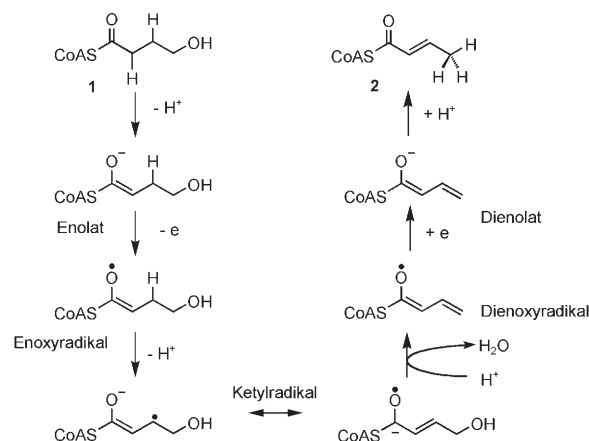


Der stereochemische Verlauf der enzymatischen Wassereliminierung von 4-Hydroxybutyryl-Coenzym A zu Crotonyl-Coenzym A**

*Peter Friedrich, Daniel J. Darley, Bernard T. Golding und Wolfgang Buckel**

Professor Duilio Arigoni gewidmet

4-Hydroxybutyryl-Coenzym A (4-Hydroxybutyryl-CoA, **1**, Schema 1) enthält drei diastereotope Methylengruppen, die während der reversiblen Dehydratisierung zu Crotonyl-CoA (But-2-enoyl-CoA, **2**) entweder ein Wasserstoffatom verlieren oder hinzugewinnen. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*, die diese faszinierende γ -Eliminierung katalysiert,^[1] ist auch das Schlüsselenzym des vor kurzem entdeckten fünften CO₂-Fixierungszyklus.^[2] Jede 56-kDa-Untereinheit der homotetrameren Dehydratase enthält ein Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und einen [Fe₄S₄]²⁺-Cluster.^[1] Die Kristallstruktur zeigt einen Spalt zwischen Cluster und FAD, in dem das Substrat gebunden werden könnte.^[3] Die mittelkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase, die auch FAD, aber keinen Cluster enthält, weist eine verwandte Struktur auf, die mit Octanoyl-CoA als gebundenem Substrat bestimmt wurde.^[4] Mit dieser Struktur als Modell konnte **1** in die Kristallstruktur der Dehydratase eingepasst werden. Als Anker dienen die beiden Wasserstoffbrücken von der NH-Gruppe von Alanin 460 und der 2'-OH-Gruppe des FADs jeweils zum Sauerstoffatom des Thioestercarbonyls.^[3] Die Hydroxygruppe von **1** wird so ein Ligand eines Eisenatoms im Cluster, das nicht wie die ande-



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA (**1**) zu Crotonyl-CoA (**2**).

ren drei Eisenatome an Cystein, sondern an Histidin 292 koordiniert ist (lange Fe-N-Bindung von 2.4 Å). Es wurde postuliert, dass die so freigesetzte Histidin-Base das 2*Re*-Proton des Substrats entfernt,^[5] während das 3*Si*-Wasserstoffatom erst nach einer Einelektronenoxidation durch das FAD als Proton auf N5 des Cofaktors übertragen wird (Schema 1).^[6,7] Diese Hypothese stützt sich auf EPR-Messungen^[8] und vermeidet das in eine mechanistische Sackgasse führende Zwischenprodukt 4-Hydroxycrotonyl-CoA. Das so erzeugte Ketylradikal eliminiert mit Unterstützung des Clusters die Hydroxygruppe zum Dienoxyradikal, das von dem intermediär entstandenen FAD-Semichinon zum Dienolat reduziert wird. Die abschließende Bildung der Methylgruppe des Produkts **2** könnte durch das protonierte Histidin 292 vorgenommen werden, wobei die freigesetzte Base wieder an das Eisenzentrum koordiniert. Auf diese Weise sollte die Hydroxygruppe unter Retention der Konfiguration eliminiert werden. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese stereochemischen Voraussagen durch organische und enzymatische Synthesen unter Verwendung aller drei Wasserstoffisotope.


