

Die Biologie der Ansamycine: Beispiel Rifamycin

Ansgar Stratmann, Anbics Laboratories AG, Martinsried

Eine ergiebige Quelle für die Identifizierung von biologisch aktiven Substanzen sind Bakterien aus der Ordnung Actinomycetales. Die Substanzklasse der Ansamycine ist ein prominentes Beispiel für die faszinierende Biologie von natürlichen Wirkstoffen. Naturstoffe sind im Gegensatz zu rein chemisch erzeugten Substanzbanken durch die Evolution als biologische Wirkstoffe optimiert und stellen die beste Grundlage für eine intelligente Struktur-Wirkungs-Optimierung bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe dar.

Rifamycin B ist ein prominenter Vertreter der Ansamycine, einer bedeutenden Gruppe natürlicher Wirkstoffe^[3]. Es wird von *Amycolopsis mediterranei* synthetisiert. Rifamycin B wirkt in Form des semisynthetischen Derivats Rifampicin als Inhibitor der bakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase und wird bei der Behandlung von mycobakteriellen Infektionen (Tuberkulose, Lepra) eingesetzt. Die Biosynthese und Genetik von Rifamycin und anderer Ansamycine wurde intensiv bearbeitet. Gemeinsame Strukturmerkmale der Ansamycine sind die C7-N-Einheit des aromatischen Kerns, die dem Startermolekül der Polyketid(PK)-Synthese, dem 3-Amino-5-hydroxybenzoat (AHBA), entstammt, und das PK-Rückgrat, welches in Form eines Henkels (Griechisch „ansa“) den intramolekularen Ringschluss herstellt. Die Ansamycine werden aufgrund ihres aromatischen Kerns in solche mit benzenischem Ringsystem (Geldanamycin, Ansatrienin, Maytansin und Ansamitocin) beziehungsweise naphthalenischem Ringsystem (Rifamycin, Streptovaricin, Naphptomycin, Actamycin und

