

Strukturbasis und Enzymmechanismus der Biosynthese von C₉- aus C₁₀-monoterpenoiden Indol-Alkaloiden**

Liuqing Yang, Marco Hill, Meitian Wang, Santosh Panjikar und Joachim Stöckigt*

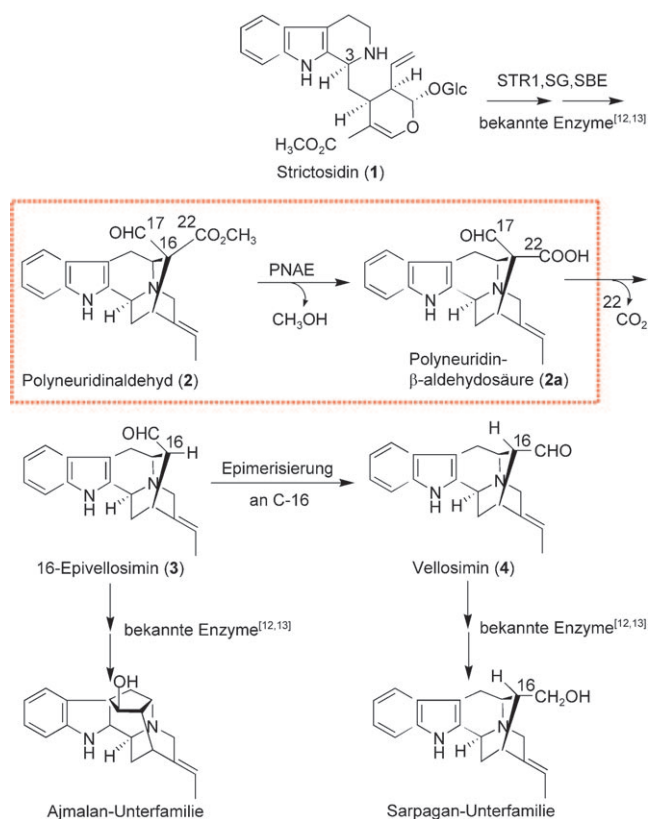
Professor Heinz G. Floss zum 75. Geburtstag gewidmet

Pflanzen sind eine wichtige Quelle für Alkaloide, von denen bis heute über 20000 identifiziert und in eine Vielzahl von verschiedenen Familien eingeordnet wurden.^[1] Wegen der lang bekannten therapeutischen Wirkung,^[2,3] der strukturellen Diversität^[4] und der komplexen Biosynthese^[4,5] hat die Familie der monoterpenoiden Indol-Alkaloide signifikantes Interesse auf sich gezogen. Viele Alkaloide der Ajmalan- und Sarpagan-Unterfamilien haben eine C₉- anstelle einer C₁₀-monoterpenoiden Struktureinheit. Alkaloide des Ajmalan-Typs, wie das Ajmalin selbst, werden für die Behandlung von Herzarrhythmien eingesetzt. Wie alle monoterpenoiden Indol-Alkaloide leiten sich die Mitglieder dieser Unterfamilien vom 3α(S)-Glucoalkaloid Strictosidin (**1**) ab,^[6,7] welches das C₁₀-Gerüst von Secologanin enthält. Aus diesem Grunde muss der Verlust einer C₁-Einheit während der Biosynthese nach der Umsetzung von **1** erfolgen. Hier beschreiben wir die Röntgenkristallstruktur des Enzyms Polyneuridinaldehyd-Esterase (PNAE),^[8–10] die einen wichtigen Einblick in die Biosynthese der beiden oben genannten Alkaloid-Unterfamilien gibt.

Zur biochemischen Charakterisierung der PNAE wurde das Enzym aus pflanzlichen Zellsuspensionskulturen der indischen Medizinalpflanze *Rauvolfia serpentina*^[10] isoliert und teilweise sequenziert, die PNAE-cDNA kloniert und in

Escherichia coli überexprimiert, wie früher schon beschrieben.^[8,10] PNAE zeigt eine sehr hohe Spezifität für das natürliche Substrat Polyneuridinaldehyd (**2**): Von insgesamt 14 Alkaloiden oder aromatischen Methylestern werden nur **2** und sein Ethylester enzymatisch umgesetzt.^[8] Sequenzanalysen der PNAE ermöglichten eine vorläufige Klassifizierung des Enzyms als Mitglied der großen α/β-Hydrolase-Superfamilie.^[9,11] Diese Klassifizierung beruhte insbesondere auf dem Vorhandensein der katalytischen Triade Ser87, Asp216 und His244, die vorher durch Punktmutationen und Homologiemodellierung nachgewiesen worden war.^[9] Die Rolle der PNAE in der Alkaloid-Biosynthese wird in Schema 1 dargestellt, zusammen mit mehreren gut bekannten und kürzlich charakterisierten Enzymen.^[12,13]

