

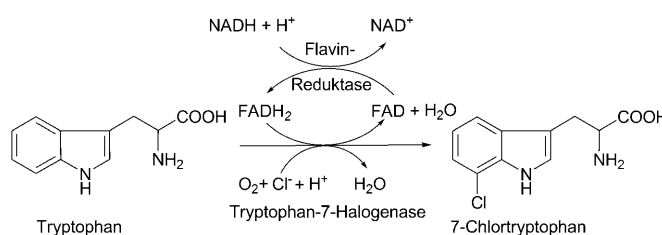
Enzymatische Halogenierung

Änderung der Regioselektivität der Tryptophan-7-Halogenase PrnA durch ortsspezifische Mutagenese**

Alexander Lang, Stefan Polnick, Tristan Nicke, Peter William, Eugenio P. Patallo, James H. Naismith und Karl-Heinz van Pée*

Professor Franz Lingens zum 85. Geburtstag gewidmet

Über viele Jahre hinweg waren Haloperoxidasen die einzigen bekannten halogenierenden Enzyme.^[1,2] Haloperoxidasen (Häm- und Vanadium-haltige) katalysieren die Bildung hypohalogeniger Säure,^[3,4] die aus dem aktiven Zentrum heraus diffundiert und im Anschluss außerhalb des Enzyms mit dem Substrat reagiert. Perhydrolasen katalysieren die Bildung von Persäuren, die außerhalb der Enzyme mit Halogenidionen zu hypohalogenigen Säuren reagieren.^[5] In beiden Fällen ist der eigentliche halogenierende Schritt, der durch Haloperoxidasen und Perhydrolasen eingeleitet wird, nichtenzymatisch. Dies erklärt den Mangel an Substratspezifität und Regioselektivität dieser Enzyme. Die Struktur vieler halogenierter Metaboliten lässt allerdings darauf schließen, dass es halogenierende Enzyme geben muss, die eine hohe Substratspezifität haben und Halogenatome regioselektiv einbauen können. Die halogenierten Indol- (oder Tryptophan-)Derivate eignen sich hervorragend als Demonstrationsbeispiele, da hier Metaboliten isoliert wurden, die an jeder einzelnen Position des Indolrings ein Halogenatom tragen.^[6] Dies zeigt deutlich, dass es halogenierende Enzyme mit einer Regioselektivität für jede einzelne Position des Indolringsystems geben muss. Die erste Halogenase, für die eine regioselektive Katalyse der Chlorierung oder Bromierung von Tryptophan nachgewiesen wurde, war die Tryptophan-7-Halogenase PrnA, die an der Pyrrolnitrinbiosynthese beteiligt ist.^[7] PrnA wurde als eine Flavin-abhängige Halogenase identifiziert, die eine Flavin-Reduktase als zweite Enzymkomponente benötigt.^[8] Diese Flavin-Reduktase produziert FADH₂ aus Flavinadeninindinukleotid (FAD) und reduziertem Nicotinamidadeninindinukleotid (NADH; Schema 1). FADH₂ wird von PrnA gebunden, wo es mit molekularem Sauerstoff unter Bildung eines Flavinhydroperoxids reagiert.^[9] Ein einzelnes



Schema 1. Die vom Zweikomponentensystem der Flavin-abhängigen Halogenasen katalysierte Reaktion.

Chloridion, das nahe am Isoalloxazinring von FAD gebunden ist (Abbildung 1), greift das Flavinhydroperoxid nukleophil an, wodurch hypochlorige Säure gebildet wird.^[10] Da das Substrat Tryptophan jedoch etwa 10 Å entfernt vom Isoalloxazinring gebunden ist, muss die hypochlorige Säure erst durch einen „Tunnel“ zum Substrat geleitet werden. An diesem Vorgang ist wahrscheinlich ein Serinrest (S347) beteiligt, der sich auf halbem Weg zwischen dem Isoalloxazinring und dem Substrat befindet. Ein Lysin- (K79) und ein Glutamatrest (E346) in der Nähe des Substrats sind beide für die Aktivität des Enzyms absolut notwendig (Abbil-