Um die Konfiguration an C2 zu bestimmen, synthetisierten wir (2*R*)- und (2*S*)-4-Hydroxy[2-³H₁]butyryl-CoA ((2*R*)-**1** und (2*S*)-**1**, Schema 2) und inkubierten sie einzeln mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase. Der Deuteriumgehalt der isolierten CoA-Thioester wurde vor und nach der Inkubation mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.^[5] Zur Synthese der Substrate wurde 3-Benzoyloxy-1-propanol (**3**) durch Oxidation zu 3-Benzoyloxypropionsäure und Reduktion mit Lithiumaluminiumdeuterid doppelt deuteriert. Die er-

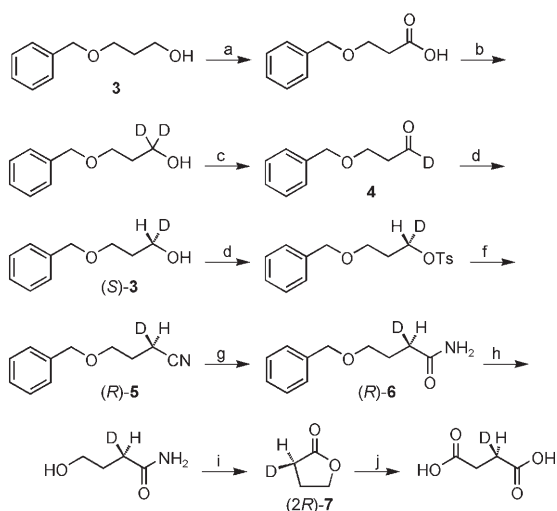
[*] P. Friedrich, Prof. Dr. W. Buckel
Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie
Philipps-Universität, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-8978
E-Mail: buckel@staff.uni-marburg.de
Homepage: <http://www.uni-marburg.de/fb17/fachgebiete/mikro-bio/mikrobiochem>

Dr. D. J. Darley
Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath
Claverton Down, Bath BA2 7AY (Großbritannien)

Prof. Dr. B. T. Golding
School of Natural Sciences – Chemistry
Bedson Building, Newcastle University
Newcastle upon Tyne NE1 7RU (Großbritannien)

[**] Wir danken Dr. Ulrike Näser (Newcastle University) für die Syntheseroute zum Bernsteinsäure-Semialdehyd, Thomas Knappe, Professor Mohammed Marahiel (beide Philipps-Universität), Simone Moser und Professor Bernhard Kräutler (beide Universität Innsbruck) für die Messung der CD-Spektren, sowie Professor James Remington (University of Oregon (USA)) für das Plasmid mit dem Gen der Malat-Synthase. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Europäischen Kommission (Fördernummer HPRN-CT-2002-00195) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Scheme 2. Synthese von (R) - γ -[$2\text{-}^2\text{H}_1$]Butyrolacton (($2R$)-7). a) Jones-Reagents; b) LiAlD_4 ; c) Oxalylchlorid, DMSO , N_2 ; d) (R) -Alpine-Boran; e) p -TsCl, Pyridin; f) NaCN; g) Acetamid, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$; h) Pd-C , H_2 ; i) HCl ; j) Teile von 7 wurden zu Bernsteinsäure oxidiert (TEMPO, NaClO , NaClO_2). (S) - γ -[$2\text{-}^2\text{H}_1$]Butyrolacton (($2S$)-7) wurde entsprechend mit (S) -Alpine-Boran synthetisiert.

