

Erweiterung des Biosyntheserepertoires in der ribosomalen Peptidsynthese

Bradley S. Moore*

Bakteriozine · Biosynthese · Enzyme · Naturstoffe ·
Ribosomale Peptide

Naturstoffe sind inspirierend: Chemikern dienen sie als Grundlage für die Entwicklung von neuen Synthesemethoden und immer empfindlicheren Analysetechniken, und sie helfen Biologen bei der Suche nach molekularen Zielstrukturen und Wirkstoffen oder beim Studium der Kommunikationswege von Zellen oder ganzer Organismen. Biochemiker schließlich nutzen Naturstoffe, um die Stoffwechselwege zu erforschen, über die die Natur komplexe organische Moleküle aufbaut. Auf die eine oder andere Weise haben Naturstoffe so ihren Beitrag zur Entwicklung der modernen Naturwissenschaften geleistet.

Im heutigen postgenomischen Zeitalter werden auf dem Gebiet der Naturstoffbiosynthese fortlaufend faszinierende Entdeckungen gemacht, die bereits eine Vielzahl neuer sekundärmetabolischer Transformationen aufgezeigt haben. Ausgehend von natürlichen cyclischen Peptiden wurden hierbei in jüngster Zeit neuartige Biosyntheseprozesse entdeckt, die mit der posttranslationalen Modifikation von ribosomal abgeleiteten bakteriellen Peptiden zusammenhängen. Besonders hervorzuheben sind die Cyanobakterien, die für ihre geradezu unheimliche Fähigkeit bekannt sind, eine breite Vielfalt von strukturell diversen Peptidylprodukten zu synthetisieren.^[1] Oft nutzen diese Bakterien nicht-ribosomale Peptidsynthasesysteme, wodurch sie weitaus mehr Substrate verarbeiten können als nur die 20 proteinogenen Aminosäuren, auf die die ribosomalen Peptide (RPs) beschränkt sind. In jüngsten Studien konnten nun aber die Gruppen um Schmidt^[2] und Hertweck/Dittmann^[3] neue enzymatische Prozesse für die Diversifizierung auch ribosomal codierter Peptide aufzeigen.

Der allgemeine Ablauf bei der Biosynthese bakterioziner RPs, von denen viele über potente antimikrobielle oder toxische Eigenschaften verfügen, beginnt mit der Synthese einer Peptidvorstufe mit erweitertem N-Terminus, die verschiedene Arten von posttranslationalen Modifikationen eingehen kann, an die sich dann die proteolytische Spaltung unter Freisetzung des aktiven Peptids anschließt.^[4] Beispiele