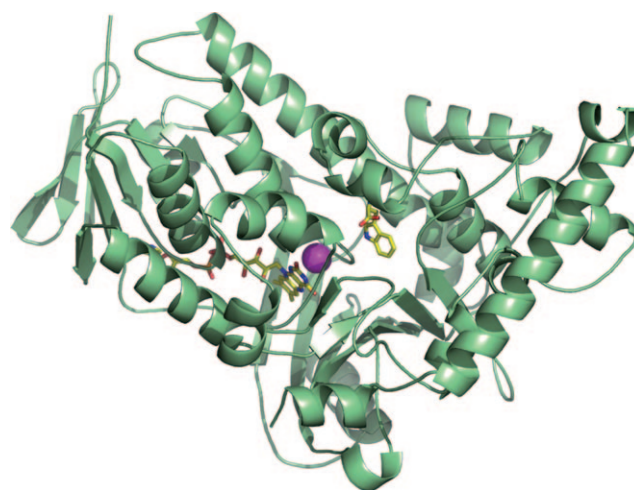


Abbildung 1. Bindung des Substrats Tryptophan im aktiven Zentrum von PrnA. Der Isoalloxazinring von FAD befindet sich auf der linken Seite und das Substrat Tryptophan auf der rechten (Stabmodelle: gelb C, blau N, rot O). Das Chloridion, das in der Nähe des Isoalloxazinrings gebunden ist, ist als violette Kugel zwischen dem Isoalloxazinring und dem Substrat dargestellt.

[*] Dr. A. Lang, S. Polnick, T. Nicke, P. William, Dr. E. P. Patallo, Prof. K.-H. van Pée
Allgemeine Biochemie, TU Dresden
01062 Dresden (Deutschland)
Fax: (+49) 351-463-35506
E-Mail: karl-heinz.vanpee@chemie.tu-dresden.de
Prof. J. H. Naismith
Centre for Biomolecular Science, University of St Andrews
St Andrews KY16 9ST (Großbritannien)

[**] Wir danken Paul Vogel für die Reinigung des Enzyms His-PrnAF103A, Dr. Ingmar Bauer für die Durchführung der LC-MS-Analysen und Dr. Margit Gruner für die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201007896> zu finden.

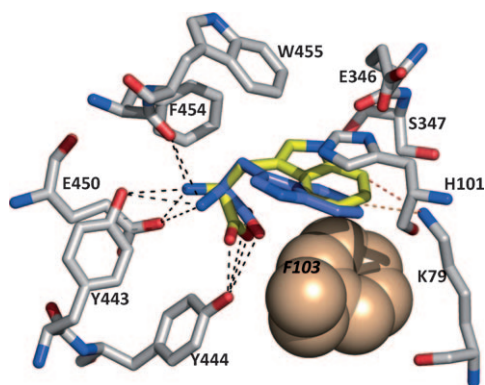


Abbildung 2. Modell des aktiven Zentrums von PrnA (grau C, blau N, rot O). Im Modell ist die vorgeschlagene Änderung in der Orientierung des Substrats durch die F103A-Variante, die eine Chlorierung in der 5-Position ermöglicht, der Orientierung des Substrats im nativen PrnA überlagert. Der Aminosäurerest F103 der nativen PrnA ist als Kalottenmodell mit den Van-der-Waals-Radien dargestellt. Das von nativem PrnA gebundene Substrat ist gelb und das nach unserem Vorschlag von der Mutante gebundene Substrat ist blau dargestellt. Die Positionen des Indolrings, die durch das native oder das mutierte Enzym halogeniert werden, sind mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins durch gestrichelte Linien verbunden. Wechselwirkungen der Amino- und der Carboxylatgruppe des Tryptophans mit dem Enzym sind ebenfalls durch gestrichelte Linien gezeigt.

dung 2).^[10,11] Es wurde vorgeschlagen, dass der Lysinrest mit der hypochlorigen Säure zu einem Chloramin als halogenierendem Zwischenprodukt reagiert.^[9] Flecks et al.^[11] postulierten, dass eine gleichzeitige Wechselwirkung der hypochlorigen Säure mit dem Lysin- und dem Glutamatrest die Elektrophilie der Chlorspezies erhöht und zusätzlich die korrekte Positionierung für den regioselektiven Einbau des Chloratoms in den Indolring des Tryptophans sicherstellt. Vergleiche der Aminosäuresequenzen Flavin-abhängiger Halogenasen haben gezeigt, dass der Lysinrest in allen Flavin-abhängigen Halogenasen vollständig konserviert ist, der Glutamatrest dagegen nur bei den Tryptophan-Halogenasen. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Tryptophan-5-Halogenase PyrH aus der Pyrroindomycin-Biosynthese ergab, dass sich die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste sowie der Isoalloxazinring an den identischen Positionen wie in den Tryptophan-7-Halogenasen PrnA und RebH befinden.^[9,12,13] Daher muss die Regioselektivität durch die Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum reguliert werden. Dies wurde durch den Vergleich der dreidimensionalen Strukturen der Substratkomplexe (d.h. der Tryptophankomplexe) der Tryptophan-7-Halogenase PrnA und der Tryptophan-5-Halogenase PyrH bestätigt. In PrnA zeigt die 7-Position des Indolrings in den Tunnel und ist damit die einzige Position, die für die Chlorspezies zugänglich ist. Die anderen reaktiven Positionen des Indolrings sind durch die Seitenketten großer aromatischer Aminosäuren (W455 und F103) abgeschirmt, die das Substrat zwischen sich „einklemmen“. Die Carbonsäure- und die Aminogruppe von Tryptophan wechselwirken mit zwei Tyrosinresten und einem Glutamatrest des Enzyms. Zusätzlich bildet die NH-Gruppe des Indolrings eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoffatom

einer Peptidbindung, wodurch erreicht wird, dass die 7-Position in den Tunnel zeigt. In der Tryptophan-5-Halogenase PyrH befindet sich die 5-Position genau an der gleichen Stelle wie die 7-Position in PrnA. Die unterschiedliche Orientierung des Substrats wird durch eine Reihe von Änderungen in den Aminosäureresten erreicht, die sich um den Indolring herum befinden, insbesondere Y454 und F94. Die Substratbindung in PrnA und PyrH ist für jedes der beiden Enzyme einzigartig.^[12]

Für PrnA konnte bereits früher gezeigt werden, dass es außer Tryptophan auch eine Reihe anderer Indolderivate chlorieren kann. Allerdings erfolgt die Chlorierung bei all diesen Substraten in der 2- oder in der 2- und 3-Position des Indolrings. Betrachtet man diese Daten unter Einbeziehung der Strukturdaten (die damals noch nicht zur Verfügung standen), so lassen sie darauf schließen, dass diese Substrate im aktiven Zentrum des Enzyms nicht richtig gebunden wurden und die Chlorierung daher an den Positionen erfolgte, die für einen elektrophilen Angriff aktiviert sind,^[14] ähnlich wie es bei den Haloperoxidasen geschieht.

Wir wollten unser Wissen über die Struktur der Tryptophan-Halogenasen nutzen, um die Regioselektivität der Chlorierung von Tryptophan zu ändern. Dafür boten sich als Ausgangspunkte die großen Aminosäuren H101, F103 und W455 an (Abbildung 2), die den Indolring eng umschließen und dadurch abschirmen. Jede dieser Aminosäuren wurde gegen einen Alaninrest ausgetauscht und zudem die Doppelmutante W455A und F103A hergestellt, die sich aber als inaktiv erwies. Die Bestimmung der kinetischen Daten der His-markierten Enzymvarianten ergab, dass die kinetischen Eigenschaften von PrnAF103A sehr ähnlich zu denen des His-markierten Wildtypenzym sind (Tabelle 1). Dagegen

Tabelle 1: K_m - und k_{cat} -Werte der His-markierten Wildtyp-PrnA und einiger ihrer Mutanten.

Enzymvariante	K_m [μM]	k_{cat} [min^{-1}]
HisPrnA	49.9 ± 5.2	6.79 ± 0.27
HisPrnAF103A	198.6 ± 27.3	3.99 ± 0.21
HisPrnAH101A	1785.1 ± 117.6	1.26 ± 0.05
HisPrnAW455A	1814.2 ± 382.1	1.05 ± 0.12
HisPrnAF103AW455A	inaktiv	inaktiv

unterscheiden sich die kinetischen Konstanten (K_m und k_{cat}) der beiden anderen Enzymvarianten deutlich von denen für PrnA: Während die k_{cat} -Werte für PrnAH101A und PrnAW455A um einen Faktor von 5.4 bzw. 6.5 verringert waren, stieg der K_m -Wert für beide Enzymvarianten auf das 36-Fache. Der Anstieg der K_m -Werte für beide Mutanten stützt die Strukturdaten, die nahe legen, dass H101 und W455 eine wichtige Rolle bei der Substratbindung spielen. Die Analyse der Reaktionsansätze von PrnAH101A und PrnAW455A ergab, dass 7-Chlortryptophan das einzige Reaktionsprodukt war. Dagegen zeigte der Peak für das Hauptprodukt 7-Chlortryptophan im HPLC-Chromatogramm des Reaktionsansatzes von PrnAF103A eine Schulter. Dies war ein Hinweis, dass zusätzlich zu 7-Chlortryptophan ein weiteres Produkt gebildet wurde. Die Trennung der Peaks

des Hauptprodukts und des zweiten, unbekanntem Produkts war besser, wenn Brom anstelle von Chlor als halogenierendes Substrat verwendet wurde. Daher wurde ein größerer Reaktionsansatz in Gegenwart von Bromid durchgeführt. Die HPLC-Analyse zeigte, dass zwei Produkte in einem Verhältnis von etwa 2:1 gebildet wurden. HPLC-MS-Analysen zufolge handelte es sich bei beiden Produkten um monobromierte Tryptophane. Anhand von $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten der gereinigten Produkte konnten das Hauptprodukt als 7-Bromtryptophan und das neue Produkt als 5-Bromtryptophan identifiziert werden.

