

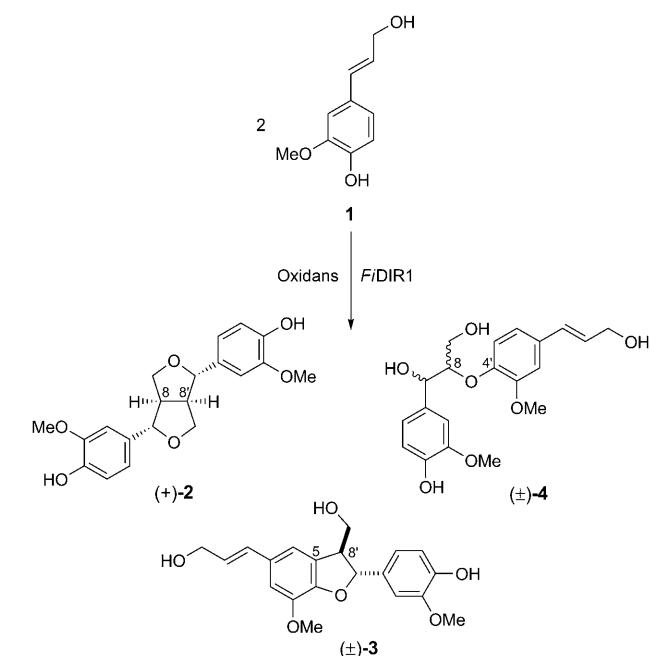
Ein enantiokomplementäres dirigierendes Protein für die enantioselektive Laccase-katalysierte oxidative Phenolkupplung**

Benjamin Pickel, Mihaela-Anca Constantin, Jens Pfannstiel, Jürgen Conrad, Uwe Beifuss* und Andreas Schaller*

Die oxidative Phenolkupplung spielt als Schlüsselschritt der Biosynthese von Lignanen, Flavonolignanen und Alkaloiden eine zentrale Rolle im pflanzlichen Sekundärmetabolismus.^[1] Während die dimerisierende Kupplung von Propenylphenol-Derivaten zu Lignanen *in vivo* meist mit hoher Regio-, Dia-stereo- und Enantioselektivität abläuft,^[2] beobachtet man *in vitro* bestenfalls vernachlässigbare Enantioselektivitäten.^[3,4] So entsteht nach enzymatischer Oxidation und Kupplung von (*E*)-Coniferylalkohol (**1**) *in vitro* nur racemisches Pinoresinol ((\pm)-**2**).

Regio- und stereoselektive Phenolkupplungen sind in der Natur aber nicht auf den pflanzlichen Sekundärmetabolismus beschränkt, sondern treten auch in Bakterien, Flechten und Pilzen auf.^[5] Beispielsweise seien hier die regioselektive Bildung der Isomeren Vioxanthin in *Penicillium citreoviride* und Pigmentosin A in *Hypotrachyna immaculata*^[6] sowie die Bildung der enantiomeren Perylenchinone Hypocrellin und Hypocrellin A in *Hypocrella bambusae* bzw. in *Shiraia bambusicola*^[7] erwähnt. Die Gründe für diesen unterschiedlichen Verlauf oxidativer Phenolkupplungen *in vivo* und *in vitro* gehören zu den offenen Fragen der Naturstoffchemie.

Vor einigen Jahren fanden Lewis et al., dass die Kupplung von **1** neben (\pm)-Dehydroniconiferylalkohol ((\pm)-**3**) und *erythro/threo*-(\pm)-Guaiacylglycerin-8-*O*-4'-coniferylether ((\pm)-**4**) auch enantiomerereines (+)-Pinoresinol ((+)-**2**) liefert, sofern sie in Gegenwart von *FiDIR1*, einem dirigierenden Protein (DP) aus *Forsythia intermedia*, durchgeführt wird (Schema 1).^[8,9] Später wurden in *Thuja plicata* weitere DPs entdeckt, die wie *FiDIR1* selbst nicht katalytisch aktiv sind, aber bei der enzymatischen Oxidation von **1** die enantioselektive Bildung von (+)-**2** vermitteln.^[2,10]



Schema 1. Oxidative Kupplung von **1** mit *FiDIR1*.^[8]

Auch gibt es Hinweise auf ein Protein aus *Linum usitatissimum*, das die bevorzugte Bildung von (-)-**2** steuert.^[11] Die atroposelektive Kupplung von Hemigossypol zu (+)-Gossypol in *Gossypium hirsutum* zeigt, dass enantioselektive Phenolkupplungen auch in Pflanzen nicht auf die Bildung von **2** beschränkt sind.^[12]

