

Heterologe Rekonstitution der Ikarugamycin-Biosynthese in *E. coli***

Janine Antosch, Françoise Schaefers und Tobias A. M. Gulder*

Abstract: Polycyclische Tetramat-Makrolactame (PTM) bilden eine Familie biomedizinisch vielversprechender Naturstoffe mit anspruchsvollen Molekülstrukturen. Trotz dieser interessanten Eigenschaften der PTMs ist bislang relativ wenig über ihren biosynthetischen Ursprung bekannt, insbesondere bezüglich der Mechanismen der Ausbildung der Ringsysteme. Hier liefern wir erste Einblicke in diese Prozesse am Beispiel der Biosynthese des Ikarugamycins. Dies gelingt durch erstmalige heterologe Expression eines PTM-Biosynthesegen-clusters in *Escherichia coli*. Mit diesem Verfahren wird es in Zukunft nicht nur möglich sein, bereits bekannte PTM-Biosynthesegencluster mechanistisch genauer zu untersuchen, sondern auch durch Genom-Mining identifizierte, chemisch bislang unerschlossene PTM-Biosynthesewege chemisch und biochemisch eingehend zu beschreiben.

Polycyclische Tetramat-Makrolactame (PTMs) sind strukturell und biosynthetisch faszinierende Beispiele für komplexe bakterielle Naturstoffe. Sie haben alle eine Tetramäure-Einheit gemein, die Teil eines Makrolactam-Ringsystems ist. Direkt mit dem Makrolactam verknüpft finden sich zwei bis drei fünf- oder sechsgliedrige Carbacyclen, welche die beeindruckende strukturelle Vielfalt der PTMs begründen. Repräsentative Beispiele sind HSAF (**1**)^[1] und die Frontalamide (**2**)^[2] die beide mit einem 5-5-6-polycyclischen Ringsystem ausgestattet sind, das Ikarugamycin (**3**)^[3] und die Clifednamide (**4**)^[4] die mit einem 5-6-5-Cyclisierungsmuster vorliegen, sowie Cylindramid (**5**)^[5] und Alteramid A (**6**)^[6] die zwei fünfgliedrige Ringe aufweisen (Abbildung 1).

Abhängig von den individuellen Strukturen der PTMs wurde über ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten berichtet, angefangen von antibakteriellen und fungiziden bis hin zu zytotoxischen Eigenschaften.^[1–6] Trotz dieses vielversprechenden biomedizinischen Potenzials der PTMs und ihrer anspruchsvollen Strukturen ist über ihren biosynthetischen

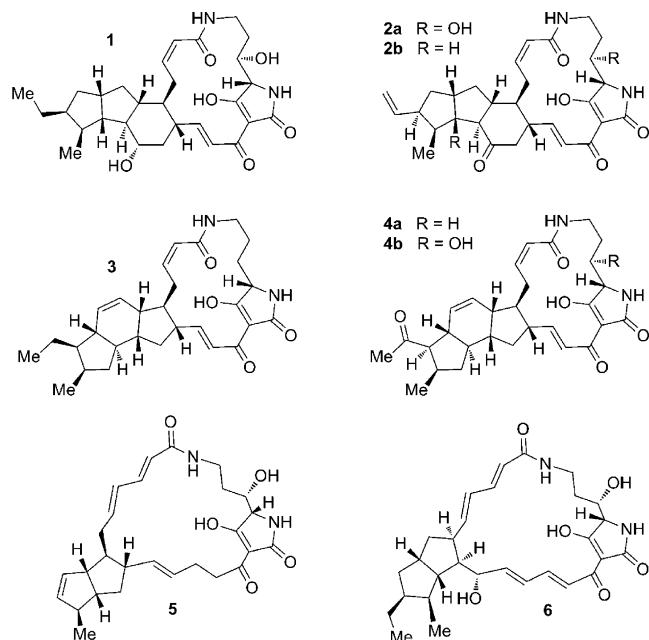


Abbildung 1. Die strukturelle Vielfalt der PTM-Naturstoffe veranschaulicht durch HSAF (**1**), die Frontalamide (**2**), Ikarugamycin (**3**), die Clifednamide (**4**), Cylindramid (**5**) und Alteramid A (**6**).

