

Umwandlung einer Anthranilatsynthase in eine Isochorismatsynthase: Implikationen für die Evolution von Chorismat-umsetzenden Enzymen

Maximilian G. Plach, Patrick Löffler, Rainer Merkl und Reinhard Sterner*

Abstract: Chorismat-umsetzende Enzyme spielen in Pflanzen sowie frei lebenden und infektiösen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese zahlreicher Metabolite. Zu diesen Enzymen zählen die primärmetabolische Anthranilatsynthase (AS) und die homologe, sekundärmetabolische Isochorismatsynthase (ICS). Beide Enzyme katalysieren mechanistisch ähnliche Reaktionen, wobei sie Ammoniak bzw. Wasser als Nukleophil nutzen. Wir zeigen hier, dass die Nukleophilspezifität der AS durch nur zwei Aminosäureaustausche im Zugangskanal zum aktiven Zentrum von Ammoniak auf Wasser erweitert werden kann. Die resultierende Bifunktionalität dieser AS/ICS-Variante verdeutlicht, dass die Evolution eines sekundärmetabolischen Enzyms von einem primärmetabolischen aus durch wenige Mutationen erfolgen kann und nicht zwingend eine initiale Genduplikation voraussetzt. Allgemein betrachtet, tragen unsere Erkenntnisse zum Verständnis bei, wie in der Natur innerhalb von Enzym-Superfamilien neue Reaktionen evolvieren.

Chorismat (CH) ist ein zentraler metabolischer Knotenpunkt und die gemeinsame Vorstufe einer Reihe von essenziellen Primärmetaboliten (Folat, Tryptophan) und bedeutenden Sekundärmetaboliten (Menaquinon, Siderophore, Antibiotika), die lebenswichtig für Pflanzen sowie frei lebende und infektiöse Mikroorganismen sind^[1] (Abbildung 1). Die von CH ausgehenden Biosynthesewege stellen daher wichtige Angriffspunkte für Herbizide und antimikrobielle Substanzen dar. Die Eingangsreaktionen („committed steps“) dieser Biosynthesewege werden von strukturell und mechanistisch ähnlichen Enzymen katalysiert, die auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückgeführt werden und deshalb als MST-Superfamilie (Menaquinon, Siderophore, Tryptophan) zusammengefasst sind.^[2] Innerhalb dieser Superfamilie können zwei Gruppen unterschieden werden: Die primärmetabolischen Anthranilat- und Aminodeoxychorismatsynthasen (AS, ADCS) nutzen Ammoniak als Nukleophil für die Bildung von aminierten CH-Derivaten, wogegen die sekundärmetabolischen Isochorismat- und Salicylatsynthasen (ICS, SS) Wasser als Nukleophil zur Bildung von hydroxylierten CH-Derivaten verwenden (Abbildung 1). Diese beiden Subfamilien werden daher nachstehend als Ammoniak-abhängige und Wasser-abhängige MST-Enzyme bezeichnet (AMEs bzw. WMEs). In Bezug auf die Vorstellung, dass

sekundärmetabolische Enzyme aus primärmetabolischen evolviert sind,^[3] legt die Teilung der MST-Familie nahe, dass ein Übergang in der Nukleophilspezifität von Ammoniak auf Wasser die Grundlage für die Entstehung von WMEs (ICS, SS) aus AMEs (AS, ADCS) war. Hier zeichnen wir diesen evolutionären Weg nach, indem wir zunächst die Aminosäuren identifizieren, die zu den unterschiedlichen Nukleophilspezifitäten in MST-Enzymen beitragen und anschließend ICS-Aktivität auf einer AS etablieren.

