

Labyrinthopeptine – eine neue Klasse carbacyclischer Lantibiotika**

Kathrin Meindl, Timo Schmiederer, Kathrin Schneider, Andreas Reicke, Diane Butz, Simone Keller, Hans Gühring, László Vértessy, Joachim Wink, Holger Hoffmann, Mark Brönstrup,* George M. Sheldrick und Roderich D. Süssmuth*

Dr. Dieter Häbich gewidmet

Lantibiotika sind ribosomal synthetisierte Peptide aus Bakterien wie Staphylokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten. Die gemeinsame Struktureigenschaft von Lantibiotika ist die nicht proteinogene Aminosäure Lanthionin (Lan, **1**; Abbildung 1), die dem Peptid Konformationsstabilität verleiht.^[1–4] Der bekannteste Vertreter ist Nisin, ein Lipid-II-Binder,^[5] der seit über 40 Jahren als antimikrobielles Nahrungskonservierungsmittel verwendet wird.^[6] Die Mehrheit der Studien über molekulare Zielstrukturen und Bioaktivitäten der Lantibiotika konzentriert sich auf potenzielle Anwendungen als Antiinfektiva.^[7–10] Duramycin (Moli1901) befindet sich in klinischen Studien der Phase II für die Behandlung zystischer Fibrose wegen seiner Fähigkeit, den Chloridtransport im Luftwegsepithel zu erhöhen.^[11] Für einige Lantibiotika wie SapB wurde eine Funktion als oberflächenaktives Biomolekül im Lebenszyklus von Streptomyzeten nachgewiesen.^[12]

Hier präsentieren wir die Strukturen, den Biosynthesegencluster und die Bioaktivität der Labyrinthopeptine, Lan-

tibiotika mit einer zuvor unbekannten carbacyclischen, posttranslational modifizierten Aminosäure namens Labionin.

Die Kulturextrakte des neuartigen Aktinomyzeten *Actinomyadura namibiensis* DSM 6313^[13,14] erregten unsere Aufmerksamkeit wegen ihrer Aktivität gegen das Herpes-simplex-Virus. Aktive Fraktionen enthielten ein Peptid, das mithilfe chromatographischer Methoden isoliert wurde. Das hochaufgelöste ESI-FTICR-Massenspektrum wies eine Molekülmasse von 984.3333 Da für das doppelt geladene Natriumaddukt der Verbindung auf. Dies entspricht einer neutralen monoisotopischen Molekülmasse von 1922.6872 Da und der Summenformel $C_{85}H_{110}N_{20}O_{24}S_4$ ($\Delta m/m = 0.7$ ppm). Eine Aminosäurenanalyse zeigte, daß Gly und die L-Enantiomere von Ala, Thr, Leu, Asx, Cys, Phe, Glx, Trp im Verhältnis 1:1:1:2:1:2:1:1:2 vorhanden sind. Die Summe der Massen der detektierten Aminosäuren wies jedoch eine beträchtliche Differenz zur Masse des Gesamtmoleküls auf, die nicht in Einklang mit bekannten posttranslationalen Modifikationen von Peptiden oder Lantibiotika gebracht werden konnte. Aufgrund von Signalverbreiterungen in Teilen des ¹H-NMR-Spektrums war keine Strukturaufklärung mit NMR-Spektroskopie möglich. Die Röntgenkristallstruktur mit einer Auflösung von 1.0 Å (Abbildung 1) ermöglichte schließlich die Interpretation der analytischen Daten und offenbarte einige einzigartige Struktureigenschaften. Wegen ihrer labyrinthartigen Struktur wurde die Verbindung Labyrinthopeptin A2 (**2**) genannt.

