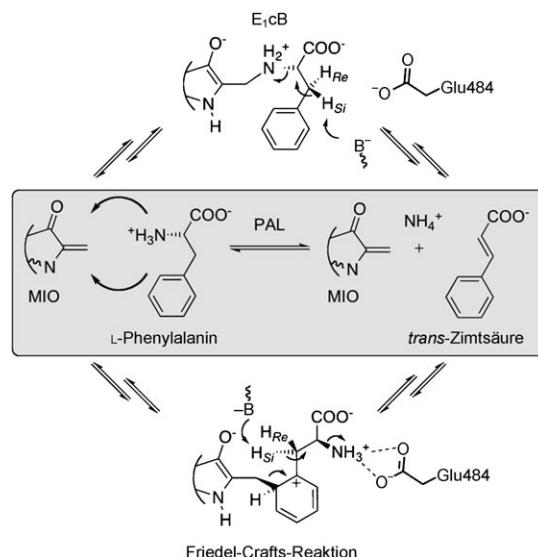


# Einfluss einer einzelnen Aminosäure auf den Reaktionsmechanismus von Ammonium-Lyasen und -Mutasen\*\*

Sebastian Bartsch und Uwe T. Bornscheuer\*

Seit Jahren wird der Mechanismus der nichtoxidativen Desaminierung aromatischer Aminosäuren durch Enzyme wie die Phenylalanin- und die Tyrosin-Ammonium-Lyase (PAL/TAL) kontrovers diskutiert.<sup>[1]</sup> Bisher wurden zwei unterschiedliche Wege vorgeschlagen – Eliminierungs- oder Friedel-Crafts-Reaktion –, was bedeutet, dass diese Enzyme eine Art katalytischer Promiskuität bezüglich der Art und Weise, wie Bindungen gebildet oder gebrochen werden, aufweisen.<sup>[2]</sup> Dies wirft die Frage auf, wieso die Natur unterschiedliche Ansätze verfolgen sollte, um dasselbe Ziel zu erreichen. Eine Erklärung soll hier auf Grundlage von Punktmutationen, die von Computermodeling-Studien abgeleitet wurden, vorgeschlagen werden.

PALs katalysieren die Reaktion von Phenylalanin (Phe) zu *trans*-Zimtsäure und Ammonium, TALs die von Tyrosin (Tyr) zu *p*-Cumarsäure (Schema 1). Alle Enzyme dieser Klasse enthalten das prosthetische 4-Methyliden-imidazol-5-on (MIO) im aktiven Zentrum, das autokatalytisch aus den Aminosäuren Ala-Ser-Gly entsteht.<sup>[3]</sup> Der zuerst beschriebene Mechanismus bestand in einer Eliminierung ( $E_{1c}B$ ) mit einem Angriff der elektrophilen MIO-Einheit auf die Aminogruppe des Substrats (Schema 1).<sup>[4]</sup> Der hauptsächliche Nachteil des  $E_{1c}B$ -Mechanismus ist die schwierige Abtrennung des nicht sauren, benzyllischen Protons mit einem  $pK_S$ -Wert von über 40<sup>[5]</sup> durch eine enzymatische Base.<sup>[1]</sup> Dieser Mechanismus wird am stärksten durch eine kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur einer Tyrosin-Ammonium-Mutase (TAM) gestützt, die ein kovalentes Addukt der MIO-Einheit und der Aminogruppe des Substrats aufweist.<sup>[6]</sup> Dies widerspricht jedoch der Beobachtung, dass Histidin-Ammonium-Lyasen (HALs) ohne intakte MIO-Einheit 5-Nitrohistidin umsetzen, was den  $E_{1c}B$ -Mechanismus ausschließt. Daher wurde ein alternativer Reaktionsmechanismus vorgeschla-



**Schema 1.** Vermutete Reaktionsmechanismen der pcPAL: Eliminierung ( $E_{1c}B$ ), wie von Hanson und Havar postuliert,<sup>[4a]</sup> und Friedel-Crafts-Mechanismus, wie von Schuster und Rétey vorgeschlagen.<sup>[9a]</sup>

gen, der darauf beruht, dass die prosthetische Gruppe den aromatischen Ring elektrophil angreift.<sup>[7]</sup> Dieser zweite Mechanismus ist für die PAL weniger wahrscheinlich als für die HAL, da der Phenylring des Phe-Substrats weniger elektronenreich ist als jener des His-Substrats und zudem während der Reaktion zwischenzeitlich seine Aromatizität einbüßt (Schema 1). Verschiedene Experimente lieferten jedoch Hinweise, dass diese erste beschriebene biologische Friedel-Crafts-Reaktion<sup>[8]</sup> auch bei der PAL auftritt.<sup>[9]</sup>

