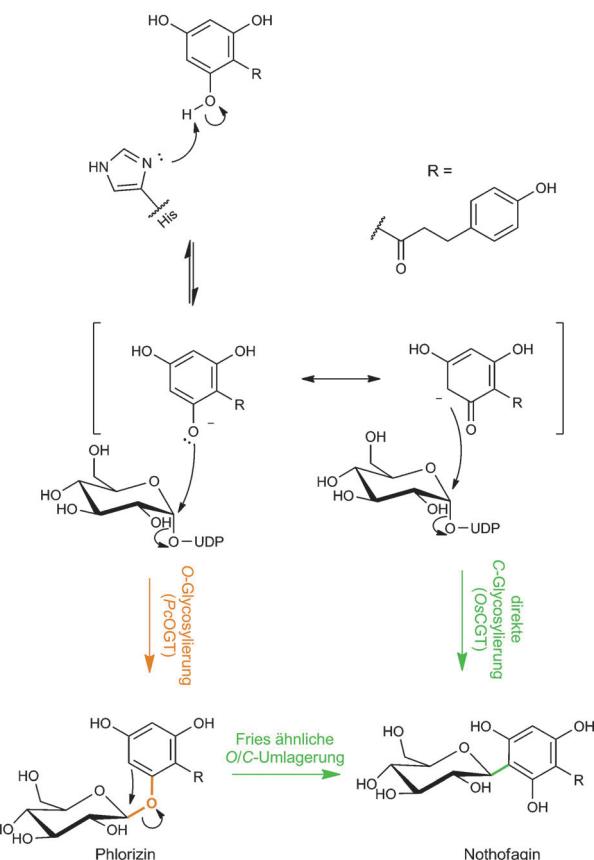


# Ein Motiv im aktiven Zentrum fungiert als Schalter zwischen O- und C-Glykosyltransferase-Aktivität\*\*

Alexander Gutmann und Bernd Nidetzky\*

Die biologische Aktivität vieler Naturstoffe wird durch Glykosylierung bestimmt.<sup>[1]</sup> Glykosylierungen sind daher häufig essenziell für die Wirksamkeit von Arzneimitteln aus Naturstoffen.<sup>[2]</sup> Modifikationen im Glykosylierungsmuster von Naturstoffen sind darüber hinaus eine vielversprechende Strategie, um neue biologisch aktive Moleküle mit maßgeschneiderten pharmakologischen Eigenschaften zu entwickeln.<sup>[3]</sup> Hierbei geht es um den Austausch des Zuckermoleküls, aber auch um Veränderungen in Position und Art der glykosidischen Bindung(en).<sup>[4]</sup> Während die allermeisten Naturstoffe *O*-glykosyliert sind, kommen auch *N*-, *C*- und *S*-Glycoside natürlich vor.<sup>[5]</sup> Chemisch zeichnen sich *C*-Glycoside durch ihre ausgeprägte Stabilität gegen spontane sowie enzymkatalysierte Hydrolyse aus.<sup>[6]</sup> *C*-Glycoside haben daher besonderes Interesse für medizinische Anwendungen geweckt, wobei sie als isofunktionelle *O*-Glykosid-Analoga den entscheidenden Vorteil einer längeren In-vivo-Halbwertszeit bieten könnten.<sup>[7]</sup>

Glykosyltransferasen (GTs; EC 2.4) katalysieren Glykosylierungen in der Naturstoffbiosynthese. In der Reaktion von GTs wird ein Glykosylrest von einem aktivierten Donor, in der Regel ein Nukleosiddiphosphat-Zucker (z.B. UDP-Glukose in Schema 1), auf die reaktive Gruppe eines Akzeptors übertragen.<sup>[8]</sup> Durch ihre vorzügliche Substratselektivität wird in GTs allgemein großes Potenzial für Anwendungen in vitro sowie für In-vivo-Glykosylierungen gesehen.<sup>[3]</sup> GTs, die von Natur aus *C*-Glycoside bilden, sind jedoch rar, was ihre Verfügbarkeit und Anwendung in Synthesen stark einschränkt.<sup>[9]</sup> Aus diesem Grund muss die Entwicklung effizienter Katalysatoren für *C*-Glykosylierungen möglicherweise durch Protein-Engineering aus verfügbaren *O*-Glykosyltransferasen (OGTs) erfolgen. Unglücklicherweise sind die mechanistischen Prinzipien des *C*-Glykosyltransfers anders als für den detailliert untersuchten *O*-Glykosyltransfer<sup>[8]</sup> nur unzureichend verstanden. Die Möglichkeiten für rationales Enzymdesign sind deshalb stark eingeschränkt.<sup>[10]</sup> Darüber hinaus sind bislang keine essenziellen Strukturmerkmale für die Unterscheidung von *C*- und *O*-



**Schema 1.** Vorgeschlagene Mechanismen der enzymatischen *C*-Glykosylierung.<sup>[7b]</sup> hier gezeigt für die untersuchte Glukosylierung von Phlorizin durch CGT (grün). *C*-Glykosylierung im Wege einer *O/C*-Umlagerung beinhaltet zunächst *O*-Glykosylierung, wie durch OGT (orange) katalysiert. Aktivierung des phenolischen Akzeptors durch ein konserviertes Histidin ist essenziell für CGT als auch OGT.

