

[3Fe-4S]-Cluster**IspH-Protein von *Escherichia coli* – Struktur und Mechanismus****

Tobias Gräwert,* Felix Rohdich, Ingrid Span, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich,
Jörg Eppinger* und Michael Groll*

Alle Eukaryoten und die meisten Prokaryoten benötigen für die Terpenbiosynthese die Isoprenoide Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als Substrate. Tiere bilden diese Metabolite über den Mevalonat-Weg,^[1] wohingegen viele Humanpathogene wie *Plasmodium falciparum* oder *Mycobacterium tuberculosis* den wesentlich später entdeckten Methylerythritolphosphat-Weg nutzen. Dieser ist somit ein vielversprechendes Target zur Wirkstoffentwicklung.^[2–4] Im letzten Schritt dieses Biosynthesewegs reduziert das IspH-Protein in einer Dehydratisierung 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat (HMBPP, Abbildung 1 a) zu IPP und DMAPP.^[5–11] Kürzlich wurde von Reikittke et al. die erste Röntgenkristallstruktur von IspH beschrieben. Sie zeigt das Protein aus dem hyperthermophilen Eubakterium *Aquifex aeolicus* in einer offenen Form.^[12] Wir berichten hier über die Kristallstruktur des IspH-Proteins aus *Escherichia coli*^[11] in seiner geschlossenen Konformation, die als Basis für eine detaillierte Diskussion des katalytischen Mechanismus dient.

Das IspH-Fusionsprotein mit N-terminalem His₆-Tag wurde unter Sauerstoffausschluss angereichert und kristallisiert. Seine Struktur wurde mit anomaler Streuung bei einer Wellenlänge von 0.1 nm mit einer Auflösung von 1.8 Å bestimmt. Je Proteinmonomer konnten drei Eisenatome in der anomalen Patterson-Differenzkarte identifiziert und zum

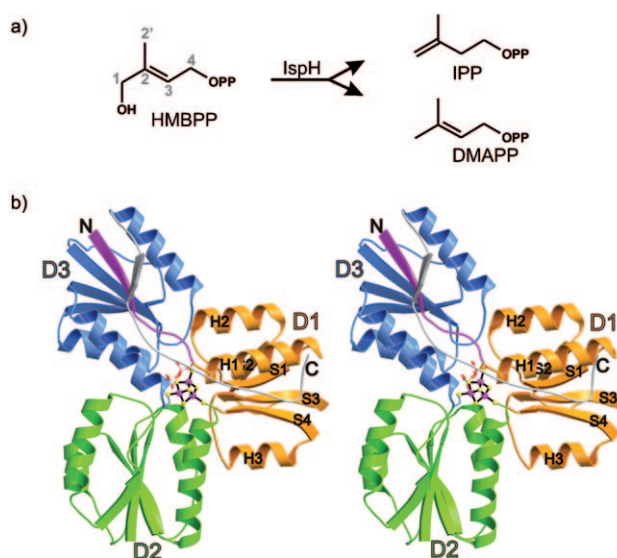


Abbildung 1. a) Die IspH-Reaktion. b) Kristallstruktur von IspH aus *E. coli* in Banddarstellung (Stereopaar). Domänen, Helices und Stränge sind nummeriert. Der N-Terminus (violett) ist für den strukturellen Zusammenhalt wichtig. PDB-Code: 3F7T.

Lösen des Phasenproblems herangezogen werden. Wiederholtes Modellieren und Verfeinern lieferten eine definierte Elektronendichte für das IspH-Molekül mit Ausnahme des His₆-Tags und der fünf C-terminalen Aminosäuren ($R_{\text{free}} = 23.8\%$, siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S2). Die Standardabweichung der C $_{\alpha}$ -Positionen beider Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit beträgt weniger als 0.3 Å.

