



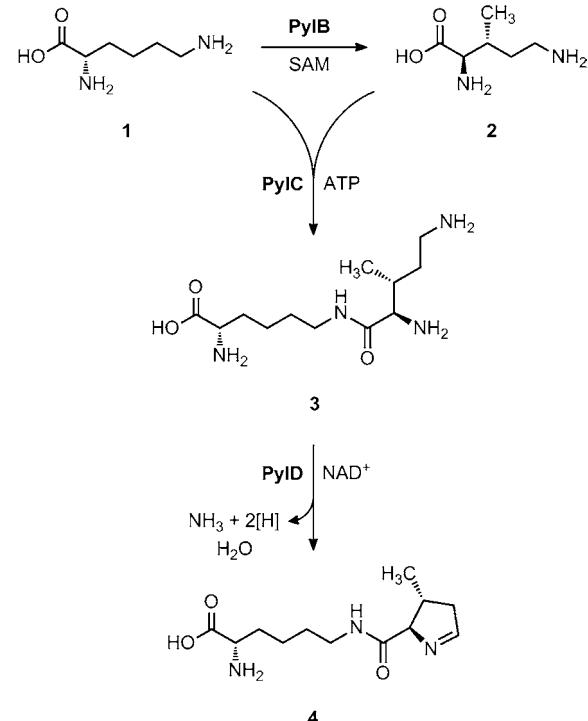
Kristallstruktur der Methylornithin-Synthase (PylB): Einblicke in die Biosynthese von Pyrolysin*

Felix Quitterer, Anja List, Wolfgang Eisenreich, Adelbert Bacher und Michael Groll*

Professor Helmut Simon zum 85. Geburtstag gewidmet

Pyrolysin (**4**, abgekürzt als Pyl oder O, Schema 1), ist die zweiundzwanzigste genetisch codierte Aminosäure.^[1] In Archaeabakterien der Familie *Methanoscincaceae* wird ihr Einbau in drei Proteine (MtMB, MtB und MtT) des katabolen Methylaminstoffwechsels vom Amber-Codon UAG codiert.^[2] Die ungewöhnliche Aminosäure wurde im Jahre 2002 bei der kristallographischen und massenspektrometrischen Untersuchung der genannten Enzyme entdeckt.^[1a,b] Auf der Grundlage von Bioinformatik-Daten erschien eine Kassette von fünf Genen (*pyBCDST*) notwendig und hinreichend für die Biosynthese von **4** und seinen Einbau in Proteine. Dabei codieren *pyIT* und *pyIS* eine Pyrolysin-tRNA und die entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetase; *pyIC* und *pyID* codieren Enzyme der Pyrolysin-Biosynthese.^[1b] Unter Verwendung rekombinanter *Escherichia coli*-Stämme, die *mtmB* und *pyBCDST* aus *Methanoscincina barkeri* exprimieren, wurde durch Einbauexperimente mit [$U-^{13}C_6, U-^{15}N_2$]Lysin (**1**) gezeigt, dass alle Kohlenstoff- und Stickstoffatome von **4** aus **1** abgeleitet sind. Entsprechend Schema 1 wird deshalb angenommen, dass **1** durch PylB-Protein zu Methylornithin (**2**) umgesetzt wird.^[3] Aufgrund von Sequenzmerkmalen kann PylB einer umfangreichen Superfamilie von Eisen-Schweif-Enzymen zugeordnet werden, die S-Adenosylmethionin (SAM) als Cofaktor verwenden.^[4] PylC katalysiert die Bildung des Amids (Pseudopeptids) **3** durch Kondensation von **1** und **2**. Die Oxidation und anschließende Cyclisierung von **3**, katalysiert durch PylD, liefert **4**. Allerdings beruht diese Reaktionsfolge zum Teil auf indirekter Evidenz;^[3] insbesondere wurde das Intermediat **2** bisher nicht direkt nachgewiesen, und es fehlen In-vitro-Untersuchungen zu PylB.^[5]

Nach Klonierung und Expression des *pyB*-Gens aus *M. barkeri* Fusaro konnten wir die Struktur des rekombinanten PylB-Proteins durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auf-