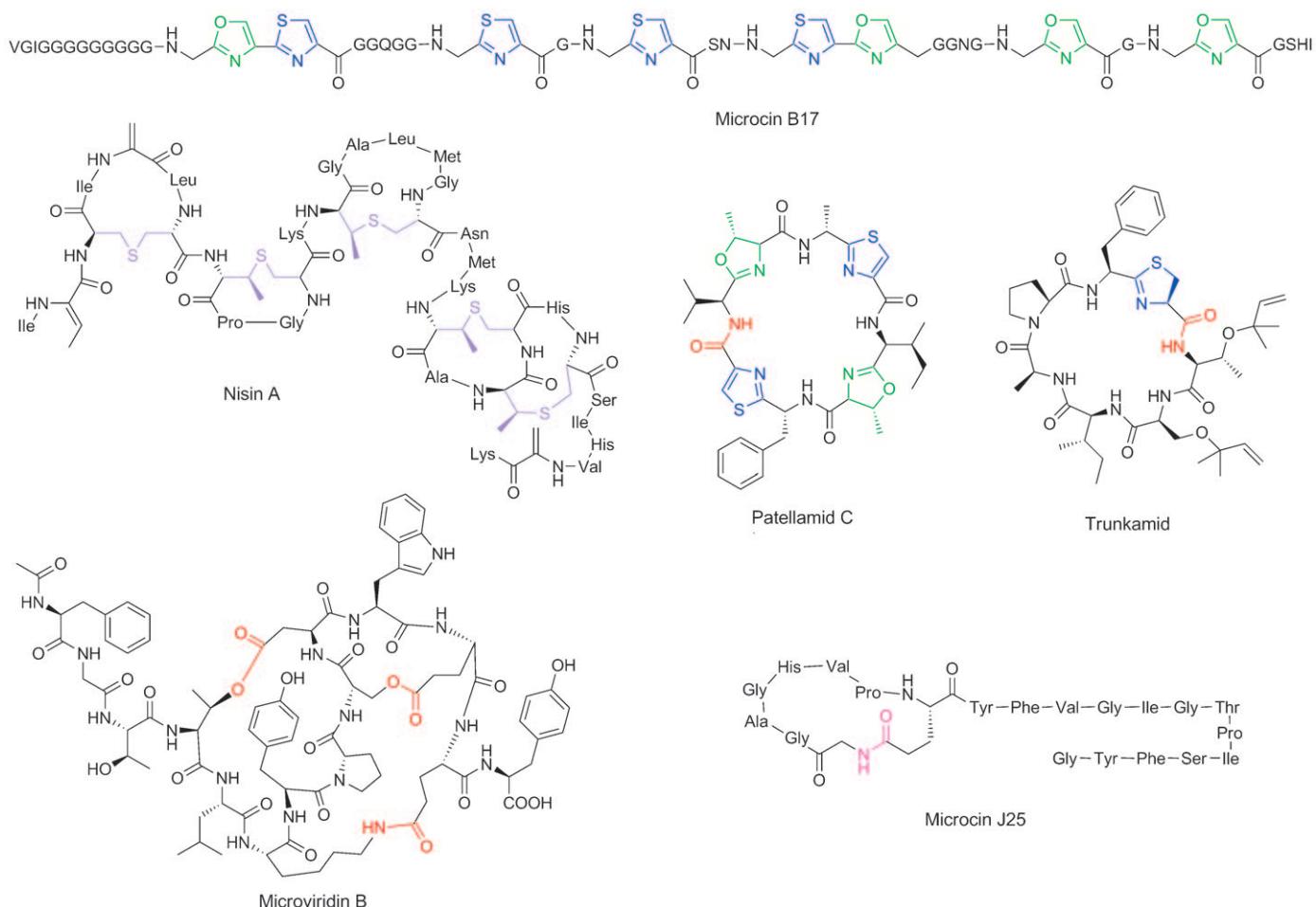
solcher Modifikationen, die aus der Ligation von Aminosäuren hervorgehen, sind die Bildung von Disulfidverketungen, von Lanthionin-Brücken wie im Lantibiotikum Nisin A,^[5] von heteroaromatischen Ringen wie im Microcin B17^[6] und von Makrolactamverkettungen (Amidbindungen) wie im Lasso-Peptid Microcin J25^[7] (Schema 1).

Vor einigen Jahren haben zwei unabhängige Studien den überraschenden Befund erbracht, dass die Klasse der vom Ascidin abgeleiteten cyclischen Patellamid-Peptide tatsächlich ribosomal im cyanobakteriellen Symbionten *Prochloron didemni* synthetisiert wird.^[8] Diese RPs, z. B. das Patellamid C (Schema 1), waren die ersten, die die charakteristischen Strukturmerkmale der Microcine in sich vereinten: Sie enthalten beide heteroaromatischen Ringe, und der Ringschluss erfolgt über eine N-C-Bindung. Während der Aufbau der Patellamide auf molekularer Ebene gut verstanden ist (was zur kombinatorischen Biosynthese von Strukturbibliotheken geführt hat),^[9] waren die biochemischen Merkmale, die mit den einzelnen enzymatischen Transformationen assoziiert sind, bislang ungeklärt – wenngleich spekuliert wurde, dass die Makrocyclisierung spontan ablaufen könnte.^[10] In neuen Studien haben nun Schmidt und Mitarbeiter ihre früheren Arbeiten fortgeführt und den schlüssigen Nachweis erbracht, dass es sich bei den „Cyanobakterien“ um eine Hauptklasse von cyanobakteriellen RPs handelt, die in Symbionten und frei lebenden Organismen produziert werden.^[2] Neu eingeführt in diese Peptidklasse wurde eine Anzahl von prenylierten cyclischen Peptiden wie die Patelline und der Antitumorwirkstoff Trunkamid (Schema 1). Eine bioinformatische Analyse des Biosynthesegenclusters *tru* konnte keine kanonischen Prenyltransferasen aufdecken, was auf das Vorliegen eines orthogonalen enzymatischen Mechanismus der Peptidylprenylierung in den Cyanobakterien schließen lässt. Die Plastizität des genetischen Systems konnte dadurch belegt werden, dass die heterologe Expression und Rekombination des *tru*-Gens in *Escherichia coli* zur Produktion des Naturstoffs führte. Damit bieten sich interessante Möglichkeiten für den Aufbau von Bibliotheken prenylierter RPs.