Glykosyltransferasen bekannt. Eine bedeutsame Publikation von Bechthold und Kollegen zeigte kürzlich die Übertragung von glykosidischer Bindungsspezifität von einer bakteriellen CGT auf eine strukturell und funktionell homologe OGT.<sup>[11]</sup> Hierfür war es notwendig, umfangreiche Bibliotheken von OGT-Chimären durch Einbringen unterschiedlicher Sequenzelemente der nativen CGT<sup>[12]</sup> in OGT zu erzeugen. Dies ermöglichte letztlich einen vollständigen Spezifitätswechsel von OGT zu CGT. Eine Strukturmodellierung erbrachte Hinweise, dass die essenziellen Austausche von Aminosäuren vor allem in hochflexiblen Schleifen um das aktive Zentrum der neu geschaffenen CGT lokalisiert sein sollten. Da jedoch relativ viele Reste ( $\geq 10$ ) ausgetauscht werden mussten, um die gewünschte Spezifitätsänderung zu erreichen, blieb eine

[\*] A. Gutmann, Prof. Dr. B. Nidetzky  
Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik  
Technische Universität Graz  
Petersgasse 12/1, 8010 Graz (Österreich)  
E-Mail: bernd.nidetzky@tugraz.at

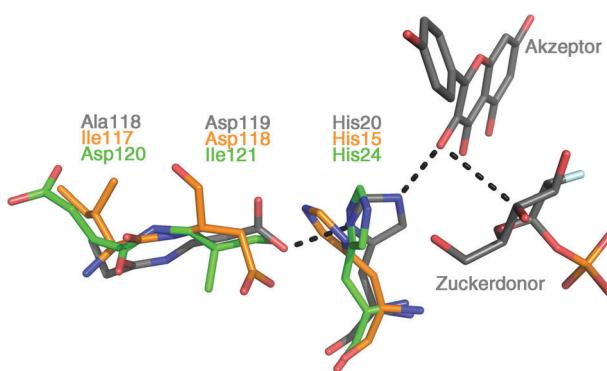
[\*\*] Finanzielle Unterstützung wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (DK Molekulare Enzymologie W901-B05) erhalten. Prof. R. Edwards und Prof. K. Stich haben freundlicherweise die Gene für OsCGT und P<sub>c</sub>OGT bereitgestellt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206141> zu finden.

detaillierte Interpretation auf molekularer Ebene schwierig, und ein allgemeines Prinzip der Spezifität von OGT und CGT konnte nicht abgeleitet werden.

Wir zeigen hier das wechselseitige Übertragen von glykosidischer Bindungsspezifität in einem homologen Paar pflanzlicher OGT und CGT. Beide Enzyme katalysieren den Glkosyltransfer von UDP-Glukose auf das Dihydrochalcon Phloretin, wobei Phlorizin (OGT) und Nothofagin (CGT) als Produkt gebildet werden (Schema 1). Die wichtigsten Strukturmerkmale, welche CGT von OGT unterscheiden, konnten daher in zwei sehr ähnlichen und gut analysierbaren chemischen Reaktionen untersucht werden. Um einen Spezifitätswechsel in beiden GTs zu erreichen, wurde ein minimaler Umbau des aktiven Zentrums basierend auf mechanistischen und strukturellen Überlegungen durchgeführt. Wir zeigen, dass ein Asp, das in pflanzlichen OGTs dazu dient, ein katalytisches His für die Funktion als Brønsted-Base auszurichten (Schema 1, Abbildung 1),<sup>[1b]</sup> eine zentrale Rolle in der OGT-CGT-Umwandlung spielt. Neben praktischen Anwen-