Die AS aus *Salmonella typhimurium* (stAS) ist ein Heterotetramer aus zwei Synthase- und zwei Glutaminaseuntereinheiten (stTrpE bzw. stTrpG).^[4] Im aktiven Zentrum der Glutaminase stTrpG wird Glutamin zu Glutamat und naszentem Ammoniak hydrolysiert, wobei letzterer durch einen Kanal zum aktiven Zentrum von stTrpE geleitet wird.^[4,5] Um diejenigen Aminosäurereste von stTrpE zu identifizieren, die am intermolekularen Transport („channeling“) des Ammoniaks zwischen den aktiven Zentren beteiligt sind und deshalb in Kontakt zu diesem kommen können, wurde MOLE 2.0 angewendet (ein Programm zur Analyse von makromolekularen Tunneln und Kanälen).^[6] Zwischen den aktiven Zentren des stAS-Komplexes konnten wir einen 30 Å langen Kanal lokalisieren (Abbildung 2a), der dem Kanal ähnelt, der in der Kristallstruktur der zur AS homologen Aminodeoxyisochorismatsynthase PhzE beobachtet worden ist.^[7] Nahe des CH-Liganden wird der Kanal hauptsächlich von drei Aminosäureresten gebildet: Dies sind Gln263 in β -Strang 11 sowie Met364 und Leu365 in α -Helix 12. Um abzuschätzen, inwieweit die Aminosäuren an diesen Positionen mit der Nukleophilspezifität von AMEs und WMEs korreliert sind, wurden für die vier MST-Enzymklassen (ADCS, AS, ICS und SS) individuelle multiple Sequenz-Alignments (MSAs) erstellt. Nennenswerterweise bilden die in den MSAs enthaltenen Sequenzen auch in einer phylogenetischen Analyse vier distinkte Teilbäume (Abbildung S1); sie sind daher repräsentativ für die vier MST-Klassen. Anhand der aus den MSAs abgeleiteten Sequenzlogos für β -Strang 11 und α -Helix 12 (Abbildung 2b) konnte die bereits früher beschriebene strikte Konservierung von Gln263 in AS und von Lys an der entsprechenden Position in ICS und SS^[2] bestätigt werden. Dieses Lys nimmt in ICS und SS die Rolle einer katalytischen Base zur Aktivierung von Wasser ein.^[2,8] In einer gewissen Zahl von ADCS-Sequenzen ist Gln263 durch Glu ersetzt. Interessanterweise sind die Aminosäuren an den Positionen 364 und 365 jeweils innerhalb der AMEs und WMEs stark konserviert, unterscheiden sich aber gleichzeitig zwischen diesen beiden Gruppen. Innerhalb der AMEs ist Met364 strikt konserviert, genauso wie Leu365 in AS und Ile365 in ADCS. In WMEs ist Position 364 hingegen weitestgehend mit hydrophoben Aminosäuren (Leu, Ile, Phe, Val) besetzt; Po-

[*] M. G. Plach, P. Löffler, Prof. Dr. R. Merkl, Prof. Dr. R. Sterner
Institut für Biophysik und physikalische Biochemie
Universität Regensburg, 93040 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: Reinhard.Sterner@ur.de



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505063> zu finden.

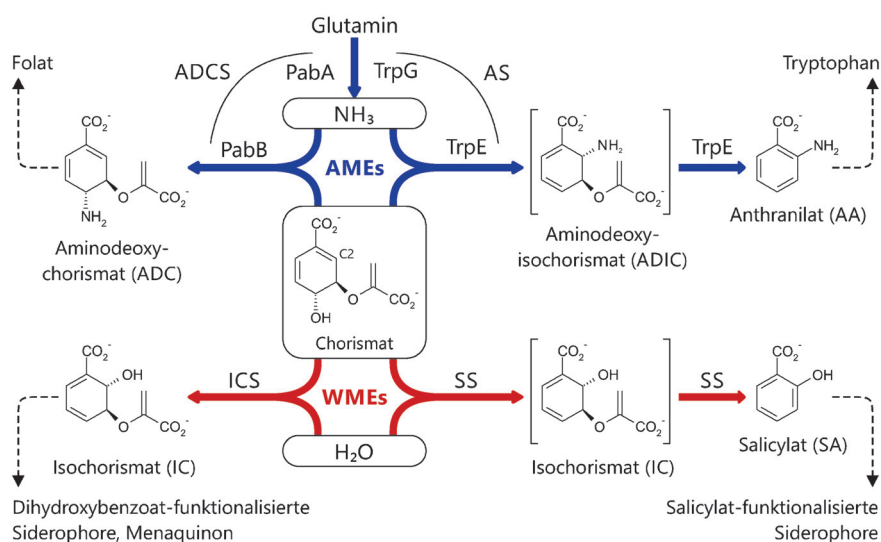


Abbildung 1. Chorismat stellt eine zentrale Verbindung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus dar. Es wird von den primärmetabolischen, Ammoniak-abhängigen MST-Enzymen (AMEs) ADCS und AS zu Aminodeoxychorismat (ADC) und Anthranilat (AA) umgesetzt. Bei beiden Enzymen handelt es sich um heteromere Komplexe, die aus Glutaminase- (PabA, TrpG) und Synthase-Untereinheiten (PabB, TrpE) bestehen. ADC und AA sind Zwischenstufen in der Biosynthese von Folat, bzw. Tryptophan. Die Wasser-abhängigen MST-Enzyme (WMEs) ICS und SS katalysieren die Umsetzung von Chorismat zu Isochorismat (IC) bzw. Salicylat (SA), welche wiederum Vorstufen von wichtigen Sekundärmetaboliten wie z. B. Eisenchelat-bildenden Siderophoren und dem am Elektronentransport beteiligten Menaquinon darstellen. Eine besondere Eigenschaft von AS und SS ist die Freisetzung von Pyruvat aus ihren jeweiligen Reaktionsintermediaten Aminodeoxyisochorismat (ADIC) bzw. IC und damit die Bildung von aromatischen Produkten.

sition 365 hauptsächlich mit Val in ICS und Ser in SS. Weitere Positionen wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da sie entweder über AMEs und WMEs hinweg konserviert sind, da keine Konservierung innerhalb der AMEs und WMEs besteht, oder da sie nicht an der Ausformung des Nukleophilkanals beteiligt sind.

