

Pyrrolysinanaloge

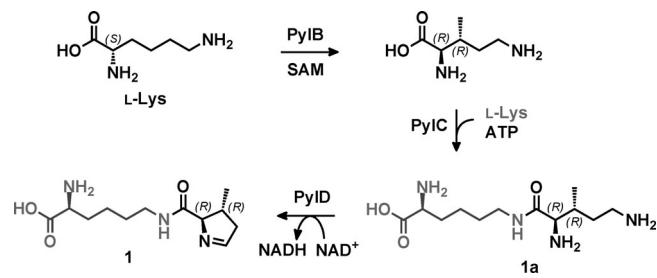
Pyrrolysin-Synthase (PyLD) katalysiert die Bildung von Pyrrolin- und Tetrahydropyridinringen in Aminosäuren**

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

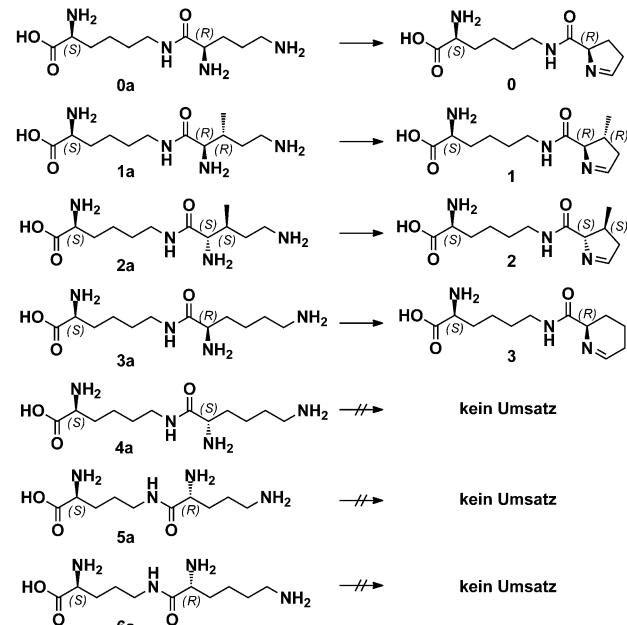
Abstract: Die Dehydrogenase PyLD katalysiert den letzten Schritt der Pyrrolysin-Biosynthese, indem sie das Isopeptid L-Lysin-Nε-3R-Methyl-D-ornithin zur zweiundzwanzigsten proteinogenen Aminosäure umsetzt. Hier zeigen wir, wie PyLD für die oxidative Umwandlung verschiedener Isopeptide zu neuen Aminosäuren genutzt werden kann. Die Kombination von chemischer Synthese, Enzymkinetik und Röntgenkristallographie ermöglicht eine genaue Beschreibung der Reaktionsfolge für PyLD zur Synthese von Pyrrolin- und Tetrahydropyridinringen als Bestandteile von Pyrrolysin-Analoga.

Pyrrolysin (**1**) ist die zweiundzwanzigste genetisch kodierte Aminosäure und wird durch die ribosomale Translation eines Amber-Stoppkodons (UAG) in bestimmte Proteine einiger methanogener Archaeen und Bakterien eingebaut, unter anderem auch im Humanpathogen *Bilophila wadsworthia*.^[1] **1** besteht aus einem 4-Methylpyrrolin-5-carboxylat, das über eine Isopeptidbindung an die Nε-Gruppe von L-Lysin gebunden ist.^[1b] Kürzlich veröffentlichte Studien haben gezeigt, dass die Genfolge *pylBCDST*^[2] für die Biosynthese von **1** (Schema 1)^[3] und dessen Einbau in die Proteine MtMB, MtB_B und MtB_T^[4] die am Abbau von Methylaminen beteiligt sind,^[5] verantwortlich ist.

Kristallstrukturen von PyLD im Komplex mit dem Substratanalogon L-Lysin-Nε-D-ornithin (**0a**) und dessen Produkt Pyrrolin-Carboxy-Lysin (**0**) zeigten, dass der C-terminale Lysinteil der Liganden fest verankert im Protein vorliegt, wohingegen der N-terminale Teil die hydrophobe Bindetasche am aktiven Zentrum nur teilweise ausfüllt und von einem Netzwerk aus definierten Wassermolekülen umgeben ist.^[3c] Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Erforschung des Anwendungsspektrums von PyLD, um das



Schema 1. Biosynthese von Pyrrolysin (**1**) ausgehend von zwei L-Lysinmolekülen. C- und N-terminale Segmente von **1a** und **1** sind grau und schwarz dargestellt. SAM = S-Adenosylmethionin.