Labyrinthopeptin A2 hat eine globuläre, vor allem aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Struktur. Formal kann es in zwei Nonapeptide zerlegt werden, von denen jedes ein C-terminales Cystein enthält. Diese Cysteine bilden eine Disulfidbindung, eine vergleichsweise seltene Modifikation in Lantibiotika, die z.B. in Sublancin 168 aus *B. subtilis* vorkommt.^[15] Jedes Nonapeptid besteht aus einem Tetrapeptid (A-Ring) und einem Pentapeptid (B-Ring), die sich ein quartäres α C-Atom teilen. Die A-Ringe von Labyrinthopeptin werden durch eine Methylengruppe zwischen den α C-Atomen von Lab1 und Lab4 sowie von Lab10 und Lab13 gebildet (Abbildung 1). Eine carbacyclische Seitenkettenverknüpfung in Peptiden und Proteinen war zuvor unbekannt. Wir schlagen den Namen Labionin (Lab) für die entsprechende Aminosäure vor (Abbildung 1). Labionin (**3**) ist eine Aminosäure mit quartärem α C-Atom. Strukturell verwandte Verbindungen sind α -Aminoisobuttersäure (Aib) und Isovalin (Iva), die in Peptaibol-Antibiotika aus Pilzen enthalten sind.^[16] **3** weist eine 2S,4S,8R-Konfiguration auf, was mit der 2S,6R-Konfiguration von Lanthionin in anderen

[*] Dr. T. Schmiederer,^[‡] Dr. K. Schneider, Dr. A. Reicke, Dr. D. Butz, Dr. S. Keller, Prof. Dr. R. D. Süssmuth
Technische Universität Berlin, Fakultät II, Institut für Chemie
Straße des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-314-24205
E-Mail: suessmuth@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://www2.tu-berlin.de/fb5/Suessmuth/contact.html>

Dr. K. Meindl,^[‡] Prof. Dr. G. M. Sheldrick
Universität Göttingen (Deutschland)

Dr. H. Gühring
Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)

Dr. L. Vértessy, Dr. J. Wink, Dr. H. Hoffmann, Dr. M. Brönstrup
Sanofi-Aventis, R&D CAS Natural Products
Industriepark Frankfurt-Höchst, H811
65926 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: mark.broenstrup@sanofi-aventis.com

[†] K. Meindl und T. Schmiederer haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde durch Fördermittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SU239/8-1) und des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (Nr. 0315198) unterstützt. Wir danken Graeme Nicholson für ESI-FTICR-MS-Messungen und die Aminosäureanalytik, Ulrike Jannsen und Claus Lattemann für die Nachisolierung der Verbindungen und Ronja Ring für die Unterstützung bei der Verhaltensstudie.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905773> zu finden.

