

Die bakterielle Methanogenese verläuft radikalisch**

Wolfgang Buckel*

C-P-Lyase · Enzymkatalyse · Konvergente Evolution ·
Radikalreaktionen · Reaktionsmechanismen

Das meiste auf der Erde biologisch produzierte Methan entsteht durch die Decarboxylierung von Acetat sowie aus $\text{CO}_2 + \text{H}_2$, Formiat, Methanol und/oder Methylamin. Diese Prozesse werden von methanogenen Archaeen katalysiert, die in strikt anaeroben Sedimenten, Kläranlagen und im Verdauungstrakt von Tieren leben.^[1] Daher war das Vorkommen von Methan-gesättigtem oxischem Meerwasser ein seit langem ungeklärtes Problem der Biogeochemie. Vor kurzem konnte dieses Problem durch die Entdeckung von Methylphosphonat (Me-P) und die Aufklärung seiner Biosynthese in *Nitrosopumilus maritimus*, einem häufigen Archaeon der offenen See, gelöst werden. Die bekannte Hydrolyse von Me-P durch viele aerob wachsende Bakterien, z. B. *Escherichia coli*, liefert Methan und Phosphat. Obwohl die Chemie der Methylierung von Phosphit zu Me-P und dessen Hydrolyse sehr einfach zu sein scheint, waren die biochemischen Wege bis zur Publikation von drei Arbeiten der Arbeitsgruppen Metcalf und van der Donk im Jahr 2012^[2] sowie der von Raushel in den Jahren 2011 und 2013 unbekannt.^[3]

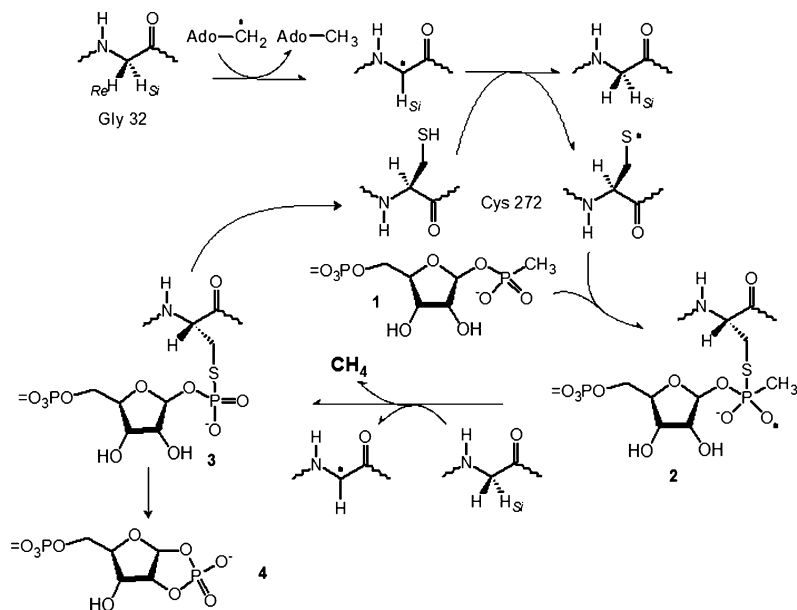
Die natürlich vorkommenden Phosphonate stammen vom Phosphoenolpyruvat (PEP), das zu 3-Phosphonopyruvat isomerisiert. Decarboxylierung führt zu Phosphonoacetaldehyd, der von NADH zu (2-Hydroxyethyl)phosphonat reduziert wird. Die abschließende Spaltung zu Bicarbonat und Me-P wird von einer Fe^{II} -haltigen Dioxygenase katalysiert.^[2] Vor etwa zwanzig Jahren wurde gezeigt, dass Zellsuspensionen von *Escherichia coli* die Umsetzung von chiralen (R)- und (S)-[1- ^2H , 1- ^3H]Ethylphosphonaten zu > 50 % racemischen (R)- und (S)-[1- ^2H , 1- ^3H]Ethanen katalysieren. Dieser Befund wurde mit einem intermediären Ethylradikal erklärt, an das ein H-Atom unter Retention der Konfiguration mit fast der gleichen Geschwindigkeit addiert wird wie die der Drehung des Methylenradikals um die C-C-Bindung.^[4]

