

Abschlussbericht zum Max-Buchner-Forschungsstipendium „Enzymatische Umlagerung von Tryptophan in ein Phenylpyrrol-Derivat“ (Kennziffer 2873)

Pyrrolnitrin [3-Chlor-4-(2-nitro-3-chlorphenyl)pyrrol] wurde 1964 von Arima et al. erstmalig isoliert und seine Struktur aufgeklärt (Imanaka et al., 1965). Pyrrolnitrin ist ein antifungisch wirkendes Antibiotikum, das von verschiedenen Bakterien wie Pseudomonaden, Burkholderia-Stämmen und Myxobakterien synthetisiert wird (Ligon et al., 2000). Die Biosynthese von Pyrrolnitrin leitet sich von der aromatischen Aminosäure Tryptophan ab und wurde seit Mitte der 1960er Jahre von verschiedenen Arbeitsgruppen intensiv untersucht. Die endgültige Aufklärung des Biosyntheseverlaufs gelang durch die Klonierung des Biosynthesegen-Clusters durch Hammer et al. (1997) und die Identifizierung der einzelnen Biosyntheseschritte durch Kirner et al. (1998). Die Biosynthese von Pyrrolnitrin enthält einige sehr interessante und ungewöhnliche Reaktionen. Der erste Schritt ist die regioselektive Chlorierung von Tryptophan in der 7-Position durch die Tryptophan-7-Halogenase PrnA (Abb. 1). Dieses Enzym wurde als erster Vertreter der Klasse der Flavin-abhängigen Halogenase untersucht. Anhand dieses Enzyms gelang die erstmalige Aufklärung der dreidimensionalen Struktur einer Flavin-abhängigen Halogenase und die Aufklärung des prinzipiellen Reaktionsmechanismus dieser Enzyme (Dong et al., 2005; Flecks et al., 2008).

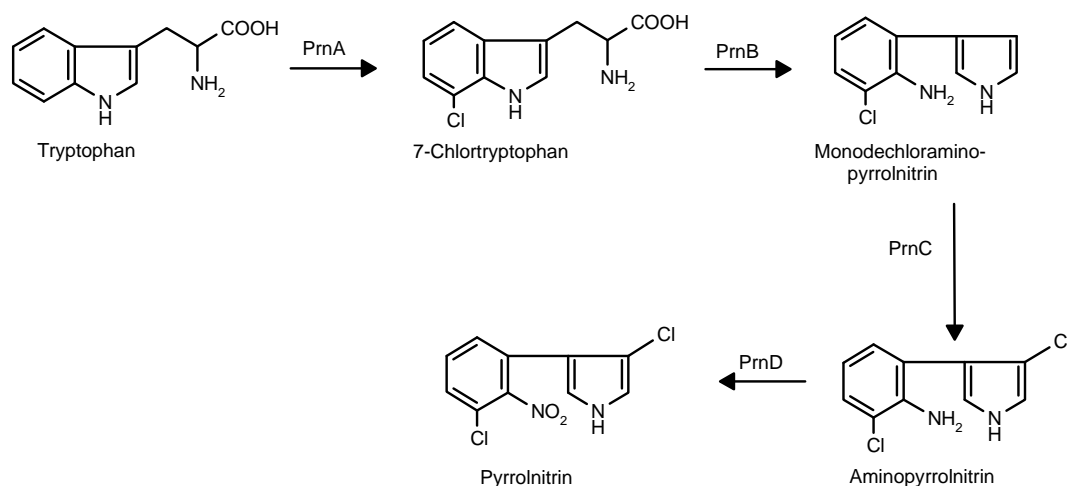


Abb. 1: Pyrrolnitrin-Biosynthese nach Kirner et al. (1998)

