

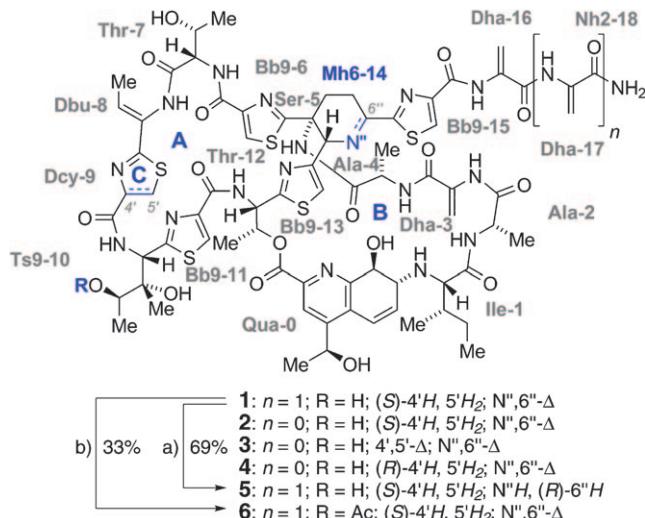
NMR-Strukturen von Thiotrepton-Derivaten zur Charakterisierung der ribosomalen Bindetasche**

Hendrik R. A. Jonker, Sascha Baumann, Antje Wolf, Sebastian Schoof, Fabian Hiller, Kathrin W. Schulte, Karl N. Kirschner, Harald Schwalbe* und Hans-Dieter Arndt*

Professor Peter B. Dervan gewidmet

Thiopeptide^[1] wie Thiotrepton (**1**) sind hochmodifizierte makrocyclische Peptidnaturstoffe, die durch ribosomale Biosynthese entstehen.^[2] **1** wurde früh^[3] als ein sehr wirksames Antibiotikum gegen Gram-positive bakterielle Keime identifiziert (Schema 1).^[1,4] Eine Röntgenkristallstrukturanalyse zeigt, dass **1** eine globuläre Form aufweist, die an gefaltete Proteindomänen erinnert.^[5] Thiotrepton inhibiert insbesondere die Proteinbiosynthese, indem es fest an die GTPase-assoziierte Region (GAR) des 70S-Ribosoms zwischen dem ribosomalen Protein L11 und dem H43/H44-Abschnitt der 23S-rRNA bindet.^[6] Kürzlich wurde die gleichzeitige Inhibition des 20S-Proteasoms durch **1** festgestellt und so viele seiner Wirkungen auf eukaryotische Zellen erklärt.^[7]

Im Unterschied zu vielen anderen Antibiotika, die am Ribosom binden, und trotz ihrer außergewöhnlichen Aktivität *in vitro* wurden Thiopeptide bislang für die Humantherapie nicht genutzt, hauptsächlich wegen ungenügender Löslichkeit.^[4] Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Identifizierung neuer Kandidatenverbindungen mit verbesserter Pharmakokinetik liegt im Mangel an Daten zu den Schlüs-



Schema 1. Molekülstrukturen von **1–4** und Synthese der Derivate **5** und **6**. Die Reste wurden in Einklang mit der Literatur benannt,^[11] die Nummerierung der Biosynthese angepasst.^[2] a) NaBH_3CN , MeOH ; b) Ac_2O (2.2 Äquiv.), DMAP (0.3 Äquiv.), THF (3 mM), 20°C, 13 h.

[*] Dr. S. Baumann, Dr. S. Schoof, B. Sc. K. W. Schulte, Dr. H.-D. Arndt
Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
und
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
Dr. H. R. A. Jonker, Dipl.-Biochem. F. Hiller, Prof. Dr. H. Schwalbe
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz-Zentrum (BMRZ)
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
Fax: (+49) 69-7982-9515
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de
M. Sc. A. Wolf, Dr. K. N. Kirschner
Fraunhofer-Institut für Wissenschaftliches Rechnen (SCAI)
Abteilungen Bioinformatik und Simulationsanwendungen
Schloss Birlinghoven, 53754 Sankt Augustin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von dem Fonds der Chemischen Industrie (H.D.A. und H.S.), der FhG (K.N.K.), dem CEF „Makromolekulare Komplexe“, dem SFB 579 und von EUNMR unterstützt (jeweils H.S.). H.D.A. bedankt sich für Förderung im Rahmen des Emmy-Noether-Programms der DFG und bei Prof. Dr. R. Goody für Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003582> zu finden.

