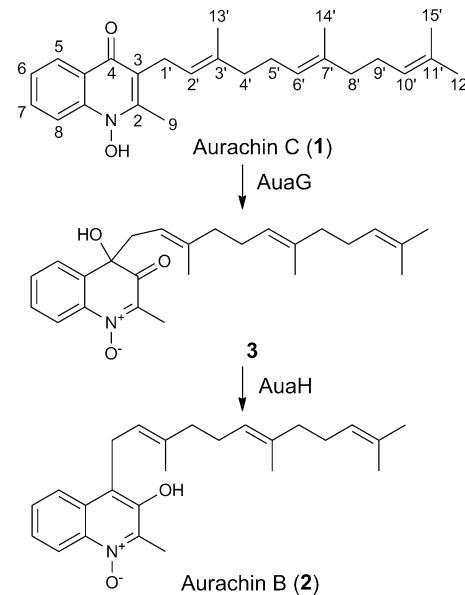


Eine Semipinakol-Umlagerung – katalysiert durch ein Enzymsystem mit difunktioneller FAD-abhängiger Monooxygenase**

Yohei Katsuyama, Kirsten Harmrolfs, Dominik Pistorius, Yanyan Li und Rolf Müller*

Die Natur hat raffinierte Wege für die Biosynthese von biologisch aktiven Metaboliten entwickelt, die seit jeher von Menschen in vielfältiger Weise genutzt werden. Im Verlauf dieser Biosyntheseprozesse werden oft hochkomplexe chemische Reaktionen von enzymatischen Systemen katalysiert, die Transformationen ermöglichen, die auf anderem Wege nicht oder nur unter extremen Bedingungen durchführbar sind. Folglich ist es von enormer Wichtigkeit, diese biochemischen Prozesse zu verstehen, um sie als potenzielle Zugänge zu pharmakologisch relevanten Molekülstrukturen zu nutzen.

Aurachine gehören zur Gruppe der Chinolin-Alkaloide. Sie wurden aus Extraktten des Myxobakteriums *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 isoliert und zeigen diverse biologische Aktivitäten gegenüber Bakterien, Pilzen und Plasmodien. Zusätzlich inhibieren sie die mitochondriale Atmungskette.^[1–6] Die Biosynthese der Aurachinderivate hat mehrere interessante Aspekte: Ein bemerkenswerter Schritt ist die Umsetzung von Aurachin C (**1**) zu B (**2**), an der eine Prenylwanderung von C-3 nach C-4 beteiligt ist, vermutlich über eine Pinakol-artige Umlagerung (Schema 1).^[7,8] Pinakol-Umlagerungen wurden für die Biosynthese von verschiedenen Sekundärmetaboliten wie Aflatoxin B1, (+)-Liphagal, (+)-Asteltoxin, Brevianamid, Paraherquamid B, Versicolamid B und Notoamid vorgeschlagen.^[9–11] Allerdings konnte bis jetzt keiner dieser hypothetischen Biosynthesewege biochemisch nachgewiesen werden, wenngleich die vorgeschlagenen Mechanismen als biomimetische Ansätze für die To-



Schema 1. Biosynthese von Aurachin B (**2**) ausgehend von Aurachin C (**1**).

talsynthese der Naturstoffe genutzt wurden.^[9] Bis heute konnte kein enzymatisches System nachgewiesen werden, das für die Pinakol-Umlagerung während der Biosynthese von Sekundärmetaboliten zuständig ist. Für den Primärmetabolismus wurden lediglich zwei Beispiele bei der Biosynthese von verzweigten Aminosäuren und von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat beschrieben.^[12–17]