Schema 1. Pyrolysin-Biosynthese.^[3]

lösung von 1.5 Å bestimmen. Phasen wurden durch anomale Streuung („single-wavelength anomalous dispersion“) erhalten. Das monomere Protein besteht aus einer einzigen Domäne mit typischer TIM-Barrel-Faltung und struktureller Ähnlichkeit zu HydE und BioB (RCSB-Codes 3CIW und 1R30; siehe die Hintergrundinformationen). Zusätzlich zum klassischen (β/α)₈-Motiv (Aminosäuren 57–335) enthält PylB drei Helices am N-Terminus (HA-HC) sowie eine C-terminale Helix (HE); die letztere erstreckt sich über den N-terminalen Pol des Barrels. Der C-terminale Pol wird durch Schleifen verschlossen, welche S1/H1, S6/H6 sowie S8/H8 verbinden (Abbildung 1A und Hintergrundinformationen, Abbildung S2). In einem zentralen Hohlraum, der zur Umgebung hin abgeschlossen erscheint, befinden sich ein Eisen-Schweif-Cluster, SAM und das Reaktionsprodukt **2** sowie mehrere lokalisierte Wassermoleküle (Abbildung 2A). Die Schleife, die S1/H1 verbindet, enthält eine CxxxCxxC-Sequenz (Aminosäuren 71–78), welche als konserviertes Motiv in vielen radikalischen SAM-Enzymen auftritt.^[6] Die drei Cysteinreste koordinieren den [4Fe-4S]-Cluster im Inneren der Reaktionskammer am C-terminalen Pol des Barrels. Das

[*] M. Sc. F. Quitterer, M. Sc. A. List, Priv.-Doz. Dr. W. Eisenreich, Prof. Dr. Dr. A. Bacher, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie
Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@ch.tum.de

[**] Wir danken Sophie Vieweg für ihre experimentelle Unterstützung und den Mitarbeitern der PXI des Paul Scherrer Instituts, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für ihre Hilfe beim Messen der Datensätze. Diese Arbeit wurde von der Hans-Fischer-Gesellschaft und der King Abdullah University of Science and Technology (Award No. FIC/2010/07) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106765> zu finden.