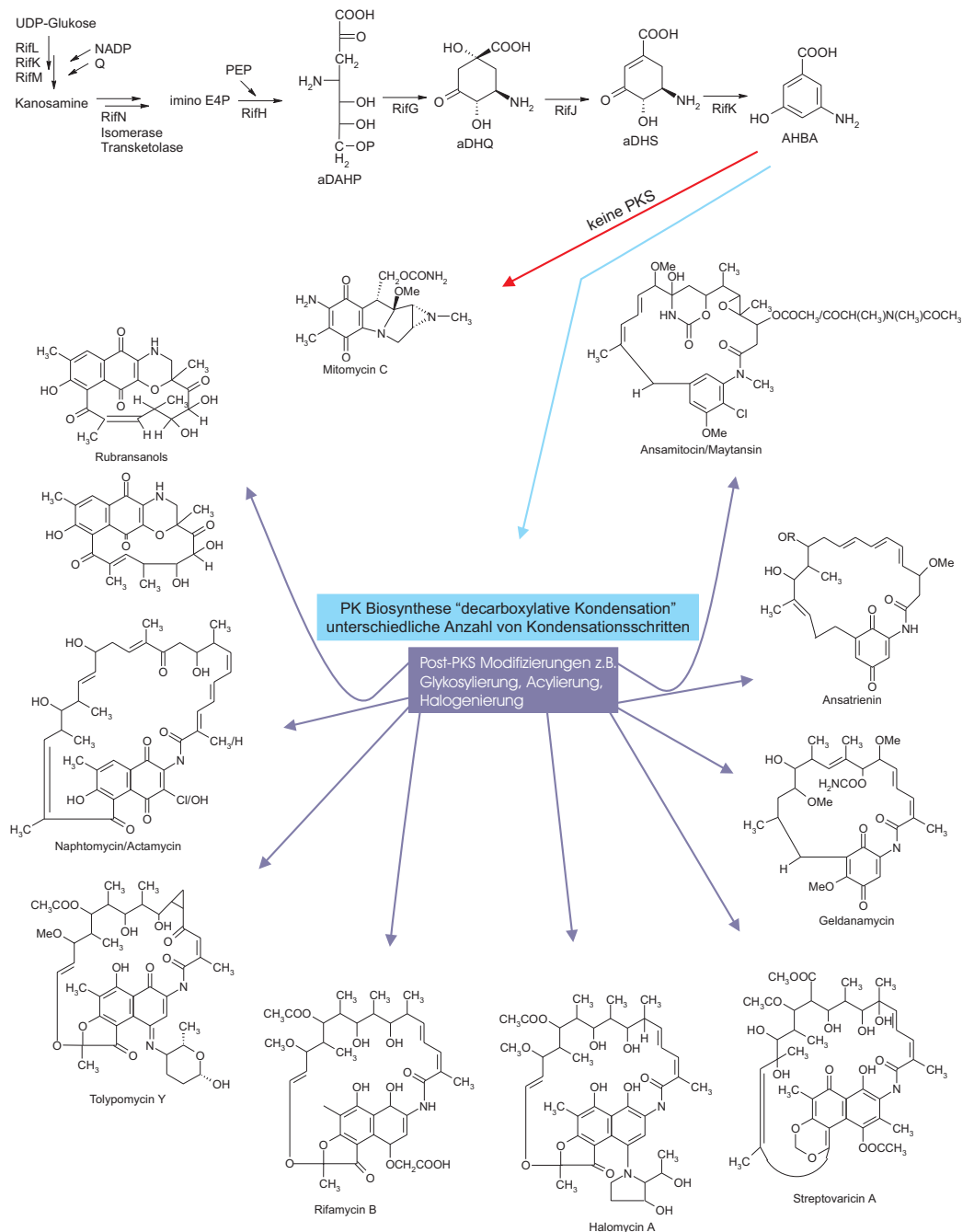
