

Absolute Konfiguration von Rhizopodin und Inhibierung der Aktin-polymerisation durch Dimerisierung**

Gregor Hagelueken, Simone C. Albrecht, Heinrich Steinmetz, Rolf Jansen, Dirk W. Heinz, Markus Kalesse und Wolf-Dieter Schubert*

Im Jahr 1993 wurde das Polyketid Rhizopodin (Abbildung 1) aus dem Myxobakterium *Myxococcus stipitatus* isoliert.^[1] Studien mit der gereinigten Substanz ergaben, dass Rhi-

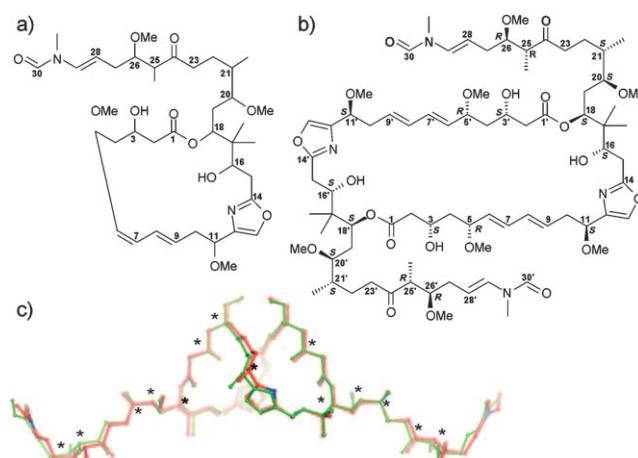


Abbildung 1. Struktur von Rhizopodin. a) Die ursprünglich vorgeschlagene Monolactonstruktur. b) Überarbeitete, C_2 -symmetrische Dilactonstruktur inklusive der Stereochemie. c) Kugel-Stab-Modell der biologisch aktiven Konformation des Rhizopodins. Die Überlagerung des Rhizopodins (grün) mit einer um 180° gedrehten Kopie (rot) belegt die C_2 -Symmetrie des Moleküls. Die Konfigurationszuordnung der stereogenen Zentren (Sternchen) ist konsistent.

zopodin bereits bei nanomolaren Konzentrationen einen drastischen Effekt auf das Zytoskelett eukaryotischer Zellen ausübt.^[2] Es wurde vermutet, dass diese Eigenschaft auf der Fähigkeit des Naturstoffs beruht, das eukaryotische Protein Aktin zu binden und dessen Polymerisation zu stören. Als Struktur für das Rhizopodin wurde ein Makrolidring bestehend aus 19 Atomen, einem disubstituierten Oxazolring sowie einem konjugierten Diensystem mit insgesamt neun stereogenen Zentren vorgeschlagen (Abbildung 1a).

Um den Bindungsmodus des Rhizopodins an G-Aktin und die absolute Konfiguration des Naturstoffs zu ermitteln, haben wir den Komplex aus Rhizopodin und Kaninchennuskelaktin kristallisiert und seine Kristallstruktur bei 2.4 \AA Auflösung untersucht. Überraschend zeigt die Kristallstruktur, dass Rhizopodin ein C_2 -symmetrisches Dilacton ist. Dementsprechend besteht Rhizopodin aus einem Makrolidring mit 38 Atomen, zwei disubstituierten Oxazolringen und zwei konjugierten Diensystemen mit insgesamt 18 stereogenen Zentren. Basierend auf der Kristallstruktur beschreiben wir hier die biologisch aktive Konformation dieses Rhizopodin-Dilactons sowie die absolute Konfiguration der 18 stereogenen Zentren.

