

Enzymmechanismen

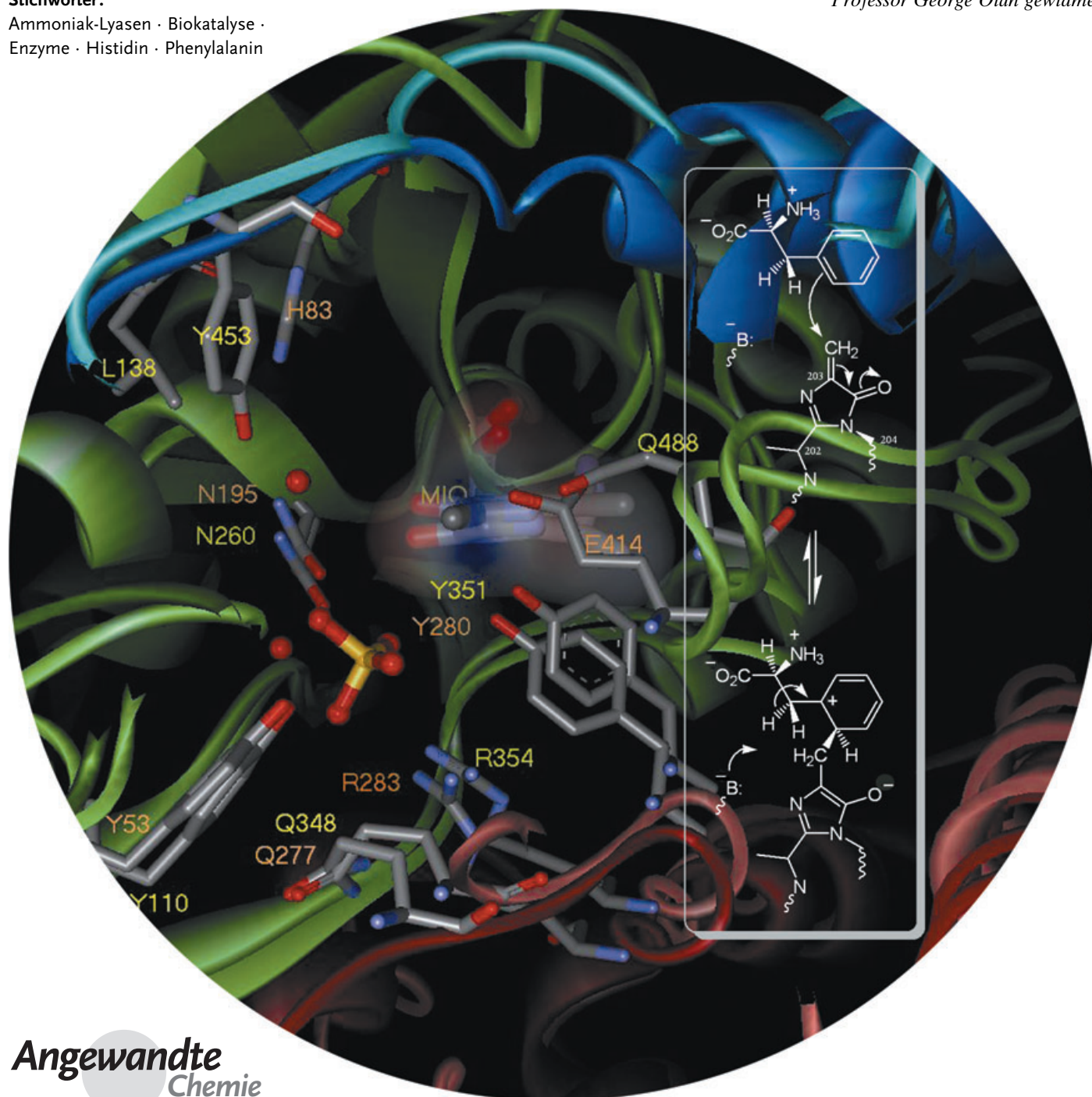
# Enzymatische Eliminierung von Ammoniak aus Histidin und Phenylalanin: der Friedel-Crafts-ähnliche Mechanismus

László Poppe und János Rétey\*

**Stichwörter:**

Ammoniak-Lyasen · Biokatalyse · Enzyme · Histidin · Phenylalanin

Professor George Olah gewidmet



Angewandte  
Chemie

**D**ie erstaunlich hohe katalytische Aktivität und Selektivität von Enzymen manifestiert sich einerseits in einer Beschleunigung der Zielreaktion und andererseits in der Unterdrückung alternativer Reaktionswege, die ohne das betreffende Enzym kinetisch kompetitiv oder sogar dominant wären. Histidin- und Phenylalanin-Ammoniak-Lyasen (HALs und PALs) z. B. bewirken eine Abspaltung des nicht-aciden  $\beta$ -Protons dieser Aminosäuren, ohne das weitaus acidere Ammonium-Proton anzutasten. Beide Ammoniak-Lyasen enthalten eine katalytisch wichtige elektrophile Gruppe, die während dreißig Jahren für Dehydroalanin gehalten wurde. Die Röntgenkristallstruktur von HAL ließ jedoch eine andere elektrophile Gruppe erkennen, nämlich 5-Methylen-3,5-dihydroimidazol-4-on (MIO), die UV-spektroskopisch auch in PAL nachgewiesen wurde. Kürzlich ermittelte Röntgenkristallstrukturen von PAL aus *Rhodospiridium toruloides* und *Petroselinum crispum* bestätigten das Vorliegen der MIO-Gruppe. Experimente legen nahe, dass die Reaktion durch einen elektrophilen Angriff von MIO auf den aromatischen Ring des Substrates gestartet wird. Diese Friedel-Crafts-ähnliche Reaktion aktiviert das  $\beta$ -Proton und führt zu seiner stereospezifischen Abspaltung mit nachfolgender Eliminierung von Ammoniak und Regenerierung der MIO-Gruppe. Die Plausibilität eines solchen Mechanismus wird durch ein synthetisches Modell gestützt. Diskutiert wird außerdem die Anwendung der PAL-Reaktion in der biokatalytischen Synthese von enantiomerenreinen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -arylpropionaten aus Arylacrylaten.

## 1. Einleitung

Fast alle biochemischen Prozesse werden von Enzymen katalysiert. Reaktionen, für die enzymatische Reaktionswege existieren, können bis zu  $10^{20}$  fach durch Enzyme beschleunigt werden. Eine noch größere Herausforderung bilden enzymkatalysierte Prozesse, die spontan nie stattfinden würden, weil entweder die entsprechenden Substrate unter den meisten Bedingungen völlig stabil sind oder alternative Reaktionen viel schneller ablaufen. Es wurde vorgeschlagen, dass Enzyme nicht nur katalytisch wirken, sondern auch konkurrierende Reaktionen unterbinden können. Dies ist besonders wichtig in Fällen, in denen hochreaktive Zwischenstufen auftreten. Davon abgesehen ist es aber eine allgemeine Eigenschaft von Enzymen, durch die sie eine hohe Reaktionsselektivität erreichen. Für diese Fähigkeit der Enzyme wurde der Begriff der „negativen Katalyse“ geprägt.<sup>[1]</sup> Gewisse Proteine wirken ausschließlich als negative Katalysatoren, z. B. Hämoglobin und Myoglobin, die reversibel Sauerstoff an ihrem Häm-Eisen ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) binden und dessen – in freiem Häm spontan ablaufende – Oxidation zu  $\text{Fe}^{\text{III}}$  verhindern.

Um hoch reaktive Zwischenstufen entstehen zu lassen, ist die Aktivierung von relativ stabilen Substraten nötig; Beispiele sind Reaktionen, die über radikalische Zwischenstufen verlaufen. Radikalinitiatoren sind z. B. Adenosylcobal-

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3735
2. HAL im Histidin-Metabolismus	3736
3. PAL im pflanzlichen und fungalen Stoffwechsel	3737
4. Zum Mechanismus der HAL- und PAL-Reaktion	3738
5. Aktive Zentren von HAL und PAL	3744
6. Inhibitoren und Substratanaloga für HAL und PAL	3747
7. Anwendung der Rückreaktion von HAL und PAL in der Biokatalyse	3750
8. Tyrosin-2,3-aminomutase: ein weiteres MIO-Enzym	3751
9. Schlussfolgerungen und Ausblick	3752

amin<sup>[1–3]</sup> (Coenzym- $\text{B}_{12}$ ) und S-Adenosylmethionin (SAM) in Kombination mit Eisenschwefel-Clustern.<sup>[4]</sup> Beide sind geschützte Formen des 5'-Desoxyadenosyl-Radikals, das durch

Einwirkung der entsprechenden Enzyme entstehen kann. Ein anderer Weg der Substrataktivierung beruht auf einem Angriff von Elektrophilen. Da die Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren nur nucleophile Gruppen enthalten, werden für die elektrophile Katalyse Cofaktoren oder posttranslational modifizierte Seitenketten eingesetzt. Die Rolle des elektrophilen Cofaktors, Pyridoxalphosphat, im Aminosäure-Metabolismus ist seit geraumer Zeit bekannt.<sup>[5]</sup> In jüngerer Zeit wurden mehrere posttranslationale Modifikationen beschrieben, die nucleophile in elektrophile Gruppen umwandeln (Tabelle 1).

Serin, dessen OH-Gruppe bei vielen Enzymreaktionen als Nucleophil eingreift, kann in Pyruvat umgewandelt werden.<sup>[6]</sup>

[\*] Prof. Dr. J. Rétey  
Institut für Organische Chemie  
Universität Karlsruhe  
Fritz-Haber-Weg 6  
76128 Karlsruhe (Deutschland)  
Fax: (+49) 721-608-4823  
E-mail: janos.retey@ioc.uka.de  
Prof. Dr. L. Poppe  
Institute of Organic Chemistry  
Research Group for Alkaloid Chemistry  
Budapest University of Technology and Economics  
1111 Budapest, Gellért tér 4 (Ungarn)

**Tabelle 1:** Umwandlung von nucleophilen in elektrophile Aminosäure-Seitenketten durch posttranslationale Modifikationen.

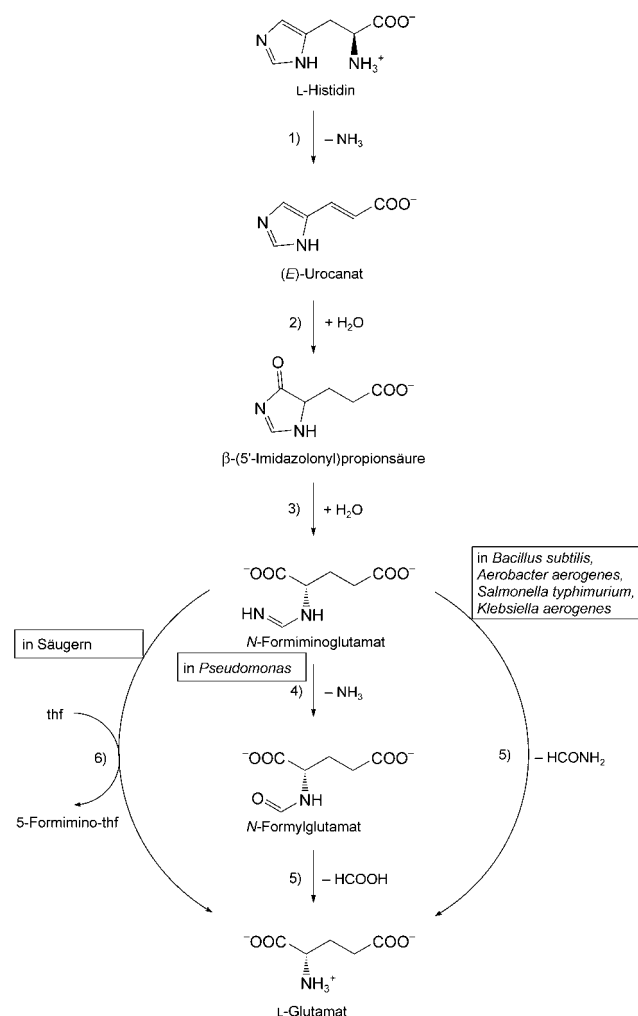
Vorstufe	elektrophile prothetische Gruppe	Enzym
Serin	Pyruvat	Histidin-Decarboxylase, SAM-Decarboxylase
Serin oder Cystein	MIO	Histidin-Ammoniak-Lyase (HAL), Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL)
Serin oder Cystein	Formylglycin	prokaryotische oder eukaryotische Arylsulfatasen
Tyrosin	Dopachinon	

Die Pyruvyl-Enzyme katalysieren ähnliche Reaktionen, wie solche, die Pyridoxalphosphat verwenden. Da sie nur in gewissen Bakterien vorkommen, kann man darüber spekulieren, ob die Pyruvyl-Gruppe der evolutionäre Vorläufer des Pyridoxalphosphats war. Eine andere Modifikation betrifft das innere Tripeptid, Ala-Ser-Gly, und führt zu dem sehr starken Elektrophil 5-Methylen-3,5-dihydroimidazol-4-on (MIO). Die entsprechenden Enzyme sind Gegenstand dieses Aufsatzes. Eine weitere, kürzlich entdeckte Modifikation der Seitenketten von Serin oder Cystein führt zu Formylglycin, das in prokaryotischen und eukaryotischen Arylsulfatasen vorkommt.<sup>[7]</sup> Weitere Modifikationen betreffen die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, die zu Chinonen oxidiert werden. Der Mechanismus der durch Chinoenzyme katalysierten Reaktionen wird intensiv erforscht.<sup>[8]</sup>

Schließlich soll die kürzliche Entdeckung der Modifikation Lysin→Pyrrolysin erwähnt werden.<sup>[9]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass eine spezifische Lysyl-t-RNA an der 6-Aminogruppe durch Bildung eines Amids mit (4*R*,5*R*)-4-substituierter Pyrrolin-5-carbonsäure modifiziert wird.<sup>[10]</sup> In einer noch neueren Arbeit wird berichtet, dass Pyrrolysin bereits vor Bindung an die t-RNA entsteht.<sup>[11]</sup> Das Codon für die so entstandene Pyrrolysyl-t-RNA ist das Stopp-Codon UAG. Präzedenz für eine solche prätranslationale Modifikation ist die Bildung von Selenocysteinyl-t-RNA aus einer spezifischen Seryl-t-RNA.<sup>[11,12]</sup>

## 2. HAL im Histidin-Metabolismus

Während der Katabolismus der meisten Aminosäuren mit einer Transaminierung zu den entsprechenden 2-Ketosäuren beginnt, wird Histidin auf einem anderen Weg abgebaut. Der erste Schritt des Histidin-Metabolismus (Schema 1) besteht in



**Schema 1.** Abbauweg des Histidins in verschiedenen Organismen; beteiligte Enzyme: 1) Histidin-Ammoniak-Lyase, 2) Urocanase, 3) Imidazolonpropionat-Hydrolase, 4) Formiminoglutamat-Hydrolase, 5) N-Formylglutamat-Aminohydrolase, 6) Glutamat-Formimino-Transferase.



László Poppe diplomierte an der Technischen Universität Budapest (BUTE) zum Chemie-Ingenieur und schloss dort 1987 seine Promotion bei L. Novák mit einer Arbeit zur Pheromon-Synthese und Biokatalyse ab. Nach Forschungsprojekten am zentralen Forschungsinstitut für Chemie der Ungarischen Wissenschaftlichen Akademie und am Institut für Organische Chemie der BUTE verbrachte er als Alexander von Humboldt-Stipendiat einen Aufenthalt am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Karlsruhe bei J. Rétey (1991–1992). Seine Interessensgebiete sind die stereoselektive Synthese von biologisch aktiven Verbindungen, selektive Biokatalyse und Mechanismen von Enzymreaktionen.



János Rétey studierte Chemie an der ETH Zürich und promovierte 1963 bei V. Prelog mit einer Arbeit zur Stereospezifität von Oxidoreduktasen. Nach Postdoc-Aufenthalten bei F. Lynen (München) und D. Arigoni (ETH Zürich) wurde er Oberassistent und Lehrbeauftragter an der ETH Zürich. 1972 erhielt er an der Universität Karlsruhe eine Professur für Biochemie und wurde im gleichen Jahr mit dem Alfred-Werner-Preis der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft ausgezeichnet. Seine Forschungsinteressen gelten den Mechanismen und der Stereospezifität von Enzymreaktionen, synthetischen Enzymmodellen und der Untersuchung von Enzymstrukturen mit molekularbiologischen Methoden.



der HAL-katalysierten Eliminierung von Ammoniak. Das Produkt, (*E*)-Urocanat, wird weiter zu Imidazolnpropionat umgesetzt, ein Prozess, der durch Urocanase (Urocanat-Hydratase, Imidazolnpropionat-Hydrolase) katalysiert wird.

