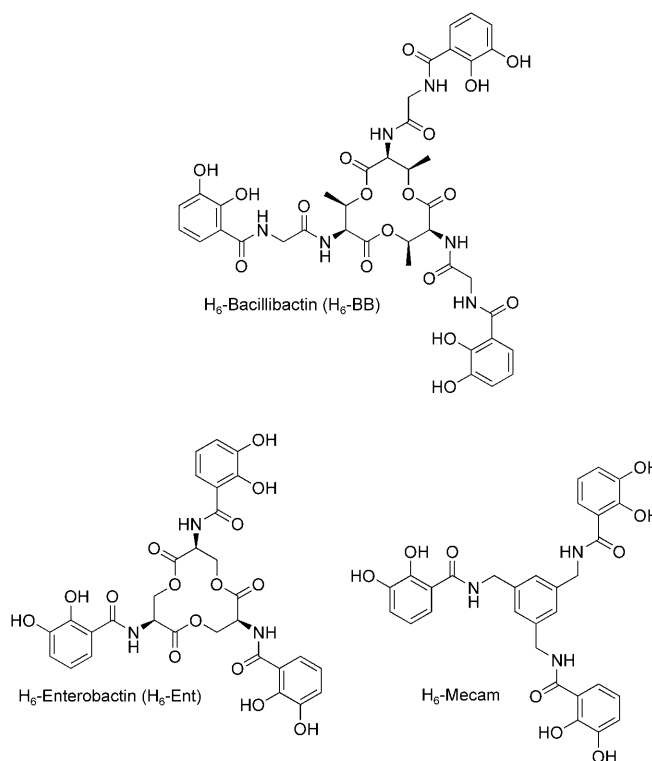


Strukturbasis und Stereochemie der Triscatecholat-Siderophor-Bindung durch FeuA**

Florian Peuckert, Marcus Miethke, Alexander G. Albrecht, Lars-Oliver Essen* und Mohamed A. Marahiel*

Die Beschaffung von Eisen nimmt im mikrobiellen Wachstum eine Schlüsselrolle ein, besonders im Hinblick auf die Virulenzentwicklung von Pathogenen im Menschen und anderen Säugetieren. Eine der Hauptstrategien zur Bereitstellung von Eisen ist die Sekretion niedermolekularer organischer Chelatoren, so genannter Siderophore. Besonders die strikte Regulierung der Eisenhomöostase in Säugetieren hat zur Entwicklung von Chelatoren höchster Affinität geführt,^[1,2] von denen die Triscatecholat-Trilacton-Derivate Bacillibactin und Enterobactin (H_6 -BB bzw. H_6 -Ent; Schema 1) die beiden stärksten repräsentieren (Bildungskonstanten von 10^{48} bzw. 10^{49} M^{-1}).^[3,4] Beide Siderophore werden vom menschlichen Immunprotein Siderocalin (NGAL, Lipocalin 2) erkannt, gebunden und aus dem Körper ausgeschieden.^[5,6] *Bacillus anthracis*, *B. cereus* und nichtpathogene Verwandte wie *B. subtilis* sekretieren Bacillibactin, ein cyclisches Trilacton-Depsipeptid, das drei Untereinheiten des 2,3-Dihydroxybenzoats (2,3-DHB)-Gly-Thr enthält, die durch eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) zusammengebaut werden.^[7] Die zelluläre Aufnahme von Ferribacillibactin ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$) beruht auf dem ABC-Transporter (ATP binding cassette) FeuABC-YusV, der ebenfalls fähig ist, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ zu importieren.^[8,9]

Das Verständnis der Coevolution von Wirtorganismen und Pathogenen bezüglich der Siderophor-Bindung verlangt ein präzises Verständnis bestehender Wechselwirkungen zwischen Siderophoren und Proteinen. Dies könnte helfen, neue Strategien zur Abwehr von Pathogenen zu entwickeln, z. B. die Entwicklung von Siderophor-Wirkstoffen oder die künstliche Affinitätssteigerung bekannter Bindungstaschen. Wir berichten hier über die 1.7-Å-Kristallstruktur des Siderophor-Bindungsproteins FeuA aus *B. subtilis* im Komplex mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. Die detaillierte Analyse der Protein-Ligand-Wechselwirkung bei hoher Auflösung wird ergänzt



Schema 1. Bacillibactin, das verwandte Enterobactin und das Catechol-Siderophor-Mimetikum Mecam.

durch Fluoreszenz- und Circular dichroismus (CD)-spektroskopische Untersuchungen von Varianten der Bindungsstelle und der Konfiguration der Liganden.

