

Neue Strukturdaten geben Einblick in die Bewegungen von Transportproteinen in der nicht-ribosomalen Peptidsynthese

Tiia Kittilä, Aurelio Mollo, Louise K. Charkoudian* und Max J. Cryle*

Biosynthese · Enzyme · Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen · Peptidyl-Transportprotein · Proteinstrukturen

Mohamed Marahiel gewidmet

Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) gehören zu den vielversprechendsten Ressourcen bei der Herstellung neuer biologisch aktiver Moleküle. Der Mechanismus der NRPS-Katalyse beruht auf sequentiell angeordneten katalytischen Domänen. Diese sind modular organisiert, wobei jedes Modul jeweils eine Aminosäure auswählt, modifiziert und in das wachsende Peptid einbaut. Die während der NRPS-Katalyse gebildeten Zwischenprodukte werden von Peptidyl-transportprotein(PCP)-Domänen von einem Enzymzentrum zum nächsten weitergereicht. Daher sind die Wechselwirkungen und Bewegungen der PCPs von entscheidender Bedeutung für den NRPS-Mechanismus. PCP-Bewegungen wurden mit den alternierenden Zyklen der Adenylierungsdomänen (A-Domänen) in Zusammenhang gebracht, und kürzlich veröffentlichte Strukturen vollständiger NRPS-Module stützen diese Hypothese. Es scheint allerdings, dass das Alternieren der A-Domänen allein nicht zur Beschreibung des vollständigen NRPS-Katalysezyklus ausreicht und dass der Beladungszustand des PCP für die Abfolge der Katalyseereignisse in diesen komplexen und faszinierenden molekularen Maschinen ebenfalls eine Rolle spielt.

1. Strukturelle und biologische Diversität nicht-ribosomaler Peptide

Sekundärmetabolite weisen eine große Vielfalt an medizinisch bedeutsamen Aktivitäten auf. Sie wirken beispielsweise krebshemmend (Bleomycin), antibiotisch (Vancomy-

cin), antimykotisch (Echinocandin) oder immunsuppressiv (Ciclosporin; Abbildung 1 A).^[1] Nicht-ribosomale Peptide (NRPs) stellen eine besonders reichhaltige Quelle an antimikrobiellen Wirkstoffen dar^[2] und werden unabhängig vom Ribosom durch Enzym-Komplexe, den sogenannten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), produziert.^[3] Da dieser Vorgang nicht den Einschränkungen der ribosombasierten Synthese unterliegt,

können NRPs aus weit mehr Monomeren als dem Standard-satz proteinogener Aminosäuren gebildet werden: Bis heute wurden mehr als 500 verschiedene Monomere in NRPs identifiziert. Dadurch bedingt sich die enorme strukturelle und biologische Vielfalt dieser Verbindungen.^[4]


[*] T. Kittilä, Dr. M. J. Cryle
Abteilung Biomolekulare Mechanismen, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung
Jahnstraße 29, 69120 Heidelberg (Deutschland)


A. Mollo, Dr. L. K. Charkoudian
Department of Chemistry, Haverford College
Haverford, PA 19041 (USA)
E-Mail: lcharkou@haverford.edu

Dr. M. J. Cryle
EMBL Australia, Monash University
Clayton, Victoria 3800 (Australien)

Dr. M. J. Cryle
The Monash Biomedicine Discovery Institute, Department of Biochemistry and Molecular Biology and ARC Centre of Excellence in

Advanced Molecular Imaging, Monash University
Clayton VIC 3800 (Australien)
E-Mail: max.cryle@monash.edu

 Die ORCID-Identifikationsnummer(n) des Autors/der Autoren dieses Artikels finden sich unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201602614>.

 © 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

2. Das NRPS-Fließband

NRPS nutzen katalytische Domänen, um verschiedene Reaktionen in der Peptidsynthese auszuführen. Die meisten NRPS-Systeme haben einen linearen Aufbau mit modular angeordneten katalytischen Domänen, die jeweils eine Aminosäure an das wachsende Peptid anfügen (nichtlineare und iterative NRPS-Maschinerien werden in diesem Kurzaufsatz nicht behandelt).^[3] Das kleinstmögliche Peptidverlängerungsmodul umfasst drei Domänen: Adenylierungsdomäne (A-Domäne), Kondensationsdomäne (C-Domäne) und Peptidyltransportprotein-Domäne (PCP-Domäne; auch Thiolierungsdomäne (T-Domäne); Abbildung 1B).

Die A-Domäne wählt das Aminosäuremonomer,^[5,6] aktiviert es mittels ATP und lädt es anschließend in die benachbarte PCP-Domäne. A-Domänen von NRPS haben zwei Subdomänen, wobei die Bewegungen der kleineren (C-terminalen) Subdomäne es ermöglichen, dass Auswahl/Aktivierung und Beladen der PCP-Domäne im selben aktiven Zentrum der größeren Subdomäne stattfinden.^[7] Bakterielle A-Domänen besitzen hochkonservierte Strukturen, und ihre Sequenzen können im Allgemeinen herangezogen werden, um die Struktur des Peptidrückgrats eines NRPs vorauszusagen. Diese Eigenschaft ist auch bei potentiellen rationalen Umprogrammierung von NRPS von großem Nutzen.^[5,6,8]

C-Domänen katalysieren die Bildung der Peptidbindungen zwischen PCP-gebundenen Substraten: zwei PCPs binden an die C-Domäne, wobei das Amin des nachgeschalteten Aminoacyl-PCPs den Thioester des vorgeschalteten Peptidyl-PCPs angreift, um eine neue Peptidbindung zu bilden. Auf diese Weise wird das NRP weitergereicht und mit jedem Zyklus um ein Monomer erweitert.^[9] Die C-Domäne spielt bei der Erhaltung der Stereochemie des wachsenden NRPs

eine wichtige Rolle,^[10] jedoch ist unser derzeitiges Verständnis dieses Zusammenhangs aufgrund eines Mangels an Strukturdaten substratgebundener C-Domänen begrenzt.