Jede Untereinheit dieses Enzyms enthält ein fest gebundenes  $\text{NAD}^+$ , das als Elektrophil wirkt und ein kovalentes Addukt mit dem Imidazolring des Substrats bildet.<sup>[13]</sup> Das Resultat ist eine Umpolung, auf die eine Wasser-Addition unter Bildung von 4-Hydroxyimidazolpropionat folgt.<sup>[13]</sup> Dieses tautomerisiert spontan zu racemischem Imidazolnpropionat. Der nächste Schritt wird durch Imidazolnpropionat-Hydrolase katalysiert, die ihrerseits enantioselektiv für das *S*-konfigurierte Substrat ist. Da Imidazolnpropionat spontan racemisiert, resultiert eine kinetische Racemattrennung, die quantitativ (*S*)-Formiminoglutamat liefert. Die Formimino-Gruppe kann in einem oder zwei Schritten abgespalten werden, je nach Organismus. In Säugern wird sie durch Formimino-Transferase auf Tetrahydrofolat (thf) übertragen. In gewissen Bakterien wie *Bacillus subtilis*,<sup>[14]</sup> *Klebsiella aerogenes*<sup>[15]</sup> oder *Salmonella typhimurium*<sup>[16]</sup> finden zuerst Hydrolyse zu Formylglutamat und, in einem zweiten Schritt, zu Formiat und Glutamat statt.<sup>[17]</sup> Histidinämie, eine seltene, meist tödliche Krankheit beim Menschen, wird durch einen Defekt von HAL verursacht.<sup>[18]</sup>

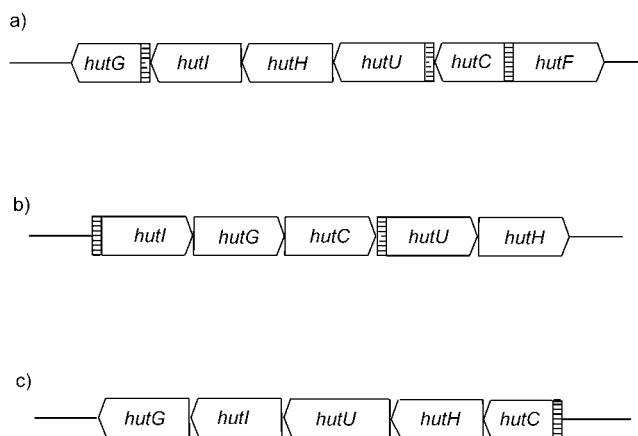
Urocanat ist Bestandteil des menschlichen Schweißes und schützt die Haut vor UV-Strahlung. Deren Einwirkung isomerisiert die *E*- zur *Z*-Form, was einen immunsuppressiven Prozess auslösen kann.<sup>[19]</sup> Ein Mangel an Urocanase in der Leber könnte die Ursache für geistiges Zurückbleiben sein.<sup>[20]</sup> Die kürzlich aufgeklärte Urocanase-Struktur ist im Einklang mit dem zuvor postulierten Mechanismus.<sup>[21]</sup>

Die Gene von *Pseudomonas putida*, die für HAL (*hutH*) und Urocanase (*hutU*) codieren, wurden kloniert und sequenziert.<sup>[22]</sup> Die HAL-Sequenzen aus Menschen-, Ratten- und Mäusegeweben sind in der Literatur beschrieben.<sup>[23]</sup>

In gewissen Bakterien befinden sich die strukturellen und regulatorischen Gene, die für die Histidin-Verwertungswege codieren, nebeneinander im *hut*-Operon (Abbildung 1).<sup>[24]</sup> In *P. putida* z. B. hat das *hut*-Operon sechs offene Leserahmen und vier Regionen, deren Transkription durch drei Promotoren reguliert wird. Die drei Strukturgene – *hutU*, *hutH* und *hutI* – sind negativ reguliert durch ein Promotor-Repressor-System. Die Expression aller drei Gene wird durch Urocanat induziert, nicht durch Histidin. Dies legt nahe, dass eine basale Expression von HAL benötigt wird. Es ist interessant, dass *hutF* in umgekehrter Richtung wie die anderen Gene transkribiert. Die Organisation des *hut*-Operons in anderen Bakterien unterscheidet sich von derjenigen in *P. putida*.<sup>[24]</sup> Nur *P. putida* enthält *hutF*, das für Formylglutamat-Amidohydrolase codiert.<sup>[14,24a,b]</sup>

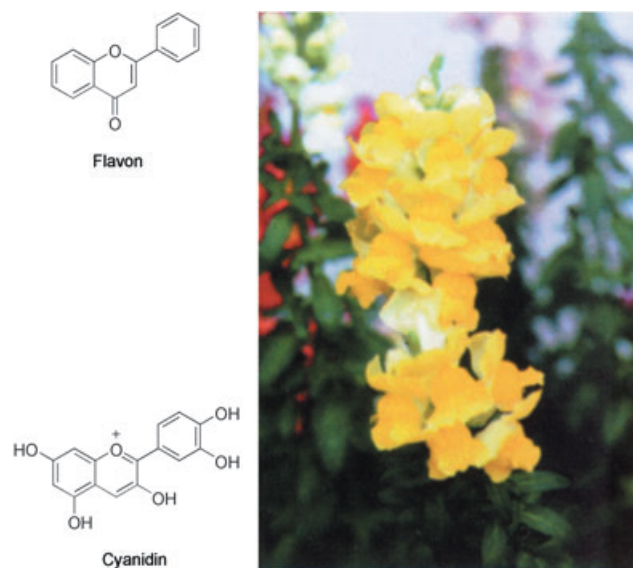
### 3. PAL im pflanzlichen und fungalen Stoffwechsel

Phenylalanin kann abhängig vom Organismus auf zwei unterschiedlichen Wegen abgebaut werden. Während bei Tieren und bei den meisten Bakterien die Umwandlung zur entsprechenden Ketosäure den ersten Schritt bildet, ist dies in Pflanzen,<sup>[25]</sup> Pilzen<sup>[26]</sup> und mindestens einem Bakterium<sup>[27]</sup> die



**Abbildung 1.** Struktur und Regulierung von Histidin verwertenden (*hut*-)Operons in a) *P. putida*, b) *Klebsiella aerogenes* und *Salmonella typhimurium*, c) *Bacillus subtilis*. Promotoren sind durch gestrichelte Abschnitte markiert, die Gen-Boxen zeigen die Richtung der Transkription an.

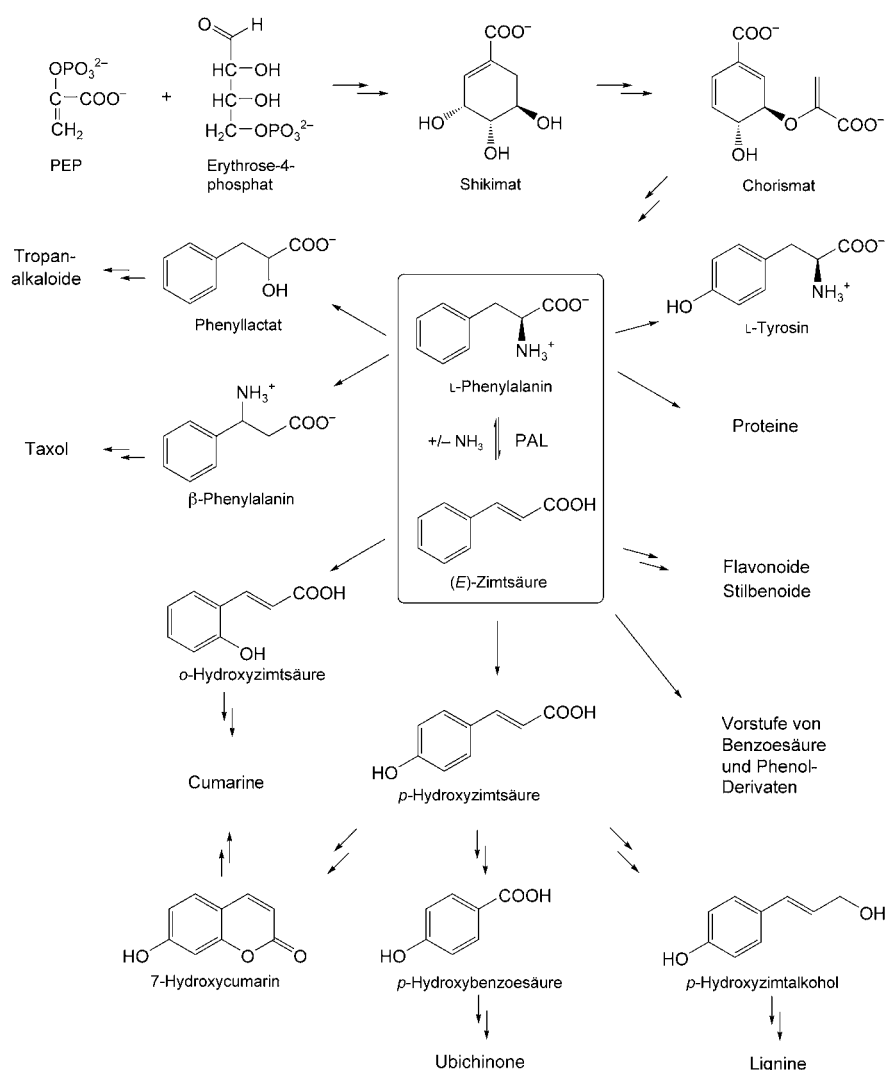
durch Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) katalysierte Eliminierung von Ammoniak.<sup>[28]</sup> Das Reaktionsprodukt ist (*E*)-Zimtsäure, die als Vorstufe einer großen Zahl von Pflanzenmetaboliten fungiert, darunter Lignin, Cumarinen und Flavonoiden.<sup>[25]</sup> Lignin ist die Hauptkomponente des Holzes, Flavonoide sind farbgebende Bestandteile bei Blumen (Abbildung 2). Durch gentechnische Manipulation



**Abbildung 2.** Farben der Pflanzenwelt: Anthocyane (Flavonoid-Pigmente).

lassen sich die Menge des Lignins oder der Flavonoide und damit die Farben von Blumen verändern.<sup>[29]</sup> Die Lyase PAL liegt an der Zweigstelle des primären und sekundären Metabolismus, was sie zu einem Zielmolekül für Herbizide macht.<sup>[30,31]</sup>

Schema 2 zeigt den Metabolismus von Phenylalanin in Pflanzen. Die Biosynthese des Phenylalanins folgt dem



Schema 2. Der Metabolismus von L-Phenylalanin.

wohlbekannten Shikimat-Weg.<sup>[31a]</sup> Hydroxylierung in *para*-Stellung führt zu Tyrosin, einer weiteren essenziellen Aminosäure. Umlagerung durch eine 2,3-Aminomutase ergibt  $\beta$ -Phenylalanin, eine Vorstufe von Taxol, das ein wichtiges Antitumormittel ist.<sup>[32]</sup> (E)-Zimtsäure, das unmittelbare Produkt der PAL-Reaktion, kann entweder in der *ortho*- oder *para*-Stellung unter Bildung von Cumarinen bzw. 4-Hydroxybenzoesäure hydroxyliert werden. Letztere ist ein Baustein des Ubichinons.<sup>[33,34]</sup>

In gewissen Pflanzen können substituierte Cumarsäuren zu den entsprechenden CoA-Estern umgewandelt werden. Ferulyl-CoA z.B. wird durch Hydroxycinnamoyl-CoA-Hydratase/Lyase umgesetzt.<sup>[34]</sup> Die vom mechanistischen Standpunkt interessante Reaktion besteht aus der  $\beta$ -Addition von Wasser an das Michael-System mit nachfolgender Retroaldol-Spaltung unter Bildung von Vanillin, einem wichtigen Geschmacksstoff, der letztlich zu Vanillinsäure oxidiert wird.

Eine teilgereinigte PAL aus *Rhodotorula glutinis* (auch bekannt als *Rhodospiridium toruloides*) ist kommerziell erhältlich.<sup>[35]</sup> Es ist das meistuntersuchte fungale PAL-Enzym.<sup>[26]</sup> Ebenfalls beschrieben wurden kürzlich die Isolierung

und die Eigenschaften von PAL aus *Streptomyces maritimus*,<sup>[27]</sup> der bisher einzigen bekannten PAL aus einem Bakterium. Die entstehende (E)-Zimtsäure könnte eine Vorstufe von spezifisch in Bakterien vorkommenden Produkten sein. Ein ähnlich gelagerter Fall ist die Entdeckung von Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) in *Rhodobacter capsulatus*.<sup>[36]</sup> Das rekombinante Enzym reagiert 150-mal schneller mit Tyrosin als mit Phenylalanin, entsprechend einem alternativen Weg zu *p*-Cumaroyl-CoA. Es ist an der Biosynthese des photoaktiven gelben Protein-Chromophors dieses Bakteriums beteiligt.

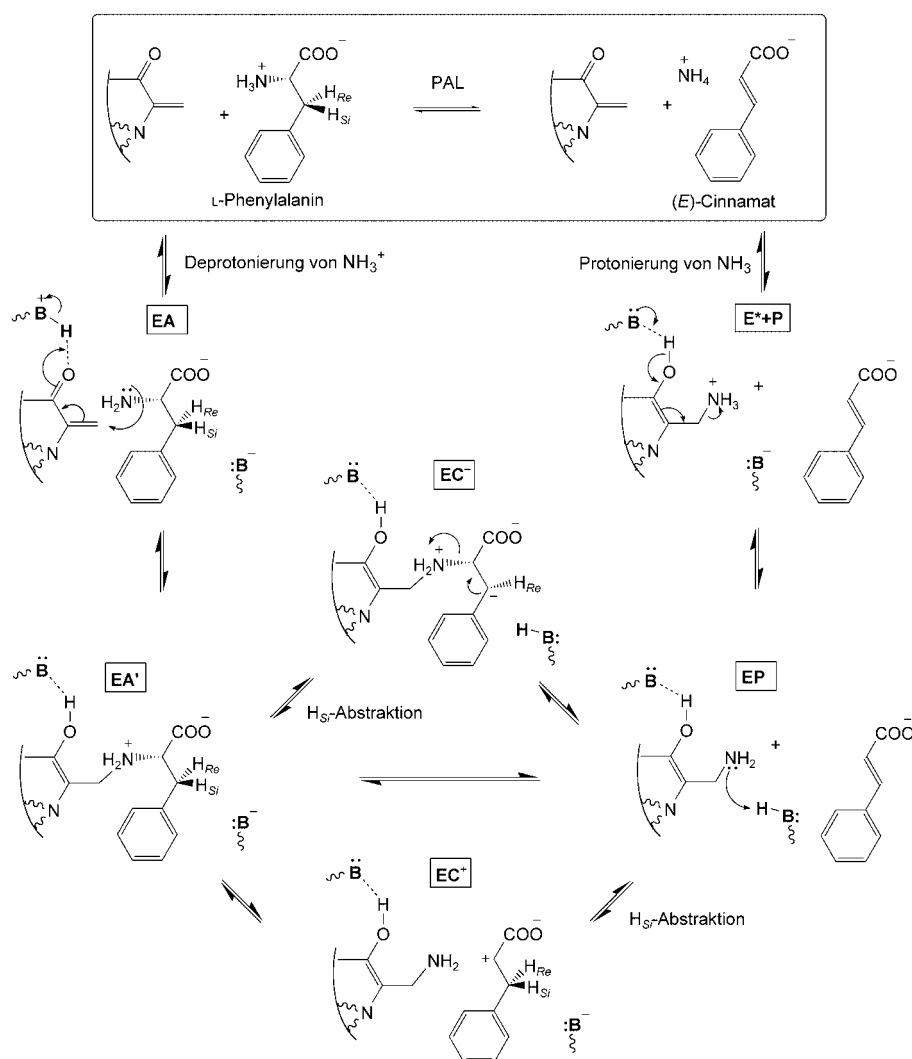
#### 4. Zum Mechanismus der HAL- und PAL-Reaktion

##### 4.1. Frühere Vorschläge zur Wirkungsweise von HAL und PAL: Entdeckung einer katalytisch wichtigen elektrophilen Gruppe

Nach der Aufklärung der Struktur der Urocaninsäure durch Hunter im Jahre 1912<sup>[37]</sup> wurde vorgeschlagen, dass sie als Zwischenstufe im Abbau des Histidins auftritt. Zellfreie Extrakte aus verschiedenen Organismen konnten Histidine in Glutamat umwandeln. Edlbacher nannte solche Systeme „Histidasen“. Später wurde der Name Histidase auf eines der Komponentenenzyme, das die Umwandlung von Histidin in Urocaninsäure und Ammoniak katalysiert, eingegrenzt. Die Reinigung des Enzyms aus *Pseudomonas putida* wurde 1954 durch Tabor und Mehler beschrieben.<sup>[17a]</sup> Die teilweise Charakterisierung erfolgte durch Peterkofsky.<sup>[39]</sup>

Ein Mechanismus für die HAL-Reaktion wurde erstmals durch Abeles und Mitarbeiter 1967 vorgeschlagen.<sup>[40]</sup> Sie fanden, dass Histidase eine katalytisch essenzielle elektrophile Gruppe enthält. Ein Hinweis darauf war die Inhibierung von HAL durch starke Nucleophile wie KCN, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> und NaBH<sub>4</sub>. Bei Verwendung von radiomarkierten Inhibitoren, z.B. [<sup>14</sup>C]CN<sup>-</sup><sup>[41]</sup> oder [<sup>3</sup>H]NaBH<sub>4</sub>,<sup>[42]</sup> lieferte die Totalhydrolyse des inhibierten Proteins [<sup>14</sup>C]Aspartat bzw. [<sup>3</sup>H]Alanin. Aufgrund dieser Resultate hat man gefolgert, dass es sich bei dem prosthetischen Elektrophil um Dehydroalanin handelt, das sich wie ein Michael-Acceptor verhält. Es wurde nun vorgeschlagen, dass die Aminogruppe des Substrates mit dem Dehydroalanin-Rest reagiert, wobei die Abgangsgruppenqualität der positiv geladenen Aminogruppe erhöht wird.<sup>[40]</sup> Nachfolgend nennen wir dies den E<sub>1</sub>cB-Mechanismus.

Obwohl der E<sub>1</sub>cB-Mechanismus inklusive des EC<sup>-</sup>-Zustandes (siehe Schema 3) nicht erklärt, wie das nicht-acide  $\beta$ -Proton des Histidins durch eine enzymatische Base abgespalten wird, war er während fast 30 Jahren von den meisten Enzymologen akzeptiert. Überdies wurde der gleiche Mechanismus auch für die PAL-Reaktion angenommen,<sup>[28,43]</sup> für



**Schema 3.** Der Mechanismus der PAL-Reaktion, wie er von Hanson und Havir (1970) vorgeschlagen<sup>[28]</sup> und von Hermes et al. (1985) modifiziert wurde.<sup>[43]</sup> Die Zustände EA, EA', EC<sup>-</sup>, EC<sup>+</sup>, EP und E\* + P sind gemäß dem Vorschlag von Hermes et al. wiedergegeben.

die die Existenz von Dehydroalanin durch ähnliche Experimente wie für HAL<sup>[40]</sup> belegt wurde.

Der E<sub>1</sub>cB-Mechanismus der PAL-Reaktion ist in Schema 3 dargestellt. Im ersten Schritt muss die Ammoniumgruppe des Phenylalanins deprotoniert werden, was eine nucleophile Addition an das prosthetische Elektrophil ermöglicht. Auf diese Weise wird eine sekundäre Ammoniumgruppe gebildet. Davon ausgehend sind drei Wege möglich:<sup>[43]</sup> Nach dem E<sub>1</sub>cB-Mechanismus würde die Abspaltung des H<sub>Si</sub>-Protons zu einem Benzyl-Carbanion (EC<sup>-</sup>) führen, während nach dem E<sub>1</sub>-Mechanismus die Spaltung der N-Cα-Bindung ein α-Carbokation (EC<sup>+</sup>) lieferte. Die Entstehung beider Zwischenstufen ist aber unwahrscheinlich, weil das benzyliche Proton einen pK<sub>s</sub>-Wert von über 40 und das Carbokation in α-Stellung zur Carboxygruppe eine zu hohe Energie hat. Obwohl die folgenden Schritte chemisch plausibel wären, sind beide Reaktionswege aufgrund der nötigen Überwindung einer Hochenergie-Zwischenstufe unwahrscheinlich. Als dritter Reaktionsweg wurde die konzertierte Reaktion

(E<sub>2</sub>-Mechanismus), die vom EA'-Zustand direkt zum EP-Zustand führen würde, in Betracht gezogen.<sup>[43]</sup>

Durch kinetische Analyse der PAL-Reaktion bestimmten Hermes et al.<sup>[43]</sup> die kinetischen Isotopeneffekte unter Verwendung von [<sup>15</sup>N]- und [3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]Phenylalaninen und schlossen daraus, dass der Mechanismus nicht konzertiert ist (zu weiteren Studien mit isotopenmarkierten Substraten siehe Abschnitt 6.2). Die Schwierigkeit, das nicht-acide β-Proton abzuspalten, wurde schon von Hermes et al. diskutiert,<sup>[43]</sup> eine Lösung wurde jedoch nicht angeboten. Nichtsdestotrotz wurde der kinetische <sup>15</sup>N-Isotopeneffekt von ca. 1 % zugunsten der Addition der Aminogruppe an das prosthetische Dehydroalanin interpretiert.