Ursprung überraschend wenig bekannt. Obwohl eine große Zahl potenzieller PTM-Biosynthesecluster in phylogenetisch diversen Bakterien weit verbreitet ist,^[2] sind die einzigen PTM-Strukturen, die bislang Biosynthesewegen zugeordnet wurden, die von **1**^[7] und **2**,^[2] zwei PTM-Familienmitglieder mit identischen Kohlenstoffgerüsten. Die jeweiligen Biosynthesegencluster sind folgerichtig ebenfalls sehr ähnlich, bestehend aus einer Hybridmaschinerie aus Polyketidsynthase und nichtribosomal Peptidsynthetase (PKS/NRPS)^[8] und einer Reihe von nachgeschalteten Red-/Ox-Enzymen (Abbildung 2). Am faszinierendsten dabei ist, dass die PKS nur aus einem einzigen Modul besteht, was stark auf einen iterativen Mechanismus hindeutet (*i*PKS). Während dies im Falle fungaler PKSs üblich ist,^[8d] ist es in bakteriellen Polyketid-Biosynthesewegen sehr ungewöhnlich.^[9] Die einzigen PTM-Biosyntheseschritte, die bislang näher untersucht worden sind, ergaben die Herkunft der Hydroxyfunktion am Ornithin-Baustein von **1** und **2**, die durch eine Post-PKS/NRPS-Hydroxylierung eingeführt wird,^[2,10] sowie die Bildung der Tetramäure-Einheit durch die terminale Thioesterasedomäne der NRPS,^[7b] ein Enzym, das auch ungewöhnliche Protease- und Peptidligase-Aktivitäten zeigt.^[11] Jedoch sind immer noch viele Schlüsselschritte der PTM-Biosynthese unbekannt, insbesondere der Mechanismus der biokatalytischen Bildung des polycyclischen Ringsystems.

[*] M.Sc. J. Antosch, Dipl.-Chem. F. Schaefers, Dr. T. A. M. Gulder
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1 (Deutschland)
M.Sc. J. Antosch, Dipl.-Chem. F. Schaefers, Dr. T. A. M. Gulder
Department Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: tobias.gulder@ch.tum.de
Homepage: <http://www.biosystemchemie.ch.tum.de>.

[**] J.A. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie (FCI) für ihr Promotionsstipendium. Dieses Projekt wird großzügig unterstützt von der Nordrhein-Westfälischen Akademie der Wissenschaften und der Künste („Junges Kolleg“) und der DFG (GU1233/2-1). Wir danken Prof. Dr. H.-P. Fiedler für die Bereitstellung von *Streptomyces* sp. Tü 6239.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310641> zu finden.

Um mehr Licht auf die Grundlagen der PTM-Biosynthese zu werfen, machten wir uns zunächst daran, ein Gencluster zu identifizieren, das ein PTM mit einem von **1** und **2** abweichenden Cyclisierungsmuster kodiert. Aufgrund seines Potenzials für die biochemische Untersuchung zellulärer Prozesse im Zusammenhang mit Endozytose^[12] wählten wir Ikarugamycin (**3**) als Zielmolekül. Fiedler und Zeeck et al. haben gezeigt, dass dieser Metabolit von *Streptomyces* sp. Tü 6239 produziert wird.^[13] Um eine PCR-vermittelte Identifizierung des PTM-Biosynthesegenclusters in diesem Stamm zu ermöglichen, wurden degenerierte Primer erstellt, die selektiv potenzielle PTM-Thioesterase-Domänen binden (siehe die Hintergrundinformationen). Basierend auf den Sequenzdaten des damit gewonnenen Amplikons wurden spezifische Primer abgeleitet und als Sonden zum Auffinden des Ikarugamycin-Genclusters in einer pCC1FOS-basierten genomischen Bibliothek von *Streptomyces* sp. Tü 6239 (1056 Klone) eingesetzt. Dies führte zur Identifizierung von vier Klonen, die die gewünschte Sequenz enthielten, von denen ein vielversprechender Kandidat, Fosmid Ika-Fos8, laut Endsequenzierung das gesamte PTM-Cluster zu enthalten schien. Ika-Fos8 wurde vollständig sequenziert (GATC) und die resultierenden Daten bioinformatisch analysiert. Sie enthüllten die Organisation des mutmaßlichen Ikarugamycin-Biosyntheseklusters (*ika*, Abbildung 2). Wie erwartet enthält

