

Abschlussbericht für das Max-Buchner-Forschungsstipendium (MBFSt-Kennziffer 2675)

Stipendiatin: Catharina Hatscher; Thema: Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Flavin-abhängigen Halogenasen am Beispiel der Tryptophan-7-Halogenase (PrnA) aus der Pyrrolnitrin-Biosynthese

1995 hatten Dairi et al. das Gen für das an der Einführung des Chloratoms im Verlauf der 7-Chlortetracyclin-Biosynthese beteiligte Enzym isoliert. Allerdings fehlte der Anfang des Gens, so dass damals nicht erkannt werden konnte, dass dieses Enzym eine Nukleotidbindestelle besitzt (Dairi et al., 1995). Als dann 1997 von uns (Hammer et al., 1997) die Gene der beiden an der Pyrrolnitrin-Biosynthese beteiligten Halogenasen isoliert werden konnten, wurde erkannt, dass diese Enzyme ein Nukleotid für ihre Aktivität benötigen. Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich bei dem Nukleotid um NADH handelt, da nur bei Zugabe von NADH zum zellfreien Rohextrakt halogenierende Aktivität messbar war (Hohaus et al., 1997). Später stellte sich dann heraus, dass die Halogenasen reduziertes FAD benötigen, das durch eine Flavin-Reduktase aus FAD mittels NADH als Reduktionsmittel hergestellt wird (Keller et al., 2000). Damit war klar, dass es sich bei diesen Halogenasen um ein Zweikomponenten-System, bestehend aus einer Flavin-Reduktase und der eigentlichen Halogenase, handelt. Inzwischen sind die Gene vieler solcher Flavin-abhängiger Halogenasen in Biosynthesegen-Clustern von Halometaboliten gefunden worden und für einige dieser Enzyme konnte auch die Aktivität in vitro nachgewiesen werden. Die Flavin-abhängigen Halogenasen sind der Typ halogenierender Enzyme, der hauptsächlich für die Chlorierung aromatischer und auch elektronenreicher aliphatischer Substrate verantwortlich ist. Die bisher am besten untersuchten Flavin-abhängigen Halogenasen sind die beiden Tryptophan-7-Halogenasen PrnA aus der Pyrrolnitrin-Biosynthese (Hammer et al., 1997) und RebH aus der Rebeccamycin-Biosynthese (Sanchez et al., 2002). Entscheidend für das Verständnis des Reaktionsmechanismus war die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Tryptophan-7-Halogenase PrnA (Dong et al., 2005; Abb. 1). Diese Struktur zeigte, dass das eigentliche halogenierende Agens durch einen 10 Å langen Tunnel vom Isoalloxazinring des Flavins zum Substrat Tryptophan geleitet werden muss. Bei dem halogenierenden Agens handelt es sich um hypochlorige Säure. Diese entsteht im aktiven Zentrum des Enzyms durch die Reaktion des aus FADH₂ und Sauerstoff gebildeten Flavinhydroperoxid mit Chlorid. Von entscheidender Bedeutung für die Aktivität des Enzyms ist ein Lysinrest (K79; Dong et al., 2005; Abb. 1).

