

Gliotoxin: wie die Natur Epidithiobrücke knüpft**

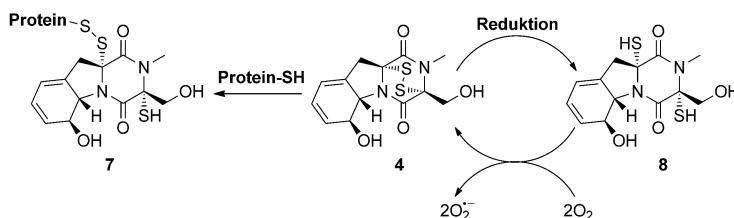
Tynchtyk Amatov und Ullrich Jahn*

Biosynthese · Disulfide · Epipolythiodioxopiperazine ·

Gliotoxin · Überbrückte Alkaloide

Alkaloide mit einem zentralen Bicyclo[n.2.2]piperazindion-Gerüst (Diketopiperazine, DKPs, $n \geq 2$), das an den Positionen 3 und 6 verbrückt ist, sind eine wichtige, stetig wachsende Klasse von Sekundärmetaboliten. DKP des Typs **1**,^[1] die aus Aminosäuren mithilfe nichtribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) oder tRNA-abhängiger Cyclodipeptidsynthetasen (CDPS)^[2] gebildet werden, sind die zentralen Vorstufen, aus denen vielfältige Alkaloide mit verschiedenartigen Brückentypen und -größen durch enzymatische Transformationen hervorgehen (Abbildung 1). Dazu gehören einerseits prenylierte Indolalkaloide wie Brevianamid A (**2**)^[3] oder das ungewöhnliche Antibiotikum Bicyclomycin (**3**).^[4] Andererseits führen oxidative Modifikationen von **1** zu vielfältigen schwefelhaltigen Naturstoffen, den Epipolythiodioxopiperazinen (ETP), mit Gliotoxin (**4**) oder den höheren ETP-Alkaloiden **5** und **6** als prominenten Beispielen.^[5]

Das 1943 isolierte Gliotoxin (**4**) war der erste beschriebene ETP- und auch DKP-Metabolit überhaupt.^[6] Seine Struktur blieb falsch zugeordnet, bis Woodward und Mitarbeiter 1958 die zu dieser Zeit ungewöhnliche, aber richtige Struktur mit einer Disulfidbrücke vorschlugen.^[7] Es wird angenommen, dass sein breites Spektrum biologischer Eigenschaften, darunter antivirale, antibakterielle und das Immunsystem unterdrückende Aktivitäten, auf der Reaktivität der Disulfidbrücke beruht (Schema 1), die in der Lage ist,



Schema 1. Die biologische Aktivität von Gliotoxin basierend auf der Disulfidbrücke.

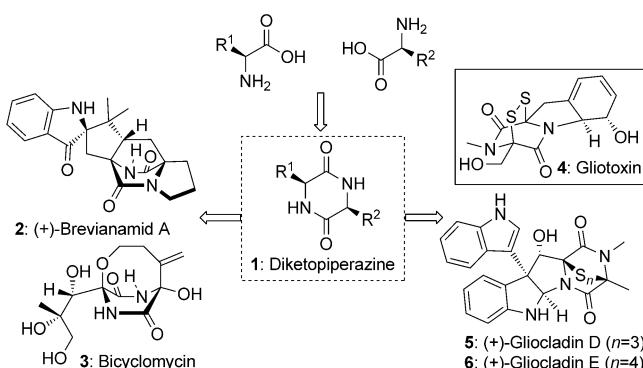


Abbildung 1. Die Vielfalt überbrückter Diketopiperazinalkaloide.

reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen und mit Proteinen zu konjugieren.^[8]

