

Neue Enzymwerkzeuge für die Biokatalyse

Jacob E. Vick und Claudia Schmidt-Dannert*

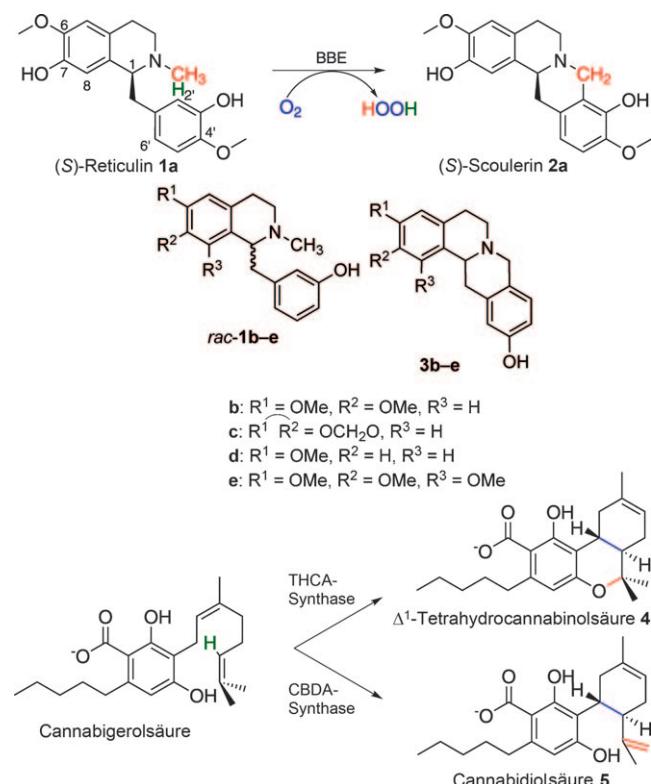
Biokatalyse · Enzyme · Enzymmodelle ·
Synthesemethoden · Wirkstoffentwicklung

Das Nomenclature Committee der International Union of Biochemistry and Molecular Biology unterhält eine Enzymdatenbank (<http://www.enzyme-database.org>), um der gewaltigen Herausforderung der Klassifizierung und Kategorisierung der derzeit 5174 beschriebenen individuellen Enzymmechanismen mithilfe von Leitlinien, die die Enzyme Commission (EC) festgelegt hat,^[1] Herr zu werden. Die Datenbank enthält jede Menge Enzyme, für die noch keine Untersuchungen zur Nutzung ihrer katalytischen Fähigkeiten durchgeführt worden sind.

Ein Beispiel für ein in die Datenbank aufgenommenes Enzym ist das Berberin-Brücken-Enzym (BBE) [EC 1.21.3.3],^[2a,b] das die Umsetzung des Tetrahydroisochinolins (*S*)-Reticulin (**1a**) zu (*S*)-Scoulerin (**2a**; Schema 1) katalysiert. BBE wurde erstmals 1985 aus *Berberis beaniana* gewonnen,^[2c] die BBE-Aktivität konnte allerdings schon 1975 in einem Zellextrakt aus *Macleaya microcarpa* nachgewiesen werden.^[2d] BBE ist eine FAD-gesteuerte Oxidase, die die Bildung intramolekularer C-C-Bindungen zwischen der *N*-Methylgruppe und dem 2'-Kohlenstoffatom des Benzylrests von **1a** katalysiert (Schema 1), wodurch die „Berberinbrücke“ über einen für Enzyme einzigartigen Reaktionsmechanismus gebildet wird. Das C1-Enantiomer (*R*)-Reticulin wird von BBE nicht umgesetzt.

Dieses Enzym wird besonders interessant mit Blick auf die Synthese neuartiger nichtnatürlicher Stoffe. Bei (*S*)-Scoulerin (**2a**) handelt es sich um eine Vorstufe für eine Vielzahl nützlicher Derivate der Benzophenantridinalkaloide, die antibakterielle, antimikrobielle, blutdrucksenkende, schmerzlindernde und beruhigende Eigenschaften haben und potenziell zur Behandlung von Schizophrenie geeignet sind, wodurch die Berberin-Alkaloidfamilie für die Entwicklung einer Fülle neuartiger nichtnatürlicher Stoffe prädestiniert ist. Eine ähnliche Wirkung (z.B. krampflösend, blutdrucksenkend) wurde für die strukturell verwandte Benzylisochinolin-Alkaloidfamilie gefunden (siehe Schrittwieser et al.,^[2e] zit. Lit.).

