

Flavoenzym-katalysierte Bildung von Disulfidbrücken in Naturstoffen**

Daniel H. Scharf, Michael Groll, Andreas Habel, Thorsten Heinekamp, Christian Hertweck,
Axel A. Brakhage und Eva M. Huber*

Abstract: Die Natur hält Verbindungen verschiedenster chemischer Struktur und biologischer Aktivität bereit, darunter schwefelhaltige Substanzen aus Bakterien und Pilzen. Einige dieser Stoffe enthalten ein Disulfid, das unabdingbar für ihre Bioaktivität ist. Spezielle Oxidoreduktasen wie GliT, HlmI und DepH katalysieren die Bildung dieses Disulfids im Virulenzfaktor Gliotoxin, dem Antibiotikum Holomycin bzw. dem Krebsmedikament Romidepsin. Alle drei Enzyme wurden mithilfe von Röntgenstrukturanalyse und Aktivitätstests untersucht. Trotz ihrer unterschiedlich großen Substrataschen und ihrer verschiedenen Spezifitäten wird ein gemeinsamer Reaktionsmechanismus postuliert. Dieser basiert auf den erhaltenen Kristallstrukturen und wird durch Mutageneseexperimente gestützt.

Disulfidbrücken sind hauptsächlich als Strukturmotive in Peptiden und Proteinen bekannt, verleihen aber auch verschiedenen komplex aufgebauten Naturstoffen besondere biologische Eigenschaften. Dazu zählen z.B. das von *Streptomyces clavuligerus* produzierte Breitbandantibiotikum Holomycin (**1**; Schema 1), das für Krebsbehandlungen zugelassene Depsipeptid Romidepsin (**2**) aus *Chromobacterium violaceum* sowie das vom humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* produzierte Gliotoxin (**3**). Gliotoxin steht im Verdacht, die Entstehung der invasiven Aspergillose zu fördern, einer häufigen Todesursache bei Personen mit geschwächtem Immunsystem.^[1] Gliotoxin ist das bekannteste Mitglied der

Epipolythiodioxopiperazin-Verbindungen (ETPs). Deren Toxizität beruht auf ihrer reaktiven Epidithiogruppe,^[2] die durch Bindung an essenzielle Thiole andere Proteine inaktiviert, das intrazelluläre Redoxgleichgewicht stört und reaktive Sauerstoffspezies generiert.^[3]

In den letzten Jahren wurde der Biosyntheseweg von **3** gentechnisch und biochemisch untersucht.^[4] Addition von Glutathion (GSH)^[5] an das Diketopiperazingrundgerüst^[6] und anschließender Abbau des GSH führen zur freien Di-thiol-Vorstufe (**4**).^[7] Schlussendlich oxidiert GliT, eine Flavinadenindinukleotid(FAD)-abhängige Oxidoreduktase, **4** zum disulfidverbrückten Gliotoxin (**3**). Diese Reaktion ist essenziell für die Resistenz des Pilzes gegenüber seinem eigenen Gift.^[8] Die Vermutung liegt nahe, dass GliT-ähnliche Enzyme den letzten Schritt der Biosynthese aller ETPs katalysieren.^[8a]