Die biosynthetische Umsetzung von Aurachin C (**1**) zu B (**2**) wurde erstmals mithilfe von Fütterungsperimenten durch Höfle und Kunze untersucht,^[7] die die Herkunft der Hydroxygruppe an C-3 in Aurachin B (**2**) molekularem Sauerstoff zuordnen konnten. Kürzlich zeigten Pistorius et al.,^[8] dass es zusätzlich zum Genlocus, der für die Biosynthese des Aurachingrundgerüstes kodiert, zwei weitere Genloci gibt, die ebenfalls Gene der Aurachinbiosynthese enthalten.^[18–20] Die Autoren mutmaßen, dass zwei Enzyme, kodiert als *auaG* und *auaH*, für die Wanderung der Farnesygruppe von C-3 nach C-4 zuständig sind. Allerdings blieb der Biosynthesemechanismus unaufgeklärt. Bei In-vivo-Experimenten mit *auaG*- und *auaH*-Mutanten von *S. aurantiaca* Sg a15 konnten auch keine Biosyntheseintermediate detektiert werden.^[8] Um den durch AuaG und AuaH katalysierten Reaktionsmechanismus aufzuklären, wurden In-vitro-Experimente unter Nutzung von rekombinanten Proteinen durchgeführt, die hier beschrieben werden sollen.

[*] Dr. Y. Katsuyama, [+] Dr. K. Harmrolfs, [\\$] Dr. D. Pistorius, [\\$] Dr. Y. Li, [#] Prof. Dr. R. Müller

Helmholtz Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung und Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes 66123 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: rom@helmholtz-hzi.de

[+] Aktuelle Adresse: Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo (Japan)

[\\$] Aktuelle Adresse: Natural Products Unit, Novartis Institutes for BioMedical Research, Novartis Pharma AG, Basel (Schweiz)

[#] Aktuelle Adresse: National Museum of Natural History, CNRS, Laboratory of Communication Molecules and Adaptation of Micro-organisms, Paris (Frankreich)

[**] Wir danken Prof. Dr. G. Höfle vom HZI Braunschweig für Referenzproben von Aurachin B und C. Y.K. wurde von der Alexander von Humboldt-Stiftung mit einem Feodor Lynen-Forschungsstipendium für Postdoktoranden unterstützt. Die Forschung im Labor von R.M. wurde von der DFG und dem BMBF gefördert. FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204138> zu finden.

AuaG gehört zur Familie der Flavin-abhängigen Monooxygenasen und hat einer BLAST-Suche und Phyre2-Analyse zufolge eine relativ hohe Ähnlichkeit mit PgaE, das an der Biosynthese von Angucyclinen beteiligt ist.^[21] Das Protein weist die konservierten Motive GxGxxG, DG und GD auf, die charakteristisch für diese Enzymklasse sind.^[22] AuaH scheint eine Rossmann-Faltung aufzuweisen und ist deshalb vermutlich eine NAD(P)H-abhängige Reduktase (NAD=Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid). Das konservierte TGxxxGxG-Motiv für die NAD(P)H-Bindung und das katalytische Zentrum, das für die ketoreduktive Aktivität verantwortlich ist (YxxxK-Motiv und der katalytische Ser-Rest), sind beide in AuaH vorhanden.^[23,24]

Für die In-vitro-Analyse der Enzyme wurden die rekombinanten Proteine mit einem Hexahistidinmarker am C-Terminus von AuaG und AuaH in *Escherichia coli* unter Verwendung eines pET- (Novagen) oder eines pCold-Expressions-Systems (Takara) hergestellt. Die Proteine wurden mit Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abbildung 1 der Hintergrundinformationen). AuaG wurde als hellgelbes Protein isoliert, und der Cofaktor konnte nach der von Lin et al. beschriebenen Methode als Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) bestimmt werden (Abbildung 1).^[25] Bei

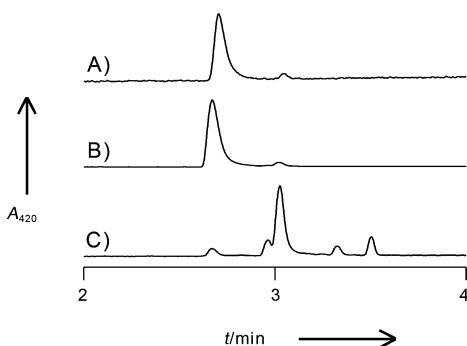


Abbildung 1. Analyse des an AuaG gebundenen Cofaktors. Die AuaG-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an Methanol versetzt und zentrifugiert, um das Protein auszufällen. Der Überstand wurde mit LC-MS analysiert (A) und mit Referenzproben von FAD (B) und Flavimononukleotid (FMN; C) verglichen.

