

Die enzymkatalysierte Bildung von Sulfidbrücken in Lantibiotika

Günther Jung*

Stichwörter:

Biosynthese · Enzymkatalyse · Kristallisation · Metalloenzyme · Zink

Polycyclische Peptidantibiotika, deren Aminosäuren durch eine Thioethergruppe verknüpft sind, wie beispielsweise Lanthionine, werden als Lantibiotika bezeichnet.^[1] Lantibiotika werden im Unterschied zu anderen Peptidantibiotika ribosomal synthetisiert und posttranslational durch Enzyme modifiziert. Biologisch aktive Polypeptide enthalten mehrere Sulfidbrücken, ebenso wie andere modifizierte Reste, beispielsweise 2,3-Didehydroaminosäuren.^[2] Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Biosynthese der Lantibiotika über Vorläuferpeptide verläuft. Eine Vielzahl von Enzymen modifiziert diese Polypeptide an spezifischen Serin-, Threonin- und Cysteinresten.^[3-6] Diese Studien ermöglichen die gentechnologische Konstruktion und Weiterentwicklung verschiedener Lantibiotika-Analoga (z.B. durch zielgerichtete Mutagenese). Beispielsweise sind viele Analoga von Epidermin (ein hoch wirksames Medikament gegen Akne) und Nisin (ein wichtiger Konservierungsstoff für Lebensmittel) bekannt.^[7-9]

Lantibiotika vom Typ A, wie Epidermin und Nisin, sind längliche Amphiphile, die auf Gram-positive Bakterien wirken, indem sie an die Zellwandvorstufe Lipid II binden. Dabei bilden sie eine spezifische, für Ionen durchlässige Membranpore, und sie hemmen die Zellwandbiosynthese.^[10,11]

Typ-B-Lantibiotika, globuläre Polypeptide mit stark gespannten Sulfidringen, greifen dagegen in spezifische enzymatische Prozesse ein.^[12]

1988 wurde das erste Strukturturen eines Lantibiotikums entdeckt, und die Grundsätze der Biosynthese von Lantibiotika durch posttranskriptionale Modifikation von Vorläuferproteinen wurden am Beispiel von Epidermin aufgezeigt.^[1] Studien über den Biosynthese-Gencluster des Nisins folgten im Jahr 1989 (siehe Lit. [3,4,12]).

Ein weiterer Höhepunkt der Lantibiotikaforschung war die Isolierung, Sequenzierung und massenspektrometrische Charakterisierung der unterschiedlichen Präpeptide, die während der Biosynthese des Lantibiotikums Pep5 auftreten.^[13] Das Vorläuferpeptid prä-Pep5 beispielsweise ist insgesamt sechsfach dehydratisiert (an vier Threonin- und zwei Serinresten). Gänzlich unmodifiziertes prä-Pep5 sowie prä-Pep5 mit drei Sulfidringen und zwei α,β -Didehydroaminosäuren wurden ebenfalls isoliert.

Die Kristallstruktur des Metalloenzymes NisC wurde kürzlich durch Röntgenbeugung aufgeklärt.^[14] Die Cyclase NisC katalysiert die Bildung des Lantibiotikums Nisin, indem sie im dehydratisierten Vorläuferprotein NisA (57 Aminosäuren) mehrere Sulfidbrücken einführt (Abbildung 1). Die Charakterisierung des dehydratisierten Vorläuferproteins von Nisin durch van der Donk und Mitarbeiter^[14] stützte die Ergebnisse von Kuipers et al.^[15] über dieses Zwischenprodukt der Lantibiotika-Biosynthese.

