

Eine enzymatische Domäne für die Erzeugung cyclischer Ether in komplexen Polyketiden**

Petra Pöplau, Sarah Frank, Brandon I. Morinaka und Jörn Piel*

Fünf- oder sechsgliedrige cyclische Ethereinheiten sind Strukturmotive vieler biologisch aktiver Naturstoffe. Beispiele sind die in Abbildung 1A gezeigten Polyketide aus Bakterien und Schwämmen sowie viele Dinoflagellentoxine. Da solche Heterocyclen wichtige pharmakologische Determinanten sind, war das Verständnis, wie cyclische Ether in der Natur^[1] und durch stereoselektive Synthese erzeugt werden, Motivation zahlreicher Arbeiten.^[2] Recht detailliert wurde die Biosynthese von Polyether-Ionophoren untersucht,^[3] die über bemerkenswerte Cyclisierungskaskaden durch freistehende Epoxidhydrolasen maturiert werden. Da diese Enzyme jedoch komplexe Substrate während des Post-Polyketidsynthase(PKS-)Abschnitts der Biosynthese umsetzen, ist ihre Entwicklung zu allgemeineren Hilfsmitteln in der chemoenzymatischen Synthese vermutlich schwierig.

Viele Polyketide, die Produkte einer als *trans*-Acyltransferase (*trans*-AT-PKS)^[4] bezeichneten Gruppe von PKS sind (**1–4**) oder als solche vermutet werden (z.B. **5**), enthalten Etherringe, die wahrscheinlich während der Kettenverlängerung eingeführt werden. *trans*-AT-PKS sind riesige modulare Enzyme, in denen jedes Modul normalerweise die wachsende Polyketidkette mit einem Baustein verlängert. Die minimale Domänenarchitektur besteht aus einer Ketosynthase (KS) für die Kettenverlängerung und einem Acylcarrierprotein (ACP), an das die Acylintermediate über eine Thioestergruppe gebunden sind. Eine optionale weitere Prozessierung während dieser Phase wird durch zusätzliche eventuell im Modul vorhandene Domänen katalysiert. Eine wichtige Eigenschaft von *trans*-AT-PKS ist die große Vielfalt von Modulvarianten als Resultat ungewöhnlicher Domänen und Domänenkombinationen.^[4,5] Zusätzlich zu kanonischen Kettoreduktase(KR)-, Dehydratase(DH)- und Enoylreduktase(ER)-Domänen, die auch in anderen Typ-I-Polyketid- und Fettsäurebiosynthesesystemen vorkommen, sind zahlreiche weitere Domänen bekannt, von denen viele nur schlecht

verstandene Funktionen haben. Ein Merkmal von *trans*-AT-PKS-Modulen, die an gekuppelte Bausteine neben cyclischen Ethereinheiten inkorporieren, ist die Gegenwart einer einzigartigen Domäne, die moderate Proteinhomologie zu DH-Domänen, aber abweichende Motive des aktiven Zentrums aufweist (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen) und in eine eigene phylogenetische Clade fällt (Abbildung S2 der Hintergrundinformationen).^[6] Für diese PKS-Komponente, provisorisch als Pyransynthase(PS)-Domäne bezeichnet,^[6c] wurde eine Ringschlussbildung über Oxakonjugat-Cyclisierung als Teil der in Abbildung 1B gezeigten Reaktionsfolge vorgeschlagen.^[6a,c] Alle bekannten Module dieses Typs haben die gleiche Gesamtarchitektur, was auf eine allgemeine biosynthetische Strategie schließen lässt, über die PKS cyclische und hinsichtlich Ringgröße, Stereochemie und Substitutiomuster diverse Einheiten generieren können.

