

Antibiotika

Antivitamine oder Trojanische Pferde in der Mikrobiologie

FRANK JANKOWITSCH, JULIA SCHWARZ, VALENTINO KONJIK, CARMEN SCHNEIDER, MATTHIAS MACK
 INSTITUT FÜR TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE, FAKULTÄT FÜR BIOTECHNOLOGIE,
 HOCHSCHULE MANNHEIM

Vitamin analogs can be potent antibiotics. We exemplarily study the structural riboflavin (vitamin B₂) analog roseoflavin synthesized by *Streptomyces davaonensis* to pave the way for the structured analysis of other vitamin analogs yet to be discovered. We investigate the biosynthesis of roseoflavin, its mechanism of action, and the resistance mechanism of the producer. As riboflavin is the most important organic cofactor roseoflavin has a broad impact on the soil microbiome.

DOI: 10.1007/s12268-021-1573-9
 © Die Autoren 2021

■ Antivitamine sind Stoffe, die eine ähnliche Struktur wie Vitamine haben, aber andere physikalische bzw. chemische Eigenschaften. Antivitamine reduzieren oder hemmen die Aktivität bestimmter Enzyme oder RNA-Moleküle und damit auch das Wachstum der Zielzellen. Wir untersuchen modellhaft das

Riboflavin-analoge Antivitamin Roseoflavin aus *Streptomyces davaonensis*, das auch noch von einem zweiten Bakterium, *Streptomyces cinnabarinus*, gebildet wird. Die Strategie, aus einem lebensnotwendigen Stoff ein Antibiotikum zu bilden, ist clever: Eine gute Aufnahme der antibiotischen Vitaminanaloga durch Vitamintransporter ist garantiert, und damit erreichen diese tückischen Verbindungen als Trojanische Pferde leicht ihr molekulares Ziel. Da die meisten Vitamine an mehreren Stellen biochemisch aktiv sind, haben Antivitamine eine ganze Reihe von Zielmolekülen.

Streptomyces davaonensis bildet das Antivitamin Roseoflavin

Das Bakterium *S. davaonensis* wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe auf der Suche nach neuen bioaktiven Wirkstoffen aus einer Bodenprobe in der Nähe von Davao City, Philippinen, isoliert [1]. *S. davaonensis* scheidet auf stärkehaltigen Nährmedien ein wasserlösliches Pigment aus (Abb. 1). Die Arbeitsgruppe isolierte und analysierte das Pigment und nannte es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Riboflavin (Vitamin B₂, Abb. 2) und der roten Farbe Roseoflavin. Roseoflavin wirkt auffallend stark antibiotisch gegen Gram-positive Bakterienarten wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus*

aureus, wirkt aber nicht gegen Gram-negative. Klinisch wird Roseoflavin bisher nicht genutzt. Roseoflavin wird für die Selektion mikrobieller Riboflavinüberproduzenten eingesetzt, die zur biotechnologischen Herstellung der wichtigen Feinchemikalie Riboflavin verwendet werden.

Aufnahme und molekulare Wirkung von Roseoflavin

Unser Labor war das erste, das molekularbiologische und biochemische Arbeiten mit *S. davaonensis* aufnahm. Schnell fanden wir heraus, warum Roseoflavin nur auf Gram-positive Bakterien wirkt: Nur diese besitzen Riboflavintransporter, die auch für die Aufnahme von Roseoflavin sorgen. Nach Aufnahme wird Roseoflavin „aktiviert“ und in die FMN/FAD-Analoga Roseoflavinmononucleotid (RoFMN) bzw. Roseoflavin-Adenin-Dinucleotid (RoFAD) umgewandelt.

Diesen Umbau der Vorstufe (*prodrug*) Roseoflavin bewerkstelligen Flavokinase und FAD-Synthetasen. Diese Enzyme sind in allen Lebewesen vorhanden und bilden normalerweise die Enzym-Kofaktoren FMN und FAD aus Riboflavin und ATP. RoFMN und RoFAD binden an Flavoenzyme. Diese Enzyme sind an zahlreichen grundlegenden zellulären Funktionen beteiligt und nur in Kombination mit FMN oder FAD voll aktiv. Wenn Flavoenzyme statt FMN oder FAD RoFMN oder RoFAD gebunden haben, sind sie weniger oder gar nicht mehr aktiv. In einem rekombinanten, Roseoflavin-sensitiven *Escherichia coli*-Stamm konnten wir beispielsweise zeigen, dass 37 von 38 Flavoenzymen RoFMN oder RoFAD binden und dass dies zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität dieser Enzyme führt. Wir konnten darüber hinaus erstmals zeigen, dass FMN-RNA-Schalter durch RoFMN blockiert werden, bzw. dass diese in Bakterien weitverbreiteten genetischen Elemente Zielmoleküle für Antibiotika sein können. FMN-RNA-Schalter regulieren die Biosynthese und den Transport von Riboflavin; werden sie durch RoFMN dauerhaft abgestellt, führt dies zu Riboflavinmangel und