Schrittwieser et al.^[2e] erkannten dieses Potenzial und wollten nun herausfinden, wie vielseitig sich BBE einsetzen lässt. Die chemische Synthese von Berberinen und Benzyl-



Schema 1. Die durch BBE katalysierte neuartige C-C-verknüpfende Oxidation sowie Reaktionen, die durch die mutmaßlichen BBE-Enzymhomologen THCA- und CBDA-Synthase katalysiert werden.

isochinolinen ist sehr zeitaufwendig, die Ausbeute ist sehr gering, und es werden kaum reine Produkte erhalten. Schrittwieser et al. synthetisierten potenzielle racemische BBE-Substrate in fünf Schritten mit einer Ausbeute von 40 % und zeigten anschließend in vitro, dass aus diesen Substraten und BBE sowohl natürliche als auch nichtnatürliche BBE-Produkte im Multigrammstab erzeugt werden können.

Bei den nichtnatürlichen BBE-Substraten handelte es sich um die Racemate (bezüglich C1) der (*S*)- und (*R*)-Tetrahydroisochinoline **1b–e** ohne die 4'-Methoxygruppe von Reticulin (Schema 1). Es zeigte sich, dass die *S*-Konformere dieser vier nichtnatürlichen Tetrahydroisochinoline Substrate für BBE waren und die *R*-Konformere wie auch bei den natürlichen Substraten von BBE nicht umgesetzt wurden. Angeichts der Vielfalt natürlicher (*S*)-Scoulerinderivate und ihrer pharmakologischen Bedeutung sind diese vier neuartigen nichtnatürlichen Produkte ausgezeichnete Ausgangspunkte für die weitere Wirkstoffentwicklung.

[*] Dr. J. E. Vick, Prof. Dr. C. Schmidt-Dannert
Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics
University of Minnesota
1479 Gortner Ave, Saint Paul, MN 55106 (USA)
Fax: (+1) 612-625-5780
E-Mail: schmi232@umn.edu

Schrittweiser et al.^[2e] konnten außerdem zeigen, dass die Übertragung auf eine kommerziell nutzbare Größenordnung durchaus möglich ist, indem sie die Substrate in einem Maßstab von 20 g L⁻¹ in Gegenwart von 1 g L⁻¹ BBE umsetzten. Es mussten allerdings zuerst mehrere Hindernisse überwunden werden, bevor so hohe Substratmengen bewältigt werden konnten:

Erstens musste die inhibitorische Wirkung des während der Reaktion entstehenden Wasserstoffperoxids durch die Zugabe von 0.05 g L⁻¹ Katalase verhindert werden. Die Katalase überführt das Wasserstoffperoxid wieder zurück in Sauerstoff und Wasser. Zweitens mussten Reaktionen mit einer Substratmenge von 20 g L⁻¹ in Gegenwart von organischen Lösungsmittel durchgeführt werden, da die Substrate bei hoher Konzentration in wässrigen Puffern nicht ausreichend löslich waren. Es ergab sich, dass BBE eine Vielzahl wässrig-organischer Lösungsmittelgemische toleriert, wobei seine hohe katalytische Aktivität erhalten bleibt, was zu seiner Akzeptanz für industrielle Anwendungen beitragen sollte.

Unter den von den Autoren entwickelten Bedingungen reagierte BBE selektiv mit dem *S*-Isomer von **1b**: Nach 24 Stunden waren 100% dieses Stereoisomers umgesetzt. Da die C-C-Bindung nicht nur über das 2'-Kohlenstoffatom, sondern auch über das 6'-Kohlenstoffatom gebildet werden kann, entstand als Nebenprodukt **3b** (Schema 1) – ein nicht ganz unerwartetes Ergebnis, da BBE auch eine Bindungssache für die bei den nichtnatürlichen Substraten fehlende 4'-Methoxygruppe von Reticulin aufweist, was die Rotation der Phenoleinheit der neuen Substrate ermöglicht.

