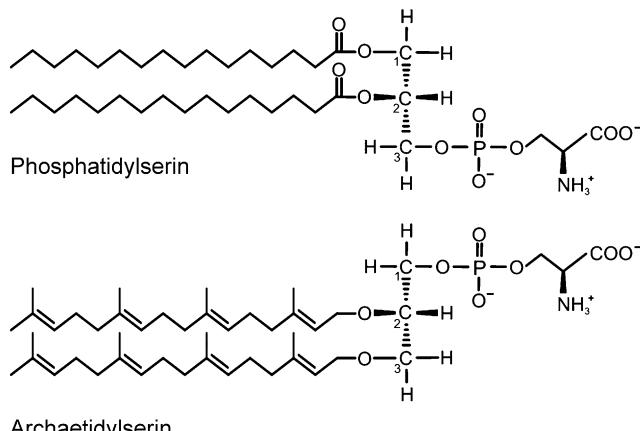


Aufklärung der Funktion eines Enzyms mit der Fähigkeit zur Synthese eines Archaea-typischen Lipids in Bacteria^{**}

Harald Guldán, Frank-Michael Matysik, Marco Bocola, Reinhard Sterner und Patrick Babinger*

Im phylogenetischen Stammbaum des Lebens werden alle Organismen in die drei Domänen Eukaryota, Bacteria und Archaea eingeteilt.^[1] Ein Hauptkriterium für diese Einteilung ist die chemische Zusammensetzung der Membranlipide der jeweiligen Organismen.^[2–5] So bestehen die Phospholipide der Bacteria und Eukaryota aus Fettsäuren, die mit *sn*-Glycerin-3-Phosphat (G3P) verestert sind, die Phospholipide der Archaea hingegen aus *sn*-Glycerin-1-Phosphat (G1P), das über Etherbrücken mit zwei Polyprenylketten verbunden ist (Abbildung 1).

Dieser Unterschied lässt vermuten, dass die Evolution der Archaea in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten der Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase (G1PDH) und der Geranylgeranylglycerylphosphat-Synthase (GGGPS) steht.^[6–9] Diese Enzyme katalysieren nacheinander die ersten beiden Stufen der Synthese der G1P-basierten Etherlipide. Im Einzelnen umfasst dies die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu G1P und dessen anschließende Kondensation mit dem aktivierte Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP; C₂₀). GGGP wird in der Folge schrittweise prozessiert und führt zu den typischen Etherlipiden, von denen eines in Abbildung 1 gezeigt ist. Da G1P und GGGP als typisch für Archaeen gelten, kam die Identifizierung von Proteinen aus bakteriellen Spezies mit signifikanter Sequenzähnlichkeit zu G1PDH und GGGPS unerwartet.^[6,10] Unser Interesse gilt der Aufklärung der Funktion dieser Proteine, und so konnten wir kürzlich zeigen, dass das AraM-Protein des Gram-positiven Bakteriums *Bacillus subtilis* homolog zu den archaeellen G1PDH ist und ebenso wie diese



Archaeatidylserin

Abbildung 1. Typische Phospholipide der Bacteria und Eukaryota (oben) und der Archaea (unten). Während bei den Bacteria und Eukaryota G3P über einen Ester mit zwei Fettsäuren verbunden ist, bestehen die Lipide der Archaea aus G1P und zwei Polyprenylketten, verknüpft durch eine Etherbindung. Die wichtigsten polaren Kopfgruppen (wie hier L-Serin) sind in allen drei phylogenetischen Domänen vertreten.

stereospezifisch und NADH-abhängig (NADH = reduzierte Form von Nicotinamid-adenin-dinukleotid) die Reduktion von DHAP zu G1P katalysiert.^[11]

Hier behandeln wir nun die Entschlüsselung der Funktion der bakteriellen Homologen zu den GGGPS, die Familie der PcrB-Proteine. Unser Ansatz basiert dabei auf der Fähigkeit des Enzyms, radioaktiv markiertes G1P in der *Bacillus-subtilis*-Zelle mit einem zweiten, bislang noch unbekannten Substrat zu verbinden. Die Analyse des gebildeten Produkts zeigt, dass PcrB in vivo die Kondensation von G1P mit Heptaprenylpyrophosphat (HepPP; C₃₅) zu Heptaprenylglycerylphosphat (HepGP) katalysiert. Dieses erste identifizierte Archaea-typische Etherlipid in der Domäne der Bacteria wird anschließend in der Zelle dephosphoryliert und acetyliert. Wir konnten zudem nachweisen, dass der Unterschied in der Substratspezifität der archaeellen GGGPS für C₂₀-Polyprenyle im Vergleich zu den bakteriellen PcrB-Enzymen für C₃₅-Polyprenyle auf eine Aminosäure am unteren Ende des aktiven Zentrums zurückzuführen ist.