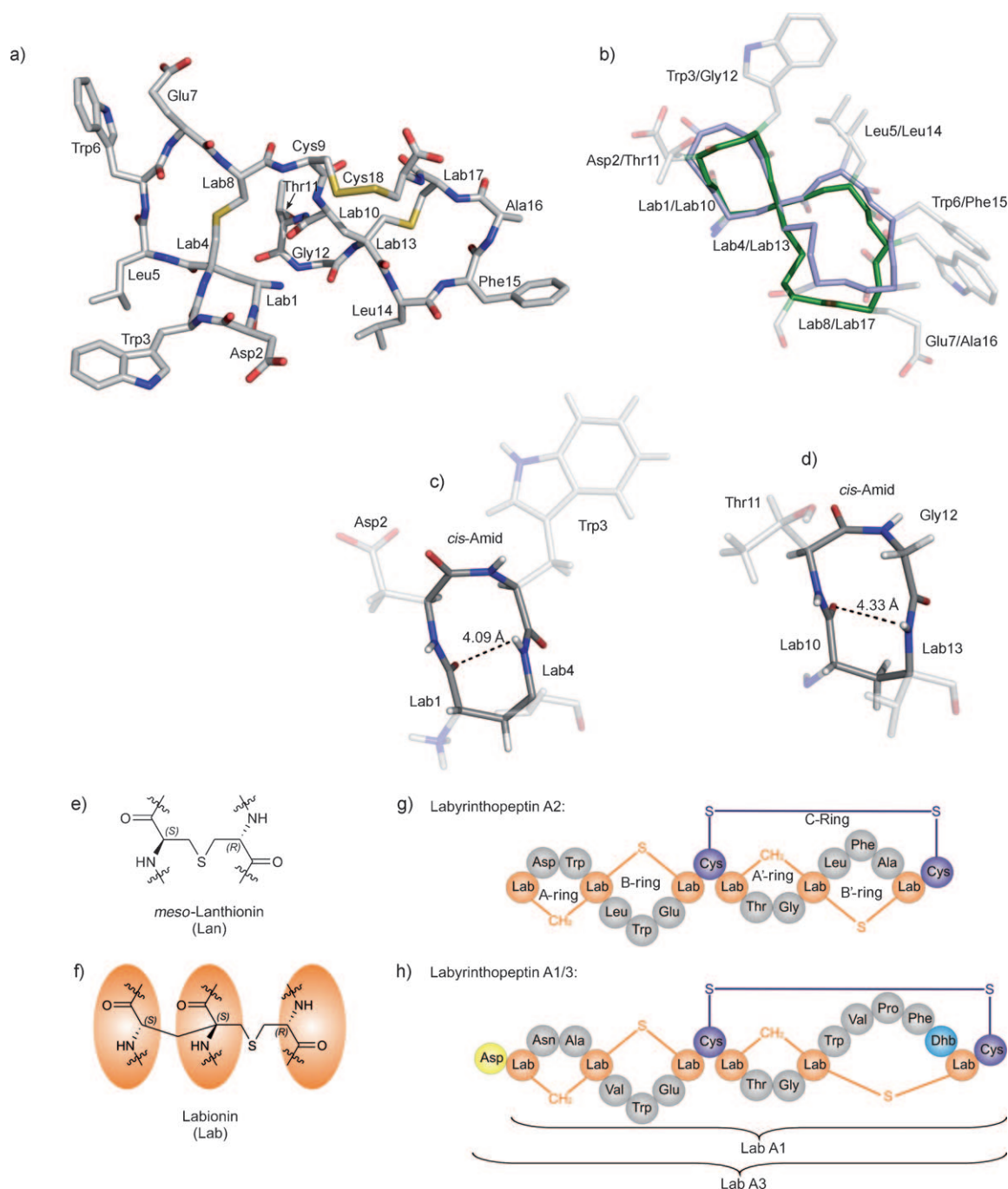


Abbildung 1. Strukturdaten. a) Struktur von **2** im Kristall. Stabmodell der dreidimensionalen Molekülstruktur; grau C, blau N, rot O, gelb S. b) Überlagerung der A-B- (grün) und A'-B'-Ringe (violett), angepasst an das zentrale α -C-Atom und die vier daran gebundenen Atome. Die beiden Ringsysteme zeigen eine hohe konformative Ähnlichkeit. c, d) *cis*-Amid-Turns des A-Rings (Lab1-Asp2-Trp3-Lab4) und des A'-Rings (Lab10-Thr11-Gly12-Lab13). e, f) Lanthionin (Lan, **1**) und Labionin (Lab, **3**). g, h) Schematische Primärstrukturen von **2**, **4** und **5**. Lanthionin-A/A'-Ringe werden durch eine Methylengruppe zwischen α -C-Atomen von Lab1/Lab4 und Lab10/Lab13 gebildet, B/B'-Ringe durch eine Thioetherbrücke. **4** ist ein Abbauprodukt von **5** durch Abspaltung des N-terminalen Asp.

Lantibiotika übereinstimmt.^[1,2] Die Bildung des elfgliedrigen Rings, der Struktur **3** enthält, zwingt das Peptidrückgrat gemäß der Röntgenkristallstruktur in eine Konformation mit *cis*-Amidbindungen zwischen Asp2–Trp3 und Thr11–Gly12 (Abbildung 1). Die Gegenwart der *cis*-Amidbindungen und das Fehlen einer Wasserstoffbrücke zwischen Lab1 und Lab4

sowie zwischen Lab10 und Lab13 zeigen, dass sich das Turn-Motiv in **2** klar von einem β -Turn-Motiv unterscheidet.