Kristallstruktur. Für VvOGT wurde die Struktur eines ternären Komplexes aus Enzym, inaktivem UDP-Glukose-Analogon, und phenolischem Akzeptor ermittelt.<sup>[13]</sup> Abbildung 1 zeigt die überlagerten Strukturen der beiden modellierten aktiven Zentren von OsCGT und PcoGT sowie die Struktur des aktiven Zentrums von VvOGT. Der Vergleich zeigt, dass die Position des angenommenen katalytischen His in OsCGT und PcoGT sehr ähnlich jener des His in VvOGT ist. Des Weiteren überlagert Asp118 von PcoGT mit dem homologen Asp119 von VvOGT, wobei Asp eine Wasserstoffbrücke zum His bildet. Die hohe Konservierung von Asp und His in pflanzlichen OGT-Sequenzen<sup>[13–16]</sup> weist auf ein katalytisches Konsensusmotiv in O-Glycosyltransferasen hin (siehe die Hintergrundinformationen; Abbildung S1). Umso mehr ist es bemerkenswert, dass OsCGT eine Modifikation in diesem „Asp-His“-Motiv des aktiven Zentrums aufweist (Abbildung 1). Diese Modifikation ergibt sich wahrscheinlich aus einem Austausch von Ile-Asp zu Asp-Ile in der Sequenz von OsCGT (Asp120, Ile121) im Vergleich zu PcoGT (Ile117, Asp118). Es resultiert daraus ein hypothetischer Zusammenhang zwischen Enzymstruktur und katalytischer Funktion als OGT oder CGT. Dieser Zusammenhang wurde durch kombinatorische Mutagenese der Reste der Ile-Asp-Dyade beider Enzyme untersucht (Tabelle 1).



**Abbildung 1.** Überlagerung der modellierten Strukturen von OsCGT (grün) und PcoGT (orange) mit der experimentell bestimmten Struktur des ternären VvOGT-Komplexes (grau; PDB-Nummer: 2C1Z).<sup>[13]</sup> In OsCGT ist die Position des Asp verschoben und die in beiden OGTs vorhandene His-Asp-Dyade dadurch aufgebrochen.

dungen im GT-Engineering haben die hier gezeigten Ergebnisse auch wichtige mechanistische Bedeutung. Sie liefern überzeugende Unterstützung für eine direkte Aryl-C-Glykosylierung nach einem Friedel-Crafts-ähnlichen Mechanismus, während sie nicht im Einklang mit einem alternativen zweistufigen Prozess mit anfänglicher O-Glykosylierung gefolgt von einer stereochemisch kontrollierten Fries-ähnlichen O/C-Umlagerung (Schema 1) sind.<sup>[7b]</sup> Die Art der glykosidischen Bindung scheint durch präzise Positionierung des Akzeptors bestimmt, wobei das konservierte His wahrscheinlich eine maßgebliche Rolle spielt.

Als komplementäres Enzympaar haben wir CGT aus *Oryza sativa* (Reis; OsCGT)<sup>[14]</sup> und OGT aus *Pyrus communis* (Birne; PcoGT)<sup>[15]</sup> ausgewählt. Beide Enzyme gehören zur Familie GT-1 der Glycosyltransferasen. Ihre Aminosäuresequenzen weisen 30% Identität auf. Wir haben OsCGT und PcoGT gegen ihre engsten Verwandten unter den pflanzlichen Vertretern aus der Familie GT-1 modelliert. Das Enzym aus *Vitis vinifera* (VvOGT; Weinrebe) erwies sich dabei als die strukturell ähnlicheste OGT mit aufgeklärter

**Tabelle 1:** Spezifische Aktivitäten von OsCGT und PcoGT in Wildtyp und Mutanten sowie Produktverteilung in den Reaktionen.

Enzym	Mutation	Motiv	Sp. Akt. <sup>[a]</sup> [mU mg <sup>-1</sup> ]	% Glykosid <sup>[a]</sup>		
				3'-C	2'-O	4'-O
PcoGT	–	ID	4300	–	100	–
	I117D <sup>[b]</sup>	DD	>3	<30	>70	–
	D118I <sup>[b]</sup>	II	>0.3	>90	<10	–
	I117D_D118I <sup>[b]</sup>	DI	>0.5	>95	–	–
OsCGT	–	DI	3300	100	–	–
	I121D	DD	3.4	49	43	8
	D120I	II	0.56	83	7	9
	D120I_I121D	ID	0.078	80	9	11

[a] Spezifische Aktivität und Produktverteilung wurden mit HPLC gemessen (100 μM Phloretin, 600 μM UDP-Glukose, pH 7.0). mU = mUnit = nmol min<sup>-1</sup>. [b] Aufgrund schwacher Proteinexpression in *E. coli* war die Menge an verwendbarem Enzym in den Assays limitiert, und die Genauigkeit der Bestimmung auf den angegebenen Bereich begrenzt.