neute Oxidation des Alkohols lieferte den deuterierten Aldehyd (4). Eine stereoselektive Reduktion des Aldehyds mit (R) - oder (S) -Alpine-Boran führte zu $(1S)$ - bzw. $(1R)$ -3-Benzyl-1-[$1\text{-}^2\text{H}_1$]propanol ((S)-3 und (R)-3).^[9] Tosylierung des Alkohols und Umsetzung mit Cyanid unter stereochemischer Inversion ergaben das Nitril 5, das zum Amid 6 hydrolysiert wurde.^[10] Entschütten und Ansäuern lieferten die stereospezifisch markierten Butyrolactone 7. Proben von 7 wurden zur Bernsteinsäure oxidiert und CD-spektroskopisch analysiert: (R) -[$2\text{-}^2\text{H}_1$]Bernsteinsäure, $[\theta]_{206\text{nm},24^\circ\text{C}} = -118 \pm 11 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$; (S) -[$2\text{-}^2\text{H}_1$]Bernsteinsäure, $[\theta]_{206\text{nm},24^\circ\text{C}} = 134 \pm 13 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$. Der zuletzt genannte Wert stimmt mit dem Literaturwert für das S -Enantiomer überein ($[\theta]_{206\text{nm},24^\circ\text{C}} = +150 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$).^[11,12] Die Lactone wurden zu den Carboxylaten hydrolysiert und durch Inkubation mit Acetyl-CoA und 4-Hydroxybutyryl-CoA-Transferase in die CoA-Thioester überführt (($2R$)-1 und ($2S$)-1).^[13] Laut MALDI-TOF-Analyse enthielten ($2R$)-1 und ($2S$)-1 (m/z 855) weniger als 11% unmarkierten CoA-Thioester (Abbildung 1 A und C), der zum größten Teil auf den H-Gehalt (8%) des verwendeten LiAlD_4 zurückzuführen ist.

Inkubation von ($2R$)-1 mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase führte zu unmarkiertem 1 (m/z 854) und 2 (m/z 836), deren monoisotopische Massenverteilung dem natürlichen Isotopengehalt entsprach (Abbildung 1 B). Dagegen blieb mit ($2S$)-1 als Substrat in 1 (m/z 855) und 2 (m/z 837) alles Deuterium erhalten, und der Gehalt an unmarkiertem 1 (m/z 854) war konstant (Abbildung 1 C und D). Die Ergebnisse zeigen, dass während der Dehydratisierung von 1 zu 2 erwartungsgemäß das $2Re$ -Wasserstoffatom selektiv entfernt wird. Zusammen mit der kürzlich beschriebenen Abstraktion des $3Si$ -Wasserstoffatoms^[5] kann der stereochemische Verlauf an den Kohlenstoffatomen 2 und 3 als *anti*-Eliminierung beschrieben werden, identisch mit den Verhältnissen bei Acyl-CoA-Dehydrogenasen.^[14–18] (Bezüglich der Konfiguration

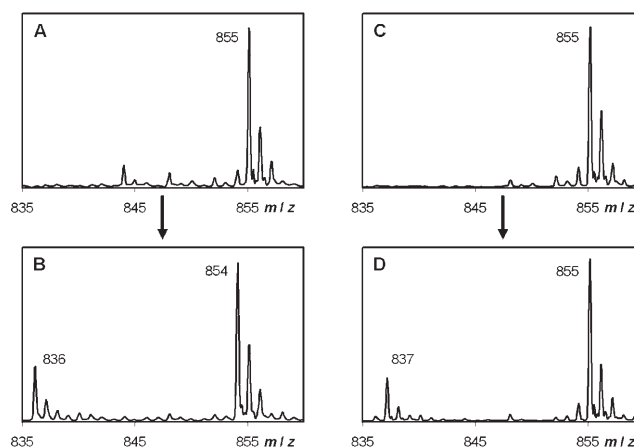
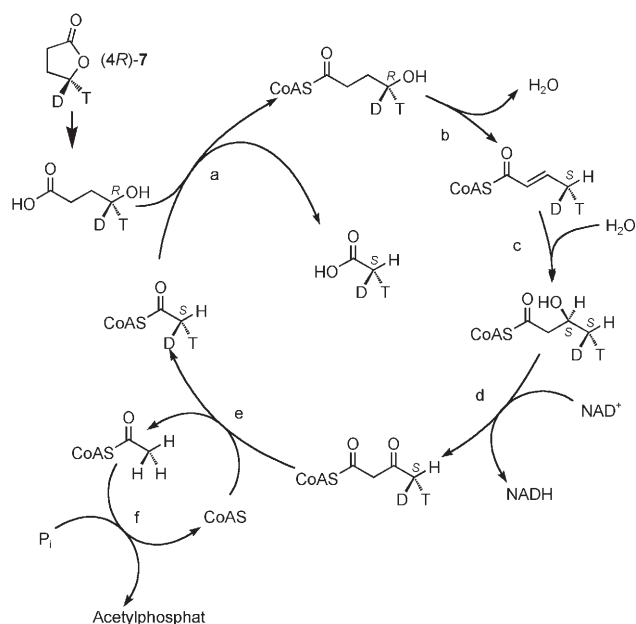


