Biosintesi non ribosomiale di metaboliti peptidici bioattivi

Principali bersagli degli antibiotici

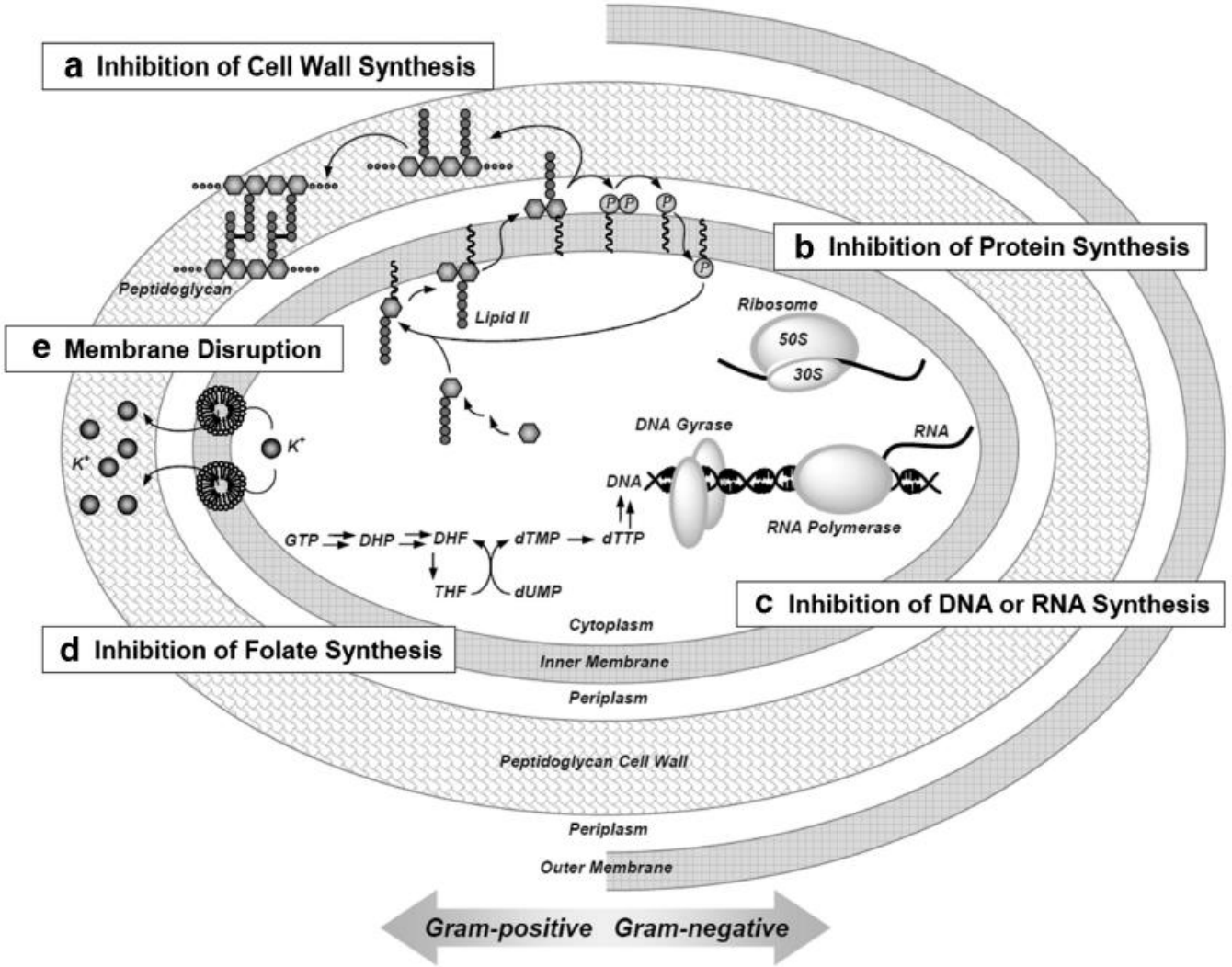


Figure 5 The five major clinically validated antibacterial targets/pathways. (**a**) Inhibition of cell wall biosynthesis. (**b**) Inhibition of protein synthesis. (**c**) Inhibition of DNA or RNA synthesis. (**d**) Inhibition of folate biosynthesis. (**e**) Disruption of membrane integrity. Modified from the cover of Walsh.[1]

Gli antibiotici derivano per la maggior parte da composti naturali

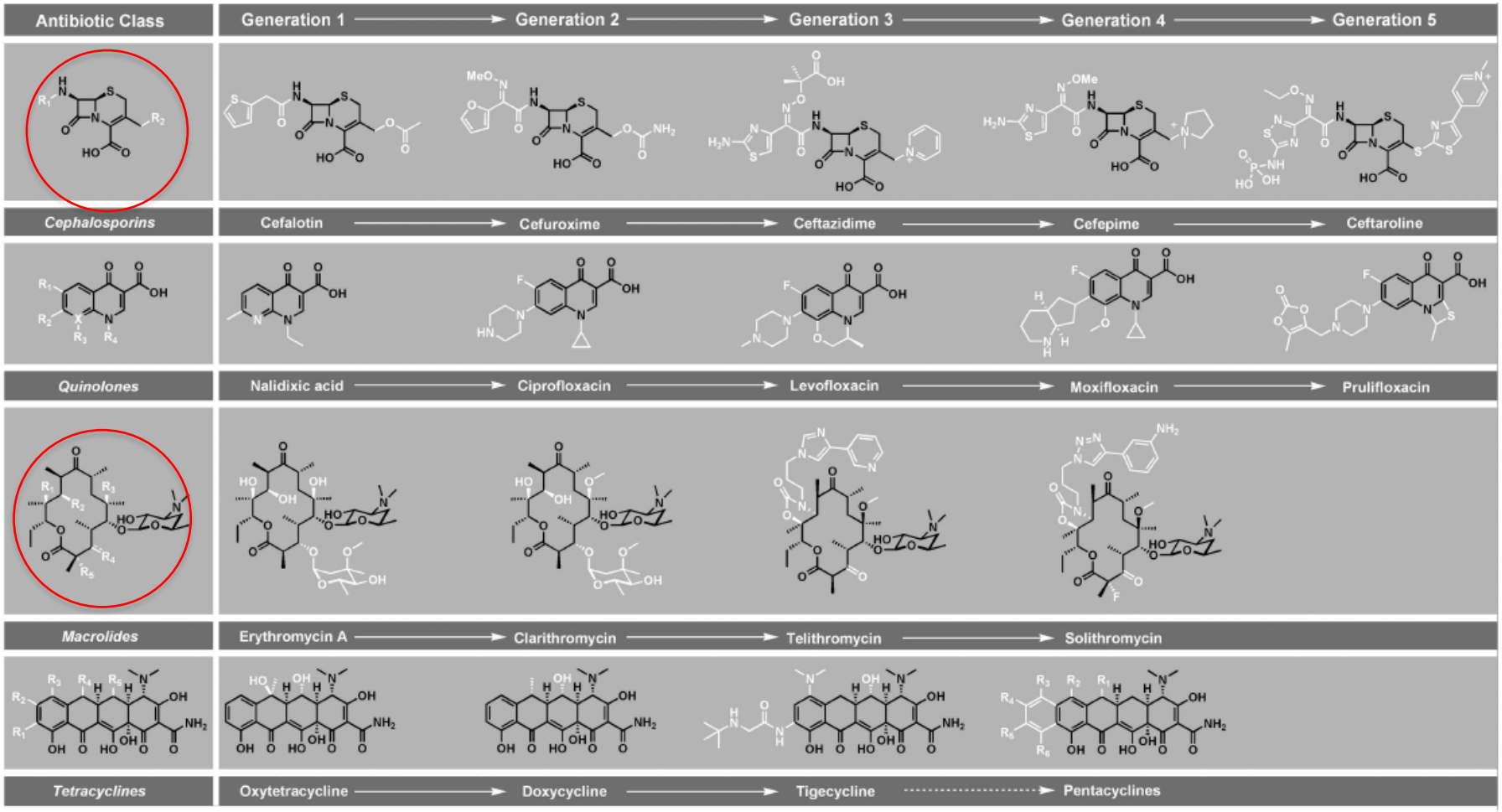
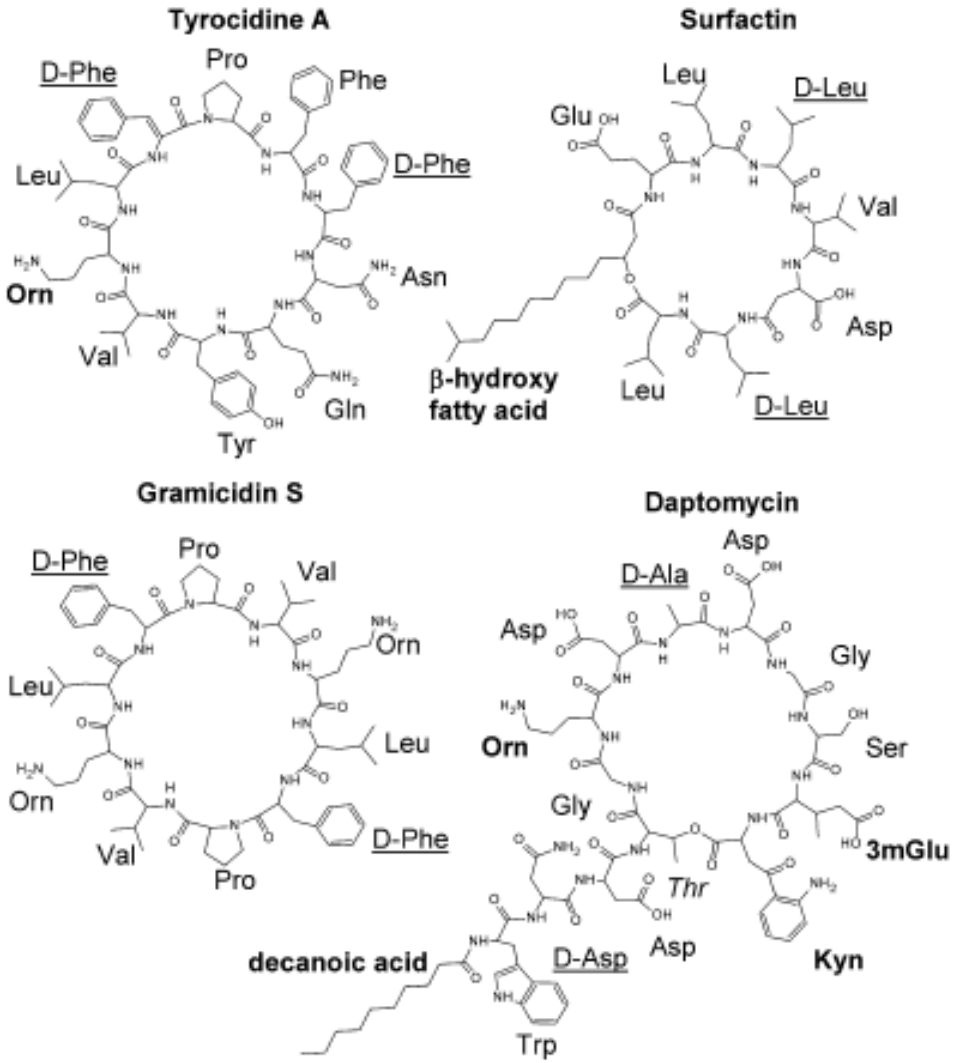