Ausschlaggebend für das Faltungsschema des monomeren Proteins sind die in einer Pseudo-C₃-Symmetrie angeordneten, strukturell ähnlichen Domänen D1 bis D3, die untereinander keine Sequenzähnlichkeit aufweisen (Abbildung 1 b und Abbildung S1). Im Verhältnis zu D1 sind D2 und D3 um ungefähr 100° bzw. 140° gedreht. Jede Domäne beginnt mit einem konservierten Cystein, das in eine zentrale Kavität hineinragt und jeweils ein Eisenatom eines [3Fe-4S]-Clusters koordiniert. Dieser Cluster erscheint um etwa 20° zur pseudo-trigonalen Achse des Apoproteins gekippt. Der trigonal-symmetrische [3Fe-4S]-Cluster befindet sich in einer hydrophoben Tasche aus Seitenketten der Domänen D1 (G14 und V15), D2 (P97 und V99), D3 (A199) und des C-Terminus (F302 und P305). Letzterer ist neben dem N-Terminus für die Stabilität des Proteins wichtig. Ferner ist die Methylengruppe des Cysteins C96 nach innen gerichtet und erzeugt so eine zusätzliche hydrophobe Abschirmung von Fe²⁺.

Remanente Elektronendichte in der zentralen Kavität konnte als anorganisches Diphosphat identifiziert werden (PP_i; vgl. Omitmap, Abbildung S3; das Phosphat (1.8M) des

[*] Dr. T. Gräwert, Dr. F. Rohdich, M.Sc. I. Span, Prof. A. Bacher, Dr. W. Eisenreich, Prof. M. Groll
Center for Integrated Protein Science, Lehrstuhl für Biochemie
Department Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2891-3363
E-Mail: tobias.graewert@ch.tum.de
michael.groll@ch.tum.de

Dr. J. Eppinger
Department Chemie
Technische Universität München (Deutschland)
Aktuelle Adresse:
King Abdullah University of Science and Technology
KAUST Catalysis Center, Thuwal (Saudi-Arabien)
E-Mail: joerg.eppinger@ch.tum.de
Joerg.Eppinger@KAUST.edu.sa

[**] Wir danken Matthias Lee für die Entwicklung des Enzym-Assays, Claudia Baier für die cyclovoltammetrischen Messungen und den Forschern des PXII der Swiss Light Source (Villigen), besonders Clemens Schulze-Briese, für Hilfe bei der Datenaufnahme. Wir danken außerdem der Hans-Fischer-Gesellschaft und dem Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft (Projekt-Nr. 11047: Forschungsdozentur Molekulare Katalyse) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900548> zu finden.

Kristallisationspuffers ist mit Diphosphat im mikromolaren Bereich im Gleichgewicht).^[13,14] Dieses Diphosphat ist in ein Wasserstoffbrückennetzwerk eingebettet, das von konservierten Aminosäuren gebildet wird (E126, T167, N227, Histidine 41, 74 und 124, Serine 225, 226 und 269, Abbildung 2; vgl. Sequenzalignment, Abbildung S2). Während H41 und H74 ohne nennenswerten Aktivitätsverlust durch Asparagin ersetzt werden können, hat die H124N-Mutante keine messbare Aktivität. Lösliches, aber inaktives oder gering aktives Protein lieferten auch S225C-, N227Q-, E126D- und E126Q-Mutationen. Der Ersatz von H41, H74 oder H124 oder von T167 durch Asparagin oder Valin führte zur Unlöslichkeit des Proteins (Tabelle S1). Der Ersatz von V99 durch Alanin hatte keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität. Dass die Cystein-Reste, die den Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren, für die Aktivität essenziell sind, wurde bereits früher gezeigt.^[11]

