

Zur Biosynthese von Thiopeptidantibiotika**

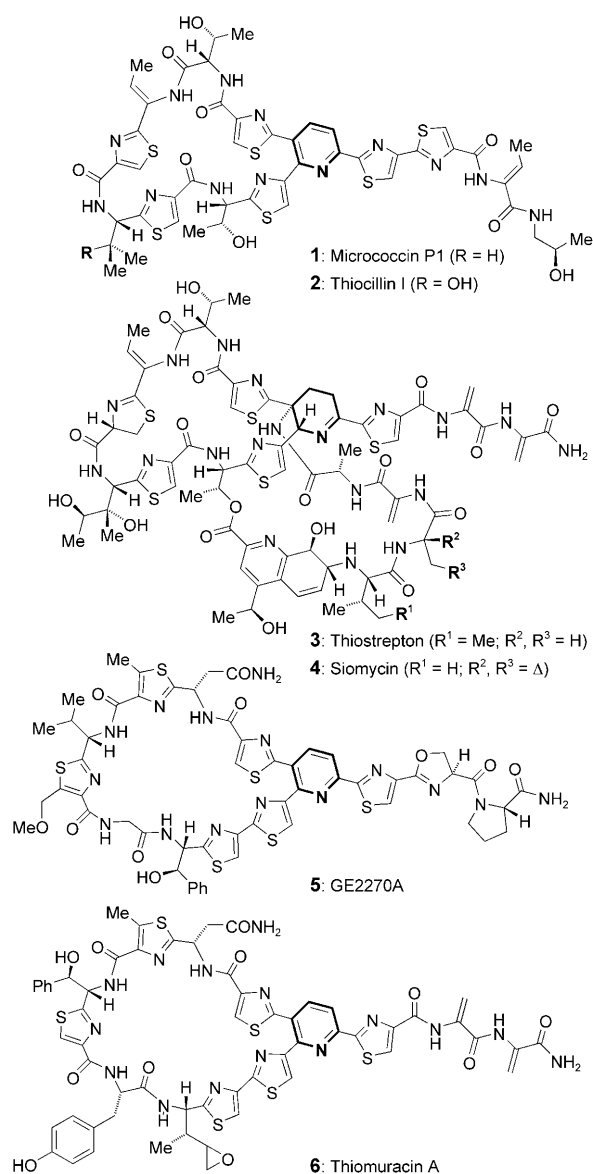
Hans-Dieter Arndt,* Sebastian Schoof und Jin-Yong Lu

Antibiotika · Biosynthese · Naturstoffe ·
Ribosomale Peptide · Thiopeptide

Professor Heinz G. Floss gewidmet

Die Familie der Thiopeptidantibiotika ist eine große Gruppe hoch modifizierter makrocyclischer Peptide mit mehr als 80 Mitgliedern.^[1] Das erste (im Jahr 1948) isolierte Thiopeptid war Micrococcin (**1**), und das prototypische und leicht herstellbare Thiostrepton (**3**) wurde bald die am meisten studierte Verbindung dieser Gruppe.^[1,2] Die Strukturen aller Thiopeptide bauen auf einem zentralen, von Pyridin abgeleiteten Heterocyclus auf. Dieser Kern bildet mit mehreren Thiazol- und Oxazolringen ein polymakrocyclisches Gerüst, das darüber hinaus weitere Reste wie Dehydroaminosäuren trägt. Viele Thiopeptide zeigen eine herausragende Bioaktivität,^[1] vor allen eine sehr hohe Wirksamkeit gegen Gram-positive Bakterien, unter anderem gegen multiresistente *Staphylococcus-aureus*(MRSA)-Stämme. Ihr Wirkprinzip beruht auf der Unterdrückung der bakteriellen Proteintranslation, indem sie das ribosomale GTPase-assoziierte Zentrum blockieren^[1,3] oder den Translationsfaktor EF-Tu inhibieren.^[4] Keine dieser beiden Zielstrukturen hat bisher für die Humantherapie geeignete Wirkstoffe ergeben, was das Interesse an Thiopeptiden in der Entwicklung antibakterieller Anwendungen^[5] neu belebt.