Aufbauend auf diesem Konservierungsmuster planten wir, mithilfe von Aminosäureaustauschen an den Positionen 263, 364 und 365 von stTrpE die Nukleophilspezifität der stAS von Ammoniak zu Wasser zu verschieben. Insgesamt wurden 16 Varianten rekombinant erzeugt und mittels HPLC auf die Bildung von CH-Derivaten untersucht. In allen Varianten wurde Gln263 durch das WME-charakteristische Lys ersetzt und dieser Austausch mit den verschiedenen Aminosäuren, wie sie in WMEs an den Positionen 364 und 365 auftreten, kombiniert (Tabelle S1). Die resultierenden Varianten sind im Folgenden nach ihrer jeweiligen Kombination an Aminosäuren an den Positionen 263, 364 und 365 bezeichnet (z. B. KML: Lys263, Met364 und Leu365). Keine der Varianten war durch die Mutationen im Vergleich zu Wildtyp-stTrpE in ihrer Löslichkeit oder Stabilität beeinträchtigt.

Zwölf der stAS-Varianten katalysierten in Abwesenheit von Ammoniak die Bildung von IC (Abbildung 3a, Abbildung S2a), das mittels ESI-Massenspektrometrie und enzymatischer Umsetzung zu SA zweifelsfrei identifiziert wurde (Abbildung S3). Allen zwölf Varianten gemeinsam ist der Gln263Lys-Austausch. In drei Varianten ist dieser Austausch mit einer Mutation an Position 365 kombiniert (KML, KMS, KMA), woraus sich folgern lässt, dass bereits zwei Amino-

säureaustausche für die Etablierung von IC-Spezifität auf dem stTrpE-Gerüst ausreichend sind. Die restlichen neun IC-bildenden Varianten enthalten einen zusätzlichen Austausch an Position 364. Über die 12 Varianten gemittelt, wurden 20 % des eingesetzten CH zu IC umgesetzt; die beste Variante (KIA) setzte 37.1 % um. Im Vergleich dazu setzte die ICS EntC aus *Escherichia coli* 31.5 % CH zu IC um, wobei der unvollständige Umsatz aus einem Gleichgewicht zwischen CH und IC resultiert.^[9] Der Austausch von Lys263 durch Ala in der IC-bildenden KLS-Variante hatte einen vollständigen Verlust der ICS-Aktivität in der resultierenden ALS-Variante zur Folge. Dies legt nahe, dass Lys263 in den hier beschriebenen stAS-Varianten eine zu ICS und SS vergleichbare katalytische Rolle spielt.^[2,8] Weitere Kontrollen zeigten, dass IC weder durch Wildtyp-stAS, noch in Abwesenheit von Enzym gebildet wird.

Im Produktgemisch der KML-Variante, die nur den einzelnen Gln263Lys-Austausch trägt, konnte weder IC noch SA detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Lys263 al-

leine nicht ausreichend für die Verwendung von Wasser als Nukleophil ist. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnten auch Abell und Mitarbeiter weder IC noch SA bei der Analyse des entsprechenden Gln263Lys-Austauschs in der AS aus *Serratia marcescens* identifizieren.^[10] Dahingegen berichteten Ziebart und Toney in einer umfassenden Studie zur Nukleophilspezifität in MST-Enzymen, dass der einfache Gln263Lys-Austausch in stAS (entsprechend unserer KML-Variante) zur Bildung von Spuren von IC und SA führt.^[11] Allerdings wurden von der entsprechenden stAS-Variante unter experimentellen Bedingungen, die mit unserem Ansatz vergleichbar sind, nur 0.008 % bzw. 0.03 % des eingesetzten CH zu IC bzw. SA umgesetzt. Die Frage, ob der einfache Gln263Lys-Austausch zu keiner ICS/SS-Aktivität oder zu Bildung von extrem geringen Mengen IC und SA führt, hat jedoch keinen Einfluss auf das zentrale Ergebnis unserer Arbeit: die Inversion der Nukleophilspezifität der stAS durch wenige Aminosäureaustausche, verdeutlicht durch die KAS- und KAA-Varianten.

