

Analyse von Protease-Inhibitor-Interaktionen unter Nutzung evolvierbarer tricyclischer Microviridine**

Annika R. Weiz, Keishi Ishida, Felix Qutterer, Sabine Meyer, Jan-Christoph Kehr, Kristian M. Müller, Michael Groll, Christian Hertweck und Elke Dittmann*

Abstract: Ein wichtiges Ziel in der therapeutischen Chemie ist das Verständnis und die Kontrolle von proteolytischen Prozessen. Unter den proteaseinhibierenden Naturstoffen nehmen Microviridine eine Sonderstellung ein. Microviridine sind ribosomal erzeugte und posttranslational modifizierte Peptide, die zu einer einzigartigen Struktur mit käfigartiger Gestalt prozessiert werden. Hier beschreiben wir einen kombinierten Ansatz aus rationaler und randomisierter Mutagenese, der grundlegende Erkenntnisse über die Bestandteile der Microviridinstruktur liefert, die zur Selektivität beitragen. Die aktive Variante Microviridin J wurde mit Trypsin kokristallisiert. Dabei wird erstmals die dreidimensionale Struktur von Microviridinen demonstriert und die Art der Inhibition dargestellt.

Fehlregulierte proteolytische Enzyme spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung lebensbedrohlicher Erkrankungen, darunter kardiovaskuläre und entzündliche Leiden, Krebs, bakterielle und virale Symptomaten.^[1] Cyanobakterien sind für die Produktion einer Vielzahl natürlicher Proteaseinhibitoren bekannt, einschließlich der Microviridine.^[2] Die tricyclischen Peptide bestehen aus 12–14 Aminosäuren und enthalten zwei Lactonringe und einen Lactamring.^[3] Sie gehören zu den ribosomal produzierten und posttranslational modifizierten Peptiden (RiPPs), deren biotechnologisches Potenzial zunehmend erkannt wird.^[4] Microviridine werden ausgehend von dem Peptid MdnA synthetisiert

und anschließend von drei posttranslational agierenden Enzymen (PTMs) modifiziert (Abbildung 1a).^[5] In einem zweiten Schritt wird ein Teil der Peptidvorstufe, das Leaderpeptid, durch eine bislang unbekannte Protease abgespalten (Abbildung 1a). Mutagenesestudien in der Core-Peptid-Region haben eine geringe Flexibilität der beiden cyclisierenden ATP-Grasp-Ligasen in vitro gezeigt.^[6] In dieser Arbeit haben wir das Potenzial der in vivo agierenden Microviridinproduktionsplattform zur Analyse der Rolle individueller Aminosäuren bei der Proteaseselektivität genutzt.

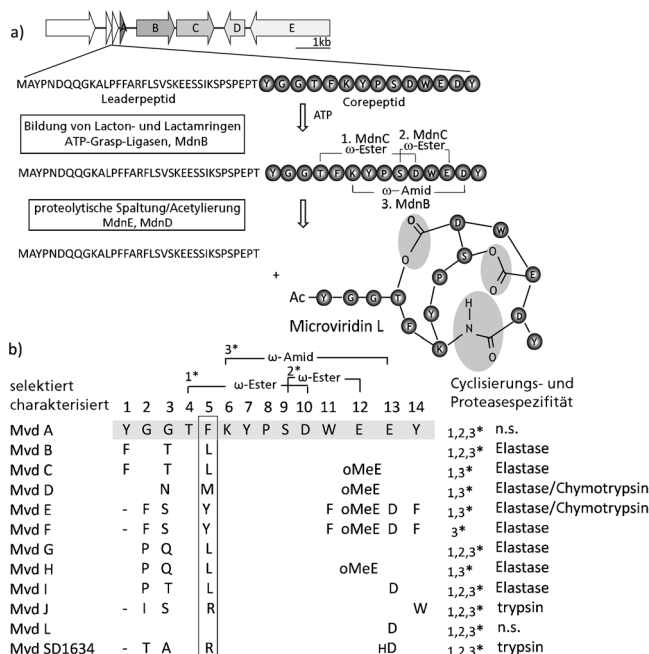


Abbildung 1. a) Prinzip der Microviridin-Biosynthese. b) Sequenzvariationen und Proteaseselektivität von charakterisierten Microviridinen aus Laborstämmen. Ac = Acetylierung, n.s. = keine Spezifität, oMeE = Glutamat-Methylester, HD = β-Hydroxyasparaginsäure.

