

# Mechanismen der enzymatischen Bildung polycyclischer Triterpene

K. Ulrich Wendt, Georg E. Schulz,\* Elias J. Corey und David R. Liu\*

Die Mechanismen, nach denen Triterpen-Cyclasen Olefine in komplexe und biologisch bedeutsame polycyclische Produkte umwandeln, haben den Antrieb für fast ein halbes Jahrhundert intensiver Forschung geliefert. Neuere chemische und biologische Untersuchungen gewähren – gemeinsam mit älteren Ergebnissen – faszinierende Einblicke in den enzymatischen Mechanismus der Triterpenbildung und zeichnen ein erstaunlich detailliertes

Bild dieser eleganten Katalysatoren. So lässt sich folgern, dass die Rolle der Oxidosqualen-Cyclasen bei der Umagerung in der Abschirmung der intermediär gebildeten Carbokationen gegen die Anlagerung von Wasser oder die Deprotonierung durch Basen besteht und dadurch die Hydrid- und Methylgruppenwanderungen entlang einer thermodynamisch und kinetisch günstigen Kaskade möglich werden. Im Ausblick werden einige Fragen im

Bereich der Strukturbioologie, der strukturbasierten Mutagenese und der gerichteten Evolution vorgestellt, denen man sich nun im Lichte der Struktur einer Triterpen-Cyclase zuwenden kann.

**Stichwörter:** Bioorganische Chemie • Cyclasen • Enzymkatalyse • Steroide • Strukturbioologie

## 1. Einleitung

Seit fast einem halben Jahrhundert üben die bemerkenswerten enzymatischen Cyclisierungen von Squalen **1** und 2,3-Oxidosqualen **2** (siehe Abbildung 1) zu polycyclischen Triterpenen Faszination aus und sind zugleich eine Herausforderung in den Molekülwissenschaften.<sup>[1–10]</sup> Diese Polyolefine werden von einer großen Zahl von Mikroorganismen und höheren Eukaryonten in einer einzigen enzymkatalysierten Reaktion stereoselektiv cyclisiert und in ihrem Kohlenstoffgerüst umgelagert. Als Reaktionsprodukte entstehen tetra- und pentacyclische Triterpenoide wie Hopen **3**, Diplopterol **4**, Tetrahymanol **5**, Lanosterin **6**, Cycloartenol **7** und  $\beta$ -Amyrin **8** (Abbildung 1). Diese Triterpene dienen ihrerseits als Ausgangsverbindungen für sämtliche Hopanoide und Steroide (einschließlich Cholesterin, Glucocorticoide, Östrogene, Androgene und Progesterone). Bereits vor knapp einem halben

Jahrhundert erweckte die durch die Triterpen-Cyclasen katalysierte außergewöhnlich leistungsfähige und effiziente Umwandlung das Interesse führender Organiker.<sup>[1–9, 11]</sup> Sie identifizierten Oxidosqualen als Intermediat der Steroid-Biosynthese und klärten sowohl den stereochemischen Verlauf der Cyclisierung als auch die nachfolgenden 1,2-Hydrid- und Methylgruppenwanderungen auf.<sup>[3–9]</sup> Um den Bereich an Strukturen, die von den Triterpen-Cyclasen umgewandelt werden können, und das Spektrum der Produkte abzustecken, konzentrierte man sich zunächst auf die Verwendung von Substratanaloga.<sup>[9]</sup> Diese chemischen Studien lieferten nützliche mechanistische Informationen, die in jüngerer Zeit unter Zuhilfenahme molekular- und strukturbioologischer Methoden um eine Vielfalt neuer Daten ergänzt wurden. Als Ganzes betrachtet, bieten diese Ergebnisse überraschend detaillierte Einblicke in die komplexe Abfolge der bei der Squalen- und Oxidosqualen-Cyclisierung beteiligten molekularen Schritte. Nachfolgend geben wir einen Überblick über die Arbeiten, die Licht in die Komplexität der Triterpen-Cyclisierung gebracht haben.

## 2. Der Reaktionsverlauf: chemische Untersuchungen

Trotz zahlreicher Versuche, die leistungsfähige enzymkatalysierte Einstufenreaktion (Abbildung 2) nachzuahmen, ist eine effiziente Bildung von tetra- oder pentacyclischen Triterpenen aus Squalen **1** oder Oxidosqualen **2** in einem rein nichtenzymatischen Experiment bisher nicht gelungen. Die Bildung eines sechsgliedrigen Rings durch intramolekulare Addition eines Carbokations an eine C-C-Doppelbin-

[\*] Prof. Dr. G. E. Schulz, Dr. K. U. Wendt<sup>[†]</sup>  
Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 761-203-6161  
E-mail: schulz@chemie.uni-freiburg.de

Prof. Dr. D. R. Liu, Prof. Dr. E. J. Corey  
Department of Chemistry and Chemical Biology  
Harvard University  
12 Oxford Street, Cambridge, MA 02138 (USA)  
Fax: (+1) 617-496-5688  
E-mail: drliu@fas.harvard.edu

[†] Gegenwärtige Adresse:  
Aventis Pharma Deutschland, Strukturbioologie, Gebäude G865  
65926 Frankfurt am Main (Deutschland)

dung ist stark exotherm ( $\Delta E = E_{\sigma\text{-CC}} - E_{\pi\text{-CC}} \approx 20 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) und erfordert nur eine geringe Aktivierungsenergie (in Abhängigkeit von der Solvatisierung null bis einige  $\text{kcal mol}^{-1}$ ).<sup>[12]</sup> Kationische Cyclisierungen konformativ beweglicher Substrate sind somit schwierig zu kontrollieren, da zahlreiche Reaktionsvarianten mit geringer Aktivierungsenergie miteinander konkurrieren und zu einer Vielzahl von Produkten führen.

## 2.1. Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen

### 2.1.1. Substratkonformation

Es liegt daher auf der Hand, dass die hoch selektive Bildung von Produkten wie Lanosterin oder Hopen eine strenge enzymatische Kontrolle der Substratkonformationen voraussetzt. Wie in Abbildung 2 verdeutlicht, unterscheiden sich die durch die Enzyme bewirkten Substratkonformationen für die Bildung von Lanosterin und Hopen merklich. Während die Squalen-Hopen-Cyclasen eine Sessel-Sessel-Sessel-Konformation von Squalen zulassen, erzwingen die Oxidosqualen-

Lanosterin-Cyclasen eine Sessel-Boot-Sessel-Konformation ihres Substrats, wie anhand der Konfigurationen isolierter Intermediate deutlich wird, die nachfolgend beschrieben werden.

Experimente mit dem 20-Thia-Analogon **9** von Oxidosqualen (Abbildung 3) unter Verwendung der Lanosterin-Synthase aus *S. cerevisiae* ergaben, dass diese Verbindung weder ein Substrat noch ein effizienter Inhibitor für das Enzym ist.<sup>[13]</sup> Völlig anders verhält es sich mit 20-Oxaoxidosqualen **10**<sup>[13, 14]</sup>, das zu zwei tetracyclischen Produkten cyclisiert wird (siehe unten). Es wurde diskutiert, dass das im Vergleich zu einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe oder einem Sauerstoffatom größere Schwefelatom eine etwas andere Konformation bei **9** verursacht, die eine schwächere Bindung an die Cyclase und einen Enzym-Substrat-Komplex zur Folge hat, bei dem sich die katalytische Säuregruppe des Enzyms nicht in der richtigen Position befindet, um die Oxiran-Funktion zu aktivieren. Die in der Literatur beschriebene fehlende Aktivität der Lanosterin-Synthase aus Rattenleber gegenüber 11-Fluoroxidosqualen **11**<sup>[15]</sup> (Abbildung 3) könnte einen ähnlichen Grund haben, da das größere Fluoratom die Sessel-Boot-Sessel-Konformation wegen der sterischen Abstoßung mit der Methylgruppe an C6

Georg E. Schulz, geboren 1939 in Berlin, studierte an der Technischen Universität Berlin und an der Universität Heidelberg Physik und promovierte 1966 bei O. Haxel. Nach einem Postdoktorandenaufenthalt bei H. Wychoff und F. Richards an der Yale University ging er 1969 zu K. Holmes an das Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg und baute dort eine Arbeitsgruppe für Proteinkristallographie auf. Seit 1984 ist er Professor für Biochemie an der Universität Freiburg. Dort betreibt er eine Protein-Struktur-Funktions-Schule für Chemiestudenten.



G. E. Schulz



D. R. Liu



K. U. Wendt



E. J. Corey

David R. Liu, geboren 1973 in Riverside, Kalifornien, erhielt 1994 seinen BA-Abschluss in Chemie an der Harvard University, an der er bei E. J. Corey über die Biosynthese von Steroiden forschte. Er promovierte bei P. G. Schultz an der University of California, Berkeley, über In-vivo- und In-vitro-Methoden zum ortsspezifischen Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren in Proteine. 1999 wurde er Assistant Professor für Chemie und chemische Biologie an der Harvard University. Seine Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Chemie und Biologie der molekularen Evolution.

Karl Ulrich Wendt, geboren 1968 in Essen, erwarb sein Diplom (1994) und seinen Dokortitel in Chemie (1998) an der Universität Freiburg bei G. E. Schulz mit einer Arbeit über die Expression, Reinigung und Röntgenstrukturanalyse der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*. 1998 ging er als Postdoktorand zu den Arbeitsgruppen von P. G. Schultz und R. C. Stevens an die University of California, Berkeley. Dort erforschte er die Auswirkungen der Reifung von Antikörpern auf deren Struktur. Nach einem weiteren Postdoktoranden-Aufenthalt in der Proteinkristallographie-Gruppe der Abteilung Protein Engineering der Firma Genentec in South San Francisco, USA, ist er jetzt in der Strukturbioologie-Gruppe von Aventis tätig.

Elias J. Corey, geboren 1928 in Methuen (30 Meilen nördlich von Boston), studierte von 1945 bis 1950 Chemie am Massachusetts Institute of Technology und promovierte bei J. C. Sheenan mit einer Arbeit über synthetische Penicilline. 1951 ging er als Instructor in Chemistry an die University of Illinois in Urbana-Champaign; dort wurde er 1956 zum Professor ernannt. Seit 1959 forscht er an der Harvard University. So lange er zurückdenken kann, haben ihm Studieren, Abenteuer und Entdeckungen immer große Freude bereitet.

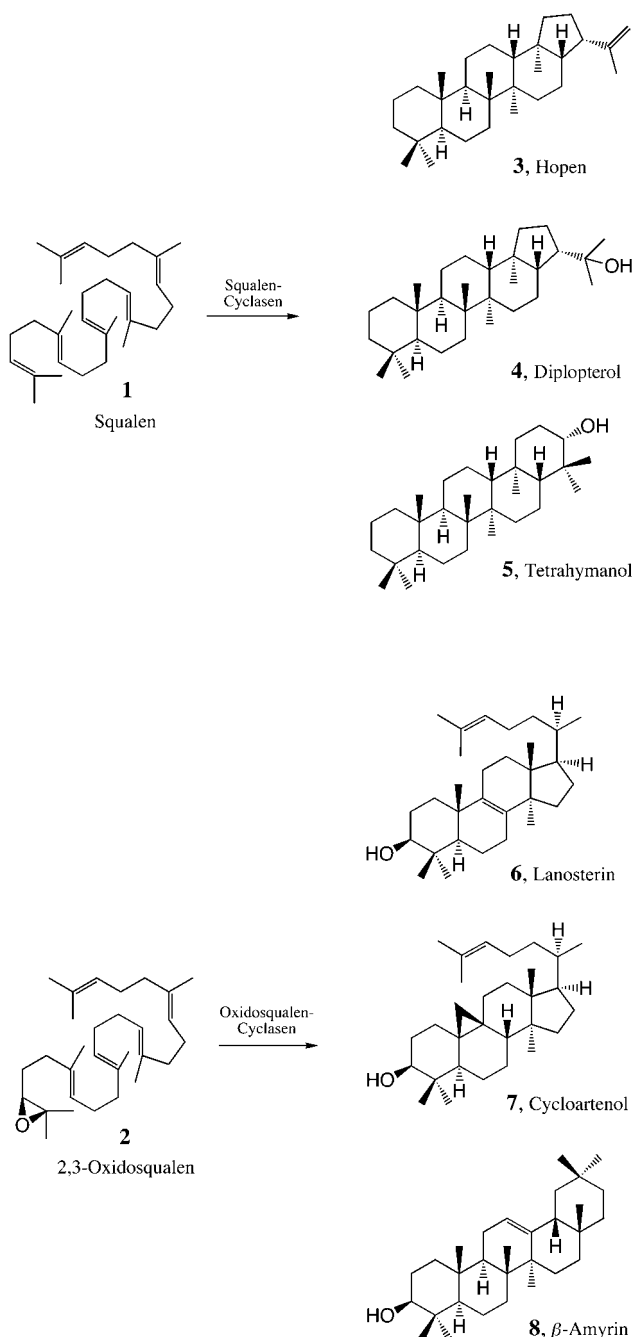


Abbildung 1. Substrate und Produkte von Triterpen-Cyclasen.

(siehe Abbildung 2) benachteiligen könnte. Dieses Argument impliziert die Annahme, dass das in der Enzymtasche bindende Konformer von Oxidosqualen eine molekulare Geometrie hat, die nach Beginn der Reaktion den Fortgang der Cyclisierung mit einem Minimum an konformativer Veränderung des Substrats ermöglicht. Aus chemischer Sicht ist diese Vorstellung attraktiv, da bei einem solchen Verlauf die Reaktionsvarianten begrenzt sind, die den intermediären Carbokationen zur Verfügung stehen, was einer optimalen Lenkung der Cyclisierungsreaktion hin zu einem einzigen Produkt entspricht.

In Einklang mit dem oben Diskutierten wurde berichtet, dass Oxidosqualen-Cyclase aus Rattenleber weder 14-Fluor-

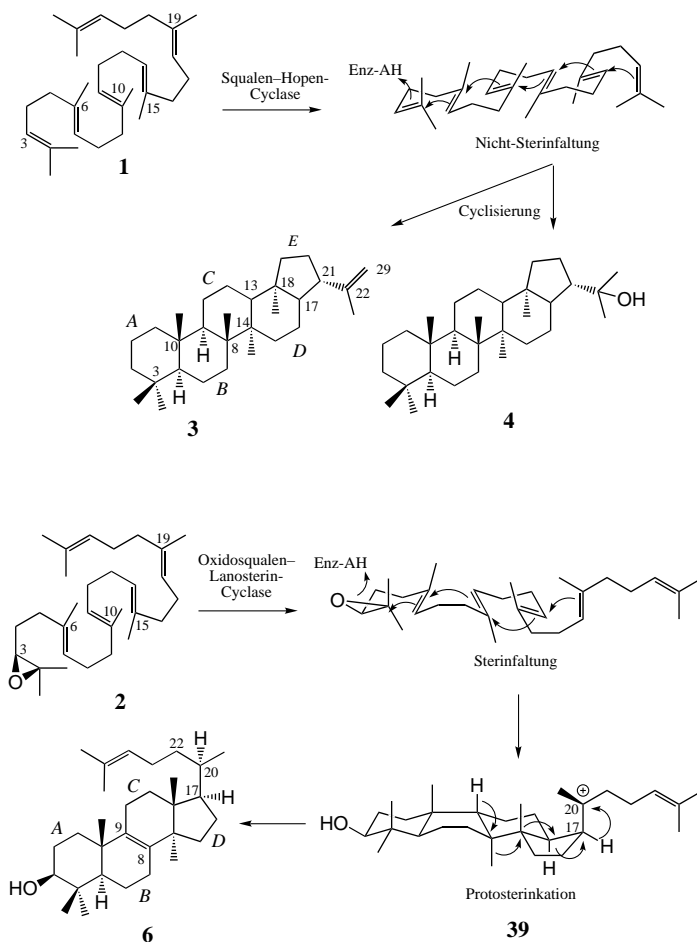


Abbildung 2. Mutmaßliche Substratkonformation und Gesamtmechanismus bei Reaktionen, die durch Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen und Squalen-Hopen-Cyclasen katalysiert werden.

oxidosqualen **12** noch 14,15-Dihydrooxidosqualen **13** (Abbildung 3) in cyclische Produkte überführt.<sup>[16]</sup> Möglicherweise geht der 14-Fluorsubstituent entweder mit der Methylgruppe an C10 oder einem nächsten Nachbarn in der Enzymtasche abstoßende Wechselwirkungen ein, was eine fehlerhafte Substratkonformation und einen Verlust an Oxiran-Aktivierung zur Folge hätte.

### 2.1.2. Oxiranöffnung und Bildung des A-Rings

Zu Beginn der chemischen Cyclisierung von Oxidosqualen muss eine elektrophile Oxiran-Aktivierung erfolgen. Oxidosqualen ist in neutralen Medien außerordentlich stabil. Auch in Eisessig liegt die Stabilität bei Raumtemperatur immer noch in der Größenordnung von einem Tag. Für eine Oxiran-Aktivierung, die hinreichend stark ist, um eine schnelle Cyclisierung zu ermöglichen, wird eine stärkere Brønsted-Säure wie etwa Trichloressigsäure benötigt.<sup>[10]</sup> Da ein einzelner Aspartatrest (D456) der Oxidosqualen-Cyclase (Lanosterin-Synthase) aus *S. cerevisiae* als entscheidend für die Cyclisierung identifiziert wurde<sup>[17, 18]</sup> und zudem Lewis-saure Metallionen im gereinigten Enzym nicht vorhanden sind,<sup>[17]</sup> wurde mit den Verbindungen **14–16** (Abbildung 4), die vereinfachte Modelle von Oxidosqualen sind, eine kinetische

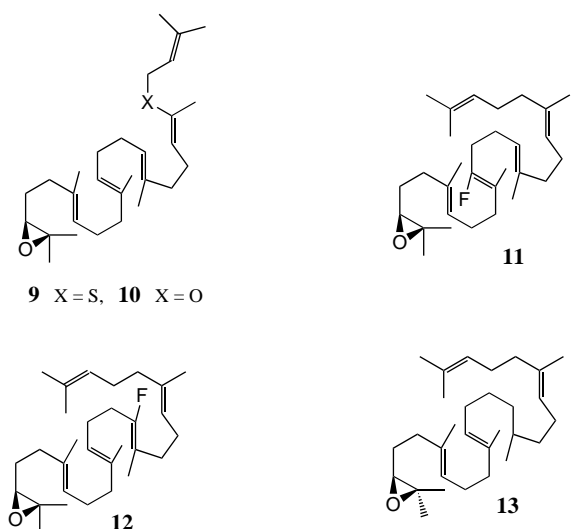


Abbildung 3. Analoga von Substraten der Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen, die Annahmen über die Substratkonformation in den enzymatischen Reaktionen ermöglichen.<sup>[13–16]</sup>

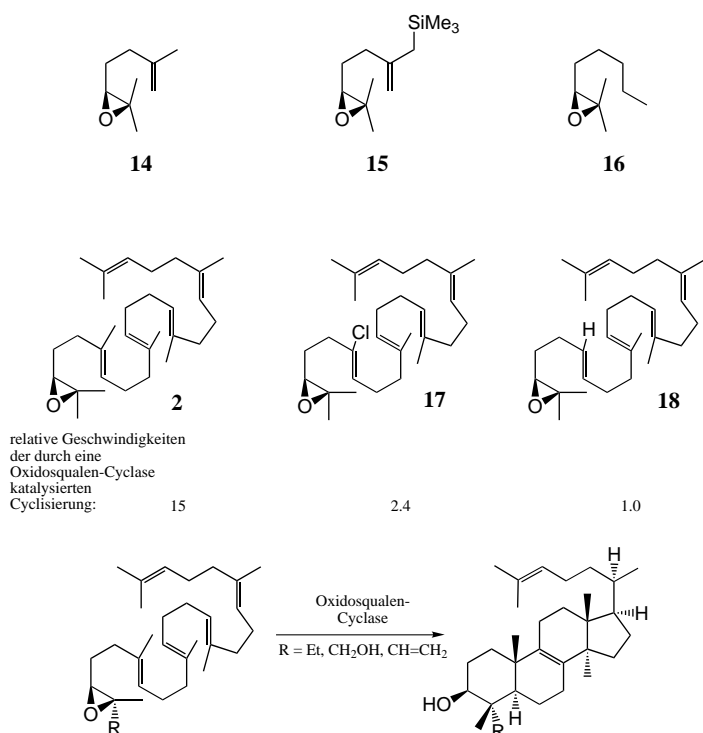


Abbildung 4. Hinweis auf einen konzertierten Ablauf von Oxiranöffnung und Schließung des A-Rings bei der Katalyse durch Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen.<sup>[17]</sup>

und mechanistische Untersuchung zur protonenkatalysierten Cyclisierung durchgeführt.<sup>[10]</sup>

Die Geschwindigkeiten der protonenkatalysierten Carbocyclisierungen von **14** und **15** waren erheblich höher als die Geschwindigkeit der protonenkatalysierten Bildung des Kations aus dem nichtcyclisierbaren Substrat **16**, was mit einem konzertierten Verlauf der Spaltung der C-O- und der Bildung der C-C-Bindung zum Cyclohexangerüst bei **14** und **15** in Einklang ist.<sup>[10]</sup> Wie zu erwarten, war die anchimere Unterstützung der C-O-Spaltung durch die benachbarte Doppel-

bindung bei dem stärker nucleophilen Olefin **15** größer als bei dem weniger  $\pi$ -nucleophilen Olefin **14**.<sup>[10]</sup> Da unter den möglichen Konformeren von **14** und **15** diejenigen mit einer für die Kation- $\pi$ -Olefin-Cyclisierung optimalen Geometrie lediglich einen kleinen Teil aller in Lösung anwesender Rotamere ausmachen, sollte die Cyclisierung der optimal vorgefalteten Konformere vermutlich sogar stärker anchimer beschleunigt sein. Somit könnte die Verknüpfung einer optimalen Platzierung des aktivierenden Protons relativ zum Oxiran-Sauerstoffatom mit einer optimalen Substratkonformation eine rasche katalytische Cyclisierung bewirken und Hinweise darauf liefern, wie eine katalytisch aktive Carbonsäuregruppe des Enzyms die Cyclisierung von Oxidosqualen einleiten könnte. Eine noch größere Beschleunigung ist aus chemischen und mechanistischen Gründen dann zu erwarten, wenn im Enzym der katalytischen Carbonsäuregruppe ein oder zwei Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren zur Verfügung stehen.

Aus frühen qualitativen Studien zu der durch Lewis-Säuren eingeleiteten Cyclisierung von Oxidosqualen-Analoga wurde abgeleitet, dass während der durch  $\text{SnCl}_4$  katalysierten Reaktion in Benzol Oxiranspaltung und Bildung des Cyclohexanrings konzertiert verlaufen.<sup>[19]</sup> Nach neueren kinetischen Untersuchungen katalysiert die Lanosterin-Synthase aus *S. cerevisiae* die Cyclisierung der Oxirane **2**, **17** und **18** mit den in Abbildung 4 angegebenen relativen Geschwindigkeiten. Die Korrelation zwischen den beobachteten Cyclisierungsgeschwindigkeiten und der  $\pi$ -Nucleophilie der 6,7-Doppelbindung der Substrate **2**, **17** und **18** ist ein zusätzliches Indiz für einen konzertierten Verlauf von C-O-Spaltung und Bildung des Rings A bei der enzymatischen Cyclisierung.<sup>[17]</sup> Die Konfiguration der Produkte der enzymatischen Cyclisierung von Oxidosqualen-Analoga, die sich im  $\alpha$ -C2-Substituenten unterscheiden (Abbildung 4),<sup>[20–23]</sup> zeigt, dass das Schließen des Rings A schneller erfolgt als die Rotation um die C2-C3-Bindung. Auch diese Beobachtung ist in Einklang mit einem konzertierten Mechanismus, obwohl sie ebenso anders interpretiert werden kann. Schließlich decken sich neuere Computersimulationen ebenfalls mit den experimentellen Ergebnissen und legen nahe, dass die Oxiranöffnung und die Bildung des Rings A konzertiert verlaufen.<sup>[12, 24]</sup>

### 2.1.3. Bildung des B- und des C-Rings

Sobald eine positive Ladung an C5 des A-Rings entstanden ist, erfolgt die Bildung des B-Rings als Bootkonformer wahrscheinlich sehr schnell. Es ist jedoch nicht bekannt, ob es eine zeitliche Überlappung der Bildung von A- und B-Ring gibt. Der Ringschluss des dritten Rings war ebenfalls lange Zeit rätselhaft, da die direkte Bildung eines sechsgliedrigen C-Rings einer Anti-Markownikow-Addition an eine Doppelbindung entsprechen würde. Die Bildung eines sechsgliedrigen Rings wäre allerdings stereoelektronisch etwas günstiger als eine Markownikow-Cyclisierung, die einen fünfgliedrigen Ring ergäbe. Eine Schlüsselinformation im Hinblick auf dieses Dilemma lieferten die Produkte der Cyclisierung des 20-Oxaosqualens **10** durch die Lanosterin-Synthase aus *S. cerevisiae*. Zusätzlich zum erwarteten 6-6-6-5-verknüpften Ringprodukt **19** (40 %) entstand das 6-6-5-Produkt **20** (3.4 %),

dessen Bildung sich am besten mit einem internen Abfangen des Carbokations **21** durch intramolekulare Reaktion mit der elektronenreichen 18,19- $\pi$ -Bindung erklären lässt (Abbildung 5).<sup>[13]</sup> Andere enzymatische Umsetzungen von Substrat-

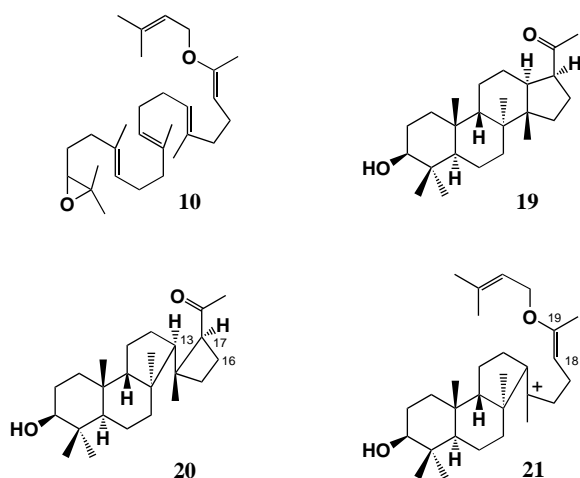


Abbildung 5. Substratanaloga und Produkte von Oxidosqualen-Cyclasen, die auf ein fünfgliedriges Intermediat des C-Rings hindeuten.<sup>[13]</sup>

analoge ergaben zusätzliche Hinweise auf das Schließen eines fünfgliedrigen Rings C und eine anschließende Ringerweiterung (Abbildung 6): Die Oxidosqualen-Cyclasen setzen 15-Ethylloxidosqualen **22** zu einer Mischung aus Ethyllanosterin und einem tricyclischen 6-6-5-Produkt im Verhältnis 71:29 um<sup>[25]</sup> und 18,19-Dihydrooxidosqualen **23** zu einem tricyclischen 6-6-5-Produkt.<sup>[26]</sup> Ferner wandeln sie **24**, das 20-C-Analogon von Oxidosqualen, in drei 6-6-5-Tricyclen um<sup>[27]</sup> und cyclisieren 10,15-Didesmethyloxidosqualen **25** überwiegend zu einem 6-6-5-4-System in Gestalt des Produkts **26**.<sup>[28]</sup> Die strukturelle Vielfalt dieser Substratanaloga lässt es unwahrscheinlich scheinen, dass sie alle nach Reaktionswegen cyclisieren, die keine Relevanz für den Weg des natürlichen Substrats haben. Beachtenswert ist die Tatsache, dass die zur Erklärung des stereochemischen Verlaufs der Umwandlung **25**  $\rightarrow$  **26** erforderliche Substratkonformation dem nichtsteroiden B-Sessel-Typ entspricht. Dies bedeutet nicht nur, dass die Cyclase den Unterschied zwischen Methyl- und Wasserstoffsubstituenten an C10 erkennt, sondern auch, dass dieses Strukturmerkmal entscheidend für die korrekte Selektivität bezüglich der Doppelbindungsseite bei der Schließung des B-Rings ist. Dieser Befund lässt zudem vermuten, dass in einigen Bereichen Substrat und Enzymtasche bemerkenswert genau zueinander passen. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Störungen des Substrats um die Positionen C10, C15 und C19 von Oxidosqualen die Fähigkeit des Enzyms, eine Ringerweiterung zu bewirken, gegenüber der zur weiteren Cyclisierung des C15-Carbokations herabsetzen. Weiterhin wird der Reaktionsverlauf über eine Umlagerung der 6-6-5- in die 6-6-6-Anordnung durch Ergebnisse aus Computersimulationen gestützt.<sup>[12]</sup>

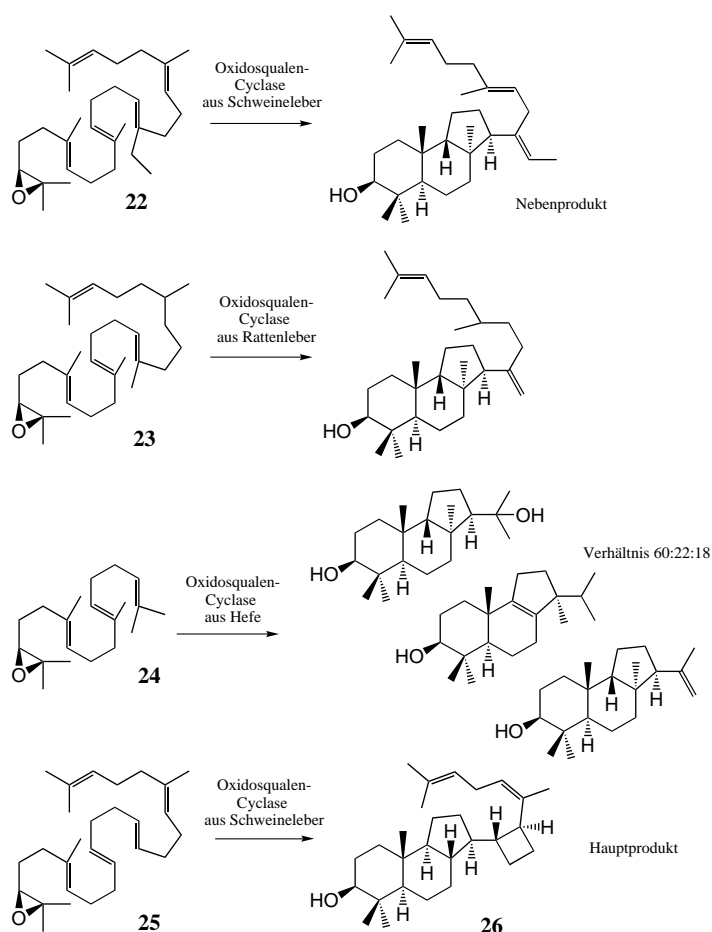


Abbildung 6. Von Oxidosqualen-Cyclasen gebildete 6-6-5-Cyclisierungsprodukte.<sup>[25–28]</sup>

#### 2.1.4. Bildung des Protosterinkations und Umlagerung zu Lanosterin

In älteren Arbeiten zum stereochemischen Verlauf der Sterinbiosynthese wurde vorgeschlagen, dass die enzymatische Umwandlung von Oxidosqualen in Lanosterin über ein Protosterinkation erfolgt, bei dem die kationische Seitenkette an C17 wie in Verbindung **27** (Abbildung 7)  $\alpha$ -orientiert ist (Steroid-Notation).<sup>[3]</sup> Einer Rolle von **27** als Intermediat steht die Tatsache entgegen, dass die Hydridwanderung von C17 zu C20 nicht zur (20*R*)-Konfiguration des natürlichen Sterins, sondern zur nichtnatürlichen (20*S*)-Konfiguration führen sollte. Ausgehend von der Struktur von **27**, die sofort nach der Schließung des D-Rings eingenommen wird, muss der Hydridwanderung eine Rotation von 120° um die C17-C20-Bindung vorausgehen, damit es zur Bildung der natürlichen (20*R*)-Konfiguration von Lanosterin **6** kommen kann (siehe Abbildung 7). Hingegen ist lediglich eine Rotation um 60° erforderlich, um zur nichtnatürlichen (20*S*)-Konfiguration zu gelangen. Möglicherweise wurde wegen dieser Ungereimtheit ursprünglich vorgeschlagen, dass das erste tetracyclische Intermediat nicht Kation **27**, sondern ein kovalentes Addukt sei, das bei der Reaktion von **27** mit einer nucleophilen Gruppe der Cyclase gebildet wird.<sup>[29, 30]</sup> Aus der Isolierung

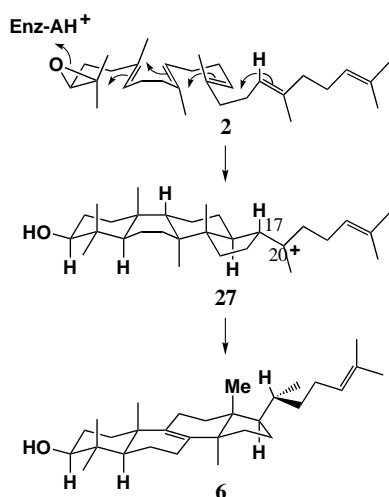


Abbildung 7. Die früher postulierte Konfiguration an C17 von Protosterin, die sich als falsch erwies, erfordert vor der Umlagerung eine große Rotation der Seitenkette, um die beobachtete Konfiguration an C20 erklären zu können.<sup>[31]</sup>

eines Protosterins (des Methylketons **19**) bei der vom Hefe-Enzym katalysierten Cyclisierung von 20-Oxaoxidosqualen **10** folgte dann aber, dass die  $\beta$ - (pseudoaxiale Seitenkette) statt der  $\alpha$ -Konfiguration (pseudoäquatoriale Seitenkette) an C17 des Protosterins vorliegt (Abbildung 8).<sup>[31]</sup> Mit

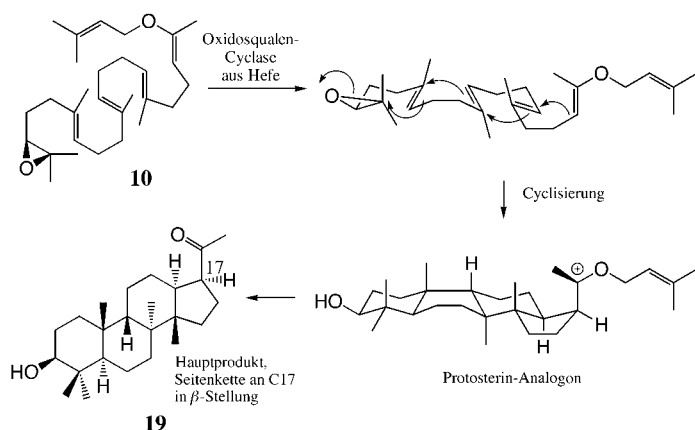


Abbildung 8. Abfangen eines enzymatisch gebildeten Protosterin-Analogons.<sup>[31]</sup>

diesem Ergebnis erübrigte sich die Notwendigkeit einer großen Rotation ( $120^\circ$ ) um die C17-C20-Bindung im Vorfeld der Umlagerung oder einer kovalenten Anlagerung eines transienten Nucleophils des Enzyms. Interessanterweise ist das Protosterin-Analogon **28** lediglich ein schwacher Inhibitor der Oxidosqualen-Cyclase aus Hefe (der  $IC_{50}$ -Wert ist 55mal größer als im Falle des 2,3-Iminosqualens **29**, Abbildung 9). Dies lässt auf eine nicht besonders feste Bindung des Protosterinkations an das Enzym schließen.<sup>[32]</sup> Auch bei der Umsetzung von 20,21-Didehydrooxidosqualen **30** durch die Oxidosqualen-Cyclase aus Hefe wurde die  $17\beta$ -Orientierung der Seitenkette des Protosterinkations nachgewiesen. Die enzymatische Cyclisierung von **30** lieferte das Protosterinderivat **31** (Abbildung 10), das mit einer synthetisch hergestellten Vergleichsprobe identisch war.<sup>[14]</sup>

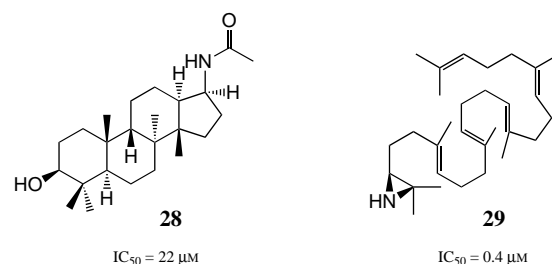


Abbildung 9. Ein Vergleich von Oxidosqualen-Cyclase-Inhibitoren lässt vermuten, dass das Protosterinkation nur schwach vom Enzym gebunden wird.<sup>[32]</sup>

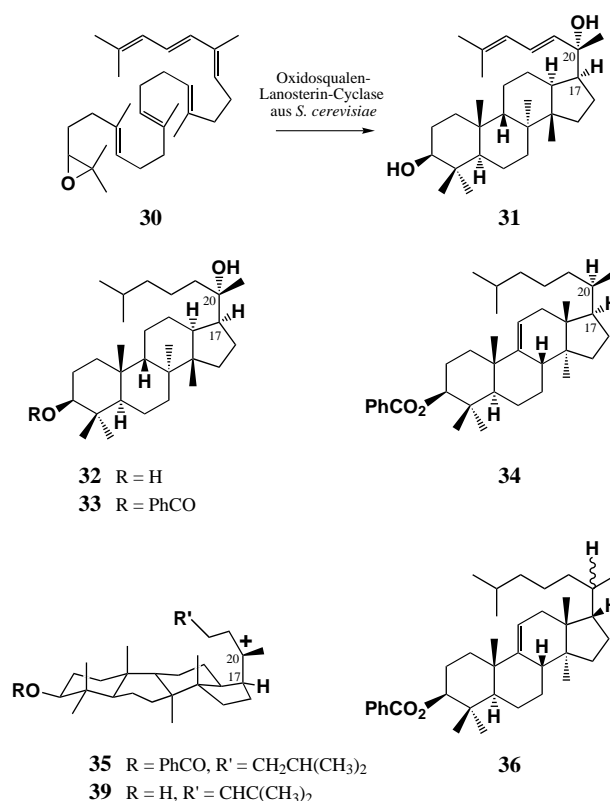


Abbildung 10. Produkte, die auf den stereochemischen Verlauf der nicht-enzymatischen Umlagerung schließen lassen.<sup>[33]</sup>

Das Abfangen und die Isolierung dieses Protosterin-Analogons ermöglichten die erste von den Cyclisierungsvorgängen abgekoppelte Untersuchung der Umlagerung. Die nicht-enzymatische Reaktion von **33** (dem Benzoessäureester von **32**) mit  $BF_3$  in Dichlormethan bei  $-90^\circ C$  über 3 min ergab 24,25-Dihydroparkeolbenzoat **34**, wobei die Reaktion über das Protosterinkation **35** verlief (Abbildung 10).<sup>[31]</sup> Analog lieferte die  $BF_3$ -induzierte Umlagerung des C20-Diastereomers von **33** hauptsächlich das C20-Diastereomer von **34**.<sup>[14]</sup> Dagegen sind die  $BF_3$ -katalysierten Umlagerungen des  $17\alpha$ -Epimers von **33** sowie von dessen C20-Epimer bezüglich C20 nicht selektiv: Sie ergeben eine 1:1-Mischung der C20-Epimere des Dihydroparkeolbenzoats **36**.<sup>[33]</sup> In Übereinstimmung mit diesen nichtenzymatischen Ergebnissen führt die enzymatische Umsetzung von Substratanaloga, die signifikante Strukturunterschiede zu Oxidosqualen aufweisen, immer noch in einem gewissen Umfang zu Hydrid- und

Methylgruppenwanderungen. So ergibt die Cyclase-katalysierte Cyclisierung eines vorcyclisierten (D-Ring) Analogons von Oxidosqualen, **38**, umgelagerte, Lanosterin-ähnliche Produkte (Abbildung 11),<sup>[34,35]</sup> und auch die enzymatische Cycli-

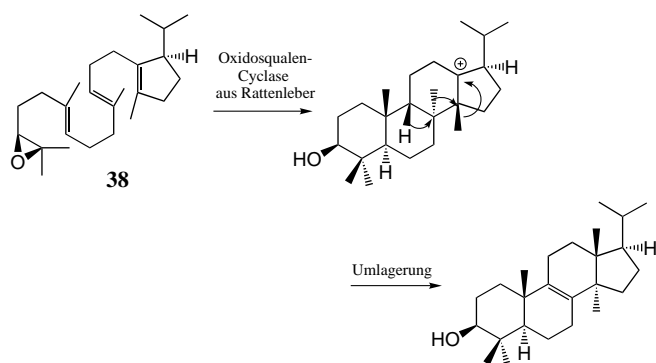


Abbildung 11. Enzymatische Cyclisierung und Umlagerung eines vorcyclisierten Oxidosqualen-Analogons.<sup>[34]</sup>

sierung des verkürzten Substratanalogons **24**, die zu nicht-natürlichen 6-6-5-Tricyclen führt, ist von einer Methylgruppenwanderung begleitet (siehe Abbildung 6).<sup>[27]</sup> Von besonderer Bedeutung ist, dass sogar die nichtenzymatische, durch Lewis-Säuren katalysierte Cyclisierung von Oxidosqualen zumindest ein Produkt liefert, das aus einer Methylgruppenwanderung hervorgeht (Abbildung 12).<sup>[36]</sup> Dies lässt die Leichtigkeit erkennen, mit der diese Umlagerungsprozesse in der Natur ablaufen.

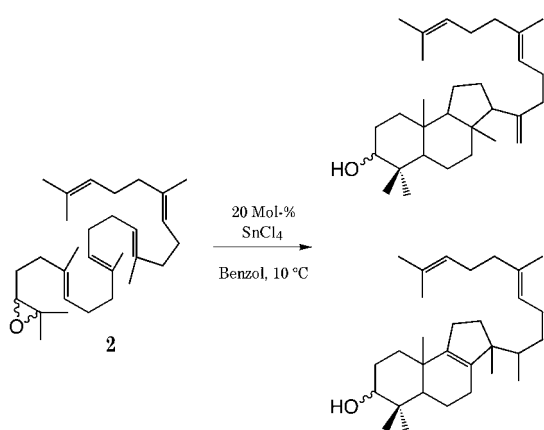


Abbildung 12. Nichtenzymatische Cyclisierung von Oxidosqualen.<sup>[36]</sup>

Diese Resultate liefern entscheidende Einblicke in die molekularen Einzelheiten der Cyclisierungs- und Umlagerungsschritte bei der Lanosterin-Biosynthese. Erstens erfolgt am Protosterinkation **39** (Abbildungen 2 und 10) eine Hydridwanderung von C17 nach C20, wobei das (20*R*)-Produkt rasch im Vergleich zur Rotation um die C17-C20-Bindung entsteht. Zweitens ist diese Bindungsrotation bei der 17β-Anordnung der Protosterin-Seitenkette stark verlangsamt (wahrscheinlich wegen einer abstoßenden Wechselwirkung mit der nahe gelegenen 14β-Methylgruppe). Drittens ermöglicht der Reaktionsweg unter Beteiligung einer 17β-Seiten-

kette (wie in **39**) eine viel strengere enzymatische Kontrolle der C20-Konfiguration des Lanosterins als es beim hypothetischen Weg mit der Seitenkette in 17α-Orientierung (entsprechend **27** in Abbildung 7) der Fall wäre. Schließlich ist es offensichtlich, dass die Hydrid- und Methylgruppenwanderungen, die das Protosterinkation in Lanosterin umwandeln, ohne Beteiligung einer Lanosterin-Synthase spontan vorstatten gehen können. Eine Ausnahme ist der abschließende Schritt der Protonenabspaltung, der unter strenger Kontrolle des Enzyms stehen muss. Die wichtigste Aufgabe des Enzyms während der Umlagerung von Protosterin könnte daher der Schutz des Intermediats sein, und zwar zum einen vor der Zerstörung durch Wasser (Ausschluss von Wasser aus dem aktiven Zentrum) und zum anderen vor einer Eliminierung noch vor der Deprotonierung durch eine geeignet positionierte basische Gruppe des Enzyms.

## 2.2. Squalen-Hopen-Cyclasen

### 2.2.1. Einleitung der Reaktion und frühe Cyclisierungsschritte

Bakterielle Squalen-Cyclasen katalysieren einen sowohl stereochemisch als auch mechanistisch einfacheren Prozess als die eukaryontischen Oxidosqualen-Cyclasen. Bei diesen Squalen-Cyclasen ist die Substratkonformation anders als bei den Lanosterin-Synthasen; sie ermöglichen es dem Substrat, eine Sessel-Sessel-Sessel-Konformation einzunehmen (siehe Abbildung 2). Weiterhin wird (im Unterschied zu den entsprechenden Oxidosqualen-Cyclasen) eine auf die Cyclisierung folgende Umlagerung des Grundgerüsts bei der ungehinderten Katalyse durch diese Enzyme nicht generell beobachtet. Da die Basizität einer C-C-Doppelbindung niedriger ist als die der Oxirangruppe, sollte die Squalen-Cyclase eine katalytisch wirksame Säure bereitstellen, die mindestens so stark ist wie die Säure, die zur Einleitung der Cyclisierung von Oxidosqualen eingesetzt wird. Übereinstimmend mit dieser Hypothese akzeptieren bakterielle Squalen-Cyclasen Oxidosqualen und viele seiner Analoga als Substrate für die Cyclisierung.<sup>[9]</sup> Zwar gibt es im Fall der Squalen-Cyclasen keine chemischen Studien, die den Mechanismus der Bildung der Ringe A und B aufgeklärt haben. Jedoch liegt aus Gründen der Analogie zu Oxidosqualen-Cyclasen die Vermutung nahe, dass das Schließen des Rings A und die Protonierung des Olefins konzentriert verlaufen, da eine anchimere Unterstützung die Protonierung des relativ schwach basischen 2,3-Olefins erheblich beschleunigen könnte.

Anders als bei den Oxidosqualen-Cyclasen sind bei den Squalen-Hopen-Cyclasen Studien mit Substratanaloga, die auf ein fünfgliedriges Intermediat des Rings C und eine nachfolgende Ringerweiterung während der Cyclisierung von Squalen hindeuten, erst in neuerer Zeit durchgeführt worden. Die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* überführt einen verkürzten Alkohol (**40**) in ein 6-6-5-Produkt. Dies ist in Einklang mit dem Abfangen eines Markownikow-Kations, das durch den Ringschluss zu einem fünfgliedrigen C-Ring gebildet wurde (siehe Abbildung 13).<sup>[37]</sup> 6-6-6-Produkte, die



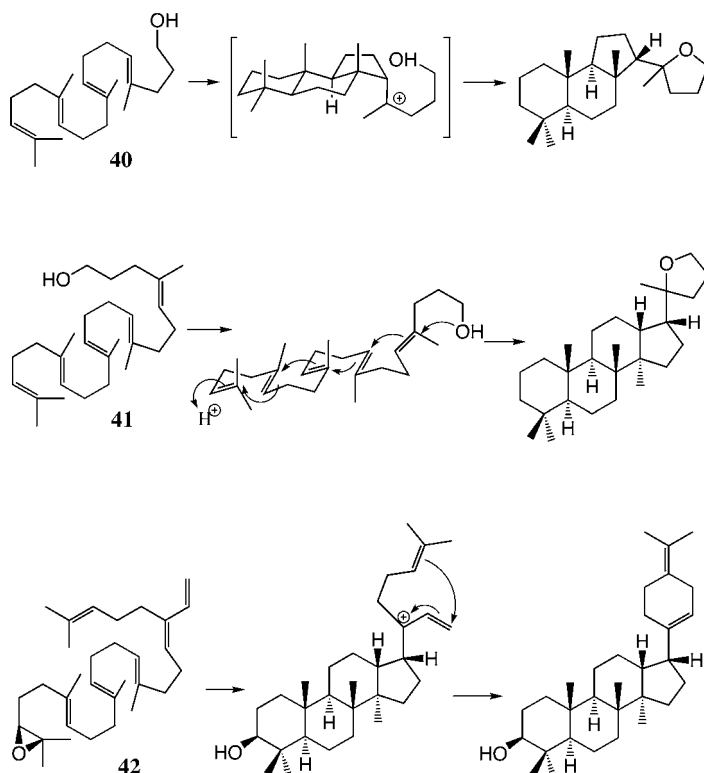


Abbildung 13. Hinweise auf die Bildung eines fünfgliedrigen D-Rings während der Squalen-Cyclisierung. In allen drei Fällen wurde die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* verwendet.<sup>[38, 39]</sup>

durch Schließen zu einem sechsgliedrigen C-Ring (Anti-Markownikow-Addition) hätten entstehen können, wurden nicht gefunden. Die Argumente für einen Markownikow-gegenüber einem Anti-Markownikow-Mechanismus bei der Schließung des C-Rings werden im Folgenden im Lichte neuerer strukturebiologischer Ergebnisse und Mutagenese-Studien diskutiert.

### 2.2.2. Bildung des D-Rings

Chemische Studien deuten stark darauf hin, dass die durch Squalen-Cyclasen katalysierte Cyclisierung des Rings D über die Bildung eines fünfgliedrigen Markownikow-Kations verläuft. Darauf folgt eine Ringerweiterung zu einem 6-6-6-6-System, ähnlich wie bei der von Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen katalysierten Schließung des Rings C. Die Umsetzung eines verkürzten Squalen-Analogons (**41**) durch eine Squalen-Hopen-Cyclase führt nahezu quantitativ zu einem 6-6-6-5-Produkt, das über ein intermediär gebildetes C18-Markownikow-Carbokations entstehen könnte (Abbildung 13).<sup>[38]</sup> In ähnlicher Weise wird 29-Methylidenoxidosqualen **42** in ein 6-6-6-5-Produkt überführt (Abbildung 13), wobei die Cyclase irreversibel inaktiviert wird (siehe unten).<sup>[39]</sup> Die Cyclisierung von 2,3-Dihydrosqualen **43** durch zwei verschiedene Squalen-

Cyclasen führt – ebenfalls über ein 6-6-6-5-Intermediat – zu drei Produkten (**44–46**; (Abbildung 14)).<sup>[40, 41]</sup> Von großer Bedeutung ist der Nachweis der 6-6-6-5-Verbindungen **47–51** als Nebenprodukte bei der natürlichen Umsetzung von Squalen durch die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Abbildung 15).<sup>[42]</sup> Dieses Ergebnis lieferte den ersten Hinweis auf die Schließung eines fünfgliedrigen Rings D, und das für ein System, das frei ist von stereochemischen Einflüssen, die von Substratanaloga oder Mutationen im aktiven Zentrum herrühren.

### 2.2.3. Bildung des E-Rings, Umlagerung und Eliminierung

Die Bedeutung der Entstehung eines Markownikow-Carbokations während der enzymkatalysierten Schließung des fünfgliedrigen Rings E wird durch die Entdeckung belegt, dass die Squalen-Analoga **52** und **53** (denen eine endständige Methylgruppe fehlt und aus denen daher im Anschluss an das Schließen des Rings E kein tertiäres Carbokation gebildet werden kann) bei der Umsetzung mit der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* die Tetrahymanol-ähnlichen 6-6-6-6-6-Produkte **54** und **55** liefern (Abbildung 16).<sup>[43]</sup> Die strukturelle Charakterisierung der tetracyclischen Verbindungen **44–46**, die bei der Umsetzung von 2,3-Dihydrosqualen **43** durch die Squalen-Cyclasen aus *Tetrahymena pyriformis* und *A. acidocaldarius* entstehen, deutet auf Hydrid- und Methylgruppenwanderungen hin (siehe Abbildung 14).<sup>[9]</sup> Darüber hinaus schließt das Spektrum an Nebenprodukten, die bei der Umsetzung der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* mit ihrem natürlichen Substrat entstehen, eine Reihe von teilweise umgelagerten Tetracyclen ein (**49–51**, siehe Abbildung 15).<sup>[42]</sup> Diese Ergebnisse stimmen eben-

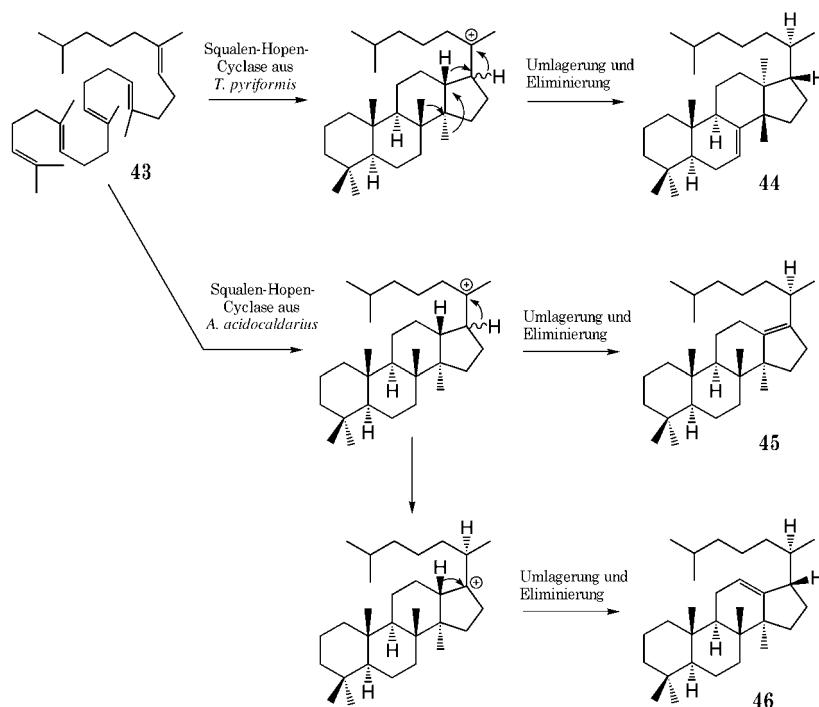


Abbildung 14. Weitere Hinweise auf die Bildung eines fünfgliedrigen D-Rings während der Squalen-Cyclisierung.<sup>[40, 41]</sup>

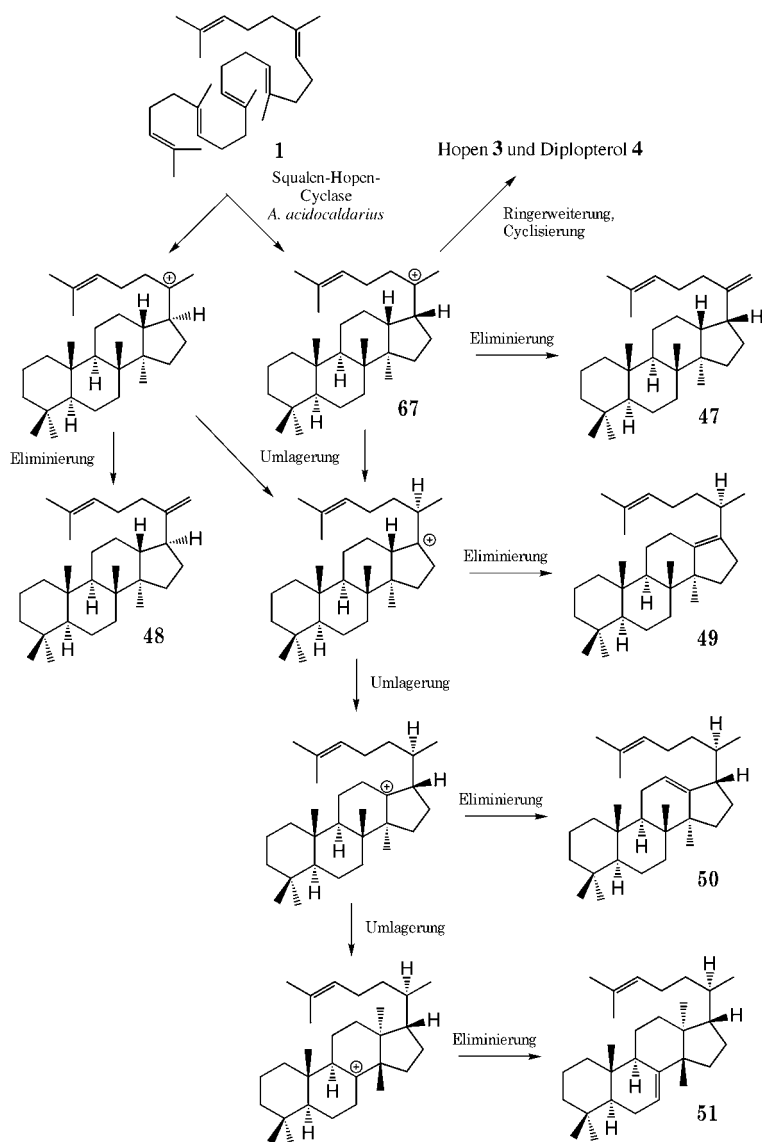


Abbildung 15. Bildung von Nebenprodukten bei der natürlichen enzymkatalysierten Squalen-Cyclisierung.<sup>[42]</sup>

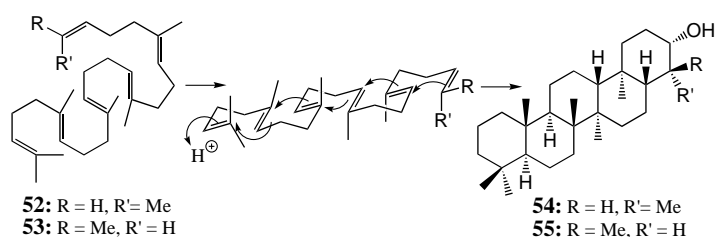


Abbildung 16. Substratanaloga, die bei der durch die Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* katalysierten Cyclisierung Tetrahymanol-ähnliche 6-6-6-6-6-6-Produkte ergeben.

falls mit dem zuvor beschriebenen Modell der Oxidosqualen-Cyclasen überein, bei dem Gerüstumlagerungen in Abwesenheit von Basen oder Wasser spontan auftreten, um Carbokationen abzufangen. Die Produktverteilung zwischen Hopen 3 (80%) und dem in Gegenwart von Wasser gebildeten Diplopterol 4 (20%) als Ergebnis der natürlichen Aktivität der Squalen-Hopen-Cyclasen belegt, dass die Terminierungs-

region des aktiven Zentrums für Wasser durchaus zugänglich ist.<sup>[44]</sup>

### 3. Der Reaktionsverlauf: biologische Studien

Bei der Aufklärung des Mechanismus der enzymkatalysierten Triterpensynthese sind Molekular- und Strukturbiologen an die Seite der Chemiker getreten. So wurden während der letzten sieben Jahren mindestens fünfzehn mutmaßliche Triterpen-Cyclasen kloniert und sequenziert: Im Einzelnen sind dies die Cyclasen aus *Homo sapiens*,<sup>[45]</sup> *Rattus norvegicus*,<sup>[46, 47]</sup> *Candida albicans*,<sup>[48, 49]</sup> *Saccharomyces cerevisiae*,<sup>[50, 51]</sup> *Schizosaccharomyces pombe*,<sup>[52]</sup> *Arabidopsis thaliana*,<sup>[53]</sup> *Panax ginseng*,<sup>[54]</sup> *Alicyclobacillus acidocaldarius*,<sup>[55]</sup> *Zymomonas mobilis*,<sup>[56]</sup> *Bradyrhizobium japonicum*,<sup>[57]</sup> *Methylococcus capsulatus*,<sup>[58]</sup> *Rhodospseudomonas palustris*,<sup>[58]</sup> *Rhizobium*,<sup>[59]</sup> *Synechocystis*<sup>[60]</sup> und *Bacillus subtilis*.<sup>[61]</sup> Die bisher einzige dreidimensionale Struktur einer Triterpen-Cyclase (Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*) wurde 1997 aufgeklärt.<sup>[62–64]</sup> Zusammen mit anderen biologischen Studien hat diese Struktur umfassende Einblicke in die Wirkungsweise sowohl der Squalen- als auch der Oxidosqualen-Cyclasen gewährt.

#### 3.1. Die Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*

Diese Cyclase ist ein homodimeres Enzym mit 631 Aminosäuren (71.5 kD) pro Untereinheit.<sup>[55, 63, 65]</sup> Die Peptidkette jeder Untereinheit ist in zwei überwiegend  $\alpha$ -helicalen Domänen organisiert, die zusammen ein hantelförmiges Molekül mit einem Durchmesser von 50 Å und einer Länge von 70 Å bilden (Abbildung 17). Domäne 1 stellt ein regelmäßiges  $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass dar, während Domäne 2 eine ähnliche, jedoch weniger regelmäßige  $\alpha$ -Fass-Faltung einnimmt. Der Vergleich der Strukturen beider Domänen lässt vermuten, dass Domäne 2 durch eine frühe Genverdopplung aus Domäne 1 hervorgegangen sein könnte.<sup>[66]</sup> Die beiden Domänen sind durch lange Schleifen miteinander verbunden, die einen zentralen Hohlraum von 1200 Å<sup>3</sup> bilden (Abbildung 17). Ein zweiter Hohlraum von 400 Å<sup>3</sup> („oberer Hohlraum“) liegt im Zentrum des  $(\alpha/\alpha)_6$ -Fasses von Domäne 1.<sup>[64]</sup>

Die Struktur legt nahe, dass sich das aktive Zentrum im zentralen Hohlraum des Enzyms befindet, in dem der kompetitive Inhibitor *N,N*-Dimethyldodecylamin-*N*-oxid (LDAO)<sup>[67]</sup> gebunden wird (Abbildung 18).<sup>[63]</sup> Diese Interpretation wird durch eine große Zahl an Hinweisen aus biochemischen und Strukturuntersuchungen bestätigt. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde gezeigt, dass die Reste Asp376 und Asp377, die in Kontakt mit dem oberen Teil des zentralen Hohlraums stehen, eine wesentliche Rolle in der Katalyse durch die Cyclase spielen.<sup>[68]</sup> Ebenso setzen Muta-

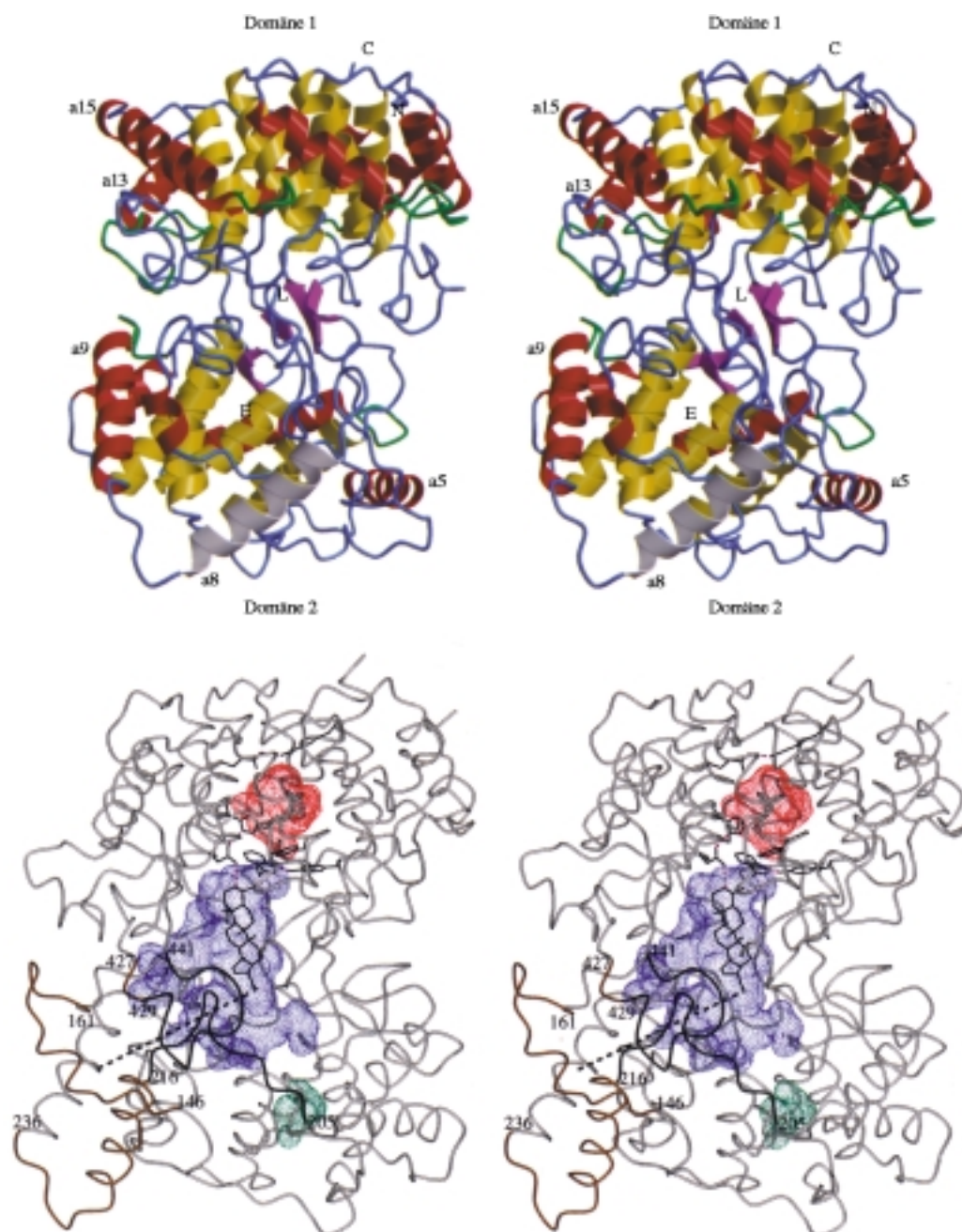


Abbildung 17. Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*. Oberes Stereobild: Bänderdarstellung einer Untereinheit des dimeren Enzyms mit Markierungen der Peptidkettenenden (N und C), der Position des kompetitiven Inhibitors LDAO (L) und des Eingangs (E) des Kanals des aktiven Zentrums. Farbcodierung: innere und äußere Helices der ( $\alpha/\alpha$ )-Fässer sind gelb bzw. rot, die  $\beta$ -Struktur violett, QW-Motive grün und Helix  $\alpha$ -8 in der vermuteten Membranbindungsregion grau dargestellt. Unterstes Stereobild:  $\alpha$ -Kettenverlauf der Cyclase. Die drei größten Hohlräume in der Struktur<sup>[103]</sup> sind folgendermaßen eingefärbt: aktives Zentrum: blau, oberer wassergefüllter Hohlraum: rot, ein kleinerer wassergefüllter Hohlraum in Domäne 2: grün. Hervorgehoben sind die Membranbindungsregion (ockerfarben; Reste 146–161, 216–236 und 427–429) und bewegliche Schleifen (dunkel; Reste 205–216 und 429–441), die sich vermutlich für den Zutritt des Substrats durch einen die Membranbindungsregion mit dem aktiven Zentrum verbindenden Kanal öffnen (gestrichelte Linie). In die Darstellung wurde ein Molekül des Produkts Hopen modelliert (siehe Text).

tionen an den nahe gelegenen Resten Asp 374 und His 451 die katalytische Aktivität des Enzyms herab.<sup>[69]</sup> Asp 456 der Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase aus *S. cerevisiae* (laut Sequenzvergleich äquivalent zu Asp 376) ist ebenfalls für die enzymatische Aktivität erforderlich.<sup>[18]</sup> Weitere Argumente für die Platzierung des aktiven Zentrums dieser Squalen-Hopen-Cyclase im zentralen Hohlraum liefert die Mutation der diesen Hohlraum auskleidenden Reste, da sie zu verän-

derten Produkten führt.<sup>[38, 69–73]</sup> Weiterhin gehen mehrere Suizid-Inhibitoren für Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen kovalente Bindungen mit Aminosäuren ein, die den Resten des zentralen Hohlraums der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* entsprechen.<sup>[18, 74]</sup> Schließlich entspricht die topologische Position des aktiven Zentrums relativ zum ( $\alpha/\alpha$ )-Fass der Position der aktiven Zentren, wie sie üblicherweise in anderen ( $\alpha/\alpha$ )-Fass-Proteinen anzutreffen ist.<sup>[63]</sup>

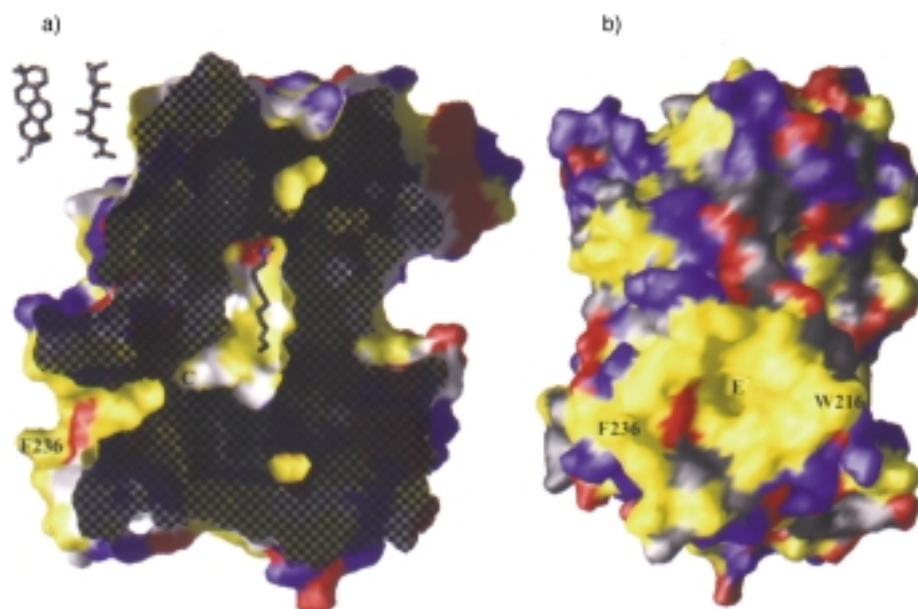


Abbildung 18. Oberflächendarstellung<sup>[104]</sup> einer Untereinheit der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* mit unpolaren (gelb), positiv geladenen (blau) und negativ geladenen Bereichen (rot). a) Der Schnitt (Schnittfläche kariert) zeigt einen Blick auf die Tasche des aktiven Zentrums mit dem gebundenen Inhibitor LDAO. Der unpolare Eingangstunnel geht in die ausgedehnte unpolare Region auf der linken Seite über, die vermutlich für die integrale Bindung in der Membran verantwortlich ist. Die Kanalverengung (C) erscheint geschlossen, ist jedoch flexibel genug, um das Substrat passieren zu lassen. Oben links ist Hopan aus zwei Blickrichtungen dargestellt. b) Blick auf die unpolare, um den Kanaleingang angeordnete Membranbindungsfläche, gegenüber (a) um 90° um eine vertikale Achse gedreht. Ein Ring positiv geladener Arg- und Lys-Reste (blau), der dieses unpolare Plateau umgibt, könnte mit den polaren Phospholipid-Kopfgruppen der Membran wechselwirken.

Squalen- wie Oxidosqualen-Cyclasen haben ein einzigartiges, sich wiederholendes Sequenzmotiv gemeinsam (als QW-Wiederholungseinheit bezeichnet), das folgende Konsensussequenz hat: a-b-x<sub>2-3</sub>-c-d-x<sub>3</sub>-Gln-x<sub>2-5</sub>-Gly-x-Trp, wobei a = Lys oder Arg, b = Gly oder Ala, c = Phe, Tyr oder Trp ist und x ein beliebiger Rest sein kann.<sup>[75]</sup> Diese Wiederholung taucht bei den Oxidosqualen-Cyclasen typischerweise fünfmal und bei den Squalen-Cyclasen bis zu achtmal auf. Die hohe Konservierung dieser Wiederholungseinheit bei sämtlichen Triterpen-Cyclasen hat zu der Hypothese geführt, dass das konservierte Trp an der Stabilisierung des intermediären Carbokations beteiligt sein könnte.<sup>[76]</sup> Dabei besteht Übereinstimmung mit älteren Modellen des aktiven Zentrums, die für die Stabilisierung carbokationischer Intermediate eine strukturell definierte<sup>[9]</sup> Anordnung der aromatischen Aminosäuren vorschlagen.<sup>[50, 77, 78]</sup> Eine solche Anordnung wurde auch als ursächlich für die Induzierung der unterschiedlichen Konformationen der Übergangszustände der Oxidosqualen- und der Squalen-Cyclase-Katalysen angesehen.<sup>[79]</sup> Die Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* zeigt jedoch, dass diese QW-Wiederholungseinheiten nicht in der Tasche des aktiven Zentrums, sondern mehr an der Enzymoberfläche gelegen sind (siehe Abbildung 17). Hier bilden die konservierten Aminosäurereste der Wiederholungseinheiten ein kompliziertes Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen, das die  $\alpha$ -Helices des ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>-Fasses der Domäne 1 verbindet.<sup>[63, 64]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass die Funktion dieser Anordnung darin besteht,

die Triterpen-Cyclasen gegen die bei der Cyclisierung freigesetzte Reaktionsenthalpie zu stabilisieren.<sup>[63]</sup>

### 3.2. Bindung an die Membran

Sowohl die Lokalisierung der Triterpen-Cyclasen in der Zelle als auch die Art ihrer Solubilisierung deuten darauf hin, dass es sich um integrale Membranproteine handelt.<sup>[44, 80]</sup> Die dreidimensionale Struktur der charakterisierten Squalen-Hopen-Cyclase weist das Enzym als monotopes Membranprotein aus,<sup>[81]</sup> das mit dem unpolaren Teil der Phospholipiddoppelschicht wechselwirkt, ohne die Membran vollständig zu durchdringen (Abbildung 19).<sup>[64]</sup> Die membranbindende Region bildet eine flache, unpolare Oberfläche von 1600 Å<sup>2</sup>, deren Zentrum sich zu einem weiten Kanal öffnet, der seinerseits die Tasche des aktiven Zentrums mit dem Inneren der Phospholipiddoppelschicht verbindet.<sup>[63, 64]</sup> Diese Anordnung ermöglicht sehr wahrscheinlich den Austausch des Substrats Squalen 1

mit den Produkten Hopen 3 und Diplopterol 4 zwischen dem Hohlraum und dem unpolaren Bereich der Lipiddoppelschicht, dem mutmaßlichen Aufenthaltsort dieser unpolaren Verbindungen.