Bei der Betrachtung der Produktgemische der stAS-Varianten fällt auf, dass nur vier Varianten mit ICS-Aktivität auch SA bildeten, was die Eliminierung von Pyruvat aus IC voraussetzt. Diese Beobachtung mag zunächst widersinnig erscheinen, da das native Produkt der stAS-Reaktion, AA, ebenso durch Eliminierung von Pyruvat aus dem Reaktionsintermediat ADIC hervorgeht. Wie seit kurzem bekannt, wird die Eliminierung von Pyruvat aus von CH abgeleiteten Reaktionsintermediaten in MST-Enzymen durch die präzise Konformation des CH-Rings kontrolliert.^[12] Die fehlende

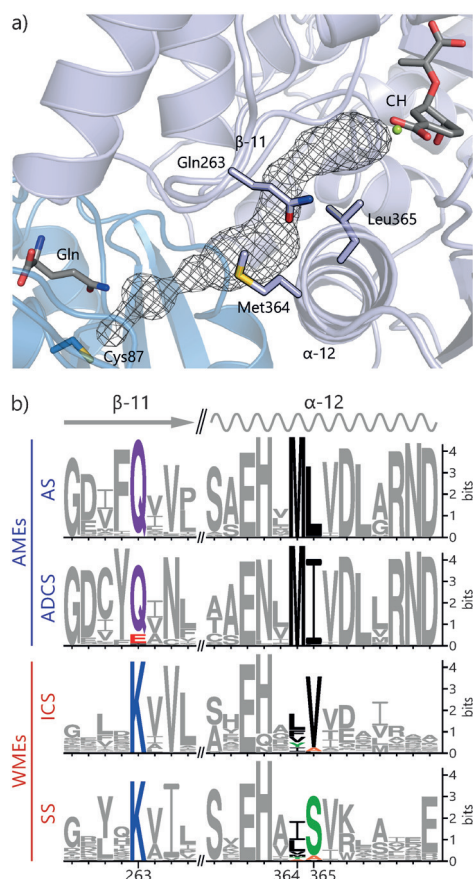


Abbildung 2. Lage und Konservierung von AME- bzw. WME-typischen Aminosäuren. a) Nukleophilkanal in stAS (Strukturmodell basierend auf PDB-ID 1i7q), der die aktiven Zentren von stTrpG (blau; angezeigt durch Cys87 und Glutamin) und stTrpE (hellblau; angezeigt durch CH und ein Mg²⁺-Ion) verbindet. Die Aminosäurereste, die den Tunnel bilden und auskleiden, sind in der Stab-Darstellung gezeigt. b) Sequenzlogos zu β-Strang11 und α-Helix 12. Der β-Strang enthält in AMEs ein konserviertes Gln/Glu und in WMEs ein strikt konserviertes Lys. Die α-Helix enthält die in AMEs konservierten Aminosäurepaare Met-Leu bzw. Met-Ile. Diese Paare sind in ICS und SS vorwiegend als [Leu,Phe,Val]-[Val,Ala] bzw. [Ile,Leu]-[Ser,Ala] konserviert. Die Nummerierung der Aminosäurereste basiert auf stTrpE. Die Positionen 263, 364 und 365 sind entsprechend der chemischen Eigenschaften der jeweiligen Aminosäuren eingefärbt (violett: Amidgruppe, rot: sauer, blau: basisch, schwarz: hydrophob, grün: Hydroxygruppe, orange: klein).

Pyruvat-Eliminierung in den meisten stAS-Varianten ist folglich plausibel mit einer Konformationsänderung des IC-Rings zu erklären, die durch die eingeführten Mutationen bedingt ist.

Um die Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Verwendung des ursprünglichen Nukleophils Ammoniak zu bewerten, wurde die Produktbildung der stAS-Varianten in Anwesenheit von Glutamin untersucht (Abbildung 3b, Abbildung S2b). Unter diesen Bedingungen setzen alle zwölf Varianten mit ICS-Aktivität CH nicht nur zu IC, sondern auch zu AA und dessen Vorstufe ADIC um. Diese Varianten besitzen folglich eine erweiterte Nukleophilspezifität. Interessanterweise war bei manchen Varianten nur ein geringer Rückgang der gebildeten Menge IC zu beobachten, während gleichzeitig aber erhebliche Mengen AA gebildet wurden

(KMV: 2.5-facher Rückgang, KIV: 1.4-fach). Andere Varianten die ebenfalls wesentliche Mengen AA bildeten, zeigten sogar einen Anstieg im Umsatz von CH zu IC durch die Anwesenheit von Glutamin (z. B. KAV: 2.2-fach).