Zur gezielten Herstellung neuartiger Microviridine haben wir einen von der natürlich Diversität inspirierten Engineering-Ansatz auf der Grundlage der bekannten Bioaktivitätsprofile und vorhandenen Sequenzinformationen von charakterisierten Microviridinen entwickelt (Abbildung 1b). Die kürzlich zur Produktion von Microviridin L-Varianten konstruierte Minialexpressionsplattform wurde dabei als Ausgangspunkt genutzt.^[7] Zu Beginn lag der Fokus auf der flexiblen Position 5, welche in den Microviridinvarianten mit

[*] Dr. A. R. Weiz,^[†] S. Meyer, Dr. J. C. Kehr, Prof. Dr. E. Dittmann
Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)
E-Mail: editt@uni-potsdam.de

Dr. K. Ishida,^[‡] Prof. Dr. C. Hertweck
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie
e.V.-HKI, Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)

Prof. Dr. K. M. Müller
Technologie-Fakultät, Universität Bielefeld (Deutschland)

F. Qutterer,^[‡] Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Sciences Munich (CIPSM)
Technische Universität München, 85474 Garching (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Katrin Hinrichs für die technische Assistenz, Maria Poetsch und Tom Bretschneider für die MALDI-TOF-MS-Messungen und den Mitarbeitern der Beamline X06SA am Paul-Scherrer-Institut, Swiss Light Source, Villigen, Schweiz für ihre Hilfe mit der Datensammlung. Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Di910/4-1 (E.D.) He3469/4-1 (C.H.)) und den Exzellenzcluster UniCAT (E.D.) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309721> zu finden.

Elastase-, Trypsin- oder Chymotrypsinselektivität unterschiedlich besetzt ist (Abbildung 1 b).^[8] Die in *E. coli* hergestellten Varianten wurden vornehmlich an Position 2 des Core-Peptids gespalten (Abbildung 2). Die korrekte Cyclisierung und *N*-Acetylierung der Peptide wurde mittels MALDI-TOF-MS nachgewiesen (Abbildungen S1–S3 in den Hintergrundinformationen). IC₅₀-Werte wurden für sechs Serinproteasen bestimmt.









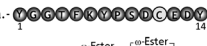
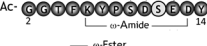



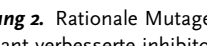
Microviridinvarianten	Inhibitorische Aktivität (IC ₅₀) in µmol/l						Ausbeute in µg/ml
	Elastase	Chymo-	Trypsin	Subtilisin	Thrombin	Plasmin	
MvdL1	Ac- 	>64	24	>64	5.8	>64	0.56
F5L	Ac- 	0.13	18	>59	3.8	>59	0.24
F5M	Ac- 	8.1	13	>65	0.09	>65	0.65
F5R	Ac- 	>32	>32	4.5	15.4	>64	0.54
F5Y	Ac- 	>32	8.3	>64	0.55	>64	0.48
G2N/ G3V/F5L/ D13E	Ac- 	0.38	>60	>60	13	>60	*
Y7W	Ac- 	>64	20	>63	5.0	>63	0.47
Y7F	Ac- 	>65	13	>65	5.1	>65	0.34
W11C lea-		--	--	--	--	--	--
W11S	Ac- 	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	*
S9A	Ac- 	>84	20	>84	n.d.	n.d.	*
S9E/ E12S	lea- 	--	--	--	--	--	--
G3T/ T4A	lea- 	--	--	--	--	--	--
T4A/ F5T	lea- 	--	--	--	--	--	--

Abbildung 2. Rationale Mutagenese des Core-Peptids von Microviridin. Signifikant verbesserte inhibitorische Aktivitäten sind hervorgehoben. Siehe Abbildungen S1 und S2 für den analytischen Nachweis. n.d. = nicht bestimmt, * nahe der Nachweisgrenze, – keine Microviridine nachweisbar, lea- = Leaderpeptid, oMe = Glutamat-Methylester.