Oxidoreduktasen, die eng mit GliT verwandt sind, wurden in Bakterien^[9] und Pilzen gefunden. Sie werden in drei verschiedene Stämme, die jeweils nach ihren Prototypen TrxR, DepH und HlmI benannt sind, unterteilt (Abbildung S1A der Hintergrundinformationen). Die TrxR-Familie ist für die intrazelluläre Redoxregulation wichtig,^[10] wohingegen die HlmI- und DepH-Klassen putativ bakterielle Sekundärmetabolite oxidieren (Schema 1). So ist HlmI an der Biosynthese von **1** beteiligt,^[9a] und DepH bildet die Disulfidbrücke in **2**.^[9b] Allen vier Klassen von Oxidoreduktasen ist das katalytisch aktive Cys-X-X-Cys-Motiv gemeinsam, jedoch sind ihre Substratspezifitäten sehr verschieden. Um die Unterschiede zwischen diesen Enzymfamilien näher zu untersuchen und Einblicke in ihre Reaktionsmechanismen zu erhalten, bestimmten wir die Kristallstrukturen von GliT aus *A. fumigatus* (1.9 Å; R_{free} 22.2 %) sowie die der beiden nahe verwandten bakteriellen Oxidoreduktasen HlmI aus *S. clavuligerus* (1.6 Å; R_{free} 15.9 %) und DepH von *C. violaceum* (1.9 Å; R_{free} 19.9 %; Tabelle S1 der Hintergrundinformationen). Alle drei Enzyme sind Homodimere, haben pro Monomer ein FAD-Molekül gebunden und weisen die für Thioredoxinreduktasen typische Faltung auf [$\text{rmsd} \text{C}_{\alpha}(\text{HlmI}/\text{DepH}/\text{GliT}) < 2.2 \text{ \AA}$; $\text{rmsd} \text{C}_{\alpha}(\text{HlmI}/\text{DepH}/\text{GliT}/\text{TrxR}) < 6.6 \text{ \AA}$; Abbildung 1A; Abbildungen S2 und S3 sowie Tabelle S2 der Hintergrundinformationen; $\text{rmsd} = \text{Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung}$].^[11] Jede Untereinheit besteht aus einer FAD- und einer Nicotinamidadenindinukleotidphosphat(NADP⁺/NADPH)-bindenden Domäne, die die β - α - β - α - β -Rossman-Faltung annehmen und über ein antiparalleles β -Faltblatt verknüpft sind. Auf Primärsequenzebene wird die FAD-Erkennungsstelle durch die NADP⁺/NADPH-Domäne zweigeteilt (Abbildung S1B der Hintergrundinformationen). Die FAD-bindende Domäne, besonders die Helices H1, H2

[*] Prof. Dr. M. Groll, Dr. E. M. Huber

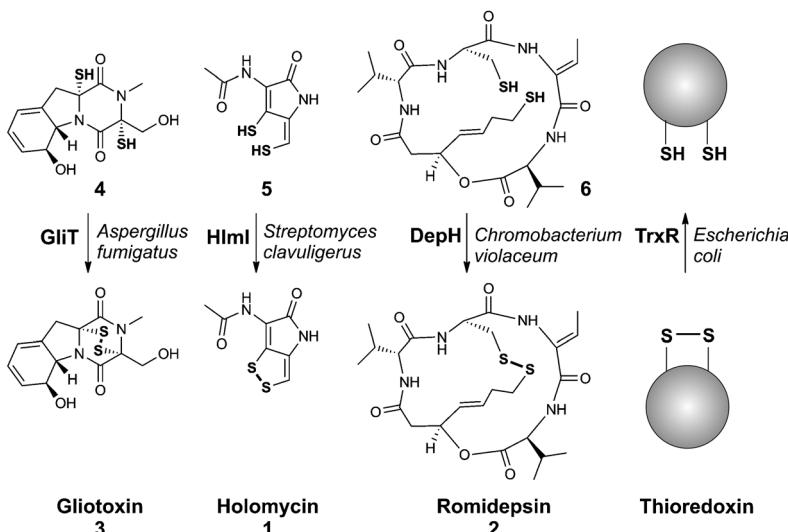
Center for Integrated Protein Science am Department Chemie,
Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: eva.huber@mytum.de

Dr. D. H. Scharf, Dr. A. Habel, Dr. T. Heinekamp,
Prof. Dr. C. Hertweck, Prof. Dr. A. A. Brakhage

Departments of Molecular and Applied Microbiology and Biomolecular Chemistry, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, HKI, und Friedrich-Schiller-Universität Jena
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)

[**] Wir danken M. Gersch und Prof. Dr. S. A. Sieber (TUM) für MS-Messungen, S. Fricke und C. Schult (HKI) für technische sowie P. Hortschansky für fachliche Unterstützung. Den Mitarbeitern der Beamline X06SA des Paul Scherrer Instituts, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) danken wir für die Hilfestellung beim Messen der Datensätze. Diese Arbeit wurde vom „Pakt für Forschung und Innovation“ des Freistaats Thüringen und des BMBF sowie der International Leibniz Research School for Biomolecular and Microbial Interactions (ILRS) als Teil der Exzellenz-Graduiertenschule Jena School for Microbial Communication gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309302> zu finden.