Inkubation von jeweils 2 μM der rekombinanten Enzyme mit 200 μM Aurachin C (**1**; 30 min, 30°C, 2 mM NADH und 0.1 mM 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure (CHES), pH 9.5) konnte die Bildung von Aurachin B (**2**) LC-MS-analytisch detektiert werden (Abbildung 2 A). Die Umsetzung zu Aurachin B (**2**) wurde durch einen Vergleich mit Referenzmaterial bezüglich Retentionszeit, UV-, MS- und MS/MS-Spektren nachgewiesen (Abbildung 2 der Hintergrundinformationen). Zusätzlich zur Bildung von Aurachin B (**2**) wurde auch die Entstehung neuer Derivate oder Intermediate beobachtet. Produkt **3** (Abbildung 2) wurde eine um 16 Da höhere Masse als Aurachin C (**1**) zugeordnet und wurde deshalb als Oxidationsprodukt von Aurachin C (**1**) interpretiert. Die Reaktion von Aurachin C (**1**) mit hitzeinaktiviertem AuaG ergab weder Aurachin B (**2**) noch das oxidierte Produkt **3** (Abbildung 2 C). Hitzeinaktivierung von AuaH alleine verhinderte zwar die Bildung von Aurachin B

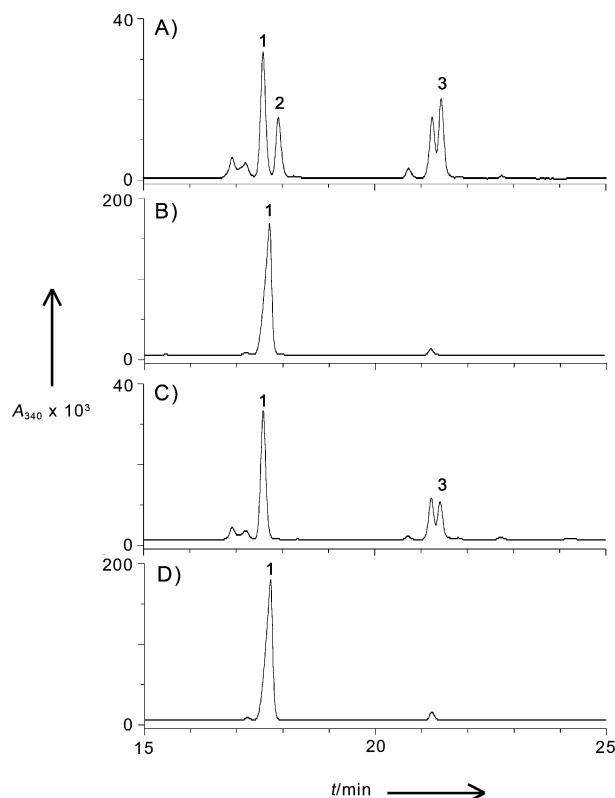


Abbildung 2. LC-MS-Analyse der Umsetzung von Aurachin C (**1**) in AuaGH-In-vitro-Assays. Inkubation von AuaG und AuaH mit Aurachin C (**1**) in Gegenwart von NADH führt zur Synthese von Aurachin B (**2**) und oxidiertem Intermediat **3** (A). Bei Nutzung von inaktiviertem AuaG und aktivem AuaH wurden weder **3** noch Aurachin B (**2**) produziert (B). Einsatz von AuaG und inaktiviertem AuaH führte ausschließlich zur Produktion von **3** (C). Im Falle der Inaktivierung beider Enzyme fand keine Reaktion statt (D).

