

Bericht zur Max-Buchner-Forschungsarbeit

„Biosynthetic engineering of fluorinated nonribosomal peptides“

(MBFSt-Kennziffer: 3811)

Hajo Kries, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (HKI Jena)

1. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Der Einbau von Fluoratomen wird in der medizinischen Chemie häufig als strategischer Ansatz zur Feinabstimmung der Eigenschaften von Arzneimitteln eingesetzt.¹ Er bietet das Potenzial, die Bindungsaffinität zu Proteintaschen zu erhöhen oder pharmakokinetische Parameter zu verbessern, wie der Erfolg von Arzneimitteln wie dem Makrolid-Antibiotikum Flurithromycin zeigt. In den letzten zwei Jahrzehnten haben zahlreiche fluorierte Arzneimittel den Weg von der klinischen Testung bis zur Marktreife geschafft, was die Bedeutung der Fluorierung in der Arzneimittelentwicklung unterstreicht. Der Einbau fluorierter Aminosäuren in nicht-ribosomale Peptide (NRP),² die eine ergiebige Quelle für verschiedene Arzneimittel und Antibiotika darstellen, beruhte in der Vergangenheit in erster Linie auf dem Füttern fluorierter Bausteine, wobei die inhärente Promiskuität der Biosynthesenzyme genutzt wird. NRPs werden von großen multimodularen Enzymen, den so genannten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), synthetisiert. Diese NRPS bestehen aus drei Kerndomänen: Adenylierungsdomänen (A-Domänen), die spezifisch Aminosäuren aktivieren, Thiolierungsdomänen (T-Domänen), die aktivierte Thioester-Zwischenprodukte tragen, und Kondensationsdomänen (C-Domänen), die die Bildung von Peptidbindungen zwischen benachbarten, an die T-Domäne gebundenen Thioestern katalysieren. Hier haben wir die Spezifität für fluorierte Aminosäuren bei dem NRPS Moduls GrsA untersucht, dem ersten Modul der Gramicidin S NRPS, um diese Analoga in Gramicidin S (GS) einzubauen.

2. Durchgeführter Arbeitsplan

- 1) Messung von Sättigungskinetiken für die Adenylierungsreaktion
- 2) Messung von Substratspektren mit Hilfe des Hydroxamatassays (HAMA)³ und Synthese der erforderlichen Hydroxamat-Standards (Kollaboration Prof. Vilotijevic, FSU Jena)
- 3) Bestimmung von Bindungsparametern mit Hilfe Isothermaler Titrationsmikrokalorimetrie
- 4) Testung der GrsA-Mutante W239S
- 5) Computermodellierung der Ligandenbindung (Kollaboration Prof. Keller, FU Berlin)

6) Produktion von fluoriertem Gramicidin S *in vitro* und *in vivo*

3. Ergebnisse

Wir hatten eingangs erwartet, dass ein oder zwei Fluorsubstituenten von der Biosynthesemaschinerie gut toleriert würden. Mit *E. coli* HM0079 als Produktionsplattform wollten wir fluoridierte Varianten des zyklischen Dekapeptids GS herstellen. Die Zugabe von 4-F-Phe oder 2,4-F₂-Phe beeinträchtigte das Wachstum der GS-produzierenden *E. coli*-Kulturen nicht. Die erwarteten Produkte waren jedoch mit LC-MS/MS nicht nachweisbar. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die A-Domäne des Moduls GrsA, das normalerweise Phe einbaut, die fluoridierten Aminosäuren ablehnt. Um die Ablehnung fluoridierter Aminosäuren durch GrsA zu erklären, haben wir die Adenylierungsspezifität dieses NRPS-Moduls untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine höhere Präferenz von GrsA für Phe im Vergleich zu 2,4-F₂-Phe und 4-F-Phe. Die geringe Fluorselektivität von GrsA wurde mit anderen NRPS-Modulen verglichen, wobei ähnliche Trends beobachtet wurden.