Abbildung 1. MALDI-TOF Massenspektren. A) ($2R$)-1 (855 Da). B) Bei Inkubation von ($2R$)-1 mit Dehydratase wird das Deuterium bei der Bildung von Crotonyl-CoA (2, 836 Da) eliminiert und im 4-Hydroxybutyryl-CoA (1, 854 Da) gegen Wasserstoff ausgetauscht. C) (S) -4-Hydroxy[$2\text{-}^2\text{H}_1$]butyryl-CoA (($2S$)-1, 855 Da). D) Bei Inkubation mit Dehydratase bleibt das Deuterium im ($2S$)-1 erhalten und [$2\text{-}^2\text{H}$]Crotonyl-CoA (837 Da) wird gebildet.

entspricht das $3Si$ -Wasserstoffatom im 4-Hydroxybutyryl-CoA dem $3Re$ -Wasserstoffatom im unsubstituierten Acyl-CoA.)

Die Frage nach der Inversion oder Retention an C4 bei der Substitution der Hydroxygruppe durch Wasserstoff wurde mit (R) - und (S) -4-Hydroxy[$4\text{-}^2\text{H}_1,4\text{-}^3\text{H}$]butyraten gelöst. Die Synthese ging vom Bernsteinsäurediethylester aus, der mit [^3H]Ameisensäureethylester zu [^2H]Formylbernsteinsäurediethylester kondensiert wurde. Die Umwandlung zu γ -Ethoxy[$4\text{-}^2\text{H}$]butyrolacton und Hydrolyse lieferten dann 4-Oxo[$4\text{-}^2\text{H}$]buttersäure (Succinatsemialdehyd).^[19] Diese wurde mit NAD^3H , das kontinuierlich aus [^3H]Formiat mit Formiat-Dehydrogenase erzeugt wurde, in Gegenwart der Enzyme 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (4-HBDH) aus *C. aminobutyricum* oder Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus Pferdeleber reduziert. Weil ADH den Hydridtransfer vom NADH auf die *Re*-Seite des Aldehyds katalysiert,^[20] kann das Produkt als (R) - γ -[$4\text{-}^2\text{H}_1,4\text{-}^3\text{H}$]butyrolacton (($4R$)-7) angesprochen werden. Da wir aber fanden, dass die viel aktivere 4-HBDH dieselbe Stereospezifität aufweist, wurde nur dieses Enzym angewendet, um 4-Oxo[$4\text{-}^3\text{H}$]buttersäure in Gegenwart von [^2H]Formiat und Formiat-Dehydrogenase zu (S) - γ -[$4\text{-}^2\text{H}_1,4\text{-}^3\text{H}$]butyrolacton (($4S$)-7) zu reduzieren.

Die synthetisierten Lactone ($4R$)-7 und ($4S$)-7 wurden zu den Carboxylaten hydrolysiert und nach Schema 3 enzymatisch zu Acetat umgesetzt. In diesem Eintopfansatz wurde das Primärprodukt 2 irreversibel über ($3S$)-3-Hydroxybutyryl-CoA und Acetoacetyl-CoA zu zwei Molekülen Acetyl-CoA gespalten. CoA-Transfer zu ($4R$)-7 oder ($4S$)-7 lieferte Acetat, während Acetylphosphat durch Phosphorolyse unter Regeneration des CoA entstand. Die freie und die durch saure Hydrolyse gebildete Essigsäure wurden zusammen durch Wasserdampfdestillation isoliert. Die spezifischen ^3H -Aktivitäten betrugen gemäß Szintillationszählung und enzymatischer Analyse erwartungsgemäß $(50 \pm 5)\%$ der Werte der Ausgangslactone, da nach Schema 3 jeweils ein markier-



