

In-vitro-Biosynthese des Typ-III-Lantibiotikums Prä-Labyrinthopeptin A2 unter C-C-Bindungsknüpfung als posttranslationaler Modifizierung**

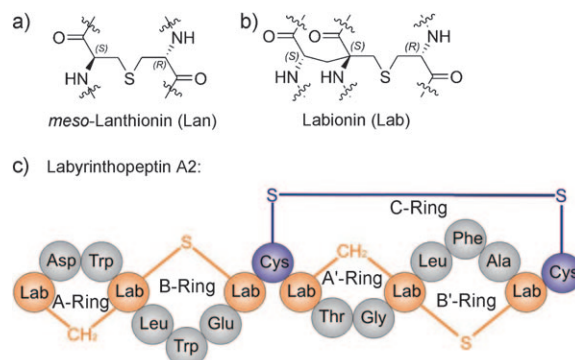
Wolfgang M. Müller, Timo Schmiederer, Paul Ensle und Roderich D. Süssmuth*

Dr. László Vértessy gewidmet

Lantibiotika sind ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika, die die Aminosäuren Lanthionin (Lan) und Methyllanthionin (MeLan) als bekannteste und charakteristische posttranslationale Modifikation enthalten.^[1] Die In-vitro-Charakterisierung der enzymatischen Prozessierung von Lantibiotika, besonders bei der Bildung von Lanthioninen, wurde bereits in Arbeiten zu Lacticin 481^[2] und Haloduracin^[3] beschrieben. Vor kurzem konnten wir die Labyrinthopeptine als Mitglieder einer neuen Lantibiotika-Familie identifizieren, die von dem Actinomyceten *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 produziert wird.^[4-6]

Im Zuge der Strukturaufklärung der Labyrinthopeptine, die zum Großteil mit kristallographischen Methoden erreicht wurde, konnte Labionin (Lab) als neues Aminosäurenmotiv identifiziert werden (Schema 1). Labionin, eine Tri(aminosäure) mit 2*S*,4*S*,8*R*-Konfiguration, besteht aus einem zentralen quartären Kohlenstoffatom mit einem Lanthionin-Motiv und einer ungewöhnlichen Methylenbrücke, die eine kovalente Verknüpfung zu einer weiteren Aminosäure bildet. Mit dieser Struktur werden zwei Ringsysteme im Peptid aufgebaut. Bioaktivitätsstudien eines In-vivo-Experiments in der Maus zeigten, dass Labyrinthopeptin A2 eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegen neuropathischen Schmerz ($ED_{50} = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$) aufweist. Die darüber hinaus gefundenen Labyrinthopeptine A1 und A3 wurden als zu A2 analoge Strukturen mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung und einer erweiterten Ringgröße des Lanthionin-Motivs diskutiert.^[4]

Bei der Identifizierung und Sequenzierung des Genclusters konnten nur fünf Gene der Biosynthese der Laby-



Schema 1. Strukturen a) der Aminosäure Lanthionin (Lan), eines charakteristischen Merkmals der Lantibiotika, und b) der Aminosäure Labionin (Lab) als Besonderheit c) der Labyrinthopeptine, einer neuen Klasse von Typ-III-Lantibiotika.


rinthopeptine zugeordnet werden. Unter ihnen befinden sich zwei Strukturgene, die für die Vorstufenpeptide der Labyrinthopeptine A1/A3 und A2 kodieren (*labA1/A2*), zwei Gene mit Sequenzhomologien zu Adenosintriphosphat-(ATP)-abhängigen ATP-Bindungskassetten(ABC)-Transportern (*labT1* und *labT2*) für den mutmaßlichen Peptidexport sowie ein Gen (*labKC*) für ein modifizierendes Enzym.^[4]