Eine weitere mechanistisch relevante Beobachtung wurde im gleichen Sinne gedeutet. 1962 berichtete Peterkofsky,<sup>[39]</sup> dass in Gegenwart von radiomarkiertem Urocanat ein substanzieller Anteil der Radioaktivität im Histidin zu finden ist, während [<sup>15</sup>N]Ammoniak nicht in Histidin eingebaut wird. Diese Beobachtung weist auf eine relativ stabile Amino-Enzym-Zwischenstufe hin, die in Gegenwart von [<sup>14</sup>C]Urocanat zu Histidin zurückreagieren kann. Diese Resultate schienen den früher akzeptierten E<sub>1</sub>cB-Mechanismus zu stützen, weil man angenommen hatte, dass

die Aminogruppe kovalent an das Elektrophil des Enzyms bindet.<sup>[40,43]</sup>

Eine überzeugende alternative Interpretation von Peterkofskys Ergebnissen wird in Abschnitt 4.2 erörtert. Obwohl Hermes et al.<sup>[43]</sup> sowohl den konzertierten (E<sub>2</sub>) als auch den Carbonium-Ion-Mechanismus aufgrund kinetischer Doppelisotopeneffekte ausgeschlossen hatten, haben wir auch diese Möglichkeiten in Betracht gezogen. Das positiv geladene Ammonium-Ion erhöht bekanntlich die Acidität benachbarter Protonen.<sup>[44]</sup> Ein solcher Effekt könnte in der enzymatischen Eliminierung von Ammoniak aus Aspartat und 3-Methylaspartat von Bedeutung sein. In diesen Substraten ist allerdings das β-H-Atom zusätzlich durch die benachbarte Carboxygruppe aktiviert. Aus diesem Grund ist es nicht erstaunlich, dass die entsprechenden Enzyme – Aspartase und Methylaspartase – kein prosthetisches Elektrophil enthalten, was auch durch neuere Röntgenstrukturanalysen belegt ist.<sup>[45–48]</sup> Überdies gehören diese beiden Ammoniak-Lyasen zur Enolase-Superfamilie, wie man aus der Ähnlich-

keit ihrer Sequenz und Struktur folgern kann. Dies legt nahe, dass im ersten Schritt das Proton in Stellung 3 entfernt wird, d. h. die Reaktion nicht wie ursprünglich angenommen konzentriert verläuft.

Seit 10 Jahren sind keine Resultate mehr veröffentlicht worden, die für den E<sub>1</sub>cB-Mechanismus sprächen. In einer unlängst erschienen Arbeit, die die erste Röntgenkristallstruktur von PAL beschreibt,<sup>[49a]</sup> wird zwar der E<sub>1</sub>cB-Mechanismus anhand von Modellierungsstudien favorisiert, eine noch neuere, besser aufgelöste Röntgenkristallstruktur<sup>[49b]</sup> spricht dagegen eindeutig für einen anderen Mechanismus, wie er im folgenden Abschnitt 4.2 diskutiert wird.

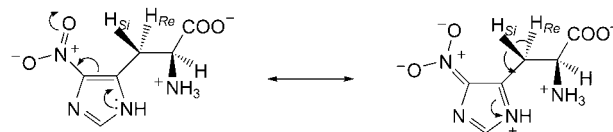
#### 4.2. Vorschlag eines alternativen Mechanismus: Friedel-Crafts-Angriff durch das prosthetische Elektrophil

Wie im vorangehenden Kapitel diskutiert, besteht das Hauptproblem des „alten“ E<sub>1</sub>cB-Mechanismus der Ammoniak-Lyase-katalysierten Reaktionen darin, dass er die Abspaltung des nicht-aciden β-Protons durch eine enzymatische Base nicht erklärt. Der pK<sub>s</sub>-Wert des benzyliischen Protons beträgt über 40,<sup>[50]</sup> sodass eine extrem starke Base unter energischen Bedingungen, etwa hohen Temperaturen, benötigt würde, um es zu abstrahieren. Gleichzeitig sollten die viel stärker sauren Ammonium-Protonen unberührt bleiben, weil die positive Ladung unerlässlich ist, um die Abgangsgruppenqualität der Ammoniumgruppe zu bewahren. Im so genannten Hofmann-Abbau zweiter Art kann die Trimethylammonium-Gruppe ihre positive Ladung sogar unter stark basischen Bedingungen nicht verlieren.

Die experimentelle Grundlage für den Vorschlag eines alternativen Mechanismus kam auf einem indirekten Weg. Er hatte seinen Ursprung in der Suche nach der Vorstufe des prosthetischen Dehydroalanins. Es war bekannt, dass Dehydroalanin durch Dehydratisierung von Serin entstehen kann, sowohl in vitro als auch in der Biosynthese der Lantibiotika.<sup>[51]</sup> Nach einigen Kontroversen<sup>[22a,52]</sup> ist das Problem durch spezifische Mutationen von Serinresten, die in mehreren HAL- und PAL-Sequenzen konserviert sind, gelöst worden.<sup>[53]</sup> Die Mutation von Ser143 in HAL aus *P. putida*<sup>[54]</sup> und Ser202<sup>[\*]</sup> in PAL aus *Petroselinum crispum*<sup>[55]</sup> zu Alanin vermindert die Aktivität um einen Faktor von mehr als 1000 (Tabelle 2).<sup>[55]</sup> Mutationen der anderen konservierten Serine hatten geringe oder keine Auswirkungen. Dieses Ergebnis identifizierte die erwähnten Serine als Vorstufen des katalytisch essenziellen Dehydroalanins. Interessanterweise ergab die Mutation der essenziellen Serine zu Cysteinen vollständig aktive Wildtyp-Enzyme.<sup>[56]</sup> Daraus kann geschlossen werden, dass die posttranslationale Modifikation entweder Wasser oder SH<sub>2</sub> abspalten kann, aber beides komplett ortsspezifisch.<sup>[56]</sup>

Aufbauend auf diesen Resultaten wandten wir uns der Rolle des Dehydroalanins im Reaktionsmechanismus zu. Eine Literaturrecherche half bei der Lösung des Problems. Klee et al. fanden, dass 5-Nitrohistidin auch ein Substrat von

HAL ist.<sup>[57]</sup> Überdies wurde bei β-dideutertem Histidin ein kinetischer Isotopeneffekt von 1.5–2.0 beobachtet, während β-dideutertes 5-Nitrohistidin keinen Effekt zeigte.<sup>[57]</sup> Die Erklärung dafür ist aus Schema 4 ersichtlich: Die Nitrogruppe



**Schema 4.** Aktivierung der β-Protonen durch die Nitrogruppe von 5-Nitro-L-histidin, einem Substrat von HAL.

pe vermindert die Elektronendichte des Imidazolrings, wodurch die β-Protonen acidifiziert werden. Als Konsequenz ist die Abspaltung des β-Protons nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend, und es wird kein kinetischer Isotopeneffekt beobachtet.

Dieses Resultat legte nahe, dass das prosthetische Dehydroalanin eine ähnliche Funktion haben könnte wie die Nitrogruppe, nämlich die Acidifizierung des β-Protons. Um diese Idee zu testen, wurde die Aktivität des Nitrohistidins sowohl mit Wildtyp-HAL als auch mit HAL-Derivaten, die am Ser 143 mutiert oder mit NaBH<sub>4</sub> behandelt worden waren, gemessen.<sup>[58]</sup> Die Reaktionsgeschwindigkeit ist praktisch unabhängig vom eingesetzten HAL-Derivat. Demzufolge macht

**Tabelle 2:** Vergleich der kinetischen Konstanten von HALs aus *Pseudomonas* ATCC 11299b, *P. putida* und mutierten, in *E. coli* BL21 (DE3) exprimierten Enzymen.<sup>[58]</sup>

HAL-Derivat	K <sub>m</sub> [mM]	V <sub>max</sub> [U mg <sup>-1</sup> ]
Wildtyp <i>Pseudomonas</i> ATCC 11299b	4.0	28
Wildtyp <i>Pseudomonas putida</i>	5.3	25
rekombinanter Wildtyp <i>E. coli</i>	3.6	25
rekombinante Mutante S112A	4.9	26
rekombinante Mutante S143A	7.5	0.021
rekombinante Mutante S393A	3.6	20
rekombinante Mutante S418A	3.5	22

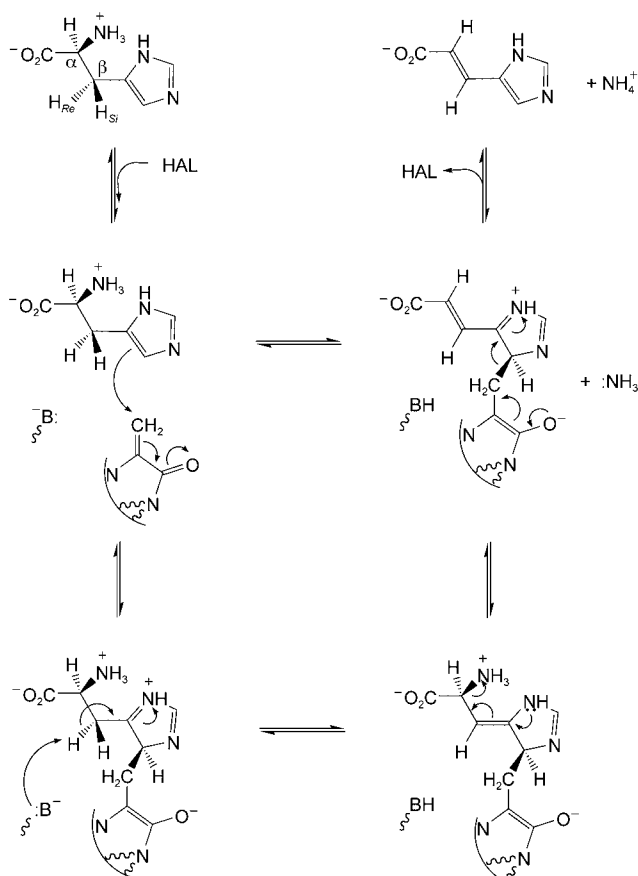
die Anwesenheit der Nitrogruppe das prosthetische Elektrophil überflüssig. Eine weitere Schlussfolgerung ist, dass die Nitrogruppe und das prosthetische Elektrophil tatsächlich beide die Funktion haben, das β-Proton zu acidifizieren.

Dies und die Präzedenz des elektrophilen Angriffs am Imidazolring in der Urocanase-Reaktion<sup>[13]</sup> führten zum Vorschlag des alternativen Mechanismus, der in Schema 5 erläutert ist.<sup>[58]</sup> Ein Angriff des prosthetischen Elektrophils am Imidazolring von Histidin bewirkt eine ähnliche Situation wie der Angriff des Nitro-Substituenten und erleichtert die Abspaltung des H<sub>Re</sub>-Protons<sup>[59]</sup> durch die enzymatische Base. Anschließend werden die Ammoniumgruppe in Form von Ammoniak abgespalten und, als letzter Schritt, das Addukt Urocanat fragmentiert und die prosthetische Gruppe regeneriert.<sup>[58]</sup>

Für die PAL-Reaktion ist ein solcher Mechanismus weniger plausibel, weil der Phenylring weniger elektronenreich ist als das Imidazol. Der Angriff durch das prosthetische

[\*] Dies ist Ser203 in der Sequenz von PAL aus *P. crispum* (P24481) in der Datenbank SWISS-PROT.





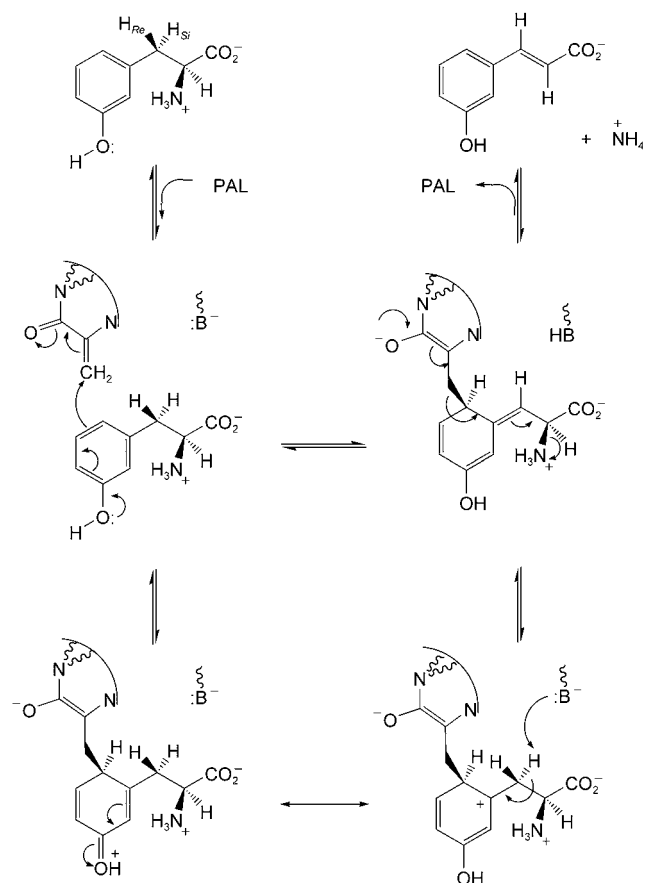
**Schema 5.** Alternativer Mechanismus der HAL-Reaktion.<sup>[58]</sup>

Elektrophil würde mindestens vorübergehend die Aromatizität aufheben, was energetisch ungünstig wäre. Dies wäre die erste biologische Friedel-Crafts-Reaktion.<sup>[60]</sup> Andererseits gibt es mehrere Experimente, die auch bei der PAL-Reaktion für diesen Mechanismus sprechen.<sup>[61]</sup> In analogen Experimenten wie mit HAL reagierten die PAL-Mutanten Ser202Ala und Ser202Thr viel schneller mit 4-NO<sub>2</sub>-Phenylalanin als mit dem unsubstituierten Substrat ( $k_{\text{cat}} > 20$ ).<sup>[61]</sup>

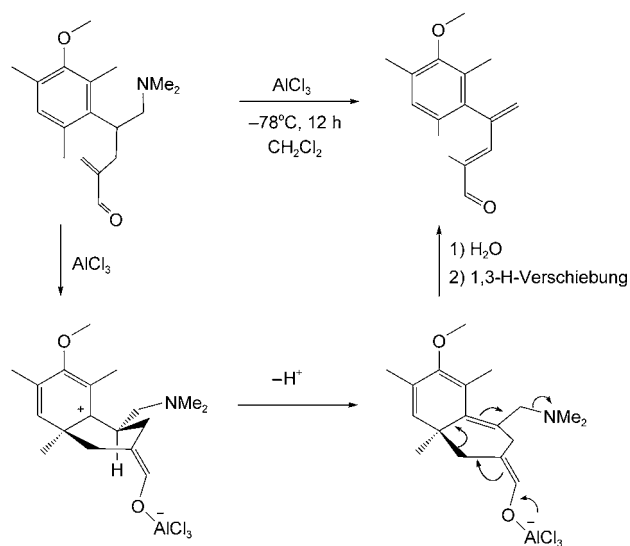
PALs aus verschiedenen Quellen akzeptieren auch Tyrosin als Substrat, reagieren damit aber viel langsamer ( $k_{\text{cat}} < 50$ ). Wenn der Friedel-Crafts-ähnliche Angriff im Mechanismus eine Rolle spielt, dann sollte *m*-Tyrosin ein viel besseres Substrat sein, was auch tatsächlich der Fall ist. Rekombinante PAL aus *Petersilie* reagiert mit *m*-Tyrosin sogar um 10–20 % schneller als mit L-Phenylalanin. Der postulierte Mechanismus ist in Schema 6 dargestellt.<sup>[61]</sup>

Die chemische Plausibilität der elektrophil unterstützten Eliminierung von Ammoniak wurde anhand eines chemischen Modells untermauert.<sup>[62]</sup> Einige Teile der Modellverbindung imitierten den wesentlichen Teil des Substrates, andere den elektrophilen Michael-Acceptor (MIO) in einer sterisch günstigen Stellung (Schema 7).

Die folgenden Maßnahmen wurden unternommen, um die Reaktion zu erleichtern: a) Intramolekularität; b) Einführung einer Methoxygruppe zur Erhöhung der Nucleophilie des Phenylringes an der Stelle des erwarteten Angriffs; c) Steigerung der Elektrophilie des Michael-Acceptors durch



**Schema 6.** Mechanismus der PAL-Reaktion mit *m*-Tyrosin als Substrat, den Friedel-Crafts-ähnlichen Angriff vorausgesetzt.



**Schema 7.** Synthetisches Modellsystem zur Modellierung der PAL-Reaktion.

Verwendung eines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyds anstatt des entsprechenden Amids.

