

# Kristallstruktur einer pflanzlichen Tyrosinase aus Walnussblättern: die Bedeutung „substratlenkender Aminosäurereste“ für die Enzymspezifität

Aleksandar Bijelic, Matthias Pretzler, Christian Molitor, Florime Zekiri und Annette Rempel\*

**Abstract:** Tyrosinasen und Catecholoxidasen gehören zur Klasse der Typ-III-Kupferenzyme. Forscher arbeiten seit Jahrzehnten daran, die Monophenolase-/Diphenolase-Spezifität dieser Enzyme auf struktureller Ebene zu erklären und entwickelten dazu eine Hypothese (basierend auf der ersten Catechol- und Tyrosinasestruktur), der zufolge der Grund für das Fehlen von Monophenolase-Aktivität in Catecholoxidasen das strukturell eingeschränkte aktive Zentrum sein könnte. Jüngste strukturelle und biochemische Studien an dieser Enzymklasse liefern jedoch Anlass zu Zweifeln an dieser Theorie. Hier wird die erste Kristallstruktur einer pflanzlichen Tyrosinase (*Juglans regia*) präsentiert, anhand derer gezeigt wird, dass die Unterscheidung zwischen Mono- und Diphenolase-Aktivität auf struktureller Ebene nicht durch eine strukturelle Einschränkung des aktiven Zentrums bestimmt wird; vielmehr spielen Aminosäuren, die sich am Eingang zu und innerhalb der zweiten Schale um das aktive Zentrum befinden, eine viel wichtigere Rolle, als bisher angenommen.

Tyrosinasen sind Oxidoreduktasen, die ein Typ-III-Kupferzentrum enthalten und in einer Vielzahl verschiedener Organismen zu finden sind.<sup>[1]</sup> Tyrosinasen katalysieren jene beiden Reaktionen, die das Ausgangsmaterial für die Melaninbiosynthese liefern: die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen (Monophenolase-Aktivität, EC 1.14.18.1) und die anschließende Oxidation der *o*-Diphenole zu den entsprechenden *o*-Chinonen (Diphenolase-Aktivität, EC 1.10.3.1). Beide Reaktionen sind an die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser gekoppelt.<sup>[2]</sup> Während des katalytischen Zyklus durchläuft das zweikernige Kupferzentrum drei unterschiedliche Oxidationszustände. In der ruhenden *met*-Form sind die Kupferionen ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) über ein Hydroxidion oder Wassermolekül miteinander verbrückt. Die *deoxy*-Form stellt den reduzierten Zustand ( $\text{Cu}^{\text{I}}$ ) dar, der nach Bindung von Sauerstoff in die reaktive *oxy*-Form um-

gewandelt wird.<sup>[3]</sup> Die Stilllegung des Gens für Walnuss-Tyrosinase (*jrTYR*) führt zu einem Phänotyp in Walnussblättern, der sich optisch nicht von dem Phänotyp ladiierter Walnussblätter, der durch Tyramin-vermittelten Zelltod induziert wird, unterscheidet.<sup>[4]</sup>

In den letzten Jahrzehnten wurden die katalytischen Mechanismen sowohl von Tyrosinasen als auch von Catecholoxidasen, unter anderem kristallographisch, intensiv untersucht. Die bisherigen Röntgenstrukturanalysen zeigten eine hohe Strukturähnlichkeit der aktiven Zentren beider Enzymgattungen mit lediglich geringfügigen Unterschieden. Eine sperrige Aminosäure, die den Substratzugang zum aktiven Zentrum blockiert, fällt hier besonders auf. Diese Aminosäure wurde zum ersten Mal in der wegweisenden Kristallstruktur der Catecholoxidase aus Süßkartoffeln (*Ipomoea batatas*) identifiziert.<sup>[5]</sup> Es wurde angenommen, dieser Aminosäurerest sei entscheidend für die Kontrolle der Mono- und Diphenolase-Spezifität, weshalb der Begriff „Blocker-Rest“ eingeführt wurde. Gestützt wurde diese Theorie durch die allererste Kristallstruktur einer Tyrosinase aus *Streptomyces castaneoglobisporus*, die an der Blocker-Position ein Glycin enthält.<sup>[6]</sup> Dennoch bietet die Beziehung zwischen Struktur und Funktion in Typ-III-Kupferproteinen gegenwärtig noch Anlass zur Diskussion.