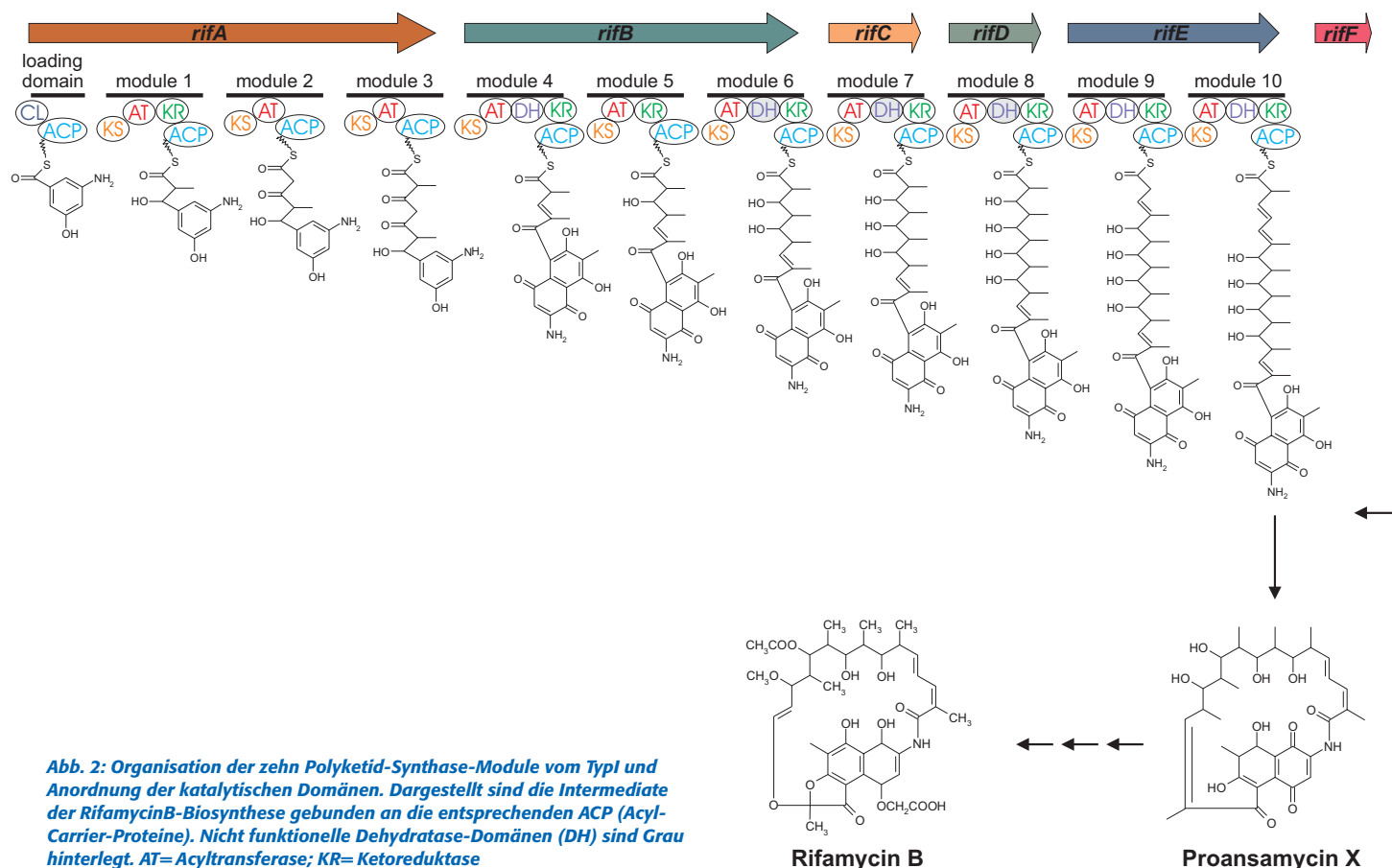