Die Überlagerung der Kristallstrukturen der archaeellen GGGPS aus *Archaeoglobus fulgidus* (afGGGPS) und PcrB aus *B. subtilis* mit der Sequenzidentität von 35% ergab eine vollkommen konservierte Bindetasche für G1P. Zudem konnte GGPP in das aktive Zentrum beider Enzyme modelliert werden (Abbildung 2). Auf Grundlage dieser Beobachtungen überprüften wir in vitro die Fähigkeit von PcrB, die GGGPS-Reaktion zu katalysieren. Dazu wurden die für PcrB codierenden Gene von *Bacillus subtilis* (bsPcrB), *Ba-*

[*] Dr. H. Guldán, Dr. M. Bocola, Prof. Dr. R. Sterner, Dr. P. Babinger
Institut für Biophysik und physikalische Biochemie
Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: Patrick.Babinger@biologie.uni-regensburg.de
Prof. Dr. F.-M. Matysik
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)

[**] Wir danken Josef Kiermaier für die MS-Messungen, Fritz Kastner und Dr. Markus Schmid für die NMR-Spektroskopiemessungen und deren Auswertung, Prof. Dr. Michael Hecker und Dr. Christian Vogl für *B. subtilis*-Stämme, Stéphanie Garcia für praktische Unterstützung, David Peterhoff, Profs. Drs. Jörg Heilmann, Ludwig Lehle und Widmar Tanner für hilfreiche Kommentare sowie Sandra Binder für die Übersetzung. Diese Arbeit von der DFG gefördert (BA 3943/1-1). H.G. wurde von der Graduiertenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung e.V. unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101832> zu finden.

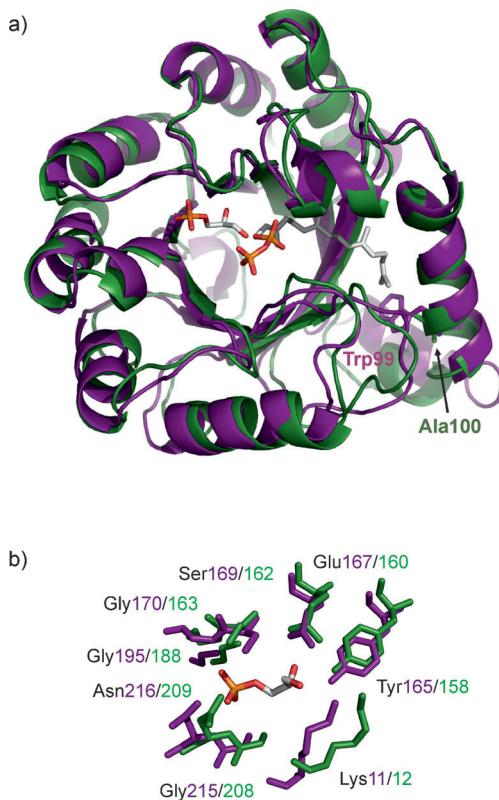


Abbildung 2. Überlagerung der Struktur von afGGGPS und bsPcrB mit modellierten Liganden. a) Die Bänderdiagramme von afGGGPS (PDB-Code: 2F6U) und bsPcrB (PDB-Code: 1VIZ^[12]) sind violett bzw. grün dargestellt. Die Darstellung der Substrate G1P und GGPP entspricht der CPK-Konvention. Die Substratbindetasche wird in afGGGPS durch die Seitenkette von Trp99 auf die Polyprenylänge C₂₀ begrenzt. Bei bsPcrB befindet sich an dieser Stelle der Rest Ala100. b) Die Reste der G1P-Bindestelle sind in afGGGPS und bsPcrB vollkommen konserviert. Die Darstellung entspricht (a).