In den vergangenen 15 Jahren wurden die meisten Rätsel für Epidermin, Pep5, Nisin und andere Lantibiotika

gelöst. Sowohl das Icosapeptid Epidermin als auch Mersacidin enthalten eine zusätzliche, untypische Modifikation infolge einer enzymatischen oxidativen Decarboxylierung des C-terminalen Cysteinrests. Dieser Prozess findet noch vor der enzymkatalysierten Bildung der Sulfidringe statt. Das oxidierende Flavoenzym EpiD^[16] konnte als erstes Enzym der Lantibiotika-Biosynthese in Reinform exprimiert und isoliert werden. EpiD wurde ausgiebig *in vitro* an Peptidylcystein-Bibliotheken mit HPLC-MS getestet.^[17] Interessanterweise oxidiert EpiD schon kurze Di-peptidylcysteine, was die Synthese von Peptiden mit ungewöhnlichen amidierten C-Termini und *S*-(2-Aminovinyl)-cystein-Ringen möglich macht. Außerdem führte gerade dieses Spezialgebiet der Lantibiotika-Forschung zur Entdeckung von verwandten Flavoenzymen, die durch Röntgenstrukturanalysen und In-vitro-Studien untersucht werden konnten.^[18,19]

Im Ausblick eines Aufsatzes über Lantibiotika aus dem Jahre 1991 heißt es:^[2] „*Wir wissen noch nicht, wodurch die stereospezifische Addition der Cystein-SH-Gruppe an die Doppelbindungen der α,β -Didehydroaminosäuren katalysiert wird.*“ Seitdem haben verschiedene Arbeitsgruppen von Peptidchemikern gezeigt, dass Lantibiotika mit der korrekten Konfiguration durch biomimetische Thioethercyclisierungen von synthetischen Peptiden mit α,β -Didehydroaminosäuren und Cysteinen erhalten werden.^[12,20] Daher sollten nichtenzymatische, spontane Cyclisierungsschritte an der Lantibiotika-Biosynthese beteiligt sein. Van der Donk und Mitarbeiter haben in ihrem aktuellsten Bericht über Struktur und Me-

[*] Prof. Dr. G. Jung

Institut für Organische Chemie
Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18
72075 Tübingen
Fax: (+49) 7071-29-5560
E-Mail: guenther.jung@uni-tuebingen.de

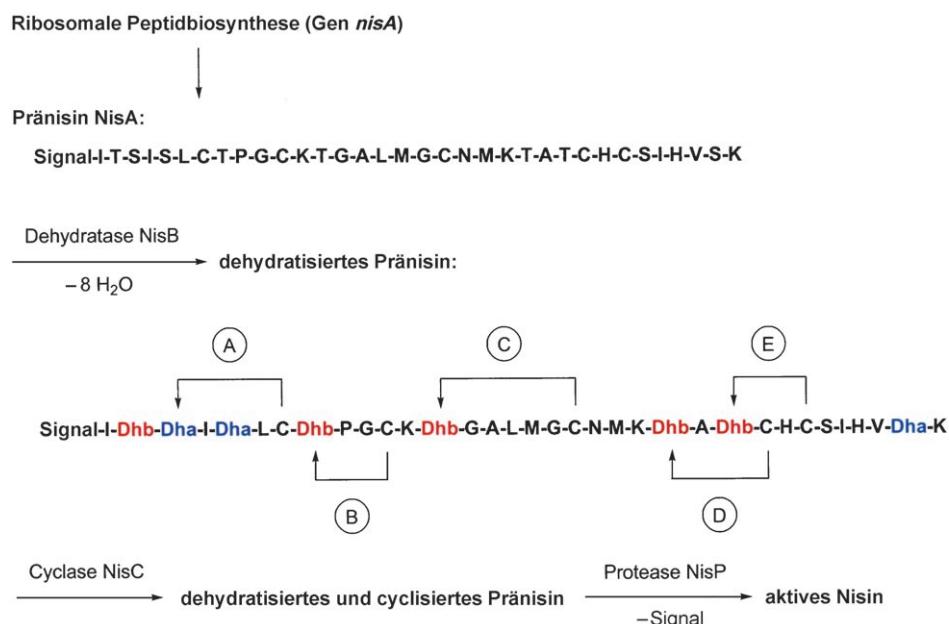


Abbildung 1. Biosynthese von Nisin: Die Sequenzen von Pränisin (NisA) und dem dehydratisierten Präpeptid von Nisin (Dha=2,3-Didehydroalanin, Dhb=2,3-Didehydrobutyryl) zeigen die Bildung der Thioetherringe A bis E; dieser Prozess wird durch die Cyclase NisC katalysiert. Danach wird das Signalpeptid (MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPR) durch die Peptidase NisP abgespalten, und das aktive Lantibiotikum Nisin entsteht.