Schema 1. Spezielle Oxidasen bilden transannulare Disulfidbrücken in Sekundärmetaboliten von Pilzen und Bakterien. Die strukturell verwandte bakterielle TrxR katalysiert die Reduktion einer Disulfidbrücke in Thioredoxin.

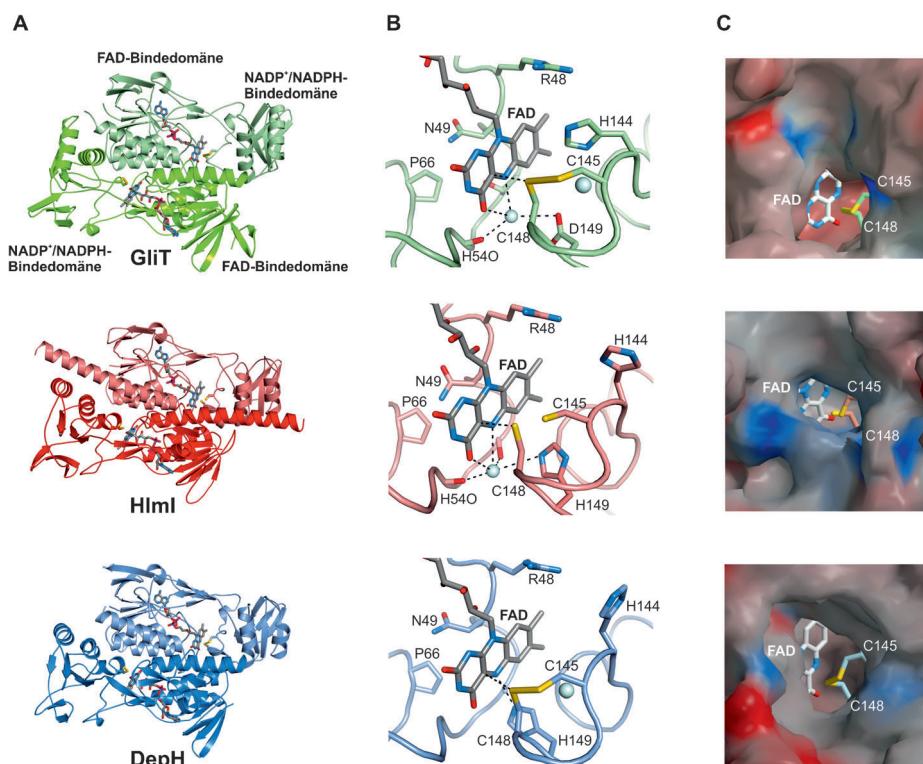


Abbildung 1. Röntgenstrukturen von GliT, HlmI und DepH. A) Bändermodelle der Enzyme mit ihrem FAD-Kofaktor und den katalytischen Cysteinresten als Stabmodelle. B) Das aktive Zentrum: Die Amidosäuren (außer Thr/Ser/Ala52) sind gemäß dem Sequenz-Alignment in Abbildung S1B der Hintergrundinformationen beschriftet. Wassermoleküle sind als hellblaue Kalotten dargestellt; schwarz gezeichnete Linien deuten für die Katalyse wichtige Interaktionen/Abstände an. In GliT und HlmI fungiert ein Wassermolekül nahe dem N5-Atom des FAD als Protonendonator (Abstand: 2.9–3.3 Å); in DepH übernimmt His149 diese Aufgabe (Abstand: 3.0 Å). Das Wassermolekül nahe Cys145 in GliT und DepH wird durch den Helixdipol H4 des CXXC-Motivs ausgerichtet und ist in HlmI durch GSH ersetzt (Abbildung S5 der Hintergrundinformationen). Der Abstand zwischen dem Elektronendonator Cys148S und dem Elektronenakzeptor, dem C4^a-Atom des FAD, ist im GSH-gebundenen HlmI kleiner (3.1 Å) als in den Apostrukturen GliT und DepH (3.4 Å). C) Connolly-Oberflächen der Substratbindetaschen aller drei Enzyme verdeutlichen deren unterschiedliche Größe. Positive und negative elektrostatische Potentiale sind von -30 kT^{-1} (rot) bis 30 kT^{-1} (blau) konturiert. Die katalytischen Cysteinreste und der Kofaktor waren nicht Teil der Oberflächenberechnung.