(**2**), das Oxidationsprodukt **3** wurde hingegen detektiert (Abbildung 2 C). Bei Umsetzung des Rohextrakts dieser Reaktion mit AuaH unter Zugabe von NADH wurde die Bildung von Aurachin B (**2**) wiederum beobachtet (Abbildung 3 der Hintergrundinformationen). Diese Experimente demonstrieren, dass AuaG und AuaH sequenziell arbeiten und dass der Umsetzung von Aurachin C (**1**) zu Aurachin B (**2**) ein Oxidations-Reduktions-Mechanismus zugrunde liegt. Beide Enzyme benötigen NADH oder NADPH für die Reaktion, wobei beide NADH bevorzugen (Tabellen 1 und 2 der Hintergrundinformationen). Durch die Zugabe von FAD zur Reaktion mit AuaG wurde die Reaktionsgeschwindigkeit nicht wesentlich beeinflusst. Basierend auf den entscheidenden Aminosäuren (Schlüsselstellen), die für den Aufbau des katalytischen Zentrums von Ketoreduktasen beschrieben sind und die mit der Produktion von Sekundärmetaboliten im Zusammenhang stehen, wurden S111A- und Y139F-Mutanten von AuaH hergestellt. Mit keinem der mutierten Enzyme konnte in vitro Aurachin B (**2**) produziert werden (Abbildung 3 der Hintergrundinformationen).^[23,24]

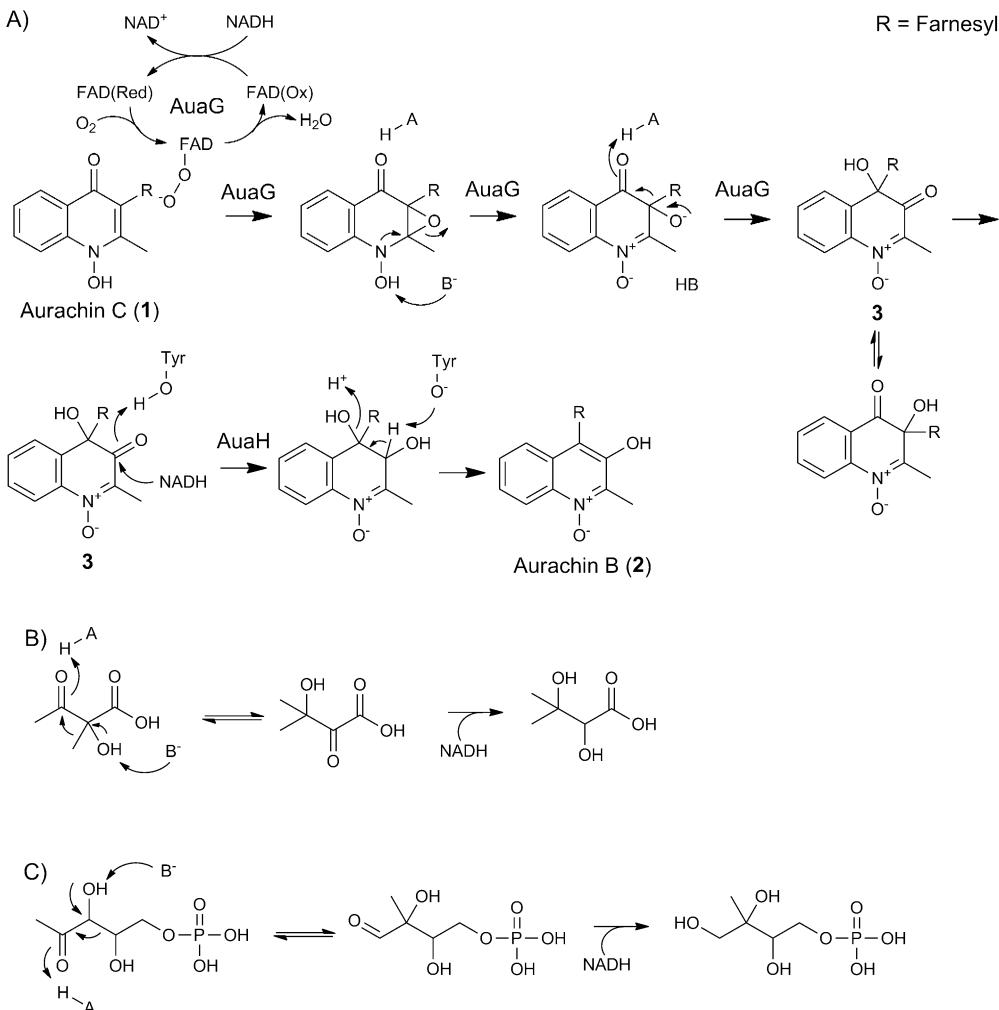
3, das Hauptprodukt der Reaktion mit AuaG, war sehr labil und isomerisierte bereits in 0.1M CHES-Puffer (pH 9.5)/Methanol (Abbildung 4 der Hintergrundinformationen). Das entstandene Isomer zeigte eine identische MS/MS-Fra-

