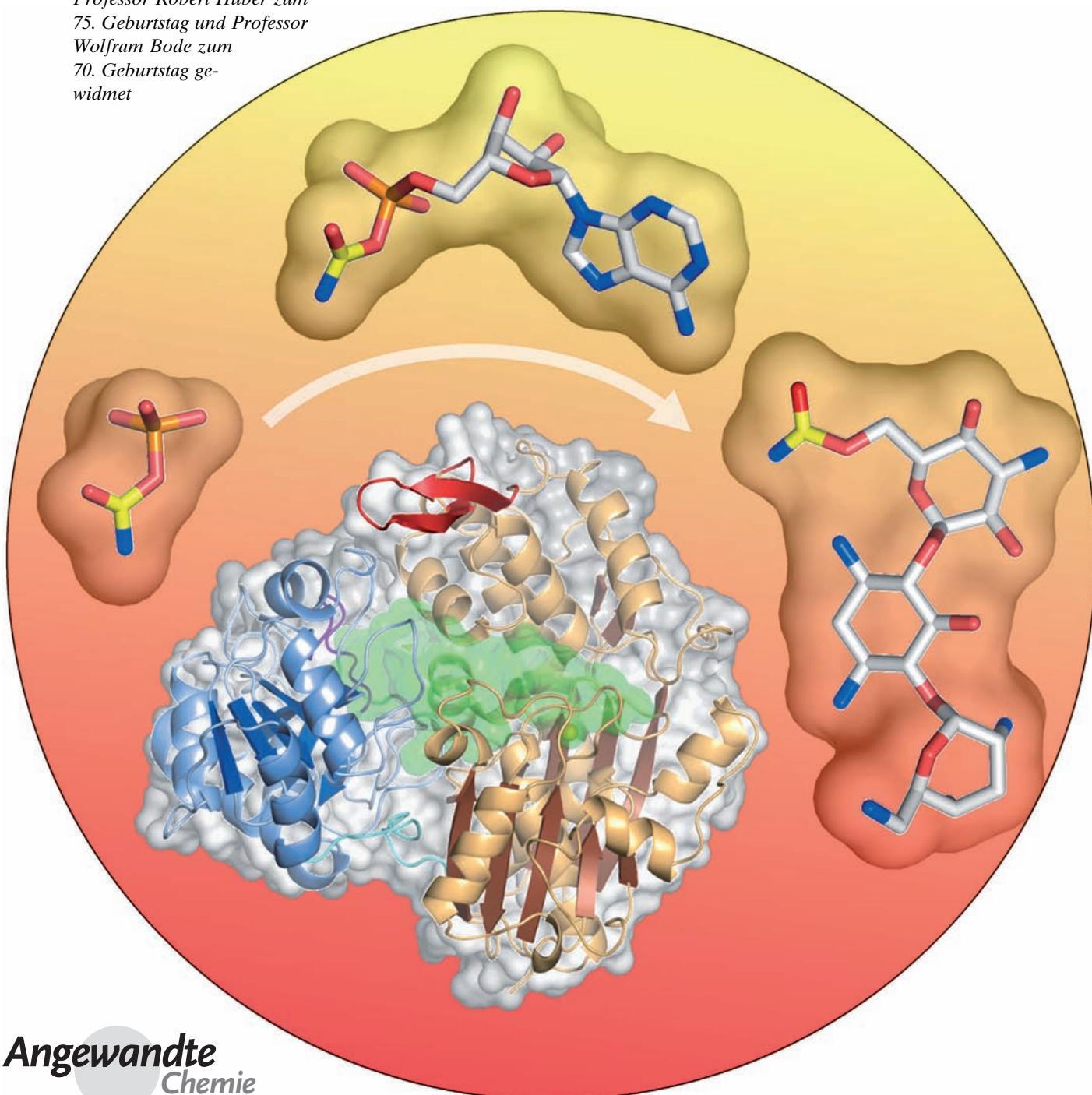


# Die O-Carbamoyltransferase TobZ katalysiert eine enzymatische Reaktion frühen Ursprungs\*\*

Christoph Parthier, Stefan Görlich, Frank Jaenecke, Constanze Breithaupt, Ulrike Bräuer, Uwe Fandrich, Diana Clausnitzer, Udo F. Wehmeier, Christoph Böttcher, Dierk Scheel und Milton T. Stubbs\*

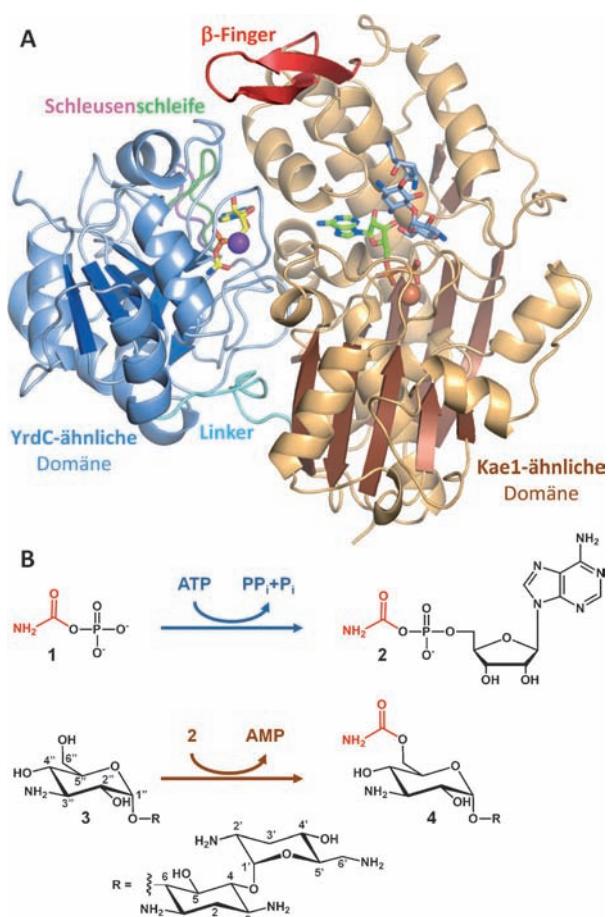
Professor Robert Huber zum  
75. Geburtstag und Professor  
Wolfram Bode zum  
70. Geburtstag ge-  
widmet