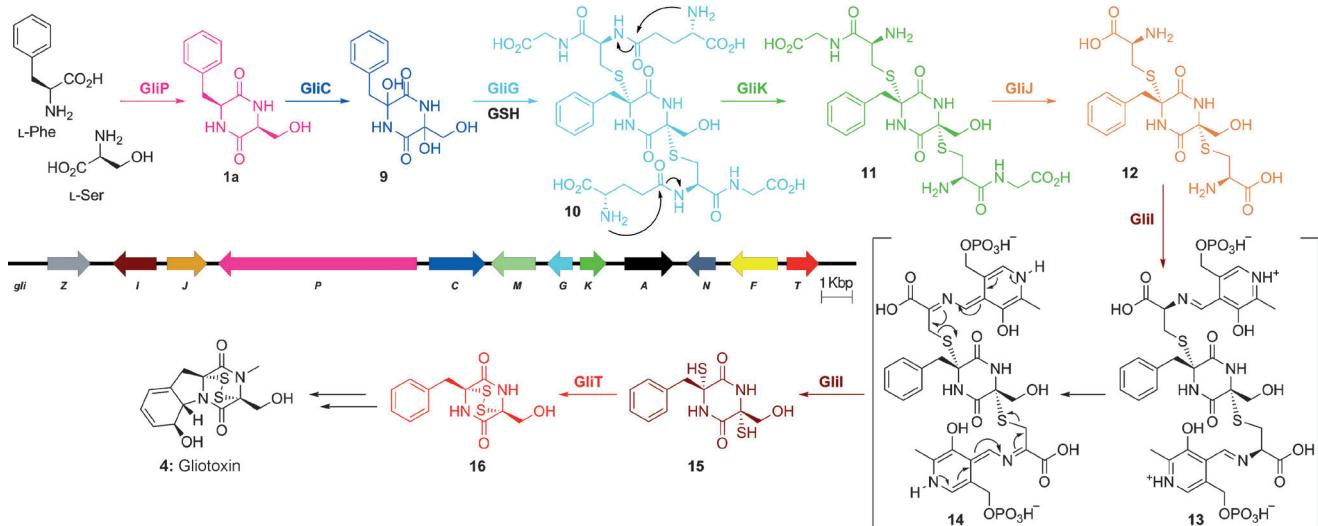
Ungeachtet der wachsenden Bedeutung der ETP-Alkaloidklasse wurden lange kaum Fortschritte bei der Aufklärung der Biosynthese von **4** und von verwandten Naturstoffen gemacht. Die Beschränkungen der klassischen Isotopenmarkierungs- und Fütterungsmethodik gewährten keine weiteren Einblicke als die, dass Phenylalanin und Serin die Vorstufen des zentralen DKP-Intermediats *cyclo-(L-Phe-L-Ser)* (**1** mit $R^1 = \text{Benzyl}$, $R^2 = \text{Hydroxymethyl}$) sind.^[9] Die interessantesten Fragen zur Biosynthese von Gliotoxin – wie die Schwefelatome eingeführt werden und wie die Epidithiobrücke gebildet wird – konnten ein halbes Jahrhundert höchstens in Form von Hypothesen beantwortet werden. Die schnelle Bildung der Epidithiobrücke durch Luftoxidation des DKP-abgeleiteten *cis*-Dithiols wurde durch viele Synthesestudien bestätigt, führt aber nur zu der viel wichtigeren Frage, ob ihre Bildung spontan oder enzymkatalysiert erfolgt.

In den letzten 20 Jahren hat ein grundlegender Wandel in der Forschung – von der Anwendung klassischer Techniken hin zur Untersuchung der jeweiligen Gene, die für bestimmte Naturstoffe kodieren – die Aufklärung der Naturstoffbiosynthese revolutioniert.^[10] Anstatt markierte Vorstufen zu synthetisieren, wurden die Gene und die durch sie kodierten Enzyme das Studienobjekt. So kann ein viel tieferer Einblick in das „Handwerkszeug“ der Natur gewonnen werden, und

[*] M. Sc. T. Amatov, Dr. U. Jahn

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik
Flemingovo náměstí 2, 16610 Prag 6 (Tschechische Republik)
E-Mail: jahn@uochb.cz
Homepage: <http://www.uochb.cz/web/structure/616.html>

[**] Wir danken dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik (RVO: 61388963) und dem Gilead Sciences & IOCB Forschungszentrum für großzügige finanzielle Förderung.



Schema 2. Die jetzt bestätigten Biosyntheseschritte auf dem Weg zu Gliotoxin. Einschub: Gliotoxin-Gencluster von *Aspergillus fumigatus*.

dies führte in der Folge zu neuen Forschungsgebieten wie der kombinatorischen Biosynthese,^[11] der chemoenzymatischen Totalsynthese und der Mutasyntese.^[12]

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Aspergillus fumigatus* im Jahre 2005^[13] ermöglichte die Identifikation der für die Biosynthese von Gliotoxin verantwortlichen Gene durch Genom- und Bioinformatik-basierte Wirkstoffsuche (genome mining).^[14] Der so gefundene Gliotoxin-Biosynthesegencluster, der aus zwölf Genen besteht, wurde das Forschungsobjekt einer Reihe von Labors, um die Biosynthese von Gliotoxin aufzuklären (Schema 2). Die Gruppe von Walsh zeigte 2006, dass das größte Gen, *gliP*, für eine multi-modulare NRPS kodiert. Das daraus abgeleitete Enzym GliP katalysiert tatsächlich die Bildung des DKP *cyclo*-(L-Phe-L-Ser) (**1a**), wodurch die Ergebnisse der ein halbes Jahrhundert zuvor durchgeföhrten Fütterungsexperimente bestätigt wurden.^[15]

Nun haben Hertweck und Mitarbeiter in einer Reihe von wegweisenden Studien alle Schlüsselschritte der Biosynthese von Gliotoxin ausgehend von der Einführung der Schwefelatome in **1a** bis hin zur Bildung der Disulfidbrücke in **16** mithilfe des Genoms und der Molekularbiologie aufgeklärt.^[16]

Schon 2010 zeigten die Gruppen von Hertweck^[16a] und Doyle^[17] unabhängig voneinander, dass die Bildung der Disulfidbrücke in **4** durch ein FAD-abhängiges homodimeres Enzym GliT mit Sauerstoff als terminalem Oxidans aus dem Dithiol **8** erfolgt (vgl. Schema 1).

