

Reinigung und teilweise Charakterisierung der Tryptophan-7-Halogenase (PrnA) aus *Pseudomonas fluorescens***

Sascha Keller, Tobias Wage, Kathrin Hohaus, Manuela Hölzer, Eric Eichhorn und Karl-Heinz van Pée*

Professor Franz Lingens zum 75. Geburtstag gewidmet

Die Bildung organischer Halogenverbindungen in der Natur ist durchaus keine Seltenheit.^[1] Gegenüber dem hohen Kenntnisstand bezüglich der Metabolite besteht jedoch ein großer Mangel an Wissen über die Mechanismen der Bildung dieser Verbindungen. Lange nahm man an, dass Haloperoxidasen für die Einführung der Halogenatome verantwortlich sind.^[2,3] Haloperoxidasen katalysieren die Einführung von Halogenatomen über die Oxidation der Halogenidionen Iodid, Bromid und Chlorid mit Wasserstoffperoxid. Die dabei entstehenden enzymgebundenen Zwischenstufen sind sehr instabil und letztendlich wird hypohalogenige Säure gebildet, wodurch es zu unspezifischen Halogenierungsreaktionen kommt, die man von einer enzymatischen Reaktion nicht erwarten würde.^[4,5] Allerdings gibt es durchaus Bereiche in der belebten Natur, in denen unspezifische Halogenierungen eine wichtige Bedeutung haben, wie beim Abwehrmechanismus von Säugerzellen gegen Eindringlinge. Hier spielt z. B. die Myeloperoxidase eine wichtige Rolle.^[6] Für die gezielte Bildung komplexer halogenierter Naturstoffe ist ein solcher Mechanismus aber wenig sinnvoll.^[3] Hinweise auf einen anderen Mechanismus für die Bildung von Halogenverbindungen in der Natur wurden bei Untersuchungen zur Biosynthese von Barbamid erhalten, das von dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* synthetisiert wird. Diese Ergebnisse deuten auf einen Radikalmechanismus für die Bildung der Trichlormethylgruppe in Barbamid hin.^[7,8]

Molekulargenetische Untersuchungen zu den Biosynthesen der Antibiotika 7-Chlortetracyclin und Pyrrolnitrin haben ergeben, dass an der Bildung dieser Halogenmetabolite keine Haloperoxidasen beteiligt sind.^[9–11] Im Zuge der Aufklärung der Pyrrolnitrin-Biosynthese wurde entdeckt, dass es halo-

genierende Enzyme gibt, die Nicotinamadenindinucleotid (NADH) für die Katalyse der Halogenierungsreaktion benötigen.^[12] Eines der beiden an der Pyrrolnitrin-Biosynthese beteiligte Enzyme katalysiert die regioselektive Chlorierung von Tryptophan **1** zu 7-Chlortryptophan **2** (siehe Schema 1). Diese Tryptophan-7-Halogenase (Trp-7-Hal), PrnA, wurde nun gereinigt und teilweise charakterisiert.

Die Reinigung bis zur Homogenität erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie, Chromatographie an hydrophober Phase und Molekularsieb(Gelfiltrations)-Chromatographie (Abbildung 1, Tabelle 1). Bereits im ersten Schritt

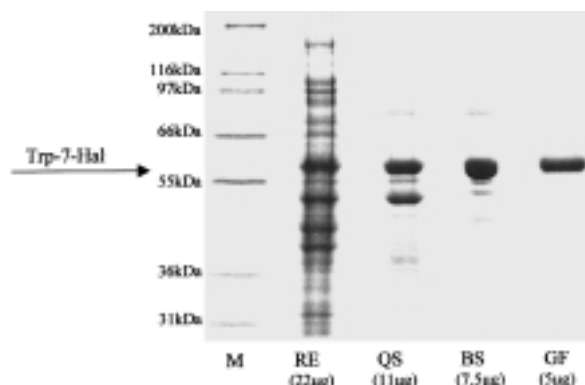


Abbildung 1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der verschiedenen PrnA-Reinigungsschritte. M: Marker-Proteine; RE: Rohextrakt; QS: Pool der Q-Sepharose; BS: Pool der Butyl-Sepharose; GF (Gelfiltration): Pool der Molekularsiebsäule; die Zahlen in Klammern geben die aufgetragenen Proteinmengen an.

Tabelle 1. Übersicht zur Reinigung von PrnA (Abbildung 1); die Aktivitäten (in Units, U) sind nach Zugabe von Reduktase bestimmt worden. Ohne Reduktase wiesen die GF-Fractionen keine Aktivität mehr auf.