Studien zum Einfluss von DPs auf die Selektivität von Phenolkupplungen sind nicht nur für das Verständnis der Lignan-Biosynthese entscheidend, sondern bilden auch die Grundlage für die Entwicklung der Phenolkupplung zu einer breit anwendbaren Methode für die enantioselektive Synthese. Der zweite Aspekt ist umso wichtiger, da es für enantioselektive Phenolkupplungen zwar einen großen Bedarf, bislang aber trotz einiger leistungsfähiger Ansätze keine allgemeine Lösung gibt.^[13]

Wir stellen hier die Klonierung, Expression, Reinigung und funktionelle Charakterisierung eines DP aus *Arabidopsis thaliana* vor, das die Laccase-katalysierte enantioselektive oxidative Kupplung von **1** zu (-)-**2** ermöglicht. Weiterhin zeigen wir, dass die Enantioselektivität des hier charakterisierten DP aus *Arabidopsis* zu der des bekannten DP aus *Forsythia* entgegengesetzt ist. In Anlehnung an enantiokomplementäre Enzyme^[14] schlagen wir für solche Proteine den Begriff enantiokomplementäre dirigierende Proteine (EDPs) vor.

[*] M.-A. Constantin, Dr. J. Conrad, Prof. Dr. U. Beifuss

Institut für Chemie, Universität Hohenheim
Garbenstraße 30, 70599 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-459-22951
E-Mail: ueifuss@uni-hohenheim.de

B. Pickel, Prof. Dr. A. Schaller
Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
Universität Hohenheim
Emil-Wolff-Straße 25, 70599 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-459-23751
E-Mail: schaller@uni-hohenheim.de

D. J. Pfannstiel
Life Science Center und Institut für Physiologie
Universität Hohenheim, August-von-Hartmann-Straße 3
Ökologiegebäude 2, 70593 Stuttgart (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; SFB 706) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904622> zu finden.

Ausgangspunkt unserer Suche nach EDPs war eine Pinoresinol-Reduktase aus *Arabidopsis thaliana*, die spezifisch (–)-2 zu (–)-Lariciresinol umsetzt.^[15] Dies ließ uns vermuten, dass es in *Arabidopsis* ein EDP für die Bildung von (–)-2 geben muss. Durch Datenbankvergleiche identifizierten wir mit At1g64160 und At4g23690 zwei Gene in *Arabidopsis*, deren Genprodukte große Ähnlichkeit mit den bekannten DPs aufweisen (Abbildung 1). Die von diesen Genen ko-

AtDIR5	MVGQMKSLFLFVFLVL	34
AtDIR6	MAFLVEKQLFKALFSFLFLVLLFSDTVLSFRK	39
FiDIR1	MVSKTQIVVALFLCFLTSTSSATYGRK	32
TpDIR7	MAIWNGRVLNLCILWLLVSIVLLNGIDCHSRK	38
AtDIR5	CKNFVLYYHDIMFGVDDVQNTSAAVTNPPG	68
AtDIR6	CKHFSFYFHDLIYDGDNVANATSAAVSPPG	73
FiDIR1	CKELVVFYFHDLFLKGNNYHNTSAIVGSPQWGNKTTAMAVP	72
TpDIR7	CPNLVLYFHDLIYNGKAGNATSTLVAAPQGANLTIMTGN	78
AtDIR5	FKFGKLVIFDDPMITDKNFQSEPVARAQGFYFYDMKNDYN	108
AtDIR6	FKFGKVFVIFDDPITMDKNLSPVRAQGFYFYDMKNDYN	113
FiDIR1	FNYGDLVVFDDPITLDDNLNLHSPVGRAGQGMFYDOKNTYN	112
TpDIR7	YHFGDLSVFDDPITVVDNNLHSPVGRAGQGFYFYDMKNTFS	118
AtDIR5	AWFAYTLVFNSTQHKGTLNIMGADLMMVQSRLDSVVGTT	148
AtDIR6	SWFSYTLVFNSTIEHKGTLNIMGADLMMEPTRDLGVGGTG	153
FiDIR1	AWLGFSFLFNSTKTYVGTLNFGAGADPLLNKTRDLSVVGTT	152
TpDIR7	AWLGFTEVFNSTDYGKTIITFGGADFLAKYRDLSVVGTT	158
AtDIR5	DFFMSRGIVTFETDTFEGAKYFRVKMDIKLYECY	182
AtDIR6	DFFMARGIAVAFVTDLFGQAKYFRVKMDIKLYECY	187
FiDIR1	DFFMARGVATLMDAFEGDVFYFRLRVDNLYECDW	186
TpDIR7	DFLMARGIAVATDIDAYEGDVFYFRLRVNTLYECY	192