Die komplexe Struktur der Thiopeptide lieferte vielfältige Anregungen für die chemische Synthese,^[1,6] die Biosynthese dieser faszinierenden Verbindungsklasse blieb jedoch bislang ungeklärt. Kürzlich wurden nahezu parallel vier Studien veröffentlicht,^[7–10] die die Aufstellung einer einheitlichen Theorie zur Biosynthese ermöglichen: Die Komplexität der Thiopeptidstrukturen resultiert anscheinend aus ungeahnten posttranslationalen Modifizierungen von genetisch codierten und ribosomal übersetzten Peptiden! Diese bemerkenswerten Entdeckungen verändern unsere Vorstellungen von Biosyntheseprozessen und werden es möglich machen, die Bio-



[*] Dr. H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu
Fakultät Chemie, Technische Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
und
Abteilung Chemische Biologie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2498
E-Mail: hans-dieter.arndt@mpi-dortmund.mpg.de

[**] Unsere Arbeiten wurden von der DFG (Emmy Noether-Nachwuchsgruppe an H.-D. A.) und dem FCI gefördert. S.S. und J.-Y.L. sind Mitglieder der IMPRS-CB. Wir danken Prof. Rolf Müller (Universität Saarbrücken) und Dr. Mark Brönstrup (Sanofi-Aventis, Frankfurt a. M.) für Diskussionen.

synthesemaschinerie hinter dieser wichtigen Klasse von Peptidnaturstoffen zu entschlüsseln und zu nutzen.

Für die Biosynthese von Peptidnaturstoffen kennt man zwei Hauptwege:^[11] Ein Vorstufenpeptid kann von Ribosomen synthetisiert werden, indem eine genetisch codierte mRNA abgelesen wird, woraufhin posttranslationale Modifizierungen der linearen Kette folgen.^[11a] Alternativ erfolgt in

einem Enzymkomplex (NRPS: nichtribosomale Peptidsynthetase) eine nichtribosomale Peptidsynthese, die Aminosäurevorstufen fließbandartig verbindet.^[11b] Typische Produkte solcher Enzymkomplexe sind stark modifizierte Moleküle mit einem hohen Gehalt an nichtproteinogenen Aminosäuren, während ribosomal synthetisierte Peptide häufig mit einem sehr viel geringeren Modifizierungsgrad auftreten. Durch die neuen Befunde bei den Thiopeptiden müssen diese scheinbar allgemeingültigen Regeln nun endgültig revidiert werden.

Eine visionäre Hypothese zur Schlüsseltransformation der Thiopeptidbiosynthese wurde 1978 von Bycroft und Gowland formuliert, die vorschlugen, dass der zentrale Pyridinring „aus der Wechselwirkung zweier Dehydroalanineinheiten in einer einzelnen Peptidkette abgeleitet werden könnte“. ^[12] Diese postulierte Transformation blieb lange Zeit theoretisch und hätte entweder auf einen ribosomalen oder auf einen nichtribosomalen Aufbau folgen können. Detaillierte Untersuchungen zur Biosynthese von Thiopeptiden wurden anschließend von Floss und Mitarbeitern vorgenommen, die den Ursprung aller Strukturelemente von Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid mit Isotopenmarkierungsexperimenten auf Standardamino­säuren zurückführen konnten. ^[13] Die für den Aufbau verantwortliche Enzymmaschinerie blieb allerdings schwer fassbar, und das Auffinden typischer NRPS-Gencluster erwies sich als schwierig. ^[13e, 14]

Wichtige Hinweise, dass komplexe heterocyclische Peptide ribosomal synthetisiert werden können, leiteten sich aus dem Biosyntheseweg der Patellamide und Cyanobactine ab. ^[15] Zweifellos erleichterten Fortschritte in der Sequenzierung ganzer Genome und die wachsende Zahl an bioinformatischen Daten die Identifizierung der entscheidenden Vorstufenpeptide und ihrer Prozessierungsfaktoren. Diese Prozessierungsfaktoren zeigten nachweislich eine Homologie zu Enzymen, die an die Heterocyclisierung von Ser/Thr/Cys-Resten zu Oxazolen und Thiazolen ^[16a] beteiligt sind, sowie zu Macrolactam bildenden Enzymen, ^[16b] die zuvor schon bei anderen Naturstoffen identifiziert worden waren.