Der zweite Schritt, katalysiert durch PrnB, stellt eine sehr ungewöhnliche Ringumwandlung dar. Hierbei wird aus dem Indolringsystem des Tryptophans ein Phenylpyrrolringsystem. Bei dieser Ringumwandlung bleiben alle C- und N-Atome des Tryptophans erhalten; nur die Carboxylgruppe geht verloren. Die Aminosäuresequenz von PrnB gibt keine Hinweise auf eine Verwandtschaft zu bereits bekannten Enzymen. Bei der Reinigung von PrnB zeigte es sich, dass PrnB ein hämhaltiges Enzym ist (De Laurentis et al., 2007). Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur ergab überraschenderweise eine große strukturelle Verwandtschaft zur Tryptophan-2,3- bzw. Indolamin-2,3-Dioxygenase. Während bei der Reaktion der Tryptophan-2,3- bzw. der Indolamin-2,3-Dioxygenase zwei Sauerstoffatome eingebaut werden und N-Formylkynurenin entsteht, enthält Monodechloraminopyrrolnitrin (MCAP), das Produkt der durch PrnB katalysierten Reaktion, kein Sauerstoffatom und die Öffnung des Indolrings erfolgt nicht wie bei der Bildung von N-Formylkynurenin zwischen C2 und C3 des Indolrings, sondern zwischen dem Indolringstickstoff und dem C2 des Indolrings. Daher kann es nur zu Beginn der beiden Reaktionen Gemeinsamkeiten geben

(obere Reihe in Abb. 2); der spätere Verlauf muss sich aber stark unterscheiden (Abb. 2, Zhu et al., 2010; Naismith, 2012).

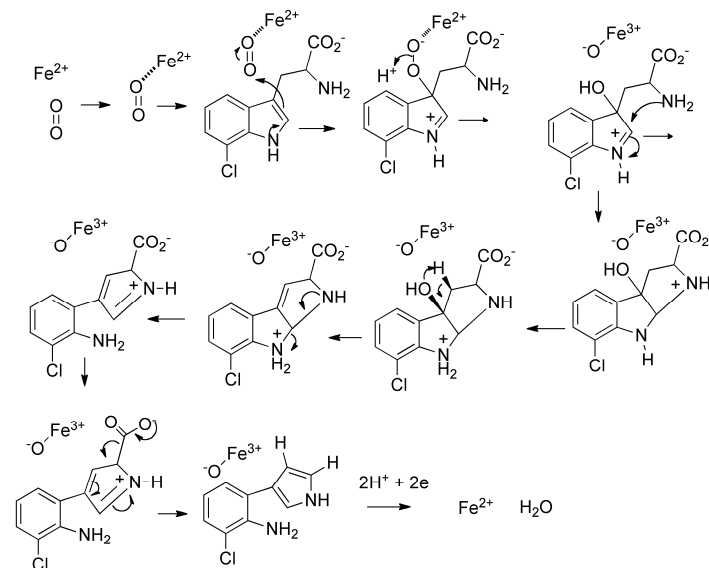


Abb. 2: Vorgeschlagener Mechanismus für die von PrnB katalysierte Reaktion (Zhu et al., 2010)

In Abb. 2 ist zu sehen, dass für die Regeneration von PrnB nach der Reaktion zwei Elektronen benötigt werden. Woher diese Elektronen kommen, war eine der Fragen, die im Rahmen dieses Projekt beantwortet werden sollten. Desweiteren sollte versucht werden, PrnB in aktiver Form zu reinigen, da es bisher nur gelungen war, PrnB in inaktiver Form zu reinigen und die dreidimensionale Struktur des inaktiven Enzyms aufzuklären.

Für diese Untersuchungen war es von großem Vorteil, dass PrnB im zellfreien Rohextrakt mit 7-Chlortryptophan als Substrat Aktivität zeigt. Da dem für die Bildung von PrnB verwendeten Stamm die anderen Gene für die Pyrrolnitrin-Biosynthese fehlen, kann der Wirtstamm kein 7-Chlortryptophan bilden, so dass es keinen Hintergrund an in den Zellen gebildetem MCAP gibt. Da PrnB auch L-Tryptophan als Substrat akzeptiert und dieses zu 3-(2-Aminophenyl)pyrrole umsetzt, ist diese Verbindung im zellfreien Rohextrakt vorhanden, stört aber den Aktivitätstest auf der Basis von 7-Chlortryptophan als Substrat nicht.