Hertweck, Dittmann und Mitarbeiter berichteten kürzlich, dass die cyanobakteriellen Toxine der Microviridin-familie mit tricyclischer Depsipeptidstruktur, wie Microviridin B (Schema 1) und J aus *Microcystis*, ebenfalls ribosomal synthetisiert werden.^[3] Das charakteristische Merkmal dieser Naturstoffe, das sie von anderen RPs unterscheidet, sind drei intramolekulare ω -Ester- und ω -Amid-Bindungen zwischen

[*] Prof. Dr. B. S. Moore

Scripps Institution of Oceanography and Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California at San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0204 (USA)
Fax: (+1) 858-534-1305
E-Mail: bsmoore@ucsd.edu
Homepage: <http://moorelab.ucsd.edu>

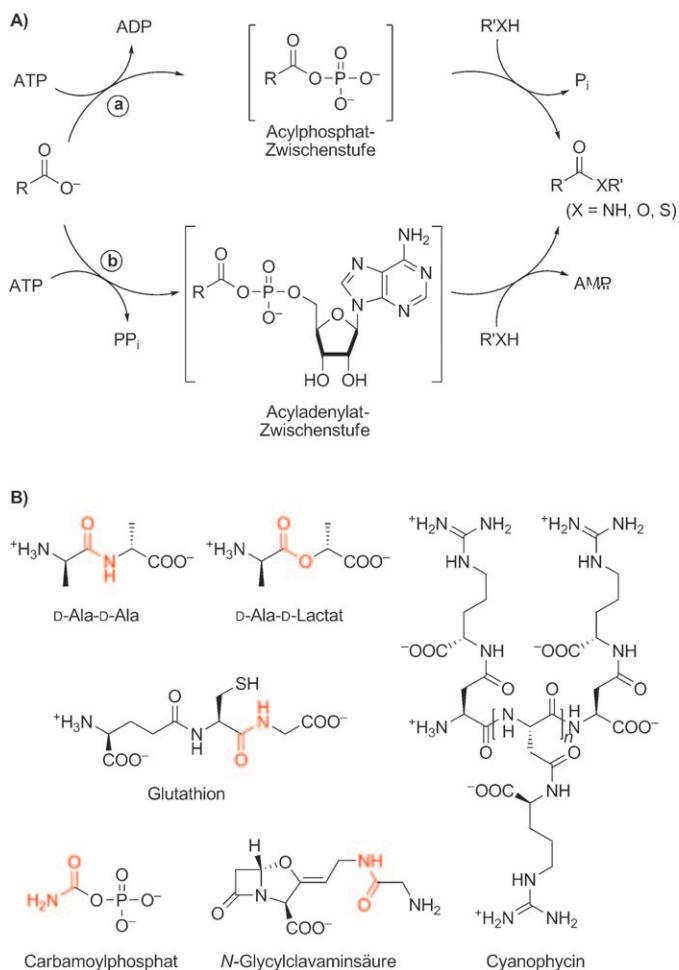


Schema 1. Strukturen ribosomal synthetisierter bakterieller Peptide mit charakteristischen Strukturelementen: Microcine (Microcin B17 und J25), Lantibiotika (Nisin A), Cyanobactine (Patellamid C und Trunkamid) und Microviridin B. Posttranskriptionale Modifikationen, die aus der Konjugation zweier Aminosäuren resultieren, sind: Oxazolin- und Oxazolringe (grün), Thiazolin- und Thiazolring (blau), Lanthionin-Brücken (violett), Amidbindungen durch Makrocyclisierung terminaler Aminosäuren (orange und rosa) sowie Ester- und ω -Amid-Bindungen unter Beteiligung von Seitenkettenresten (rot).

Seitenkettenresten. Eine Betrachtung der Microviridin-Biosyntheseloci (*mdn*) aus zwei produzierenden Stämmen offenbarte zwei Gene (*mdnB* und *mdnC*), die für ATP-abhängige Carboxylatamin/Thiol-Ligasen codieren, neben dem angrenzenden Gen der Microviridinvorstufe (*mdnA*). Die Genprodukte MdnB und MdnC gehören überraschenderweise zur Überfamilie der ATP-Grasp-Enzyme, die auch die D-Alanin:D-Alanin-Ligase, die Glutathionsynthase, die Biotincarboxylase und die Succinat-CoA-Ligase einschließt.^[11] Kondensierende Enzyme dieser Überfamilie sind im Primärmetabolismus zahlreich vertreten und operieren durch ATP-Aktivierung von Carboxylaten zu Acylphosphat-Zwischenstufen, die auf diese Weise für nucleophile Angriffe unter Bildung von Amid-, Ester- und Thioesterbindungen vorbereitet werden (Scheme 2 A). Diese Reaktion ist orthogonal zum vorherrschenden Modus der ATP-vermittelten Kondensationen, der über die Spaltung von ATP in Acyladenylate und Pyrophosphat verläuft und in der ribosomalen und nichtribosomalen Synthese von Peptidbindungen auftritt.