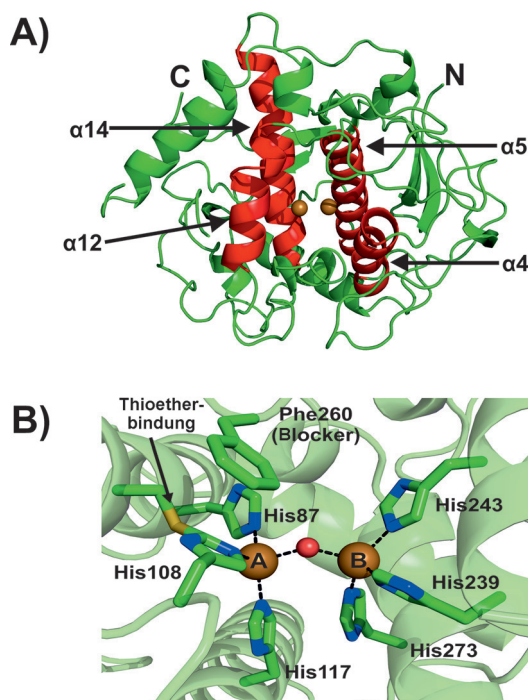
Hier wird nun die hochaufgelöste Kristallstruktur der ersten pflanzlichen Tyrosinase in ihrer aktiven Form präsentiert, die aus Walnussblättern isoliert und gereinigt wurde. Die Walnuss-Tyrosinase weist sowohl Monophenolase-Aktivität als auch einen sperrigen Aminosäurerest an der Blocker-Position auf.<sup>[7,8]</sup>

*jrTYR* wurde aus Walnussblättern isoliert<sup>[7]</sup> und die Struktur anschließend kristallographisch mit einer Auflösung von 1.8 Å gelöst (PDB-Eintrag: 5CE9). Die Kerndomänenstruktur von *jrTYR* ist beinahe identisch mit bereits veröffentlichten Polyphenoloxidasen (PPOs).<sup>[6,9–12]</sup> Die höchste Strukturähnlichkeit weist *jrTYR* zu zwei seiner nächsten Verwandten auf, der pflanzlichen Catecholoxidase aus *Ipomoea batatas* (*ibCO*; Sequenzidentität des Hauptkerns 56.6%)<sup>[5]</sup> und der aus *Vitis vinifera* (*vvCO*; 63.7%).<sup>[13]</sup> Das zwei Kupferionen enthaltende aktive Zentrum ist aus einem Bündel aufgebaut, das aus vier  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 12$  und  $\alpha 14$ ) besteht (Abbildung 1A). Jedes Kupferion des aktiven Zentrums wird von drei Histidin(His)-Resten koordiniert (Abbildung 1B). Kupfer A ( $\text{CuA}$ ) wird von His87, His108 und His117 koordiniert, wobei His87 und His117 auf  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ ) und His108 auf einer Schleife lokalisiert sind. Das C $\epsilon$ -Atom von His108 bildet mit dem Schwefelatom eines benachbarten Cysteinrests (Cys91) eine Thioetherbindung, die die Flexibilität von His108 einschränkt. Kupfer B

[\*] M. Sc. A. Bijelic, Dipl.-Ing. M. Pretzler, Dipl.-Chem. C. Molitor, M. Sc. F. Zekiri, Prof. Dr. A. Rempel  
Institut für Biophysikalische Chemie  
Fakultät für Chemie, Universität Wien  
Althanstraße 14, 1090 Wien (Österreich)  
E-Mail: annette.rompel@univie.ac.at  
Homepage: <http://www.bpc.univie.ac.at>

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506994> zu finden.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.