Reinigung	Gesamtprotein [mg]	Aktivität [mU] [nmol min ⁻¹]	spez. Aktivität [µU mg ⁻¹] [pmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	Ausb. [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	2789.9	96.3	34.5	100.0	1.0
QS-Pool	221.3	92.6	418.4	96.2	12.1
BS-Pool	90.2	47.53	527.0	49.4	15.3
GF-Pool	12.5	9.12	730.0	9.5	21.2

[*] Prof. Dr. K.-H. van Pée, Dipl.-Chem. S. Keller, Dipl.-Chem. T. Wage, Dr. K. Hohaus, Dr. M. Hölzer
Institut für Biochemie der Technischen Universität Dresden
Mommensenstraße 13, 01062 Dresden (Deutschland)
Fax: (+49) 351-463-5506
E-mail: Karl-Heinz.vanPee@chemie.tu-dresden.de

Dipl.-Biotech. E. Eichhorn
Institut für Mikrobiologie, ETH
ETH-Zentrum, 8092 Zürich (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Graduiertenkollegs Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bei Heterocyclen, durch das Environment and Climate Research and Technology Development Programme der Europäischen Union, vom Sächsischen Staatsministerium für Umwelt und Landesentwicklung, von der Max-Buchner-Stiftung und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. *P. fluorescens* BL915ΔORF1-4 mit pPEH14(*prnA*) und pPEH14(*prnC*) wurden von Dr. J. M. Ligon, Novartis Agribusiness Biotechnology Research, Inc., Research Triangle, NC (USA), bezogen und die NADH-Oxidase aus *Thermus thermophilus* wurde von Prof. Helmut Erdmann, Fachhochschule Flensburg, zur Verfügung gestellt.

dieser Reinigung wird eine für die Aktivität unbedingt notwendige Proteinkomponente partiell abgetrennt (Abbildung 2). Bei dem abgetrennten Protein handelt es sich um eine Flavin-Reduktase, die Flavinadenindinucleotid (FAD) mit Hilfe von NADH zu FADH₂ reduziert. Das für diese Reaktion benötigte FAD ist nach dem ersten säulenchromatographischen Schritt noch vorhanden, wird allerdings in den nachfolgenden Schritten ebenfalls abgetrennt.

Die Notwendigkeit einer zweiten Komponente war sehr überraschend, da aufgrund der molekulargenetischen Daten davon ausgegangen werden musste, dass keine zweite Proteinkomponente benötigt wird.^[11] Offensichtlich liegt das Gen für diese zweite Komponente nicht in dem aus vier Genen (*prnA-D*) bestehenden Biosynthesecuster. Bei der Flavin-Reduktase handelt es sich um ein unspezifisches Enzym, da die Reduktase aus dem *Pseudomonas*-Stamm durch Flavin-Reduktasen aus anderen Bakterien ersetzt werden kann, z. B.

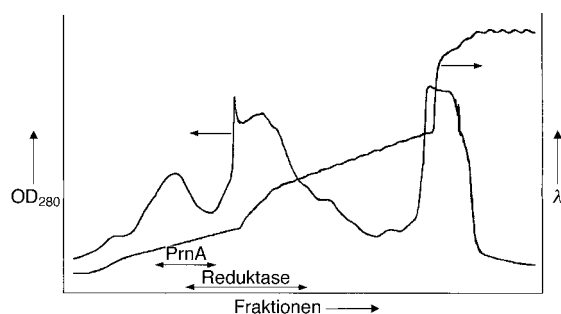


Abbildung 2. Elutionsdiagramm des Anionenaustauschschritts. QS-Pool: PrnA-enthaltende Fraktionen, die für die weitere Reinigung verwendet wurden; Aktivator-Komponenten-Pool: Reduktase-enthaltende Fraktionen. OD_{280} = optische Dichte bei 280 nm; λ = Leitfähigkeit.