selwechselwirkungen mit der adaptiven Zielstruktur aus ribosomaler RNA und dem Protein L11. Die Kristallstrukturdaten von **1** wurden genutzt, um Modelle für die Bindung am dynamischen L11-rRNA-Zielkomplex mithilfe der NMR-Spektroskopie abzuleiten.^[6a, 9, 10] Eine Röntgenkristallstrukturanalyse von mit **1** getränkten Einkristallen der intakten 50S-Untereinheit des Ribosoms aus *D. radiodurans* wurde bis zu einer Auflösung von 3–4 Å verfeinert.^[6b] Biochemische Daten liefern ein schlüssiges Bild der globalen Wechselwirkung,^[1, 6c–e] jedoch blieb wegen der beträchtlichen Größe von **1** und der Dynamik der ribosomalen Zielstrukturregion unser Verständnis davon auf molekularer Ebene unvollständig.^[6d, e] Um in Zukunft eine gezielte Verbindungsoptimierung zu ermöglichen, haben wir den Einfluss ausgewählter Veränderungen auf den Konformationsraum von Thiotrepton (**1**) mithilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Während **1** und verwandte Thiopeptide zur Strukturaufklärung früh durch NMR-Spektroskopie charakterisiert wurden,^[11] sind Studien zur Konformation mit heute üblichen Methoden selten.^[12] Wir berichten hier über die Strukturen von **1** sowie von drei Derivaten in Lösung und korrelieren ihre molekulare Wechselwirkung an der GAR des 70S-Ribosoms mit ihrer biologischen Aktivität.

Als repräsentativen Vertreter der Thiopeptidfamilie haben wir Thiotrepton (**1**) durch Semisynthese modifiziert

(Schema 1). Basenvermitteltes Abspalten des Rests Dha-17 lieferte das Derivat **2**,^[6d] und die Oxidation des Rings C an Dcy-9 ergab das chemisch stabilere Thiazol **3**.^[7b] Thiostrepton ist konfigurativ labil,^[13] was den Zugang zu dem formal von L-Cystein abgeleiteten Epimer **4** gestattete. Außerdem ergab eine Reduktion des Dehydropiperidins (Mh6-14) glatt und stereoselektiv das äquatorial substituierte Piperidin **5**, das den Thiopeptinen und Sch18640 stark ähnelt.^[14] Unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen gelang es auch, die sekundäre OH-Gruppe am Rest Ts9-10 zu verestern (—**6**). Insgesamt machten diese Modifikationen lokale Veränderungen in der Gerüststruktur zugänglich, insbesondere in drei Segmenten des wichtigen A-Rings.

Zunächst untersuchten wir diese unterschiedlichen Thiostreptongerüste mithilfe der NMR-Spektroskopie. Da **1–5** in biologischen Puffern nur schlecht löslich sind (niedriger μ M-Bereich)^[6d] und auch die Bindestelle größtenteils hydrophoben Charakter hat, wurde die moderat polare und anpassungsfähige^[15] Lösungsmittelmischung $\text{CDCl}_3/[\text{D}_5]\text{EtOH}$ (5:1) für die NMR-Studien in Lösung eingesetzt.^[16] Von Thiostrepton (**1**) und seinen Derivaten **2–5** (5–10 mM) wurden bei 298 K und 600 MHz Homo- und Heterokern-NMR-Spektren (HSQC, HMBC, TOCSY, NOESY) zur Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen bei natürlicher Isotopenhäufigkeit aufgenommen (siehe die Hintergrundinformationen).

Die NMR-Spektren von **1** und **2** waren nahezu identisch, was darauf schließen lässt, dass die Verkürzung des Terminus keinen Einfluss auf die Struktur des Kerns hat.^[6d] Alle anderen Verbindungen wiesen charakteristische Merkmale in den ^1H , ^{15}N -HSQC-Korrelationsspektren (Abbildung 1, oben) auf, was auf unterschiedliche Konformationen hindeutete. Proton-Proton-Abstände aus ^1H , ^1H -NOESY-Spektren wurden dann Strukturrechnungen mit CNS 1.1^[17a] und ARIA 1.2^[17b] zugeführt, wobei angepasste Protokolle eingesetzt wurden (siehe die Hintergrundinformationen). NOE-Aufbaudaten ($t_{\text{mix}} = 100$ –600 ms) wurden zur Korrektur von Spindiffusionseffekten eingesetzt,^[18] und vom chemischen Austausch beeinflusste Kerne wurden mit ^1H , ^1H -ROESY eliminiert.^[19] Die ausgezeichnete Auflösung der Spektren ermöglichte es, eine große Zahl von NOE-Abstandsparametern für alle Proben abzuleiten (Tabelle 1). Diese umfassenden Daten führten zu sehr kompakten Strukturbündeln (Abbildung 1, unten). Wegen der vielen gut definierten NOEs und des Algorithmus von ARIA unterschätzen diese eng konvergierten Ensembles wahrscheinlich die wahre Flexibilität der Moleküle, sie geben allerdings die gemittelte Lösung mit niedrigster Energie sehr gut wieder.