Schema 2. Isopeptidsubstrate (**0a–6a**) und ihre entsprechenden Produkte (**0–3**).

Enzym für die Oxidation von diversen Isopeptiden zu neuartigen Aminosäuren zu nutzen (Schema 2).

Bislang gibt es keine strukturellen und funktionellen Informationen zu PyLD im Zusammenspiel mit seinem natürlichen Produkt **1**. Somit war die Synthese des Substrats L-Lysin-Nε-3R-Methyl-D-ornithin (**1a**; Abbildung S1 (S: Hintergrundinformationen)) und dessen Charakterisierung ein Ziel der vorliegenden Arbeit. **1a** wurde mit PyLD kokristallisiert und die Komplexstruktur mit einer Auflösung von 2.2 Å bestimmt (Abbildung 1a). Die Elektronendichte zeigt, dass **1a** in **1** in situ umgewandelt wurde. In der Kris-

[*] F. Quitterer,^[+] P. Beck,^[+] Prof. Dr. A. Bacher, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

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

[**] Wir danken den Mitarbeitern der Beamline X06SA am Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source, Villigen (Schweiz), für ihre Hilfe bei der Datensammlung und Katrin Gärtner für ihre hervorragende Mitarbeit. Kinetikmessungen wurden von F.Q. in den Laboratorien (Biological & Organometallic Catalysis (BOC) Laboratories) von Prof. Dr. Jörg Eppinger (King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Saudi-Arabien) durchgeführt. Diese Arbeit wurde von der Hans-Fischer-Gesellschaft, durch Award No. FIC/2010/07 der KAUST sowie von der DFG (Nr. GR1861/7-1) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201402595> zu finden.

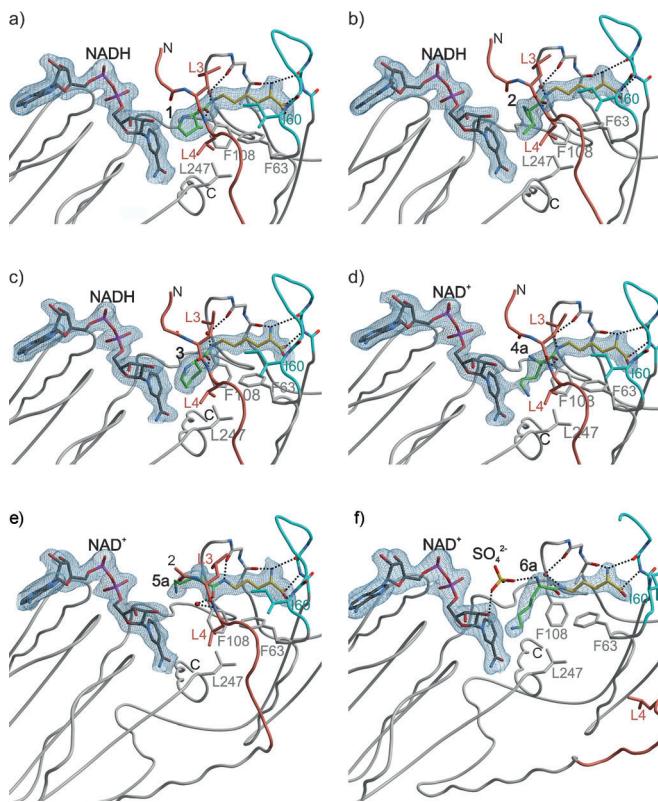


Abbildung 1. Aktives Zentrum von PyLD im Komplex mit a) 1, b) 2, c) 3, d) 4a, e) 5a und f) 6a. Die $2F_c$ -Elektronendichte ist bei 1.0σ konturiert. Der N-Terminus (Aminosäuren 1–11) ist rot und die Schleife, die β -Strang 1 und α -Helix 3 (Aminosäuren 55–59) verbindet, ist blau dargestellt. Die Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums und die Liganden sind als Stabmodelle abgebildet. Rote Kugeln repräsentieren Wassermoleküle. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien hervorgehoben. Die entsprechenden Stereoabbildungen befinden sich in den Hintergrundinformationen (Abbildung S4).