**Abbildung 1.** Gesamtstruktur und die Struktur des aktiven Zentrums von *jrTYR*. A) Die Gesamtstruktur ist als grüner Cartoon abgebildet, wobei die vier  $\alpha$ -Helices des Bündels, welches das aktive Zentrum bildet, in Rot zu sehen sind. B) Das aktive Zentrum mit den kupferkoordinierenden Histidinresten, dem Blocker und der Thioetherbindung ist in der Stäbchendarstellung angezeigt. Das restliche Protein ist als Cartoon mit 50-prozentiger Transparenz zu sehen (grün C, blau N, gelb S). Die beiden Kupferatome sind als braune Kugeln dargestellt, und das kupferverbrückende Lösungsmittelmolekül ist als kleine rote Kugel gezeigt.

(CuB) wird von His239, His243 und His273 koordiniert, die sich alle auf  $\alpha$ -Helices befinden.

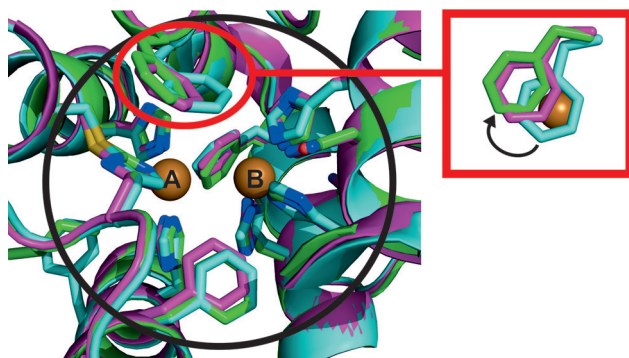
*jrTYR* wurde in der ruhenden *met*-Form mit einem Cu-Cu-Abstand von 4.0 Å kristallisiert, der ähnlich dem Abstand ist, der in der *met*-Form von *vvCO* (4.2 Å) gefunden wurde.<sup>[13]</sup> Beide Kupferionen sind über ein Lösungsmittelmolekül miteinander verknüpft, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um ein Hydroxidion handelt und das von beiden Kupferionen 2.1 Å entfernt ist. CuA weist mit seinen drei koordinierenden Histidinresten und dem Lösungsmittelmolekül eine Geometrie auf, die am besten als Intermediat aus einem verzerrten Tetraeder und einer trigonalen Bipyramide mit einer unbesetzten Koordinationsstelle beschrieben werden kann, während CuB eine fast perfekt tetraedrische Geometrie hat (Abbildung 1 B).

Die Struktur enthält zwei Disulfidbrücken (Cys11-Cys26 und Cys25-Cys88), die einerseits die N-terminalen Schleifen stabilisieren, indem sie diese mit dem Hauptkern verankern. Andererseits werden Disulfidbrücken mit dem Kupferereinbau in Verbindung gebracht, da *jrTYR* das in Tyrosinasen hochkonservierte CXXC-Motiv (C88-A-Y-C91) enthält, das der Literatur zufolge für die Kupferaufnahme erforderlich ist.<sup>[11]</sup> Die beiden Disulfidbrücken sind in *jrTYR* 8 Å voneinander entfernt und bilden einen Pfad, der den kürzesten Weg in das aktive Zentrum des Enzyms beschreibt (ca. 16 Å). Deshalb

könnten diese Disulfidbrücken eine ähnliche Rolle bei der Kupferaufnahme spielen wie das CXXC-Motiv in anderen Tyrosinasen oder Kupferchaperonen (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).<sup>[14]</sup>