Die Tatsache, dass sich die ATP-Grasp-Enzyme an der Bildung der Microviridine beteiligen, stellt für RPs ein be-

sonderes Verhalten dar, wie es außerhalb des Primärmetabolismus nur in seltenen Fällen anzutreffen ist, etwa bei der Synthese des Biopolymers Multi-L-arginyl-poly-L-asparaginsäure (Cyanophycin)^[12] und von N-Glycylclavaminsäure (Schema 2 B).^[13] Dies ist abermals ein Beispiel dafür, wie die Natur Schlüsselenzyme des Primärmetabolismus für die Biosynthese eines Naturstoffs „recycelt“. Die heterologe Expression der *mdnABC*-Genkassette in *E. coli* bestätigte, dass diese drei Gene nur für die Synthese des richtig gefalteten tricyclischen Depsipeptid-Kerns der Microviridine vor der Spaltung des N-terminalen Signalpeptids zuständig sind.^[3] Die funktionelle Charakterisierung des Microviridins bleibt künftigen In-vitro-Analysen überlassen. Obwohl die Bildung der ω -Amid-Bindung des Microviridins analog zu der in den Lasso-Peptiden Microcin J25^[7] und Capistruin^[14] erfolgt, in denen das Macrolactam durch eine ATP-abhängige Reaktion zwischen der α -Aminogruppe von Gly1 und den Carboxygruppen der Glu- bzw. Asp-Seitenketten gebildet wird, verläuft die enzymatische Route in diesem Fall über eine Acyladenylat-Zwischenstufe.



Schema 2. Biosynthese und Strukturen von Produkten der ATP-Grasp-Ligase. A) Die ATP-Aktivierung von Carbonsäuren durch ATP-Grasp-Ligasen verläuft über Acylphosphate (Weg a) oder über Acyladenylate (Weg b). P_i = anorganisches Phosphat, PP_i = Pyrophosphat. B) Durch ATP-Grasp-Ligase erzeugte Amid- und Esterbindungen (rot).

Der Befund, dass die neuartigen Peptide Trunkamid und Microviridin B und J zur Familie der ribosomalen Peptide gehören, erweitert zum einen das Repertoire an posttranskriptionalen Modifikationen und bietet darüber hinaus auch

Perspektiven für die biotechnologische Erzeugung chemischer Spezies durch Mixing und Matching von RP-modifizierenden Genen. Da die RP-Synthese sehr leicht reprogrammiert werden kann,^[9,15] wird es interessant sein zu verfolgen, wie diese Systeme gezielt manipuliert werden können und ob sich neue Leitverbindungen für die Wirkstoffentwicklung entwerfen lassen.

Online veröffentlicht am 7. Oktober 2008

- [1] R. M. van Wagoner, A. K. Drummond, J. L. C. Wright, *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, *61*, 89; M. Welker, H. von Dohren, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 530.
- [2] M. S. Donia, J. Ravel, E. W. Schmidt, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 341.
- [3] N. Ziemert, K. Ishida, A. Liamer, C. Hertweck, E. Dittmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7870; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7756.
- [4] J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477; S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, S. Rebuffat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 708.
- [5] B. Li, J. P. J. Yu, J. S. Brunzelle, G. N. Moll, W. A. van der Donk, S. K. Nair, *Science* **2006**, *311*, 1464.
- [6] Y.-M. Li, J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter, C. T. Walsh, *Science* **1996**, *274*, 1188.
- [7] S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzón, S. Zirah, C. Goulard, J. Peduzzi, S. Rebuffat, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 793.
- [8] E. W. Schmidt, J. T. Nelson, D. A. Rasko, S. Sudek, J. A. Eisen, M. G. Haygood, J. Ravel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7315; P. F. Long, W. C. Dunlap, C. N. Battershill, M. Jaspars, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1760.
- [9] M. S. Donia, B. J. Hathaway, S. Sudek, M. G. Haygood, M. J. Rosovitz, J. Ravel, E. W. Schmidt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 729.
- [10] B. F. Milne, P. F. Long, A. Starcevic, D. Hranueli, M. Jaspars, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 631.
- [11] M. Y. Galperin, E. V. Koonin, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2639.
- [12] H. Berg, K. Ziegler, K. Piotukh, K. Baier, W. Lockau, R. Volkmer-Engert, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5561; G. Füser, A. Steinbüchel, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 278.
- [13] H. Arulanantham, N. J. Kershaw, K. S. Hewitson, C. E. Hughes, J. E. Thirkettle, C. J. Schofield, *J. Biol. Chem.* **2005**, *281*, 279.
- [14] T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, S. Rebuffat, X. Xie, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11446.
- [15] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633.