Wir haben native sowie ortsgerichtet mutierte OsCGT und PcoGT in *E. coli*-Kulturen als Fusionsproteine mit N-terminalen Strep-tag II exprimiert (siehe Abbildung S2). Ein empfindlicher HPLC-Assay zur Bestimmung und Quantifizierung der Glykosylierungsprodukte wurde entwickelt, und die Produktidentität wurde NMR-spektroskopisch bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen). OsCGT bildete ausschließlich das 3'-C-Glykosid Nothofagin, wohingegen PcoGT einzig das 2'-O-Glykosid Phlorizin synthetisierte (Schema 1; Tabelle 1). Weiter unten beschriebene OsCGT-Mutanten bildeten ein weiteres Produkt, das als 4'-O-Glykosid identifiziert wurde (Tabelle 1). Der HPLC-Assay wurde zur Aufnahme von Zeitverläufen der Reaktionen von nativen und mutierten Enzymen verwendet (Abbildung S3). Tabel-

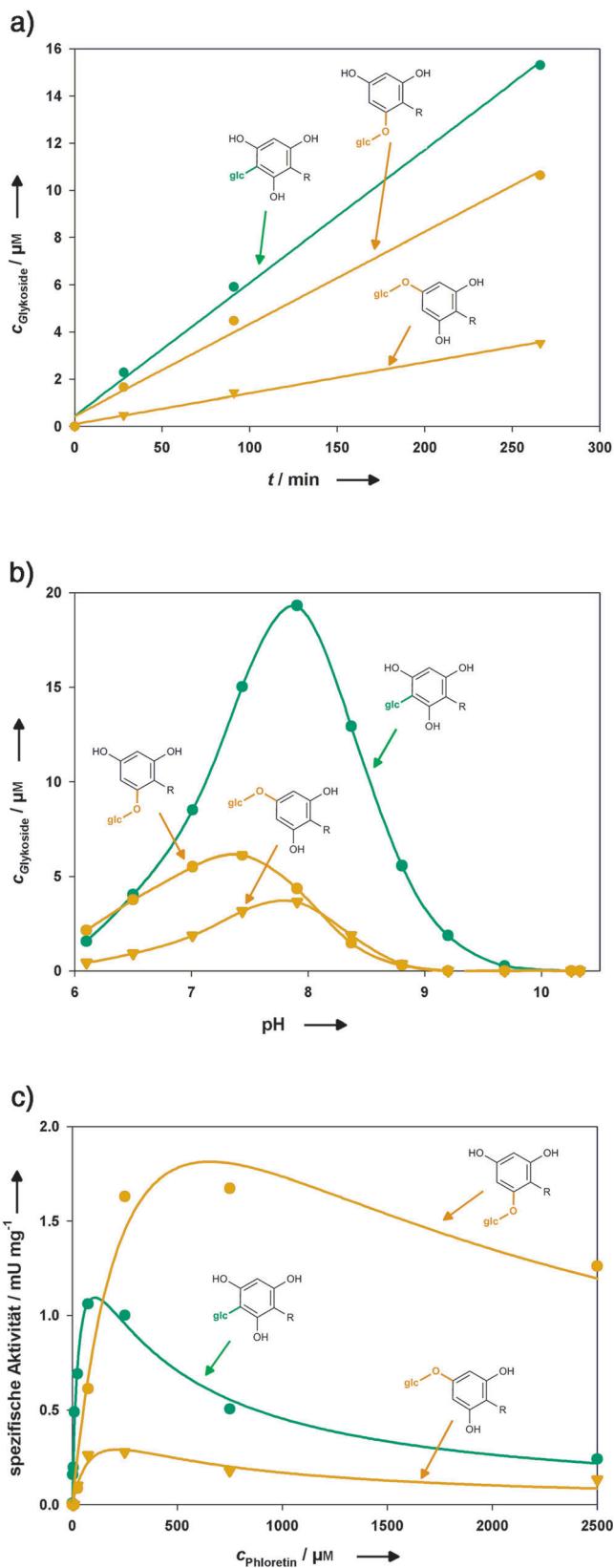
le 1 zeigt die spezifischen Aktivitäten aller verwendeten Enzyme und beschreibt die Produktverteilungen in den Reaktionen. Es ist bekannt, dass einige GTs neben der normalen Umsetzung auch die Hydrolyse des Glykosyldonors in einer schwachen Nebenreaktion katalysieren.<sup>[17]</sup> Mutationen könnten diese „Irrtumshydrolyse“ begünstigen, und wir überprüften deshalb alle Enzyme in Tabelle 1 auf UDP-Freisetzung aus UDP-Glukose in An- und Abwesenheit des Akzeptors Phloretin. In keinem Fall war Hydrolase-Aktivität messbar, wodurch das spezifisch katalytische Verhalten als Glykosyltransferase bestätigt wurde. Tabelle 1 zeigt, dass Mutagenese im Ile-Asp-Motiv von *PcOGT* im Vergleich zum nativen Enzym zu einem erheblichen Verlust an spezifischer Aktivität führte. Dieser Effekt war im Fall von *OsCGT* noch deutlicher ausgeprägt. Modifikationen im entsprechenden Asp-Ile-Motiv verringerten die spezifische Aktivität um mindestens drei Größenordnungen. Ungeachtet der niedrigen Aktivitäten zeigten Mutanten von *PcOGT* und *OsCGT* mit teilweisem oder vollständigem Motivwechsel im aktiven Zentrum jedoch deutliche Veränderungen der Spezifität der glykosidischen Bindungsknüpfung, die beinahe perfekt mit der Hypothese aus Abbildung 1 übereinstimmten. In *PcOGT* ergab sich eine deutlich stärkere Spezifitätsänderung von OGT zu CGT durch die Mutation Asp<sup>118</sup>→Ile (D118I) im Vergleich zu Ile<sup>117</sup>→Asp (I117D). Dies stimmt mit der Annahme überein, dass die His-Asp-Wechselwirkung ein bestimmendes Element der OGT-Aktivität ist, und ihre Unterbindung in D118I sollte daher zu CGT-Aktivität führen. Die Spezifität der I117D-Mutante, die neben OGT geringe CGT-Aktivität zeigte, kann etwa durch eine abgeschwächte His-Asp-Bindung durch Störung durch den eingeführten Asp117-Rest erklärt werden. Die *PcOGT*-Doppelmutante I117D\_D118I weist im aktiven Zentrum einen kompletten Austausch des OGT- gegen das CGT-Motiv auf und verhielt sich als perfekte CGT, die Nothofagin als einziges Produkt bildete.