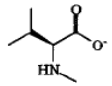
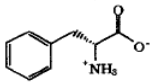
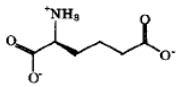
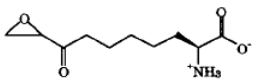
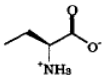
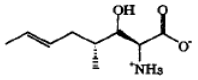
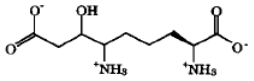
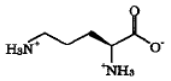
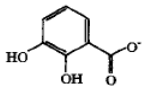
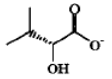
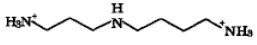
Figure 3 Synthetic tailoring of antibiotic core structures leading to successive generations of antibiotic classes has been the mainstay of antibiotic drug development for the past 50 years. New antibiotic core scaffolds are desperately needed. Core scaffolds are shown in black and peripheral chemical derivatizations are shown in white. The quinolone/fluoroquinolone scaffolds are of synthetic origin, while all other scaffolds are natural products or their semisynthetic derivatives.

Strutture di alcuni peptidi bioattivi prodotti da batteri e funghi



Molti peptidi bioattivi contengono amminoacidi non 'standard'

Table 1. Nonproteinogenic Constituents of Peptide Antibiotics (Examples for Some Unusual Moieties)

Name	Structure	Abbreviation	System(s)	Organism(s)
modified, proteinogenic amino acids				
N-methyl aa (e.g. *N*-methyl valine)		MeVal	cyclosporin enniatin	*Tolypocladium niveum* *Fusarium scirpi*
D-aa (e.g. D-phenylalanine)		D-Phe	e.g. bacitracin gramicidin S tyrocidine	*Bacillus licheniformis* *Bacillus brevis* *Bacillus brevis*
non-proteinogenic amino acids				
δ-(L-α-amino adipic acid)		Aad	ACV-tripeptide (precursor of penicillin and cephalosporin)	*Penicillium chrysogenum* *Aspergillus nidulans* *Streptomyces clavuligerus*
2-amino-9,10-epoxy-8-oxodecanoic acid		Aeo	HC-toxin	*Cochliobolus carbonum*
L-α-amino butyric acid		Abu	cyclosporin	*Tolypocladium niveum*
(4R)-4[(E)-2-butenyl-4-methyl-L-threonine]		Bmt	cyclosporin	*Tolypocladium niveum*
2,6-diamino-7-hydroxy-azealic acid		Dha	edeine	*Bacillus brevis*
ornithine		Orn	e.g. bacitracin gramicidin S tyrocidine	*Bacillus licheniformis* *Bacillus brevis* *Bacillus brevis*
carboxy acids				
2,3-dihydroxy benzoic acid		Dhb	enterobactin	*Escherichia coli*
D-α-hydroxyisovaleric acid		Hiv	enniatin B	*Fusarium scirpi*
amines				
spermidine		Sperm	edeine	*Bacillus brevis*

Come vengono prodotti questi peptidi?

- Hanno strutture complesse (spesso cicliche) e contengono amminoacidi modificati o che non si trovano nelle proteine.
- La sintesi richiede ATP, ma procede anche in assenza di acidi nucleici (DNA/RNA) o in presenza di inibitori della sintesi proteica.

Meccanismo di sintesi non ribosomiale catalizzato da grandi enzimi multifunzionali: le sintetasi peptidiche (NRPS: non-ribosomal peptide synthetases)

Approcci concettuali e metodologici per lo studio di un metabolita secondario

- Quali sono i precursori biosintetici del metabolita?
- Quale è la sequenza delle reazioni coinvolte nella formazione del metabolita e quali sono gli intermedi biosintetici?
- Quali enzimi sono coinvolti nella formazione del metabolita e quale è il loro meccanismo di azione?
- Quali sono i geni importanti per la produzione del metabolita e quale è il loro ruolo?

Proteina ⇨ Gene
Gene ⇨ Proteina

- Somministrazione dei possibili precursori marcati (p.es. con isotopi radioattivi) alle colture in crescita o a sistemi 'cell-free', isolamento del metabolita e localizzazione della marcatura
- Produzione di mutanti 'bloccati' che accumulano l'intermedio.
- Si produce l'intermedio marcato e si misura la sua incorporazione nel metabolita (da parte del ceppo selvatico o in sistemi 'cell-free')
- Purificazione degli enzimi e saggi di attività
- Caratterizzazione strutturale e funzionale degli enzimi
- Identificazione dei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nella biosintesi del metabolita
- Clonaggio ed espressione delle proteine coinvolte nella biosintesi del metabolita
- Regolazione?

Sintetasi peptidiche (NRPS)

- Le NRPS sono complessi multienzimatici di grandi dimensioni
- Le NRPS hanno una struttura ripetitiva
- I geni coinvolti nella sintesi del peptide sono organizzati in cluster
- Il meccanismo d'azione richiede gruppi SH e ATP
- Informazioni ottenute sulla proteina unite all'identificazione dei geni che codificano per le NRPS hanno permesso di comprenderne il meccanismo d'azione

Organizzazione genica delle sintetasi peptidiche

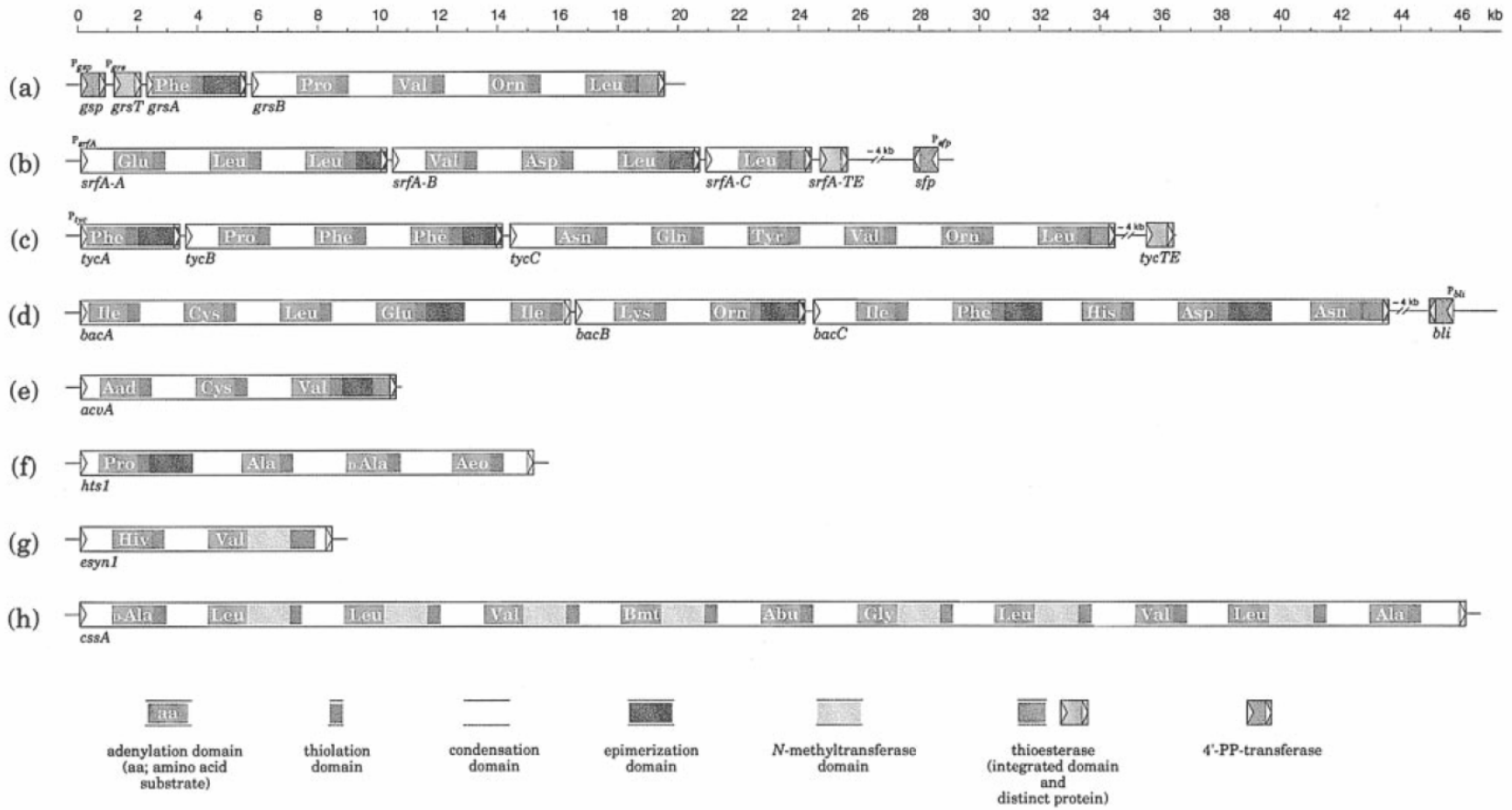
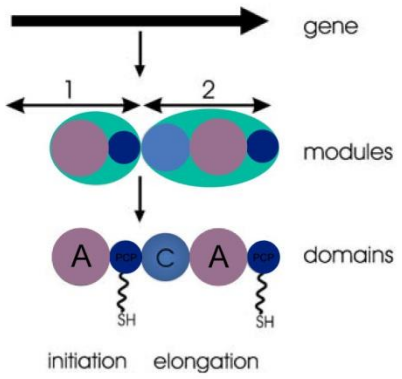


Figure 3. Schematic diagram showing the modular organization of peptide synthetases encoded by the bacterial operons *grs* (gramicidin S; row a), *srfA* (surfactin; row b), *tyc* (tyrocidine; row c) and *bac* (bacitracin; row d) as well as the fungal genes *acvA* (δ-(L-α-aminoadipyl)-L-Cys-D-Val; row e), *hts1* (HC-toxin; row f), *esyn1* (enniatin; row g) and *cssA* (cyclosporin A; row h). Red boxes indicate the amino acid adenylation domains, and green strips show the location of the thiolation domain, the site of cofactor 4′-PP-binding. Modules associated with the activation and incorporation of D-amino acids (GrsA, TycA, SrfA-A-Leu, SrfA-B-Leu, TycB-Phe, BacA-Glu, BacB-Orn, BacC-Phe and BacC-Asp, AcvA-Val, and Hts1-Pro) have an epimerization domain (blue regions) located downstream of the thiolation domain. The first module of the *cssA* gene (D-Ala) and the third one in the *hts1* gene (D-Ala) have no epimerization modules; however, it incorporates D isomers that are supplied by external racemases. A fourth type of domain (yellow regions) is only found in peptide synthetases of fungal origin (*esyn1* and *cssA*) that are associated with the activation and incorporation of *N*-methylated amino acids. These putative *N*-methyltransferases have a cosubstrate SAM-binding site and are inserted between the adenylation and the thiolation domains. The intermodular regions shown as white boxes represent putative elongation domains. Also shown is the location of gene-(fragment)s encoding the thioesterase-like proteins (pale pink) and thioesterase-like domains (pink) found associated with terminal modules in bacterial operons (*grs*, *srfA*, *tyc*, and *bac*). Genes that encode the 4′-PP transferase, located outside the operons *grs*, *srfA*, and *bac*, are also displayed (gray regions).

