

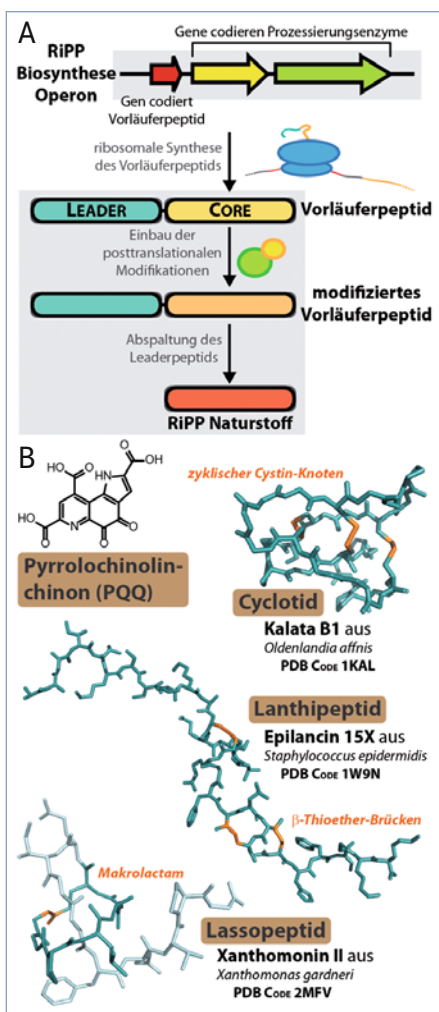
Naturstoffe

Das Potenzial von RiPPs in medizinisch-biotechnologischen Anwendungen

JULIAN D. HEGEMANN
INSTITUT FÜR CHEMIE, FAKULTÄT II, TU BERLIN

Ribosomally synthesized and post-translationally modified proteins (RiPPs) are an interesting natural product superfamily. Their underlying biosynthetic principles, where recognition sites are strictly separated from the regions that are modified in the substrate, make them interesting for utilization in medicinal and biotechnological applications. Here, the promiscuity of RiPP biosynthetic enzymes will be described for examples from the lasso and lanthipeptide subfamilies and current developments as well as future directions in this field will be discussed.

DOI: 10.1007/s12268-020-1368-4
© Der Autor 2020



■ Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs) sind eine der großen Superfamilien unter den Naturstoffen. Die Mitglieder dieser Superfamilie haben ein gemeinsames Biosyntheseprinzip: Ein genetisch codiertes Vorläuferpeptid wird nach der Synthese am Ribosom von speziellen Prozessierungsenzymen in den finalen Naturstoff umgewandelt (Abb. 1A, [1]). Das Vorläuferpeptid selbst besteht aus zwei distinkten Bereichen, der N-terminalen Leader- und der C-terminalen Core-Region. Während der Core-Peptid-Bereich enzymatisch modifiziert wird, dient die Leader-Region primär der Erkennung durch die Enzyme. Der Leader wird daher auch während der Biosynthese proteolytisch abgespalten.

Durch räumliche Trennung der Bereiche für Erkennung und Modifikation wird eine

◀ **Abb. 1:** Grundlegendes über ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs). **A**, Prinzipien der RiPP-Biosynthese. Zunächst wird das Gen-codierte Vorläuferpeptid am Ribosom assembliert. Anschließend erkennen und binden die Prozessierungsenzyme ein Erkennungsmotiv in der Leader-Region und modifizieren dann das Core-Peptid. Durch Abspaltung des Leader-Peptids wird der Naturstoff freigesetzt. **B**, Strukturen einer Auswahl an RiPP-Naturstoffen.

hohe Spezifität für die Leader-Erkennung mit einer hohen Substrattoleranz gegenüber den zu modifizierenden Sequenzen im Core-Peptid kombiniert. Dies ermöglicht eine schnelle Diversifizierung von RiPP-Naturstoffen und macht sie interessant für die Entwicklung biotechnologischer und medizinischer Anwendungen.

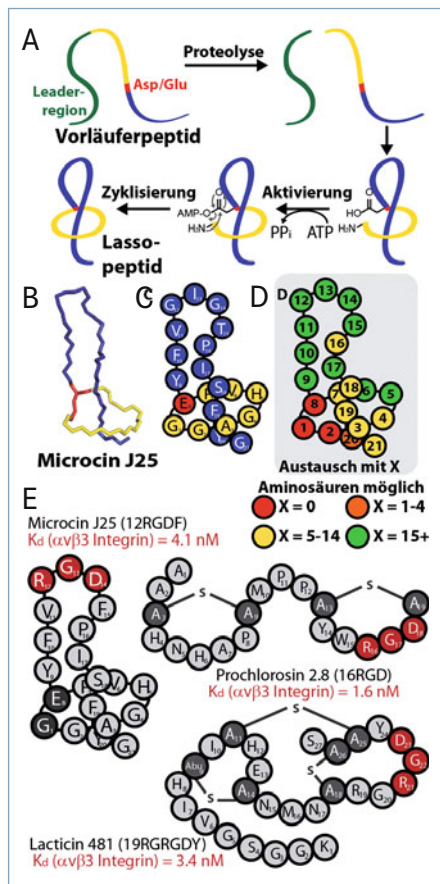
Wegen ihres ribosomalen Ursprungs bestehen Vorläuferpeptide nur aus kanonischen Aminosäuren (AS). Trotzdem kann eine große strukturelle und chemische Vielfalt realisiert werden (Abb. 1B), da die Prozessierungsenzyme eine Vielzahl verschiedenster chemischer Modifikationen durchführen können [1].