Der Transport zwischen A- und C-Domäne wird von der PCP-Domäne ausgeführt, einer kleinen (ca. 10 kDa), katalytisch inaktiven Domäne mit einem 18 Å langen Phosphopantethein-Arm (Ppant-Arm), der posttranslational an einen konservierten Serinrest am N-Terminus von Helix II angehängt wird (Abbildung 2A).^[3] Der Ppant-Teil dient als Schwenkarm, der die „Reichweite“ der PCP-Domäne bis zu den aktiven Zentren der benachbarten Domänen erweitert. Der Ppant-Arm endet in einem Thiolrest. Dies ist ausschlaggebend dafür, dass die Zwischenstufen als Thioester transportiert werden können und gleichzeitig reaktiv genug bleiben, um Peptidbindungen in der C-Domäne bilden zu können.

Die grundlegende C/A/PCP-Architektur wird durch eine Vielzahl zusätzlicher NRPS-Domänen ergänzt: Die häufigsten sind die Epimerisierungsdomänen (E-Domänen), welche die von der A-Domäne aktivierten L-Aminosäuren in die D-Form epimerisieren, sowie Thioesterasedomänen (TE-Domänen), die das fertige NRP vom NRPS-Fließband freisetzen.^[3] Zusätzliche Diversität kann durch weitere *cis*-Domänen erlangt werden, wie beispielsweise Formylierungs-, Oxidierungs- oder Methylierungsdomänen,^[3] sowie durch Enzyme, die in trans mit der NRPS-Hauptmaschinerie interagieren.^[11–13] In beiden Fällen finden die Interaktionen mit dem PCP-gebundenen Substrat statt, wobei die PCP-Domänen eine entscheidende Rolle bei der in-trans-Rekrutierung von Enzymen spielen.^[11–13] Die X-Domäne ist eine weitere C/E-Domäne aus dem Biosyntheseprozess der Glykopeptid-Antibiotika. Sie ist für die Rekrutierung der Cytochrom P450s an das PCP-gebundene Substrat zum Zwecke der Quervernet-



Tiia Kittilä, geboren 1984, studierte Biochemie an der Universität von Helsinki und schrieb ihre Masterarbeit am Wihuri Research Institut. Seit 2013 ist sie DAAD-Stipendiatin in der Arbeitsgruppe von Max Crayle und befindet sich derzeit in der Endphase ihrer Promotion. Sie befasst sich mit der Biosynthese des Glykopeptid-Antibiotikums Teicoplanin.



Louise K. Charkoudian, geboren 1980, promovierte in Bioanorganischer Chemie an der Duke University. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Chaitan Khosla an der Stanford University wurde sie Fakultätsmitglied am Haverford College. Ihre Forschung gilt der Entschlüsselung und Entwicklung von Naturstoffsynthesen.

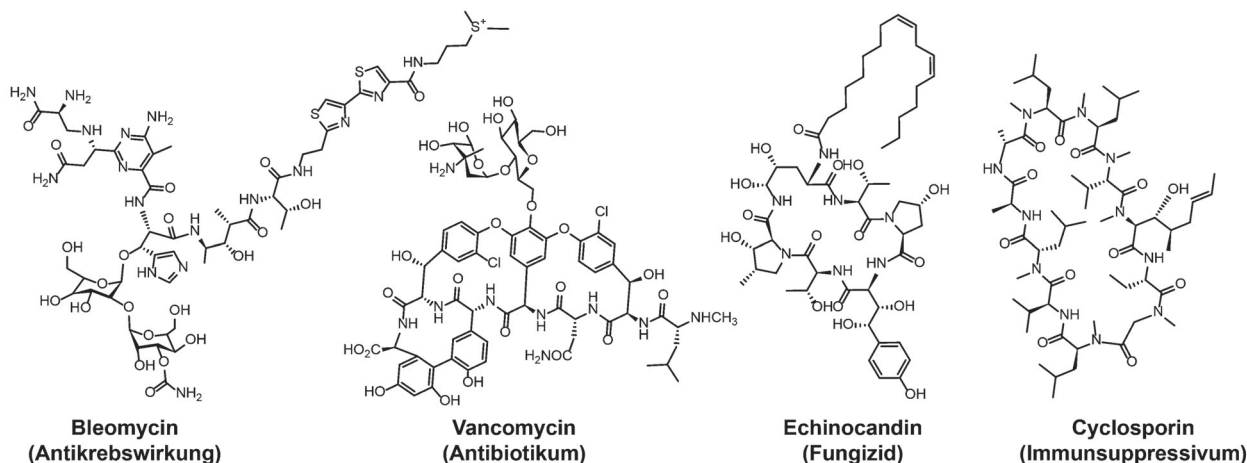


Aurelio Mollo, geboren 1995, studiert Chemie mit dem Schwerpunkt Biochemie am Haverford College. Zurzeit forscht er in der Gruppe von Dr. Louise Charkoudian an der Entwicklung einer chemoenzymatischen Synthesemethode für das Heptapeptid-Antibiotikum Complestatin.



Max J. Crayle, geboren 1979, promovierte 2006 im Fach Chemie an der University of Queensland. Er wechselte als HFSP-Cross-Disciplinary Fellow an das Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg und wurde später Leiter einer Emmy-Noether-Forschungsgruppe. Heute ist er Gruppenleiter am Biomedicine Discovery Institute der Monash University und trägt mit seiner Arbeit zum Verständnis der Biosynthese von Antibiotika sowie zur Entwicklung neuer Antibiotika bei.

A.



B.