Die Interaktion zwischen Rhizopodin und G-Aktin wurde *in vitro* anhand von Polymerisationsexperimenten mit Pyren-modifiziertem G-Aktin untersucht. Es zeigt sich, dass eine steigende Rhizopodin-Konzentration die Aktinpolymerisation zunehmend inhibiert, wobei die Polymerisation ab einem stöchiometrischen Verhältnis von 0.5 Rhizopodin-Dilacton pro G-Aktin vollständig unterbunden ist. Rhizopodin führt zudem in Gelpermeationsexperimenten zu einer Verringerung des Elutionsvolumens von G-Aktin. Diese Beobachtungen lassen auf eine durch Rhizopodin induzierte Dimerisierung des Aktins schließen. *In vivo* würde vermutlich ein deutlich geringerer stöchiometrischer Anteil an Rhizopodin die Dynamik des Zytoskeletts empfindlich stören, da der Einbau eines einzigen Aktin-Rhizopodin-Dimers in ein Aktinfilament dessen Wachstum unterbinden würde.

Orthorombische Kristalle des gereinigten Aktin-Rhizopodin-Komplexes beugen Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 2.4 \AA . Die Struktur des Komplexes wurde mittels molekularen Ersatzes gelöst, wobei als Suchmodell die Struktur des Tetramethylrhodamin(TMR)-gebundenen Aktins aus Kaninchennuskulatur (PDB: 1J6Z)^[3,4] eingesetzt wurde. Die asymmetrische Einheit des Aktin-Rhizopodin-Komplexkristalls umfasst zwei Aktinmonomere (A und B), die über eine senkrecht zur kristallographischen c -Achse liegende, nicht-kristallographische zweizählige Drehachse ineinander überführt werden. Die kristallographischen Daten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

* G. Hagelueken, S. C. Albrecht, Dr. W.-D. Schubert
Arbeitsgruppe Molekulare Wirt-Pathogen-Interaktionen
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-6181-7099
E-Mail: wolf-dieter.schubert@helmholtz-hzi.de

Prof. D. W. Heinz
Bereich Strukturbioologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig (Deutschland)
Dipl.-Chem. H. Steinmetz, Dr. R. Jansen, Prof. M. Kalesse
Bereiche Mikrobielle Wirkstoffe und Medizinische Chemie
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Braunschweig (Deutschland)

** Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft als Teil des Prioritätsprogramms 1150 (SCHU 1560/1-1 bis 1-3) gefördert. Wir danken den Mitarbeitern der Messstation X12 (EMBL Hamburg Outstation, DESY) für die zugeteilte Messzeit sowie für technische Unterstützung. Die Koordinaten und Strukturfaktoren des Aktin-Rhizopodin-Komplexes wurden in der Proteindatenbank (PDB) unter der Zugangsnummer 2VYP hinterlegt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802915> zu finden.

Tabelle 1: Kristallographische Daten des Aktin-Rhizopodin-Komplexes.

Beugungsdaten

Raumgruppe	$P_{2,1,2}$
Zellabmessungen [Å]	77.7 (<i>a</i>), 194.9 (<i>b</i>), 53.0 (<i>c</i>)
Auflösung [Å]	97.6–2.3 (2.5–2.3) ^[a]
$I/\sigma(I)$	28.4 (3.5) ^[a]
Vollständigkeit [%]	99.8 (99.5) ^[a]
Redundanz	8.0 (7.4) ^[a]
R_{merge} [%]	4.7 (55.0) ^[a]
Wilson B [Å ²]	45.0
Verfeinerung	
Auflösung [Å]	97.6–2.35 (2.41–2.35) ^[a]
R_{work} [%]	19.0
R_{free} [%]	24.4
Atome (Protein/Ligand/Wasser)	5483/104/212
Temperaturfaktoren (Å ² ; Protein/Ligand/Wasser)	42/30/41
Rmsd der Bindungen [Å]/Winkel [°]	0.017/1.7
Ramachandran bevorzugt/verboten [%]	97.2/0.3

[a] Einträge in Klammern stehen für die Schale der höchsten Auflösung.