Auf Grundlage dieser Kenntnisse gelang es vier Gruppen mithilfe aktueller Sequenzierungstechniken nahezu gleichzeitig, die Biosyntheseenzyme für die Thiocilline (z.B. **2**), ^[7] Thiostrepton und Siomycin (**3/4**; Δ = Doppelbindung), ^[8, 9] GE2270A (**5**) ^[10] sowie für das neu identifizierte Thiomuracin (**6**) ^[10] zu lokalisieren. Einen direkten Einstieg bot das vollständig sequenzierte Genom von *Bacillus cereus*. ^[7, 8] Im Falle der Produzenten *Streptomyces lividans* ^[8, 9] und *Nonomurea* sp. ^[10] fanden Genombibliotheken zusammen mit partieller Sequenzierung Verwendung. In allen Fällen wurden analoge Clusterarchitekturen gefunden (Schema 1 A), die über Speziesgrenzen erhalten zu bleiben scheinen. Sequenzhomologien zeigten die Struktur­gene, die für lineare Vorstufenpeptide codieren und von Modifizierungsgenen umgeben sind. Vier von diesen Genen codierte mutmaßliche Enzyme wurden übereinstimmend als entscheidend für das charakteristische Thiopeptidgerüst identifiziert: eine zu PatD der Patellamidbiosynthese homologe Cyclodehydratase sowie eine Dehydrogenase, die an das Microcin-B17-Biosyntheseenzym MbcC erinnert; darüber hinaus scheinen zwei Enzyme mit Homologie zur Lantibiotika-Dehydratase LanB für die Bil-

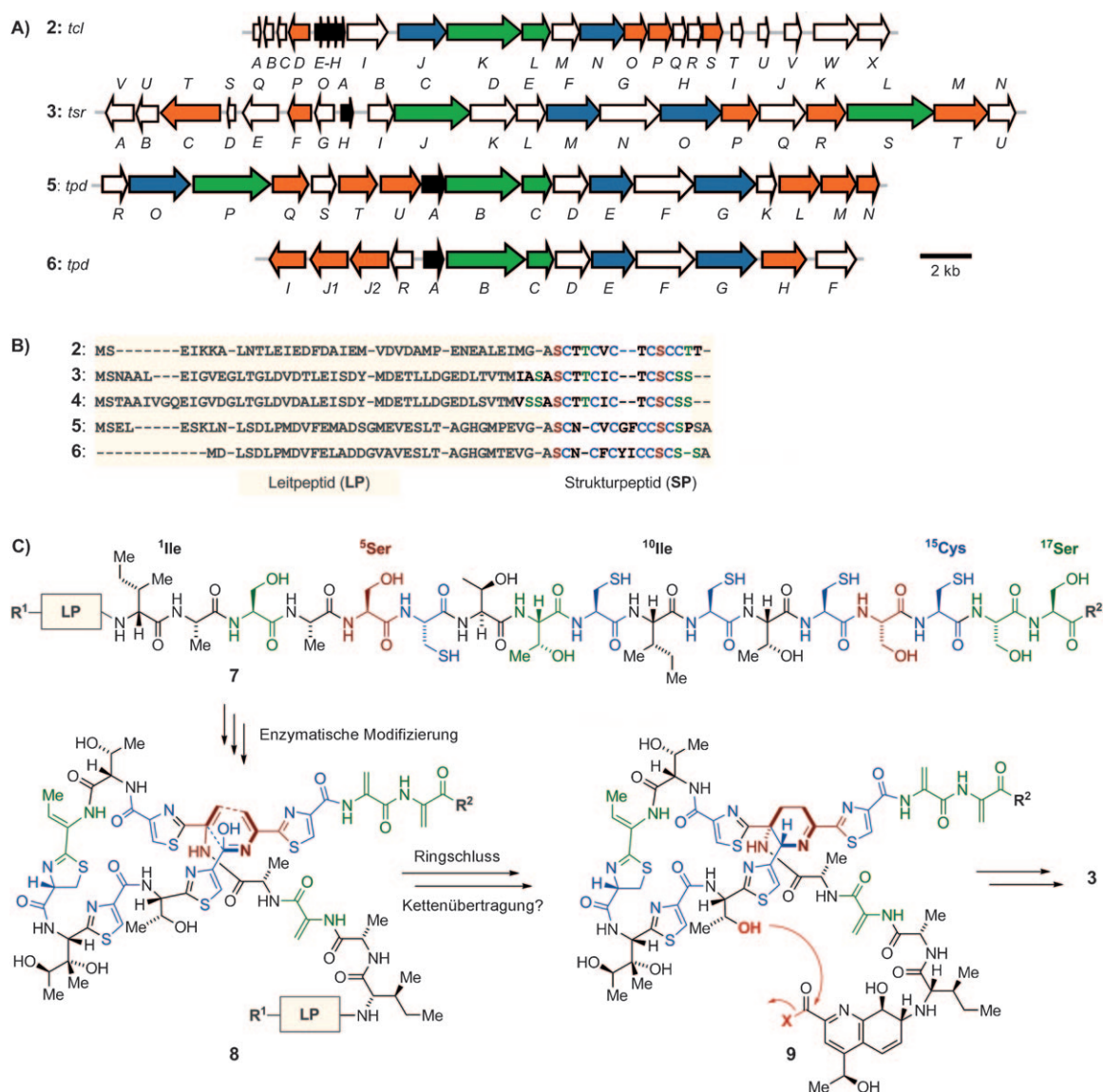
dung der Dehydroalanine und -butyrine verantwortlich zu sein.

