

Bioaktive Peptidnaturstoffe in der Chemischen Biologie

Bioactive peptide natural compounds in chemical biology

Arndt, Hans-Dieter; Baumann, Sascha; Lu, Jin-Yong; Riedrich, Matthias; Schoof, Sebastian

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund

Korrespondierender Autor/in

E-Mail: hans-dieter.arndt@mpi-dortmund.mpg.de

Zusammenfassung

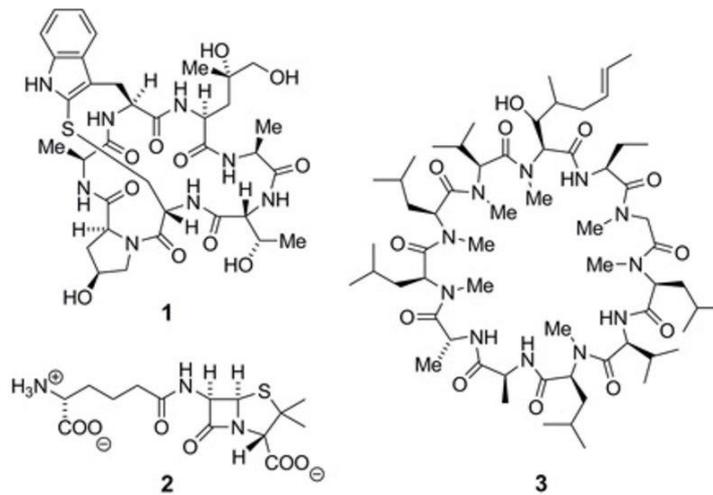
Peptidnaturstoffe sind strukturell verwandte, in der Natur vorkommende kleine Moleküle mit breiter biologischer Aktivität. Wissenschaftler am Dortmunder Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie befassten sich unter anderem mit Thiopeptiden, das sind potente Antibiotika, und mit Chondramid C, einem F-Aktin adressierenden Zytostatikum. Es wird über Fortschritte in der Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen, abgeleitete Fluoreszenzsonden sowie chemisch-synthetische Zugänge berichtet.

Summary

Peptide natural products are structurally related small molecules which occur in nature and display broad biological activity. Scientists at the Max Planck Institute in Dortmund focused on thiopeptides and on chondramide C, potent antibiotics and an F-actin addressing cytostatic. Progress in elucidating their molecular mode of action, in designing derived fluorescent probes and in access by chemical synthesis is reported.

Einleitung

Die vergleichsweise junge Disziplin der Chemischen Biologie widmet sich dem Studium und der Aufklärung biologischer Vorgänge mit chemischen Methoden. Besonders gesucht sind kleine Moleküle, deren Anwendung einen spezifischen biologischen Effekt hervorruft. Vielversprechend ist es dabei, sich Sekundärmetaboliten zuzuwenden, die von der Natur im Lauf der Evolution auf eine wichtige molekulare Funktion hin selektiert worden sind. Diese „Naturstoffe“ sind oft hoch bioaktiv und ermöglichen es, neue Wirkprinzipien aufzufinden und ihre Aktivitätsmuster auszunutzen. Von besonderem Interesse sind Peptidnaturstoffe (**Abb. 1**): Diese Klasse strukturell verwandter Substanzen überrascht mit einem sehr breiten Spektrum an unterschiedlichen Aktivitäten und umfasst Toxine wie Phalloidin (**1**), eines der Gifte des Knollenblätterpilzes, wichtige Antibiotika wie die Penicilline (**2**) und auch das Cyclosporin (**3**), dessen immunsuppressive Wirkung nach Organtransplantationen nahezu unverzichtbar ist. Über ihr enormes biologisches Potenzial hinaus fordern Peptidnaturstoffe auch die synthetische Chemie, die zur effektiven Darstellung und gezielten Modifikation solcher Moleküle weiterentwickelt werden muss. Das Studium dieser Substanzen an der Schnittstelle zwischen Chemie und Biologie kann daher beide Disziplinen befruchten.