Die Konformationen der Aktinmonomere A und B sind weitgehend äquivalent (mittlere quadratische Abweichung 0.5 Å, Abbildung 2a) und anderen bekannten Strukturen des G-Aktins sehr ähnlich. Zwischen den Domänen 2 und 4 bindet jedes Monomer ein Molekül ATP.^[5,6] Bis auf die DNase-Bindungsschlaufe der Domäne 2 (Reste 40–53) ist

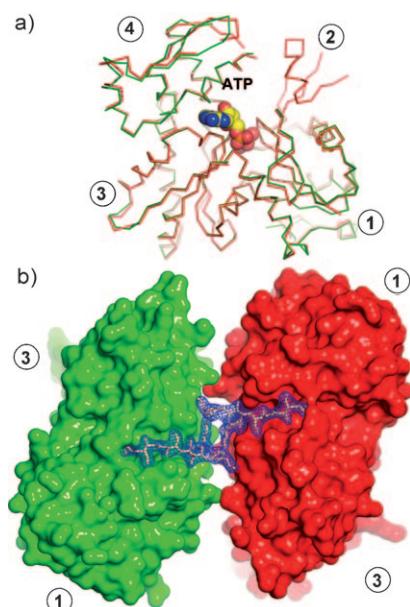


Abbildung 2. Struktur der Aktinmonomere A (rot) und B (grün).

a) Überlagerung der kristallographisch unabhängigen Monomere. Die vier Domänen des G-Aktins sind durch Nummern gekennzeichnet. Das zwischen Domänen 2 und 4 gebundene ATP ist als Kalottenmodell dargestellt (N blau, C gelb, O rot, P orange). b) Die asymmetrische Einheit des Aktin-Rhizopodin-Kristalls enthält die Monomere A (rot) und B (grün), die hier in Oberflächendarstellung gezeigt sind. Die Differenzelektronendichte ($F_0 - F_c$, 2σ , blau) wurde nach Perturbierung und erneuter Verfeinerung des Modells ohne Berücksichtigung des zwischen den Domänen 1 und 3 gebundenen Rhizopodins berechnet („omit-map“).

die Elektronendichte für Monomer A gut definiert. Im Monomer B ist hingegen die gesamte Domäne 2 (32–70) wie auch eine Schlaufe der Domäne 4 (199–204) fehlgeordnet und folglich in der Elektronendichte nicht zu erkennen.

Bereits nach wenigen Strukturverfeinerungsrunden^[7] war deutliche positive Differenzelektronendichte in der Furche zwischen den Domänen 1 und 3 der beiden Aktinmonomere zu erkennen (Abbildung 2b). An diese Stelle binden auch andere die Aktinpolymerisation inhibierende Proteine oder Substanzen wie Gelsolin.^[8] TMR^[3] sowie verschiedene Makrolide.^[5,6,9] Die Differenzelektronendichte wurde zunächst durch zwei Rhizopodin-Monolactone modelliert, deren Diengruppen sich aufgrund der relativen Orientierung der G-Aktinmonomere A und B direkt gegenüberliegen (Abbildung 3a). Während die Enamidseitenkette und die benach-