Alle Vorstufen enthalten die komplette Peptidsequenz des Produkts und ein N-terminales Leitpeptid (LP), das wahrscheinlich die weiteren Umwandlungen lenkt, bevor das Endprodukt oder ein weit fortgeschrittenes Zwischenprodukt freigesetzt wird. ^[17] Diese Struktur­gene sind einander sehr ähnlich (Schema 1 B), wobei die hochkonservierte Ser/Cys-Platzierung und der feste Abstand der beiden Ser-Schlüsselreste besonders auffallen. Die Zahl der im Endprodukt eingebauten Aminosäuren schwankt, allerdings nimmt man an, dass bei Thiopeptiden mit Pyridinkern (z.B. **1**, **2**, **5**, **6**) alle Aminosäuren N-terminal zum ersten Pyridin bildenden Ser-Rest bei der Aromatisierung des Kerns durch Eliminierung verloren gehen.

Die für Thiostrepton zu erwartende Biosynthese beruht auf der ribosomalen Synthese der Peptidvorstufe **7**, für die das Strukturgen *tsrA/tsrH* codiert (Schema 1 C). Alle Ser/Thr-Reste des Peptids **7** scheinen zu Dehydroalaninen oder -butyrinen dehydratisiert zu werden. Ebenso werden alle Cys-Reste durch Cyclodehydratisierung in Thiazoline umgewandelt und anschließend weitgehend zu Thiazolen oxidiert (\rightarrow **8**). Der zentrale sechsgliedrige Heterocyclus wird möglicherweise durch eine intramolekulare Reaktion zwischen zwei Dehydroalaninen und einer angrenzenden Carboxygruppe gebildet (\rightarrow **9**). Diese formale Hetero-Diels-Alder-Cycloaddition könnte durch die enzymatische Aktivierung einer rückgefalteten Peptidkette vermittelt werden und mag entweder konzertiert verlaufen oder auch eine asynchrone Folge schrittweiser 1,2/1,4-Additionen sein. ^[9] In jedem Fall bestätigen diese Befunde vollständig die Hypothese von Bycroft und Gowland zur Biosynthese der Thiopeptide. ^[12]

Auch die chemische Synthese legte den Schluss nahe, dass eine solche Transformation möglich ist (Schema 2). Nicolaou et al. berichteten von der Bildung des *endo*-Dehydropiperidins **13** aus **12** durch die Dimerisierung des 2-Azadiens **11**, das in situ aus **10** freigesetzt wurde. ^[18] Diese Methode wurde für die Totalsynthesen von Thiostrepton (**3**) ^[19] und GE2270A (**5**) eingesetzt. ^[20] Moody et al. verwirklichteten eine Hetero-Diels-Alder-Reaktion des Thiopeptiddienophils **14** mit dem 2-Azadien **15**, um so das Pyridin **16** in einem Schritt zu erhalten, was dem erwarteten biologischen Prozess nahe kommen mag. ^[21] Ob die mutmaßlichen Biosyntheseenzyme tatsächlich eine ähnliche Umwandlung zweier sich kreuzender Peptidstränge bewirken, muss noch weiter geklärt werden.