Das abgeleitete LabKC-Protein (MW = 95 kDa) besteht aus zwei Domänen, einer konservierten N-terminalen Domäne mit Merkmalen eukaryotischer Ser/Thr-Proteinkinasen sowie einer C-terminalen Domäne mit geringer Sequenzhomologie zu LanC-Cyclasen. Für eine erwartete Funktion als LanC-Cyclase fehlen in LabKC jedoch wichtige Reste des aktiven Zentrums, z.B. das Zink-Bindemotiv der Nisin-Cyclase.^[7] Weiterhin zeigt die Aminosäuresequenz von LabKC eine sehr hohe Homologie zum SapB-modifizierenden Enzym RamC und zu Sequenzen von Genclustern vieler weiterer, bereits vollständig sequenzierter Actinomyceten-Stämme (siehe Hintergrundinformationen).^[4,8] Die Labyrinthopeptide können aus diesem Grunde zur Klasse der Typ-III-Lantibiotika gezählt werden.

Hier zeigen wir den ersten Nachweis der In-vitro-Biosynthese von Prä-Labyrinthopeptin A2, in deren Verlauf von LabKC eine C-C-Verknüpfung katalysiert wird. Dabei wird erstmals Guanosintriphosphat (GTP) anstelle von ATP, wie zuvor bei anderen In-vitro-Biosynthesen von Lantibiotika beschrieben wurde,^[2,3] für die Phosphorylierung und Dehydratisierung von Serin verwendet. Aus den erhaltenen Daten konnte ein Modell zur Biosynthese der Labyrinthopeptide

[*] W. M. Müller, Dr. T. Schmiederer, P. Ensle, Prof. Dr. R. D. Süssmuth
Technische Universität Berlin, Fakultät II – Institut für Chemie
Straße des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-314-79651
E-Mail: suessmuth@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://suessmuth.chem.tu-berlin.de>

[**] Diese Arbeit wurde durch Fördermittel der DFG (SU239/8-1) und des Exzellenzclusters „Unifying Concepts in Catalysis“, koordiniert durch die TU Berlin und das BMBF (No. 0315198), unterstützt. Wir danken Dr. Mark Brönstrup (Sanofi-Aventis), Anne Hänchen und Jonny Nachtigall für wertvolle Diskussionen.

 Hintergrundinformationen (Experimentelle Details zur Überexpression der Labyrinthopeptin-Kinase-Cyclase LabKC, In-vitro-Assays, Synthese von Referenzverbindungen und zusätzliche Massenspektrometriedaten) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905909> zu finden.

abgeleitet werden. Unseres Wissens ist dies das erste Mal, dass die Bildung von Lanthionin-haltigen Peptidantibiotika unter Verwendung von GTP als Cosubstrat demonstriert werden konnte. Das Verständnis der Funktionsweise von LabKC und des gesamten Biosynthesewegs könnte den Weg für die Entwicklung neuer Labyrinthopeptin-Analoga ebnen.