Die Identifizierung des Biosynthesegenclusters erfolgte auf einer Cosmidbank von *A. namibiensis* mithilfe von degenerierten Primersonden und anschließender Sequenzierung des Cosmids (siehe Hintergrundinformationen). Eine

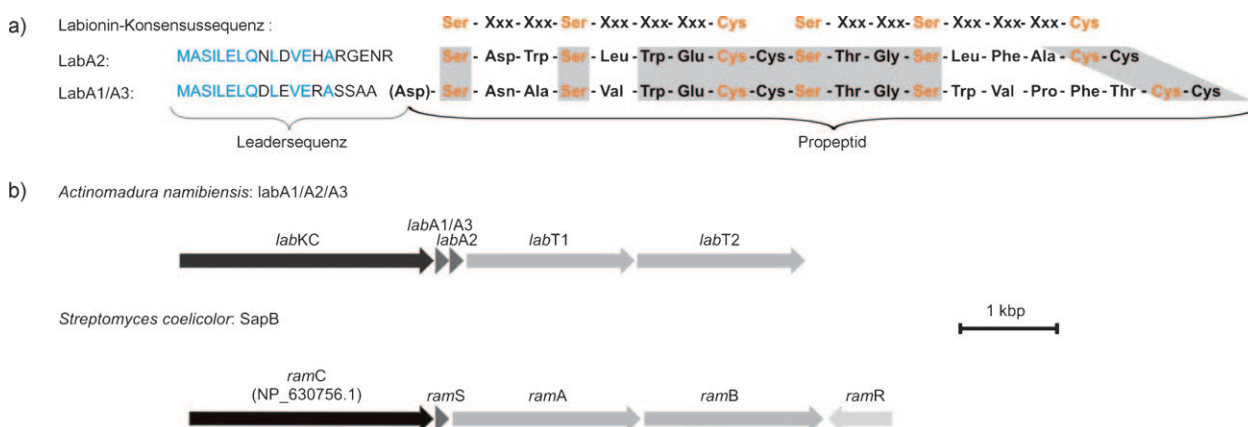


Abbildung 2. Biosynthese der Labyrinthopeptide. a) Aminosäuresequenzen der Präpropeptide von **2**, **4** und **5**, die von den Genen *labA1* und *labA2* kodiert werden. Identische Reste der Leadersequenzen (Ein-Buchstaben-Code) sind blau dargestellt, und identische Reste der Propeptide sind grau unterlegt. Die Aminosäuren Ser, Ser und Cys sind die Biosynthesestufen für Labionin (orange). b) Annotation der Gene *labKC* (Ser/Thr-Kinase-Cyclase), *labA1/A3* (Strukturprotein von **4** und **5**), *labA2* (Strukturprotein von **2**), *labT1* und *labT2* (ABC-Transporter), die im Labyrinthopeptidengencenter identifiziert werden konnten. Vergleich mit dem Biosynthesegencenter von *Streptomyces coelicolor*, der für SapB kodiert.

6.4 kb große DNA-Sequenz kodiert für fünf Gene, die dem Labyrinthopeptin-Biosynthesegencenter (*lab*) zugeordnet werden (Abbildung 2). Die DNA-Sequenz des Strukturgens *labA2* (38 Aminosäuren) von **2** enthält ein 20 Aminosäuren langes Leaderpeptid und zeigt ein Ser-Xxx-Xxx-Ser-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-Motiv als Vorstufenaminoaciden für **3** (Abbildung 2). Direkt stromaufwärts von *labA2* kodiert das Gen *labA1/A3* für das Strukturgen der Labyrinthopeptide A1 (**4**) und A3 (**5**) (Leaderpeptid 20 bzw. 19 Aminosäuren, Strukturgene 20 bzw. 21 Aminosäuren). Die Gene *labT1* und *labT2* kodieren für ATP-abhängige ABC-Transporter,^[17] die vermutlich eine Exportfunktion für Labyrinthopeptide haben. Das Gen *labKC* kodiert für ein difunktionelles Protein, das eine N-terminale Ser/Thr-Kinase-Funktion und eine C-terminale Lanthionin-Cyclase-Funktion aufweist. Innerhalb der Cosmidgrenzen wurden keine für die Disulfidbildung (C-Ring) verantwortliche Thiol-disulfid-Oxidoreduktase, die als essenziell für Sublancin 168 gilt,^[15] und keine Protease für die Abspaltung des Präpeptids identifiziert.