cellus anthracis (baPcrB), *Geobacillus kaustophilus* (gkPcrB), *Listeria monocytogenes* (lmPcrB) und *Staphylococcus aureus* (saPcrB) in *Escherichia coli* exprimiert und die Proteine über Metall-Chelat-Chromatographie zur Homogenität gereinigt. ¹⁴C-markiertes G1P oder G3P wurde enzymatisch aus Glucose und Adenosin-5'-triphosphat synthetisiert (Hintergrundinformationen, Schema S1) und zusammen mit dem gereinigten PcrB und GGPP inkubiert. Die Analyse der Reaktionsprodukte mit Dünnschichtchromatographie (DC) und Autoradiographie ergab, dass alle untersuchten bakteriellen PcrB-Enzyme die gleiche Stereospezifität für die Kondensation von G1P mit GGPP aufweisen wie die Kontrolle afGGGPS. Dieses Ergebnis bestätigt den kürzlich veröffentlichten Befund, dass PcrB *in vitro* GGPP als Substrat akzeptiert.^[13] Diese Daten erlauben jedoch keinen Rückschluss auf die Natur des Polyprenylsubstrates, das von PcrB *in vivo* verwendet wird. In Zusammenhang mit dieser Frage war die Konserviertheit eines Tryptophanrests (Trp99) am unteren Ende der Bindetasche von afGGGPS festgestellt worden. Man ging davon aus, dass dessen sperrige und hydrophobe Seitenkette die Länge des Polyprenylsubstrates auf C₂₀ beschränkt.^[10] Bemerkenswerterweise befindet sich im aktiven Zentrum von PcrB an vergleichbarer Stelle nur ein kleiner,

aliphatischer Rest (meist ein Alanin), womit die bakteriellen Homologen der archaealen GGGPS in der Lage sein könnten, auch längere Polyprenylsubstrate aufzunehmen (Abbildung 2).

Wir haben daher ein Verfahren zur Identifizierung des unbekannten, nativen Polyprenylsubstrates von PcrB entwickelt, das darauf beruht, das Produkt basierend auf der Reaktion mit ¹⁴C-G1P zu markieren und zu isolieren. Dazu wurden Wildtyp-Zellen von *B. subtilis* sowie Δ pcrB-Zellen ohne chromosomal pcrB-Gen^[14] mit ¹⁴C-G1P über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, anschließend wurden ihre Lipide extrahiert und auf Kieselgelplatten dünnstichtchromatographisch aufgetrennt. Der Vergleich der Autoradiogramme zeigte zwei schwach markierte Flecken X1 und X2 in Extraktten aus *B. subtilis*-Wildtyp, die in Δ pcrB-Zellen fehlten (Abbildung 3).

Durch plasmidcodierte Überexpression der pcrB-Gene aus *B. subtilis*, *G. kaustophilus*, *S. aureus* und *L. monocytogenes*