Der Austausch der großen Aminosäure F103 gegen das kleinere Alanin muss es dem Substrat ermöglichen, eine andere Konformation bei der Bindung an das Protein anzunehmen. Eine elektrophile Substitution am Aren durch *N*-Chlorlysin^[9] erfordert eine spezifische Orientierung des Indolrings. Da PyrH und PrnA die Amino- und die Carboxylsäuregruppe in einer ähnlichen Orientierung verankern, nehmen wir an, dass die F103-Mutante Tryptophan sowohl in der für PrnA „normalen“ als auch einer zu PyrH sehr ähnlichen Art und Weise bindet. Das *N*-Chlorlysin benötigt einen bestimmten Abstand und E346 eine bestimmte Orientierung. Die unveränderten Aminosäuren, welche die Amino- und die Carboxylatgruppe binden, fixieren sehr wahrscheinlich deren Position. In PrnA verhindern Y444 und N459, dass Tryptophan sich genauso ausrichtet wie in PyrH. Wir gehen davon aus, dass die F103-Mutante von PrnA es ermöglicht, dass das Tryptophan sich in ungefähr die gleiche Orientierung dreht (aber an einer etwas anderen Stelle), wie dies in PyrH der Fall ist. Wir nehmen weiterhin an, dass die Carboxylat- und die Aminogruppe im Wesentlichen an derselben Position wie im nativen Enzym bleiben. Daher wird im energetischen Minimum des Torsionswinkels von Tryptophan der Indolring aus der ursprünglichen Position (im Vergleich zu PrnA wie auch zu PyrH) verschoben. Die Einnahme dieser Position, die normalerweise durch F103 verhindert würde, ist wegen der Mutation zum kleineren Alaninrest möglich. Abbildung 2 zeigt ein von Hand erstelltes Modell des aktiven Zentrums mit der möglichen Änderung der Orientierung des Substrats für eine Halogenierung in der 5-Position relativ zur Positionierung bei Halogenierung in der 7-Position. Die neue Ausrichtung ist gegenüber der idealen Geometrie im aktiven Zentrum verschoben, und wir nehmen an, dass diese ungünstigere Lage der Grund für die bevorzugte Bildung von 7-Bromtryptophan gegenüber derjenigen von 5-Bromtryptophan ist. Dass kein dibromiertes Produkt gebildet wird, lässt sich damit erklären, dass der aromatische Ring nicht mehr ins aktive Zentrum passt, sobald er einen Halogensubstituenten trägt.

Die hier vorgestellte Arbeit belegt erstmals, dass die Regioselektivität von Tryptophan-Halogenasen durch ortsspezifische Mutagenese verändert werden kann. Bei unserer Beispielreaktion wurde eine Mischung von Produkten erhalten, die an zwei unterschiedlichen Positionen halogeniert waren; die Reaktionsgeschwindigkeit war dabei vergleichbar mit der des nativen Enzyms. Nachdem es gelungen ist, die Strategie, mit der die Natur die gewünschte Position der Halogenierung ändert, nachzuvollziehen, können nun weitere Experimente zur Verbesserung der Regioselektivität geplant

werden, um das Biosynthesepotenzial von Halogenasen nutzbar zu machen.

Experimentelles

Die His-markierten PrnAH101A-, PrnAF103A- und PrnAW455A-Einfachmutanten wurden durch „overlap extension“-Polymerasekettenreaktion mit pUC-*prnA* als Templat konstruiert.^[10,15] Die für die Konstruktion der Mutanten verwendeten Primer sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt. Die Fusionsfragmente wurden in pBluescript II SK (+) ligiert und durch Elektroporation in *E. coli* eingebracht.

Für die Konstruktion der PrnAF103AW455A-Doppelmutante wurden die Fragmente, die das mutierte Gen enthielten, aus den entsprechenden pBluescript-II-SK-(+)-Derivaten durch Verdauen mit *Eco*I30I und *Bsh*TI isoliert. Alle Mutanten wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft. Für die Expression wurden die Halogenasegene in den *E. coli*-*Pseudomonas*-Shuttle-Vektor pCIBHis^[16] ligiert und in *Pseudomonas fluorescens* BL915 Δ ORF 1–4 eingebracht.