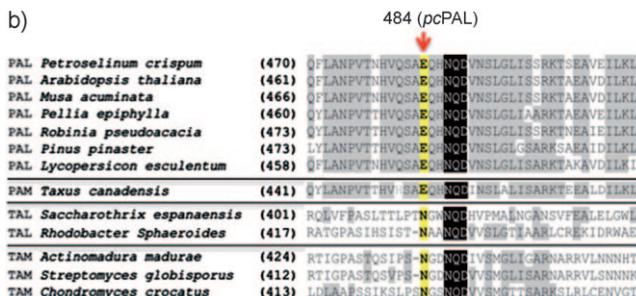
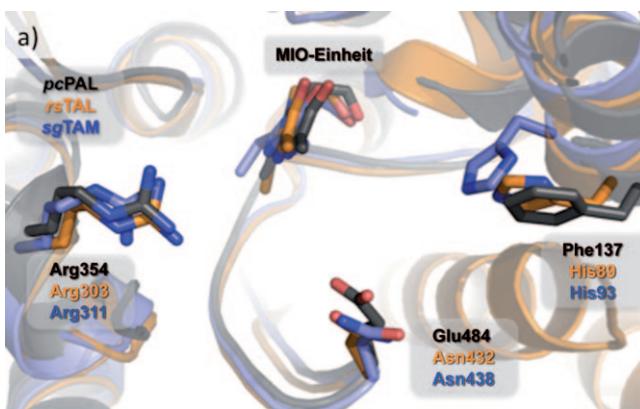
Frühere Studien der TAL und PAL zeigten, dass ein konservierter Phe-Rest (Phe137 der pcPAL<sup>[10]</sup>) in der rsTAL<sup>[10]</sup> durch ein His ersetzt ist, das H-Brücken mit der *p*-OH-Gruppe des Tyrosinsubstrats eingeht und so zur unterschiedlichen Substratspezifität der beiden Enzyme führt.<sup>[11]</sup> Durch Struktur- und Sequenzvergleiche entdeckten wir Glutamat als eine weitere konservierte Aminosäure in der PAL (Glu484 in pcPAL) und der entsprechenden Ammonium-Mutase (PAM), die durch ein Asparagin in TAL (Asn432 in rsTAL) und TAM (Abbildung 1) ersetzt ist.

Um die Funktion von Glu484 aufzuklären, wurden ein automatisiertes Docking und Moleküldynamik(MD)-Simulationen unter Verwendung der Kristallstrukturen der rsTAL<sup>[11a]</sup> (pdb-Code: 2o6y) und pcPAL<sup>[12]</sup> (pdb-Code: 1w27) durchgeführt. Es wurde vermutet, dass die Struktur der pcPAL wegen einer ungünstigen Orientierung der Schleife, die das für die Katalyse essenzielle Tyr110 enthält, einem inaktiven Enzym entspricht.<sup>[13]</sup> Es wurde ein wahrscheinlich

[\*] Dipl.-Biochem. S. Bartsch, Prof. U. T. Bornscheuer  
Institut für Biochemie, Abteilung Biotechnologie & Enzymkatalyse  
Universität Greifswald  
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)  
Fax: (+49) 3834-86-80066  
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de  
Homepage: <http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech>

[\*\*] Wir danken der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Unterstützung (AZ 13197), Prof. Kenji Miyamoto und Martin Mahro für grundlegende Arbeiten zur PAL, Dr. Dominique Böttcher für ihre generelle Unterstützung innerhalb des Projektes, Inga Mahr für Ihre Mithilfe im Labor und Prof. George E. Schulz (Universität Freiburg) für die großzügige Bereitstellung des für PAL kodierenden Gens.

Hintergrundinformationen (Experimentelles) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900337> zu finden.

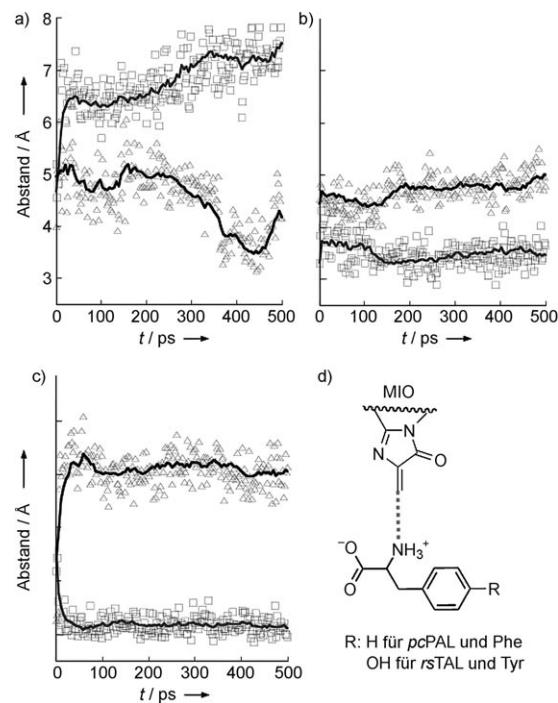


**Abbildung 1.** Struktur- und Sequenzvergleiche unterschiedlicher Ammonium-Lyasen und -Mutasen. a) Der Strukturvergleich der pcPAL (schwarz), rsTAL (orange) und sgTAM (blau) zeigt die wichtigsten Reste für die Substratbindung. b) Sequenzvergleich der bekannten PAL-, PAM-, TAL- und TAM-Enzyme. Schwarz: konservierte Aminosäuren; grau: homologe und ähnliche Aminosäuren; Aminosäure 484 (pcPAL) ist gelb hervorgehoben und durch einen Pfeil markiert.

aktives Homologiemodell mit der korrekten Konformation der Tyr110 enthaltenden Schleife generiert, das ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Substratorientierung und -stabilisierung zeigte (siehe Hintergrundinformationen). Während der MD-Simulationen konnten wir stets eine starke Anziehung zwischen der Aminogruppe des Substrats und Glu484 beobachten, mit der Konsequenz, dass der Abstand zwischen der Aminogruppe und der prosthetischen MIO-Einheit signifikant zu groß für Wechselwirkungen war (Abbildung 2a, Quadrate).

Dieses Ergebnis stützt für pcPAL den Friedel-Crafts-Mechanismus und schließt den E<sub>1</sub>cB-Mechanismus aus, was im Gegensatz zu den Resultaten für die Glu484Asn-pcPAL-Mutante (Abbildung 2a, Dreiecke) sowie für den rsTAL- und sgTAM-Wildtyp (WT)<sup>[10]</sup> (Abbildung 2b,c) steht.<sup>[6a]</sup> Durch die Glu→Asn-Substitution (Abbildung 2, Dreiecke) im aktiven Zentrum des TAL-WT (Asn432), TAM-WT (Asn438) und der pcPAL-Mutante Glu484Asn wird die Aminogruppe nicht gezwungen, während der MD-Simulationen in Richtung von Glu484 (pcPAL) zu zeigen; daher dreht sie sich in allen Fällen, unabhängig von der anfänglichen Orientierung, zur MIO-Einheit hin. Dies lässt auf einen E<sub>1</sub>cB-Mechanismus bei TAL und TAM schließen.

Diese Erkenntnisse führten zur Hypothese, dass beide Mechanismen, der Friedel-Crafts- und der E<sub>1</sub>cB-Mechanismus, in aromatischen Aminosäure-Ammonium-Lyasen und



**Abbildung 2.** MD-Simulationen der WT-Enzyme (pcPAL, rsTAL, sgTAM; Quadrate) und der entsprechenden Mutanten (Glu484Asn-pcPAL, Asn432Glu-rsTAL, Asn438Glu-sgTAM; Dreiecke). a) pcPAL mit Phe; b) rsTAL mit Tyr; c) sgTAM mit β-Tyrosin; d) der gemessene Abstand ist durch die gestrichelte Linie dargestellt (β-Tyrosin nicht gezeigt).

-Mutasen auftreten können, abhängig von der neu entdeckten Aminosäure Glu484 (in pcPAL).