Der Einfluss verschiedener Reagentien auf die Enzymaktivität ist in Abbildung S7 und Tabelle S1 zusammengefasst. Diphosphat ($c(\text{PPi}) = 10 \text{ mM}$) verringert die Aktivität auf $28 \pm 5 \%$, während Orthophosphat nur geringfügige Hemmwirkung zeigt ($62 \pm 8 \%$ Restaktivität bei $c(\text{Pi}) = 900 \text{ mM}$). Das Enzymprodukt IPP in einer Konzentration von 10 mM reduziert die Aktivität etwa auf die Hälfte. Zur Klä-

rung der Frage, ob der kristallographisch beobachtete $[\text{3Fe-4S}]$ -Cluster den physiologischen Cofaktor darstellt oder ob es sich dabei um das Abbauprodukt eines Aconitase-artigen $[\text{4Fe-4S}]$ -Clusters handelt,^[5,6,12] wurden Aktivitätsmessungen in Gegenwart von $0.5 \text{ mM Fe}^{\text{II}}$ durchgeführt. Interessanterweise wird dabei die Aktivität verringert ($77 \pm 8 \%$). Andererseits zeigten photometrische und NMR-spektroskopische Aktivitätsmessungen nach Auflösung von Proteinkristallen in Puffer eine relative Aktivität von $70 \pm 25 \%$ trotz der Anwesenheit von Phosphat (90 mM , aus dem Kristallisationspuffer) und gebundenem Diphosphat, die beide die Aktivität hemmen. In Übereinstimmung mit früheren enzymatischen und ESR-spektroskopischen Untersuchungen^[11] bestätigen diese Befunde den $[\text{3Fe-4S}]$ -Cluster als katalytisch kompetenten Cofaktor des aktiven Enzyms.

Laut computergestützten Modellrechnungen ist die in Abbildung 3 gezeigte Substratkonformation um mindestens 38 kJ mol^{-1} günstiger als alle anderen getesteten Konformationen (Abbildung S8, Tabelle S3). In dieser quasi-cyclischen

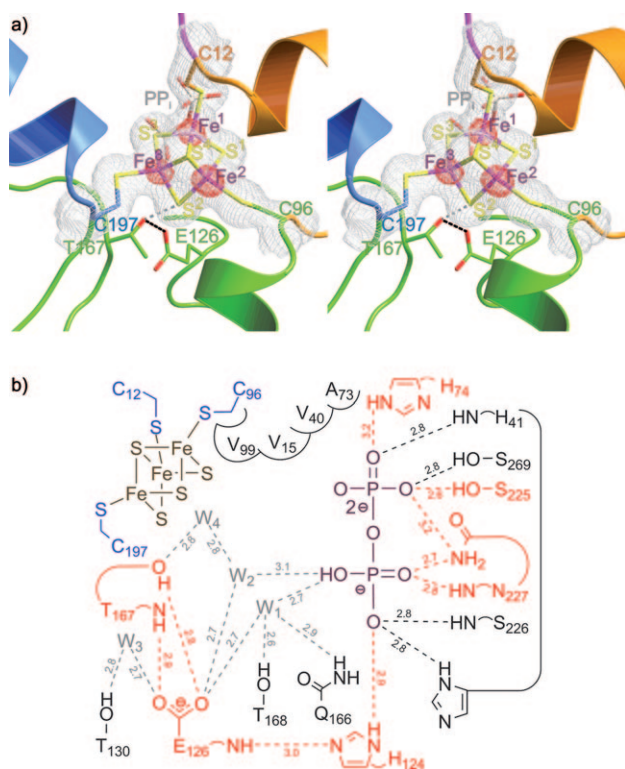


Abbildung 2. Aktives Zentrum des IspH-Proteins aus *E. coli*. a) Stereopaar. Die Elektronendichte ist grau konturiert bei 1.0σ mit $(2F_o - F_c)$ -Koeffizienten; Farbcode und Orientierung wie in Abbildung 1 b). Die anomale Elektronendichte wurde zur Identifizierung der individuellen Eisenpositionen bei 25σ konturiert (rot). b) Koordination von gebundenem PPi; Wasserstoffbrücken gestrichelt. Alle aufgeführten Aminosäuren sind streng konserviert. Rot: mindestens eine untersuchte Mutante führt zu verminderter Aktivität. Die Position der Reste innerhalb der Struktur ist in Abbildung S3 dargestellt.