▲ Abb. 1: *Streptomyces davaonensis* bildet das rote Antibiotikum Roseoflavin.

damit zu reduziertem Wachstum. Merck, USA, entwickelt derzeit ein synthetisches Antiinfektivum (*Ribocil*) [2], das hemmend auf FMN-RNA-Schalter wirkt, aber keine Vitaminmangelsymptome im Patienten erzeugt.

S. davaonensis besitzt einen ganz speziellen FMN-RNA-Schalter, der zwar noch FMN bindet, aber kein RoFMN, was die Roseoflavinresistenz des Produzenten erklärt. Ganz bestimmte Nukleotide im 285 Nukleotide langen FMN-RNA-Schalter aus *S. davaonensis*, die übrigens auch im FMN-RNA-Schalter des zweiten bekannten Roseoflavinproduzenten *S. cinabarinus* vorkommen, sind dabei für die Resistenz verantwortlich. Im Umkehrschluss war die Aufklärung des Resistenzmechanismus ein wichtiger „Beweis“ dafür, dass Roseoflavin tatsächlich auf FMN-RNA-Schalter wirkt [3].

Biosynthese von Roseoflavin

Wir dachten ursprünglich, dass eine ganze Reihe von Enzymen benötigt würde, um aus Riboflavin Roseoflavin zu bilden bzw. um den Austausch einer Methylgruppe am aromatischen System von Riboflavin durch eine Dimethylamino-Gruppe zu bewerkstelligen. *S. davaonensis* löst das Problem jedoch mit wenigen Katalysatoren. Nicht Riboflavin, sondern Riboflavin-5'-phosphat (FMN) ist das Substrat für ein verhältnismäßig kleines Enzym (RosB, 29 kDa), das in einer oxidativen Kaskade zunächst das Schlüsselintermediat 8-Demethyl-8-amino-riboflavin-5'-phosphat synthetisiert (**Abb. 2**, [4]).

Allein wegen RosB hat sich die Untersuchung der Roseoflavinbiosynthese gelohnt. RosB ist das erste bekannte Enzym einer neuen Enzymklasse (mit einem neuen Reaktionsmechanismus), deren Vertreter Oxidoreduktasen, Decarboxylasen und Aminotransferasen in einem sind. Unsere darauffolgende Strukturanalyse von RosB legte nahe, dass RosB aus einem Elektronen-übertragenden Flavodoxin entstanden ist [5]. RosC und RosA komplettieren die Biosynthese von Roseoflavin – insgesamt sind also nur wenige Enzyme nötig, um aus einem Vitamin ein hochwirksames Antibiotikum zu bilden (**Abb. 2**).

Die Roseoflavin-Biosynthesegene befinden sich auf einem der terminalen Arme des linearen Chromosoms von *S. davaonensis* in Gesellschaft einer Vielzahl ande-

rer Gene des Sekundärstoffwechsels. Noch bilden *rosB*, *rosA* und *rosC* keine Transkriptionseinheit (**Abb. 2**), und man könnte spekulieren, dass *S. davaonensis* die Kompetenz zur Bildung von Roseoflavin erst spät in der Evolution erworben hat.

Die Sequenzierung des 9,5 Mbp Genoms von *S. davaonensis* und eine darauffolgende Transkriptionsanalyse waren nicht nur für die Aufklärung der Roseoflavinbiosynthese wichtig, sondern ergaben auch, dass *S. davaonensis* mit 17 ungewöhnlich viele funktionelle Riboflavin-Biosynthesegene besitzt. *S. davaonensis* hat demnach eine hohe katalytische Kapazität im Hinblick auf die Bildung von Flavinen, was gut zu einem Produzenten eines Riboflavinanalogons passt. Wir entdeckten u. a. mit RibAB5 ein Enzym, das fünf Mal aktiver ist als alle anderen bekannten RibABs. RibAB5 aus *S. davaonensis* ist ein schnelles „Eingangsenzym“ der Riboflavinbiosynthese und damit für biotechnologische Anwendungen höchst interessant.