Die vorgeschlagene Struktur-Funktions-Beziehung von OGT und CGT wurde durch komplementäre Entwicklung von OGT-Aktivität in *OsCGT* bestätigt. Austausch des nativen Ile121 gegen Asp sollte eine OGT-ähnliche Asp-His-Sequenz im aktiven Zentrum ermöglichen. Die resultierende I121D-Mutante ist eine unspezifische *O/C*-Glykosyltransferase, die einen ähnlichen Grad an *O*- und *C*-Glykosylierungsaktivität aufwies. Die OGT-Aktivität war hauptsächlich auf das 2'-OH von Phloretin gerichtet, beinhaltete aber auch das 4'-OH als alternative Glukosylierungsposition. CGT-zu-OGT-Spezifitätswechsel aufgrund der D120I-Mutation in *OsCGT* war nicht identisch, aber im Allgemeinen gut vergleichbar mit dem OGT-zu-CGT-Spezifitätswechsel der D118I-Mutation in *PcOGT*. Die *OsCGT*-D120I-Mutante weist genauso wie die *PcOGT*-D118I-Mutante eine Ile-Ile-Abfolge im aktiven Zentrum auf. Die *O/C*-Glukosidverteilung war in diesen beiden analogen OGT- und CGT-Varianten beinahe identisch mit einer deutlichen Präferenz für *C*-Glykosylierung und nur geringen Mengen an gebildeten *O*-Glukosiden. Diese Spezifitäten sind in vollkommener Übereinstimmung mit den Erwartungen an Enzymvarianten, denen Asp in einer geeigneten Position für katalytische Funktion als OGT fehlt. Interessanterweise unterschied sich

*OsCGT*\_D120I von *PcOGT*\_I118D darin, dass Glykosylierung sowohl an 2'-OH als auch an 4'-OH stattfand, während die *PcOGT*-Mutante vollständig spezifisch für 2'-OH war (Tabelle 1). Der Fall der *OsCGT*-Doppelmutante D120I\_I121D zeigte jedoch Limitierungen unseres einfachen Models in der Vorhersage der Stärke der Spezifitätsänderung durch Aminosäureaustausch im Ile-Asp-Motiv. Während vorwiegend OGT-Aktivität erwartet wurde, verhielt sich die Doppelmutante eher als „fehlerbehaftete“ CGT, die geringe OGT-Nebenaktivität sowohl an 2'-OH als auch 4'-OH aufwies. Es ist bekannt, dass Mutationen im aktiven Zentrum unvorhergesehene Effekte auf die Enzymfunktion haben können, da Strukturänderungen nicht strikt lokal sind, sondern das aktive Zentrum als Ganzes beeinflussen.<sup>[18]</sup> Wir glauben daher, dass die Eigenschaften der D120I\_I121D-Doppelmutante störende Nachbarschaftseffekte im aktiven Zentrum von *OsCGT* widerspiegeln. Die sehr geringe spezifische Aktivität der Mutante ist wahrscheinlich auch ein Ausdruck solch sekundärer Effekte. Ungeachtet dieser nicht ungewöhnlichen Schwierigkeiten zeigen unsere Ergebnisse eindeutig, dass bestimmte Motive des aktiven Zentrums von pflanzlichen GTs gefunden wurden, welche die Funktion als Aryl-OGT oder Aryl-CGT definieren. Die hier präsentierten Ergebnisse schlagen eine unmittelbare Designstrategie für die Modifizierung der Art der glykosidischen Bindungsknüpfung in pflanzlichen GTs vor. Die Umwandlung von nativer OGT- in neu kreierte CGT-Aktivität wäre von speziellem Interesse für die Entwicklung neuer CGT-Katalysatoren.