Bereits der Austausch von Phe in Microviridin L gegen Leu, Met, Arg oder Tyr erhöhte die inhibitorische Aktivität gegen Elastase, Subtilisin, Trypsin und Chymotrypsin deutlich (Abbildung 2). Der Austausch einer einzelnen Aminosäure bei der F5L-Variante führte zu einer Erhöhung der Aktivität gegenüber Elastase in den nanomolaren Bereich. Weitere schrittweise Mutationen von flexiblen Positionen innerhalb des Microviridins, unter Nutzung einer weitverbreiteten Freiland-Variante als Vorbild,^[9] hatten nur wenig Einfluss auf die gesamtinhibitorische Aktivität gegenüber Elastase (G2N/G3V/F5L/D13E, Abbildung 2). Veränderungen an Position 7 blieben ebenfalls ohne bedeutende Konsequenz. Der Austausch von Trp an Position 11 führte zu einem starken Rückgang oder völligen Verlust an Aktivität. Dasselbe Phänomen konnte beobachtet werden, wenn der erste Microviridinring zwischen Tyr und Asp (Positionen 4 und 10) vergrößert oder verkleinert wurde. Ähnlich wirkte sich der ge-

genseitige Austausch von Ser und Glu aus, welche den zweiten Microviridinring bilden (Positionen 9 und 12) (Abbildung 2). Diese Ergebnisse belegen, dass Position 5 eine zentrale Bedeutung für das Bioaktivitätsprofil der Microviridine hat. Darüber hinaus repräsentieren die entsprechenden Aminosäuren bei den aktivsten Varianten an dieser Position ein perfektes Substrat für die spezifische Zielprotease, was auf eine substratartige Interaktion zwischen Microviridinen und den zugehörigen Proteasen hindeutet. Wir haben weiterhin die *K_i*-Werte ausgewählter Microviridin-Varianten mit dem Modell der starken kompetitiven Bindung berechnet (Tabelle S5).

Ausgehend von unseren Ergebnissen zur ortsspezifischen Mutagenese des Peptids haben wir eine Zufallsmutagenese gestartet. Mittels randomisierter Oligonukleotide konnten wir eine Microviridinbibliothek generieren, die auf die Positionen 1,2,3,5 und 15 fokussiert ist. Ausbeute und Prozessierungseffizienz unterschieden sich bei ausgewählten Klonen deutlich (Abbildung S4). Mit dieser Methode konnten wir schließlich einen einzelnen Klon identifizieren (der ein Phe an Position 1 und ein Ala an Position 2 trägt), der hohe Ausbeuten an komplett prozessiertem tricyclischem *N*-acetyliertem Microviridin bei nur geringen Mengen unvollständig prozessierter Nebenprodukte erzeugt (Abbildung S4). Da die geringe Effizienz bei der Prozessierung ein Hauptproblem bei der Ausbeute von heterolog produzierten Microviridinen darstellt, wurde daraufhin eine stärker fokussierte Microviridinbibliothek hergestellt. Es wurde hierbei lediglich das Codon für die Position 5 zur Randomisierung ausgewählt, wohingegen das Phe- und das Ala-Codon am N-Terminus beibehalten wurden. Die Bibliothek wurde dann benutzt, um einen kolorimetrischen Ganzzellassay (Abbildung 3) mit *p*-Nitroanilid-haltigen (*p*-NA) Substraten für Elastase, Trypsin und Subtilisin zu entwickeln. Aktive Klone wurden sequenziert, die resultierenden Peptide aufgereinigt und charakterisiert. Die korrekte Cyclisierung und *N*-Acetylierung aller Varianten wurde mittels MALDI-TOF-MS und PSD bestätigt (Abbildung S1). Chymotrypsin, Thrombin und Subtilisin wurden in die Bioaktivitätsstudien eingeschlossen. Die aktivsten Microviridinvarianten im Elastase-Screening weisen ein Leu oder Val an Position 5 auf, wohingegen die aktivsten Varianten im Trypsin-Screening ein Arg oder Leu an dieser Stelle tragen. Die ermittelten IC₅₀-Werte für die Varianten aus der randomisierten Mutagenese mit



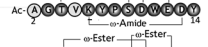


Microviridinvarianten	Inhibitorische Aktivität (IC ₅₀) in µmol/l						Ausbeute in µg/ml
	Elastase	Chymo-	Trypsin	Subtilisin	Thrombin	Plasmin	
G2A/F5L	Ac- 	0.65	14	>65	0.78	>65	0.99
G2A/F5I	Ac- 	5.2	>33	>65	>33	>65	0.76
G2A/F5V	Ac- 	0.16	66	>66	0.4	>66	0.56
G2A/F5K	Ac- 	>65	>65	2.5	0.32	>65	2.0
G2A/F5R	Ac- 	64	>64	1.8	0.64	>64	47

