

Struktur und Reaktionsmechanismus der Pyrrolisinsynthese (PylD)**

Felix Quitterer, Philipp Beck, Adelbert Bacher und Michael Groll*

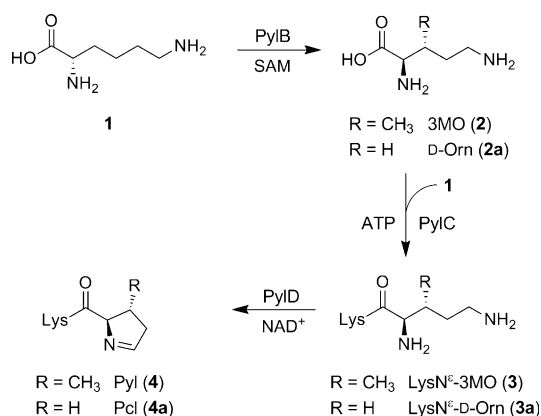
Die vor wenigen Jahren entdeckte, zweiundzwanzigste genetisch kodierte Aminosäure Pyrrolysin (Pyl, **4**) findet größtes Interesse in der Proteinbiochemie,^[1] ungeachtet der Beschränkung des natürlichen Vorkommens auf drei Methylaminkatabolismus-Enzyme in einer kleinen Untergruppe von Archaeen und Bakterien.^[2] Der Pyrrolysin-Einbau im Rahmen der Translation wird ermöglicht durch die Interpretation eines Amber-Stoppcodons (UAG), vermittelt durch eine von *pylT* kodierte tRNA und ihre von *pylS* kodierte Synthetase.^[2a,3]

Die Biosynthese von **4**, ausgehend von zwei Lysinmolekülen (**1**), wird katalysiert durch die Enzyme PylB, PylC und PylD (Schema 1).^[4] Dabei katalysiert das Eisen-Schwefel-Enzym PylB mithilfe seines Koenzyms S-Adenosylmethionin die Umsetzung von **1** zu (3*R*)-3-Methyl-D-ornithin (3MO, **2**),^[5] das anschließend in einer ATP-abhängigen Reaktion an die ε-Aminogruppe eines zweiten Lysinmoleküls unter Bildung von **3** gekuppelt wird.^[6] Das Pseudopeptid **3** wird von

PylD durch Dehydrierung an der C5-Position und anschließenden Ringschluss zu **4** umgesetzt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Struktur von PylD, stellt neue Einsichten bezüglich des Reaktionsmechanismus vor und eröffnet neue Möglichkeiten für die biotechnologische Anwendung.^[7]

Wir haben das *pylD*-Gen aus *Methanosarcina barkeri* Fusaro in einem *Escherichia coli*-Stamm exprimiert. Das rekombinante Protein wurde durch Metallaffinitätschromatographie gereinigt und setzt L-Lysin-N^ε-D-ornithin (LysN^ε-D-Orn, **3a**) in vitro zu Pyrrolincaroxylysin (Pcl, **4a**) um ($k_{\text{cat}} = 0.76 \text{ s}^{-1} \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, $K_m = 3.6 \text{ mM} \pm 0.5 \text{ mM}$; Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). PylD wurde zusammen mit **3a** und/oder einem Pyridinnukleotid-Kosubstrat (NADH bzw. NAD⁺) kristallisiert. Die Kristalle beugten bis zu einer Auflösung von 1.8 Å. Startphasen wurden erhalten durch anomale Dispersion („single-wavelength anomalous diffraction“, SAD) mit einem Selenomethioninderivat in Verbindung mit zweifacher nichtkristallographischer Symmetriemittelung. Die Mittelung der Elektronendichte im realen Raum wurde mit MAIN^[8] in Kombination mit dem Softwarepaket CCP4^[9] durchgeführt. Das Modell wurde mit MAIN gebaut und die Verfeinerung mit REFMAC5^[10] abgeschlossen (Tabelle S1). Nach der Strukturaufklärung des Selenomethionin-markierten PylD Holoenzym (PylD:holo (peak), PDB-Nummer: 4JK3) kristallisierten wir natives PylD in Gegenwart von NAD⁺ und bestimmten dessen Struktur (PylD:holo, PDB-Nummer: 4J43) mit einer Auflösung von 2.2 Å ($R_{\text{frei}} = 20.1 \%$, Tabelle S1). Die Architektur des Enzyms ist in Abbildung 1a gezeigt: Das C-terminale Segment (Aminosäuren 139–259) gleicht einem Rossmann-Motiv aus fünf parallelen β-Strängen (S6–S10) mit einer 21345-Topologie, das N- und C-terminal von den Helices H5 bzw. H10 flankiert wird (Nomenklatur der Sekundärstruktur: siehe Abbildung S3). Eine DALI-Suche^[11] für das C-terminale Segment ergab einen maximalen Z-Wert von 15.6 für die Transhydrogenase-Domäne I von *Rhodospirillum rubrum* (PDB-Nummer: 1L7D). Das N-terminale Segment (Aminosäuren 1–138) beinhaltet ein β-Faltblatt aus fünf Strängen (S1–S5) mit orthogonaler Orientierung bezüglich des Rossmann-Motivs. Die C-terminale Helix (H10) von PylD liegt zwischen den zwei β-Faltblättern und unterstützt dadurch die korrekte Faltung und Orientierung des N-terminalen Segments. Anders als für die Rossmann-Faltung ergab eine DALI-Suche für Proteine, die dem N-terminalen Segment ähneln, lediglich geringe Analogie mit tRNA-Bindedomänen einiger tRNA-Synthetasen (Z-Wert < 8).