Die enorme Vielfalt von Sekundärmetaboliten beruht auf zahlreichen chemischen Modifizierungsreaktionen im Verlauf ihrer Biosynthese und schafft die Grundlage für deren pharmazeutische Anwendung z.B. als Antibiotika, antivirale Medikamente sowie Krebs-Therapeutika.<sup>[1]</sup> Während Reaktionen wie die Glykosylierung und Prenylierung sowohl funktionell als auch strukturell gut verstanden sind, ist die enzymatisch katalysierte *O*-Carbamoylierung (die Übertragung einer Carbamoylgruppe auf die Hydroxygruppe eines Substrats) noch wenig untersucht. *O*-Carbamoylierung wurde bereits für eine Reihe von Sekundärstoffwechselprodukten nachgewiesen, z.B. für diverse Antibiotika wie Cephalomycin,<sup>[2]</sup> Novobiocin<sup>[3]</sup> und Nebramycin,<sup>[4,5]</sup> sowie die Rhizobien-Nodulationsfaktoren (Nod)<sup>[6]</sup> (verantwortlich für die Wirtsspezifität von Knöllchenbakterien) und dem Muschelvergiftung auslösenden Saxitoxin.<sup>[7]</sup>

Wie für die Aspartat- und Ornithin-*N*-Carbamoyltransferasen (CTasen) des primären Stoffwechsels ist der Ursprung der Carbamoylgruppe das energiereiche Substrat Carbamoylphosphat (1, Abbildung 1). Anders als bei den oben genannten CTasen wird jedoch die Aktivität der Carbamoylphosphat-3-hydroxymethylcephem-*O*-Carbamoyltransferase (*O*-CTase) CmcH, die an der Biosynthese des  $\beta$ -Lactam-Antibiotikums Cephamycin beteiligt ist, durch ATP stimuliert.<sup>[2]</sup> Sequenzvergleiche mit dem rhizobiellen Enzym NodU, das die *O*-Carbamoylierung der Nod-Faktoren katalysiert,<sup>[6]</sup> verdeutlichen zudem, dass beide Proteine zu einer größeren Klasse von Enzymen gehören, die als CmcH/NodU *O*-CTasen bezeichnet werden.<sup>[8]</sup> In-vitro-Untersuchungen bestätigten ebenfalls für die *O*-CTase NovN, beteiligt an der Biosynthese des bakteriellen DNA-Gyrase-Hemmstoffs Novobiocin, diese unerwartete Abhängigkeit von  $Mg^{2+}$ -ATP, wie sie auch für die CmcH gezeigt wurde.<sup>[3]</sup>

Tobramycin (3), ein Aminoglykosid, das nah verwandt ist mit Kanamycin und Gentamicin, entfaltet seine antibiotische Wirkung durch die Bindung in einer tiefen Furche am Ort der tRNA-Entschlüsselung innerhalb der 16S-ribosomalen RNA.<sup>[9]</sup> Die mögliche Existenz einer *O*-CTase TobZ (auch als TacA<sup>[4]</sup> bezeichnet) im Tobramycin-Biosyntheseweg wurde



**Abbildung 1.** A) Die Kae1-ähnliche ASKHA-Domäne (braun/rot) und die YrdC-ähnliche Domäne (blau) von TobZ mit ausgewählten Substraten und Intermediaten. Orange: gebundenes Eisenatom; magenta:  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ ; gelb: Carbamoyladenylat (2) im aktiven Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne; grün: ADP im aktiven Zentrum der Kae1-ähnlichen Domäne; hellblau: Tobramycin (3). Die Nukleotidbindung im aktiven Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne führt zum Schließen der Schleusenschleife (rosa: offen; grün: geschlossen). B) Schema der von TobZ katalysierten Reaktionen.

aus genetischen Untersuchungen von *Streptoalloteichus tebrarius* abgeleitet.<sup>[5]</sup> Das heterolog exprimierte Protein TobZ zeigt eine ATP-abhängige Carbamoylierungsaktivität gegenüber 3 und Kanamycin A, die zu den Produkten Nebramycin-5' (4) sowie der neuen Verbindung Carbamoyl-Kanamycin A führt (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Hier zeigen wir, dass TobZ eine zweistufige Reaktion katalysiert, bei der ein Carbamoyladenylat (2) als Zwischenprodukt auftritt, und dass Adenylyl-Synthese und Carbamoylübertragung an zwei verschiedenen aktiven Zentren stattfinden. Die Konservierung von Domänen, funktionelle Gemeinsamkeiten und die Neuauswertung von bereits publizierten Strukturdaten deuten auf analoge Reaktionen bei der Reifung von [NiFe]-Hydrogenasen und der Synthese der essenziellen tRNA-Modifizierung Threonylcarbamoyladenosin hin.

TobZ besteht aus zwei Domänen (Abbildung 1), von denen die größere Domäne (M1–A354) zur ASKHA-Superfamilie<sup>[10]</sup> („acetate and sugar kinases, Hsc70, actin“) gehört

[\*] Dr. C. Parthier,<sup>[+]</sup> S. Görlich,<sup>[+]</sup> F. Jaenecke, Dr. C. Breithaupt, U. Bräuer, U. Fandrich, Prof. Dr. M. T. Stubbs  
Institut für Biochemie und Biotechnologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle (Saale) (Deutschland)  
E-Mail: stubbs@biochemtech.uni-halle.de  
Dr. D. Clausnitzer, Priv.-Doz. Dr. U. F. Wehmeier  
Chemische Mikrobiologie/Lehrstuhl für Sportmedizin  
Bergische Universität Wuppertal, 42097 Wuppertal (Deutschland)  
Dr. C. Böttcher, Prof. Dr. D. Scheel  
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie  
Weinberg 3, 06120 Halle (Saale) (Deutschland)

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Anteilen zu dieser Arbeit bei.

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das DFG Schwerpunktprogramm SPP1152 „Evolution metabolischer Diversität“ sowie der Landesexzellenzinitiative Sachsen-Anhalt „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“ (M.T.S.) und dem „GenoMik-plus“-Programm des BMBF (D.C. und U.F.W.) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108896> zu finden.