Abbildung 3. Ergebnisse des kolorimetrischen Screenings. Veränderte Aminosäuren sind hellgrau dargestellt. Signifikant verbesserte Bioaktivitäten sind hervorgehoben.

einem Ala an Position 2 (Abbildung 3) waren geringfügig höher als die der entsprechenden Varianten aus der ortsspezifischen Mutagenese, die ein Gly an Position 2 tragen (Abbildung 2), was auf eine Bedeutung der N-terminalen Seitenkette für die Bioaktivität hinweist. Das Subtilisin-Screening führte zu einer Reihe aktiver Klone, einschließlich der Varianten F5L, F5V, F5R und F5K (Abbildung 3). Keines der aufgereinigten Microviridine zeigte eine Aktivität gegenüber Chymotrypsin oder Thrombin. Die Variante mit einem Lys an Position 5 zeigte aber eine Aktivität gegenüber Plasmin im unteren mikromolaren Bereich.

Für die Interpretation der Mutagenesedaten und für eine weitere Rationalisierung der Interaktionsanalysen initiierten wir eine Kristallisationsstudie. Aufgrund des aussagekräftigen IC_{50} -Werts (90 nM) von Microviridin J gegenüber Trypsin wurde dieses Protein-Inhibitor-Paar für Kokristallisationsansätze ausgewählt (Tabelle S6) und die molekulare Architektur des Komplexes und die Wechselwirkung von Microviridin J mit Trypsin aus Rind aufgeklärt. Der Komplex kristallisierte in zwei unterschiedlichen Raumgruppen bei pH 6.5 (CS I, 1.35 Å, PDB ID: 4KTU) und pH 8.5 (CS II, 1.30 Å, PDB ID: 4KTS). Die kristallographischen Details sind in Tabelle S7 dargestellt. Die Elektronendichtekarte für CS II zeigt, dass das gesamte Inhibormolekül sowie die Trypsin-Protease vollständig definiert vorliegen, wohingegen Trp14 des Inhibitors (iTrp14; i für Inhibitor) in CS I strukturell fehlgeordnet ist (Abbildungen 4, S5 und S7). Die Gesamtstruktur des an Trypsin gebundenen Microviridin J bietet interessante Einblicke in den Bindungsmodus.

So nimmt der N-Terminus des Inhibitors verschiedene Konformationen an: Während iAc1, iIle2 und iSer3 in CS I in eine hydrophobe Tasche an der Proteinoberfläche binden (Leu99 und Trp215), sind diese N-terminalen Reste in CS II um etwa 150° entlang der C1-C2-Bindung von iSer3 verdreht und deshalb nicht in Kontakt mit dem Protein (Abbildung S5b). Im Gegensatz dazu nehmen iThr4, iArg5 und iLys6 (P2, P1 und P1') in beiden Kristallstrukturen ein klassisches, substratähnliches Trypsin-Bindungsmotiv an. Konkret zeigt die Methylgruppe der iThr4-Seitenkette in Richtung Leu99 der S2-Tasche, wohingegen die iArg5-Seitenkette über die Carboxylgruppe von Asp189 am Boden der S1-Tasche koordiniert wird (2.9 Å). Darüber hinaus bildet der aliphatische Teil der iLys6-Seitenkette Van-der-Waals-Kontakte mit der Disulfidbrücke zwischen Cys42 und Cys58 der S1'-Tasche. Diese Interaktionen richten Microviridin J perfekt für die Komplexbildung mit Trypsin aus, während der C-terminale Teil des Inhibitors, iSer9–iTrp14, eine helikale Konformation annimmt. Interessanterweise wird diese Helix wesentlich durch intramolekulare, kovalente Verbrückungen von zwei Depsi- und einer Lactambindung stabilisiert. Zusätzlich verhindern intramolekulare, polare Kontakte, wie in Abbildung S6 gezeigt, jegliche Flexibilität des Inhibitors zwischen iThr4 und iGlu13. Obwohl sich das Nukleophil Ser195O^γ der katalytischen Triade, welche auch His57 und Asp102 einschließt, in einer perfekten Bürgi-Dunitz-Trajektorie gegenüber dem iArg5-Carbonylkohlenstoff des Inhibitors befindet (Distanz 2.5 Å), bleibt die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 5 und 6 intakt, wie beide Kristallstrukturen darlegen (Abbildung 4d). Somit wirken die kompakte Ringstruktur und

