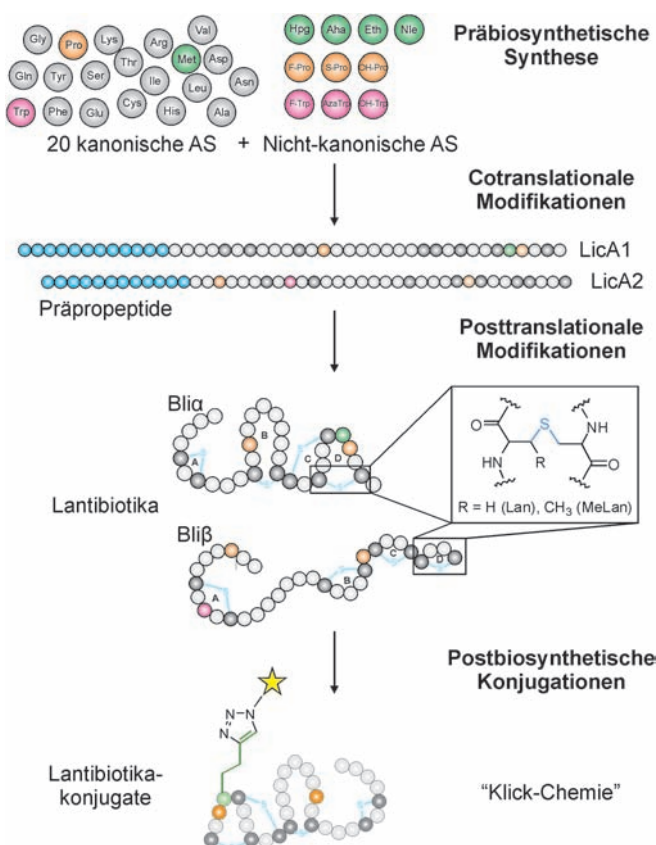


Peptidsynthese

Lantibiotika-Kongenere mit nicht-kanonischen Aminosäuren durch ribosomale In-vivo-Peptidsynthese**

Florian Oldach, Rashed Al Toma, Anja Kuthning, Tânia Caetano, Sónia Mendo, Nediljko Budisa* und Roderich D. Süssmuth*

Ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika spielen innerhalb der Vielzahl von Sekundärmetaboliten bakteriellen und pilzlichen Ursprungs eine bedeutende Rolle. In der Natur werden Lantibiotika, als Familie der Lanthionin (Lan) enthaltenden, bioaktiven und polycyclischen Peptidantibiotika, von einer Vielzahl Gram-positiver Bakterien synthetisiert. Lantibiotika weisen eine antimikrobielle Wirkung gegen eine große Bandbreite an pathogenen Bakterien, beispielsweise *Staphylococcus aureus*, auf.^[1] Nach der ribosomalen Peptidsynthese (RPS) werden die Peptide posttranslational modifiziert, und im Falle der Lantibiotika werden so aus Ser/Cys bzw. Thr/Cys die Thioetherbrücken enthaltenden Aminosäuren Lan oder MeLan (Schema 1).^[2] Die Möglichkeiten zur Vergrößerung der strukturellen Vielfalt dieser Peptide sind durch die RPS auf die 20 kanonischen Aminosäuren (kAS) begrenzt. Andererseits ist eine Totalsynthese solcher Peptide nur unter Einschränkungen möglich,^[3] wobei semisynthetische Modifikationen mit leicht zugänglichen funktionellen Gruppen selbst mithilfe von zielgerichteter Mutagenese ebenfalls nur in begrenztem Umfang erfolgreich durchführbar sind.^[4] Zwar erlaubt die Ligation exprimierter Proteine (EPL; expressed protein ligation) die Herstellung von semisynthetischen Proteinen mit einer fast uneingeschränkten Anzahl an nicht-kanonischen Aminosäuren (nkAS),^[5] die nkAS werden hierbei jedoch methodenbedingt nur in den Peptidteil des Zielproteins eingebaut. Obwohl diese Limitierung prinzipiell überwunden werden kann, wie kürzlich durch Benkovic und Schultz gezeigt,^[6] bleiben die Ausbeuten sehr gering. Demgegenüber ist der aminosäurespezifische



