

Biosynthese und Einbau von Pyrrolysin, der 22. genetisch codierten Aminosäure

Christian Hertweck*

Amber-Codon · Aminosäuren · Biosynthese · Genetischer Code · Protein-Engineering

Hält man sich die vielen verschiedenen Proteine und Enzyme vor Augen, die notwendig sind, alle möglichen Zellfunktionen zu ermöglichen, dann ist es erstaunlich, dass dafür ein einfacher Satz von nur 20 kanonischen Aminosäuren ausreicht – dies trifft zumindest für fast alle Fälle zu, denn einige Enzyme benötigen die 21. proteinogene Aminosäure, das Cystein-homologe Selenocystein. Vor mehreren Jahren gab es noch einen weiteren bemerkenswerten Neuzugang zur Familie genetisch codierter Aminosäuren: Pyrrolysin (Pyl, 1).^[1] Krzycki und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass dieses völlig neuartige Lysinderivat in einige Methyltransferasen aus Archaeobakterien eingebaut wird, z.B. Monomethylamin-Methyltransferase (MtmB; Abbildung 1) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

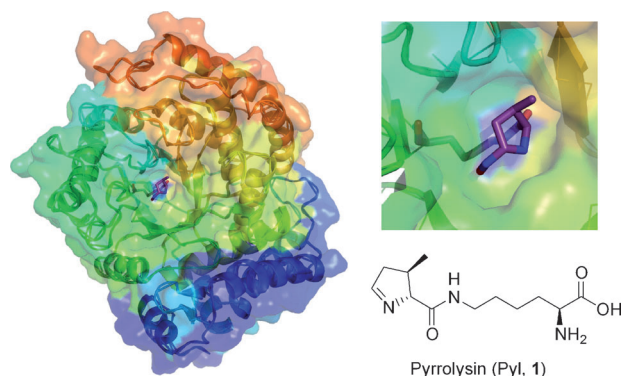
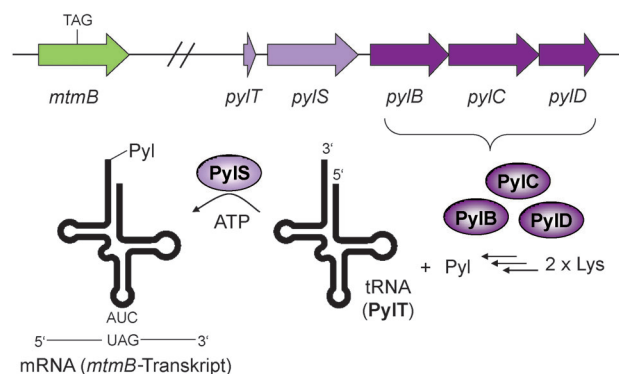


Abbildung 1. Strukturen der Monomethylamin-Methyltransferase MtmB (PDB 1 V2) und von Pyrrolysin (Pyl, 1). Blick in den Substrattunnel mit dem Pyl-Rest im katalytischen Zentrum (Kasten: Vergrößerung).

thanosarcina barkeri.^[2] Die exotische Pyl-Seitenkette wird in das Reaktionszentrum von MtmB platziert, wo sie für die katalytische Funktion des Corrino-abhängigen Enzyms unentbehrlich ist. Im Laufe des letzten Jahrzehnts haben ge-

netische und biochemische Studien schon einen guten Einblick in das Codieren und den Einbau von Pyl geliefert, aber über die biosynthetische Herkunft der Aminosäure war bislang nichts bekannt. Zwei voneinander unabhängige Untersuchungen aus den Laboren von Krzycki^[3] und Geierstanger^[4] haben nun den Pyl-Biosyntheseweg beleuchtet. In Verbindung mit den früheren Arbeiten lassen diese Studien auf eine interessante Fusion zweier Aminosäuren zu einer schließen.

Diese Detektivarbeit begann 2002 mit der Entdeckung eines bestimmten Codons (TAG) – das normalerweise den Abbruch der Proteinbiosynthese bewirkt – innerhalb des Leserahmens des *mtmB*-Gens (Schema 1).^[1] Die genauere