Abbildung 1. Sequenzvergleich von DPs und EDPs aus *F. intermedia*, *T. plicata* und *A. thaliana*. Mit schwarz, grün und orangegebläut sind die Reste hervorgehoben, die vollständig, zwischen *Thuja* und *Forsythia* oder nur in *Arabidopsis* konserviert sind. N-terminal vorhergesagte Signalpeptide (www.cbs.dtu.dk) sind kursiv dargestellt.

dierten Proteine werden der Nomenklatur von Ralph et al. folgend als AtDIR5 (At1g64160) und AtDIR6 (At4g23690) bezeichnet.^[16] Da ihre Sequenzübereinstimmung mit FiDIR1 jeweils 52% beträgt, sind sie gute Kandidaten für die enantioselektive Kupplung von 1 zu (–)-2 (Schema 2).

Das offene Leseraster von AtDIR6 wurde in einen Expressionsvektor kloniert, in kultivierte Pflanzenzellen (*Solanum peruvianum*) transformiert, und die Zelllinie mit dem höchsten AtDIR6-Expressionsspiegel wurde in Suspensionskultur genommen. Das sekretierte AtDIR6 wurde durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und konventionelle chromatographische Methoden gereinigt. Die Ausbeute betrug 0.2 mg L^{–1} homogenes AtDIR6, das in fünf unterschiedlich glykosylierten Isoformen vorlag (Abbildung 2). Die fünf Isoformen mit Massen von 20.4, 20.9, 21.4, 21.9 und 22.4 kDa wurden mit CF₃SO₃H deglykosyliert und in ein 18.6

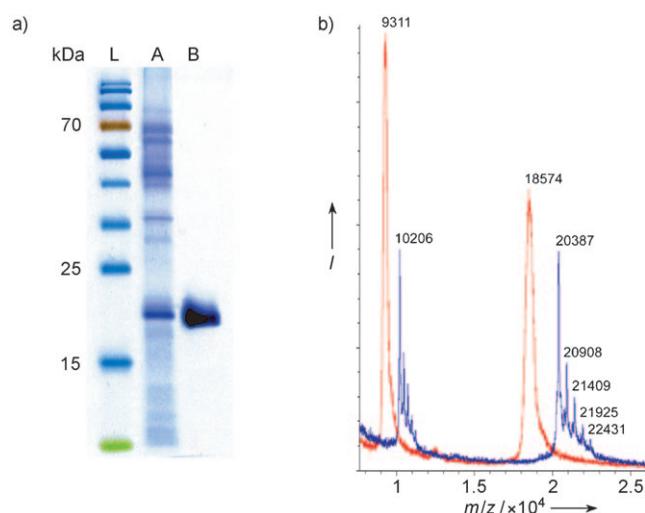


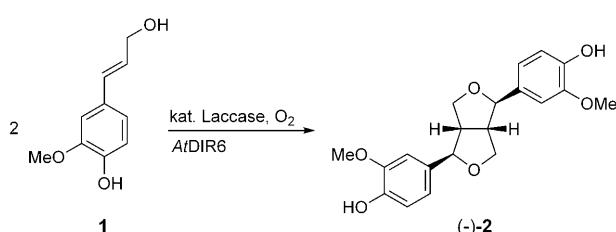
Abbildung 2. Reinigung von AtDIR6. a) SDS-PAGE-Analyse mit dem Rohextrakt (A), gereinigtem AtDIR6 (B) und einem Größenstandard (L). b) MALDI-TOF-MS-Analyse des gereinigten Proteins vor (blau) und nach (rot) Deglykosylierung mit CF₃SO₃H.

kDa-Protein überführt. Der N-Terminus dieses Proteins wurde durch Massenspektrometrie (MS) identifiziert, womit die für das Signalpeptid vorhergesagte Prozessierungsstelle bestätigt werden konnte (Abbildung 1). Mit 18.6 kDa entspricht die Masse des deglykosylierten Proteins der für das reife AtDIR6 errechneten Masse.

Zur Untersuchung der dirigierenden Aktivität von AtDIR6 wurde zunächst das Produktspektrum der durch eine Laccase von *Trametes versicolor* katalysierten oxidativen Dimerisierung von 1 mit O₂ als Oxidans analysiert. Neben (±)-Pinoresinol ((±)-2) wurden auch (±)-3 und (±)-4 isoliert und eindeutig identifiziert. HPLC an chiraler Phase (Chiralpak IB) zeigte, dass es sich bei dem durch Laccase-katalysierte Dimerisierung erhaltenen 2 um das Racemat handelte (Abbildung 3a).