Mechanistisch gesehen besteht die wesentliche Funktion des Enzyms in der Hydrolyse der Methylestereinheit in **2**, die



Schema 1. Die zentrale Rolle der PNAE in der Biosynthese der C₉-monoterpenoiden Ajmalan- und Sarpagan-Alkaloid-Unterfamilien (biogenetische Nummerierung; STR1: Strictosidin-Synthase, SG: Strictosidin-Glucosidase, SBE: Sarpagan-Brückenenzym).

[*] L. Yang, Prof. Dr. J. Stöckigt
Institute of Materia Medica, College of Pharmaceutical Sciences,
Zijingang Campus, Zhejiang University
383 Yu Hang Tang Road, 310058 Hangzhou (China)

L. Yang, Dr. M. Hill, Prof. Dr. J. Stöckigt
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie,
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Staudinger Weg 5, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-392-3752
E-Mail: stoeckigt@uni-mainz.de

Dr. M. Wang
Swiss Light Source PX III, Paul Scherrer Institut
5232 Villigen (Schweiz)

Dr. S. Panjikar
European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Outstation
Notkestraße 85, 22603 Hamburg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Zhejiang University K.P. Chao's High-Tech Foundation (Hangzhou, VR China) unterstützt. Wir danken Prof. Dr. David E. Cane (Brown University, USA) für kritische Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Syntheseverfahren, kristallographische Daten, 3D-Strukturen und Alkaloidformeln) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900150> zu finden.

zur postulierten Polyneuridin β -Aldehydosäure (**2a**) führt. β -Ketonsäuren, wie die Oxalbernsteinsäure im Krebs-Zyklus, sind wegen ihrer leichten enzym- oder pufferkatalysierten Decarboxylierung hoch instabil und kommen gelegentlich als Intermediate in Biosynthesewegen vor. Die Decarboxylierung von **2a** ergibt das erste C_9 -monoterpenoide Alkaloid 16-Epivellosimin (**3**), die direkte Vorstufe der Ajmalan-Unterfamilie in *Rauvolfia*. Die Epimerisierung von **3** liefert anschließend Vellosimin (**4**), das als unmittelbare Vorstufe in der Biosynthese der C_9 -Sarpagan-Alkaloide fungiert. Es ist also die Abspaltung von CO_2 (C-22) vom C_{10} -terpenoiden Kohlenstoffgerüst, die entscheidend für die Biosynthese der C_9 -*Rauvolfia*-Alkaloide aus den C_{10} -Vorstufen **2** und **2a** ist (Schema 1). Biochemische Daten hatten zwar grundsätzlich bereits die enzymkatalysierte Bildung beider Alkaloidgruppen nachgewiesen, nun geben wir aber einen direkten Einblick in die dreidimensionale Struktur und den Mechanismus der PNAE.^[13]

Die Struktur der PNAE im Kristall (Abbildung 1) zeigt die Kerndomäne aus sechs β -Faltblättern, die von fünf α -Helices flankiert werden. Zusammen mit der so genannten Cap-Domäne^[14] bestätigt die dreidimensionale Struktur erstmals eindeutig, dass die PNAE zum gut bekannten α/β -

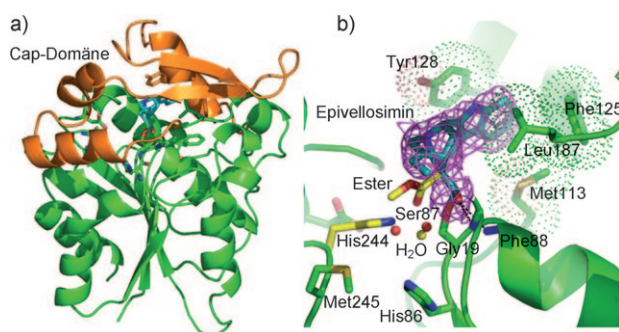
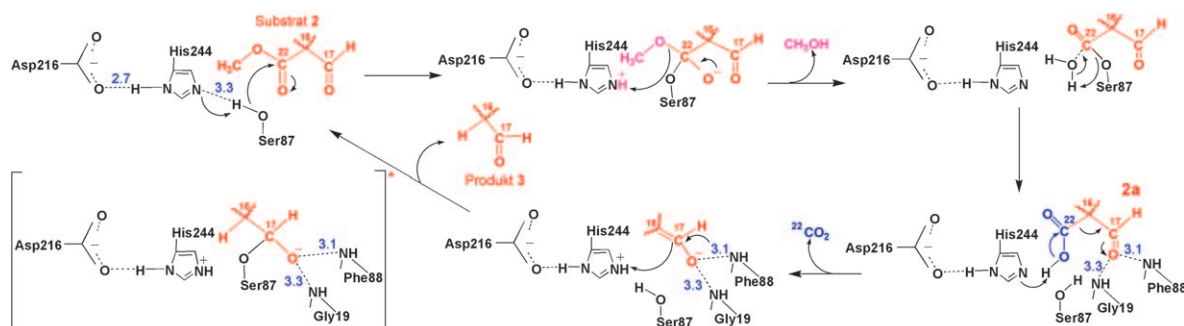