tierung zu **3**, was zum Schluss führte, dass beide Verbindungen ähnliche Grundgerüste aufweisen (Abbildung 2 der Hintergrundinformationen). Allerdings traten starke Veränderungen im UV-Spektrum auf, was auf eine Doppelbindungsomerisierung in der Farnesylkette schließen lässt (Abbildung 2 der Hintergrundinformationen). Versuche zur Stabilisierung des Intermediats durch Variieren des pH-Werts in der Lösung führten zu verschiedenen Zusammensetzungen von **3**, dem Isomer und einer unterschiedlichen Zahl an Zersetzungspunkten (Abbildungen 4 und 5 der Hintergrundinformationen). Im eingestellten Gleichgewicht konnte das Verhältnis Isomer zu **3** auf 9:1 bei pH 9.5 und auf 1.4:1 bei pH 7 bestimmt werden. Unter sauren Bedingungen wurde lediglich eine schnelle Zersetzung von **3** beobachtet (Abbildung 6 der Hintergrundinformationen).

Für ein besseres Verständnis des AuaGH-katalysierten Reaktionsmechanismus sollte die oxidierte Form von Aurachin C (**3**) strukturell aufgeklärt werden. Die Isolierung von **3** scheiterte zunächst wegen der enormen Instabilität dieses Intermediats. Deshalb sollte die Struktur der Substanz direkt aus dem Rohextrakt der enzymatischen Reaktion durch NMR-spektroskopische Analyse bestimmt werden. Die Reaktionsmischung mit AuaG wurde mit Dichlormethan extrahiert, und die organische Phase wurde mit Phosphatpuffer auf pH 7 eingestellt. Die Probe wurde mithilfe eines kalten N₂-Stroms eingeengt und direkt in CD₃CN für die NMR-spektroskopische Analyse gelöst. Aus der Lösung wurde eine Probe für die LC-MS-Analytik entnommen, um sicherzustellen, dass **3** das Hauptprodukt der Reaktion ist (Abbildung 7 der Hintergrundinformationen). Die NMR-spektroskopische Analyse erfolgte durch Kombination von 1D- und 2D-NMR-Experimenten. **3** war in Acetonitril wesentlich stabiler als in wässriger Lösung, wenngleich auch hier mit der Zeit eine leichte Zersetzung zu beobachten war. Die ausführliche Analyse der NMR-Daten des Rohextrakts aus der Reaktion mit AuaG ergab, dass die Umlagerung der Farnesylgruppe von C-3 nach C-4 im Intermediat **3** bereits stattgefunden hatte. Belege dafür konnten aus dem HMBC-Spektrum er-

halten werden. Für die Methylgruppe mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 2.23$ ppm (H-9) und eine CH₂-Gruppe bei $\delta = 2.64$ und 2.53 ppm (H-1'_{a,b}) wurden HMBC-Korrelationen zu einer Carbonylgruppe bei $\delta = 195.3$ ppm detektiert. Des Weiteren zeigten die Signale von H-5 und H-1'_{a,b} HMBC-Korrelationen zu einem hydroxylierten quartären Kohlenstoffatom mit einer Verschiebung von $\delta = 77.5$ ppm (C-4). Zusammengenommen führten diese Befunde zu dem Schluss, dass die Farnesylgruppe in **3** an C-4 gebunden ist; **3** konnte somit als 4-Hydroxy-2-methyl-3-oxo-4-farnesyl-3,4-dihydrochinolin-1-oxid identifiziert werden.