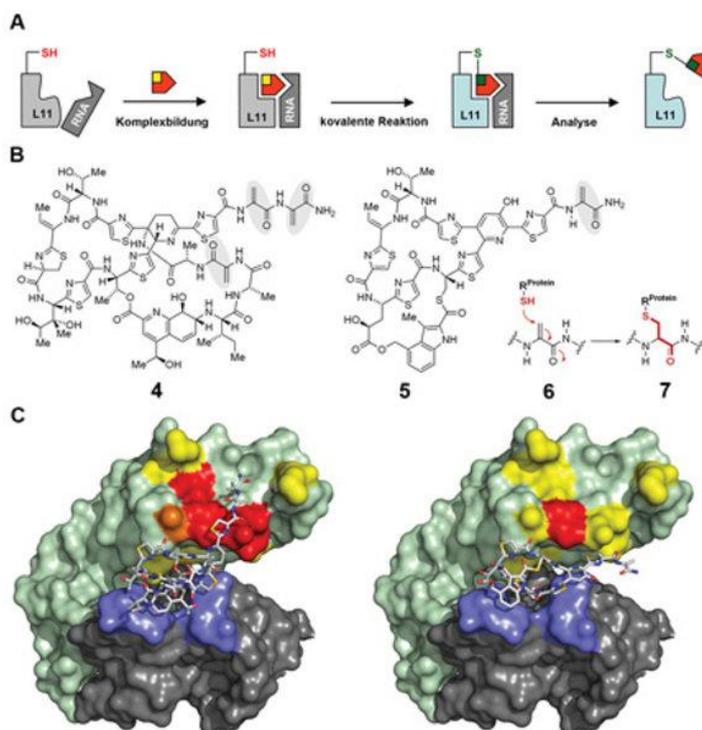


Strukturformeln von beispielhaft herausgegriffenen Peptidnaturstoffen. **1**: Phalloidin; **2**: Penicillin N; **3**: Cyclosporin A.

© Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie/Arndt

Kartierung von Bindestellen durch chemisches Abtasten

Eine Aufgabe der Chemischen Biologie ist die Charakterisierung der Wechselwirkung von Peptidnaturstoff-Liganden mit größeren Biomakromolekül-Zielstrukturen, wie etwa Proteinen oder Nukleinsäuren. Neben der Bestimmung der Molekül-Affinitäten spielt die Klärung der räumlichen Lage und Orientierung des Liganden auf der Oberfläche der Makromoleküle eine wichtige Rolle. Zum Studium dieser Parameter unter möglichst realistischen Bedingungen kann die dem Liganden eigene chemische Reaktivität genutzt werden: Sie führt bei der Wechselwirkung der Moleküle mit einer Funktion der Zielstruktur zur Ausbildung einer kovalenten Bindung und zu einem analysierbaren „Schnappschuss“ der Orientierung. Bedingung ist, dass diese Reaktion nur bei großer räumlicher Nähe stattfindet (*proximity induced covalent capture, PICC*).



A) In einem nichtkovalenten ternären Komplex aus L11-Protein, 23S-rRNA und Thiopeptid kann die Thiolgruppe (rot) von L11-Cysteinmutanten (hellgrau) mit einer Dehydroaminosäure (gelb) des Thiopeptids reagieren. Die Bildung eines kovalenten Addukts wird im Anschluss mittels Gelelektrophorese und Massenspektrometrie analysiert. B) Strukturen von Thiostrepton (**4**) und Nosiheptid (**5**) sowie die Reaktionen der Thiopeptid-Dehydroaminosäuren (grau) mit Protein-Thiofunktionen (**6/7**). C) Visualisierung der biochemischen Abtastung an der Röntgenstrukturanalyse des ternären Komplexes von L11/23S-rRNA und Thiostrepton (links) bzw. Nosiheptid (rechts). Bereiche des L11-Proteins (hellgrün) mit reaktivem Potenzial sind rot gekennzeichnet, nicht-reaktive Positionen sind gelb markiert. Zur Orientierung wurden zwei für die Bindung wichtige RNA-Basen (A1067 und A1095) blau hervorgehoben.