chanismus der Lantibiotika-Cyclase in der Biosynthese von Nisin eine detaillierte Beschreibung der enzymatischen Cyclisierung durch NisC geliefert.^[14] Zunächst katalysiert das Enzym die Bildung aller fünf Sulfidbrücken des Nisins, obwohl sich diese bezüglich der Ringlänge und des Elektrophils (2,3-Didehydroalanin (Dha) oder 2,3-Didehydrobutyryl (Dhb)) unterscheiden. Besonders bemerkenswert ist daran, dass eine Cyclisierung von dehydratisiertem Pränisin auch *in vitro* beobachtet werden konnte.^[14] Bis dahin war man der Überzeugung, dass das Signalpeptid von NisA entscheidend für die Erkennung von dehydratisiertem Pränisin als Substrat durch NisC ist. Der erste experimentelle Beweis für die Beteiligung solcher LanC-Proteine an der Regulierung der Cyclisierung gelang Sahl und Mitarbeiter im Jahr 1995 anhand des Biosynthesystems von Pep5.^[21] Die Auswirkungen von Mutationen im Signalpeptid auf die Biosynthese des Lantibiotikums Pep5 wurden später beschrieben.^[22] Vergleichbare Experimente folgten für NisC. Interessanterweise erzeugt die Lantibiotika-Cyclase von Subtilin, SpaC, aus dehydratisiertem Pränisin auch Nisin, was zusätzlich dafür spricht, dass Dehydratisierung und Cyclisierung bei Typ-A-Lantibiotika unabhängige Prozesse sind. (Dies gilt

nicht für Typ-B-Lantibiotika, siehe unten.)

Die Kristallstruktur des Zinkenzyms NisC zeigt ein Protein mit insgesamt 14 α -Helices. Sieben dieser Helices bilden die innere Schicht einer Toroidstruktur (α/α -Fass), in deren Zentrum sich das Zinkion befindet. Dieses Ion ist tetraedrisch durch zwei Cysteinreste, einen Histidinrest und ein Molekül Wasser koordiniert (Abbildung 2).^[14]

Ähnlichkeiten von NisC zur Farnesylyltransferase und zu anderen Zinkproteinen, die Thiolalkylierungen katalysieren, wurden angesprochen. Allerdings unterscheiden sich die von van der Donk und Mitarbeitern beschriebenen Enzyme^[23] topologisch von der α - α -

Fass-Struktur des NisC und Enzymen, die sie selbst diskutiert haben.^[14] (Zur Verdeutlichung siehe die Übersicht von Wendt und Schulz.^[24]) Die Autoren wiesen auch auf eine interessante Homologie unter LanC-antigen Proteinen in Säugern hin (20–25 % Sequenzidentität, konservierte Liganden um das Zinkion, eine Base im aktiven Zentrum, ausgedehnte Domänen). Diese Proteine katalysieren möglicherweise eine post-transkriptionale Cysteinmodifikation an einem noch unbekannten Protein.

Zur Katalyse der Cyclisierung im neutralen pH-Bereich muss NisC die Thiolgruppe des Cysteins zunächst deprotonieren, um die nucleophile Addition an α,β -ungesättigte Aminosäuren

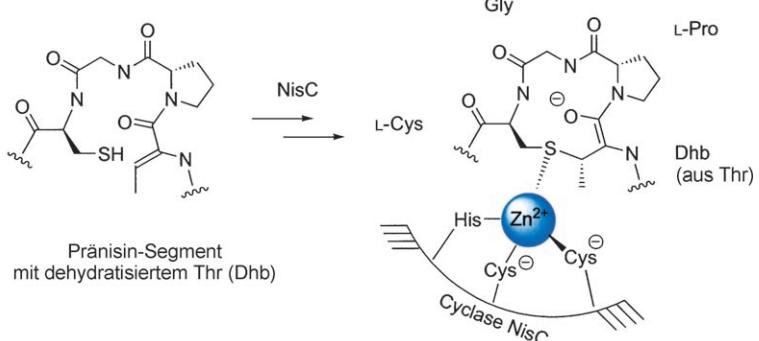


Abbildung 2. Thioether-Ringbildung für das Segment Thr-Pro-Gly-Cys von Pränisin (NisA) über das dehydratisierte Pränisin als Substrat. Das Schwefelatom von L-Cystein ((R)-Cystein) koordiniert nach wie vor an Zn^{2+} , das durch die Reste His331, Cys330 und Cys284 der Cyclase NisC komplexiert ist. (Wasserstoffatome sind nicht gezeigt; adaptiert aus Lit. [14].)