Die DNA-Sequenz des Strukturgens *labA2* (kodierend für 38 Aminosäuren) enthält ein Ser-Xxx-Xxx-Ser-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-Motiv (Xxx = beliebige Aminosäure) als Vorstufenaminosäuren für das Labionin-Motiv. Für die In-vitro-Synthese des Labyrinthopeptin-A2-Präpeptids wurde die Kinase-Cyclase LabKC mit einem C-terminalen Hexahistidin (LabKC-His₆) in *Escherichia coli* überexprimiert und durch Affinitätschromatographie unter Verwendung immobilisierter Metallionen (IMAC) aufgereinigt (siehe Hintergrundinformationen). Als Substrat für LabKC fungierte das 38 Aminosäuren lange Labyrinthopeptin-A2-Vorstufenpeptid, das aus einem N-terminalen, 20 Aminosäuren langen Leader-Peptid und einem 18 Aminosäuren langen Strukturpeptid besteht und durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt wurde (siehe Hintergrundinformationen). Da LabKC eine konservierte Nucleotidbindungstasche enthält und die katalytische Domäne Ähnlichkeit zu der anderer Ser/Thr-Proteinkinase wie PknB aus *Mycobacterium tuberculosis* aufweist (siehe Hintergrundinformationen),^[9] verwendeten wir zunächst ATP als Substrat für die Phosphorylierung. Bei Inkubation von LabKC-His₆ mit dem LabA2-Vorstufenpeptid in Gegenwart von ATP und Mg²⁺-Ionen konnte jedoch keine Umsetzung beobachtet werden (Abbildung 1). Als alternative Phosphatdonoren wurden anschließend systematisch die weiteren Nucleotide Guanosintriphosphat (GTP), Thymidintriphosphat (TTP) und Cytidintriphosphat (CTP) getestet. Dabei wurde das LabA2-Präpropeptid ($M = 4272.88$ Da) nur bei Inkubation in Gegenwart von GTP oder dGTP und Mg²⁺-Ionen über einen Zeitraum von 12 h zum vierfach dehydratisierten Präpeptid ($[M-72+4H]^{4+}$) als Hauptprodukt umgesetzt (Abbildung 1 und Hintergrundinformationen). Beobachtet wurden außerdem Signale mit Massenverlusten von 54, 36 und 18 Da, was dreifachen, zweifachen und einfachen Dehydratisierungen entspricht, sowie die Signale dreier entsprechender monophosphorylierter und dehydratisierter Zwischenprodukte mit $M-54+80$ Da, $M-36+80$ Da und $M-18+80$ Da (Abbildung 1 und Tabelle 1). Diese Befunde zeigen eindeutig, dass LabKC als funktionell aktives Enzym erhalten werden konnte, das GTP statt ATP für die Phosphorylierung und anschließende Dehydratisierung von Serinen zu α,β -Didehydroalanin (Dha) verwendet.

Um zu überprüfen, ob LabKC außer der Dehydratisierung auch die Cyclisierung, also die Bildung der Lanthionin- und Labionin-Motive katalysiert, wurden ESI-MS/MS-Experimente durchgeführt. Da jedoch das lineare dehydratisierte (4x Dha) Präpeptid und die cyclischen Formen (2x Lan oder 2x Lab) keinen Unterschied in ihrer Molekülmasse zeigen ($M = 4200.84$ Da) und außerdem diese Peptide wegen der hohen Molekülmasse für MS/MS-Experimente schlecht zugänglich sind, gestaltete sich die Analytik als sehr anspruchsvoll. Die Peptide aus dem In-vitro-Assay zeigten des Weiteren keine nennenswerten Unterschiede in ihren Retentionszeiten während der Umkehrphasen-HPLC. Deshalb

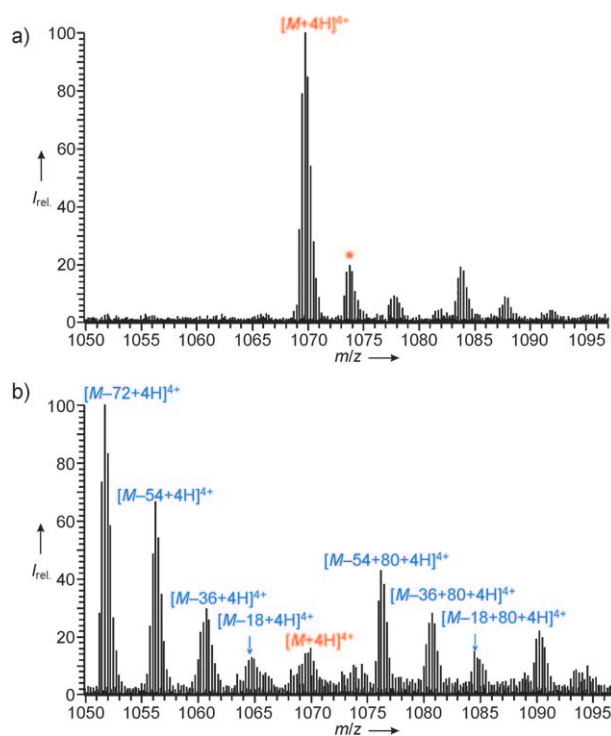


Abbildung 1. HR-ESI-Orbitrap-Massenspektren der Umsetzung des 38-mer-LabA2-Präpropeptids mit der Kinase-Cyclase LabKC-His₆. Die mit einem Stern markierten Signale kennzeichnen Methionin-Oxidationsprodukte des Peptids. a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Reaktion mit ATP (12 h); b) Assay in Gegenwart von 1 mM GTP durchgeführt (12 h).