Außer diesen gerüstbildenden Enzymen wurden noch verschiedene weitere Modifizierungs- und Dekorationsenzyme gefunden, z.B. SAM-abhängige Methyltransferasen (TclO: Thiocillin) oder P450-Monooxygenasen (TpdJ: Thiomuracin). Eine Zuordnung der Enzyme, die für die Bildung des zentralen Sechsrings verantwortlich sind, bedarf allerdings noch weiterer Forschungsarbeiten. Auch weitere Punkte, wie etwa der Einbau des zweiten Makrocyclus in Thiostrepton, bleiben noch zu klären (Schema 1 C). Offensichtlich ist die Vorstufenamino­säure Trp des Chinaldinsäurebausteins nicht gencodiert, was zeigt, dass das Zwischenprodukt der ribosomalen Peptidbiosynthese bei den bicyclischen Thiopeptiden Thiostrepton/Siomycin sowie Nosiheptid/Nocathiacin ^[1, 22] noch durch weitere Manipulationen kom-

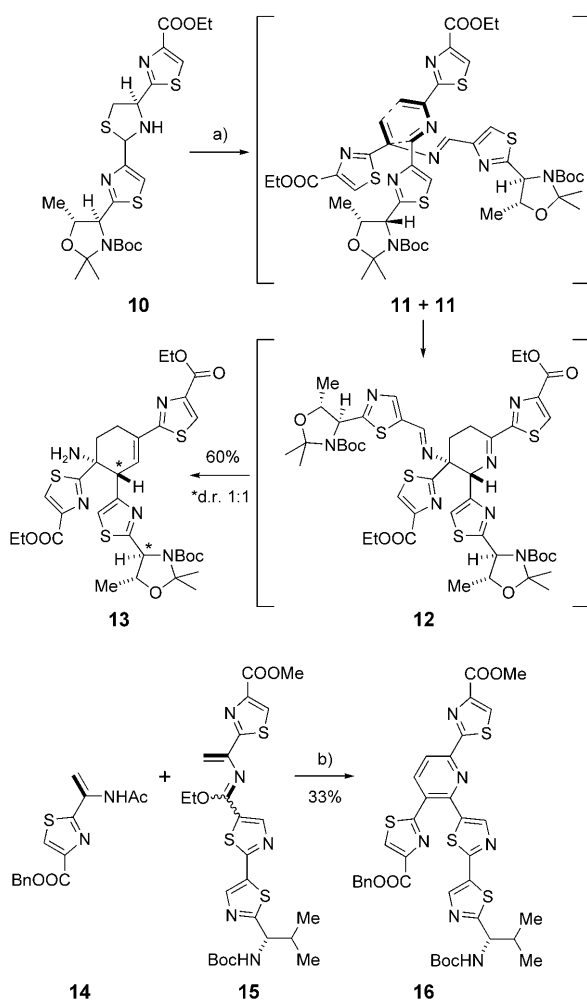


Schema 1. A) Architekturen der Thiopeptid-Biosynthese-Gencluster von 2,^[7] 3,^[8,9] 5^[10] und 6.^[10] Man beachte die divergierende Nummerierung und die leicht unterschiedlichen Zuordnungsvorschläge für die identischen *tsr*-Gene durch Liu et al. (unten)^[8] und Kelly et al. (oben).^[9] Schwarz: Strukturgenen; grün: Dehydratase; blau: Cyclodehydratase oder Dehydrogenase; orange: Modifizierungsenzym (Monooxygenase, Methyltransferase, Protease, Desaminase, Amidotransferase); farblos: weiteres/unbekanntes offenes Leseraster; *tcl* = Thioicillin-Gene, *tsr* = Thioistrepton-Gene, *tpd* = Thiopeptid-Gene; Balken: 2 kb. B) Ausschnittsweiser Vergleich der Thiopeptid-Strukturgen-Sequenzen (ClustalW 2.0) von 2–6. Leitpeptide sind in Grau hervorgehoben, Strukturpeptide farbcodiert (siehe C). C) Postulierte Reifung des Strukturpeptids von Thioistrepton (vereinfacht); grün: Dehydratase-vermittelte Bildung von Dehydroalanin/-butyrin; blau: durch Cyclodehydratase eingeleitete Heterocyclisierung; schwarz: strukturell unmodifizierte/peripher dekorierte Reste; rot: an der Bildung des Stickstoffheterocyclus beteiligte Dehydroamino-säuren. R¹ = flankierende Sequenz; R² = OH; X = Abgangsgruppe, möglicherweise CoA oder Adenylat.