Unter Friedel-Crafts-Bedingungen ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  oder  $\text{AlCl}_3$ ) wurden zwei diastereomere tricyclische Verbindungen in



ausgezeichneten Ausbeuten isoliert, aber keine Spur des Produktes, das man bei der Eliminierung von Dimethylamin erwarten würde. Offensichtlich war die zu Rearomatisierung führende Abstraktion des Ringprotons mit anschließender Substitution bevorzugt, sodass die Abspaltung des benzyli-schen Protons unterdrückt wurde. PAL verhindert eine solche Abstraktion dadurch, dass jegliche Base aus der hydrophoben Tasche, in der sich der Phenylring platziert, ausgeschlossen wird. Daher mussten wir einen anderen Weg wählen, um die „negative Katalyse“ zu imitieren. Wir erreichten dies, indem wir die Protonen am Phenylring durch Methylgruppen ersetzen (Schema 7). Auf diese Weise konnten die Vollendung der Friedel-Crafts-Substitution verhindert und das erwünschte Eliminierungsprodukt isoliert werden.<sup>[62]</sup>

Eine aktive Rolle des Phenylringes im Prozess wurde durch dessen Desaktivierung entweder durch Weglassen der Methoxygruppe oder deren Austausch durch eine Nitrogruppe belegt. In diesen Fällen wurden keine Eliminierungsprodukte beobachtet.<sup>[62]</sup>

#### 4.3. Die Entdeckung von 5-Methylen-3,5-dihydroimidazol-4-on (MIO) als das prosthetische Elektrophil von HAL und PAL

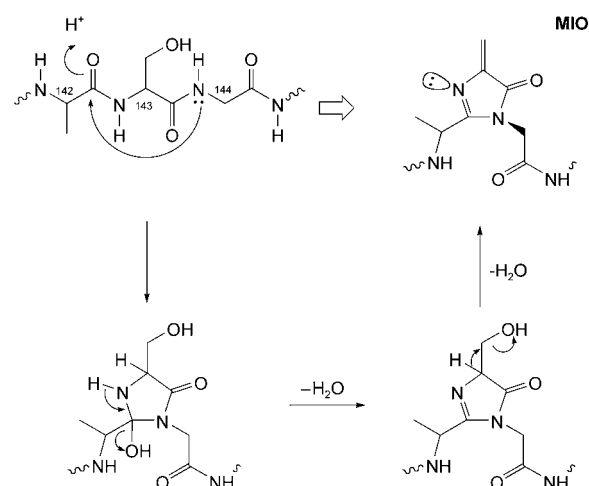
Voraussetzung für die ortsspezifische Mutation in HAL und PAL war die erfolgreiche Klonierung und heterologe Expression beider Enzyme. Zuerst gelang dies mit HAL. Die Expression des entsprechenden Gens aus *P. putida* in *E. coli* mithilfe des Expressionsvektors pT7-7 ergab ungefähr 100 mg reines Enzym aus 1 Liter Übernachtskultur der rekombinanten Bakterien. Aufgrund der verhältnismäßig großen Mengen an HAL gelang die Kristallisation recht einfach.<sup>[58]</sup> Allerdings gelang die Bestimmung der Kristallstruktur erst nach der Mutation eines solvensexponierten Cysteins zum Alanin.<sup>[63b]</sup>

HAL aus *P. putida* ist ein Homotetramer und war bereits zuvor mit biochemischen Methoden charakterisiert worden.<sup>[52]</sup> Die Röntgenkristallstruktur bei 2.1 Å Auflösung bestätigte die vorherigen Ergebnisse und lieferte zusätzlich ein unerwartetes Resultat, nämlich dass es sich bei dem prosthetischen Elektrophil nicht um Dehydroalanin, sondern um MIO handelt.<sup>[64]</sup> MIO kann als ein modifiziertes Dehydroalanin angesehen werden und entsteht durch posttranslationale Cyclisierung und nachfolgende Eliminierung zweier Wassermoleküle aus dem inneren Tripeptid Ala142-Ser143-Gly144 (Schema 8).

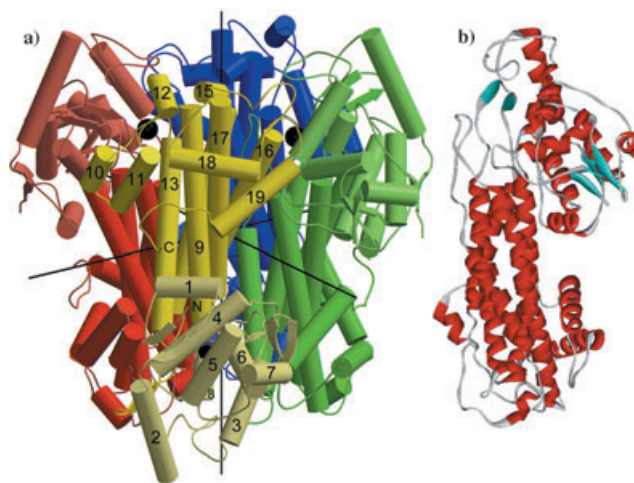
MIO ist der einzige katalytisch wichtige proteinabgeleitete Cofaktor mit einer solchen heterocyclischen Struktur. Ein Beispiel einer nichtkatalytischen Spezies ist das Fluorophor des grün fluoreszierenden Proteins, das ebenfalls eine MIO-Struktur aufweist, aber am exocyclischen Methylen einer *p*-Hydroxyphenyl-Substituenten trägt.<sup>[65]</sup>

Da auch in einem In-vitro-Translationssystem katalytisch aktives HAL gebildet wird, muss die Information für die Biosynthese von MIO aus der Aminosäuresequenz und somit aus der Faltung der Polypeptidkette kommen.<sup>[66]</sup>

Das Homotetramer hat  $D_2$ -Symmetrie und besteht hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices (Abbildung 3). Jede Untereinheit lässt sich in zwei Domänen unterteilen. Die N-terminale Domäne ist globulär und besteht aus acht Helices und vier kurzen  $\beta$ -



**Schema 8.** Die Bildung der MIO-Gruppe in HAL durch posttranslationale Modifikation.



**Abbildung 3.** Röntgenkristallstruktur des Homotetramers von HAL (a) und einer Untereinheit (b).<sup>[64]</sup>

Strängen, die C-terminale Domäne besteht aus fünf langen, beinahe parallelen  $\alpha$ -Helices, umgeben von sechs weiteren Helices.<sup>[64]</sup>

In den aktiven Zentren (die anhand der MIO-Gruppen identifiziert wurden) finden sich Aminosäure-Reste von jeweils drei Untereinheiten (Abbildung 4), deren Bedeutung für die Katalyse durch Mutationsanalysen gestützt wird. MIO ist weitaus elektrophiler als Dehydroalanin, weshalb der Friedel-Crafts-Angriff am aromatischen Ring möglich ist.<sup>[52]</sup>

In MIO ist eine Delokalisierung der einsamen Elektronenpaare der Stickstoffatome in das Michael-System unterbunden. Beim  $sp^2$ -Stickstoffatom ist das Orbital des einsamen Elektronenpaars orthogonal zu den  $\pi$ -Orbitalen des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylsystems, beim  $sp^3$ -Stickstoffatom verbietet die Faltung der Polypeptidkette den Übergang vom  $sp^3$ - zum  $sp^2$ -Zustand. Allerdings ist die Barriere für diesen Übergang nicht allzu hoch.<sup>[67]</sup> Überdies macht der Angriff eines Nucleophils auf die exocyclische Doppelbindung den Imidazolkern aromatisch, was den vorübergehenden Verlust

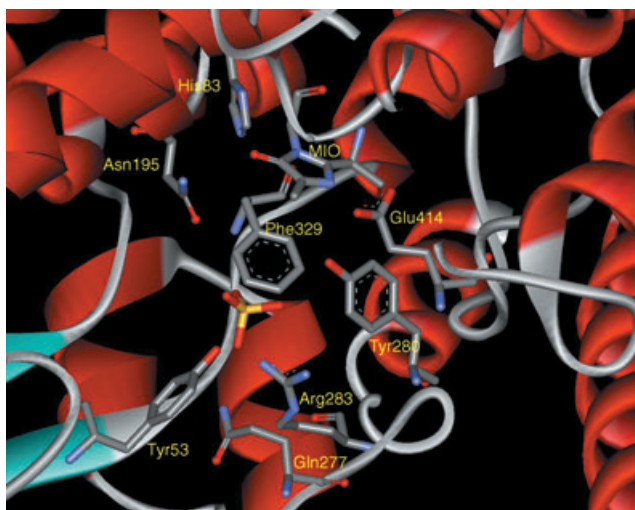
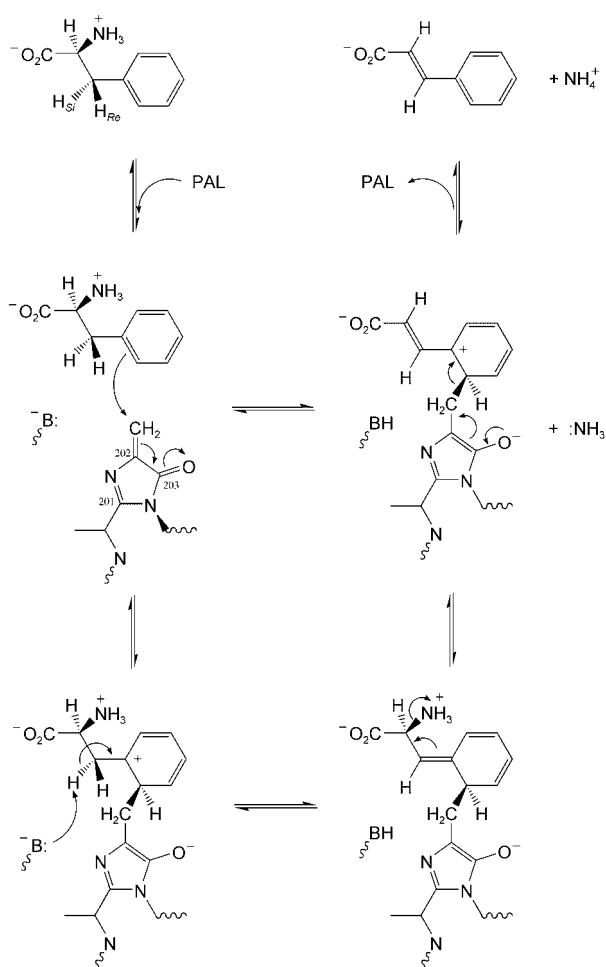


Abbildung 4. Substratfreies aktives Zentrum von HAL.

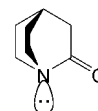
der Aromatizität der Imidazol- oder Phenylgruppe des Substrates kompensiert.

Der mit einem Friedel-Crafts-Angriff beginnende Mechanismus der PAL-Reaktion ist in Schema 9 gezeigt. Ein



Schema 9. Mechanismus der PAL-Reaktion.

Beispiel für das Ausbleiben einer Delokalisierung des einsamen Elektronenpaares von einem Stickstoffatom in die benachbarte Carbonylgruppe findet sich beim Chinuclidon (Schema 10). Dieses verhält sich nicht wie ein Lactam, sondern wie ein Ketoamin.



Schema 10. Struktur von Chinuclidon.

1970 berichtete Klee über eine Schulter im UV-Spektrum von HAL bei etwa 315 nm,<sup>[68a,b]</sup> deren Ursache zu dieser Zeit nicht erklärt werden konnte. Da MIO ein kreuzkonjugiertes Doppelbindungssystem enthält, lag es auf der Hand, dass dieses die beobachtete Schulter verursachen könnte. Um dies zu überprüfen, nahmen wir UV-Differenzspektren von HAL- und PAL-Mutanten und der entsprechenden Wildtypformen auf. Diese zeigten ein klares Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) bei 308 nm (Abbildung 5).<sup>[69]</sup> Die Methode wurde auch von anderen Arbeitsgruppen zum Nachweis von MIO genutzt.<sup>[70]</sup>

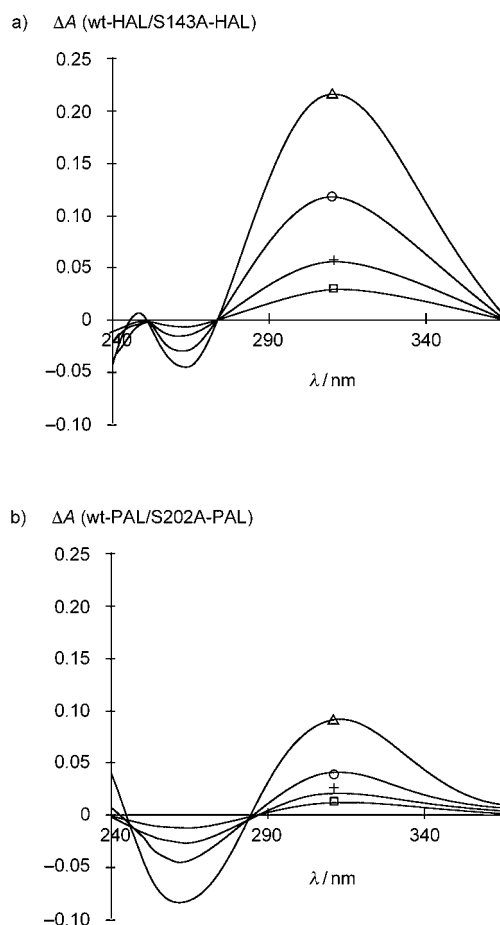


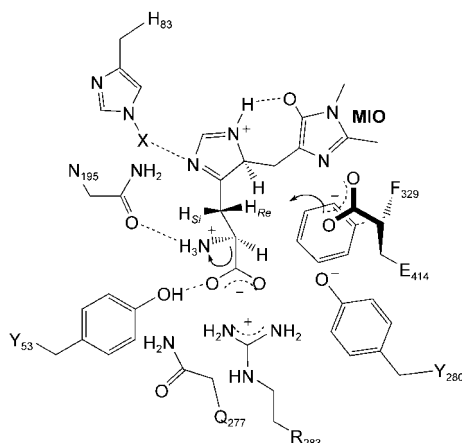
Abbildung 5. UV-Differenzspektren von a) Wildtyp-HAL und der Mutante Ser143Ala-HAL sowie b) Wildtyp-PAL und der Mutante Ser202Ala-PAL. Konzentrationen in  $\text{mg mL}^{-1}$ :  $\Delta$  1.6,  $\circ$  0.8,  $+$  0.4,  $\square$  0.2.

Die unlängst veröffentlichten Röntgenkristallstrukturen von PAL aus *Rhodospiridium toruloides*<sup>[49a]</sup> und aus *Petersilie*<sup>[49b]</sup> bestätigten nochmals die Anwesenheit von MIO.

## 5. Aktive Zentren von HAL und PAL

### 5.1. Identifizierung der Aminosäuren im aktiven Zentrum durch ortsspezifische Mutagenese

Die Aminosäuren im aktiven Zentrum von HAL wurden durch Röntgenstrukturanalyse identifiziert.<sup>[64,71]</sup> In Schema 11 sind die relativen Positionen dieser Aminosäuren



**Schema 11.** Modell des aktiven Zentrums von HAL; das Substrat ist entsprechend dem Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus lokalisiert.<sup>[74]</sup>

gezeigt, zusammen mit dem in das aktive Zentrum modellierten Substrat.<sup>[72]</sup> Alle Mutationen wurden an der Cys273Ala-Mutante eingeführt, die für die Röntgenstrukturanalyse verwendet wurde. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert dieser Mutante war 5-mal niedriger als der von Wildtyp-HAL, während der  $K_{\text{m}}$ -Wert 4.5-mal höher lag. Die kinetischen Konstanten mehrerer Mutanten sind in Tabelle 3 aufgeführt.<sup>[72]</sup> Eine Verringerung des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes der Glu414Ala-Mutante um einen Faktor von 21000 unterstreicht die Bedeutung von Glu414. Die wahrscheinliche Funktion dieses Restes besteht in der Abstraktion des  $\text{H}_{\text{Re}}$ -Protons vom Substrat als enzymatische Base. Wie in Schema 11 zu erkennen ist, wird Glu414 hierbei durch das zur benachbarten Untereinheit gehörende Tyr280 unterstützt.

**Tabelle 3:** Kinetische Konstanten von aktivstellenmutierten C273A-HALs.<sup>[72]</sup>

Mutation in C273A-HAL	$K_{\text{m}}$ [mM]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat,C273A}}/k_{\text{cat,mut}}$
–	$18 \pm 3$	$18 \pm 1$	1 <sup>[a]</sup>
R283K	$4.1 \pm 0.7$	$0.79 \pm 0.03$	20
Y280F	$8 \pm 1$	$0.32 \pm 0.01$	55
F329A	$4.4 \pm 0.7$	$0.18 \pm 0.01$	100
Q277A	$7 \pm 2$	$0.14 \pm 0.01$	125
E414Q	$1.7 \pm 0.9$	$0.053 \pm 0.0025$	339
N195A	$3 \pm 1$	$0.018 \pm 0.001$	1000
R283I	$18.0 \pm 4$	$0.011 \pm 0.001$	1640
Y53F	$8 \pm 1$	$0.0068 \pm 0.0004$	2650
H83L	$1.2 \pm 0.4$	$0.001 \pm 0.0002$	18000
E414A	$6.1 \pm 0.7$	$0.00086 \pm 0.00007$	20930

[a]  $k_{\text{cat,C273A}}/k_{\text{cat,wt}} = 0.21$ .

Ausgehend von der Struktur von Cystein-inhibierter HAL postulierten Baedeker und Schulz einen anderen Mechanismus, demzufolge Tyr280 das  $\text{H}_{\text{Re}}$ -Proton abstrahiert und Glu414 unterstützend wirkt.<sup>[67]</sup> Für beide Ansichten gibt es Argumente. Die Tatsache, dass die Mutation Glu414Ala in HAL einen stärkeren Aktivitätsverlust verzeichnet als Tyr280Phe, stützt den ersten Vorschlag,<sup>[64,72]</sup> während die Beobachtung, dass die analoge Position in PAL nicht durch Glu, sondern durch Gln488 besetzt wird, Tyr351 aber konserviert ist, für den zweiten Vorschlag spricht.