tallstruktur erscheint der L-Lysinteil des Isopeptids eingeschlossen in einem hydrophoben Tunnel, der durch Leu3, Ile60, Phe63 und Ala103 gebildet wird. Die Carboxy- und Aminogruppen des Liganden sind über direkte und indirekte Wasserstoffbrücken mit dem Rückgrat von PyLD verbunden (Details siehe Abbildung S2a). Das Isopeptidmotiv wird durch eine indirekte Wasserstoffbrücke zwischen seiner NH-Gruppe und Asp104O über ein definiertes Wassermolekül stabilisiert, während das Carbonylsauerstoffatom eine Wechselwirkung mit Leu4NH der N-terminalen Schleife eingeht und so die Konformationsänderung des Proteins einleitet.^[3e] Der N-terminale Ausläufer von **1** ist zu NADH hin ausgerichtet, wobei sich C5 des Pyrrolinrings in räumlicher Nähe (4.0 \AA) zu C4 des Koenzym-Pyridinteils befindet. Die 3R-Methylgruppe des Pyrrolinrings geht Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Phe63, Phe108 und Leu247 ein, während der aliphatische Ring durch die Seitenkette von Leu4 stabilisiert wird.

Die Strukturdaten verdeutlichen, dass die verschlossene Bindetasche um den N-terminalen Bereich von **1** einen Hohlraum von etwa 450 \AA^3 bildet. Deshalb waren wir an der Stereospezifität des Enzyms interessiert und synthetisierten das Diastereomer zu **1a**, L-Lysin-Ne-3S-Methyl-L-ornithin

(**2a**), das im Komplex mit PyLD untersucht wurde. Die Elektronendichte der PyLD:**2**-Struktur (Abbildung 1b, 2.2 \AA Auflösung) veranschaulicht die Umsetzung von **2a** zu einem gegenüber **1** gekippten Pyrrolinring in *S,S*-Konfiguration, wobei die 3S-Methylgruppe in Richtung der Seitenkette von Leu4 und des Nicotinamidrings des Koenzyms zeigt (Details siehe Abbildung S2 b).

Angeregt durch das erweiterte Umsatzspektrum von PyLD wurden die substratanalogen Verbindungen L-Lysin-Ne-d-Lysin (**3a**) und L-Lysin-Ne-L-Lysin (**4a**), bei denen die N-terminale Region um eine CH_2 -Einheit verlängert wurde, untersucht. Die PyLD:**3**-Komplexstruktur (Abbildung 1c, 2.2 \AA Auflösung) demonstriert im Fall von **3a** die Umwandlung der d-Lysinseitenkette in einen Tetrahydropyridinring (Abbildung S2c), während der Ringschluss bei **4a** nicht erfolgt. Dies wurde sowohl durch die Kristallstruktur (Abbildung 1d, 2.1 \AA Auflösung) als auch durch kinetische Messungen bestätigt (Tabelle 1). Der Abstand zwischen der freien ϵ' -Aminogruppe von **4a** zu C4 des Koenzyms erscheint optimal als Voraussetzung für einen Hydridübergang (3.3 \AA ; Abbildung S3a). Allerdings lässt eine Analyse der Rotati-

Tabelle 1: Kinetische Parameter für die Umsetzung der PyLD-Substrate. Eine ausführliche Tabelle mit Werten für K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m und v_{max} für **0a** und **1a** befindet sich in den Hintergrundinformationen (Tabelle S2).

Substrat	spez. Aktivität [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	v_0 bei 8 mM [nmol min ⁻¹]	rel. Aktivität bei 8 mM [%]
0a	54.5 ^[3e]	10.2	72
1a	61.6	14.1	100
2a		3.4	24
3a		0.08	0.6
4a		< 0.001	< 0.01
5a		< 0.001	< 0.01
6a		< 0.001	< 0.01

onsfreiheitsgrade der terminalen L-Lysin-Seitenkette darauf schließen, dass nach vorangegangener Oxidation wegen der sterischen Hinderung durch die Seitenwände des aktiven Zentrums kein Ringschluss mehr möglich ist.

