

## Antimikrobielle Peptide

# Lantibiotika – hoffnungsvolle Alternative gegen Antibiotikaresistenz?

JULIA GOTTSTEIN<sup>1</sup>, HANS KLOSE<sup>1</sup>, C. VIVIEN KNOSPE<sup>1</sup>, JENS REINERS<sup>2</sup>, SANDER H. SMITS<sup>1,2</sup>, LUTZ SCHMITT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

<sup>2</sup> CENTER FOR STRUCTURAL STUDIES, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Nisin is one of the most studied lantibiotics which are antimicrobial peptides. Nowadays the knowledge about the Nisin-modification system is profound and can be explored to express and modify lantibiotics with new or specific antimicrobial features. Here we highlight recent advances that include a strategy on bypassing natural occurring resistances against antimicrobial peptides.**

DOI: 10.1007/s12268-021-1621-5

© Die Autorinnen und Autoren 2021

■ Lanthipeptide sind ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide, die als Hauptmerkmal (Methyl-)Lanthioninringe besitzen. Im Fall einer antibakteriellen Wirkung werden Lanthipeptide als Lantibiotika bezeichnet [1]. Diese stehen verstärkt im Fokus der Forschung, da oft eine potente, antimikrobielle Wirkung gegenüber humanpathogenen Stämmen vorliegt [2]. Vor dem Hintergrund steigender Antibiotikaresistenzen [3] sind dies wichtige Voraussetzungen für eine Anwendung.

Eines der meist untersuchten Lantibiotika ist Nisin aus dem Gram-positiven Bakterium *Lactococcus lactis*, das seit 1983 (EU) in der Lebensmittelindustrie unter der Bezeichnung E234 [4] verwendet wird. Nisin wirkt, indem es: (I) an Lipid II, eine Zellwandvorstufe, bindet und (II) nach der Bindung Poren in der Membran bildet. Das detaillierte Wissen über das Nisin-Produktionssystem kann daher auch prinzipiell zur Herstellung und Modifikation heterologer Lantibiotika eingesetzt werden [2].

Lantibiotika, generell als LanA bezeichnet, liegen nach ribosomaler Synthese als Vorläuferpeptid vor und bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid (SP) und C-terminalen Kernpeptid (KP). Das SP interagiert mit den Modifikationsenzymen, woraufhin alle Modifikationen im KP stattfinden. Das zweistufige Modifikationssystem des Nisins beinhaltet

die Dehydratase NisB sowie die Cyklase NisC (**Abb. 1**). NisB dehydriert die Aminosäuren Serin und Threonin zu Dehydroalanin (Dha) bzw. Dehydrobutyrin (Dhb). Diese dehydrierten Aminosäuren gehen mit räumlich in der Nähe befindlichen Cysteinen eine Michael-Addition ein, die durch NisC katalysiert wird und zur Ausbildung der (Methyl-)Lanthioninringe führt [1, 5]. Nach erfolgreicher Modifikation wird das Peptid mittels eines ABC-Transporters, NisT im Fall von Nisin, exportiert und die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Abspaltung des SP durch die Protease NisP (**Abb. 1**, [1, 5]).

Die Aktivierung beinhaltet die Gefahr, dass Nisin zu einem „Selbstmord“ des Produzenten führt. Dies wird durch die Immunitätsproteine NisI und NisFEG [6] verhindert. Das Nisinsystem wird durch das Zweikomponentensystem NisR und NisK komplementiert, welches die Expression des Operons reguliert (**Abb. 1**, [7]). Trotz dieser Immunitätsproteine haben sich weitere Resistenzsysteme gegen Lantibiotika entwickelt, die einen möglichen Ansatzpunkt zur Bekämpfung darstellen.