Die NMR-Struktur von Thiostrepton (**1**) in Lösung vergleicht sich sehr gut mit der Kristallstrukturanalyse (PDB 1E9W),^[5] was unsere Vorgehensweise bestätigt. In allen Derivaten nehmen der Chinaldinsäure-Makrocyclus (Ring B) und der Dehydroalanin-Terminus nahezu gleiche Konformationen ein. Die Termini konnten für **3** und **4** nicht vollständig verglichen werden, die jeweils vorhandenen Teile waren aber nahezu gleich. Wesentliche Strukturunterschiede treten in der Konformation des Rings A auf, der die Thiazolinringe umfasst, und dort insbesondere in den Resten 7–10. Deren Orientierung weicht für die oxidierte Verbindung **3** und beson-

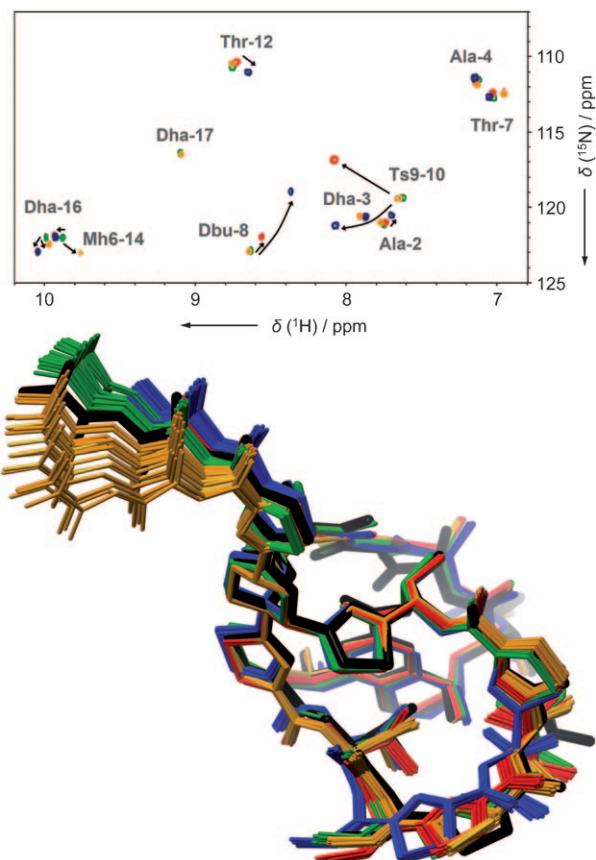


Abbildung 1. Oben: Zugeordnete Überlagerung von ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren für **1** (grün), **3** (rot), **4** (blau) und **5** (orange) bei natürlicher Isotopenhäufigkeit. Unten: Strukturbündel der 20 energieminierten NMR-Strukturen der Verbindungen **1** (PDB 2L2W), **3** (2L2X), **4** (2L2Y) und **5** (2L2Z), überlagert mit der bereits bekannten Röntgenkristallstruktur von Thiostrepton (schwarz, 1E9W).

Tabelle 1: Wichtige Daten zu Strukturbestimmung und Docking-Studien.

	NOEs ^[a]	RMSD ^[b,c]	RSA ^[d]	Bewertung ^[e]	Bewertung ^[f]
1	231 (38)	0.43/0.42/0.42	0.77	−8.41/4	−8.35/14
3	167 (8)	0.43/0.42/0.43	1.09	−8.54/23	−8.54/23
4	170 (13)	0.43/0.43/0.44	1.83	−8.30/6	−7.92/34
5	220 (29)	0.45/0.42/0.44	1.02	−9.15/2	−8.71/20

[a] Gesamtzahl von NOE-Abstandsparametern, unklare NOEs in Klammern. [b] Quadratisch gemittelte Abweichung in Å. [c] Bündel/nur Ring A/nur Ring B. [d] Durchschnittliche RMSD in Å der Schweratome im Bereich des Rings A (Reste 6–11) verglichen mit den Röntgenstrukturdaten bei gleicher Ausrichtung der identischen Ringe B. [e] Beste AUTODOCK-Bewertungen/Anzahl der Binevorschläge. [f] Bewertungen/Anzahl der Binevorschläge im größten Bündel.

ders für das Epimer **4** deutlich ab (Abbildung 1, unten). Dabei werden der Ring C (Dcy, Cys, Bb9) und die Dihydroxyisoleucin-Seitenkette (Ts9-10) um bis zu 2.5–2.9 Å versetzt.