Die Hydrophobie des aktiven Zentrums eröffnet in Verbindung mit der großen Ausdehnung und Starrheit der Cyclisierungsprodukte die interessante Möglichkeit, dass sich die Domänen der Triterpen-Cyclasen während der Freisetzung der Produkte relativ zueinander bewegen. Allerdings konnten bis jetzt aus der Kristallstruktur der Squalen-Hopen-Cyclase keine Hinweise auf ein solches Geschehen abgeleitet werden. Eine Analyse der kristallographischen B-Faktoren der Proteinstruktur lässt vermuten, dass die Schleifen, die als Pforten des Eingangskanals fungieren, beweglich genug sind, um die sperrigen und unpolaren Produkte vom aktiven Zentrum zum unpolaren Abschnitt der Membran und umgekehrt passieren zu lassen.<sup>[63, 64]</sup>

Die membranbindenden Bereiche sind innerhalb des Squalen-Hopen-Cyclase-Dimers annähernd parallel ausgerichtet (Abbildung 19a). Eine solche Anordnung tritt auch in den dimeren Prostaglandin-H(2)-Synthasen I und II auf, den einzigen anderen monotopen Membranproteinen, die strukturell charakterisiert worden sind (Abbildung 19c).<sup>[82–84]</sup> In der Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase sind Detergensliganden in einem unpolaren Hohlraum an der Dimerkontakfläche gebunden, die in vivo Lipidmoleküle aufnehmen könnte. Es wurde daher vorgeschlagen, dass die Bindung von Lipiden in diesem Hohlraum die polare Dimerkontakfläche



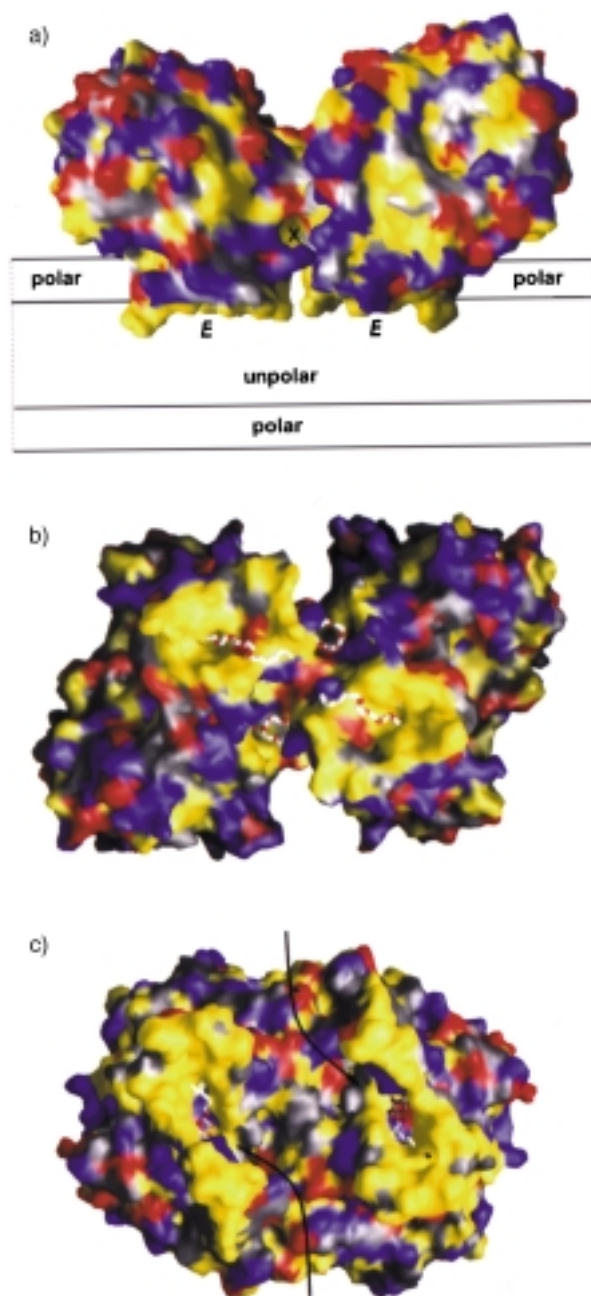


Abbildung 19. Oberflächendarstellungen<sup>[104]</sup> der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* ((a) und (b)) und eines der einzigen sonstigen monotopen Membranproteine mit bekannter Struktur (c).<sup>[82–84]</sup> Farbcodierung der Oberflächen: unpolare Bereiche: gelb, positiv geladenen Bereiche: blau, negativ geladenen Bereiche: rot. a) Für die monotope Membranbindung der Squalen-Hopen-Cyclase vorgeschlagenes Modell. Die unpolaren Regionen der Protomere sind parallel angeordnet. Dieses Arrangement ermöglicht es den Kanaleingängen (E), in den unpolaren Teil der Membran hineinzuragen, in dem Squalen gelöst vorliegt. Eine unpolare Tasche, die ein Detergensmolekül an der Dimerkontakfläche bindet, ist mit X markiert. b) Blick von der Membran auf die unpolaren Bereiche des Dimers. Einige Moleküle des Kristallisationsdetergens *n*-Octyltetraoxyethylen (weiß) sind in der hochaufgelösten Kristallstruktur zu erkennen.<sup>[64]</sup> c) Blick von der Membran auf die hufeisenförmigen Membranbindungsregionen der dimeren Prostaglandin-H(2)-Synthase I mit zwei Molekülen des Kristallisationsdetergens  $\beta$ -D-Octylglucosid, die am Eingang zum aktiven Zentrum gebunden sind. Die Pfeile deuten einen Weg für die polare Kopfgruppe des Substrats Arachidonsäure zum Eingang des aktiven Zentrums an. Ein solcher Durchgang ist bei der Squalen-Hopen-Cyclase nicht erforderlich, da das vollständig unpolare Substrat sich nicht zwischen den polaren Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht einlagert.

gegen Wasser abschirmen und damit die Assoziation der Monomere zu Dimeren und die Einlagerung der Squalen-Hopen-Cyclase in die Membran verknüpfen könnte.<sup>[64]</sup>

### 3.3. Das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum der Squalen-Hopen-Cyclasen besteht aus einem ausgedehnten zentralen, unpolaren Abschnitt und zwei kleineren polaren Bereichen am oberen Ende (um Asp376) und am unteren Ende (um Glu45) des Hohlraums (Abbildung 20).<sup>[63]</sup> Einige der Reste, die diesen Hohlraum auskleiden, sind bei den Squalen- und den Oxidosqualen-Cyclasen konserviert (Abbildung 21). Der zentrale Abschnitt enthält eine Kette von konservierten aromatischen Aminosäuren, die dem Hohlraum zugewandt sind und wahrscheinlich die kationischen Intermediate stabilisieren. Die oberen und unteren Abschnitte des Hohlraums werden durch polare Netzwerke aus Wasserstoffbrückenbindungen um Asp376 und Glu45 gebildet. Diese beiden Aminosäurereste sind vermutlich an der initialen Olefin- oder Oxiran-Protonierung bzw. am abschließenden Deprotonierungsschritt beteiligt.<sup>[63]</sup>

Voraussetzung für jede weitere mechanistische Diskussion ist die Zuordnung der katalytischen Säuregruppe zu einem der polaren Bereiche. Eine Struktur-Funktions-Untersuchung dieser Enzyme ermöglichte diese Zuordnung.<sup>[63]</sup> Die durch die Squalen- und Oxidosqualen-Cyclasen katalysierten Protonierungsschritte erfolgen am gleichen Teil der Substratkette, die Deprotonierungsschritte dagegen an unterschiedlichen Teilen der Produktkette. Da die Mutation der Reste Asp376 (Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*) bzw. Asp456 (Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase aus *S. cerevisiae*) im polaren Bereich am oberen Ende des aktiven Zentrums die Enzyme inaktiviert<sup>[18, 68]</sup> und da der Inhibitor LDAO mit seiner polaren Kopfgruppe an dieser Stelle bindet,<sup>[63]</sup> liegt es nahe, dass diese Reste als Protonendonoren fungieren. Übereinstimmend mit dieser Hypothese nimmt die Konservierung der Reste, die das aktive Zentrum auskleiden, zwischen Squalen- und Oxidosqualen-Cyclasen vom oberen Ende (nahe Asp376) zum Boden des Hohlraums (Glu45) ab (Abbildung 21). Dieser Befund stützt angesichts der Tatsache, dass die Anfangsschritte im Unterschied zu den Schlusschritten bei den Squalen- und Oxidosqualen-Cyclasen recht ähnlich sind, die Rolle von Asp376 bzw. Asp456 als die katalytischen Säuren, die die Cyclisierungen von Squalen bzw. Oxidosqualen einleiten.<sup>[63]</sup>

### 3.4. Suizid-Inhibitoren

Die für Asp376 (Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*) und Asp456 (Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase aus *S. cerevisiae*) vorgeschlagene Funktion wird durch Studien erhärtet, bei denen die Oxidosqualen-Cyclase aus *S. cerevisiae* mit Substratanaloga umgesetzt wurde, die kovalent an das Enzym binden. Trypsinverdauung und Edman-Abbau der derart markierten Enzyme deuten darauf hin, dass Carbo-

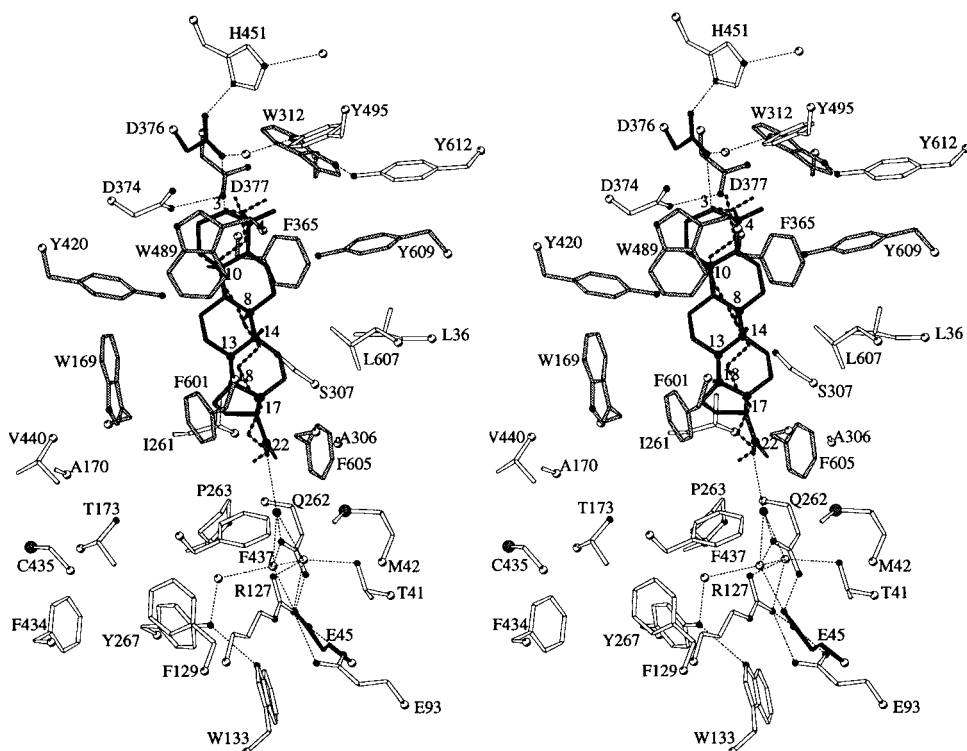


Abbildung 20. Stereoansicht des aktiven Zentrums der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* mit dem Inhibitor LDAO (gepunktet) und einem modellierten Hopenmolekül (dunkelgrau). Hopen wurde in die Wildtyp-Struktur modelliert,<sup>[63]</sup> wohingegen die Wassermoleküle (helle Kugeln) und die benachbarten Aminosäuren aus der hochaufgelösten Struktur der Asp376Cys-Mutante stammen.<sup>[64]</sup> Asp 376 und Glu 45 in den polaren Bereichen am oberen bzw. unteren Ende des Hohlraums sind schwarz dargestellt. Die Positionen im Hopenmodell, an denen die positive Ladung zu erwarten ist, sind als schwarze Kreise wiedergegeben. Die vermutete Position für das reaktive Wassermolekül, das zu Diplopterol führt, ist grau markiert (nahe dem Rest Gln262). An der Kationen-Stabilisierung – vermutlich oder nachweislich – beteiligte Reste sind hellgrau hervorgehoben.

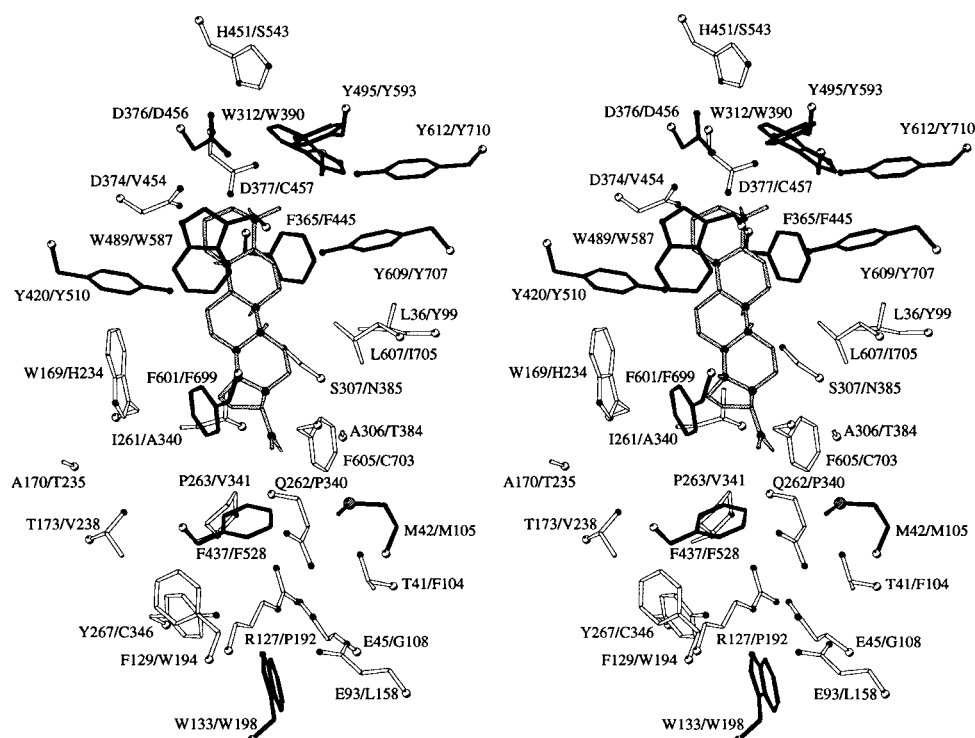


Abbildung 21. Sequenzvergleich der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* und der Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase aus *S. cerevisiae* anhand der Struktur des aktiven Zentrums der Squalen-Cyclase. Die rechte Aminosäurerest-Angabe gehört jeweils zur Squalen-Cyclase, die linke zur Oxidosqualen-Cyclase. Identische Reste sind schwarz dargestellt. Das Hopenmodell (hellgrau) ist wie in Abbildung 20 wiedergegeben. Der Sequenzvergleich ist Teil eines Mehrfachvergleichs, der mit dem Programm CLUSTAL<sup>[105]</sup> durchgeführt wurde. Die Abbildung zeigt einen Gradienten in der Homologie für die Reste im aktiven Zentrum von niedriger Homologie am Boden (um Glu45) zu höherer Homologie im oberen Teil des Hohlraums (um Asp376).

kationen, die in zunehmendem Abstand vom Ort der Protonierung gebildet werden, mit Resten des aktiven Zentrums wechselwirken, die ihrerseits einen zunehmenden Abstand zum katalytischen Aspartatrest haben. Die Umsetzung der Tritium-markierten Verbindungen 6-De-methyloxidosqualen (**56**), 10-De-methyloxidosqualen (**57**) und 10,15-Didemethyloxidosqualen (**58**) durch das Enzym aus *S. cerevisiae* sollte reaktive mono- und bicyclische Kationen ergeben. Ergebnis dieser Umsetzungen ist die Markierung eines oder mehrerer Reste zwischen den Positionen 486 und 512 (Abbildung 22),<sup>[18]</sup> von denen Tyr510 dem Tyr420 aus dem aktiven Zentrum der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* entspricht (Abbildung 21). Die Cyclisierungen von 20-Oxaoxidosqualen **10** sowie der beiden verkürzten Diene **59** und **60** lassen die Entstehung von reaktiven Kationen in der Nachbarschaft des Rings D erwarten (Abbildung 20). Diese Verbindungen markieren die Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase aus *S. cerevisiae* an His234<sup>[18]</sup> (entsprechend Trp169 der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*), einem Rest, der weiter von Asp376 als von Tyr420 entfernt ist (Abbildung 21). Auf analoge Weise wird die Squalen-Hopen-Cyclase durch 29-Methylidenoxidosqualen **42**<sup>[39]</sup> an einem Peptidabschnitt markiert, der das am Boden des aktiven Zentrums befindliche Glu45 enthält (Abbildung 20) und somit das wahrscheinlichste Ziel für den kovalenten Angriff ist. Dieses Ergebnis ist zudem ein Indiz für eine Beteiligung dieses Restes am abschließenden Deprotonierungsschritt.<sup>[85]</sup>

