

# Die Mikroben in uns und der Wettlauf um die Struktur und Biosynthese von Colibactin\*\*

Helge B. Bode\*

Colibactin · Darmkrebs · Dysbiose · Mikrobiom ·  
Prodrug-Aktivierung

Der menschliche Körper besteht aus ungefähr 200 Zelltypen (<http://www.bioon.com/book/biology/mboc/mboc.cgi?code=220801800040279.htm>) mit insgesamt  $10^{13}$  Zellen. Dies resultiert in so verschiedenen Geweben und Organen wie dem Gehirn, der Haut, der Leber oder den Blutgefäßen. Auch wenn diese Zahlen eindrucksvoll sowohl die Einfachheit als auch die Komplexität des menschlichen Körpers, seiner zugrundeliegenden Biochemie und der ständig stattfindenden Zell-Zell-Kommunikation demonstrieren, die für die offensichtliche Multizellularität verantwortlich sind, so sind sie doch unbedeutend im Vergleich zur Anzahl und Diversität von Bakterien, die auf und in uns leben.

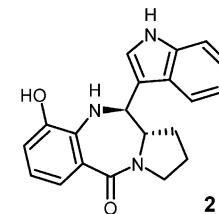
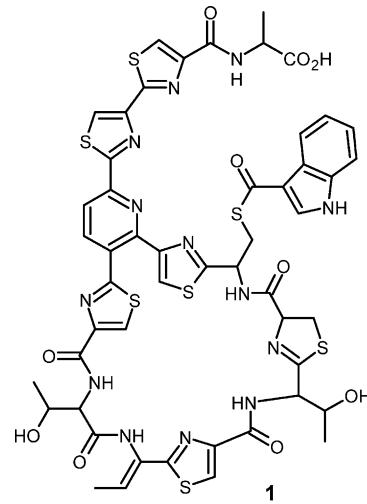
Vorsichtige Schätzungen gehen von mindestens 2000 verschiedenen Bakterienarten aus, die sich zu insgesamt  $10^{14}$  mikrobiellen Zellen (10-mal mehr als menschliche Zellen) auf und in jedem menschlichen Körper addieren (<http://hmpdacc.org>). Sie sind essentiell für die Verdauung, trainieren das Immunsystem, beschützen uns gegen „böse“ Bakterien, z.B. indem sie deren Eintrittspforten blockieren, oder sie produzieren Vitamine wie z.B. Biotin oder Vitamin K.

Insbesondere Darmbakterien gelten generell als segensreich für unsere Gesundheit, und jüngste Erkenntnisse zeigen, dass sogar der Beginn bzw. die Prognose oder Schwere bestimmter neurologischer Erkrankungen durch die Darmflora beeinflusst werden.<sup>[1]</sup> Bezuglich des menschlichen Immunsystems scheint es sogar so zu sein, dass dieses nicht entwickelt wurde, um uns vor mikrobiellen Infektionen zu schützen, sondern es scheint vielmehr von Bakterien entwickelt worden zu sein, die es das ganze Leben lang kontrollieren.<sup>[2]</sup>

Mit der Entwicklung moderner Sequenziertechnologien wurde offensichtlich, dass nicht nur die bakterielle Diversität, sondern auch die Anzahl der bakteriellen Gene die der

menschlichen Zellen bei weitem übertrifft und mehrere hundertmal größer ist.

Unter diesen Genen sind auch Biosynthese-Gencluster (BGCs), die an der Biosynthese typischer Makrolid-Polykette, nichtribosomal erzeugter Peptide oder ribosomal erzeugter Peptide, die post-translational modifiziert wurden (RiPPs), beteiligt sind. Ein Beispiel ist das RiPP Lactocillin (1), das große strukturelle Ähnlichkeit mit einem Antibioti-



kum hat, das sich derzeit in der klinischen Phase befindet.<sup>[3]</sup> Es könnte also sein, dass auch die von unserer Mikroflora produzierten Antibiotika zu unserer Gesundheit beitragen. Auf der anderen Seite kann ein Ungleichgewicht zwischen Symbionten (nützlichen Bakterien), Kommensalen (Bewohner des menschlichen Körpers, die weder Vor- noch Nachteile verschaffen) oder Pathogenen (schädlichen Bakterien), eine sogenannte Dysbiose, direkt mit Fettleibigkeit, Diabetes,

[\*] Prof. Dr. H. B. Bode

Merck Stiftungsprofessur für Molekulare Biotechnologie  
Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt  
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)  
und  
Buchmann Institute for Molecular Life Sciences (BMLS)  
Goethe-Universität Frankfurt  
Max-von-Laue-Straße 15, 60438 Frankfurt a. M. (Deutschland)  
E-Mail: h.bode@bio.uni-frankfurt.de  
Homepage: <http://www.uni-frankfurt.de/fb/fb15/institute/inst-3-mol-biowiss/AK-Bode>

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der DFG unterstützt.