Das Siderophor-Bindungsprotein FeuA [297 Aminosäuren (AS) ohne Signalpeptid] ist an die Cytoplasmamembran durch einen Lipidanker geknüpft, der an das N-terminale Cystein des reifen Proteins gebunden ist. Kristalle von FeuA ohne Lipidanker und exklusive der ersten 20 AS mit und ohne gebundenes $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ wurden in verschiedenen Raumgruppen erhalten, und die Phasen wurden durch molekularen Ersatz (molecular replacement) gelöst (siehe Hintergrundinformationen).^[23] FeuA ist aus zwei Domänen aufgebaut, die jeweils eine Rossmann-ähnliche Faltung aufweisen und durch eine 22 AS lange α -Helix verbunden sind (Abbildung 1). Diese Strukturmerkmale sind charakteristisch für Siderophor-Bindungsproteine der Superfamilie der „Helixrückgrat“-Metallrezeptoren, wie FluD und CeuE.^[10,11]

Die Bindung des Substrats an der Grenzfläche zwischen N- und C-terminaler Domäne induziert eine Domänenbewegung zur Bindungsstelle hin. Bei Überlagerung der N-ter-

[*] Dipl.-Chem. F. Peuckert, Dr. M. Miethke, Dipl.-Chem. A. G. Albrecht, Prof. Dr. L.-O. Essen, Prof. Dr. M. A. Marahiel
Fachbereich Chemie, Biochemie, Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-2191
E-Mail: essen@chemie.uni-marburg.de
marahiel@staff.uni-marburg.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die DFG gefördert (MA811/23-1). Wir danken Christoph Müller-Dieckmann, Alexander Popov und Xavier Thibault an der ESRF für Hilfe bei Datenaufnahmen. Wir danken weiterhin Thomas Knappe und Maryna Batokha (Forschungsstudentin) für Hilfe bei spektroskopischen Messungen sowie Detlef Eppers und Markus Oberthür für die Bereitstellung von Mecam.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902495> zu finden.

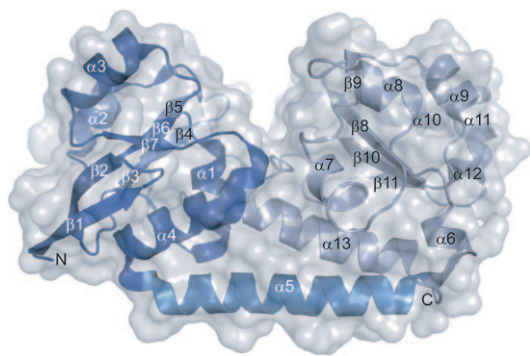


Abbildung 1. Gesamtansicht von FeuA. Die zwei asymmetrischen Domänen und die verbindende α -Helix sind in unterschiedlichen Farbtönen gezeigt (N-terminale Domäne: dunkelblau, verbindende α -Helix: mittelblau, C-terminale Domäne: hellblau). Die Proteinoberfläche ist in Grau gezeig.

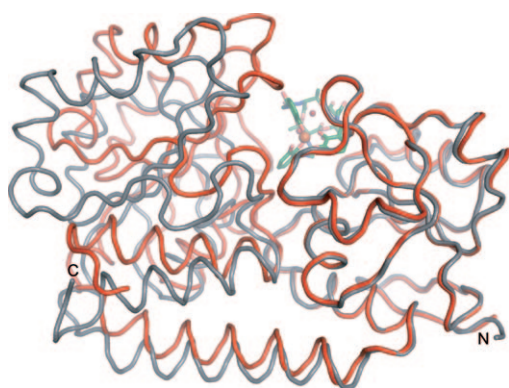


Abbildung 2. FeuA-Domänenbewegung nach Bindung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ (Farbschema siehe Abbildung 3). Die N-terminale Domäne des nativen Proteins (grau) und seines Siderophorkomplexes (rot) sind überlagert. Der Verlauf des $\text{C}\alpha$ -Rückgrats ist gezeig.