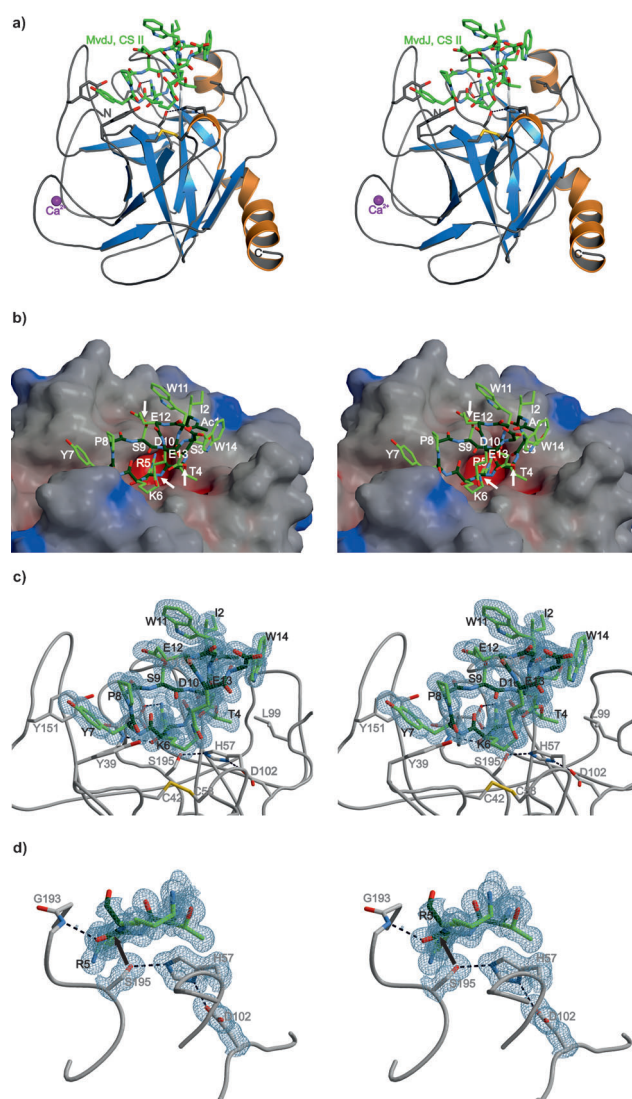


Abbildung 4. a) Bändermodell von Trypsin im Komplex mit Microviridin J, CS II (grün). Proteinseitenketten sind als Stabmodelle dargestellt, Ca^{2+} ist als violette Kugel gezeigt. b) Oberflächenpotential von Trypsin im Komplex mit Microviridin J (CS II), abgebildet als Kugel- und Stabmodell. Die Rückgrat-Atome von Microviridin J sind dunkelgrün, die Seitenketten von Microviridin J grün hervorgehoben. Intramolekulare kovalente Verknüpfungen sind durch einen weißen Pfeil markiert. c) $2F_o - F_c$ -Elektronendichtedarstellung (1.0σ) von Microviridin J (CS II). Interaktionen innerhalb der katalytischen Triade (His57, Asp102 und Ser195) werden durch gestrichelte Linien angedeutet. d) $2F_o - F_c$ -Elektronendichtedarstellung (1.0σ) der katalytischen Triade sowie Gly193 (welches das Oxyanion-Loch bildet) und iThr4–iLys6 von Microviridin J. Der ausbleibende nukleophile Angriff von Ser195 auf den Carbonyl-Kohlenstoff von iArg5 wird durch einen schwarzen Pfeil verdeutlicht.