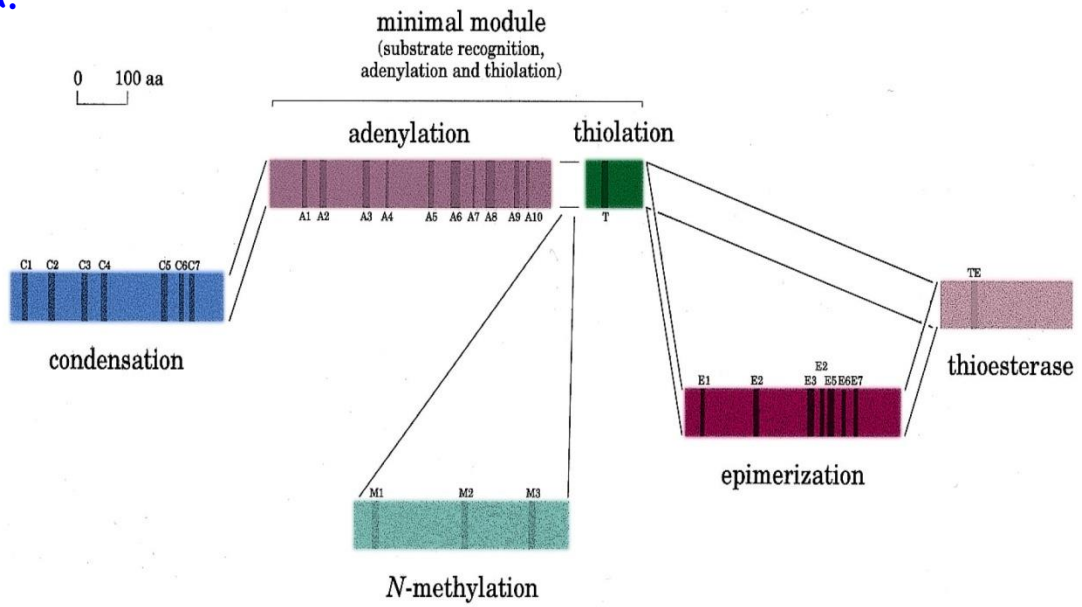
Organizzazione modulare delle sintetasi peptidiche

La sequenza amminoacidica del metabolita è determinata dalla successione dei moduli nella struttura dell'enzima, a sua volta dettata dalla sequenza genica che codifica per i singoli moduli. Esiste quindi una colinearità tra il prodotto del gene e quello dell'enzima.

Ogni modulo è organizzato in domini e catalizza l'inserimento di un singolo amminoacido nel prodotto







Analogie tra biosintesi ribosomiale e non ribosomiale

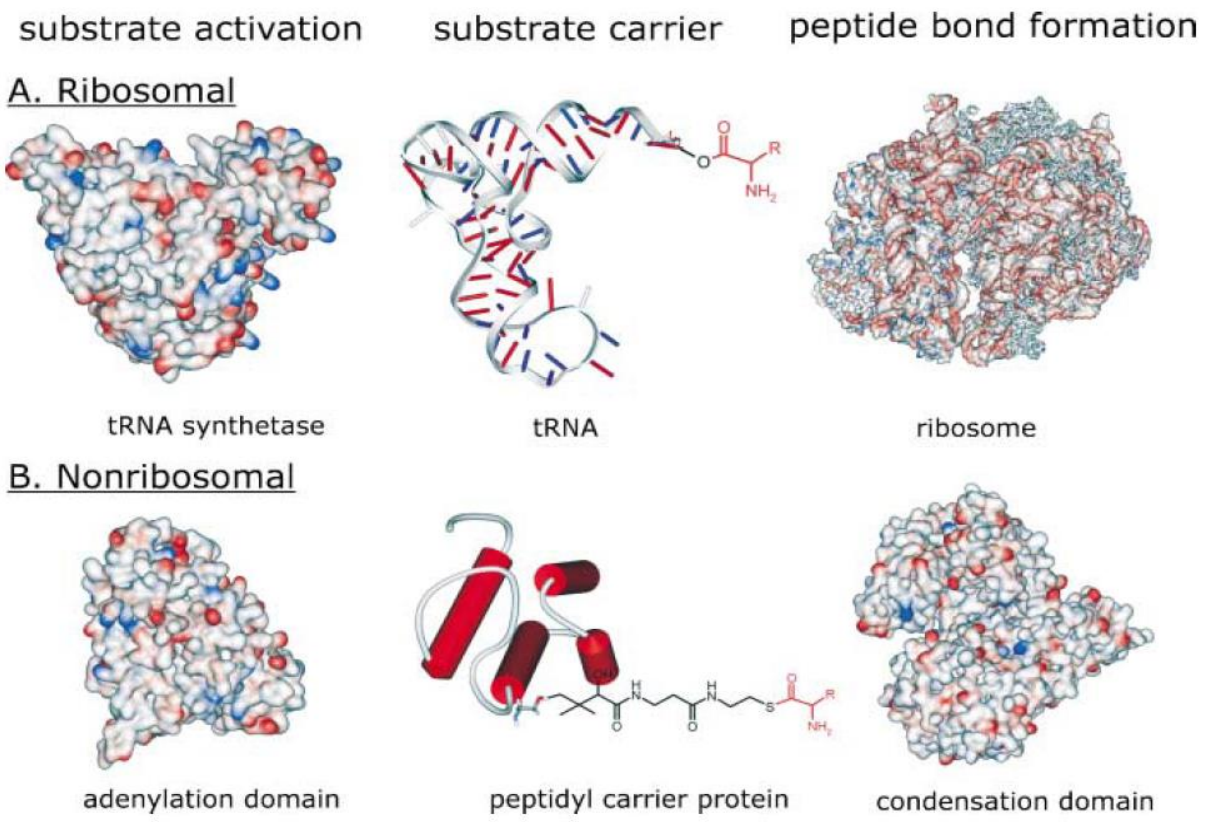
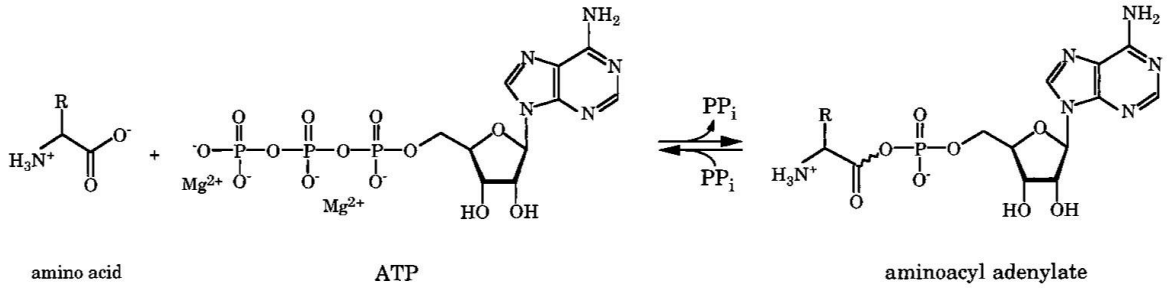


Figure 1 (*A*) Enzymes of the ribosomal machinery for the production of peptides and proteins. t-RNA synthetases activate amino acids as acyl adenylate and load it onto the t-RNA, which is subsequently directed to the ribosome for peptide bond formation with an amino acid tethered to a second t-RNA. (*B*) The basic enzymes of the nonribosomal system. The A-domain, although structurally unrelated to the t-RNA synthetase, activates amino acids as acyl adenylate. The activated amino acid is transferred to the cofactor of the PCP, and the C-domain forms peptide bonds between amino acids loaded onto two different PCPs.

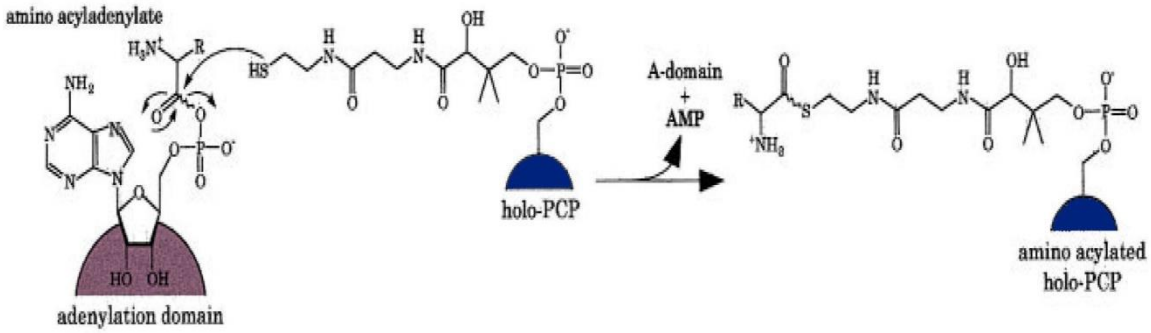
Dominio di adenilazione (*A*)

Il dominio di adenilazione è formato da circa 550 amminoacidi ed è deputato al riconoscimento ed all'attivazione dell'amminoacido in una reazione di amminoacil-adenilazione con idrolisi dell'ATP e formazione di un amminoacil-AMP.



Dominio di tiolazione (PCP)

Il dominio di tiolazione (T) o peptidyl carrier protein (PCP) è formato da circa 100 amminoacidi e trasporta l'amminoacido legando covalentemente l'amminoacil-AMP alla 4'-fosfopanteteina (4'-PP) attraverso la formazione di un legame tioestere e la liberazione di AMP.