minalen Domänen von apo- und holo-FeuA findet man für die C-terminale Domäne eine Verschiebung von 20.2° (Abbildung 2). Diese Schließbewegung ist zwar nicht so ausgeprägt wie bei Bindungsproteinen mit flexiblen Linkern aus β -Strängen, wie dem Maltose-Bindungsprotein,^[12] aber deutlich stärker als bei anderen Proteinen der „Helixrückgrat“-Superfamilie (siehe Hintergrundinformationen).^[13–16] Die Siderophor-abhängige Domänenverknüpfung führt zu einer Stabilisierung des Proteins gegen Hitzedenaturierung, die CD-spektroskopisch beobachtet wurde (Tabelle 1).

Tabelle 1: Schmelzpunkte von FeuA und seinen Varianten, bestimmt durch CD-Spektroskopie.

FeuA-Variante	T_M [°C] ^[a]	+ $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$
nativ	58.15 ± 0.02	65.99 ± 0.04
K84A	63.12 ± 0.03	62.93 ± 0.06
K105A	59.64 ± 0.03	59.44 ± 0.05
R178A	56.96 ± 0.04	57.33 ± 0.06
R180A	58.82 ± 0.98	58.78 ± 1.04
K213A	50.84 ± 0.05	58.74 ± 0.07

[a] T_M : Schmelztemperatur, berechnet mit Spectra Analysis Software, JASCO Corporation.

Das Profil der Protein-Ligand-Wechselwirkung weist eine basische Triade der Reste K84 und K105 (von der N-terminalen Domäne) sowie R180 (von der C-terminalen Domäne) auf, die $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ durch elektrostatische Wechselwirkungen binden, die hauptsächlich gegen die deprotonierten Catechol-O-Atome des Liganden gerichtet sind (Abbildung 3). Q181 und Q215 sind die einzigen weiteren Reste, die direkt an der Bindung des Siderophors beteiligt sind, indem sie Wasserstoffbrücken mit Teilen des Liganden bilden. Die Reste T104, R178, N183, Y185, Y187, E239 und Q277 tragen zur Bildung der Bindungstasche bei, sind allerdings nicht direkt an der Ligandbindung beteiligt (siehe Abbildung 3 und Hintergrundinformationen).

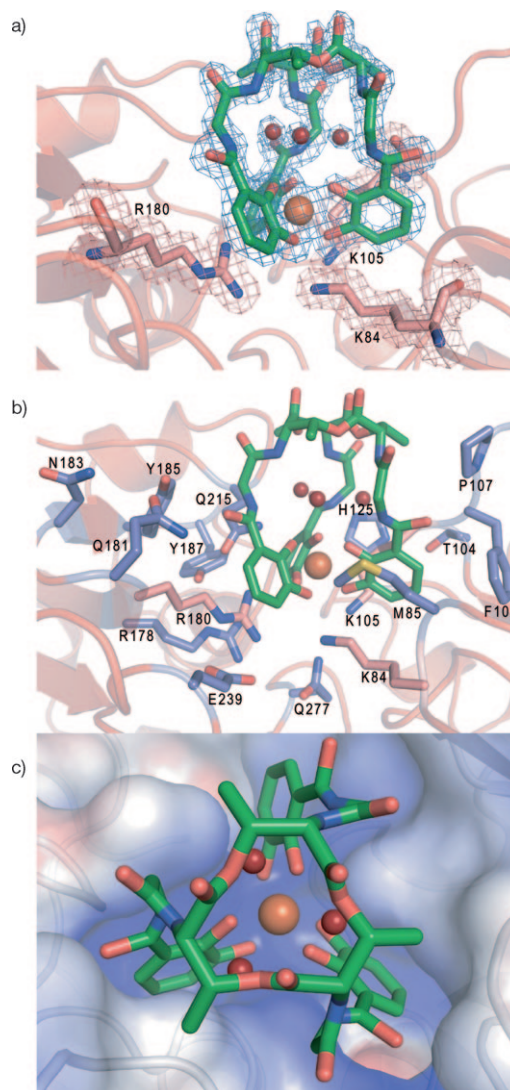


Abbildung 3. Detaillierter Blick auf die Siderophor-Bindungstasche von FeuA; Ligandatome: grün C, rot O, blau N, orange Kugel Fe.