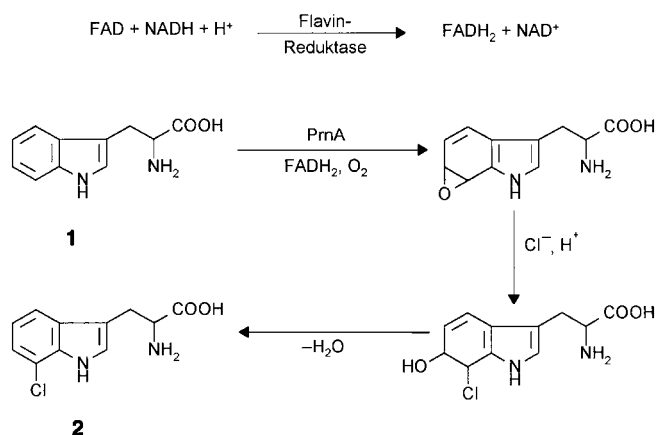
durch SsuE, die Flavin-Reduktase-Komponente der Alkan-sulfonat-Monooxygenase aus *E. coli*,^[13] oder die NADH-Oxidase aus *Thermus thermophilus*.^[14] Obwohl für diese Flavin-Reduktasen Flavinmononucleotid (FMN) das bessere Substrat ist, wird für die Halogenierung nur FAD akzeptiert. Offensichtlich ist die Tryptophan-7-Halogenase spezifisch für $FADH_2$.

Die Möglichkeit, die Flavin-Reduktase aus *P. fluorescens* durch eine Flavin-Reduktase aus *E. coli* zu ersetzen, erklärt auch, weshalb *E. coli* Pyrrolnitrin bilden kann, wenn es nur die vier Gene des Pyrrolnitrin-Biosynthesecusters ohne das Reduktase-Gen auf einem Plasmid enthält.^[11] Auch die zweite, bisher bekannte NADH/FAD-abhängige Halogenase, die Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase (PrnC), ist ein Zwei-Komponenten-System und benötigt eine Flavin-Reduktase als zweite Komponente.

Nach dem hypothetischen Mechanismus der neuen Halogenasen ist für die Einführung des Chloridions eine Aktivierung des organischen Substrats durch Sauerstoff notwendig.^[12] Die Sauerstoffabhängigkeit konnte durch Inkubation unter anaeroben Bedingungen bestätigt werden. Ohne Sauerstoff konnte keine Halogenierungs-Aktivität gemessen werden. Die absolute Notwendigkeit von Sauerstoff, FAD und NADH für die Reaktion deutete sehr stark auf eine Monooxygenase-Reaktion hin, wie sie bereits früher postuliert worden war.^[12] Bei diesen Monooxygenasen^[15–17] reagiert eine Flavin-Reduktase mit FAD und NADH unter Bildung von $FADH_2$, das dann mit Sauerstoff ein Flavinhydroperoxid bildet. Dieses kann dann an Doppelbindungen angreifen und zur Bildung eines Epoxids führen. Durch regioselektiven Angriff von Chlorid entsteht ein Halogenhydrin. Die spezifische Abspaltung von Wasser liefert dann das chlorierte Endprodukt (Schema 1). Gene solcher Halogenasen wurden inzwischen auch in anderen Halogenmetaboliten-produzierenden Bakterien gefunden.^[18–21] Offensichtlich handelt es sich hierbei um einen Hauptmechanismus für die spezifische Bildung von Halogenmetaboliten.

Experimentelles

Für die Reinigung der Tryptophan-7-Halogenase wurde *P. fluorescens* BL915ΔORF1-4, der das Tryptophan-7-Halogenase-Gen auf einem Plasmid [pPEH14(*prnA*)] trägt, eingesetzt.^[11] Nach 3 d Züchtung in Mais-Melasse-Komplettmedium bei 30 °C wurden die Zellen abzentrifugiert,



Schema 1. Hypothetischer Reaktionsmechanismus der $FADH_2$ -abhängigen Tryptophan-7-Halogenase-Reaktion.

gewaschen und nach Resuspension in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.2) mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation wurde der Rohextrakt gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.2) dialysiert und auf eine Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose FF, Pharmacia) aufgetragen. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten (0–0.5 M). Die Fraktionen, in denen durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) PrnA nachgewiesen wurde, wurden zusammengegeben. Die Flavin-Reduktase wurde teilweise mit PrnA überlappend etwas später im Gradienten eluiert (siehe Abbildung 2). Reduktase, die kein PrnA mehr enthielt, wurde extra gepoolt und gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer dialysiert. Für die weitere Reinigung wurde der PrnA-Pool mit Ammoniumsulfat (1 M) versetzt und auf eine Säule mit Butyl-Sepharose 4FF gegeben. Eluiert wurde mit einem linearen, absteigenden Gradienten von 1–0.5 M Ammoniumsulfat. Die Fraktionen, die laut Analyse durch SDS-PAGE PrnA enthielten, wurden zusammengegeben, durch Ultrafiltration konzentriert und auf eine HiLoad-16/60-Superdex-200-Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, der 1 M Ammoniumsulfat enthielt. Die Fraktionen wurden elektrophoretisch analysiert und diejenigen, welche PrnA enthielten, wurden zusammengegeben, gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit 25 % Glycerin dialysiert und durch Ultrafiltration konzentriert.