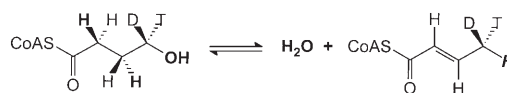
Schema 3. Umwandlung von (R)-4-Hydroxy[4-²H₁, ³H]butyrat in (S)-[²H₁, ³H]Acetat. Unter den Bedingungen der Isolierung (H⁺, 100 °C) hydrolysiert Acetylphosphat zu Essigsäure. Die Inkubationsmischung enthält hydrolysiertes Lacton, Kaliumphosphat pH 7.4, NAD⁺, Acetyl-CoA, CoASH, 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase (a), 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (b) Crotonase (c), 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (d), Thiolase (e) und Phosphat-Acetyltransferase (f).

tes und ein unmarkiertes Acetat entstehen. Folglich fand während der Inkubation kein signifikanter ³H-Austausch statt. Die Konfiguration der Acetate wurde enzymatisch über Malat und Fumarat bestimmt.^[21–23]

Wie man aus Tabelle 1 ersieht, verloren die Malate aus beiden (4R)-7-Spezies bei Äquilibrierung mit Fumarase mehr als 50 % ihres Tritiumgehalts (70 und 71 %). Damit haben die beiden Acetate überwiegend S-Konfiguration, während (4S)-7 ein Acetat mit überwiegend R-Konfiguration lieferte (41 % Tritiumverlust). Die Daten zeigen eindeutig, dass die Bildung der Methylgruppe von **2** aus der Hydroxymethylgruppe von **1** (Schema 3) unter Retention verläuft. Außerdem wird aus den Versuchen mit (4R)-7 ersichtlich, dass beide Dehydrogenasen – ADH und 4-HBDH – bezüglich der Seite des Aldehydsubstrats *Re*-Stereospezifität aufweisen.

Damit ist der stereochemische Verlauf der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA vollständig aufgeklärt (Schema 4). Zur Analyse der drei beteiligten diastereotopen Methylengruppen wurden insgesamt sechs verschieden markierte 4-Hydroxybutyryl-CoA Spezies benötigt. Dieses Ergebnis zeigt die Bedeutung der stereoselek-

tiven organischen Synthese bei der Aufklärung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen. Die beobachtete Retention der Konfiguration stützt die Vorstellung eines planaren Dienolat-Intermediats (Schema 1), das durch Eliminierung der Hy-



Schema 4. Stereochemischer Verlauf der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA.

droxygruppe unter Mithilfe des als Lewis-Säure wirkenden Fe₄S₄-Clusters entsteht. Anschließend wird das Dienolat von der gleichen Seite wieder protoniert. Der Protonendonator könnte Histidin 292 sein, das anfänglich das Proton am Kohlenstoff 2 abstrahiert. Die sich daraus ableitende Wanderung des Wasserstoffatoms von C2 nach C4 wurde aber nicht beobachtet (Abbildung 1). Während der langen Inkubationszeiten fand sicher ein kompletter Austausch mit Wasser statt. Interessanterweise zeigt eine ähnliche Reaktion, die Dehydratisierung von (1S,3S)-3-Hydroxycyclohexancarbonsäure zu Cyclohex-1-encarbonsäure (vermutlich auf der Stufe des CoA-Esters) in der Biosynthese von Cyclohexancarbonsäure aus Shikimi-Säure, den gleichen stereochemischen Verlauf.^[24] Bemerkenswert ist dabei, dass in der vermutlich stabilsten Konformation des Cyclohexanrings die beiden zu eliminierenden Wasserstoffatome und die Hydroxygruppe axiale Positionen einnehmen.