Unabhängig davon, ob Glutamin als Ammoniakquelle im Reaktionsgemisch vorhanden war oder nicht, war eine deutliche Zunahme der IC-Bildung für die Aminosäurefolge Leu→Val→Ser/Ala365 auffällig. Varianten mit Leu365 waren katalytisch inaktiv, setzten CH also weder zu AA, noch zu IC um. Der Austausch von Leu365 gegen Val, Ser oder Ala hatte hingegen steigende durchschnittliche Umsatzwerte von 8.2 %, 28.1 % bzw. 24.6 % IC zur Folge.

Wie bereits beschrieben, tragen die Aminosäuren 263, 364 und 365 wesentlich zur Bildung des Nukleophilkanals in stTrpE bei. Verschiedene Aminosäuren mit unterschiedlichem Raumbedarf für ihre Seitenketten an diesen Positionen können daher die Form und den Verlauf des Kanals beeinflussen und so die unterschiedlichen Reaktivitäten der stAS-Varianten begründen. Um eine statistisch stichhaltige Vorhersage des Verlaufs der Nukleophilkanäle in den verschiedenen stAS-Varianten zu erhalten, wurden Strukturmodelle der Varianten mittels Moleküldynamik (MD) simuliert und für jede Variante 600 putative Nukleophil-Trajektorien (PNTs) berechnet. Eine PNT ist dabei durch die Zentralachse des entsprechenden, mittels MOLE 2.0 berechneten, Kanals definiert.

Diese Analysen ergaben, dass eine Verkleinerung der Seitenkette der Aminosäure an Position 365 zu einer Verlagerung der PNTs in einer 10-Å-Zone um den CH-Liganden führt (Abbildung 4a). In Wildtyp-stTrpE verlaufen alle PNTs zunächst gerade entlang Met364 und Gln263, dann gebogen um Leu365 und enden an CH-C2, dem Punkt des nukleophilen Angriffs von Ammoniak. Der einfache Gln263Lys-Austausch, der von Wildtyp-stTrpE zur KML-Variante führt, hat keine Auswirkungen auf den Verlauf der PNTs. Da Wildtyp-stTrpE und die KML-Variante Leu365 enthalten, wird der zugehörige Verlauf der PNTs als L-Pfad bezeichnet (Abbildung 4b). Eine deutliche Veränderung in der KML-Variante, im Vergleich zu Wildtyp-stTrpE, ist allerdings eine Verengung der PNT-zugehörigen Kanäle zwischen Lys263, Leu365 und Val265. Hervorgerufen wird dies durch die Vergrößerung des Seitenkettenvolumens an Position 263 von 114 Å³ (Gln) auf 135 Å³ (Lys).^[13] Über die entsprechenden Kanäle ist in der KML-Variante für Ammoniak oder Wasser als Nukleophil kein Zugang zu CH möglich, was in der beobachteten fehlenden katalytischen Aktivität in Varianten mit Leu365 resultiert. Wird Leu365 durch Val ersetzt (KMV-Variante; Volumenverringern von 124 Å³ auf 105 Å³), hat dies zwei Auswirkungen auf die PNTs: Einerseits vergrößert sich der Durchmesser der PNT-zugehörigen Kanäle im Vergleich zur KML-Variante. Andererseits weichen 31 % der PNTs vom L-Pfad ab und nehmen einen neuen Verlauf entlang Val365 und Thr425. In der KMS-Variante (Ser365 mit 73 Å³) sind 79 % der PNTs auf den alternativen Pfad verlagert. Die Anwesenheit von Ala365 (67 Å³) führt letztlich zu einer kompletten Verlagerung der PNTs auf diesen Pfad, der folglich als A-Pfad bezeichnet wird (Abbildung 4b).

Die übrigen stTrpE-Varianten wurden gleichermaßen moleküldynamisch simuliert und mittels MOLE 2.0 auf PNTs