Wurde die Laccase-katalysierte Oxidation von 1 in Gegenwart von AtDIR6 und O₂ als Oxidans durchgeführt, blieb das Produktspektrum unverändert. Allerdings stieg bei Zusatz von AtDIR6 die Menge an 2 auf Kosten von 3 und 4. Entscheidend aber ist, dass die oxidative Kupplung von 1 in Gegenwart von AtDIR6 bevorzugt zu (–)-2 führte (Abbildung 3b). So beobachtete man in Gegenwart von 1.9 μM AtDIR6 die Bildung von (–)-2 mit einem Enantiomerenüberschuss von (26.8 ± 3.1)% ee. Bei konstanter AtDIR6-Konzentration stieg dieser Wert mit sinkender Konzentration von 1 auf (49.2 ± 2.1)% ee (Abbildung 4b). Durch Erhöhung der AtDIR6-Konzentration ließ sich der Enantiomerenüberschuss sukzessiv bis auf (78 ± 3.6)% ee bei 11.7 μM AtDIR6 steigern, ohne dass das Maximum erreicht zu sein schien (Abbildung 4a).

Damit ist eindeutig gezeigt, dass es sich bei AtDIR6 um ein DP handelt, und zwar eines, das mit der Umwandlung von 1 in (–)-2 eine neue und zu den bekannten DPs enantio-komplementäre dirigierende Aktivität aufweist. Um diesen Befund zu erhärten, haben wir auch das von Lewis et al. beschriebene FiDIR1^[8] kloniert, gereinigt und hinsichtlich seiner dirigierenden Aktivität mit AtDIR6 verglichen. Bei der



Schema 2. Oxidative Kupplung von 1 mit AtDIR6.

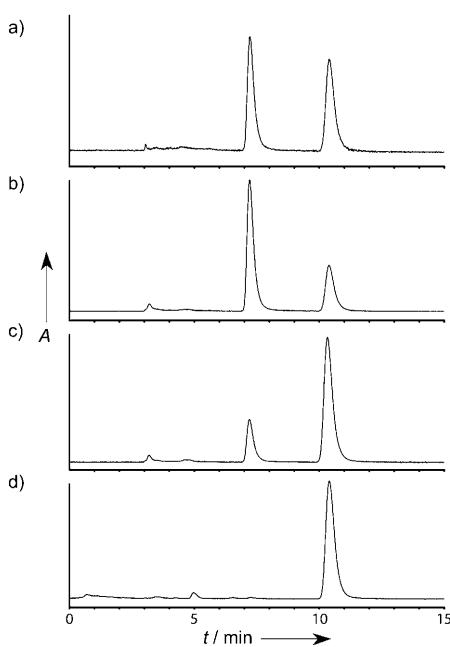


Abbildung 3. Nachweis der dirigierenden Aktivität. HPLC-Analyse (A bei 280 nm) der Enantiomerenzusammensetzung von **2** nach Umsetzung von **1** mit a) Laccase, b) Laccase und AtDIR6, c) Laccase und FiDIR1, d) (+)-**2** als Standard.

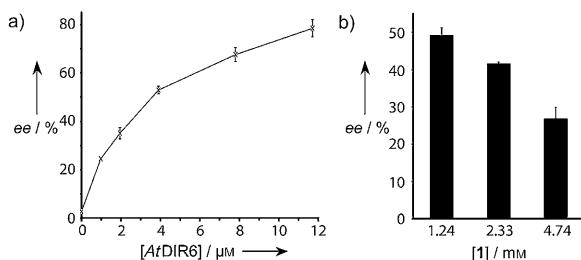


Abbildung 4. Einfluss der Konzentration von a) AtDIR6 und b) **1** auf den Enantiomerenüberschuss an (–)-**2**, bei konstanter Konzentration an a) **1** (1.7 mM) bzw. b) AtDIR6 (1.9 μM).

Laccase-katalysierten Kupplung von **1** zu **2** beobachteten wir für FiDIR1 und AtDIR6 entgegengesetzte Enantioselektivitäten, nämlich die bevorzugte Bildung von (+)-**2** durch FiDIR1 und von (–)-**2** durch AtDIR6 (Abbildung 3b,c). Mit AtDIR6 und FiDIR1 liegen uns nun erstmals zwei rekombinante dirigierende Proteine vor, die eine entgegengesetzte Enantioselektivität aufweisen und damit die enantioselektive Synthese von (+)-**2** und (–)-**2** ermöglichen.