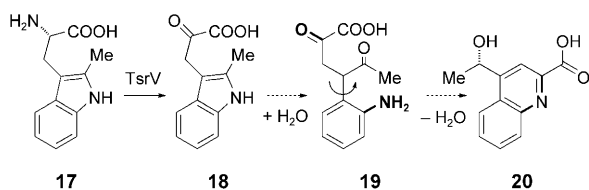
plettiert werden muss. Es gibt einige Hinweise, dass der Einbau des einzigartigen Chinaldinsäure-Bausteins in Thioistrepton (**3**) über Coenzym-A-vermittelte Aktivierung^[8] oder NRPS-artige Adenylierungsdomänen^[9,13e] stattfindet (→**9**). Schließlich lieferte die Klonierung und Überexpression des *tsrV*-Gens durch Kelly et al. ein Protein, das 2-Methyltryptophan (**17**) in die α -Ketosäure **18** umwandelt (Schema 3),^[9] was auf seine Beteiligung an der Bildung von Chinaldinsäure **20** über das angenommene Diketon **19** schließen lässt.^[13d]

Die Entdeckung und Analyse der Thiopeptid-Biosynthese-Gencluster erweitert das Spektrum bekannter posttrans-

lationaler Modifikationen von ribosomalen Peptiden deutlich. Zudem wurden viele Thiopeptide beschrieben, die noch weitere Modifikationen tragen, z.B. Oxidationen von Alkylseitenketten (Berninamycin, Thioistrepton), O/S-Alkylierungen, oxidative transannulare Verbrückung (Nocathiacin)^[22] und Glycosidierungen (Nocathiacin, Philipimycin).^[23] Genomweite Sequenzanalysen zeigen, dass viele weitere Biosynthese-Gencluster von Thiopeptid-artigen Metaboliten gefunden werden können.^[7,8,10] Somit scheinen noch weitere Thiopeptide auf ihre Entdeckung zu warten.



Scheme 2. Ausgewählte biomimetische Synthesen stickstoffheterocyclischer Kerne der Thiopeptide; a) Ag_2CO_3 , Pyridin, DBU, BnNH_2 , $-12 \rightarrow 25^\circ\text{C}$; b) Toluol, Mikrowellenstrahlung, 120°C , 12 h. DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, Bn = Benzyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.



Scheme 3. Beteiligung von TsrV an der Biosynthese von **20** aus Trp.

Verschiedene Schritte der Thiopeptidbiosynthese sowie die Abfolge der Modifizierungsreaktionen müssen sicher noch genauer aufgeklärt werden, aber die Entdeckung,^[7–10] dass solch komplexe Molekülstrukturen aus ribosomalen Peptiden maßgeschneidert werden können, verändert die gängigen Lehrmeinungen im Bereich der Naturstoffbiosynthese. Die neu gewonnenen Einsichten verheißen viel für die Biotechnologie und die kombinatorische Biosynthese von diversifizierten Verbindungsbibliotheken. Thiopeptide werden sicher auch weiterhin zu spannenden Entdeckungen in

der chemischen Biologie und in der Naturstoff-Forschung anregen.