Darüber hinaus fanden die Autoren, dass durch Variation des organischen Lösungsmittels sowie seines Anteils im Gemisch die Reaktion vom gewünschten **2b** zum unerwünschten Nebenprodukt **3b** verschoben werden konnte. Das Verhältnis **2b**:**3b** variierte von 1:1 im schlechtesten Fall bis zu 96:4 im

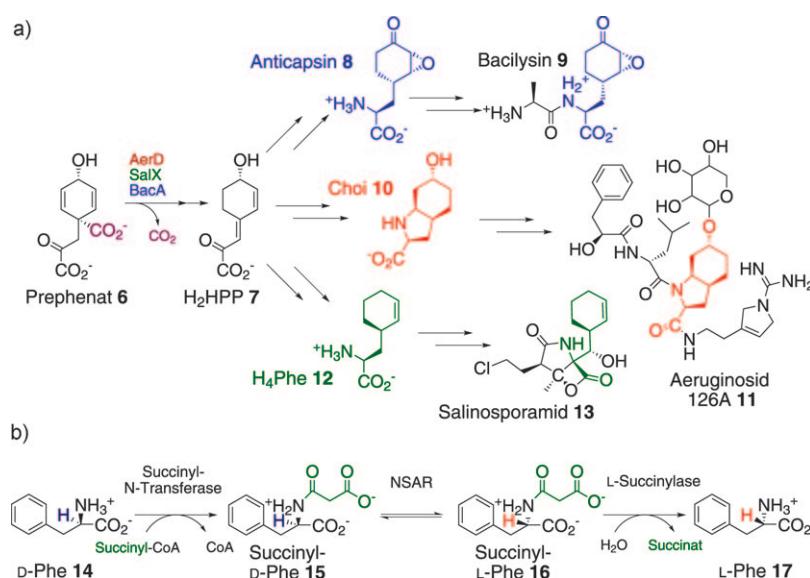
besten Fall. Bei der chemischen Synthese wird **2b** mit einer Ausbeute von 30 % erhalten, und das Verhältnis **2b**:**3b** beträgt 2:3, wohingegen die Ausbeute an (*S*)-**2b** bezogen auf (*S*)-**1b** mit BBE 100% beträgt.

BBE scheint ein ausgezeichnetes Enzym für die kommerzielle Nutzung zu sein. Es ist für eine Vielzahl an Reaktionsbedingungen geeignet, hat eine hohe Umsatzzahl, ergibt ausgezeichnete Ausbeuten mit einem hohen Reinheitsgrad und passt sich sehr leicht an Substrate an.

Schrittweiser et al.^[2e] zeigten an BBE, dass sehr viel mehr Enzyme mit einzigartigen Aktivitäten das Potenzial haben, bei Syntheseanwendungen eingesetzt zu werden, sobald sie ausreichend charakterisiert sind und ihre Aufreinigung etabliert ist, als man angesichts der vergleichsweise geringen Zahl an Enzymen annehmen könnte, die zur Zeit in der Biokatalyse zur Anwendung kommen. Zum Beispiel sind die Δ^1 -Tetrahydrocannabinolsäure(THCA)-Synthase und die Cannabidiolsäure(CBDA)-Synthase dem BBE sehr ähnlich. Beide Enzyme verwenden Cannabigerolsäure um THCA^[3a] (**4**) bzw. CBDA^[3b] (**5**; Schema 1) zu erzeugen. Angesichts der breiten Bioaktivitäten von Cannabigerolen^[3] sollten die THCA- und CBDA-Synthasen ausgezeichnete Kandidaten für weitere Untersuchungen sein.

Eine andere erst kürzlich identifizierte Enzymgruppe mit dem Potenzial für Syntheseanwendungen sind die Prephenat-Decarboxylasen.^[4a] Sie sind die einzigen bekannten Enzyme, die Prephenat (**6**) decarboxylieren und den Sechsring des Prephenats in einen aromatischen Ring überführen. Eine neu entdeckte Klasse der Prephenat-Decarboxylasen dagegen katalysiert nicht die Ringaromatisierung, sondern decarboxyliert Prephenat zu 4-Hydroxydihydrophenylpyruvat, das dann spontan zum Regioisomer H₂HPP (**7**; Schema 2a) isomerisiert.

Dank der H₂HPP-Synthese fungieren diese neuartigen Prephenat-Decarboxylasen als Tor zu einer Vielzahl an be-



Schema 2. a) Die drei möglichen Stoffwechselwege zu Prephenat-Sekundärmetaboliten, wenn die Katalyse zu Beginn von AerD, SalX oder BacA durchgeführt wird. b) Die irreversible Racemisierung von D-Phe zu L-Phe, die durch drei Mitglieder der facettenreichen und promiskuitiven GNAT-, Enolase- und Amidohydrolase-Enzymüberfamilien katalysiert wird.