a) SIGMAA-gewichtete ($F_{\text{gef.}} - F_{\text{ber.}}$)-Differenzelektronendichte (blau), berechnet bei einer Auflösung von 1.7 \AA (Konturierungsniveau 2.7σ) für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und die drei Wassermoleküle (dunkelrote Kugeln); die ($2F_{\text{gef.}} - F_{\text{ber.}}$)-Elektronendichte (Konturierungsniveau 1σ) ist für die Reste K84, K105 und R180 gezeig (C hellrot). b) Die Seitenketten der anderen Reste, die die Bindungstasche aufbauen, sind zusätzlich gezeig (C hellblau). c) Elektrostatistische Oberfläche der Bindungstasche [von -5 (rot) bis $+5$ (blau) $k_B T/e_0$].

Um die Bedeutung der beteiligten Reste für die Ligandenbindung und die Strukturstabilisierung zu untersuchen, wurden die Reste der basischen Triade sowie die Reste R178 in der Bindungstasche und K213 auf der Oberfläche der C-terminalen Domäne außerhalb der Bindungstasche einzeln zu Alanin mutiert und einer ligandenabhängigen Schmelzpunktanalyse unterzogen (Tabelle 1). Das native Protein und die Variante K213A sind fähig, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ zu binden, was durch eine Verschiebung des Schmelzpunkts in Gegenwart des Liganden um etwa 8 °C belegt wurde. Dagegen wurde die Stabilität der drei Einzelsubstitutionen der basischen Triade sowie der Variante R178A in Gegenwart des Siderophors nicht beeinflusst. Der Rest R178 ist zwar nicht direkt für die Ligandenbindung zuständig, scheint aber durch stabilisierende Wechselwirkungen mit R180 indirekt an der Bindungsbildung beteiligt zu sein. Des Weiteren hat R180 wohl einen signifikanten Einfluss auf die allgemeine Faltungsstabilität des Proteins, da sich bei R180A im Unterschied zu allen anderen Varianten bei höherer Temperatur ein Präzipitat bildete. Der höhere Schmelzpunkt der Variante K84A gegenüber jenem von nativem FeuA resultiert vermutlich aus einer verminderten elektrostatischen Abstoßung mit anderen positiv geladenen Resten der Bindungstasche. Zusätzliche Untersuchungen mithilfe von Fluoreszenzlöschung bestätigten die vorliegenden Daten, da sie eine starke Minderung der Ligandenbindungsaffinitäten der Varianten K84A, K105A, R180A und R178A erkennen lassen (etwa drei Größenordnungen niedriger als jene von nativem FeuA; siehe Hintergrundinformationen). Es stellt sich weiterhin heraus, dass die basische Triade als Bindungsmotiv für Triscatecholate weit verbreitet ist und in nichthomologen Bindungsproteinen von Bakterien bis zum Menschen gefunden werden kann.^[5,6,11]

Der Siderophorfänger Siderocalin bindet $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ durch hybride elektrostatische/Kation- π -Wechselwirkungen mit seinen Resten R81, K125 und K134 sehr stark.^[5,6] Des Weiteren weist die Kristallstruktur des Enterobactin-Bindungsproteins CeuE, das durch eine $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Brücke (H_6 -Mecam; Schema 1) dimerisiert wurde, die Reste R117, R204 und R248 als die entsprechende basische Triade auf.^[11]

Obwohl das Trilactonrückgrat von Siderocalin-gebundenem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ teilweise abgebaut war, ließ sich feststellen, dass die Fragmente eine Λ -Konfiguration einzunehmen scheinen. Es ist bekannt, dass der ungebundene Komplex in Lösung als das Δ -Diastereomer vorliegt, was ebenfalls in einer Kristallstruktur von $[\text{V}^{\text{IV}}(\text{Ent})]^{2-}$ beobachtet wurde.^[17,18] Im Unterschied dazu zeigt $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ in Lösung die Λ -Konfiguration^[19] und ist ebenfalls als Λ -Spezies in der vorliegenden FeuA-Kristallstruktur gebunden. Weiterhin bevorzugt das als Racemat vorliegende $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ nach Bindung durch CeuE die Λ -Konfiguration.^[11]