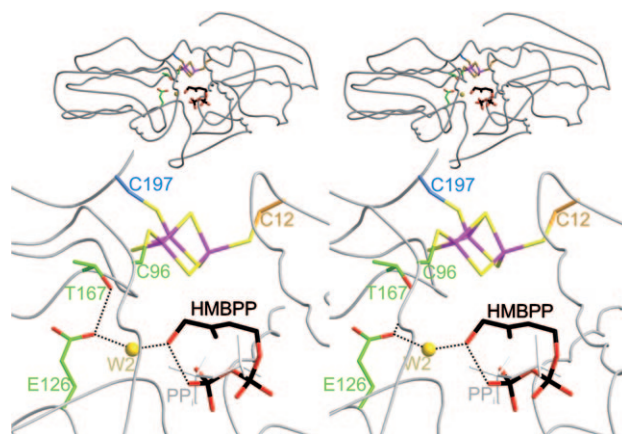


Abbildung 3. Stereodarstellung des aktiven Zentrums mit gebundenem HMBPP (schwarz) in quasi-cyclischer Konformation; gelb, gebundenes Wassermolekül W2 aus der MD-Simulation (siehe Hintergrundinformationen bezüglich Einfluss von Wassermolekülen in der Computer-Modellierung); grau, PPi (kristallographische Daten).

Konformation kommt die Diphosphat-Einheit von HMBPP weitgehend zur Deckung mit dem anorganischen Diphosphat in der Kristallstruktur.^[15] Die Kohlenstoffatome 1 und 3 des Allylsystems liegen bei dieser Konformation auf der nach oben offenen Fläche des Eisen-Schwefel-Clusters, und die C-2'-Methylgruppe ist auf das Innere der hydrophoben Tasche gerichtet. Die quasi-cyclische Substratkonformation wird stabilisiert durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Diphosphatgruppe und der allylischen Hydroxygruppe in Nachbarschaft zu E126. Die quantenmechanische Untersuchung möglicher Intermediate und Übergangszustände liefert zusätzlichen Einblick in den Mechanismus der IspH-katalysierten reduktiven Dehydratisierung (siehe auch Hintergrundinformationen 2.8). Für ein $[\text{HMBPP}(\text{H}^+)]^{3-}$ -Radikal ($S = 1/2$) in der cyclischen Konformation, das beim initialen Elektronentransfer als erstes Intermediat zu erwarten ist, fanden wir auf der Potentialhyperfläche kein Minimum. Während der Minimierung kommt es zum Bruch der C(4)-O-

Bindung und weiterhin zur Bildung eines C(2)-C(3)-C(4)-Allylradikals mit zweifach protoniertem Diphosphatmotiv, in guter Übereinstimmung mit der Erwartung, dass das Diphosphat eine bessere Abgangsgruppe ist als die Hydroxygruppe. Wird jedoch die C(4)-O-Bindung bei 1.47 Å fixiert, so führt die Minimierung zur Spaltung der C(1)-O-Bindung, zur Wasserabspaltung und zur Bildung eines C(1)-C(2)-C(3)-Allylradikals. Dieser Reaktionsweg entspricht der Bildung von Intermediat B in Schema 1. Die Lockerung der C-O-Bindung durch ein benachbartes, delokalisiertes Radikalanion ist vergleichbar mit den Verhältnissen bei der Ribonucleotidreduktase oder der 2-Hydroxyglutaryl-Reduktase, wo die Abspaltung der α -Hydroxygruppe aus einem Ketyl-artigen Radikalintermediat nachgewiesen wurde (Abbildung S9).