Abbildung 1. a) Dreidimensionale Gesamtstruktur der PNAE (PDB-Code: 2WFL). b) Enzymprodukt **3** (blau), kovalent gebunden an Ser87 als Halbacetat im aktiven Zentrum der PNAE-Mutante His244Ala (PDB-Code: 3GZJ), überdeckt mit His244 und H_2O der nativen dreidimensionalen Struktur (gelb) und der Komplexstruktur (rot). Die Estergruppe (gelb) ist modelliert. Die Cap-Domäne ist orange.

Hydrolase-Faltungstyp gehört, jedoch eine neue Funktion hat. Die Öffnung des Reaktionskanals liegt in der Cap-Domäne (siehe Hintergrundinformationen), einer Region, die im Unterschied zum kanonischen Kernbereich der α/β -Hydrolasen eine sehr variable Struktur hat. Der Kanal führt **2** zu den katalytischen Aminosäuren mit typischer Folge der α/β -Faltung aus nucleophilem Ser87, saurem Asp216 und basischem His244, deren Vorhandensein auf einen Serin-Esterase-Mechanismus schließen lässt (Schema 2).

Die PNAE-His244Ala-Mutante zeigt eine stark verringerte Hydrolase-Aktivität (ca. 1.3 % relative Aktivität verglichen mit dem Wildtyp). Wie jetzt die Kristallstruktur des Komplexes von His244Ala mit dem Produkt **3** zeigt, wechselwirkt die Indol-Teilstruktur mit Met113, Phe125, Tyr128 und Lys187. Auf diese Weise wird das Alkaloid durch hydrophobe, Sandwich-ähnliche Wechselwirkungen für die Katalyse in optimaler Anordnung fixiert. Die optimierte Geometrie des aktiven Zentrums, die Substratstruktur und die C-17-Aldehydfunktion sind entscheidend für die PNAE-Aktivität, da bereits leichte Änderungen in Struktur oder Funktionalität zum Verlust der Hydrolase-Aktivität führen, z. B. wenn **2** mit dem Indol-Alkaloid Picralinal oder mit Polyneuridin (reduzierte CHO-Gruppe an C-17; Hintergrundinformationen) verglichen wird.

Außer der katalytischen Triade (geprüft durch Mutationen^[9]) ist auch Met245 in der Bindungstasche für die Hydrolyse unverzichtbar, da die Mutante Met245Ala lediglich ca. 0.4 % relative Aktivität zeigt. Met245 ist vom H_2O -Molekül im katalytischen Zentrum weit entfernt (ca. 5 Å), und als Nachbar des katalytischen His244 hat Met eher strukturelle als katalytische Bedeutung. Diese Situation ist ähnlich zu der von His86, dem Nachbarn von Ser87, da die Mutante His86Ala ebenfalls nur ca. 0.1 % relative Aktivität aufweist. Nach Ser87-unterstützter Hydrolyse wird **2a** (Schema 2) zur Enolform von **3** decarboxyliert, wobei das Enolat-Anion durch H-Brücken mit Gly19 und Phe88 eine Oxyanion-Höhle bildet. Von den drei möglichen Decarboxylierungsmechanismen^[15] – a) Metall-Ionen katalysiert, b) unterstützt durch Bildung einer Schiff-Base und c) H-Brückenbindung und/oder Polarisierung der Ketofunktion durch elektrostatische Kräfte – entfallen (a) und (b). Weder Kationen komplexierendes Ethylendiamintetraacetat^[10a] noch eine $BH_4^{(-)}$ -Re-



Schema 2. Vorgeschlagener Serin-Esterase-Reaktionsmechanismus der PNAE, der die Grundlage für die Biosynthese von C_9 - aus C_{10} -monoterpenoiden Indol-Alkaloiden der Ajmalan- und Sarpagan-Unterfamilien in der indischen Medizinalpflanze *Rauvolfia serpentina* bildet (Teilstrukturen des Substrates **2** und des Produktes **3** sind gezeigt; das kovalent gebundene Enzymprodukt **3** ist mit einem Stern markiert. Durchschnittliche Abstände der Aminosäuren sind in Å angegeben).