Zur Untersuchung der Funktion dieser Domänen exprimierten wir die PS des Biosynthesewegs für Pederin (**1**) aus einem bisher nicht kultivierbaren bakteriellen *Pseudomonas*-sp.-Symbionten in *Paederus*-spp.-Kurzflügelkäfern.^[6a,7] **1** ist ein hochwirksames Zytotoxin und blasenbildendes Dermatoxin, das von den Käfern zur chemischen Verteidigung eingesetzt wird.^[8] Für die PS wurde postuliert, dass sie an der Erzeugung der östlichen Tetrahydropyran(THP)-Einheit mit anti-Substitutionsmuster an den α -Positionen der Etherfunktion beteiligt ist.^[6a] Die Domänengrenzen wurden durch Alignment mit anderen Homologen, einschließlich DH-Domänen, bestimmt (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Nach Polymerasenkettenreaktions(PCR)-Amplifizierung und Klonierung in pET29a wurde die PS exprimiert und als C-terminal His₆-markiertes Protein aufgereinigt (Abbildung S3–S5 der Hintergrundinformationen). Als Testsubstrate synthetisierten wir Thioester **6** und **7** sowie Standards für die möglichen Produkte **8** und **9** über die in Schema 1 gezeigten Routen. Diese Verbindungen enthalten *N*-Acetyl-cysteaminthioester(SNAC)-Einheiten als vereinfachte Surrogate der ACP-gebundenen 4'-Phosphopantetheinylthioester in der Polyketidbiosynthese. Die *E*-konfigurierte Doppelbindung des natürlichen Substrats wurde auf Grundlage des Stereospezifitätsmotivs der KR innerhalb desselben Moduls angenommen. Dieses Motiv korreliert normalerweise mit der Olefinkonfiguration nach der Dehydratisierung.^[9] HPLC- (Abbildung 2) und NMR-spektroskopische Analysen zeigten vernachlässigbare spontane Ringbildung der konjugierten Thioester.

Enzymassays wurden durch Inkubation von **6** oder **7** in getrennten Reaktionen mit der exprimierten PS durchgeführt und über HPLC verfolgt. Neue Produktsignale wurden für beide Testreaktionen detektiert, aber nicht in Kontrollen mit

[*] P. Pöplau, S. Frank, Prof. Dr. J. Piel
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Dr. B. I. Morinaka, Prof. Dr. J. Piel
Institut für Mikrobiologie
Eigenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zurich (Schweiz)
E-Mail: jpiel@ethz.ch

[**] Wir danken Roy Meoded für technische Unterstützung bei der Proteinexpression und Andreas Schneider für HPLC-Analysen sowie der EU (BlueGenics an J.P.), der DFG (SFB 642 und PI 430/8-1 an J.P.) und der Alexander von Humboldt-Stiftung (an B.M.).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201307406> zu finden.