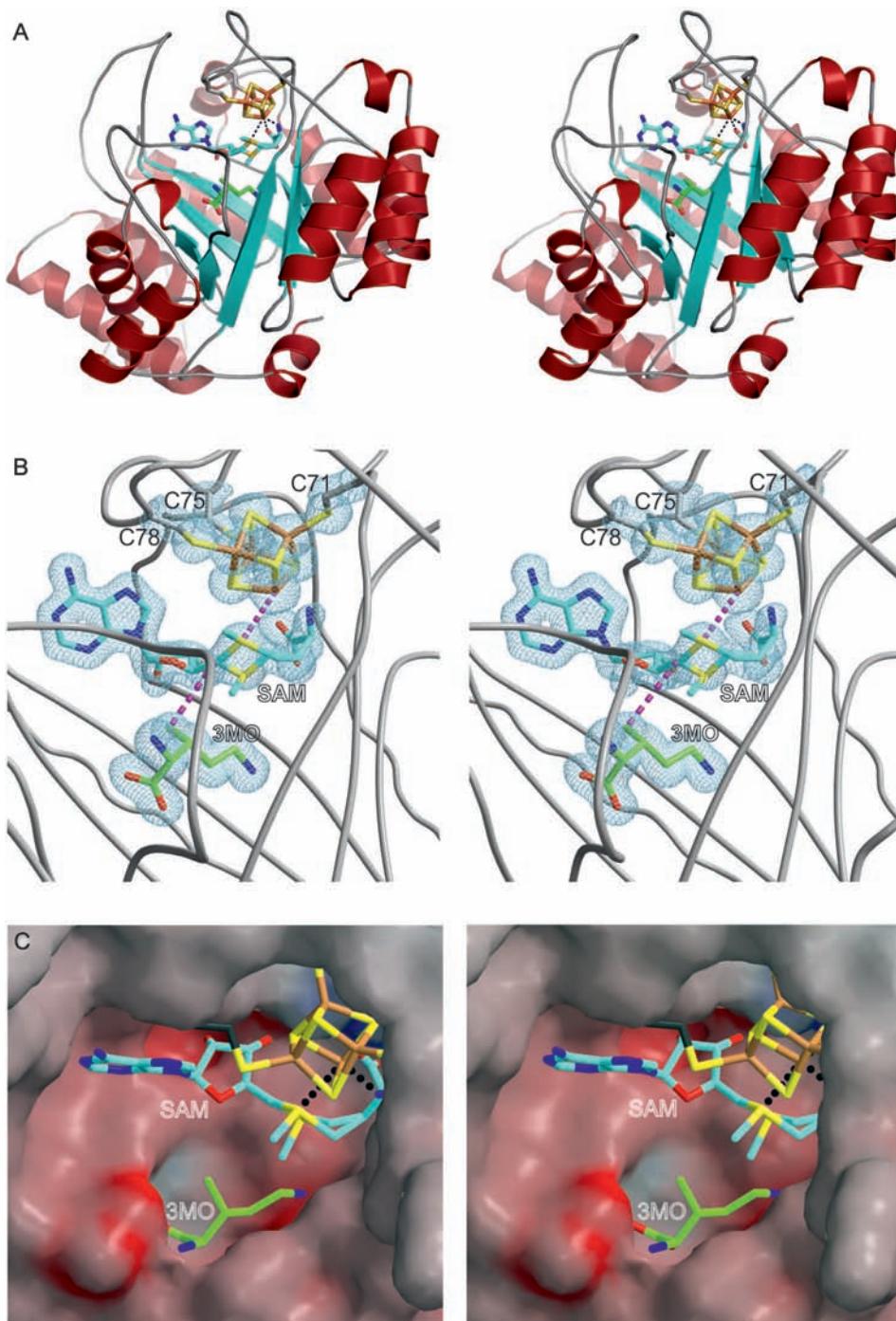


Abbildung 1. A) Bändermodell von PylB (Stereopaar) mit [4Fe-4S]-Cluster, SAM und dem Reaktionsprodukt **2** (3MO). B) $F_{\alpha}-F_{\beta}$ -Elektronendichtedarstellung (blaues Netz, 1σ) des aktiven Zentrums von PylB. Elektronenübergang: kurz gestrichelte violette Linie (oben rechts); Wasserstoffatomübergang: lang gestrichelte violette Linie (unten links). C) Oberflächenpotential des aktiven Zentrums von PylB vom C-terminalen Pol des β -Barrels aus gesehen; [4Fe-4S]-Cluster, SAM und das Reaktionsprodukt **2** (3MO) sind als Stabmodelle dargestellt. Koordinaten und Strukturfaktoren von PylB wurden in der Protein Data Bank unter der Zugangsnummer 3T7V hinterlegt.

vierte Eisenion des Clusters wird durch den Methioninrest von SAM koordiniert (Abbildung 1). Übereinstimmend mit den Beobachtungen für HemN-Protein^[7] kann die diffuse Elektronendichte am Sulfonium-Motiv (Abbildung 1B) als

onskammer modelliert. Ausgehend von unterschiedlichen Ausgangskonformationen erhielten wir durch Minimierung der freien Energie ein robustes Modell (Abbildung 2B). Die ϵ -Aminogruppe des modellierten Substrats nimmt eine ähn-

Überlagerung von biosynthetischem SAM (Hauptkomponente) und seinem *R*-Epimer (Nebenkomponente) interpretiert werden. Letzteres entsteht bei Raumtemperatur durch spontane Epimerisierung.^[8]

Die Anwesenheit von **2** im aktiven Zentrum von PylB ist überraschend, da es kein natürlicher Metabolit von *E. coli* ist und weder dem Nährmedium noch den Puffern, die für die Reinigung und die Kristallisation verwendet wurden, zugesetzt wurde. Daraus folgt, dass PylB in *E. coli* in aktiver Form exprimiert wird. Allerdings konnten wir die Umsetzung von **1** zu **2** bisher nicht *in vitro* nachweisen (siehe die Hintergrundinformationen); demnach könnte es sich bei PylB, zumindest in Abwesenheit von PylC und/oder PylD, um ein „Single-turnover“- oder Suizidenzym handeln. Substrat und Produkt von PylB wurden ursprünglich aus eleganten Proteomikstudien abgeleitet, aber biosynthetisches **2** wurde bisher nicht direkt nachgewiesen.^[3,9] Die Struktur des neuen Metaboliten, einschließlich der 2*R*,3*R*-Konfiguration, ist nunmehr aus der Elektronendichte direkt ersichtlich. Die Kohlenstoffatome 2–5 und die δ -Aminogruppe der Aminosäure stehen in *anti*-Konformation, während die Carboxylgruppe eine *gauche*-Konformation einnimmt. Das Reaktionsprodukt **2** und der Cofaktor SAM sind eingebettet in ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen unter Beteiligung zahlreicher Aminosäurereste des aktiven Zentrums (Hintergrundinformationen, Abbildung S3).