Il dominio di tiolazione deve essere attivato dalle fosfopanteteinil-trasferasi che utilizzano il Coenzima A come donatore di 4'-PP e catalizzano l'attacco del cofattore su un residuo di serina conservato.

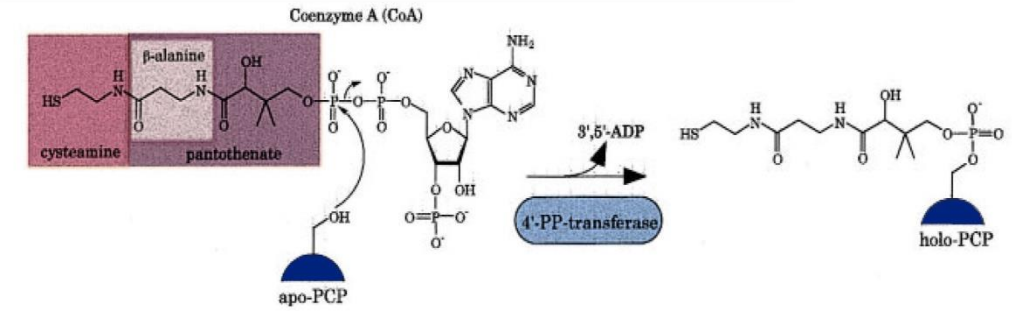


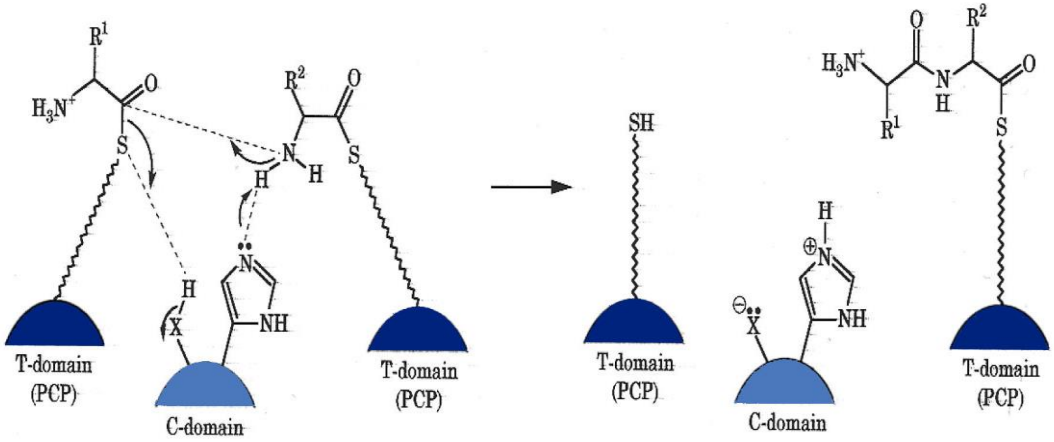
Table 4. Enzyme Superfamily of Acyl/Peptidyl Carrier Proteins (ACPs/PCPs): Sequence Alignment around the Highly Conserved Cofactor 4'-PP Binding Site

Enzyme	Organism	Position (aa)	Sequence #
A) Peptide synthetases			
TycA	*Bacillus brevis*	553	D N F Y S L G G H **S** I Q A I Q V
GrsB	*Bacillus brevis*	2033	D N F F E L G G H **S** L R A M T M
SrfA-B	*Bacillus subtilis*	990	D N F F M I G G H **S** L K A M M M
AcvA	*Penicillium chrysogenum*	3049	D D L F K L G G D **S** I T S L H L
Hts1	*Cochliobolus carbonum*	2405	S D F F S S G G N **S** M A A I A L
CssA	*Tolypocladium niveum*	13645	D N F F E L G G H **S** L L A T K L
B) Acyl carrier proteins			
Polyketide synthases			
Act-ACP	*Streptomyces coelicolor*	33	L R F E D I G Y D **S** L A L M E T
Gra-ACP	*Streptomyces violaceoruber*	33	I T F E E L G Y D **S** L A L M E S
Fatty acid synthases			
FAS-ACP	*Escherichia coli*	28	S F V E D L G A D **S** L D T V E L
FAS-ACP	*Saccharomyces cervisiae*	73	Q F H K D L G L D **S** L D T V E L
		consensus	L G x(HD)S L

Sequence data are derived from: TycA [54], GrsB [32], SrfA-B [33]; AcvA [29], CssA [35], Hts [36], Act-ACP [104], Gra-ACP [105], FAS-ACP from *E. coli* [103], FAS-ACP from yeast [102].

Dominio di condensazione (C)

Il dominio di condensazione è costituito da circa 450 amminoacidi, è localizzato a monte del dominio di adenilazione e catalizza la formazione del legame peptidico tra gli amminoacidi legati a due domini di tiolazione adiacenti.



Meccanismo tio-templato delle NRPS

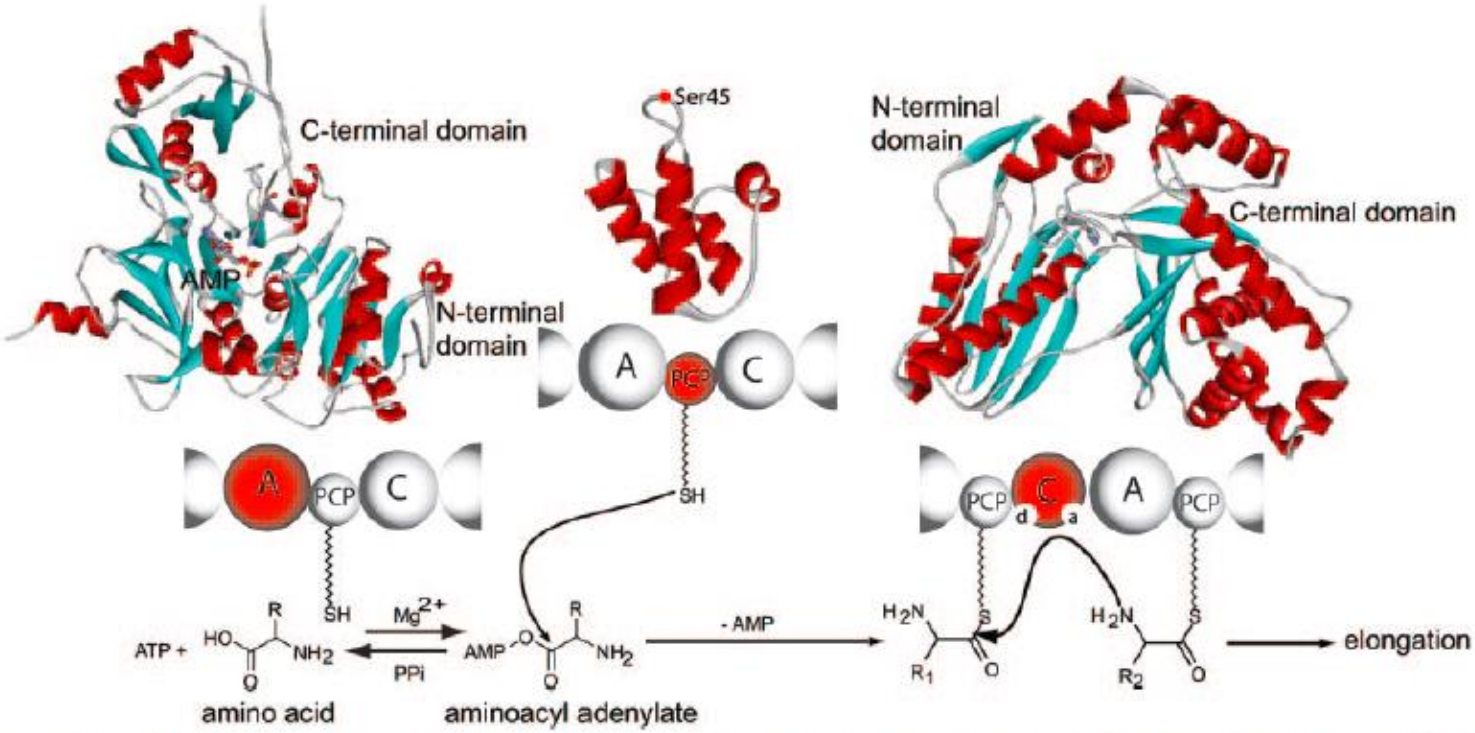
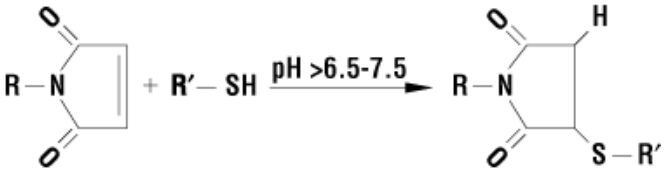


FIG. 4. Chemical principles of nonribosomal peptide synthesis. Domains in action are indicated in red and the respective crystal structures are shown above. First, the A-domain specifically recognizes a dedicated amino acid and catalyzes formation of the aminoacyl adenylate under consumption of ATP. Second, the activated aminoacyl adenylate is tethered to the free thiol group of the PCP-bound phosphopantetheine (ppan) cofactor. Third, the C-domain catalyzes peptide elongation. Here, the nucleophilic amine of the acceptor substrate nucleophilically attacks the electrophilic thioester of the donor substrate (a, acceptor site; d, donor site). The crystal structure of the A-domain is derived from the Phe-activating A-domain (PheA) of the first module of gramicidin S synthetase of *B. brevis* (22). The NMR-structure of the PCP is derived from the third module of the *B. brevis* tyrocidine synthetase (141), and the C-domain is derived from the crystal structure of VibH, a stand alone C-domain of the *V. cholerea* vibriobactin synthetase (60).

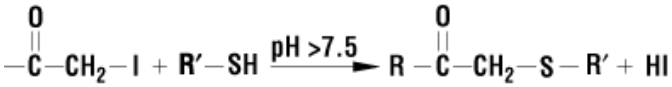
Meccanismo tio-templato delle NRPS

Evidenze sperimentali a favore del meccanismo tio-templato:

- Reagenti che bloccano –SH sono inibitori
  - Maleimidi



  - Alogenuri alchilici



- Nelle NRPS è presente 4'-phosphopantetheine
- Le proprietà chimiche dell'intermedio covalente sono attribuibili a un tioestere

Come è stato dimostrato il meccanismo tio-templato delle NRPS?