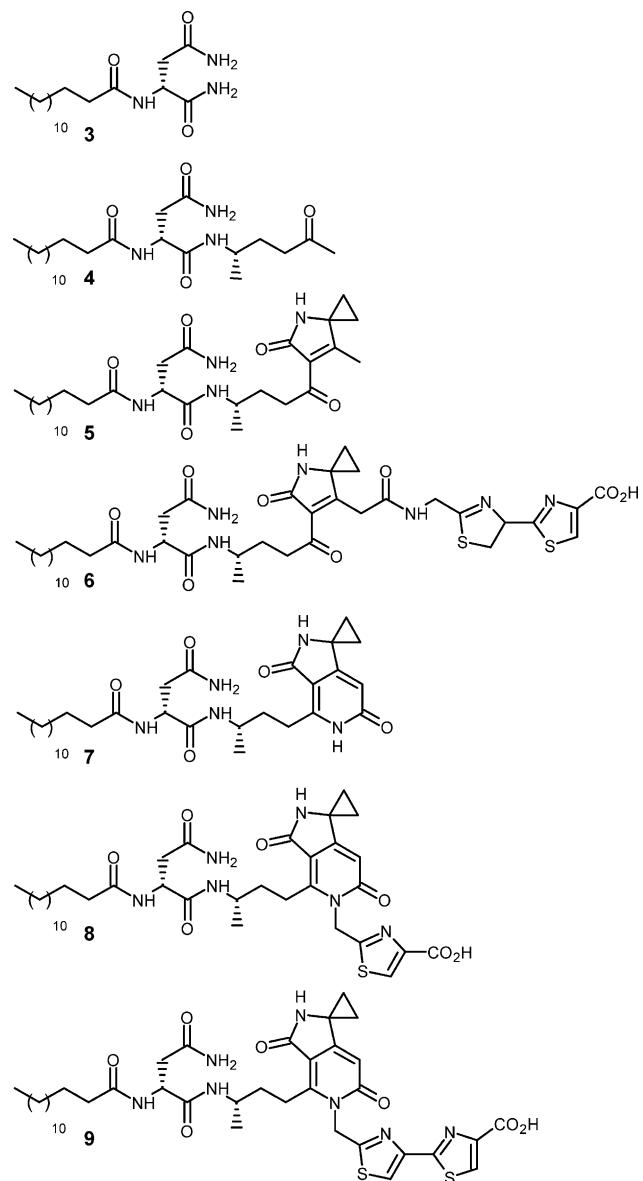
chronischen Entzündungen wie Morbus Crohn oder sogar Krebs korreliert werden.<sup>[2]</sup> Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen sich erst langsam herauskristallisieren, gibt es doch einige jüngste Beispiele, dass bakterielle niedermolekulare Naturstoffe auch an diesen Prozessen beteiligt sind.<sup>[4]</sup>

Tilivallin (**2**), ein zytotoxisches Pyrrolobenzodiazepin, entsteht durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) in *Klebsiella oxytoca*.<sup>[5]</sup> *K. oxytoca* ist die Ursache für die Antibiotika-assoziierte blutige Darmentzündung (antibiotic-associated hemorrhagic colitis; AAHC), die durch das verstärkte Wachstum von *K. oxytoca* nach Gabe bestimmter Antibiotika verursacht wird. Dieses Bakterium wird in 2–10 % aller gesunden Menschen gefunden und kann nach einer Antibiotikatherapie die Darmflora dominieren, sodass es durch Tilivallin zur Apoptose und Zerstörung der Darmepithelbarriere und damit zu einer Darmentzündung kommen kann.