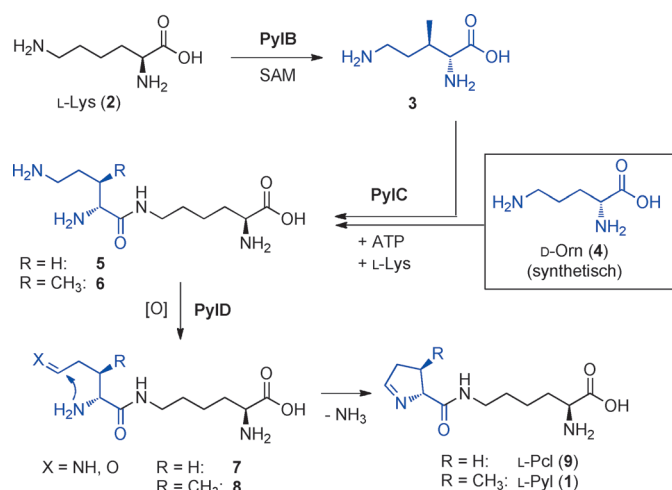
Schema 1. Das Gen *mtmB* mit TAG-Amber-Codon und die Kassette zur Erweiterung des genetischen Codes (genetic code expansion cassette) für die Pyl-Biosynthese (*pylBCD*) und den Einbau (*pylTS*) in MtmB.

Untersuchung des *mtmB*-Genprodukts ergab jedoch, dass an dieser Stelle Pyl eingebaut wurde. Dies bedeutet, dass der Einbau der seltenen 22. Aminosäure die Suppression des Stop-Codons erfordert.^[2] Dass ein so genanntes Amber-Codon den Einbau einer Aminosäure programmieren kann, war bereits von Selenocystein bekannt.^[5] Im Unterschied zum Biosyntheseweg, der zu Selenocysteinyl-tRNA führt, erfordert die Beladung mit Pyrrolysin jedoch eine spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase, PylS, die Pyl auf eine besondere tRNA, PylT, überträgt.^[6] Interessanterweise befinden sich in *Methanobacterium* spp. die für PylS und PylT codierenden Gene in einem kleinen Gencluster (*pylTSBCD*) in der Nähe des Gens, das für MtmB codiert (Schema 1).

[*] Prof. Dr. C. Hertweck

Abteilung Biomolekulare Chemie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, HKI
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)
und
Lehrstuhl für Naturstoffchemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena (Deutschland)
E-Mail: christian.hertweck@hki-jena.de
Homepage: <http://www.hki-jena.de>

Durch die heterologe Expression von *mtmB* und *pyl-TSBCD* in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass diese „Kassette zur Erweiterung des genetischen Codes“ notwendig und hinreichend dafür ist, dem heterologen Wirt die Fähigkeit zu übertragen, intaktes MtmB mit Pyl zu produzieren.^[7] Dies belegte, dass die Genprodukte von *pylBCD* an der Pyl-Biosynthese beteiligte Enzyme sind. Eine weitere interessante Entdeckung dar, dass die Zugabe von D-Ornithin (D-Orn) zum heterologen Expressionswirt die MtmB-Titer zu erhöhen schien; daher wurde zunächst angenommen, dass D-Orn eine Vorstufe von Pyl sei.^[8] Eine genaue Analyse ergab jedoch, dass anstelle von Pyl die Desmethylvariante, Pyrrolincarboxyl-Lysin (Pcl, **9**; Schema 2), durch PylBCD aus D-Orn synthetisiert^[3] und in das Enzym eingebaut wurde.^[3]



Schema 2. Modell für die Biosynthese von Pyrrolysin (Pyl) aus zwei Lysin-Einheiten (Lys).

Über Markierungsexperimente mit stabilen Isotopen haben Krzycki und Mitarbeiter aufgeklärt, dass D-Orn kein Biosynthese-Intermediat ist und dass Pyl ausschließlich von Lys abstammt.^[3] MtmB wurde heterolog in *E. coli* unter Zusatz von [¹³C₆¹⁵N₂]Lysin produziert, und massenspektrometrische Analysen der Proteinfragmente (tryptische Verdauung) zeigten eine Massenverschiebung von 15 Da. Dies lässt darauf schließen, dass Pyl aus zwei Lys-Einheiten unter Verlust einer Aminogruppe gebildet wird. Da der ¹⁵N-Marker nach Zugabe von [ε-¹⁵N]Lys in Pyl fehlte, [α-¹⁵N]Lys dagegen vollständig eingebaut wurde, ist offensichtlich, dass die ε-Aminogruppe abgebaut wird, vermutlich während der Heterocyclisierung.^[3] Zudem konnten Geierstanger und Mitarbeiter durch MS-Analysen von *pylBCD* exprimierenden *E. coli*-Kulturen in Gegenwart oder Abwesenheit von D-Orn entweder Pcl oder Pyl nachweisen. Dies bedeutet, dass diese Aminosäuren vollständig synthetisiert werden, bevor das Aminoacyl-tRNA-Addukt gebildet wird.^[4]