Das Nikotinamidadenindinukleotid NAD⁺ bindet an PylD in einer gestreckten Konformation innerhalb einer Furche am C-terminalen Pol des Rossmann-β-Faltblatts, mit beiden Furanoseringen in C2'-endo-Konformation. Ein charakteristisches VXGXGXXGXXA-Motiv^[12] (Aminosäuren 146–157) ist Teil der Kosubstratbindestelle; Rückgrat-



Schema 1. Biosynthese von Pyrrolysin. PylB erzeugt nur 3MO (**2**). PylC und PylD katalysieren auch die Umsetzung von **2a** bzw. **3a**.

[*] F. Quitterer, P. Beck, Prof. Dr. A. Bacher, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
am Department Chemie, Lehrstuhl für Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

[**] Wir danken den Mitarbeitern der Beamline X06SA am Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source, Villigen (Schweiz), für Hilfe bei der Datensammlung und Katrin Gärtner für ihre hervorragende Mitarbeit. Weiterhin danken wir Dr. Anja List für Hilfestellung und Diskussion. Diese Arbeit wurde durch die Hans-Fischer-Gesellschaft, durch Award No. FIC/2010/07 der King Abdullah University of Science and Technology (KAUST) und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Nr. GR1861/7-1) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201301164> zu finden.

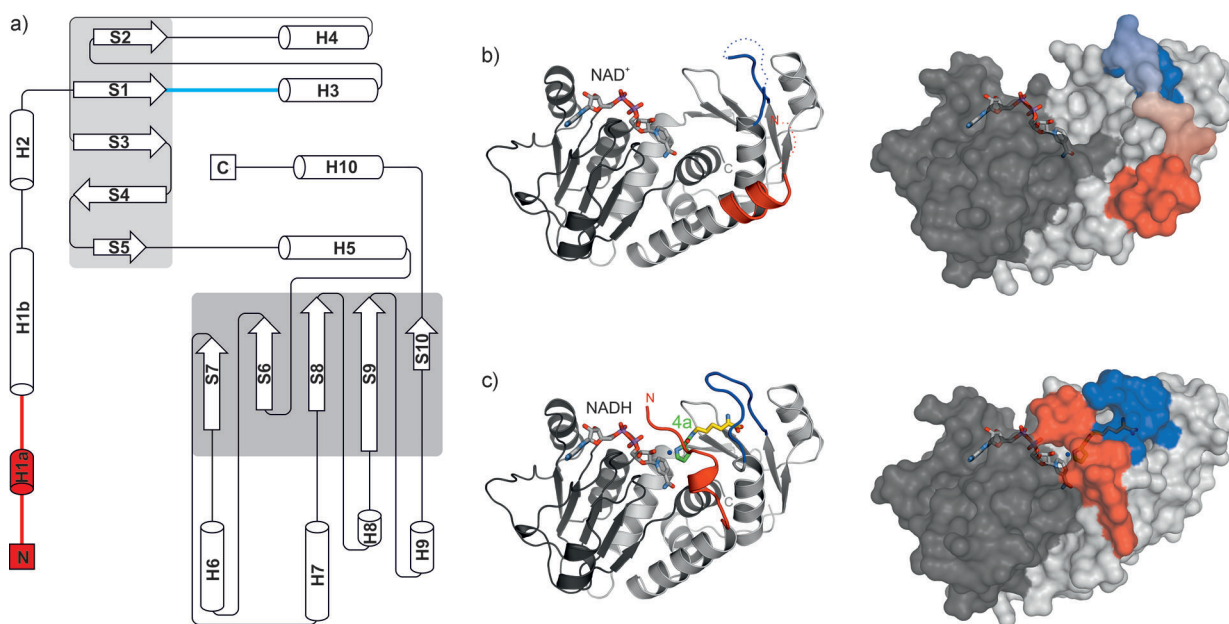


Abbildung 1. Struktur von PylD. a) Topologie der Sekundärstrukturelemente von PylD im Komplex mit **4a**. Das Rossmann-Motiv ist dunkelgrau, das Substratbindemotiv grau hinterlegt. Das N-terminale Segment und die Aminosäuren 52–61, beteiligt am „Induced-fit“-Mechanismus, sind rot und blau abgebildet. b) Links: Bändermodell der PylD:holo-Struktur (offene Konformation). Die C-terminale Rossmann-Faltung ist dunkelgrau, das N-terminale Substratbindeselement grau dargestellt. Der N-Terminus (rot) und eine Schleife, die S1 und H3 verbindet (blau), sind flexibel (angedeutet durch gestrichelte Linien) und in der Elektronendichte nicht definiert. Rechts: Oberflächendarstellung der PylD:holo-Struktur. Fehlgeordnete Bereiche werden analog zum Bändermodell gezeigt. c) Links: Bändermodell von PylD, kokristallisiert mit **3a** und NAD⁺ (geschlossene Konformation). Das aktive Zentrum enthält das Produkt **4a** (C-Atome des Lysinrests sind gelb, C-Atome des Pyrrolinrests grün dargestellt); weitere Farbgebung analog zu (b). Alle Aminosäuren der Struktur in (c) sind in der Elektronendichte gut definiert. Rechts: Oberflächendarstellung der PylD:**4a**-Struktur.

elemente und NAD⁺ bilden gemeinsam ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk (Abbildung 2a). Beide Hydroxygruppen des Adenosylrests stehen über Wasserstoffbrücken mit der streng konservierten Seitenkette von Asp171 in Wechselwirkung. In Abwesenheit des Substrats sind die vier N-terminalen Aminosäuren sowie die Reste 56–59 fehlgeordnet und daher in

der Elektronendichte nicht sichtbar. Der Komplex aus PylD und Kosubstrat zeigt einen offenen Hohlraum an der Schnittstelle zwischen den beiden β -Faltblättern, die als Substratbindestelle fungiert (Abbildung 1b).

Um den Reaktionsverlauf von PylD zu untersuchen, synthetisierten wir das Substratanalogon **3a** (siehe die Hin-

