

Doppelte Rolle von S-Adenosylmethionin (SAM⁺) bei der Methylierung von sp²-hybridisierten elektrophilen Kohlenstoffatomen

Wolfgang Buckel und Rudolf K. Thauer*

Aktive Zentren · Radikale · Reaktionsmechanismen · Transferasen

Viele Biomoleküle enthalten an Kohlenstoffatome gebundene Methylgruppen, die aus C₁-Verbindungen gebildet werden; Beispiele sind Thymidin und Ubichinon. Ausgehend von Methylentetrahydrofolat (Methylen-H₄F)^[1] bzw. S-Adenosylmethionin (SAM⁺)^[2] werden Methylgruppen in diese Verbindungen über S_N2-Methylen- oder S_N2-Methyl-Gruppentransferreaktionen eingeführt. Andere Beispiele von Verbindungen mit C-Methylgruppen, die über C₁-Transfer von SAM⁺ auf nukleophile Kohlenstoffatome gebildet werden, sind 5-Methylcytosin,^[3] Menachinon (Methylnaphthochinon)^[2] und das zwei Methylgruppen enthaltende Präcorrin-2, ein Intermediat der Biosynthesen von Vitamin B₁₂, Sirohäm, Häm D und Faktor 430 (F₄₃₀) der methanogenen Archaea.^[4]

Darüber hinaus gibt es viele Verbindungen, die mit SAM⁺ C-methyliert werden, obwohl das methylakzeptierende C-Atom keinen nukleophilen Charakter aufweist. Adenosin 2503 in der 23S-ribosomalen RNA von Bakterien ist eine solche Verbindung, deren posttranslationale Methylierung an C-2 für die Genauigkeit der Proteinbiosynthese von Bedeutung ist, während eine Methylierung an C-8 dem Wirt Resistenz gegenüber mehreren Klassen von Antibiotika verleiht, die gegen die große Untereinheit der Ribosomen gerichtet sind. Die Atome C-2 und C-8 des Adenosins sind eher elektrophile als nukleophile sp²-hybridisierte Kohlenstoffatome mit schwacher C-H-Acidität, werden aber dennoch SAM⁺-abhängig unter Katalyse der Enzyme RlmN aus *Escherichia coli* bzw. Cfr aus *Staphylococcus aureus* methyliert.^[5]

Der erste Hinweis auf den Mechanismus war der Befund, dass beide Methyltransferasen zur Familie der Radikal-SAM⁺-Eisen-Schwefel-Proteine gehören und sich dadurch von denjenigen Enzymen unterscheiden, die an S_N2-Methylierungen beteiligt sind. Radikal-SAM⁺-Enzyme katalysieren in der Regel Reaktionen, die von einem 5'-Desoxyadenosylradikal (5'-dA[•]) initiiert werden. Dieses Radikal wird durch eine Ein-Elektronen-Reduktion von SAM⁺, das an einen [4Fe-4S]-Cluster gebunden ist, erzeugt.^[6] Der zweite Hinweis

war die Beobachtung, dass beide Methylgruppen – sowohl die an C-2 als auch die an C-8 – von der Methylgruppe des SAM⁺ stammen, und dass nicht nur S-Adenosylhomocystein (SAH), sondern auch 5'-Desoxyadenosin (5'-dAH) und Methionin gebildet werden.^[5a] SAH ist das Nebenprodukt einer S_N2-Methylierung, während Methionin bei der Reduktion von SAM⁺ zu 5'-dA[•] und 5'-dAH nach H-Atom-Abstraktion durch 5'-dA[•] anfallen. Schließlich wurde gezeigt, dass beim Methylgruppentransfer von S-Adenosyl-[methyl-²H₃]methionin nach C-2 oder C-8 des Adenosins ein Deuteriumatom durch den Wasserstoff am entsprechenden Amidinkohlenstoffatom ersetzt wird (Abbildung 1).^[5b,7] Im Unterschied dazu katalysieren diejenigen Methyltransferasen, die nach einem S_N2-Mechanismus arbeiten, die Methylgruppenübertragung ohne jeglichen H-Austausch.