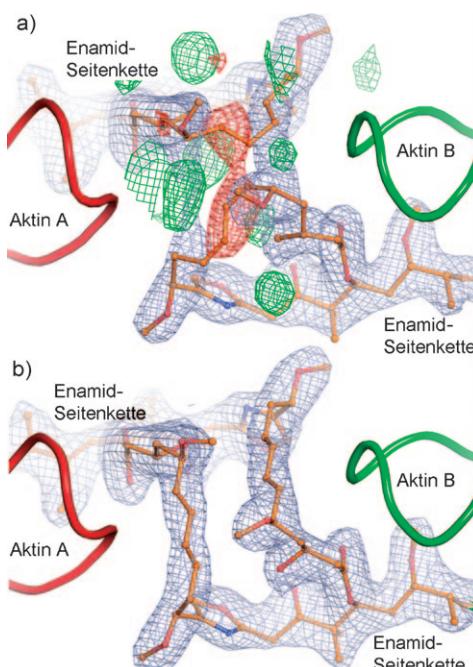


Abbildung 3. Raumstruktur von Rhizopodin. a) Das vermutete Rhizopodin-Monolacton (Kugel-Stab-Modell; N blau, C orange, O rot) liefert keine optimale Erklärung für die Elektronendichte (blaues Gitter, $2F_o - F_c$, 1σ) und führt bei der Verfeinerung zu signifikanter Differenzdichte ($F_o - F_c$, grün, 3σ ; rot, -3σ). Teile der Aktinmonomere sind als Schlaufenmodell gezeigt und wie in Abbildung 2 eingefärbt. b) Als korrigiertes, C_2 -symmetrisches Dilacton erklärt Rhizopodin die beobachtete Elektronendichte optimal.

barten Bereiche des Makrolidrings die Elektronendichte der jeweiligen Furche optimal erklären, war eine Anpassung der Diene nicht möglich (Abbildung 3a). Stattdessen ließ sich die Elektronendichte als homodimeres Rhizopodin-Dilacton erklären, dessen Struktur sich problemlos verfeinern ließ (Abbildung 3b). Diese Beobachtung ist zudem in Einklang mit der beschriebenen Dimerisierung des Aktins durch Rhizopodin, da ein C_2 -symmetrisches Rhizopodin-Dilacton zwei Enamidseitenketten trägt, die je ein G-Aktinmolekül binden können, was folglich zu einem ternären Rhizopodin-(G-Aktin)-Komplex führt. Tatsächlich ergab eine massenspektrometrische Analyse des zur Kristallisation eingesetzten

Rhizopodins eine Masse von 1470 Da. Die massenspektrometrischen Daten lieferten weder einen Hinweis auf ein Rhizopodin-Monolacton noch auf höhere Oligomere (siehe Hintergrundinformationen). Die hier vorgestellte Überarbeitung der Rhizopodinstruktur erinnert an den Fall des Antibiotikums Vermiculin, dessen C_2 -symmetrische Struktur zunächst ebenfalls als kleineres Monomer beschrieben worden war.^[10]

Aus der Differenzelektronendichte des Rhizopodins kann die Konfiguration aller 18 stereogenen Zentren eindeutig abgeleitet werden. Bei der Verfeinerung wurden keine Zwangsbedingungen für die Konfiguration angewendet, sodass die nicht-kristallographische C_2 -Symmetrie des Rhizopodin-Dilactons als interne Kontrolle für die Konformationsbestimmung genutzt werden konnte (Abbildung 1c).

Die Enamidseitenkette des Rhizopodins zeigt eine hohe Passgenauigkeit bezüglich der Moleküloberfläche des Aktins (Abbildung 4), wobei die Erkennung überwiegend durch