Ein stark verringerter  $k_{\text{cat}}$ -Wert wird auch bei der Mutante His83Leu beobachtet. His83 ist höchstwahrscheinlich bei der Bindung des Imidazolrings von Histidin wichtig. Der Abstand ( $4.15 \text{ \AA}$ ) lässt vermuten, dass die Bindung durch ein Wassermolekül oder ein Hydronium-Ion vermittelt wird. In der Röntgenkristallstruktur wurde zwar kein Metall-Ion beobachtet, es wurde aber festgestellt, dass  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  sowie ähnliche Metall-Ionen die Aktivität von HAL erhöhen.<sup>[73]</sup> Wir schlagen vor, dass die mit X bezeichnete Spezies in Schema 11 entweder ein Hydronium- oder ein Metall-Ion sein könnte. Die Guanidinium-Gruppe von Arg283 ist das Gegenion der Carboxylat-Gruppe des Substrat-Histidins und kann bei relativ wenig Aktivitätsverlust durch Lys substituiert werden. Die Substitution durch Ile, eine neutrale Aminosäure, führt dagegen zu einem stark verminderten  $k_{\text{cat}}$ -Wert. Ein noch größerer Verlust an Aktivität wird bei der Mutation Tyr53Phe beobachtet. Tyr53 wechselwirkt mit der Carboxylat-Gruppe des Substrats und dürfte bei der Abspaltung und Bindung der  $\alpha$ -Aminogruppe eine Rolle spielen. Tyr53 könnte auch für die Stabilität der Amino-Enzym-Zwischenstufe zuständig sein<sup>[39]</sup> und dabei durch Asn195, dessen Ersatz durch Ala einen 1000fach geringeren  $k_{\text{cat}}$ -Wert verursacht, unterstützt werden. Etwas umstritten ist der Effekt der Mutation Phe329Ala. Eine Arbeitsgruppe<sup>[72]</sup> fand eine 100fache, eine andere eine 2500fache Verminderung der Aktivität. Nach dem zweiten Modell<sup>[67]</sup> wechselwirkt Phe329, das in allen Mitgliedern der HAL/PAL-Familie konserviert ist, mit der Imidazol-Gruppe des Substrates. Es wird postuliert, dass die Phenylgruppe von Phe329 benötigt wird, um durch sterische Kompression die Bildung von MIO zu erzwingen. Die Mutante Phe329Gly führt zu einem inaktiven, MIO-freien HAL-Protein,<sup>[71]</sup> während die entsprechende Mutante Phe329Ala zwar die MIO-Gruppe bildet, aber eine sehr niedrige Aktivität zeigt.

Um die Rolle der Aminosäuren im aktiven Zentrum von PAL aufzuklären, griff man zunächst auf die hohe Sequenzhomologie mit HAL zurück, die es ermöglichte, das aktive Zentrum von PAL zu modellieren (siehe auch Abschnitt 5.2). Anhand dieses Modells und der kinetischen Konstanten mehrerer PAL-Mutanten konnten Funktionen der Reste im aktiven Zentrum postuliert werden.<sup>[74]</sup> Von zwei Ausnahmen abgesehen findet man, dass die Aminosäuren in PAL und HAL fast die gleichen Stellen besetzen. His83 und Glu414 in HAL sind in PAL durch Leu138 bzw. Gln488 ersetzt.

In einem Versuch, PAL in HAL umzuwandeln, wurden die PAL-Mutanten Leu138His und Gln488Glu sowie die Doppelmutante Leu138His/Gln488Glu hergestellt.<sup>[74,75]</sup> Während bei den Einzelmутanten die  $k_{\text{cat}}$ -Werte nur geringfügig niedriger waren, zeigte die Doppelmutante eine 145fach

geringere Aktivität als Wildtyp-PAL (Tabelle 4). Deutlicher ausgeprägt war die Veränderung der  $K_m$ -Werte der Leu138His-Mutanten, die 100-mal höher lagen als die des Wildtyp-Enzyms. Dies stützt die Annahme, dass Leu138 ein

**Tabelle 4:** Kinetische Konstanten von aktivstellenmutierten PALs.<sup>[74]</sup>

Mutation in wt-PAL	$K_m$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat,wt}/k_{cat,mut}$
wt	0.12 ± 0.004	13.5 ± 0.1	1
Q488E	0.057 ± 0.006	2.1 ± 0.04	6
L138H	13.5 ± 0.6	0.99 ± 0.02	14
R354A	0.057 ± 0.003	0.104 ± 0.005	130
L138H/Q488E	55 ± 4.9	0.093 ± 0.004	145
Y351F	0.024 ± 0.004	0.057 ± 0.001	235
F400A	0.027 ± 0.005	0.039 ± 0.001	345
S203A	0.019 ± 0.001	0.031 ± 0.0001	435
Q488A	0.033 ± 0.002	0.022 ± 0.002	615
Q348A	0.03 ± 0.01	0.0057 ± 0.0004	2370
N260A	0.033 ± 0.003	0.005 ± 0.001	2700
Y110F	–	0.00018	75 000

Bestandteil der hydrophoben Bindungstasche ist, in die sich die Phenylgruppe des Substrates einpasst. Wegen der relativ starken Adhäsion der Phenylgruppe an diese hydrophobe Umgebung wird die Freisetzung des Produktes (*E*)-Cinnamat zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PAL-Reaktion. Aus diesem Grund wurde bei der PAL-Reaktion im Unterschied zur HAL-Reaktion kein kinetischer Deuterium-Isotopeneffekt beobachtet.<sup>[43]</sup> Kürzlich wurde gezeigt, dass bei der Leu138His-Mutante die Freisetzung des Produktes schneller ist und ein kinetischer Deuterium-Isotopeneffekt auftritt ( $k_H/k_D = 2.3$ ).<sup>[75]</sup>

Die Annahme, dass sich die PAL-Doppelmutante Leu138His/Gln488Glu wie HAL verhalten würde, bestätigte sich nur zum Teil. Während der  $K_m$ -Wert für Histidin dem von HAL ähnelte, war der  $k_{cat}$ -Wert 8000-mal kleiner. Es scheint, dass auch Aminosäuren, die sich nicht direkt im aktiven Zentrum befinden, einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben.

Der größte Aktivitätsverlust wurde bei der PAL-Mutante Tyr110Phe gemessen. Es wird angenommen, dass Tyr110 in PAL die gleiche Funktion hat wie Tyr53 in HAL, aber offensichtlich noch wichtiger ist. Auf analoge Weise entsprechen Asn260 und Tyr348 von PAL den Resten Asn195 und Tyr280 von HAL, und sie haben wahrscheinlich die gleichen wichtigen Funktionen. Die Phenolat-Form von Tyr348 fungiert hier definitiv als die enzymatische Base, die das  $\beta$ -H<sub>SR</sub>-Proton des Substrates abstrahiert.<sup>[76]</sup> Arg354 und Phe400 in PAL entsprechen Arg283 und Phe329 in HAL. Deren Mutationen beeinflussen die kinetischen Konstanten beider Enzyme ähnlich.

Ein anderer interessanter Unterschied zwischen HAL und PAL zeigt sich bei den Mutanten Ser143Thr und Ser203Thr. Die HAL-Mutante Ser143Thr ist zwar praktisch inaktiv, zeigt aber im UV-Differenzspektrum (Referenzmutante Ser143Ala) ein Maximum bei 305 nm, während die Ser203Thr-Mutante von PAL in einem ähnlichen Experiment kein Absorptionsmaximum erkennen ließ. Dieses Resultat

weist darauf hin, dass HAL-Ser143Thr weiterhin eine MIO-Struktur ausbildet, die entsprechende PAL-Mutante hingegen nicht. Der Austausch der beiden anderen Aminosäuren, die direkt in die MIO-Struktur eingehen (Ala142Ser und Gly144Val), führte zu verminderten  $V_{max}$ -Werten (Faktor 6 bzw. 44), die Effekte sind aber schwächer ausgeprägt.<sup>[77]</sup> Andere Mutationen in den gleichen Positionen (Ala142Gly, Ala142Asp und Gly144Ala) führten zu moderaten Aktivitätsverlusten. Die HAL-Mutante Asp145Ala zeigte keinerlei Aktivität mehr.<sup>[67]</sup>

## 5.2. Modellierung des aktiven Zentrums von HAL und PAL

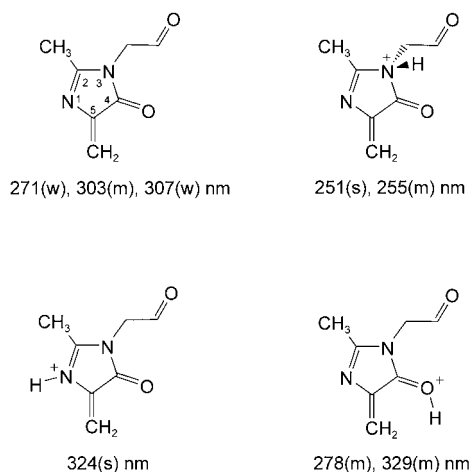
Um die enzymkinetischen Daten von Reaktionen mit aktivstellenmodifizierten HAL- oder PAL-Mutanten besser interpretieren zu können, wurden Molecular-Modeling-Studien ausgeführt. Zu diesem Zweck wurde in die Röntgenkristallstruktur von HAL<sup>[64]</sup> ein Histidin-Molekül in einer Weise hineinmodelliert, dass sich seine Aminogruppe in Bindungslänge zum exocyclischen Methylenkohlenstoffatom der MIO-Einheit und seine Carboxylatgruppe nahe der Guanidinium-Gruppe von Arg283 befanden.<sup>[67]</sup> In dieser Anordnung wurde weder eine stark basische Gruppe in Nachbarschaft zum  $\beta$ -H-Atom des Substrates noch eine Bindungsstelle für den Imidazolring des Histidins gefunden, woraus sich ableiten lässt, dass eine direkte Abspaltung von Ammoniak nicht mit der experimentellen Struktur vereinbar ist. Im Gegenteil wurde gefunden, dass die experimentelle HAL-Struktur<sup>[64]</sup> mit einem Friedel-Crafts-ähnlichen Angriff der MIO-Gruppe auf den aromatischen Ring des Substrats in Einklang ist.<sup>[58,61,64]</sup>

Zwei geringfügig unterschiedliche Modelle für die Substrat-Bindung durch HAL wurden beschrieben.<sup>[64,71,72]</sup> Nach dem ersten Modell<sup>[64,72]</sup> positioniert sich der Imidazolring des Histidins in der Nähe von Leu146 und somit „unterhalb“ der MIO-Gruppe. Nach dem zweiten, später formulierten Vorschlag<sup>[67]</sup> ordnet sich das betreffende Imidazol „oberhalb“ der MIO-Gruppe an und wechselwirkt mit Phe329. Beide Modelle sind mit den aus Mutationsexperimenten abgeleiteten Funktionen der Aminosäurereste im aktiven Zentrum vereinbar, und beide erklären den experimentellen Befund, dass erst Urocanat und dann Ammoniak freigesetzt wird.<sup>[39]</sup>

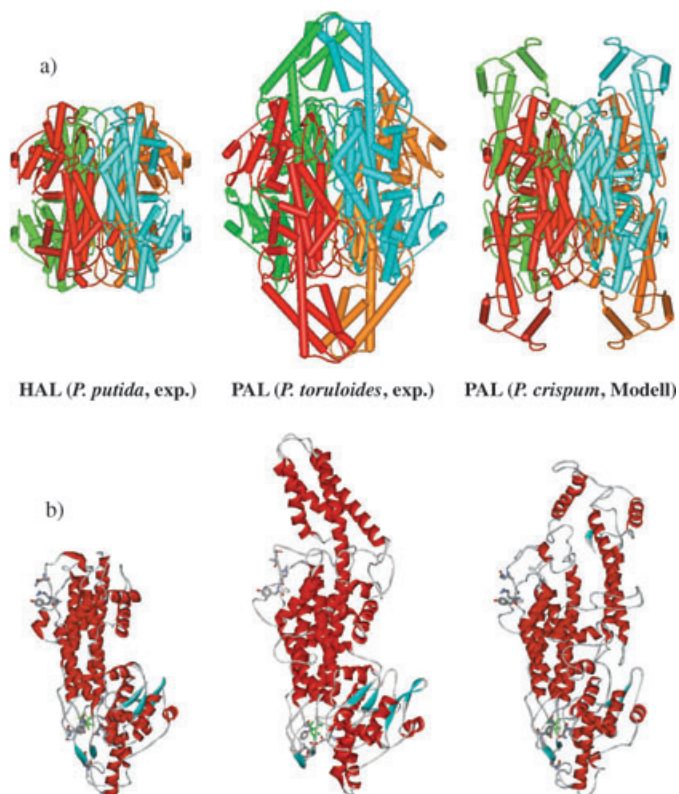
Die Elektronenspektren eines vereinfachten MIO-Modells wurden auf dem PM3-Niveau berechnet und verwendet, um den Grad der Polarisierung der MIO-Gruppe im substratfreien Zustand von HAL abzuschätzen (Schema 12).<sup>[72]</sup> Die berechneten Absorptionsmaxima bei 303 und 307 nm sind in guter Übereinstimmung mit dem experimentell ermittelten Maximum von 308 nm im UV-Differenzspektrum von HAL. Die berechneten UV-Spektren von MIO-Strukturen, die entweder am Carbonylsauerstoffatom, am N1-Atom oder am N3-Atom protoniert sind, unterscheiden sich hiervon deutlich, was darauf hinweist, dass die MIO-Gruppe in der substratfreien HAL nicht signifikant polarisiert ist.

Um die Funktionen der Aminosäurereste im aktiven Zentrum von PAL zu untersuchen, wurde die PAL-Struktur ausgehend von der Röntgenkristallstruktur von HAL als Templat modelliert („homology modeling“) (Abbildung 6).<sup>[74]</sup>





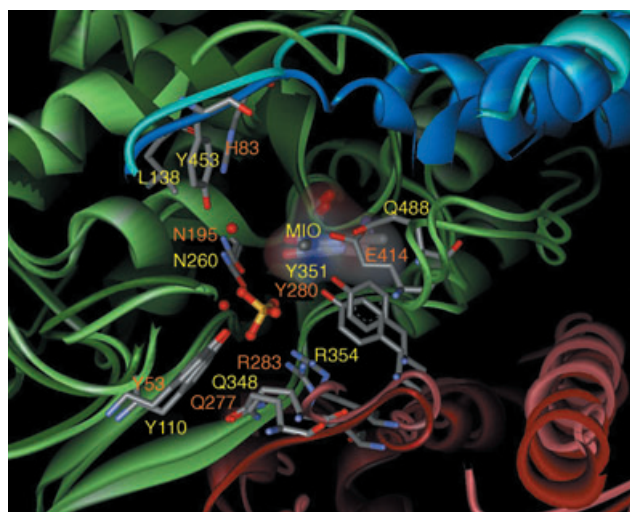
**Schema 12.** Modellverbindung für nichtprotoniertes MIO und einfach protonierte Formen; angegeben sind die berechneten Absorptionsmaxima.



**Abbildung 6.** Vergleich der Röntgenkristallstrukturen von HAL (aus *Pseudomonas putida*)<sup>[64]</sup> und PAL (aus *Rhodospiridium toruloides*)<sup>[49a]</sup> mit dem Homologie-Modell von PAL (aus *Petroselinum crispum*)<sup>[86]</sup>: a) tetramere Strukturen, b) einzelne Untereinheiten (die katalytisch wichtigen Reste sind durch Stabmodelle hervorgehoben; die zu MIO gehörenden Teile sind grün gefärbt).

In Übereinstimmung mit biochemischen Daten wurde PAL als Homotetramer modelliert (Abbildung 6, rechts). Das Modell zeigte, dass die katalytisch wichtigen Aminosäuren innerhalb von zwei bestimmten Regionen der Proteinketten von HAL und PAL in isosterischen Positionen lokalisiert sind.

Im Bereich des aktiven Zentrums deckt sich das PAL-Modell sehr gut mit der Röntgenkristallstruktur von HAL (Abbildung 7). Alle Aminosäuren im PAL-Modell besetzen Positionen, wie man sie in der Sequenz und Struktur von

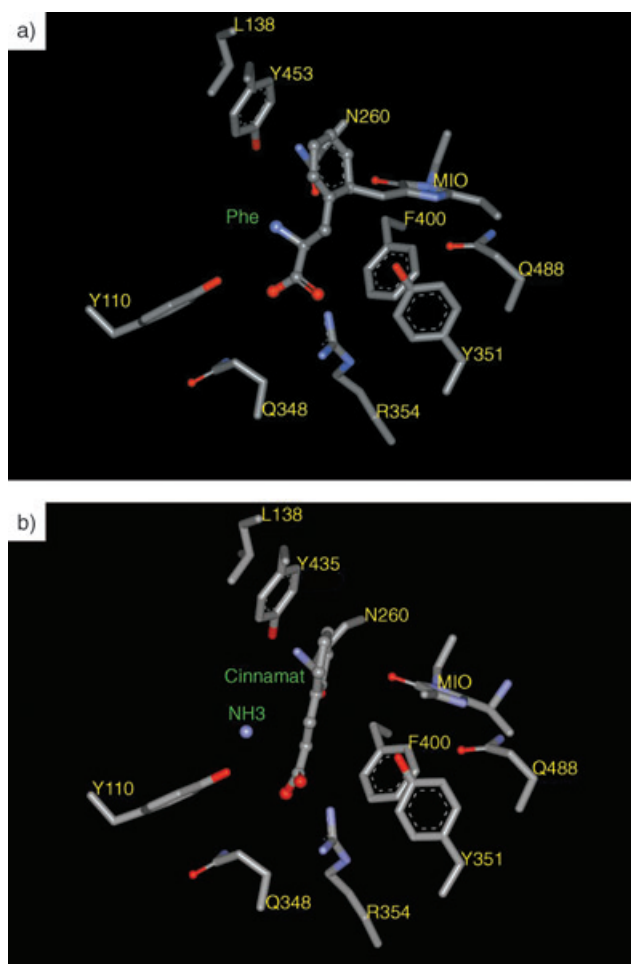


**Abbildung 7.** Substratfreies Modell des aktiven Zentrums von PAL (aus *P. crispum*)<sup>[86]</sup> überlagert mit dem aktiven Zentrum von HAL (aus *P. putida*)<sup>[64]</sup>. Die helleren Farben (gelbe Ziffern; hellblaue, hellgrüne Farbbänder) kennzeichnen das PAL-Modell, die dunkleren (orangefarbene Ziffern; blaue, grüne und rote Farbbänder) die HAL-Struktur.

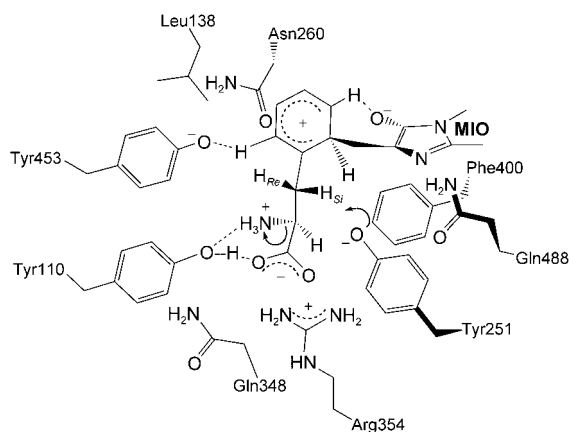
HAL erwarten würde. Darüber hinaus stimmt das für PAL aus *Petroselinum crispum* konstruierte Modell<sup>[86]</sup> (*Pc*-PAL; Abbildung 6, rechts) sehr gut mit den kürzlich veröffentlichten Röntgenkristallstrukturen von PAL aus *Rhodospiridium toruloides*<sup>[49a]</sup> (*Rt*-PAL; Abbildung 6, mittlere Spalte; PDB-Codes für *Rt*-PAL: 1T6J und 1T6P) und von *Pc*-PAL überein.<sup>[49b]</sup>

Interessanterweise findet man, dass His 137 und Glu 138 im aktiven Zentrum von *Rt*-PAL durch Phe 140 und Leu 141 in *Pc*-PAL ersetzt sind. Grund sind nicht Fehler in der Modellierung von *Pc*-PAL, sondern eher Unterschiede in den Sequenzen der beiden PALs in dieser Region. Darüber hinaus fehlt in der *Rt*-PAL-Struktur die Schleife 105–123, die das katalytisch wichtige Tyr 110 enthält.<sup>[49a]</sup> Dies kann dazu führen, dass das Substrat nicht eindeutig angeordnet werden kann, wenn es in diese Struktur hineinmodelliert wird.

