

# Reversibler Zuckeraustausch mit Glycosyltransferasen als Methode in der Naturstoff(bio)synthese\*\*

Helge B. Bode\* und Rolf Müller\*

## Stichwörter:

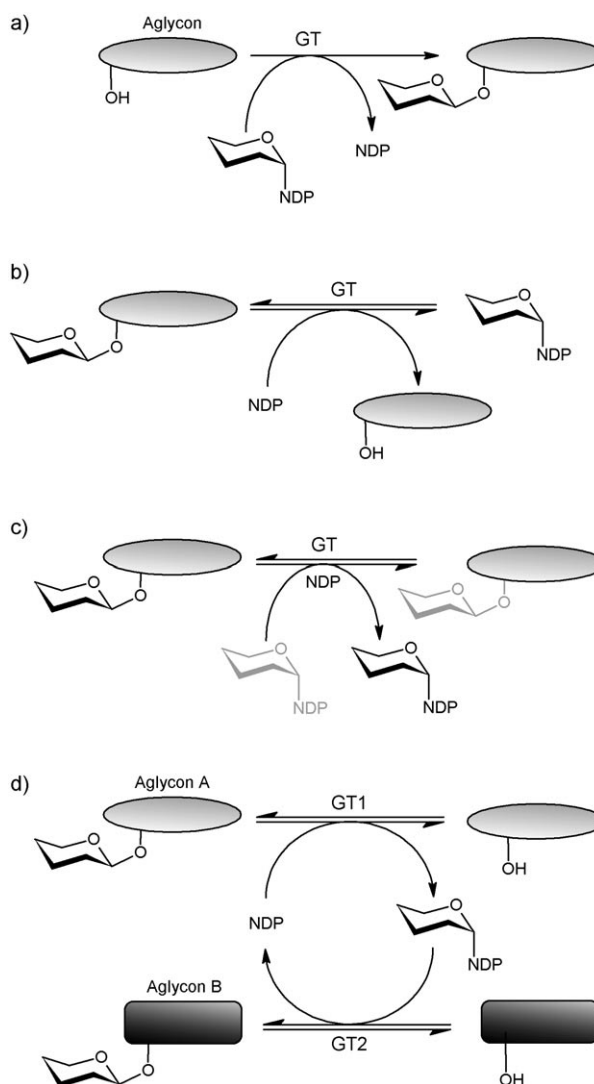
Aglyconaustausch · Glycosylierungen · Naturstoffe · Transferasen · Zuckeraustausch

Seit den Anfängen der Medizin spielen Zucker eine bedeutende Rolle. Ohne Zuckerwürfel wäre auch die Verdrängung der Kinderlähmung in Europa und den USA nicht so relativ einfach durchführbar gewesen; in Deutschland wurde die Impfkampagne unter der treffenden Bezeichnung „Schluckimpfung schmeckt süß!“ propagiert. Der Impfstoff hätte natürlich auch ohne Zucker gewirkt – für viele therapeutisch verwendete Naturstoffe trifft dies allerdings nicht zu: Die meisten dieser klinisch genutzten Polyketide, Peptide oder Terpenoide sowie ihre semisynthetischen Derivate sind glycosylierte Verbindungen, deren Aglycone oft kaum oder gar keine biologische Aktivität aufweisen.<sup>[1,2]</sup> Die Zuckerreste haben einen großen Einfluss auf die Spezifität, die Substratbindung und die pharmakologischen Eigenschaften der jeweiligen Substanz, weshalb gerade für den Aufbau von Substanzbibliotheken ein großes Interesse daran besteht, das natürliche Glycosylierungsmuster zu verändern.<sup>[3]</sup>

Die enzymatische Verknüpfung von Aglycon und Nucleosiddiphosphat-(NDP)-aktivierten Zuckern wird durch Glycosyltransferasen katalysiert und

resultiert letztlich in den bekannten glycosylierten Naturstoffen (Schema 1 a).<sup>[4,5]</sup> Es gibt bisher drei Methoden zur Herstellung von einzelnen Substan-

zen mit nichtnatürlichen Glycosylierungsmustern oder Substanzbibliotheken glycosylierter Naturstoffe – die so nicht in der Natur vorkommen und



**Schema 1.** Beispiele von Glycosyltransferase (GT)-katalysierten Reaktionen. a) Klassischer Zuckertransfer, b) NDP-Zuckerbiosynthese, c) Zuckeraustausch (die beiden unterschiedlichen Zuckermoleküle sind grau und schwarz dargestellt) und d) Aglyconaustausch.

[\*] Dr. H. B. Bode, Prof. Dr. R. Müller  
Institut für Pharmazeutische  
Biotechnologie  
Universität des Saarlandes  
Gebäude A4.1,  
66041 Saarbrücken (Deutschland)  
Fax: (+49) 681-302-5473  
E-Mail: h.bode@mx.uni-saarland.de  
rom@mx.uni-saarland.de

[\*\*] Wir danken der DFG und dem BMBF für die Unterstützung unserer Forschung und den Gutachtern für hilfreiche Kommentare zu diesem Manuskript.

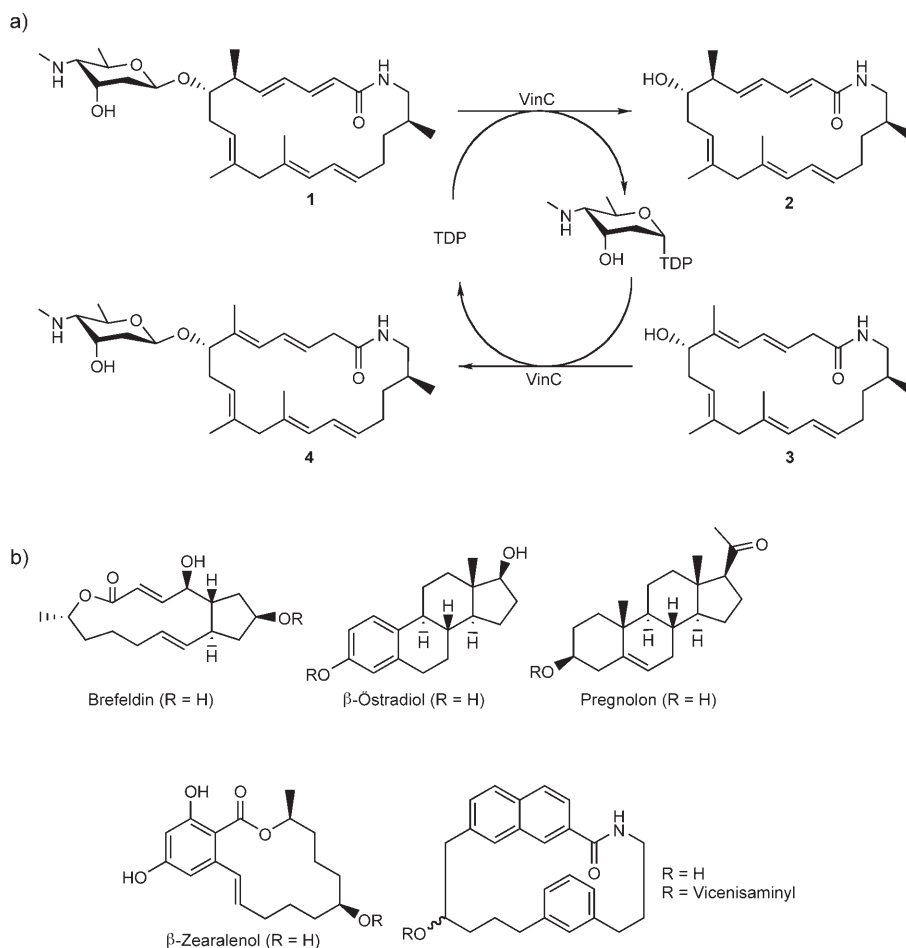
wichtige Aussagen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen und damit auch zur Strukturoptimierung ermöglichen:

- 1) Die Totalsynthese oder die Semi-synthese. Am Beispiel des Rebexamycins konnte so eindrucksvoll die Bedeutung des Zuckerrestes für die biologische Aktivität nachgewiesen werden.<sup>[6]</sup> Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren große Fortschritte bei der automatisierten Synthese von Zuckeroligomeren erzielt.<sup>[7]</sup>
- 2) Die Manipulation der Zuckerbiosynthesewege in vivo. Bei diesem, oft auch als kombinatorische Biosynthese bezeichneten Verfahren, werden zusätzliche Enzyme oder ganze Stoffwechselwege in Mikroorganismen exprimiert, die bereits ein Aglycon oder einen glycosylierten Naturstoff produzieren. Die so bewirkten Veränderungen können zur Bildung neuer oder veränderter Zu-

cker führen, die dann anstelle des natürlichen Zuckers mit dem Aglycon verbunden werden. Ausgehend von diesem Ansatz konnten Bibliotheken von Naturstoffen hergestellt werden, die sich im Zuckerrest unterscheiden. Im Fall der Indolcarbazole wurden außerdem auch Derivate erhalten, die sich durch Modifikationen unterscheiden, die erst nach der Glycosidbildung entstehen.<sup>[8]</sup> Die Voraussetzung für diese Art der kombinatorischen Biosynthese ist ein genaues Verständnis der Biochemie der aktivierten Zucker und der entsprechenden Glycosyltransferasen.<sup>[9]</sup> Mehrere Zuckerbiosynthesewege sind bisher im Zuge der Analyse von Biosynthese-Genclustern glycosylierter Naturstoffe identifiziert und im Detail untersucht worden. Ausgehend von diesen Arbeiten sind auch ungewöhnliche

Enzyme wie *N*- oder *C*-Glycosyltransferasen oder iterativ arbeitende Glycosyltransferasen identifiziert worden, die die Möglichkeiten der kombinatorischen Biosynthese noch erweitern.<sup>[10–12]</sup>

- 3) Die Glycorandomisierung. Dieser Prozess umfasst im Wesentlichen zwei Schritte: Zuerst die Aktivierung einer Vielzahl von Zuckern (natürlichen oder synthetischen Ursprungs) mithilfe von Kinasen, die keine hohe Substratspezifität aufweisen sollten. Im weiteren Verlauf werden die so gewonnenen Zuckerphosphate durch Nucleotidyltransferasen in die entsprechenden NDP-Zucker überführt, die dann wiederum als Substrate für die Glycosylierung von Aglyconen eingesetzt werden und so zum Aufbau glycosylierter Substanzbibliotheken dienen.<sup>[13–15]</sup> Die Leistungsfähigkeit



**Schema 2.** a) Deglycosylierung von Vicenistatin (**1**; obere Reaktion), Glycosylierung von Neovicenilactam (**3**; untere Reaktion) und Transglycosylierung von Vicenilactam ausgehend von **1** zu **4** (beide Reaktionen zusammen). b) Weitere Aglycone und ihre glycosylierten Derivate, die auf ähnliche Weise erzeugt wurden.

dieser Methode wurde durch die Synthese von 11 bekannten und 39 neuen Derivaten des Vancomycins – von denen einige eine höhere biologische Aktivität als der Naturstoff zeigen – eindrucksvoll demonstriert.<sup>[13]</sup> Die Zahl der so erhaltenen Derivate kann noch erhöht werden, wenn der eingesetzte Zucker mit funktionellen Gruppen ausgestattet ist, die weitere chemische Reaktionen ermöglichen (z.B. mithilfe von Klick-Chemie).

Die neueste Ergänzung zu diesen biochemischen und chemischen Glycosylierungsmethoden ist die Nutzung von glycosylierten Naturstoffen selbst als Quelle für aktivierte Zucker (Schema 1b). Des Weiteren ist der Austausch von Zuckern (Schema 1c) oder Aglyconen (Schema 1d) möglich. Die biochemische Basis für diese neuen Möglichkeiten war die Erkenntnis, dass Glycosyltransferasen auch reversibel arbeiten können. Bis vor kurzem wurde auf dem Gebiet der Naturstoffbiosynthese davon ausgegangen, dass Glycosyltransferasen unidirektionale Katalysatoren sind, die die Verknüpfung von NDP-Zuckern mit Aglyconen katalysieren. Gleichwohl war bekannt, dass die Saccharosesynthase auch die umgekehrte Reaktion katalysieren kann, die zur Bildung von NDP-Glucose und Fructose aus Saccharose und NDP führt.<sup>[16]</sup>

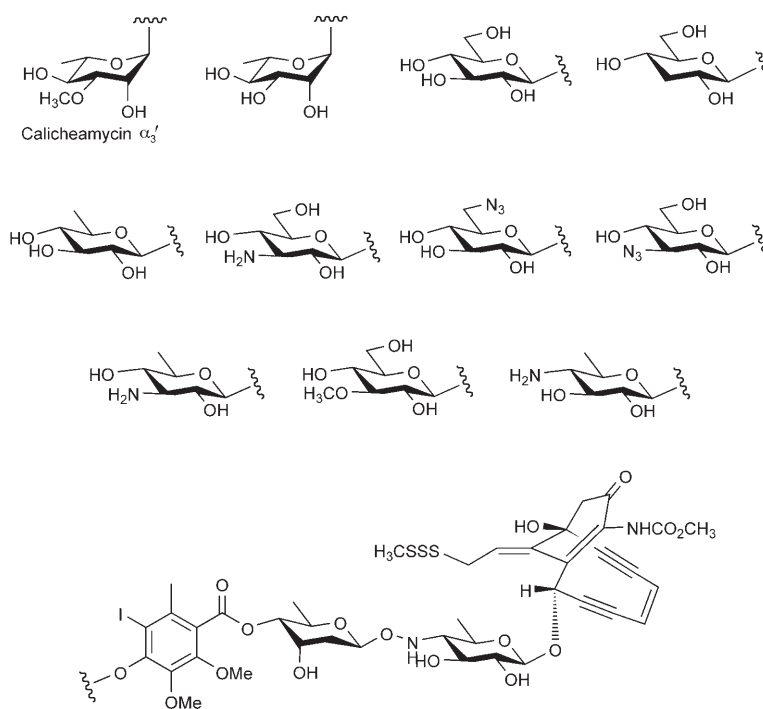
Eguchi und Mitarbeiter beschrieben 2005 erstmals die Nutzung einer reversibel arbeitenden Glycosyltransferase, die an einer Naturstoffbiosynthese beteiligt ist.<sup>[17]</sup> Sie verwendeten die Glycosyltransferase VinC, die die Verknüpfung von NDP-Vicenisamin mit Vicenilactam (**2**) katalysiert. Das so erzeugte Vicenistatin (**1**) wurde aus *Streptomyces halstedii* HC 34 isoliert und weist Antitumoraktivität auf.<sup>[18,19]</sup> Die Autoren konnten zeigen, dass VinC auch die Thymidindiphosphat(TDP)-abhängige Deglycosylierung von **1** zu TDP-Vicenisamin katalysiert (Schema 2a, oben).<sup>[17]</sup> Zugabe von Neovicenilactam (**3**), einem Doppelbindungs-isomer von **1**, zur Reaktionsmischung führte zur Bildung von Neovicenistatin (**4**) in 42% Ausbeute in einer Eintopfreaktion (Schema 2a). In weiteren Experimenten nutzten Eguchi und Mitar-

beiter **1** als Ausgangsmaterial für TDP-Vicenisamin, um fünf verschiedene Aglycone zu glycosylieren. So entstanden die entsprechenden Produkte in Ausbeuten zwischen 7 und 24% (Schema 2b). Zwar wirken die Aglycone auf den ersten Blick sehr verschieden, durch die Bestimmung ihrer dreidimensionalen Struktur konnte jedoch nachgewiesen werden, dass alle Verbindungen eine ähnliche Größe haben. Auch befindet sich die freie Hydroxygruppe bei allen Aglyconen an fast der gleichen Position wie bei **2**.

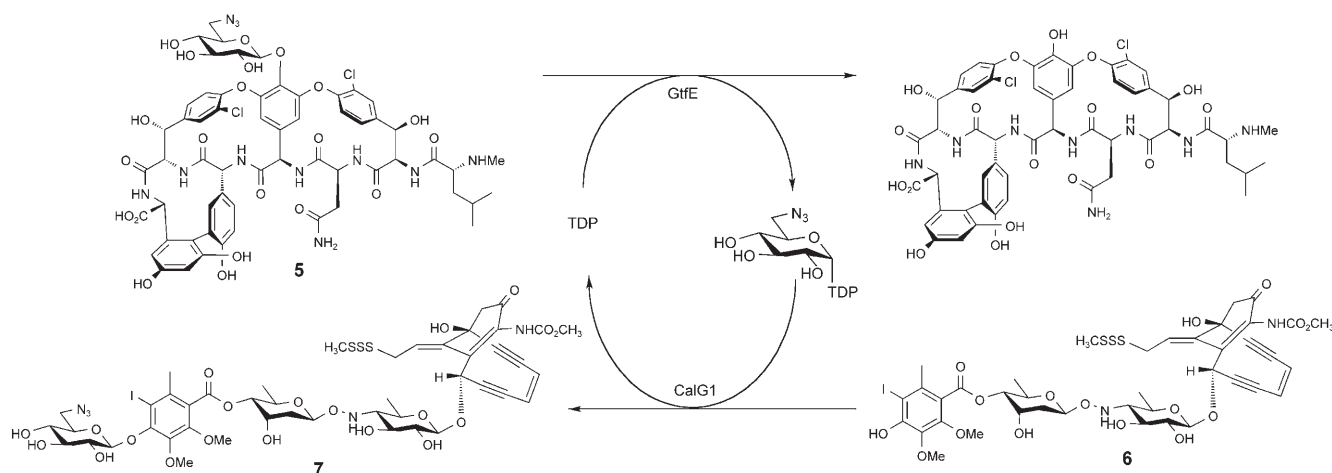
Kürzlich konnten Thorson und Mitarbeiter diese Methode noch erweitern, indem sie die Glycosyltransferasen CalG1 und CalG4 bzw. GtfD und GtfE aus der Biosynthese von Calicheamycin bzw. Vancomycin einsetzten.<sup>[20]</sup> Zusätzlich zu der bereits beschriebenen Deglycosylierung war dank der geringen Substratspezifität von CalG1 die Bildung von zehn neuen Calicheamycin-Glycosiden möglich, die sich im Zuckerrest an der substituierten Benzoesäure-Einheit unterscheiden (Schema 3). Außerdem beobachteten die Autoren einen Zuckeraustausch während der Inkubation von Calicheamycin mit CalG1, wenn TDP-3-Desoxy- $\alpha$ -D-glucose im Überschuss vorhanden war.

Eine Erweiterung dieses Ansatzes auf acht natürliche sowie semisynthetische Calicheamycin-Derivate und die Kombination mit zehn TDP-Zuckern führte zur Bildung von mehr als 70 neuen Calicheamycin-Derivaten, was die Leistungsfähigkeit dieser Art des kombinatorischen Zuckeraustauschs demonstriert. Ähnliche Resultate wurden mit CalG4 erhalten. Bei einer Ergänzung dieser Untersuchungen, die über die Strukturklasse der Endiine hinausführte, verwendeten Thorson und Mitarbeiter die Glycosyltransferasen GtfD und GtfE aus der Vancomycinbiosynthese, was ebenso zum erwarteten Zuckeraustausch führte. Abschließend ermöglichte die Kombination von CalG1 und GtfD zusammen mit dem Vancomycin-Derivat **5** und dem Calicheamycin-Aglycon **6** die Bildung des neuen Calicheamycin-Derivates **7** in 48% Ausbeute in einer Eintopfreaktion (Schema 4).

Ausgehend von diesem Ansatz können seltene NDP-Zucker einfach aus glycosylierten Naturstoffen mit der entsprechenden Glycosyltransferase erhalten und durch eine zweite Glycosyltransferase mit dem zugehörigen anderen Naturstoff-Aglycon verknüpft werden. Dieser Befund ist von großer Be-



**Schema 3.** Calicheamycin-Derivate, die durch Zuckeraustausch ausgehend von Calicheamycin  $\alpha_3'$ , CalG1 und zehn verschiedenen TDP-aktivierten Zuckern erhalten wurden.



**Schema 4.** Beispiel eines Aglyconaustauschs in einer Eintopfreaktion zwischen dem Vancomycin-Derivat **5**, dem Calicheamycin-Aglycon **6** und den Glycosyltransferasen GtfE und CalG1 zur Deglycosylierung bzw. Glycosylierung.

deutung, da viele für die Naturstoffbiosynthese benötigte aktivierte Zucker nur schwer präparativ oder durch Abbau zugänglich sind.