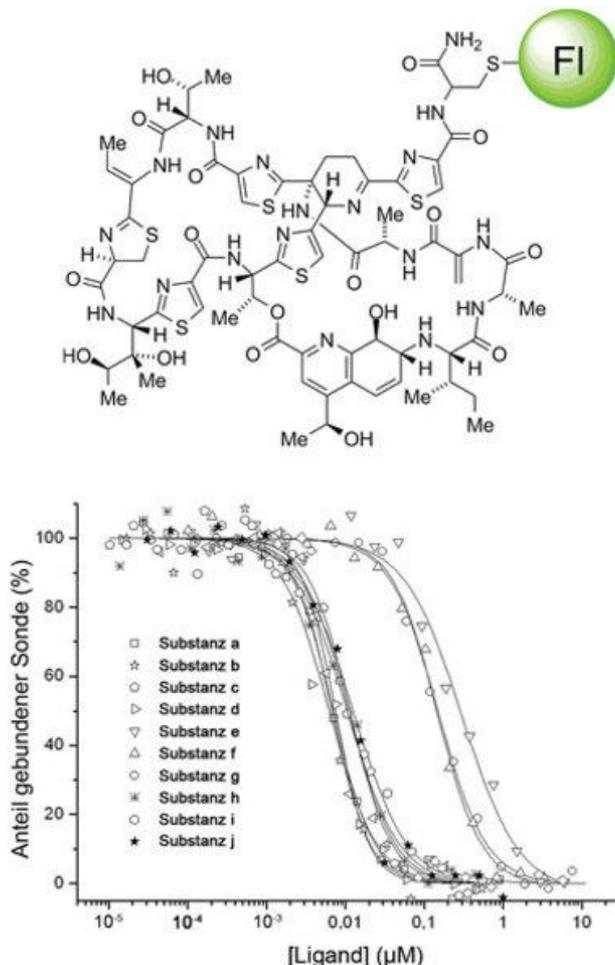
© Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie/Arndt

Eine solche Methode wurde zur Kartierung der Bindestelle der Thiopeptid-Antibiotika Thiostrepton (**4**) und Nosiheptid (**5**) entwickelt (**Abb. 2**), [1]. Dazu setzte man den Komplex aus ribosomaler RNA – 23S-rRNA – und dem ribosomalen Protein L11 ein, der die GTPase-Bindedomäne des bakteriellen Ribosoms bildet. Die Dehydroaminosäuren des Thiopeptid-Moleküls wurden mit künstlich hergestellten Cysteinmutanten des L11-Proteins zur Reaktion gebracht. Die Analyse ergab für diese Thiopeptide ein charakteristisch unterschiedliches Reaktivitätsmuster und ermöglichte so eine genaue Lokalisierung des Moleküls auf der Proteinoberfläche. Vergleiche mit kürzlich zugänglichen Röntgenstrukturanalysen der am Ribosom gebundenen Wirkstoffe zeigen eine hohe Zuverlässigkeit der Methode und lassen Schlüsse auf die Unterschiede zwischen dem Verhalten der isolierten biomolekularen Komponenten im Vergleich zum gesamten Ribosom zu.

Laufende Arbeiten konzentrieren sich nun auf die Ausweitung der Methode auf das intakte Ribosom sowie die Anwendung der Kartierungstechnik auf andere Kleinmolekül-Makromolekül-Interaktionen.

Thiopeptid-Naturstoffe als molekulare Sonden

Viele Wirkstoffe, die heute noch gegen Infektionskrankheiten eingesetzt werden, verlieren durch Resistenzen ihre Wirksamkeit. Darum müssen Wirkstoffe mit neuer Struktur und neuem Wirkprinzip gefunden werden. Eine Substanzklasse mit hohem antibakteriellen Potenzial sind die Thiopeptide, etwa Thiostrepton **4**. Dieses Molekül bindet an das GTPase-assoziierte Zentrum des bakteriellen Ribosoms und unterbindet so gezielt die Proteinproduktion. Dieser Wirkmechanismus wird bislang in der Humanmedizin nicht genutzt.



A) Struktur einer fluoreszenten Thiostrepton-Sonde (FI: Fluorescein). B) Repräsentatives Diagramm der Quantifizierung des Bindungsverhaltens von Thiostrepton-Derivaten.

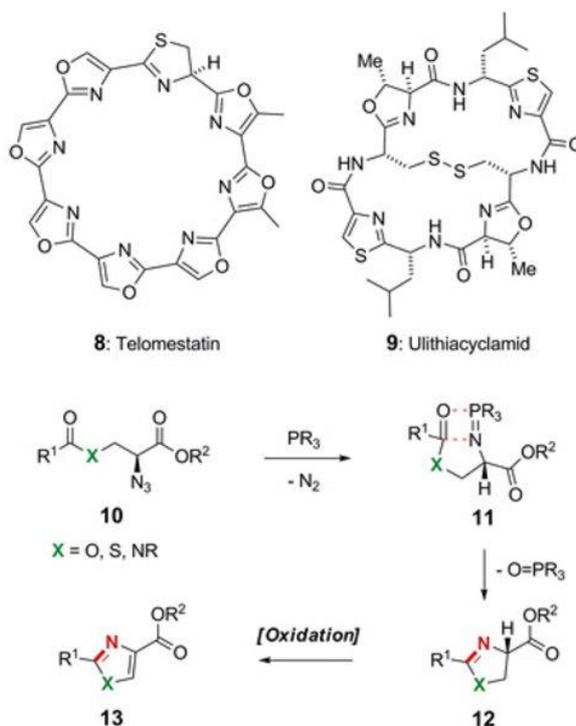
© Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie/Arndt