An der Blocker-Position über CuA weist *jrTYR* ein Phenylalanin (Phe260) auf (Abbildung 1 B). Dies ist insofern interessant, als die Gegenwart eines sperrigen Blocker-Rests bisher nur mit Catecholoxidasen in Verbindung gebracht wird.<sup>[5,6]</sup> Es wurde postuliert, dass das sperrige Phenylalanin in Catecholoxidasen die Bindung des Substrats an CuA verhindert und somit die Monophenolase-Aktivität inhibiert.<sup>[9,15,16]</sup> Dies führte zur Annahme, dass Monophenole ausschließlich an CuA und Diphenole an CuB binden.<sup>[17]</sup> Goldfeder et al. ersetzten das an der Blocker-Position befindliche Val218 in der Tyrosinase aus *Bacillus megaterium* (*bmTYR*) durch einen sperrigen Phenylalaninrest, um eine Catecholoxidase nachzuahmen und so die Monophenolase-Aktivität zu hemmen. Diese wurde jedoch erstaunlicherweise durch die Mutation erhöht, und gleichzeitig wurde die Diphenolase-Aktivität verringert.<sup>[18]</sup> Dieselbe Arbeitsgruppe lieferte später Strukturen (Tränken von *bmTYR*-Kristallen in Substratlösungen), die zeigten, dass sowohl Mono- als auch Diphenole an CuA in *bmTYR* binden können, woraus die Autoren schlossen, dass beide Substratarten auch in Catecholoxidasen an CuA binden.<sup>[19]</sup> Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die eingeschränkte Flexibilität von CuA (wegen der Thioetherbrücke) in Kombination mit einem sperrigen Blocker für das Fehlen von Monophenolase-Aktivität in Catecholoxidasen verantwortlich ist, da beide Restriktionen eine Substratrotation verhindern würden, die laut Literatur essenziell für die Hydroxylierung von Monophenolen sei.<sup>[17,19]</sup> Dennoch wurde Monophenolase-Aktivität für *jrTYR* eindeutig nachgewiesen, obwohl die hier gezeigte Struktur sowohl einen sperrigen Blocker über CuA als auch eine die Flexibilität einschränkende Thioetherbrücke aufweist.<sup>[7]</sup> Dieser Befund zeigt unmissverständlich, dass ein in Raum und Flexibilität eingeschränktes aktives Zentrum nicht die Ursache für die Mono- und Diphenolase-Spezifität sein kann.

Diese These wird weiter durch den Vergleich der *jrTYR*-Struktur mit den Strukturen der pflanzlichen Catecholoxidasen *ibCO* (PDB-Eintrag: 1BT3)<sup>[5]</sup> und *vvCO* (PDB-Eintrag: 2P3X) gestützt.<sup>[13]</sup> Obwohl die Enzyme unterschiedliche Funktionalitäten aufweisen, sind ihre Strukturen beinahe identisch, und innerhalb eines Radius von 5.5 Å um jedes Kupferion ist kein Unterschied in ihrer Aminosäuresequenz zu finden (Abbildung 2). Erst ab der zweiten Schale des aktiven Zentrums (hier definiert als all jene Aminosäurereste, die mindestens 6 Å von beiden Kupferionen entfernt sind) werden die Strukturen allmählich unterschiedlich, wobei der größte Unterschied in der Positionierung des Blocker-Rests zu finden ist (Abbildung 2). Phe261 in *ibCO* verdeckt CuA komplett und scheint deshalb den Begriff „Blocker“ zu rechtfertigen. Eine andere Struktur von *ibCO*, in der das Enzym den Inhibitor Phenylthiocarbamid (PTC; PDB-Eintrag: 1BUG)<sup>[5]</sup> bindet, zeigte jedoch, dass die Seitenkette von Phe261 flexibel ist und sich nach der PTC-Bindung von CuA weg drehen kann. Dasselbe wurde auch für *vvCO* berichtet: In der Struktur des freien Enzyms (ohne Substrat) wird CuA