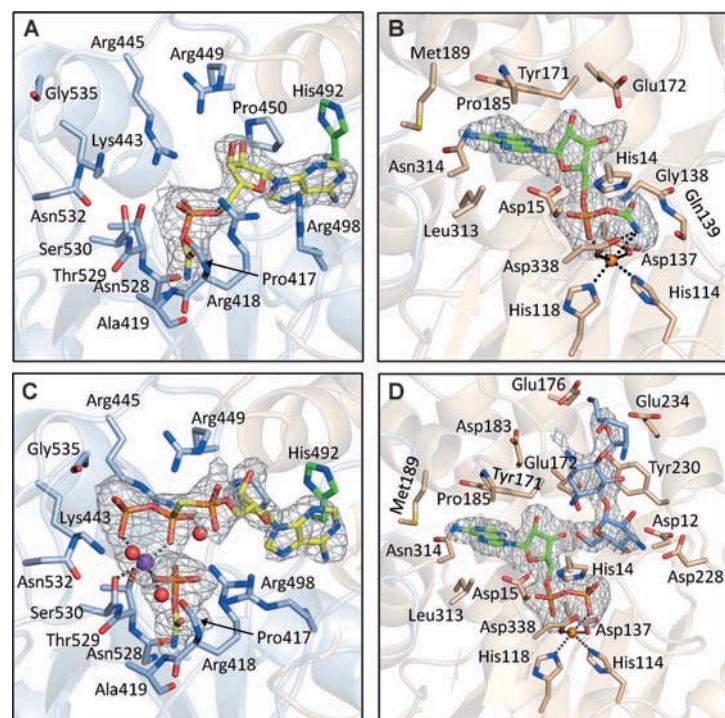
und sich in zwei ähnliche  $\alpha/\beta$ -Unterdomänen und einen vorstehenden zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt-„Finger“ (E251–R269) untergliedern lässt. Bemerkenswerterweise befindet sich ein Eisen- (oder Zink-)Atom, das durch die Reste H114, H118, D137 und D338 koordiniert wird, in der Nähe der Stelle, an der in anderen ASKHA-Proteinen ATP gebunden wird. Mit Ausnahme von D137 sind diese Reste auch in anderen CmCH/NodU-*O*-CTasen konserviert (Abbildung S2). Bisher wurde jedoch lediglich für einen Vertreter der ASKHA-Superfamilie – das universelle Protein Kae1 („kinase-associated endopeptidase 1“)<sup>[11,12]</sup> – eine Metallbindung (Eisen) gezeigt. Tatsächlich sind auch die aktiven Zentren in beiden Strukturen sehr ähnlich. Die kleinere Domäne (D367–H570) besteht aus einem stark gewundenen, offenen  $\alpha/\beta$ -Faltblatt und weist eine deutliche strukturelle Homologie zu Mitgliedern einer weiteren universellen Proteininfamilie, YrdC/Sua5 („suppressor of upstream ATG“), auf.<sup>[13–15]</sup> Die räumliche Aneinanderlagerung beider Domänen erzeugt einen voluminösen inneren Hohlraum (Abbildung S3) mit Öffnung an der Eisen-Bindestelle. Diese könnte gegebenenfalls durch eine Konformationsänderung des  $\beta$ -Faltblatt-„Fingers“ komplett geschlossen werden. Im Zwischenraum beider Domänen wurde im Übrigen ein aus dem Kristallisationspuffer stammendes Tartrat-Ion gefunden, das von zahlreichen basischen Aminosäureresten umgeben wird (Abbildung S4 A).

Diffusion von **1** in die Kristalle führte zu einer Verdrängung des Tartrat-Ions, wodurch die Bindestelle von **1** zwischen den beiden Domänen identifiziert werden konnte (Abbildung S4B; siehe Abbildung 1). Diese ist jedoch ca. 20 Å von der Eisen-Bindestelle entfernt. Die Carboxamidgruppe von **1** wird durch vier Wasserstoffbrücken zu den Atomen A419<sup>N</sup>, A419<sup>O</sup>, N528<sup>O</sup> im Peptidrückgrat und zur Guanidinium-Gruppe von R418 gehalten. Im Gegenzug wird der Phosphat-Rest durch die Seitenkettenatome R498<sup>N<sub>η1</sub>/N<sub>η2</sub></sup>, T529<sup>O<sub>γ</sub></sup> und S<sup>S30O<sub>γ</sub></sup> sowie durch das Rückgrat-Stickstoffatom von S530 gebunden. Außer einer Rotation der Seitenketten R418 und R498 wurden keine wesentlichen Konformationsänderungen beobachtet. Sämtliche an der Bindung von **1** beteiligten Reste sind in *O*-CTasen absolut konserviert (Abbildung S2).

Diffusion von ATP-Analoga in die Kristalle führte zu keiner signifikanten Differenz-Elektronendichte; jedoch konnte in Anwesenheit von ADP letzteres in der vermuteten ATP-Bindestelle der Kae1-Domäne detektiert werden, wobei das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat des ADP durch das Eisenatom koordiniert werden (Abbildung 1, S5A). Das  $\beta$ -Phosphat zeigt dabei die größte Zahl von Wechselwirkungen. Zusätzlich zur Eisenbindung bestehen Wasserstoffbrücken zu den Eisen-koordinierenden Resten H118 und D338, zu den Rückgrat-Amidgruppen von G138 und Q137, als auch zu der Imidazol-Gruppe von H14. Das  $\alpha$ -Phosphat interagiert mit den Eisen-koordinierenden Resten H118 und D338 sowie mit den Rückgrat-Amiden von G310 und D338. Die Ribose-Hydroxygruppen bilden außerdem Wasserstoffbrücken zu

G168<sup>O</sup> und E172<sup>O<sub>ε1</sub></sup>. Die Adeninbase wechseltwirkt stapelartig mit der Seitenkette von Y171, die eine Begrenzung der von den Resten P185, G186, M189, V311 und L313 gebildeten Bindungstasche darstellt. Eine weitere Wasserstoffbrücke besteht zwischen dem Stickstoffatom N1 des ADP-Moleküls und der Seitenkette N314<sup>N<sub>81</sub></sup>. Mit der Nukleotidbindung gehen nur minimale Strukturänderungen einher. Die Protein-Eisen-Koordination wechselt von einer zweizähnigen Wechselwirkung der Seitenkette D137 zu einer einzähnigen Wechselwirkung. Des Weiteren reorientiert sich die Seitenkette der Aminosäure E172, um Platz für den Riboseteil des Nukleotids zu schaffen.