Da die C-terminalen Bereiche (einschließlich der Isopeptidbindungen) der Liganden **1a–4a** mit einer Abweichung vom quadratischen Mittel $< 0.35\text{ \AA}$ nahezu perfekt überlappen, war unser nächstes Ziel, deren Einfluss auf die Enzymkatalyse zu analysieren. Dafür wurde L-Ornithin als C-terminale Einheit verwendet, woraus die Verbindungen L-Ornithin-Nδ-d-Ornithin (**5a**) und L-Ornithin-Nδ-d-Lysin (**6a**) resultierten. Interessanterweise zeigten die Kristallstrukturen von PyLD:**5a** und PyLD:**6a** (Abbildung 1e,f, 2.2 \AA Auflösung), dass die entsprechende Verbindung im aktiven Zentrum gebunden wurde und dass die treibende Kraft hinter der Ligandbindung die Koordinierung der Carboxy- und Aminogruppen des C-Terminus durch das Protein ist. Da die C-terminale Region dieser Analoga die gleiche Position wie in den vorherigen Beispielen einnimmt, ändert das Isopeptidmotiv seine Position, Orientierung und Koordinierungsphäre (Abbildung S3b,c). Dies geht direkt mit Konformationsänderungen der Amidsubstituenten einher und führt im Fall von **5a** zu einem ungünstigen Abstand (6.3 \AA) zwischen

der δ' -Aminogruppe und NAD^+ , was die fehlende Umsetzung erklärt.

Alle bislang untersuchten PyLD-Komplexstrukturen wiesen ausschließlich die geschlossene Konformation auf. Daher war es überraschend, dass **6a** gut definiert in der Elektronendichte zu sehen ist, obwohl das Enzym im offenen Zustand vorliegt. Ähnlich wie in der PyLD:holo-Struktur^[3e] verschließen die N-terminalen Reste (Aminosäuren 1–11) nicht das aktive Zentrum, sondern verlängern die Helix. Darüber hinaus sind die Reste 55–59 in einer Schleife, welche die Carboxy- und Aminogruppen des C-terminalen Ligandensteils koordinieren, strukturell fehlgeordnet. Obwohl die terminale ϵ' -Aminogruppe ideal gegenüber dem Koenzym ausgerichtet ist (4.3 Å Abstand zu C4 von NAD^+), wurde **6a** nicht umgesetzt. Diese Beobachtungen zeigen, dass die geschlossene Konformation, die im Fall von **6a** aufgrund von Abstoßungen mit den PyLD-Seitenketten Leu3 und Leu4 nicht möglich ist (Abbildung S5), substanzell für die Enzymkatalyse ist. Basierend auf den Strukturbefunden scheint Leu4 eine entscheidende Rolle bei der Koordinierung und Orientierung des N-terminalen Substratbereichs zu spielen. In Übereinstimmung damit lässt eine L4A-Mutante keinen messbaren Umsatz von **1a** erkennen und bestätigt somit den bedeutenden Einfluss dieser Aminosäure auf den geschlossenen Zustand des Enzyms.

Eine genauere Analyse der PyLD-Komplexstrukturen identifizierte ein Netzwerk aus Wassermolekülen in räumlicher Nähe zum N-terminalen Segment (Abbildung S6). Dabei ist das Pyrrol-Stickstoffatom der Katalyseprodukte über ein wohldefiniertes Solvensmolekül im Abstand von 2.6 bis 3.1 Å mit diesem Netzwerk verbunden (Abbildung 2a); dieses Moleköl fehlt hingegen in den Elektronendichten der nicht umgesetzten Substratanaloga (Abbildung 2b). Da im aktiven Zentrum keinerlei aktivierende Aminosäuren vorhanden sind, scheint diese Ansammlung von Wassermolekülen die finalen Schritte der PyLD-Katalyse, insbesondere die Addition der α -Aminogruppe an das intermedier gebildete Imin und die Freisetzung von Ammoniak, zu gewährleisten.