Um die Selektivität von GrsA unter Wettbewerbsbedingungen mit fluoridierten Aminosäuren zu testen, verwendeten wir einen Multiplex-Hydroxamat-Assay (HAMA). HAMA zeigte eine starke Präferenz von GrsA für Phe gegenüber fluoridiertem Phe. Um die Ursachen für die hohen K_M -Werte bei den fluoridierten Substraten zu verstehen, führten wir Bindungsstudien mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) durch. Die Ergebnisse zeigten eine schwächere Bindung der fluoridierten Substrate an GrsA im Vergleich zu Phe. Dieser Effekt erklärt den Anstieg der K_M -Werte. Die starke Diskriminierung gegen fluoridierte Phe-Derivate durch GrsA legte nahe, dass durch Mutagenese möglicherweise eine Umkehrung dieser Präferenz erreicht werden könnte, um die Biosynthese von fluoridierten Peptiden zu ermöglichen. Durch eine aus früheren Arbeiten bekannte Trp239Ser Mutation,⁴ konnten wir tatsächlich die Toleranz für den Fluorsubstituenten erhöhen. Mit Sättigungskinetiken und HAMA wurde die erhöhte Spezifität der Mutante bestätigt.

Die Auswirkung eines Fluorsubstituenten auf die Substratbindung an GrsA und GrsA-W239S wurde mithilfe von Computersimulationen untersucht. Es wurde festgestellt, dass der Fluorsubstituent eine T-förmige aromatische Wechselwirkung zwischen dem Substrat und Trp239 stört, was zu einer geringeren Bindung der fluoridierten Substrate führt. Die Mutation W239S schafft einen Hohlraum, der bei GrsA-W239S die Bindung von F-Phe verbessert. Die wässrige Umgebung kann den Fluorsubstituenten besser aufnehmen als die hydrophobe Tasche in GrsA. Allerdings füllt der Fluorsubstituent die vergrößerte GrsA-W239S-Bindungstasche weniger effizient aus als das zuvor getestete O-Propargyl-Tyr.

Um die Selektivität von GrsA für die Biosynthese von fluoridierten GS-Analoga zu nutzen, wurde ein *in vitro*-System verwendet, das die Konkurrenz mit Phe ausschließt. Unter kompetitiven Bedingungen zeigte der Wildtyp GrsA eine geringe Aufnahme von fluoridiertem Substrat in GS, während die Mutante GrsA-W239S eine deutlich höhere Aufnahme ermöglichte. Eine ähnliche Präferenz wurde auch für die Inkorporation von 2,4-F₂-Phe beobachtet. Wir haben die Bedingungen für die Produktion von fluoridiertem

GS *in vivo* erneut versucht, nachdem die ersten Versuche keinen nachweisbaren Fluoreinbau zeigten. Um die Wirksamkeit der Mutation W239S für den Einbau von fluorierten Phe-Analoga *in vivo* zu testen, wurde das mutierte Plasmid pSU18-GrsTAB-W239S kloniert. Wenn die fluorierten Aminosäuren zu Kulturen von *E. coli* HM0079 mit diesem Plasmid hinzugefügt wurden, wurde tatsächlich die Produktion von 4-F-GS bzw. 2,4-F₂-GS durch LC-MS/MS-Analyse beobachtet.

4. Fazit

Wir waren dabei erfolgreich, fluorierte Analoga des antimikrobiellen zyklischen Dekapeptids Gramicidin S (GS) biosynthetisch herzustellen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die A-Domäne des NRPS-Moduls GrsA fluorierte Aminosäuren aufgrund einer durch das Fluoratom unterbrochenen T-förmigen aromatischen Interaktion in der Bindungstasche zunächst ablehnt. Die GrsA-Mutante W239S umgeht jedoch dieses Problem und hat den Einbau von fluoriertem Phe in GS sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ermöglicht. Unsere Ergebnisse liefern spannende Einblicke in das Verhalten von NRPS gegenüber fluorierten Aminosäuren und Strategien für die Biosynthese von fluorierten Peptiden. Die bisherigen Ergebnisse wurden als Manuskript bei RSC Chemical Biology eingereicht.

5. Literatur

- (1) Müller, K.; Faeh, C.; Diederich, F. Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition. *Science* **2007**, *317* (5846), 1881–1886. <https://doi.org/10.1126/science.1131943>.
- (2) Süßmuth, R. D.; Mainz, A. Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56* (14), 3770–3821. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>.
- (3) Stanišić, A.; Hüsken, A.; Kries, H. HAMA: A Multiplexed LC-MS/MS Assay for Specificity Profiling of Adenylate-Forming Enzymes. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (44), 10395–10399. <https://doi.org/10.1039/C9SC04222A>.
- (4) Kries, H.; Wachtel, R.; Pabst, A.; Wanner, B.; Niquille, D.; Hilvert, D. Reprogramming Nonribosomal Peptide Synthetases for “Clickable” Amino Acids. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, *53* (38), 10105–10108. <https://doi.org/10.1002/anie.201405281>.