Die beobachtete Bindungstasche in der FeuA-Kristallstruktur scheint für Λ -Substrate spezifisch zu sein und wäre in dieser Form nicht dazu fähig, Δ - $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ zu binden. Da die Konfiguration von Ferrisiderophoren maßgeblich für ihre biologische Funktion während der Aufnahme und weiteren Prozessierung ist, wurde untersucht, welche Konfiguration von FeuA bevorzugt wird und ob FeuA in der Lage ist, die absolute Ligandkonfiguration zu ändern, um seine Substrat-

promiskuität zu erzielen. Dazu wurden CD-spektroskopische Untersuchungen verschiedener Eisentriscatechol-Komplexe in Gegenwart von FeuA durchgeführt (Abbildung 4).

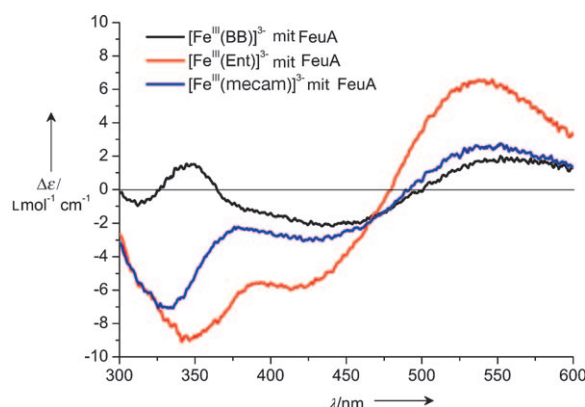


Abbildung 4. CD-Spektren von FeuA-komplexiertem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ in gepuffertem Wasser (Tris-HCl, pH 7.0) bei 22.5 °C.

Negative Banden um 450 nm und positive um 550 nm sind charakteristisch für Eisentriscatechol-Komplexe mit Λ -Konfiguration.^[20] Die Messungen bestätigten die Λ -Konfiguration von FeuA-gebundenem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ in Lösung. Der achirale $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplex kann ebenfalls in der Λ -Konfiguration beobachtet werden, und beachtlicherweise zeigt $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ in Gegenwart von FeuA die gleiche Konfiguration. Diese Befunde zeigen, dass FeuA die Konfiguration dieser Siderophore beeinflussen kann. Die strikte Bindung von Λ -konfigurierten Triscatechol-Substraten mag ein Grund für die geringere Affinität von FeuA für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ als für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ sein.^[8] Dies wurde ebenfalls für die Bindung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und seinem nichtnatürlichen Λ -Stereoisomer $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{ent-Ent})]^{3-}$ durch das Protein FepB aus *E. coli* beobachtet.^[21]

Bemerkenswert ist weiterhin, dass der Trilactonring nicht die Struktur einnimmt, die als stabiler berechnet wurde (allerdings um nur 2.3 kcal mol⁻¹), obwohl $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ in der bevorzugten Λ -Konfiguration gebunden wird.^[19] Stattdessen weist unsere Elektronendichtekarte zwischen dem Trilactonring und dem Eisen(III)-Triscatechol-Zentrum drei hochgeordnete Wassermoleküle auf (Abbildung 3). Diese Wassermoleküle stabilisieren die Struktur des Eisen-Siderophor-Komplexes durch Wasserstoffbrückennetzwerke, die zu der unerwarteten räumlichen Anordnung des Trilactons führen, die derjenigen von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ ähnelt. Dies mag für den anschließenden Transportprozess oder die Erkennung durch Trilactonhydrolasen von Bedeutung sein.

