

## Antibiotika vom molekularen Fließband: Modulare Peptidsynthetasen als Biokatalysatoren

Stephan A. Sieber, Mohamed A. Marahiel

Philipps-Universität Marburg

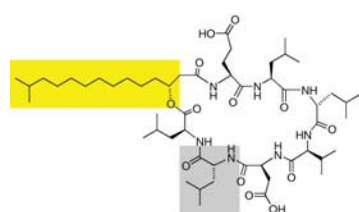
► Auf der Suche nach neuen Medikamenten geraten Naturprodukte zunehmend in den Fokus und dienen als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Pharmakologisch relevante Peptide und Polyketide von Bakterien und Pilzen haben ein breites Wirkungsspektrum, das von antibiotischen über zytostatische bis zu immunsuppressiven Eigenschaften reicht. Prominente Vertreter dieser Verbindungen sind etwa ACV (Vorläufermolekül von Penicillin), Bleomycin, Surfactin, Vancomycin, Bacitracin und Cyclosporin (Abb. 1). Die chemischen Strukturen und damit die biologischen Eigenschaften dieser Moleküle sind sehr vielfältig. Charakteristisch sind zyklische Strukturen, der Einbau von nicht-proteinogenen Aminosäuren und Fettsäuren, Heterozyklen

und postsynthetische Modifikationen wie Glycosylierung und oxidative Vernetzung. Da die chemische Synthese solcher komplexer Verbindungen sehr aufwändig ist, ist die Herstellung im biologischen System interessant. Die Natur hat dafür eine Strategie gewählt, die eine spezifische und effiziente Synthese von Peptiden und Polyketiden an großen Multienzymkomplexen erlaubt, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und Polyketidsynthetasen (PKS)<sup>[1]</sup>.

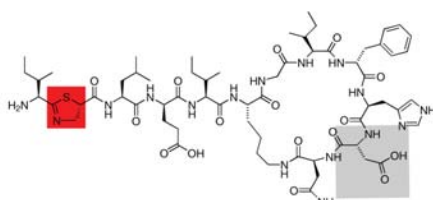
Im Gegensatz zur ribosomalen Peptidsynthese ist die nichtribosomale Peptidsynthese an NRPS nicht auf den Einbau von 20 Aminosäuren limitiert. Es sind hunderte monomere Baueinheiten zusätzlich bekannt, die postsynthetisch verändert werden können. Bei dieser nichtribosomalen Synthese

ist keine mRNA als Matrize nötig, da die großen modular aufgebauten Multienzymkomplexe selbst die Rolle der Matrize übernehmen, entlang der die schrittweise Elongation des Peptids ähnlich dem Modell eines Fließbandes vom N- zum C-Terminus erfolgt. Ein Modul (ca. 1000 Aminosäuren lang) ist verantwortlich für die Substraterkennung, Aktivierung als Acyladenylat und Bindung auf dem Enzym als Thioester sowie die Peptidbindungsknüpfung. Diese individuellen Reaktionen werden von einzelnen Domänen innerhalb der Module ausgeführt. Abb. 2 zeigt Prinzipien der nichtribosomalen Peptidsynthese am Beispiel der Vancomycin-Synthetase.

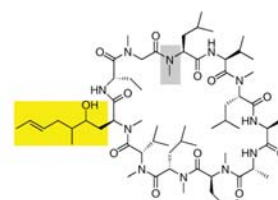
Der Einbau jeder neuen Aminosäure in die wachsende Peptidkette beginnt mit der spezifischen Erkennung und Aktivierung durch die etwa 550 Aminosäuren große Adenylierungsdomäne (A-Domäne). A-Domänen katalysieren analog zu den Aminoacyl-t-RNA-Synthetasen die Aktivierung der Substrataminosäure als Aminoacyl-adenylat durch die  $Mg^{2+}$ -abhängige Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) unter Bildung von Pyrophosphat ( $PP_i$ )<sup>[2]</sup>. Die Kristallstruktur einer A-Domäne (GramicidinS-SynthetaseA) gab Einblick in die Funktionsweise der Substraterkennung von NRPS



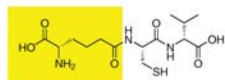
Surfactin (Biotensid)