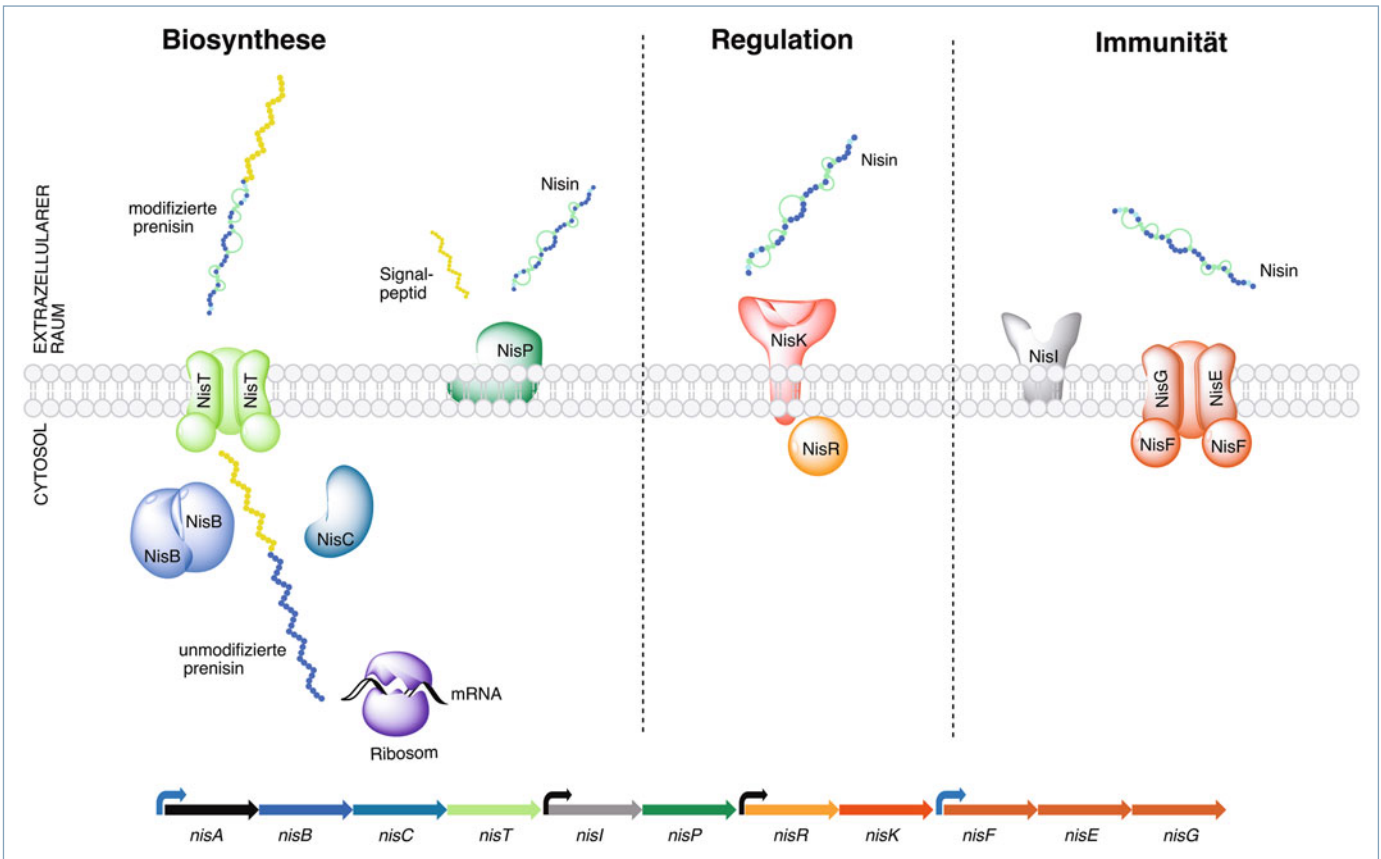
### Umgehung der Resistenz gegenüber Lantibiotika

Humanpathogene Bakterien besitzen unterschiedliche Abwehrsysteme gegen Lantibiotika. Ein Beispiel ist das Nsr-Operon aus

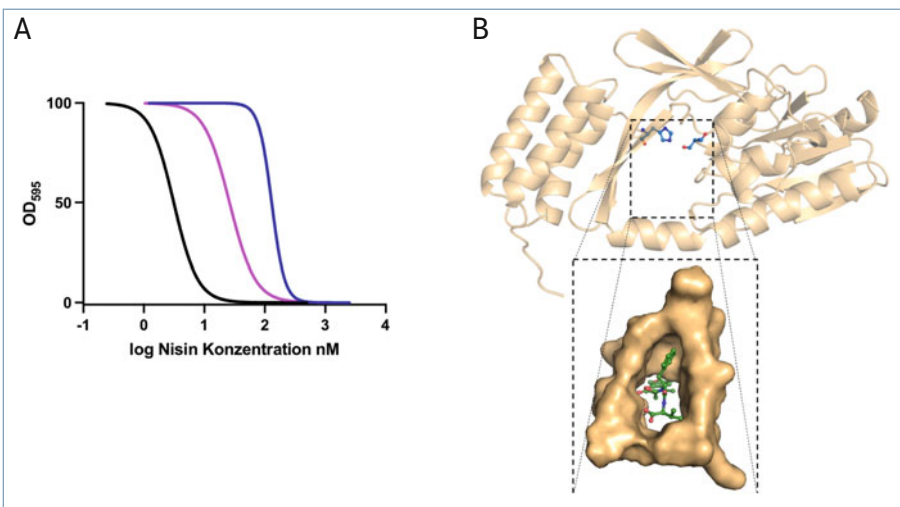
*Streptococcus agalactiae*. Durch die dort codierten Proteine besitzt das Bakterium zwei Möglichkeiten zur Abwehr: (I) durch Nutzung eines Transporters oder (II) proteolytischen Abbau. Das Nsr-Operon wird durch die Anwesenheit eines Zweikomponentensystems, eines BceAB-Typ-ABC-Transporters (SaNsrFP) und einer Serinprotease (SaNsr) charakterisiert. Nsr erkennt die C-terminalen Ringe D und E des Nisins und inaktiviert es durch Abspaltung der letzten sechs Aminosäuren, welche die antibakterielle Wirkung um den Faktor 10<sup>2</sup> reduzieren [8]. Da diese Resistenzproteine die Wirkung von Lantibiotika inhibieren, wurden zwei Ansätze gewählt, um ihre Funktion zu umgehen: (I) Inhibition der Resistenzproteine und (II) Entwicklung von inerten Varianten.

Spezifische Inhibitoren würden die Resistenz eines humanpathogenen Bakteriums aufheben. Als Startpunkt wurden daher Inhibitoren evaluiert, die vergleichbare Struktureigenschaften wie der Erkennungsbereich des Nisins besitzen. Ein Phenylharnstoffderivat (SaNSR) konnte als spezifischer Nsr-Inhibitor mittels Dosis-Wirkungs-Analysen identifiziert werden (**Abb. 2**, [9]). Dieses Beispiel belegt das Potenzial derartiger Ansätze, um Inhibitoren zu identifizieren.

Ein anderer Ansatz, die Lantibiotikaresistenz zu umgehen, ist die genetische Veränderung bekannter Lantibiotika. Eine Studie konnte zeigen [10], dass die Veränderung einer einzigen Aminosäure in Nisin H (*S. hyotintestinalis* DPC 6484) die Wirksamkeit gegen Resistenzproteine oder resistente Pathogene beeinflussen kann. Hierzu wurde Position 1 durch Valin substituiert und die antimikrobiellen Eigenschaften untersucht (**Abb. 3**). Die Mutante besaß ein leicht gesteigertes Potenzial gegen SaNsr/NsrFP-exprimierende *Lactobacillus lactis*-Stämme. Gegen humane Pathogene wie *Staphylococcus aureus* oder *Enterococcus faecium* konnte sowohl für Nisin H als auch seine Variante im Vergleich zu Nisin eine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. Diese Studie demonstriert, dass biotechnologische Ansätze die Antibiotikaresistenz humanpathogener



▲ **Abb. 1:** Das Nisin-Operon aus *Lactococcus lactis*. Die Proteine der Biosynthese NisB (blau), NisC (türkis), NisT (grün) und NisP (dunkelgrün) sind links abgebildet. Die Regulationsproteine NisK (rot) und NisR (orange) befinden sich im mittleren Teil, während die Immunitätsproteine NisI (grau) und NisFEG (braun) rechts dargestellt sind. NisB katalysiert die Dehydrierung der Aminosäuren Serin und Threonin innerhalb des Kernpeptids von pre-Nisin, welche in ihrer dehydrierten Form zur Ringbildung durch die Cyclase NisC mit den enthaltenen Cysteinen genutzt werden. Zur vollen Entfaltung der Aktivität wird pre-Nisin mithilfe eines ABC-Transporters (NisT) exportiert und das Signalpeptid durch die Protease (NisP) entfernt. Aktives Nisin wird durch die Immunitätsproteine (NisI und NisFEG) inaktiviert, während das Zweikomponentensystem (NisK und NisR) in Gegenwart ausreichender Konzentration von Nisin die Expression der Proteine des Nisin-Operons induziert.

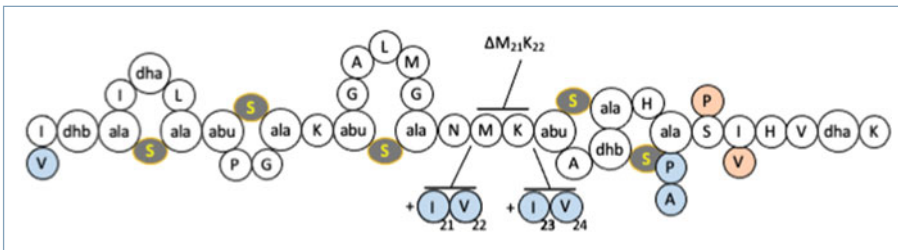


▲ **Abb. 2:** Umgehung der Resistenz durch einen Inhibitor. **A,** Schema der Dosis-Wirkungs-Kurven für einen SaNSR-exprimierenden Stamm (blau) und einen Kontrollstamm (schwarz) im Vergleich zu einem SaNSR-Stamm, der mit einem Inhibitor und Nisin behandelt wurde (pink). **B,** Darstellung der Struktur von SaNSr und seiner Bindetasche (gold) mit dem bindenden Inhibitor NPG9 (grün). SaNSr mit seiner katalytische Dyade His98 und Ser236 ist im Hintergrund gezeigt. Im Ausschnitt ist die Oberflächenstruktur der Bindetasche von SaNSr mit gebundenem Inhibitor (grün) dargestellt.

Bakterien teilweise oder ganz aufgeben können und eine Alternative darstellen, das akute Problem zunehmender Antibiotika-resistenzen zu umgehen.

**Biotechnologische Optimierung von Nisin**

Als dritte Möglichkeit kann eine biotechnologische Optimierung durchgeführt werden. Am Beispiel des Nisins wurde hierzu ein rationaler Ansatz mittels Punktmutationen verfolgt. Eine Mutation von Cystein an Position 28 zu Alanin verhindert die Ausbildung des letzten Lantioninrings (Ring E), wodurch die Fähigkeit des Resistenzproteins Nsr, diese Variante zu erkennen, sinkt. Aber auch die antimikrobielle Aktivität war reduziert. In einem zweiten Schritt wurde daher Cystein zu Prolin verändert (**Abb. 3**). In dieser Mutante blieb die antimikrobielle Aktivität erhalten, während die Nsr-Resistenz weiterhin reduziert war. Experimentell konnte zudem gezeigt werden, dass Nisin C28P



**Abb. 3:** Nisin A. In blau sind die Mutationen durch rationales Design hervorgehoben: Der Austausch von Isoleucin (I) zu Valin (V) an Position 1, die Veränderung von Cystein 28 zu Alanin (A) und Prolin (P) sowie die Addition von Isoleucin und Valin in der Scharnier-Region. Reste, die einer Sättigungsmutagenese unterworfen wurden, sind orange dargestellt. Zur Verdeutlichung wurden ebenfalls die deletierten Aminosäuren Methionin (M) und Lysin (K) in der Scharnier-Region markiert.

nicht nur eine antibakterielle Wirkung gegen *L. lactis*, sondern auch gegen nosokomiale *S. aureus* und *E. faecalis* Stämme besaß [11].

Über eine Sättigungsmutagenese an Position 2 konnte die Expression bei gleichbleibender biologischer Aktivität auf das Niveau des Nisins angehoben werden. Diesmal wurde neben Position 29 auch Position 30 verändert (**Abb. 3**). Die beste Variante, NisinA\_S29P\_I30V, besaß eine 7,5fach höhere Aktivität gegenüber *L. lactis*. Viel wichtiger, diese Variante besaß im Gegensatz zu Nisin eine antimikrobielle Aktivität gegen lantibiotikaresistente *Streptococcus uberis*- und *Enterococcus casseliflavus*-Stämme [12].

Neben Ring E ist die Scharnier-Region von Interesse. Diese Region ist für die Porenbildung von Nisin essenziell und wurde als wichtiger pharmazeutischer Hotspot identifiziert. Deletionsmutanten belegten, dass eine Kürzung der Scharnier-Region zu einer Versteifung von Nisin führt (**Abb. 3**). Dadurch kann nach Bindung an Lipid II keine Pore in der Zellmembran ausgebildet werden. Eine Verlängerung dieser Region durch die Aminosäuren Isoleucin (I) und Valin (V) wies jedoch wie Nisin ein Wirkspektrum im nanomolaren Bereich auf – und Porenbildung, wenn auch verlangsamt, wurde ebenfalls nachgewiesen. Der Einfluss dieser Mutationen auf Resistenzmechanismen wurde anhand zweier Modeltransporter untersucht: NisFEG (Immunität) und SaNsrFP (Resistenz). In beiden Fällen blieb die antimikrobielle Wirkung erhalten, während die Erkennung durch NisFEG und SaNsrFP ineffizient erfolgte [11].