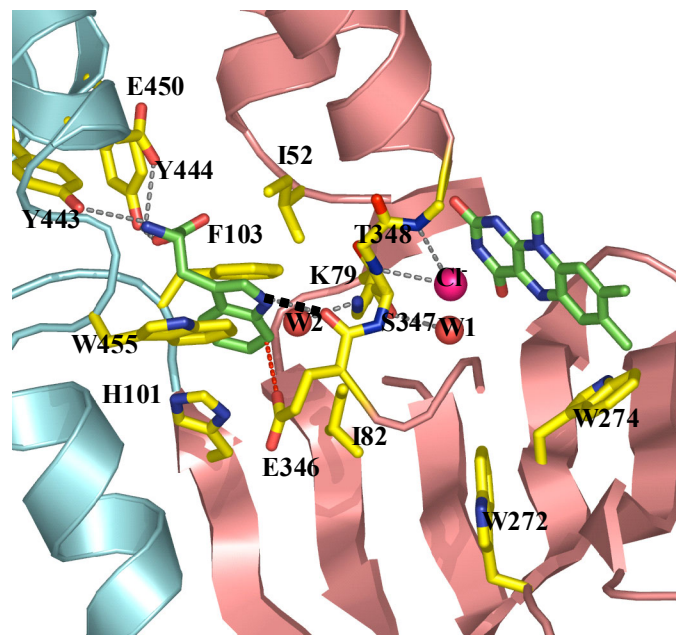


Abb. 1: Aktives Zentrum der Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus dem Pyrrolnitrin-Produzenten *Pseudomonas fluorescens* BL915.

Im Rahmen dieses Projekts sollte der Mechanismus der Reaktion mit Hilfe von mutierten Varianten der Halogenase näher untersucht werden. Insbesondere war dabei von Interesse, wie es das Enzym schafft, das an sich chemisch sehr inerte Tryptophan regioselektiv mit Hilfe von hypochloriger Säure zu chlorieren, obwohl eine chemische Chlorierung von Tryptophan mit hypochloriger Säure nicht möglich ist.

Der Austausch des Lysins an Position 79 gegen ein Alanin hatte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust geführt. Wie K79 ist auch das Glutamat an Position 346 (E346) in allen Tryptophan-Halogenasen absolut konserviert, nicht aber in den Flavin-abhängigen Halogenasen, die leichter chlorierbare Substrate wie Pyrrole oder Phenole chlorieren. Daher wurde angenommen, dass dieser Aminosäurerest für die Chlorierung von Tryptophan eine besondere Bedeutung haben könnte. Der Austausch von E346 gegen einen Glutamin-Rest führe zu einer Verringerung der Aktivität um zwei Zehnerpotenzen. Ein vollständiger Verlust der Aktivität wurde durch den Austausch von E346 gegen einen Aspartatrest erreicht. Offensichtlich reichte die Verkürzung des Seitenkette u eine CH_2 -Gruppe aus, um den Ablauf der Reaktion unmöglich zu machen. Dies legte nahe, dass E346 einen großen sterischen

Einfluss haben musste, aber auch ein elektronischer Einfluss war zu erwarten, da weder durch hypochlorige Säure noch durch ein als Intermediat postuliertes Chloramin (Yeh et al., 2007) eine chemische Chlorierung von Tryptophan möglich ist. Quantenchemische Berechnungen ergaben, dass eine schwache Wechselwirkung von E346 mit dem Proton der hypochlorigen Säure zu einer Verringerung der Ladung (Q) auf $-0,07$ gegenüber $+0,017$ in der freien hypochlorigen Säure führt. Es ist zu erwarten, dass dies den nukleophilen Angriff des Tryptophans am Chlor erleichtert. Der sterische Einfluss von E346 sollte für die exakte Positionierung der hypochlorigen Säure mit entscheidend sein und der elektronische Einfluss für die Ermöglichung der Chlorierung von Tryptophan durch die hypochlorige Säure. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der E346D-Mutante zeigt eindeutig, dass das Aspartat weder einen Einfluss auf die korrekte Positionierung noch auf die Ladung des Chlors ausüben kann, da es im aktiven Zentrum im Gegensatz aller anderen Aminosäuren und des Flavins völlig anders orientiert vorliegt als das Glutamat (Abb. 2). Das sich aus diesen Daten ergebende Postulat für den Einfluss der Aminosäuren K79 und E346 auf den Ablauf der Reaktion ist in Abb. 3 dargestellt.