Die Pionierarbeit von Eguchi und Mitarbeitern,<sup>[17]</sup> ergänzt durch die Untersuchungen von Thorson et al.,<sup>[20]</sup> hat unser Verständnis von Glycosyltransferasen sowie ihrer Rolle und Nutzung in der Naturstoff(bio)synthese deutlich vergrößert. Ein Wermutstropfen allerdings bleibt: In beiden Arbeiten wurden sehr hohe Enzymkonzentrationen benötigt, sodass kaum noch von eigentlicher Katalyse gesprochen werden kann. Um die vorgestellten Reaktionen für die Synthese präparativer Mengen nutzen zu können, wie sie zur Durchführung biologischer Tests meist notwendig sind, ist noch viel Optimierungsarbeit notwendig. Dass dieses Ziel prinzipiell erreichbar ist, zeigt eine kürzlich publizierte Arbeit: Die (Bio-)Synthese von TDP-6-Desoxy-4-keto- $\alpha$ -D-glucose gelang hier unter hocheffizienter Enzymkatalyse in einer dreistufigen Eintopfreaktion in 72 % Ausbeute und im 0.2-g-Maßstab.<sup>[21]</sup>

Sind die notwendigen Optimierungen einmal erreicht, steht bereits eine Vielzahl biochemisch charakterisierter Glycosyltransferasen für die Glycosylierung und den Zucker- oder Aglyconaustausch zur Verfügung. Hier ergeben sich enorme Möglichkeiten insbesonde-

re aus der großen Zahl unterschiedlicher Glycosyltransferasen, die im Rahmen von Sequenzierungen einzelner Gencluster für die Biosynthese von Sekundärstoffen oder ganzer Genome<sup>[22]</sup> identifiziert werden. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die biologische Aktivität glycosylierter Substanzen, für die die Zuckerreste eine herausragende Rolle spielen.<sup>[1]</sup>

Online veröffentlicht am 15. Februar 2007

- [1] A. C. Weymouth-Wilson, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 99–110.
- [2] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022–1037.
- [3] S. Blanchard, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 263–271.
- [4] K. M. Koeller, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465–4493.
- [5] M. Oberthür, C. Leimkuhler, R. G. Kruger, W. Lu, C. T. Walsh, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10747–10752.
- [6] G. Zhang, J. Shen, H. Cheng, L. Zhu, L. Fang, S. Luo, M. T. Muller, G. E. Lee, L. Wei, Y. Du, D. Sun, P. G. Wang, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2600–2611.
- [7] P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 751–763.
- [8] C. Sanchez, L. Zhu, A. F. Brana, A. P. Salas, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 461–466.
- [9] A. Trefzer, J. A. Salas, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 283–299.
- [10] C. Dürr, D. Hoffmeister, S. E. Wohler, K. Ichinose, M. Weber, U. von Mulert, J. S. Thorson, A. Bechthold, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3022–3025; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2962–2965.
- [11] A. Luzhetskyy, M. Fedoryshyn, C. Dürr, T. Taguchi, V. Novikov, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 725–729.
- [12] A. P. Salas, L. Zhu, C. Sanchez, A. F. Brana, J. Rohr, C. Mendez, J. A. Salas, *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 17–27.
- [13] X. Fu, C. Albermann, J. Jiang, J. Liao, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1467–1469.
- [14] X. Fu, C. Albermann, C. Zhang, J. S. Thorson, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1513–1515.
- [15] J. S. Thorson, W. A. Barton, D. Hoffmeister, C. Albermann, D. B. Nikolov, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 16–25.
- [16] T. Bülter, C. Wandrey, L. Elling, *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 469–473.
- [17] A. Minami, K. Kakinuma, T. Eguchi, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6187–6190.
- [18] Y. Ogasawara, K. Katayama, A. Minami, M. Otsuka, T. Eguchi, K. Kakinuma, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 79–86.
- [19] A. Minami, R. Uchida, T. Eguchi, K. Kakinuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6148–6149.
- [20] C. Zhang, B. R. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I. K. Lee, L. Li, J. S. Thorson, *Science* **2006**, *313*, 1291–1294.
- [21] L. Elling, C. Rupprath, N. Günther, U. Römer, S. Verseck, P. Weingarten, G. Dräger, A. Kirschning, W. Piepersberg, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1423–1430.
- [22] H. B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988–7007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6828–6846.