

## Zusammenfassung

Die Klasse der Thiopeptidantibiotika ist eine Gruppe hochmodifizierter makrozyklischer Polythiazolylpeptide. Sie zeigen nanomolare antibiotische Aktivität gegen eine Vielzahl Gram-positiver Pathogene, wie z.B. den multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Trotz ihrer hochpotenten antibakteriellen Wirksamkeit, wird bisher keines der Thiopeptide in der Humantherapie eingesetzt. Thiopeptide inhibieren das bakterielle Translationsystem durch die Störung der 70S ribosomalen GTPase assoziierten Region (GAR). Thiopeptidantibiotika, mit ihrem berühmtesten Vertreter Thiostrepton (**1**), binden an einen konservierten und hoch-dynamischen Komplex des ribosomalen Proteins L11 (rplK) und der 23S rRNA. Die Beeinflussung der Konformation von L11 führt hierbei entweder zu einer Blockade oder Stimulierung der Aktivität ribosomaler GTPasen. Die bemerkenswerte Aktivität gegen eine klinisch bisher ungenutzte, bakterielle Zielstruktur sowie das exakte Verständnis dieser Kleinmolekül-RNA-Protein-Interaktion war die Triebfeder zur detaillierten Analyse dieser interessanten und vielversprechenden Naturprodukte.

### Thiostrepton-basierter Bindungsassay

Zu Beginn dieser Studien existierten keine quantitativen Daten zur Affinität von Thiopeptiden an ihre ribosomale Zielstruktur. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung dieses wichtigen Parameters, ein auf Fluoreszenzpolarisation basierender Bindungs-(Kompetitions)-Assay für den Gebrauch im Mittel- bis Hochdurchsatzformat entwickelt. Die Basis dieses Systems waren semisynthetische Thiostrepton-FITC-Konjugate (Dipl Biochem. Sebastian Schoof), welche als molekulare Sonden, die quantitative Analyse der Thiopeptid-Zielstruktur-Affinität im mikromolaren bis pikomolaren Konzentrationsbereich an isolierte 23S rRNA-L11-Komplexen als auch an intakten Ribosomen, erlaubten. Das patentierte System ermöglichte u.a. zum ersten Mal:

1. Die Bestimmung quantitativer Bindedaten für eine Vielzahl unterschiedlicher Thiopeptidnaturstoffe. Einige der Thiopeptide wie Thiostrepton und Nosiheptid, zeigten hierbei bemerkenswerte Zielstrukturaffinitäten im pikomolaren Bereich (Kapitel 3).
2. Die Bestimmung der Zielstrukturaffinitäten einer Vielzahl (>50) von semisynthetischen (z.T. physikochemisch-optimierten) Thiostrepton-Derivaten und totalsynthetischen Nosiheptid-Derivaten. Das System lieferte so wertvolle Information bezüglich der molekularen Aspekte der Interaktion u.a. im Sinne einer Struktur-Affinitäts-Relation.

3. Die Analyse der molekularen Determinanten von Thiopeptid-Resistenzen. Hierbei wurde der Einfluss von Punktmutationen in Protein und RNA auf die Affinität von Thiopeptiden untersucht. Interessanterweise zeigten die Studien, dass für Thiopeptide wie Thiostrepton, Mutationen der RNA aber nicht des Proteins zu Affinitätsverlusten führen, obwohl Mutationen in beiden Makromolekülen *in vivo* zu Resistenzen führen. Dieser Sachverhalt legt eine mutationsbedingte Flexibilitätserhöhung des L11 Proteins nahe, welche die Thiostreptonbindung nicht beeinflusst. Darüberhinaus identifiziert sie die 23S rRNA als primäre Zielstruktur von Thiostrepton. Andere Thiopeptide wie Micrococcin hingegen, zeigten eine deutliche Reduktion der Affinität bei Mutationen im Protein. Vertreter dieser Thiopeptidklassen scheinen im Unterschied zu Thiostrepton direkt an das Protein zu binden, was einen unterschiedlichen Bindungsmodus vermuten lässt.

Die gesammelten Affinitätsdaten wurden zusätzlich mit der *in vitro* Wirksamkeit der Thiopeptidnaturstoffe bzw. Derivate auf die bakterielle Proteinbiosynthese, wie auch auf Gram-positive Prokaryoten, korreliert. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Translations-Inhibitions-System, auf Basis eines kommerziellen zellfreien, gekoppelten Transkriptions-Translationssystems (*E. coli*), für Mitteldurchsatz-Analysen optimiert und etabliert.