Viele RiPP-Subfamilien befinden sich zwischen kleinen, organischen Wirkstoffen (< 500 Da) und großen Biopharmazeutika (> 5.000 Da). Die medizinische Anwendung von RiPPs könnte daher eine Nische füllen, da sie durch ihre Größe geeigneter Inhibitoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen als kleine organische Moleküle sind und gleichzeitig eine verbesserte Zellpermeabilität als Biopharmazeutika aufweisen [2].

Das Lassopeptid Microcin J25

Lassopeptide zeichnen sich durch eine 3D-Struktur aus, die an den Knoten in einem Lasso erinnert. Diese Struktur entsteht durch Ausbildung eines Makrolactamrings, der den linearen C-terminalen Bereich des Peptids fest umschließt. Der Ring wird zwischen der N-terminalen α -Aminogruppe und der Carbonsäure-Seitenkette eines Aspartat- oder Glutamatrestes ausgebildet (Abb. 2A, [1, 3]). Stabilisiert wird die Lassotopologie durch die Positionierung großer, sperriger Aminosäuren über und unter dem Ring. Trotz der rein sterischen Stabilisierung weisen Lassopeptide eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen und auch oft gegenüber hitzeinduzierter Entfädelung in ein verzweigt-zyklisches Peptid auf [4].

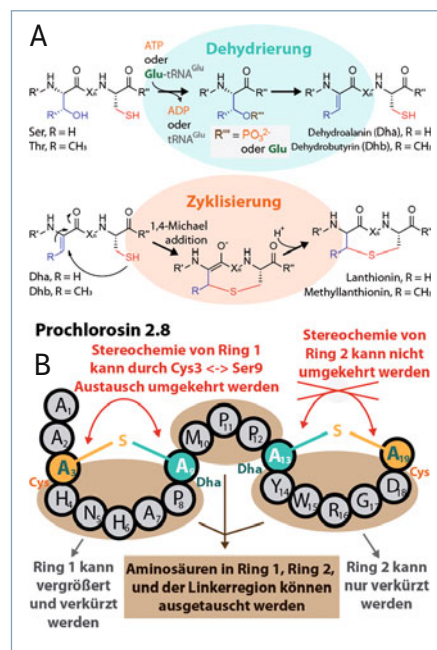
Microcin J25 wurde 1992 entdeckt und gehört zu den bestuntersuchten Lassopeptiden (Abb. 2B, C). Durch Testen von 381 Punktmutationen des Core-Peptids wurde die



▲ **Abb. 2:** Grundprinzipien der Lassopeptidbiosynthese und Beispiele für das *epitope grafting* unter Verwendung von RiPPs. **A**, Posttranslationale Modifikationen in Lassopeptiden [3]. Nach Bindung des Leader-Peptids setzt eine Cysteinprotease das Core-Peptid frei. Eine Makrozyklase aktiviert anschließend die Asp/Glu-Seitenkette unter Verbrauch von ATP und katalysiert dann den Ringschluss zwischen der aktivierten Carbonsäure und dem primären Amin des freigesetzten N-Terminus. **B**, **C**, Microcin J25: 3D-Struktur (PDB-Code 1Q71) (**B**) und schematische Darstellung (**C**). **D**, Darstellung besonders promiskuer Regionen in Microcin J25 [5]. **E**, Primärstrukturen von Microcin J25 (RGDF), Prochlorosin 2.8 (16RGD) und Lacticin 481 (RGRGDY). Die Bindungskonstanten für die Interaktion mit dem $\alpha\beta 3$ -Integrin sind angegeben [6, 9, 11].

hohe Substrattoleranz der Biosynthesemaschinerie bewiesen (**Abb. 2D**, [5]).