Schema 1. Erweiterung der synthetischen Möglichkeiten für das Design ribosomal synthetisierter Peptidantibiotika. Im Vergleich mit dem natürlichen Syntheseweg umfasst die umprogrammierte In-vivo-Synthese von Lantibiotika drei Ebenen der chemischen Diversifizierung: 1) cotranslational, durch Integration verschiedener nicht-kanonischer Aminosäuren, darunter einige mit einzigartigen chemischen Eigenschaften; 2) posttranslational, z.B. durch enzymatische Prozessierung und Aufbau charakteristischer Lanthionine (Lan, MeLan); und 3) postbiosynthetisch, durch die Modifizierung der Lantibiotikastrukturen mit bioorthogonalen Gruppen unter physiologischen Bedingungen (z.B. Konjugation verschiedener Liganden, u.a. von Chromophoren oder Pharmakophoren durch Klick-Chemie).

[*] F. Oldach, R. Al Toma, A. Kuthning, Prof. N. Budisa, Prof. R. D. Süssmuth
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: budisa@biocat.tu-berlin.de
suessmuth@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://www.biochemie.tu-berlin.de>
<http://www.biocat.tu-berlin.de>

T. Caetano, Prof. S. Mendo
Department of Biology and CESAM, University of Aveiro
3810 Aveiro (Portugal)

[**] Diese Arbeit wurde durch den von der TU Berlin koordinierten Exzellenzcluster „Unifying Concepts in Catalysis“ von der DFG gefördert. Wir danken Waltraud Wenger für die experimentelle Unterstützung in den frühen Phasen des Projekts. R.A.T. dankt dem EMECW (Erasmus Mundus-External Cooperation Window) für ein Stipendium. T.C. wurde durch die „Fundação para a Ciência e Tecnologia“ unterstützt. Wir danken Dr. Lars Merkel für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106154> zu finden.

Austausch,^[7] der nicht mit diesen Problemen behaftet ist, eine vielversprechende Strategie, um verschiedene nkAS mittels Translation in bioaktive Peptide einzubauen und somit die chemische Vielfalt zu erhöhen.

Die Bildung von Lanthionin konnte kürzlich in einem zellfreien Expressionssystem (in vitro) nachgewiesen werden,^[8] während wir und auch andere Arbeitsgruppen Lantibiotika erfolgreich mittels RPS heterolog im Gram-ne-

gativen Wirt *Escherichia coli* exprimieren konnten.^[9,10] Dieser bakterielle Wirt stellt bis heute die besten Bedingungen für gentechnische Arbeiten bereit und ermöglicht, eine oder mehrere nkAS cotranslational in Peptide zu integrieren.^[11] Dadurch lässt sich die rekombinante Expression für die Produktion von Antibiotika mit nkAS nutzen. Durch die zahlreichen möglichen Kombinationen der Anzahl und Art der funktionellen Gruppen kann die strukturelle Vielfalt der Lantibiotika erhöht werden und zu neuen, einzigartigen Sequenzkombinationen führen. Dies ist von höchstem Interesse im Sinne der Wirkstoffentwicklung, da Lantibiotika neben der bekannten antimikrobiellen Aktivität (z.B. Subtilin und Nisin)^[12] auch andere bedeutende Bioaktivitäten zeigen, z.B. Schmerzunterdrückung im Mausmodell.^[13]