Antibiose des flavinogenen Bakteriums *Streptomyces davaonensis*

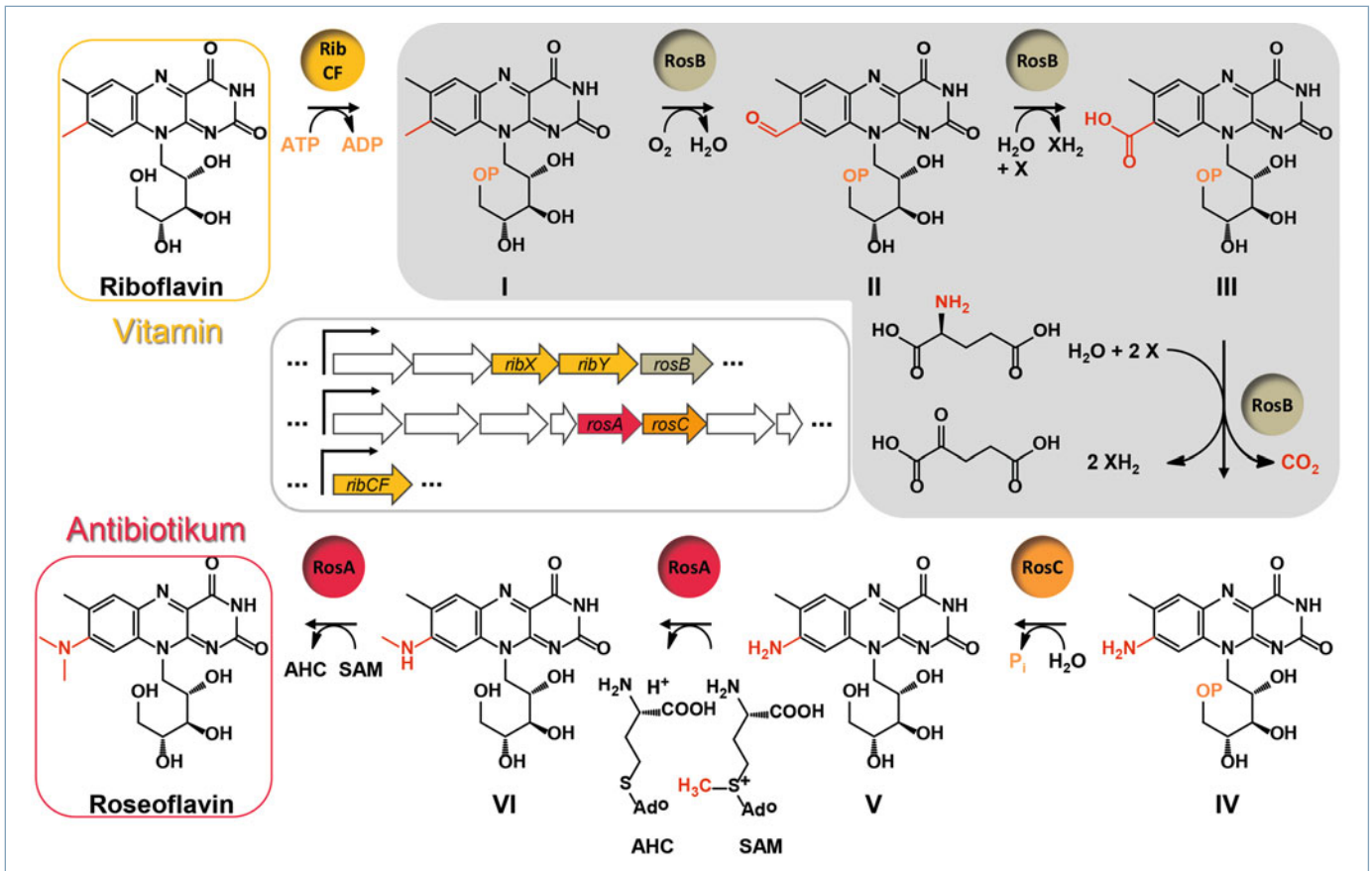
Riboflavin wird in seiner reduzierten Form (Dihydroriboflavin) von zahlreichen Mikroorganismen, aber auch Pflanzen ausgeschieden, um schlecht lösliches Eisen(III) zu gut löslichem Eisen(II) zu reduzieren (**Abb. 3**). Neben dieser assimilatorischen Eisenreduktion gibt es im Boden auch die dissimilatorische Eisenreduktion, die darauf abzielt, Reduktionsäquivalente im Rahmen kataboler Prozesse zu entsorgen.