Zur experimentellen Bestätigung dieser Annahme wurde m-Tyrosin (*m*-Tyr) als Substrat ausgewählt, um die Wahrscheinlichkeit des Friedel-Crafts-Mechanismus zu untersuchen. Es wurde berichtet, dass das freie Elektronenpaar der *m*-OH-Gruppe die zwischenzeitlich auftretende positive Ladung am aromatischen Ring während der Friedel-Crafts-Reaktion stabilisiert (Schema 1).<sup>[9a]</sup> Weitere Experimente, die diesen Mechanismus stützten, zeigten ähnliche elektronische Effekte bei der Verwendung von Pyrimidin-Alaninen sowie halogenierten oder N-methylierten Phenylalaninen.<sup>[14]</sup>

Die für den pcPAL-WT und die Glu484Asn-Mutante gemessenen kinetischen Konstanten belegen im Fall der Glu484Asn-Mutante eine signifikant verminderte Aktivität für *m*-Tyr gegenüber jener für Phe (7,6-fach niedrigerer *k*<sub>cat</sub>-Wert); dagegen waren die WT-Aktivitäten für *m*-Tyr erwartungsgemäß ähnlich, allerdings nicht höher, wahrscheinlich, weil *m*-Tyr sterisch anspruchsvoller ist als Phe (Tabelle 1). Dies zeigt eindeutig, dass die vorteilhaften elektronischen Effekte von *m*-Tyr, die den Friedel-Crafts-Mechanismus fördern, bei der Glu484Asn-Mutante wirkungslos bleiben, was unsere Hypothese stützt.

Dies wirft die Frage auf, weshalb die Natur zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen nutzen sollte, um dasselbe Ziel zu erreichen, und weshalb in Abhängigkeit vom bevorzugten Substrat unterschiedliche Aminosäuren an derselben Position konserviert sein sollten. Um die Gründe auf molekularer Ebene aufzudecken, betrachteten wir die Fak-

**Tabelle 1:** Vergleich der kinetischen Konstanten des pcPAL-WT und der Glu484Asn-Mutante bei der Umsetzung von L-Phenylalanin und m-Tyrosin.

Enzym	Substrat	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
pcPAL-WT	L-Phe	0.054 ± 0.01	31 ± 3	568 000
pcPAL-E484N	L-Phe	0.75 ± 0.08	13 ± 1	16 700
pcPAL-WT	L-m-Tyr	0.10 ± 0.01	24 ± 1	246 000
pcPAL-E484N	L-m-Tyr	0.32 ± 0.03	1.7 ± 0.2	5410

toren für die Substratstabilisierung im aktiven Zentrum: Während Tyrosin in TAL/TAM durch H-Brücken zwischen der Carboxygruppe von Tyr und Arg303 (in rsTAL) und zwischen der p-OH-Gruppe des Substrats und His89 (rsTAL) ausgerichtet wird, fehlt die p-OH-Gruppe bei PAL/PAM (Abbildung 3). Dies führte uns zu der Annahme, dass mindestens zwei unabhängige H-Brücken für die Stabilisierung und korrekte Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum der PAL/PAM notwendig sind.

Zur Identifizierung der H-Brücken wurde Phenylalaninol (Phe-ol) verwendet, um die starke H-Brücke zwischen Arg354 (pcPAL) und der Carboxygruppe des Substrates zu vermeiden (Abbildung 3a/b). MD-Simulationen mit der pcPAL zeigten, dass sich Phe-ol, anders als Phe, frei im aktiven Zentrum bewegen kann und nur durch die H-Brücken zwischen der Aminogruppe und Glu484 gebunden wird (Abbildung 3b,c), da die H-Brücke der Carboxygruppe fehlt

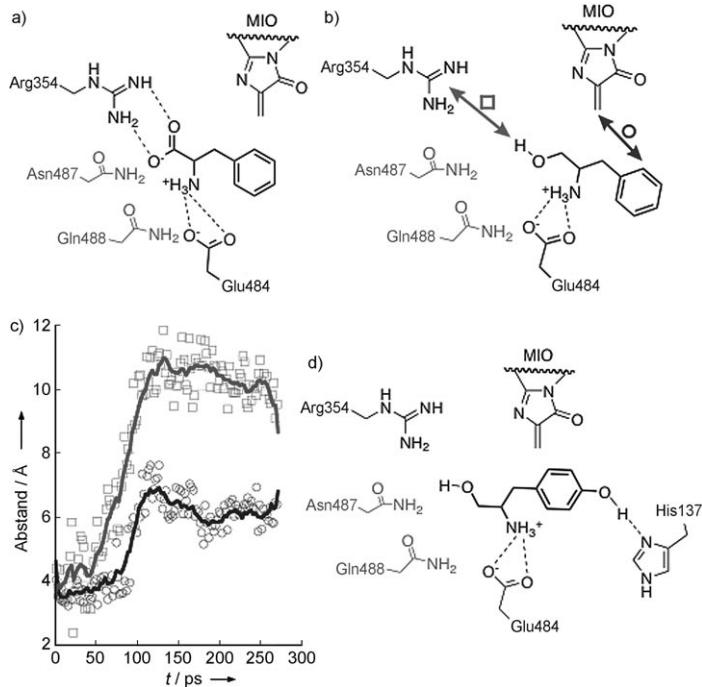
und nur eine schwache hydrophobe Stabilisierung des aromatischen Ringes vorhanden ist.