Sono stati proposti due meccanismi alternativi:

- Un singolo braccio di 4'-fosfopanteteina che si sposta tra i singoli moduli
- Bracci di 4'-fosfopanteteina multipli, uno per ogni modulo

Come è stato dimostrato il meccanismo tio-templato delle NRPS?

Identificazione del sito di legame covalente dell'amminoacido.

È necessario purificare l'enzima.

È necessario un saggio di attività enzimatica per identificare le frazioni che contengono l'attività enzimatica di interesse.

Saggi di attività enzimatica delle sintetasi peptidiche

Attivazione degli amminoacidi

amminoacido + ATP ↔ amminoacido-AMP + $^{32}PP_i$

Il saggio è basato sullo scambio ATP-$^{32}PP_i$: si segue la formazione di ATP marcato con ^{32}P in presenza dell'enzima e di amminoacidi che esso riconosce come substrati.

L'enzima viene incubato con i substrati e successivamente viene aggiunto $^{32}PP_i$ in eccesso. L'ATP che si forma viene separato dalla miscela di reazione mediante adsorbimento su carbone attivo e quindi viene dosata la radioattività.

Saggi di attività enzimatica delle sintetasi peptidiche

Formazione del metabolita peptidico
Legame covalente dell'amminoacido all'enzima

Vengono forniti gli amminoacidi precursori di cui almeno uno è marcato radioattivamente (^{14}C oppure ^{3}H) e si misura la radioattività incorporata nel peptide formato.

Il peptide viene separato dalla miscela di reazione mediante precipitazione con acido tricloroacetico (TCA). Il TCA è un precipitante delle proteine e di peptidi, quindi la radioattività associata ad amminoacidi liberi (non incorporati) non verrà precipitata.

Come si misura la radioattività?

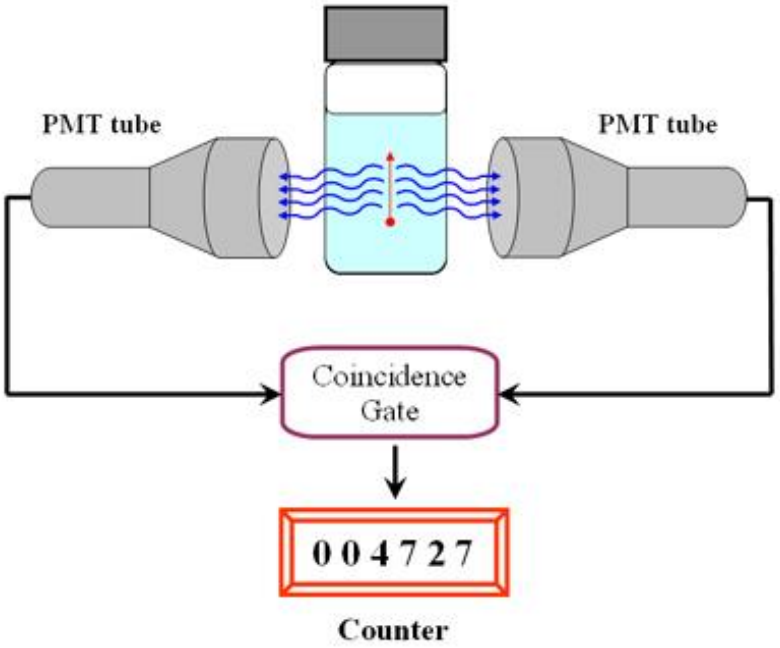
Tabella 5.5 Principali vantaggi e svantaggi degli emettitori β più comunemente usati

Isotopo	Vantaggi	Svantaggi
^{3}H	Sicurezza Possibilità di avere una attività specifica elevata Ampia scelta di posizioni nei composti organici Risoluzione molto elevata nell'autoradiografia	Bassa efficienza di rilevazione Scambio isotopico con l'ambiente Effetto isotopico
^{14}C	Sicurezza Ampia scelta di atomi sostituiti nei composti organici Buona risoluzione nell'autoradiografia	Bassa attività specifica
^{35}S	Alta attività specifica Buona risoluzione nell'autoradiografia	Tempo di dimezzamento corto Tempo di dimezzamento biologico relativamente lungo
^{32}P	Facilità di rivelazione Alta attività specifica Tempo di dimezzamento breve che semplifica l'eliminazione degli scarti Conteggio Cerenkov	Tempo di dimezzamento breve che alza i costi e rende complessi i protocolli sperimentali Pericoloso per le radiazioni esterne Bassa risoluzione nell'autoradiografia

Tratto da R.J. Slater, *Radioisotopes in Biology. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford

Come si misura la radioattività?

Nei contatori a scintillazione liquida il campione contenente radioisotopi β emittenti viene posto in liquido di scintillazione (una miscela di solvente e molecole che vengono eccitate dagli elettroni emessi dal radioisotopo). Viene misurata (contata) l'emissione di luce da parte dello scintillatore, che sarà proporzionale alla concentrazione di radioisotopo.



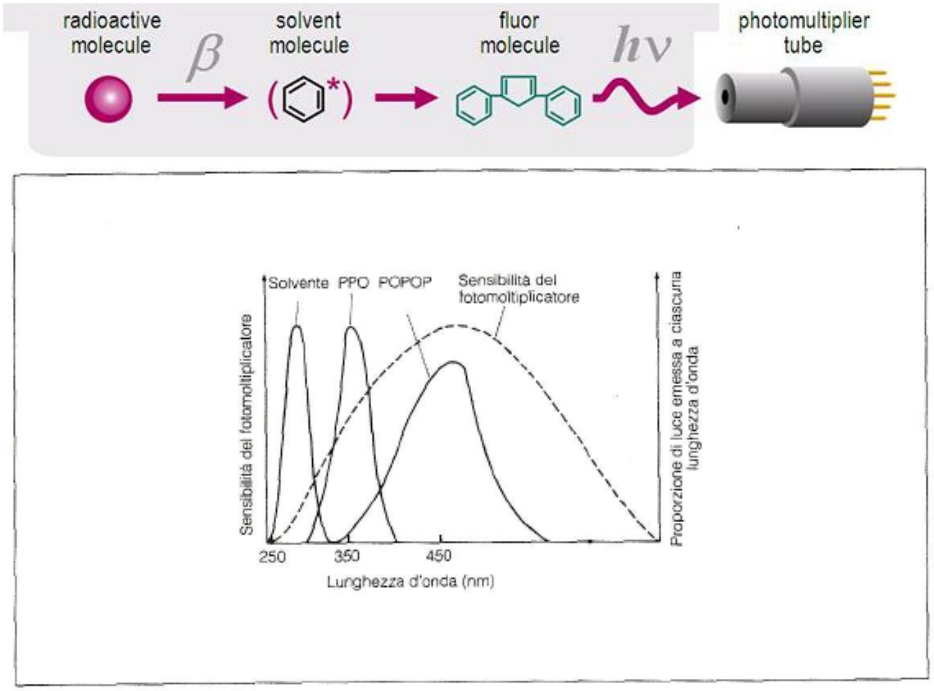
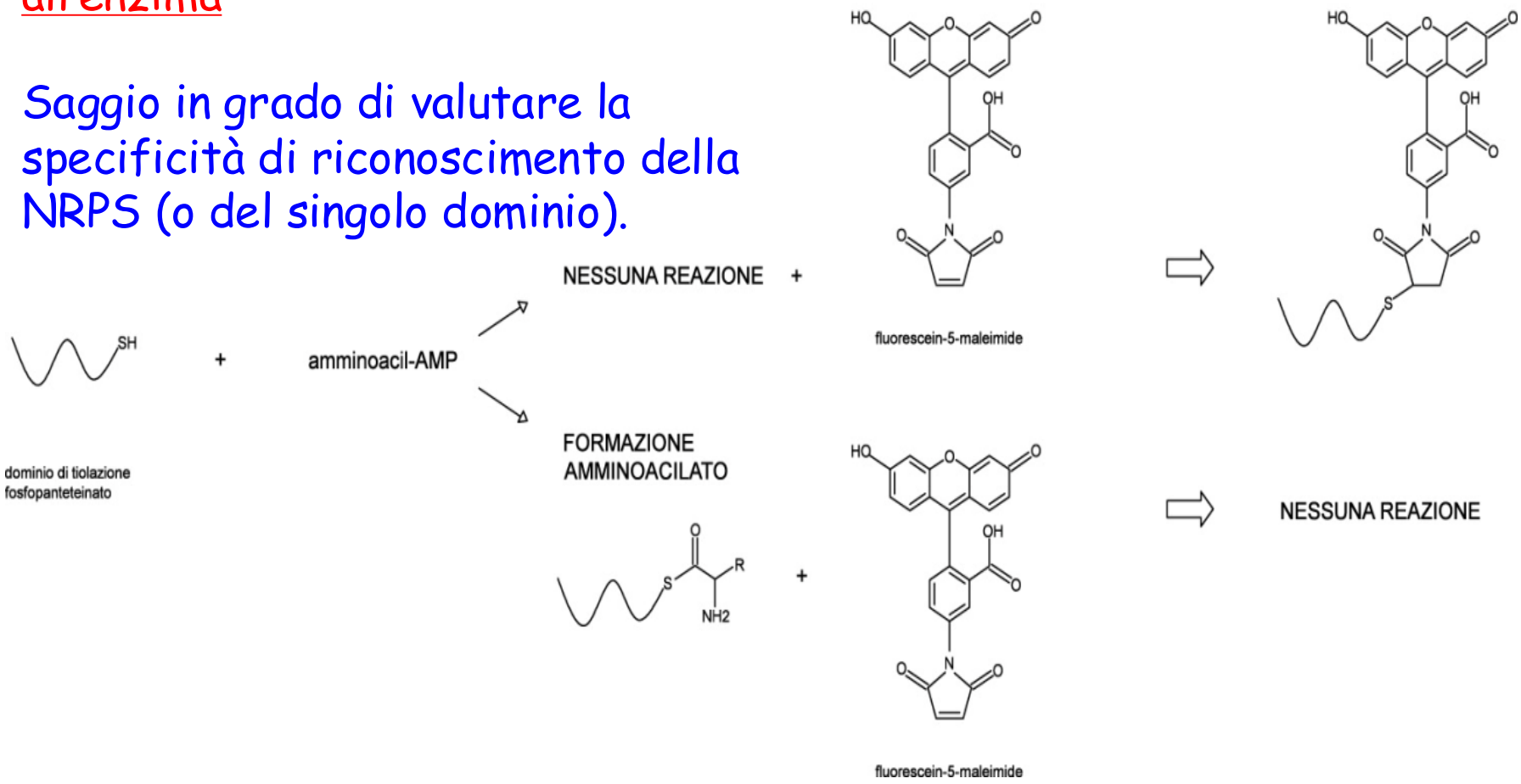


Figura 5.7 Spettri di emissione di alcuni scintillatori e sensibilità dei fotomoltiplicatori.

Saggi di attività enzimatica delle sintetasi peptidiche

Legame covalente dell'amminoacido all'enzima

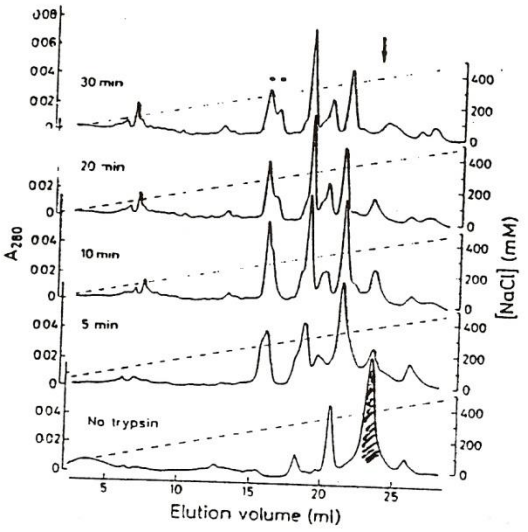
Saggio in grado di valutare la specificità di riconoscimento della NRPS (o del singolo dominio).



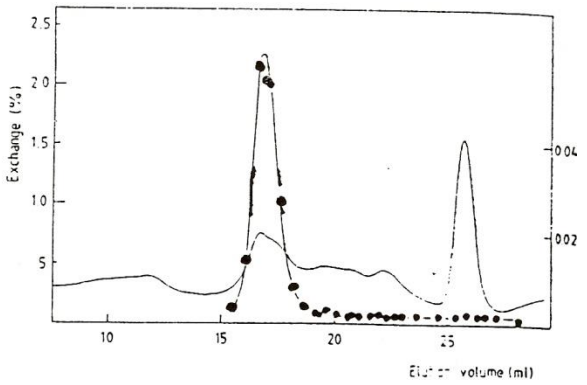
Come è stato dimostrato il meccanismo tio-templato delle NRPS?

Identificazione del sito di legame covalente dell'amminoacido.

Le NRPS sono enzimi di grandi dimensioni quindi è necessario frammentarle mediante proteolisi limitata in condizioni native per ottenere i singoli moduli o domini che possono essere separati per cromatografia e ulteriormente caratterizzati.



Proteolisi limitata della Grs2 con tripsina per isolare il dominio che lega prolina. Cromatografia a scambio ionico

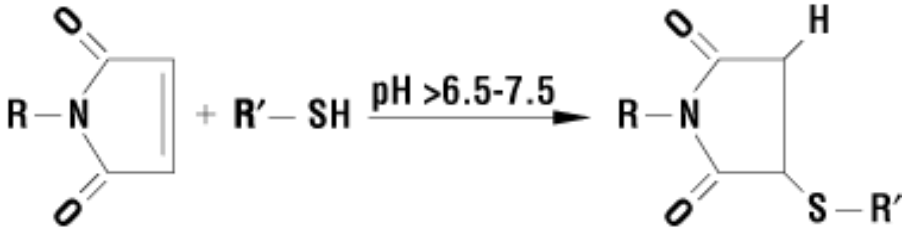


Gel-filtrazione su Superose
•-• attività di scambio ATP/PP_i prolina-dipendente

Identificazione del sito di legame covalente dell'amminoacido:

marcatura per affinità del sito di legame per la valina sulla gramicidina S sintetasi 2

- Protezione del gruppo –SH del sito attivo con valina
- Blocco di tutti gli altri gruppi -SH con N-etil-maleimide (NEM)
- Gel-filtrazione per rimuovere NEM in eccesso
- Riduzione con ditiotreitolo (DTT) e gel-filtrazione per rimuovere la valina
- Marcatura del sito attivo con [^{3}H] NEM



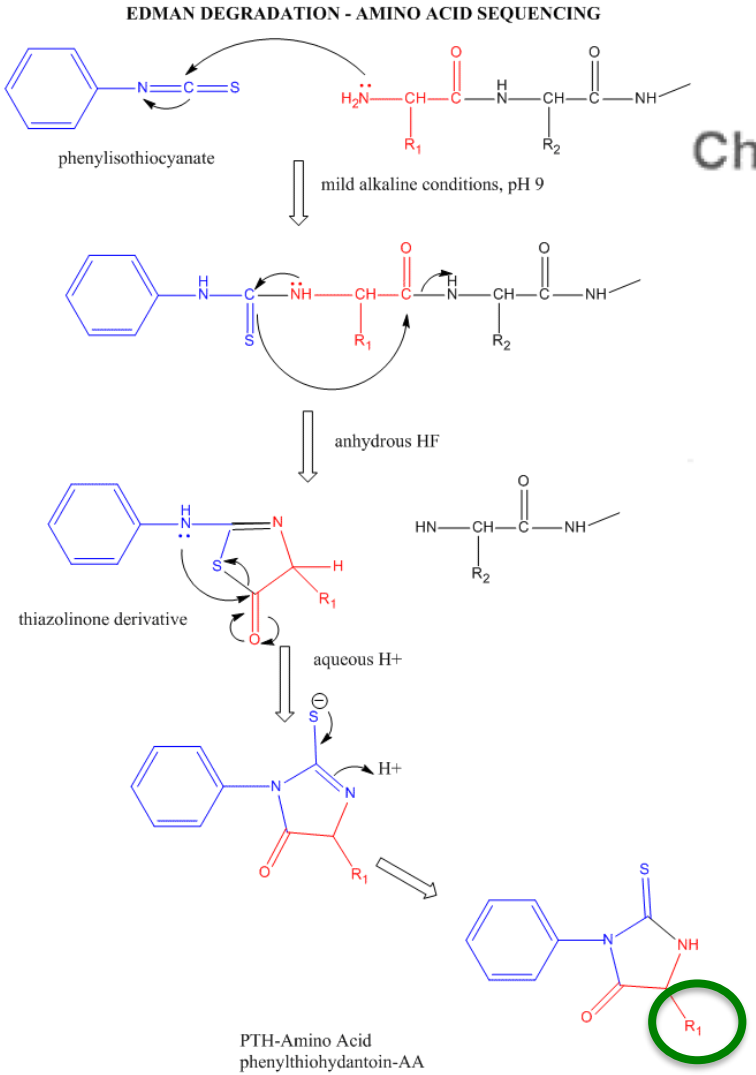
Identificazione del sito di legame covalente dell'amminoacido:

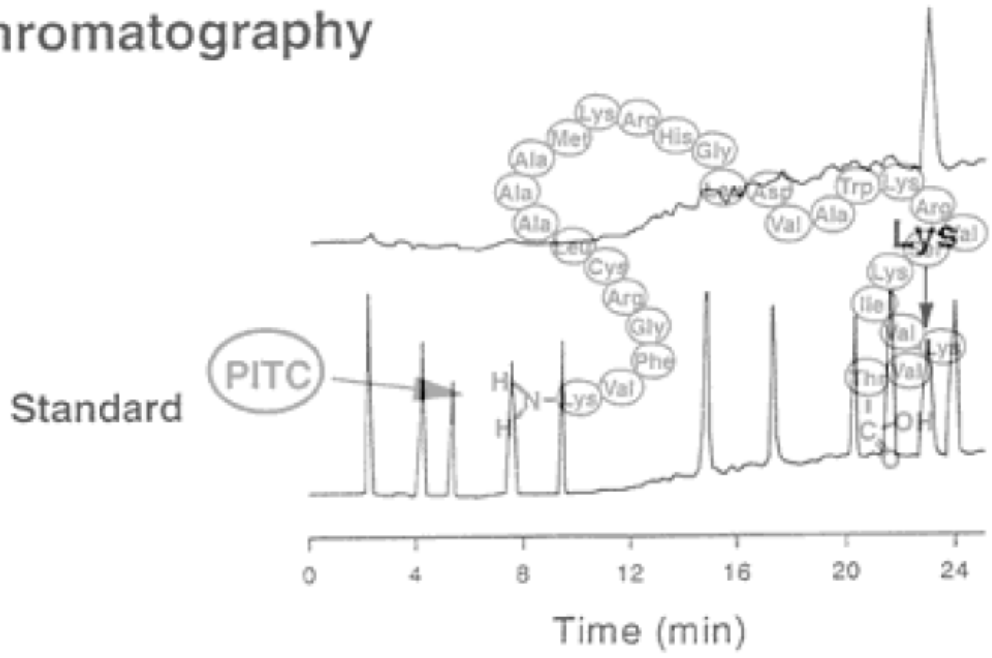
marcatura per affinità del sito di legame per la valina sulla gramicidina S sintetasi 2

- Digestione con tripsina per ottenere frammenti proteici da analizzare

- Purificazione mediante cromatografia del peptide marcato con [^{3}H] e sequenziamento mediante degradazione di Edman

Determinazione della sequenza amminoacidica: la degradazione di Edman



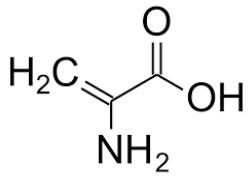


Identificazione del sito di legame covalente dell'amminoacido:

marcatura per affinità del sito di legame per la valina sulla gramicidina S sintetasi 2

- Sequenza ottenuta dalla degradazione di Edman del peptide marcato:

  LGGH ΔA LR



  ΔA: deidroalanina, può derivare da Cisteina o Serina

- Però…. NEM non è legata direttamente all'enzima altrimenti sarebbe stata identificabile nella sequenza poiché forma un legame stabile con i gruppi R-SH

Meccanismo tio-templato delle NRPS

Evidenze sperimentali a favore del meccanismo tio-templato:

- Sono coinvolti gruppi –SH

  inibitori –SH bloccano l'attività
- Si forma un legame tioestere tra l'amminoacido e l'enzima

  il tioestere è instabile nella degradazione di Edman (la marcatura viene persa anche usando Val marcata)

- Informazione ottenuta sulla **proteina**: la sequenza amminoacidica del peptide del sito attivo indica la presenza di cisteina o serina

  deidroalanina
- Informazione ottenuta sul **gene**: la sequenza nucleotidica del peptide del sito attivo indica la presenza di serina

  codone che codifica per serina

Da dove viene il gruppo SH che forma il tioestere???