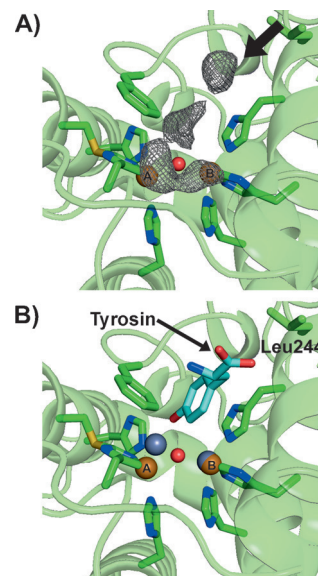
**Abbildung 2.** Überlagerung der aktiven Zentren von *jrTYR* mit *ibCO* und *nuCO*. Die Proteine sind als Cartoons dargestellt, während das jeweilige aktive Zentrum in der Stäbchendarstellung angezeigt ist. Jede PPO-Struktur hat eine andere Farbe: *jrTYR* grün, *ibCO* cyan und *nuCO* lila (grün/cyan/lila C, blau N, gelb S, rot O). Der große schwarze Kreis stellt den Bereich der ersten Schale des aktiven Zentrums dar (ca. 5.5 Å um jedes Kupferzentrum). Der rote Kreis mit dem rechts gezeigten Einschub weist auf die unterschiedlichen Positionen der einzelnen Phenylalaninreste über CuA hin (Sicht von oben). CuA ist als braune Kugel dargestellt. Das Phenylalanin von *ibCO* (cyan) bedeckt CuA komplett, während dasjenige von *nuCO* (lila) CuA nur teilweise bedeckt. Die Position der Phenylalaninseitenkette in *jrTYR* (grün) führt zu keiner Abdeckung von CuA. Der schwarze Pfeil im Einschub zeigt die Verschiebung von kompletter Überdeckung (*ibCO*, cyan) bis hin zu keiner Überdeckung von CuA (*jrTYR*, grün).

teilweise durch den Blocker Phe260 (Abbildung 2, Nebengraphik) abgeschirmt, aber Moleküldynamiksimulationen zeigten, dass auch dieses Phenylalanin flexibel ist und eine Substratbindung an CuA ermöglichen kann.<sup>[20]</sup> Im Fall von *jrTYR* ist CuA bereits in seinem ruhenden *met*-Zustand (kein Substrat) völlig frei zugänglich (Abbildung 2, Nebengraphik). Es ist jedoch nicht klar, ob diese CuA-Zugänglichkeit das Ergebnis einer Rotation von Phe260 ist oder ob diese Zugänglichkeit durch eine feste Position des Phenylalaninrests, die CuA nicht abschirmt, immer gegeben ist. Wir favorisieren die zweite Theorie, da alle analysierten Datensätze (insgesamt fünf) zeigten, dass die Phe260-Seitenkette sich immer an derselben Position befindet. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass zumindest für pflanzliche PPOs der Begriff „Blocker“ für die Aminosäure über CuA nicht gerechtfertigt ist und überdacht werden sollte.

Die Aminosäuren aus der zweiten Schale, die sich am Eingang zum aktiven Zentrum befinden, könnten entscheidend für die Aktivitätsunterschiede sein, obwohl sich selbst dort die einzelnen pflanzlichen PPOs nur geringfügig in ihren Aminosäuren unterscheiden. Dennoch führen einige dieser wenigen Aminosäureunterschiede zu unterschiedlichem elektrostatischem Verhalten in ihrer jeweiligen Umgebung, z. B. der Aminosäurerest, der sich über dem CuB koordinierenden Histidinrest (His243 in *jrTYR*) befindet. *jrTYR* trägt an dieser Position ein kleines hydrophobes Leucin (Leu244), während sich im Unterschied dazu in *ibCO* und *nuCO* dort ein langes und positiv geladenes Arginin (Arg245) bzw. Lysin (Lys244) befindet, die in der Lage sind, acide Gruppen von Substraten zu stabilisieren. Diese Tatsache deutet auf die besondere Wichtigkeit von elektrostatischen Wechselwirkungen hin, die während der Substratbindung beider En-

zymgattungen stattfinden und sich daher auf die Tyrosinase-spezifität auswirken könnten.<sup>[21]</sup>

