

Eliminierungsreaktionen von Estern in der Biosynthese von Polyketiden und ribosomalen Peptiden**

Bartłomiej Krawczyk, Eric F. van Herwerden, Herman S. Overkleeft und Roderich D. Süssmuth*

Antibiotika · Biosynthese · Eliminierungen ·
Lantipeptide · Polyketide

In vielen Naturstoffen kommen C-C-Doppelbindungen vor, für deren Synthese die Natur eine Reihe chemischer Transformationen bereitstellt, aus denen sich eine Vielfalt von Alkenen und Alken-abgeleiteten funktionellen Gruppen ergibt. Mithilfe einer oxidativen Decarboxylierung eines C-terminalen Cysteinrests wird beispielsweise die seltene Aminosäure Aminovinylcystein (AviCys) gebildet, die in einigen Lantipeptiden gefunden wird.^[1] Die formale, von verschiedenen Dehydrogenasen katalysierte Abstraktion von H₂ aus einer gesättigten C-C-Bindung ist unter anderem einer der Hauptbiosynthesewege zur Einführung von Doppelbindungen in Fettsäuren.^[2] Die wohl am weitesten verbreitete chemische Transformation zur Einführung einer C-C-Doppelbindung ist jedoch die formale Eliminierung von Wasser aus einer β -Hydroxycarbonylverbindung. In der Fettsäurebiosynthese ist die β -Eliminierung von Wasser ein entscheidender Zwischenschritt in jedem der aufeinanderfolgenden C₂-Verlängerungsschritte. Malonat als Monothioester wird zunächst mit einem weiteren Thioester zu einem Keton kondensiert, das zum entsprechenden β -Hydroxythioester reduziert wird. Der Deprotonierung am α -Kohlenstoffatom folgt die Abspaltung durch Eliminierung der Hydroxygruppe unter Bildung der C-C-Doppelbindung. Diese wird üblicherweise zur Einfachbindung reduziert, um das System für eine weitere Kettenverlängerung vorzubereiten. Derselbe Mechanismus wird grundsätzlich auch beim Polyketid-Biosyntheseweg angetroffen, der in vielen Mikroorganismen bei der Synthese von Sekundärmetaboliten vorkommt.^[3] Die strukturelle Diversität der Polyketide resultiert nicht nur aus der Verwendung unterschiedlicher α -monosubstituierter Malonate zusätzlich zu Malonat selbst, sondern auch aus dem partiellen oder vollständigen Durchlaufen eines Zyklus aus

Ketoreduktion der β -Carbonylgruppe mithilfe einer Ketoreduktase (KR), gefolgt von einer Dehydratase (DH)-vermittelten β -Eliminierung und einer Enoylreduktase (ER)-katalysierten Hydrierung.^[2]