Gleichzeitige Diffusion von **1** und ATP in die Kristalle resultierte in einer zusätzlichen Differenz-Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne, die eindeutig als Carbamoyladenylat (**2**) interpretiert werden kann (Abbildung 1, 2A, S4D). Die Adeninbase befindet sich in einer großräumigen Tasche, die durch das Schließen der konservierten, an der Oberfläche befindlichen Schleife V490–R498 (hier „Schleusenschleife“ genannt) für das Lösungsmittel unzu-



**Abbildung 2.** A) Das Intermediat Carbamoyladenylat (**2**) in der YrdC-ähnlichen Domäne, beobachtet in Kristallen, die mit **1**, ATP und Mn<sup>2+</sup> getränkt wurden. Nukleotid-Bindung resultiert im Schließen der Schleusenschleife (enthält H492). B) Das Intermediat **2** in der Kae1-ähnlichen Domäne (gleicher Kristall): die Carboxamid-Gruppe wechseltwirkt mit dem Eisenatom und mit den Rückgrat-Amid-Stickstoffatomen der benachbarten G138 und Q139. C) Diffusion von AMP-PCP, **1** und Mn<sup>2+</sup> in die Kristalle resultiert in eindeutigen Elektronendichten für die jeweiligen Substrate sowie geordnete Lösungsmittelmoleküle (rote Kugeln), die gemeinsam das Kation (magenta) oktaedrisch koordinieren. D) Diffusion von Tobramycin, **1** und ADP in die Kristalle ermöglichte die Identifizierung der Bindestelle des Antibiotikums sowie von ADP im aktiven Zentrum der Kae1-ähnlichen Domäne. Das Aminoglykosid wird hauptsächlich durch elektrostatische Interaktionen gebunden. Die 6''-Akzeptor-Hydroxygruppe befindet sich in Nachbarschaft zu H14 und dem  $\beta$ -Phosphat von ADP. Die F<sub>o</sub>–F<sub>c</sub>-Elektronendichtekarten sind mit 3 $\sigma$  konturiert.

gänglich wird. Die Adeninbase weist nur wenige Kontakte zum Protein auf, z.B. einige stapelartige Wechselwirkungen mit der Seitenkette von P450 als auch mit H492 und R498 der Schleusenschleife. Die Ribose wechselwirkt über die O3'-Hydroxygruppe mit der Aminosäure R449<sup>N<sub>η</sub>2</sup>. Der Phosphatrest des Adenylyls lässt sich mit dem Phosphatrest von **1** bei einer Verschiebung des Hauptkettensegments D533-E536 und der Guanidiniumgruppe von R445 (in Bezug auf die Position in der **1**-gebundenen Struktur) überlagern. Darüber hinaus wird das ADP, das vorher an der Eisenbindestelle gefunden wurde, durch ein zweites Molekül von **2** ersetzt (Abbildung 2B, S5B), wobei das Carboxamid-Stickstoffatom von dem Eisenatom, D338<sup>O<sub>62</sub></sup> und dem Rückgrat-Sauerstoffatom von Q139 in seiner Position gehalten wird, und das Carbonyl-Sauerstoffatom durch die benachbarten Amid-Stickstoffatome der Hauptketten von G138 und Q139 positioniert wird.

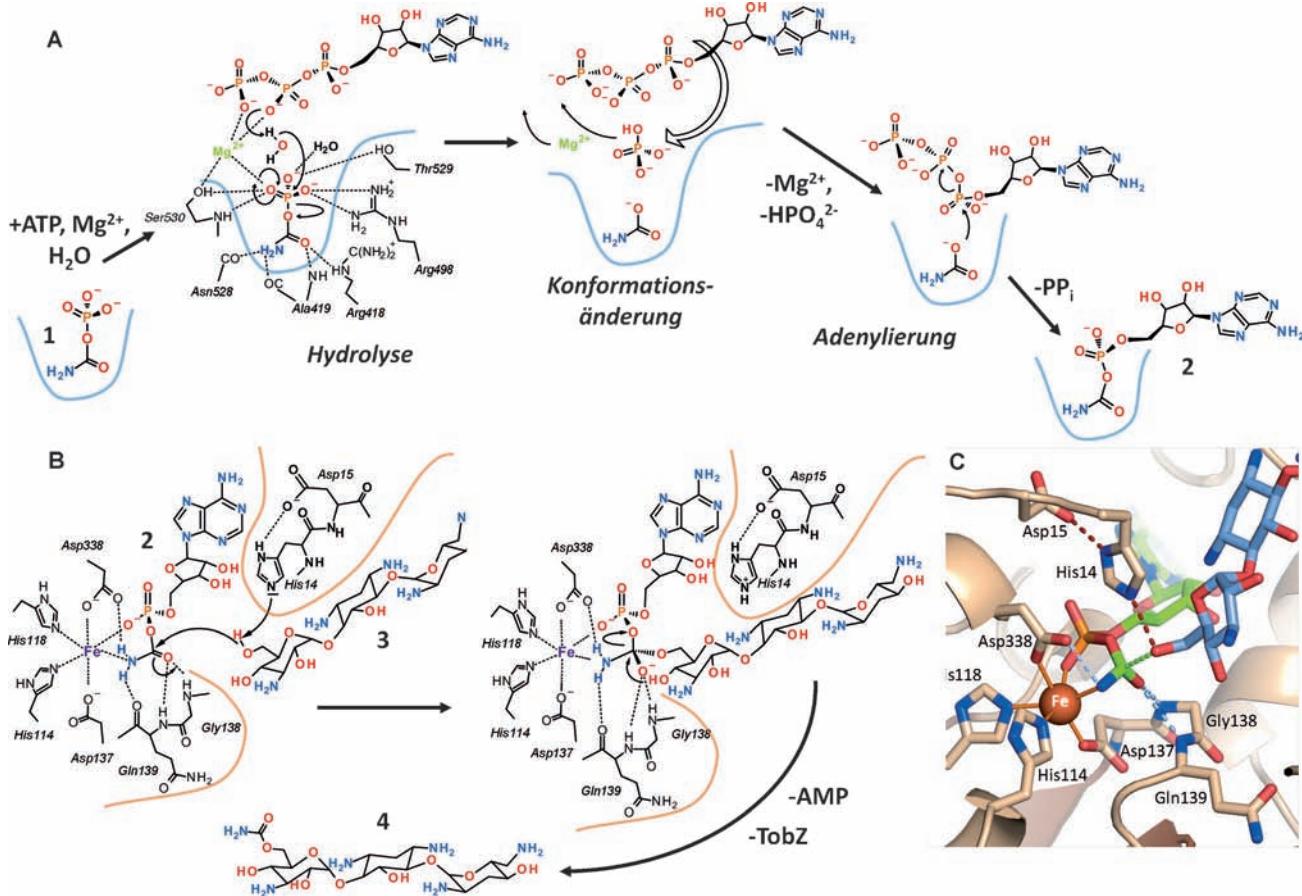
Simultane Diffusion von **1**, dem ATP-Analogon AMPCPP und Manganionen in die Kristalle bestätigte die Nukleotidbindestelle in der YrdC-ähnlichen Domäne (Abbildung 2C, S4C), es wurde jedoch keine Elektronendichte für ein Nukleotid an der Eisenbindestelle gefunden. Die Positionen der Adeninbase und des Riboseteils verschieben sich in Bezug auf die Position im Komplex mit **2** (das C4'-Atom der Ribose bewegt sich um 2.3 Å) bei gleichzeitigen geringfügigen Umlagerungen der Seitenketten von R498 und R445. Der Hauptteil der Enzym-Nukleotid-Wechselwirkungen wird durch die Phosphatgruppen beigesteuert. Das  $\gamma$ -Phosphat wird sowohl durch Wechselwirkung mit den Seitenketten von K443<sup>N<sub>ε</sub></sup>, R445<sup>N<sub>η</sub>1</sup>, S530<sup>O<sub>γ</sub></sup> und N532<sup>N<sub>δ2</sub></sup> als auch durch das Rückgrat-Amid-Stickstoffatom von G535<sup>N</sup> positioniert. Das  $\beta$ -Phosphat des Nukleotids bindet R449<sup>N<sub>2</sub></sup> sowie R418<sup>N<sub>2</sub></sup>, die ebenfalls mit dem  $\alpha$ -Phosphat von AMPCPP und dem Phosphat von **1** wechselwirken. Bemerkenswerterweise führt die AMPCPP-Bindung zur Bindung eines oktaedrisch koordinierten Mn<sup>2+</sup>-Ions. Zu den äquatorialen Liganden zählen das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des AMPCPP<sup>O<sub>2β</sub>/O<sub>2γ</sub></sup>, S530<sup>O<sub>γ</sub></sup> und ein Lösungsmittelmolekül (ebenso gebunden von P417<sup>O</sup> und dem Carboxamid-Sauerstoffatom von **1**), sowie die axialen Liganden **1**<sup>O<sub>1P</sub></sup> und ein zweites Lösungsmittelmolekül. Die Nukleotid-Bindung wird durch ein drittes Lösungsmittelmolekül vervollständigt, das sich im Wasserstoffbrücken-Abstand zum  $\beta$ -Phosphat von AMPCPP<sup>O<sub>1P</sub></sup>, zum O2'-Atom der Ribose und zur Seitenkette R445<sup>N<sub>η</sub>2</sup> befindet. Mutationen in dieser Regionen (siehe die Hintergrundinformationen) liefern einen weiteren Beweis dafür, dass die YrdC-ähnliche Domäne mit ihrer kryptischen **1**-abhängigen Mg<sup>2+</sup>-ATP-Bindestelle für die Synthese von **2** verantwortlich ist.