duktion in Gegenwart von **2**, die eine intermediäre Schiff-Base reduzieren und damit die Katalyse blockieren würde, beeinflussen die PNAE-Aktivität. Außerdem weisen die dreidimensionalen Strukturen des Enzyms und des Komplexes keine Schiff-Basen bildenden Aminosäuren in der Bindungstasche auf, und der Komplex enthält keine Metall-Ionen (keine signifikanten Signale in der anomalen Fourier-Map). Beide Resultate sprechen ebenfalls für Mechanismus (c).

Die Strukturdaten der PNAE sind in Einklang mit dem Mechanismus in Schema 2, der zweifelsfrei die Schlüsselreaktion für die Biosynthese der C₉-monoterpenoiden *Rauvolfia*-Alkaloide ist. Die neuen Daten werden auch ein rationales, strukturbasiertes Redesign des Enzyms ermöglichen, ähnlich wie wir für die Strictosidin-Synthase^[16] zeigen konnten, die als Pictet-Spenglerase wirkt und jetzt für die chemoenzymatische Synthese neuer Alkaloidbibliotheken eingesetzt wird.

Da die Cap-Domäne (siehe Hintergrundinformationen) und die Architektur der Bindungstasche der PNAE die hohe Substratspezifität bestimmen, sollten zukünftige systematische strukturbasierte Mutationen, Mutationen in zweiten Bindungssphären sowie Zufallsmutationen Polyneuridin-aldehyd-Esterasen mit veränderter, insbesondere niedriger Substratspezifität liefern. Solche mutierten Enzyme könnten dann als Vielzweck-Katalysatoren für die Synthese neuer Alkaloidstrukturen und deren biologisches Screening eingesetzt werden.

Eingegangen am 9. Januar 2009,
veränderte Fassung am 4. März 2009
Online veröffentlicht am 3. Juni 2009

Stichwörter: Enzymkatalyse · Biosynthese · Esterasen · Proteinstrukturen · Alkaloide

- [1] *Dictionary of Natural Products on DVD*, version 16.2 (Hrsg.: J. Buckingham), Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, **2008**.
- [2] a) M. H. Zenk, M. Juenger, *Phytochemistry* **2007**, 68, 2757–2772; b) J. Leonard, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 319–338.
- [3] J. E. Saxton, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 14, 559–590.
- [4] G. A. Cordell, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, San Diego, **1998**, 50, S. 260.
- [5] S. E. O'Connor, J. J. Maresh, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 532–547.
- [6] T. M. Kutchan, *Phytochemistry* **1993**, 32, 493–506.
- [7] J. Stöckigt, M. Ruppert in *Comprehensive Natural Products Chemistry: Amino Acids, Peptides, Porphyrins and Alkaloids. Vol. 4* (Hrsg.: D. H. R. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, J. W. Kelly), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 109–138.
- [8] E. Dogru, H. Warzecha, F. Seibel, S. Haebel, F. Lottspeich, J. Stöckigt, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 1397–1406.
- [9] E. Mattern-Dogru, X. Ma, J. Hartmann, H. Decker, J. Stöckigt, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 2889–2896.
- [10] a) A. Pfitzner, J. Stöckigt, *Planta Med.* **1983**, 48, 221–227; b) A. Pfitzner, J. Stöckigt, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 459–460.
- [11] X. Cousin, T. Hotelier, K. Giles, J. P. Toutant, A. Chatonnet, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 226–228.
- [12] M. Ruppert, X. Ma, J. Stöckigt, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 1431–1444.
- [13] a) J. Stöckigt, S. Panjikar, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1382–1400; b) J. Stöckigt, S. Panjikar, M. Ruppert, L. Barleben, X. Ma, E. Loris, M. Hill, *Phytochem. Rev.* **2007**, 6, 15–34.
- [14] Y. Cajal, A. Svendsen, J. De Bolos, S. A. Patkar, M. A. Alsina, *Biochimie* **2000**, 82, 1053–1061.
- [15] a) G. J. Poelarends, W. H. Johnson, Jr., A. G. Murzin, C. P. Whitman, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 48674–48683; b) A. J. T. Smith, R. Müller, M. D. Toscano, P. Kast, H. W. Hellings, D. Hilvert, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15361–15373.
- [16] E. A. Loris, S. Panjikar, M. Ruppert, L. Barleben, M. Unger, H. Schübel, J. Stöckigt, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 979–985.