und ihre verbindende Schleife bilden die Be- rührungsfläche der Monomere, die $2200\text{--}2750 \text{ \AA}^2$ beträgt. Im Unterschied zu DepH^[9b] sind die NADP⁺/NADPH-Bindestellen von GliT und HlmI vermutlich nicht funktionell, da beide Enzyme O₂ anstelle von NADP⁺ als Ko- substrat und terminalen Elektronenakzeptor nutzen.^[8a,9a] In den NADP⁺/NADPH-Bindedomänen befindet sich auch das konservierte Cys145-X-X-Cys148-Motiv (CXXC; Nummerierung gemäß Abbildung S1B der Hintergrundinformationen), ein Merkmal zahlreicher Oxidoreduktasen.^[11] Die Connolly-Oberflächen verdeutlichen, dass sich die katalytisch aktiven Cysteinreste in jeder der beiden Proteinuntereinheiten am Boden einer ausgeprägten, von beiden Monomeren gebildeten Substratbinde tasche befinden (Abbildung 1 A,C). Analog zu DepH und HlmI^[9] zeigen unsere Aktivitätsstu dien mit GliT-Mutanten, dass beide katalytisch aktiven Cysteinreste unabdingbar für die enzymatische Aktivität in vitro sind (Abbildung 2 A). Darüber hinaus sind *A. fumigatus*-Stämme mit Mutationen in der CXXC-Box empfindlicher gegenüber Gliotoxin, ähnlich dem ΔgliT - Knockout-Stamm (Abbildung 2 C). Somit ist dieses Motiv ausschlaggebend für die GliT-ver mittelte Selbstresistenz gegenüber Gliotoxin. Die helikale Ausrichtung der CXXC-Box ermöglicht die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys145 und Cys148. Wie in TrxR sind die reaktiven Cy steinreste von GliT, HlmI und DepH der Re-Seite des Isoalloxazinrings zugewandt. In GliT, HlmI und DepH befindet sich die Bin dung jedoch senkrecht zum Flavin. Diese Orientierung des katalytischen Disulfids ähnelt den Glutathionreduktasen,^[12] steht aber im Gegensatz zur eher parallelen Ausrichtung in TrxR (Abbildung S2C der Hintergrundinfor mationen).^[11] Wegen der Nähe zum C4^a-Atom der prosthetischen Gruppe (3.1–3.5 Å) wird ange nommen, dass Cys148 den Elektronentransfer auf den FAD-Ko faktor während der Katalyse ver mittelt, wohingegen Cys145, das distal zum FAD liegt (5.3–5.8 Å), ein gemischtes Disulfid mit dem Substrat bildet. Eine solch unter schiedliche Reaktivität der katalytischen Cysteinreste wurde bereits