Eingegangen am 3. April 2009

Online veröffentlicht am 17. Juni 2009

- [1] a) M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685–714; b) R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076–8101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7930–7954.
- [2] Herausragende Arbeit zur Strukturaufklärung von Thiostrepton: B. Anderson, D. Crowfoot-Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, *225*, 233–235.
- [3] a) H. R. A. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 441–454; b) J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schlünzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. T. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell* **2008**, *30*, 26–38; c) S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664–5666; d) S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242–245.
- [4] a) S. E. Heffron, F. Jurnak, *Biochemistry* **2000**, *39*, 37–45; b) A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6846–6857.
- [5] Eine neuere Übersicht: F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194–5254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072–5129.
- [6] Übersicht: K. C. Nicolaou, J. S. Chen, D. J. Edmonds, A. A. Estrada, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 670–732; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 660–719.
- [7] L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2549–2553.
- [8] R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141–147.
- [9] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327–4334.
- [10] R. P. Morris, J. A. Leeds, H.-U. Nägeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946–5955.
- [11] Übersicht: a) E. M. Nolan, C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 34–53; b) S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715–738.
- [12] B. W. Bycroft, M. S. Gowland, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 256–258.
- [13] a) P. Zhou, D. O'Hagan, U. Mocek, Z. Zeng, L.-D. Yuen, T. Frenzel, C. J. Unkefer, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7274–7276; b) T. Frenzel, P. Zhou, H. G. Floss, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278*, 35–40; c) U. Mocek, A. R. Knaggs, R. Tsuchiya, T. Nguyen, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7557–7568; d) U. Mocek, Z. Zeng, D. O'Hagan, P. Zhou, L.-D. G. Fan, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7992–8001; e) N. D. Priestley, T. M. Smith, P. R. Shipley, H. G. Floss, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1135–1147.
- [14] M. C. Carnio, T. Stachelhaus, K. P. Francis, S. Scherer, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6390–6400.
- [15] a) E. W. Schmidt, J. T. Nelson, D. A. Rasko, S. Sudek, J. A. Eisen, M. G. Haygood, J. Ravel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7315–7320; b) P. F. Long, W. C. Dunlap, C. N. Battershill, M. Jaspars, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1760–1765.
- [16] a) Y.-M. Li, J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter, C. T. Walsh, *Science* **1996**, *274*, 1188–1193; b) J. O. Solibati, M. Ciaccio, R. N. Farias, J. E. González-Pastor, F. Moreno, R. A. Salomón, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2659–2662.
- [17] M. R. Levengood, C. C. Kerwood, C. Chatterjee, W. A. van der Donk, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 911–919.

- [18] K. C. Nicolaou, M. Nevalainen, B. S. Safina, M. Zak, S. Bulat, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2021–2025; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1941–1945.
- [19] a) K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, A. A. Estrada, S. H. Lee, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5197–5202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5087–5092; b) K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, S. H. Lee, A. A. Estrada, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5202–5207; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5092–5097.
- [20] K. C. Nicolaou, B. Zou, D. H. Dethe, D. B. Li, D. Y.-K. Chen, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7950–7956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7786–7792.
- [21] C. J. Moody, R. A. Hughes, S. P. Thompson, L. Alcaraz, *Chem. Commun.* **2002**, 1760–1761.
- [22] K. L. Constantine, L. Mueller, S. Huang, S. Abid, K. S. Lam, W. Li, J. E. Leet, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7284–7285.
- [23] C. Zhang, J. Occi, P. Masurekar, J. F. Barrett, D. L. Zink, S. Smith, R. Onishi, S. Ha, O. Salazar, O. Genilloud, A. Basilio, F. Vicente, C. Gill, E. J. Hickey, K. Dorso, M. Motyl, S. B. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12102–12110.

Chemie

rund um die Uhr

Das Buch zum Jahr der Chemie

Das offizielle Buch der Gesellschaft Deutscher Chemiker und des BMBF ist ein wahrer Lesespaß und Augenschmaus.



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Wiley-VCH, Kundenservice
Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim
Tel.: +49 (0) 6201 606-400, Fax: +49 (0) 6201 606-184
E-Mail: service@wiley-vch.de, www.wiley-vch.de



Mädfessel-Herrmann, K. /
Hammar, F. /
Quadbeck-Seeger, H.-J.
Herausgegeben von der
Gesellschaft Deutscher
Chemiker
2004. X, 244 Seiten, mehr
als 300 Abbildungen kom-
plett in Farbe. Gebunden.
€ 27,90
ISBN 978-3-527-30970-2



WILEY-VCH

42272805_gu