Microcin J25 wirkt antimikrobiell gegen Enterobakterien. Diese Aktivität wird primär durch Inhibierung der Gram-negativen RNA-Polymerase und sekundär durch Eingriff in die Atmungskette erreicht [3]. Wegen seiner hohen Stabilität, seiner guten heterologen Produzierbarkeit in *Escherichia coli* und der Vielzahl an tolerierten Aminosäureaustauschen konnte Microcin J25 erfolgreich



▲ **Abb. 3:** Grundprinzipien der Lanthipeptidbiosynthese und Substrattoleranz des Prozessierungsenzyms ProcM. **A**, Posttranslationale Modifikationen in Lanthipeptiden. Die Aktivierung der Hydroxygruppe im ersten Schritt der Biosynthese wird je nach Enzym durch ATP-abhängige Phosphorylierung oder durch tRNA-abhängige Glutamylierung erreicht [7]. Durch Eliminierung der aktivierten Hydroxygruppe entstehen Dha- und Dhb-Gruppen. Die ungesättigten Doppelbindungen können anschließend nukleophil von den Thiolgruppen der Cysteinreste angegriffen werden, was die Bildung der β -Thioetherverbrückungen ermöglicht. **B**, Primärstruktur von Prochlorosin 2.8 und Zusammenfassung der von ProcM tolerierten Änderungen des Core-Peptids [9].

genutzt werden, um mittels *epitope grafting* (das heißt Einbringen einer kurzen Peptidsequenz, die eine bestimmte Aktivität vermittelt; hier: RGD) einen potenten Antagonisten des $\alpha\beta 3$ -Integrin-Rezeptors zu erzeugen (**Abb. 2E**, [6]). Dessen Inhibition ist von klinischer Relevanz, da er in Angiogeneseprozesse involviert ist und auf bestimmten Tumorzellarten überexprimiert wird.

Das Lanthipeptid Prochlorosin 2.8

Lanthipeptide besitzen charakteristische β -Thioethergruppen, die (Methyl)lanthionine, die durch den nukleophilen Angriff von Cysteinthiolen auf Seitenketten dehydrierter Serin-/Threoninreste erzeugt werden (**Abb. 3A**, [1, 7]).

Prochlorosine sind Lanthipeptide, deren natürliche Funktionen bisher unbekannt sind. Die Gene von 30 verschiedenen Pro-

Hier steht eine Anzeige

Springer

chlorosin-Vorläuferpeptiden (ProcAs) und von dem Prozessierungsenzym ProcM wurden im Genom des Cyanobakteriums *Prochlorococcus marinus* sp. MIT9313 gefunden [7, 8]. Alle ProcAs besitzen hochkonservierte Leader-Peptid-Bereiche und hypervariable Core-Regionen, die in eine Vielzahl verschiedener Lanthipeptide mit zum Teil grundverschiedenen Ringtopologien umgewandelt werden [7–9]. Vermutlich prozessiert ProcM alle 30 ProcAs. Dies wurde experimentell bereits für 17 ProcAs nachgewiesen [7, 8]. Diese extrem hohe Promiskuität des Enzyms für sowohl Substratsequenz als auch Ringtopologien ist selbst für RiPPs bemerkenswert. Am Beispiel von Prochlorosin 2.8 wurden 37 Core-Peptid-Varianten für die Prozessierung durch ProcM getestet [9]. Prochlorosin 2.8 ist 19 Aminosäuren lang und besitzt zwei benachbarte Lanthioninringe, die über eine Met-Pro-Pro-Linkerregion miteinander verknüpft sind (Abb. 3B). Die meisten der 37 Varianten wurden von ProcM umgesetzt (Abb. 3B, [9]). Alanin-Austausche von Resten in den Ringen und der Linkerregion werden gut toleriert, und der Einbau von mehreren starren Prolinresten in die Ringe ist bis zu einem bestimmten Punkt möglich. Änderungen in der Größe der Lanthioninringe werden ebenfalls zum Großteil toleriert. Durch den Austausch der ringformenden Cystein-/Serinreste des ersten Rings ist sogar ein Diastereomer zugänglich, was für den zweiten Ring nicht möglich ist.

Um zu testen, ob Prochlorosin 2.8 auch für *epitope grafting* verwendet werden kann, wurde die RGD-Sequenz an drei Positionen eingebracht. Eine dieser Varianten zeigte ebenfalls eine hohe Bindungsaffinität zu dem $\alpha\beta$ 3-Integrin (Abb. 2E, [9]).

Durch die Nutzung degenerierter Oligonukleotid-Primer konnte eine Bibliothek aus etwa 10^6 verschiedenen Prochlorosin-2.8-Varianten erzeugt werden [10]. Durch Screening dieser Bibliothek konnte ein Inhibitor der Protein-Protein-Interaktion zwischen dem HIV-p6-Protein und der UEV-Domäne des humanen Proteins TSG101 identifiziert werden [9]. Diese Wechselwirkung ist essenziell für die Knospung von HIV-Partikeln in infizierten Zellen.