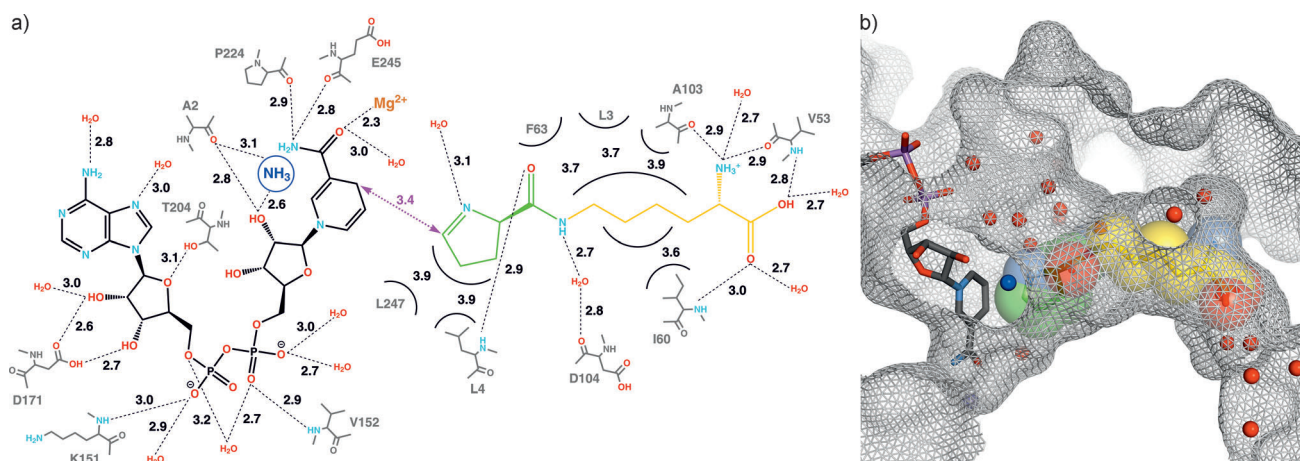


Abbildung 2. a) Aminosäuren im Kontakt mit NADH (schwarz) und **4a** (Pyrrolinteil: grün, Lysinteil: gelb; Abstände in Å). b) Connolly-Oberflächendarstellung des aktiven Zentrums von PylD. Die Atome von Ligand **4a** sind als Kalotten mit den entsprechenden Van-der-Waals-Radien dargestellt. Lösungsmittelmoleküle sind als kleinere Kalotten gezeichnet (Wasser: rot, Ammoniak: blau). Anmerkung: Das Ammoniak-Molekül befindet sich in einem Kanal im Kontakt zur Proteinoberfläche. Die Orientierung der Struktur ist analog zu Abbildung 1. Eine Stereodarstellung von (b) findet sich in den Hintergrundinformationen (Abbildung S2).

tergrundinformationen) und bestimmten die Struktur von PylD im Komplex mit NADH und **3a** (PylD:**3a**, PDB-Nummer: 4J4B) mit einer Auflösung von 1.9 Å ($R_{\text{frei}} = 24.0\%$; Tabelle S1). Die Bindung des Substrats bewirkt einen Bruch der Helix H1 im Rahmen einer erheblichen topologischen Umlagerung des N-terminalen Segments unter Verschluss der Substratbindestelle durch den proximalen Teil der gebrochenen Helix (Aminosäuren 1–11, roter Bereich in Abbildung 1). Infolge dieser Konformationsänderung liegt das gebundene Substrat fast vollständig in einem engen hydrophoben Tunnel, dessen Wand aus den Aminosäuren Leu3, Leu4, Ile60, Phe63, Ala103 und Leu247 aufgebaut wird (Abbildung 2). Das C- und N-terminale Ende des Substrats sowie dessen Isopeptidbindung bilden Wasserstoffbrücken zu Rückgratelementen und Wassermolekülen (Abbildung 2a). Der Ornithin-Rest des Substratanalogs nimmt eine sichelförmige Konformation ein, wobei die Amino- und Amid-Stickstoffatome räumlich eng benachbart sind (2.0 Å). Mit einem Abstand von 2.6 Å zum C4 des Kofaktor-Pyridinrings erscheint das pro-R-Wasserstoffatom der Aminomethylen-gruppe ideal positioniert, um als Hydrid abgespalten zu werden. Somit legt die Orientierung von NADH im PylD:**3a**-Komplex gegenüber dem Substrat nahe, dass PylD als R-Typ-Dehydrogenase fungiert (Abbildung 3a).