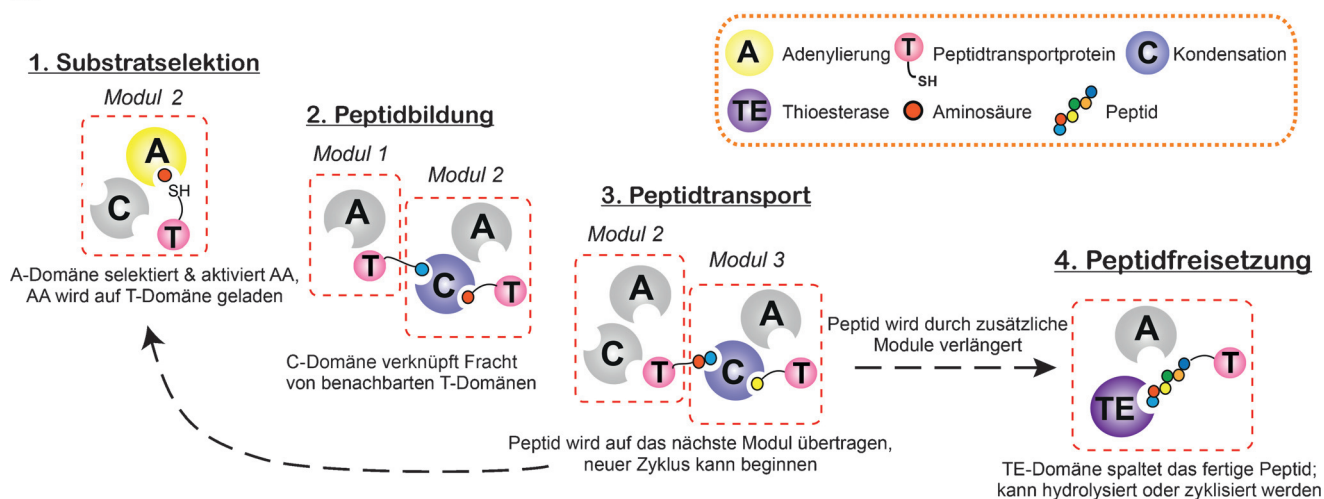


Abbildung 1. Nicht-ribosomale Peptidsynthese. A) Beispiele bioaktiver NRPs. B) Die lineare NRPS-Biosynthese ist fließbandartig aufgebaut, wobei Substrataktivierung und -modifizierung sowie die Bildung von Peptidverbindungen durch eine Abfolge aktiver Domänen katalysiert werden.

zung aromatischer Seitenketten nötig und stellt eine Ausnahme von der PCP-gesteuerten Rekrutierung dar.^[14,15] Außerdem werden zunehmend Abweichungen von der „Standardchemie“ der Domänen der NRPS-Maschinen beobachtet: Kürzlich wurden β -Lactam-Bildung^[16] und TE-katalysierte Epimerisierung^[17] in der Biosynthese von Norcardicin sowie Umesterungen in der Biosynthese von Salinamid entdeckt.^[18]

3. Das Peptidyltransportprotein

Die Sekundär- und Tertiärstrukturen der PCP-Domänen sind hochkonserviert, und nur wenige geringe Abweichungen vom prototypischen Vierhelixbündel wurden bisher dokumentiert.^[19–25] Dies gilt auch für kürzlich beschriebene Multidomänen-NRPS-Strukturen.^[26,27] Auf der Ebene der Primärstruktur weisen PCPs höhere Variabilität auf,^[21] was lokale Änderungen der Form und Ladungsverteilung exponierter und verdeckter Oberflächen zur Folge hat. Diese Variationen beeinflussen wiederum die Art der Wechselwir-

kungen zwischen einzelnen PCPs mit ihren Katalysepartnern,^[21] besonders in trans, wo die PCP-Erkennung ausschlaggebend für die Selektivität ist.^[11,20]

Eine ältere Hypothese bezüglich des NRPS-Mechanismus ging von umfassenden Veränderungen in der Tertiärstruktur des PCPs in Abhängigkeit von dessen Beladungszustand aus, die wiederum die Interaktionen des PCPs beeinflussen und regulieren würden. Dieses Modell beruhte auf der Beobachtung, dass die PCP-Domäne der Tyrocidinsynthetase in drei verschiedenen Konformationen (A, A/H und H) abhängig von ihrem Beladungszustand existiert.^[28] Mittlerweile hat sich dies jedoch als Artefakt des Herausschneidens der PCP-Domäne aus der größeren Synthetase herausgestellt, da alle weiteren bis heute untersuchten PCP-Strukturen die A/H-Konformation aufweisen.^[19–26,29,30]

Welche Rolle der Ppant-Arm oder der Beladungszustand für die Tertiärstruktur von PCPs spielen, ist somit noch nicht geklärt. Analoge Transportproteine der Polyketidsynthasen können ihre molekulare Fracht sequestrieren, doch die biochemische Bedeutung dieses Vorgangs ist noch unklar.^[31–33] Im Falle des PCPs scheint der Ppant-Arm weder in nen-