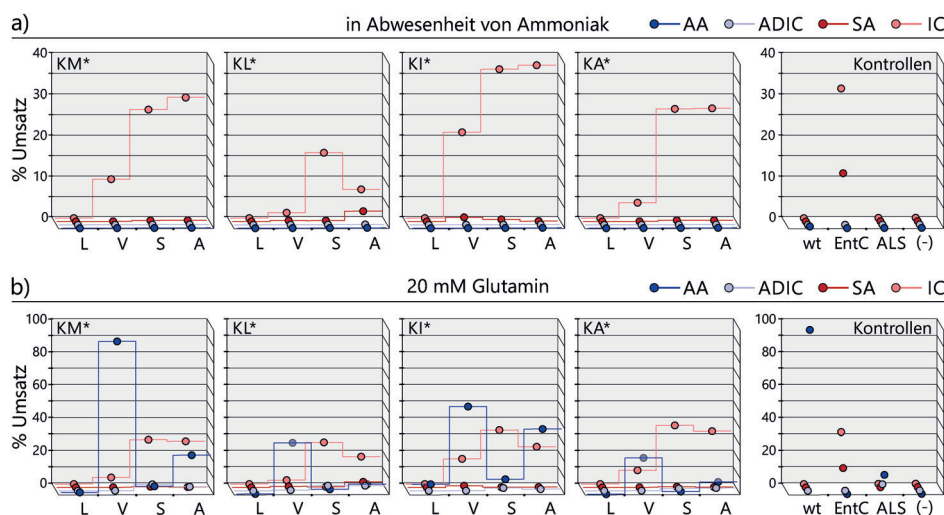


Abbildung 3. Produktverteilung in Reaktionen der stTrpE-Varianten mit Chorismat in Anwesenheit (a) und in Abwesenheit (b) von Glutamin als Ammoniakquelle. Allen Varianten gemeinsam ist Lys263. Die Varianten sind gemäß der Aminosäure an Position 364 gruppiert (z. B. bezeichnet KM* diejenigen Varianten, die Lys263 und Met364 enthalten und bei denen an Position 365 entweder Leu, Val, Ser oder Ala zu finden ist). Alle Varianten wurden in Anwesenheit der Glutaminase-Untereinheit stTrpG untersucht. Ganz rechts sind die Produktverteilungen von Kontrollreaktionen gezeigt: mit Wildtyp-stTrpE (wt), mit ecEntC (EntC), mit einer Lys263Ala-Knockout-Variante von KLS (ALS) und in Abwesenheit jeglichen Enzyms (-). Jedes Produkt ist mit seinem Anteil (% Umsatz) am Gesamtumsatz von CH aufgetragen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Bestimmungen dar. Da die mittleren und maximalen absoluten Fehler kleiner als 0.3% und 3.7% waren, sind keine Fehlerbalken gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind zudem produktspezifische Umsatzwerte durch Stufenlinien miteinander verbunden.

analysiert (Abbildung S4, Tabelle S2). Die PNT-Verteilungen in diesen Varianten entsprechen den oben für die KML-, KMV-, KMS- und KMA-Varianten beschriebenen. Zusammenfassend wird deutlich, dass hohe Umsatzraten von CH zu IC eindeutig mit hohen Anteilen solcher PNTs korrelieren, die entlang des A-Pfades verlaufen (Abbildung 4c).

Aus diesen Erkenntnissen kann die Funktion von Wasser als Nukleophil in WMEs abschließend beschrieben werden. Von Ziebart und Toney wurde vorgeschlagen, dass zwei strukturelle Eigenschaften von WMEs die Fähigkeit von Lys263, Wasser nukleophil zu aktivieren, begünstigen.^[11] Zunächst wurde angenommen, dass zwei Wasserstoffbrückenakzeptoren die Deprotonierung der ϵ -Aminogruppe von Lys263 unterstützen. Allerdings ist einer dieser Akzeptoren, ein Glutamat, nicht nur in