Wir erkannten, dass eine doppelt spezifische OGT/CGT wie die I121D-Mutante von *OsCGT* hilfreich für die mechanistische Erforschung des enzymatischen *C*-Glykosyltransfers sein könnte. Falls *C*-Glykosylierung die Umlagerung eines zunächst gebildeten *O*-Glykosids beinhaltet (Schema 1), wäre in der Reaktion einer unspezifischen OGT/CGT zu erwarten, dass der relative Anteil von *C*-Glykosid im gesamten Transferprodukt im Lauf der Zeit ansteigt, wodurch die allmähliche Umwandlung des *O*-Glykosids reflektiert würde. Für eine enzymatische Reaktion mit direktem *O*- und *C*-Glykosyltransfer hingegen würde man ein konstantes Verhältnis von *O/C*-Glykosylierungsprodukten erwarten, so lange die Reaktion weitgehend unter Anfangsbedingungen verläuft. Wir haben daher einen Zeitverlauf der *O*- und *C*-Glukosidbildung der I121D-Mutante aufgenommen und zeigen in Abbildung 2a, dass die Konzentration jedes Produkts linear mit der Zeit anstieg. Dies weist auf ein konstantes molares Verhältnis der Glukosyltransferprodukte während der Reaktion hin. Dieselbe Analyse des Zeitverlaufs wurde auch auf alle anderen doppelt spezifischen *O/C*-GTs in Tabelle 1 angewendet. In allen Fällen war die Produktverteilung unbeeinflusst von Reaktionszeit und Grad des Substratumsatzes.

Als Nächstes bestimmten wir die pH-Abhängigkeit der Glykosidbildung durch die I121D-Mutante und zeigen die Resultate in Abbildung 2b. Die pH-Profile von *C*- und *O*-Glykosidsynthese unterschieden sich klar voneinander, und zusätzlich hatte die pH-Veränderung starken Einfluss darauf, welche Hydroxygruppe glukosyliert wurde. Die beobachteten pH-Abhängigkeiten scheinen im Einklang mit dem mechanistischen Vorschlag der direkten *C*-Glykosylierung zu sein.



**Abbildung 2.** Mechanistische Studie von OsCGT\_I121D basierend auf detaillierter kinetischer Analyse der Glukosylierung von Phloretin. Zeit- (a) und pH-Abhängigkeit (b) der Produktbildung; c) Abhängigkeit der spezifischen Produktbildungsgeschwindigkeiten von der eingesetzten Akzeptorkonzentration.

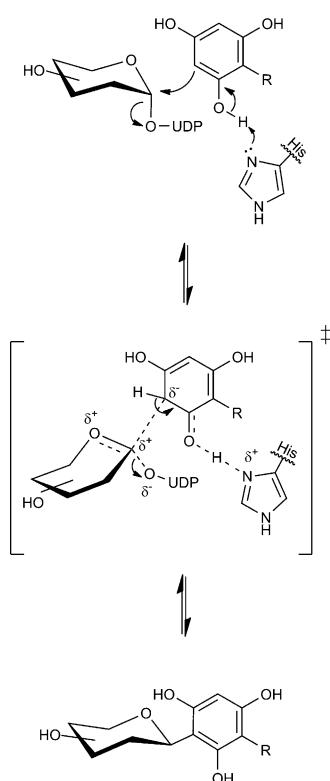
Veränderungen des pH-Werts könnten den bevorzugten Bindemodus zwischen Substrat und Enzym und damit auch die Spezifität der glykosidischen Bindungsknüpfung beeinflussen. Anzumerken ist hierbei, dass Phloretin ( $pK_s$ -Werte: 7.0, 9.4 und 10.5)<sup>[19]</sup> im untersuchten pH-Bereich mehrere Ionisierungszustände aufweist. Es ist schwieriger, die pH-Abhängigkeit mit einem Mechanismus über  $O/C$ -Umlagerung in Einklang zu bringen. Die beinahe vollständige Abwesenheit von  $O$ -Glukosylierung bei hohem pH würde voraussetzen, dass die katalytische Umlagerung wesentlich schneller als die Freisetzung des enzymgebundenen  $O$ -Glykosids geschieht. Eine pH-Senkung müsste dann das Verhältnis zugunsten von Dissoziation des  $O$ -Glykosids verändern. Nichtsdestotrotz bedingt die Beobachtung, dass die  $O$ -Glukosylierung der I121D-Mutante eine pH-abhängige Regioselektivität aufweist, eine unterschiedliche Anlagerung von Phloretin an die Akzeptor-Bindestelle, sodass bei pH 7 oder niedriger die Glukosylierung beinahe ausschließlich an 2'-OH stattfindet, während bei pH 8 oder höher die Reaktivitäten von 2'-OH und 4'-OH beinahe identisch sind.