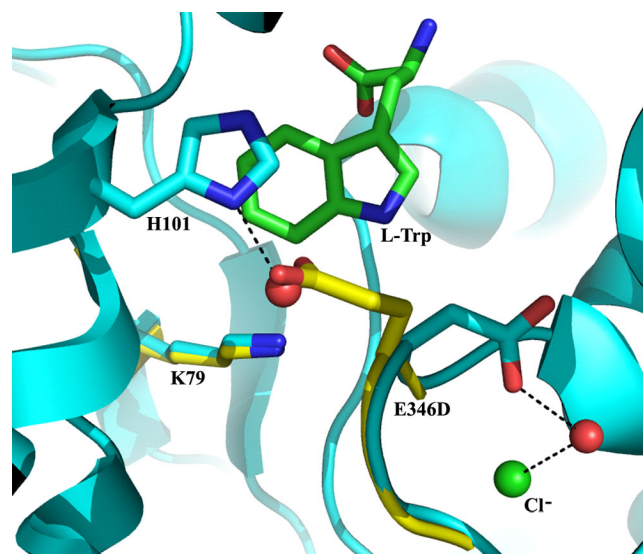


Abb. 2: Aktives Zentrum der E346D-Mutante (Kohlenstoffe in cyan). Das Wildtyp-Enzym ist in gelb dargestellt. Die Mutation führt zu keiner Veränderung bei K79, Cl⁻, Tryptophan oder FAD. Die Seitenkette von E346D hat ein Wassermolekül aus dem Wildtyp-Enzym ersetzt.

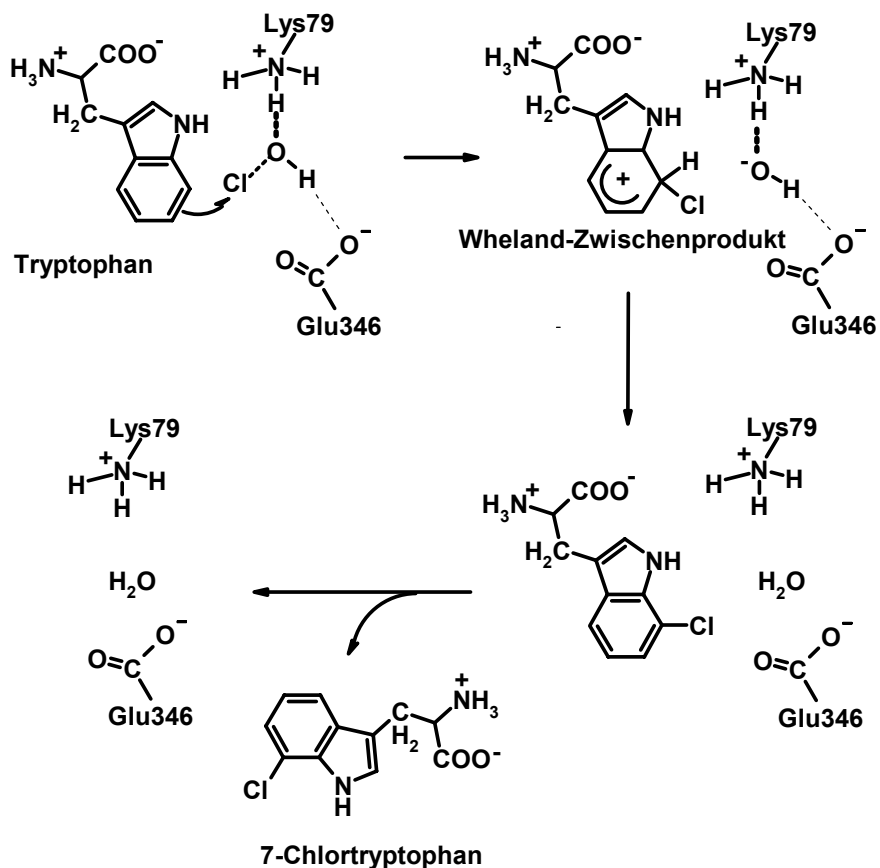


Abb. 3: Vorgeschlagerener Mechanismus für die regioselektive Chlorierung von Tryptophan, der die Beteiligung von K79 und E346 zur Erhöhung der Elektrophilie der Chlorspezies und für ihre korrekte Positionierung für den Einbau in die 7-Position zeigt. Die starke Wechselwirkung des HOCl-Sauerstoffs mit der protonierten ϵ -Aminogruppe von K79 ist durch eine dick gestrichelte Linie und die schwache Wechselwirkung des HOCl-Wasserstoffs mit der Carboxylatgruppe von E346 durch eine dünne gestrichelte Linie dargestellt.