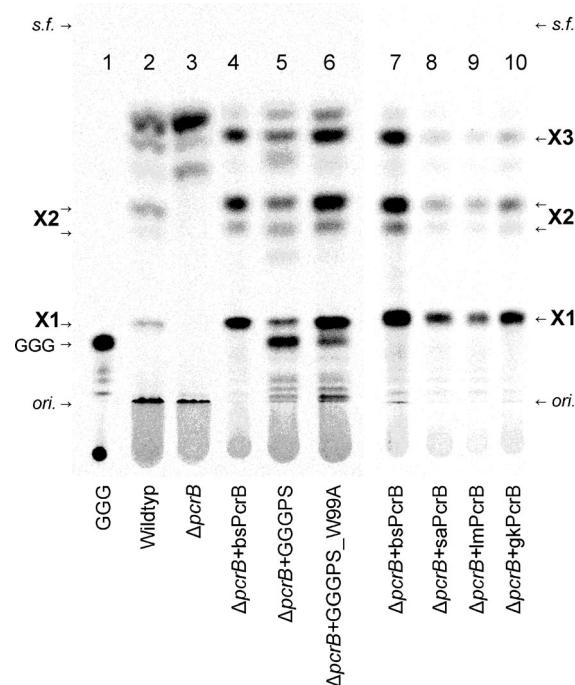


Abbildung 3. Dünnschichtchromatographische Auf trennung von ¹⁴C-markierten Glycerolipiden, produziert in *B. subtilis* durch verschiedene PcrB-Proteine und afGGGPS. Die Zellen wurden über Nacht mit radioaktiv markiertem G1P inkubiert. Anschließend wurden ihre Lipide extrahiert und zur Verringerung der Polarität dephosphoryliert. Die Extrakte wurden auf Kieselgel-60-Platten aufgetragen, und das Chromatogramm wurde in Ethylacetat/Hexan 1:1 (v/v) entwickelt und autoradiographiert. Spur 1: GGG (dephosphoryliertes GGGP) = Referenz; Spur 2: *B. subtilis*-Wildtyp; Spur 3: Δ pcrB-Zellen; Spur 4: Δ pcrB-Zellen, die plasmidcodiert das Gen von bsPcrB überexprimieren; Spur 5: Δ pcrB-Zellen, die plasmidcodiert das Gen von afGGGPS überexprimieren; Spur 6: Δ pcrB-Zellen, die plasmidcodiert das Gen des mutierten Proteins afGGPS_W99A überexprimieren; Spuren 7–10: Δ pcrB-Zellen, die plasmidcodiert die Gene von bsPcrB, saPcrB, lmPcrB, und gkPcrB überexprimieren. Die Proben 1–6 und 7–10 wurden auf zwei getrennten DC-Platten analysiert. Probe 7 ist dabei identisch mit Probe 4 und dient als Referenz für die Spuren 8–10. Der Ursprung der DC (ori.), die Laufmittelfront (s.f.) sowie die Punkte X1, X2 und X3 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

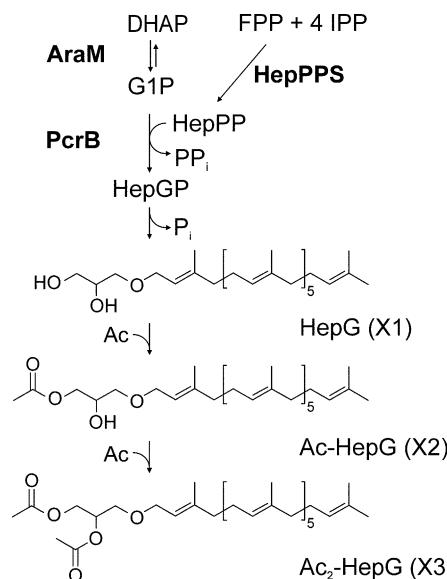
genes in *B.-subtilis*- Δ pcrB-Zellen konnten wir bestätigen, dass die Bildung der Punkte X1 und X2 auf PcrB zurückzuführen ist. Die Lipidextrakte dieser Zellen zeigten zudem stärkere Signale für X1 und X2 als die Extrakte aus *B.-subtilis*-Wildtyp. X2 liegt zudem als Doppelbande vor. Die Gründe hierfür werden unten diskutiert. Darüber hinaus konnte ein weiterer markierter Punkt X3 identifiziert werden, der in den Wildtypzellen nicht vom Hintergrund zu unterscheiden war. Bei der dünnenschichtchromatographischen Auftrennung auf Kieselgel-60-Platten werden die Produkte X1–X3 weniger stark verzögert als das afGGGPS-Produkt GGPP, was darauf schließen lässt, dass sie auch weniger polar als diese Kontrolle sind (Abbildung 3). Das native Polyprenylsubstrat von PcrB sollte somit mehr Kohlenstoffatome aufweisen als GGPP.