Kinetische Messungen zeigten keine erkennbare Aktivität der pcPAL für Phe-ol und bestätigten somit die Simulationen. Die Unterstützung durch eine zusätzliche H-Brücke unter Verwendung der bereits beschriebenen pcPAL-Mutante Phe137His<sup>[11]</sup> und Tyrosinol (Tyr-ol) als Substrat (Abbildung 3d) versprach eine stabile Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum während MD-Simulationen. Tatsächlich konnte für die Mutante eine signifikante Aktivität von 18.6 mU mg<sup>-1</sup> gemessen werden, anders als für den WT, der keine Aktivität für Tyr-ol zeigte. Zum Vergleich wurde die rsTAL getestet, die wie erwartet eine höhere Aktivität (33.7 mU mg<sup>-1</sup>) gegenüber Tyr-ol aufwies (Tabelle 2). In der pcPAL-Mutante Glu484Asn ist keine starke H-Brücke zwischen der Aminosäure 484 und der Aminogruppe des Substrates möglich. Tatsächlich zeigte diese Mutante eine signifikant verminderte Aktivität und einen drastisch höheren  $K_M$ -Wert bei der Umsetzung von Phe als der Wildtyp (Tabelle 2). Diese Befunde belegen die schwache Bindung des Substrats im aktiven Zentrum, verursacht durch die fehlenden H-Brücken zwischen Phe und Glu484. Dies erklärt, warum Glu484 (pcPAL) in PAL/PAM wesentlich für eine effiziente Umsetzung von Phe ist und warum es bei TAL/TAM nicht benötigt wird.

Darüber hinaus zeigte die Glu484Asn-Mutante einen signifikant niedrigeren  $K_M$ -Wert, was zu einem höheren  $k_{cat}/K_M$ -Wert bei der Tyr-Umsetzung (ähnlich der Phe137His-Mutante) führte (Tabelle 2). Diese Beobachtungen konnten

nicht durch Computersimulationen erklärt werden, machen aber deutlich, dass es einen Grund für das Vorliegen von Asparagin an Position 432 (rsTAL) gibt. Des Weiteren erwarten wir, dass die Doppelmutante Phe137His-Glu484Asn noch mehr TAL-ähnliche Eigenschaften hat und dass die Asn432Glu-Mutante der rsTAL eher PAL-ähnliche Eigenschaften aufweist. Allerdings zeigten diese Mutanten nur sehr geringe Aktivitäten für Phe und Tyr, ein Beleg für das fein abgestimmte und sehr empfindliche aktive Zentrum dieser Enzyme. Daran ist auch ersichtlich, dass die Unterschiede der PAL und TAL nicht ausschließlich auf zwei Aminosäureresten beruhen, sondern auch noch durch andere Faktoren beeinflusst werden.

Zusammenfassend kann der seit vielen Jahren kontrovers diskutierte Mechanismus der PAL/PAM- und TAL/TAM-Enzyme durch die Beobachtung erklärt werden, dass Glu484 (pcPAL) einen Angriff der MIO-Einheit auf die Aminogruppe des Substrates verhindert, wodurch der Friedel-Crafts-Mechanismus unterstützt wird, im Unterschied zu TAL/TAM-Enzymen. Diese Beobachtung, die einer „mechanistischen Promiskuität“ entspricht, bei der unterschiedliche Reaktionsmechanismen zum selben Produkt führen können, beantwortet die Frage, warum in der Literatur bisher sowohl der E<sub>1</sub>cB- wie auch der Friedel-Crafts-Mechanismus favorisiert wurden. Die Unterschiede der Substratspezifitäten von PAL/PAM und TAL/TAM konnten nun basierend auf Untersuchungen der Substratorientierung und -stabilisierung dadurch erklärt werden, dass bei



**Abbildung 3:** Aktives Zentrum der pcPAL mit gedocktem Substrat. a) pcPAL-WT mit gedocktem Phe; b) pcPAL-WT mit gedocktem Phe-ol. Der gemessene Abstand zwischen Arg354 und der OH-Gruppe [in (b) und (c) mit Kästen markiert] und zwischen MIO-Einheit und aromatischem Ring [in (b) und (c) mit Kreisen markiert] wurde gegen die Zeit aufgetragen. d) Aktives Zentrum von Phe137His-pcPAL mit gedocktem Tyrosinol.