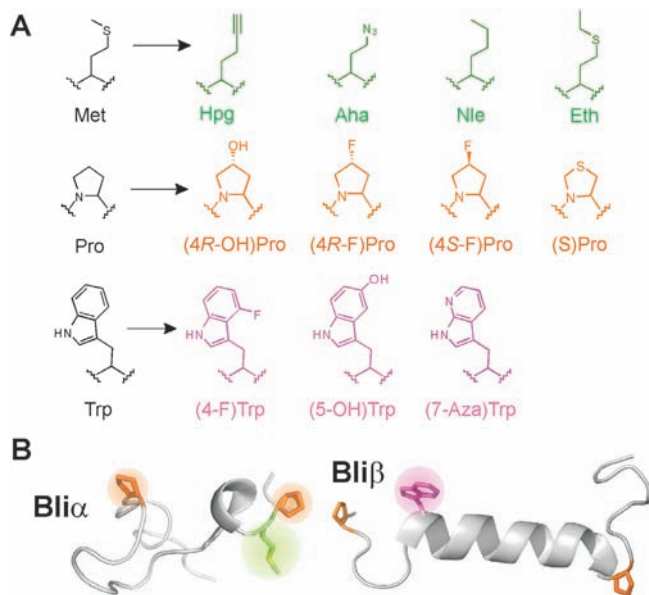
Untersuchungen zur In-vivo-Expression von ribosomal synthetisierten Peptidantibiotika wurden bisher nicht mit mehreren unterschiedlichen nkAS durchgeführt. Mit der heterologen Expression des Zweikomponenten-Lantibiotikums Lichenicidin (Bli α und Bli β) aus *Bacillus licheniformis*^[14] in *E. coli* (Schema S2 in den Hintergrundinformationen) präsentieren wir ein Modellsystem für die Translation von nkAS in Lantibiotika (Schema 1). Hierbei wird die Plasmid-basierte Expression der Bli α - und Bli β -Präpropeptide durch die Expression der fosmidkodierten, posttranslationalen Biosynthesemaschinerie im Wirt *E. coli* begleitet.^[9] Die Auswahl der für die Translation auszutauschenden Aminosäuren erfolgte mittels eines auf NMR-Daten basierenden 3D-Strukturmodells^[15] der beiden Lichenicidinkomponenten Bli α und Bli β (Schema 2).

Der Met-auxotrophe *E. coli*-Stamm B834 (Met⁻), der kein Methionin synthetisieren kann, wurde mit einem Plas-

mid, welches für das Bli α -Präpropeptid (LicA1, Schema 1) kodiert, und einem Fosmid, das für die posttranslationale Lantibiotika-Biosynthesemaschinerie kodiert, transformiert. Letzteres enthält vor allem die Lanthionin-Zyklasen LicM1 und LicM2 für die posttranslationale Modifikation, den Transporter LicT, der für die Prozessierung und den Export aus dem Zytoplasma verantwortlich ist, und die Protease LicP (Schema S2). Die transformierten Zellen wurden in Flüssigkultur bis zu einer definierten Zelldichte angezogen (OD₆₀₀ = 0.6–0.8). Anschließend wurde das Medium durch Minimalmedium (New Minimal Medium; NMM),^[7] ergänzt mit verschiedenen nkAS (50 mg L⁻¹), ersetzt: Hpg (Homopropargylglycin), Aha (Azidohomoalanin), Nle (Norleucin) oder Eth (Ethionin) im Austausch für Met. Nach Induktion der Bli α -Produktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde für 16 h bei 30 °C exprimiert. Anschließend wurden die Peptide mit *n*-Butanol extrahiert und mittels Festphasenextraktion aufgereinigt.

Die aufgereinigten Peptide wurden mittels hochauflösender HPLC-ESI-MS analysiert, und der Einbau der Aminosäureanaloge von Met (Schema 2) konnte aufgrund charakteristischer Massendifferenzen gegenüber der Molekülmasse von Bli α (Abbildung 1 und S1) nachgewiesen werden. Der Einbau in den B-C-D-Ring wurde ferner durch MS/MS-Experimente (Abbildung S3) bestätigt. Die Ausbeuten an kongenem Bli α wurden im Vergleich zu aufgereinigtem Wildtyp-Peptid mittels LC-MS-Analyse quantifiziert.

Micrococcus luteus ATCC 9341 wurde als Indikatorstamm in Agar-Diffusionstests verwendet, um die antimikrobielle Aktivität der kongenem Met-Analoga von Bli α zu testen.



Schema 2. Kanonische Aminosäuren und die zugehörigen Analoga, die in Lichenicidin Bli α und Bli β eingebaut wurden. A) Der positionsspezifische Austausch der kanonischen Aminosäure (links) mit der zugehörigen nicht-kanonischen Aminosäure (rechts) wird durch eine Serie von einzelnen In-vivo-Expressionsexperimenten erreicht. B) 3D-Strukturmodell des Zweikomponenten-Lantibiotikums Lichenicidin; Met-(Bli α)-, Pro-(Bli α und Bli β)- und Trp-(Bli β)-Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren sind durch farbige Schatten hervorgehoben.