Um zu prüfen, ob PylD im Kristall katalytisch aktiv ist und ob der „Induced-fit“-Mechanismus Teil der katalytischen Reaktion ist, wurde ein PylD/NAD⁺-Kokristall mit **3a** inkubiert (PylD:soak, PDB-Nummer: 4J49). Dabei wurden schlagartige optische Veränderungen der Morphologie sowie Blasenbildung im Kristall beobachtet. Der mit Substrat behandelte Kristall beugte dennoch bis zu einer Auflösung von 2.2 Å ($R_{\text{frei}} = 20.1\%$, Tabelle S1). Die Strukturaufklärung zeigte zwei Moleküle in der asymmetrischen Elementarzelle. Während ein Molekül die offene Konformation ohne gebundenes Substrat aufweist, deutet die Elektronendichte für das zweite Molekül die Umsetzung von **3a** zu **4a** an. Der Ligand zeigt dabei jedoch nur teilweise Besetzung am Enzym, angedeutet durch einen erhöhten Debye-Waller-Faktor. Aus diesem Grund wurde PylD mit **3a** und NAD⁺ kokristallisiert und die Komplexstruktur (PylD:**4a**, PDB-Nummer: 4J4H) mit einer Auflösung von 1.8 Å bestimmt ($R_{\text{frei}} = 21.8\%$, Tabelle S1). In ihrer Gesamtarchitektur unterscheidet sich die Struktur nicht vom PylD:**3a**-Komplex

(Abbildung 3b), allerdings zeigen sich in den jeweiligen Elektronendichten deutliche Unterschiede zwischen dem Substrat und dem Produkt **4a** (Abbildung 3c).^[13] Darüber hinaus lässt die Elektronendichte der Produktstruktur im Unterschied zur Substratstruktur ein fixiertes kleines Molekül erkennen, bei dem es sich um ein neben **4a** als zweites Produkt gebildetes Ammoniak-Molekül handeln könnte (Abbildung 3b). Alle schon vor der Umsetzung beobachteten definierten Lösungsmittelmoleküle in der Ligandenumgebung sind weiterhin vorhanden, mit einer Abweichung vom quadratischen Mittel (r.m.s.d.) unterhalb von 0.2 Å (Abbildung 3c).

Unsere kristallographischen Daten identifizieren PylD als Mitglied der großen FAD/NAD(P)-bindenden Rossmann-Superfamilie. Die Zuordnung zu einer speziellen Untergruppe aufgrund struktureller Argumente ist jedoch nicht möglich. Mit einer Länge von 259 Aminosäuren liegt PylD zwar im Größenbereich (250–300 Aminosäuren) der kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase-Familie („short-chain dehydrogenase/reductase family“, SDR), allerdings ist das