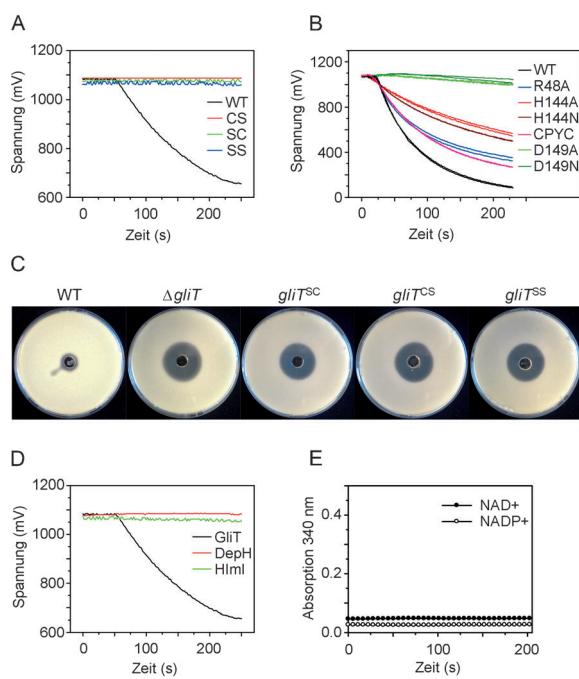


Abbildung 2. Biochemische Analyse von GliT, HmlI und DepH.
 A) Wildtyp(WT)-GliT oxidiert **4** unter Verbrauch von O_2 ; Mutationen im CXXC-Motiv verhindern die enzymatische Aktivität. B) Substratumsatz verschiedener GliT-Mutanten; unter anderem wurde das CLFC-Motiv durch die CPYC-Box von HmlI und DepH ersetzt. C) *A. fumigatus* ist deutlich empfindlicher für **3**, wenn GliT fehlt oder aufgrund von Mutationen nicht funktionell ist. D) O_2 -Verbrauchs-Messungen zeigen, dass **4** von GliT, nicht aber von HmlI und DepH umgesetzt wird. E) DepH konvertiert **4** auch nicht in Gegenwart von NAD^+ oder $NADP^+$.

für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase, die E3-Komponente des Pyruvatedehydrogenasekomplexes, beschrieben.^[13]

Die Kristallstrukturen von GliT, HmlI and DepH ermöglichen es, einen Reaktionsmechanismus für die Thiol-oxidation in Naturstoffen analog dem für die Disulfidbrückenbildung in Proteinen^[14] zu postulieren (Abbildung 3): Deprotonierung einer der beiden Thiolgruppen im Substrat führt zur Bildung eines reaktiven, nukleophilen Thiolats, das die katalytische Disulfidbrücke des Enzyms angreift. Dabei wird das Substrat kovalent mit Cys145 der Oxidoreduktase verknüpft, und an Cys148 entsteht ein Thiolat. Dieses wiederum bildet einen vorübergehenden Charge-Transfer-Komplex mit dem C4^a-Atom des elektronenarmen oxidierten FAD. Die resultierende negative Ladung am N5-Atom des Flavins wird durch ein Proton von His149 (DepH) oder einem benachbarten Wassermolekül, das von Asp149OD2/His149NE2, His54O und dem O4- sowie dem N5-Atom des FAD vororientiert ist, neutralisiert (GliT/HmlI; Abbildungen 1B und 3; Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Ebenso wie in TrxR^[11] verhindert die Mutation der Asparaginsäure 149 zu Asn oder Ala jegliche Aktivität von GliT (Abbildung 2B). Dies lässt vermuten, dass die Asparaginsäure 149 das N5-Atom des Kofaktors über das oben genannte Wassermolekül protoniert und aktiviert. Zusätzlich verstärkt der positive N-terminale Helixdipol H8, der direkt auf das O2-Atom des FAD zeigt, dessen elektronenziehende Wirkung.^[11,15]

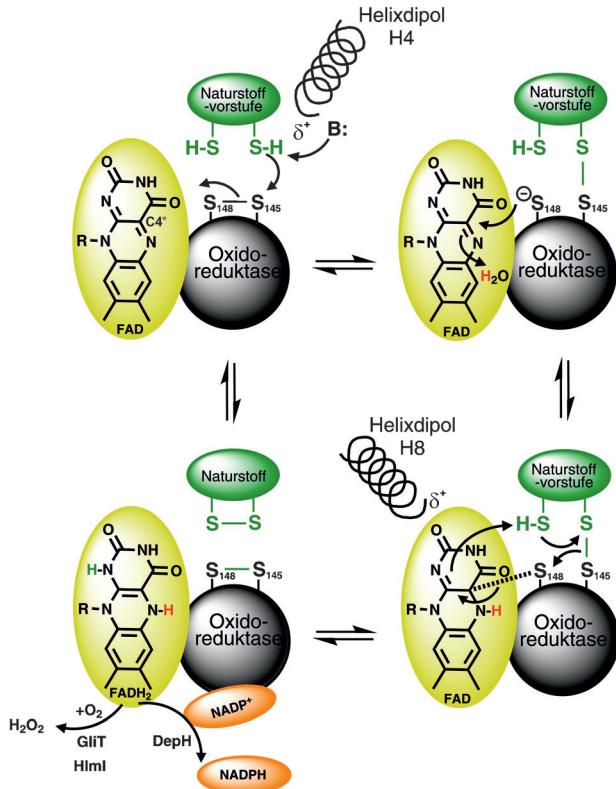


Abbildung 3. Postulierter Reaktionsmechanismus für die Oxidation von **4–6** durch die Oxidoreduktasen GliT, HmlI und DepH.

Durch den Übertrag eines zweiten Elektrons von Cys148SG auf FADH übernimmt das N1-Atom der prosthetischen Gruppe das Proton der zweiten Thiolgruppe des Substrats. In einer konzertierten Kaskade von Elektronenpaarverschiebungen bildet sich der Disulfid-verbrückte Naturstoff, und der oxidierte Zustand der CXXC-Box wird wieder hergestellt. Im letzten Reaktionsschritt nutzen GliT und HmlI ihre gewonnenen reduktiven Äquivalente, um aus O_2 Wasserstoffperoxid zu produzieren.^[8a,9a] Im Unterschied dazu werden die im FADH₂ von DepH gespeicherten Elektronen auf $NADP^+$ übertragen.^[9b] Die Reduktion von $NADP^+$ bedingt vermutlich Strukturveränderungen wie in TrxR.^[11,16]

Die Substratbindung an GliT, HmlI und DepH könnte sowohl Arg48 als auch His144 involvieren. Bemerkenswerterweise ist die Orientierung von Arg48 in allen drei Enzymen identisch, und die Mutation zu Ala vermindert die Aktivität von GliT. His144 nimmt verschiedene Konformationen in GliT, HmlI und DepH ein, und ein Ersatz durch Ala oder Asn beeinträchtigt die katalytische Aktivität stark (Abbildungen 1B und 2B). Die anfängliche Deprotonierung des Substrats wird vermutlich von His144 sowie dem positiv geladenen N-terminalen Dipol der CXXC-Helix H4 durchgeführt (Abbildung 3). Ein Wassermolekül, das die Mitte des Helixendes in den GliT- und DepH-Apostrukturen besetzt, deutet die Relevanz dieses Helixdipols an (Abbildung 1B). Das aktive Zentrum von HmlI zeigt eine starke zusätzliche positive Elektronendichte, die im Einklang mit massenspektrometrischen Messungen als kovalent an Cys145 gebundenes

GSH-Molekül interpretiert wurde (Abbildungen S4 und S5 der Hintergrundinformationen). Da der Ligand in der 2Fo–Fc-Dichte nur schlecht definiert ist, wurde der Besetzungsanteil auf 0.5 gesetzt. Bemerkenswerterweise nimmt die Thiolgruppe von GSH die Position des Wassermoleküls in GliT und DepH ein und ist optimal entlang dem positiv geladenen Dipol der H4-Helix ausgerichtet. Diese Anordnung erleichtert die initiale Deprotonierung des Substrats durch Absenkung des pK_a -Werts und stabilisiert die negative Ladung für den anschließenden nukleophilen Angriff auf das aktive Zentrum des Enzyms. Im Unterschied zu natürlichen Substraten fehlt GSH die zweite Thiolgruppe, die nötig ist, um den Enzym-Ligand-Komplex zu lösen. Folglich ist die negative Ladung an Cys148 gefangen, und der Abstand zwischen Cys148SG und C4^a des FAD im GSH-gebundenen HlmI (3.1 Å) ist kleiner als in den Aposstrukturen GliT und DepH (3.4 Å; Abbildung 1B; Abbildung S5 der Hintergrundinformationen).

Auch wenn GliT, HlmI und DepH identische Mechanismen für die Oxidation von Thiolen nutzen, unterscheiden sich ihre Substrattaschen und -spezifitäten doch deutlich voneinander (Abbildung 1C). Die Größen der natürlichen Substrate **5** und **6** sind in Einklang mit dem engen aktiven Zentrum von HlmI bzw. dem geräumigeren von DepH. Die im Vergleich mit **4** jedoch relativ große Tasche von GliT könnte eine breitere Substratspezifität vermitteln. So wurde gezeigt, dass GliT mit **5** kreuzreagiert,^[9a] was das Enzym reizvoll für Protein-Engineering-Versuche macht. Im Unterschied dazu wird **4** nur von GliT umgesetzt (Abbildung 2D,E), da es möglicherweise nicht in HlmI passt und in DepH nicht geeignet stabilisiert werden kann.

Die Disulfid-bildenden Flavoenzyme GliT, HlmI und DepH sind Teil höchst unterschiedlicher Biosynthesewege aus verschiedenen Mikroben. Trotz der deutlichen Diskrepanzen in ihrer Substratspezifität weisen sie einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus auf. Diese Tatsache könnte dazu genutzt werden, Oxidoreduktasen für bestimmte biokatalytische Anwendungen zu optimieren. Zudem bilden die hier dargestellten Kristallstrukturen den Grundstein für die Untersuchung von GliT aus *A. fumigatus* als neues Angriffsziel zur Behandlung der invasiven Aspergillose und fördern die Entwicklung selektiver Inhibitoren für diesen Typ von Oxidoreduktasen.

Eingegangen am 24. Oktober 2013
Online veröffentlicht am 20. Januar 2014

Stichwörter: Disulfidbrücken · Enzymkatalyse · Naturstoffe · Oxidoreduktasen · Schwefel

- [1] T. R. Dagenais, N. P. Keller, *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, 22, 447–465.
- [2] K. J. Kwon-Chung, J. A. Sugui, *Med. Mycol.* **2009**, 47, Suppl. 1, S97–103.
- [3] D. M. Gardiner, P. Waring, B. J. Howlett, *Microbiology* **2005**, 151, 1021–1032.
- [4] D. H. Scharf, T. Heinekamp, N. Remme, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93, 467–472.
- [5] a) C. J. Balibar, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2006**, 45, 15029–15038; b) R. A. Cramer, Jr., M. P. Gamsik, R. M. Brooking, L. K. Najvar, W. R. Kirkpatrick, T. F. Patterson, C. J. Balibar, J. R. Graybill, J. R. Perfect, S. N. Abraham, W. J. Steinbach, *Eukaryotic Cell* **2006**, 5, 972–980.
- [6] D. H. Scharf, N. Remme, A. Habel, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 12322–12325.
- [7] a) D. H. Scharf, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, M. Roth, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 10211–10215; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10064–10068; b) D. H. Scharf, P. Chankhamjon, K. Scherlach, T. Heinekamp, K. Willing, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 11298–11301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11092–11095.
- [8] a) D. H. Scharf, N. Remme, T. Heinekamp, P. Hortschansky, A. A. Brakhage, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10136–10141; b) M. Schrett, S. Carberry, K. Kavanagh, H. Haas, G. W. Jones, J. O'Brien, A. Nolan, J. Stephens, O. Fenelon, S. Doyle, *PLoS Pathog.* **2010**, 6, e1000952.
- [9] a) B. Li, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2011**, 50, 4615–4622; b) C. Wang, S. R. Wesener, H. Zhang, Y. Q. Cheng, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 585–593.
- [10] D. Mustacich, G. Powis, *Biochem. J.* **2000**, 346 Pt 1, 1–8.
- [11] G. Waksman, T. S. Krishna, C. H. Williams, Jr., J. Kurian, *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 800–816.
- [12] P. A. Karplus, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1987**, 195, 701–729.
- [13] C. Thorpe, C. H. Williams, Jr., *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 3553–3557.
- [14] a) E. J. Heckler, P. C. Rancy, V. K. Kodali, C. Thorpe, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2008**, 1783, 567–577; b) C. Thorpe, K. L. Hooper, S. Raje, N. M. Glynn, J. Burnside, G. K. Turi, D. L. Coppock, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 405, 1–12.
- [15] A. Mattevi, A. J. Schierbeek, W. G. Hol, *J. Mol. Biol.* **1991**, 220, 975–994.
- [16] B. W. Lennon, C. H. Williams, Jr., M. L. Ludwig, *Science* **2000**, 289, 1190–1194.