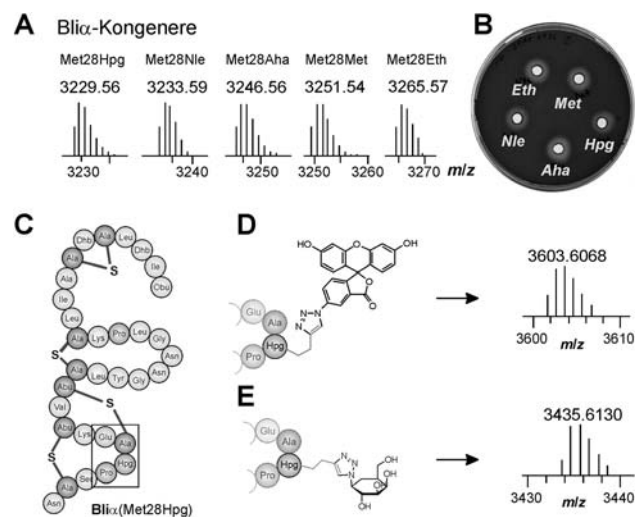


Abbildung 1. Aktivitätsprofil der Lichenicidin-Kongenere und -Konjugate, die Met-Analoga enthalten. A) HR-ESI-MS-Analyse von Lichenicidin Bli α (M_{ber} = 3251.53 Da) und Met-Kongenere: Bli α (Met28Hpg) (M_{ber} = 3229.53 Da), Bli α (Met28Nle) (M_{ber} = 3233.57 Da), Bli α (Met28Aha) (M_{ber} = 3246.54 Da), Bli α (Met28Eth) (M_{ber} = 3265.54 Da). B) Ein Inhibitionstest von Bli α und der Met-Kongenere zeigt die antibakterielle Wirkung gegen *M. luteus*. C–E) HR-ESI-MS des konjugierten Bli α (Met28Hpg) mit D) dem Farbstoff Azidofluorescein (M_{ber} = 3603.6087 Da) und E) dem Azidozucker 1-Azido-1-desoxy- β -D-glucopyranosid (M_{ber} = 3435.6130 Da) als Beispiele für postbiosynthetische Modifikationen ribosomal synthetisierter Lantibiotika.

Dafür wurden die Met-Kongeneren mittels Massenspektrometrie quantifiziert und in einem molaren Verhältnis von 1:1 (Blia:Blif) eingesetzt. Die antimikrobielle Aktivität war im Vergleich zum Wildtyp-Lichenicidin etwas geringer für Blia (Met28Hpg), fast gleich für die kongeneren Eth- bzw. Nle-Analoga und vollständig wiederhergestellt für das Aha-Kongener (Abbildung 1 B und S4).

Abschließend sollte die strukturelle Vielfalt der Lantibiotika noch mittels postbiosynthetischer Modifikation unter Nutzung von bioorthogonaler chemischer Synthese erweitert werden. Dazu wurde die Cu^I-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition (Klick-Reaktion)^[16] mit Blia(Met28Hpg) nach einem bereits beschriebenen Protokoll^[17] angewendet (Tabelle S3). Die synthetische Kupplung des Peptids mit 1-Azido-1-desoxy- β -D-glucopyranosid oder Azidofluorescein konnte mittels HR-ESI-MS nachgewiesen werden (Abbildung 1).