Die Bindestelle für das Aminoglykosid-Antibiotikum konnte durch gleichzeitige Diffusion von **1**, ADP und Tobramycin in die Kristalle ermittelt werden (Abbildung 2D). Der zentrale 2-Desoxystreptamin-Ring des Antibiotikums ist über der Seitenkette von Y230 aufgeschichtet, wohingegen die basischen Aminogruppen von den Carboxylatgruppen der Aminosäuren D12, D183, E172, E176, D228 und E234 gebunden werden. Die 6"-Hydroxygruppe des Substrats befindet sich in der Nähe von H14 und den Eisen-gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphaten des Nukleotids, was darauf hindeutet, dass hier der Carbamoyltransfer stattfindet.

Um weitere Einblicke in die Reaktion zu bekommen, wurde die Katalyse mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-markiertem ATP verfolgt (Abbildung S7). In Anwesenheit von **1**, **3** und  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP führt die Reaktion ausschließlich zur Bildung von markiertem AMP, wohingegen bei der Verwendung von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP nur radioaktiv markiertes Pyrophosphat entsteht. Dies deutet darauf hin, dass TobZ eine ATP-Pyrophosphatase-Reaktion katalysiert, was durch die Abhängigkeit der ATP-<sup>32</sup>PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion von der Anwesenheit von **1** bestätigt wird. Demzufolge wird die ATP-Pyrophosphatase-Aktivität von einer Phosphat-Abspaltung von **1** zum Zwischenprodukt **2** und einer letztendlichen AMP-Bildung begleitet. Aufgrund der Anwesenheit von ADP in dem Kae1-ähnlichen aktiven Zentrum und einer durch das Lösungsmittelmolekül vermittelten Wechselwirkung zwischen der 2'-Hydroxygruppe von ATP und dem  $\beta$ -Phosphat in dem **1**-AMPCPP-Komplex, wurde der Effekt anderer Nukleotide auf die Carbamoylierung getestet (Abbildung S9). Dabei konnte gezeigt werden, dass ADP die Entstehung von **4** hemmt und die Reaktion in Anwesenheit von Desoxy-ATP deutlich langsamer ist.

Aus der Kombination der hier unterbreiteten strukturellen und biochemischen Daten schlagen wir folgenden Reaktionsablauf von TobZ vor (Abbildung 3). Durch die Bindung von **1** in einer schmalen Höhle am Grunde der Reaktionskammer wird die sonst verborgene sekundäre Bindestelle für Mg<sup>2+</sup>-ATP vervollständigt. Die Nukleotidbindung führt zum Schließen der Schleusenschleife. Die Bildung einer Salzbrücke zwischen Mg<sup>2+</sup> und einem Sauerstoffatom des Phosphats von **1** könnte die Elektrophilie des Phosphoratoms in **1** erhöhen und die Stabilisierung der entstehenden negativen Ladung während der Hydrolyse erleichtern. Wir schlagen vor, dass ein Wassermolekül den freien Raum zwischen **1** und dem  $\beta$ -Phosphat des ATP gegenüber der zu brechenden Bindung von **1** besetzt. In dieser Position ist eine Aktivierung des Wassermoleküls für den nukleophilen Angriff durch Deprotonierung mithilfe eines  $\beta$ -Phosphat-Sauerstoffatoms von ATP (in Analogie zur nukleophilen Aktivierung bei den Ein-Metallion-Typ-II-Restriktionsendonukleasen)<sup>[16]</sup> oder mithilfe eines Hydroxidions möglich, das durch das Mg<sup>2+</sup>-Ion koordiniert wird (wie bereits für das selbstspleißende Hammerhead-Ribozym beschrieben).<sup>[17]</sup> Nach der Hydrolyse verbleiben beide Produkte durch die Anwesenheit des ATP-Moleküls in der Höhle, wodurch das reaktive Carbamat geschützt wird. Die anschließende Adenylierung könnte durch eine Verschiebung der Ribose und des  $\alpha$ -Phosphats von ATP zur Position, die in der Struktur des Komplexes mit **2** beobachtet wurde, eingeleitet werden. Die Verdrängung des gespaltenen Phosphats durch das  $\alpha$ -Phosphat des ATP würde das  $\alpha$ -Phosphat in die richtige Position für einen nukleophilen Rückseitenangriff des Carbamats bringen, was zu einer Freisetzung von Pyrophosphat führen würde. Besonders hervorzuheben ist die passive Rolle des Proteins in der Adenylierungsreaktion: sämtliche funktionellen Gruppen werden durch die Substrate selbst zur Verfügung gestellt, was eine extreme Form der substratgestützten Katalyse darstellt.