die durch intramolekulare, posttranslationale kovalente Verknüpfungen sowie die polaren Interaktionen der Seitenketten verursachte Ringspannung in Microviridin J einer Spaltung der Verbindung entgegen. Als nächstes führten wir ITC-Experimente (isotherme Titrationskalorimetrie) durch, um die enthalpischen und entropischen Beiträge zur Bindungsaffinität von Microviridin J gegenüber Trypsin abschätzen zu können. Die Analyse ergab, dass die Wechselwirkung sowohl

enthalpisch als auch entropisch gesteuert ist, mit einem K_D -Wert von $0.68 \mu\text{M}$ (Abbildung S7). Hiermit werden die kristallographischen Ergebnisse bestätigt, in denen ein Umsatz des Liganden nicht stattfindet. Bemerkenswerterweise ist diese Art der Inhibition ähnlich derjenigen des aus Cyanobakterien isolierten Inhibitors A90720A,^[10] jedoch unterscheidet sich der Aufbau der beiden Naturstoffe grundlegend (Abbildung S8). Darüber hinaus, und im Gegensatz zu den Microviridinen, wird diese vielfältige Gruppe von peptidischen Cyanopeptolinen,^[11] einschließlich A90720A, von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) produziert.^[12] Anders als die RiPP-Typ-Verbindungen sind sie daher für eine genetische Weiterentwicklung nicht zugänglich.

Die vorliegende Arbeit demonstriert das große Potenzial der Microviridin-Expressionsplattform für die Identifizierung von selektivitätsvermittelnden Aminosäuren gegenüber verschiedenen Serinproteasen. Wir haben zunächst die Aminosäure des tricyclischen Peptids optimiert, die sich in einer direkten Interaktion mit der S1-Tasche des Enzyms befindet. Die Mutagenese- und Kristallisationsdaten zeigen jedoch, dass genügend Potenzial für die weitere Steigerung der Affinität und die Verkleinerung der Molekülgröße des Peptids vorhanden ist.

Die ortsgerichtete und randomisierte Mutagenese von ribosomal synthetisierten Peptiden ist ein aussichtsreicher Ansatz zur Herstellung neuartiger biologisch aktiver Peptide, wie unter anderem für Lantibiotika gezeigt werden konnte.^[13] Hier beschreiben wir die erste selektive Modifikation eines ribosomalen Peptids, die zur spezifischen Bindung an verschiedene Zielproteasen führt. Aus den vorliegenden Daten lässt sich nicht nur ein außerordentliches Potenzial für eine therapeutische Entwicklung ableiten, vielmehr können die Daten der Studie auch als Inspiration für das Design und die Synthese von Peptidomimetika dienen.

Eingegangen am 7. November 2013,
veränderte Fassung am 3. Januar 2014
Online veröffentlicht am 3. März 2014

Stichwörter: Cyanobakterien · Peptid-Engineering · Proteaseinhibitoren · RiPPs · Strukturaufklärung

- [1] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 785–799.
- [2] M. Welker, H. von Dohren, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 530–563.
- [3] M. O. Ishitsuka, T. Kusumi, H. Kakisawa, K. Kaya, M. M. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8180–8182.
- [4] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy et al., *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108–160.
- [5] a) B. Philmus, G. Christiansen, W. Y. Yoshida, T. K. Hemscheidt, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 3066–3073; b) N. Ziemert, K. Ishida, A. Liaimer, C. Hertweck, E. Dittmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7870–7873; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7756–7759.
- [6] B. Philmus, J. P. Guerrette, T. K. Hemscheidt, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 429–434.
- [7] A. R. Weiz, K. Ishida, K. Makower, N. Ziemert, C. Hertweck, E. Dittmann, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1413–1421.
- [8] a) M. Murakami, Q. Sun, K. Ishida, H. Matsuda, T. Okino, K. Yamaguchi, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1197–1202; b) T. Okino, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10679–10686; c) T. Rohrlack, K. Christoffersen, M. Kaebernick, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5047–5050; d) H. J. Shin, M. Murakami, H. Matsuda, K. Yamaguchi, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8159–8168.
- [9] N. Ziemert, K. Ishida, A. Weiz, C. Hertweck, E. Dittmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3568–3574.
- [10] A. Y. Lee, T. A. Smitka, R. Bonjouklian, J. Clardy, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 113–117.
- [11] a) C. Martin, L. Oberer, T. Ino, W. A. König, M. Busch, J. Weckesser, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1550–1556; b) U. Matern, C. Schleberger, S. Jelakovic, J. Weckesser, G. E. Schulz, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 997–1001; c) L. A. Salvador, K. Taori, J. S. Biggs, J. Jakoncic, D. A. Ostrov, V. J. Paul, H. Luesch, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1276–1290.
- [12] T. B. Rounge, T. Rohrlack, A. Tooming-Klunderud, T. Kristensen, K. S. Jakobsen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7322–7330.
- [13] P. J. Knerr, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 479.