Abb. 1: Ausgewählte Strukturen der natürlichen Wirkstoff-Familie der Ansamycine^[3]. Dargestellt ist auch der Biosyntheseweg des für die Ansamycine charakteristischen Startermoleküls AHBA. PK(S) = Polyketid(-Synthese).

Tolyptomycin) eingeteilt (Abb. 1). Charakteristisch für die Biologie der Ansamycine ist der Biosyntheseweg des AHBA. Dabei

handelt es sich um eine Variante des Shikimat-Biosynthesewegs, die sich durch die Einführung einer Aminogruppe in dem einlei-

tenden Schritt, der Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Imino-Erythrose-4-Phosphat, vom Shikimat-Weg unter-



scheidet^[1] (Abb. 1). Für den Sekundärstoffwechsel in den Ansamycin-Produzenten wurden drei dem Shikimat-Weg homologe Enzymreaktionen (RifG, -H, -J) mit vier Shikimat-unabhängigen Syntheseschritten (RifK, -L, -M, -N) kombiniert^[12].

Biosynthese von Rifamycin B – Modulare Typ I-Polyketid-Synthase

Der modulare Aufbau der Polyketidsynthasen vom Typ I ist anhand der Biosynthese des Rifamycins beispielhaft dargestellt (Abb. 2). Die bakterielle Polyketidsynthase (PKS) vom Typ I zeigt deutliche Ähnlichkeit zu den modularen Fettsäuresynthasen (FAS) wie sie bei Pilzen und Vertebraten vorliegen. Die Biosynthese des PK-Rückgrats erfolgt an einem komplex organisierten Multienzymkomplex bestehend aus den Enzymen RifA bis RifE und mit dem aromatischen Startermolekül AHBA. Diese fünf Proteine (495, 527, 183, 180 und 354 kDa) wirken als Dimere, die zu einem gemeinsamen Biosynthese-Komplex assoziiert sind. Je nach Spezifität der zehn Module werden Malonyl oder Methylmalonyl als Bausteine für die zehn Kondensationschritte genutzt (Abb. 2).

Potenzial der Rifamycin-Biosynthese

Die Flexibilität und Produktivität des Rifamycin-Biosynthesegenclusters wurde deutlich, indem die für die Zyklisierung des PK-Rückgrats verantwortliche Rifamycin-Amidsynthase (RifF) inaktiviert wurde^[9, 11]. Danach lassen sich alle zu erwartenden Intermediate (Abb. 2) als Abbruchprodukte der normalen PK-Biosynthese aus der Kulturbühe isolieren. Vermutlich kommt es durch die fehlende Zyklisierung beziehungsweise Ablösung des PK-Rückgrats von Modul 10 (RifE) zu einem Rückstau und damit zum Stillstand der Biosynthese. Der Stau wird durch die Bindung aller Intermediate an den Acyl-Carrier-Proteinen (ACP) der entsprechenden Module verursacht. Durch einen bisher nicht verstandenen Mechanismus werden die Intermediate von den ACP abgelöst, und die Synthese kann durch Aktivierung des Startermoleküls AHBA an Modul 1 (RifA) erneut ablaufen.