Der entwickelte, hochempfindliche Bindungsassay wurde u.a. für die Verwendung in Mittel- bis Hochdurchsatzformaten konzipiert und hat somit das Potenzial zur Analyse großer Substanzbibliotheken. Dies, in Kombination mit gezielter organischer Semi- und Totalsynthese, stellt eine wertvolle Plattform für die Suche und Analyse von Thiopeptid-Leitstrukturen, -Derivaten, wie auch neuen Modulatoren der 70S ribosomalen GTPase-assoziierten Region dar. Da für Thiopeptide die Fähigkeit zur Bindung  $\neq$  der tatsächlichen *in vitro* Aktivität ist, sollten solche Studien jedoch stets von *in vitro* Inhibitionsanalysen begleitet werden.

### **Nähe-induzierter kovalenter Einfang – Proximity-Induced Covalent Capture (PICC)**

Trotz signifikanter kristallographischer und NMR-spektroskopischer Analysen wurde die exakte Position und molekulare Struktur der Thiopeptidbindestelle, vor allem in Hinblick auf die geometrische Orientierung des Liganden, kontrovers diskutiert. Um einen genaueren Einblick in diese komplexe Interaktion zu bekommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die „Proximity-Induced-Covalent-Capture“ (PICC) Methodologie entwickelt. Es handelt sich

hierbei um eine Variante der klassischen Affinitätsmarkierung, zur genauen Analyse der Ligandenbindung an RNA-Proteinkomplexen. Die Technik basiert generell auf der Michael-Additions-Reaktivität der Thiopeptid-Dehydroaminosäuregruppen mit Cystein-Thiofunktionen. Durch das Einbringen von Cysteinfunktionen in N-Terminus von L11 in Kombination mit gezielten chemischen Modifikationen der Thiopeptide war es so möglich die genaue Lage der Thiopeptid-Dehydroaminosäurefunktionen auf der Oberfläche des L11 Proteins in isolierten L11-23S rRNA Komplexen wie auch vollständigen Ribosomen in Aminosäureauflösung zu kartieren. Die Technik erlaubte zusätzlich die Identifizierung unterschiedlicher Bindemodi verschiedener Thiopeptidklassen, sowie die Detektion putativer Konformationsunterschiede des L11-Proteins, in Abhängigkeit der Ionen- als auch der Makromolekülumgebung (freier Komplex vs. Ribosom). Diese Resultate dieser wurden durch kürzlich publizierte kristallographische Studien bestätigt und untermauert.

Ein Vorteil der PICC-Methodologie ist, dass sie neben der Ligandenorientierung und auch einen „Schnappschuss“ der Konformation des L11 N-Terminus erlaubt. PICC könnte so in Zukunft z.B. bei der Analyse der L11-Konformation in Anwesenheit verschiedener ribosomaler Faktoren helfen, oder, durch die Einführung von Doppelmutationen in L11, auch eine eingehendere Analyse der L11-vermittelten Thiopeptidresistenz ermöglichen. Auch eine Ausweitung der Methodologie auf weitere Makromolekül-Kleinmolekül- wie auch Makromolekül-Makromolekül-Interaktionen ist denkbar.

### **Die eukaryotische Thiopeptid-Zielstruktur<sup>[6]</sup>**

Einige Thiopeptide zeigen vielversprechende selektive Aktivitäten gegen verschiedene Krebszelllinien und den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*. In Kooperation mit Dipl. Biochem. Sebastian Schoof und Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger konnte im Rahmen dieser Arbeit, das 20S Proteasom als eine eukaryotische Zielstruktur von Thiopeptiden identifiziert und im Bezug auf Bindung und Inhibitionsmechanismus charakterisiert werden. Die Kenntnis dieser Zielstruktur ebnet den Weg für die gezielte Synthese neuer Thiopeptid-basierter Proteasomen-Inhibitoren und möglicherweise auch zukünftiger, neuer Krebs- und Malaria-Medikamente.

## 8. Summary

The class of thiopeptide antibiotics is a group of highly modified macrocyclic polythiazolyl peptides. They show nanomolar activities against a variety of Gram-positive pathogens, e.g. the multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Despite their high antibacterial potency, none of the thiopeptides is used for human therapy, yet. Thiopeptides inhibit the bacterial translation system by interfering with the 70S ribosomal GTPase-associated region (GAR). Here they bind to the highly conserved and highly dynamic complex of the ribosomal protein L11 (rplK) and the 23S rRNA and thus manipulate the conformation of L11. This can either lead to blocking or stimulation of the activity of ribosomal GTPases. The remarkable activity against a so far clinically unused bacterial target as well as the molecular understanding of the underlying small molecule-RNA-protein interaction was the driving force to investigate these interesting natural products in deeper detail.