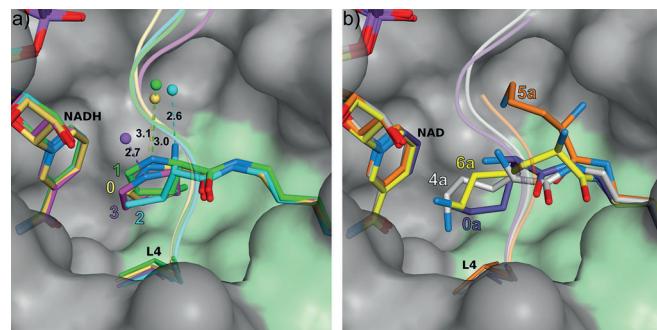
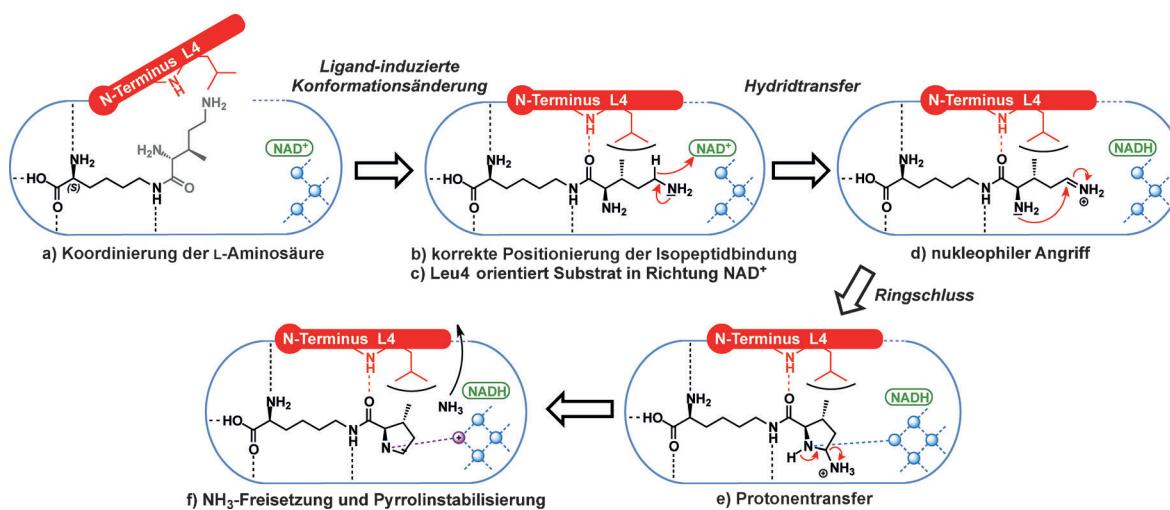


Abbildung 2. Überlagerung der PyLD-Komplexstrukturen. Das aktive Zentrum von PyLD:1 ist als graue Oberfläche gezeichnet. Hydrophobe Aminosäureseitenketten von PyLD sind grün und der N-Terminus des Proteins ist als transparente Schleife dargestellt. a) Produktstrukturen 0-3. Solvensmoleküle im Kontakt mit dem heterocyclischen Stickstoffatom sind als Kugeln gezeichnet; Wechselwirkungen werden als gestrichelte Linien hervorgehoben (die Abstände sind in Å angegeben). b) Substratstrukturen 0a und 4a-6a. Die entsprechenden Stereoabbindungen finden sich in den Hintergrundinformationen (Abbildungen S7 und S8).

Eine verwandte enzymkatalysierte Reaktion ist die Oxidation von L-Ornithin zu Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat durch δ -Aminotransferasen in Pflanzen. In diesem Fall wird die Aminogruppe der Ornithinseitenkette durch Transaminierung zum Aldehyd oxidiert.^[6]

Die hier präsentierten Komplexstrukturen von PyLD in offenen und geschlossenen Konformationen ermöglichen einen detaillierten Einblick in den Reaktionsmechanismus von PyLD, wie im Folgenden zusammengefasst (Schema 3):

- a) Die Ligandenbindung erfolgt im offenen Zustand, hauptsächlich durch Wechselwirkungen der C-terminalen Substrateinheit mit dem Protein
- b) Die korrekte Positionierung der Isopeptidbindung des Liganden initiiert die Strukturänderung des Enzyms.
- c) Leu4NH fungiert als Substratsensor über eine definierte Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoffatom des



Schema 3. Reaktionsablauf der PyLD-Katalyse und der wichtigsten Substratwechselwirkungen. Fixierte Wassermoleküle in unmittelbarer Nähe zum N-Terminus der Substrate/Produkte sind als blaue Kugeln eingezeichnet. Die violette Kugel symbolisiert ein protoniertes Wassermoleköl.