Ein weiteres Beispiel für einen berühmt-berüchtigten Naturstoff eines Darmbakteriums ist Colibactin. Bereits vor 10 Jahren wurde gezeigt, dass *Escherichia coli*-Arten, die den Colibactin-Biosynthesegencluster tragen, DNA-Doppelstrangbrüche in eukaryotischen Zellen verursachen, die zur Hemmung der Mitose und damit schließlich zur Megalozytose und final zu chronischen Darmentzündungen und Darmkrebs führen können.<sup>[6]</sup> Weder die Struktur noch die Biosynthese von Colibactin sind bisher bekannt, obwohl sich zahlreiche Gruppen in den letzten Jahren mit beidem beschäftigt haben. Biochemisch entsteht Colibactin durch eine Mischung aus Polyketidsynthase (PKS) und NRPS, und alle Gene, die für die Bildung verantwortlich sind, wurden bereits in der ersten Publikation beschrieben. Während 53 % aller ExPEC-Stämme (extraintestinal pathogenic *E. coli*) den Colibactin-Biosynthesegencluster tragen, findet man diesen auch in 34 % aller Stuhlproben gesunder Menschen.<sup>[6]</sup> Der Gencluster kommt neben *E. coli* auch in *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, einem marinen *Pseudovibrio*-Stamm oder dem Bienen-symbionten *Fischerella perrara* vor.<sup>[7]</sup> Überaschenderweise ist unter den *E. coli*-Stämmen auch *E. coli* Nissle 1917, ein Kommensale, der als Probiotikum gerade bei chronischen Darmentzündungen wie Morbus Crohn verwendet wird.

Der Colibactin-Biosynthesegencluster ist komplex und erlaubt keine einfache Vorhersage des resultierenden Naturstoffs. Der Startschuss für die Aufklärung der Colibactin-Biosynthese war die Identifizierung von ClbP als neuartige Peptidase, die an der Colibactin-Aktivierung beteiligt ist.<sup>[8]</sup> Wegen dieser wichtigen Funktion scheint es es auch möglich zu sein, durch Hemmung von ClbP durch niedermolekulare Wirkstoffe vor Colibactin-abhängigem Darmkrebs zu schützen.<sup>[9]</sup>

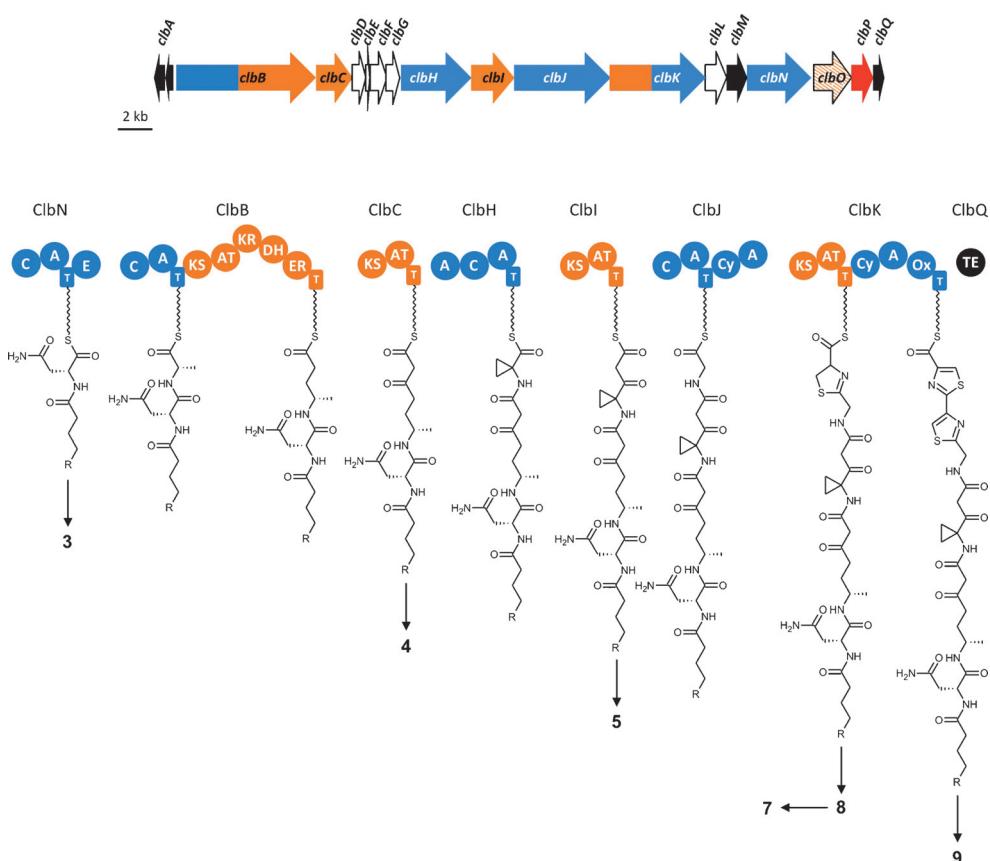
Die Identifizierung ähnlicher Prodrug-Aktivierungsmechanismen in weiteren Naturstoffen, die durch NRPS oder NRPS/PKS-Hybride erzeugt werden, zeigte, dass solche Mechanismen weit verbreitet sind.<sup>[10]</sup> Mechanistisch wurden zuerst die Biosynthese des Antibiotikums Xenocoumacin aus *Xenorhabdus nematophila* aufgeklärt.<sup>[11]</sup> Hier konnte gezeigt werden, dass zunächst acylierte Prexenocoumacine gebildet werden, die bei der Sekretion nach einem konservierten D-Asparagin gespalten und so in das antibiotisch aktive Xen-