Die erste Arbeit der Raushel-Gruppe^[3a] beschreibt die Expression aller 14 Gene des Me-P-Clusters aus *E. coli*; vier davon wurden als inaktive rekombinante Proteine erhalten, die mit Glutathion-S-transferase fusioniert waren, um die Reinigung zu erleichtern und ihre Stabilität und Löslichkeit zu erhöhen. Die Proteine wurden mit möglichen Substraten gemischt, und die Reaktionen wurden mit dem Blutgerinnungsfaktor Xa gestartet. Diese Protease spaltet die Transferasedomäne ab und setzt das aktive Enzym frei. Zunächst reagiert Me-P mit ATP zu Adenin und 5-Triphospho- α -D-ribose-1-Me-P, das anschließend zu Diphosphat und 5-Phosphoribose-1-Me-P (**1**; Schema 1) hydrolysiert. Diese unter physiologischen Bedingungen irreversible Hydrolyse gewährleistet die vollständige Umsetzung des Me-P zum Ribosederivat **1**, das als „aktives Me-P“ bezeichnet werden kann. Die nächste Stufe wird von der eigentlichen C-P-Lyase katalysiert, die mit S-Adenosylmethionin (SAM) und dem Reduktionsmittel Dithionit als Kofaktoren Methan und 5-Phosphoribose-1,2-cyclophosphat (**4**) bildet. **4** hydrolysiert abschließend zu Ribose-1,5-bisphosphat, aus dem ATP resynthetisiert wird. Energetisch gesehen ist diese Methanogenese sehr kostspielig, da sie pro mol Methan 3 ATP, 1 PEP und 1 NADH verbraucht. Im Unterschied dazu ist die anaerobe Methanogenese ein exergonischer Prozess, der ATP für das Wachstum der Zellen liefert.^[1] Diese Überlegung wirft die Frage nach der biologischen Rolle des Me-P auf. Metcalf et al. fanden es mit Kohlehydraten der Zellwände von *N. maritimus* verestert. Der Abbau der Zellwände liefert Phosphat, einen wichtigen Nährstoff im oligotrophen Meereswasser.^[2]

Der Bedarf von katalytischen Mengen an SAM und Dithionit für die Aktivität der C-P-Lyase lässt auf ein Glycylradikalenzym schließen. Zu dieser Familie gehören sechs Enzyme, die je ein Glycylradikal in ihrer Polypeptidkette enthalten. Bei Zugabe des Substrats oxidiert das Glycylradikal einen Cysteinrest zum Thiylradikal, dem Katalysator der Radikalreaktion, z. B. die Spaltung von Pyruvat mit Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA und Formiat.^[5] Andere Glycylradikalenzyme katalysieren die Reduktion von Ribonucleotiden zu 2'-Desoxyribonucleotiden,^[6] die Decarboxylierung von 4-Hydroxyphenylacetat,^[7] die Dehydratisierung von Glycerin^[8] und die Addition von Fumarat an Toluol^[9] oder Alkane.^[10] Das Glycylradikal wird durch die Wirkung einer spezifischen Aktivase erzeugt, die einen $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster enthält, der von drei Cysteinresten in einem konservierten Sequenzmotiv $\text{CX}_3\text{CX}_2\text{C}$ (C = Cystein, X = beliebige Aminosäure) koordiniert wird. Dieses Motiv ist in tausenden SAM-Radikalenzymen gefunden worden. Nach Bindung von

[*] Prof. Dr. W. Buckel
Fachbereich Biologie – Mikrobiologie und Synmikro –
Philipps-Universität
35032 Marburg (Deutschland)
und
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)
E-Mail: buckel@biologie.uni-marburg.de
Homepage: <http://www.uni-marburg.de/fb17/fachgebiete/mikro-bio/mikrobiochem>

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und Synmikro Marburg unterstützt. Dank gilt Prof. Dr. R. K. Thauer für hilfreiche Diskussionen.