In einer der beiden Ketten des kristallographischen Dimers der *jrTYR*-Struktur wurde innerhalb des aktiven Zentrums eine interessante Elektronendichte gefunden, die wie die verschmierte Elektronendichte eines gebundenen Liganden aussieht (Abbildung 3 A). Diese Elektronendichte



**Abbildung 3.** Pfad in das aktive Zentrum. A) Die mFo-DFc-Karte (konturiert bei 3.0 σ) der Elektronendichte, die den Pfad in das aktive Zentrum markiert, ist als graues Netz dargestellt. Der Pfeil zeigt die Richtung des Pfades an. Die sechs kupferkoordinierenden Histidinreste, der Phenylalaninrest über CuA, Leucin244 in der zweiten Schale des aktiven Zentrums und die Thioetherbrücke sind in der Stäbchendarstellung angezeigt (grün C, blau N, gelb S), während der Rest der Struktur als Cartoon mit 50-prozentiger Transparenz dargestellt wird. Die beiden Kupferionen sind als braune Kugeln abgebildet, das kupferverbrückende Lösungsmittelmolekül als kleine rote Kugel. B) Strukturüberlagerung von Tyrosin (Stäbchendarstellung; cyan C, blau N, gelb S) mit *jrTYR* (dieselbe Darstellung wie in Abbildung 3 A). Die Kupferionen von *jrTYR* sind als braune Kugeln dargestellt, die Zinkionen der überlagerten Struktur von *bmTYR* + Tyrosin als silberne Kugeln. Die Ausrichtung des überlagerten Substrats (Tyrosin) passt zu dem in Abbildung 3 A gezeigten Pfad. Leu244 ist in der zweiten Schale des aktiven Zentrums lokalisiert und befindet sich in unmittelbarer Nähe der Carboxygruppe des Tyrosinrests (Substratschwanz). Substrate, die einen hydrophoben Teil anstelle der Carboxygruppe enthalten, können mit Leu244 (hydrophob) wechselwirken und stabilisiert werden (wie die kinetischen Daten zeigen).

scheint einen Pfad zu beschreiben, der von der Proteinoberfläche in das aktive Zentrum führt und höchstwahrscheinlich von Lösungsmittelmolekülen stammt, die in das aktive Zentrum hinein und aus diesem wieder hinaus diffundieren. Da ein Teil dieser Elektronendichte mit CuA überlappt, kann daraus geschlossen werden, dass ein ankommendes Substrat diesen Pfad nutzt und sich in Richtung von CuA ausrichtet. Diese Substratausrichtung wurde bereits in den Kristallstrukturen von *bmTYR*<sup>[19]</sup> beschrieben, die unterschiedliche Substrate gebunden hatten (PDB-Eintrag: 4P6R (gebundenes L-Tyrosin), 4P6S (gebundenes L-DOPA) und 4P6T (ge-



bundenes *p*-Tyrosol)). Die Strukturüberlagerungen von *jr*TYR mit allen substratgebundenen Strukturen von *bm*TYR führten zu exzellenten Überlappungen (r.m.s.d.<sup>Cα</sup> ca. 1.3 Å, mit 647 übereinstimmenden Atomen; r.m.s.d. = Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung) und zeigten, dass die Ausrichtung der Substrate zu der Dichte im aktiven Zentrum von *jr*TYR passte, was den vorgeschlagenen Pfad stützt (Abbildung 3B). Zudem wurden kinetische Studien an *jr*TYR mit den Substraten, die in der Strukturüberlagerung verwendet worden waren, durchgeführt, um die Ergebnisse dieser Überlagerungsuntersuchungen zu bekräftigen. Die kinetischen Daten zeigten, dass alle untersuchten Phenolkomponenten als Substrate akzeptiert werden, wobei Monophenole, die keine Carboxylatgruppe tragen, zu einer höheren katalytischen Effizienz führen (Abbildung S2 und Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Dies könnte am bereits erwähnten Leu244 liegen, das sich über CuB befindet und bevorzugt hydrophobe Substratbereiche stabilisiert (Abbildung 3B). Im Unterschied zu *jr*TYR enthält die *bm*TYR-Struktur ein Arginin (Arg209) an dieser Position und kann deshalb mittels Wasserstoffbrücken eher Substrate stabilisieren, die eine Carboxylatgruppe tragen, wie in den Tyrosin- und L-DOPA-gebundenen Strukturen gezeigt wurde.<sup>[19]</sup>