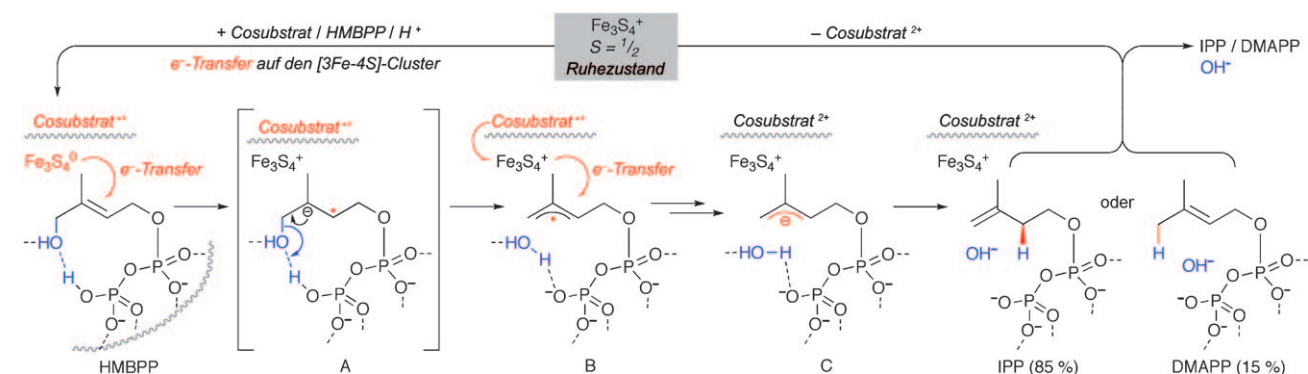
Da das elektrochemische Potenzial des [3Fe-4S]-Clusters ($E^0 = -0.25$ V)^[16] für eine Elektronenübertragung auf einen Allylalkohol ($E^0 = -1.25$ V)^[17] nicht ausreicht, nehmen wir an, dass die Aktivierung von HMBPP durch die Proteinumgebung für die Einleitung der Substrat-Reduktion eine wichtige Rolle spielt. Die Röntgenkristallstruktur besagt in Verbindung mit der MD-Simulation, dass eine Lewis-Aktivierung durch eines der Eisenzentren^[12] wegen sterischer Hinderung nicht möglich ist. Die cyclische Konformation des Substrats begünstigt jedoch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Alkoholgruppe und der Brønsted-sauren Diphosphatgruppe. Eine Protonenübertragung von der Diphosphatgruppe auf die Alkoholgruppe von HMBPP könnte durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren ermöglicht werden. Die Lage der Diphosphatbindungsstelle jeweils am positiv geladenen N-Terminus von drei H2-Helices (je eine aus allen drei Domänen) verstärkt die Acidität der umgebenden Seitenketten sowie der Diphosphatgruppe. Außerdem stabilisiert das negativ geladene E126 eine positive Ladung auf der benachbarten, allylischen OH-Gruppe. Das Zusammenwirken dieser Faktoren könnte die Übertragung eines Elektrons und die anschließende Spaltung der allylischen C-O-Bindung auslösen. Stereochemische Faktoren im aktiven Zentrum von IspH könnten die Abspaltung der Diphosphat-Einheit verhindern und umgekehrt die Eliminierung der Wasserstoffverbrückten OH-Gruppe ermöglichen.

Die Protonierung des Allylanions (C in Schema 1) muss von der Diphosphat-Seite (H^{Si} -Seite) erfolgen, wahrschein-

lich unter Verwendung von Wasser als Protonendonator, da das Allylsystem auf der anderen Seite durch die lipophile Oberfläche des [3Fe-4S]-Clusters abgeschirmt ist. Damit stimmt auch die experimentell ermittelte Stereochemie der Reaktion überein.^[18] Das Produktverhältnis von IPP und DMAPP ist kinetisch kontrolliert (bevorzugte Protonierung an C-3).^[19] Die Abdissoziation des Produkts (IPP bzw. DMAPP) könnte unterstützt werden durch die Erhöhung der negativen Ladung innerhalb des aktiven Zentrums infolge der Injektion von zwei Elektronen.