Aufgrund dieser Befunde schlagen wir eine Semipinakol-Umlagerung ausgehend von Aurachin C (**1**) als Mechanismus für die Wanderung der Farnesylgruppe von C-3 nach C-4 vor (Schema 2).^[9] Im ersten Schritt wird die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 des Chinolingerüsts mit AuaG epoxidiert. Anschließend wird die N-Hydroxygruppe deprotoniert, und die Carbonylgruppe wird durch koordinative Protonierung aktiviert. Die Öffnung des Epoxids findet Säure-Base-katalysiert statt; dem schließt sich eine Semipinakol-Umlagerung an, die die Wanderung der Farnesylgruppe von C-3 nach C-4 bewirkt und somit den Zugang zu **3** ermöglicht.



Schema 2. Potenzieller Mechanismus der Reaktion von AuaGH (A) und Vergleich mit der Reaktion von Aceto-hydroxsäure-Isomeroreduktase (B) und 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (C), zwei Enzymen, die Semipinakol-Umlagerungen katalysieren.

Diese Art von Protonentransfer ist auch von anderen Enzymen bekannt, die Semipinakol-Umlagerungen katalysieren und weiter unten diskutiert werden.

Aus folgenden Gründen ist die Katalyse der Epoxidierung wie auch der Umlagerung durch AuaG als wahrscheinlich anzusehen: Die Reaktion scheint unter optimierten Bedingungen selektiv in Richtung der Bildung von **3** abzulaufen (Abbildung 7 der Hintergrundinformationen). **3** isomerisiert wiederum umgehend unter leicht basischen Reaktionsbedingungen (Abbildung 4 der Hintergrundinformationen), was darauf hindeutet, dass **3** nicht das bevorzugte Pinakol-Produkt im Gleichgewicht ist und die Reaktion enzymatisch katalysiert verläuft. Die Umlagerung scheint unter neutralen und basischen Bedingungen in entgegengesetzter Richtung abzulaufen, vermutlich geleitet durch die Deprotonierung der Hydroxygruppe an C-4. Keto-Enol-Tautomerie an dieser Position forciert die Farnesylwanderung zurück zu C-3. Der Umlagerung zum benötigten Intermediat **3** liegt der gleiche Mechanismus zugrunde, das „falsche“ Isomer ist jedoch vermutlich wegen einer stärkeren Elektrophilie, die durch die Gegenwart des N-Oxids begründet ist, bevorzugt. Diese Theorie wird von der Tatsache gestützt, dass die Synthese von 2-Benzoyl-3-isnitrosobutan-2-ol unter stark sauren Bedingungen beschrieben wurde.^[26] Der beschriebene Gleichgewichtszustand und die Instabilität von **3** erklären die Notwendigkeit einer sofortigen Reduktion des Intermediats durch AuaH zur Stabilisierung der Farnesylgruppe an C-4.

Unseres Wissens wurden lediglich zwei Enzyme beschrieben, die Semipinakol-Umlagerungen (Acyloin-Umlagerungen) katalysieren:^[12–17] Acetohydroxsäure-Isomerase und 1-Desoxy-d-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase sind an der Valin/Isoleucin-Biosynthese^[12–14] bzw. dem 2-C-Methyl-d-erythritol-4-phosphat(MEP)-Biosyntheseweg beteiligt (Schema 2B bzw. C).^[15–17] Beide Enzyme zeigen eine duale Funktionalität in Form der Katalyse einer Isomerisierung, gefolgt von der spezifischen Reduktion eines der Isomere, wofür von beiden Enzymen außer NAD(P)H auch zweiwertige Metallionen benötigt werden. Tyagi et al. vermuten hierzu, dass die Reduktion für die sofortige Umsetzung und damit Stabilisierung des nicht begünstigten Intermediats notwendig ist.^[13] Im Unterschied dazu werden von AuaG keine zweiwertigen Metallionen benötigt, und es wird eine Isomerisierung in Kombination mit einer Epoxidierung, nicht aber mit einer Reduktion, katalysiert. AuaG ist somit vermutlich für eine selektive Isomerisierung durch eine Umlagerung in Kombination mit der Ringöffnung eines Epoxids verantwortlich. Das Hauptprodukt aus der Reaktion mit AuaG ist das energetisch nicht bevorzugte Isomer der Semipinakol-Umlagerung. Dieses wird umgehend durch Reduktion und daraus resultierende Aromatisierung, katalysiert durch AuaH, stabilisiert, was die Umlagerung vollendet.