Des Weiteren zeigten die Strukturüberlagerungen, dass der sperrige Phe260-Rest in *jr*TYR so ausgerichtet ist, dass er zumindest schwache T-förmige  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ring der Substrate eingehen kann. Dies lässt auf eine neue Funktion für Phe260 schließen, das anscheinend zusammen mit dem CuB koordinierenden His243 ein speziell geformtes Tor bildet, das zum aktiven Zentrum führt und nur von Substraten in der richtigen Ausrichtung passiert werden kann (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Die aromatischen Ringe aller Substrate, die mit *jr*TYR überlagert wurden, befanden sich genau zwischen Phe260 und His243 und werden von dem parallel positionierten His243 über Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen stabilisiert, die man auch in der *bm*TYR-Struktur gefunden hatte.<sup>[19]</sup> Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass die Mutation des über CuA befindlichen Phe273-Rests zu Alanin in *cg*AUS1 (eine pflanzliche PPO, die an der Biosynthese von Auronen beteiligt ist) zu einer signifikanten Verringerung der Diphenolase-Aktivität führte, was wiederum die Wichtigkeit dieser Aminosäure für die Ausrichtung des Substrats und dessen Bindung an das aktive Zentrum belegt.<sup>[22]</sup>

Es wird ein Bindungsmechanismus vorgeschlagen, in dem das Substrat bereits am Eingang zum aktiven Zentrum durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureresten aus der zweiten Schale des aktiven Zentrums präorientiert wird. Gleichzeitig könnte die notwendige Deprotonierung des Substrats durch ein hochkonserviertes Wassermolekül, das durch Glu235 und Asn240 stabilisiert wird, erfolgen (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).<sup>[1,19]</sup> Anschließend findet die endgültige Ausrichtung des Substrats mithilfe von His243 und Phe260 statt, und das Substrat nähert sich CuA, jedoch leicht versetzt, sodass die *o*-Position des Phenylrings zum Kupfer-verbrückenden *oxo*-Liganden zeigt (hierbei wird angenommen, dass sich das Enzym in seiner *oxy*-Form befindet). Die Hydroxylierungsreaktion könnte dann von weiteren Lösungsmittelmolekülen unter-

stützt werden, die als Protonendonoren wie auch -akzeptoren fungieren können. Danach wird das entstehende Diphenol-Zwischenprodukt zum endgültigen *o*-Chinon oxidiert. Dieser „durch substratlenkende Aminosäurereste vermittelte“ Mechanismus benötigt nur eine kleine Substratrotation, die keine konformative Neuausrichtung des aktiven Zentrums erfordert, da das Substrat bereits beim Eintritt in das aktive Zentrum für beide Reaktionen passend ausgerichtet ist.

Die hier präsentierte erste pflanzliche Tyrosinasestruktur hat gezeigt, dass entgegen bisherigen Vermutungen der sperrige Aminosäurerest über CuA und die Flexibilität des aktiven Zentrums nicht für die fehlende Monophenolase-Aktivität in pflanzlichen PPOs verantwortlich sind. Diese Beobachtungen sind in Einklang mit der jüngsten Entwicklung dieses Forschungsgebiets, die Zweifel an der „klassischen“ Rolle des sperrigen Aminosäurerests aufkommen lässt. Es wird daher vorgeschlagen, dass die elektrostatische Umgebung, die Konformation und die Art der Aminosäurereste in der zweiten Schale, die sich am Eingang zum aktiven Zentrum befinden, der Schlüssel zur Aufklärung der Mono- und Diphenolase-Spezifität sein könnten.