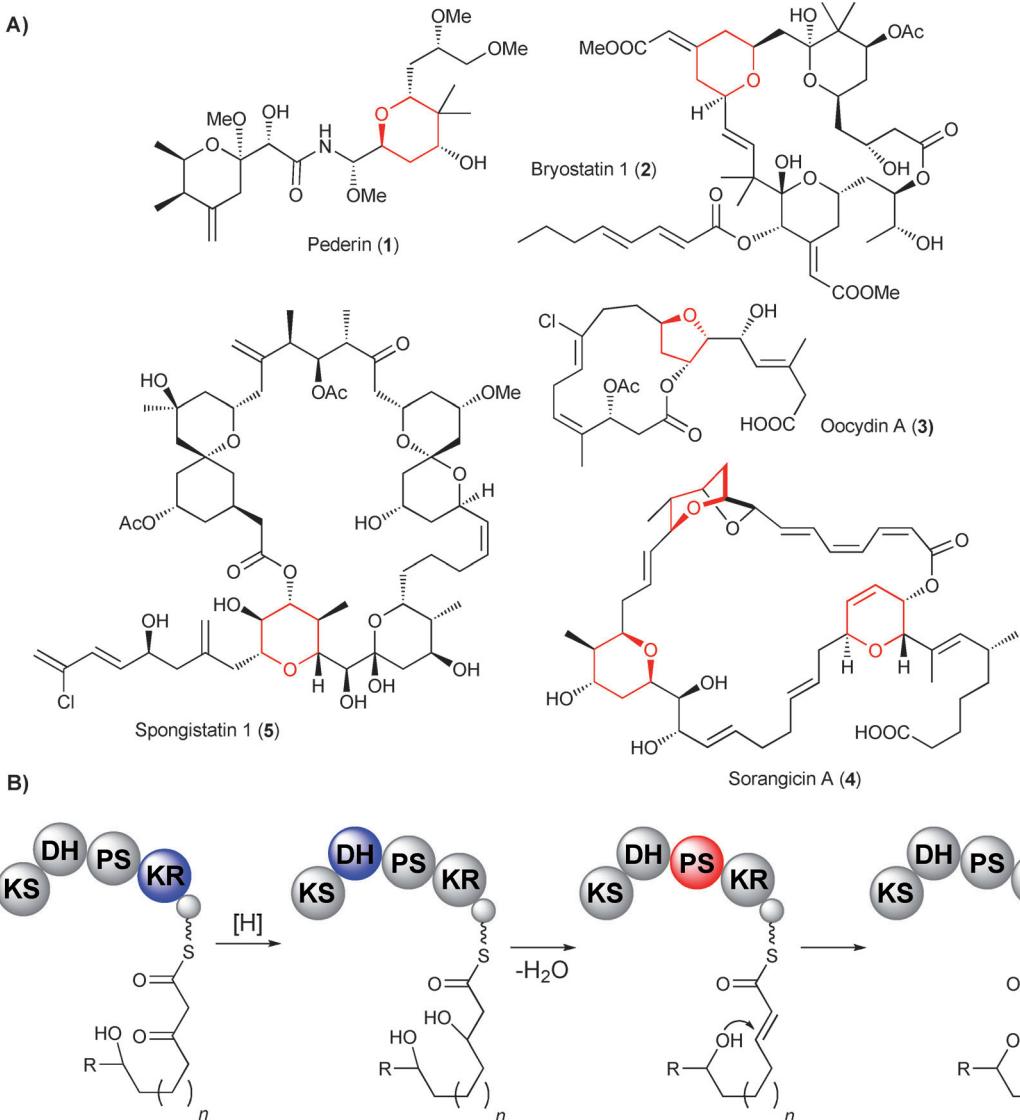


Abbildung 1. Pyransynthasen (PS) und die Polyketid-Heterocyclisierung. A) Ausgewählte Polyketide mit Einheiten (in Rot gezeigt), für die eine Biosynthese durch PS-Domänen vermutet wird. B) Biosynthesemodell für die Erzeugung cyclischer Ether; $n = 0, 1$. Domänen, die auf der jeweiligen Stufe agieren, sind farbig gekennzeichnet.

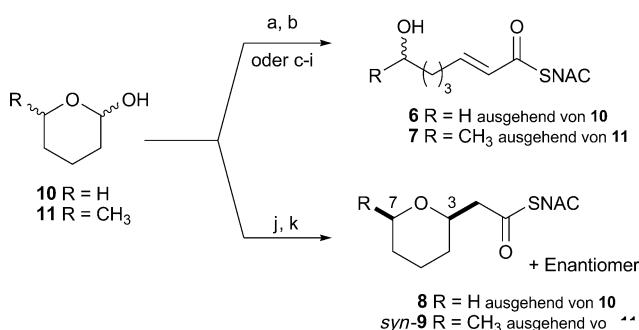
gekochtem Enzym (Abbildung 2), was auf Umsetzung der Substrate hinwies.

Für Testsubstrat **6** mit primärer Alkoholfunktion enthielten HPLC-Profilen ein einziges zusätzliches Signal, während für den sekundären Alkohol **7** zwei neue Signale beobachtet wurden (Abbildung 2B, I und II). Hochauflösende MS-Analyse deutete darauf hin, dass alle neuen Signale zu Substanzen mit identischen Summenformeln wie die der jeweiligen Testsubstrate gehören (für das Produkt von **6**: $m/z = 246.1158$, ber. 246.1158, übereinstimmend mit $C_{11}H_{20}NO_3S$; Produkte von **7**: $m/z = 282.1139$ und 282.1144, ber. 282.1140, übereinstimmend mit $C_{12}H_{21}NO_3SNa$). Die UV-Spektren aller Produkte hatten Maxima, die gegenüber denen der Testsubstrate von 260 und 224 nm nach 230 nm verschoben waren. Diese Daten passten eher zu einer Isomerisierung als Resultat einer konjugierten Addition als zu einer *E/Z*-Isomerisierung. Ein weiterer Hinweis auf einen Ringschluss

waren die mit denjenigen der cyclisierten Standards **8** und **9** (*syn*-Diastereomer nur verfügbar für **9**) identischen HPLC-Retentionszeiten.

Zur detaillierten Charakterisierung wurde die Assayreaktion in präparativem Maßstab für **7** wiederholt, um NMRspektroskopische Analysen durchzuführen. Dies lieferte 6.4 und 8.3 mg Produkt bei früherer (Abbildung 2B, Signal I) bzw. späterer Retentionszeit (Signal II). Spektrale Daten für Signal II waren in Übereinstimmung mit denen des synthetischen Standards *syn*-**9** und Bildung der THP-Einheit. Die NMRspektroskopische Analyse von Signal I war mit dem *anti*-Diastereomer konsistent (NOESY-Kreuzsignal zwischen dem Methyldublett und dem oxygenierten Methin an C3).

Diese Daten warfen Fragen bezüglich stereochemischer Details der Cyclisierung auf. Da der sekundäre Alkohol **7** als racemische Mischung im Assay eingesetzt wurde, könnte die Entstehung zweier Diastereomere die Konsequenz folgender



Schema 1. Synthese von Substraten (**6** und **7**) und möglichen Produkten (**8** und **9**): a) CH₂(CO₂H)₂, Piperidin, Pyridin, über Nacht bei RT → 100°C, 4 h, 43%; b) NAC, EDC-HCl, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0°C → RT, über Nacht, 7%; c) MeMgBr, THF, 0°C auf RT, über Nacht, 69%; d) TBSCl, Imidazol, CH₂Cl₂, RT, über Nacht, quant.; e) HF, Pyridin, THF, RT, über Nacht, 68%; f) Oxalylchlorid, DMSO, CH₂Cl₂, -78°C, 1.15 h, dann Ph₃PCHCO₂Et, NEt₃, RT, über Nacht, 81%; g) LiOH, THF, MeOH, H₂O, RT, über Nacht, 79%; h) NAC, EDC-HCl, HOBT, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0°C → RT, über Nacht, 45%; i) HF, Pyridin, THF, RT, 6 h, 68%; j) CH₂(CO₂H)₂, Piperidin, AcOH, DMSO, RT → 100°C, 4.5 h, 71% (R=H), 75% (R=CH₃); k) NAC, EDC-HCl, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0°C → RT, über Nacht, 68% (**8**), 53% (**9**). 4-DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, EDC-HCl = N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, HOBT = N-Hydroxybenzotriazol, NAC = N-Acetyl cysteamin, TBSCl = *tert*-Butyldimethylsilylchlorid.

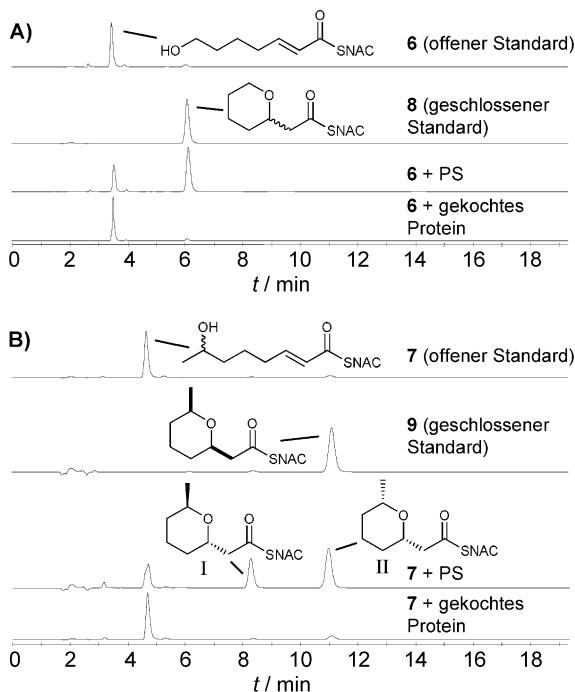


Abbildung 2. HPLC-Analyse der PS-katalysierten Reaktion. A) Assays mit dem primären Alkohol **6**. Die oberen beiden Profile sind Messungen mit den Standards, die unteren beiden sind Analysen der Assaymischung und der negative Kontrolle. B) Assays mit dem sekundären Alkohol **7**. Die Reihenfolge der Profile ist wie für (A).

Szenarien sein: 1) hoher Substrat-, aber niedriger Produktselektivität der PS, 2) niedriger Substrat-, aber hoher Produktselektivität oder 3) insgesamt niedrigere Selektivität. Situation (1) würde zwei angereicherte Enantiomere mit der gleichen Konfiguration an C7 des THP-Rings liefern, (2) zwei

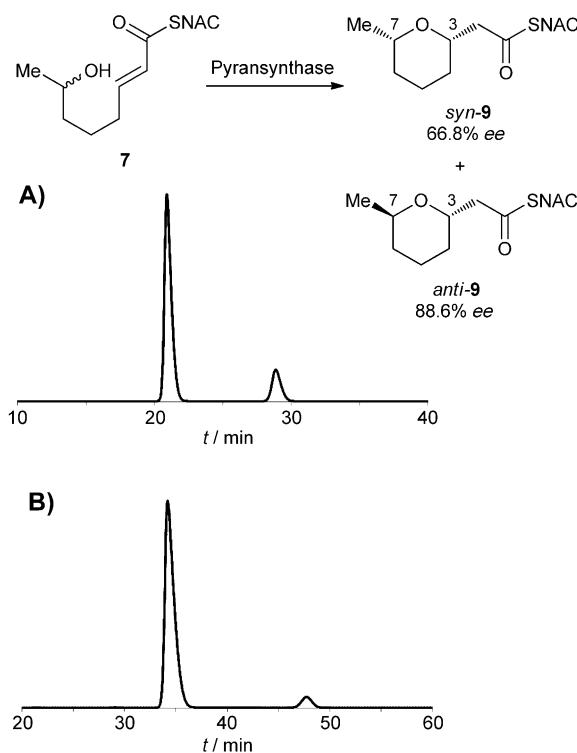


Abbildung 3. Produkte der Pyransynthase und chirale HPLC-Analyse (Phenomenex, Amylose-2, 10% *i*PrOH/Hexan) der Produkte. A) Chromatogramm der HPLC an chiraler Phase für **syn-9**. B) Chromatogramm der HPLC an chiraler Phase für **anti-9**.