Nach dem virtuellen Entfernen des Enzymprodukts **2** aus der Röntgenstruktur wurde das Substrat **1** in die Reaktionskammer modelliert. Ausgehend von unterschiedlichen Ausgangskonformationen erhielten wir durch Minimierung der freien Energie ein robustes Modell (Abbildung 2B). Die ϵ -Aminogruppe des modellierten Substrats nimmt eine ähn-

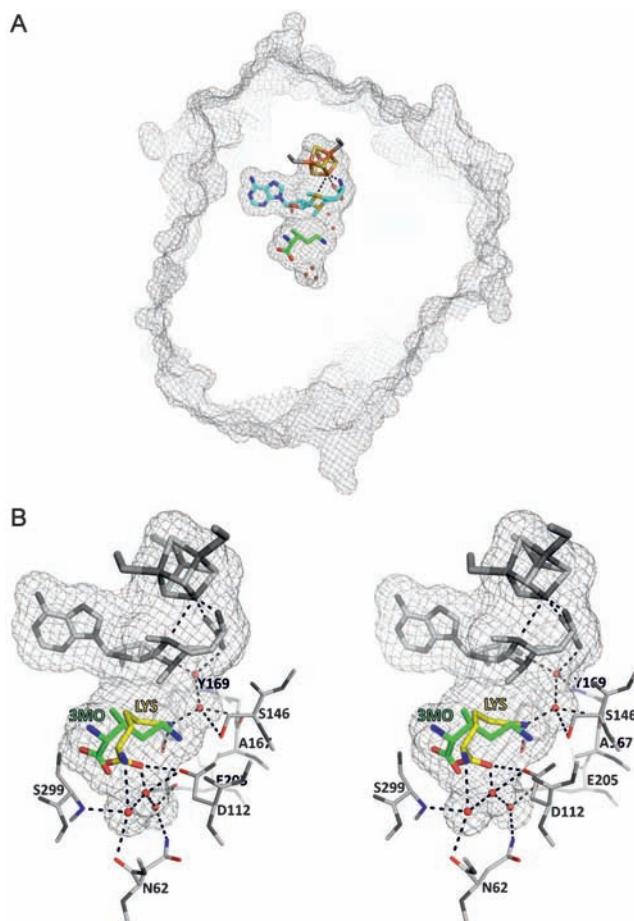


Abbildung 2. Connolly-Oberflächen von PylB mit [4Fe-4S]-Cluster, SAM und **2** (3MO), abgebildet als Stabmodelle; Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. A) Übersicht. B) Aktives Zentrum (Stereopaar) mit Aminosäureresten, die das modellierte L-Lysin (**1**, LYS) über indirekte Wasserstoffbrücken koordinieren.

liche Position ein wie die δ -Aminogruppe des Produkts in der experimentell ermittelten Struktur. Die Carboxyl- und α -Aminogruppe des modellierten Moleküls **1** erscheinen gegenüber **2** rotiert.

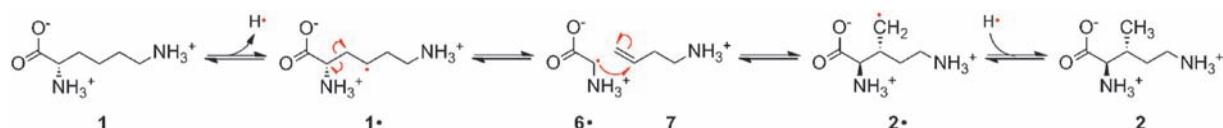
Die Überlagerung der experimentell bestimmten Struktur von **2** mit der modellierten Struktur von **1** im aktiven Zentrum liefert eine Hypothese für den Reaktionsmechanismus der PylB-katalysierten Rückreaktion von **2** zu **1** (Schema 2). Gewöhnlich beginnt die Katalyse durch Eisen-Schwefel-SAM-Enzyme mit einem Elektronenübergang von einem oder über einen Eisen-Schwefel-Cluster auf das Sulfonium-Motiv von SAM. Das so gebildete Radikal fragmentiert unter Bildung von Methionin und einem 5'-Desoxyadenosylradikal (**5**·; Hintergrundinformationen, Schema SS2), das im Folgenden als Wasserstoff-Transponder wirkt.^[4] Die Umsetzung