La spettrometria di massa rivela la presenza di fosfopanteteina legata alla serina del sito attivo

TABLE I

Structure of the radiolabeled thiotemplate site peptide fragments of gramicidin S synthetase

Enzyme	Thio-template	Position of the fragment within the multienzyme	Thiotemplate site peptide fragments	Molecular mass (Dalton) Calculation from gene[a]	Pan-adduct[b]	Results of ESI-MS[c]
GS1	Phe	D 564 - K 575	DNFYALGGDSIK └Pan-[^{3}H]NES	1299.4	1764.9	1764.4
GS2	L-Pro	I 983 - K1008	IWEEVLGISQIGIQDNFFSLGGHSLK └Pan-[^{3}H]NES	2888.4	3353.8	3352.4
	L-Val	I2029 - R2044	IGVLDNFFELGGHSLR └Pan-[^{3}H]NES	1774.0	2239.5	2239.3
	L-Orn	V3075 - K3090	VGIHDDFFTIGGHSLK └Pan-[^{3}H]NES	1742.9	2208.3	2208.0
	L-Leu	F4120 - L4132	FELGGHSLKATLL └Pan-[^{14}C]Leu	1385.6	1848.9	1849.1

[a] The molecular masses of the peptides were calculated from the gene-derived sequence (7, 8).

[b] Mass was calculated as the sum of the molecular masses of the peptide moiety, the 4′-phosphopantetheine substituent that is covalently attached to the serine residue, and the radioactively labeled tracers (shaded boxes, NES: *N*-ethylsuccinimido and L-leucine, respectively) bound to the reactive thiol group of the Pan cofactors.

[c] Results of the investigation of the active site peptide fragments by electrospray mass spectrometry (ESI-MS).

Strategia di marcatura e purificazione dei peptidi del sito attivo della gramicidina S sintetasi 1 e 2

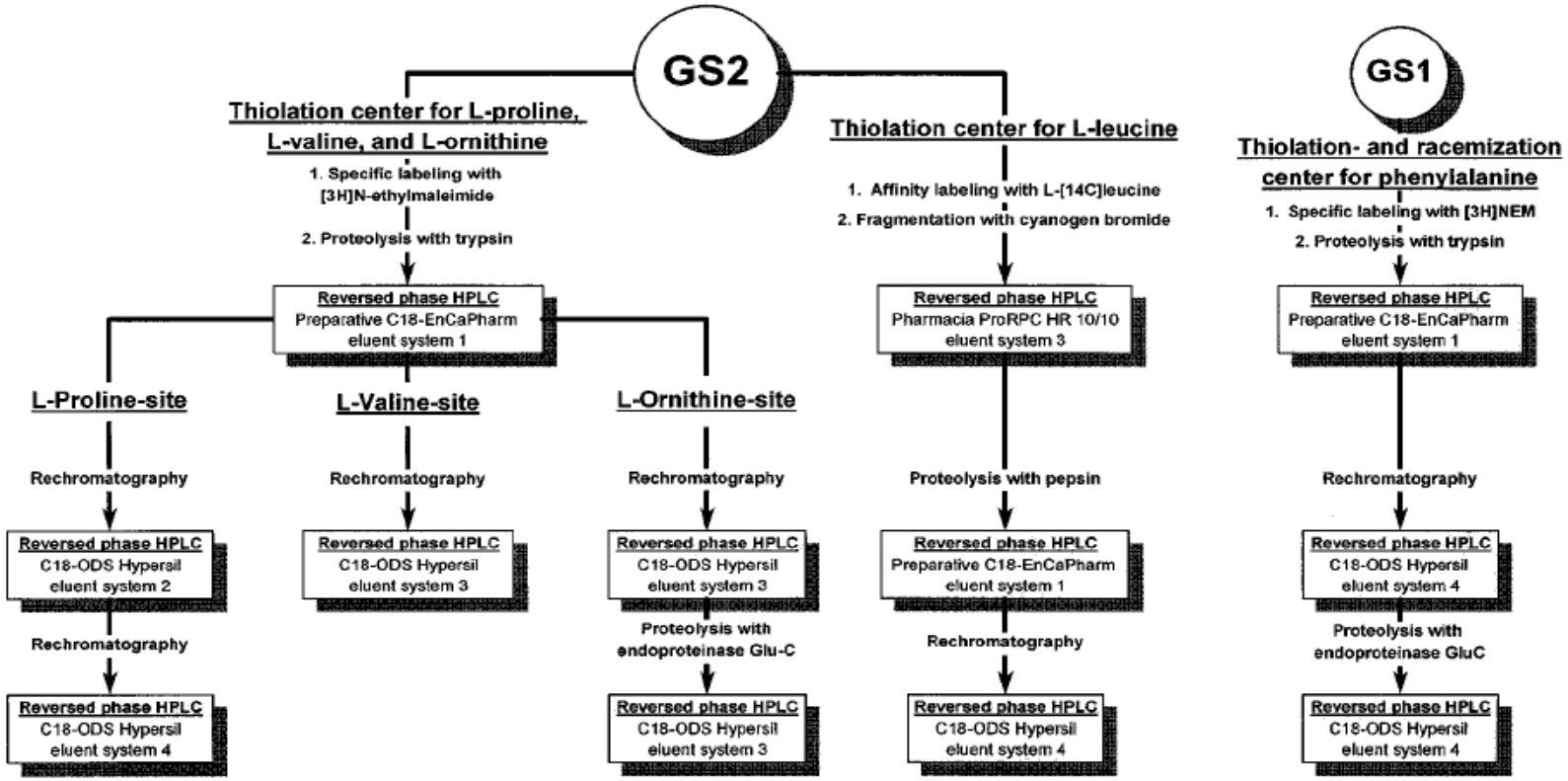
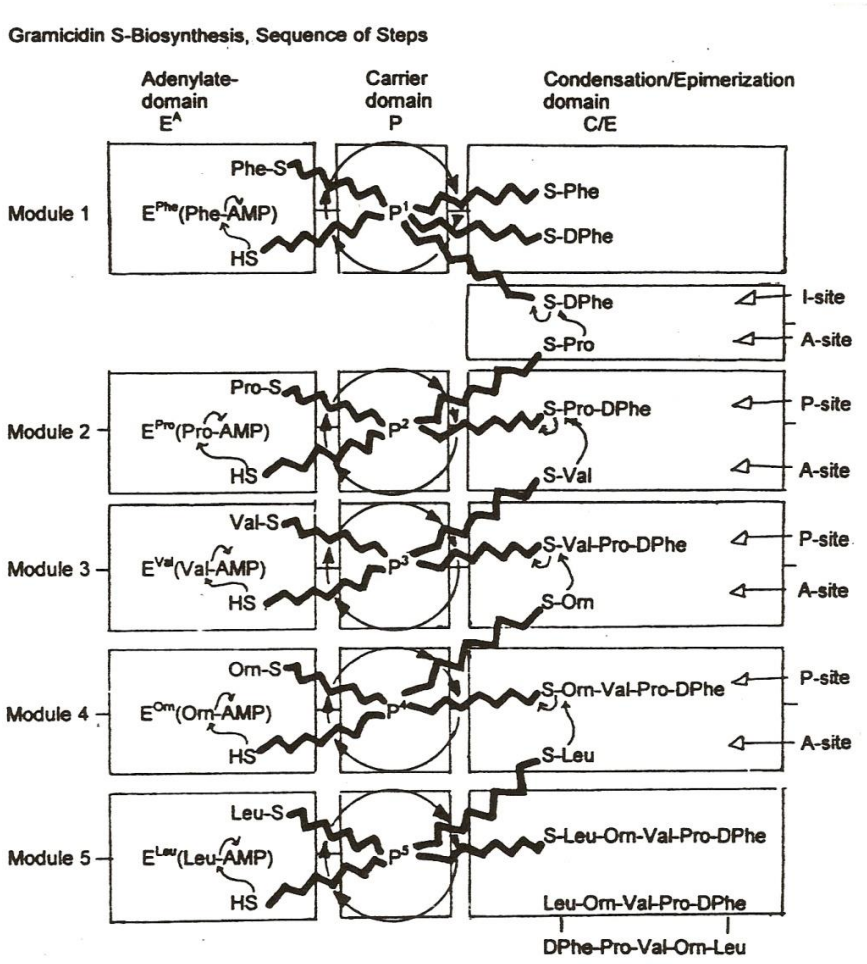
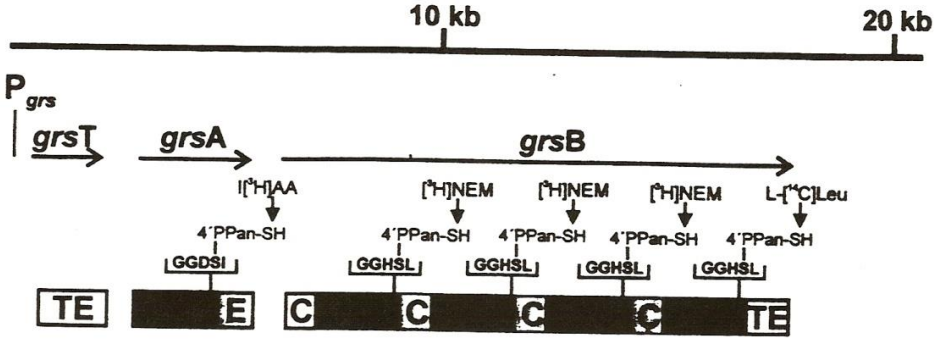


FIG. 1. Summary of the steps in the course of the purification of all thiotemplate site peptide fragments of gramicidin S synthetase 1 and 2.

Modello del meccanismo d'azione delle NRPS: meccanismo tio-templato a trasportatore multiplo. I bracci di 4'-PP facilitano il trasporto del substrato e dei vari intermedi ai centri catalitici dei diversi domini.