His-markierte Enzyme wurden durch Nickelchelatchromatographie an Sepharose FF gereinigt. Die halogenierende Aktivität wurde wie früher beschrieben bestimmt, wobei 1 U an halogenierender Aktivität als 1 μmol gebildetes Produkt pro min definiert ist.^[8,17] Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsmischung kann in den Hintergrundinformationen nachgelesen werden. Nach halbstündiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch fünfminütiges Kochen gestoppt, und die Reaktionsmischung wurde mit HPLC analysiert. Für die Bestimmung der K_m - und k_{cat} -Werte wurde die Tryptophankonzentration zwischen 0,025 und 2 mM variiert. Die Experimente wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Die berechneten Werte wurden mithilfe verschiedener linearer und nichtlinearer Regressionsanalysemethoden analysiert. Die gezeigten K_m - und k_{cat} -Werte wurden durch nichtlineare Regression (30–50 Zyklen für je 200 Iterationen nach dem Levenberg-Marquardt-Verfahren) ermittelt.^[18] Die Angleichungsfunktion war entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung eine Hyperbelfunktion.

Die Zusammensetzung des Großansatzes für die Identifizierung der durch die PrnAF103A-Variante gebildeten Reaktionsprodukte ist in den Hintergrundinformationen beschrieben. Nach vierstündiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch fünfminütiges Kochen im Wasserbad gestoppt. Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt, und der resultierende Überstand wurde auf eine Festphasenextraktionssäule (Strata C 18-E, 1000 mg, Phenomenex) aufgetragen. Die Säule war mit Methanol und Wasser äquilibriert worden. Nach Waschen mit 10-proz. Methanol wurden die halogenierten Verbindungen mit 100-proz. Methanol eluiert. Die Eluate von zehn Großansätzen wurden im Vakuum konzentriert. Die beiden halogenierten Verbindungen wurden mit HPLC (LiChrospher 100 RP-18, 5 μm , 250 \times 4 mm, Methanol/Wasser 40:60, 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v), Fließgeschwindigkeit: 1,0 mL min⁻¹) getrennt und gereinigt. Die Reaktionsprodukte wurden mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und ESI-MS identifiziert (siehe Hintergrundinformationen).

Eingegangen am 14. Dezember 2010

Online veröffentlicht am 25. Februar 2011

Stichwörter: Enzyme · Halogenierungen · Mutagenese · Regioselektivität · Substratbindung

- [1] P. D. Shaw, L. P. Hager, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1011–1012.
- [2] K.-H. van Pée, C. Dong, S. Flecks, J. Naismith, E. P. Patallo, T. Wage, *Adv. Appl. Microbiol.* **2006**, *59*, 127–157.
- [3] M. Sundaramoorthy, J. Terner, T. L. Poulos, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 461–473.

- [4] A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 392–396.
- [5] B. Hofmann, S. Tölzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K.-H. van Pée, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 889–900.
- [6] G. W. Gribble in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 91* (Hrsg.: A. D. Kinghorn, H. Falk, J. Kobayashi), Springer, Wien, **2010**, S. 197–217.
- [7] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2102–2104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2012–2013.
- [8] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2380–2382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300–2302.
- [9] E. Yeh, L. C. Blasiak, A. Koglin, C. L. Drennan, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1284–1292.
- [10] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *Science* **2005**, *309*, 2216–2219.
- [11] S. Flecks, E. P. Patallo, X. Zhu, A. J. Ernyei, G. Seifert, A. Schneider, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9676–9679; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9533–9536.
- [12] X. Zhu, W. De Laurentis, K. Leang, J. Herrmann, K. Ihlefeld, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 74–85.
- [13] E. Bitto, Y. Huang, C. A. Bingman, S. Singh, J. S. Thorson, G. N. Phillips, Jr., *Proteins* **2008**, *70*, 289–293.
- [14] M. Hölzer, W. Burd, H.-U. Reißig, K.-H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 591–595.
- [15] R. Higuchi, B. Krummel, R. K. Saiki, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7351–7367.
- [16] S. Zehner, B. Bister, R. D. Süßmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445–452.
- [17] S. Unversucht, F. Hollmann, A. Schmid, K.-H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1163–1167.
- [18] D. W. Marquardt, *SIAM J. Appl. Math.* **1963**, *11*, 431–441.