In einer weiteren kinetischen Analyse der Reaktion der I121D-Mutante wurde der Einfluss der Akzeptorkonzentration auf die Verteilung der Glukosyltransferprodukte untersucht. Abbildung 2c zeigt, dass bei niedrigen Phloretinkonzentrationen die  $C$ -Glukosylierung deutlich überwog. Eine Anhebung der Akzeptorkonzentration hingegen erhöhte die  $O$ -Glukosylierung (hauptsächlich an 2'-OH, aber auch an 4'-OH), so dass sie letztendlich die  $C$ -Glukosylierung überstieg, welche bei hohen Phloretinkonzentrationen abnahm. Eine Datenanalyse zeigte, dass die Phloretin-Halbsättigungskonstante für die Phlorizinbildung ( $K_M = 324 \mu\text{M}$ ) innerhalb der Fehlerrate identisch mit der Phloretin-Inhibierungskonstante für die Nothofaginbildung war (Tabelle S4). Entsprechend dem Parameter  $k_{\text{cat}}/K_M$ , welcher die enzymatische Reaktion unter limitierenden Phloretinkonzentrationen beschreibt, bevorzugt die I121D-Mutante die Nothofaginbildung ungefähr fünfmal über die Phlorizinbildung (Tabelle S4). Die durch Abbildung 2 implizierte direkte Konkurrenz zwischen  $O$ - und  $C$ -Glukosyltransfer in Abhängigkeit der Akzeptorkonzentration ist unerwartet für eine Reaktion über eine  $O/C$ -Glykosidumlagerung, während sie ausgezeichnet mit den Erwartungen für eine direkte  $O$ - und  $C$ -Glykosylierung übereinstimmt.

Schließlich untersuchten wir die Umsetzung von Phlorizin ( $60 \mu\text{M}$ ) zu Nothofagin in Gegenwart von OsCGT\_I121D ( $6.7 \mu\text{M}$ ) und UDP ( $1 \text{ mM}$ ). Es gab keine Reaktion oberhalb der Nachweisgrenze (ca. 1 %), und Phlorizin war  $48 \text{ h}$  stabil. Dieses Ergebnis spricht stark gegen eine katalytische  $O/C$ -Umwandlung im CGT-Mechanismus.

Zusammengefasst ziehen wir den Schluss, dass *PcOGT* und *OsCGT* zwischen 2'-*O*- und 3'-*C*-Glukosylierung von Phloretin hauptsächlich durch die relative Positionierung von Akzeptor und Zuckerdonor unterscheiden. Teilweise Deprotonierung von Phloretin am 2'-OH durch ein konserviertes His stellt dabei ein gemeinsames katalytisches Motiv der beiden enzymatischen Reaktionen dar. Nukleophiler Charakter wird direkt am O<sub>2</sub> und durch Resonanz auch am C3 in *ortho*-Position dazu hervorgerufen (Schema 1). Die *C*-Glykosylierung wird, genauso wie die *O*-Glykosylierung,<sup>[8]</sup> durch

eine einfache nukleophile Substitution am anomeren Kohlenstoffatom erreicht. Solch eine Reaktion kann auch als Friedel-Crafts-ähnliche direkte Alkylierung des phenolischen Akzeptors in einer elektrophilen aromatischen Substitution beschrieben werden. Die nukleophile Substitution beinhaltet wahrscheinlich die Bildung eines Glykosyl-Oxocarbeniumion-ähnlichen Übergangszustands, wobei das positiv geladene anomere Kohlenstoffatom sowohl durch die UDP-Abgangsgruppe als auch durch das angreifende Carbanion, wie in Schema 2 angedeutet, stabilisiert wird. Bechthold und Kollegen haben einen ähnlichen Mechanismus für eine bakterielle CGT<sup>[11]</sup> vorgeschlagen, die strukturell nicht mit OsCGT verwandt ist.



**Schema 2.** Vorgeschlagener Mechanismus der Aryl-C-Glykosylierung durch direkte nukleophile Substitution am anomeren Kohlenstoffatom durch ein aromatisches Carbanion. Der Übergangszustand der Reaktion hat wahrscheinlich Glykosyl-Oxocarbeniumion-Charakter.