Die Oxidation des Rings C führt zu einer planaren Substruktur, bewirkt aber nur eine leichte Verschiebung des angrenzenden Ts9-10. Übereinstimmend damit beobachteten wir eine leichte Veränderung der chemischen Verschiebung des Amids von Ts9-10. Die Umkehr der Konfiguration im

Epimer **4** führt zu wesentlich größeren Strukturänderungen, die einen merklichen Versatz des Rings C auslösen und sich in stärker verschobenen Amidsignalen der benachbarten Reste Dbu-8 und Ts9-10 manifestieren. Darüber hinaus rotiert Thz-11 um 22°. Auch diese Veränderung spiegelt sich in der chemischen Verschiebung der benachbarten Reste Ts9-10 und Thr-12 wider. Für das Derivat **5** wurden ähnliche Abweichungen nur im Bereich des Piperidins (Reste 5 und 14) und des angrenzenden Thiazols (Rest 15) beobachtet, was bestätigt, dass die Struktur des Kerns nicht stark beeinflusst wird, die Orientierung des Dehydroalanin-Terminus dagegen schon.

Deuteriumaustauschgeschwindigkeiten sowie die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Amide zeigten, dass die internen Wasserstoffbrücken^[5] der Rückgrat-Amide von Ser-5, Thr-7 und Ts9-10 auch in Lösung erhalten bleiben sollten (siehe die Hintergrundinformationen). Diese Reste liegen sehr nahe bei den Stickstoffatomen der benachbarten Thiazol(in)ringe, was ihre starke Abschirmung gegen chemischen Austausch erklären könnte. Übereinstimmend mit früheren Berichten^[12] stellten wir untypische Eigenschaften der Dehydroaminoäuren fest, was wahrscheinlich an ihrem Enamincharakter liegt.

Die Struktur des Dehydroalanin-Terminus konnte lokal durch NMR-Spektroskopie nicht gut definiert werden. Darum wurde seine Flexibilität in quantenmechanischen Gasphasenrechnungen (HF/6-31G*) der Torsionspotentiale eines verkürzten Analogons abgeschätzt (siehe die Hintergrundinformationen).^[20] Im Verlauf von Drehungen um 360° traten sieben Minima auf, die alle innerhalb eines Bereichs von 5 kcal mol⁻¹ lagen. Die Umwandlungsbarrieren betragen niemals über 7–8 kcal mol⁻¹, sodass die Termini recht flexibel sein sollten. Gasphasenrechnungen unterschätzen die in kondensierter Phase auftretenden Energien nur selten, da stabilisierende Lösungsmittel und Bindungspartner fehlen. Demzufolge kann sicher angenommen werden, dass der Molekül-Terminus in Lösung ein ausgedehntes Volumen einnimmt^[6c] und seine Konformation bei der Zielstrukturbindung anpasst.^[6b]

Daraufhin wurden Docking-Studien mit AUTODOCK durchgeführt.^[21] NMR-Strukturenensembles decken typischerweise einen maßgeblichen Bereich des energetisch zugänglichen Konformationsraums ab, auch wenn sie die wirklich erreichbaren Fluktuationen möglicherweise unterschätzen.^[22] Daher setzten wir jede einzelne Struktur aus den NMRspektroskopisch ermittelten Bündeln von **1** und seinen oxidierten (**3**), epimerisierten (**4**) und reduzierten Derivaten (**5**) für Docking-Experimente an der großen ribosomalen Untereinheit ein, die einer Strukturanalyse mit gebundenem Thiotrepton entnommen wurde (PDB 3CF5).^[23] Mit den Kristallstrukturkoordinaten des Proteins L11 und der 23S-RNA wurde die Bindegemenge definiert. Nutzten wir diese Daten für ein vollständig starres Docking, so erhielten wir durchweg unerwartete Bindevorschläge, bei denen der Dehydroalanin-Terminus tief in die Spalte zwischen L11 und 23S eingeschoben war. Solch eine Bindegemenge wird weder von den bekannten Strukturdaten noch von unserer PICC-Studie gestützt,^[6] in der die Lage des Dehydroalanin-Terminus biochemisch bestimmt worden war.