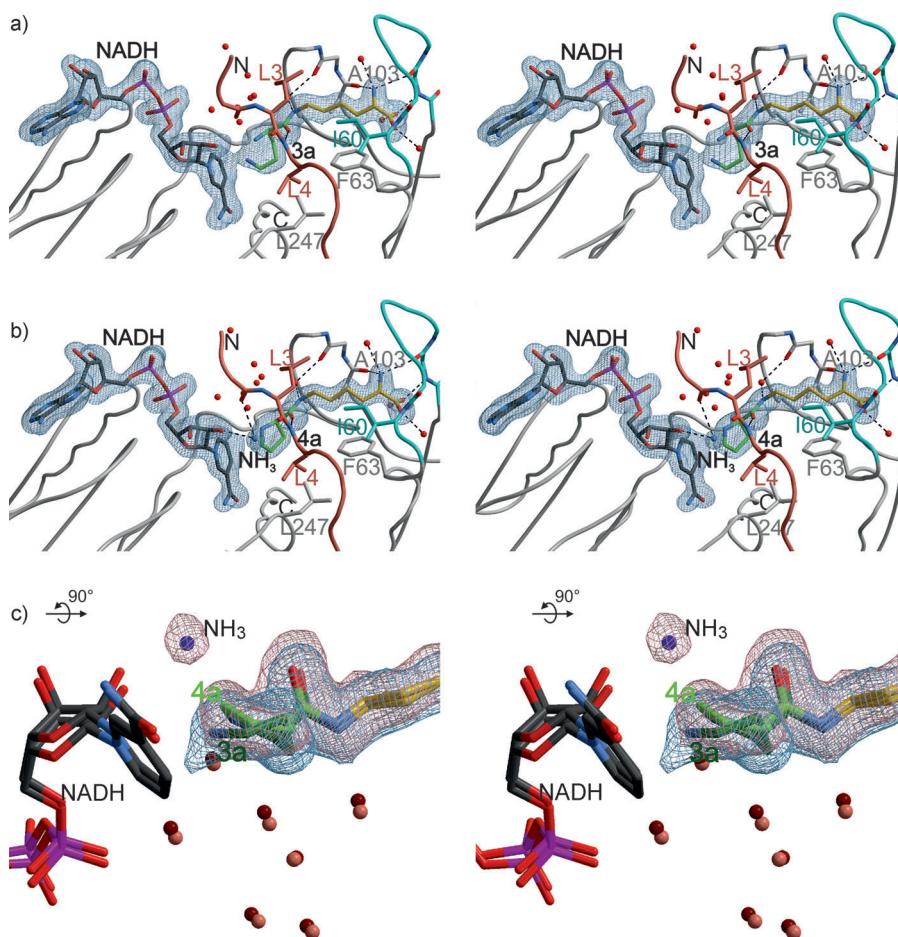


Abbildung 3. Stereodarstellung des aktiven Zentrums von PylD. Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte ist bei 1.0σ konturiert. Der N-Terminus ist in rot und die Schleife, die S1 und H3 verbindet, in blau dargestellt. Die Aminosäuren im aktiven Zentrum sowie die Liganden sind als Stabmodelle abgebildet; die entsprechenden Lösungsmittelmoleküle sind als Kugeln (rot: Wasser, blau: Ammoniak) gezeichnet. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien angedeutet. a) PylD im Komplex mit **3a**; b) PylD im Komplex mit **4a**; c) Strukturüberlagerung von **3a** (dunkelgrün, blaues Netz) und **4a** (grün, rotes Netz). Die Orientierung von PylD ist analog zu Abbildung 1.

Die Kristallstrukturen (PylD:holo, PylD:**3a** und PylD:**4a**) sind allesamt vereinbar mit dem hypothetischen Reaktionsmechanismus in Schema 2. Die Konformation des Substrat-



- [1] C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 9712–9714; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9540–9541.
- [2] a) G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, 296, 1459–1462; b) B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, 296, 1462–1466; c) J. A. Soares, L. Zhang, R. L. Pitsch, N. M. Kleinholz, R. B. Jones, J. J. Wolff, J. Amster, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 36962–36969.
- [3] a) A. Mahapatra, A. Patel, J. A. Soares, R. C. Larue, J. K. Zhang, W. W. Metcalf, J. A. Krzycki, *Mol. Microbiol.* **2006**, 59, 56–66; b) 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; c) C. Polycarpo, A. Ambrogelly, A. Berube, S. M. Winbush, J. A. McCloskey, P. F. Crain, J. L. Wood, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12450–12454.