Die Modellierung der einem  $\sigma$ -Komplex ähnlichen Zwischenstufe (Abbildung 8a) und des Produktbindungszustandes mit (*E*)-Cinnamat plus Ammoniak (Abbildung 8b) im aktiven Zentrum von *Pc*-PAL gab weiteren Aufschluss über die katalytischen Funktionen der Aminosäuren (Schema 13). Eine gemeinsame Eigenschaft der tetrameren HAL- und PAL-Strukturen ist, dass sich an der Ecke des Kanals, durch den das Substrat in die aktive Tasche gelangt und das Produkt entlassen wird, ein Tyrosin befindet (Tyr 53 in HAL und Tyr 110 in PAL). Mutationen an diesen Stellen führen zu einer drastischen Verringerung der katalytischen Aktivität (Schema 14).<sup>[74]</sup> Die Existenz dieses engen Kanals kann den

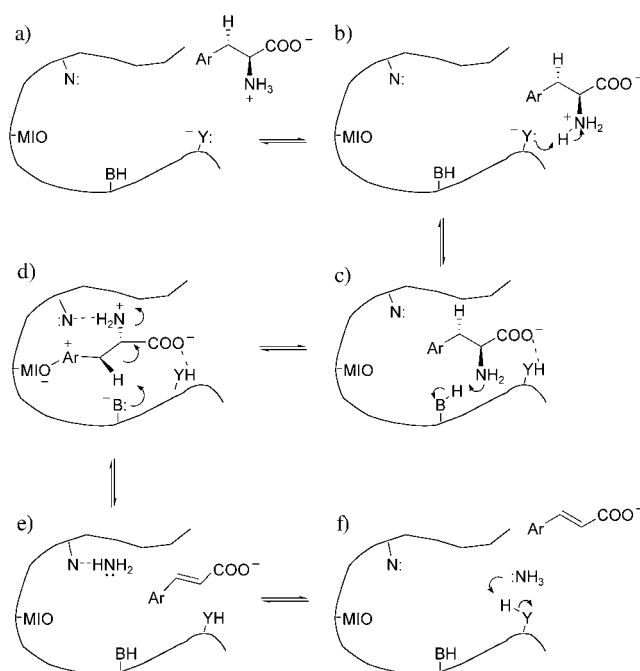


**Abbildung 8.** Modelle der kationischen Zwischenstufe (a) sowie von Produktbindungszuständen (b) im aktiven Zentrum von PAL gemäß dem Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus.



**Schema 13.** Nach dem PAL-Modell postulierte katalytische Rollen der Aminosäuren im aktiven Zentrum.<sup>[86]</sup>

experimentellen Befund erklären,<sup>[39,74]</sup> dass nach der Eliminierung zunächst das Produkt (*E*)-Cinnamat entlassen wird (Schema 14e) und nachfolgend erst der Ammoniak (in Form des Ammonium-Ions) (Schema 14f).



**Schema 14.** Vorgeschlagener Mechanismus für die Bindung des Substrats (a-c), Eliminierung (d) und Freisetzung des Produkts (e, f) gemäß dem Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus.

## 6. Inhibitoren und Substratanaloga für HAL und PAL

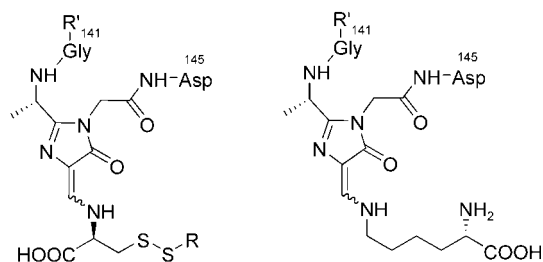
### 6.1. Inhibition von HAL durch Cystein

Unter den Inhibitoren von HAL ist L-Cystein der interessanteste, weil sein Verhalten Aufschluss über den Mechanismus gab.<sup>[58]</sup> Die Inhibition durch Cystein ist bei neutralem pH-Wert und unter anaeroben Bedingungen reversibel, über pH 10.5 und in Gegenwart von Sauerstoff dagegen irreversibel. Bei Einwirkung des Inhibitors tritt eine Absorption bei ca. 340 nm auf, die dem Inhibitionsgrad proportional ist.<sup>[68b]</sup>

Die ersten Vorschläge für die Struktur des erzeugten Chromophors wurden formuliert, noch bevor MIO als die prosthetische Gruppe von HAL identifiziert wurde.<sup>[78]</sup> Bald nach der Entdeckung der MIO-Gruppe<sup>[64]</sup> beschrieben zwei Arbeitsgruppen die Struktur und machten Vorschläge zum Bildungsmechanismus.<sup>[79]</sup> In beiden Fällen ging man davon aus, dass die Thiolat-Gruppe des Cysteins als Nucleophil an MIO addiert, was mit unserem früheren Vorschlag übereinstimmt.<sup>[58,78b]</sup> Folgende Argumente sprechen für einen Angriff des Thiolats: 1) Ausschließlich L-Cystein und L-Homocystein, aber keine der anderen nichtaromatischen Aminosäuren wirken als Inhibitoren. 2) Die Thiolgruppen der beiden Inhibitoren positionieren sich in einem für einen Angriff an die MIO-Gruppe passenden Abstand (bezüglich der Position 5 des Imidazolrings von Histidin).

Zur Isolierung des bei 335–340 nm absorbierenden Chromophors wurde das inhibierte HAL-Protein denaturiert und mit Pronasen partiell verdaut. Nach Trennung der entstandenen Peptide wurden die chromophorhaltigen Peptide iden-

tifiziert und spektroskopisch charakterisiert. Die in den beiden Arbeiten beschriebenen Polypeptide unterschieden sich zwar in ihrer Länge, enthielten aber die gleiche Chromophorstruktur (**1** und **2** in Schema 15).<sup>[79]</sup> Oberflächlich



- 1: S-R= Cys, R'= H : 335nm  
2: S-R= Cys, R'= Gly-Ser-Val : 335nm

3: 332nm

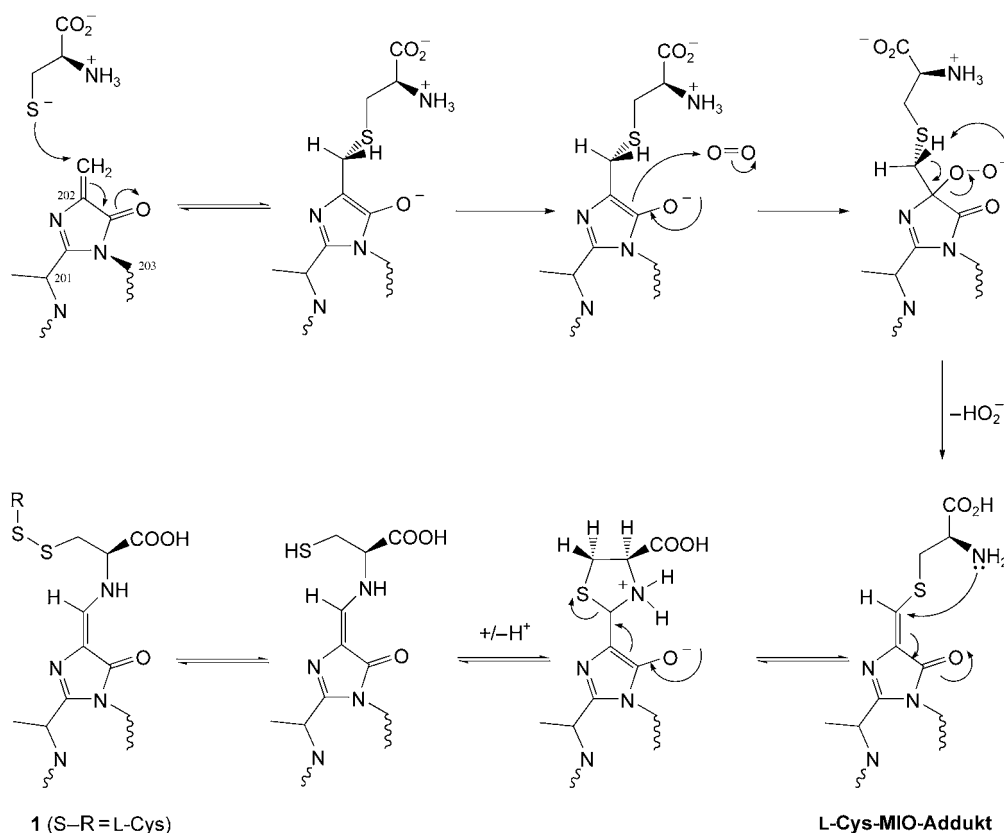
**Schema 15.** Chromophore Gruppen der isolierten Oligopeptide nach Behandlung des HAL-Proteins mit Cystein oder nach Reaktion mit L-Lysin und anschließendem proteolytischem Verdau.

gesehen stützt dieser Befund den früher favorisierten Mechanismus, demzufolge die  $\alpha$ -Aminogruppe des Histidins das mit MIO reagierende Nucleophil ist.<sup>[28,41–43]</sup> Dennoch nahmen beide Arbeitsgruppen an, dass der isolierte Chromophor, so wie in Schema 16 dargestellt, das Produkt einer Umlagerungsreaktion ist.<sup>[79]</sup> Demnach addiert zunächst die Thiolatgruppe des Cysteins an MIO und erzeugt ein stark nucleophil

philes Enolat, das ähnlich wie bei der Photorespiration durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco)<sup>[80]</sup> mit Sauerstoff zu einem Peroxid-Anion reagiert. In einer electrocyclischen Reaktion, gekoppelt mit einer 1,3-H-Verschiebung von einem C- zu einem O-Atom, entsteht zunächst ein vinyloger Thioester, der nach intramolekularer Aminolyse unter Beteiligung eines weiteren Cysteins schließlich das Disulfid bildet.

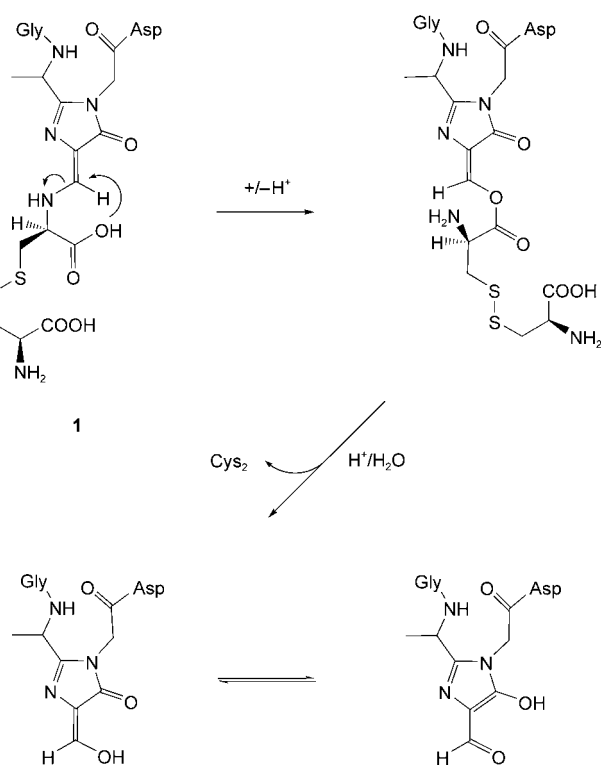
Die postulierte Umlagerung wird durch die Beobachtung weiterer Proteolyseprodukte gestützt. Merkel isolierte das Addukt aus Lysin und MIO als Hauptprodukt (**3** in Schema 15).<sup>[79a,c]</sup> Offenbar ging der zunächst gebildete vinyloge Thioester auch eine intermolekulare Aminolyse mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinmolekülen ein, die nach erschöpfender Proteolyse im Lysat vorhanden waren. Dies ist mit der Beobachtung in Einklang, dass das inhibierte, aber sonst intakte Protein ein Absorptionsmaximum von  $\lambda_{\max} = 338$  nm aufweist, während für das isolierte Cystein-Addukt  $\lambda_{\max} = 335$  nm und für das Lysin-Addukt  $\lambda_{\max} = 332$  nm gefunden werden.<sup>[79a,c]</sup>

Das isolierte reine Peptid, das den bei 335 nm absorbierenden Chromophor enthält, wurde nach Chromatographie an einer Umkehrphasensäule unter sauren Bedingungen instabil, wie an einem schwachen Extrasignal im Elutionsdiagramm zu erkennen war. Dieses Abbauprodukt wurde isoliert und spektroskopisch charakterisiert. Anhand der spektroskopischen Daten (UV, NMR, MS) wurde der Chromophor als MIO-Derivat identifiziert, das am exocyclischen Methylen eine Hydroxygruppe trägt. Es bildet zwei Tauto-



**Schema 16.** Vorgeschlagener Mechanismus der Addition von L-Cystein an MIO mit anschließender Oxidation und Umlagerung.

mere und ist, wie Vitamin C, Redukton-ähnlich. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 310 nm und unterscheidet sich nur geringfügig vom  $\lambda_{\text{max}}$ -Wert von MIO (308 nm). Ein möglicher Bildungsmechanismus, der eine weitere Umlagerung und eine Esterhydrolyse umfasst, ist in Schema 17 gezeigt.<sup>[79a,c]</sup>



**Schema 17.** Abbau des Chromophors **1** nach Hydrolyse.

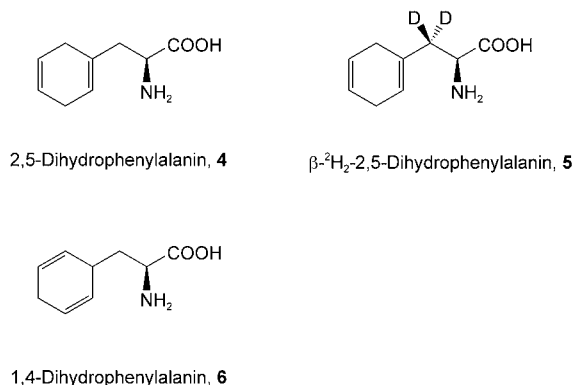
Es sollte erwähnt werden, dass als HAL-Inhibitor eingesetztes L-[<sup>35</sup>S]Cystein in das Peptid mit dem 335-nm-Chromophor eingebaut wurde.<sup>[79a,c]</sup> Dies scheint früheren Resultaten zu widersprechen.<sup>[68,78a]</sup> Eine plausible Erklärung für diese Unstimmigkeit könnte darin liegen, dass in diesen früheren Arbeiten der primär gebildete Chromophor bereits in cysteinfreie Produkte umgewandelt worden war.

Die Röntgenkristallstruktur der durch Cystein inhibierten HAL ist kürzlich bestimmt worden, das Cystein wurde jedoch trotz sehr hoher Auflösung nicht gesehen.<sup>[67]</sup> Da die Kristalle mehrere Monate vor der Messung präpariert worden waren, könnte sich der Chromophor umgelagert haben, wodurch das Cystein nicht mehr lokalisierbar wäre.

## 6.2. Das Verhalten von Substratanaloga und kinetische Isotopeneffekte in der PAL-Reaktion

Mehrere Arbeitsgruppen, die in den letzten Jahren das Verhalten von Substratanaloga sowie kinetische Isotopeneffekte in der PAL-Reaktion untersuchten, interpretierten ihre Ergebnisse im Sinne des Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus.<sup>[81–83,94]</sup> Allerdings waren schon vor diesem Mechanismusvorschlag relevante Arbeiten erschienen,<sup>[43,84]</sup> in denen

2,5-Dihydrophenylalanin (**4**, Schema 18) als ein mäßig gutes Substrat von PAL identifiziert wurde. Anders als Phenylalanin zeigte das 3,3-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]dideuterierte Derivat **5** einen primären kinetischen Isotopeneffekt von etwa 2, was darauf hinweist,



**Schema 18.** Partiell hydrierte Phenylalanine, die in kinetischen Untersuchungen der PAL-Reaktion eingesetzt wurden.

dass die Deprotonierung teilweise geschwindigkeitsbestimmend ist.<sup>[43]</sup> Offenbar ist die Aktivierung des  $\beta$ -H<sub>S<sub>T</sub></sub>-Protons bei diesem Substratanalogen weniger wirksam, wenn auch durch elektrophilen Angriff von MIO an der zur Seitenkette benachbarten Doppelbindung noch immer möglich. Keinerlei Aktivierung der  $\beta$ -Protonen wird dagegen erwartungsgemäß bei 1,4-Dihydrophenylalanin (**6**) beobachtet. Es wurde entdeckt, dass die Birch-Reduktion von L-Phenylalanin neben dem Hauptprodukt, 2,5-Dihydrophenylalanin, auch etwas 1,4-Dihydrophenylalanin liefert.<sup>[81]</sup> Dieses war wie erwartet kein Substrat für PAL, sondern zeigte schwache inhibitorische Eigenschaften.

Aus der Annahme, dass der schwierigste Schritt in der PAL-Reaktion der Friedel-Crafts-ähnliche Angriff mit gleichzeitiger Dearomatisierung des Phenylringes ist, wurde gefolgert, dass eine Substitution der Phenylgruppe die Reaktion begünstigen könnte. Racemisches Cyclooctatetraenylalanin zeigte jedoch einen sehr niedrigen  $V_{\text{max}}$ -Wert (0.6% des Wertes von L-Phenylalanin).<sup>[85]</sup> Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Größe und die nichtplanare Geometrie des Cyclooctatetraen-Ringes den elektrophilen Angriff durch MIO erschweren.