Im Widerspruch zu diesen Befunden und der daraus abgeleiteten Orientierung des Substrats markiert 29-Methylidenoxidosqualen **42** die Oxidosqualen-Cyclase aus Rattenleber an Asp456 (Nummerierung wie beim *S. cerevisiae*-Enzym, Abbildung 22), was darauf schließen lässt, dass dieser Rest an der Stabilisierung des Protosterinkations beteiligt ist (siehe Abbildung 19).<sup>[74]</sup> Interessanterweise markierte diese Verbindung zwar eine Reihe von Oxidosqualen-Cyclasen aus Wirbeltieren, nicht jedoch die entsprechenden Enzyme aus

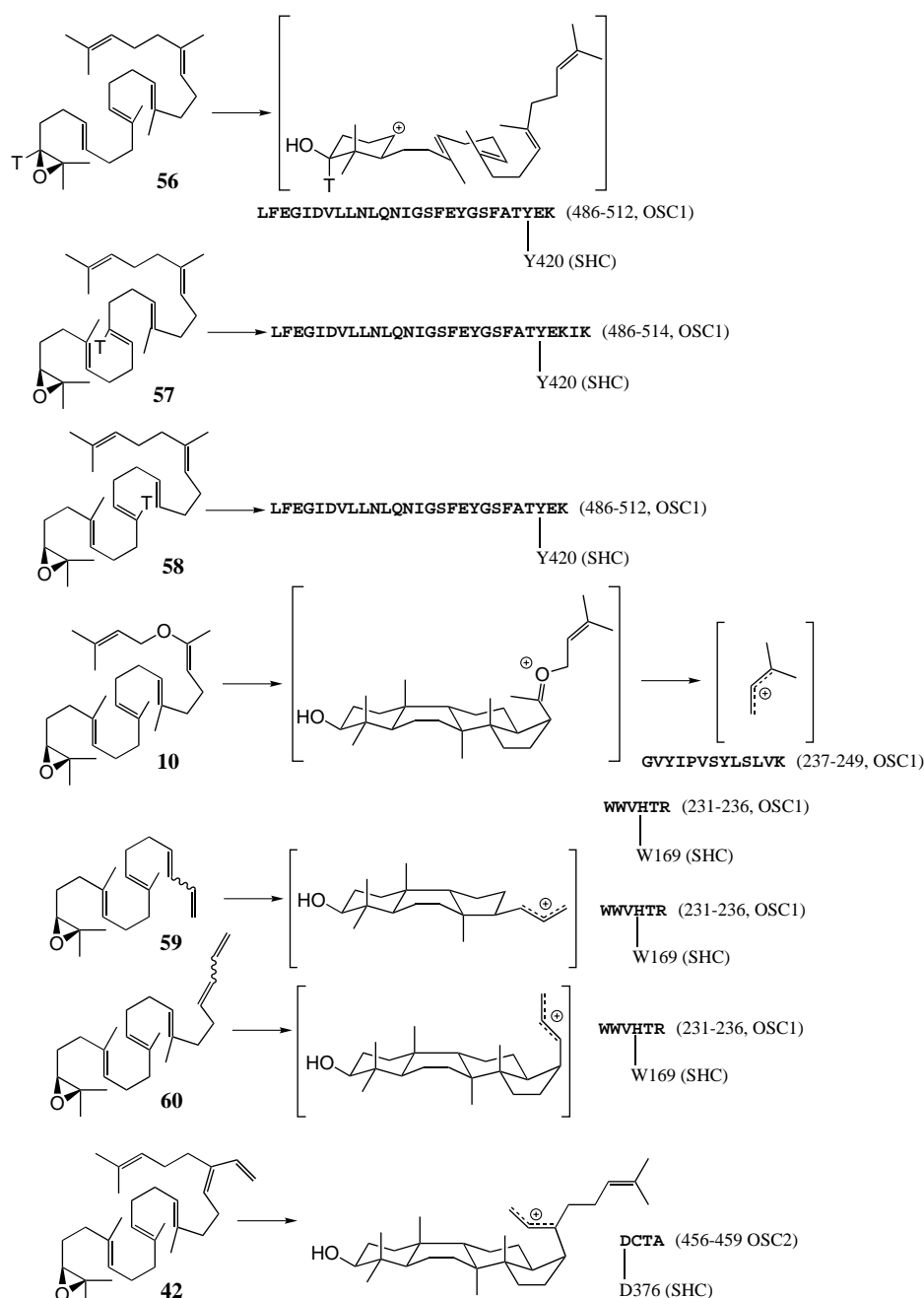


Abbildung 22. Markierung von Triterpen-Cyclasen mit Suizid-Inhibitoren. OSC1 = Oxidosqualen-Cyclase aus *S. cerevisiae*, OSC2 = Oxidosqualen-Cyclase aus Rattenleber, SHC = Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*.<sup>[17, 18, 41]</sup>

Hefe oder Pflanzen.<sup>[46]</sup> Dieses Ergebnis könnte auf eine ungewöhnlich hohe konformative Flexibilität oder eine nicht-natürliche Orientierung von 29-Methylidenoxidosqualen bei der Bindung an das Rattenleber-Enzym hindeuten.

### 3.5. Stabilisierung des Kations

Neuere Ergebnisse aus Mutagenesestudien ermöglichen in Verbindung mit der dreidimensionalen Struktur und den in vorangegangenen Abschnitten diskutierten Enzymmarkierungsexperimenten zum ersten Mal eine detaillierte Diskus-

sion spezifischer  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen bei den Triterpen-Cyclasen. Ein auf der Grundlage von Strukturdaten vorgenommener Austausch konservierter Reste im aktiven Zentrum der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* beeinflusst das Verhältnis von Hauptprodukten (Hopen und

Diplopterol) zu Nebenprodukten mit ungewöhnlicher Struktur (Abbildung 23). So führt der Ersatz von Asp377 durch Cys oder Asn zur Bildung der monocyclischen Verbindung **61**, was auf eine Stabilisierung des Kations an C10 durch diesen Rest hindeutet.<sup>[37]</sup> Die Mutation von Tyr 420 zu Ala wiederum

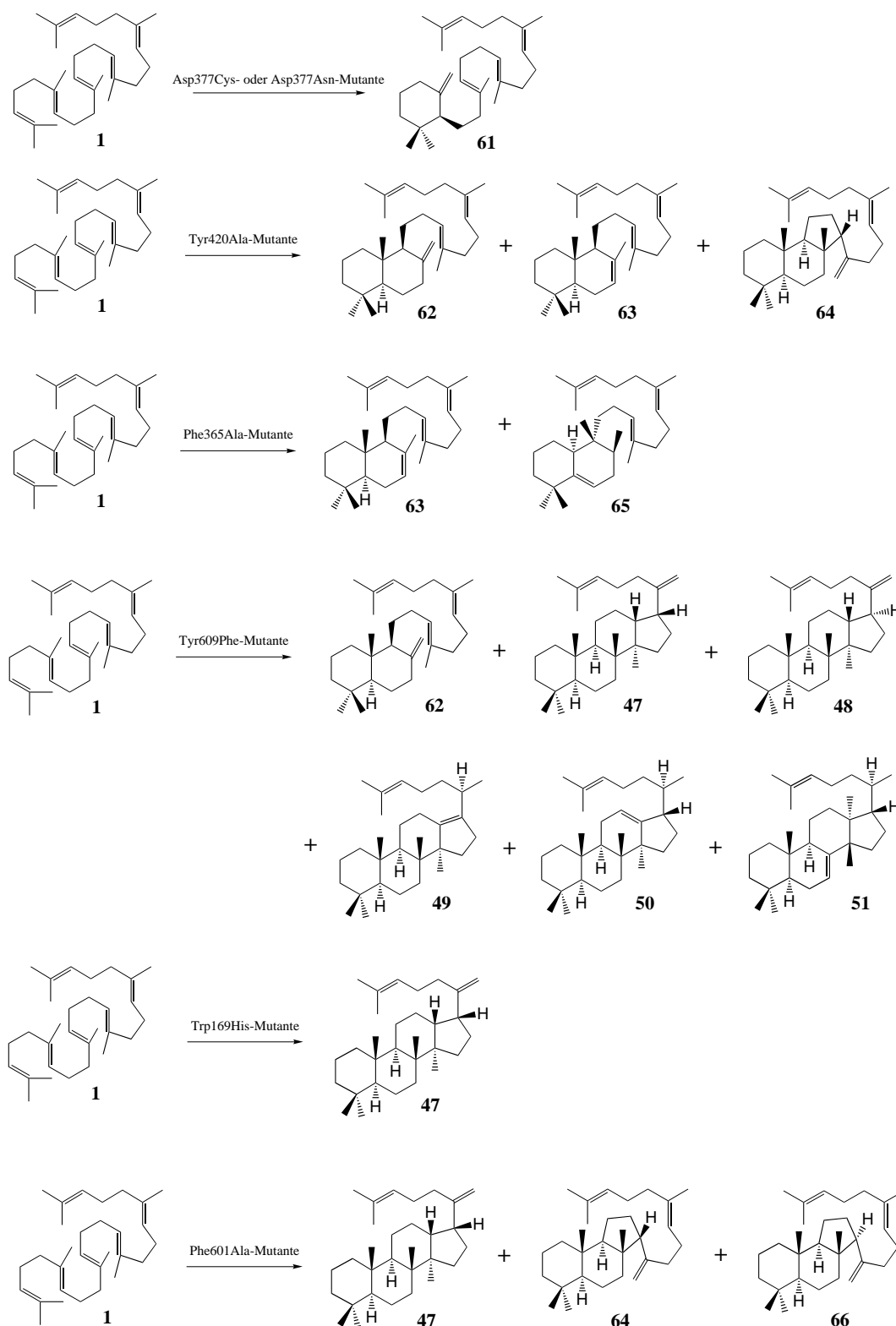


Abbildung 23. Teilcyclisierte Produkte als Ergebnis der Umsetzung von Squalen durch Mutanten der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius*, wobei die Mutationen an den mutmaßlichen kationenstabilisierenden Resten vorgenommen wurden.<sup>[37, 38, 70–73]</sup>



führt zur Bildung signifikanter Mengen der bicyclischen Triterpene **62** und **63** sowie geringer Mengen der tricyclischen Verbindung **64**.<sup>[71]</sup> Die bicyclischen Verbindungen könnten durch ein vorzeitiges Abfangen des Kations an C10 des B-Rings (C8 gemäß Hopen-Nummerierung, siehe Abbildung 20) entstehen. Dieses Kation könnte beim Wildtyp der Squalen-Hopen-Cyclase durch seine Nachbarschaft zu Tyr 420 stabilisiert werden (Abbildung 24). Die durch die Mutante

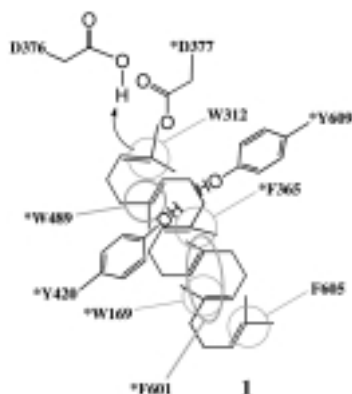


Abbildung 24. Vorgeschlagene kationenstabilisierende Wechselwirkungen während der Squalen-Cyclisierung. Wechselwirkungen, die durch Mutagenesedaten gestützt werden, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Phe365Ala gebildeten bicyclischen Verbindungen **63** und **65** (Abbildung 23) entstehen wahrscheinlich nach einem ähnlichen Mechanismus,<sup>[72]</sup> was darauf hindeutet, dass Phe365 ebenfalls an der Stabilisierung des bicyclischen C8-Kations beteiligt ist (Abbildungen 20 und 24). Die Ersetzung von Tyr609 durch Phe führte zur Synthese des bicyclischen Triterpens **62**, was eine Beteiligung auch dieses Restes an der Stabilisierung oder Positionierung des intermediären Carbokations nahelegt.<sup>[73]</sup> Diese Mutante produzierte außerdem die tetracyclischen Verbindungen **47–51** in einem deutlich höheren Maße als das Wildtyp-Enzym.

Die Mutation von Trp169 im Zentrum der Tasche des aktiven Zentrums (Abbildung 20) zu den weniger elektronenreichen Resten Phe und His führt zur vermehrten Bildung der 6-6-6-5-verknüpften Ringverbindung **47** (Abbildung 23).<sup>[38]</sup> Während die natürliche Squalen-Hopen-Cyclase **47** zu 0.6 % bildet, produzieren die Trp169Phe-Mutante 5 % und die Trp169His-Mutante 29 % dieser Verbindung. Interessanterweise führt die Mutation Phe601 → Ala, in der unmittelbaren Nähe von Trp169 (siehe Abbildung 20), zu einer deutlich erhöhten Produktion von **47**; daneben werden geringe Mengen der beiden 6-6-5-tricyclischen Verbindungen **64** und **66** gebildet (Abbildung 23).<sup>[37, 70]</sup> Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Reste Trp169 und Phe601 das Kation **67** (siehe Abbildung 15) durch  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen stabilisieren und dass Phe601 ebenfalls mit einem 6-6-5-Markownikow-Kation-Intermediat wechselwirkt (Abbildungen 20 und 24). Der Verlust oder eine Störung dieser Wechselwirkungen könnte zu einem vorzeitigen Abreagieren der tricyclischen und tetracyclischen Markownikow-Kationen und damit zur Bildung des 6-6-6-5-Produkts **47** und der 6-6-5-Verbindungen **64** und **65** führen.

Überraschenderweise führt der Ersatz von Trp489 (das direkt zu Tyr420 im oberen Teil des aktiven Zentrums benachbart ist; siehe Abbildung 20) durch Phe ebenfalls zu einer deutlich höheren Produktion von **47**. Dies steht im Widerspruch zu dem in Abbildung 24 vorgeschlagenen Modell.<sup>[38]</sup> Die Mutanten Trp489Val und Trp489Leu haben überhaupt keine Aktivität,<sup>[38]</sup> wohingegen Trp489Ala eine herabgesetzte katalytische Aktivität bei unveränderter Produktverteilung hat.<sup>[70]</sup> Da die Platzierung von Trp489 in der Struktur (Abbildung 20) vermuten lässt, dass dieser Rest für eine Wechselwirkung mit dem Kation **67** (Abbildung 15) ungünstig positioniert ist, könnten diese Ergebnisse dann erklärt werden, wenn nichtisostere Austausche von Trp489 das Kation an C19 (Squalen-Nummerierung) von den stabilisierenden aromatischen Resten (z. B. Trp169 und Phe601) im unteren Teil der Tasche des aktiven Zentrums wegdrängen würden (siehe unten).

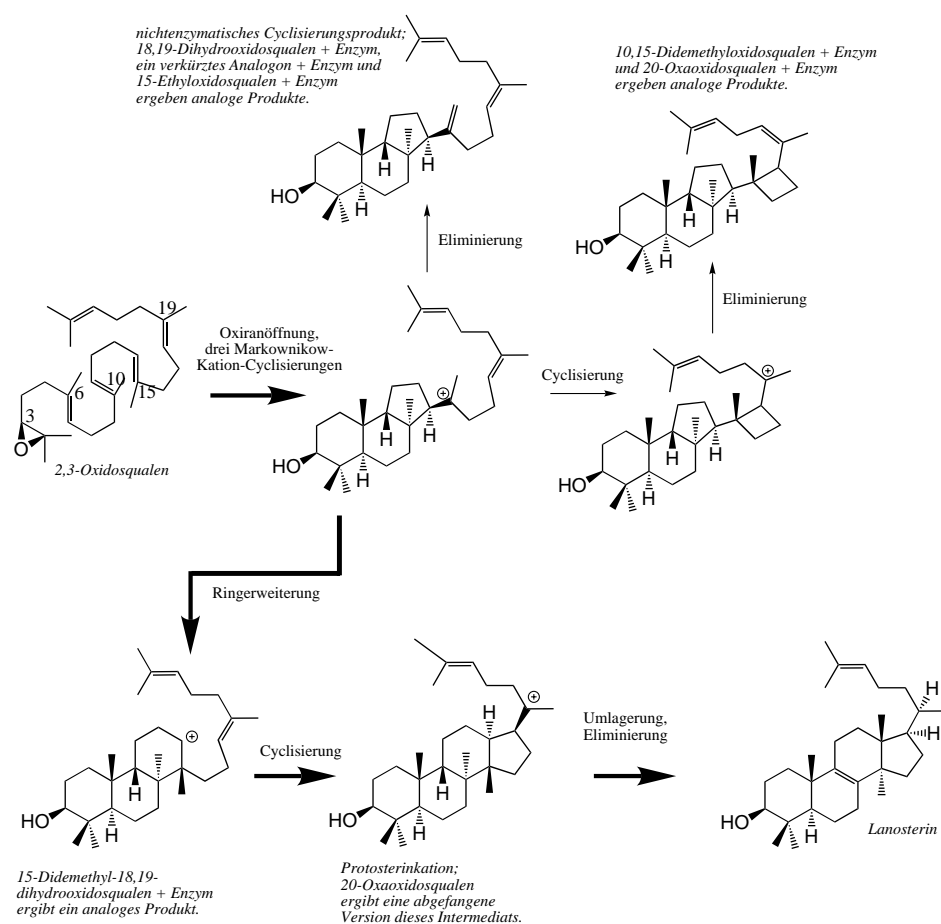
#### 4. Der enzymatische Mechanismus: eine vereinheitlichte Darstellung

Ein Vergleich der chemischen Studien zu den nichtkatalysierten gegenüber den enzymkatalysierten Prozessen zeigt, dass die für die Triterpensynthese erforderlichen elementaren chemischen Schritte bei nichtenzymatischen Reaktionen nach vorhersagbaren chemischen Prinzipien möglich sind. Daher kommen den Cyclasen folgende Aufgaben zu: 1) Bereitstellen einer Brønsted-Säure, deren Stärke für die Einleitung der Cyclisierung ausreichend ist; 2) Erzwingen der Konfiguration des Übergangszustands überall dort, wo eine Nichtsesselkonformation erforderlich ist; 3) Schutz der kationischen Intermediate vor der vorzeitigen Zerstörung durch Reaktion mit nucleophilen Gruppen des Enzyms oder mit Wasser, bis die Cyclisierungs- und Umlagerungsschritte kontrolliert erfolgt sind; 4) Beschleunigen der Reaktion durch die Stabilisierung von Carbokationen in einer elektronenreichen Umgebung. Nachfolgend stellen wir einen vereinheitlichten Mechanismus vor, der sich im Einklang mit den derzeit verfügbaren chemischen und strukturellen Daten befindet (Schema 1 und 2).