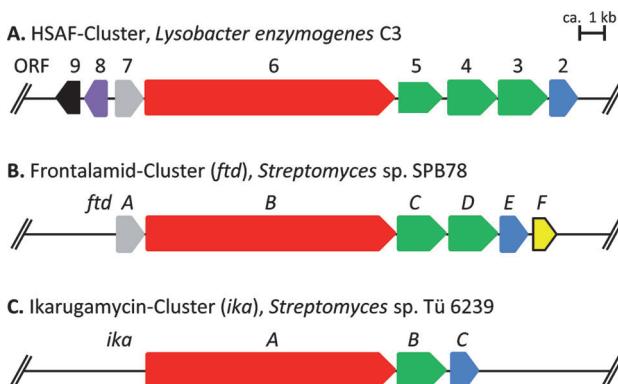


Abbildung 2. Biosynthesegencluster von HSAF (1, A), den Frontalamiden (2, B) und Ikarugamycin (3, C). Rot = iPKS/NRPS (Domänen gezeigt in Schema 1), grün = FAD-abhängige Oxidoreduktase, blau = Alkohol-Dehydrogenase, gelb = Cytochrom P450, grau = Sterol-Desaturase, violett = Ferredoxin-Reduktase, schwarz = Arginase.

der *ika*-Lokus das ungewöhnliche PKS/NRPS-System. Darüber hinaus wurden jedoch nur zwei Oxidoreduktasen identifiziert, was die Zahl der möglichen Post-PKS/NRPS-Modifikationen im Vergleich zu den beiden bekannten PTM-Genclustern stark reduziert. Vor- und nachgelagert zu diesen drei PTM-Biosynthesegenen wurde eine Reihe von Genen gefunden, die nicht in den beiden bekannten PTM-Biosynthesewegen zu finden waren (siehe Tabelle S4).

Der funktionale Beweis des Ika-Clusters sollte durch heterologe Rekonstitution in *E. coli* erbracht werden. Als Produzentenstamm wurde *E. coli* BAP1 genutzt,^[14] da er eine chromosomal Kopie der promiskuen Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp aus dem Surfactin-Biosyntheseweg besitzt,

die die posttranskriptionale Aktivierung von PKS- und NRPS-Carrier-Proteinen katalysiert.^[15] Basierend auf pHIS8^[16] wurden durch homologe Rekombination^[17] Vektoren erstellt, in denen die Expression der gewünschten Gene unter der Kontrolle des induzierbaren T7-Promotors steht (siehe die Hintergrundinformationen). Insgesamt wurden drei Plasmide erzeugt, die alle Gene von *ikaA* bis Orf + 7 (pJA_Orf + 7), die drei Gene *ikaABC* (pJA_ikaABC), oder lediglich *ikaAB* (pJA_ikaAB) enthielten (siehe Tabelle S4). In den mit diesen Konstrukten durchgeföhrten Expressionsexperimenten zeigte sich die Bildung von **3** nicht nur mit pJA_Orf + 7, sondern auch – sogar mit signifikant höherem Produktionsraten – mit dem auf drei Gene reduzierten pJA_ikaABC (Abbildung 3). In den Experimenten mit pJA_ikaAB hingegen