Tabelle 1: Berechnete und gefundene Massen aus dem HR-ESI-Orbitrap-Massenspektrum der In-vitro-Umsetzung des LabA2-Präpropeptids mit der Kinase-Cyclase LabKC-His₆ und GTP.

Molekülmasse ^[a]	Ladungszustand	berechnete exakte Masse	gefundene Masse	Fehler [ppm]
M	+4	1069.2277	1069.2316	3.65
$M-18$	+4	1064.7251	1064.7262	1.03
$M-18+80$	+4	1084.7166	1084.7182	1.48
$M-36$	+4	1060.2224	1060.2256	3.02
$M-36+80$	+4	1080.2140	1080.2174	3.15
$M-54$	+4	1055.7198	1055.7243	4.26
$M-54+80$	+4	1075.7114	1075.7163	4.56
$M-72$	+4	1051.2171	1051.2221	4.76

[a] $M = 4272.88$ Da = nicht modifiziertes LabA2-Präpropeptid, Wasserabspaltungen: -18 ($-1 H_2O$) -36 ($-2 H_2O$) -54 ($-3 H_2O$) und -72 ($-4 H_2O$), $+80$ = Phosphorylierung.

wurden vor den ESI-MS/MS-Experimenten die Assay-Produkte des Umsatzes mit Trypsin verdaut, um geeignete, für die massenspektrometrische Sequenzanalyse zugängliche Fragmente zu erhalten. Im Leader-Peptid befinden sich zwei Trypsin-Spaltstellen C-terminal von Arg-16 und Arg-20 (Abbildung 2). Beim tryptischen Verdau des nicht modifizierten LabA2-Präpropeptids C-terminal von diesen Aminosäuren erhält man ein 22-mer und ein 18-mer. Nach Kollisionsaktivierung zeigte das lineare 22-mer eine intensive b- und y-Fragmentierung, die sehr gut der C-terminalen Aminosäuresequenz des Präpropeptids zugeordnet werden konnte (Abbildung 2 und Hintergrundinformationen). Dem-