Die stereochemisch ähnlichen Reaktionen von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und Acyl-CoA-Dehydrogenasen lassen einen gemeinsamen Mechanismus vermuten. Bei der Dehydratase erscheint die Eielektronen-Redoxreaktion die einzige realistische Möglichkeit, während bei den Dehydrogenasen ein Hydridtransfer von C3 zum FAD favorisiert wird.^[25] Andererseits gibt es auch Experimente mit der mittelkettigen Acyl-CoA-Dehydrogenase, die mit radikalischen Zwischenstufen besser zu vereinbaren sind.^[26]

Eingegangen am 30. November 2007
Online veröffentlicht am 17. März 2008

Stichwörter: Chirale Methylgruppen · Dehydratasen · Eisen-Schwefel-Cluster · Radikalenzyme · Stereoselektivität

Tabelle 1: Analyse der chiralen Acetate, die aus (R)- und (S)-γ-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton erhalten wurden.^[a]

Lacton	(R)-γ-[4- ² H ₁ , ³ H]Butyrolacton ((4R)-7)								(S)-γ-[4- ² H ₁ , ³ H]Butyrolacton ((4S)-7)			
	erzeugt mit ADH (cpm)				erzeugt mit 4-HBDH (cpm)				erzeugt mit 4-HBDH (cpm)			
	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H-Verlust	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H-Verlust	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H-Verlust
Malat	1239	914	1.36	–	4295	1377	3.12	–	1033	173	5.97	–
Malat + Fumarat	361	886	0.41	70 %	961	1053	0.91	71 %	881	250	3.52	41 %

[a] [2-¹⁴C]Acetat wurde als interner Standard hinzugesetzt. ¹⁴C cpm wurden auf ca. 20–60 % der ³H cpm eingestellt.

- [3] B. M. Martins, H. Dobbek, I. Çinkaya, W. Buckel, A. Messerschmidt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15645.
- [4] J. J. Kim, R. Miura, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 483.
- [5] R. Scott, U. Näser, P. Friedrich, T. Selmer, W. Buckel, B. T. Golding, *Chem. Commun.* **2004**, 1210.
- [6] W. Buckel, B. T. Golding, *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, *22*, 523.
- [7] W. Buckel, B. T. Golding, *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 27.
- [8] U. Näser, A. J. Pierik, R. Scott, I. Çinkaya, W. Buckel, B. T. Golding, *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 53.
- [9] A. M. Valentine, B. Wilkinson, K. E. Liu, S. Kornar-Panicucci, N. D. Priestley, P. G. Williams, H. Morimoto, H. G. Floss, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1818.
- [10] S. I. Maffioli, E. Marzorati, A. Marazzi, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5237.
- [11] G. Hartrampf, W. Buckel, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *156*, 301.
- [12] I. Listowsky, G. Avigad, S. Englard, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1080.
- [13] U. Scherf, W. Buckel, *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2699.
- [14] L. Bücklers, A. Umani-Ronchi, J. Rétey, D. Arigoni, *Experientia* **1970**, *26*, 931.
- [15] J. F. Biellmann, C. G. Hirth, *FEBS Lett.* **1970**, *8*, 55.
- [16] J. F. Biellmann, C. G. Hirth, *FEBS Lett.* **1970**, *9*, 335.
- [17] H. J. La Roche, M. Kellner, H. Günther, H. Simon, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1971**, *352*, 399.
- [18] A. J. Polito, C. C. Sweeley, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 4178.
- [19] U. Näser, Dissertation, University of Newcastle upon Tyne, Großbritannien, **2004**.
- [20] J. Rétey, J. A. Robinson, *Stereospecificity in Organic Chemistry and Enzymology*, Verlag Chemie, Weinheim, **1982**.
- [21] A. J. Pierik, D. Ciceri, G. Bröker, C. H. Edwards, W. McFarlane, J. Winter, W. Buckel, B. T. Golding, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14039.
- [22] J. W. Cornforth, J. W. Redmond, H. Eggerer, W. Buckel, C. Gutschow, *Nature* **1969**, *221*, 1212.
- [23] J. Lüthy, J. Retey, D. Arigoni, *Nature* **1969**, *221*, 1213.
- [24] B. S. Moore, K. Poralla, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5267.
- [25] S. Ghisla, C. Thorpe, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 494.
- [26] N. D. Lenn, Y. Shih, M. T. Stankovich, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3065.