In einem verfeinerten, teilrelaxierten Ansatz wurden dann alle Seitenketten des Liganden sowie der komplette Terminus als flexibel angenommen.^[24] Für alle vier Strukturen konnten wir so Bindemodi mit den jeweils besten Docking-Bewertungen („Scores“) finden, die der Bindungsart in der Kristallstruktur ähnelten (Abbildung 2, oben). Diese Er-

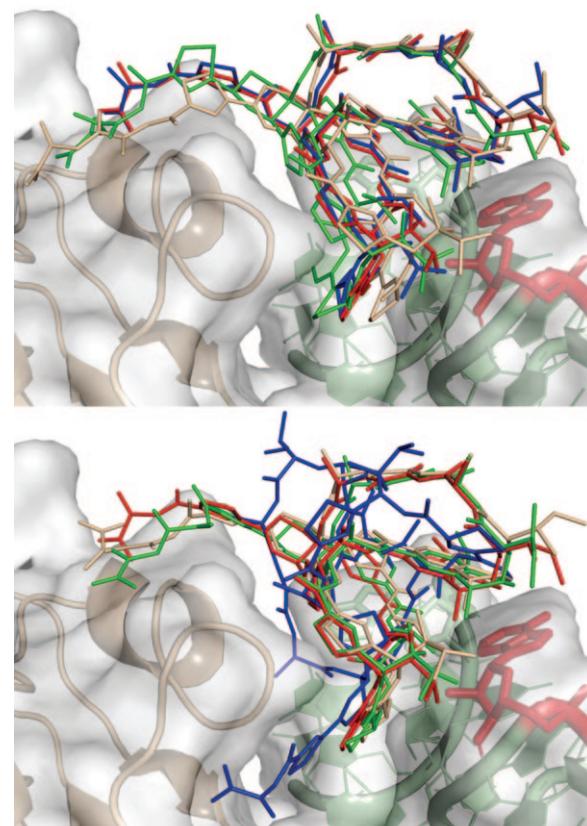


Abbildung 2. Docking von **1** (grün), **3** (rot), **4** (blau) und **5** (hellorange) an das Protein L11 (grau, nur Rückgratspur gezeigt) und die 23S-rRNA (dunkelgrün). Die Van-der-Waals-Oberfläche wurde grau schattiert, das wichtige Nukleotid A1067 hervorgehoben (rot). Oben: Bindevorschläge mit den besten Docking-Prognosen. Unten: Repräsentative Bindevorschläge aus den größten Bündeln. Man beachte den sehr häufigen umgekehrten Bindevorschlag für **4**.

gebnisse zeigen, dass die Flexibilität der Seitenketten und des Terminus für die korrekte Bindung an die Zielstruktur wichtig sind. Als wir dafür allerdings eine Bewertungsfunktion einsetzten, die speziell an RNA-Zielstrukturen angepasst ist,^[25] erhielten wir wesentlich schlechtere Vorhersagen. Dies weist darauf hin, dass, obwohl die Bindegemenge von RNA bestimmt wird,^[6c] die Bindestelle ihrem Charakter nach eher einem unpolaren Proteinrezeptor als isolierter RNA ähnelt. In der Tat treten nur Oberflächenkontakte zwischen Basen und Ligand auf, aber keine Wechselwirkungen zwischen Ladungen.

Eine statistische Auswertung der Bewertungen ergab für **1**, **3** und **5** konsistent Kristallstruktur-ähnliche Geometrien (Abbildung 2, unten), die ähnliche Wechselwirkungen mit der Bindestelle aufwiesen (siehe die Hintergrundinformationen).

In dieser Analyse bildeten die OH-Gruppen der Seitenketten von Thr-7 und Ts9-10 drei Wasserstoffbrücken zu A1067, und Bb9-6 ist in eine Stapelwechselwirkung mit A1095 eingebunden. Die Termini von **3** und **5** bilden zusätzlich Wasserstoffbrücken mit dem Proteinrückgrat. Dagegen fehlten diese Charakteristika für das Epimer **4** weitestgehend. Darüber hinaus fanden wir immer wieder den unwahrscheinlichen^[6c] Spaltenbindemodus über den Terminus. Insgesamt weisen diese Daten sowie die schwächere Bewertung der biochemisch gestützten „besten“ Lösung deutlich darauf hin, dass das Epimer **4** sich weniger gut für die Zielstrukturbindung eignet.