##### 4.1. Die Cyclase-Struktur als Grundlage für mechanistische Interpretationen

Die Kristallstruktur der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidoalcalarius* wurde bei einer Auflösung von 2.8 Å (Wildtyp)<sup>[63]</sup> sowie bei 2.0 Å (inaktive Asp376Cys-Mutante) bestimmt.<sup>[64]</sup> Bei einem geschätzten Koordinatenfehler von ungefähr 0.4 bzw. 0.2 Å sind die Identifizierung von Wasserstoffbrücken-Netzwerken und die Lokalisierung von fest gebundenen Wassermolekülen ohne weiteres möglich. In Ermangelung der hochaufgelösten Struktur einer mit einem Übergangszustandsanalogon komplexierten Triterpen-Cyclase wurde Hopen entsprechend der in Abschnitt 3.3 diskutierten Substratorientierung in das aktive Zentrum der Squalen-Hopen-Cyclase modelliert.<sup>[64]</sup>

Nach der manuellen Platzierung des Hopenmodells in das aktive Zentrum wurden 36 Bindungsvarianten durch Rotie-



Schema 1. Die enzymkatalysierte Cyclisierung von Oxidosqualen zu Lanosterin. Sie verläuft wahrscheinlich über eine Oxiranprotonierung durch eine enzymatische Säuregruppe und eine anschließende Oxiranöffnung, konzertiert mit einer, zwei oder drei Markownikow-Kation-Cyclisierungen zu einem tricyclischen Intermediat. Die Erweiterung des C-Rings und die Markownikow-Cyclisierung dieses Intermediats vervollständigen das Protosterinskelett, das nach einer Reihe von Hydrid- und Methylgruppenwanderungen zu Lanosterin wird. Produkte einer Eliminierung, einer direkten Cyclisierung oder auch einer Ringerweiterung dieses Schlüsselintermediats wurden aus der enzymatischen Umsetzung einer Vielzahl von Substratanaloga erhalten.

ren des Modells in Schritten von  $10^\circ$  um die C3-C17-Achse erzeugt. Die Van-der-Waals-Energien aller resultierenden Positionen wurden mit dem Programm XPLOR rechnerisch minimiert.<sup>[86]</sup> Eine Bewegung des Proteins während der Minimierung wurde nicht zugelassen, und Hopen wurde als starrer Körper behandelt. Sämtliche Bindungskonformationen niedriger Energie gruppieren sich um die in Abbildung 20 gezeigte Vorzugskonformation. In einer zweiten Minimierungsrunde wurde eine Drehung um die C21-C22-Bindung von Hopen ermöglicht, woraus sich jedoch keine nennenswerten Änderungen ergaben. Das resultierende Modell weist keine Kollisionen zwischen Protein- und Hopenatomen auf und dient als Ausgangsbasis für die weitere Diskussion des Mechanismus. Der A-Ring des modellierten Hopenmoleküls stimmt mit seinem C3-Atom in einem Abstand von 3.0 Å vom Carbonyl-Sauerstoffatom von Asp376 gut mit der Bindungsweise des in der Kristallstruktur gefundenen Inhibitors LDAO überein (siehe Abbildung 20). Der untere Teil des Modells bringt die ausschließlich von den Squalen-Hopen-Cyclasen gebildete Doppelbindung C22-C29 von Hopen in die Nähe von Phe605, einem unter den Squalen-Hopen-

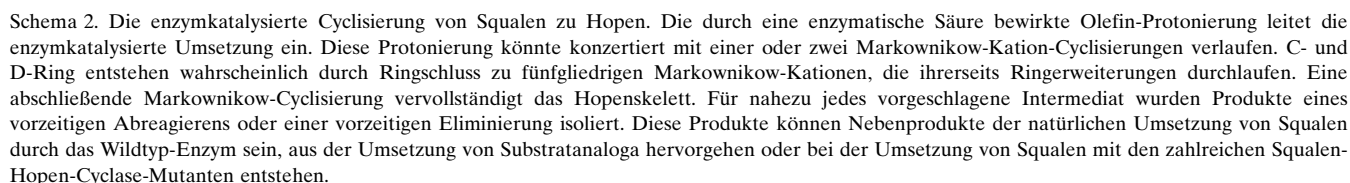
Cyclasen konservierten Rest. Diese Befunde deuten darauf hin, dass dieses Arbeitsmodell den ungefähren Ort der Anfangs- und Schlusschritte der Reaktion widerspiegelt.<sup>[64]</sup>

## 4.2. Initiierung der Reaktion

### 4.2.1. Squalen-Hopen-Cyclasen

Für die initiale Protonierung wurde folgender Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 25; siehe auch Abbildung 20):<sup>[63, 64]</sup> Die katalytische Säure Asp376 liegt 3.0 Å vom C3-Atom des in das aktive Zentrum modellierten Hopens entfernt, was grob mit der für die Protonierung erwarteten Geometrie übereinstimmt. Zwischen Asp376 und His451 besteht über eine Distanz von 2.8 Å eine Wasserstoffbrückenbindung. Da für die Olefin-Protonierung eine starke Brønsted-Säure erforderlich ist, sind beide Reste sehr wahrscheinlich vor dem einleitenden Schritt protoniert. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zu einem geordnet vorliegenden Wassermolekül, das Asp376 mit der Seitenketten-Hydroxygruppe von Tyr495 verbindet, könnte die Acidität von Asp376 zusätzlich erhöhen; die herabgesetzte Aktivität der Tyr495Phe-Mutante<sup>[73]</sup> ist in Einklang mit dieser

Hypothese. Zur Kompensation der positiven Ladung des Asp376-His451-Paares (im ansonsten ungeladenen Kernbereich der Proteinstruktur) im Vorfeld des Protonentransfers wurde eine negative Nettoladung an dem fest H-verbrückten Asp374-Asp377-Paar (Abstand 2.6 Å) vorgeschlagen. Interessanterweise ist Asp376 im kristallinen Enzym eindeutig so orientiert, dass es sein *anti*-Proton auf Squalen übertragen kann. In Einklang mit der Evolution der Squalen-Hopen-Cyclasen in Richtung der Bereitstellung einer starken Säure für die Olefin-Protonierung wird davon ausgegangen, dass Carboxyprotonen in der *anti*-Stellung  $10^4$ mal saurer sind als solche in der *syn*-Stellung.<sup>[87]</sup> Im Anschluss an den Protonentransfer auf Squalen verliert das Asp376-His451-Paar seine Ladung und lässt die verbleibende negative Ladung auf dem Asp374-Asp377-Paar zur Stabilisierung des initial gebildeten kationischen Intermediats zurück.<sup>[63]</sup> In Übereinstimmung mit dieser Hypothese führt die Mutation von Asp377 zu Cys oder Asn zur Bildung des monocyclischen Produkts **61** (siehe Abbildung 23), was darauf hindeutet, dass dieser Rest während der Cyclisierung das C10-Kation stabilisiert.<sup>[69]</sup> Verringerter Reaktionsgeschwindigkeiten nach den Mutationen von



#### 4.2.2. Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen

brückte Asp456-His146-Paar vorgeschlagen,<sup>[18]</sup> doch die Strukturdaten der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* und der Sequenzvergleich lassen vermuten, dass sich His146 in der Domäne 2 des Enzyms befindet und daher von der mutmaßlichen katalytischen Säure Asp456 weit entfernt ist. Da Oxirane leichter protoniert werden als Olefine, könnte ein isolierter Asparaginsäurerest als katalytische Säure für die Oxidosqualen-Cyclasen ausreichen. Diese Betrachtungsweise stimmt auch mit der Tatsache überein, dass das H-verbrückte Asp374-Asp377-Paar, das vermutlich die Ladung des katalytischen Asp-His-Paars der Squalen-Hopen-Cyclase kompensiert, zwar innerhalb der Squalen-Cyclase-Familie konserviert ist, bei den Oxidosqualen-Cyclasen jedoch fehlt.<sup>[63]</sup>

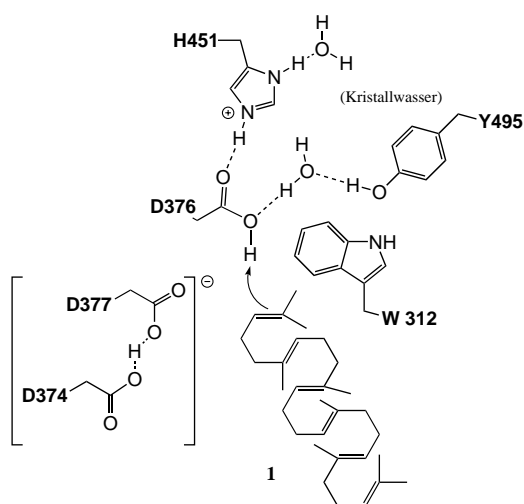


Abbildung 25. Vorgeschlagener Mechanismus für die initiale Protonierung während der Squalen-Cyclisierung.<sup>[64]</sup>

### 4.3. Ringschluss

Die bisher beschriebenen chemischen und theoretischen Studien deuten darauf hin, dass die Bildung des A- und möglicherweise auch des B-Rings konzertiert mit der initialen Oxiran- oder Olefin-Protonierung verlaufen und wahrscheinlich die Einleitung der Cyclisierungskaskade begünstigen. Auf der Grundlage der Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* (Abbildung 20) wurde vorgeschlagen, dass Trp312, Trp489 und Phe365 die Carbokationen stabilisieren, die sich an C2, C6 bzw. C10 von Squalen bilden (C4, C10, C8 gemäß Hopen-Nummerierung, siehe Abbildung 24).<sup>[64]</sup> Die Reste Tyr420, Tyr609 und Tyr612 sind mit ihren Hydroxygruppen der Tasche des aktiven Zentrums zugewandt und könnten für ein zusätzliches negatives elektrostatisches Potential während der frühen Cyclisierungsstadien sorgen.<sup>[64, 78]</sup> Tatsächlich führt die Mutation Tyr612 → Phe zu einem deutlichen Verlust an katalytischer Aktivität.<sup>[73]</sup>

Die verstärkte Bildung der bicyclischen Produkte **62** und **63** durch die Tyr420Ala-Mutante der Squalen-Hopen-Cyclase ist in Einklang mit einer solchen Rolle für Tyr420 (Abbildungen 23 und 24).<sup>[71]</sup> Analog dazu stützt die Bildung des bicyclischen Produkts **62** durch die Mutation Tyr609 → Phe das zuvor erörterte Modell.<sup>[73]</sup> Die Synthese der Verbindungen **63** und **65** durch die Phe365Ala-Mutante (Abbildung 23) gibt einen zusätzlichen Hinweis auf eine  $\pi$ -Kation-Wechselwirkung zwischen Phe365 und dem C8-Kation (Hopen-Nummerierung; Abbildung 20).<sup>[71]</sup> In Übereinstimmung mit diesen Annahmen sind Trp312, Trp489, Phe365, Tyr609 und Tyr612 innerhalb der Squalen- und Oxidosqualen-Cyclasen konserviert. Diese Aminosäuren bilden eine hydrophobe, nichtnucleophile und elektronenreiche Umgebung, die die initialen Cyclisierungsschritte begünstigt (siehe oben).

Es ist wahrscheinlich, dass die Bildung des C-Rings bei der Oxidosqualen-Cyclase über eine Cyclisierung mit fünfgliedrigem Übergangszustand verläuft, an die sich eine Ringerweiterung anschließt (siehe oben). Vielleicht ist dieses fünfgliedrige Intermediat gegenüber der sechsgliedrigen Alter-

native im Sinne der Markownikow-Regel begünstigt; die anschließenden Cyclisierungsschritte hingegen verlaufen offenbar thermodynamisch kontrolliert bevorzugt zu Produkten, die einen sechsgliedrigen Ring enthalten. In der Tat würde eine weitere Markownikow-Cyclisierung des 6-6-5-Kations zu einem unter Ringspannung stehenden 6-6-5-4-Produkt führen (siehe Schema 1). In Analogie zu den Oxidosqualen-Cyclasen ist bei der Bildung des C-Rings durch Squalen-Hopen-Cyclasen ein Ringerweiterungsschritt als kinetisch bevorzugter Reaktionsweg zu erwarten. Die Tyr420Ala-Mutante der Squalen-Hopen-Cyclase bildet das 6-6-5-Trien **64** als Nebenprodukt,<sup>[71]</sup> was belegt, dass eine solche Cyclisierung bei diesem Enzym möglich ist. Die 6-6-5-Produkte **64** und **66** wurden kürzlich bei Umsetzungen mit der Phe601Ala-Mutante der Squalen-Hopen-Cyclase<sup>[37]</sup> isoliert (Abbildung 23). Schließlich wurde gezeigt, dass das Enzym den verkürzten Alkohol **40** in ein 6-6-5-Produkt umwandelt, was mit dem Abfangen eines beim Schließen eines fünfgliedrigen C-Rings gebildeten Markownikow-Kations konsistent wäre (Abbildung 13).<sup>[37]</sup>

Die Isolierung unterschiedlicher Mengen an 6-6-6-5-Produkten bei den Reaktionen des Wildtyps und der Mutanten der Squalen-Hopen-Cyclase deutet stark auf die Bildung eines fünfgliedrigen D-Rings und eine nachfolgende, ebenfalls durch das Enzym katalysierte Ringerweiterung hin.<sup>[38, 42, 70]</sup> Ein fünfgliedriges Intermediat des D-Rings könnte gegenüber der sechsgliedrigen Alternative begünstigt sein, weil im Sechsring eine 1,3-diaxiale Abstoßung zwischen den C15- und C19-Methylgruppen von Squalen vorliegt. Jedoch hat dieser Unterschied keine Gültigkeit für die Bildung des C-Rings bei Hopen. Auf der Grundlage der Daten von Abe et al.<sup>[37, 38]</sup> und Merkofer et al.<sup>[70]</sup> schlagen wir vor, dass Trp169 und Phe601 das bei der Cyclisierung des fünfgliedrigen D-Rings entstehende Kation **67** (Abbildung 15) stabilisieren. In dem bereits vor Bekanntwerden der neueren Mutagenese-Ergebnisse durch Energieminimierung erhaltenen Hopenmodell befinden sich Trp160 und Phe601 erfreulicherweise in unmittelbarer Nachbarschaft zu den erwarteten Positionen des C19-Kations (C18 gemäß Hopen-Nummerierung) in **67** (Abbildung 20 und 24).<sup>[64]</sup> Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass ein 6-6-6-5-Tetracyclus nicht etwa lediglich ein Nebenprodukt, sondern ein echtes Intermediat der Hopen-Cyclisierung ist.

Phe605 der Squalen-Hopen-Cyclase scheint sich in einer Position zu befinden, die für eine Stabilisierung des aus der Bildung des E-Rings resultierenden terminalen Kations geeignet ist (Abbildung 20).<sup>[64]</sup> Diese Hypothese wird durch die Konservierung von Phe605 bei sämtlichen bekannten Squalen-Cyclasen (alle bilden pentacyclische Produkte) sowie durch das Fehlen dieses Rests bei den Oxidosqualen-Cyclasen (alle bilden lediglich vier Ringe) gestützt.<sup>[64]</sup>

Unter der Annahme, dass das von den Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen gebildete C20-Protosterinkation an die konservierten aromatischen Reste in ähnlicher Weise bindet wie das von der Squalen-Hopen-Cyclase gebildete 6-6-6-5-Intermediat, könnten Trp232 und/oder His234, aber auch Phe699 dazu dienen, das C20-Protosterinkation der Oxidosqualen-Cyclase aus *S. cerevisiae* zu stabilisieren (Abbildung 21). Von diesen Resten ist Trp232 lediglich innerhalb

der Oxidosqualen-Cyclasen konserviert. Phe699 dagegen entspricht Phe601 der Squalen-Hopen-Cyclase und ist daher in beiden Enzymklassen konserviert. Diese Sichtweise ist in Einklang mit den oben beschriebenen Enzymmarkierungs- und Mutagenese-Experimenten an der Cyclase aus *S. cerevisiae*.<sup>[18]</sup>

#### 4.4. Umlagerung und Eliminierung

Obwohl sich das vorgeschlagene 6-6-6-5-Intermediat **67** (Abbildung 15) in geringem Umfang zu Nebenprodukten umlagert, verläuft die Hopenbildung ohne Methylgruppen- oder Hydridwanderung.<sup>[42]</sup> Ihren Abschluss findet die Reaktion entweder durch die Eliminierung zum Hauptprodukt Hopen (80%) oder durch die Anlagerung von Wasser zu Diplopterol (20%).<sup>[44]</sup> Die bei einer Auflösung von 2.0 Å bestimmte Struktur der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* enthält im unteren Teil des aktiven Zentrums ein Netzwerk aus gut definierten Wassermolekülen (Abbildung 20).<sup>[64]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass diese enzymgebundenen Wassermoleküle durch Reste des weitreichenden Wasserstoffbrücken-Netzwerks um Glu45 am Boden des Hohlraums polarisiert werden.<sup>[64]</sup> Die Position von Glu45 in der Squalen-Hopen-Cyclase-Struktur und seine Konservierung innerhalb der Squalen-Hopen-Cyclasen deuten darauf hin, dass ein polarisiertes Wassermolekül das Kation des E-Rings angreift oder ein Proton von diesem abstrahiert, was zur Bildung von Diplopterol bzw. Hopen führt. Alle partiell cyclisierten Produkte, die von Squalen-Hopen-Cyclasen aus einer großen Zahl an Substratanaloga gebildet werden, enthalten Doppelbindungen, die auf die Eliminierung eines Protons aus dem Kation zurückzuführen sind, und keine Hydroxygruppen, wie sie bei einer Wasseranlagerung an das Kation resultieren würden (siehe oben). Dieser Befund legt nahe, dass das Netzwerk der Wassermoleküle um Glu45 der einzige Ort sein könnte, an dem Wasser aus dem aktiven Zentrum für die Reaktion mit Kationen zur Verfügung steht.