Die Halogenierungs-Aktivität wurde durch Inkubation von 55 μ L der PrnA-haltigen Proteinlösung mit 110 μ L der Reduktase-haltigen Lösung bzw. 3.5×10^{-4} Units SsuE oder 7×10^{-4} Units NADH-Oxidase aus *Thermus thermophilus*, 10 μ M FAD, 100 mM NaCl, 0.6 mM **1** und 2.4 mM NADH in einem Gesamtvolumen von 200 μ L in 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.2) bestimmt. Nach 6 h Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion, wie bereits beschrieben, abgebrochen und per HPLC analysiert.^[12]

Für die Untersuchung der Sauerstoffabhängigkeit wurde der Sauerstoffgehalt sämtlicher Lösungen durch Spülen mit Argon weitmöglichst verringert.

Für die Anreicherung von PrnC wurde *P. fluorescens* BL915ΔORF1-4 eingesetzt, das das Monodechloraminopyrrolnitrin-3-Halogenase-Gen auf einem Plasmid [pPEH14(*prnC*)] trägt.^[11] Die Züchtung der Zellen und die Herstellung der Rohextrakte wurden wie für PrnA beschrieben durchgeführt. PrnC wurde durch eine Ammoniumsulfatfällung bei 25–45 % Sättigung angereichert.

Eingegangen am 14. Januar 2000 [Z14537]

- [1] G. W. Gribble, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1966**, 68, 1–5.
- [2] S. L. Neidleman, J. Geigert, *Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, **1986**.
- [3] K.-H. van Pée, *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, 50, 375–399.
- [4] M. C. R. Franssen, *Biocatalysis* **1994**, 10, 87–111.
- [5] M. Sundaramoorthy, J. Turner, T. L. Poulos, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 461–473.
- [6] H. B. Dunford, *Heme Peroxidases*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

- [7] N. Sitachitta, J. Rossi, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, M. D. Flötscher, C. L. Willis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7131–7132.
- [8] J. Hartung, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1287–1288; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1209–1211.
- [9] T. Dairi, T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsumata, M. Hasegawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1099–1106.
- [10] S. Kirner, S. Krauss, G. Sury, S. T. Lam, J. M. Ligon, K.-H. van Pée, *Microbiology* **1996**, *142*, 2129–2135.
- [11] P. E. Hammer, D. S. Hill, S. T. Lam, K.-H. van Pée, J. M. Ligon, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2147–2154.
- [12] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2102–2104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2012–2013.
- [13] E. Eichhorn, J. R. van der Ploeg, T. Leisinger, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26639–26646.
- [14] H. J. Hecht, H. Erdmann, H.-J. Park, M. Sprinzl, R. D. Schmid, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 1109–1114.
- [15] M. Witschel, S. Nagel, T. Egli, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6937–6943.
- [16] R. J. Parry, W. Li, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23303–23311.
- [17] M. A. Kertesz, K. Schmidt-Larbig, T. Wüest, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 1464–1473.
- [18] A. van Wageningen, P. N. Kirkpatrick, D. H. Williams, B. R. Harris, J. K. Kershaw, N. J. Lennard, M. Jones, S. J. M. Jones, P. J. Solenberg, *Chem. Biol.*, **1998**, *5*, 155–162.
- [19] S. Pelzer, R. Stübner, D. Heckmann, J. Recktenwald, P. Huber, G. Jung, W. Wohlleben, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1565–1573.
- [20] B. Nowak-Thompson, N. Chaney, J. S. Wing, S. J. Gold, J. E. Loper, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2166–2174.
- [21] K.-H. van Pée, S. Keller, T. Wage, I. Wynands, H. Schnerr, S. Zehner, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 1–5.