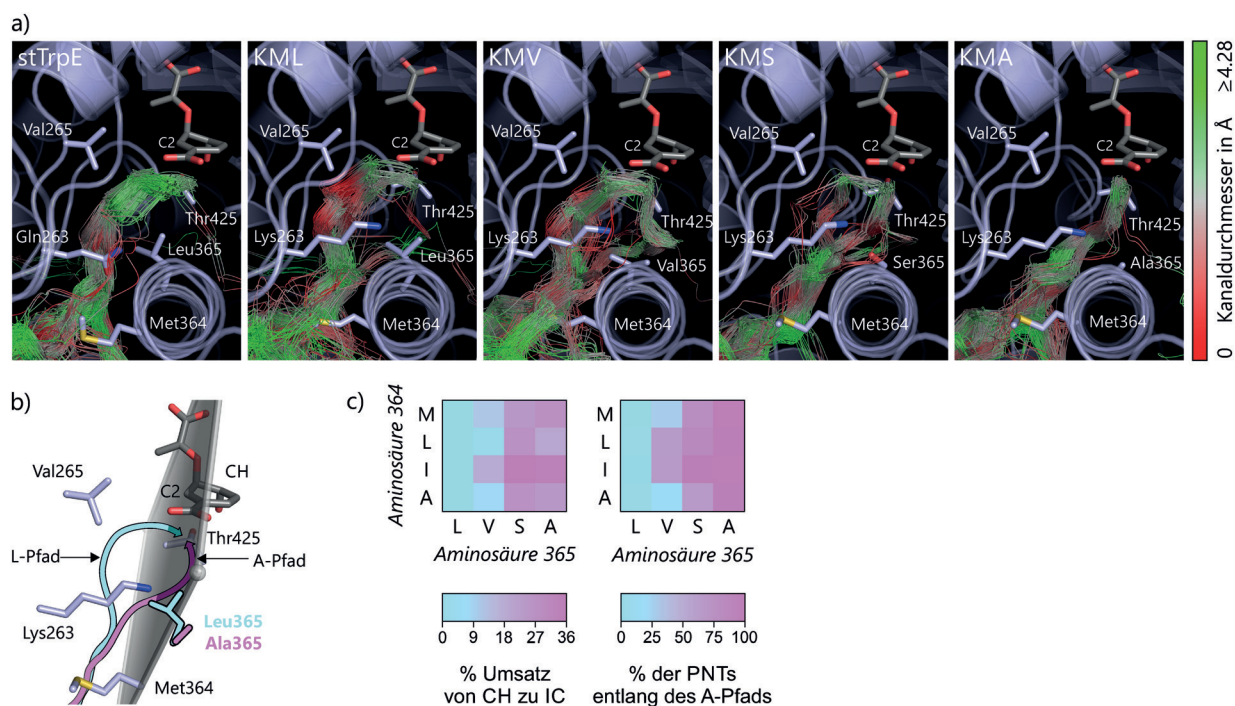


Abbildung 4. Visualisierung und quantitative Auswertung der PNTs in Wildtyp-stTrpE und dessen Varianten. a) Vergleich der PNTs in Wildtyp-stTrpE mit denen in den KML-, KMV-, KMS- und KMA-Varianten. Der Farbgradient der PNTs zeigt den Durchmesser der entsprechenden Nukleophilkanäle an. Wichtige Aminosäurereste, die den Kanal auskleiden, sind in der Stab-Darstellung gezeigt. Auffallend ist die Korrelation zwischen abnehmender Größe des Rests 365 (Leu > Val > Ser > Ala) und einer Verlagerung der PNTs vom L-Pfad in Richtung des A-Pfades (siehe Teilabbildung b). b) Die charakteristischen Verläufe der PNTs in Varianten mit Leu365, bzw. Ala365, und damit die Grenzen der PNT-Verlagerung, werden durch den L-Pfad (cyan) bzw. A-Pfad (magenta) beschrieben. Zur Unterscheidung dieser Pfade dient eine Ebene durch CH-C2, sowie durch die C α -Atome von Met364 und Thr425 (Details in den Hintergrundinformationen). c) Vergleich des mittleren Umsatzes von CH zu IC mit dem Anteil an PNTs entlang des A-Pfades in stTrpE-Varianten mit Lys263.

WMEs, sondern in allen 1222 MST-Enzymen in unserem Datensatz konserviert. Der zweite der postulierten Akzeptoren, ein Serin, das Ser365 in stAS entspricht, ist in SS nicht konserviert (7 % aller SS enthalten stattdessen ein Ala) und fehlt gänzlich in ICS. Wir konnten außerdem zeigen, dass Ser365 nicht essenziell für die Bildung von IC ist (Abbildung 4c).

Als zweites wichtiges Element in WMEs wurde Position 364 vorgeschlagen. Von dieser Position, die in WMEs auffällig mit hydrophoben Aminosäuren (Leu, Ile, Val, Phe) besetzt ist, wurde angenommen, dass sie über die Bildung von Van-der-Waals-Kontakten zu den Methylengruppen von Lys263 an dessen korrekter Orientierung beteiligt ist. Da allerdings selbst Varianten mit Met364 (wie im Wildtyp) oder jene mit Ala364 hohe IC-Spezifität zeigen (Abbildung 4c), ist es unwahrscheinlich, dass die Aminosäure an Position 364 in WMEs eine Rolle bei der Ausrichtung des katalytischen Lys spielt.

Zusammenfassend betrachtet, konnten wir zeigen, dass die Nukleophilspezifität von MST-Enzymen von zwei Faktoren bestimmt wird: 1) An- oder Abwesenheit von Lys263 als katalytische Base zur Aktivierung von Wasser und 2) ausreichend Platz im Kanal, um den Zugang des Nukleophils zu CH zu ermöglichen. Letzteres ist in Einklang mit der Aminosäureverteilung natürlich vorkommender WMEs. Keine der SS und nur fünf der ICS in unserem Datensatz weisen an Position 365 eine größere Aminosäure als Val auf. Das Vorkommen von Leu an Position 365 ist in diesen fünf ICS vermutlich lediglich die Folge eines lokalen Fehl-Alignments, da in allen fünf Sequenzen direkt vor diesem Leu ein Val auftritt.