Der Lysinrest an Position 79 wurde gegen einen Tyrosinrest ausgetauscht, um zu prüfen, ob dieser durch die hypochlorige Säure im aktiven Zentrum chloriert werden kann und damit chloriertes Enzym entsteht. Hierzu wurde das veränderte Enzym gereinigt, durch Proteaseverdauung fragmentiert, die Fragmente durch SDS-Gelelektrophores aufgetrennt und das Fragment, das die Veränderung trägt, mit MALDI-TOF untersucht. Der Austausch des Lysinrests gegen den Tyrosinrest konnte hiermit zwar bestätigt werden, aber es gab keinen Hinweis auf eine Chlorierung des Tyrosinrests. Eine Erklärung für diesen Befund haben wir noch nicht.

Bei den Aminosäureresten Y444 und Y443 handelt es sich um Reste, die nicht direkt an der Reaktion beteiligt sind, sondern durch Wechselwirkungen mit der Aminogruppe des Tryptophans an der Bindung des Substrats beteiligt sind (Abb. 1). Es stellt sich heraus, dass der Austausch des Tyrosins an Position 343 gegen einen Phenylalaninrest, wodurch keine Wasserstoffbrückenbindung zur Aminogruppe des Tryptophans mehr möglich ist, keinen Einfluss auf die Aktivität, sondern nur auf Bindung des Substrats hat und der K_m -Wert durch die Mutation auf das 12fache ansteigt ($K_m = 363,6 \mu\text{M}$). Der entsprechende Austausch des Tyrosinrests an der Position 444 (Y344F) hat sogar einen Anstieg des K_m -Werts auf das 15fache zur Folge. In keinem Fall kam es jedoch zu einer so drastischen Veränderung der Substratbindung, dass die Regioselektivität beeinflusst wurde; als Produkt konnte in allen Fällen nur 7-Chlortryptophan nachgewiesen werden.

Die beiden Tryptophanreste W272 und W274 sind in allen bisher bekannten Flavin-abhängigen Halogenasen absolut konserviert, unabhängig davon, welches Substrat sie halogenieren. Daher, und auch aufgrund ihres Abstands zu den an der Reaktion direkt beteiligten Aminosäureresten kann davon ausgegangen werden, dass auch sie nicht direkt an der Reaktion beteiligt sind, sondern eine andere Aufgabe haben. Wir hatten postuliert, dass diese beiden großen Aminosäuren den Platz in der Nähe des Isoalloxazinrings für die Bindung potentieller organischer Substrate blockieren und damit verhindern, dass die Enzyme als Monooxygenasen fungieren (Dong et al., 2005). Die beiden Tryptophanreste wurden daher einzeln gemeinsam gegen Phenylalaninreste und auch gegen Alaninreste ausgetauscht. War es nicht überraschen, dass die Austusche gegen Phenylalanin keinerlei Auswirkungen auf die Aktivität der Halogenase hatten, überraschte es doch, dass der Austausch des Tryptophans an Position 272 gegen Alanin ebenfalls keine signifikante Auswirkungen auf die Aktivität wie auch den K_m -Wert hatten (Tabelle 1). Dagegen führte der Austausch W274A, das näher am Isoalloxazinring platziert ist, zu inaktivem Enzym. Im Fall der Doppelmutante, bei der beide Tryptophanreste gegen Alaninreste ausgetauscht sind, konnte keine Bildung der Halogenase beobachtet werden (Tabelle 1). Der Verlust an Aktivität im Fall der Mutante W274A im Gegensatz zur Mutante W274F unterstützt die Hypothese, dass dieser Tryptophanrest für die Enzyme sehr wichtig ist und der Einfluss etwas mit der Größe des Aminosäurerests zu tun hat.