**Abbildung 1.** Bisher beschriebene Colibactin-Intermediate und Vorstufen. Während die Strukturen von **3–5**, **7** und **8** mittels NMR- und MS-Techniken aufgeklärt wurden, wurden die Strukturen der Precolibactin-derivate **6** und **9** nur basierend auf MS und Markierungsexperimenten (für **6**) vorhergesagt. Die Hauptkomponenten mit Myristoyl-Seitenkette sind gezeigt, es wurden aber auch weitere Kettenlängen beschrieben.

ocoumacin 1 überführt werden. Basierend auf diesen Arbeiten konnte auch aus verschiedenen Colibactin-Produzenten ein entsprechendes Acyl-D-Asn(**3**)-Spaltprodukt und ein verlängertes Produkt **4** (Abbildung 1) identifiziert und ein Biosynthesemechanismus postuliert werden.<sup>[12–14]</sup>

Anfang 2015 gipfelte die Suche nach der wahren Colibactinstruktur in der Publikation eines einzigartigen 7-Methyl-4-azaspiro[2.4]hept-6-en-5-on-Derivats (**5**) durch die Gruppen Balskus, Crawford und Müller.<sup>[15–17]</sup> Während Brotherton et al. zeigen konnten, dass **5** ein Substrat für ClbP ist,<sup>[15]</sup> konnten Vizcaino und Crawford die DNA-Crosslinking-Aktivität von **5** in vitro demonstrieren und damit erstmals einen Mechanismus für die Toxizität von Colibactin



**Abbildung 2.** Colibactin-Biosynthesegenencluster (*cib*) aus *E. coli* (oben) und von Li et al. vorgeschlagene Biosynthese<sup>[18]</sup> (unten). NRPS und PKS (sowie die kodierenden Gene) sind blau bzw. orange dargestellt. Das Gen, das die für den Prodrug-Aktivierungsmechanismus verantwortliche Peptidase ClbP kodiert, ist rot markiert. Gene mit bereits bekannter Beteiligung an der Colibactin-Biosynthese sind schwarz, solche, deren Funktion noch unklar ist, weiß (*cibDEF* und *cibL*) oder orange/weiß (*cibO*; kodiert ein bisher nicht berücksichtigtes PKS-Modul) dargestellt.

nach ClbP-Aktivierung zeigen.<sup>[17]</sup> Zusätzlich konnten sie eine Struktur für Precolibactin (**6**) (Abbildung 1), die auf detaillierten MS-Analysen und Markierungsexperimenten beruhte, und auch einen Biosynthesemechanismus für Colibactin vorschlagen.