Ein interessanter Aspekt ist die synergistische Inhibition von PAL durch verschiedene Phenole und Glycin. Während Glycin allein überhaupt nicht inhibiert und Phenole nur schwache Inhibitoren sind, wirken beide zusammen im Verhältnis 1:1 stark inhibierend.<sup>[83,94]</sup> *m*-Cresol und Glycin z. B. können zusammengefasst als Mosaik von *m*-Tyrosin betrachtet werden, das ein ausgezeichnetes Substrat von PAL ist.<sup>[61]</sup> Eine Kombination dieser beiden Substanzen bildet ein kompetitiv inhibierendes System mit einem  $K_i$ -Wert von 0.89 mM, der mehr als 20-mal niedriger liegt als der von Glycin oder *m*-Cresol allein.<sup>[94]</sup> Alunni et al.<sup>[83]</sup> fanden in systematischen Studien, dass das Paar Phenol/Glycin am stärksten inhibiert ( $K_i = 0.014$  mM), während *p*-Cresol/Glycin gegen PAL fast wirkungslos ist. Mit Ausnahme von *m*-Cresol/Glycin zeigten alle anderen Paare gemischte Inhibition.



Ebenfalls untersucht wurden die kinetischen Isotopeneffekte bei Phenylalaninen, die am Phenylring deuteriert oder tritiiert sind. Gloge et al.<sup>[94]</sup> fanden bei  $[^2\text{H}_5]$ Phenylalanin einen normalen sekundären Isotopeneffekt von  $1.09 \pm 0.01$  auf die Gesamtgeschwindigkeit. Da im ersten angenommenen chemischen Schritt der Gesamtreaktion das deuterierte Kohlenstoffatom seinen Hybridisierungszustand von  $\text{sp}^2$  zu  $\text{sp}^3$  wechselt, wäre ein inverser sekundärer Isotopeneffekt zu erwarten gewesen. Dieser dürfte aber durch den Einfluss der übrigen vier Deuteriumatome am Phenylring überkompensiert werden.

Lewandowicz et al.<sup>[82]</sup> bestätigten den konventionellen sekundären Isotopeneffekt bei  $[^2\text{H}_5]$ Phenylalanin durch Kompetitionsexperimente (Bestimmung der Anreicherung von deuteriertem Material im nichtumgesetzten Substrat). Der erhaltene  $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ -Wert von  $1.13 \pm 0.02$  ähnelte dem zuvor von Gloge et al.<sup>[94]</sup> ermittelten Wert von  $1.09 \pm 0.01$ . Ebenfalls Lewandowicz et al.<sup>[82]</sup> untersuchten den sekundären kinetischen Tritium-Isotopeneffekt bei Phenylalanin, das in den *ortho*-Stellungen der Phenylgruppe mit Tritium markiert war. Der Isotopeneffekt hing stark vom Reaktionsfortschritt ab. Innerhalb der ersten 5 % Umsatz betrug der  $k_{\text{H}}/k_{\text{T}}$ -Wert 0.85, danach erreichte er den normalen Wert und bei 20 % Umsatz einen Wert von ca. 1.15. Die Autoren interpretierten diese Resultate im Sinne des Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus. Vereinfachte semiempirische Rechnungen stützten diese Interpretation. Es wurde der Schluss gezogen, dass bei  $[^2\text{H}_5]$ Phenylalanin sowohl der Hanson/Havir- als auch der Friedel-Crafts-ähnliche Mechanismus einen konventionellen sekundären Isotopeneffekt ergeben sollte, für letzteren aber ein höherer Wert zu erwarten ist.

### 6.3. *N*-Methylierte *L*-Phenylalanine in der PAL-Reaktion

*N*-Methyl-*L*-phenylalanin, *N*-Methyl-4-nitro-*L*-phenylalanin und *N,N*-Dimethyl-4-nitrophenylalanin wurden als Substrate oder Inhibitoren von PAL aus *Petrosilenum crispum* untersucht.<sup>[86]</sup> Obwohl *N*-Methyl-*L*-phenylalanin ein mäßig gutes Substrat war ( $K_{\text{m}} = 6.6 \text{ mM}$ ,  $k_{\text{cat}} = 0.22 \text{ s}^{-1}$ ), konnte keine Rückreaktion mit Methylamin und (*E*)-Cinnamat festgestellt werden. Der  $K_{\text{m}}$ -Wert für Ammoniak in der Rückreaktion unter Verwendung von (*E*)-Cinnamat wurde bei pH 8.8 zu 4.4 M und bei pH 10 zu 2.6 M bestimmt. *N*-Methyl- und *N,N*-Dimethyl-4-nitrophenylalanin wirkten nicht als Substrate, sondern zeigten lediglich stark inhibierende Effekte ( $K_{\text{i}} = 130 \text{ nM}$  bzw.  $8 \text{ nM}$ ).<sup>[86]</sup> Dieser Befund lässt sich eher mit dem Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus als mit dem Hanson/Havir-Mechanismus in Einklang bringen.<sup>[28]</sup>

*N*-Methyl- und *N,N*-Dimethyl-4-nitrophenylalanin wurden in der dem Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus entsprechenden Orientierung<sup>[86]</sup> in das aktive Zentrum von PAL modelliert.<sup>[74]</sup> Dabei zeigte sich, dass die nitrierten aromatischen Ringe im Grunde gut in die apolare Bindungstasche passen. Auf der anderen Seite könnten die verglichen mit *L*-Phenylalanin<sup>[87]</sup> hohen Gasphasen-Protonenaffinitäten von *N*-Methyl- und *N,N*-Dimethylphenylalanin dazu führen, dass die *N*-Methylamino- und *N,N*-Dimethylamino-Gruppen stärker gebunden werden als die nichtmethylierten Gruppen.

Wenn die 4-Nitrogruppe am aromatischen Ring die Addition an MIO verhindert, wird überdies die *N*-methylierte Gruppe an Tyr 100 gedrückt und das  $\beta\text{-H}_{\text{S}}$ -Proton<sup>[76]</sup> von der enzymatischen Base Tyr 348 entfernt gehalten. Diese Gegebenheiten dürften für die starke inhibierende Wirkung ausschlaggebend sein.

Betrachtet man andererseits die Tatsache, dass 4-Nitro-*L*-phenylalanin sowohl mit Wildtyp-PAL als auch mit der MIO-freien Ser202Ala-Mutante reagiert<sup>[61]</sup> und dass *N*-Methyl-*L*-phenylalanin ein langsam reagierendes Substrat von Wt-PAL ist,<sup>[86]</sup> würde man eine schnellere Reaktion über die  $\text{E}_{\text{1cB}}$ -Route erwarten. Dies umso mehr, als eine elektrophile Gruppe in Stellung 4 des Phenylringes die Deprotonierung aus dem  $\text{EA}'$ -Zustand (Schema 3, Route 1) erleichtern und die Bildung des Carbanions im EC-Zustand begünstigen würde.

## 7. Anwendung der Rückreaktion von HAL und PAL in der Biokatalyse

Die Synthese von enantiomerenreinen natürlichen Aminosäuren sowie nichtnatürlichen Derivaten und Analoga ist ein wichtiges Ziel der synthetischen Chemie. Zum Beispiel hat das Pharmakophor von Protease-Inhibitoren, einer extrem wichtigen Klasse von Wirkstoffen gegen HIV, Grippe oder menschliche Cytomegaloviren, eine Phenylalanin-ähnliche Architektur.

Die Ammoniak-Lyase-Reaktionen verlaufen über eine stereodestruktive Eliminierung von Ammoniak aus *L*-Aminosäuren. Damit wäre es im Prinzip möglich, die *D*-Aminosäuren durch enantioselektive Abtrennung der *L*-Aminosäuren aus dem Racemat zu erhalten. Auf der anderen Seite machte der stereokonstruktive Verlauf der Rückreaktion (enantioselektive Addition von Ammoniak an die  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Säuren) diese zum attraktiveren Ansatz zur Herstellung von *L*-Aminosäuren durch Biotransformation.<sup>[88]</sup>

Die Reversibilität der HAL-Reaktion wurde schon vor etwa dreißig Jahren erkannt.<sup>[89]</sup> Unter extremen Reaktionsbedingungen *in vitro* (4 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , pH 10) vermag HAL die Rückreaktion (Aminierung) zu katalysieren.<sup>[90]</sup> Der Gebrauch von HAL in der Synthese ist relativ eingeschränkt, weil es nur mit wenigen Analoga wie 5-Nitrohistidin und 5- oder 2-Fluorhistidinen reagiert.<sup>[57,91]</sup> Kürzlich wurde allerdings berichtet, dass HAL zur Herstellung einer breiteren Auswahl von aromatischen Aminosäuren aus den entsprechenden Acrylsäuren genutzt werden kann.<sup>[92]</sup>

Vor mehr als zwanzig Jahren erkannte man, dass auch PAL die enantioselektive Addition von Ammoniak an Arylacrylsäuren katalysiert, wenn die Ammoniak-Konzentration auf 5 M erhöht wird.<sup>[93]</sup> Darüber hinaus toleriert *L*-PAL eine größere und strukturell diversere Auswahl von Substraten als HAL, und dies bei strikt beibehaltener Enantioselektivität der Ammoniak-Addition. Diese breitere Substrattoleranz – und der gleichzeitige Bedarf an Protease-Inhibitoren, die von Phenylalanin abgeleitete Strukturelemente enthalten – machen PAL zu einem attraktiven Reagens für die Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren aus achiralen Acrylat-Vorstufen. Methoden der PAL-katalysierten Bio-

transformation wurden zur enantioselektiven Synthese von sämtlichen Isomeren der Pyridinylalanine,<sup>[94]</sup> von 5-Pyrimidinylalanin und mehreren Fluor- und Chlorphenylalaninen<sup>[85,95]</sup> sowie anderen substituierten Arylalaninen genutzt (Tabelle 5).<sup>[85]</sup> Mehrere Arylalanine wurden in enantiomerenreiner Form (>99% ee) durch PAL-Katalyse in moderaten bis quantitativen Ausbeuten erhalten.

Es sollte aber erwähnt werden, dass mit ganzen Zellen von *Rhodotorula graminis* als PAL-Quelle keine Reaktion zu beobachten war, wenn versucht wurde, 4-Chlor-, 3,4-Dichlor-, 2,4,6-Trichlor-, 4-Brom-, 4-Methyl-, 4-Formyl-, 4-Amino-, 4-Nitro-, 2-Hydroxyphenyl-, Naphth-2-yl- oder Furan-3-ylacrylate als Substrate einzusetzen.<sup>[95]</sup> Betrachtet man die Unterschiede im Bereich der aktiven Zentren von *Pc*-PAL und *Rt*-PAL (siehe Abschnitt 5.2), könnten gewisse Abweichungen in der Substrattoleranz der PAL-Enzyme aus Hefe und Pflanzen existieren.

Ein PAL-Enzym aus einer pflanzlichen Quelle wurde kürzlich als ein wertvolles Reagens für die enzymatische Synthese von nichtnatürlichen Aminosäuren eingeführt.<sup>[96]</sup> Zu erwähnen ist, dass PAL auch in organischen Lösungsmitteln wie *n*-Octanol katalytisch aktiv sein kann.<sup>[97]</sup>

Enzyme können nicht nur als einzelne Biokatalysatoren genutzt werden, man kann auch kombinatorische Biosynthesewege zur Herstellung von Naturstoffen und zum Aufbau von Bibliotheken nichtnatürlicher Analoga von Naturstoffen entwerfen. Demonstriert wurde diese Strategie anhand der Synthese der Chalkone Naringenin und Pinocembrin aus L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin durch rekombinante *E. coli* mit

künstlichem Gencluster, zusammengesetzt aus dem PAL-Gen der Hefe *Rhodotorula rubra* und aus den für die Chalkon-Isomerase und Chalkon-Synthase codierenden Genen aus anderen Organismen.<sup>[98]</sup>

## 8. Tyrosin-2,3-aminomutase: ein weiteres MIO-Enzym

Es gibt eine Reihe von Ammoniak-Lyasens<sup>[88]</sup> und Aminomutasen, die verschiedene Cofaktoren und Mechanismen nutzen. Ethanolamin-Ammoniak-Lyase ist z. B. Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängig, wie auch β-Lysin-5,6-aminomutase.<sup>[3]</sup> Beide haben radikalische Zwischenstufen. α-Lysin-2,3-aminomutase ist ein Radikal-SAM-Enzym,<sup>[4]</sup> während Aspartat- und Methylaspartat-Ammoniak-Lyasen keinen Cofaktor benötigen.

Bis vor kurzem waren HAL und PAL die einzigen Enzyme, von denen bekannt war, dass sie die MIO-Gruppe enthalten. Christenson et al. entdeckten nun ein weiteres Enzym, Tyrosin-2,3-aminomutase,<sup>[70]</sup> das ebenfalls die MIO-Gruppe enthält und den gleichen Mechanismus nutzt wie HAL und PAL. Das Enzym wird von *Streptomyces globisporus* produziert, und sein Produkt, (S)-β-Tyrosin, ist Annahmen zufolge eine Vorstufe des Antibiotikums C-1027, das Antitumor- und antimikrobielle Aktivitäten zeigt.<sup>[99]</sup> Ein Bestandteil von C-1027, das (S)-3-Chlor-4,5-dihydroxyphenylalanin, wird wahrscheinlich aus (S)-β-Tyrosin gebildet, das sich 3,4-Dihydroxyphenylalanin und 3-Chlorphenylalanin als schlechte Substrate der isolierten Mutase erwiesen haben.<sup>[70]</sup> Das für die Mutase codierende Gen, das aus *S. globisporus* isoliert und in *E. coli* überexprimiert wurde, zeigt eine hohe Sequenzhomologie mit der HAL/PAL-Enzymfamilie.

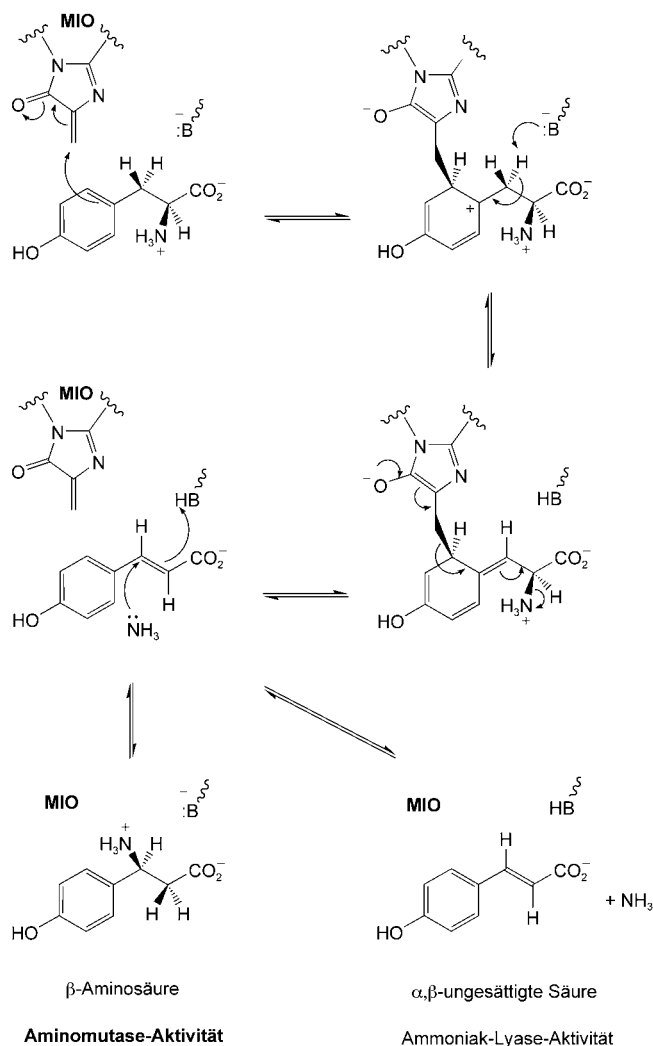
Dass die Tyrosin-2,3-aminomutase eine MIO-Gruppe enthält, wurde auf mehrerlei Weise belegt: 1) Mutation des Serins in der Sequenz Ala152Ser153Gly154 im internen Tripeptid reduziert den *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*-Wert 640fach; 2) das UV-Differenzspektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 310 nm; c) Nucleophile wie NaBH<sub>4</sub> oder KCN inhibierten die Mutase, Präinkubation mit L-Tyrosin oder 4-Hydroxycinnamat schützte aber das Enzym vor Inhibition. Das pH-Optimum der Mutase-Reaktion liegt bei etwa 8.8 – ähnlich wie bei den HAL- und PAL-Reaktionen.

Weitere mechanistische Studien zeigten, dass 4-Hydroxycinnamat eine Zwischenstufe ist und langsam freigesetzt wird, d. h., es ist ein Nebenprodukt der Reakti-

**Tabelle 5:** Synthese enantiomerenreiner L-Phenylalanin-Analoga durch PAL-Katalyse.

$\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}^- \xrightarrow[\text{NH}_3]{\text{PAL}} \text{Ar}-\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{COO}^-$			$\text{Ar-L-Ala: } >99\% \text{ ee}$		
Nr.	Ar	Lit.	Nr.	Ar	Lit.
1		[93]	9		[85]
2		[94]	10		[85]
3		[94, 95]	11		[85, 95]
4		[94]	12		[85, 95]
5		[94]	13		[85, 95]
6		[85]	14		[85]
7		[85, 95]	15		[95]
8		[85, 95]	16		[95]
17		[95]			
18		[95]			
19		[95]			
20		[95]			
21		[95]			
22		[95]			
23		[95]			
24		[95]			

on. Daraus folgt, dass Tyrosin-2,3-aminomutase auch Ammoniak-Lyase-Aktivität aufweist. Normalerweise entlässt die Mutase das im aktiven Zentrum produzierte Ammoniak aber nicht, sondern addiert es an die Zwischenstufe 4-Hydroxycinnamat in  $\beta$ -Position. Dieser zweite Schritt ist eine Michael-Addition an eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Säure und damit auch der leichtere Teil der Gesamtreaktion.<sup>[70]</sup> Die Mutase zeigt interessanterweise auch eine  $\beta$ -Tyrosin-Racemase-Aktivität,  $\alpha$ -Tyrosin wird aber nicht racemisiert. Das bedeutet, dass die Zurückaddition von Ammoniak an das Michael-System reversibel ist und nicht enantioselektiv verläuft. Der Mechanismus der L-Tyrosin-2,3-aminomutase-Reaktion ist in Schema 19 illustriert.