Durch chemische Synthese gelang es kürzlich [2], aus dem leicht verfügbaren Naturstoff Thiostrepton fluoreszente Sonden zu entwickeln, welche die eingehende Untersuchung des Bindeverhaltens von Antibiotika-Kandidaten am zellulären Wirkort des Thiostreptons erlauben (**Abb. 3**). So war es möglich, die Bindungseigenschaften verschiedener Substanzen quantitativ zu bestimmen. Vorteil des Verfahrens ist, dass die Sonden in automatisierten Testverfahren eingesetzt werden können und ihre Anwendung leicht auf Hochdurchsatzformate ausgeweitet werden kann. Dies wird die gezielte Entwicklung von neuartigen Antibiotika erleichtern, die den Wirkort des Thiostreptons ansteuern.

Im Rahmen der Forschungsarbeiten wurden darüber hinaus bereits einige Thiostrepton-Derivate synthetisiert, die hochspezifisch an den Wirkort des Naturstoffs binden. Manche dieser Substanzen zeigten viel versprechende Resultate in ersten Untersuchungen mit Pathogenen. Hauptgegenstand der laufenden Forschung ist nun die Synthese von Abkömmlingen der Thiostrepton-Struktur und anderer Thiopeptidderivate.

Synthesemethoden zur Darstellung von Thiopeptiden

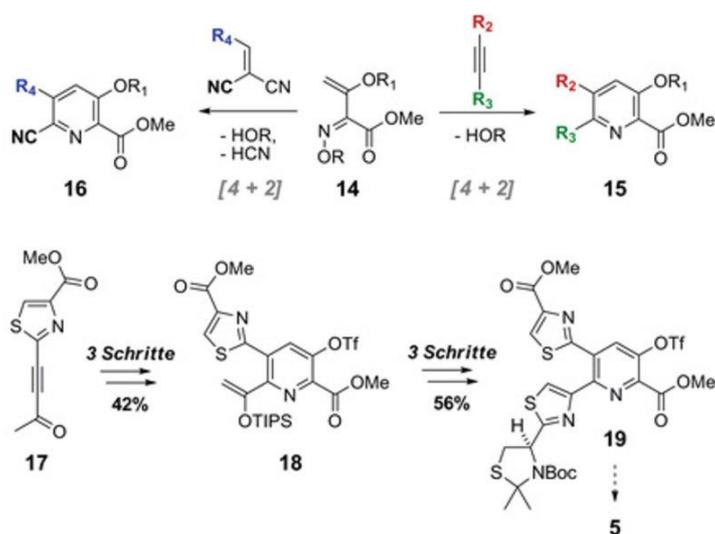
Azoline



Ringschlussvorläufer **11** geht aus der Reaktion des Azids **10** mit einem geeigneten Phosphin hervor und bildet unter Abspaltung eines Phosphinoxids den Heterozyklus **12**. Das 1,3-Azol **13** wird dann durch Oxidation erzeugt. Die beiden gezeigten Naturstoffe sind mögliche Zielstrukturen für zukünftige Anwendungen von Aza-Wittig-Ringschlüssen.
© Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie/Arndt

1,3-Azol(in)e und ihre Oligomere kommen häufig als wichtige strukturelle Elemente in Peptidnaturstoffen vor, wie etwa im Telomerase-Inhibitor Telomestatin (**8**) oder im Toxin Ulithiacyclamid (**9**). Durch Entwicklung einer Aza-Wittig-Methode für den Ringschluss zu 1,3-Azol(in)en (**Abb. 4**) gelang es den Dortmunder Wissenschaftlern [3], eine große Vielfalt an Oxazol(in)en (X = O) und Thiazol(in)en (X = S) zugänglich zu machen. Das milde und flexible Verfahren lässt reaktive funktionelle Gruppen in der Synthese zu und erlaubt zudem die Herstellung von heterozyklischen Dimeren. In laufenden Arbeiten konnte auch die Anwendbarkeit dieser Synthesestrategie auf die Herstellung von Imidiazol(in)en (X = NR) gezeigt werden. Die entwickelte Prozedur wird wegen ihrer Flexibilität die Herstellung komplizierter multiheterozyklischer Verbindungen mit hohem biologischen Potenzial ermöglichen. Die Anwendung auf bioaktive Zielmoleküle, insbesondere Thiopeptide wie Nosiheptid (**5**), wird aktuell bearbeitet.