Diese Zusammenfassung belegt hoffentlich, dass Lantibiotika ein enormes Potenzial besitzen, das sicherlich durch biotechnologische Ansätze gesteigert werden kann. Eventuell eröffnet sich damit auch die Möglichkeit, Lantibiotika großflächig gegen Bakterien einzusetzen ohne neue Resistenzen zu generieren.

### Danksagung

Wir danken allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Biochemie und der DFG für finanzielle Unterstützung (Schm1279/13-1 (L.S.) und GRK2158 (S.S.)).

### Literatur

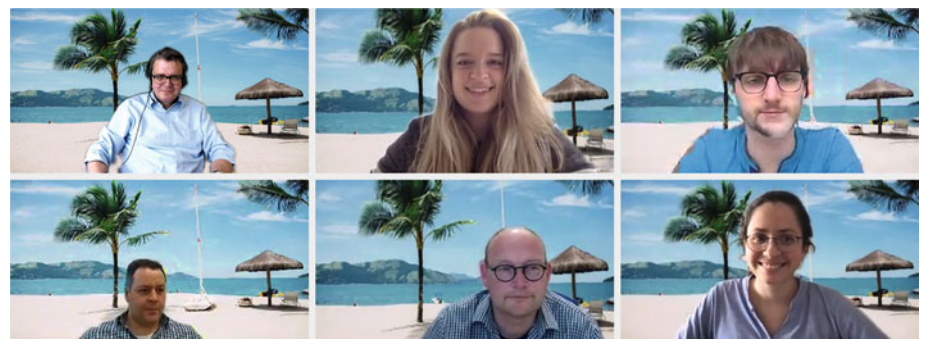
- [1] Repka LM, Chekan JR, Nair SK, van der Donk WA (2017) Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. *Chem Rev* 117: 5457–5520
- [2] van Heel AJ, Kloosterman TG, Montalban-Lopez M et al. (2016) Discovery, production and modification of five novel lantibiotics using the promiscuous nisin modification machinery. *ACS Synth Biol* 5: 1146–1154
- [3] Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013) Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11: 95–105

- [4] Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3: 777–788
- [5] van den Berg van Saparoea HB, Bakkes PJ, Moll GN, Driessen AJ (2008) Distinct contributions of the nisin biosynthesis enzymes NisB and NisC and transporter NisT to prenisin production by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 74: 5541–5548
- [6] Alkhatib Z, Abts A, Mavaro A et al. (2012) Lantibiotics: how do producers become self-protected? *J Biotechnol* 159: 145–154
- [7] Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG et al. (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem* 270: 27299–27304
- [8] Khosa S, Frieg B, Mulnaes D et al. (2016) Structural basis of lantibiotic recognition by the nisin resistance protein from *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* 6: 18679
- [9] Porta N, Zschke-Kriesche J, Frieg B et al. (2019) Small-molecule inhibitors of nisin resistance protein NSR from the human pathogen *Streptococcus agalactiae*. *Bioorg Med Chem* 27: 115079
- [10] Reiners J, Lagedroste M, Gottstein J et al. (2020) Insights in the antimicrobial potential of the natural nisin variant nisin H. *Front Microbiol* 11: 573614
- [11] Zschke-Kriesche J, Reiners J, Lagedroste M, Smits S H J (2019) Influence of nisin hinge-region variants on lantibiotic immunity and resistance proteins. *Bioorg Med Chem* 27: 3947–3953
- [12] Field D, Blake T, Mathur H et al. (2019) Bioengineering nisin to overcome the nisin resistance protein. *Mol Microbiol* 111: 717–731

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized 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:

Prof. Dr. Lutz Schmitt  
 Institut Biochemie I  
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 Universitätsstraße 1  
 D-40225 Düsseldorf  
 lutz.schmitt@hhu.de  
 www.biochemistry1.hhu.de



Oben: Lutz Schmitt, Vivien Knosp und Hans Klose (v. l. n. r.), unten: Jens Reiners, Sander Smits und Julia Gottstein (v. l. n. r.).