Display-Techniken ermöglichen ein effizientes Screening von Lanthipeptid-Bibliotheken

Eine besonders spannende Entwicklung in der anwendungsorientierten RiPP-Forschung war zuletzt die Etablierung von Hefe- und

Phagen-Display-Techniken für Lanthipeptide [11, 12]. Durch die Nutzung solcher Display-Methoden lassen sich große, biologisch erzeugte Bibliotheken im Hochdurchsatz für Proteinbinder screenen. So konnten z. B. durch Hefe-Display einer Lacticin-481-Bibliothek potente Binder des $\alpha\beta$ 3-Integrins identifiziert werden (Abb. 2E, [11]). Durch Nutzung von Phagen-Display von Prochlorosin-Bibliotheken wurden spezifische Liganden für Streptavidin und das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Protein identifiziert [12].

Ausblick

Durch die Charakterisierung bekannter RiPP-Subfamilien und die Entdeckung neuer RiPPs entwickelt sich dieses Forschungsbereich kontinuierlich weiter und damit auch sein Potenzial für anwendungsbezogene Forschung. Es werden auch weiterhin interessante biologische Aktivitäten im Zusammenhang mit RiPPs entdeckt werden.

RiPPs können unabhängig von ihren intrinsischen Aktivitäten auch als Gerüst zur Entwicklung neuer Wirkstoffe dienen, wie durch den zuvor beschriebenen *epitope grafting*-Ansatz. Die Etablierung von Hefe- und Phagen-Display-Techniken für Lanthipeptide wird als Basis für die Entwicklung analoger Techniken für andere RiPPs dienen, wodurch zusätzliche Strukturmodule und chemische Modifikationen für die Erzeugung und das Hochdurchsatzscreening von Bibliotheken zugänglich werden. Neben Ansätzen für die medizinische Wirkstoffentwicklung können RiPP-Biosynthesemaschinen auch Anwendung in der Biotechnologie finden: Durch die Trennung der Vorläuferpeptidbereiche für die enzymatische Erkennung und Modifikation sowie die hohe Promiskuität der Enzyme gegenüber der Core-Peptidsequenz ist es vorstellbar, dass solche Enzyme zu allgemein verwendbaren Katalysatoren für die Peptidchemie weiterentwickelt werden könnten. ■

Literatur

- [1] Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G et al. (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 30:108–160
- [2] Craik DJ, Du J (2017) Cyclotides as drug design scaffolds. *Curr Opin Chem Biol* 38:8–16
- [3] Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X et al. (2015) Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. *Acc Chem Res* 48:1909–1919
- [4] Hegemann JD (2020) Factors governing the thermal stability of lasso peptides. *ChemBioChem* 21:7–18
- [5] Pavlova O, Mukhopadhyay J, Sineva E et al. (2008) Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J Biol Chem* 283:25589–25595
- [6] Hegemann JD, De Simone M, Zimmermann M et al. (2014) Rational improvement of the affinity and selectivity of integrin binding of grafted lasso peptides. *J Med Chem* 57:5829–5834
- [7] Repka LM, Chekan JR, Nair SK et al. (2017) Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Chem Rev* 117:5457–5520
- [8] Li B, Sher D, Kelly L et al. (2010) Catalytic promiscuity in the biosynthesis of cyclic peptide secondary metabolites in planktonic marine cyanobacteria. *107:10430–10435*
- [9] Hegemann JD, Bobeica SC, Walker MC et al. (2019) Assessing the flexibility of the prochlorosin 2.8 scaffold for bioengineering applications. *ACS Synth Biol* 8:1204–1214
- [10] Yang X, Lennard KR, He C et al. (2018) A lanthipeptide library used to identify a protein-protein interaction inhibitor. *Nat Chem Biol* 14:375–380
- [11] Hetrick KJ, Walker MC, van der Donk WA (2018) Development and application of yeast and phage display of diverse lanthipeptides. *ACS Cent Sci* 4:457–467
- [12] Urban JH, Moosmeier MA, Aumüller T et al. (2017) Phage display and selection of lanthipeptides on the carboxy-terminus of the gene-3 minor coat protein. *Nat Commun* 8:1500

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse

Dr. Julian Hegemann
Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
Institut für Chemie
Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 124/TC2
D-10623 Berlin
julian.hegemann@campus.tu-berlin.de

AUTOR



Julian Hegemann

2005–2011 Chemiestudium an der Universität Marburg; dort bis 2014 Promotion in der Gruppe von Prof. Dr. M. Marahiel und anschließend Postdoktorand bis 2016. Von 2016–2019 Postdoktorand an der University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, in der Gruppe von Prof. Dr. W. van der Donk. Seit 2019 Postdoktorand an der TU Berlin in der Gruppe von Prof. Dr. R. Süßmuth.