3-Hydroxypyridine



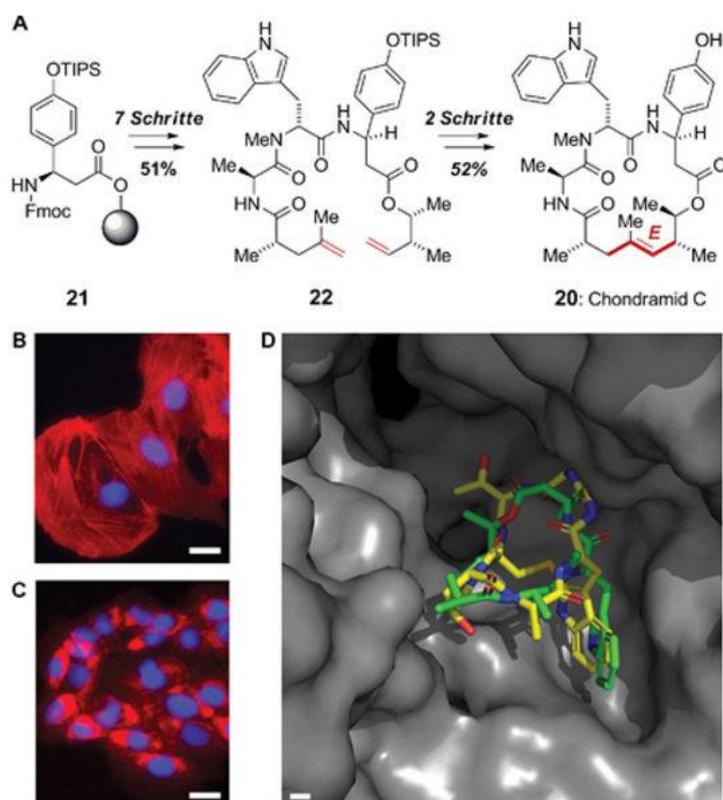
Hetero-Diels-Alder-Reaktionen von 1-Azadien **14** zu verschiedenen 3-Hydroxypyridinen **15** und **16** sowie zur Darstellung des Nosiheptidkerns **19**.

© Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie/Arndt

Um die komplexe Struktur von Nosiheptid **5** synthetisch zu erschließen, wurden zudem 1-Azadien-Hetero-Diels-Alder-Reaktionen entwickelt. Die Dortmunder Wissenschaftler konnten zeigen, dass sowohl Alkine [4] als auch Dicyano-Alkene [5] geeignete Substrate sind, 3-Hydroxypyridine regioselektiv zugänglich zu machen (**Abb. 5**). Quantenchemische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus lieferten das eindeutige Bild von konzertiert ablaufenden Zyклоadditionen [5]. Durch Einsatz des Alkynylketons **17** konnte über den Enolether **18** der Synthesebaustein **19** erhalten werden, dessen weitere Umsetzung zu Nosiheptid **5** zurzeit studiert wird.

Synthese und Evaluierung von Chondramid C

Nicht nur das antibiotische, sondern auch andere Wirkprinzipien sind von Interesse. Der Peptidnaturstoff Chondramid C (**20**) etwa stabilisiert die polymere Form des Zytoskelettproteins Aktin (das F-Aktin) und greift so in die Reorganisationsprozesse der Zellstruktur ein. Im Gegensatz zum Pilzgift Phalloidin **1**, das einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweist, durchdringt Chondramid C die Zellmembran wesentlich leichter und eignet sich daher sowohl als chemisch-biologisches Werkzeugmolekül, als auch als Leitstruktur für die Entwicklung von auf Aktin gerichteten Wirkstoffen.