Unsere Docking-Studien schätzten die reduzierte Form **5** als stärksten Binder ein und platzierten Thiostrepton (**1**) sowie seine oxidierte Form **3** mit vergleichbaren Eigenschaften zwischen **5** und **4** (Tabelle 1). Dieser vorhergesagte Trend wurde durch eine biochemische Messung bestätigt.^[23] Ligandenaffinitäten wurden mit einem auf Fluoreszenzpolarisation aufgebauten Assay bestimmt.^[6d,e] Um funktionelle Inhibitionskonstanten der bakteriellen Translation zu ermitteln, setzten wir einen gekoppelten In-vitro-Transkriptions-Translations-Assay ein. Wir nutzten dabei ein GFP-Reportergen-Konstrukt, um mit T7-Polymerase mRNA in situ zu erzeugen, die durch Zell-Lysat aus *E. coli*-Zellen direkt in detektierbares grün fluoreszierendes Protein (GFP) umgesetzt wurde.^[26] Temperatur und zeitliche Abstimmung der gekoppelten Reaktionen wurden dabei auf ein stabil reproduzierbares Signals hin optimiert (siehe die Hintergrundinformationen).

Thiostrepton (**1**), sein verkürztes Derivat **2** und die oxidierte Form **3** wiesen vergleichbare Aktivitäten auf. Für das Epimer wurde eine deutlich verringerte Affinität gefunden (20- bis 25-fach), die auch an den wesentlich kleineren Hemmhöfen auf behandelten Agarplatten erkennbar war (siehe die Hintergrundinformationen). Überraschenderweise zeigt **4** im Translationsinhibitierungstest eine mit **1** vergleichbare Inhibitionskonstante. HPLC-Experimente ergaben dann aber, dass in Anwesenheit von translationsfähigem Zell-Lysat über den Zeitraum des Experiments aus **4** das stabilere d-Epimer^[13] **1** zurückgebildet wurde. Wie durch die Docking-Studien vorhergesagt, zeigte **5** eine deutlich erhöhte Affinität zur isolierten Zielstruktur – vergleichbar mit dem hochaktiven Nosiheptid.^[1,6d] Die monocyclischen Thiopeptide Micrococcin und Thiotipin hatten dagegen eine 10- bis 1000-fach (Thiotipin) geringere Affinität. Die Translationsinhibitierung folgte qualitativ den Bindedaten.^[27-28] Interessanterweise wurde durch Spalten des Rings B in **1** zum einfachen Makrocyclus^[13] eine noch deutlich weniger aktive Verbindung erhalten (**7**). Dieser Befund weist erneut darauf hin, dass das sonst recht ähnliche Micrococcin einen von **1** unterschiedlichen Bindemodus aufweist.^[6b,c,29]

In der gesamten Klasse der Thiopeptide tritt der Dihydroxyisoleucin-Rest (Ts9-10) nur in Thiostrepton (**1**) auf.^[1] Die Docking-Analysen legten nahe, dass Ts9-10 Wasserstoffbrücken zur Ribose von A1067 bilden könnte. Das Derivat **6** mit einer acylierten sekundären OH-Gruppe an diesem Rest hatte tatsächlich eine zehnfach reduzierte Affinität für die Zielstruktur und eine zweifach verringerte Wirksamkeit in der Translationsinhibitierung. Dies zeigt, dass

die OH-Gruppen der Seitenketten an Ts9-10 die Wirkung von **1** fördern, sehr wahrscheinlich wegen ihrer wasserstoffbrückenbildenden Eigenschaften.

Im L-Cystein-Epimer **4** ist der Abstand zwischen A- und B-Ring verkleinert, was zu einer mit der Zielstruktur weniger gut komplementären Form führt. Dadurch leiden die passgenaue Insertion des Dehydrobutyryinrests (Dbu-8) zwischen RNA und dem Protein L11 sowie die optimale Platzierung von Ts9-10 an A1067. Bemerkenswert ist, wie gut die experimentellen Daten von der integrierten NMR-Docking-Studie qualitativ beschrieben wurden (Tabelle 2), besonders,

Tabelle 2: Bestimmung der biologischen Aktivität.