Weiterhin wird der Biosyntheseweg für Rifamycin B vom Produzenten-Stamm variabel genutzt. In der Mutante F1/24 von *A. mediterranei* konnte ein alternativer 8-Deoxy-Biosyntheseweg aufgeklärt werden (Abb. 3). Bio-transformationsstudien zeigten, dass dieser

alternative Biosyntheseweg ebenfalls im Rifamycin B-Produzentenstamm ausgeprägt ist^[10]. Die 8-Deoxy-Derivate lassen sich nicht in die entsprechenden 8-Hydroxy-Derivate überführen und repräsentieren somit einen eigenständigen Biosyntheseweg.

Gemeinsame Strukturmerkmale, Biosyntheseweg und genetische Organisation

Die Ansamycine sind eine komplex organisierte Gruppe von Naturstoffen mit PK-Grundgerüst, die in ihrer natürlichen Variationsbreite ein eindrucksvolles Beispiel für die Flexibilität von bakteriellen Biosynthesewegen und somit auch den zugrunde liegenden Genclustern darstellt (Abb. 1, 4). Ausgehend von dieser Struktur-Variabilität bei den Ansamycinen und aufbauend auf den gemeinsamen Strukturmerkmalen, ist in den bisher bekannten Biosynthesegenclustern ebenfalls ein gemeinsames Grundmuster für die Biosynthese des C7-N-Motivs und des PK-Rückgrats in den verschiedenen Produzenten konserviert. Eine erste vergleichende Analyse der DNA-Sequenz der Gencluster für die Biosynthese von Rifamycin, Naphthomycin und Ansatrienin zeigt eine

Relation von gemeinsamen strukturellen Motiven (Anzahl der Kondensationschritte, Struktur des aromatischen Kerns) und zugrunde liegenden genetischen Informationen (Abb. 4)^[2]. Der Biosyntheseweg zum charakteristischen AHBA-Startermolekül wurde in diesen drei Ansamycin-Biosynthesewegen untersucht. Bemerkenswert ist, dass *Streptomyces collinus* sowohl Naphptomycin als auch Ansatrien synthetisiert und für beide Ansamycine über ein vollständiges, unabhängiges Biosynthese-gencluster verfügt. Es findet somit keine für beide Synthesewege gemeinsame AHBA-Biosynthese statt. Dass diese energiesparende, effiziente Möglichkeit von *S. collinus* nicht genutzt wird, ist wahrscheinlich in der Regulation beider Biosynthesewege und in der verschiedenen biologischen Funktion der beiden Naturstoffe für den Produzenten begründet.

Abbildung 4 zeigt, dass der Grad der strukturellen Ähnlichkeit der Ansamycine sich in der Organisation der Gencluster widerspiegelt. Nimmt man das Rifamycin-System als Vergleich, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung der physikalischen Karte zu dem von der Struktur ähnlichen Naphptomycin. Demgegenüber weicht die Anordnung der PKS-Gene und der für die AHBA-Synthese verantwortlichen Gene in den Genclustern für die benzenischen Ansamycine, Ansatrienin und Ansamitocin, deutlich ab. Während im Naphptomycin-Gencluster die Anordnung und Orientierung der AHBA-Biosynthesegene im Vergleich zu den entsprechenden *rif*-Genen bis auf ein zusätzliches Gen zwischen *napA1* und *napC* fast identisch ist, zeigt die physikalische Karte der entsprechenden *ans*- und *asm*-Gene deutliche Abweichungen. Der unterschiedlichen Organisation der Biosynthesegene steht aber eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz der entsprechenden Genprodukte gegenüber (Abb. 4). Die Organisation des Genclusters für die Synthese des strukturell ähnlichen Mitomycins, einer wichtigen Substanz für die Antitumor-Therapie, wurde kürzlich aufgeklärt. Die chemische Verwandtschaft zu den Ansamycinen lässt sich anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz der AHBA-Biosynthesegene (*mtc*) im Biosynthese-gencluster eindeutig ablesen (Abb. 4)^[4]. Die Clusterung der AHBA-Gene ist im *mtc*-Gencluster allerdings fast vollständig aufgelöst. Ähnliches scheint für das Geldanamycin-Gencluster zu gelten. Es wurden eine Reihe von möglichen AHBA-Biosynthesegenen in genomischer DNA von *S. hygroscopicus* identifiziert, deren Beteiligung an der Geldanamycin-Biosynthese beziehungsweise deren Clusterung mit den identifizierten *gdm*-Genen allerdings noch nicht gezeigt wurde^[8].