Ergebnisse aus weiteren In-vivo- und In-vitro-Experimenten, die unabhängig voneinander in den Gruppen von Krzycki und Geierstanger erhalten wurden, stützen folgendes Biosynthesemodell: PylB scheint den ersten Schritt in der Pyl-Biosynthese zu katalysieren; sein Fehlen kann durch die Zugabe von D-Orn kompensiert werden, wobei Pcl (**9**) ent-

steht.^[4] Zudem kann synthetisches 3-Methyl-D-Orn (**3**) eine Mutante komplementieren, der PylB fehlt.^[4] Sequenzvergleiche sprechen dafür, dass PylB mit radikalischen SAM-Enzymen verwandt ist, von denen einige als Mutasen fungieren. Es ist daher gut möglich, dass PylB als Aminomutase die mechanistisch anspruchsvolle Transformation von L-Lys in **3** ermöglicht, wobei die Konfiguration am α-Kohlenstoffatom invertiert wird. PylC, ein Enzym mit Sequenzhomologie zu D-Aminosäure-Ligasen, könnte die ε-Aminogruppe von Lys entweder mit D-Orn (**4**) oder mit **3** verknüpfen, um die Dipeptide **5** bzw. **6** zu erhalten. Ein In-vitro-Enzymassay mit PylC zeigte, dass ATP gebunden und umgesetzt wird, eine spezifische Aktivität konnte jedoch noch nicht beobachtet werden.^[4] Massenspektrometrie lieferte Hinweise darauf, dass PylC zumindest in vivo Dipeptid **5** bildet, wenn D-Orn zu einem *pylC* exprimierenden *E. coli*-Stamm gegeben wird.^[3] Auf der Stufe des Dipeptids könnte anschließend die mutmaßliche Dehydrogenase PylD die ε-Aminogruppe zum entsprechenden Imin oxidieren und somit die anschließende, vermutlich spontane Kondensation-Heterocyclisierung einleiten. Tatsächlich konnte über eine In-vitro-Studie gezeigt werden, dass gereinigtes PylD Dipeptid **5** in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) und der oxidierten Form von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) in Pcl (**9**) umsetzt.^[4] Zuletzt wird Pyl (oder alternativ Pcl) durch die Pyl-spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase PylS unter Verbrauch von ATP aktiviert und auf die Pyl-spezifische tRNA geladen, die durch *pylT* codiert wird (Schema 1).

Insgesamt reichen offensichtlich drei Enzyme aus, um zwei Lys-Einheiten in einen Pyl-Baustein umzuwandeln. Aus evolutionärer Sicht ist es bemerkenswert, dass das TAG-Amber-Codon für Pyl sich nur in einer Position vom AAG-Codon für Lys unterscheidet. Im Sinne der Coevolutionstheorie haben Aminosäuren, die aus den gleichen Vorstufen hervorgehen, ähnliche Codons – was für Lys und Pyl zutrifft. Biosynthese und Einbau von Pyl sind nicht nur mechanistisch reizvoll, sondern haben auch eine praktische Bedeutung, da die Pyl-Translationsmaschinerie genutzt werden kann, um den genetischen Code zu erweitern.^[9] Die cotranslationale Insertion von synthetischen Pyrrolysinanaloga durch PylS und PylT konnte bereits dazu eingesetzt werden, um z. B. Click-Reaktionen^[10] und ortsspezifische Ubiquitinierung von Proteinen zu ermöglichen.^[11] Ein besseres Verständnis des Pyl-Biosynthesewegs und der Faktoren, die die Substratspezifität bestimmen, ist die Grundlage für die zukünftige Herstellung und den Einbau von Pyl-Analoga in vivo.

Eingegangen am 2. Juni 2011

Online veröffentlicht am 27. Juli 2011

- [1] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459–1462.
- [2] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, 296, 1462–1466.
- [3] M. A. Gaston, L. H. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Nature* **2011**, 471, 647–650.
- [4] S. E. Celitti, W. Ou, H. P. Chiu, J. Grünwald, D. H. Jones, X. Hao, Q. Fan, L. L. Quinn, K. Ng, A. T. Anfora, S. A. Lesley, T.

- Uno, A. Brock, B. H. Geierstanger, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 528–530.
- [5] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 29–35.
- [6] 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.
- [7] D. G. Longstaff, R. C. Larue, J. E. Faust, A. Mahapatra, L. H. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 1021–1026.
- [8] O. Namy, Y. Zhou, S. Gundllapalli, C. R. Polycarpo, A. Denise, J. P. Rousset, D. Söll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2007**, 581, 5282–5288.
- [9] T. Fekner, M. K. Chan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 387–391.
- [10] T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1661–1663; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1633–1635.
- [11] X. Li, T. Fekner, J. J. Ottesen, M. K. Chan, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9348–9351; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9184–9187.

ChemistryViews

Spot your favorite content
www.ChemistryViews.org

Education & entertainment

Exciting news

Unique articles

Multi-media

Free & easy access to new magazine

New online service brought to you by

ChemPubSoc Europe

WILEY-VCH

603701008