Die Kopplung der Pyrophosphat/Phosphat-Freisetzung an die Umlagerung der zahlreichen basischen Seitenketten in räumlicher Nähe, wie es bereits für die Adenylierungsdomäne der nichtribosomalen Peptid-Synthetasen (NRPSen) vorge-



**Abbildung 3.** TobZ katalysiert zwei Halbreaktionen (siehe Text und die Hintergrundinformationen): A) Die erste Halbreaktion der YrdC-ähnlichen Domäne besteht in der Hydrolyse von **1** und einer anschließenden Adenylierung mithilfe von ATP zu **2**. B) Die Kae1-ähnliche Domäne katalysiert den Transfer der Carbamoylgruppe von **2** zur 6'-Hydroxygruppe von Tobramycin (**3**). C) Vorgeschlagener Übergangszustand für die Transferreaktion.

schlagen wurde,<sup>[18]</sup> könnte eine treibende Kraft für die Verlagerung des Zwischenprodukts **2** vom Ort der Entstehung zur Carbamoyltransferdomäne (entlang eines elektrostatischen Potentialgradienten innerhalb der Reaktionskammer, Abbildung S3) darstellen. Nach dem Eintreffen von Tobramycin (**3**) an der Carbamoyltransferstelle würde die Annäherung der 6'-Hydroxygruppe von **3** an das aktive Zentrum seine Deprotonierung durch die katalytische Diade H14/D15 ermöglichen. Dadurch würde der nukleophile Angriff auf die Carbamoylgruppe ermöglicht, woraufhin sich ein tetraedrisches Intermediat (nachgeahmt durch das ADP-Molekül an der Eisenbindestelle) bilden könnte, dessen Oxyanion durch die Rückgrat-Amidgruppen von G138<sup>N</sup> und Q139<sup>N</sup> stabilisiert würde (Abbildung 3B, C). Die Abspaltung der AMP-Abgangsgruppe würde dann zu der Bildung des Produkts Nebramycin-5' (**4**) führen. Zu berücksichtigen ist, dass die genaue Identität und die Rolle des Metallions während der Katalyse zurzeit unklar sind.

Die hohe Sequenzkonservierung innerhalb der CmCH/NodU-Familie (Abbildung S2) legt nahe, dass dieser Mechanismus auch für andere bekannte, am Sekundärstoffwechsel beteiligte *O*-CTasen gilt. Damit bildet die TobZ/CmCH/NodU-*O*-CTasen-Familie eine neue Klasse der Adenylatbildenden Enzym-Superfamilie,<sup>[19]</sup> welche die Aminoacyl-

tRNA-Synthetasen, Adenylierungsdomänen der nichtribosomalen Peptid-Synthetasen (NRPSs), die NRPS-unabhängigen Siderophor-Synthetasen sowie die Ubiquitin-aktivierenden-E1-Enzyme enthält. Es besteht allerdings ein wichtiger Unterschied: alle Enzyme dieser Klasse aktivieren die Carboxygruppe ihres Substrats durch Pyrophosphat-Hydrolyse, während die TobZ/CmCH/NodU-*O*-CTasen darüber hinaus die Phosphatabspaltung von **1** bewirken. Aber warum werden zwei energiereiche Verbindungen – ein Phosphat-Anhydrid und ATP – für die Carbamoylierung geopfert? Womöglich liegt die Antwort darin begründet, dass das Carbamat leicht in  $\text{CO}_2$  und Ammoniak zerfällt. Eine Kupplung der Carbamatgruppe an ein Phosphat in **1** oder ein AMP in **2** schützt das sonst instabile Zwischenprodukt, wodurch ein Transport zwischen verschiedenen aktiven Zentren ermöglicht wird. Mehrere Mechanismen von TobZ könnten diese scheinbar verschwenderische Nutzung energiereicher Substrate regulieren: 1)  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP bindet an der sekundären Bindestelle nur in Anwesenheit von **1**; 2) die Besetzung der Adenylierungsstelle resultiert im Schließen der Schleusenschleife, wodurch die Diffusion der Substrate eingeschränkt wird; 3) die Entfernung von Magnesium/Phosphat/Pyrophosphat (erleichtert durch die elektrostatische Verteilung innerhalb der Kammer) treibt die Reaktion in Richtung der

Adenylatbildung; und 4) die beobachtete Hemmung durch ADP könnte eine unproduktive ATP-Hydrolyse drosseln.

Im [NiFe]-Hydrogenase-reifenden Faktor HypF folgen ebenfalls eine YrdC-ähnliche und eine Kae1-ähnliche Domäne aufeinander,<sup>[20]</sup> obwohl die Reihenfolge der Domänen umgekehrt ist. HypF katalysiert die Carbamoylierung des C-terminalen Cystein-Rests von HypE, welche eine Schlüsselreaktion in der Biosynthese des [NiFe]-Hydrogenase-Komplexes darstellt.<sup>[21,22]</sup> Diese ist essenziell für den reversiblen, katalysierten Umsatz von Wasserstoff in Protonen und Elektronen in Archaeen, vielen anaeroben Bakterien und in einigen niederen Eukaryoten.<sup>[23]</sup> Wie TobZ zeigt auch HypF eine ATP-abhängige CTase-Aktivität, wobei die Carbamoylgruppe ebenfalls von **1** stammt und **2** als Zwischenprodukt vorgeschlagen wurde.<sup>[20,24,25]</sup> Es ist daher wahrscheinlich, dass die von HypF und TobZ katalysierten Reaktionen analog zueinander ablaufen.