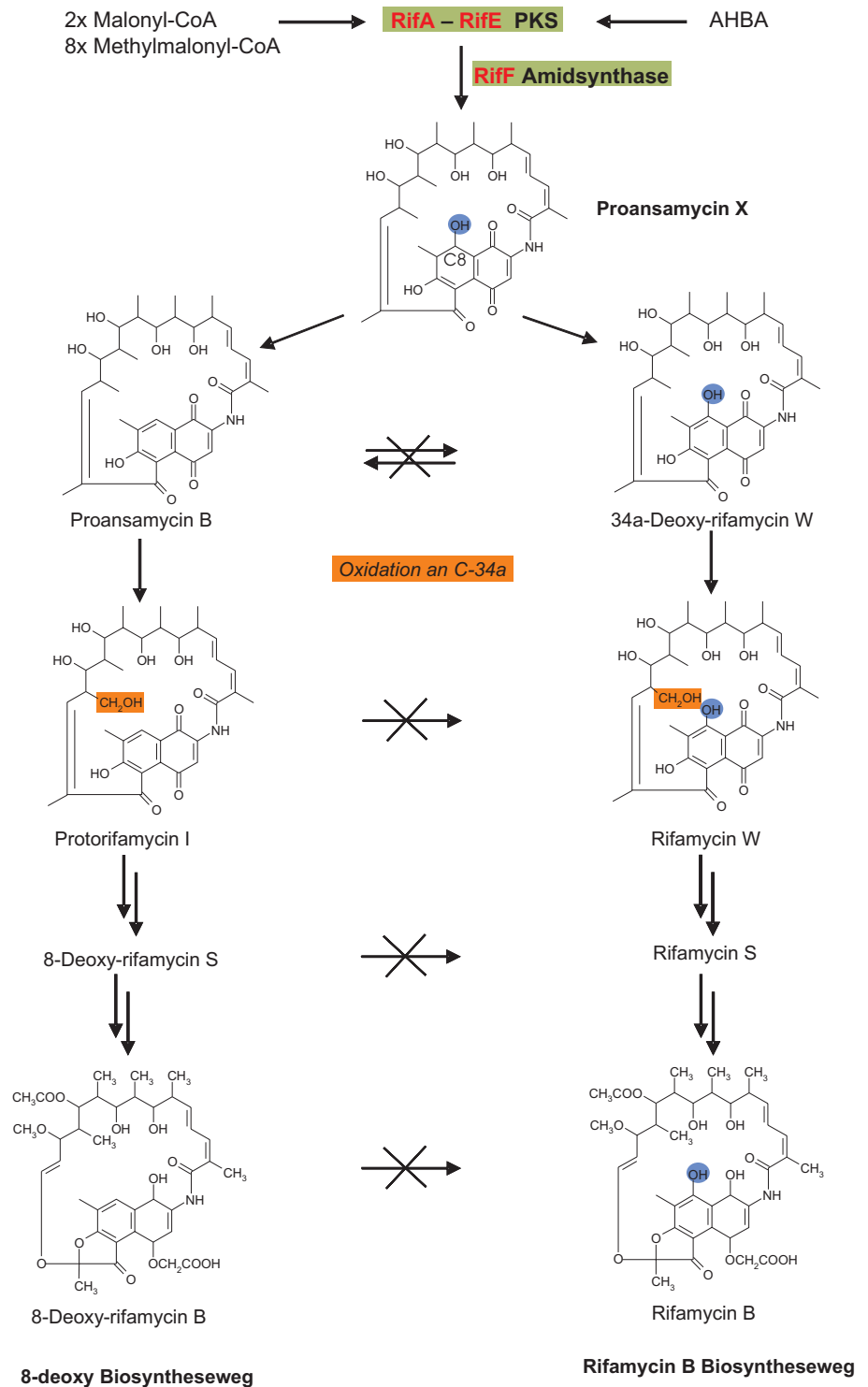


Abb. 3: Vergleichende Darstellung des Rifamycin-Biosynthesewegs mit dem alternativen 8-Deoxy-Weg aus *A. mediterranei*. Die 8-Deoxy-Derivate können in Biotransformationsstudien nicht in die 8-Hydroxy-Derivate überführt werden. Die durchgestrichenen Pfeile zeigen die durchgeführten Biotransformationen.

Evolution der Ansamycine

Die Anpassung von Bakterien an veränderte Umweltbedingungen und somit auch deren Evolution wird maßgeblich durch horizontalen Gentransfer mitbestimmt^[5]. Die Verbreitung der Ansamycin-Biosynthese-

gencluster auf die verschiedenen Produzenten über horizontalen Gentransfer kann man an der sehr hohen Sequenzidentität (50–80%) der AHBA-Biosynthesegene ablesen. Die physikalische Karte der bisher beschriebenen Gencluster ist allerdings im Laufe der Anpassung/Optimierung in den

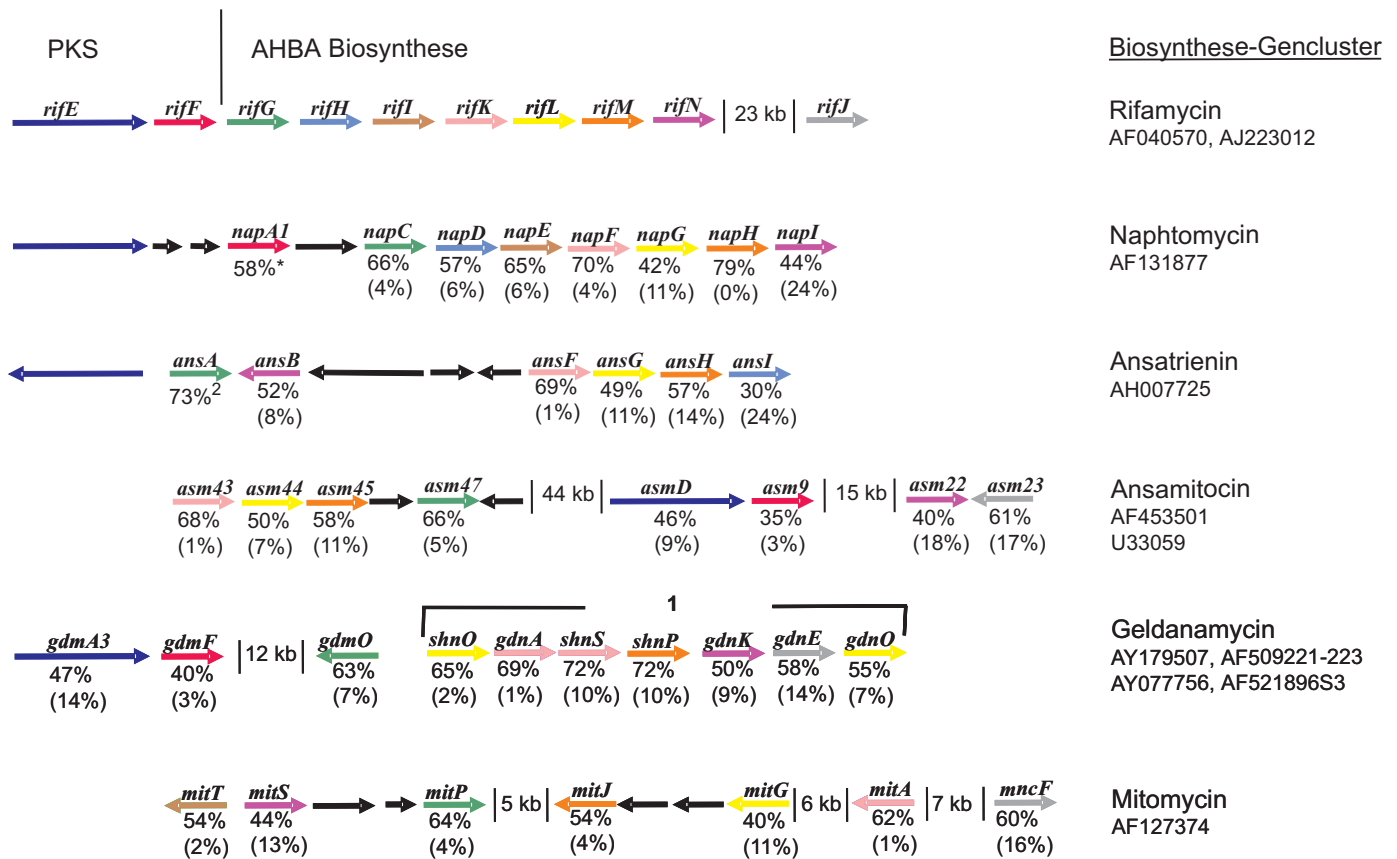


Abb. 4: Vergleichende Analyse der AHBA-Biosynthesegene als Bestandteil ausgewählter Ansamycin-Gencluster. Gezeigt ist die physikalische Kartierung der Gencluster und die prozentuale Identität der abgeleiteten Genprodukte zu dem jeweiligen funktionsgleichen Gen des Rifamycin-Genclusters. Die Aminosäuresequenz der Rif-Genprodukte wurde als 100% gesetzt. Es wurde jeweils die Identität funktionsgleicher Genprodukte und in Klammern die prozentuale Häufigkeit von Lücken in dem jeweiligen Alignment zum Rif-Genprodukt („gap“ von einer Position und größer) berechnet. Funktionsgleiche Gene sind farbig markiert. Die Einträge in GeneBank sind anhand der Acc.No. angezeigt
* Literaturdaten; 1 Die Lokalisation der Gene ist nicht bekannt; die Funktion der Genprodukte ist experimentell nicht belegt.

verschiedenen Produzentenstämmen grundlegend verändert worden (siehe oben). Durch Neukombination der verschiedenen Gencluster und Modifikation/Mutation einzelner Gene konnte es im Verlauf der Evolution zu dieser Vielfalt an Biosynthesewegen und damit auch der entsprechenden Strukturen kommen, die sich wahrscheinlich auf ein gemeinsames „ursprüngliches Ansamycin-Biosynthesegencluster“ zurückführen lassen. Es ist aber vorauszusetzen, dass in jeder der heute bekannten Wirkstoff-Produzenten-Gemeinschaft für die jeweilige ökologische Situation und das Bedürfnis des jeweiligen Produzenten die Struktur des entsprechenden Ansamycins optimiert wurde. Die Frage nach den Struktur-erhaltenden Faktoren, die sowohl Stamm-spezifisch (intern) als auch extern (Umweltfaktoren) wirksam sein sollten, bleibt allerdings vorläufig unbeantwortet.

Eine kürzlich entdeckte Eigenschaft der Ansamycine eröffnet weitere Fragestellungen zu Funktion und Evolution dieser natürlichen Wirkstoffe. Die Ansamycine scheinen bei der Wechselwirkung zwischen Pflan-

zen und assoziierten Bakterien eine Funktion zu übernehmen. In Pflanzen aus der Familie der *Celastraceae* (Spindelbaumgewächse) und auch in Moosen wurden verschiedene Maytansinoide/Maytansine beschrieben. Bisher wurden die Pflanzen als Produzenten dieser Ansamycine angesehen. Eine umfangreiche Studie zeigt jedoch, dass für die Synthese dieser Wirkstoffe wahrscheinlich Wurzel-assoziierte Bakterien verantwortlich sind^[7]. Wahrscheinlich übernehmen die Ansamycine, neben der Funktion als Wirkstoff im Kampf mit konkurrierenden Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen), im natürlichen Habitat weitere wichtige Aufgaben. Wie wohl generell für mikrobielle Sekundärmetabolite gültig, sind diese Substanzen an der Kommunikation von Mikroorganismen untereinander, aber auch bei der Bildung von Symbiosen zwischen Mikroorganismen und höheren Eukaryoten beteiligt. Die Synthese solcher komplexen Substanzen stellt einen wichtigen Selektionsvorteil für die Produzentenstämmen dar. Dies wird deutlich durch die Aufrechterhaltung und ständige Veränderung dieser kompli-

zierten und sehr energieaufwändigen Biosynthesen, die zusätzlich einer hohen Regulation unterliegen^[6].