Um dieselbe basenkatalytische Funktion des His an einem Akzeptormolekül, das variabel für Reaktion am O2 oder C3 angelagert ist, zu erreichen, scheinen die entsprechenden His in den aktiven Zentren von OGT und CGT in einer unterschiedlichen Mikroumgebung positioniert zu sein (Abbildung 1). Neben sterischen Effekten („Positionierung“) können auch weitere chemische Faktoren, welche die Selektivität von konkurrierender O- und C-Alkylierung von Phenoxid-Ionen beeinflussen (z.B.: Lösungsmittelleigenschaften, Charakter des Übergangszustands), in den einzelnen Enzymen optimiert worden sein.<sup>[20]</sup> Die zentrale Idee dieser Studie, dass kleine Änderungen in der Struktur des aktiven Zentrums die Spezifität der glykosidischen Bindung verändern können, wird durch die Literatur gestützt.<sup>[21]</sup> Durch

Punktmutationen konnte N-Glykosylierungsaktivität in eine OGT eingebracht und auch von einer doppelt spezifischen O/N-Glycosyltransferase entfernt werden. Interessanterweise wurden Strukturänderungen in der His-Asp-Dyade der OGT (Abbildung 1) als Grund für die ungewöhnliche N-Glykosidbildung angesehen.

Wir hoffen, dass hier beschriebene Fortschritte in der Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung und mechanistischen Charakteristika von pflanzlichen CGTs, im Vergleich zu den entsprechenden OGTs, die Entwicklung von neuen CGT-Katalysatoren durch gezielte Umgestaltung des aktiven Zentrums der zahlreichen O-Glycosyltransferasen stimulieren werden.

Eingegangen am 31. Juli 2012  
Online veröffentlicht am 14. November 2012

**Stichwörter:** C-Glycoside · Enzymmechanismen · Glycosyltransferasen · Naturstoffe · Protein-Engineering

- [1] a) C. J. Thibodeaux, C. E. Melancon III, H. W. Liu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9960–10007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9814–9859; b) X. Q. Wang, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 3303–3309.
- [2] B. R. Griffith, J. M. Langenhan, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 622–630.
- [3] G. J. Williams, R. W. Gantt, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 556–564.
- [4] a) R. W. Gantt, R. D. Goff, G. J. Williams, J. S. Thorson, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9021–9024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8889–8892; b) G. J. Williams, C. Zhang, J. S. Thorson, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 657–662.
- [5] C. J. Thibodeaux, C. E. Melancon, H. W. Liu, *Nature* **2007**, *446*, 1008–1016.
- [6] T. Bililign, C. G. Hyun, J. S. Williams, A. M. Czisny, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 959–969.
- [7] a) J. Lee, S. H. Lee, H. J. Seo, E. J. Son, S. H. Lee, M. E. Jung, M. Lee, H. K. Han, J. Kim, J. Kang, J. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2178–2194; b) C. Dürr, D. Hoffmeister, S. E. Wohlfert, K. Ichinose, M. Weber, U. von Mulert, J. S. Thorson, A. Bechthold, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3022–3025; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2962–2965.
- [8] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555.
- [9] M. A. Fischbach, H. N. Lin, D. R. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 571–576.
- [10] T. Bililign, B. R. Griffith, J. S. Thorson, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 742–760.
- [11] J. Härlé, S. Gunther, B. Lauinger, M. Weber, B. Kammerer, D. L. Zechel, A. Luzhetsky, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 520–530.
- [12] M. Mittler, A. Bechthold, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 67–76.
- [13] W. Offen, C. Martinez-Fleites, M. Yang, E. Kiat-Lim, B. G. Davis, C. A. Tarling, C. M. Ford, D. J. Bowles, G. J. Davies, *EMBO J.* **2006**, *25*, 1396–1405.
- [14] M. Brazier-Hicks, K. M. Evans, M. C. Gershater, H. Puschmann, P. G. Steel, R. Edwards, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17926–17934.
- [15] C. Gosch, H. Halbwirth, B. Schneider, D. Holscher, K. Stich, *Plant Sci.* **2010**, *178*, 299–306.
- [16] a) L. N. Li, L. V. Modolo, L. L. Escamilla-Trevino, L. Achtnine, R. A. Dixon, X. Q. Wang, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 951–963; b) L. V. Modolo, L. N. Li, H. Y. Pan, J. W. Blount, R. A. Dixon, X. Q. Wang, *J. Mol. Biol.* **2009**, *392*, 1292–1302; c) H. Shao,

- X. Z. He, L. Achnine, J. W. Blount, R. A. Dixon, X. Q. Wang, *Plant Cell* **2005**, *17*, 3141–3154.
- [17] G. Sugiarto, K. Lau, J. Qu, Y. Li, S. Lim, S. Mu, J. B. Ames, A. J. Fisher, X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1232–1240.
- [18] N. Tokuriki, D. S. Tawfik, *Science* **2009**, *324*, 203–207.
- [19] C. Valenta, J. Cladera, P. O'Shea, J. Hadgraft, *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 485–492.
- [20] R. Breslow, K. Groves, M. U. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3622–3635, zit. Lit.
- [21] M. Brazier-Hicks, W. A. Offen, M. C. Gershater, T. J. Revett, E. K. Lim, D. J. Bowles, G. J. Davies, R. Edwards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20238–20243.
-