Die Produkte von PcrB aus *B. subtilis*, X1–X3, wurden isoliert und über MS und NMR-Spektroskopie analysiert. Zur Präparation ausreichender Mengen an Reinsubstanz wurde die Auftrennung der Lipide nun über HPLC statt wie bisher über DC durchgeführt. Die Elution der ^{14}C -markierten Produkte X1–X3 wurde über einen On-line-Szintillationsdetektor verfolgt (Hintergrundinformationen, Abbildung S2) und anschließend mit nichtmarkiertem Extrakt wiederholt. Auf Basis der Retentionszeiten der markierten Substanzen wurde der nichtmarkierte Extrakt fraktioniert, und so wurden X1–X3 gesammelt. Durch die Analyse über MS, MS-MS, hochauflösende MS und NMR-Spektroskopie (Hintergrundinformationen, Abbildung S3–S5) konnte X1 eindeutig als Heptaprenylglycerin (HepG) identifiziert werden. Damit muss es sich beim zweiten Substrat von PcrB um Heptaprenylpyrophosphat (HepPP) handeln. Das Produkt HepGP wird offensichtlich in vivo dephosphoryliert. Hochauflösende MS-Analysen von X2 zeigten, dass seine Masse um 42011 Da größer ist als die von X1. Diese Differenz entspricht einer Acetylgruppe, deren Lokalisation am C1- oder C2-Atom des Glycerintrückgrats von HepG das verschiedene Laufverhalten dieser beiden Isoformen erklärt (Abbildung 3). Die Masse von X3 mit einer erneuten Differenz von 42 Da zu X2 entspricht demnach HepG mit zwei Acetylgruppen. Diese Modifikation konnten wir *in vitro* mit Essigsäureanhydrid als Acylierungsmittel reproduzieren und so X1 in X2 und X3 überführen.

Wurde hingegen plasmidcodiert das Gen von afGGGPS im Δ pcrB-Stamm überexprimiert, trat bei der dünnenschichtchromatographischen Analyse ein langsamer laufender Punkt auf, der GGPP entspricht (Abbildung 3). GGPP liegt also in der *B.-subtilis*-Zelle als mögliches Substrat vor, wird jedoch *in vivo* von den PcrB-Enzymen nicht als solches akzeptiert. Mithilfe von Moleküldynamikrechnungen konnte diese Substratkriminierung erklärt werden: Die lange Polyprenylkette von HepPP passt exakt in die tiefe Substratbindetasche von PcrB, sodass das Ende des Moleküls mit konservierten Aminosäuren und einer modifizierten Schleife am Ende der Bindetasche interagiert (Hintergrundinformationen, Abbildung S6). Wird afGGGPS im Δ pcrB-Stamm überexprimiert, so wird neben GGPP ein kleiner Anteil an X1–X3 produziert (Abbildung 3). Das Enzym akzeptiert somit, wenngleich im geringeren Maße, auch Polyprenylsubstrate, die länger als 20 Kohlenstoffatome sind. Die Seitenkette von Trp99, die vermutlich der Grund für die Begrenzung der Substratlänge auf

C_{20} ist (Abbildung 2), muss dafür bisweilen aus der Bindetasche schwenken und so die Bindung langerer Substrate ermöglichen können. Somit überrascht es nicht, dass die Mutante afGGGPS_W99A vergleichbare Mengen X1–X3 wie PcrB produziert (Abbildung 3).

Die Isolierung und Identifizierung von X1–X3, zusammen mit dem zuvor gefundenen AraM als G1PDH,^[11] deckt einen bislang unbekannten Weg zu Biosynthese von Archaea-typischen Lipiden in Gram-positiven Bacteria auf. In diesem Syntheseweg reduziert AraMDHAP zu G1P, das im aktiven Zentrum von PcrB mit HepPP unter Freisetzung von Pyro-



Schema 1. Ein neu gefundener Biosyntheseweg zur Herstellung Archaea-typischer Lipide in *B. subtilis* und weiteren Gram-positiven Bacteria. AraM reduziert DHAP zu G1P, und HepPP ist ein Produkt von HepPPS. PcrB katalysiert stereospezifisch die Kondensation von G1P und HepPP zu HepGP, das anschließend von bislang noch unbekannten Enzymen dephosphoryliert und acetyliert wird. Die drei gezeigten Etherlipide entsprechen den DC-Punkten X1–X3 aus Abbildung 3. FPP = Farnesylypyrophosphat, IPP = Isopentenylpyrophosphat, PP_i = Pyrophosphat.

phosphat zu HepGP reagiert. Anschließend wird HepGP enzymatisch dephosphoryliert und acetyliert (Schema 1).