Diese und andere experimentelle Befunde lassen darauf schließen, dass die Methylierung an C-2 oder C-8 des Adenosins in zwei Stufen abläuft, wobei zwei Moleküle SAM⁺ pro übertragene Methylgruppe verbraucht werden. In Stufe 1 wird die Thiolgruppe eines der beiden essenziellen Cystein-

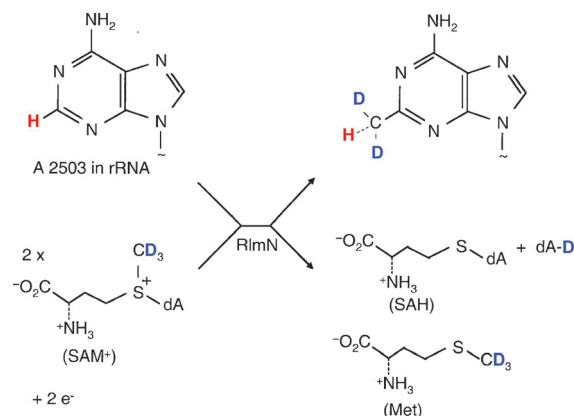
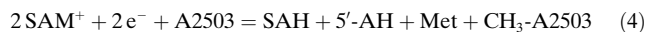
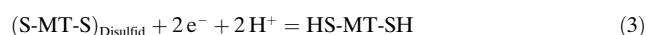
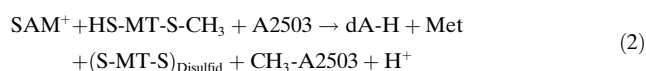


Abbildung 1. SAM⁺-abhängige Bildung von C-2-Methyladenosin aus Adenosin 2503 der 23S-rRNA von *Escherichia coli*. Die Methylierung wird von der Radikal-SAM⁺-Methyltransferase aus dem gleichen Organismus katalysiert. Die Bildung von C-8-Methyl-A2503 wird in analoger Weise von der Radikal-SAM⁺-Methyltransferase Cfr aus *Staphylococcus aureus* katalysiert. RlmN und Cfr sind phylogenetisch nahe verwandt (33 % Sequenzidentität). dA-D = 5'-Desoxyadenosin, das ein Deuteriumatom in der Methylgruppe enthält.

[*] Prof. Dr. W. Buckel, Prof. Dr. R. K. Thauer
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)
E-Mail: thauer@mpi-marburg.mpg.de

reste im aktiven Zentrum der Methyltransferase (HS-MT-SH) durch SAM^+ in einer $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion unter Bildung von HS-MT-S- CH_3 und SAH methyliert (Reaktion 1).^[7] In Stufe 2 wird ein zweites SAM^+ , das an den [4Fe-4S]-Cluster gebunden ist, reduktiv zu Methionin (Met) und 5'-dA⁺ gespalten. 5'-dA⁺ entfernt ein H-Atom von der proteingebundenen Methylgruppe, wobei 5'-dAH und ein neutrales kohlenstoffzentriertes Methylenradikal entstehen; das Radikal greift anschließend das sp^2 -hybridisierte C-2-Atom von Adenosin A2503 in der rRNA an. Das radikalische Addukt wird wahrscheinlich durch Transfer eines Elektrons zum Cluster oxidiert und von einer noch nicht identifizierten monoprotonischen Base des Enzyms deprotoniert. Das Thiolat des zweiten essenziellen Cysteinrests bildet mit dem Schwefelatom des Thioethers ein Disulfid und das resonanzstabilisierte Anion des Produktes, das von der jetzt protonierten Base zum 2-Methyladenosin umgesetzt wird. Damit erklärt sich der Befund, dass nur zwei H-Atome von der Methylgruppe des SAM^+ und das dritte H-Atom von der C-2-Position des Adenosins stammen (Reaktion 2).^[7] Der katalytische Zyklus schließt sich mit der Reduktion des Disulfids durch zwei Elektronen (Reaktion 3), die in der Summengleichung (Reaktion 4 = Reaktionen 1 + 2 + 3) für die Reduktion von SAM^+ zu SAH und Methionin benötigt werden.^[7] Die Methylierung an C-8 dürfte nach dem gleichen Mechanismus ablaufen.



Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass die Methyltransferase RlmN die Reaktion 3 katalysiert. Experimentell wurde das an Cys355 methylierte Enzym zusammen mit SAM^+ , einem rRNA-Fragment und einem Elektronendonator inkubiert, wobei Methyladenosin und das Disulfid (S-MT-S) entstanden und somit der Katalysezyklus nur einmal zur Hälfte durchlaufen wurde.

Die Kristallstrukturen von RlmN und RlmN mit SAM^+ zeigten, dass ein SAM^+ -Molekül an den [4Fe-4S]-Cluster koordiniert. Das Schwefelatom von Cys355 ist methyliert und befindet sich gegenüber der Methylgruppe von SAM^+ . Man kann daraus schließen, dass ein zweites SAM^+ -Molekül, das im ersten Schritt das Cystein methyliert, ebenfalls an dieser Stelle gebunden wird.^[8] So kann RlmN mit struktureller Ökonomie beide Facetten von SAM^+ („two faces of SAM^+ “)^[9] gleichzeitig nutzen.

Die C-2- und C-8-Methylierungen des Adenosins in der rRNA sind nicht die einzigen Beispiele von SAM^+ -abhängigen Methylierungen an sp^2 -hybridisierten elektrophilen Kohlenstoffatomen. Andere Beispiele sind die Methylierungen von C-2' eines Tryptophans im Thiostrepton^[10] und die Synthese von Cyclopropanfettsäuren aus einfach ungesättigten Fettsäuren und SAM^+ .^[11] Allerdings gibt es Hinweise, dass beide Methylierungen nicht dem Mechanismus der Bil-

dung von C-2- und C-8-Methyladenosin in der rRNA folgen. Im Fall von Thiostrepton wurde gezeigt, dass die Methylgruppe von SAM^+ unter Retention der Konfiguration am Methylkohlenstoffatom inseriert wird.^[10] Damit werden Mechanismen, die entweder über einen $\text{S}_\text{N}2$ -Methyltransfer mit Inversion oder über ein Methylenradikal mit H-Austausch verlaufen, ausgeschlossen. Bei der Synthese von Cyclopropanfettsäuren konnte durch Genanalyse gezeigt werden, dass keines der beteiligten Proteine das für Radikal- SAM^+ -Enzyme charakteristische [4Fe-4S]-Cluster-Bindemotiv $\text{CX}_3\text{CX}_2\text{C}$ enthält (C = Cystein; X = beliebige Aminosäure).^[11a]

Es gibt auch sp^3 -hybridisierte elektrophile Kohlenstoffatome, die methyliert werden können.^[12] Ein Beispiel sind die Methylierungen von C-8² und C-12¹ im Bakteriochlorophyll c (Abbildung 2), an denen Radikal- SAM^+ -Enzyme beteiligt sind.^[13]

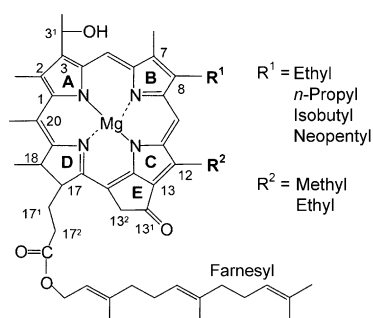


Abbildung 2. Struktur von Bakteriochlorophyll c aus *Chlorobaculum tepidum*. Die Seitenketten R^1 und R^2 entstehen durch aufeinanderfolgende Methylierungen an den unreaktiven C-8²- und C-12¹-Methylgruppen mit SAM^+ als Donor.^[13]

Weitere Beispiele sind die Synthesen der C-Alkylgruppen in Pactamycin,^[14] Thienamycin, Sitosterol, Stigmasterol und verwandter 24-Ethylsteroiden, die Synthesen von C-5-Methylarginin und C-2-Methylglutamin in der Methyl-Coenzym-M-Reduktase (MCR) aus methanogenen Archaea,^[15] die Synthese der beiden Methylgruppen in Tetrahydromethanopterin^[16] und die Synthese der C-Methylgruppe im Fosfomycin.^[17] Im Fall der beiden Aminosäuren in der MCR^[15] und dem Tetrahydromethanopterin^[16] wurde gezeigt, dass die Methylgruppen von [*Methyl*- $^2\text{H}_3$]Methionin stammen und ohne D/H-Austausch von noch unbekannten Enzymen inseriert werden.^[18]