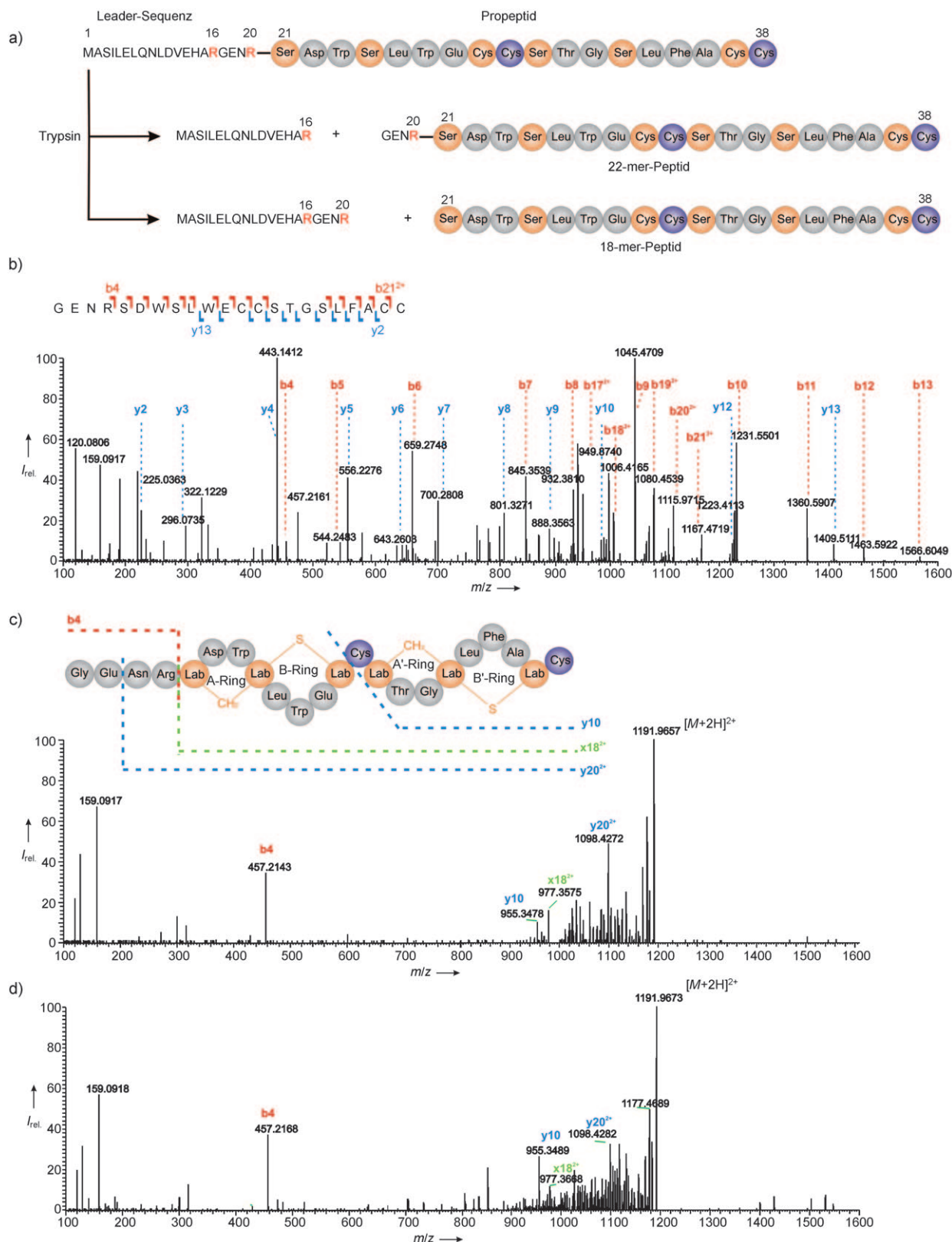


Abbildung 2. HR-ESI-MS/MS-Experimente und Zuordnung der Fragmente des tryptischen Verdau des LabA2-Peptids. a) Fragmente nach Verdau des linearen LabA2-Präpropeptids; b) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des synthetischen, linearen Präpropeptid-Fragments ($[M + 2H]^{2+} = 1227.4923$) nach tryptischem Verdau (2 h) und C-terminaler Spaltung nach Arg-16 (y- und b-Fragment-Ionen-Serie); c) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des 4-fach dehydratisierten und cyclisierten Peptids ($[M + 2H]^{2+} = 1191.4683$) nach Inkubation mit LabKC-His₆ und anschließendem tryptischem Verdau. Keine Fragment-Ionen konnten im Bereich des 4-fach dehydratisierten Propeptids beobachtet werden, was auf eine vollständige Cyclisierung des Peptids schließen lässt. Zuordnung charakteristischer und diagnostischer Fragmente, die auch für (d) gefunden wurden. d) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des semisynthetischen Referenzpeptids GENR-LabA2 ($[M + 2H]^{2+} = 1191.4686$).

gegenüber entstand beim tryptischen Verdau des enzymatisch umgesetzten Ansatzes nur ein Peptid, das dem vierfach dehydratisierten 22-mer-Peptid entspricht. Dies lässt bereits auf eine volle Cyclisierung des Peptids schließen, da Trypsin hier offenbar an der Spaltung C-terminal von Arg-20 gehindert wird. Weiterhin zeigen die ESI-Tandem-Experimente, dass das 4-fach dehydratisierte 22-mer-Peptid bei identischen Fragmentierungsbedingungen relativ stabil ist. Innerhalb der Cyclen der vermuteten Lanthionin- und Labionin-Motive konnten keine Fragment-Ionen gefunden werden, was ein klares Indiz dafür ist, dass alle Cyclisierungen in vitro tatsächlich stattfinden (Abbildung 2). Schließlich wurde als endgültiger Beleg das massenspektrometrische Fragmentmuster mit dem eines entsprechenden semisynthetischen N-terminal modifizierten Labyrinthopeptin-A2-Referenzpeptids verglichen (Abbildung 2 und Hintergrundinformationen), wobei dieselben charakteristischen und diagnostischen Ionen identifiziert und zugeordnet werden konnten.