Isopeptids. Infolgedessen wird die N-terminale Substrat-einheit im aktiven Zentrum neu orientiert.

- d) Die Leu4-Seitenkette begrenzt den Hohlraum des aktiven Zentrums und positioniert die terminale Aminogruppe für den Hydridtransfer auf NAD⁺. Der intramolekulare nukleophile Angriff der α-Aminogruppe auf die entstandene Schiff-Base führt zu einem 2-Aminopyrrolidinium-Intermediat.
- e) Das Netzwerk aus fixierten Wassermolekülen im aktiven Zentrum fungiert als Protonentransporter, wobei ein definiertes Wasser- oder Ammoniakmolekül das gebildete Pyrrolin- oder Pyrrolidinstickstoffatom stabilisiert. Diese Wechselwirkung liegt ausschließlich in den Produktstrukturen vor und könnte für die Initiierung der Protonentransferkaskade und die Bildung von **1** verantwortlich sein.

Die Umsatzraten und Substrataffinitäten von **1a** belegen, dass PylD nur eine mäßige Aktivität aufweist ($K_m = 1.6 \text{ mM} \pm 0.18 \text{ mM}$, $k_{cat} = 1.72 \text{ s}^{-1} \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$; Tabelle S1). Diese Befunde stimmen gut mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus überein, da dem Enzym jegliche aktivierende Aminosäure im Katalysezentrum fehlt und keine hohe Spezifität für die Koordinierung der N-terminalen Substrateinheit vorliegt.

Nichtnatürliche Aminosäuren haben sich zu unverzichtbaren Hilfsmitteln bei der Herstellung maßgeschneiderter Proteine entwickelt.^[7] Hier konnten wir zeigen, dass primäre Amine mit unterschiedlichen stereochemischen Eigenschaften von PylD als Substrate akzeptiert werden. Hierdurch können verschiedene Pyrolysinanaloga mithilfe der PylDST-Maschinerie *in vivo* in Proteine eingebaut werden, ohne auf kosten- und zeitintensive chemische Synthese zurückgreifen zu müssen.

Eingegangen am 19. Februar 2014
Online veröffentlicht am 10. Juni 2014

Stichwörter: Aminosäuren · Dehydrogenase · Enzymkatalyse · Proteinkristallographie · Pyrolysin

-
- [1] 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) 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; d) C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9712–9714; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9540–9541; e) M. A. Gaston, R. Jiang, J. A. Krzycki, *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 342–349.
 - [2] D. G. Longstaff, R. C. Larue, J. E. Faust, A. Mahapatra, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1021–1026.
 - [3] 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; c) F. Quitterer, A. List, W. Eisenreich, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1367–1370; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1339–1342; d) F. Quitterer, A. List, P. Beck, A. Bacher, M. Groll, *J. Mol. Biol.* **2012**, *424*, 270–282; e) F. Quitterer, P. Beck, A. Bacher, M. Groll, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7171–7175; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7033–7037; f) J. A. Krzycki, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 619–625.
 - [4] 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.
 - [5] a) S. A. Burke, J. A. Krzycki, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16570–16577; b) D. J. Ferguson, N. Gorlatova, D. A. Grahame, J. A. Krzycki, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29053–29060; c) D. J. Ferguson, J. A. Krzycki, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 846–852.
 - [6] J. Stránská, D. Kopečný, M. Tylichová, J. Sněgaroff, M. Šebela, *Plant Signaling Behav.* **2008**, *3*, 929–935.
 - [7] a) 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**; b) S. Lepthien, L. Merkel, N. Budisa, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5576–5581; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5446–5450; c) 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; d) C. H. Kim, M. Kang, H. J. Kim, A. Chatterjee, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7358–7361; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7246–7249.