angereicherte Diastereomere mit der gleichen C3-Konfiguration und (3) Mischungen mit signifikanten Anteilen aller vier Diastereomere. Für die Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten wurden die gereinigten *syn*- und *anti*-Thioester der Signale I und II über HPLC an chiraler Phase analysiert (Phenomenex, Lux Amylose-2, Abbildung 3). In beiden Fällen wurden zwei Isomere beobachtet, bei denen ein Enantiomer mit einem ee-Wert von 88.6% für das *anti*- und von 66.8% für das *syn*-Enantiomerengemisch dominierte, was gegen Szenario (3) sprach. Um die absolute Konfiguration der Produkte zu bestimmen, wurden Substanzen aus den Fraktionen, die zu den Signalen I und II gehören, in die entsprechenden Carbonsäuren umgewandelt, für die es publizierte optische Drehwerte gibt.^[4,5] Diese Analyse (siehe Hintergrundinformationen) zeigte, dass das Hauptenantioner beider Signale die 3*S*-Konfiguration an der neu gebildeten C-O-Bindung hat, in Übereinstimmung mit der *S*-Konfiguration von C14 in Pederin. Die Daten lassen daher darauf schließen, dass die Pederin-PS geringe Spezifität für die C7-Konfiguration und Art des dort vorhandenen Substituenten aufweist, aber den Ring stereoselektiv schließt.

Zusammenfassend zeigen wir eine Oxakonjugat-Addition als neuen Reaktionstyp während der Kettenverlängerung, katalysiert durch eine hierfür spezialisierte PKS-Domäne. Diese Reaktion ist wahrscheinlich relevant für die Biosynthese vieler weiterer bioaktiver Naturstoffe aus Bakterien und Invertebratenquellen. Zusätzlich zu nicht charakterisierten Transformationen, bei denen PS-Domänen offenbar keine Rolle spielen,^[10] sind nachgewiesene Beispiele Ether-

bildender Enzyme in Polyketidrouten die Epoxidhydrolasen,^[3] Chalconisomerasen,^[11] Nonactat-Synthase^[12] und die an der Aureothinbiosynthese beteiligte P450-Monooxygenase.^[13] Dies sind isolierte, mit PS evolutiv nicht verwandte Enzyme, die nach Bildung der Polyketidkette zu agieren scheinen. Unsere Daten lassen vermuten, dass – im Unterschied zu den meisten dieser Enzyme – PS-Domänen sowohl minimalistische als auch komplexe Vorstufen mit diversen Substitutionsmustern zu einer breiten Palette fünf- und sechsgliedriger Produkte umsetzen. Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass die Pederin-PS keine anderen PKS-Komponenten für In-vitro-Aktivität benötigt, liefern ein vielversprechendes Hilfsmittel für die chemoenzymatische Synthese stereochemisch definierter oxacyclischer Produkte. Derzeitige Studien zur Substrattoleranz und zum Mechanismus zielen darauf ab, weitere Einblicke in das präparative Potenzial und die biosynthetische Vielfalt von PSs zu erhalten.