PcrB ist in den Genomen einer Vielzahl von *Bacillales* codiert (Hintergrundinformationen, Abbildung S7). Unsere Analyse einer repräsentativen Auswahl zeigt eine eindeutige Präferenz der Enzyme für HepPP gegenüber GGPP als Substrat (Abbildung 3). Wir postulieren daher, dass alle bakteriellen Vertreter der PcrB-Familie die gleiche Reaktion wie bsPcrB katalysieren. Zudem enthalten alle Spezies mit einem *pcrB*-Gen auch die Gene für die Heptaprenylpyrophosphat-Synthase (HepPPS; Hintergrundinformationen, Tabelle S1), die bereits als Quelle für HepPP zur Synthese von Menachinon in Gram-positiven Bacteria beschrieben ist.^[15] Jedoch haben nicht alle diese Mikroorganismen eine AraM-ähnliche G1PDH. G1P könnte in diesen Spezies durch eine nichthomologe G1PDH oder auch über die stereospe-

zifische Phosphorylierung von Glycerin durch eine noch unbekannte Kinase synthetisiert werden.

Mit der Aufklärung der Funktionen von AraM und PcrB sind nun G1P-basierte Etherlipide erstmals auch in der Domäne der Bacteria nachgewiesen. HepG und seine acetylierten Derivate machen jedoch nur einen geringen Teil der Gesamtlipidkomposition von *B. subtilis* aus. Somit widersprechen unsere Befunde nicht dem Konzept, dass das Aufkommen der G1PDH und GGGPS das Schlüsselereignis war, das zur Abspaltung der Archaea führte.^[6,8] Vielmehr spricht das nahezu exklusive Auftreten der PcrB-Enzyme in den Bacillales für ein einzelnes horizontales Gentransferereignis ausgehend von einer archaeellen Spezies, gefolgt von der Entwicklung einer neuen Substratspezifität (Hintergrundinformationen, Abbildung S7).

Phänotypisch konnten wir beim *B.-subtilis*-ΔpcrB-Stamm eine gewisse Verklumpung der Zellen beobachten. Zudem konnten wir zeigen, dass die verschiedenen HepG-Derivate, die hier beschrieben wurden, in der *B.-subtilis*-Membran populiert sind, was vermuten lässt, dass sie deren Struktur und Funktion beeinflussen. Es sind jedoch weitere Experimente notwendig, um diese Hypothesen zu bekräftigen und die physiologische Bedeutung der neu beschriebenen Etherlipide in der phylogenetischen Domäne der Bacteria aufzuklären.

Eingegangen am 15. März 2011,
veränderte Fassung am 19. Mai 2011
Online veröffentlicht am 14. Juli 2011

Stichwörter: Biosynthese · Enzyme · Funktionsaufklärung · Glycerin-1-phosphat

- [1] C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4576–4579.
- [2] G. Wächtershäuser, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 13–22.
- [3] Y. Koga, M. Nishihara, H. Morii, M. Akagawa-Matsushita, *Microbiol. Rev.* **1993**, *57*, 164–182.
- [4] M. Kates in *The biochemistry of archaea* (Hrsg.: M. Kates, D. J. Kushner, A. T. Matheson), Elsevier, Amsterdam, **1993**, S. 261–295.
- [5] R. Matsumi, H. Atomi, A. J. Driessen, J. van der Oost, *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 39–52.
- [6] J. Peretó, P. Lopez-Garcia, D. Moreira, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 469–477.
- [7] N. Glansdorff, Y. Xu, B. Labedan, *Biol. Direct* **2008**, *3*, 29.
- [8] Y. Koga, *J. Mol. Evol.* **2011**, *72*, 274–282.
- [9] J. Payandeh, E. F. Pai, *J. Mol. Evol.* **2007**, *64*, 364–374.
- [10] J. Payandeh, M. Fujihashi, W. Gillon, E. F. Pai, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6070–6078.
- [11] H. Guldan, R. Sterner, P. Babinger, *Biochemistry* **2008**, *47*, 7376–7384.
- [12] J. Badger, J. M. Sauder, J. M. Adams, S. Antonysamy, K. Bain, M. G. Bergseid, S. G. Buchanan, M. D. Buchanan, Y. Batiyenko, J. A. Christopher et al., *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2005**, *60*, 787–796.
- [13] E. H. Doud, D. L. Perlstein, M. Wolpert, D. E. Cane, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1270–1273.
- [14] K. Kobayashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4678–4683.
- [15] Y. W. Zhang, T. Koyama, D. M. Marecak, G. D. Prestwich, Y. Maki, K. Ogura, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13411–13420.