Ein möglicher Biosyntheseweg für den Einbau der beiden Labionin-Aminosäuren in das Rückgrat des LabA2-Propeptids ist in Abbildung 3 gezeigt. Diesem Mechanismus zufolge erfordert die Bildung der Aminosäure Labionin zwei Dehydratisierungsreaktionen der beiden Serinreste aus dem Ser-Xxx-Xxx-Ser-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-Motiv, wodurch zwei α,β -Didehydroalanine entstehen. Diese werden anschließend über eine doppelte Michael-Addition cyclisiert, die wiederum durch einen nucleophilen Angriff der aktivierten Seitenkette des C-terminalen Cysteins ausgelöst wird. Die nachfolgenden Schritte der Biosynthese bestehen aus der proteolytischen

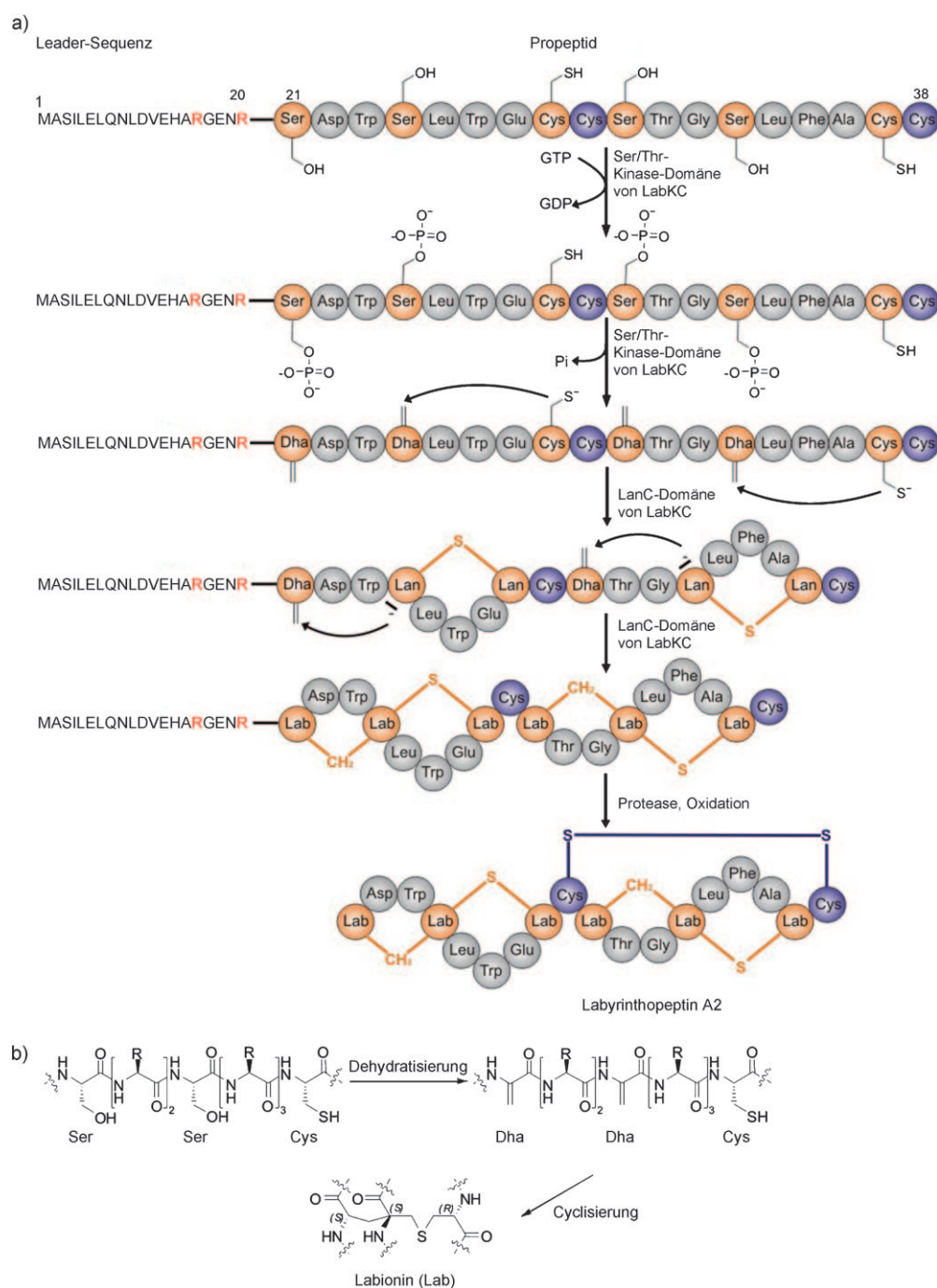


Abbildung 3. Modell zur Labyrinthopeptin-A2-Biosynthese: a) Nach Phosphorylierung, Dehydratisierung und Cyclisierung des Präpropeptids durch LabKC werden die Labionin-Ringe durch eine doppelte Michael-Addition aufgebaut. Die Oxidation der verbleibenden Cysteinreste sowie die proteolytische Prozessierung sind die abschließenden biosynthetischen Schritte. b) Das Ser/Ser/Cys-Motiv als biosynthetische Vorstufe der Labionin-Aminosäure.

Prozessierung sowie der Oxidation von Cys-29 und Cys-38 zu Cystin.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass LabKC funktionell als Kinase-Cyclase in einem zweistufigen Mechanismus arbeitet. Der erste Schritt ist die Phosphorylierung und Dehydratisierung der Serine von LabA2 und resultiert in zwei entsprechenden α,β -Didehydroalaninen. Im zweiten Schritt erfolgt die doppelte Michael-Addition, die mit dem

nucleophilen Angriff eines C-terminalen Cys beginnt und intermediär in Lan resultiert. Bei der Bildung des Carbacyclus von Labionin vermuten wir die Stabilisierung eines Carbanions am α -C-Atom, das wiederum als Nucleophil für die Reaktion mit dem N-terminalen Dha wirken könnte. Wir gehen davon aus, dass die Funktion von LabKC stellvertretend