Schließlich untersuchten wir die Fähigkeit der Lichenicidin-Biosynthesemaschinerie, den Austausch weiterer kanonischer gegen nicht-kanonische Aminosäuren in Blia und Blif zu tolerieren. Wir wählten Prolin (Pro), das jeweils zweimal in Blia und Blif vorkommt, und Tryptophan (Trp), das ausschließlich in Blif vorkommt, als Substitutionsziele (Schema 2). Den Einbau von Pro-Analoga untersuchten wir allerdings nur in Blia. Die Einbauexperimente mit den entsprechenden auxotrophen Stämmen JM83 (Pro⁻) und ATCC 49980 (Trp⁻) wurden, wie in den Hintergrundinformationen beschrieben, ebenfalls mithilfe von Mediaustauschexperimenten durchgeführt. So wurde Pro gegen (4R-OH)Pro (*trans*-4-Hydroxyprolin), (4S-F)/(4R-F)Pro (*cis*- und *trans*-4-Fluorprolin) oder (S)Pro (L-Thioprolin) ausgetauscht. Die Trp-Analoga (4-F)Trp (4-Fluortryptophan), (5-OH)Trp (5-Hydroxytryptophan) und (7-Aza)Trp (7-Azatryptophan) wurden durch Fermentations- und Expressionsmethoden nach Lepthien et al.^[18] in Lichenicidin translatiert. Wie erwartet, zeigte die massenspektrometrische Analyse deutlich einen hohen Einbaugrad aller Analoga (Abbildung S2). Diese Experimente zeigen die allgemeine Anwendbarkeit der Methode, ribosomal synthetisierte Lantibiotika strukturell und chemisch zu verändern.

Im natürlichen Szenario werden Lantibiotika zunächst als Präpropeptid-Stufe aus den 20 kanonischen Aminosäuren synthetisiert, bevor diese Standardbausteine durch posttranslationale Modifikationen (PTM) effizient zu bioaktiven Lantibiotika umgewandelt werden (Schema 1). PTM sind eine Möglichkeit der natürlichen chemischen Modifikation und Diversifizierung durch eine Batterie an Enzymen, die selektiv verschiedene Arten von Aminosäureseitenketten prozessieren. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Erweiterung des Aminosäure-Repertoires mit anderen nicht-kanonischen Aminosäuren den synthetischen Spielraum drastisch vergrößert. Dadurch konnten wir erfolgreich zusätzliche Ebenen struktureller Vielfalt in die Peptide einführen, die weit über die übliche Kapazität lebender Zellen hinausgehen. Dies ermöglicht uns, Lantibiotika mit chemischen Eigenschaften zu generieren, die nicht durch die natürliche Evolution hervorgebracht wurden.

Zurzeit dehnen wir unsere Strategie auf andere nicht-kanonische Aminosäuren, wie beispielsweise fluoridierte

Aminosäureanaloga, aus. Fluorierte Polymere sind allgemein für eine erhöhte thermodynamische und hydrolytische Stabilität, sowie verbesserte biologische Verfügbarkeit bekannt. Ähnliche Effekte können durch systematische Fluorierung von Peptidantibiotika erzielt werden. Wie wir außerdem bereits am Hpg-haltigen Lichenicidin gezeigt haben, können Sequenzpositionen in Lantibiotika, die nicht von der PTM-Maschinerie verändert werden, mit zusätzlichen bioorthogonalen reaktiven Gruppen besetzt werden, die sie für verschiedene bioorthogonale Konjugationen zugänglich machen. Andererseits können Sequenzpositionen, die Ziele der PTM-Maschinerie sind, in verschiedene nicht-kanonische Aminosäuren (z.B. mit anderer Chiralität, Polarität, molekularem Volumen usw.) übersetzt werden, um den katalytischen Umfang der PTM-Maschinerie von Lantibiotika auszureizen.

Wir erwarten, dass unsere Ergebnisse in Kombination mit anderen Methoden (zielgerichteter, supressionsvermittelter Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren zusammen mit gerichteter Evolution von Zielpolypeptiden) es ermöglichen, Bausteine zur Entwicklung von Antibiotika mit neuartiger Sequenzzusammensetzung zu generieren. Diese werden eine deutlich vergrößerte strukturelle und funktionelle Diversität zeigen, während sie ihre strukturelle Funktionalität und ihr Bioaktivitätsprofil behalten oder verbessern.

Experimentelles

Auxotrophe *E. coli*-Stämme (JM83, B834 und ATCC 49980) wurden mit dem Fosmid pLic54A1 und dem Plasmid pQE80L-A2 oder mit dem Fosmid pLic54A2 und dem Plasmid pQE80L-A1 transformiert,^[9] um Blia und Blif separat zu exprimieren. Die Zellen wurden in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0.6–0.8 kultiviert. Anschließend wurde LB-Medium durch Minimalmedium (NMM)^[7] ersetzt, das die nicht-kanonischen Aminosäuren enthielt (50 mg L⁻¹), und darauffolgend mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach Kultivierung für 16 h bei 30°C wurden die Peptide mit *n*-Butanol extrahiert und über Festphasenextraktion (SPE-C8) aufgereinigt. Die analytische Charakterisierung der Peptide wurde mithilfe von hochauflösenden HPLC-ESI-Orbitrap-MS- und MS/MS-Experimenten durchgeführt. Um die Menge des produzierten kongeneren Blia mit der Produktionsmenge des Wildtyp-Peptids zu vergleichen, wurden LC-MS-Analysen durchgeführt.