In Kulturfiltraten von *A. namibiensis* wurden zwei weitere Verbindungen, die Labyrinthopeptide A1 (**4**) und A3 (**5**), identifiziert (siehe Hintergrundinformationen). Bei längeren Fermentationszeiten wandelt sich **5** in **4** um. In Fermentationsextrakten gleicht die Menge von **2** ungefähr der Menge an **4** und **5**. Diese Beobachtung spricht für eine gemeinsame Transkription von *labA2* und *labA1/A3* desselben Gencusters und deutet auf ähnliche Prozessierungseffizienzen der Präpropeptide durch LabKC und proteolytische Enzyme hin. Die Strukturen von **4** und **5** wurden durch Kombination der genetischen Information, der Strukturdaten für **2**, der massenspektrometrischen Analytik und der Aminosäureanalyse abgeleitet (Abbildung 1). Der B'-Ring von **2** ist in **4** und **5** zu einem Heptapeptid erweitert, wobei Didehydrobutyrin (Dhb) von Th abgeleitet ist. **5** hat im Vergleich zu **4** ein zusätzliches N-terminales Asp.

Die In-vitro-Testung von **2** bestätigte die antivirale Aktivität, die in den Originalextrakten gefunden wurde (siehe Hintergrundinformationen). Im Zuge breiterer, weiterfüh-

render Profilierungsexperimente wurde **2** in vivo in einem Nervenverletzungsmodell (spared nerve injury) in der Maus gegen neuropathische Schmerzen getestet.^[18] Die intravenöse Gabe von **2** (0.01–3.0 mg kg⁻¹) führte zu einer signifikanten Verminderung taktiler Allodynie mit einem ED₅₀-Wert von 50 µg kg⁻¹. Die Effizienz erreichte 100 % und war über die Beobachtungsdauer von 6 Stunden stabil. 24 Stunden nach der Verabreichung war der anti-allodynsche Effekt verschwunden, wie bei der Vergleichssubstanz Gabapentin (Abbildung 3 und Hintergrundinformationen).

Insgesamt zeigen unsere Beobachtungen, dass die Labyrinthopeptide eine neue Klasse carbacyclischer Lantibiotika darstellen, die gemäß der Struktur des Gencusters den Typ-III-Lantibiotika zugeordnet werden können.^[2] In unserem aktuellen Modell werden die Labyrinthopeptide als Präpropeptide synthetisiert und posttranslational durch die aus zwei Domänen bestehende Proteinkinase-Cyclase LabKC prozessiert. Diese katalysiert Serinphosphorylierungen, Dehydratisierungen von Phosphoserinen zu Didehydroalaninen sowie alle Cyclisierungen. Ein ATP-abhängiger Phosphorylierungsschritt wurde bereits für LctM in der Lacticin-481-Biosynthese beschrieben.^[19,20] Die Lanthioninbildung in anderen Lantibiotika erfolgt durch eine Michael-Addition mit anschließender Protonierung des Enolats. Wir vermuten, dass im Fall der Labyrinthopeptin-Biosynthese das Enolatintermediat nicht durch Protonierung abgefangen wird, sondern in einer zweiten Michael-Addition in situ mit einem zweiten Didehydroalanin reagiert. Abschließende Biosyntheseschritte umfassen die N-terminale Prozessierung des Präpeptids durch Proteasen, die Disulfidbildung und den Export in den Extrazellulärraum.^[1,2]

Die Anordnung der Gene und die Leadersequenzen der Strukturgene *labA1/A3* und *labA2* zeigen signifikante Homologien zu Biosynthesegencustern aus anderen Aktinomyzeten (Abbildung 2). Dies trifft besonders auf den *ram*-Gencenter des Modellorganismus *Streptomyces coelicolor* mit SapB als Biosyntheseprodukt zu.^[12] Der Sequenzvergleich mit Genen der Ser/Thr-Kinase (*ramC*), des Struktur-