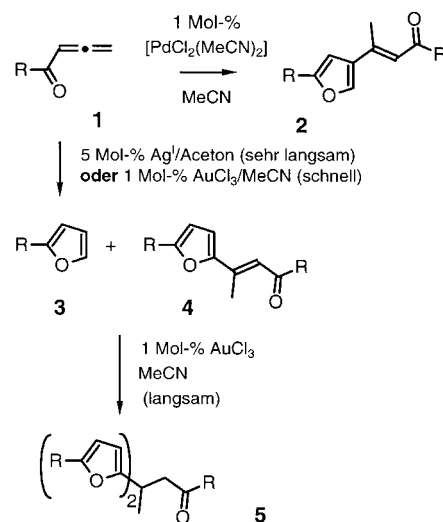
Eine neue Gold-katalysierte C-C-Bindungsknüpfung**

A. Stephen K. Hashmi,* Lothar Schwarz, Ji-Hyun Choi und Tanja M. Frost

Während die Organometallchemie des Goldes mannigfaltig ist, sind nur wenige katalytische Anwendungen für Gold bekannt;^[1] in der *homogenen* Katalyse organischer Reaktionen findet man nur zwei Reaktionen, die eine gewisse Bedeutung erlangt haben. Die eine ist eine C-Heteroatom-Bindungsknüpfung, es handelt sich um die von Utimoto et al.^[2] und Teles et al.^[3] entwickelte Addition von O- oder N-Nucleophilen an Alkene oder Alkine. Die zweite Anwendung ist eine C-C-Bindungsknüpfung, es ist die von Ito und Hayashi et al. sowie Togni et al.^[4] entwickelte asymmetrische Aldolreaktion. Wir berichten nun über eine neue, Gold-

katalysierte Reaktion, die C-O- und C-C-Bindungsknüpfung miteinander kombiniert und die selektive Cycloisomerisierung/Kreuzdimerisierung von terminalen Allenylketonen und α,β -ungesättigten Ketonen ermöglicht.

Im Verlauf unserer Untersuchungen von Übergangsmetall-katalysierten Reaktionen der gut verfügbaren Allenylketone **1** beobachteten wir,^[5] dass bestimmte Substrate mit elektronenreichen Substituenten wie **1a** in der Ag^I-katalysierten Marshall-Reaktion^[6] neben **3** als Hauptprodukt auch das Cycloisomer/Dimer **4** als Nebenprodukt bilden. **4** ist ein Konstitutionsisomer des aus den Pd^{II}-katalysierten Umsetzungen von **1** erhaltenen Cycloisomers/Dimers **2** (Schema 1).^[7]



	Ausbeute [%] an		
1-5	2	3	4
a: R = 4-(TBDMSO)C ₆ H ₄	59	-	-
Pd ^{II}	-	22	14
Ag ^I	-	22	14
Gold-Katalyse		3 ^{a)}	4 ^{a)} 5 ^{b)}
b: R = CH ₂ -4-(MeO)C ₆ H ₄	60	31	-
c: R = CH ₂ -4-(TBDMSO)C ₆ H ₄	35	5	42
d: R = CH ₂ CH ₂ -4-(TBDMSO)C ₆ H ₄	38	6	31
e: R = 3-(MeO)C ₆ H ₄	34	38	-
f: R = 4-(O ₂ N)C ₆ H ₄	88	4	-
g: R = 2-(O ₂ N)C ₆ H ₄	72	8	-
h: R = 3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	29	24	-
i: R = 4-(MeS)C ₆ H ₄	48	51	-
k: R = CH ₃	47 ^{c)}	47	-
m: R = 2,5-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	45	36	-

Schema 1. Cycloisomerisierung, Dimerisierung und Trimerisierung von **1**. a) Sofortige Aufarbeitung nach Umsatz des Ausgangsmaterials. b) Aufarbeitung nach mehreren Stunden. c) Im Rohprodukt durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

Um **4** zum Hauptprodukt zu machen, testeten wir Au^{III}-Katalysatoren, bei denen ein dem Pd^{II} äquivalentes d⁸-System mit einem dem Silber ähnlichen Metall der Kupfertriade kombiniert ist. Die Gold-Katalysatoren erwiesen sich als extrem aktiv und erlaubten eine Durchführung der Reaktionen unter äußerst milden Bedingungen bei Raumtemperatur oder darunter. Dank der Abwesenheit von paramagnetischen Spezies konnten die Reaktionen gut NMR-spektroskopisch verfolgt werden. Mit 1 Mol-% an Katalysator betrugen die Reaktionszeiten bei 20 °C, abhängig vom Sub-

[*] Priv.-Doz. A. S. K. Hashmi, Dipl.-Chem. L. Schwarz, J.-H. Choi, T. M. Frost
Institut für Organische Chemie
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt a. M. (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29464
E-mail: hashmi@chemie.uni-frankfurt.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha 1932/5-1, Ha 1932/6-1) und den Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Goldsalze wurden von der Degussa-Hüls AG gespendet. A.S.K.H. ist Prof. Dr. M. Göbel für die Überlassung von Laborraum zu Dank verpflichtet.