Wir haben hier ein neues Enzymsystem beschrieben, das die Wanderung einer Prenylgruppe mithilfe einer neuartigen FAD-abhängigen Monooxygenase (AuaG) bewirkt. Dieses System katalysiert eine Epoxidierung in Kombination mit Semipinakol-Umlagerung, gefolgt von der Aktion einer Ketoreduktase (AuaH). Diese Entdeckung liefert wichtige Informationen zu enzymatischen Umlagerungen in Naturstoffbiosynthesen und gibt somit Impulse für die Nutzung biomati-

metischer Semipinakol-Umlagerungen in der organischen Synthese.

Eingegangen am 28. Mai 2012
Online veröffentlicht am 21. August 2012

Stichwörter: Aurachine · Biosynthese · Enzyme · Epoxidierungen · Umlagerungen

- [1] G. Höfle, H. J. Irschik, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *71*, 1946–1948.
- [2] W. Oettmeier, R. Dostatni, C. Majewski, G. Höfle, T. Fecker, B. Kunze, H. Reichenbach, *Z. Naturforsch. C* **1990**, *45*, 322–328.
- [3] T. Friedrich, P. van Heek, H. Leif, T. Ohnishi, E. Forche, B. Kunze, R. Jansen, W. Trowitzsch-Kienast, G. Höfle, H. Reichenbach, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 691–698.
- [4] B. Meunier, S. A. Madgwick, E. Reil, W. Oettmeier, P. R. Rich, *Biochemistry* **1995**, *34*, 1076–1083.
- [5] B. Kunze, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1987**, *40*, 258–265.
- [6] G. Höfle, B. Böhlendorf, T. Fecker, F. Sasse, B. Kunze, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1967–1969.
- [7] G. Höfle, B. Kunze, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1843–1849.
- [8] D. Pistorius, Y. Li, A. Sandmann, R. Müller, *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 3308–3315.
- [9] Z. L. Song, C. A. Fan, Y. Q. Tu, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7523–7526.
- [10] H. Kato, Y. Nakamura, J. M. Finefield, H. Umaoka, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6923–6926.
- [11] S. Li, J. M. Finefield, J. D. Sunderhaus, T. J. McAfoos, R. M. Williams, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 788–791.
- [12] G. T. Mrachko, S. K. Chunduru, K. C. Calvo, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *294*, 446–453.
- [13] R. Tyagi, Y. T. Lee, L. W. Guddat, R. G. Duggleby, *FEBS J.* **2005**, *272*, 593–602.
- [14] R. Dumas, G. Curien, R. T. DeRose, R. Douce, *Biochem. J.* **1993**, *294*, 821–828.
- [15] M. Takenoya, A. Ohtaki, K. Noguchi, K. Endo, Y. Sasaki, K. Ohsawa, S. Yajima, M. Yohda, *J. Struct. Biol.* **2010**, *170*, 532–539.
- [16] L. M. Henriksson, T. Unge, J. Carlsson, J. Aqvist, S. L. Mowbray, T. A. Jones, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19905–19916.
- [17] T. Kuzuyama, S. Takahashi, M. Takagi, H. Seto, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19928–19932.
- [18] A. Sandmann, J. Dickschat, H. Jenke-Kodama, B. Kunze, E. Dittmann, E. R. Müller, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2768–2772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2712–2716.
- [19] E. Stec, D. Pistorius, R. Müller, S. M. Li, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1724–1739.
- [20] D. Pistorius, Y. Li, S. Mann, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12362–12365.
- [21] H. Koskineni, M. Metsä-Ketelä, D. Dobritzsch, P. Kallio, H. Korhonen, P. Mäntsälä, G. Schneider, J. Niemi, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 633–648.
- [22] M. H. Eppink, H. A. Schreuder, W. J. Van Berkel, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2454–2458.
- [23] T. P. Korman, J. A. Hill, T. N. Vu, S. C. Tsai, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14529–14538.
- [24] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79.
- [25] S. Lin, S. G. Van Lanen, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6616–6623.
- [26] G. Wittig, H. Kleiner, H. J. Conrad, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1929**, *469*, 1–16.