für die Biosynthese weiterer Typ-III-Lantibiotika aus verwandten Biosynthesegenclustern ist, z.B. von *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseus* und dem Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea*. Unsere zukünftigen Experimente werden die detaillierte Charakterisierung von LabKC, die Aufklärung anderer Genfunktionen des *lab*-Genclusters und die Identifizierung der vermeintlichen Protease LabP umfassen.

Eingegangen am 21. Oktober 2009,
veränderte Fassung am 15. Dezember 2009
Online veröffentlicht am 28. Februar 2010

Stichwörter: C-C-Kupplungen · Lanthionin · Lantibiotika · Proteinmodifikationen · Enzyme

- [1] J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- [2] L. Xie, L. M. Miller, C. Chatterjee, O. Averin, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, *Science* **2004**, *303*, 679–681.
- [3] A. L. McClarren, L. E. Cooper, C. Quan, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17243–17248.
- [4] K. Meindl, T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, G. Nicholson, H. Gühring, L. Vertesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G. M. Sheldrick, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1169–1173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1151–1154.
- [5] G. Seibert, L. Vértessy, J. Wink, I. Winkler, R. Süßmuth, G. Sheldrick, K. Meindl, M. Broenstrup, H. Hoffmann, H. Guehring, L. Toti, WO2008/040469, **2008**.
- [6] J. Wink, R. M. Kroppenstedt, G. Seibert, E. Stackebrandt, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 721–724.
- [7] 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.
- [8] S. Kodani, M. E. Hudson, M. C. Durrant, M. J. Buttner, J. R. Nodwell, J. M. Willey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11448–11453.
- [9] T. A. Young, B. Delagoutte, J. A. Endrizzi, A. M. Falick, T. Alber, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 168–174.