM901 kultiviert, der entweder mit pBMM901 (*stlA⁺*, +) oder einem Kontrollplasmid (-) transformiert war ($n=6$).^[18]

von *Heterorhabdus*-Nematoden notwendig ist. Aus diesem Grund ist **1** sowohl an der Pathogenese als auch an der Symbiose beteiligt und ist damit ein zentraler Baustein im Wechselspiel zwischen Bakterium, Nematode und Insektenlarve. Eine solche Rolle erklärt auch das Auftreten von **1** in allen bisher untersuchten *Photobacteroides*-Stämmen.

Eingegangen am 7. November 2007,
veränderte Fassung am 6. Dezember 2007
Online veröffentlicht am 31. Januar 2008

Stichwörter: Biosynthese · Nematoden · *Photobacteroides* · Stilben · Symbiose

- [1] W. H. Richardson, T. M. Schmidt, K. H. Nealson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1602–1605.
- [2] K. J. Hu, J. X. Li, W. J. Wang, H. M. Wu, H. Lin, J. M. Webster, *Can. J. Microbiol.* **1998**, *44*, 1072–1077.
- [3] K. Hu, J. M. Webster, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *189*, 219–223.

- [4] H. Goodrich-Blair, D. J. Clarke, *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*, 260–268.
- [5] J. Li, G. Chen, H. Wu, J. M. Webster, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 4329–4333.
- [6] R. J. Watson, S. A. Joyce, G. V. Spencer, D. J. Clarke, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 763–773.
- [7] K. Hu, J. Li, J. M. Webster, *J. Chromatogr. B* **1997**, *703*, 177–183.
- [8] I. Eleftherianos, S. Boundy, S. A. Joyce, S. Aslam, J. W. Marshall, R. J. Cox, T. J. Simpson, D. J. Clarke, R. H. ffrench-Constant, S. E. Reynolds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2419–2424.
- [9] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79–110.
- [10] J. S. Williams, M. Thomas, D. J. Clarke, *Microbiology* **2005**, *151*, 2543–2550.
- [11] E. Duchaud, C. Rusniok, L. Frangeul, C. Buchrieser, A. Giavudan, S. Taourit, S. Bocs, C. Boursaux-Eude, M. Chandler, J. F. Charles, E. Dassa, R. Derose, S. Derzelle, G. Freyssinet, S. Gaudriault, C. Medigue, A. Lanois, K. Powell, P. Siguier, R. Vincent, V. Wingate, M. Zouine, P. Glaser, N. Boemare, A. Danchin, F. Kunst, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1307–1313.
- [12] A. O. Brachmann, S. A. Joyce, H. Jenke-Kodama, G. Schwär, D. J. Clarke, H. B. Bode, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1721–1728.
- [13] A. O. Brachmann, S. Forst, G. M. Furgani, A. Fodor, H. B. Bode, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1830–1832.
- [14] T. A. Ciche, S. B. Bintrim, A. R. Horswill, J. C. Ensign, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 3117–3126.
- [15] B. Nowak-Thompson, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. Stafford, N. Torkewitz, T. D. Gaffney, S. T. Lam, I. Molnar, J. M. Ligon, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 860–869.
- [16] X. Zhu, F. Yu, X. C. Li, L. Du, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 36–37.
- [17] O. Strauch, R. U. Ehlers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 369–374.
- [18] Die Daten sind nichtparametrisch. Um sie dennoch graphisch darzustellen, wurde die Entwicklung zu Hermaphroditen aus Dauerlarven auf Wildtypzellen als 100% gesetzt und mit der auf den entsprechenden Mutanten verglichen. So wurden z.B. für die Bestimmung des Einflusses von **1** insgesamt 480 Dauerlarven (12 Platten mit jeweils 40 Dauerlarven) untersucht. Die nichtparametrische statistische Analyse (Mann-Whitney) dieser Daten zeigt, dass sich die Zahl der sich entwickelnden Dauerlarven signifikant unterscheidet. Wurde der Agar für BMM901 mit **1** oder **3** versetzt, so wurde ein Resultat analog zum Wachstum auf dem Wildstamm erreicht ($P \leq 0.01$). Analog glich das Wachstum auf BMM901/pBMM901 auch eher dem auf Wildtypzellen ($P \leq 0.01$).