Eingegangen am 22. August 2013
Online veröffentlicht am 4. November 2013

Stichwörter: Biosynthese · Cyclische Ether · Enzyme · Naturstoffe · Polyketide

- [1] P. Domínguez de María, R. W. van Gemert, A. J. J. Straathof, U. Hanefeld, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 370.
- [2] a) T. Nakata, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1955; b) M. Sasaki, H. Fuwa, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 401; c) H. Fuwa, *Heterocycles* **2012**, *85*, 1255; d) P. A. Clarke, S. Santos, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2045.
- [3] a) Z. A. Hughes-Thomas, C. B. Stark, I. U. Bohm, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4613; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4475; b) M. Oliynyk, C. B. Stark, A. Bhatt, M. A. Jones, Z. A. Hughes-Thomas, C. Wilkinson, Z. Oliynyk, Y. Demydchuk, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 1179; c) A. Bhatt, C. B. Stark, B. M. Harvey, A. R. Gallimore, Y. A. Demydchuk, J. B. Spencer, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7237; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7075; d) A. R. Gallimore, C. B. Stark, A. Bhatt, B. M. Harvey, Y. Demydchuk, V. Bolanos-Garcia, D. J. Fowler, J. Staunton, P. F. Leadlay, J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 453; e) K. Sato, A. Minami, T. Ose, H. Oguri, H. Oikawa, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5277; f) B. M. Harvey, T. Mironenko, Y. Sun, H. Hong, Z. Deng, P. F. Leadlay, K. J. Weissman, S. F. Haydock, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 703; g) Y. H. Sun, X. F. Zhou, H. Dong, G. Q. Tu, M. Wang, B. F. Wang, Z. X. Deng, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 431; h) C. Y. Jiang, H. G. Wang, Q. J. Kang, J. Liu, L. Q. Bai, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 994; i) M. E. Turkovich, P. A. Tyarakis, H. Hong, Y. H. Sun, M. Samborskyy, K. Kamiya, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 66; j) Y. Shichijo, A. Migita, H. Oguri, M. Watanabe, T. Tokiwano, K. Watanabe, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12230; k) A. Migita, M. Watanabe, Y. Hirose, K. Watanabe, T. Tokiwano, H. Kinashi, H. Oikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 169; l) Y. Matsuura, Y. Shichijo, A. Minami, A. Migita, H. Oguri, M. Watanabe, T. Tokiwano, K. Watanabe, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2226; m) A. Minami, A. Migita, D. Inada, K. Hotta, K. Watanabe, H. Oguri, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1638; n) K. Hotta, X. Chen, R. S. Paton, A. Minami, H. Li, K. Swaminathan, I. I. Matthews, K. Watanabe, H. Oikawa, K. N. Houk, C. Y. Kim, *Nature* **2012**, *483*, 355; o) A. Minami, M. Shimaya, G. Suzuki, A. Migita, S. S. Shinde, K. Sato, K. Watanabe, T. Tamura, H. Oguri, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246; p) L. Smith, H. Hong, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2967; q) M. Tosin, L. Smith, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12136; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11930.
- [4] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 996.
- [5] T. A. M. Gulder, M. F. Freeman, J. Piel, *Top. Curr. Chem.* **2011**, DOI: 10.1007/128 2010 113.
- [6] a) J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14002; b) H. Irschik, M. Kopp, K. J. Weissman, K. Buntin, J. Piel, R. Müller, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1840; c) S. Sudek, N. B. Lopanik, L. E. Waggoner, M. Hildebrand, C. Anderson, H. B. Liu, A. Patel, D. H. Sherman, M. G. Haygood, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 67; d) M. A. Matilla, H. Stockmann, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 39125.
- [7] a) R. L. L. Kellner, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *32*, 389; b) J. Piel, D. Butzke, N. Fusetani, D. Q. Hui, M. Platzer, G. P. Wen, S. Matsunaga, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 472.
- [8] a) R. Narquian, P. J. Kocienski in *The role of natural products in drug discovery*, Vol. 32 (Hrsg.: R. Mulzer, R. Bohlmann), Springer, Heidelberg, **2000**, S. 25; b) R. L. L. Kellner, K. Dettner, *Oecologia* **1996**, *107*, 293.
- [9] a) P. Caffrey, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1060; b) A. P. Siskos, A. Baerga-Ortiz, S. Bali, V. Stein, H. Mamdani, D. Spiteller, B. Popovic, J. B. Spencer, J. Staunton, K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1145; c) J. T. Zheng, C. A. Taylor, S. K. Piascicki, A. T. Keatinge-Clay, *Structure* **2010**, *18*, 913.
- [10] S. C. Wenzel, H. B. Bode, I. Kochems, R. Müller, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2711.
- [11] M. N. Ngaki, G. V. Louie, R. N. Philippe, G. Manning, F. Pojer, M. E. Bowman, L. Li, E. Larsen, E. S. Wurtele, J. P. Noel, *Nature* **2012**, *485*, 530.
- [12] A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1662.
- [13] J. He, M. Müller, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16742.