Für die Methylierung am sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatom in der Fosfomycinbiosynthese gibt es einen mechanistischen Vorschlag.^[12b] Er basiert auf dem Befund, dass das verantwortliche Gen *fom3* für ein Protein mit zwei Domänen kodiert. Die konservierte N-terminale Domäne ist als Bindepotein für B_{12} -Cofaktoren annotiert, während die C-terminale Domäne eine hohe Sequenzidentität mit Enzymen der Radikal- SAM^+ -Familie aufweist, einschließlich des diagnostischen [4Fe-4S]-Cluster-Bindemotivs. Die Hypothese besagt, dass ein 5'-Desoxyadenosylradikal ein Kohlenstoff-zentriertes Substratradikal erzeugt, das mit Methylcobalamin (Methyl- B_{12}) das methylierte Produkt liefert. Dies wäre das erste

Beispiel einer radikalischen Methylierung, an der B₁₂ beteiligt sein soll. So gibt es noch viel auf diesem Gebiet zu entdecken!

Eingegangen am 20. Juli 2011

Online veröffentlicht am 14. September 2011

-
- [1] E. M. Koehn, A. Kohen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *493*, 96–102.
 - [2] P. T. Lee, A. Y. Hsu, H. T. Ha, C. F. Clarke, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 1748–1754.
 - [3] Y. Motorin, F. Lyko, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1415–1430.
 - [4] S. Storbeck, S. Saha, J. Krausze, B. U. Klink, D. W. Heinz, G. Layer, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26754–26767.
 - [5] a) F. Yan, J. M. LaMarre, R. Röhrich, J. Wiesner, H. Jomaa, A. S. Mankin, D. G. Fujimori, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3953–3964; b) F. Yan, D. G. Fujimori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3930–3934.
 - [6] a) W. Buckel, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6911–6920; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6779–6787; b) W. Buckel, B. T. Golding in *Handbook of Radicals in Chemistry and Biology*, Vol. 3 (Hrsg.: C. Chatgililoglu, A. Studer), Wiley, Chichester, **2011**.
 - [7] T. L. Grove, J. S. Benner, M. I. Radle, J. H. Ahlum, B. J. Landgraf, C. Krebs, S. J. Booker, *Science* **2011**, *332*, 604–607.
 - [8] A. K. Boal, T. L. Grove, M. I. McLaughlin, N. H. Yennawar, S. J. Booker, A. C. Rosenzweig, *Science* **2011**, *332*, 1089–1092.
 - [9] J. Stubbe, *Science* **2011**, *332*, 544–545.
 - [10] T. Frenzel, P. Zhou, H. G. Floss, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278*, 35–40.
 - [11] a) E. Guangqi, D. Lesage, O. Ploux, *Biochimie* **2010**, *92*, 1454–1457; b) D. F. Iwig, A. Uchida, J. A. Stromberg, S. J. Booker, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11612–11613.
 - [12] a) Q. Zhang, W. Liu, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 30245–30252; b) M. R. Challand, R. C. Driesener, P. L. Roach, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, PubMed ID 21779595.
 - [13] A. G. M. Chew, N.-U. Frigaard, D. A. Bryant, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 6176–6184.
 - [14] F. Kudo, Y. Kasama, T. Hirayama, T. Eguchi, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 492–503.
 - [15] T. Selmer, J. Kahnt, M. Goubeaud, S. Shima, W. Grabarse, U. Ermler, R. K. Thauer, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3755–3760.
 - [16] R. H. White, *J. Bacteriol.* **1986**, *165*, 215–218.
 - [17] R. D. Woodyer, G. Li, H. Zhao, W. A. van der Donk, *Chem. Commun.* **2007**, 359–361.
 - [18] A. K. Kaster, M. Goenrich, H. Seedorf, H. Liesegang, A. Wollherr, G. Gottschalk, R. K. Thauer, *Archaea* **2011**, 9738–9748.
-