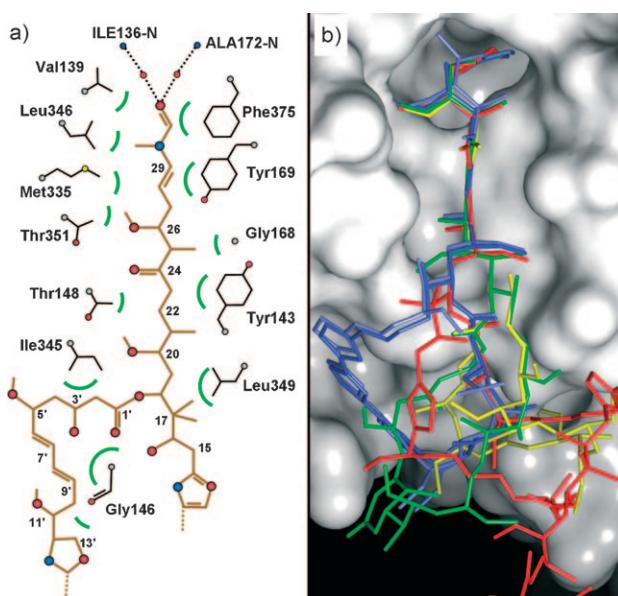


Abbildung 4. Bindung von Rhizopodin an G-Aktin. a) Schematische Darstellung der Rhizopodinerkennung (C orange, N blau, O rot) durch hydrophobe Reste des G-Aktins (schwarz). Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind als grüne Bögen, Wassermoleküle als rote Kugeln und Wasserstoffbrücken als gepunktete Linien dargestellt. b) Überlagerung strukturell verwandter Inhibitoren in Aktin-gebundener Form. Aktin: weiße Oberfläche, rot: Rhizopodin, grün: Sphinxolid B, gelb: Reidispongiolid A, violett: Kabiramid C, blau: Jaspisamid A.

Van-der-Waals-Kontakte zwischen Enamidseitenkette und der Bindungsfurche des Aktins vermittelt wird. Lediglich zwei Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücken zwischen dem terminalen Carbonylsauerstoff des Rhizopodins und den Stickstoffatomen der Hauptkette von Ile136 und Ala172 sind zu erkennen. Die Konformation der Enamidseitenkette von Rhizopodin ähnelt der anderer Makrolide wie Kabiramid, Reidisphingolid^[2,6] und Sphinxolid.^[5] Die Struktur des Komplexes aus G-Aktin und Bistramid A, einem strukturell nicht-verwandten Polymerisationsinhibitor, zeigt darüber hinaus, dass allein die Blockierung der Bindungsfurche die Polyme-

risation von Aktin verhindert.^[11] Diese Interpretation wird durch die strukturelle Divergenz der Makrolidringe von Rhizopodin und ähnlichen Inhibitoren gestützt (Abbildung 4b).

Die Kristallstruktur des funktionellen Komplexes aus G-Aktin und Rhizopodin zeigt, dass Rhizopodin in einer unerwarteten C_2 -symmetrische Dilactonstruktur vorliegt. Die gut definierte Elektronendichte ermöglicht die Zuordnung der absoluten Konfiguration aller 18 stereogenen Zentren, wobei die C_2 -Symmetrie des Moleküls eine interne Kontrolle liefert (Abbildung 1c). Die symmetrische Struktur des Rhizopodins verdeutlicht, wie ein kleines Molekül einen sperrigen Rhizopodin-Aktin-Komplex (Abbildung 2b) erzeugen kann, der die Aktinpolymerisation effizient unterbindet und damit den drastischen Effekt von Rhizopodin *in vivo* erklärt.^[2]

Experimentelles

Aktin wurde aus Kaninchenmuskel-Acetonpulver isoliert^[11] und in G-Puffer aufbewahrt (2 mM Hepes pH 7.5, 0.2 mM ATP, 1 mM β -Mercaptoethanol, 0.2 mM CaCl₂). Das Protein wurde durch Hydroxylapatit-Chromatographie (BIO-RAD) gereinigt, wobei G-Puffer ohne ATP als Laufmittel verwendet wurde (Puffer A). Kationische Verunreinigungen wurden durch einen linearen Gradienten von Puffer A zu Puffer B (Puffer A + 500 mM KCl) eluiert, und Aktin wurde durch einem zweiten Gradienten von Puffer A zu Puffer C (Puffer A + 500 mM KH₂PO₄/K₃PO₄) eluiert.

Mit *N*-(1-Pyren)-iodacetamid markiertes Aktin (Pyren-Aktin) wurde für die Polymerisationsversuche verwendet.^[13] Ein typisches Experiment (1 mL) enthielt 11 μ M G-Aktin und 1 μ M Pyren-Aktin in G-Puffer. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 100 μ L einer Lösung aus 20 mM Hepes pH 7.5, 500 mM KCl und 10 mM MgCl₂ gestartet. Die Rhizopodinkonzentration lag zwischen 2.2 und 22 μ M. Die Pyrenfluoreszenz wurde bei 365 nm angeregt und bei 385 nm mit einem Perkin-Elmer LS50B gemessen.