Die einfache und direkte Etablierung der ICS-Aktivität auf einer zu ICS evolutionär verwandten AS verdeutlicht, dass die MST-Superfamilie eine flexible und anpassungsfähige Verbindung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus darstellt. Eine gemeinhin akzeptierte Vorstellung besagt, dass der Ursprung jedes sekundärmetabolischen Biosynthesewegs auf Mutationen zurückzuführen ist, die sich in einem Gen eines primärmetabolischen Enzyms angesammelt haben. Folglich sollten solche Mutationen 1) die allgemeine metabolische Vielseitigkeit erhöhen, indem sie zur Bildung von Molekülen mit neuen biologischen Aktivitäten führen, 2) die Erhaltung bereits existierender metabolischer Diversität erlauben, und 3) die beiden vorherigen Bedingungen unter minimalen Zugeständnissen bei der evolutionären Fitness erfüllen.^[3a] Unsere Erkenntnisse stützen diese Hypothese. Für die Etablierung von ICS-Aktivität waren lediglich zwei Mutationen nötig, und alle IC-bildenden stTrpE-Varianten waren gleichzeitig in der Lage, unter Verwendung von Ammoniak als Nukleophil AA zu bilden, das wiederum in die Tryptophanbiosynthese eingehen kann. Nach dieser Argumentation setzt die Evolution der IC-Bildung nicht zwingend eine Genduplikation voraus, sondern könnte auch über ein bifunktionelles Intermediat, ähnlich den hier beschriebenen stTrpE-Varianten, verlaufen sein.

Die Kanalisierung von Substraten, d. h. der inter- oder intramolekulare Transport von Substraten zwischen aktiven Zentren von Enzymen, der so entscheidend ist für die Übertragung der Nukleophile in MST-Enzymen, ist keineswegs ein seltenes Phänomen. In über 64 % aller bekannten Enzymstrukturen wurden mindestens zwei Kanäle identifiziert, die zum aktiven Zentrum führen.^[14] Der von uns gewählte Ansatz mag sich daher als aussichtsreich für die Modifizierung von Enzymreaktivitäten erweisen, woraus letztlich neue enzymatische Funktionen entstehen können.

Danksagung

M.G.P. wurde durch ein Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Kristina Heyn für ihre Hilfe bei phylogenetischen Analysen sowie Christiane Endres, Sonja Fuchs und Jeannette Ueckert für technische Unterstützung.

Stichwörter: Chorismat-umsetzende Enzyme · Enzymevolution · Enzymkatalyse · Nukleophilspezifität · Proteindesign

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 11270–11274
Angew. Chem. **2015**, 127, 11423–11427

- [1] F. Dosselaere, J. Vanderleyden, *Crit. Rev. Microbiol.* **2001**, 27, 75–131.
- [2] S. Kolappan, J. Zwahlen, R. Zhou, J. J. Truglio, P. J. Tonge, C. Kisker, *Biochemistry* **2007**, 46, 946–953.
- [3] a) R. D. Firn, C. G. Jones, *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 989–994; b) L. C. Vining, *Gene* **1992**, 115, 135–140.
- [4] A. A. Morollo, M. J. Eck, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 243–247.
- [5] A. A. Morollo, R. Bauerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 9983–9987.
- [6] D. Sehnal, R. Svobodova Varekova, K. Berka, L. Pravda, V. Navratilova, P. Banas, C. M. Ionescu, M. Otyepka, J. Koca, *J. Cheminf.* **2013**, 5, 39.
- [7] Q. A. Li, D. V. Mavrodi, L. S. Thomashow, M. Roessle, W. Blankenfeldt, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 18213–18221.
- [8] J. Zwahlen, S. Kolappan, R. Zhou, C. Kisker, P. J. Tonge, *Biochemistry* **2007**, 46, 954–964.
- [9] J. Liu, N. Quinn, G. A. Berchtold, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1990**, 29, 1417–1425.
- [10] O. Kerbarh, D. Y. Chirgadze, T. L. Blundell, C. Abell, *J. Mol. Biol.* **2006**, 357, 524–534.
- [11] K. T. Ziebart, M. D. Toney, *Biochemistry* **2010**, 49, 2851–2859.
- [12] J. E. Culbertson, D. H. Chung, K. T. Ziebart, E. Espiritu, M. D. Toney, *Biochemistry* **2015**, 54, 2372–2384.
- [13] N. J. Darby, T. E. Creighton, *Protein structure*, Oxford University Press, Oxford, UK, **1993**.
- [14] L. Pravda, K. Berka, R. Svobodova Varekova, D. Sehnal, P. Banas, R. A. Laskowski, J. Koca, M. Otyepka, *BMC Bioinf.* **2014**, 15, 379.

Eingegangen am 3. Juni 2015,
veränderte Fassung am 23. Juni 2015
Online veröffentlicht am 6. August 2015