Modificazioni del peptide

- N-metilazione
- Ossidazione
- Alogenazione
- Eterociclizzazione
- Epimerizzazione

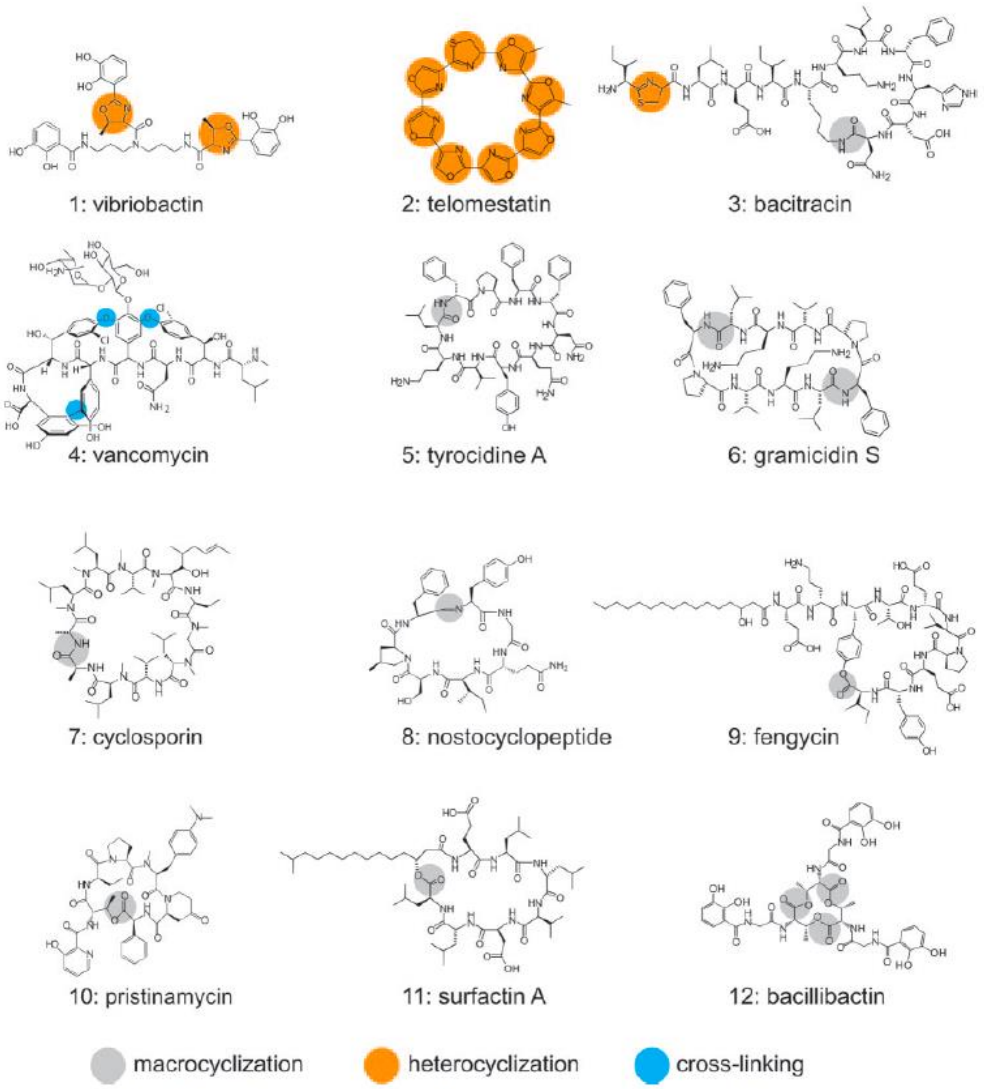


FIG. 1. A selection of non-ribosomally synthesized peptides. Characteristic structural features that confer rigidity to the peptide backbone are highlighted.

Epimerizzazione

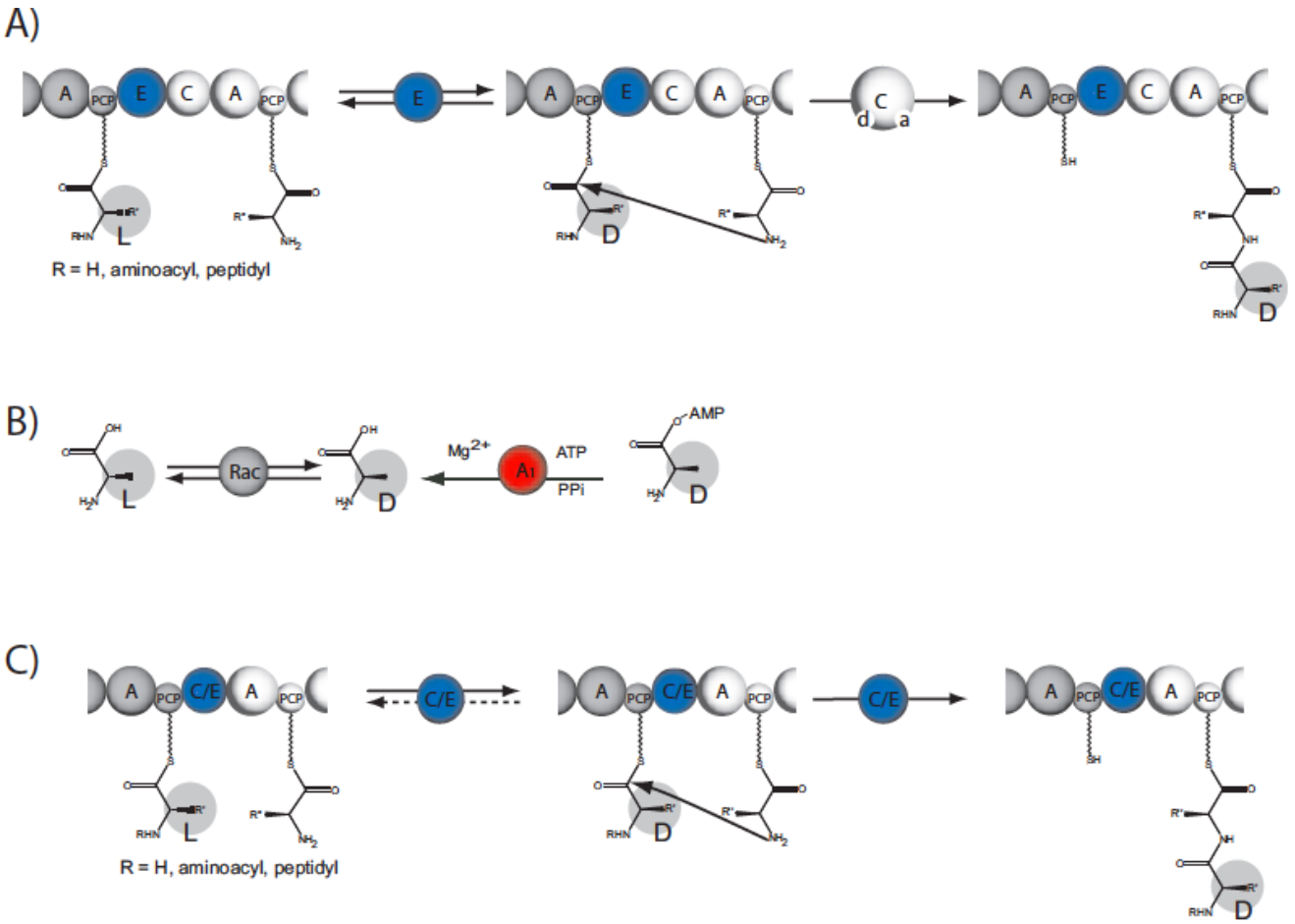
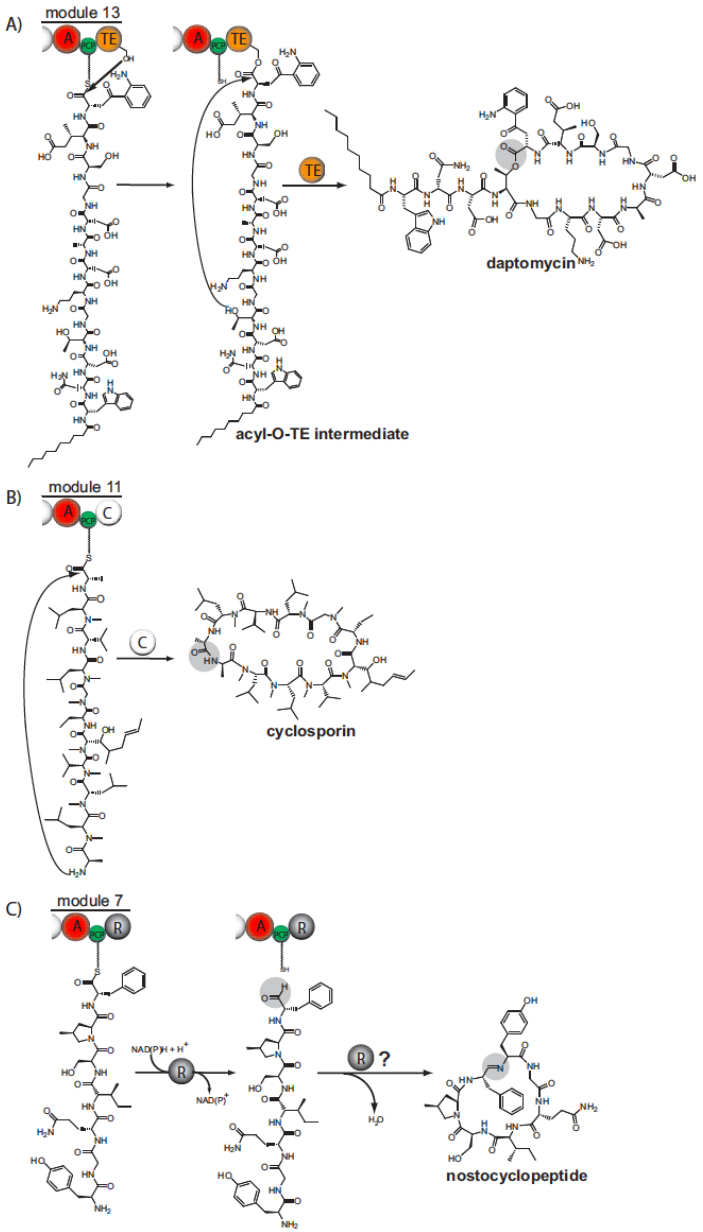


FIG. 6. Proposed mechanisms underlying amino acid epimerization. (A) The E-domain converts the PCP-tethered aminoacyl substrate into a D/L equilibrium. The stereoselective donor site (d) of the C-domain of the downstream module uses only the D-configured amino acid for subsequent peptide elongation. (B) In some cases, an external racemase (Rac) catalyzes the racemization of a freely diffusible amino acid. Here, a stereoselective A-domain is the determinant that activates solely the corresponding D-enantiomer. (C) D-Amino acid incorporation into arthrofactin, syringomycin, and syringopeptin is catalyzed by a new type of condensation domain (C/E-domain). Epimerization does not take place unless the PCP downstream of this C/E-domain is loaded with the dedicated amino acid. It is not yet known whether the epimerization reaction is reversible or not. After epimerization of the upstream aminoacyl/peptidyl thioester, the C/E-domain mediates the elongation of the peptidyl chain with $^{D}C_{L}$ chirality.

Rilascio del prodotto

Il rilascio del prodotto è catalizzato da un dominio tioesterasico (TE) di circa 250 amminoacidi presente alla fine dell'ultimo modulo.
Il meccanismo di catalisi è simile a quello delle proteasi a serina e la reazione genera un intermedio acil-O-TE.
Il rilascio del peptide avviene per attacco nucleofilo intramolecolare che genera un prodotto ciclico o per idrolisi nel caso di prodotti lineari.

Il rilascio del peptide può essere mediato da un dominio di condensazione (ciclosporina) o da un dominio con attività reduttasica (nostociclopeptide).



Classificazione delle sintetasi peptidiche