Darauf folgend demonstrierte die Gruppe von Hertweck^[16b] sowohl durch In-vitro- als auch durch In-vivo-Studien, dass eine zweifache Dihydroxylierung von **1a** durch GliC, eine Cytochrom-P450-Monooxygenase, die Voraussetzung für die Einführung der Schwefelfunktionen in das resultierende DKP **9** ist, was mithilfe von GliG, einer Glutathion-S-Transferase, erfolgt, deren Rolle gleichzeitig auch von Doyle et al. bestimmt wurde.^[18] Die Konfiguration der Hydroxygruppen in **9** wurde nicht aufgeklärt, jedoch erfolgt die Einführung der Glutathioneinheiten *cis*-selektiv. Für das

resultierende Bis(glutathion)-Addukt **10** gelang die Isolierung und vollständige Charakterisierung aus Mutanten, denen das Gen *gliK* fehlte, das für eine γ -Glutamat-Cyclotransferase kodiert, die für die Verarbeitung von **10** zum Gly-Cys-Intermediat **11** und Pyroglutamat verantwortlich ist.^[16d] GliJ wurde als eine Diptidase identifiziert, die die beiden Glycineinheiten unter Bildung des kurzlebigen und instabilen Bis(cysteinyl)-DKP **12** abspaltet. Wenn das Gen *gliI* abgeschaltet wurde, resultierten Mutanten, die nicht in der Lage waren, Gliotoxin zu bilden, aber aus 140 L Kulturmedium konnten 1.49 mg **12** erhalten und vollständig charakterisiert werden. Die Inkubation von **12** mit dem gereinigten GliI-Enzym, das eine homodimere, Pyridoxalphosphat-abhängige C-S-Lyase ist, ergab vermutlich über die Zwischenstufen **13** und **14** das Dithiol **15** zusammen mit dem durch Luftoxidation entstandenen Epidisulfid **16**.^[16c]

Hertweck et al. zeigten als Höhepunkt dieser Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung der gesamten Enzymmaschinerie für die Umwandlung des DKP **1a** in das Epidisulfid **16**, dass letzteres auch *in vitro* durch Inkubation des Bis(glutathion)-Addukts **10** mit einem Gemisch der Enzyme GliK, GliJ, GliI und GliT in einer Eintopf-Enzymkaskade erhalten werden kann.^[16d] Dies belegt die Anwendbarkeit von GliT sowohl zur Oxidation von **8** als auch der von **15**.

Vor kurzem gelang die Lösung der Kristallstrukturen von GliT und zwei verwandten Thioloxidinasen durch Huber und Groll in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Hertweck.^[19] Die so erhaltenen Erkenntnisse ermöglichen es, einen vereinheitlichten Mechanismus der enzymatischen Disulfidbrückenbildung zu formulieren.

Mit diesen Arbeiten konnten alle Schlüsselschritte der Biosynthese von Gliotoxin aufgeklärt und Schritt für Schritt experimentell nachvollzogen werden. Mit der Charakterisierung von GliG als der ersten Glutathiontransferase konnte ein tiefer Einblick in den enzymatischen Einbau von Schwefel in Sekundärmetabolite gewonnen werden. Die Erkenntnisse haben biologische Konsequenzen: Beispielsweise ist die Selbstresistenz von *Aspergillus fumigatus* gegenüber seinem

eigenen Toxin eine direkte Folge der Rolle des Disulfid-bildenden Schlüsselenzyms GliT.^[16a,d,17] Es kann angenommen werden, dass GliT die schnelle Oxidation des Dithiols **8** zu **4** zusätzlich zu der von **16** aus **15** übernimmt und damit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und unspezifischer Proteinkonjugation verhindert. Dies kann medizinische Auswirkungen haben: Mit dem Vorliegen der Kristallstrukturanalyse kann GliT nun als die Achillesferse von *Aspergillus fumigatus* identifiziert werden, und das Design von möglichen Medikamenten für die Behandlung der invasiven Aspergillose kann vorangetrieben werden, für die Gliotoxin als Hauptvirulenzfaktor angesehen wird. Insgesamt zeigt das Beispiel der Gliotoxinbiosynthese, wie radikal sich die Naturstoffchemie mithilfe der Genetik, Bioinformatik, Molekularbiologie, Biotechnologie und moderner analytischer Methoden verändert hat und welche zuvor nicht möglichen Erkenntnisse gewonnen werden können.