**Tabelle 2:** Kinetische Konstanten des pcPAL-WT, der Mutanten und rsTAL bei der Umsetzung von L-Phe und L-Tyr-ol.

Enzym	Substrat	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
pcPAL-WT	L-Phe	0.054 ± 0.01	31 ± 3	568 000
pcPAL-E484N		0.75 ± 0.08	13 ± 1	16 700
pcPAL-F137H		5.2 ± 0.6	21 ± 0.2	4000
rsTAL-WT		2.7 ± 0.7	0.6 ± 0.02	226
pcPAL-WT	L-Tyr	2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.1	754
pcPAL-E484N		0.20 ± 0.01	0.6 ± 0.02	3200
pcPAL-F137H		0.26 ± 0.02	1.0 ± 0.02	3600
rsTAL-WT		0.10 ± 0.02	0.9 ± 0.1	10 000
pcPAL-WT	L-Tyr-ol	n.d. <sup>[b]</sup>	< 0.01 <sup>[a]</sup>	
pcPAL-F137H			0.1 ± 0.04 <sup>[a]</sup>	n.d. <sup>[b]</sup>
rsTAL-WT			0.12 ± 0.04 <sup>[a]</sup>	

[a] Aktivitätsmessung mit 10 mM Substrat unter der Annahme von Sättigungsbedingungen [b] n.d.: nicht detektierbar.

PAL/PAM mindestens zwei H-Brücken für die Stabilisierung und korrekte Orientierung des Substrats erforderlich sind. Zusätzlich eröffnet die beobachtete Aktivität der Phe137His-Mutante der pcPAL und des rsTAL-WT für den Aminoalkohol die Möglichkeit, Aminoalkohole in optisch reiner Form herzustellen, sofern die umgekehrte Reaktion ausgehend von den entsprechenden α/β-ungesättigten Alkoholen durchgeführt wird.

Eingegangen am 19. Januar 2009  
Online veröffentlicht am 2. April 2009

**Stichwörter:** Enzymkatalyse · Friedel-Crafts-Mechanismus · Molecular Modeling · Lyasen · Substratspezifität

- [1] L. Poppe, J. Rétey, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3734–3754; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3668–3688.
- [2] U. T. Bornscheuer, R. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156–6165; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032–6040.
- [3] T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5355–5361.
- [4] a) K. R. Hanson, E. A. Havar, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *141*, 1–17; b) J. D. Hermes, P. M. Weiss, W. W. Cleland, *Biochemistry* **1985**, *24*, 2959–2967.
- [5] Y. Zhao, F. G. Bordwell, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3932–3933.
- [6] a) C. V. Christianson, T. J. Montavon, S. G. Van Lanen, B. Shen, S. D. Bruner, *Biochemistry* **2007**, *46*, 7205–7214; b) C. V. Christianson, T. J. Montavon, G. M. Festin, H. A. Cooke, B. Shen, S. D. Bruner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15744–15745.
- [7] M. Langer, A. Pauling, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1585–1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1464–1465.
- [8] J. Rétey, *Naturwissenschaften* **1996**, *83*, 439–447.
- [9] a) B. Schuster, J. Rétey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8433–8437; b) M. Rettig, A. Sigrist, J. Rétey, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2246–2265.
- [10] pcPAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase aus *Petroselinum crispum*; rsTAL: Tyrosin-Ammonium-Lyase aus *Rhodobacter sphaeroides*; sgTAM: Tyrosin-Ammonium-Mutase aus *Streptomyces globisporus*.
- [11] a) G. Louie, M. Bowman, M. Moffitt, T. Baiga, B. Moore, J. Noel, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1327–1338; b) K. T. Watts, B. N. Mijts, P. C. Lee, A. J. Manning, C. Schmidt-Dannert, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1317–1326.
- [12] H. Ritter, G. E. Schulz, *Plant Cell* **2004**, *16*, 3426–3436.
- [13] D. Rother, L. Poppe, G. Morlock, S. Viergutz, J. Rétey, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3065–3075.
- [14] a) A. Gloge, J. Zon, A. Kovari, L. Poppe, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3386–3390; b) S. Viergutz, L. Poppe, A. Tomin, J. Rétey, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3601–3612.