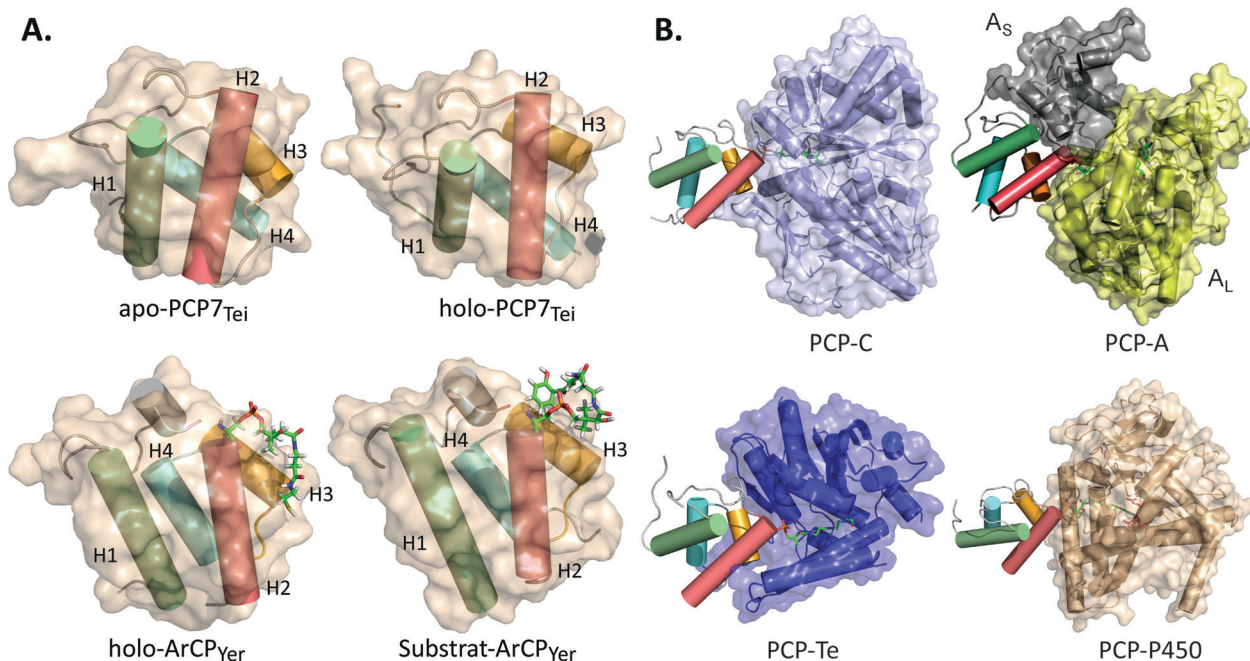


Abbildung 2. PCP-Struktur und -Wechselwirkungen. A) PCP7 aus der Biosynthese von Teicoplanin^[21] und ArCP aus der Yersiniabaktin-Biosynthese^[23] weisen nur geringe Abweichungen vom typischen Vierhelixbündel auf, wenn sie jeweils mit Ppant-Linker bzw. Substrat beladen sind. B) PCP-Wechselwirkungen mit benachbarten Domänen werden hauptsächlich durch Helix II und III sowie die Verbindungsregionen vor und nach Helix II vermittelt (Farben der Helices wie in 2A).^[12,24,26]

nenswerter Weise mit dem Protein zu interagieren noch die Tertiärstruktur des PCPs wesentlich zu verändern.^[21,34] Diese Beobachtung stützt die „Schwenkarmhypothese“, nach welcher der flexible Ppant-Arm die Substrate an benachbarte Domänen weitergibt und die PCP-Domäne im Wesentlichen eine unbewegliche und chemisch inerte Plattform darstellt. Zwei kürzlich veröffentlichte NMR-Studien deuten darauf hin, dass das PCP mit dem Ppant-Arm schwach wechselwirken kann (Abbildung 2A),^[23,25] allerdings wurden diese Wechselwirkungen in atypischen PCPs beobachtet: dem Arylsäure-beladenen PCP der Yersiniabaktinsynthetase^[23] und dem Pyrrol-beladenen PCP der Pyoluteorinsynthetase.^[25] In beiden Fällen wurde gezeigt, dass der Ppant-Arm mit den Helices II und III interagiert. Auch wenn diese Beobachtungen den Schluss nahelegen, dass der beladene Zustand des PCPs NRPS-Wechselwirkungen modulieren kann, wird unser Verständnis der PCP-Kettensequestrierung durch einen Mangel an Daten prototypischer und nicht-herausgeschnittener PCP-Domänen begrenzt.

4. Wechselwirkungen zwischen der PCP-Domäne und den katalytischen Domänen der NRPS

Strukturuntersuchungen haben gezeigt, dass PCP-Domänen für Interaktionen mit den A-, C- und TE-Domänen eine ähnliche Proteinoberfläche nutzen.^[20] Diese Interaktionen kommen hauptsächlich mittels der Helices II/III sowie der dazwischenliegenden Verbindungsschleife zustande (Abbildung 2B). Hydrophobe Wechselwirkungen wurden bereits mehrfach beschrieben,^[24,26,35,36] aber da verwandte Domänen in Bezug auf ihr(e) Partner-PCP(s) selektiv sind, müssen an-

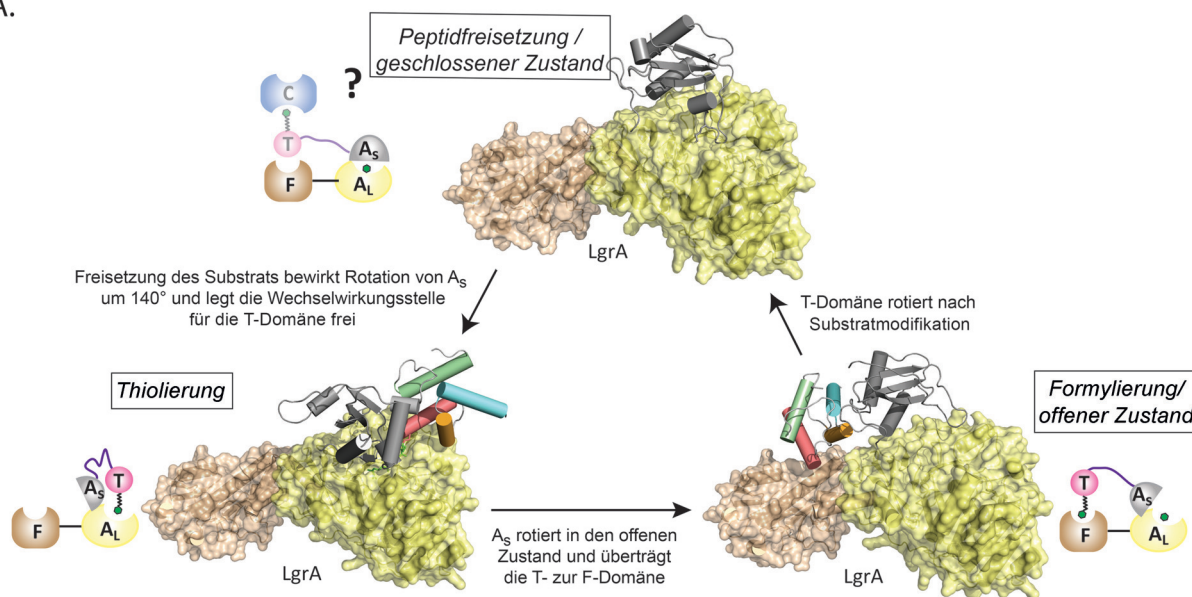
dere Wechselwirkungsformen, wie z.B. variable Ladungsverteilung,^[20] ebenfalls eine wichtige Rolle in der Erkennung spielen. Strukturanalysen von holo-PCPs in Multidomänenumgebungen zeigten, dass die Beladung des Ppant-Arms die Wechselwirkungen zwischen den Domänen verstärkt.^[24,26,36] Dies scheint für in-trans-Interaktionen, beispielsweise mit P450-Enzymen, besonders wichtig zu sein.^[11,12]