Eingegangen am 18. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 24. Februar 2014

-
- [1] R. Huang, X. Zhou, T. Xu, X. Yang, Y. Liu, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 2809–2829.
- [2] P. Belin, M. Moutiez, S. Lautru, J. Seguin, J.-L. Pernodet, M. Gondry, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 961–979.
- [3] J. M. Finefield, J. C. Frisvad, D. H. Sherman, R. M. Williams, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 812–833.
- [4] R. M. Williams, C. A. Durham, *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 511–540.
- [5] D. M. Gardiner, P. Waring, B. J. Howlett, *Microbiology* **2005**, *151*, 1021–1032.
- [6] J. R. Johnson, W. F. Bruce, J. D. Dutcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, *65*, 2005–2009.
- [7] M. R. Bell, J. R. Johnson, B. S. Wildi, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1001–1001.
- [8] P. Waring, A. Sjaarda, Q. H. Lin, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1195–1201.
- [9] G. W. Kirby, P. L. Graham, D. J. Robins, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1978**, 1336–1338, zit. Lit.
- [10] C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469–2493.
- [11] C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 124–134.
- [12] a) F. Klopp, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 513–520; b) T. Hudlický, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1785–1796; c) A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4086–4096; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012–4022; d) A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245–3259; e) J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 25–34.
- [13] W. C. Nierman, A. Pain, M. J. Anderson, J. R. Wortman, H. S. Kim, J. Arroyo, M. Berriman, K. Abe, D. B. Archer, C. Bermejo, J. Bennett, P. Bowyer, D. Chen, M. Collins, R. Coulson, R. Davies, P. S. Dyer, M. Farman, N. Fedorova, N. Fedorova, T. V. Feldblyum, R. Fischer, N. Fosker, A. Fraser, J. L. Garcia, M. J. Garcia, A. Goble, G. H. Goldman, K. Gomi, S. Griffith-Jones, R. Gwilliam, B. Haas, H. Haas, D. Harris, H. Horiuchi, J. Huang, S. Humphrey, J. Jimenez, N. Keller, H. Khouri, K. Kitamoto, T. Kobayashi, S. Konzack, R. Kulkarni, T. Kumagai, A. Lafont, J. P. Latge, W. X. Li, A. Lord, W. H. Majoros, G. S. May, B. L. Miller, Y. Mohamoud, M. Molina, M. Monod, I. Mouyna, S. Mulligan, L. Murphy, S. O’Neil, I. Paulsen, M. A. Penalva, M. Perteal, C. Price, B. L. Pritchard, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, N. Rawlins, M. A. Rajandream, U. Reichard, H. Renauld, G. D. Robson, S. R. de Cordoba, J. M. Rodriguez-Pena, C. M. Ronning, S. Rutter, S. L. Salzberg, M. Sanchez, J. C. Sanchez-Ferrero, D. Saunders, K. Seeger, R. Squares, S. Squares, M. Takeuchi, F. Tekaia, G. Turner, C. R. V. de Aldana, J. Weidman, O. White, J. Woodward, J. H. Yu, C. Fraser, J. E. Galagan, K. Asai, M. Machida, N. Hall, B. Barrell, D. W. Denning, *Nature* **2005**, *438*, 1151–1156.
- [14] D. M. Gardiner, B. J. Howlett, *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *248*, 241–248.
- [15] C. J. Balibar, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2006**, *45*, 15029–15038.
- [16] a) D. H. Scharf, N. Remme, T. Heinekamp, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10136–10141; b) D. H. Scharf, N. Remme, A. Habel, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12322–12325; c) D. H. Scharf, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, M. Roth, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Angew. Chem. 2012*, *124*, 10211–10215; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10064–10068; d) D. H. Scharf, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, K. Willing, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11298–11301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11092–11095.
- [17] M. Schrettli, S. Carberry, K. Kavanagh, H. Haas, G. W. Jones, J. O’Brien, A. Nolan, J. Stephens, O. Fenelon, S. Doyle, *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000952.
- [18] C. Davis, S. Carberry, M. Schrettli, I. Singh, J. C. Stephens, S. M. Barry, K. Kavanagh, G. L. Challis, D. Brougham, S. Doyle, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 542–552.
- [19] D. H. Scharf, M. Groll, A. Habel, T. Heinekamp, C. Hertweck, A. A. Brakhage, E. M. Huber, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2253–2256; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2221–2224.