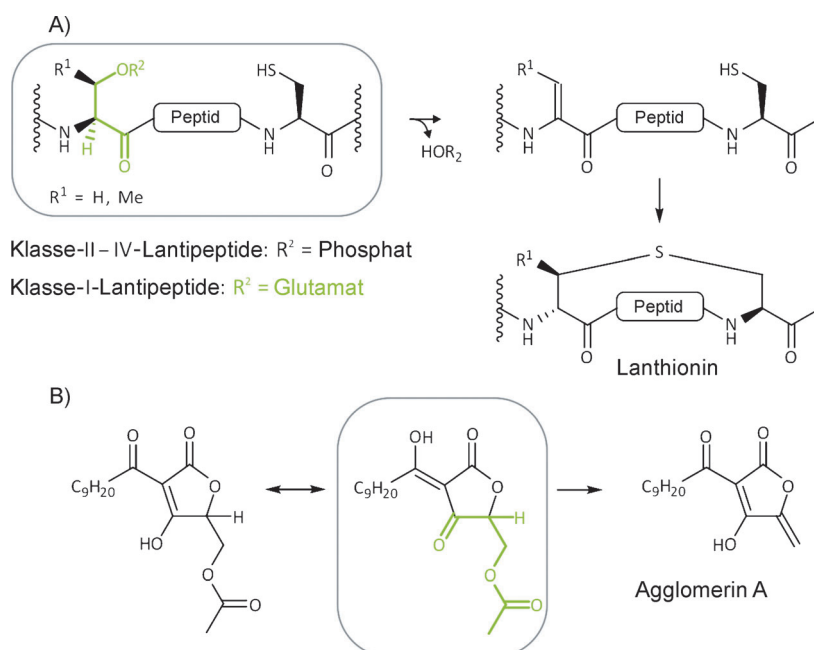
Die β -Eliminierung zu α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen ist ein bedeutender Bestandteil der Biosynthesen zahlreicher ribosomal synthetisierter und post-translational modifizierter Peptide (RiPPs).^[4] So enthalten die Lantipeptide, eine wichtige Strukturklasse unter den RiPPs mit beispielsweise antibakteriellen und antiallodynen Eigenschaften, Thioetherbrücken als charakteristische Strukturmerkmale.^[4] Diese als Lanthionin bezeichneten Brückenaminoacids werden durch eine intramolekulare 1,4-Addition einer Cys-Thiolseitenkette an ein 1,2-Didehydroalanin (Dha) oder 1,2-Didehydrobutyrin (Dhb) gebildet. Dha und Dhb werden über eine formale Dehydratisierung von Ser bzw. Thr synthetisiert, d. h. aus zwei proteinogenen Aminosäuren, die ein β -Hydroxycarbonylmotiv tragen. In Analogie zur Fettsäure- und zur Polyketidbiosynthese würde die β -Eliminierung einer Hydroxygruppe zum gewünschten Intermediat führen. Tatsächlich hat sich in der Natur aber eine abweichende Abgangsgruppenstrategie entwickelt: Die Abgangsgruppe der Wahl bei einer Vielzahl biochemischer Reaktionen ist Phosphat (z. B. Phosphatmonoester, Pyrophosphate). Da die Aminosäuren Ser und Thr häufig durch Kinasen phosphoryliert werden, ist es folgerichtig, Phosphoserin (pSer) und Phosphothreonin (pThr) als Intermediate der Bildung der Lanthionine anzunehmen (Schema 1 A). Dies ist tatsächlich der Fall für die Lantipeptide der Klassen II und IV^[5–7] und wurde auch für Klasse-III-Lantipeptide bestätigt.^[8,9]

Im Unterschied dazu blieben die Vorgänge bei der Dehydratisierung von Ser/Thr des Vorläuferpeptids des wohl bekanntesten Klasse-I-Lantipeptids – Nisin – viele Jahre ungeklärt. Kürzlich kam die Gruppe von van der Donk der Lösung dieses Problems ein großes Stück näher, indem sie zeigte, dass die Natur als Abgangsgruppe sehr wahrscheinlich eine Esterfunktion verwendet, die aus einem primären oder sekundären Alkohol und einer Carboxygruppe der Glutaminsäure aufgebaut wird.^[10] Bei einer In-vitro-Untersuchung der Dehydratase NisB in Gegenwart von ATP, Mg²⁺ und der *E.-coli*-Membranfraktion wurde gefunden, dass im Vorläuferpeptid Dha und Dhb nur dann gebildet werden, wenn Glu zugegeben wurde. Diese Beobachtung ist auch

[*] Dr. B. Krawczyk, E. F. van Herwerden, Prof. Dr. R. D. Süssmuth
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: suessmuth@chem.tu-berlin.de

Prof. Dr. H. S. Overkleeft
Leiden Institute of Chemistry, Leiden University
Einsteinweg 55, 2300 RA Leiden (Niederlande)

[**] H.S.O. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für den Friedrich Wilhelm Bessel Forschungspreis. Die Arbeit wurde von Exzellenzcluster UniCat (DFG) gefördert.