Tabelle 1: K_m - und V_{max} -Werte der Wildtyp-PrnA und einiger Mutanten, erhalten aus Hanes-Diagrammen

Enzym	K_m [μM]	V_{max} [pmol min^{-1}]
PrnA	$17,1 \pm 4.4$	43 ± 4
PrnA_S347A	$10,0 \pm 3.4^{[a]}$	$17 \pm 1,2^{[a]}$
PrnA_W272F	$13,3 \pm 3.0$	67 ± 2
PrnA_W274F	$22,3 \pm 2.9$	45 ± 3
PrnA_W272F_W274F	$17,5 \pm 1.5$	88 ± 8
PrnA_W272A	$29,6 \pm 2.1$	74 ± 5
PrnA_W274A	keine Aktivität	keine Aktivität
PrnA_W272A_W274A	kein Enzym	kein Enzym

[a]Aufgrund der geringen Aktivität dieser Mutanten war es schwierig, die kinetischen Daten genau zu ermitteln.

Paulsen et al. (2005) hatten festgestellt, dass das Pyrrolnitrin-Biosynthesegen-Cluster nicht nur aus den vier Genen PrnA-D besteht, sondern dass noch weitere Gene dazugehören, darunter das Gen einer Flavin-Reduktase (PrnF), das allerdings in *E. coli* nicht benötigt wird (Hammer et al., 1997). Um die Frage zu klären, ob zwischen der Flavin-Reduktase PrnF und der Halogenase PrnA ein direkter Kontakt während der Halogenierungsreaktion besteht, wurde das Gen der Flavin-Reduktase kloniert und in *Pseudomonas fluorescens* BL915 exprimiert. Das Enzym wurde zur Homogenität gereinigt und charakterisiert. Dabei stellt es sich heraus, dass diese Flavin-Reduktase sehr viel stabiler ist, als bisher bekannt Flavin-Reduktasen und daher besonders gut geeignet ist, als FADH_2 -Quelle für die Flavin-abhängigen Halogenasen eingesetzt zu werden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur direkten Interaktion zwischen Halogenase und Flavin-Reduktase haben keinen Hinweis auf eine Komplexbildung ergeben. Daher wird zurzeit davon ausgegangen, dass kein direkter Kontakt zwischen den beiden Enzymkomponenten notwendig ist.

Literatur

Dairi T, Nakano T, Aisaka K, Katsumata R, Hasegawa M (1995) Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci Biotech Biochem* 59: 1099-1106.

Dong C, Flecks F, Unversucht S, Haupt C, van Pée K-H, Naismith JH (2005) The structure of tryptophan 7-halogenase (PrnA) suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science* 309: 216-219.

Hammer PE, Hill, DS, Lam ST, van Pée K-H, Ligon JM (1997) Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl Environ Microbiol* 63: 2147-2154.

Hohaus K, Altmann A, Burd W, Fischer I, Hammer PE, Hill DS, Ligon JM, van Pée K-H (1997) NADH-dependent halogenases are more likely to be involved in halometabolite biosynthesis than haloperoxidases. *Angew Chem Int Ed Engl* 36: 2012-2013.

Keller S, Wage T, Hohaus K, Hölzer M, Eichhorn E, van Pée K-H (2000) Purification and partial characterization of tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Angew Chem Int Ed* 39: 2300-2302.

Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GSA, Mavrodi DV, DeBoy RT, Seshadri R, Ren Q, Madupu R, Dodson RJ, Durkin AS, Brinkac LM, Daugherty SC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Gwinn ML, Zhou L, Schneider DJ, Cartinhour SW, Nelson WC, Weidman J, Watkins K, Tran K, Khouri H, Pierson EA, Pierson III LS, Thomashaw LS, Loper JE (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnol* 23: 873-878.

Sanchez C, Butovich IA, Brana AF, Rohr J, Mendez C, Salas JA (2002). The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin. Characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol* 9: 519-531.

Yeh, E, Ganeau, S, Walsh, C (2007) Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry* 46: 1284-1292.