Betrachtet man die begrenzten Bewegungsmöglichkeiten der PCP-Domäne im Multidomänenkontext, so überrascht es nicht, dass weitere Oberflächen beschrieben wurden, die ebenfalls Wechselwirkungen zwischen PCPs und Partnerdomänen ermöglichen. C- und TE-Domänen beispielsweise können gleichzeitig mit bestimmten Interaktionsstellen eines PCPs wechselwirken.^[35] Zudem ist die PCP-Domäne in der kürzlich beschriebenen AB3403-Multidomänenstruktur zwischen die C- und die TE-Domäne „gepackt“, was auf alternierende Wechselwirkungen zwischen der Helix I und der TE-Domäne hinweist, wenn der Ppant-Arm sich in der Bindungsstelle der C-Domäne befindet.^[26] Aufgrund der subtilen Änderungen der PCP-Konformation, die eine Substratbindung hervorbringt, ist es unwahrscheinlich, dass dies die einzige Triebkraft hinter der Rekrutierung von Partnerdomänen ist; es muss offensichtlich zusätzliche Prozesse geben, welche die NRPS-Katalyse vorantreiben.

5. Konformationsänderungen der Adenylierungsdomäne lenken die Interaktionen des PCPs

Die erste Strukturanalyse eines kompletten NRPS-Moduls (SrfA-C, C/A/PCP/TE) zeigte, dass die Ppant-Verbindungsstelle des PCP 16 Å vom aktiven Zentrum der C-Domäne

A.



B.

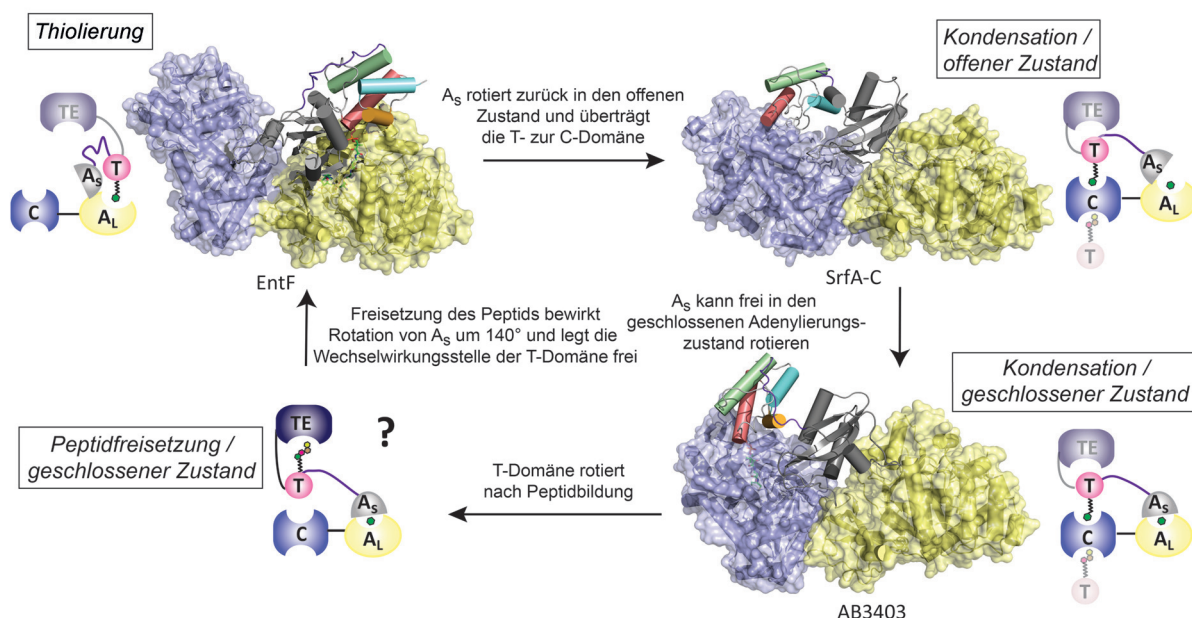


Abbildung 3. Die A-Domäne lenkt die Bewegungen der PCP-Domäne. Umfangreiche Konformationsänderungen sind nötig, damit die PCP-Domäne sich zwischen den aktiven Zentren der A- und C-Domäne bewegen kann. Diese Bewegung wird durch den Alternationszyklus der A-Domäne vermittelt. Der Beladungszustand könnte weitergehende Bewegungen in Richtung nachgeschalteter Domänen herbeiführen. A) Katalysekreislauf eines Initiationsmoduls. B) Katalysekreislauf eines Terminationsmoduls.^[26,27,37] Gelb = A, große Subdomäne (A_L), grau = A, kleine Subdomäne (A_S), pink = T (PCP)-Domäne, braun = F-Domäne, blau = C-Domäne.

mäne entfernt ist (und damit in Reichweite seines 18 Å langen Ppant-Arms), sowie jeweils 57 und 43 Å von den aktiven Zentren der A- bzw. TE-Domäne.^[37] Somit sind umfangreiche Bewegungen und Domänenumgestaltungen nötig, um die Interaktionen zwischen dem PCP und allen seinen Partnern zu ermöglichen. Es wurde vermutet, dass diese PCP-Bewegungen direkt mit dem Katalysekreislauf der A-Domäne gekoppelt sind (Abbildung 3).^[7] Während der Substrataktivierung befindet sich die kleinere Subdomäne der A-Domäne nahe an der größeren Subdomäne (geschlossener Zustand)^[38] und dreht sich dann um 140° , wodurch das aktive Zentrum für

die nachfolgende PCP-Thiolierung freigelegt wird.^[39] Der Kreislauf schließt sich mit einem dritten, offenen Zustand, der die Substratbindung ermöglicht.^[37] Gulick und Mitarbeiter identifizierten in der Verbindungsregion zwischen den PCP- und A-Domänen ein konserviertes LPxP-Motiv, das eine stabile Wechselwirkung mit der kleineren Subdomäne der A-Domäne eingeht und dadurch die effektive Länge der Verbindungsregion verkürzt.^[40] Diese Wechselwirkung könnte der Kopplung von Konformationsänderungen der A-Domäne mit Bewegungen der PCP-Domäne dienen.^[40] Dieses Modell wird dadurch gestützt, dass die Effizienz der A-