Micrococcus luteus ATCC 9341 wurde als Indikatorstamm in Agar-Diffusionsversuchen verwendet, um die antimikrobielle Aktivität der kongeneren Met-Analoga von Blia zu testen.

Eine detaillierte Beschreibung der Experimente und Analysetechniken findet sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 30. August 2011,
veränderte Fassung am 20. Oktober 2011
Online veröffentlicht am 30. November 2011

Stichwörter: In-vivo-Peptidsynthese · Lantibiotika · Lichenicidin · Nicht-kanonische Aminosäuren · Peptidantibiotika

- [1] H.-G. Sahl, G. Bierbaum, *Annu. Rev. Microbiol.* **1998**, 52, 41–79.
- [2] G. Jung, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1051–1068.
- [3] W. Liu, A. S. H. Chan, H. Liu, S. A. Cochrane, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14216–14219.
- [4] a) M. Paul, W. A. van der Donk, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2005**, 2, 23–37; b) N. Ghalit, J. F. Reichwein, H. W. Hilbers, E. Breukink,

- D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1540–1554; c) O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. Ottenwälder, H. M. Dodd, N. Horn, J. Metzger, T. Kupke, V. Gnau, R. Bongers, P. Bogaard, H. Kusters, H. S. Rollema, W. M. Vos, R. J. Siezen, G. Jung, F. Götz, H.-G. Sahl, M. J. Gasson, *Antonie Van Leeuwenhoek* **1996**, *69*, 161–169.
- [5] K. M. Clark, W. A. van der Donk, Y. Lu, X. Zhang, W. A. van der Donk in *Methods Enzymol.*, Vol. 462 (Hrsg.: T. W. Muir, J. N. Abelson), Academic Press, New York, **2009**, S. 97–115 und 117–134.
- [6] T. S. Younga, D. D. Younga, I. Ahmada, J. M. Louis, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11052–11056.
- [7] N. Budisa, B. Steipe, P. Demangel, C. Eckerskorn, J. Kellermann, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 788–796.
- [8] a) Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami, H. Suga, *Chem. Commun.* **2009**, 3419–3421; b) F. P. Seebeck, A. Ricardo, J. W. Szostak, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6141–6143.
- [9] T. Caetano, J. M. Krawczyk, E. Mösker, R. D. Süßmuth, S. Mendo, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 90–100.
- [10] Y. Shi, X. Yang, N. Garg, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2338–2341.
- [11] a) J. Xie, P. G. Schultz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 548–554; b) A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603–609; c) N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6586–6624; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6426–6463.
- [12] a) C. Klein, C. Kaletta, K. D. Entian, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 296–303; b) K. Rayman, N. Malik, A. Hurst, *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46*, 1450–1452.
- [13] K. Meindl, T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Gühring, L. Vértessy, 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.
- [14] M. Begley, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5451–5460.
- [15] Z. O. Shenkarev, E. I. Finkina, E. K. Nurmukhamedova, S. V. Balandin, K. S. Mineev, K. D. Nadezhidin, Z. A. Yakimenko, A. A. Tagaev, Y. V. Temirov, A. S. Arseniev, T. V. Ovchinnikova, *Biochemistry* **2010**, *49*, 6462–6472.
- [16] R. Huisgen, R. Grashey, J. Sauer, *Chemistry of Alkenes*, Interscience, New York, **1964**, 806–877.
- [17] V. Hong, S. I. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 10063–10067; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879–9883.
- [18] S. Lepthien, L. Merkel, N. Budisa, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5576–5581; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5446–5450.
- [19] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. Van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633–683.
- [20] M. Pagliaro, R. Ciriminna, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 4981–4991.