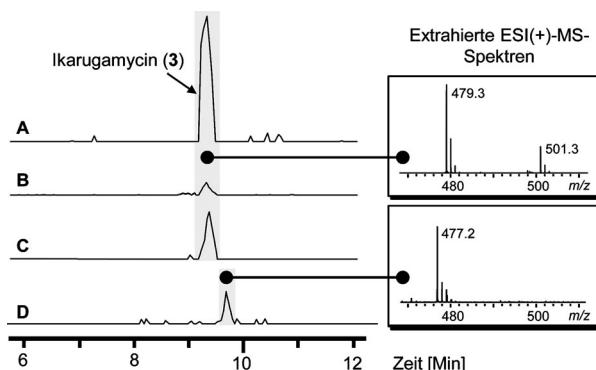
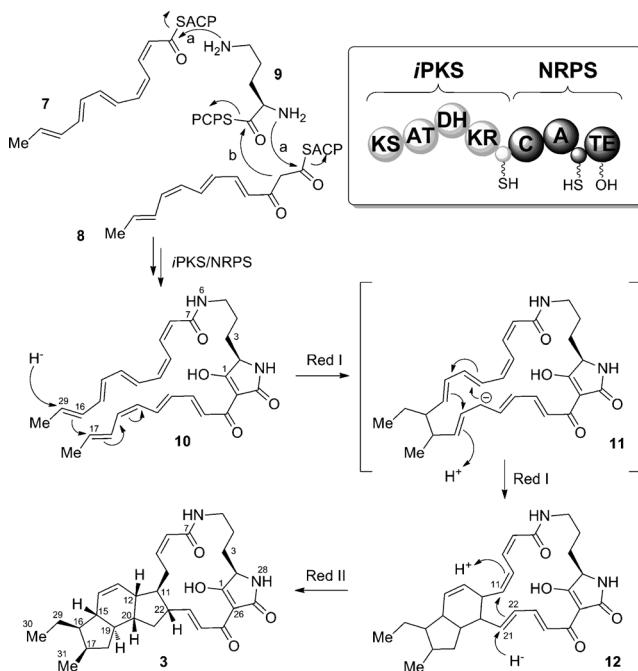


Abbildung 3. Analyse der heterologen Expressionsexperimente aus *E. coli* BAP1 mittels HPLC-ESI(+)-MS. „Extracted ion chromatograms“ (EICs) der Massen für *m/z* von **3** und **12**. A = Standardlösung von **3** (0.1 mg mL⁻¹). Extrakte von *E. coli* BAP1 pJA_Orf + 7 (B), pJA_ikaABC (C) oder pJA_ikaAB (D, Intensität × 10).

war **3** nicht detektierbar. Der damit erbrachte Nachweis, dass die drei Proteine IkaABC hinreichend und essentiell sind, um **3** zu erzeugen, offenbart einen bemerkenswert scharfen Kontrast zwischen der Simplizität des *ika*-Lokus und der strukturellen Komplexität von **3**. Unsere Experimente bilden zudem den ersten experimentellen Nachweis dafür, dass das PKS-Modul in der PTM Biosynthese tatsächlich iterativ arbeitet.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann ein hoch effizienter Biosyntheseweg zu **3** formuliert werden. Das iPKS-Modul in IkaA bildet dabei nacheinander zwei ACP-gebundene, ungesättigte Hexaketide **7** und **8**, die durch die Kondensationsdomäne der NRPS an die Stickstoff-Funktionen des PCP-gebundenen Ornithins (**9**) übertragen werden (Schema 1, Pfeile a).^[18] Die Thioesterase katalysiert anschließend die Bildung der Tetramäure Einheit^[7b] (Pfeil b) mit gleichzeitiger Abspaltung der Vorstufe **10** von der Synthetase. Das Zwischenprodukt **10** wird durch Hydrid-induzierte Cyclisierung/Protonierung, katalysiert durch die beiden Oxidoreduktasen IkaBC, weiter prozessiert. Reduktase I (Red I) erzeugt so eine Bindung zwischen C16 und C17. Die theoretische Zwischenstufe **11** cyclisiert direkt weiter zu Verbindung **12**, die bereits zwei Carbacylen trägt. Der letzte Ringschluss zwischen C22 und C11 wird dann durch Reduktase II (Red II) katalysiert, wiederum durch reduktive Cyc-



Schema 1. Möglicher Biosyntheseweg zu **3**. Reaktionen katalysiert von (a) der C und (b) der TE. KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, DH = Dehydratase, KR = Ketoreduktase, C = Kondensationsdomäne, A = A-Domäne, TE = Thioesterasedomäne. Die nichtmarkierten thioltragenden Domänen in iPKS und NRPS sind Carrier-Proteine.