Domäne durch die Anwesenheit der PCP-Domäne erhöht wird.^[41,42] Zudem arbeitet die A-Domäne in intakten A-/PCP-Domänen schneller als in herausgeschnittenen Domänen,^[36] was den Schluss nahelegt, dass die Funktionen der A- und PCP-Domänen eng miteinander verflochten sind. Die Kopplung von A-Domänenaktivität mit der Bewegung der PCP-Domäne hat bedeutende Konsequenzen für die Umprogrammierung von NRPS-Maschinerien, da die Änderungen in der Aktivitätsrate der A-Domäne, die mit den Bemühungen einhergehen, die Substratspezifität zu ändern, die Gesamteffizienz der NRPS-Katalyse beeinflussen würden.

Kürzlich veröffentlichte Strukturen von NRPS-Terminationsmodulen in zwei verschiedenen Zuständen (Thiolierung und Kondensation) stützen die Alternationstheorie zusätzlich (Abbildung 3).^[26] Bezüglich der Art der Kopplung von A- und PCP-Domänenbewegungen werfen die Strukturen aber dennoch Fragen auf. Beispielsweise befindet sich die A-Domäne in der Holo-AB3404-Struktur (C/A/PCP/TE, Kondensationszustand) in geschlossenem Zustand,^[26] was inkonsistent mit dem offenen Zustand der SrfA-C-Struktur ist.^[37] Im Falle der kürzlich beschriebenen Strukturen der Gramicidinsynthetase (LgrA, Formylierung (F)/A/PCP)^[27] käme die PCP-Interaktion mit der F-Domäne zusätzlich mit dem in der SrfA-C-Struktur beschriebenen offenen Zustand der A-Domäne in Konflikt. Unglücklicherweise ist die Struktur des PCPs in der LgrA-Struktur, die eine A-Domäne im offenen Zustand aufweist, verzerrt, was die Frage der Lokalisierung des PCP für weitere Analysen offenlässt.

6. Substratzustände lenken PCP-Bewegungen

Die offensichtlichen Widersprüche bezüglich der PCP-Lokalisierung, die diese vollständigen Modulstrukturen aufwerfen, verlangen eine Erweiterung der Theorie, wonach die Domänenalternation die einzige Triebkraft der NRPS-Katalyse sei. Konformationsänderungen der C-Domänen wurden beschrieben, doch ist ihre Funktion unklar.^[43] Die AB3403-Struktur^[26] weist eine C-Domäne im geschlossenen Zustand auf, sowie starke Wechselwirkungen zwischen dem Ppant-Arm und der C-Domäne, wohingegen die C-Domäne der Apo-SrfC-A-Struktur^[37] einen geschlossenen Zustand aufweist. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass eine A-Domäne zwei Aktivierungszyklen in einem intakten Modul katalysieren kann (einen für die Beladung des PCPs und einen zur Aktivierung der nächsten Aminosäure). Das Modul kommt dann zum Stillstand, wenn kein Substrat von einer vorgelagerten Stelle mehr nachgereicht wird.^[41] Diese Beobachtungen sowie die beschriebenen Zustände der A-Domänen aus vollständigen Modulstrukturen legen den Schluss nahe, dass die Wechselwirkung zwischen dem PCP und der vorgelagerten C-Domäne die A-Domäne im Adenylierungsschritt arretiert, wenn die vorgelagerte C-Domäne kein Peptid zur Verfügung stellt. Mechanistisch gesehen ist das sinnvoll, denn ein Voranschreiten des PCPs in den Thiolierungszustand ist nicht wünschenswert, bevor das gebundene Substrat aus der PCP-Domäne entlassen wurde.

Die vor kurzem veröffentlichte Struktur einer C-Domäne im Komplex mit einem Ppant-Mimetikum offenbarte starke Wechselwirkungen zwischen der Bindungstasche und der α -Aminogruppe des Substrats.^[44] Die Beeinflussung dieser Wechselwirkungen durch die Ausbildung von Peptidbindungen könnte ein Sensorsignal für das Schließen der C-Domäne und die PCP-Freigabe darstellen, doch diese Hypothese muss noch weitergehend untersucht werden. Für die weitere NRPS-Forschung sind die mechanistischen Einzelheiten, welche die Aktivität der C-Domäne sowie die Interaktionen des PCPs zur Bildung von Peptidbindungen ausmachen, von großer Bedeutung, wobei biochemische Untersuchungen derzeit hinter In-vivo-Experimenten zurückbleiben.^[8,45,46]

Trotz der maßgeblichen Erkenntnisse, die jüngste vollständige Modulstrukturen zum NRPS-Mechanismus geliefert haben, bleibt das Verständnis der Wechselwirkungen der PCP-Domäne mit nachgeschalteten C- und TE-Domänen begrenzt. Einblicke in diese Wechselwirkungen können jedoch mittels einer chemisch abgefangenen PCP-/TE-Domänenstruktur gewonnen werden.^[24] Durch eine Überlagerung der TE-Domäne dieser Struktur mit der TE-Domäne aus der AB3403-Struktur zeigen sich die Veränderungen in der Deckelregion der TE-Domäne infolge einer Substratbindung (Abbildung 4). Auffällig ist, dass eine einfache Rotation der PCP-Domäne auszureichen scheint, um das Substrat ohne wesentliche strukturelle Umformungen der NRPS von der C- an die TE-Domäne weiterzureichen. Eine PCP-/C-Domänenstruktur zeigte zudem, dass sich die vorgelagerte PCP-Domäne nahe der Donor-Bindungsstelle der C-Domäne befindet, die Ppant-Befestigungsstelle jedoch um 180° weggedreht ist, wenn die PCP-Domäne nicht beladen ist.^[47] Dies erinnert stark an die Wechselwirkungen zwischen PCP- und TE-Domäne der AB3403-Struktur.^[26] Somit ist es gut möglich, dass nicht die Reorganisation der A-Domäne,