Ein Vergleich der IspH-Strukturen von *E. coli* und *A. aeolicus* zeigt als wichtigsten Unterschied einen um ca. 20° verschiedenen Anstellwinkel für die Domäne D3 im Verhältnis der Domänen D1 und D2 (siehe Ca-Superposition in Abbildung S10). Durch die Verkipfung der Domäne D3 erscheint die zentrale Kavität im Enzym aus *A. aeolicus* erheblich aufgeweitet. Dieser Unterschied in der Tertiärstruktur ergibt sich durch Veränderungen der Diederwinkel im Bereich der Aminosäuren R9-G10-F11 von *E. coli* bzw. A10-G11-F12 von *A. aeolicus* und von C197 bei *E. coli* bzw. C193 bei *A. aeolicus*. Hier könnte ein dynamischer Scharniermechanismus vorliegen, der das Öffnen und Schließen des aktiven Zentrums ermöglicht. Mutagenesestudien legen nahe, dass diese Scharnierbewegung induziert wird durch die Bindung des PP_i-Liganden an das konservierte SXN-Motiv in D3 (S225-S226-N227 beim Protein aus *E. coli*, S221-G222-N223 beim Protein aus *A. aeolicus*) und nicht durch Wechselwirkung mit H41 und H74 (*E. coli*) bzw. H42 und H74 (*A. aeolicus*). Die Positionen der für die Rotationsbewegungen maßgeblichen Aminosäuren sind in Abbildung 4 durch Pfeile gekennzeichnet.

Insgesamt untermauern die Proteinstrukturdaten in Verbindung mit der Ligandenbindung, den Mutationsstudien und Modellrechnungen einen Reaktionsmechanismus in Analogie zur Birch-Reaktion von Allylalkoholen durch Lithium in flüssigem Ammoniak.^[10] In Bezug auf Bindung und Aktivierung des Substrats ergeben sich erhebliche Unterschiede gegenüber Vorschlägen in der neueren Literatur.^[5,6,12] Die Enzyme des Methylerythritolphosphat-Wegs sind klinisch validierte Ziele^[20,21] für die Entwicklung antimikrobieller Substanzen. Insofern kann diese Arbeit zur Entwicklung von neuen Medikamenten für die Behandlung mehrerer pandemischer Erkrankungen beitragen.



Schema 1. Hypothetische Elektronen- und Protonenübertragungen bei der IspH-katalysierten Reduktion von HMBPP zu IPP/DMAPP. Graue Wellenlinien bezeichnen die Wand der Kavität mit dem aktiven Zentrum. Flavodoxin dient als physiologisches Cosubstrat für IspH; intermediäre Ladungen des Eisen-Schwefel-Clusters in Anlehnung an Daten für [3Fe-4S]-Cluster anderer Proteine^[22] und für Modellsysteme.^[23]

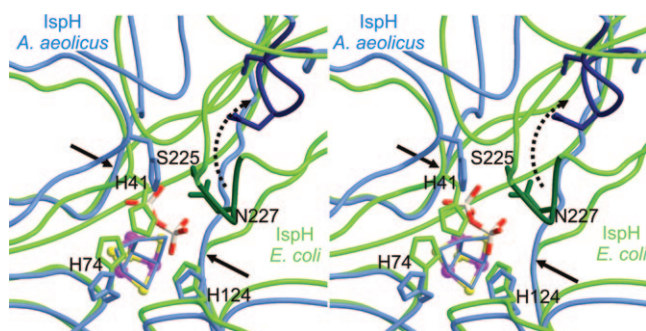


Abbildung 4. Superposition (Stereopaar) der IspH-Proteine aus *E. coli* (grün, geschlossene Konformation) und *A. aeolicus* (blau, offene Konformation). Pfeile zeigen das Scharniermotiv der Domäne D3; der gestrichelte Pfeil zeigt die Bewegung des SNX-Loops.