### Thiostrepton-based binding assay

Prior to this thesis no quantitative information was available concerning the thiopeptide-target affinity. To shed light into this important aspect of the thiopeptide target interaction, a fluorescence polarization based binding (competition)-assay was developed and established for the use in mid- to high-throughput format. The fundament of this system were semi-synthetic Thiostrepton-FITC-conjugates, which served as molecular probes for the quantitative analysis of the thiopeptide-target interaction in the picomolar to micromolar range, using isolated L11-23S rRNA complexes or whole ribosomes. The developed system allowed for the first time:

1. The determination of quantitative binding data for a variety of different thiopeptide natural products. Interestingly, some of the thiopeptides, like thiostrepton or nosiheptide showed target affinities in the picomolar range.
2. The determination of quantitative binding data for a variety (>50) of different semi-synthetic derivatives of Thiostrepton or total-synthetic derivatives of nosiheptide. The system thus delivered important information concerning the molecular aspects of the interaction in the context of a structure-affinity relationship.
3. The analysis of the molecular determinants of thiopeptide resistances. In this context the influence of point mutations in the L11 protein or the 23s rRNA on the thiopeptide target affinity was analyzed. Interestingly these studies showed that for thiopeptides like

thiostrepton, only mutations in the RNA lead to decreases of the target affinity, although mutations in both macromolecules can lead to resistances *in vivo*. This result possibly indicates a mutation-mediated flexibility increase of L11 that doesn't influence thiopeptide binding in general. Furthermore it identifies the 23S rRNA as primary target of thiostrepton. Other thiopeptides like micrococin interestingly also showed significant target affinity decreases, when L11 mutants were analyzed. Members of this Thiopeptide class thus appear to bind directly to the protein and the RNA, showing a binding mode which is substantially different to thiostrepton

The collected affinity data were furthermore correlated with the *in vitro* activity of the analyzed compounds in a translation inhibition system as well as antibacterial assays. Therefore a coupled *in vitro* transcription/translation system was established on the basis of a commercial *in vitro* translation kit.

The highly sensitive thiopeptide binding assay was developed for the use in a mid- to high-throughput format and thus has the potential for the analysis of large substance libraries. This, in combination with a directed organic total or semi-synthesis, is a valuable platform for the search and analysis of thiopeptide leads, derivatives and also new modulators of the 70S ribosomal GTPase-associated region.

### **Proximity-Induced Covalent Capture (PICC)**

Despite significant crystallographic and NMR-spectroscopic studies, the exact position and binding orientation of the thiopeptides at their target remained elusive. To investigate this aspect in deeper detail the „Proximity-Induced-Covalent-Capture“ (PICC) technique was developed which is a modified version of the classical affinity labeling strategy, for the analysis of ligand binding events at RNA-protein complexes. The technique is generally based on the Michael-addition reactivity of the thiopeptide dehydroamino acids with Cysteine thiol functions. By selectively introducing cysteine functions into the N-terminus of the L11 protein combined with semi-synthetic modifications of the thiopeptide scaffold, an exact mapping of the binding geometry of the thiopeptides was possible in amino acid resolution, either on isolated L11-23S rRNA complexes or intact ribosomes. The technique further allowed the identification of differing binding modes of the different Thiopeptide classes, as well as the detection of possible conformational differences of the L11 protein depending on

the ion and/or macromolecule environment (free complex vs. ribosome). The results were recently verified by independent X-ray crystallographic studies.

An advantage of the PICC technique is that it provides a snapshot of the thiopeptide binding geometry as well as the conformation of the L11 N-terminus. PICC thus also could resemble a fruitful platform for the analysis of the L11 conformation when bound to different ribosomal factors. Also an extension of the technique to other macromolecule-small molecule or macromolecule-macromolecule interactions might be possible.

### **The eukaryotic thiopeptide target**

Some thiopeptides show promising activities against different cancer cell lines as well as the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. In cooperation with Dipl. Biochem. Sebastian Schoof and Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger the 20S proteasome could be identified as a eukaryotic thiopeptide target and furthermore characterized in terms of thiopeptide binding and inhibition. The identification of this target will pave the way for the targeted synthesis of thiopeptide based proteasome inhibitors and possibly also for the development of future anti-cancer or anti-malaria drugs.