Für die konservierten und ubiquitären Proteine YrdC/Sua5 und Kae1 wurde kürzlich gezeigt, dass beide an der Biosynthese der modifizierten tRNA-Base Threonylcarbamoyladenosin ( $t^6A_{37}$ ) beteiligt sind.<sup>[26-29]</sup> Diese tRNA-Modifikation ist für die korrekte Entschlüsselung der mRNA durch das Ribosom notwendig,<sup>[30]</sup> wodurch die vielfältigen Effekte, die im Zusammenhang mit Sua5/Kae1-Mutationen gefunden wurden, erklärt werden können (z. B. zahlreiche verschiedene Wachstumsdefekte und Telomer-Fehlfunktionen).<sup>[26-28]</sup> Aus früheren Strukturuntersuchungen sind die Adeninnukleotid- und Nukleinsäure-Bindungseigenschaften von YrdC/Sua5 bekannt.<sup>[13,15]</sup> Die TobZ-Adenylierungsstelle weist große Ähnlichkeit zur Nukleotid-Bindestelle in der YrdC-Domäne von Sua5 auf, wobei die Reste K57/R59/P64 in Sua5 konserviert sind (entsprechend K443/R445/P450 in TobZ, Abbildung S10). Beim Vergleich dieser Bindestellen fallen ebenfalls einige übereinstimmende Kontaktbereiche auf, die in TobZ wichtig für die Carbamoylphosphat-Bindung sind. So befinden sich sowohl die Hauptkettenatome von N528-T529-S530 in TobZ als auch die Seitenketten-Hydroxygruppen an der gleichen Position wie die entsprechenden Reste in YrdC (S137-T138-S139) bzw. Sua5 (A142-P143-S144). Allerdings fällt auf, dass die in O-CTasen vorhandene Schleife, welche die hochkonservierte GPRAL-Sequenz (in TobZ an Position 416-420) enthält – von der A419 mit seinen Rückgratatomen eine doppelte Wasserstoffbrücke zur Carboxamidgruppe von **1** eingeht – in YrdC und Sua5 fehlt.

Die Identifizierung von **2** in der Kristallstruktur von TobZ gab Anlass, die bereits veröffentlichten kristallographischen Daten<sup>[13]</sup> für Sua5 aus *Sulfolobus tokadaii* einer erneuten Auswertung zu unterziehen. Die Differenz-Elektronendichte zeigte dabei eindeutig die Anwesenheit eines Threonylcarbamoyladenylat-Moleküls im vermuteten aktiven Zentrum von Sua5 (Abbildung S10). Die Elektronendichte des Intermediates, gebildet vermutlich im Verlauf der Expression im Wirtsexpressionsorganismus *E. coli*, war zuvor in Form von AMP und Lösungsmittelmolekülen interpretiert worden.<sup>[13]</sup> Wie kürzlich anhand der Sua5-Struktur im Komplex mit L-Threonin und AMPPNP festgestellt wurde,<sup>[31]</sup> bindet L-Threonin in einer in TobZ nicht vorhandenen, kleinen Tasche und wird dabei durch zahlreiche Wechselwirkungen koordiniert: Die Seitenketten-Hydroxygruppe geht Wasserstoff-

brücken mit H68<sup>Ne2</sup> und R122<sup>Ne</sup> ein (R122 ist wiederum an einer Salzbrücke zu E35 beteiligt), während die terminale Carboxygruppe Wasserstoffbrücken zu T36<sup>Oy1</sup>, S182<sup>N/Oy</sup> und R<sup>196N2</sup> bildet. Ebenso bildet R196<sup>N2</sup> Wasserstoffbrücken zu S182<sup>O</sup> und dem Phosphat-Sauerstoff O1 des Adenylnats – Wechselwirkungen, die ebenfalls in TobZ beobachtet werden (wobei die Guanidinium-Gruppe von R418 der GPRAL-Sequenz die Bindung des Adenylnat-Phosphats koordiniert) und in YrdC von R188 gebildet werden könnten.

Aus der Struktur lässt sich damit schließen, dass die YrdC-Domäne das Threonylcarbamoyladenylat-Intermediat bindet und schützt. Die Biosynthese von  $t^6A_{37}$  erfordert Threonin, Bicarbonat und ATP als Substrate, wobei mindestens zwei ATP-Moleküle hydrolysiert werden.<sup>[32,33]</sup> Es wird vermutet, dass Bicarbonat durch ATP aktiviert wird, wobei Carboxyphosphat und ADP gebildet werden. Eine anschließende Reaktion von Carboxyphosphat mit Threonin zum Produkt *N*-Carboxythreonin könnte den Startpunkt für die  $t^6A_{37}$ -Synthese darstellen. Kuratani et al.<sup>[31]</sup> stellten die Hypothese auf, dass die *N*-Carboxythreonin-Synthese von YrdC/Sua5 katalysiert werde. Letzteres erscheint jedoch unwahrscheinlich, da weder genügend Platz für Bicarbonat zwischen Threonin und AMPPNP vorhanden ist, noch AMPPNP (ATP) für die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphats korrekt platziert ist. Unsere Daten deuten dagegen auf eine von YrdC/Sua5 katalysierte, klassische Adenylierung (R-COOH + ATP  $\rightarrow$  R-C=O-AMP + PP<sub>i</sub>) von *N*-Carboxythreonin mit ATP unter Bildung von Threonylcarbamoyladenylat hin. Diese Reaktion würde in Analogie zu der hier für TobZ vorgeschlagenen Carbamat-Adenylierung verlaufen (Abbildung 3A). Eine entsprechende YrdC-katalysierte Adenylierung wurde kürzlich auch von El Yacoubi und Mitarbeitern vorgeschlagen,<sup>[27]</sup> die zudem YrdC die Übertragung der Threonylcarbamoylgruppe auf die tRNA zuschreiben, während Kae1 die Synthese von *N*-Carboxythreonin zugeordnet wird. In Anbe tracht der großen Ähnlichkeit der aktiven Zentren von Kae1<sup>[11]</sup> und der O-CTase-Domäne von TobZ – in denen nicht nur die Eisen- und ATP-Bindung ähnlich sind, sondern auch das Oxyanion-Loch (gebildet jeweils von den Resten G138 und Q139 in TobZ und G130 und G131 in Kae1) vorhanden ist (Abbildungen S11, S12) – plädieren wir für eine Rolle von Kae1 bei der Übertragung des Threonylcarbamoyl-Rests unter Bildung des Produkts  $t^6A_{37}$ . Basierend auf den vorliegenden Daten und der Beobachtung, dass bei der In-vitro- $t^6A_{37}$ -Synthese neben gereinigtem YrdC/Sua5 und Kae1 zusätzlich Zellextrakte benötigt werden,<sup>[27,28]</sup> ist es wahrscheinlich, dass *N*-Carboxythreonin durch eine bisher unbekannte, enzymatisch katalysierte Reaktion aus Bicarbonat und Threonin gebildet wird.