- [4] a) M. A. Gaston, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Nature* **2011**, 471, 647–650; b) S. E. Cellitti, W. Ou, H. P. Chiu, J. Grunewald, 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] F. Quitterer, A. List, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1367–1370; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1339–1342.
- [6] F. Quitterer, A. List, P. Beck, A. Bacher, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2012**, 424, 270–282.
- [7] a) E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 4542–4545; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4466–4469; b) M. J. Gattner, M. Vrabel, T. Carell, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 379–381; c) B. H. Geierstanger, W. Ou, S. Cellitti, T. Uno, T. Crossgrove, H. P. Chiu, J. Grunewald, X. Hao, International patent application WO/2010/048582, **2010**; d) P. R. Chen, D. Groff, J. Guo, W. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4052–4055; e) M. G. Hoesl, N. Budisa, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2948–2955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2896–2902.
- [8] D. Turk, Dissertation, Technische Universität München **1992**.

- [9] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2011**, 67, 235–242.
 - [10] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1997**, 53, 240–255.
 - [11] L. Holm, P. Rosenström, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, W545–549.
 - [12] G. Kleiger, D. Eisenberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, 323, 69–76.
 - [13] Die asymmetrische Elementarzelle enthält vier PylD-Moleküle, wovon jedes das Produkt komplexiert. Die r.m.s.d. für C_α zwischen den Untereinheiten liegt unterhalb von 0.2 Å.
 - [14] B. Persson, Y. Kallberg, U. Oppermann, H. Jornvall, *Chem.-Biol. Interact.* **2003**, 143, 271–278.
 - [15] U. Oppermann, C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson, H. Jornvall, *Chem.-Biol. Interact.* **2003**, 143–144, 247–253.
-