Bei der Bildung von (–)-**2** durch AtDIR6, wie auch bei der Bildung von (+)-**2** durch FiDIR1, lassen sich hohe ee-Werte nur bei hohen (E)DP-Konzentrationen erzielen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die unselektive Kupplung freier Radikale mit der dirigierten Reaktion der DP-gebundenen Radikale konkurriert.^[2,9]

Die Wirkungsweise von DPs und EDPs, und insbesondere die molekulare Grundlage ihrer entgegengesetzten Enantioselektivität, wird in Zukunft näher zu untersuchen sein. Erste Hinweise ergeben sich aus einem Sequenzvergleich von DPs und EDPs (Abbildung 1). In FiDIR1 fallen Aminosäurereste

auf, die mit dem DP aus *T. plicata* übereinstimmen, sich aber von den phylogenetisch viel näher stehenden Sequenzen in *Arabidopsis* unterscheiden. Die Sequenzabweichungen sind also nicht auf die phylogenetische Distanz, sondern eher auf funktionelle Unterschiede zurückzuführen und mögen demzufolge relevant für die Enantiokomplementarität sein. Aufschluss hierüber wird letztlich nur eine vergleichende Strukturanalyse von DPs und EDPs liefern. Auf der Grundlage von Strukturdaten werden sich möglicherweise Minimal-DPs entwerfen lassen, die sich für die Entwicklung einer allgemein anwendbaren Methode für die enantioselektive Phenolkupplung eignen.

Eingegangen am 19. August 2009
Online veröffentlicht am 27. November 2009

Stichwörter: *Arabidopsis* · Dirigierende Proteine · Enantioselektivität · Lignane · Phenolkupplungen

- [1] R. B. Herbert, *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, 2. Aufl., Chapman&Hall, London, **1989**.
- [2] L. B. Davin, N. G. Lewis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 398–406.
- [3] N. G. Lewis, L. B. Davin in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1 (Hrsg.: D. H. R. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn), Elsevier, Oxford, **1999**, S. 639–712.
- [4] K. Freudenberg, *Science* **1965**, *148*, 595–600.
- [5] Zahlreiche Beispiele finden sich in: G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp, S. Tasler, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2001**, *82*, 1–249, zit. Lit.
- [6] a) S. E. Bode, D. Drochner, M. Müller, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6020–6024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5916–5920; b) A. Zeeck, P. Ruß, H. Laatsch, W. Loeffler, H. Wehrle, H. Zähner, H. Holst, *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 957–978; c) J. A. Elix, J. H. Wardlaw, *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 681–683.
- [7] a) T. Kishi, S. Tahara, N. Taniguchi, M. Tsuda, C. Tanaka, S. Takahashi, *Planta Med.* **1991**, *57*, 376–379; b) H. Wu, X.-F. Lao, Q.-W. Wang, R.-R. Lu, C. Shen, F. Zhang, M. Liu, L. Jia, *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 948–951; c) U. Weiss, L. Merlini, G. Nasini, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, *52*, 1–71, zit. Lit.
- [8] L. B. Davin, H. B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkani, N. G. Lewis, *Science* **1997**, *275*, 362–366.
- [9] S. C. Halls, L. B. Davin, D. M. Kramer, N. G. Lewis, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2587–2595.
- [10] M. K. Kim, J.-H. Jeon, M. Fujita, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Plant Mol. Biol.* **2002**, *49*, 199–214.
- [11] J. D. Ford, K. S. Huang, H. B. Wang, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1388–1397.
- [12] J. Liu, R. D. Stipanovic, A. A. Bell, L. S. Puckhaber, C. W. Magill, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3038–3042.
- [13] Übersichten: a) G. Bringmann, A. J. Price Mortimer, P. A. Keller, M. J. Gresser, J. Garner, M. Breuning, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5518–5563; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5384–5427; b) M. P. Sibi, S. Manyem, J. Zimmerman, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3263–3295; c) G. Lessene, K. S. Feldman in *Modern Arene Chemistry* (Hrsg.: D. Astruc), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 479–538.
- [14] P. F. Mugford, U. G. Wagner, Y. Jiang, K. Faber, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8912–8923; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8782–8793.
- [15] T. Nakatsubo, M. Mizutani, S. Suzuki, T. Hattori, T. Umezawa, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15550–15557.
- [16] S. G. Ralph, S. Jancsik, J. Bohlmann, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1975–1991.