## Experimentelles

Das aktive Enzym wurde wie zuvor beschrieben isoliert, gereinigt und anschließend kristallisiert.<sup>[7,23]</sup> Die Beschreibung der verwendeten Methoden, die Statistiken der Datensammlung (Tabelle S1) und die relevante Literatur für die Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse können in den Hintergrundinformationen gefunden werden.

## Danksagung

Die Forschung wurde finanziert durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF): P25217-N28. Wir bedanken uns bei Dr. Saravanan Panneerselvam vom Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg für seine Unterstützung während der Datensammlung (Antragsnummer: I-20130227 EC).

**Stichwörter:** Enzymkatalyse · Metalloenzyme · Oxidoreduktasen · Strukturaufklärung · Tyrosinasen

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14677–14680  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 14889–14893

- [1] M. Kanteev, M. Goldfeder, A. Fishman, *Protein Sci.* **2015**, *9*, 1360–1369.
- [2] J. N. Rodríguez-López, J. Tudela, R. Varón, F. García-Carmona, F. García-Cánovas, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 3801–3810.
- [3] C. A. Ramsden, P. A. Riley, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2388–2395.
- [4] S. Araj et al., *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 1191–1203.
- [5] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084–1090.
- [6] Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, M. Sugiyama, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8981–8990.
- [7] F. Zekiri, C. Molitor, S. G. Mauracher, C. Michael, R. L. Mayer, C. Gerner, A. Rempel, *Phytochemistry* **2014**, *101*, 5–15.

- [8] M. A. Escobar, A. Shilling, P. Higgins, S. L. Uratsu, A. M. Dandekar, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2008**, *133*, 852–858.
- [9] M. Sendovski, M. Kanteev, V. S. Ben-Yosef, N. Adir, A. Fishman, *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 227–237.
- [10] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, B. W. Dijkstra, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477–5486.
- [11] N. Fujieda, S. Yabuta, T. Ikeda, T. Oyama, N. Muraki, G. Kurisu, S. Itoh, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 22128–22140.
- [12] S. G. Mauracher, C. Molitor, R. Al-Oweini, U. Kortz, A. Rompel, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2014**, *70*, 2301–2315.
- [13] V. M. Virador, J. P. R. Grajeda, A. Blanco-Labra, E. Mendiola-Olaya, G. M. Smith, A. Moreno, J. R. Whitaker, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1189–1201.
- [14] N. J. Robinson, D. R. Winge, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 537–562.
- [15] C. Olivares, J. C. García-Borrón, F. Solano, *Biochemistry* **2002**, *41*, 679–686.
- [16] C. Gerdemann, C. Eicken, B. Krebs, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 183–191.
- [17] H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuczek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4546–4550; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4658–4663.
- [18] M. Goldfeder, M. Kanteev, N. Adir, A. Fishman, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 629–633.
- [19] M. Goldfeder, M. Kanteev, S. Isaschar-Ovdat, N. Adir, A. Fishman, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4505.
- [20] P. Fronk, H. Hartmann, M. Bauer, E. Solem, E. Jaenicke, S. Tenzer, H. Decker, *Food Chem.* **2015**, *183*, 49–57.
- [21] C. Molitor, S. G. Mauracher, S. Pargan, R. L. Mayer, H. Halbwirth, A. Rompel, *Planta* **2015**, *242*, 519–537.
- [22] C. Kaintz, R. L. Mayer, F. Jirsa, H. Halbwirth, A. Rompel, *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 789–797.
- [23] F. Zekiri, A. Bijelic, C. Molitor, A. Rompel, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2014**, *70*, 832–834.

Eingegangen am 28. Juli 2015,  
veränderte Fassung am 8. September 2015  
Online veröffentlicht am 16. Oktober 2015