Die Chancen, etwas extrazelluläres Riboflavin zu ergattern, stehen daher für die Mitbewohner im Boden recht gut, was auch daran liegt, dass sich Mikroorganismen gegenseitig durch die Ausscheidung und Aufnahme bestimmter Vitamine (u. a. Riboflavin) unterstützen. Auch wenn wahrscheinlich viele Bodenmikroorganismen Riboflavin selbst synthetisieren können, spart die Aufnahme des Vitamins aus der Umgebung metabolische Energie, schließlich benötigt die Synthese von Riboflavin ein Molekül GTP und zwei Moleküle Ribulose-5-phosphat.

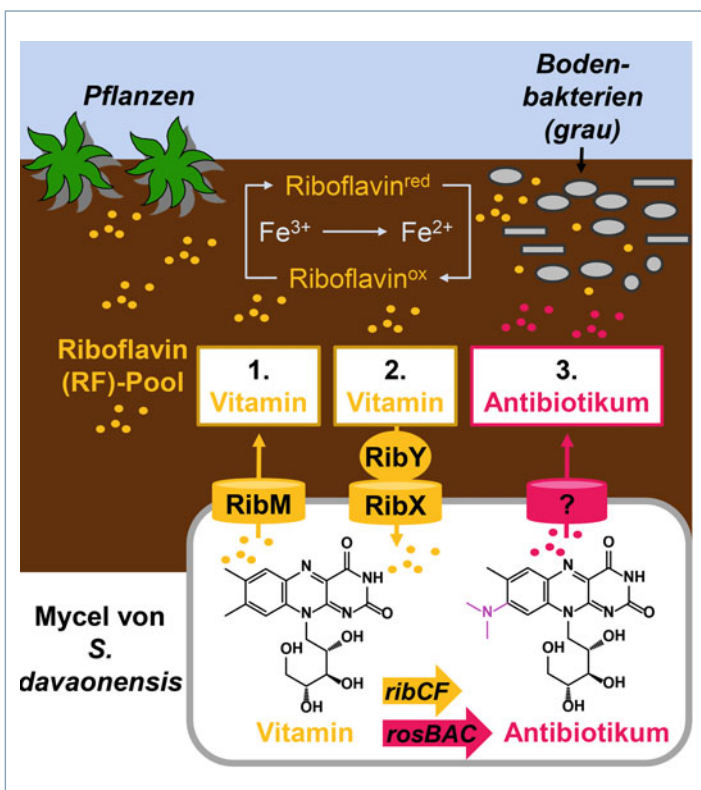
Die Aufnahme von Riboflavin scheint im Boden also normal zu sein was, u. a. erklärt, dass schon neun verschiedene

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Die Biosynthese von Roseoflavin in *Streptomyces davaonensis*. Die Enzyme sind als Kreise dargestellt. Die Flavokinase RibCF bildet den wichtigen Enzym-Kofaktor Flavinmononukleotid (FMN, I). Das Schlüsselenzym RosB (grau) katalysiert sowohl die Oxidation der Methylgruppe an FMN (I zu III) als auch eine Decarboxylierung bzw. die Übertragung einer Aminogruppe. Die Roseoflavin-Biosyntheseenzyme RosA, RosB und RosC sind auf das lineare Chromosom von *S. davaonensis* verteilt. Die Gene *ribXY* codieren für ein Riboflavinaufnahmesystem (s. Abb. 3). P: Phosphat.



Familien von Riboflavintransportern in verschiedenen Bakterien gefunden wurden. Wir bezeichnen Roseoflavin gerne als „Trojanisches Pferd“ und füttern die Nachbarn sozusagen an.

Ahnungslose Nachbarn von *S. davaonensis* nehmen Roseoflavin mittels Riboflavintransportern auf und gehen zugrunde. *S. davaonensis* gehört wahrscheinlich zunächst einmal ebenfalls zu den Riboflavinausscheidern (Abb. 3) und füttert die Nachbarn sozusagen an.

Unsere Transkriptomanalysen zeigen, dass *S. davaonensis* bei Eintritt in die stationäre Phase des Wachstums (Roseoflavin-Bildungsphase) die Gene eines hocheffizienten Riboflavin-Aufnahmesystems (RibXY) extrem stark exprimiert. *S. davaonensis* nimmt damit den Nachbarn das Riboflavin

◀ **Abb. 3:** Durch „Umschalten“ von Riboflavinausscheidung auf Roseoflavinausscheidung verstärkt *Streptomyces davaonensis* die Wirkung seines Antibiotikums. Riboflavin wird im Zuge der assimilatorischen bzw. dissimilatorischen Eisenreduktion von vielen Bodenmikroorganismen sowie Pflanzen ausgeschieden. Auch das flavinogene Bakterium *S. davaonensis* unterfüttert möglicherweise den Riboflavin-Pool (1.). Bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase nimmt *S. davaonensis* Riboflavin via RibXY wieder auf (2.), wandelt es in Roseoflavin um und scheidet das Antibiotikum wieder aus (3.; der Exporter ist noch unbekannt).