Schema 1. Möglicher Mechanismus der C-P-Lyase (aus Lit. [3a]). Ado-CH₃ = 5'-Desoxyadenosin. Das Glycylradikal, das in der Reaktion **2**→**3** gebildet wird, leitet den nächsten Umsatz ein.

SAM an das vierte Eisenzentrum des reduzierten [4Fe-4S]⁺-Clusters wird ein Elektron vom Cluster an das Sulfonium übertragen, wodurch das Molekül in Methionin und ein 5'-Desoxyadenosylradikal (Ado-CH₂•) fragmentiert. Dieses Radikal abstrahiert den Si-Wasserstoffatom des spezifischen Glycinrests, wobei 5'-Desoxyadenosin (Ado-CH₃) und das aktive Glycylradikalenzym entstehen, das in Abwesenheit von Sauerstoff eine unbeschränkte Zahl von Umsetzungen katalysieren kann.

Die C-P-Lyase enthält vier konservierte Cysteinreste, die aber nicht in das oben genannte Sequenzmotiv passen.^[3b] Ortsspezifische Mutagenese jedes einzelnen Cysteinrests zu Alanin ergab, dass drei der Cysteinreste einen $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster koordinieren, während der vierte, Cys272, eine katalytische Funktion hat. Wie beim Aktivator der klassischen Glycylradikalenzyme fragmentiert SAM zu Methionin und Ado-CH_2^{\cdot} , das das *Re*-Wasserstoffatom von Gly32 desselben Proteinmoleküls abstrahiert (Schema 1). Dies wurde durch Wachstum des C-P-Lyase produzierenden *E.-coli*-Stammes auf 20 mM (*R*)-[2- $^2\text{H}_1$]Glycin gezeigt. Das gebildete Glycylradikal oxidiert Cys272 zum Thiylradikal, welches den Phosphonat-P-Atom des 5-Phosphoribose-1-Me-P (**1**) unter Bildung eines kovalent gebundenen Thiophosphonatr radikals **2** angreift. Die Fragmentierung dieses Radikals zu 5-Phosphoribose-1-thiophosphat (**3**) erzeugt ein Methylradikal, das umgehend das *Si*-Wasserstoffatom von Gly32 einfängt und so Methan unter Retention der Konfiguration liefert. Ein intramolekularer Angriff der 2-OH-Gruppe von 5-Phosphoribose-1-thiophosphat am Thiophosphat entlässt das Produkt 5-Phosphoribose-1,2-cyclophosphat (**4**) vom Enzym. Der jetzt freie Thiolrest von Cys272 kann zusammen mit dem Glycylradikal einen neuen Umsatz (turnover) starten, ohne ein weiteres SAM zu beanspruchen. Mit dem „mutierten“ Substrat 5-Phospho-2-desoxyribose-1-Me-P konnte die Thio-

phosphat-Zwischenstufe abgefangen und identifiziert werden.^[3b]

Dieser neue Mechanismus beginnt so wie bei der Pyruvat-Formiat-Lyase, in der der Glycinrest nur das Radikal speichert und nach Bildung des Thylradikals die Katalyse als Zuschauer betrachtet. Dagegen spielt hier das Thylradikal nicht nur die Rolle des Radikalstarters, sondern partizipiert in der kovalenten Katalyse, während derselbe Glycinrest das vierte H-Atom des Methans liefert. Beide Funktionen werden getrennt von den *Re*- und *Si*-Wasserstoffatomen von Gly32 ausgeführt. So abstrahiert Ado-CH_2^\bullet das *Re*-Wasserstoffatom von vorne (Schema 1), und wenn nun Cys272 sein H-Atom von derselben Seite addiert, muss sich das Methylradikal von der Rückseite nähern. Damit werden Glycylradikal- und Methanbildung durch einen Winkel von ca. 109° voneinander getrennt.^[3b]