lisierung.^[19] Dies komplettiert die biosynthetische Sequenz zu **3** unter ausschließlicher Verwendung der drei Enzyme IkaABC. Der gezeigte Biosyntheseweg wirft aber auch die Frage auf, welche der beiden Oxidoreduktasen jeweils welche Ringschlussreaktion bewirkt. Bei der Analyse der heterologen Expressionsexperimente mit pJA_ikaAB fällt auf, dass sich anstatt **3** ein Metabolit mit leicht erhöhter Retentionszeit anreichert, dessen molekulare Masse der des postulierten Intermediats **12** entspricht (Abbildung 3D; die relative Intensität des Chromatogramms D wurde im Vergleich zu A-C um den Faktor 10 erhöht). Obwohl aufgrund der geringen gebildeten Mengen dieses Metabolits eine Strukturaufklärung durch NMR-Analyse nicht möglich war, deutet dies stark darauf hin, dass die initiale Cyclisierungskaskade von IkaB (= Red I) vermittelt wird, während IkaC (= Red II) die Bildung des letzten Carbacyclus katalysiert. Fehlt IkaC, wie in pJA_ikaAB, bleibt die finale Cyclisierung aus und die Biosynthese somit auf der Stufe von **12** stehen. Diese Annahme wird unterstützt von bioinformatischen Analysen putativer PTM-Biosynthesegencluster in sequenzierten bakteriellen Genomen, in denen immer ein Homolog von *ikaB* zu finden ist, während sich nicht in allen eine Kopie einer Alkoholdehydrogenase, hier kodiert durch *ikaC*, befindet. Dies ist in Einklang mit der Beobachtung, dass alle bislang isolierten PTMs eine Cyclisierung zwischen C16 und C17 aufweisen und damit eine Kopie von Red I enthalten müssen, wohingegen manche Vertreter, zum Beispiel **5** und **6**, lediglich zwei kleine Carbacyclen enthalten und somit keine funktionale Kopie von Red II aufweisen dürfen.

Zusammenfassend haben wir PCR-Sonden zur selektiven Amplifikation von PTM-Thioesterasedomänen entwickelt, mit deren Hilfe wir das Ikarugamycin-Biosynthesegencluster *ika* identifizierten. Dieses System wurde durch homologe Rekombination in einen induzierbaren Expressionsvektor überführt, in *E. coli* BAP1 transformiert und dort zur heterologen Produktion von **3** genutzt. Die so gewonnenen Erkenntnisse lassen auf einen sehr kompakten Biosyntheseweg zu **3** schließen. Dabei zeigt sich eine große Diskrepanz zwischen der Simplizität des *ika*-Lokus, bestehend aus nur drei Genen, und der Komplexität des dort kodierten Naturstoffs **3**. Unsere Untersuchungen bilden eines der wenigen Beispiele der erfolgreichen heterologen Expression eines bakteriellen PKS-Systems in *E. coli* und das erste überhaupt für eine bakterielle iPKS. Das hier vorgestellte einfache System zur PTM-Produktion kann nun verwendet werden, um kryptische iPKS/NRPS-Biosynthesewege aus anderen Bakterien zu untersuchen. Es stellt somit ein wertvolles Werkzeug für die zielgerichtete Entdeckung neuer PTMs und damit potenter biologisch aktiver Naturstoffe dar.

Eingegangen am 8. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 12. Februar 2014

Stichwörter: Biosynthese · Heterologe Expression · Ikarugamycin · Naturstoffe · PTMs