Von besonderer Bedeutung war die Beobachtung, dass PrnB nach Dialyse die Aktivität verliert. (Abb. 3 und 4). Dies führte zu der Vermutung, dass entweder eine niedermolekulare Verbindungen oder ein kleineres Protein durch die Poren des Dialyseschlauchs diffundiert und somit für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Daher wurde nach Dialysieren des Rohextrakts gegen das 50fache Volumen entionisiertes Wasser dieses Dialysewasser am Rotationsverdampfer bei 45 °C auf 1/200stel eingengt und davon etwas zum Enzymtest gegeben. Dies führte zu einer Reaktivierung von PrnB (Abb. 3).

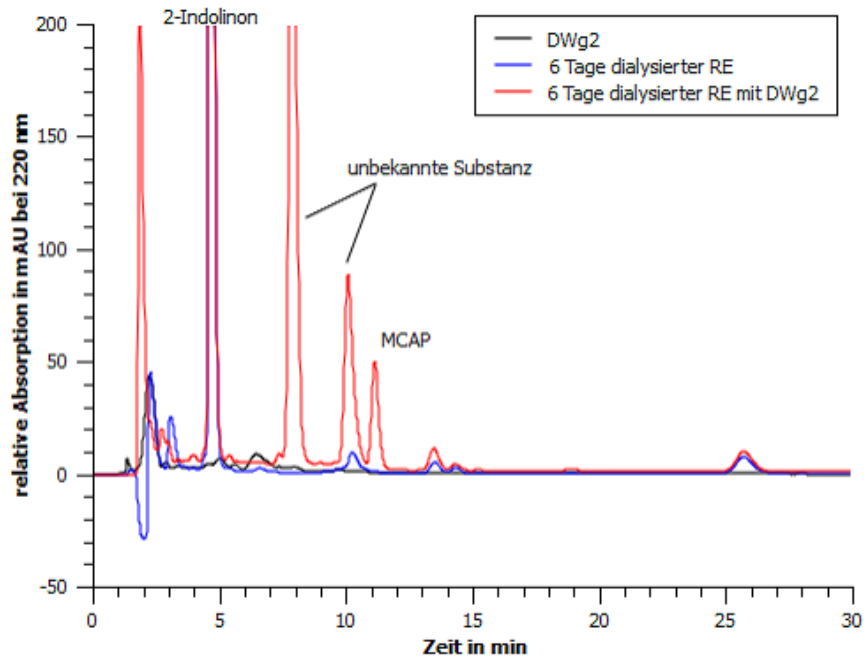


Abb. 3: Inaktivierung von PrnB durch Dialyse und Reaktivierung durch die Zugabe von konzentriertem Dialysewasser (DWg2).

Um größere Mengen der reaktivierenden Komponente(n) für eine Identifizierung zu erhalten, wurde Rohextrakt einer Mutante hergestellt, in der die Pyrrolnitrin-Biosynthesegene deletiert worden waren, die aber noch die unbekannt, PrnB-reaktivierende(n) Komponente(n) enthalten sollte. Mit diesem Rohextrakt war es möglich, durch Dialyse inaktiviertes PrnB zu reaktivieren (Abb. 4).