Demzufolge kann TobZ als ein Vertreter einer Familie modular aufgebauter Enzyme sehr frühen Ursprungs angesehen werden, die Reaktionen katalysieren, die an wichtigen Biosyntheseprozessen mitwirken, wie der [NiFe]-Hydrogenase-Reifung<sup>[25]</sup> sowie der Bildung der universellen tRNA-Modifizierung Threonylcarbamoyladenosin.<sup>[26-28]</sup> Der angenommene frühe Ursprung der Reaktion könnte einen weiteren Grund für den unerwarteten und scheinbar verschwendlichen Verbrauch von **1** und ATP im Verlauf der O-Carbamoylierung darstellen: Da die Mitglieder dieser En-

zymklasse an einer essenziellen biotischen Reaktion ( $t^6A_{37}$ -Biosynthese) beteiligt sind, widerstanden sie dem evolutionären Druck und standen im Verlauf der nachfolgenden Evolution als „Blaupause“ für weitere Funktionen zur Verfügung, z.B. in der Biosynthese von Antibiotika. Sowohl die „Arbeitsteilung“ zwischen den beiden Modulen – ATP-abhängige Carbamoylierung und Carbamoylübertragung – als auch die zugrundeliegenden enzymatischen Reaktionen scheinen dabei von der frühen Evolution bis heute konserviert geblieben zu sein. Streptomyceten (als Produzenten von Nebramycin, Cephamycin und Novobiocin), Rhizobien (Nodulationsfaktoren) und Cyanobakterien (Saxitoxin) scheinen diese beiden Module der „Ur-Enzyme“ inkorporiert und als Bausteine für die Produktion von Sekundärstoffwechselprodukten vereinigt zu haben. Die damit erworbenen, inhärenten „Sicherheitsmechanismen“, wie die Regulation des Umsatzes der Substrate **1** und ATP sowie der Schutz von Zwischenprodukten, die essenziell für grundlegende Stoffwechselprozesse sind, könnten gegenwärtige Organismen dazu befähigen, ihr Spektrum von Sekundärmetaboliten (z.B. Nebramycin- oder Tobramycin-Produktion) an den aktuellen metabolischen Status anzupassen.

Eingegangen am 17. Dezember 2011  
Online veröffentlicht am 1. März 2012

**Stichwörter:** Antibiotikum · Biosynthese · Evolution · RNA · Strukturbiologie

- [1] C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469–2493.
- [2] S. J. Brewer, P. M. Taylor, M. K. Turner, *Biochem. J.* **1980**, *185*, 555–564.
- [3] C. L. Freel Meyers, M. Oberthur, H. Xu, L. Heide, D. Kahne, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 69–72; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 67–70.
- [4] M. K. Kharel, D. B. Basnet, H. C. Lee, K. Liou, J. S. Woo, B. G. Kim, J. K. Sohng, *Fems Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 185–190.
- [5] U. F. Wehmeier, W. Piepersberg, *Methods Enzymol.* **2009**, *459*, 459–491.
- [6] S. Jabbouri, R. Fellay, F. Talmont, P. Kamalapriya, U. Burger, B. Relic, J. C. Prome, W. J. Broughton, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22968–22973.
- [7] R. Kellmann, T. K. Michali, B. A. Neilan, *J. Mol. Evol.* **2008**, *67*, 526–538.
- [8] J. J. R. Coque, F. J. Perezllarena, F. J. Enguita, J. L. Fuente, J. F. Martin, P. Liras, *Gene* **1995**, *162*, 21–27.
- [9] Q. Vicens, E. Westhof, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747–755.
- [10] J. H. Hurley, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 137–162.
- [11] A. Hecker et al., *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6042–6051.
- [12] D. Y. L. Mao et al., *Mol. Cell* **2008**, *32*, 259–275.
- [13] Y. Agari, S. Sato, T. Wakamatsu, Y. Bessho, A. Ebihara, S. Yokoyama, S. Kuramitsu, A. Shinkai, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, *70*, 1108–1111.
- [14] J. Jia, V. V. Lunin, V. Sauve, L. W. Huang, A. Matte, M. Cygler, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *49*, 139–141.
- [15] M. Teplova, V. Tereshko, R. Sanishvili, A. Joachimiak, T. Buschueva, W. F. Anderson, M. Egli, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 2557–2566.
- [16] A. Pingoud, M. Fuxreiter, V. Pingoud, W. Wende, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 685–707.
- [17] J. K. Frederiksen, J. A. Piccirilli, *Methods* **2009**, *49*, 148–166.
- [18] H. Yonus, P. Neumann, S. Zimmermann, J. J. May, M. A. Mahariel, M. T. Stubbs, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32484–32491.
- [19] S. Schmelz, J. H. Naismith, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 666–671.
- [20] A. Paschos, A. Bauer, A. Zimmermann, E. Zehelein, A. Bock, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49945–49951.
- [21] L. Forzi, R. G. Sawers, *Biometals* **2007**, *20*, 565–578.
- [22] M. R. Leach, D. B. Zamble, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 159–165.
- [23] P. M. Vignais, B. Billoud, J. Meyer, *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 455–501.
- [24] M. Blokesch, A. Paschos, A. Bauer, S. Reissmann, N. Drapal, A. Bock, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 3428–3436.
- [25] S. Reissmann, E. Hochleitner, H. F. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, A. Bock, *Science* **2003**, *299*, 1067–1070.
- [26] B. El Yacoubi et al., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2894–2909.
- [27] B. El Yacoubi, I. Hatin, C. Deutsch, T. Kahveci, J. P. Rousset, D. Iwata-Reuy, G. Murzin, V. Crecy-Lagard, *EMBO J.* **2011**, *30*, 882–893.
- [28] M. Srinivasan, P. Mehta, Y. Yu, E. Prugar, E. V. Koonin, A. W. Karzai, R. Sternglanz, *EMBO J.* **2011**, *30*, 873–881.
- [29] E. M. Gustilo, A. P. F. Franck, P. F. Agris, *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 134–140.
- [30] F. V. Murphy, V. Ramakrishnan, A. Malkiewicz, P. F. Agris, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1186–1191.
- [31] M. Kuratani, T. Kasai, R. Akasaka, K. Higashijima, T. Terada, T. Kigawa, A. Shinkai, Y. Bessho, S. Yokoyama, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2011**, *79*, 2065–2075.
- [32] B. N. Elkins, E. B. Keller, *Biochemistry* **1974**, *13*, 4622–4628.
- [33] A. Körner, D. Soll, *FEBS Lett.* **1974**, *39*, 301–306.