von **2** zu **1** (d.h. die Rückreaktion) erfordert die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Methylgruppe an Position 3 von **2** durch **5**·, wobei 5'-Desoxyadenosin (**5**) und das Radikal **2** entstehen. Letzteres könnte dann unter Bildung von **1**· isomerisieren, anschließend erfolgt die Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch **1**· von **5**. Die Methylgruppe von **2** ist benachbart zur 5'-Methylengruppe der Riboseeinheit von SAM. Der Abstand von ca. 4.6 Å ist in guter Übereinstimmung mit den Abständen zwischen **5**· und den jeweiligen Reaktanten in anderen radikalischen SAM-Proteinen.^[10] Die Gerüstumlagerung bei der Reaktion von **2** nach **1** (d.h. der Rückreaktion) kann über eine Fragmentierungs-Rekombinations-Sequenz erfolgen, wobei ein Glycyrradikal (**6**·) und Aminobuten (**7**) gebildet werden, ähnlich wie beim Mechanismus der Glutamatmutase (Hintergrundinformationen, Schema SS1).^[11] In Übereinstimmung mit diesen mechanistischen Überlegungen nimmt die C4-Methylengruppe des modellierten Lysin-Substrats eine ähnliche Position ein wie die Methylgruppe von **2** in der experimentell bestimmten Struktur. Das großvolumige aktive Zentrum füllt annähernd die Hälfte des Proteinmoleküls (C-terminaler Pol) aus, in Übereinstimmung mit der typischen Lage der aktiven Zentren von TIM-Barrel-Enzymen am C-terminalen Pol.^[12] Allerdings erklärt die Kristallstruktur nicht, wie das Produkt das aktive Zentrum von PylB verlassen kann. Denkbar sind Konformationsänderungen der Schleifen, die S1/H1, S6/H6 oder S8/H8 verbinden; allerdings koordiniert die zuerst genannte Schleife den Eisen-Schwefel-Cluster und erscheint dadurch konformativ stark eingeschränkt. Denkbar wäre auch eine Freisetzung des Produkts über den N-terminalen Pol des β -Barrels, aber auch dann wären erhebliche Strukturänderungen, einschließlich der Umlagerung von Helix HE, notwendig.

Da die Erkennung des Amber-Codons durch die *pylT*-codierte tRNA keinerlei zusätzliche RNA-Sequenzmotive voraussetzt,^[13] könnte das Pyrrolysin-System die Herstellung von Proteinen mit nichtnatürlichen Aminosäuren durch In-vivo- oder In-vitro-Translation grundlegend verändern. Während dieser Ansatz von der tRNA und der Aminoacyl-tRNA-Synthetase (kodiert durch *pylT* und *pylS*) abhängt, könnte PylB neue Wege für die Herstellung nichtnatürlicher Aminosäuren, insbesondere in isotopenmarkierter Form, eröffnen. Durch In-vivo-Experimente mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurde bereits gezeigt, dass D-Ornithin durch PylCD zu Norpyrrolysin umgesetzt werden kann.^[3,9]

Eingegangen am 23. September 2011
Online veröffentlicht am 16. November 2011

Stichwörter: (2R,3R)-3-Methylornithin · Eisen-Schwefel-Proteine · *Methanosarcina barkeri* · PylB-Protein · Pyrrolysin



Schema 2. Hypothetischer Reaktionsmechanismus für PylB.

- [1] a) B. Hao, W. M. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, 296, 1462; b) G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459; c) D. Söll, *FEBS J.* **2008**, 275, 17.
- [2] M. A. Gaston, R. Jiang, J. A. Krzycki, *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, 14, 342.
- [3] M. A. Gaston, L. W. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Nature* **2011**, 471, 647.
- [4] S. C. Wang, P. A. Frey, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, 32, 101.
- [5] C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 9712; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9540.
- [6] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1097.
- [7] W. D. Schubert, G. Layer, J. Moser, D. W. Heinz, D. Jahn, *EMBO J.* **2003**, 22, 6214.
- [8] a) S. E. Wu, W. P. Huskey, R. T. Borchardt, R. L. Schowen, *Biochemistry* **1983**, 22, 2828; b) J. L. Hoffman, *Biochemistry* **1986**, 25, 4444.
- [9] S. E. Cellitti, W. J. Ou, H. P. Chiu, J. Grünewald, D. H. Jones, X. S. 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.
- [10] a) F. Berkovitch, Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett, C. L. Drennan, *Science* **2004**, 303, 76; b) B. W. Lepore, F. J. Ruzicka, P. A. Frey, D. Ringe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13819; c) J. L. Vey, J. Yang, M. Li, W. E. Broderick, J. B. Broderick, C. L. Drennan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 16137.
- [11] a) W. Buckel, B. T. Golding, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 25, 329; b) E. N. G. Marsh, D. P. Ballou, *Biochemistry* **1998**, 37, 11864; c) H. W. Chih, E. N. G. Marsh, *Biochemistry* **1999**, 38, 13684; d) J. B. Rommel, J. Kästner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10195.
- [12] A. Ochoa-Leyva, X. Soberón, F. Sánchez, M. Argüello, G. Montero-Morán, G. Saab-Rincón, *J. Mol. Biol.* **2009**, 387, 949.
- [13] O. Namy, Y. Zhou, S. Gundlapalli, C. R. Polycarpo, A. Denise, J. P. Rousset, D. Söll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2007**, 581, 5282.