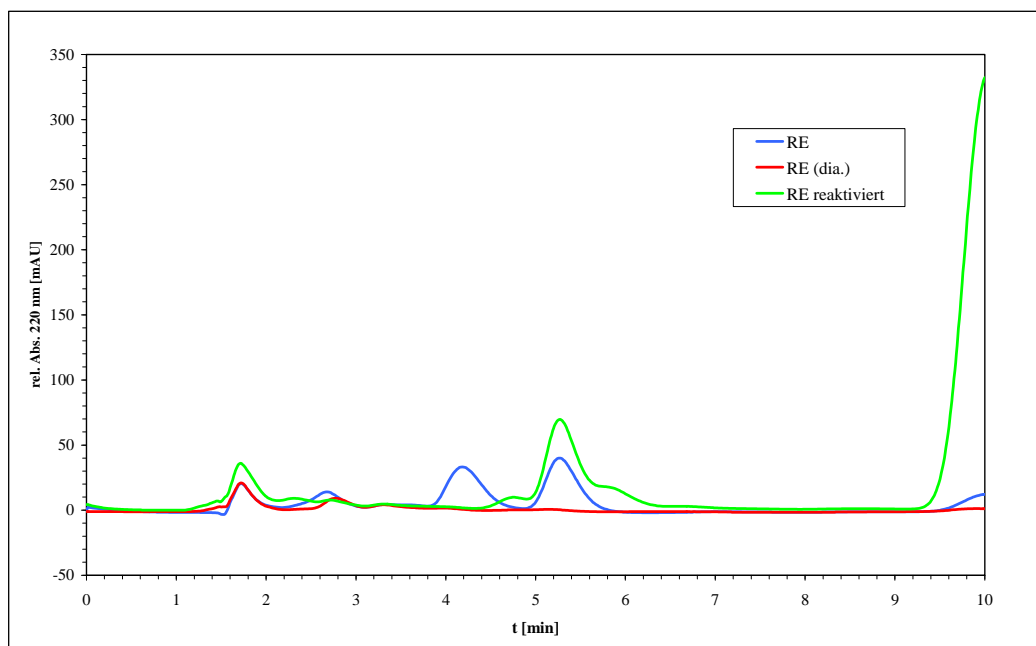


Abb. 4: Reaktivierung von PrnB mit einem Rohextrakt aus einem *Pseudomonas fluorescens* Stamm, in dem die Pyrrolnitrin-Biosynthesegene deletiert worden waren.

Die Untersuchung der Temperaturstabilität der unbekannt, aktivierenden Komponente(n) ergab, dass diese Verbindung(en) sehr temperaturstabil sind; selbst nach Kochen erfolgte noch eine Reaktivierung auf ~40% im Vergleich zum unbehandelten Rohextrakt der Mutante. Dieser Befund deutet darauf hin, dass es sich bei der reaktivierenden Komponente eher nicht um ein Protein handelt.

Nach Reinigung des Enzyms über His-Tag mittels Nickel-Chelatchromatographie war das Enzym zwar homogen, aber es gelang nicht, es wieder mit Rohextrakt der Deletionsmutante zu reaktivieren.

Dadurch, dass aus noch ungeklärten Gründen die Inaktivierung durch Dialyse plötzlich nicht mehr reproduziert werden konnte, wurde nun versucht, das Enzym über Ionenaustauschchromatographie anzureichern. Dabei war PrnB sowohl im Durchlauf als auch in Fraktionen, die durch Gradientenelution erhalten wurden, zu finden (Abb. 5). Allerdings konnte nur im Durchlauf Aktivität gefunden werden; die PrnB-haltigen Fraktionen der Gradientenelution zeigten keine Aktivität und konnten auch nicht durch Rohextrakt der Deletionsmutante reaktiviert werden (Abb. 6).