Verbindung	K_D (L11/RNA) [nM] ^[a]	IC_{50} [μ M] ^[b]
1 (TS)	0.26 ± 0.06	0.69 ± 0.03
2 (TS-1)	0.25 ± 0.06	0.80 ± 0.18
3 (ox-TS-1)	0.30 ± 0.14	0.88 ± 0.06
4 (epi-TS-1)	7.4 ± 1.4	$(0.63 \pm 0.08)^{[c]}$
5 (red-TS)	0.14 ± 0.07	— ^[d]
Nosiheptid	0.14 ± 0.08	— ^[d]
Micrococcin	2.3 ± 1.2	1.69 ± 0.12
Thiotipin	240 ± 13	7.02 ± 1
7 (Ring B offen)	882 ± 69	8.01 ± 2.8
6 (Ac-TS)	2.4 ± 0.28	1.67 ± 0.42

[a] Scheinbare Affinität an den rekonstituierten minimalen L11-rRNA-Zielkomplex (*T. thermophilus*). [b] IC_{50} für die Translationsinhibitierung aus einem gekoppelten Transkriptions-Translationsreporter-Assay in vitro. [c] Reäquilibriert zu **2** während des Experiments (siehe Text). [d] Verdeckt durch Autofluoreszenz des Liganden. Für Details siehe die Hintergrundinformationen.

wenn man die recht geringe Auflösung der Röntgenkristallstruktur des Zielkomplexes bedenkt (3–4 Å). Dies weist stark darauf hin, dass die Inhibitorstrukturen bei der Bindung an den Komplex keiner größeren Konformationsänderung unterliegen sollten. Thiopeptidinhibitoren könnten sich also entwickelt haben, um dieses Erkennungsmotiv abzubilden, etwa um die Domäne V des Elongationsfaktors EF-G in einem seiner Stadien während des Übergangs vom PRE- in den POST-Zustand nachzuahmen.^[30,31]

Zusammenfassend konnten durch integrierte Semisynthese, NMR-spektroskopische Strukturbestimmung in Lösung, computergestützte Docking-Studien und biologische Evaluierung wesentliche konformativ und strukturelle Parameter gefunden werden, die am Ansteuern der ribosomalen GAR durch Thiostrepton beteiligt sind.^[23] Diese ternäre Ligand-RNA-Protein-Wechselwirkung scheint von der Ligandenform und RNA-Erkennung bestimmt zu werden,^[6c] toleriert jedoch Strukturvariationen in einem gewissen Maß. Die NMR-Analyse der Strukturen von Thiostrepton (**1**) und den Derivaten **2–5** zeigte auch, dass das Molekülgerüst von **1** nicht perfekt geeignet sein mag, um die Pharmakophorregion dieser hochkomplexen RNA-Protein-Zielstruktur anzusteuern. Dieser leichte „Formfehler“ wird anscheinend durch die Dihydroxyisoleucin-Seitenkette ausgeglichen. Insgesamt zeigen die vorgestellten Daten strukturelle Rahmenbedingungen auf, innerhalb derer eine Verbesserung des pharmakologischen Profils dieser Verbindungen oder ihrer Analoga möglich sein wird.

Eingegangen am 11. Juni 2010,
veränderte Fassung am 20. September 2010
Online veröffentlicht am 1. März 2011

Stichwörter: Antibiotika · NMR-Spektroskopie · Ribosom ·
Thiopeptide · Wirkstoff-Design