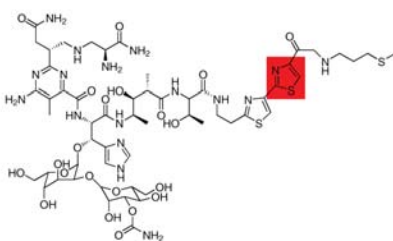
Bacitracin (Antibiotikum)



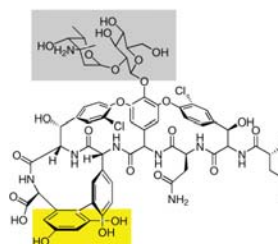
Cyclosporin (Immunsuppressivum)



ACV (Penicillin Vorstufe)



Bleomycin (Antitumormittel)



Vancomycin (Antibiotikum)



nicht-proteinogene Aminosäuren  
oder Fettsäuren



Heterozyklisierung



Modifikationen wie N-Methylierung,  
Epimerisierung oder Glycosylierung

Abb. 1: Produkte von nichtribosomalen Peptidsynthetasen (Bleomycin ist eine NRPS-PKS-Hybridverbindung). Interessante Strukturmerkmale einzelner Verbindungen sind farbig hervorgehoben. Diese Strukturvielfalt trägt zu einer Bandbreite von biologischen Aktivitäten bei, die von antibiotischen über zytostatische bis hin zu immunsuppressiven Eigenschaften reichen.

und zeigte, dass die Seitenkette des Substrates in einer speziellen Tasche gebunden und dort von mehreren Resten koordiniert wird<sup>[3]</sup>.

Das als Aminoacyladenylat aktivierte Substrat wird im nächsten Schritt durch einen nukleophilen Angriff von einer freien Thiol-Gruppe des Phosphopantethein-Kofaktors (ppan) auf die Thiolierungsdomäne (T-Domäne, 80 AS) übertragen<sup>[4]</sup>. Der ppan-Kofaktor ist über einen invarianten Serinrest kovalent mit der T-Domäne verbunden. Vorher wird zunächst durch eine von Phosphopantethein-Transferasen katalysierte Reaktion der ppan-Kofaktor des Coenzym A auf den invarianten Serinrest der apo-T-Domäne übertragen und diese somit in die aktive Holo-Form überführt<sup>[5]</sup>. Das Substrat ist nun kovalent über einen Thioester mit dem Multienzymkomplex über den flexiblen ppan-Arm verbunden, der das gebundene Substrat an räumlich entfernte Domänen für Reaktionen weiterreichen kann.

Die sich anschließende Peptidbindung zwischen zwei Substraten wird von der Kondensationsdomäne (C-Domäne) katalysiert. Die C-Domäne (450 AS) ist zwischen zwei aufeinanderfolgenden A- und T-Domänen angeordnet. Sie katalysiert den nukleophilen Angriff des freien Amins des stromabwärtsliegenden, T-Domäne-gebundenen Substrates auf die aktivierte Thioesterbindung der wachsenden Peptidkette, die an der stromaufwärts liegenden T-Domäne gebunden ist. Das Produkt dieser Reaktion ist eine um ein Monomer verlängerte Peptidkette, die vom stromaufwärts liegenden Modul an ein stromabwärts liegendes Modul weitergereicht wurde. Einer Modellvorstellung zufolge besitzt die C-Domäne zwei benachbarte Bindetaschen: eine für die stromaufwärts eintretende, wachsende Peptidkette (elektrophile Donor Position, d) und eine weitere für die stromabwärts liegende, nukleophil angreifende Aminosäure (nukleophile Akzeptorposition, a)<sup>[6]</sup>.

Neben diesen drei Domänen, die dem Elongationsprozess dienen, sind auch optionale Domänen bekannt, die durch Modifikationsreaktionen eine größere Vielfalt in die Peptidsequenz bringen. Ein häufig vorkommendes Strukturmerkmal von nichtribosomal synthetisierten Peptiden ist der Einbau von D-Aminosäuren, der von der Epimerisierungsdomäne (E-Domäne, 450 AS) vorgenommen wird<sup>[7]</sup>. Sie katalysiert die Racemisierung der an den Kofaktor gebundenen C-terminalen Aminosäure und überführt sie somit von dem L- in das D-Enantiomer, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Der Selektivitätsfilter, der sicherstellt, dass nur eines der beiden Enantiomere in die Peptidsequenz eingebaut wird, ist die C-Domäne. Am Beispiel der Vancomycin-Synthetase in *Abb. 2* sind drei E-Domänen zu erkennen (Module 2, 4 und 5), die für den Einbau von D- $\beta$ -Hydroxytyrosin und zwei Mal hintereinander für den Einbau von D- $\beta$ -Hydroxyphenylglycin verantwortlich sind. Am Beispiel des Vancomycins zeigt sich die Bedeutung von D- und L-Enantiomeren in der Peptidkette, da die Reste im Raum so angeordnet werden, dass sie sich durch eine post-synthetische Reaktion über Etherbrücken vernetzen lassen und so zu einer starren Konformation des Peptides beitragen.

Die bisher besprochenen katalytischen Domänen dienen vorwiegend dem Aufbau des linearen Peptidgerüsts und sind deshalb sich wiederholende Einheiten des modularen Enzymtemplates (*Abb. 2*). Um das Enzymtemplate für einen weiteren Syntheszyklus zu reaktivieren, muss das lineare Peptid vom terminalen ppan-Kofaktor des Enzyms abgespalten werden. Dies wird in den meisten NRPS-Systemen von C-terminalen Thioesterase-Domänen (TE-Domäne) über zwei verschiedene Wege katalysiert<sup>[8]</sup>. Die Abspaltungsreaktion kann entweder wie im Falle von Bleomycin, Vancomycin und ACV über eine hydrolytische Abspaltung zu einem linearen



ben. Strukturdaten sind mittlerweile für die wichtigsten NRPS-Domänen erhältlich (A-, C-, T- und TE-Domäne)<sup>[3]</sup>, und die quartäre Organisation ist bekannt<sup>[10]</sup>. Mit dieser Vielzahl von Informationen können nun neue Peptide mit verbesserter oder veränderter biologischer Aktivität durch eine Umprogrammierung der nichtribosomalen Peptidsynthese hergestellt werden. Dazu können durch Austausch einzelner Module innerhalb der NRPS neue Hybrid-Verbindungen geschaffen und deren neue Produkte in einem sich anschließenden Test auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht werden<sup>[11]</sup>.

Die hier vorgestellten natürlichen Arzneimittelfabriken haben eine Reihe von pharmakologisch relevanten Verbindungen hervorgebracht. Das Verständnis ihrer komplexen Biosynthese ermöglicht nun den gezielten Eingriff in die Synthesemaschinerie zur Erschließung neuer Wirkstoffbibliotheken.

## Literatur

- [1] **C. T. Walsh**, (2003): Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. *ASM Press, Washington DC, 2003*
- [2] **R. Dieckmann, Y. O. Lee, H. van Liempt, H. von Dohren, H. Kleinkauf**, (1995): Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett*, 357, 212.
- [3] **T. Weber, M. A. Marahiel**, (2001): Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure (Camb)*, 9, R3.
- [4] **T. Stachelhaus, A. Hüser, M. A. Marahiel**, (1996): Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.*, 3, 913.
- [5] **R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh**, (1996): A new enzyme superfamily – the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol*, 3, 923.
- [6] **P. J. Belshaw, C. T. Walsh, T. Stachelhaus**, (1999): Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science*, 284, 486.
- [7] **Linne, U., Doekel, S., Marahiel, M.A.** (2001): Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, 40 (51): 15824–34.
- [8] **J. Trauger, R. Kohli, H. Mootz, M. Marahiel, C. Walsh**, (2000): Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature*, 407, 215.
- [9] **C. C. Tseng, S. D. Bruner, R. M. Kohli, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, S. A. Sieber**, (2002): Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*, 41, 13350.
- [10] **S. A. Sieber, U. Linne, N. J. Hillson, E. Roche, C. T. Walsh, M. A. Marahiel**, (2002): Evidence for a monomeric structure of nonribosomal Peptide synthetases. *Chem Biol*, 9, 997.
- [11] **H. D. Mootz, D. Schwarzer, M. A. Marahiel**, (2000): Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5848.

## Korrespondenzadresse:

**Mohamed A. Marahiel**  
Philipps-Universität Marburg  
Fachbereich Chemie/Biochemie  
Hans-Meerwein-Straße  
D-35032 Marburg  
Tel.: 06421-282-5722  
Fax: 06421-282-2191  
marahiel@chemie.uni-marburg.de