

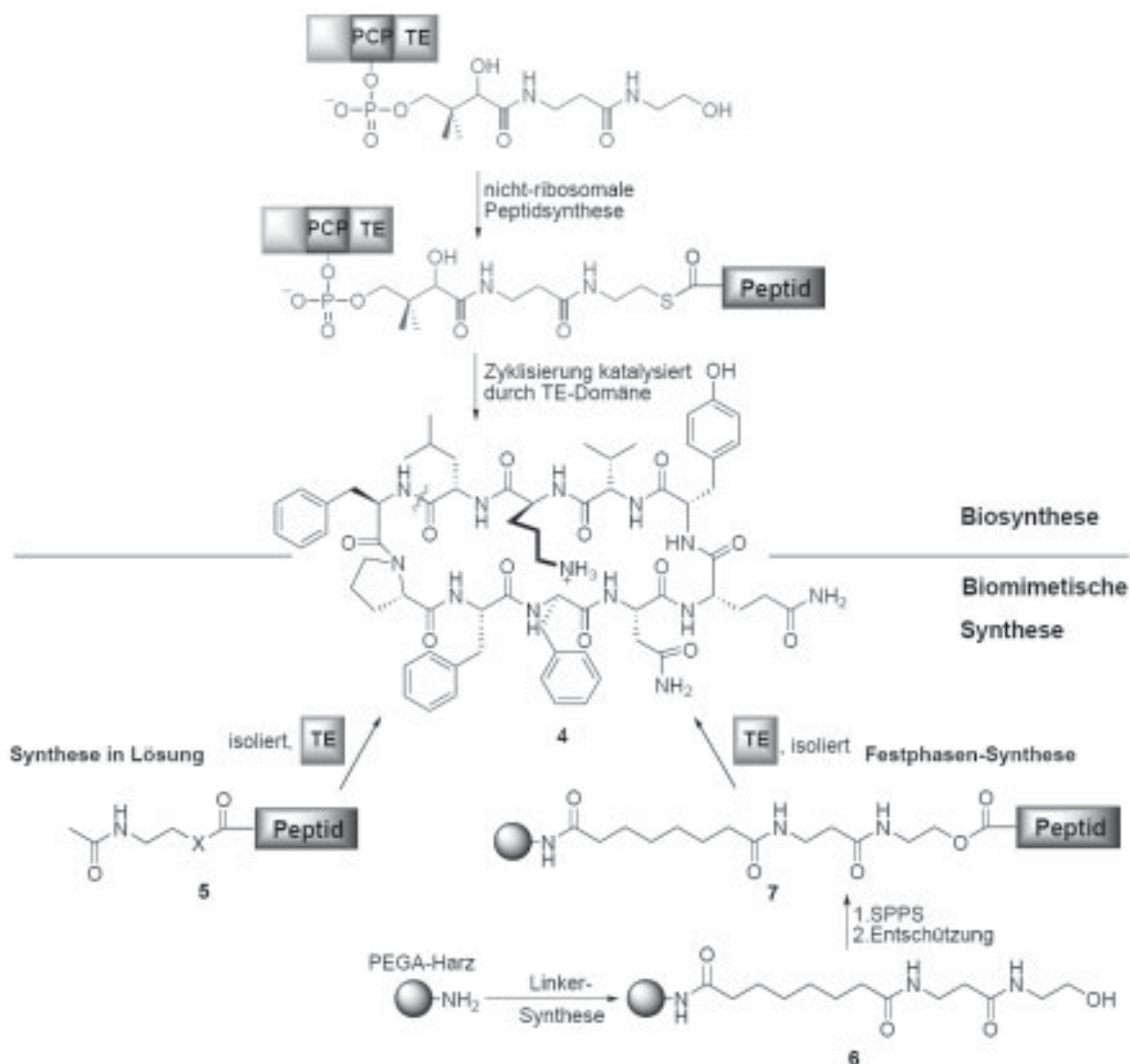
2. Theoretischer Teil

2.1. Zyklische Peptide und Proteine

Die Entdeckung der biologischen Wirkung zyklischer Peptide und Proteine geht weit zurück. Ein Großteil dieser Klasse wurden mit ihren Wirkungsweisen erst in den letzten 10 Jahren charakterisiert.^[6] In den siebziger Jahren wurde von Gran et al. die Eigenschaften eines Extraktes aus *Oldenlandia affinis*, einer in Afrika beheimateten Pflanze entdeckt, welche Uteruskontraktionen auslöste. Als Ursache wurde damals ein 29 Aminosäuren langes Peptid namens Kalata B1 identifiziert,^[9] wobei die Struktur unbekannt blieb. Erst 25 Jahre später wurde es als Genprodukt identifiziert und als zyklisches Peptid aufgeklärt.^[10,11] Die Klasse dieser Verbindungen reicht von kleinen Peptidstrukturen, die weniger als 12 Aminosäuren haben, wie zum Beispiel das Cyclosporin A (3), bis hin zu großen DNA-kodierten Proteinen zwischen 14 und 70 Aminosäuren.^[6] Zyklische Peptide und Proteine, die über eine Amidbindung verknüpft sind, zeichnen sich generell durch eine höhere Stabilität aus. Im Gegensatz zu linearen Strukturen besitzen sie keinen flexiblen C- oder N-Terminus und proteolytische Enzyme finden keinen Ansatzpunkt.^[12]

Charakteristisch für zyklische Peptide und Proteine ist der fast ausschließliche Einsatz im Abwehrsystem des Wirtes. Dennoch unterscheiden sie sich in einigen Merkmalen. Man findet bei den bisher bekannten zyklischen Vertretern dieser Klasse aus Mikroorganismen Strukturen ohne Disulfidbrücken. Bei höheren Organismen werden diese jedoch fast durchweg ausgebildet.^[13] Da das Gebiet der zyklischen Peptide und Proteine ein recht junges Forschungsfeld ist, sind viele Aspekte der Struktur-Wirkungs-Beziehungen noch ungenügend aufgeklärt. Die Biosynthesen vieler Peptide sind bislang nicht bekannt oder nur teilweise verstanden. Viele zyklische Vertreter stammen von azyklischen Vorläufer-Proteinen ab, die am N-Terminus ein Signalpeptid besitzen, das in den Spaltungs- und Zyklisierungsprozess integriert ist. Bei mehreren Verbindungen aus Pflanzen und Säugetieren beinhalten sie außerdem eine C-terminale Domäne, die bei der für die Zyklisierung relevanten Konformation eine Rolle spielen könnte. Interessanterweise gibt es keine exakt und nur sehr wenig natürlich vorkommende, lineare Analoga zu dieser Klasse der zyklischen Naturstoffe. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Schritt effizient und schnell abläuft, nachdem das lineare Vorläuferpeptid abgespalten wurde.^[6] Ein enzymatischer Prozess ist daher vermutlich der entscheidende Weg zur Zyklisierung. Von diesen Enzymen wurden bisher erst wenige charakterisiert, die die nötige Spezifität für die relevanten chemischen Transformationen

besitzen. Eine Aufklärung der Biosynthese inklusive dem enzymatischen Zyklisierungsprozess des Tyrocidin A (**4**) veröffentlichten Burkart et al. 2002 (Schema 1).^[14]



Schema 1: Biosynthese und biomimetische Synthese des Tyrocidin A (**4**)

Das lineare Vorläuferpeptid wird über eine Multidomäne der nicht-ribosomalen Synthetase, in jedem Schritt über einen Thioester an ein Trägerprotein verknüpft, aufgebaut. Dies entspricht dem biologischen Analogon zur Festphasensynthese. Im letzten Schritt wird über eine integrierte C-terminale Thioesterasedomäne (TE) die Zyklisierung durchgeführt. Weiterhin konnten Burkart et al zeigen, dass auch die isolierte Thioesterase-Domäne die Peptidzyklisierung in Lösung und an der Festphase (PEGA-Harz) katalysiert.^[14] An der Festphase wurde das Peptid über einen biomimetischen Linker an das Harz gebunden

(Schema 1). Dabei toleriert die Esterase Variationen der Peptidlänge, wie auch ein breites Spektrum an unterschiedlichen Aminosäureseitenketten.^[8, 15]

In den folgenden Kapiteln 2.1.1-2.1.4 werden die Strukturen einiger biologisch relevanter zyklischer Peptide und Proteine näher beschrieben. Dort sind sie in die Wirtsorganismen unterteilt, angefangen von den am weitesten entwickelten Lebewesen, den Säugetieren, über Pflanzen, Pilze bis hin zu Mikroorganismen.

2.1.1. Zyklische Peptide und Proteine in Säugetieren

Ein zyklisches Peptid in Säugetieren ist das RTD-1 (Rhesus theta defensin 1; Abbildung 3).^[16] Diese zyklische Verbindung stammt aus den Leukozyten der Rhesusaffen und hat 18 Aminosäuren in seiner Sequenz. Es gehört mit seinen 6 Cysteinen und 5 Argininen zu den Cystein-reichen Peptiden. Diese bilden dabei drei Disulfidbrücken aus, die ähnlich einer Leiter angeordnet sind.

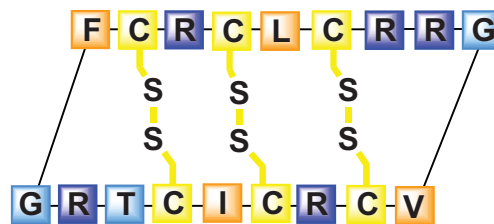
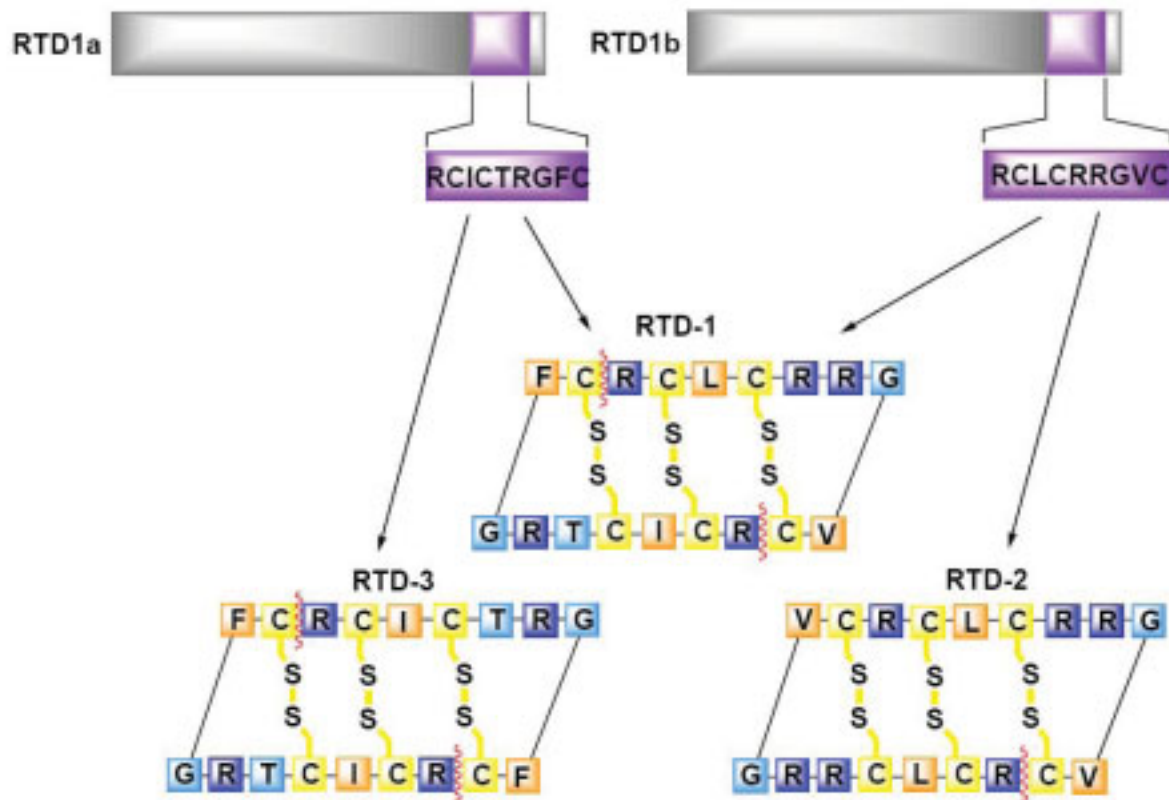


Abbildung 3: Struktur des RTD-1

Die übrige Struktur kennzeichnet sich durch zwei β -Stränge, die an den Enden jeweils mit einem engen Turn im Peptidrückgrat verknüpft sind. Haupteffekt der Zyklisierung ist wohl die Stabilität. Da RTD-1 aufgrund seines antibakteriellen Charakters zur Wirtsverteidigung gegenüber Bakterien eingesetzt wird, bringt ihm eine Stabilität gegen Proteolyse durch Exoproteasen einen entscheidenden Vorteil.^[6]



Schema 2: Biosynthese des RTD-1

Die Biosynthese geht von RTD1a und RTD1b aus, die jeweils eine lineare Vorstufe des RTD-1 kodieren.^[16] Diese werden dann in zwei Verknüpfungen miteinander zyklisiert. Zwar ist die Gensequenz der Vorstufen bekannt, die für die Spaltung und Zyklisierung verantwortlichen Enzyme bislang allerdings noch nicht. Man findet neben dem RTD-1 mit RTD-2 (ausgehend von RTD1b) und RTD-3 (ausgehend von RTD1a) noch zwei weitere Homodimere im Verhältnis 29:1:2 (Schema 2).^[17,18]

2.1.2. Zyklische Peptide und Proteine in Pflanzen

In Pflanzen sind die Cyclotide beheimatet, die mit mehr als 45 Mitgliedern die größte Gruppe an zyklischen Proteinen darstellen. Sie haben eine Sequenzgröße von 28-37 Aminosäuren und stammen fast ausschließlich aus der in den Tropen ansässigen Familie der *Rubiaceae*. Ihre Strukturmerkmale sind die Zyklisierung und 6 Cysteine, die wie im RTD-1 drei Disulfidbrücken ausbilden. Im Gegensatz zum RTD-1 sind sie nicht wie eine Leiter angeordnet. Zwei Disulfidbrücken spannen mit dem Peptidrückgrat eine Ebene auf, die von der dritten geschnitten wird.^[19] Solche Motive findet man in der Natur nicht nur bei den

Cyclotiden, sondern auch bei kleinen Toxinen^[20] oder Wachstumsfaktoren.^[21] Sie führen zu einer sehr hohen Stabilität. Die peptidische Ringstruktur dient ebenfalls der Stabilität, ist allerdings für die dreidimensionale Anordnung der Cyclotide, wie Studien mit offenkettigen Analoga gezeigt haben, nicht maßgebend.^[22] Dieses Merkmal führt dazu, dass die Peptide nicht nur gegenüber der Hydrolyse durch Proteasen, sondern auch gepaart mit den Disulfidbrücken gegenüber thermischer Denaturierung stabil sind.^[23]

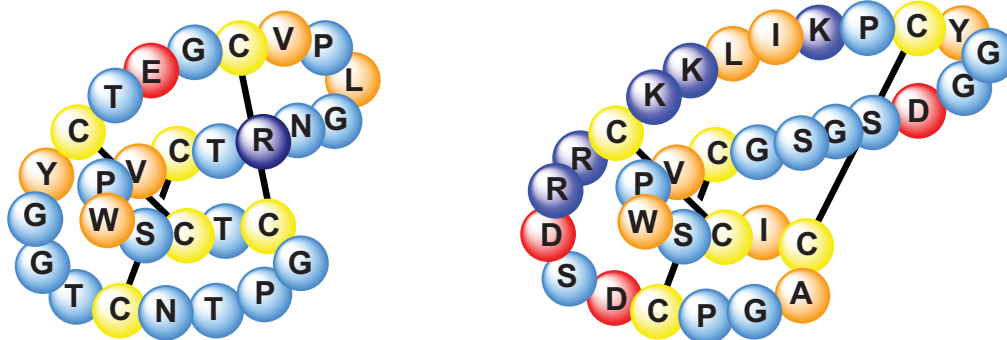


Abbildung 4: Darstellung des Kalata B1 (links) und des MCoTI-II (rechts)

Des weiteren gehören zu den Merkmalen auch drei β -Faltblattstränge. Cyclotide besitzen aufgrund dieser komplexen Strukturmerkmale diverse biologische Aktivitäten, wodurch sie in der Pharmazie häufig auch als Leitstrukturen dienen. Die Cyclotide Circulin A und B zeigen beispielsweise eine anti-HIV-Aktivität^[24, 25] oder das Kalata B1, wie bereits eingangs erwähnt, führt zu Uterus-Kontraktionen.^[26] Bei diesem Naturstoff wird vermutet, dass die eigentliche Aufgabe in der Abwehr von Insekten-Parasiten besteht.^[11] Weitere Cyclotide wirken antibakteriell oder fungizid.^[27] 2000 konnten Hernandez et al. dieser Familie mit MCoTI-II (Abbildung 4) noch eine weitere Gruppe zuordnen.^[28] Diese konnten aus den Samen von *Momordica cochinchinensis*, einem Rebengewächs der Familie *Curcubitaceae*, isoliert werden. Die Substanzen zeigen die gleichen Strukturmerkmale wie Kalata B1 und sind die einzigen bisher entdeckten Beispiele, bei der die lineare Form parallel zur zyklischen Struktur im Organismus vorkommt. Dieser ist der einzige bekannte Vertreter mit diesem strukturellen Motiv, der ein Trypsin-Inhibitor ist. Die Biosynthese der Cyclotide ist weitgehend noch nicht bekannt. Im Fall des Kalata B1 konnte gezeigt werden, dass sie durch eine Multigen-Familie kodiert sind. Die Vorstufen sind mit jeweils einer Signalsequenz über mehrere Domänen verteilt. Diese müssen gespalten und verknüpft werden, wobei weder der genaue Mechanismus noch mögliche involvierte Enzyme bekannt sind.^[11]

(8-11).^[29, 34, 35] (Abbildung 5)



Abbildung 5: Zyklische Peptide aus *Annona montana*

2.1.3. Zyklische Peptide in Pilzen

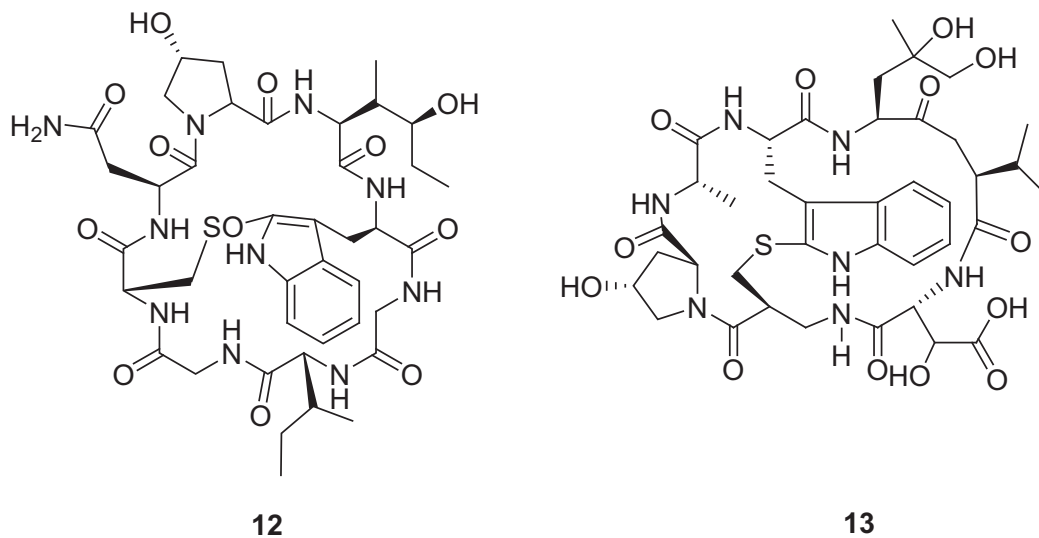


Abbildung 6: Struktur von α -Amanitin (**12**) und Phallacidin (**13**)

Die in Abbildung 6 gezeigten α -Amanitin (**12**) und Phallacidin (**13**) sind Toxine zweier unterschiedlicher Toxinklassen, den Amatoxinen (**12**) und den Phallotoxinen (**13**). Beide werden von Pilzen der Gattung *Amanita* des Stammes *Phalloideae* produziert. Nicht alle Vertreter dieser Gattung produzieren Toxine, einige sind sogar essbar. Dennoch rühren mehr als 90% aller Pilzvergiftungen von dieser Gattung her. Für das α -Amanitin **12** liegt der LD₅₀-Wert für den Menschen bei ≈ 0.1 mg/kg. Ein Pilz der Gattung *Amanita bisporigera* kann bis zu 12 mg enthalten, allerdings besitzen nur die Fruchtkörper hohe Konzentrationen des Toxins.^[36] Der Wirkmechanismus beinhaltet, dass Amatoxine aktiv in die Zellen aufgenommen werden und die RNA-Polymerase II inhibieren.^[37] Die Phallotoxine wirken, indem sie das F-Actin stabilisieren,^[38] allerdings sind sie aufgrund ihrer schlechten Resorption für eine orale Aufnahme kaum zugänglich.^[37] **12** und **13** sind kleine bicyklische Peptide, mit acht beziehungsweise sieben Aminosäuren. Die Biosynthesen werden nicht von Peptidsynthetasen durchgeführt, sondern sowohl das α -Amanitin (**12**) als auch das Phallacidin (**13**) sind direkt über die Gene AMA1 und PHA1 kodiert.^[37] Sie werden zunächst als Vorstufen mit Signalpeptidsequenz am N-Terminus synthetisiert, die dann von Oligopeptidasen gespalten werden. Die genaue Biosynthese ist noch nicht bekannt, da *Amanita*-Pilze schwierig zu kultivieren sind. Dennoch ist klar, dass die Genome von *Amanita bisporigera* und *Amanita phalloides* viele verschiedene Regionen mit Genen besitzen, die zu AMA1 und PHA1 ähnlich sind.^[37] Sie können somit eine große Bandbreite an

verschiedensten 7-10 Aminosäuren langen zyklischen Peptiden synthetisieren, die ebenfalls toxische Wirkung zeigen können.

2.1.4. Zyklische Peptide und Proteine in Mikroorganismen

Man findet zyklische Peptide und Proteine über die gesamte Bandbreite an Mikroorganismen, dabei dienen sie meist zur Verteidigung.^[6] Es gibt ein breites Spektrum an verschiedensten zyklischen Strukturen zu denen auch die in Abbildung 7 gezeigten kleinen Peptide **14-16** gehören. Auffällig ist, dass Disulfidbrücken in den Naturstoffen der Bakterien, im Gegensatz zu höher entwickelten Organismen, eher eine untergeordnete Rolle spielen.

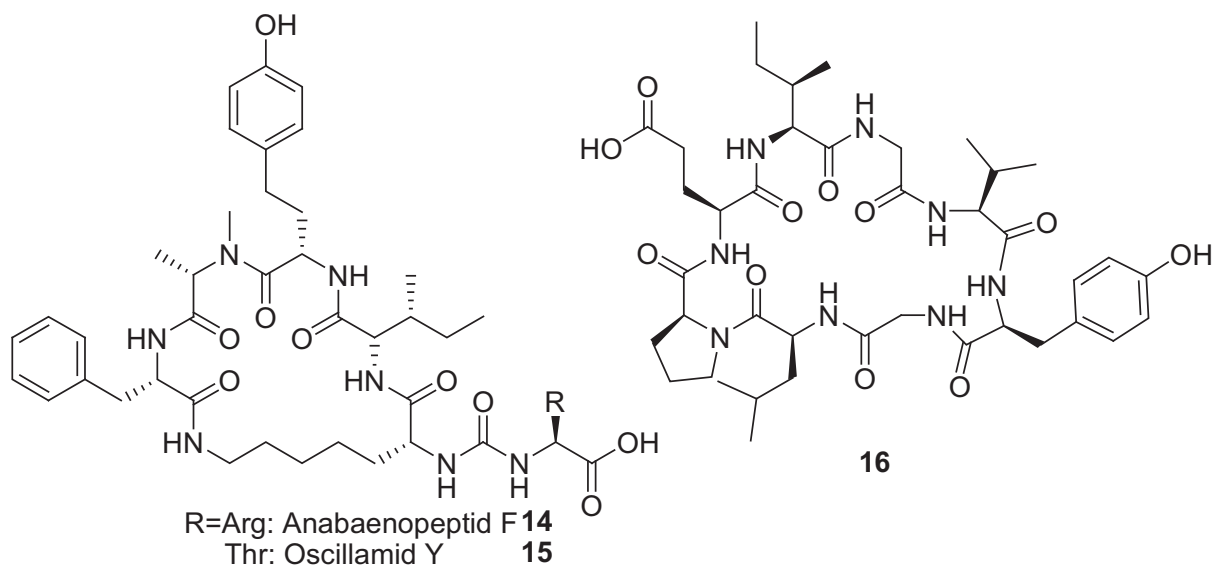


Abbildung 7: Strukturen von Anabaenopeptid F (**14**) und Oscillamid Y (**15**), Microphycin AL828 (**16**)

14-16 stammen aus den Cyanobakterien *Microcystis* sp. Die beiden Protease-Inhibitoren Anabaenopeptid F (**14**)^[39] und Oscillamid Y (**15**)^[40] sind bereits seit Mitte bis Ende der 90er Jahre bekannt, während das Microphycin AL828 (**16**) erst 2008 entdeckt und charakterisiert wurde.^[41] Es handelt es sich um einen Aminoprotease-Inhibitor, der aus acht proteogenen Aminosäuren besteht. Bei diesen Naturstoffen gibt es strukturell kleinere Unterschiede. So ist **16** über das Peptidrückgrat zyklisiert, während bei **14** und **15** eine Lysin-Seitenkette mit dem C-Terminus verknüpft das zyklische Rückgrat bildet.

Ein weiteres Beispiel für kleine zyklische Peptide mit bis zu 10 Aminosäuren Länge ist das in Abbildung 8 gezeigte und in Kapitel 2.1. bereits erwähnte Tyrocidin A (**4**).^[14]

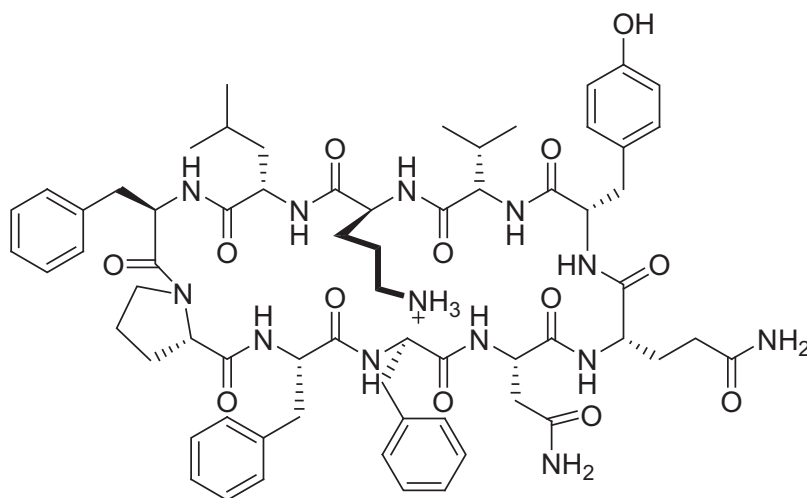


Abbildung 8: Struktur des Tyrocidin A (**4**)

Es besitzt eine β -Faltblattstruktur und gehört zur Klasse kationischer Peptide, die in verschiedenen Bakterienstämmen zu finden sind. Diese kationischen Peptide wechselwirken entgegen dem üblichen Wirkmechanismus von Antibiotika nicht mit spezifischen Proteinen oder der RNA. Vielmehr wird vermutet, dass ihre Wirkung von unspezifischer Einlagerung in Zellmembranen herrührt.^[42] Somit wird die osmotische und ionische Regulierung der Zellen unterbrochen. Dieser andere Wirkmechanismus macht diese Klasse von Peptiden für die Pharmazie äußerst interessant.