A) Totalsynthese und Strukturbeweis von Chondramid C durch festphasengestützten Aufbau und E-selektive Ringschlussmetathese. B) Fluoreszenzmikroskopische Abbildung (Balkenlänge: 10 μm) von nicht mit Wirkstoff behandelten BSC-1-Zellen (Affenniere), rot: F-Aktin, blau: DNA. C) Abbildung von BSC-1-Zellen im gleichen Maßstab nach Behandlung mit Chondramid C (200 nM). Die Ausbildung eines durch Aggregation von Aktinfasern (tieferrote Bereiche) hervorgerufenen, viel kompakteren Phänotyps ist deutlich zu erkennen. D) Durch "Docking" erhaltenes molekulares Strukturmodell (Balken: 0.1 nm) der Bindung von Chondramid C (grün) an F-Aktin (grau) im Vergleich mit dem Pilzgift Phalloidin (gelb).

© Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie/Arndt

Zur Untersuchung des aus natürlichen Quellen nicht in größeren Mengen zugänglichen Chondramids wurde zunächst eine effiziente festphasengestützte Synthese entwickelt, in der am Ende der Synthesesequenz durch eine Ringschlussmetathese der entscheidende Ringschluss gelang – direkt unter Aufbau der gewünschten E-konfigurierten Doppelbindung (**Abb. 6**). In gleicher Weise erhielten die Forscher auch verschiedene Derivate, die sie auf ihre Wirkung in Zellen hin charakterisierten. Durch computergestütztes "Docking" konnte darüber hinaus ein Vorschlag für die Bindegeometrie von Chondramid C an F-Aktin abgeleitet werden. Es wird erwartet, dass aus diesen Daten eine neue Generation zellgängiger und potenter Aktinmodulatoren erwachsen kann [6].

Ausblick

Das gezielte Studium von Peptidnaturstoffen liefert in verschiedenen Gebieten der Chemischen Biologie wesentliche Beiträge. Die inhärente strukturelle Ähnlichkeit dieser Verbindungen wird chemische Biologen in Zukunft sicher dazu anregen, vollkommen neuartige Molekülstrukturen anzustreben und im Hinblick auf spezifische biologische Fragestellungen maßzuschneidern. Die so erhältlichen Moleküle werden das

Verständnis über die molekularen Prozesse in der Zelle verbessern und können in Zukunft auch in Testverfahren und neuartigen Therapieansätzen eine Rolle spielen – gerade auf dem Feld der Infektionskrankheiten.

Originalveröffentlichungen



[Nach](#) [Erweiterungen](#) [suchen](#)[Absatz](#)[Bilder](#)[Erweiterung](#)[Dateiliste](#)[HTML-Erweiterung](#)[Job](#)[ticker](#)[Kalender](#)[erweiterung](#)[Linker](#)[erweiterung](#)[MPG.PuRe-Referenz](#)[Mitarbeiter](#) ([Employee Editor](#))[Mitarbeiterliste](#)[erweiterung](#)[Personen](#)[erweiterung](#)[Publikation](#)[erweiterung](#)[RSS](#)[ticker](#)[Tagliste](#)[erweiterung](#)[Teaser](#) [mit](#)[Bild](#)[Textblock](#)[erweiterung](#)[Veranstaltung](#)[sticker](#)[erweiterung](#)[Video](#)[erweiterung](#)[YouTube-Erweiterung](#)

[1] **S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H.-D. Arndt:**

Mapping the binding site of thiopeptide antibiotics by proximity-induced covalent capture.

Journal of the American Chemical Society 130 (17), 5664–5666 (2008).

[2] **S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt:**

A fluorescent probe for the 70 S-ribosomal GTPase-associated center.

ChemBioChem 10(2), 242-245 (2009).

[3] **M. Riedrich, S. Harkal, H.-D. Arndt:**

Peptid-embedded heterocycles by mild single- and multiple aza-Wittig ring closures.

Angewandte Chemie International Edition 47 (15), 2701-2703 (2007).

[4] **J.-Y. Lu, H.-D. Arndt:**

Hetero Diels–Alder synthesis of 3-hydroxypyridines: Access to the Nosiheptide core.

Journal of Organic Chemistry 72 (11), 4205–4212 (2007).

[5] **J.-Y. Lu, J. A. Keith, W.-Z. Shen, M. Schürmann, H. Preut, T. Jacob, H.-D. Arndt:**

Regioselective de novo synthesis of cyanohydroxypyridines with a concerted cycloaddition mechanism.

Journal of the American Chemical Society 130 (40), 13219–13221 (2008).

[6] **H. Waldmann, T.-S. Hu, S. Renner, S. Menninger, R. Tannert, T. Oda, H.-D. Arndt:**

Total synthesis of Chondramide C and its binding mode to F-Actin.

Angewandte Chemie International Edition 47 (34), 6473 - 6477 (2008).