Die beschriebenen Studien an den Oxidosqualen-Cyclasen unter Verwendung von Substratanaloga lassen vermuten, dass die Rolle des Enzyms bei der Umlagerung wahrscheinlich in der Abschirmung der intermediär gebildeten Carbokationen gegen die Anlagerung von Wasser oder die Deprotonierung durch Basen besteht und dadurch die Hydrid- und Methylgruppenwanderungen entlang einer thermodynamisch und kinetisch günstigen Kaskade möglich werden. Ein homologiestützter Vergleich der Strukturen der Oxidosqualen-Cyclase aus *S. cerevisiae* und der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* (Abbildung 21) deutet darauf hin, dass sich His234, ein essentieller und innerhalb der Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen konservierter Rest,<sup>[18]</sup> in einer geeigneten Position befindet, um als katalytische Base bei den Oxidosqualen-Cyclasen fungieren zu können.

### 5. Ausblick

#### 5.1. Strukturbiologie

Die erste Bestimmung der Struktur einer Triterpen-Cyclase, in Verbindung mit einer Fülle neuerer chemischer und

biologischer Daten, hat unsere Kenntnisse über den Mechanismus der Triterpen-Cyclisierung einen großen Schritt voran gebracht. Ein tief greifendes und detailliertes Verständnis der Rolle der Cyclasen bei der konformativen Vororientierung der Substrate und der Kationenstabilisierung setzt jedoch die Aufklärung weiterer Triterpen-Cyclase-Strukturen voraus. Angesichts der Fülle chemischer Daten, die nun für Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclasen verfügbar sind, und der potentiellen medizinischen Bedeutung dieser Enzyme kommt dabei der Aufklärung der Struktur einer Oxidosqualen-Cyclase eine vorrangige Bedeutung zu. Diese Bemühungen werden hoffentlich durch die rasche Entwicklung neuer Methoden zur Expression und Kristallisation von Membranproteinen unterstützt.<sup>[88, 89]</sup> Wenngleich die menschliche Oxidosqualen-Cyclase sowie das Enzym aus *Candida albicans* hoch attraktive Angriffspunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Cholesterinämie bzw. Pilzerkrankungen sind, würde für ein besseres Verständnis der enzymatischen Mechanismen auch die Aufklärung der Strukturen von leichter handhabbaren Cyclasen aus Bakterien oder Pilzen genügen.

#### 5.2. Strukturbasierte Mutagenese

Neuere Erfolge bei der strukturbasierten Mutagenese und die sorgfältige Analyse der daraus resultierenden veränderten Produktverteilungen haben viel zu unserem Kenntnis über den Mechanismus der enzymatischen Triterpen-Cyclisierungen beigetragen. Die Charakterisierung weiterer Mutanten wird unser Verständnis dieser Enzyme zweifellos vertiefen. Der Übersichtlichkeit wegen wird in diesem Abschnitt durchgängig die Nummerierung der Reste der Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* verwendet. Selbstverständlich sind analoge Experimente auf dem Gebiet der Oxidosqualen-Cyclasen ebenfalls von Bedeutung.

Die Mutationen Leu36→Tyr und Leu607→Ile bei der Squalen-Hopen-Cyclase sowie die entsprechenden Mutationen Tyr99→Leu und Ile705→Leu bei der Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase aus *S. cerevisiae* könnten einen Einblick in die Rolle dieser Reste bei der Festlegung der Konfiguration des B-Rings oder auch bei der Ringerweiterung während der Bildung des C-Rings liefern. Der wiederholte Nachweis teilcyclisierter Produkte, die von vielen der beschriebenen Mutanten gebildet werden, ist Ausdruck eines generellen Problems. Dieses Problem besteht darin, spezifische  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen von einfachen sterischen Effekten zu unterscheiden, die von einer Verdrängung des entstehenden Produkts aus der Tasche des aktiven Zentrums herrühren könnten oder aber durch geringfügige Änderungen der Struktur des aktiven Zentrums verursacht werden. Besonders deutlich wird dieses Problem in den teilweise widersprüchlichen Berichten von Sato et al.<sup>[38]</sup> und Merkofer et al.<sup>[70]</sup> bezüglich der Bildung des D-Rings durch die Squalen-Hopen-Cyclase. Isostere Austausche unter Einführung nicht-natürlicher Aminosäuren<sup>[90]</sup> könnten solche Widersprüche auflösen. Der Ersatz von Trp489, Phe601 und Trp169 durch fluoridierte Analoga dieser Aminosäuren würde eine Reihe von hinreichend isosteren Seitengruppen mit unterschiedlichem Elektronenreichtum und somit unterschiedlicher Fähigkeit

zur Stabilisierung von Kationen zur Verfügung stellen. Eine Korrelation zwischen Elektronenreichtum und Produktverteilung, abgeleitet aus der Isolierung mutmaßlicher 6-6-6-5-Intermediate, würde auf spezifische  $\pi$ -Kation-Wechselwirkungen hindeuten. Die Notwendigkeit, eine In-vitro-Expression dieser Enzyme in Gegenwart von Lipiden zu entwickeln und auch in geringen Mengen gebildete Nebenprodukte der mutierten Enzyme zu analysieren, sowie die geringe Wechselzahl der Squalen-Hopen-Cyclase ( $0.3 \text{ s}^{-1}$ ) machen dies zu einem anspruchsvollen Unterfangen. Die Herstellung einer monomeren Squalen-Hopen-Cyclase durch Mutationen an der vorgeschlagenen Dimerkontaktfäche könnte klären, ob die Dimerbildung für die Enzymaktivität und die Bindung an die Membran notwendig ist.

### 5.3. Gerichtete Evolution

Die relativ geringen Substrat- und Produktspezifitäten der mutierten Squalen-Hopen-Cyclasen deuten die Möglichkeit an, neue Triterpene über eine gerichtete Evolution dieser Enzyme herzustellen.<sup>[91, 92]</sup> In Einklang mit dieser Hypothese wurde kürzlich eine Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclase isoliert, die durch spontane Mutation eines Lanosterin-auxotrophen Hefestammes entstanden war (Ile481 → Val) und in der Lage ist, Lanosterin herzustellen.<sup>[93]</sup> Ein katalytischer Antikörper mit Terpen-Cyclase-Aktivität, der die Cyclisierung eines nichtnatürlichen Sesquiterpens zu einer Reihe von ungesättigten *trans*-Decalinen katalysiert,<sup>[94]</sup> imitiert ebenfalls die Struktur des aktiven Zentrums einer natürlichen Sesquiterpen-Cyclase.<sup>[95–97]</sup> Auch wenn bisher kein katalytischer Antikörper mit Triterpen-Cyclase-Aktivität beschrieben wurde,<sup>[98]</sup> könnte die Entwicklung von Methoden zur Herstellung solcher Biokatalysatoren neue Wege zu nichtnatürlichen Triterpenen eröffnen.<sup>[99, 100]</sup>

Da viele Squalen-Cyclasen Oxidosqualen als Substrat akzeptieren,<sup>[9]</sup> könnten Strategien zur gerichteten Evolution auch auf die Squalen-Hopen-Cyclasen (oder andere Cyclasen, die kein Lanosterin produzieren) angewendet werden.<sup>[101, 102]</sup> Der Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase-defiziente Hefestamm *ERG7* bietet die Möglichkeit, in vivo bezüglich der Bildung von Lanosterin zu selektieren.<sup>[53]</sup> Die Struktur einer durch gerichtete Evolution erhaltenen, zur Lanosterinbildung fähigen Squalen-Hopen-Cyclase-Mutante könnte wertvolle Informationen über die strukturellen Anforderungen verschiedener Übergangszustandsgeometrien und über Gerüstumlagerungen liefern. Ein solches Ergebnis wäre zudem unbeeinflusst von der natürlichen Richtung der Evolution. Allgemeiner formuliert bieten Herstellung und Verwendung von mutierten Organismen, die andere essentielle Triterpene nicht produzieren können, die Chance, genetische Selektionen in Richtung einer künstlichen Evolution von Cyclase-Enzymen mit neuen Produktspezifitäten vorzunehmen. Eine gründliche Analyse der für die veränderten Produktspezifitäten ursächlichen Mutationen könnte wichtige Einblicke in die Bedeutung von Aminosäureresten – sowohl in der Nähe des aktiven Zentrums als auch weiter davon entfernt – für den Verlauf dieser mechanistisch komplexen, jedoch überaus eleganten enzymkatalysierten Cyclisierungen liefern.

*Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM-34167 für E.J.C.), dem Sonderforschungsbereich 388 (K.U.W. und G.E.S.) sowie durch ein Postdoktorandenstipendium der BASF und der Studienstiftung des deutschen Volkes (K.U.W.) gefördert.*

Eingegangen am 18. November 1999 [A 371]  
Übersetzt von Dr. Joachim Seemann, Reinheim

- [1] R. B. Woodward, K. Bloch, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2023–2024.
- [2] G. Stork, A. W. Burgstahler, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 5068–5077.
- [3] A. Eschenmoser, L. Ruzika, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **1955**, 38, 1890–1904.
- [4] R. K. Maudal, T. T. Tchen, K. Bloch, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2589–2590.
- [5] J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popjak, Y. Shimizu, S. Ichii, E. Forchielli, E. Caspi, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3224–3228.
- [6] E. J. Corey, W. E. Russey, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4750–4751.
- [7] E. J. Corey, W. E. Russey, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4751–4752.
- [8] E. E. van Tamelen, J. D. Willett, R. B. Clayton, K. E. Lord, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4752–4754.
- [9] I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2189–2206.
- [10] E. J. Corey, D. D. Staas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3526–3527.
- [11] K. Poralla in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 5 (Hrsg.: D. Barton, K. Nakashini, O. Meth-Cohn), Pergamon, Oxford, **1999**, S. 299–319.
- [12] C. Jenson, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10846–10854.
- [13] E. J. Corey, S. C. Virgil, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, V. Singh, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11819–11820.
- [14] E. J. Corey, S. C. Virgil, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8171–8172.
- [15] B. Robustell, I. Abe, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 957–960.
- [16] B. Robustell, I. Abe, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9385–9388.
- [17] E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1277–1288.
- [18] E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1289–1296.
- [19] E. E. van Tamelen, D. R. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 950–952.
- [20] E. J. Corey, K. Lin, M. J. Jautelat, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2724–2726.
- [21] L. O. Crosby, E. E. van Tamelen, R. B. Clayton, *Chem. Commun.* **1969**, 532–533.
- [22] J. C. Medina, K. S. Kyler, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4818–4821.
- [23] X.-y. Xiao, S. E. Sen, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2097–2100.
- [24] D. Gao, Y.-K. Pan, K. Byun, J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4045–4046.
- [25] T. Hoshino, Y. Sakai, *Chem. Commun.* **1998**, 1591–1592.
- [26] E. E. van Tamelen, K. B. Sharpless, R. Hanzlik, R. B. Clayton, A. L. Burlingame, P. C. Wszolek, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7150–7151.
- [27] E. J. Corey, H. Cheng, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2709–2712.
- [28] E. J. Corey, S. C. Virgil, D. R. Liu, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1524–1525.
- [29] J. W. Cornforth, *Angew. Chem.* **1968**, 80, 977–985; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, 7, 903–911.
- [30] W. R. Nes, T. E. Varkey, K. Krevitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 260–262.
- [31] E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4025–4026.
- [32] E. J. Corey, D. C. Daley, H. Cheng, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3287–3290.
- [33] E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6429–6431.

- [34] E. E. van Tamelen, J. W. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 7204–7206.
- [35] E. E. van Tamelen, J. H. Freed, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 7206–7207.
- [36] E. E. van Tamelen, J. Willet, M. Schwartz, R. Nadeau, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 5937–5938.
- [37] T. Hoshino, M. Kouda, T. Abe, S. Ohashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 2038–2041.
- [38] T. Sato, T. Abe, T. Hoshino, *Chem. Commun.* **1998**, 2617–2618.
- [39] I. Abe, T. Y. Dang, Y. F. Zheng, B. A. Madden, C. Feil, K. Poralla, G. D. Prestwich, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11333–11334.
- [40] I. Abe, M. Rohmer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 902–903.
- [41] I. Abe, M. Rohmer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 783–791.
- [42] C. Pale-Grosdemange, C. Feil, M. Rohmer, K. Poralla, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2355–2358; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2237–2240.
- [43] T. Hoshino, T. Kondo, *Chem. Commun.* **1999**, 731–732.
- [44] B. Seckler, K. Poralla, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 881, 356–363.
- [45] C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. R. Liu, E. J. Corey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 213, 154–160.
- [46] I. Abe, M. Bai, X.-y. Xiao, G. D. Prestwich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 187, 32–38.
- [47] M. Kusano, M. Shibuya, U. Sankawa, Y. Ebizuka, *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, 18, 195–197.
- [48] C. H. Buntel, J. H. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9711–9713.
- [49] C. A. Roessner, C. Min, S. H. Hardin, L. W. Harris-Haller, J. C. McCollum, A. I. Scott, *Gene* **1993**, 127, 149–150.
- [50] Z. Shi, C. J. Buntel, J. H. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 7370–7374.
- [51] E. J. Corey, S. P. T. Matsuda, B. Bartel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2211–2215.
- [52] E. J. Corey, S. P. T. Matsuda, C. H. Baker, A. Y. Ting, H. Cheng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 219, 327–331.
- [53] E. J. Corey, S. P. T. Matsuda, B. Bartel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11628–11632.
- [54] T. Kushiro, M. Shibuya, Y. Ebizuka, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 256, 238–244.
- [55] D. Ochs, C. Kaletta, K. D. Entian, A. Beck-Sickinger, K. Poralla, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 298–302.
- [56] I. G. Reipen, K. Poralla, H. Sahm, G. A. Sprenger, *Microbiology* **1995**, 141, 155–161.
- [57] M. Perzl, P. Müller, K. Poralla, E. L. Kannenberg, *Microbiology* **1997**, 143, 1235–1242.
- [58] A. Tippelt, L. Jahnke, K. Poralla, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1391, 223–232.
- [59] C. Freiberg, R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, X. Perret, *Nature* **1997**, 387, 394–401.
- [60] T. Kaneko, S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, S. Tabata, *DNA Res.* **1996**, 3, 109–136.
- [61] F. Kunst et al. (über 100 weitere Autoren), *Nature* **1997**, 390, 249–256.
- [62] K. U. Wendt, C. Feil, A. Lenhart, K. Poralla, G. E. Schulz, *Protein Sci.* **1997**, 6, 722–724.
- [63] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, 277, 1811–1815.
- [64] K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 175–187.
- [65] S. Neumann, H. Simon, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1986**, 367, 723–729.
- [66] K. U. Wendt, G. E. Schulz, *Structure* **1998**, 6, 127–133.
- [67] D. Ochs, C. H. Tappe, P. Gartner, R. Kellner, K. Poralla, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 194, 75–80.
- [68] C. Feil, R. Stüssmuth, G. Jung, K. Poralla, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242, 51–55.
- [69] T. Sato, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 2189–2198.
- [70] T. Merkofer, C. Pale-Grosdemange, K. U. Wendt, M. Rohmer, K. Poralla, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2121–2124.
- [71] C. Pale-Grosdemange, T. Merkofer, M. Rohmer, K. Poralla, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6009–6012.
- [72] T. Hoshino, T. Sato, *Chem. Commun.* **1999**, 2005–2006.
- [73] C. Füll, K. Poralla, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 183, 221–224.
- [74] I. Abe, G. D. Prestwich, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 802–804.
- [75] K. Poralla, A. Hewelt, G. D. Prestwich, I. Abe, I. Reipen, G. Sprenger, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 157–158.
- [76] K. Poralla, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 285–290.
- [77] W. S. Johnson, S. D. Lindell, J. Steele, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2517–2518.
- [78] D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163–168.
- [79] G. Ourisson, Y. Nakatani, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 11–23.
- [80] G. Balliano, F. Viola, M. Ceruti, L. Cattel, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 293, 122–129.
- [81] G. Blobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1496–1500.
- [82] D. Picot, P. J. Loll, R. M. Garavito, *Nature* **1994**, 367, 243–249.
- [83] C. Luong, A. Miller, J. Barnett, J. Chow, C. Ramesha, M. F. Browner, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 927–933.
- [84] R. G. Kurumbail, A. M. Stevens, J. K. Gierse, J. J. McDonald, R. A. Stegeman, J. Y. Pak, D. Gildehaus, J. M. Miyashiro, T. D. Penning, K. Seibert, P. C. Isakson, W. C. Stallings, *Nature* **1996**, 384, 644–648.
- [85] T. Y. Dang, I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 333–341.
- [86] A. T. Brünger, *Science* **1987**, 235, 458–460.
- [87] R. D. Gandour, *Bioorg. Chem.* **1981**, 10, 169–176.
- [88] A. Pautsch, J. Vogt, K. Model, C. Siebold, G. E. Schulz, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1999**, 34, 167–172.
- [89] C. Ostermeier, S. Iwata, B. Ludwig, H. Michel, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 842–846.
- [90] V. W. Cornish, D. Mendel, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 677–690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 621–633.
- [91] F. H. Arnold, A. A. Volkov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 54–59.
- [92] D. R. Liu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 36–56; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 36–54.
- [93] E. A. Hart, L. Hua, L. B. Darr, W. K. Wilson, J. Pang, S. P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9887–9888.
- [94] J. Hasserodt, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5993–5998.
- [95] C. M. Paschall, J. Hasserodt, T. Jones, R. A. Lerner, K. D. Janda, D. W. Christianson, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1859–1864; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1743–1747.
- [96] C. M. Starks, K. Back, J. Chappel, J. P. Noel, *Science* **1997**, 277, 1815–1820.
- [97] C. A. Lesburg, J. M. Caruthers, C. M. Paschall, D. W. Christianson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 695–703.
- [98] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, 269, 1835–1842.
- [99] J. Hasserodt, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11654–11655.
- [100] J. Hasserodt, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 40–45.
- [101] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, 370, 389–391.
- [102] P. A. Patten, R. J. Howard, W. P. C. Stemmer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 724–733.
- [103] M. L. Connolly, *J. Mol. Graph.* **1993**, 11, 139–141.
- [104] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, 11, 281–296.
- [105] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4876–4882.