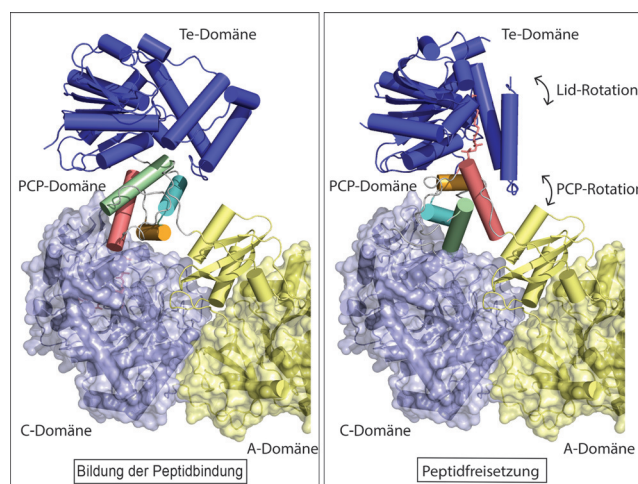


Abbildung 4. PCP-Wechselwirkung mit der TE-Domäne. Links: Die PCP-Wechselwirkung mit der C-Domäne einer vollständigen Modulstruktur^[26] zeigt die TE-Domäne in offener Konformation, aber nahe der PCP-Domäne. Rechts: Überlagerung der TE-Domäne aus einer PCP-/TE-Struktur^[24] mit einer Gesamtmodul-TE-Domäne zeigt, dass die Deckelregion („Lid“) sich nach PCP-Bindung schließt. In diesem Fall rotiert die PCP-Domäne, bleibt aber nahe der Bindungsstelle der C-Domäne.

sondern eher der Beladungszustand des PCP und die Flexibilität der Akzeptordomäne für die Wechselwirkung zwischen PCP- und C-/TE-Domänen ausschlaggebend sind. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass die TE-Domäne der EntF-Struktur sich frei bewegt,^[26] denn eine freie Rotation der TE-Domäne würde die Substratbindung nach dessen Freigabe von der vorgelagerten C-Domäne erleichtern. Eine ähnliche Strategie könnte möglicherweise verwendet werden, um die PCP-Domänen an Peptid-modifizierende Enzyme heranzuführen, jedoch gibt es bis zum heutigen Tag keine Strukturdaten, die eine Untersuchung dieser Hypothese ermöglichen würden.

7. Ausblick

Jüngste vollständige Modulstrukturen geben Einblicke in die Mechanismen der NRPS-Funktion und deuten an, dass Bewegungen der PCP-Domäne durch eine Kombination aus Konformationsänderungen und Beladungszuständen zustande kommen. Die nächste Herausforderung für dieses Forschungsfeld wird sein, die Wechselwirkungen zwischen den NRPS-Modulen zu verstehen, denn die Struktur einer multimodularen NRPS wurde bisher nicht aufgelöst. Marahiel schlug kürzlich das Modell eines auf Multidomänenstrukturen gestützten kompletten NRPS-Systems vor, bei dem die helikale Organisation dadurch erreicht wird, dass jedes Modul entlang der Helixachse um 120° rotiert angeordnet ist. Die PCP-Domänen bleiben so nahe der Achse, wodurch sie vor Hydrolyse geschützt sind.^[48] Ein helikaler Aufbau würde die C-Domänen benachbarter Module in unmittelbarer Nähe zueinander ausrichten, und eine einfache Drehung der PCP-Domäne würde somit ausreichen, um das Substrat von einer C-Domäne zur nächsten weiterzureichen. Diese Vorstellung ist mit dem fließbandartigen NRPS-Aufbau des aktuellen Katalysemodells gut in Einklang zu bringen. Strukturuntersuchungen liefern wichtige Einsichten in das NRPS-System, müssen jedoch nun durch weitere biochemische Charakterisierungen kompletter Module ergänzt werden, da die immense Bedeutung von Domäneninteraktionen für die Katalyse, sowohl innerhalb von Modulen als auch untereinander, inzwischen offensichtlich geworden ist.^[36,41,45,46] Diese Art von Untersuchungen sind besonders für die effektive Umprogrammierung von NRPS-Maschinen enorm wichtig, da ein Verständnis der Ursachen der Substratspezifität kompletter NRPS-Module derzeit hinter der In-vivo-Umprogrammierung von NRPS zurückbleibt.^[8] Aufgrund der Bedeutung von NRPs sind diese Bemühungen vonnöten, um unseren Zugriff auf Derivate dieser medizinisch relevanten Naturprodukte zu verbessern.

Danksagungen

Wir danken dem Haverford College (A.M. und L.K.C.), der Research Corporation for Science Advancement Cottrell Scholars Award (L.K.C.), dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (T.K.; Graduate School Scholarship Program), der Monash University, EMBL Australia und dem

Emmy-Noether-Programm (CR 392/1-1) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (M.J.C.) für finanzielle Unterstützung.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 9834–9840
Angew. Chem. **2016**, 128, 9988–9995

- [1] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461.
- [2] E. A. Felnagle, E. E. Jackson, Y. A. Chan, A. M. Podevels, A. D. Berti, M. D. McMahon, M. G. Thomas, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, 5, 191.
- [3] G. H. Hur, C. R. Vickery, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1074.
- [4] C. T. Walsh, R. V. O'Brien, C. Khosla, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 7098; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 7238.
- [5] G. L. Challis, J. Ravel, C. A. Townsend, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 211.
- [6] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 493.
- [7] A. M. Gulick, *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4, 811.
- [8] M. Winn, J. K. Fyans, Y. Zhuo, J. Micklefield, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 317.
- [9] P. J. Belshaw, C. T. Walsh, T. Stachelhaus, *Science* **1999**, 284, 486.
- [10] U. Linne, M. A. Marahiel, *Biochemistry* **2000**, 39, 10439.
- [11] B. Kokona, E. S. Winesett, A. N. von Krusenstiern, M. J. Cryle, R. Fairman, L. K. Charkoudian, *Anal. Biochem.* **2016**, 495, 42.
- [12] K. Haslinger, C. Brieke, S. Uhlmann, L. Sieverling, R. D. Süßmuth, M. J. Cryle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8518; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 8658.
- [13] S. Uhlmann, R. D. Süßmuth, M. J. Cryle, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 2586.
- [14] K. Haslinger, M. Peschke, C. Brieke, E. Maximowitsch, M. J. Cryle, *Nature* **2015**, 521, 105.
- [15] M. Peschke, K. Haslinger, C. Brieke, J. Reinstein, M. J. Cryle, **2016**, 138, 6746–6753.
- [16] N. M. Gaudelli, D. H. Long, C. A. Townsend, *Nature* **2015**, 520, 383.
- [17] N. M. Gaudelli, C. A. Townsend, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 251.
- [18] L. Ray, K. Yamanaka, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 364; *Angew. Chem.* **2016**, 128, 372.
- [19] P. Tufar, S. Rahighi, F. I. Kraas, D. K. Kirchner, F. N. Lohr, E. Henrich, J. Köpke, I. Dikic, P. Güntert, M. A. Marahiel, V. Dötsch, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 552.
- [20] J. R. Lohman, M. Ma, M. E. Cuff, L. Bigelow, J. Bearden, G. Babnigg, A. Joachimiak, G. N. Phillips, Jr., B. Shen, *Proteins* **2014**, 82, 1210.
- [21] K. Haslinger, C. Redfield, M. J. Cryle, *Proteins* **2015**, 83, 711.
- [22] S. Zimmermann, S. Pfennig, P. Neumann, H. Yonus, U. Weininger, M. Kovermann, J. Balbach, M. T. Stubbs, *FEBS Lett.* **2015**, 589, 2283.
- [23] A. C. Goodrich, B. J. Harden, D. P. Frueh, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 12100.
- [24] Y. Liu, T. Zheng, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **2011**, 18, 1482.
- [25] M. J. Jaremko, D. J. Lee, S. J. Opella, M. D. Burkart, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 11546.
- [26] E. J. Drake, B. R. Miller, C. Shi, J. T. Tarrasch, J. A. Sundlov, C. L. Allen, G. Skiniotis, C. C. Aldrich, A. M. Gulick, *Nature* **2016**, 529, 235.
- [27] J. M. Reimer, M. N. Aloise, P. M. Harrison, T. M. Schmeing, *Nature* **2016**, 529, 239.
- [28] A. Koglin, M. R. Mofid, F. N. Lohr, B. Schafer, V. V. Rogov, M. Blum, T. Mittag, M. A. Marahiel, F. N. Bernhard, V. Dötsch, *Science* **2006**, 312, 273.
- [29] J. R. Lai, A. Koglin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2006**, 45, 14869.
- [30] J. A. Sundlov, C. Shi, D. J. Wilson, C. C. Aldrich, A. M. Gulick, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 188.
- [31] J. Crosby, M. P. Crump, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1111.
- [32] J. Beld, H. Cang, M. D. Burkart, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 14456; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 14684.

- [33] S. E. Evans, C. Williams, C. J. Arthur, E. Ploskon, P. Wattanamorn, R. J. Cox, J. Crosby, C. L. Willis, T. J. Simpson, M. P. Crump, *J. Mol. Biol.* **2009**, 389, 511.
- [34] A. C. Goodrich, D. P. Frueh, *Biochemistry* **2015**, 54, 1154.
- [35] D. P. Frueh, H. Arthanari, A. Koglin, D. A. Vosburg, A. E. Bennett, C. T. Walsh, G. Wagner, *Nature* **2008**, 454, 903.
- [36] C. A. Mitchell, C. Shi, C. C. Aldrich, A. M. Gulick, *Biochemistry* **2012**, 51, 3252.
- [37] A. Tanovic, S. A. Samel, L. Essen, M. A. Marahiel, *Science* **2008**, 321, 659.
- [38] E. Conti, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, P. Brick, *EMBO J.* **1997**, 16, 4174.
- [39] H. Yonus, P. Neumann, S. Zimmermann, J. J. May, M. A. Marahiel, M. T. Stubbs, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 32484.
- [40] B. R. Miller, J. A. Sundlov, E. J. Drake, T. A. Makin, A. M. Gulick, *Proteins* **2014**, 82, 2691.
- [41] T. Kittilä, M. Schoppet, M. J. Cryle, *ChemBioChem* **2016**, 17, 576.
- [42] J. C. Henderson, C. D. Fage, J. R. Cannon, J. S. Brodbelt, A. T. Keatinge-Clay, M. S. Trent, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 2382.
- [43] K. I. Bloudoff, D. Rodionov, T. M. Schmeing, *J. Mol. Biol.* **2013**, 425, 3137.
- [44] K. I. Bloudoff, D. A. Alonzo, T. M. Schmeing, *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23, 331.
- [45] G. C. Uguru, C. Milne, M. Borg, F. Flett, C. P. Smith, J. Micklefield, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5032.
- [46] J. Thirlway, R. Lewis, L. Nunns, M. Al Nakeeb, M. Styles, A.-W. Struck, C. P. Smith, J. Micklefield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 7181; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 7293.
- [47] S. A. Samel, G. Schoenafinger, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, L.-O. Essen, *Structure* **2007**, 15, 781.
- [48] M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 136.

Eingegangen am 15. März 2016

Online veröffentlicht am 20. Juli 2016

Übersetzt von Dr. Julia Freund, Dresden