Literatur

[1] Arakawa, K., Müller, R., Mahmud, T., Yu, T-W., Floss, H. G. (2002): Characterization of the early stage aminoshikimate pathway in the formation of 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid: The RifN protein specifically converts Kanosamine into Kanosamine 6-phosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 10644–10645

[2] Chen, S., von Bamberg, D., Hale, V., Breuer, M., Hardt, B., Müller, R., Floss, H.G., Reynolds, K. A., Leistner, E. (1999): Biosynthesis of ansatrienin (mycotrienin) and naphptomycin: identification and analysis of two separate biosynthetic gene clusters in *Streptomyces collinus* Tü 1892. *Eur. J. Biochem.* 261: 98–107

[3] Ghisalba, O., Auden, J. A. L., Schupp, T. Nüesch, J. (1984): The rifamycins: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Vandamme, E. J. (Hrsg.) *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel

[4] Mao, Y., Varoglu, M., Sherman, D. H. (1999): Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin

C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem. Biol.* 6: 251–263

[5] **Ochmann, H., Lawrence, J. G., Groismann, E. A.** (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299–304

[6] **Piepersberg, W.** (2002): Endogenous antimicrobial molecules: an ecological perspective. In: Sussmann, M. (Hrsg.) *Molecular Medical Microbiology. Hartcourt - Academic Press. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo*, 561–584

[7] **Pullen, C. B., Floss, H.G., Leistner, E., et al.** (2003): Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. *Phytochemistry* 62: 377–387

[8] **Rascher, A., Hu, Z., Viswanathan, N., Schirmer, A., Reid, R., Niermann, W. C., Lewis, M., Hutchinson, C. R.** (2003): Cloning and characterization of a gene cluster for geldamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS Microbiol Lett.* 218: 223–230

[9] **Stratmann, A., Toupet, C., Schilling, W., Traber, R., Oberer, L., Schupp, T.** (1999): Intermediates of rifamycin polyketide synthase produced by an *Amycolatopsis mediterranei* mutant with inactivated *riff* gene. *Microbiology* 145: 3365–3375

[10] **Stratmann, A., Schupp, T., Toupet, C., Schilling, W., Oberer, L., Traber, R.** (2002): New insights into rifamycin B biosynthesis: isolation of proansamycin B and 34a-deoxy-rifamycin W as early macrocyclic intermediates indicating two separated biosynthetic pathways. *J. Antibiot.* 55: 396–406

[11] **Yu, T-W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B. S., Hutchinson, C. R., Floss, H. G.** (1999): Direct evidence that the rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9051–9056

[12] **Yu, T-W., Müller, R., Müller, M., Xiaohong, Z., Draeger, G., Chun-Gyu, K., Leistner, E., Floss, H. G.** (2001): Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J. Biol. Chem.* 276: 12546–12555

Danksagung:

Ich danke Thomas Schupp für die freundschaftliche Aufnahme in seinem Labor während meiner Zeit bei der Novartis Pharma AG. An die kollegiale Zusammenarbeit in Basel, vor allem mit Renè Traber und seinem Team, erinnere ich mich gerne zurück. Dank auch an Christiane Toupet für die engagierte Zusammenarbeit beim Rifamycin-Projekt.

Korrespondenzadresse:

Dr. Ansgar Stratmann
Anbics Laboratories AG
Am Klopferspitz 19
D-82152 Martinsried
Tel.: 089 51777672
a.stratmann@anbics.com



Dr. Ansgar Stratmann

Jahrgang 1966; Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bo-

chum; Promotion an der Bergischen-Universität Wuppertal in der AG von Prof. Dr. Wolfgang Piepersberg; Postdoc bei der Novartis Pharma AG in Basel; danach wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Piepersberg; seit April 2002 Leiter der Mikrobiologie bei der Anbics Laboratories AG.