Schema 1. A) Glutamatester der Biosynthese von Klasse-I-Lantipeptiden. B) β -Eliminierung von Acetat als Schlüsselschritt der Agglomerin-A-Biosynthese.

deshalb bedeutend, weil NisB-homologe Proteine auch an der Dehydratisierung von anderen Naturstoffen, z. B. Thiopeptiden und linearen Azol-haltigen Peptiden (LAPs), beteiligt sind. Der exakte Mechanismus, mit dem die vermuteten Ser/Thr-Glu-Ester gebildet werden, ist allerdings noch unklar, und zukünftige Arbeiten werden zeigen müssen, ob ein α - oder γ -Glu-Carboxylat gebildet wird.^[11,12]

Für die Entwicklung von Laborsynthesen der Lantipeptide wie auch vieler anderer Naturstoffe weist oft die Natur den Weg. In den vergangenen Jahrzehnten ist eine Vielzahl von Abgangsgruppen zur präparativen Einführung von Dha oder Dhb untersucht worden, die jeweils entweder das Produkt oder das Intermediat für eine nachfolgende 1,4-Addition der Cys-Thiolseitenkette waren. Unter den verwendeten Abgangsgruppen an Ser und Thr waren Mesylate, Isoharnstoffe und Carbonate,^[13] aber auch ungewöhnlichere Einheiten, wie das Trimethylammonium-Salz der Diaminopropionsäure (Dap).^[14] In verwandten Strategien wurde ein effizienter Zugang zu Dha durch Methylierung der Seitenkette von Cystein oder Selenocystein (Sec), gefolgt von oxidativer Eliminierung, eröffnet.^[15] Es ist wohl nicht verwunderlich, dass Phosphatester- genau wie Carbonsäureester-Abgangsgruppen, die in der Natur Verwendung finden, nicht Eingang in das gewöhnliche Repertoire von Synthesestrategien gefunden haben.

Im Rahmen der Biosynthese des mehrfach ungesättigten Furanrings des Tetransäureantibiotikums Agglomerin berichteten Leadlay und Mitarbeiter kürzlich über eine mechanistisch verwandte formale Eliminierungsreaktion (Schema 1B).^[16] Auch hier zeigte die In-vitro-Untersuchung mit gereinigten Enzymen, dass in einem ersten Acetyl-CoA-abhängigen Schritt das Enzym Agg4 die Hydroxygruppe acetyliert. Im darauffolgenden Schritt, der durch Agg5 kataly-

siert wird, wird vermutlich das acide α -Proton des konjugierten Systems abstrahiert und die Acetylgruppe freigesetzt. Diese natürliche Strategie dürfte sich wegen ihrer Einfachheit auch für die Laborsynthese von Agglomerin und verwandten Metaboliten eignen. Interessanterweise sind seit der frühen Synthese von Furanon durch eine Hoffmann-Eliminierung aus Dap^[17] keine weiteren neuen Synthesemethoden bekannt geworden sind.

Die beiden oben genannten Entdeckungen zeigen, dass die Palette der Eliminierungsreaktionen, bei denen Enoylverbindungen entweder als Intermediate oder als Endprodukte in Naturstoffen auftreten, größer zu sein scheint als bisher angenommen. Dies ist insofern bedeutend, als bei der In-vitro-Rekonstitution von Enzymen das Ausbleiben der Reaktion viel eher durch das Fehlen wichtiger Komponenten verursacht werden kann als durch andere Faktoren, wie Proteinfaltung. Aus diesem Grund ist es klug, bei solchen Experimenten außer dem Enzym und den üblichen Cofaktoren auch andere, weniger offensichtliche Cosubstrate oder Komponenten zuzugeben. Bei der Naturstoffsynthese ist die Natur nach wie vor eine wichtige Quelle der Inspiration, nicht nur für interessante Leitstrukturen, sondern auch für deren Synthese. Abschließend ist anzumerken, dass die hier beschriebenen Eliminierungsbeispiele entweder zu Intermediaten (Nisin) oder zu Endprodukten (Nisin, Agglomerin) führen – da die Natur aber effizient in der Nutzung ihrer Ressourcen ist, könnte auch das Furanonmotiv des Agglomerins nicht nur ein Endprodukt, sondern auch das Intermediat auf dem Weg hin zu einer 1,4-Addition sein, was der Reaktion ähnelt, die zu Lanthionin der Klasse-I/II/IV-Lantipeptide (Thioladdition an Dha/Dhb) oder zur komplexen Triaminotrisäure (Labionin) in Labyrinthopeptin der Klasse-III-Lantipeptide (Enolataddition an Dha/Dhb) führt.^[18]