- [1] P. R. Graupner, S. Thornburgh, J. T. Mathieson, E. L. Chapin, G. M. Kemmitt, J. M. Brown, C. E. Snipes, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1014–1019.
- [2] J. A. V. Blodgett, D.-C. Oh, S. Cao, C. R. Currie, R. Kolter, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11692–11697.
- [3] K. Jomon, Y. Kuroda, M. Ajisaka, H. Sakai, *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 271–280.
- [4] S. Cao, J. A. V. Blodgett, J. Clardy, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4652–4654.
- [5] S. Kanazawa, N. Fusetani, S. Matsunaga, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1065–1068.
- [6] H. Shigemori, M.-A. Bae, K. Yazawa, T. Saaki, J. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4317–4320.
- [7] a) F. Yu, K. Zeleta-Rivera, X. Zhu, J. Huffman, J. C. Millet, S. D. Harris, G. Yuen, X. -C. Li, L. Du, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 64–72; b) L. Lou, G. Qian, Y. Xia, J. Hang, H. Chen, K. Zeleta-Rivera, Y. Li, Y. Shen, P. H. Dussault, F. Liu, L. Du, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 643–645.
- [8] Übersichtsartikel zur PKS-, NRPS- und hybriden PKS-NRPS-Biosynthese: a) C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; b) S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715–738; c) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496; d) D. Böttger, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 28–42.
- [9] Die wenigen bislang charakterisierten iPKS-Systeme aus Bakterien führen generell zu einfachen Produkten, oder, als Teil größerer Biosynthesegencluster, zu relativ einfachen Biosynthese-Intermediaten, die in komplexere Sekundärstoffe eingebaut werden: a) S. Gaisser, A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, A. Bechthold, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6271–6278; b) J. Ahlert, E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, N. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R. E. Whitwam, C. M. Farnet, J. S. Thorson, *Science* **2002**, *297*, 1173–1176; c) B. Sthapit, T. J. Oh, R. Lamichhene, K. Liou, H. C. Lee, C. C. Kim, J. K. Sohng, *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 201–206; d) W.

- Liu, K. Nonaka, L. Nie, J. Zhang, S. D. Christenson, J. Bae, S. G. Van Lanen, E. Zazopoulos, C. M. Farnet, C. F. Yang, B. Shen, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 293–302; e) S. C. Wenzel, F. Gross, Y. Zhang, J. Fu, A. F. Stewart, R. Müller, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 349–356; f) X. Y. Jia, Z. Tian, L. Shao, X. Qu, Q. Zhang, J. Tang, G. Tang, W. Liu, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 575–585; g) L. Shao, X.-D. Qu, X.-Y. Jia, Q.-F. Zhao, Z.-H. Tian, M. Wang, G.-L. Tang, W. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *345*, 133–139; h) S. G. Van Lanen, T.-J. Oh, W. Liu, E. Wendt-Pienkowski, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13082–13094; i) Q. Zhao, Q. He, W. Ding, M. Tang, Q. Kang, Y. Yu, W. Deng, Q. Zahng, J. Fang, G. Tang, W. Liu, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 693–705; j) H. Kage, M. F. Kreutzer, B. Wackler, D. Hoffmeister, M. Nett, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 764–771.
- [10] Y. Li, J. Huffman, Y. Li, L. Du, *MedChemComm* **2012**, *3*, 982–986.
- [11] L. Lou, H. Chen, R. L. Cerny, Y. Li, Y. Shen, L. Du, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4–6.
- [12] a) K. Hasumi, C. Shinohara, S. Naganuma, A. Endo, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 841–846; b) E. Onelli, C. Prescianotto-Baschong, M. Caccianiga, A. Moscatelli, *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3051–3068.
- [13] M. Bertasso, M. Holzenkämpfer, A. Zeeck, E. Stackebrandt, W. Beil, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 364–371.
- [14] B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **2001**, *291*, 1790–1792.
- [15] a) R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936; b) L. E. N. Quadri, P. H. Weinreb, M. Lei, M. M. Nakano, P. Zuber, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1585–1595.
- [16] J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 890–902.
- [17] a) K. A. Datsenko, B. L. Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6640–6645; b) B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1541–1546.
- [18] Die Konfiguration der Doppelbindungen in **7** und **8** nach deren Aufbau durch die *iPKS* sowie potenzielle Konfigurationsänderungen durch die Oxidoreduktasen können momentan nicht vorhergesagt werden.
- [19] Alternativ könnte **10** direkt nach der ersten Cyclisierung an C18 protoniert werden, gefolgt von einer (nichtenzymatischen) Diels-Alder-Cycloaddition des Diens an C12 bis C15 mit der in diesem Fall *trans*-konfigurierten Doppelbindung an C19/C20; die reduktiven Cyclisierungsschritte könnten ferner auch nach einer initialen Diels-Alder-Cycloaddition erfolgen.