kannten sekundären Metaboliten, einschließlich des Antibiotikums Bacilysin (**9**) sowie der Proteaseinhibitoren Salinosporamid (**13**) und Aeruginosid 126A (**11**).^[4b] Da diese Metaboliten sehr unterschiedlich sind, scheint diese neue Gruppe von Enzymen prädestiniert, die Synthese einer Vielzahl von nichtnatürlichen Produkten zu katalysieren, falls sie für die entsprechenden nichtnatürlichen Substrate genauso zugänglich sind, wie es BBE ist. Zudem muss weiter an der Aufklärung der Stoffwechselwege zu den Sekundärmetaboliten Salinosporamid und Aeruginosid 126A, wie auch von Bacilysin, gearbeitet werden, um Zugang zu einer noch größeren Vielfalt an Stoffen zu erhalten.^[4a]

Sakai et al. klärten vor wenigen Jahren einen dreigliedrigen Enzymstoffwechselweg zur unidirektionalen Racemisierung von D,L-Aminosäuren auf^[5] (Schema 2b). Dieser Stoffwechselweg beginnt mit der Übertragung einer Succinylgruppe von Succinyl-CoA auf D-Phe (**14**) mittels einer D-Aminosäure-Succinyl-N-Transferase. Succinyl-D-Phe (**15**) wird dann durch die N-Succinylaminosäure-Racemase (NSAR) zum entsprechenden Succinyl-L-Phe (**16**) racemisiert. Schließlich wird die Succinylgruppe durch L-Succinylase hydrolytisch und – anders als mit den gewöhnlichen TPP-abhängigen Aminosäure-Racematen – irreversibel entfernt, was L-Phe (**17**) als Produkt ergibt. Die Verwendung einer einzigen Racemase, um 50% verwendbares Substrat in 100% verwendbares Substrat umzuwandeln, ist kein neues Konzept, allerdings trug diese Arbeit dazu bei, den potenziellen Baustein zu erweitern, falls keine geeignete einzelne Racemase zur Verfügung steht, indem eine alternative Gruppe von Enzymen angeboten wird.

Jedes der drei Enzyme setzte eine Vielzahl an Substraten um: Die D-Aminosäure-Succinyl-N-Transferase reagierte mit 16 Aminosäuren, die NSAR konnte 17 Succinylaminosäuren racemisieren, und die L-Succinylase konnte 19 N-Succinyl-L-Aminosäuren hydrolyseren. Außerdem gehören die Succinyl-N-Transferase, die NSAR und die L-Succinylase zur GNAT-,^[6] Enolase-^[7] bzw. Amidohydrolase-Überfamilie,^[8] die alle drei gut charakterisiert sind und eine Vielzahl an Reaktionen katalysieren und deren Enzyme oft sehr promiskuitiv sind, was die Zahl der akzeptierten Substrate anzeigt.

Glücklicherweise wurden viele der Probleme, die mit der Suche nach dem richtigen Enzym für eine bestimmte Anwendung verbunden waren, durch das PathPred-Programm^[9a] (<http://www.genome.jp/tools/pathpred/>) der Kyoto-Encyclopedia-of-Genes-and-Genomes(KEGG)-Datenbank^[9b] vereinfacht, die ihre Enzyme entsprechend den EC-Standards ordnet. Bei PathPred können sowohl das abzubauende Substrat als auch der gewünschte Naturstoff eingegeben werden. Daraufhin generiert PathPred eine Reihe von potenziellen enzymkatalysierten Stoffwechselwegen, die zum Synthesenzieiel führen würden. Abbildung 1 zeigt als Beispiel eine Systemkarte, die mit PathPred für die Synthese von Kaffeesäure (C01197) angefertigt wurde: PathPred ermittelte drei unterschiedliche Stoffwechselwege zu Kaffeesäure ausgehend von L-Tyr (C0079) sowie zusätzliche Ausgangssubstrate und die zugehörigen Stoffwechselwege, die ebenfalls Kaffeesäure als Synthesenzieiel haben.