Noch neuer sind die Arbeiten von Li et al.<sup>[18]</sup> Hier wurde der gesamte Biosynthese-Gencluster aus *E. coli* CFT073 kloniert und in klassische *E. coli*-Expressionsstämme eingebracht, sodass ein Stamm erhalten werden konnte, der Colibactin bis zu 12-mal besser produziert als der Ausgangsstamm. Eine Fermentation dieses Überproduzenten im großen Maßstab (200 L) führte zur Isolierung einer *1H*-Pyrrolo-[3,4-*c*]pyridin-3,6(2*H*,5*H*)-dion-Einheit (**7**), die bei späteren Intermediaten auch mit Thiazol-Einheiten verknüpft war (**8**) und deren Strukturen per NMR-Spektroskopie gelöst werden konnten. Verbindungen **7** und **8** wurden nur in Spuren produziert; aus 200 L konnten nur 6 bzw. 0.5 mg der beiden Substanzen erhalten werden. Es wurden jedoch leider keine Details zur Kultivierung oder Isolierung genannt. MS-Analyse erlaubt den Autoren zudem die Strukturvorhersage des möglichen Precolibactins (**9**), das in noch geringeren Mengen erhalten wurde (0.1 mg) und sich von der durch Crawford vorhergesagten Struktur unterscheidet (Abbildung 1). Deletionen einzelner *cib*-Gene erlaubte es den Autoren zudem, einen Biosyntheseweg aufzustellen, der den derzeitigen Stand zum Colibactin darstellt (Abbildung 2).

Nichtsdestotrotz ist der Wettlauf um die Biosynthese und Struktur des Colibactins wohl auch damit noch nicht zu Ende:

1. Die Struktur des postulierten vollständigen Precolibactins bzw. seiner Varianten muss noch durch NMR-Spektroskopie oder eine andere MS-unabhängige Methode bestätigt werden.
2. Die Tatsache, dass Kontakt zwischen der bakteriellen und der eukaryotischen Zelle wichtig für die maximale Toxizität ist<sup>[6]</sup> und dass immer nur sehr kleine Mengen an Intermediaten gefunden werden, deutet darauf hin, dass Colibactin möglicherweise an die bakterielle Zelle gebunden ist und somit eine wesentlich größere Struktur hat.
3. Die Funktionen von ClbDEF sind bis jetzt ungeklärt, da sie in keinem Biosynthesevorschlag berücksichtigt werden, aber in allen *cib*-BGCs hochkonserviert sind.<sup>[7]</sup> Nahe Verwandte dieser Proteine sind an der Biosynthese der ungewöhnlicher Polyketid-Verlängerungseinheit Aminomalonyl-ACP in der Biosynthese von Zwittermicin beteiligt.<sup>[19]</sup> Alle derzeitigen Biosynthesemodelle berücksichtigen aber nur von Malonyl-ACP abgeleitete Colibactin-derivate.
4. Ähnliches gilt für die Amidase ClbL und die zusätzliche PKS ClbO. Die Funktionen beider Proteine sind unklar, und sie wurden bisher nicht in der Biosynthese berücksichtigt. Falls sie beteiligt sind, deutet dies ebenfalls auf ein größeres und vermutlich deutlich anderes Precolibactin hin.

verglichen mit den beiden beschriebenen Derivaten **6** und **9** hin.

- Sind alle der identifizierten Strukturen nur unspezifische Shunt-Produkte des Biosyntheseweges? Tragen sie zur Gesamtbioaktivität bei oder haben sie vielleicht sogar unterschiedliche Bioaktivitäten? Die schwache antibiotische Aktivität des ClbP-Spaltprodukts **3** scheint letzteres nahezulegen. Es ist möglich, dass **3** zur Wachstumshemmung andere Darmmikroben beiträgt und die Colibactin-Produzenten damit einen Wachstumsvorteil haben. Die Tatsache, dass **5** (ein verkürztes Colibactin) *in vitro* DNA-Crosslinking-Aktivität hat,<sup>[17]</sup> stützt ebenfalls diese Theorie. Vielleicht hat das wahre Colibactin sogar eine Selektivität für eine bestimmte DNA-Sequenz, die ein Ergebnis der Kombination des *1H*-Pyrrolo[3,4-*c*]pyridin-3,6-(2*H*,5*H*)-dion-Restes mit den Thiazolgruppen ist. Eine Beteiligung von Thiazolen an der DNA-Interkalation wurde bereits für andere Naturstoffe gezeigt.
- Das Vorkommen hoch konservierter *clb*-Biosynthesegengencluster in sehr unterschiedlichen Bakterien aus verschiedenen ökologischen Nischen deutet zwar auf ähnliche Strukturen und ökologische Funktionen hin, dies muss jedoch noch gezeigt werden.