Der Mechanismus der C-P-Lyase liefert ein schönes Beispiel für eine konvergente Evolution. Es besteht keine Sequenzähnlichkeit zwischen der C-P-Lyase und der Pyruvat-Formiat-Lyase + Aktivator. Somit haben beide Lyasen sehr wahrscheinlich keinen gemeinsamen Ursprung, sondern nutzen nur das gleiche Glycylradikal, das durch den captodativen Effekt stabilisiert wird. Überraschenderweise ist die C-P-Lyase mit dem komplizierteren Mechanismus ein viel kleineres Protein (281 Aminosäuren) als die Pyruvat-Formiat-Lyase (810) + Aktivator (308).

Eingegangen am 28. Mai 2013
Online veröffentlicht am 11. Juli 2013

- [1] R. K. Thauer, A. K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel, R. Hedderich, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 579–591.

- [2] W. W. Metcalf, B. M. Griffin, R. M. Cicchillo, J. Gao, S. C. Janga, H. A. Cooke, B. T. Circello, B. S. Evans, W. Martens-Habben, D. A. Stahl, W. A. van der Donk, *Science* **2012**, 337, 1104–1107.
- [3] a) S. S. Kamat, H. J. Williams, F. M. Raushel, *Nature* **2011**, 480, 570–573; b) S. S. Kamat, H. J. Williams, L. J. Dangott, M. Chakrabarti, F. M. Raushel, *Nature* **2013**, 497, 132–136.
- [4] Y. H. Ahn, Q. Z. Ye, H. J. Cho, C. T. Walsh, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7953–7954.
- [5] M. Frey, M. Rothe, A. F. Wagner, J. Knappe, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12432–12437.
- [6] E. Mulliez, M. Fontecave, J. Gaillard, P. Reichard, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 2296–2299.
- [7] B. M. Martins, M. Blaser, M. Feliks, G. M. Ullmann, W. Buckel, T. Selmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14666–14674.
- [8] J. R. O'Brien, C. Raynaud, C. Croux, L. Girbal, P. Soucaille, W. N. Lanzilotta, *Biochemistry* **2004**, 43, 4635–4645.
- [9] B. Leuthner, C. Leutwein, H. Schulz, P. Horth, W. Haehnel, E. Schiltz, H. Schägger, J. Heider, *Mol. Microbiol.* **1998**, 28, 615–628.
- [10] R. Jarling, M. Sadeghi, M. Drozdowska, S. Lahme, W. Buckel, R. Rabus, F. Widdel, B. T. Golding, H. Wilkes, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1362–1366; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1334–1338.

Stellenanzeige



SciTec Career

...the ultimate global JobMachine
for scientists and engineers.

www.scitec-career.com

Online vacancies worldwide
in physics, chemistry, chemical engineering,
construction engineering,
materials science and life sciences.

WILEY-VCH



GROUP LEADER POSITION IN CHEMICAL BIOLOGY AT THE CURIE INSTITUTE IN PARIS

The Curie Institute (<http://www.curie.fr>) is a world-class multidisciplinary cancer research center. With the creation of a research unit on Chemical Biology in January 2014, opportunities arise to develop novel programs related to small molecules as discovery tools (chemical genetics), medicinal chemistry, targeted therapies, especially in relation with biological membranes and/or signal transduction. Applications are open for a group leader position from outstanding organic or medicinal chemists who are involved in these areas of research.

A complete description of the offer can be downloaded at http://xfer.curie.fr/get/akIHxnoermZ/Call_Chemical%20biology_Institut%20Curie.pdf

Contact: ludger.johannes@curie.fr

Deadline for applications: September 15, 2013
Short-listed candidates will be invited to the Curie Institute at the beginning of October 2013