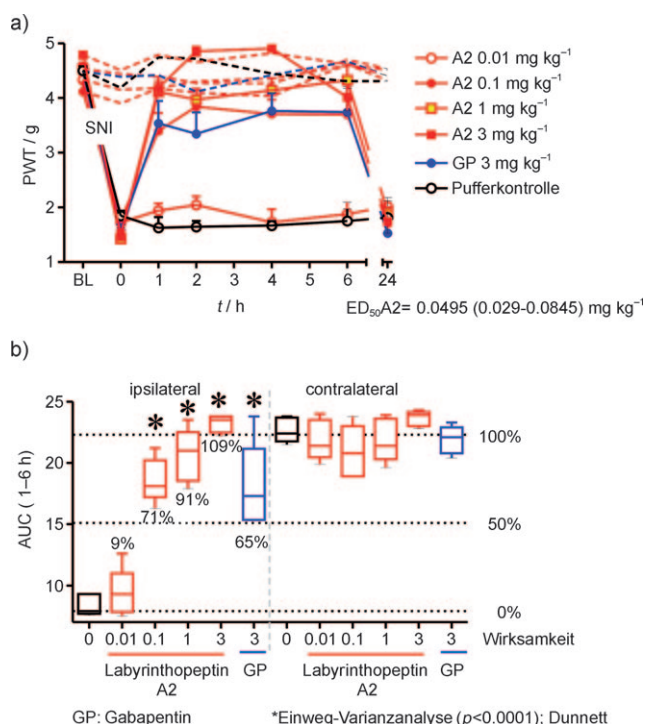


Abbildung 3. Neuropathisches Schmerzmodell in der Maus (spared nerve injury, SNI). a) Vor und sieben Tage nach der chirurgischen Nervenverletzung wurde die taktile Allodynie gemessen (Basislinie BL = vor Verletzung und 0 h = sieben Tage nach Verletzung). Nach intravenöser (i.v.) Gabe von **2**, Gabapentin oder Vehikel (Ethanol/Solutol/Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 1:1:18), wurde die taktile Allodynie als Paw Withdrawal Threshold (PWT) über 6 h und nach 24 h an der geschädigten und nicht geschädigten Hinterpfote bestimmt. Zur Allodyniemessung wurde ein Dynamic-Plantar-Anesthesiometer der Firma TSE (Bad Homburg) verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler ($N=5$ /Gruppe) angegeben. Gestrichelte Linien: Contralaterale Messungen. b) Berechnungen der Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) von 1 bis 6 h nach intravenöser Gabe. Die taktile Allodynie der geschädigten Hinterpfote in der Vehikelgruppe entspricht 0% Wirksamkeit, wogegen die taktile Empfindlichkeit der nicht-geschädigten Hinterpfoten die maximal mögliche Wirkstärke anzeigen (100%). Die intravenöse Gabe von **2** resultiert in einer dosisabhängigen Wirksamkeit (Kastengrafik mit Median, Quartilen und Extremwerten).

proteins (*ramS*) und der ABC-Transporter (*ramA*, *ramB*) unterstreicht die evolutionäre Beziehung beider Gencluster. Das Strukturmodell von SapB geht von der Existenz von Lanthionin/Dha-Paaren und nicht von Labionin aus.^[12]

Abgesehen von der transkriptionellen Regulatorsequenz *ramR* zeigt der *ram*-Biosynthesegencluster keine weiteren Gene, z.B. für die proteolytische Prozessierung des Präpeptids. Das Vorhandensein *lab*-homologer Gencluster in *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseus* und dem Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* mit bislang unbekannten Biosyntheseprodukten lässt auf eine bedeutende Rolle dieses Lantibiotika-Typs in Aktinomyzeten schließen (siehe Hintergrundinformationen).