durch Aktivierung als Thiolat zu beschleunigen. Interessanterweise bildet sich bei der zur Cyclisierung führenden *anti*-Addition des Cysteinthsiolats an das β -Kohlenstoffatom von Dha oder Z-Dhb ein Enolat-Zwischenprodukt (Abbildung 2). Da dieses Enolat am α -Kohlenstoffatom protoniert wird, kommt es zur Inversion der Konfiguration am α -Kohlenstoffatom im Vergleich zum ursprünglichen L-Threonin. Das L-Cystein behält hingegen seine *R*-Konfiguration im gebildeten (2S,3S,6R)- β -Methyllanthionin (MeLn) bei.^[25]

Die LanC-Enzyme bestimmen nicht nur die Regio- und Stereoselektivität, sondern auch die Richtung der Sulfidringbildung: Für Typ-A-Lantibiotika erfolgt diese immer vom N-Terminus zum C-Terminus; das C-terminale Cystein wird also mit der Dehydroaminoäure Dha oder Dhb am N-Terminus verbunden. Allerdings werden manche Sulfidbrücken in Typ-B-Lantibiotika vom N-terminalen Cystein zur C-terminalen Dehydroaminoäure geknüpft. Van der Donk und Mitarbeiter haben den grundlegenden Unterschied zwischen beiden Möglichkeiten experimentell gezeigt. Die Ringbildung kann demnach entweder über ein endocyclisches (Typ A) oder über ein exocyclisches Enolat (Typ B) verlaufen.^[12,14]

LanC-Enzyme sorgen in der Natur auch dafür, dass die Cyclisierungen von Lanthioninen ähnlich schnell verlaufen wie diejenigen von β -Methyllanthioninen; in biomimetischen Modellstudien wurden hier Unterschiede von mehreren Größenordnungen ermittelt.^[20]

Große difunktionelle Enzyme (LanM) von unbekannter Struktur sind an der Dehydratisierung und Cyclisierung der kompakten, globulären Typ-B-Lantibiotika beteiligt. Das Enzym LanM unterscheidet sich von LanB und LanC für die Biosynthese der Typ-A-Lantibiotika (siehe Lit. [12]). Diese Enzyme benötigen Adenosintriphosphat (ATP) und Mg^{2+} , zeigen aber keine Homologie zu LanB und nur 20–27% Sequenzhomologie zu LanC-Proteinen.

Der Mechanismusvorschlag für NisC (Abbildung 2) beruht nicht auf der Kristallstruktur eines Substrat-Enzym-Komplexes, sondern auf einem Docking-Experiment. Dazu wurde der 13-gliedrige B-Ring von Nisin verwendet,

der aus Pro9, Gly10 und MeLn besteht. NMR-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass diese drei Komponenten eine β -Schleife bilden. Nichtsdestotrotz lieferten die Modellstudien erste Hinweise auf den Mechanismus der Cyclisierung, die zur Bildung von Sulfidringen mit vier (Ring B) bis sieben Aminosäuren in der flachen Substratmulde von NisC führt. Das positiv geladene Signalpeptid des dehydratisierten Pränisins scheint dabei spezifisch in einer negativ geladenen Furche von NisC zu binden.

Dennoch ist die genaue Rolle des Signalpeptids noch nicht hinreichend aufgeklärt, ebenso wie der Ablauf der Ringbildung bei der Biosynthese des Nisins. Da die Präpeptide der Lantibiotika und ihrer Derivate durch chemische Peptidsynthese zugänglich sind,^[26] könnten chemische und biochemische Studien diese Frage beantworten. Auch können dadurch neue Strategien für die Synthese cyclischer Peptide entwickelt werden, die bisher nur schwer oder gar nicht herstellbar waren. Die Lantibiotika-Forschung bleibt ein anspruchsvolles und faszinierendes Tätigkeitsfeld für die Entdeckung von Biosynthesemechanismen, das Chemiker und Biochemiker ebenso wie Mikrobiologen und Proteinforscher in seinen Bann zieht.