Eingegangen am 5. Juni 2013
Online veröffentlicht am 9. August 2013

- [1] T. Kupke, C. Kempter, V. Gnau, G. Jung, F. Götz, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 5653–5659.
- [2] R. H. Garrett, C. M. Grisham, *Biochemistry* Cengage Learning **2007**.
- [3] T. A. M. Gulder, M. F. Freeman, J. Piel, *Top. Curr. Chem.* **2013**, DOI: 10.1007/128_2010_113.
- [4] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, P. D. Cotter, D. J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P. C. Dorrestein, K.-D. Entian, M. A. Fischbach, J. S. Garavelli, U. Goeransson, C. W. Gruber, D. H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A. R. Horswill, M. Jaspars, W. L. Kelly, J. P. Klinman, O. P. Kuipers, A. J. Link, W. Liu, M. A. Marahiel, D. A. Mitchell, G. N. Moll, B. S. Moore, R. Müller, S. K. Nair, I. F. Nes, G. E. Norris, B. M. Olivera, H. Onaka, M. L. Patchett, J. Piel, M. J. T. Reaney, S. Rebuffat, R. P. Ross, H.-G. Sahl, E. W. Schmidt, M. E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R. D. Süssmuth, J. R. Tagg, G.-L. Tang, A. W. Truman, J. C. Vederas, C. T. Walsh, J. D. Walton, S. C. Wenzel, J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 108–160.
- [5] C. Chatterjee, L. M. Miller, Y. L. Leung, L. Xie, M. Yi, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15332–15333.
- [6] Y. Goto, B. Li, J. Claesen, Y. Shi, M. J. Bibb, W. A. van der Donk, *PLoS Biol.* **2010**, 8, e1000339.
- [7] Y. Goto, A. Okesli, W. A. van der Donk, *Biochemistry* **2011**, 50, 891–898.
- [8] W. M. Müller, T. Schmiederer, P. Ensle, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2486–2490; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2436–2440.
- [9] B. Krawczyk, P. Ensle, W. M. Müller, R. D. Süssmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9922–9925.
- [10] N. Garg, L. M. A. Salazar-Ocampo, W. A. van der Donk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 7258–7263.
- [11] Acyleliminierung in der Biosynthese von Macrolactonen wurde bereits früher beobachtet: K. P. Bateman, K. Yang, P. Tibault, R. L. White, L. C. Vining, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5335–5338.
- [12] Acetateliminierung bei der Biosynthese von Cys und Met aus Ser/homoSer: C. Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W. H. Freeman, **1979**; S. 825–827.
- [13] a) C. Shin, Y. Yonezawa, M. Takahashi, J. Yoshimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, 54, 1132–1136; b) M. J. Miller, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3131–3132; c) R. Ramesh, K. De, S. Chandrasekaran, *Tetrahedron* **2007**, 63, 10534–10542.
- [14] S. Nomoto, A. Sano, T. Shiba, *Tetrahedron* **1979**, 35, 521–522.
- [15] a) S. Burrage, T. Raynham, M. Bradley, *Tetrahedron* **1998**, 54, 2831–2834; b) K. Hashimoto, M. Sakai, T. Okuno, H. Shirahama, *Chem. Commun.* **1996**, 1139–1140.
- [16] C. Kanchanabancha, W. Tao, H. Hong, Y. Liu, F. Hahn, M. Samborsky, Z. Deng, Y. Sun, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5897–5900; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5785–5788.
- [17] S. V. Ley, M. L. Trudell, D. J. Wadsworth, *Tetrahedron* **1991**, 47, 8285–8296.
- [18] K. Meindl, T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Gühring, L. Vértesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G. M. Sheldrick, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1169–1173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1151–1154.