**Schema 19.** Postulierter Mechanismus der L-Tyrosin-2,3-aminomutase-Reaktion.<sup>[70]</sup>

Es entsteht die Frage, ob es noch weitere MIO-Enzyme zu entdecken gibt. Zur Aktivierung der inerten  $\beta$ -Stellung von Carbonsäuren existieren mehrere mechanistische Möglichkeiten. Hoch reaktive Radikale wie 5-Desoxyadenosyl- oder Glycyl-Radikale können Wasserstoffatome auch aus unreaktiven Stellungen abspalten und dadurch ein aktiviertes Sub-

strat-Radikal erzeugen, das aber unter enzymatischer Kontrolle bleibt.<sup>[1]</sup> Elektrophile Aktivierung ist eine Alternative in Fällen, in denen sich ein aromatischer Ring in benachbarter Position befindet. Es gibt einige Beispiele, bei denen nicht endgültig geklärt ist, welcher der beiden Aktivierungsmechanismen, radikalisch oder elektrophil, vorliegt.

## 9. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im vorliegenden Aufsatz haben wir den Mechanismus geschildert, durch den die Ammoniak-Lyasen HAL und PAL die chemisch schwierige Eliminierung von Ammoniak aus Histidin und Phenylalanin katalysieren. Diese Enzyme nutzen eine superelektrophile prosthetische Gruppe, das kürzlich entdeckte 5-Methylen-3,5-dihydroimidazol-4-on, um die nicht-acide  $\beta$ -Stellung ihrer Substrate durch einen Friedel-Crafts-ähnlichen Angriff am aromatischen Ring zu aktivieren. In den erzeugten  $\sigma$ -Komplexen ist die Abspaltung eines Protons vom Ring dadurch verhindert, dass jegliche Base aus der Bindungstasche des Enzyms ausgeschlossen bleibt. Stattdessen wird das exocyclische Proton durch eine geeignet platzierte enzymatische Base abstrahiert. Die so gebildete exocyclische Doppelbindung ist die Voraussetzung für einen konzertierten Prozess, bestehend aus Ammoniak-Eliminierung, Rearomatisierung und Fragmentierung. Am Ende werden die MIO-Gruppe regeneriert und die Produkte (*E*)-Urocanat und (*E*)-Cinnamat gebildet.

Der obige Mechanismus ist durch mehrere biochemische Resultate, die Röntgenkristallstrukturen von HAL und PAL sowie durch Modellierungsexperimente belegt. Vor diesen Entdeckungen nahm man während 30 Jahren an, dass es sich bei dem prosthetischen Elektrophil um Dehydroalanin handelt und die  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe des Substrates an den Michael-Acceptor addiert. Dieser „alte“ Mechanismus war aus mehreren Gründen unbefriedigend: Er konnte nicht erklären, wie eine enzymatische Base das nicht-acide  $\beta$ -Proton ( $pK_s > 40$ ) abspaltet, und auch nicht, warum die meisten Aminosäuren (außer L-Cystein und L-Homocystein) HAL nicht inhibieren. Davon abgesehen ist Dehydroalanin im Grunde kein guter Michael-Acceptor, weil die Delokalisierung der einsamen Elektronenpaare der Stickstoffatome seine Elektrophilie herabsetzt.

Seit der Veröffentlichung des „neuen“ Mechanismus und speziell der Röntgenkristallstruktur von HAL bestätigten die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen den Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus, während in keinem Fall Argumente dagegen vorgebracht wurden.

Ein neues bakterielles MIO-Enzym mit Tyrosin-2,3-aminomutase-Aktivität wurde kürzlich beschrieben, und wir erwarten mit Interesse die Entdeckung weiterer MIO-Enzyme.

*Wir danken Dr. Csaba Paizs für seine Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes. J.R. dankt seinen früheren Mitarbeitern für ihren begeisterten Einsatz für das MIO-Projekt, namentlich Dr. Andreas Gloge, Dr. Birgid Langer (vorm. Schuster), Dr. Martin Langer, Dr. Dietrich Merkel, Dr. Gaby Morlock, Dr. Andrea Pauling, Dr. Gunhild Reck, Dr. Dagmar Röther, Dr.*

Alexander Skolaut, Dr. Sandra Viergutz und Dr. Karl-Heinz Weber. J.R. dankt auch Professor Georg E. Schulz sowie Dr. Torsten F. Schwede und Dr. Mathias Baedeker für die Zusammenarbeit bei der Röntgenstrukturanalyse von HAL und für ein Plasmid mit dem modifizierten PAL-Gen.

Wir danken weiter Prof. Nikolaus Amrhein und Prof. Klaus Hahlbrock, die uns einen Antikörper gegen PAL bzw. das PAL-Gen aus Petersilie zur Verfügung gestellt haben.

Für ausgezeichnete technische Assistenz danken wir Ingrid Merkel und Stefanie Vollmer.

Die Arbeiten in Karlsruhe wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Land Baden-Württemberg finanziell unterstützt. L.P. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium und dem OTKA (T-048854) für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 21. Juli 2004,

veränderte Fassung am 29. Oktober 2004

Online veröffentlicht am 20. Mai 2005

- [1] J. Rétey, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 373–379; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 355–361.
- [2] a) P. A. Frey, M. K. Essenberg, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 5369–5377; b) T. H. Finlay, J. Valinsky, K. Sato, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 4197–4207; c) Y. Zhao, P. Such, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 212–213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 215–216; d) Y. Zhao, A. Abend, M. Kunz, P. Such, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225, 891–896.
- [3] Ausgewählte Übersichten zum Thema: a) W. Buckel, B. T. Golding, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 25, 329–337; b) E. N. G. Marsh, C. L. Drennan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 499–505; c) R. Banerjee, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2083–2094; d) T. Toraya, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2095–2127.
- [4] P. A. Frey, O. T. Magnusson, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2129–2148.
- [5] P. Christen, P. K. Mehta, *Chem. Rev.* **2001**, 1, 436–447.
- [6] E. E. Snell, *Methods Enzymol.* **1986**, 122, 128–135.
- [7] G. Lukatela, N. Krauss, K. Theis, T. Selmer, V. Gieselmann, K. von Figura, W. Saenger, *Biochemistry* **1998**, 37, 3654–3664.
- [8] a) J. E. Dove, J. P. Klinman, *Adv. Protein Chem.* **2001**, 58, 141–174; b) S. J. Firbank, M. S. Rogers, C. M. Wilmot, D. M. Dooley, M. A. Halcrow, P. F. Knowles, M. J. McPherson, S. E. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 12932–12937.
- [9] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459–1462.
- [10] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, 296, 1462–1466.
- [11] S. K. Blight, R. C. Larue, A. Mahapatra, D. G. Longstaff, E. Chang, G. Zhao, P. T. Kang, K. B. Green-Church, M. K. Chan, J. A. Krzycki, *Nature* **2004**, 431, 333–335.
- [12] M. Thanbichler, A. Böck, *Methods Enzymol.* **2002**, 347, 3–16.
- [13] J. Klepp, A. Fallert-Müller, K. Grimm, W. E. Hull, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 192, 669–676.
- [14] L. A. Chasin, B. Magasanik, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 5165–5178.
- [15] P. Lund, B. Magasanik, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 4316–4319.
- [16] H. K. Meiss, W. J. Brill, B. Magasanik, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 5382–5391.
- [17] a) H. Tabor, A. H. Mehler, *J. Biol. Chem.* **1954**, 210, 559–568; b) T. G. Lessie, F. C. Neidhard, *J. Bacteriol.* **1967**, 149, 1800–1810; c) B. E. Uhlir, A. J. Clark, *J. Bacteriol.* **1981**, 163, 386–390.
- [18] R. G. Taylor, H. L. Levy, R. R. McInnes, *Mol. Biol. Med.* **1991**, 8, 101–116.
- [19] a) D. H. Hug, J. K. Hunter, *J. Bacteriol.* **1970**, 152, 874–876; b) A. R. Young, *Phys. Med. Biol.* **1997**, 42, 789–802.
- [20] a) T. Yoshida, K. Tada, Y. Honda, T. Arakawa, J. Tohoku, *J. Exp. Med.* **1971**, 104, 305–312; b) Z. Kalatatic, K. Lipovac, Z. Jereniac, D. Juretic, M. Dumic, B. Zurga, L. Res, *Metabolism* **1980**, 29, 1013–1019.
- [21] D. Kessler, J. Rétey, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 183–194.
- [22] a) M. W. Consevage, A. T. Phillips, *Biochemistry* **1985**, 24, 301–308; b) M. Fessenmaier, R. Frank, C. Schubert, J. Rétey, *FEBS Lett.* **1991**, 286, 55–57.
- [23] a) R. G. Taylor, J. Garcia-Heras, S. J. Sadler, R. G. Lafreniere, H. F. Willrad, D. H. Ledbetter, R. R. McInnes, *Cytogenet. Cell Genet.* **1991**, 56, 178–181; b) R. G. Taylor, D. Grieco, G. A. Clarke, R. R. McInnes, B. A. Taylor, *Genomics* **1993**, 16, 231–240; c) R. G. Taylor, R. R. McInnes, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27473–27477.
- [24] a) „Regulation in the hut System“: B. Magasanik in *The Operon* (Hrsg.: J. H. Miller, W. S. Reznikoff), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1987**, S. 373–387; b) L. Hu, S. L. Allison, A. T. Phillips, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 1489–1495; c) S. A. Boylan, L. J. Eades, *Mol. Gen. Genet.* **1984**, 193, 92–97; d) A. J. Nieuwkoop, S. A. Baldauf, M. E. S. Hudspeth, R. A. Bender, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 2240–2246; e) M. Oda, A. Sugishita, K. Furukawa, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 3199–3205.
- [25] a) K. Hahlbrock, D. Scheel, *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **1989**, 40, 347–369; b) C. Appert, E. Logemann, K. Hahlbrock, J. Schmid, N. Amrhein, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225, 491–499.
- [26] J. G. Anson, H. J. Gilbert, J. D. Oram, N. P. Minton, *Gene* **1987**, 58, 189–199.
- [27] L. Xiang, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 32505–32509.
- [28] K. R. Hanson, E. A. Havir, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 141, 1–17.
- [29] a) B. V. Charlwood, M. Pletsch, *J. Herbs Spices Med. Plants* **2002**, 9, 139–151; b) T. Kusumi, *Bio Ind.* **1999**, 16, 31–39; c) K. M. Davies, S. J. Bloor, G. B. Spiller, *Plant J.* **1998**, 13, 259–266.
- [30] J. Zoñ, N. Amrhein, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 625–628.
- [31] a) G. M. Kishore, D. M. Shah, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 627–663; b) E. Haslam, *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, Wiley, New York, **1993**.
- [32] a) P. E. Flemming, U. Mocek, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 805–807; b) K. Walker, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5333–5334.
- [33] W. W. Poon, B. N. Marbois, K. F. Faull, C. F. Clarke, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 320, 305–314.
- [34] A. Mitra, Y. Kitamura, M. J. Gasson, A. Narbad, A. J. Parr, J. Payne, M. J. C. Rhodes, C. Sewter, N. J. Walton, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 365, 10–16.
- [35] PAL aus *Rhodotorula glutinis*, Sigma Biochemicals and Reagents, Cat. No. P1016.
- [36] J. A. Kyndt, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, J. J. Van Beumen, *FEBS Lett.* **2002**, 512, 240–244.
- [37] A. Hunter, *J. Biol. Chem.* **1912**, 11, 537–545.
- [38] S. Edlbacher, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1926**, 157, 106.
- [39] A. Peterkofsky, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 787–795.
- [40] T. A. Smith, F. H. Cordelle, R. H. Abeles, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, 120, 724–725.
- [41] a) D. Hodgins, R. H. Abeles, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 5158–5159; b) D. Hodgins, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 2977–2985.
- [42] R. B. Wickner, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6550–6552.
- [43] J. D. Hermes, P. M. Weiss, W. W. Cleland, *Biochemistry* **1985**, 24, 2959–2967.
- [44] a) M. Varma, C. J. M. Stirling, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 553–554; b) M. B. Smith, J. March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, S. 1321.



- [45] W. Shi, J. Dunbar, M. M. K. Jayasekera, R. E. Viola, G. K. Farber, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9136–9144.
- [46] M. M. K. Jayasekera, W. Shi, G. K. Farber, R. E. Viola, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9145–9150.
- [47] a) C. V. Levy, P. A. Sedelnikova, Y. Kato, Y. Asano, D. W. Rice, P. J. Baker, *Struct. Fold. Des.* **2002**, *10*, 105–113; b) Y. Asano, Y. Kato, C. Levy, P. Baker, D. Rice, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 131–138.
- [48] M. Asuncion, W. Blankenfeldt, J. N. Barlow, D. Gani, J. H. Naismith, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 8306–8311.
- [49] a) J. C. Calabrese, D. B. Jordan, A. Boodhoo, S. Sariaslani, T. Vannelli, *Biochemistry* **2004**, *43*, 11403–11416; b) H. Ritter, G. E. Schulz, *Plant Cell* **2004**, *16*, 3426–3436.
- [50] F. G. Bordwell, Y. Zhao, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3932–3933.
- [51] H. G. Sahl, R. W. Jack, G. Bierbaum, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 827–853.
- [52] J. Rétey, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1647*, 179–184.
- [53] „Novel Cofactors“: B. Langer, M. Langer, J. Rétey, *Adv. Protein Chem.* **2002**, *58*, 175–214.
- [54] M. Langer, G. Reck, J. Reed, J. Rétey, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6462–6467.
- [55] B. Schuster, J. Rétey, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 252–254.
- [56] a) B. Langer, A. Lieber, J. Rétey, *Biochemistry* **1994**, *33*, 14034–14039; b) B. Langer, D. Röther, J. Rétey, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10867–10871.
- [57] C. B. Klee, K. L. Kirk, L. A. Cohen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 343–348.
- [58] M. Langer, A. Pauling, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1585–1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1464–1465.
- [59] J. Rétey, H. Fierz, W. P. Zeylemaker, *FEBS Lett.* **1970**, *6*, 203–204.
- [60] J. Rétey, *Naturwissenschaften* **1996**, *83*, 439–447.
- [61] B. Schuster, J. Rétey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8433–8437.
- [62] M. Rettig, A. Sigrist, J. Rétey, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2246–2265.
- [63] a) D. Hernandez, J. G. Stroh, A. T. Phillips, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *307*, 126–132; b) T. F. Schwede, M. Bädeker, M. Langer, J. Rétey, G. E. Schulz, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 151–153.
- [64] T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5355–5361.
- [65] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392–1395.
- [66] D. Merkel, J. Rétey, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [67] M. Bädeker, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1790–1797.
- [68] a) C. B. Klee, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3143–3152; b) C. B. Klee, *Biochemistry* **1974**, *22*, 4502–4507.
- [69] D. Röther, D. Merkel, J. Rétey, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2592–2594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2462–2464.
- [70] a) S. D. Christenson, W. Liu, M. D. Toney, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6062–6063; b) S. D. Christenson, W. Wu, M. A. Spies, B. Shen, M. D. Toney, *Biochemistry* **2003**, *42*, 12708–12718.
- [71] M. Bädeker, G. E. Schulz, *Structure* **2002**, *10*, 61–67.
- [72] D. Röther, L. Poppe, S. Viergutz, B. Langer, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6011–6019.
- [73] C. B. Klee, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 1398–1406.
- [74] D. Röther, L. Poppe, G. Morlock, S. Viergutz, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3065–3075.
- [75] S. Viergutz, J. Rétey, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 296–302.
- [76] a) K. R. Hanson, R. H. Wightman, J. Staunton, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 185–186; b) G. W. Kirby, J. Michael, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 187.
- [77] S. Viergutz, J. Rétey, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [78] a) D. Hernandez, J. G. Stroh, A. T. Phillips, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *307*, 126–132; b) K. Weber, J. Rétey, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1001–1006.
- [79] a) D. Merkel, Dissertation, Universität Karlsruhe, **1999**; b) D. Galpin, B. E. Ellis, M. E. Tanner, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10840–10841; c) D. Merkel, J. Rétey, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1151–1160.
- [80] T. Andrews, G. Lorimer, N. Tolbert, *Biochemistry* **1973**, *12*, 11–18.
- [81] A. Skolaut, J. Rétey, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *393*, 187–190.
- [82] A. Lewandowicz, J. Jemielity, M. Kańska, J. Zoń, P. Paneth, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *370*, 216–221.
- [83] S. Alunni, A. Cipiciani, G. Fioroni, L. Ottavi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *412*, 170–175.
- [84] K. R. Hanson, E. A. Harry, C. Ressler, *Biochemistry* **1979**, *18*, 1431–1439.
- [85] A. Gloge, J. Zoń, Á. Kövári, L. Poppe, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3386–3390.
- [86] S. Viergutz, L. Poppe, A. Tomin, J. Rétey, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3601–3612.
- [87] S. Campbell, E. M. Marzluff, M. T. Rodgers, J. L. Beauchamp, M. E. Rempe, K. F. Schwinck, D. L. Lichtenberger, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5251–5264.
- [88] a) L. Poppe, J. Rétey, *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 1297–1315; b) H. Kamachi, H. Aoki, *Bio Ind.* **2003**, *20*, 12–20.
- [89] V. R. Williams, J. M. Hiroms, *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *139*, 214–216.
- [90] R. L. Fuchs, J. F. Kane, *J. Bacteriol.* **1985**, *167*, 98–101.
- [91] C. B. Klee, K. L. Kirk, L. A. Cohen, P. McPhie, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 5033–5040.
- [92] H. Aoki, H. Kamachi (Showa Denko K. K., Japan), Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2004), JP 2004041107 A2 [*Chem. Abstr.* **2004**, *140*, 117363].
- [93] a) S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, K. Nakamichi, I. Chibata, *Appl. Environ. Microb.* **1981**, *42*, 773–778; b) C. T. Evans, K. Hanna, C. Payne, D. Conrad, M. Misawa, *Enzyme Microb. Technol.* **1987**, *9*, 417–421; c) M. Yanaka, D. Ura, A. Takahashi, N. Fukuhara (Mitsui Toatsu Chemicals), JP 06,113,870 (1994) [*Chem. Abstr.* **1994**, *121*, 155941y].
- [94] A. Gloge, B. Langer, L. Poppe, J. Rétey, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *359*, 1–7.
- [95] W. Liu (Great Lakes Chemical Co.), USP 5,981,239 (1999) [*Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 321632].
- [96] H. Aoki, H. Kamachi (Showa Denko K. K., Japan), PCT Int. Appl. (2003), WO 2003000915 A1 [*Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 54648].
- [97] D. G. Rees, D. H. Jones, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1338*, 121–126.
- [98] K. Masafumi, H. E. Il, O. Yasuo, H. Sueharu, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 456–461.
- [99] J. L. Hu, Y. C. Xie, M. Y. Xie, R. Zhang, T. Otani, Y. Mihami, Y. Yamada, T. Marunaka, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1575–1579.