Eingegangen am 29. Januar 2009,
veränderte Fassung am 25. März 2009
Online veröffentlicht am 30. Juni 2009

Stichwörter: Eisen-Schwefel-Cluster · Enzyme · Isoprenoide · Methylerythritolphosphat · Reaktionsmechanismen

- [1] K. Bloch, *Steroids* **1992**, 57, 378–382.
- [2] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, 295, 517–524.
- [3] H. P. Kuemmerle, T. Murakawa, H. Sakamoto, N. Sato, T. Konishi, F. De Santis, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **1985**, 23, 521–528.
- [4] H. Jomaa, J. Wiesner, S. Sanderbrand, B. Altincicek, C. Weidemeyer, M. Hintz, I. Türbachova, M. Eberl, J. Zeidler, H. Lichtenhaler, D. Soldati, E. Beck, *Science* **1999**, 285, 1573–1576.
- [5] M. Wolff, M. Seemann, B. T. Sim, Y. Frapart, D. Tritsch, A. G. Estrabot, M. Rodríguez-Concepción, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **2003**, 541, 115–120.
- [6] B. Altincicek, E. C. Duin, A. Reichenberg, R. Hedderich, A.-K. Kollas, M. Hintz, S. Wagner, E. Beck, H. Jomaa, *FEBS Lett.* **2003**, 532, 437–440.
- [7] Y. Xiao, Z. K. Zhao, P. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 130, 2165–2166.
- [8] Y. Xiao, P. Liu, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9868–9871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9722–9725.
- [9] F. Rohdich, S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 99, 1158–1163.
- [10] F. Rohdich, F. Zepeck, P. Adam, S. Hecht, J. Kaiser, R. Laupitz, T. Gräwert, S. Amslinger, W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1586–1591.
- [11] T. Gräwert, J. Kaiser, F. Zepeck, R. Laupitz, S. Hecht, S. Amslinger, N. Schramek, E. Schleicher, S. Weber, M. Haslbeck, J. Buchner, C. Rieder, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, F. Rohdich, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12847–12855.
- [12] I. Reikittke, J. Wiesner, R. Rohdich, U. Demmer, E. Warkentin, W. Xu, K. Troschke, M. Hintz, J. H. No, E. C. Duin, E. Oldfield, H. Jomaa, U. Ermler, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17206–17207.
- [13] H. Floodgard, P. Fleron, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 3465–3474.
- [14] Kristallisation von IspH in Phosphat-freiem Malonatpuffer (1.5M, pH 6.5) ergab eine nahezu identische Proteinstruktur, in der Malonat die Bindestelle des PP_i-Liganden besetzt (Abbildungen S5 und S6).
- [15] Die Bindung des PP_i-Liganden könnte exemplarisch für die Bindung der Diphosphatgruppe des Substrats sein (Abbildung S4).
- [16] Die Cyclovoltammetrie zeigt eine Welle bei $E^0 = -0.25$ V für eine reversible Einelektronenreduktion und eine Welle bei $E^0 = -0.58$ V für eine irreversible Zweielektronenreduktion; diese Wellen sind für [3Fe-4S]-Proteine typisch: J. N. Butt, F. A. Armstrong, J. Breton, S. J. George, A. J. Thomson, E. C. Hatchikian, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6663–6670.
- [17] H. Shukun, S. Souqun, S. Jian, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4487–4493.
- [18] R. Laupitz, T. Gräwert, C. Rieder, F. Zepeck, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, W. Eisenreich, *Chem. Biodiversity* **2004**, 1, 1367–1376.
- [19] P. Adam, S. Hecht, W. Eisenreich, J. Kaiser, T. Gräwert, D. Arigoni, A. Bacher, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12108–12113.
- [20] W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, 61, 1401–1426.
- [21] M. A. Missinou, S. Borrmann, A. Schindler, S. Issifou, A. A. Adegnik, P. B. Matsiegui, R. Binder, B. Lell, J. Wiesner, T. Baranek, H. Jomaa, P. G. Kremsner, *Lancet* **2002**, 360, 1941–1942.
- [22] M. K. Johnson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 173–181, zit. Lit.
- [23] P. W. Rao, R. H. Holm, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 527–560.