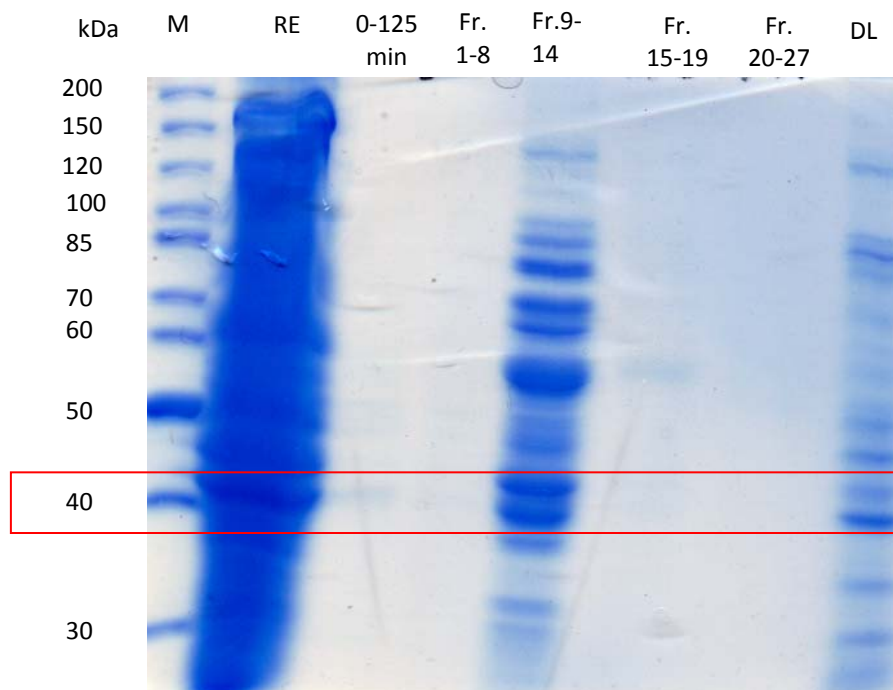


Abb. 5: SDS-Polyacrylamidgelelektrophores von PrnB-haltigem Rohextrakt (RE), Fraktionen der Spülung der Anionenaustauschchromatographie (0-125 min), Fraktionen der Gradientenelution (Fr.) und des Durchlaufs (DL). Der Bereich, in dem PrnB zu finden ist, ist rot umrahmt.