Experimente zur Profilierung der Bioaktivitäten bei Labyrinthineptinen erbrachten einen moderaten antiviralen Effekt sowie signifikante Wirksamkeit gegen neuropathische Schmerzen^[21] als Anwendungsgebiete. Anti-allodynsche Ef-

fekte in vivo wurden für Lantibiotika bisher nicht beschrieben, sind aber wohlbekannt für natürliche Peptide aus Spinnengiften^[22,23] oder Kegelschnecken.^[24] Das bekannteste Beispiel ist Ziconotid, ein Conotoxin, das für die Behandlung schwerer chronischer Schmerzen angewendet wird.^[25] Wegen der neuartigen Struktur und der ermutigenden In-vivo-Ergebnisse können die Labyrinthineptine als vielversprechende neue Leitstrukturen mit möglicher Anwendung zur Therapie neuropathischer Schmerzen angesehen werden. Sie erweitern den Strukturraum der Lantibiotika durch eine zuvor unbekannte carbacyclische Modifikation, die zur neuen Aminosäure Labionin führt. Die enzymatische, posttranslationale Modifikation repräsentiert einen neuen Weg der C-C-Bindungsbildung der Natur, deren mechanistische Details das Thema weiterer Studien sein werden.

Experimentelles

CCDC 721326 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich. Die DNA-Sequenz wurde in der EMBL Nucleotide Sequence Database unter der Zugangsnummer FN178622 abgelegt.

Eingegangen am 14. Oktober 2009

Online veröffentlicht am 15. Januar 2010

Stichwörter: Antibiotika · Antischmerzaktivität · Lanthionin · Lantibiotika · Peptide

- [1] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633–683.
- [2] J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- [3] F. J. Van De Ven, G. Jung, *Antonie van Leeuwenhoek* **1996**, *69*, 99–107.
- [4] S.-T. D. Hsu, E. Breukink, G. Bierbaum, H.-G. Sahl, B. de Kruijff, R. Kaptein, N. A. J. van Nuland, A. M. J. J. Bonvin, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13110–13117.
- [5] E. Breukink, I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H.-G. Sahl, B. de Kruijff, *Science* **1999**, *286*, 2361–2364.
- [6] P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 777–788.
- [7] R. Kellner, G. Jung, T. Hörner, H. Zähler, N. Schnell, K.-D. Entian, F. Götz, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177*, 53–59.
- [8] F. Märki, E. Hanni, A. Fredenhagen, J. van Oostrum, *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 2027–2035.
- [9] K. Wakamatsu, S. Y. Choung, T. Kobayashi, K. Inoue, T. Higashijima, T. Miyazawa, *Biochemistry* **1990**, *29*, 113–118.
- [10] E. Breukink, B. de Kruijff, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 321–323.
- [11] H. Grasemann, F. Stehling, H. Brunar, R. Widmann, T. W. Laliberte, L. Molina, G. Döring, F. Ratjen, *Chest* **2007**, *131*, 1461–1466.
- [12] S. Kodani, M. E. Hudson, M. C. Durrant, M. J. Buttner, J. R. Nodwell, J. M. Willey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11448–11453.
- [13] G. Seibert, L. Vértessy, J. Wink, I. Winkler, R. Süßmuth, G. Sheldrick, K. Meindl, M. Broenstrup, H. Hoffmann, H. Guehring, L. Toti, WO2008/040469.
- [14] J. Wink, R. M. Kroppenstedt, G. Seibert, E. Stackebrandt, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 721–724.

- [15] R. Dorenbos, T. Stein, J. Kabel, C. Bruand, A. Bolhuis, S. Bron, W. J. Quax, J. M. van Dij, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 16682–16688.
 - [16] C. P. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, E. Sandorb, I. S. Druzhinina, *Chem. Biodiversity* **2007**, 4, 1068–1082.
 - [17] A. L. Davidson, J. Chen, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 241–268.
 - [18] I. Decosterd, C. J. Woolf, *Pain* **2000**, 87, 149–158.
 - [19] L. Xie, L. M. Miller, C. Chatterjee, O. Averin, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, *Science* **2004**, 303, 679–682.
 - [20] C. Chatterjee, L. M. Miller, Y. L. Leung, L. Xie, M. Yi, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15332–15333.
 - [21] D. W. Y. Sah, M. H. Ossipov, F. Porreca, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 460–472.
 - [22] S. P. Park, B. M. Kim, J. Y. Koo, H. Cho, C. H. Lee, M. Kim, H. S. Na, U. Oh, *Pain* **2008**, 137, 208–217.
 - [23] R. J. Lewis, M. L. Garcia, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 790–802.
 - [24] B. M. Olivera, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 31173–31177.
 - [25] K. Garber, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 399.
-