Wir haben hier die erste Kristallstruktur eines Bindungsproteins in Komplex mit einem intakten Triscatechol-Trilacton-Siderophor vorgestellt und demonstriert, dass die Mecam-abhängige Dimerisierung von Bindungsproteinen nicht auf Trilactonderivate ausgedehnt zu sein scheint. Detaillierte Untersuchungen zur Bindung bestätigten die Bedeutung einer basischen Triade für die Erkennung des Eisentriscatechol-Ligandenzentrums, die in verschiedenen Spe-

zies hoch konserviert zu sein scheint. Es wurden keine signifikanten Proteinwechselwirkungen mit dem Rückgrat des Liganden gefunden; daher kann das Trilactongerüst möglicherweise für Vernetzungsstrategien zur Generierung von Siderophor-Antibiotika-Konjugaten, so genannten Sideromycinen, oder Siderophor-Import-Inhibitoren verwendet werden.

Die Fähigkeit von FeuA, die in freier Form in Lösung vorliegende Konfiguration des Triscatechol-Substrates zu ändern, lässt darauf schließen, dass die stereochemische Erkennung eine Schlüsselrolle bei mindestens einer Stufe des Imports und der weiteren intrazellulären Prozessierung des Siderophors spielen muss. Es ist eher unwahrscheinlich, dass von FeuA eine weitere Konformation angenommen wird, um auch Δ -Triscatechol-Siderophore erkennen zu können, zumal sich die Bindungstasche des verwandten Hydroxamat-Siderophor-Bindungsproteins FhuD bei der Bindung verschiedener, wenn auch verwandter Substrate nur minimal verändert.^[10,22]

Eingegangen am 11. Mai 2009

Online veröffentlicht am 11. September 2009

Stichwörter: Bacillibactin · Eisen · Proteine · Siderophore · Stereoselektivität

- [1] S. C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodriguez-Quinones, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, 27, 215–237.
- [2] M. Miethke, M. A. Marahiel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, 71, 413–451.
- [3] E. A. Dertz, J. Xu, A. Stintzi, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 22–23.
- [4] L. D. Loomis, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 906–911.
- [5] D. H. Goetz, M. A. Holmes, N. Borregaard, M. E. Bluhm, K. N. Raymond, R. K. Strong, *Mol. Cell* **2002**, 10, 1033–1043.
- [6] R. J. Abergel, M. K. Wilson, J. E. Arceneaux, T. M. Hoette, R. K. Strong, B. R. Byers, K. N. Raymond, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 18499–18503.
- [7] J. J. May, T. M. Wendrich, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 7209–7217.
- [8] M. Miethke, O. Klotz, U. Linne, J. J. May, C. L. Beckering, M. A. Marahiel, *Mol. Microbiol.* **2006**, 61, 1413–1427.
- [9] J. Ollinger, K. B. Song, H. Antelmann, M. Hecker, J. D. Hellmann, *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 3664–3673.
- [10] T. E. Clarke, S. Y. Ku, D. R. Dougan, H. J. Vogel, L. W. Tari, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 287–291.
- [11] A. Müller, A. J. Wilkinson, K. S. Wilson, A. K. Duhme-Klair, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5256–5260; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5132–5136.
- [12] A. J. Sharff, L. E. Rodseth, J. C. Spurlino, F. A. Quioco, *Biochemistry* **1992**, 31, 10657–10663.
- [13] Y. H. Lee, R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, C. A. Hasemann, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 628–633.
- [14] Y. H. Lee, M. R. Dorwart, K. R. Hazlett, R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, C. A. Hasemann, *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 2300–2304.
- [15] E. L. Borths, K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16642–16647.
- [16] N. K. Karpowich, H. H. Huang, P. C. Smith, J. F. Hunt, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8429–8434.
- [17] M. Llinas, D. M. Wilson, J. B. Neilands, *Biochemistry* **1973**, 12, 3836–3843.
- [18] T. B. Karpishin, K. N. Raymond, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 486–488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 466–468.
- [19] M. E. Bluhm, B. P. Hay, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 5475–5478.
- [20] T. B. Karpishin, T. D. P. Stack, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6115–6125.
- [21] C. Sprencel, Z. Cao, Z. Qi, D. C. Scott, M. A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. M. Raymond, S. M. Newton, P. E. Klebba, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 5359–5364.
- [22] T. E. Clarke, V. Braun, G. Winkelman, L. W. Tari, H. J. Vogel, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 13966–13972.
- [23] Die Strukturdaten wurden in der Protein Data Bank unter den Zugriffscode 2WI8 (apo) und 2WHY (Komplex) hinterlegt.