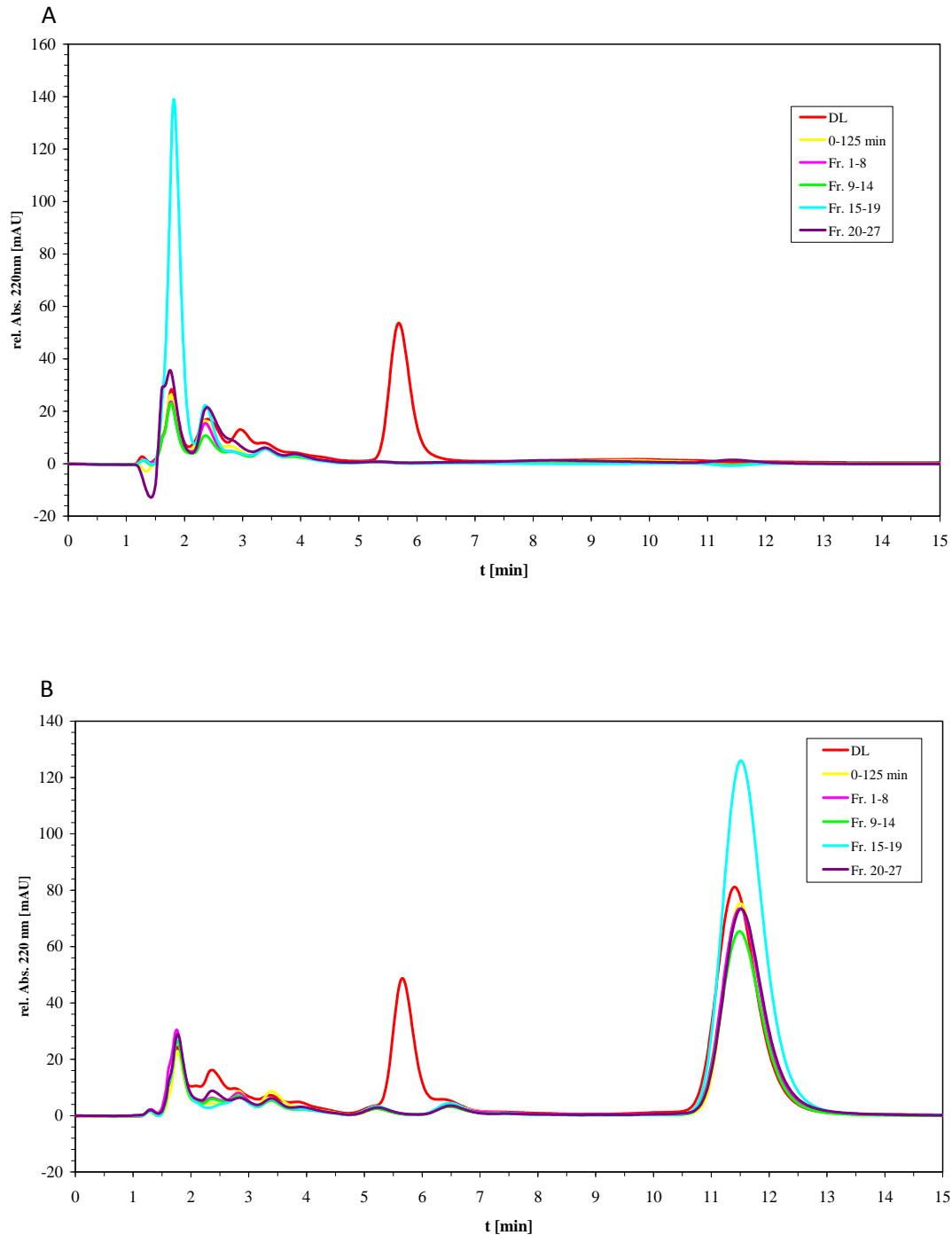


Abb. 6: HPLC-Chromatogramm des PrnB-Aktivitäts-Tests von (A) Durchlauf und Fraktionen der Gradientenelution der Ionenaustauschchromatographie und (B) des Durchlaufs und der Fraktionen in Gegenwart von Rohextrakt der Deletionsmutante.

In weiteren Untersuchungen soll nun geklärt werden, weshalb das PrnB aus dem Durchlauf aktiv ist und das, was an die Säule gebunden hat, inaktiv ist. Desweiteren soll versucht werden, das PrnB aus dem Durchlauf unter Erhalt der Aktivität weiter zu reinigen, um letztendlich homogenes, aktives PrnB zu erhalten.

Insgesamt muss konstatiert werden, dass PrnB ein sehr ungewöhnliches Enzym ist und das Verständnis dieses Enzymes durch die Tatsache, dass es in den Datenbanken kein homologes Enzym gibt, nicht gerade erleichtert wird. Andererseits erhöht gerade diese Tatsache den Reiz an den Arbeiten zu PrnB.

Literaturangaben

- Arima, K., H. Imanaka, M., Kousaka, A., Fukuda, and G. Tamura (1964) Pyrrolnitrin, a new antibiotic produced by *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.* **28**, 575-576.
- De Laurentis, W., L. Khim, J. L. R. Anderson, A. Adam, R. S. Phillips, S. K. Chapman, K.-H. van Pee, J. H. Naismith (2007) The second enzyme in pyrrolnitrin biosynthetic pathway is related to the heme-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **46**, 12393-12404.
- Dong C., S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith (2005) Tryptophan 7-halogenase structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science* **309**, 2216-2219.
- Flecks, S., E. P. Patallo, X. Zhu, A. J. Ernyei, G. Seifert, A. Schneider, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée (2008) New insights into the mechanism of enzymatic chlorination of tryptophan. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 9533-9536.
- Hammer, P. E., D. S. Hill, S. T. Lam, K.-H. van Pée, J. M. Ligon (1997) Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2147-2154.
- Imanaka, H., M. Kousaka, G. Tamura, K. Arima (1965) Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. III. Structure of pyrrolnitrin. *J. Antibiotics* **18**, 207-210
- Kirner, S., P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K.-H. van Pée, J. M. Ligon (1998) Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **180**, 1939-1943.
- Ligon, J. M., D. S. Hill, P. E. Hammer, N. R. Torkewitz, D. Hofmann, H.-J. Kempf, K.-H. van Pée (2000) Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag. Sci.* **56**, 688-695.
- Naismith, J. H. (2012) Tryptophan oxygenation: mechanistic considerations. *Biochem. Soc. Transact.* **40**, 509-514.
- Zhu, X., K.-H. van Pee, J. H. Naismith. (2010) The ternary complex of PrnB (the second enzyme in pyrrolnitrin biosynthesis pathway), tryptophan and cyanide yields new mechanistic insights into the indolamine dioxygenase superfamily. *J. Biol. Chem.*, **285**, 21126-21133.

**Abstract zum Abschlussbericht zum Max-Buchner-Forschungsstipendium
„Enzymatische Umlagerung von Tryptophan in ein Phenylpyrrol- Derivat“ (Kennziffer
2873)**

PrnB katalysiert den zweiten Schritt in der Biosynthese des antifungisch wirkenden Antibiotikums Pyrrolnitrin, die Umwandlung von 7-Chlortryptophan in das Phenylpyrrolderivat Monodechloraminopyrrolnitrin. PrnB ist ein Hämenzym und seine 3-dimensionale Struktur hat große Ähnlichkeiten zu Tryptophan-2,3-Dioxygenase. PrnB benötigt für die Regeneration eine noch nicht identifizierten Cofaktor, der temperaturstabil ist und durch Dialyse vom Enzym abgetrennt werden kann.