Der Aktin-Rhizopodin-Komplex (Verhältnis 1:2) wurde durch Gelfiltration (Säule Superdex 200 10/30, GE-Healthcare) gereinigt. G-Puffer mit 25 mM KCl wurde als Laufmittel verwendet. Nach der Elution wurde der gereinigte Komplex sofort gegen frischen G-Puffer dialysiert.

Kristalle des gereinigten Aktin-Rhizopodin-Komplexes wurden durch Dampfdiffusion mit der Methode des hängenden Tropfens bei 20°C gezüchtet. 3 μ L des Aktin-Rhizopodin-Komplexes wurden mit 3 μ L einer Reservoirlösung bestehend aus 100 mM MES-Puffer pH 6.6, 14% (w/v) PEG1500, 12% (w/v) 1,6-Hexandiol, 100 mM CaCl₂, 1 mM DTT (Dithiothreitol), 10 mM Betain-Hydrochlorid vermischt. Die Größe der Kristalle wurde durch Animpfen des Kristallisationsstropfens mit Kristallkeimen optimiert. Um Eiskristallbildung beim Tiefkühlen der Kristalle in flüssigem Stickstoff zu verhindern, wurden die Kristalle zuvor in eine mit 15% PEG400 versetzte Reservoirlösung überführt.

Beugungsdaten wurden bei einer Wellenlänge von 1.07 Å auf einem 225-mm-Marmosaic-CCD-Detektor gesammelt (Messstation X12, EMBL, DESY, Hamburg). Die Datenverarbeitung erfolgte mit HKL2000,^[14] die Strukturlösung (molekularer Ersatz) mit Phaser,^[4] die Strukturverfeinerung mit Refmac^[7] und die manuelle Optimierung mit Coot.^[15] Das Rhizopodinsmodell wurde mit Monomer Library Sketcher erstellt,^[16] die Abbildungen mit Pymol (<http://pymol.org>).

Eingegangen am 18. Juni 2008,
veränderte Fassung am 3. Oktober 2008
Online veröffentlicht am 26. November 2008

Stichwörter: Aktin · Inhibitoren · Makrolide · Myxobakterien · Rhizopodin

-
- [1] F. Sasse, H. Steinmetz, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 741–748.
 - [2] T. M. Gronewold, F. Sasse, H. Lünsdorf, H. Reichenbach, *Cell Tissue Res.* **1999**, *295*, 121–129.
 - [3] L. R. Otterbein, P. Graceffa, R. Dominguez, *Science* **2001**, *293*, 708–711.
 - [4] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2005**, *61*, 458–464.
 - [5] J. S. Allingham, A. Zampella, M. V. D'Auria, I. Rayment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 14527–14532.
 - [6] V. A. Klenchin, J. S. Allingham, R. King, J. Tanaka, G. Marriott, I. Rayment, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 1058–1063.
 - [7] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1997**, *53*, 240–255.
 - [8] P. J. McLaughlin, J. T. Gooch, H. G. Mannherz, A. G. Weeds, *Nature* **1993**, *364*, 685–692.
 - [9] V. A. Klenchin, R. King, J. Tanaka, G. Marriott, I. Rayment, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 287–291.
 - [10] E. J. Corey, K. C. Nicolaou, T. Toru, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2287–2288.
 - [11] S. A. Rizvi, V. Tereshko, A. A. Kossiakoff, S. A. Kozmin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3882–3883.
 - [12] J. D. Pardee, J. A. Spudich, *Methods Cell Biol.* **1982**, *24*, 271–289.
 - [13] T. Kouyama, K. Mihashi, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *114*, 33–38.
 - [14] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
 - [15] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 2126–2132.
 - [16] CCP4, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 760–763.
-