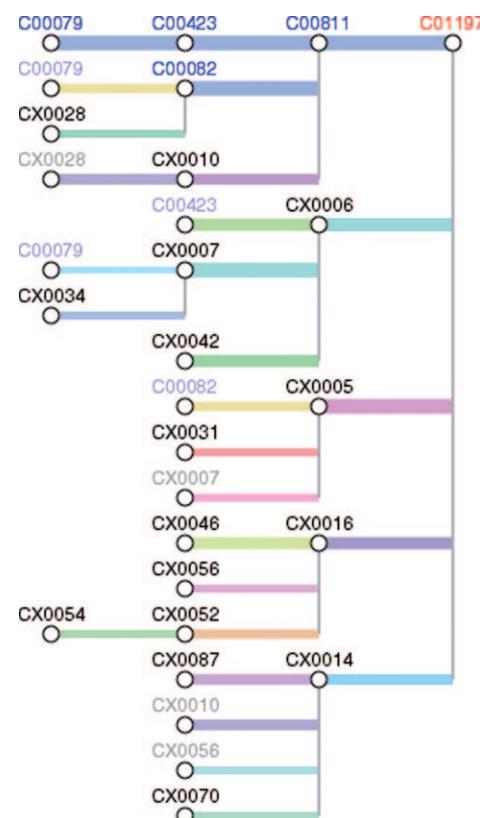


Abbildung 1. Eine Systemkarte zur enzymkatalysierten Synthese von Kaffeesäure, die mit dem PathPred-Programm auf der Internetseite der KEGG-Datenbank erstellt wurde. Ein offener Kreis stellt ein chemisches Intermediat dar, und farbige horizontale Balken symbolisieren Enzymreaktionen. Die grauen Linien stehen für die gleichen chemischen Intermediates wie die offenen Kreise, von denen sie ausgehen. Ein Lesebeispiel: C00811 kann aus drei verschiedenen Substraten mithilfe zweier verschiedener Enzyme hergestellt werden (man beachte die identischen dunkelblauen Linien, die C00811 mit seinen Nachbarn C00423 und C00082 verbinden, was bedeutet, dass diese Reaktionen durch dasselbe Enzym katalysiert werden).

Berücksichtigt man die Tatsache, dass Enzyme häufig zu ausgedehnten Überfamilien gehören, die oft gut charakterisiert sind und eine Anzahl bekannter Eigenschaften haben und deren Mitglieder häufig relativ substratpromiskuitiv sind, kann man zu dem Schluss gelangen, dass es ein beträchtliches Potenzial an bisher kommerziell ungenutzten Enzymen gibt, das angezapft werden könnte. Nimmt man dazu Programme wie PathPred, die Wissenschaftlern, Chemikern und Ingenieuren helfen können, nützliche Enzyme schnell zu finden, und die sich ständig vergrößernde EC-Datenbank, kann man nur optimistisch sein, was die Biokatalyse angeht. Wir verfügen über das enzymatische Rüstzeug, und wir haben Talent, jetzt müssen wir nur noch den Mut haben, beides zu nutzen.

Eingegangen am 5. Januar 2011
Online veröffentlicht am 4. Juli 2011

[1] Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and

Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes (Hrsg: E. Webb), Academic Press, New York, **1992**.

- [2] a) T. M. Kutchan, H. Dittrich, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24475–24481; b) A. Winkler, A. Lyskowski, S. Riedl, M. Puhl, T. M. Kutchan, P. Macheroux, K. Gruber, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 739–741; c) P. Steffens, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2577–2583; d) E. Rink, H. Böhm, *FEBS Lett.* **1975**, *49*, 396–399; e) J. H. Schrittewieser, C. Resch, J. H. Sattler, W. D. Lienhard, K. Durchschein, A. Winkler, K. Gruber, P. Macheroux, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1100–1103; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1068–1071.
- [3] a) S. Sirikantaramas, S. Morimoto, Y. Shoyama, Y. Ishikawa, Y. Wada, Y. Shoyama, F. Taura, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39767–39774; b) F. Taura, S. Sirikantaramas, Y. Shoyama, K. Yoshikai, Y. Shoyama, S. Morimoto, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2929–2934.
- [4] a) S. Mahlstedt, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2010**, *49*, 912–923; b) S. Mahlstedt, E. N. Fielding, B. S. Moore, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2010**, *49*, 9021–9023.
- [5] A. Sakai, D. F. Xiang, C. Xu, L. Song, W. S. Yew, F. M. Raushel, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2006**, *45*, 4455–4462.
- [6] W. M. Vetting, L. P. S. de Caravalho, M. Yu, S. S. Hegde, S. Magnet, S. L. Roderick, J. S. Blanchard, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 212–226.
- [7] M. E. Glasner, N. Fayazmanesh, R. A. Chiang, A. Sakai, M. P. Jacobson, J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 228–250.
- [8] C. M. Seibert, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6383–639.
- [9] a) Y. Moriya, D. Shigemizu, M. Hattori, T. Tokimatsu, M. Kotera, S. Goto, M. Kaneisa, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W138–W143; b) M. Kanehisa, S. Goto, M. Furumichi, M. Tanabe, M. Hirakawa, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D355–D360.