- [1] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähner, R. Kellner, G. Jung, *Nature*, **1988**, 333, 276–278.
- [2] G. Jung, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1051–1068.
- [3] *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H.-G. Sahl), Escom, Leiden, **1991**.
- [4] R. W. Jack, G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *Lantibiotics and Related Peptides*, Springer, Berlin, **1998**.
- [5] R. Jack, F. Götz, G. Jung in *Lantibiotics*, Vol. 7 (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed), VCH, Weinheim, **1997**, Kap. 8, S. 323–368.
- [6] R. W. Jack, G. Jung, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 310–317.
- [7] G. Bierbaum, C. Szekat, M. Josten, C. Heidrich, C. Kempter, G. Jung, H.-G. Sahl, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 385–392.
- [8] B. Ottenwälter, T. Kupke, S. Brecht, V. Gnau, J. Metzger, G. Jung, F. Götz, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 3894–3903.
- [9] O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. Ottenwälter, H. M. Dodd, N. Horn, J. Metzger, T. Kupke, V. Gnau, R. Bongers, P. van den Bogaard, K. Kosters, H. S. Rollema, W. M. de Vos, R. J. Siezen, G. Jung, F. Götz, H.-G. Sahl, M. J. Gasson, A. van Leeuwenhoek, *J. Microbiol.* **1996**, 69, 161–170.
- [10] H. Brötz, M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *Mol. Microbiol.* **1998**, 30, 317–327.
- [11] E. Breukink, I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H.-G. Sahl, B. de Kruijff, *Science* **1999**, 286, 2361–2364.
- [12] Eine umfassende Übersicht zu Lantibiotika deckt auch die neueste Literatur über Genetik, Biosynthese, Struktur und Wirkungsweise ab: C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 633–683.
- [13] H.-P. Weil, A. G. Beck-Sickinger, J. Metzger, S. Stevanovic, G. Jung, M. Josten, H.-G. Sahl, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 194, 217–223.
- [14] B. Li, J. P. J. Yu, J. S. Brunzelle, G. N. Moll, W. A. van der Donk, S. K. Nair, *Science* **2006**, 311, 1464–1467.
- [15] A. Kuipers, E. de Boef, R. Rink, S. Fekken, L. D. Kluskens, A. J. M. Driesen, K. Leenhouts, O. P. Kuipers, G. N. Moll, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 22176–22182.
- [16] T. Kupke, C. Kempter, G. Jung, F. Götz, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11282–11289.
- [17] C. Kempter, T. Kupke, D. Kaiser, J. W. Metzger, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2235–2238; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2104–2107.
- [18] P. Hernández-Acosta, D. G. Schmid, G. Jung, F. A. Culiáñez-Macià, T. Kupke, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20490–20498.
- [19] T. Kupke, M. Uebel, D. Schmid, G. Jung, M. Blaessel, S. Steinbacher, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31838–31846.
- [20] Y. Zhu, M. D. Gieselmann, H. Zhou, O. Averin, W. A. van der Donk, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3304–3315.
- [21] S. Neis, G. Bierbaum, M. Josten, C. Kempter, G. Jung, H.-G. Sahl, *FEMS Lett.* **1997**, 149, 249–255.
- [22] C. Meyer, G. Bierbaum, C. Heidrich, M. Reis, J. Süling, M. I. Iglesias-Wind, C. Kempter, E. Molitor, H.-G. Sahl, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 232, 478–489.
- [23] Siehe Lit. [14] und die Literaturstellen 16 und 17 darin.
- [24] K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure*, **1998**, 6, 127–133.
- [25] In Abbildung 4 von Lit. [14] verwendeten die Autoren die verwirrende konventionelle α -Zuordnung für die L-Cystein((*R*)-Cystein)-Einheit von MeLn.
- [26] A. G. Beck-Sickinger, G. Jung in *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H.-G. Sahl), Escom, Leiden, **1991**, S. 218–230.