Abschließend kann man sagen, dass der immer noch stattfindende Wettlauf um die Struktur und Biosynthese des Colibactins eindrucksvoll die Möglichkeiten, aber auch Grenzen der modernen Naturstoff-Forschung belegt. Zudem ist es ein eindrucksvolles Beispiel für Naturstoffe, die durch unser „anderes“ Genom (des uns bewohnenden Mikrobioms) kodiert werden, wie diese Naturstoffe unsere Gesundheit beeinflussen können<sup>[20]</sup> oder wie ein besseres Verständnis der entsprechenden Biosynthesewege auch zur Behandlung schwerer Krankheiten beitragen kann.<sup>[9]</sup> Wir stehen erst am Anfang, den Reichtum dieser Naturstoffe und ihre Bedeutung zu erkennen. Mit den aktuellen Entwicklungen der Bioinformatik, Bioanalytik und hier insbesondere der MS-Technologien, modernsten Sequenziertechnologien und molekularen Tools für die Manipulation ausgewählter Biosynthese-Gencluster<sup>[21]</sup> scheint es aber an der Zeit zu sein, das wir uns auch mit den Mikroben in und auf uns und ihrem Beitrag zu unserer Biochemie beschäftigen. Vermutlich werden wir hier zudem sowohl strukturell und biologisch interessante und relevante Naturstoffe finden, die wir bereits seit Urzeiten nutzen ohne es zu wissen und die vielleicht sogar als Leitstrukturen für neue Wirkstoffe dienen können.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10408–10411  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10550–10553

- T. R. Sampson, S. K. Mazmanian, *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 565–576.
- J. L. Round, S. K. Mazmanian, *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 313–323.
- M. S. Donia, P. Cimermancic, C. J. Schulze, L. C. Wieland Brown, J. Martin, M. Mitreva, J. Clardy, R. G. Linington, M. A. Fischbach, *Cell* **2014**, *158*, 1402–1414.
- P. C. Dorrestein, S. K. Mazmanian, R. Knight, *Immunity* **2014**, *40*, 824–832.
- G. Schneditz, J. Rentner, S. Roier, J. Pletz, K. A. T. Herzog, R. Bucker, H. Troeger, S. Schild, H. Weber, R. Breinbauer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 13181–13186.
- J.-P. Nougayrède, S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, C. Buchrieser, J. Hacker, U. Dobrindt, E. Oswald, *Science* **2006**, *313*, 848–851.
- P. Engel, M. I. Vizcaino, J. M. Crawford, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1502–1512.
- D. Dubois, O. Baron, A. Cognoux, J. Delmas, N. Pradel, M. Boury, B. Bouchon, M.-A. Bringer, J.-P. Nougayrède, E. Oswald, et al., *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35562–35570.
- A. Cognoux, J. Delmas, L. Gibold, T. Faïs, C. Romagnoli, F. Robin, G. Cuevas-Ramos, E. Oswald, A. Darfeuille-Michaud, F. Prati, et al., *Gut* **2015**, DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307241.
- D. Reimer, H. B. Bode, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 154–159.
- D. Reimer, K. M. Pos, M. Thines, P. Grün, H. B. Bode, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 888–890.
- C. A. Brotherton, E. P. Balskus, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3359–3362.
- X. Bian, J. Fu, A. Plaza, J. Herrmann, D. Pistorius, A. F. Stewart, Y. Zhang, R. Müller, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1194–1197.
- M. I. Vizcaino, P. Engel, E. Trautman, J. M. Crawford, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9244–9247.
- C. A. Brotherton, M. Wilson, G. Byrd, E. P. Balskus, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2294–2294.
- X. Bian, A. Plaza, Y. Zhang, R. Müller, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3154–3160.
- M. I. Vizcaino, J. M. Crawford, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 411–417.
- Z.-R. Li, Y. Li, J. Y. H. Lai, J. Tang, B. Wang, L. Lu, G. Zhu, X. Wu, Y. Xu, P.-Y. Qian, *ChemBioChem* **2015**, DOI: 10.1002/cbic.201500239.
- Y. A. Chan, M. T. Boyne, A. M. Podevels, A. K. Klimowicz, J. Handelsman, N. L. Kelleher, M. G. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14349–14354.
- G. Sharon, N. Garg, J. Debelius, R. Knight, P. C. Dorrestein, S. K. Mazmanian, *Cell Metab.* **2014**, *20*, 719–730.
- A. O. Brachmann, H. B. Bode, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2013**, *135*, 123–155.

Eingegangen am 11. Juni 2015

Online veröffentlicht am 14. Juli 2015