- [1] Übersichten: 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] Übersichten: a) H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6900–6904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6770–6773; b) C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153–164.
- [3] a) J. F. Pagano, M. J. Weinstein, H. A. Stout, R. Donovick, *Antibiot. Ann.* **1955/1956**, 554; b) J. Vandeputte, J. D. Dutcher, *Antibiot. Ann.* **1955/1956**, 560; c) B. A. Steinberg, W. P. Jambor, L. O. Suydam, A. Soriano, *Antibiot. Ann.* **1955/1956**, 562.
- [4] a) G. H. Nesbitt, P. R. Fox, *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **1981**, *76*, 535–538; b) T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, John-Innes-Foundation, Norwich (Großbritannien), **2000**.
- [5] a) B. Anderson, D. Crowfoot-Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, *225*, 233–235; b) C. S. Bond, M. P. Shaw, M. S. Alphey, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2001**, *57*, 755–758.
- [6] Jüngste Entwicklungen: a) H. R. A. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhner, 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; e) S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Takagi, K. Shin-ya, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973–6981.
- [7] a) U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6593; b) S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H.-D. Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389–3393; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3317–3321.
- [8] J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 870–881.
- [9] G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. H. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769–778.
- [10] a) M. A. Markus, A. P. Hinck, S. Huang, D. E. Draper, D. A. Torchia, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 70–77; b) A. P. Hinck, M. A. Markus, S. Huang, S. Grzesiek, I. Kustonovich, D. E. Draper, D. A. Torchia, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 101–113; c) S. Ilin, A. Hoskin, O. Ohlenschläger, H. R. A. Jonker, H. Schwalbe, J. Wöhner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1611–1618; d) D. Lee, J. D. Walsh, P. Yu, M. A. Markus, T. Choli-Papadopoulou, C. D. Schwieters, S. Krüger, D. E. Draper, Y. X. Wang, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1007–1022.
- [11] a) K. Tori, K. Tokura, Y. Yoshimura, Y. Terui, K. Okabe, H. Otsuka, K. Matsuhita, F. Inagaki, T. Miyazawa, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 124–129; b) O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, B. F. Anderson, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 799–813; c) U. Mocek, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1649–1652.
- [12] a) B.-S. Yun, K.-i. Fujita, K. Furihata, H. Seto, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9683–9687; b) R. J. Lewis, R. A. Hughes, L. Alcaraz, S. P. Thompson, C. J. Moody, *Chem. Commun.* **2006**, 4215–4217.
- [13] S. Schoof, H.-D. Arndt, *Chem. Commun.* **2009**, 7113–7115.
- [14] a) O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 814–831; b) M. S. Puar, A. K. Ganguly, A. Afonso, R. Brambilla, P. Mangiaracina, O. Sarre, R. D. MacFarlane, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5231–5233.
- [15] R. Gratias, H. Kessler, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2027–2031.
- [16] Wir führten auch erste Untersuchungen in $[D_6]DMSO$, $[D_3]TFE$ und wässrigen Mischungen durch, die jeweils deutlich schlechtere Ergebnisse lieferten.
- [17] a) A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, *54*, 905–921; b) J. P. Linge, S. I. O'Donoghue, M. Nilges, *Methods Enzymol.* **2001**, *339*, 71–90.
- [18] J. P. Linge, M. Habeck, W. Rieping, M. Nilges, *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 334–342.
- [19] A. Bax, S. Grzesiek in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, Band 7 (Hrsg.: E. D. Becker, J. W. Emsley, B. C. Gerstein, S. I. Chan, T. C. Farrar, A. McDermott), Wiley, New York **1996**, S. 4157–4166.
- [20] GAMESS (<http://www.msg.ameslab.gov/gamess/gamess.html>) wurde eingesetzt: M. S. Gordon, M. W. Schmidt in *Theory and Application of Computational Chemistry: The First Forty Years* (Hrsg.: C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, G. E. Scuseria), Elsevier, Amsterdam, **2005**, S. 1167–1189.
- [21] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- [22] C. A. E. M. Spronk, S. B. Nabuurs, A. M. J. J. Bonvin, E. Krieger, G. W. Vuister, G. Vriend, *J. Biomol. NMR* **2003**, *25*, 225–234.
- [23] Die experimentellen Bedingungen sind wegen der Verfügbarkeit an Strukturdaten (*D. radiodurans*) und verlässlichen Binde- (*T. thermophilus*) und Translationsinhibitierungsstudien (*E. coli*) jeweils leicht unterschiedlich. Allerdings gestattet der hohe Grad an Konservierung von Struktur und Funktion der GAR einen Vergleich. Für Details siehe: D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *121*, 991–1004 und Lit. [6].
- [24] Eine ähnliche Vorgehensweise: B. Stauch, B. Simon, T. Basile, G. Schneider, N. P. Malek, M. Kalesse, T. Carloni, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4026–4030; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3934–3938.
- [25] P. Pfeffer, H. Gohlke, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 1868–1876.
- [26] M. B. Iskakova, W. Szaflarski, M. Dreyfus, J. Remme, K. H. Nierhaus, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e135.
- [27] Wir danken Dr. M. Brönstrup (Sanofi-Aventis, Frankfurt) und Dr. K. Shin-ya (BIRC Tokyo, Japan) für analytische Proben von Nosiheptid, Micrococcin und Thiotipin.
- [28] Die hohe Konzentration an Ribosomen (μM) sowie die komplexe gekoppelte Assaykinetik lassen nur einen qualitativen Vergleich der Translationsinhibition mit den Bindedaten zu.
- [29] A. A. Bowers, M. G. Acker, A. Koglin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7519–7527.
- [30] a) M. V. Rodnina, A. Savelbergh, N. B. Matassova, V. I. Katunin, Y. P. Semenkov, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9586–9590; b) H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, M. van Heel, W. Wintermeyer, *Cell* **2000**, *100*, 301–309.
- [31] Y.-G. Gao, M. Selmer, C. M. Dunham, A. Weixlbaumer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 694–699.