

Zusammenfassung

Die Thiopeptid-Naturstoffe sind eine Gruppe von strukturell komplexen, makrozyklischen Peptiden, die sehr hohe Wirkung gegen *Gram*-positive Bakterien aufweisen. Die potentesten Vertreter stellen sub-nanomolare Hemmstoffe der GTPase-assoziierten Region des Ribosoms dar. Diese Region ist für die dynamische Interaktion des Ribosoms mit verschiedenen Proteinfaktoren während des Translationszyklus essentiell, so dass ihre Inhibierung zum Abbruch des Translationsvorgangs und Absterben der Bakterien führt. Die Thiopeptidbindestelle der GTPase-assoziierten Region zeichnet sich strukturell und funktional durch das enge Zusammenwirken von Protein- und RNA-Komponenten aus. Die Thiopeptide wechselwirken hier kooperativ mit dem L11-Protein und mit der 23S rRNA. Mit dieser Eigenschaft stellen sie eine Besonderheit unter den antibakteriellen Hemmstoffen dar. Bislang sind nur wenige Beispiele von Inhibitoren bekannt, die gleichzeitig mit Protein- als auch mit RNA-Komponenten wechselwirken. Die Bindestelle der GTPase-assoziierten Region des Ribosoms wird derzeit von keinem therapeutisch eingesetzten Antibiotikum ausgenutzt. Ein detaillierteres Verständnis der Bindeeigenschaften kann daher zur Entwicklung von neuen ribosomalen Wirkstoffen beitragen.

Semisynthetische Modifizierungen des Thiostreptons

Semisynthetische Modifizierungen des Thiopeptid-Grundgerüsts bieten eine hervorragende Möglichkeit, die strukturellen Bindungseigenschaften der Thiopeptide näher zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stellvertretend semisynthetische Modifizierungen des Thiostreptons untersucht, die auch zum Patent angemeldet werden konnten. Dabei wurden verschiedene Thiostreptonderivate synthetisiert, die durch Modifizierungen unterschiedlicher Funktionalitäten des Thiostrepton-Grundgerüsts erhalten wurden.

Einerseits wurden abbauende Modifizierungen durchgeführt, die die Seitenkette verkürzten, andererseits wurden dekorierende Modifizierungen bearbeitet, die die Reaktivitäten funktioneller Gruppen ausnutzten, um neue Gruppen einzufügen (Michael-Addition, Acylierung). Durch Reduktion des zentralen Heterozyklus und die Oxidation bzw. Epimerisierung des A-Ring-Thiazolins wurde das Gerüst modifiziert. Selektive Hydrolyse des Lactons öffnete den B-Ring, so dass dessen Einfluss auf die Struktur erstmalig untersucht werden konnte.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die chemische Reaktivität des Thiostreptons wurden dann für die Synthese von funktionstragenden Thiostreptonderivaten genutzt, die teilweise patentiert wurden. Neben den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Thiostrepton-Sonden wurde die biotinylierte Thiostrepton-Sonde synthetisiert. Die fluoreszenten Thiostrepton-Sonden dienten in Folge einerseits der Quantifizierung von Bindungsaffinitäten der Thiopeptide bzw. der Derivate an die GTPase-assoziierte Region und zur Untersuchung der Resistenzwirkung verschiedener Mutationen des L11-Proteins bzw. der 23S rRNA. Andererseits waren die Thiostrepton-Sonden in Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen zur Aufklärung der Zielstrukturen des Thiostreptons in Zellen besonders nützlich.

Hemmung des Ribosoms

Durch vergleichende Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Polarisationsassay wurden wichtige Erkenntnisse über die strukturellen Parameter der Bindung an den Protein/RNA-Komplex erhalten. Es konnte gefunden werden, dass Modifizierungen der Seitenkette nur geringen Einfluss auf die *in vitro* Bindeeigenschaften der Derivate haben, so dass sich Modifizierungen dieser Position dazu eignen, die physikochemischen Eigenschaften der Moleküle zu verbessern. Neben den biochemischen *in vitro* Untersuchungen wurden die Derivate auf ihre bakterielle Wachstumshemmung hin untersucht. Hieraus folgten die Erkenntnisse, dass beispielsweise Modifizierungen der Seitenkette durch positiv geladene Gruppen sehr gute antibakterielle

Wirksamkeit vermitteln, während die Addition von Thioglucose scheinbar die Aufnahme des Derivats in die Zellen verhindert.

Darüber hinaus wurden NMR-Strukturen wichtiger Gerüst-Derivate bestimmt und der Einfluss der verschiedenen Modifizierungen auf die Bindungseigenschaften mittels *Docking*-Berechnungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Gerüst-Modifizierungen teilweise einen deutlichen Einfluss auf die Bindeeigenschaften der Moleküle ausüben, wobei die beobachteten Strukturveränderungen eher moderat waren. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der A-Ring-Konformation für die hochaffine Bindung der Thiopeptide an den Protein/RNA-Komplex und die starke Formabhängigkeit der molekularen Erkennung.

Antimalariawirkung des Thiostreptons

Thiostrepton weist Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* auf. Unsere neuartigen semisynthetischen Thiostreptonderivate zeigten Plasmodien-Wachstumshemmung in niedrigen mikromolaren Konzentrationen und waren bis zu 10x aktiver als Thiostrepton selbst. Interessanterweise zeigten sich besonders lipophile Derivate als sehr aktiv, deren antibakterielle Wirksamkeit vergleichsweise gering war. Phänotypische Untersuchungen legten einen neuartigen Wirkmechanismus in Plasmodien nahe. Fluoreszenzmikroskopische Experimente mit den fluoreszenten Thiostreptonsonden und Kolkalisierung mit Antikörpern wiesen darauf hin, dass Thiostrepton im Eukaryoten an das Proteasom bindet. In Folge konnte die inhibitorische Wirkung der Thiostreptonderivate auf die Proteaseaktivität des Proteasoms in enzymatischen Assays mit fluorogenen Substraten spezifisch nachgewiesen werden. Interessanterweise wird die Caspaseaktivität des Proteasoms um ungefähr eine Größenordnung stärker inhibiert als die Chymotrypsinaktivität. Damit konnte zum ersten Mal die Zielstruktur der Thiopeptide in Plasmodien identifiziert und das Antimalaria-Wirkprofil schlüssig erklärt werden.

Biosynthese des Thiostreptons

Erst seit kurzer Zeit ist bekannt, dass die Biosynthese der Thiopeptide über die ribosomale Synthese eines linearen Vorläuferpeptids verläuft, gefolgt von umfangreichen post-translationalen Modifikationen. Alle Aminosäurereste des Thiostreptons stammen daher aus proteinogenen L-Aminosäuren. Das einzige Thiazolin im A-Ring des Thiostreptons ist jedoch D-konfiguriert. Es konnte gezeigt werden, dass das α -Proton des Thiazolins sehr leicht deprotoniert werden und in die D-Konfiguration überführt werden kann, die für Thiostrepton thermodynamisch bevorzugt ist. Die Umwandlung der Epimere wurde mittels NMR- und HPLC-Kinetiken charakterisiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Epimerisierung nicht auf Aminosäureebene sondern am Gerüst erfolgen kann und keiner „klassischen“ Aminosäure-Epimerase bedarf. Bislang wurde keine Epimerase im Biosynthesecluster des Thiostreptons gefunden.