wieder weg, wandelt es mit den Enzymen RosB, RosC und RosA in Roseoflavin um und scheidet das gebildete Antivitamin wieder aus. In Erwartung eines Vitamins nehmen die Riboflavin-hungrigen Mitbewohner Roseoflavin dann umso bereitwilliger auf. Da Flavine zusammen mit Eisen mit großem Abstand die häufigsten Kofaktoren [6] sind, hat ein toxisches Flavinderivat auch entsprechend großen Einfluss.

Ein verbreitetes System – als Medikament einsetzbar?

Wir hoffen, dass wir folgende Fragen im Hinblick auf das Vitaminanalogon Roseoflavin noch klären können:

- Welches regulatorische System koordiniert den Stoffwechsel von Riboflavin und Roseoflavin in *S. davaonensis*?
- Welches Protein ist für den Export von Roseoflavin verantwortlich?
- Welche Organismen hemmt Roseoflavin im Boden?
- Gibt es noch weitere natürliche Vitaminanaloge bzw. ist das Antivitamin-konzept noch weiter verbreitet?
- Kann man Roseoflavin als Rückfallmedikament zur Behandlung von z. B. MRSA-Infekten klinisch verwenden?

In Zusammenarbeit mit einer australischen Gruppe fanden wir heraus, dass die Behandlung mit Roseoflavin die Proliferation von Malariaerregern hemmt. Für erste *in vivo*-Versuche nutzten wir dabei *Plasmodium vinckei vinckei* in einem Maus-Infektionsmodell. Die mit Roseoflavin behandelten Mäuse zeigen allerdings die typischen Symptome eines Riboflavinmangels, daher wollen wir als nächstes ein ausgewogeneres Behandlungskonzept entwickeln.

Danksagung

Die AG Mack bedankt sich für die Förderung bei BMBF, DFG, der Landesstiftung-Baden-Württemberg, der Karl-Völker-Stiftung und der Konanz-Stiftung. Wir bedanken uns bei Jörn Kalinowski für die Sequenzierung und Analyse des Genoms von *S. davaonensis* und bei Ulrich Ermler für die Strukturanalysen. ■

Literatur

- [1] Otani S, Takatsu M, Nakano M et al. (1974) Letter: Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* 27: 86–87
- [2] Wang H, Mann PA, Xiao L et al. (2017) Dual-targeting small-molecule inhibitors of the *Staphylococcus aureus* FMN riboswitch disrupt riboflavin homeostasis in an infectious setting. *Cell Chem Biol* 24: 576–588

- [3] Pedrolli DB, Matern A, Wang J et al. (2012) A highly specialized flavin mononucleotide riboswitch responds differently to similar ligands and confers roseoflavin resistance to *Streptomyces davaonensis*. *Nucleic Acids Res* 40: 8662–8673
- [4] Schwarz J, Konjik V, Jankowitsch F et al. (2016) Identification of the key enzyme of roseoflavin biosynthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 55: 6103–6106
- [5] Konjik V, Brunle S, Demmer U et al. (2017) The crystal structure of RosB: insights into the reaction mechanism of the first member of a family of flavodoxin-like enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* 56: 1146–1151
- [6] Monteverde DR, Gomez-Consarnau L, Suffridge C, Sanudo-Wilhelmy SA (2017) Life's utilization of B vitamins on early Earth. *Geobiology* 15: 3–18

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Matthias Mack
 Institut für Technische Mikrobiologie
 Fakultät für Biotechnologie
 Hochschule Mannheim
 Paul-Wittsack-Straße 10
 D-68163 Mannheim
 m.mack@hs-mannheim.de

AUTOREN



Die AG Mack interessiert sich für Antivitamine und arbeitet darüber hinaus an der Verbesserung mikrobieller Produktionsstämme. Frank Jankowitsch, Julia Schwarz, Valentino Konjik und Carmen Schneider waren als Doktorand/inn/en im Roseoflavin-Projekt tätig. Matthias Mack leitet das Institut für technische Mikrobiologie und kam im Rahmen seiner Arbeiten zur biotechnologischen Synthese des auch kommerziell wichtigen Riboflavins bei der Firma Hoffmann-La Roche AG in Basel erstmals mit Roseoflavin in Berührung.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer