

## Expressionsregulation

# Kurze Peptide regulieren die Aktivität bakterieller Ribosomen

A. CAROLIN SEEFELDT, BRITTA SEIP

INSTITUT EUROPÉEN DE CHIMIE ET BIOLOGIE, INSERM U1212, CNRS UMR5320, UNIVERSITÄT BORDEAUX, PESSAC, FRANKREICH

In all living cells ribosomes are responsible for the translation of genetic information into the corresponding protein sequence. This central position does not only make them a valuable target for antibiotics but also offers great possibilities to regulate gene expression. This article addresses two distinct mechanisms of ribosomal activity regulation: via short nascent peptides (regulation in *cis*) and via proline-rich antimicrobial peptides (regulation in *trans*).

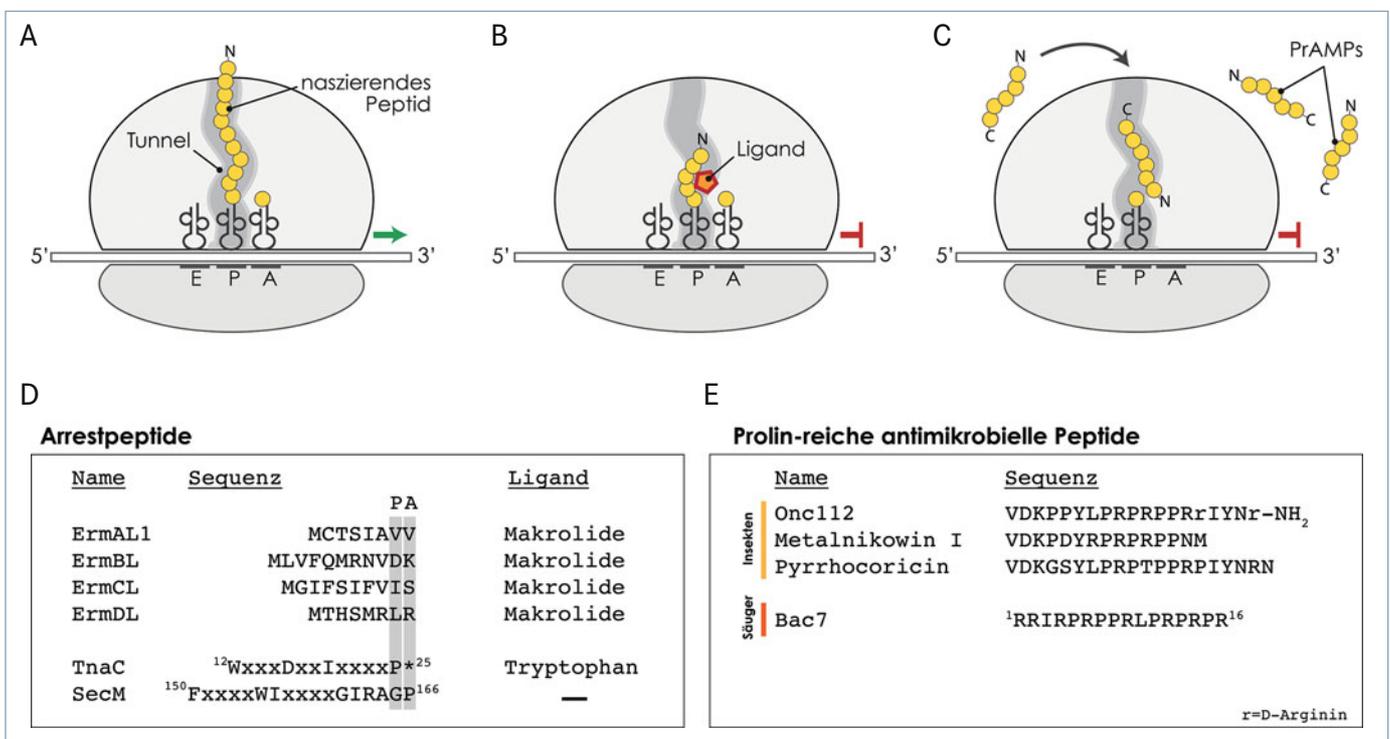
DOI: 10.1007/s12268-017-0833-1  
© Springer-Verlag 2017

■ Ribosomen sind in allen lebenden Zellen für die Übersetzung des genetischen Codes und die Synthese der entsprechenden Pro-

teine verantwortlich. In der Zelle nehmen sie dadurch eine zentrale Rolle ein. Zwar ist seit Langem bekannt, dass die wachsende Pep-

tidkette die Aktivität des translatierenden Ribosoms direkt, also in *cis*, variieren kann, die molekularen Details und die Sequenzdeterminanten dieser Arrestpeptide sind jedoch noch weitgehend unverstanden [1, 2]. Die Regulation der ribosomalen Aktivität durch Prolin-reiche antimikrobielle Peptide hingegen wurde erst vor Kurzem entdeckt [3, 4] und stellt eine Regulation in *trans* dar.

Ribosomen sind makromolekulare Komplexe, die in Bakterien aus einer großen 50S- und einer kleineren 30S-Untereinheit bestehen. Die 30S-Untereinheit erkennt die ribosomale Bindungsstelle der Boten-RNA (mRNA), positioniert das Ribosom auf dem Startcodon des Gens und ist anschließend für die Übersetzung der genetischen Sequenz verantwortlich. In der 50S-Untereinheit befindet sich das Peptidyltransferasezentrum



▲ **Abb. 1:** Effekt naszierender und freier Peptide auf die ribosomale Aktivität. **A,** Nach der Synthese wandert das naszierende Peptid durch den Tunnel der ribosomalen 50S-Untereinheit. **B, C,** Ein Arrest des Ribosoms kann ausgelöst werden durch die Translation eines Arrestpeptids bei Anwesenheit des Liganden (B) oder die Bindung eines Prolin-reichen antimikrobiellen Peptids (PrAMPs) in umgekehrter Orientierung (C). **D,** ausgewählte Arrestpeptidsequenzen. **E,** ausgewählte PrAMP-Sequenzen.

(PTC), das die Peptidbindung zwischen der wachsenden (naszierenden) Peptidkette und der nächsten Aminosäure katalysiert. Aminosäuren werden durch Transfer-RNAs (tRNAs), die als Adapter zwischen dem genetischen Code und der Proteinsequenz dienen, dem Ribosom präsentiert. Bevor die wachsende Peptidkette ins Zytoplasma entlassen wird, passiert sie den Tunnel, der die gesamte 50S-Untereinheit des Ribosoms durchspannt und das PTC mit dem Zytoplasma verbindet. Der Tunnel (etwa 100 Ångström lang) wird hauptsächlich durch ribosomale RNA (rRNA) gebildet und ist als Bindungsstelle für Antibiotika bekannt [5].

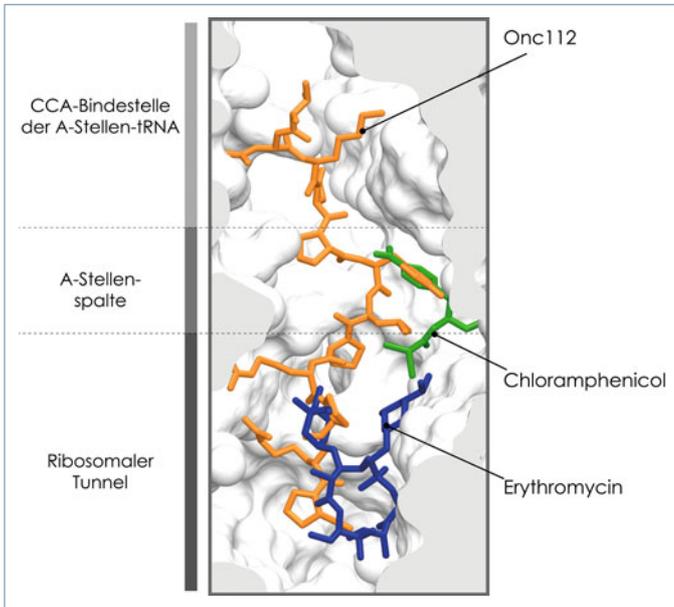
### Translationsregulation in *cis*: Arrestpeptide

Während die meisten Proteine den Tunnel nach ihrer Synthese ohne nennenswerte Verzögerungen passieren (**Abb. 1A**), interagieren Arrestpeptide über spezifische, nicht-kovalente Bindungen mit der Tunnelwand und zwingen so das Ribosom zum Anhalten. Die Interaktion zwischen dem naszierenden Peptid und der Tunnelwand hängt im Wesentlichen von der Sequenz des Peptids selbst ab, wobei in manchen Fällen der Arrest erst durch die Präsenz eines Liganden (Metabolit oder Antibiotikum) induziert wird (**Abb. 1B**). Diesen Regulationsmechanismus durch naszierende Peptide erkannten vor mehr als drei Jahrzehnten zwei Labore beinahe zeitgleich [6, 7], als sie die Regulation von *ermC* (*erythromycin resistance methylase*) untersuchten. ErmC wird durch ein stromabwärts codiertes Leader-Peptid reguliert, das die Bindung von Makrolidantibiotika im ribosomalen Tunnel erkennt und das Ribosom anhält. Diese Immobilisierung des Ribosoms begünstigt die Umlagerung der mRNA-Sekundärstruktur stromabwärts der Arreststelle und ermöglicht die Translation von *ermC* durch ein anderes Ribosom. ErmC codiert eine Methyltransferase, die die Bindungsstelle von Makrolidantibiotika im ribosomalen Tunnel methyliert. Dies reduziert einerseits die Bindungsaffinität der Makrolide, andererseits jedoch auch die Effizienz des Ribosoms. Mittlerweile wurden weitere *erm*-Gene identifiziert, deren Leader-Peptide alle mit Makrolidantibiotika interagieren, die sich in ihren Sequenzmotiven jedoch stark unterscheiden (**Abb. 1D**, [8]). Andere gut untersuchte Arrestpeptide sind

TnaC, das die Konzentration seines Liganden Tryptophan detektiert und die Expression der Tryptophan-Abbauenzyme TnaA und TnaB reguliert, sowie SecM, das als Leader-Peptid des Sekretionsproteins SecA das Ribosom ligandenunabhängig reguliert. Arrestpeptide hemmen entweder die Elongation (durch Inhibierung der Peptidyltransferase-Aktivität oder der Bindung der A-Stellen-tRNA) oder die Termination (durch Inhibierung der Ablösung des Peptids von der P-Stellen-tRNA) der Proteinbiosynthese [1, 2]. Noch ist die Identifizierung neuer Arrestpeptide schwierig, da nur eine geringe Anzahl dieser Sequenzen bekannt ist. Arrestpeptide zeichnen sich durch kurze Motive mit drei bis 15 Aminosäuren aus und sind meist nur unter nah verwandten Spezies konserviert.

### Translationsregulation in *trans*: PrAMPs

Anders als Arrestpeptide regulieren Prolinreiche antimikrobielle Peptide (PrAMPs; **Abb. 1C**) Ribosomen in *trans* und wirken erst nach ihrer Synthese [3, 4]. PrAMPs sind kurze Peptide (**Abb. 1E**) von 20 bis 60 Aminosäuren. Sie werden von höheren Eukaryoten, wie Säugern und Insekten, als Teil der ersten Immunantwort gegen Infektionen gebildet und wirken spezifisch gegen Gram-negative Bakterien. Eukaryotische Zellen synthetisieren PrAMPs als inaktive Vorstufe, die im Fall einer Infektion teilweise in mehreren Stufen aktiviert und anschließend in den Blutstrom bzw. die Lymphe abgegeben werden [9]. Über spezifische Transporter in der Zellwand, deren eigentliche Funktion unbekannt ist, nehmen Bakterien PrAMPs auf und akkumulieren sie im Zytoplasma. Molekularbiologische Studien zeigten kürzlich, dass PrAMPs wie Onc112, Bac7, Metalnikowin I und Pyrrhocorricin spezifisch die Proteinbiosynthese hemmen [4, 9, 10]. Um einen detaillierten Einblick zu erhalten, wurden in enger Kollaboration der Gruppen von Axel Innis (Institut Européen de Chimie et Biologie, IECB), Daniel Wilson (Universität Hamburg) und Gilles Guichard (IECB) die Strukturen von Ribosomen im Komplex mit diesen PrAMPs mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die hochauflösenden Strukturen (2,8 bis 3,1 Ångström) zeigen, dass PrAMPs im ribosomalen Tunnel in umgekehrter Orientierung zur wachsenden Peptidkette binden



◀ **Abb. 2:** 3,1-Ångström-Struktur des 70S-Ribosoms aus *Thermus thermophilus* mit dem Prolin-reichen antimikrobiellen Peptid (PrAMP) Onc112. PrAMPs binden in umgekehrter Orientierung zum wachsenden Peptid und inhibieren die Elongation durch Besetzen der A-Stellenspalte. In diese bindet normalerweise die nächste codierte Aminosäure, die an das CCA-Ende der A-Stellen-tRNA gebunden ist. Die Überlagerung mit Erythromycin und Chloramphenicol zeigt, dass PrAMPs und A-Stellen-tRNA den gleichen Bereich binden.

(**Abb. 2**). Der hohe Prolin- und Argininanteil verleiht den Peptiden eine spezifische Sekundärstruktur und fördert ihre Interaktion mit der Tunnelwand über Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen. Die Bindungsstelle der PrAMPs überlappt mit der A-Stellenspalte und verhindert die Bindung der A-Stellen-tRNA, wodurch der Übergang von der Initiations- in die Elongationsphase der Proteinbiosynthese blockiert wird [10, 11]. Biochemische Studien bestätigen diesen Mechanismus und zeigen zudem die Destabilisierung des Post-Initiationskomplexes [10].

### Peptide als Inspiration für neue Antibiotika

Sowohl Arrestpeptide als auch PrAMPs binden im oberen Teil des ribosomalen Tunnels [1, 2, 9]. Während PrAMPs unspezifisch alle Ribosomen der Zelle inhibieren, sind Arrestpeptide Sensoren für veränderte Umweltbedingungen und regulieren die Aktivität des sie translatierenden Ribosoms, um die Expression bestimmter Gene anzupassen.

Neben diesem grundlegenden Verständnis genetischer Regulationsmechanismen könnten PrAMP- und Arrestpeptidsequenzen auch als Inspiration für die Entwicklung neuer Antibiotika dienen. Eine Vielzahl klinisch verwendeter Antibiotika, wie etwa Erythromycin und Chloramphenicol (**Abb. 2**), bindet spezifisch im ribosomalen Tunnel an die gleichen Stellen wie PrAMPs und Arrestpeptide. Während Peptide durch ihre große Oberfläche viele Bindungen mit dem ribosomalen Tunnel eingehen, binden Antibiotika nur wenige Basen [5], wodurch Resistenzen schnell ausgebildet werden können. Antibiotika auf

einer Spezies und würden die Entwicklung spezifischer Antibiotika und gezielter Therapien ermöglichen.

### Danksagung

Wir danken Axel Innis für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts. Außerdem danken wir INSERM, IdEx, ANR, der Région Aquitaine und FRM für die Finanzierung. ■

### Literatur

- [1] Ito K, Chiba S (2013) Arrest peptides: *cis*-acting modulators of translation. *Annu Rev Biochem* 82:171–202
- [2] Seip B, Innis CA (2016) How widespread is metabolite sensing by ribosome-arresting nascent peptides? *J Mol Biol* 428:2217–2227
- [3] Krizsan A, Volke D, Weinert S et al. (2014) Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70 S ribosome. *Angew Chem Intern Ed* 53:12236–12239
- [4] Mardirossian M, Grzela R, Giglione C et al. (2014). The host antimicrobial peptide Bac71-35 binds to bacterial ribo-

- mal proteins and inhibits protein synthesis. *Chem Biol* 21:1639–1647
- [5] Wilson DN (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12:35–48
- [6] Gryczan TJ, Grandi G, Hahn J et al. (1980) Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucl Acid Res* 8:6081–6097
- [7] Horinouchi S, Weisblum B (1980) Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7079–7083
- [8] Ramu H, Mankin A, Vazquez-Laslop N (2009) Programmed drug-dependent ribosome stalling. *Mol Microbiol* 71:811–824
- [9] Graf M, Mardirossian M, Nguyen F et al. (2017) Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Nat Prod Rep* 34:702–711
- [10] Seefeldt AC, Nguyen F, Antunes S et al. (2015) The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* 22:470–475
- [11] Roy RN, Lomakin IB, Gagnon MG et al. (2015) The mechanism of inhibition of protein synthesis by the proline-rich peptide oncocin. *Nat Struct Mol Biol* 22:466–469

### Korrespondenzadresse:

Dr. Britta Seip  
Institut Européen de Chimie et Biologie  
INSERM U1212, CNRSUMR5320  
Université de Bordeaux  
2 rue Robert Escarpit  
F-33607 Pessac  
Tel.: +33-(0)5-40006308  
Britta.Seip@inserm.fr

### AUTORINNEN



#### A. Carolin Seefeldt

Chemie- und Biochemiestudium an der LMU München. 2014 Masterarbeit bei Prof. Dr. D. N. Wilson. Seit 2014 Doktorandin in der Gruppe von Dr. C. Axel Innis am Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB). Stipendiatin der Région Aquitaine und Inserm.



#### Britta Seip

Biologiestudium (Diplom) an der Universität Bonn. 2010–2013 Doktorarbeit bei Prof. Dr. E. A. Galinski, 2012 Forschungsaufenthalt an der Yale University bei Prof. Dr. T. A. Steitz. Seit 2013 Postdoc in der Gruppe von Dr. C. Axel Innis am Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB).