

Natürliche 1,3-dipolare Cycloadditionen

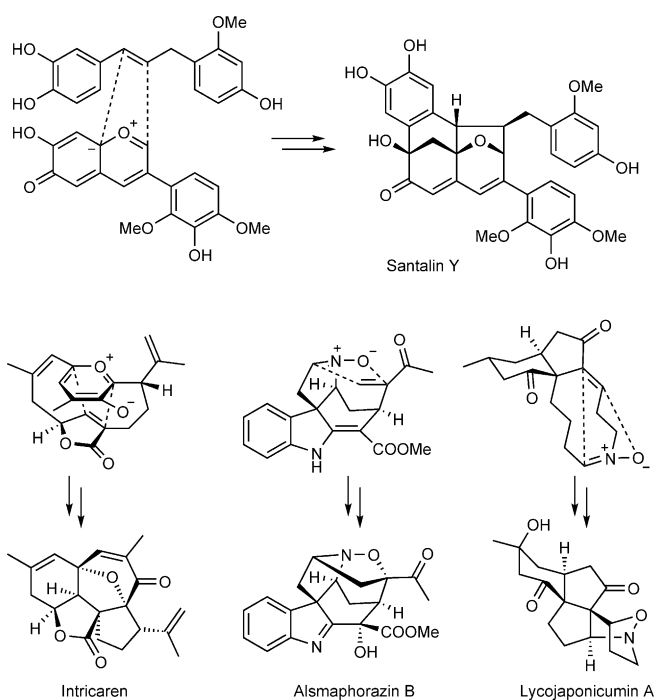
Martin Baunach und Christian Hertweck*

[3+2]-Cycloadditionen · Decarboxylierung · Flavin-Koenzym · Prenyltransferase · Ubichinon-Biosynthese

Enzymkatalysierte Reaktionen dienen oft als Inspirationsquelle für organische Chemiker. Dennoch gibt es zahlreiche bewährte Syntheseprotokolle, für die noch kein enzymatisches Gegenstück gefunden wurde. Jahrzehntelange Bemühungen auf der Suche nach enzymatischen Cycloadditionen gipfelten schließlich in der Entdeckung natürlicher und künstlicher Diels-Alderasen.^[1] Im Gegensatz zu den in der Biosynthese von Naturstoffen weitverbreiteten [4+2]-Cycloadditionen war bisher wenig über ihre [3+2]-Entsprechungen bekannt, die wertvolle Werkzeuge in der organischen Synthese darstellen. Dennoch legen verschiedene Strukturen von Naturstoffen nahe, dass 1,3-dipolare Cycloadditionen an Biosynthesewegen beteiligt sind (Schema 1).^[2] Solch faszinierende Reaktionsmodelle wurden durch elegante biomimetische Totalsynthesen unterstützt, wie beispielsweise von Santalin Y, Intricareen und Alsmaphorazin B.^[2a-c] Trotz alledem blieb eine enzymatische Beteiligung fragwürdig, nachdem Berechnungen mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT) nahelegten, dass [3+2]-Cycloadditionen von Nitronen und Alkenen in der Biosynthese einiger Alkaloide auch ohne enzymatisches Eingreifen ablaufen könnten.^[2d] Auf der anderen Seite betonten DFT-Rechnungen den Einfluss von Wasserstoff-Donoren bei der vorgeschlagenen 1,3-dipolaren, intramolekularen Cycloaddition eines Nitrons und eines Enons in der Biosynthese von Lycopodiumjaponicum. Eine beträchtliche Beschleunigung der Umsatzrate (2000-fach) in einem hypothetischen aktiven Zentrum eines Enzyms wurde errechnet.^[2e]

Die jüngste Entdeckung des ersten Enzyms, das bei einer 1,3-dipolaren Cycloaddition eine Rolle spielt, war allerdings nicht strukturgeleitet, sondern ein glücklicher Zufall. Die seltene Reaktion spielt eine Schlüsselrolle im Rahmen der Ubichinon-Biosynthese und Detoxifizierungsreaktionen in Hefe.^[3]

Das Terpen Ubichinon (auch bekannt unter dem Namen Coenzym Q, Schema 2 A) ist ein entscheidender Bestandteil



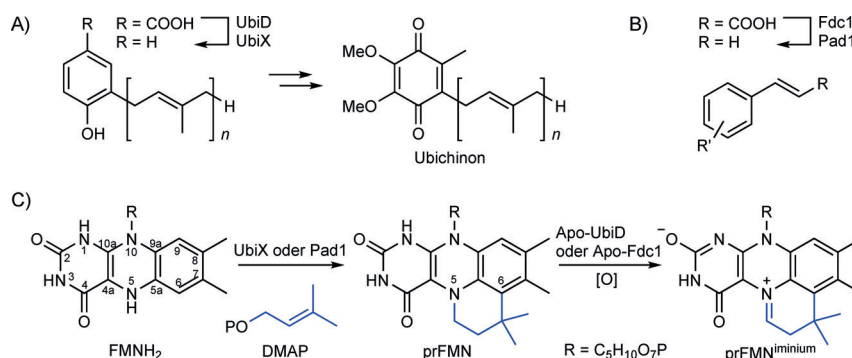
Schema 1. Beispiele von vorgeschlagenen [3+2]-Cycloadditionen in der Biosynthese von Naturstoffen. Ableitungen von biomimetischer Synthese und DFT-Berechnungen.

der Elektronentransportkette. Es war lange bekannt, dass das Enzympaar UbiX und UbiD an der Decarboxylierung eines Ubichinon-Vorläufers beteiligt ist.^[4] Die homologen Enzyme Pad1 (Phenylacrylsäure-Decarboxylase) und Fdc1 (Ferulasäure-Decarboxylase) von *Saccharomyces cerevisiae* spielen eine Rolle bei Detoxifizierungsreaktionen und der Produktion flüchtiger organischer Stoffe (Schema 2 B).^[5] Die allgemein anerkannte Theorie besagte, dass diese Enzympaare isofunktionale Decarboxylasen darstellen, die unabhängig voneinander dieselben Reaktionen katalysieren. Dennoch blieb die genaue Rolle jedes einzelnen Proteins ein Rätsel, nachdem verschiedenen Versuche gescheitert waren, für individuelle Enzyme Aktivität bezüglich der Decarboxylierungsreaktion in vitro zu ermitteln. Kürzlich kamen Beweise zutage, dass sich beide Enzyme zusammenschließen und in einer kooperativen Weise arbeiten.^[6] Wie sich herausstellte, sind nicht UbiX und dessen pilzliches Homolog Pad1 für die Decarboxylierungsreaktionen verantwortlich, sondern aktivieren vielmehr UbiD und Fdc1, indem sie einen modifizierten, von Flavin abgeleiteten Kofaktor synthetisieren. Dessen

[*] M. Baunach, Prof. Dr. C. Hertweck
Abteilung Biomolekulare Chemie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie (HKI)
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)
E-Mail: christian.hertweck@leibniz-hki.de

Prof. Dr. C. Hertweck
Friedrich-Schiller-Universität
Jena (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507120> zu finden.



Scheme 2. Enzymatische Decarboxylierung von Carbonsäuren A) in der bakteriellen Ubichinon-Biosynthese und B) der Bildung von Fremdaromen in Pilzen. C) Vorgeschlagene Reaktion von DMAP und FMNH₂, katalysiert von UbiX (Protein-Datenbank 4ZAX) als auch Pad1, die zur Bildung des prenylierten Kofaktors (prFMN) führt. Dieser wird daraufhin zu seiner aktiven Form oxidiert (prFMN^{iminium}).

Instabilität hatte bislang die Strukturaufklärung verhindert.^[6b] Die Identität des mysteriösen Kofaktors blieb ein Rätsel, das bis ins Jahr 1976 zurückreicht, als zum ersten Mal beobachtet wurde, dass der Decarboxylierungsschritt in der Biosynthese des Ubichinons „einen unbekannten, hitzestabilen Faktor benötigt, mit einem Molekulargewicht von unter 1000 [Da]“.^[7]

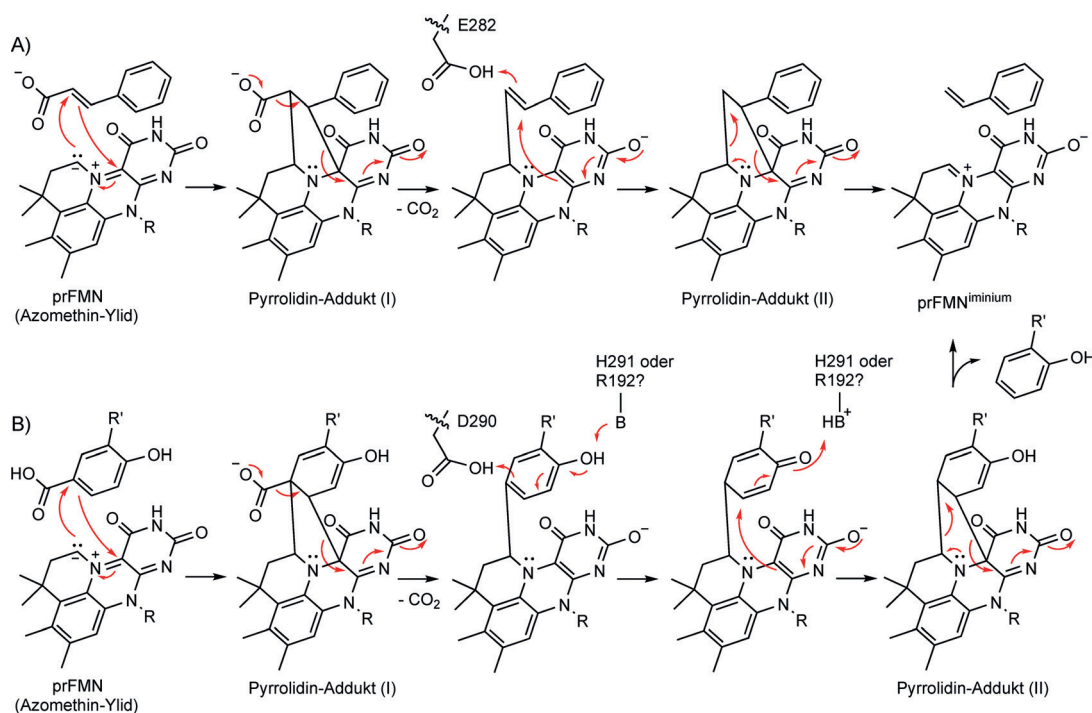
Fast vier Jahrzehnte später wurde nun die Struktur dieses Kofaktors von Payne und Mitarbeitern mittels Kristallographie und hochauflösender Strukturanalyse von Fdc1, oder vielmehr Fdc1^{UbiX}, das durch die Koexpression von *fdc1* zusammen mit entweder *ubiX* oder *fad1* in *E. coli* erhalten wurde, aufgeklärt.^[3b] Im Gegensatz zu Fdc1 (produziert in der Abwesenheit von UbiX und Pad1) ist Fdc1^{UbiX} dazu in der Lage, die Decarboxylierung von Modellsubstraten *in vitro* zu katalysieren. Unterschiedliche spektrale Charakteristika von Fdc1^{UbiX} im Vergleich zu Fdc1 wiesen auf ein stark modifiziertes Flavinmononukleotid (FMN) hin, und die Kristallstrukturen von drei unterschiedlichen Fdc1^{UbiX}-Varianten enthüllten, dass der Kofaktor ein FMN-Derivat ist, das einen zusätzlichen, von Isopren abgeleiteten Ring enthält (prFMN) (Schema 2 C).

Daraufhin wurde die Rolle von UbiX in Bezug auf die FMN-Modifikation von White und Mitarbeitern unter die Lupe genommen, wozu allerdings noch eine weitere Hürde überwunden werden musste: Obwohl UbiX eine Prenyltransferase zu sein schien, wurden die typischen C5-Terpenbausteine Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) nicht als Substrat akzeptiert. Zur großen Überraschung konnten spektroskopische Hinweise auf eine Modifizierung des Kofaktors nur erhalten werden, wenn UbiX mit oxidiertem FMN und Dimethylallylmonophosphat (DMAP) inkubiert wurde. Mithilfe von kinetischer Kristallographie, biochemischen Studien, Spektroskopie und computergestützten Berechnungen wurde der ungewöhnliche Prenylierungs-/Cyclisierungs-Mechanismus aufgeklärt. Im aktuellen Modell unterstützt das π -Elektronen-reiche Umfeld des aktiven Zentrums die Abspaltung der Phosphatgruppe des DMAP und vermittelt die N5-Prenylierung. Nach der räumlichen Neuausrichtung des Dimethylallylrestes führt der nukleophile Angriff der Isoalloxazingruppe auf ein kurzlebiges Carbokation zur Ausbildung des zusätzlichen Rings.^[3a] Folglich ist UbiX ein neues

Mitglied der wachsenden Familie von ungewöhnlichen Prenyltransferasen, die gleichzeitig als Cyclasen fungieren.^[8]

Dieser ausgeklügelte Mechanismus wirft die Frage auf, warum die Natur solch einen Aufwand betreibt, um die Struktur eines Flavin-Kofaktors zu verändern. Flavin-Koenzyme sind vielseitige Heterocyklen, die Enzyme dazu befähigen, diverse Redox-Umwandlungen in Biosynthesewegen zu katalysieren. Das katalytische Repertoire dieser Kofaktoren beinhaltet sowohl Zwei- als auch Ein-Elektronen-Übertragungen, die es Flavoenzymen erlauben, die Oxidation und Reduktion von verschiedenen Substraten zu bewerkstelligen.^[9] Typischerweise spielt N5 des Isoalloxazinrings des FMN eine besondere Rolle. Es ist die Position, an die ein Proton angelagert oder der ein Proton entzogen werden kann, und an die vorübergehend Substrat-Carbanionen kovalent gebunden werden können. Aus diesem Grund verhindert die N5-Alkylierung herkömmliche Flavin-Katalyse, was höchst überraschend ist. Aber wie es so oft ist, wenn sich eine Tür schließt, öffnet sich eine andere: Sobald prFMN zu dem entsprechenden Flavo-N5-Iminium-Addukt (prFMN^{iminium}) oxidiert wird, kann es leicht in ein Azomethin-Ylid umgewandelt werden (Schema 3). Dieser wohlbekannte 1,3-Dipol kann mit verschiedenen Dipolarophilen in [3+2]-Cycloadditionen reagieren. Aus Decarboxylierungs-Experimenten *in vitro*, in denen verschiedenen Zimtsäurederivate benutzt wurden, sowie aus Strukturdaten wurde ein Reaktionsmechanismus abgeleitet, der ein kurzlebiges, kovalentes Pyrrolidin-Addukt involviert. Das Styrolprodukt würde nach der Ausbildung eines weiteren Pyrrolidin-Addukts freigesetzt, und das verbleibende prFMN^{iminium} könnte daraufhin zurück zum Azomethin-Ylid umgewandelt werden (Schema 3).^[3b] Obwohl kein direkter Beweis für eine konzertierte Reaktion besteht, stellt dies ein plausibles Schema für ein Enzym-katalysiertes biologisches Gegenstück einer [3+2]-Cycloaddition dar.

Während dieses Modell erklärt, wie Styrol und andere Fremdaromen bei der Fermentation von *S. cerevisiae* entstehen, wurde der Mechanismus für die Decarboxylierung des Ubichinonvorläufers, der sich deutlich von dem Zimtsäure-Dipolarophil unterscheidet, noch nicht untersucht. Von Synthesestudien weiß man jedoch, dass 1,3-dipolare Cycloadditionen mit Azomethin-Yliden auch mit aromatischen Verbindungen stattfinden können, auch wenn dabei deren Aro-



Scheme 3. A) Vorgeschlagener Mechanismus für die Decarboxylierungsreaktion des Modells substrats Zimtsäure zu Styrol, die von Fdc1 (Protein-Datenbank 4A7) katalysiert wird. Ein kurzlebiges Pyrrolidin-Addukt bildet sich während einer 1,3-dipolaren Cycloaddition der Azomethin-Ylid-Resonanzstruktur des prFMN und Zimtsäure. B) Modell für die Decarboxylierung von aromatischen Säuren durch UbiD (Protein-Datenbank 2IDB).

matizität verloren geht. Für die [3+2]-Cycloaddition mit aromatischen Dipolarophilen ist es von Vorteil, Benzole zu verwenden, die direkt mit dem Ylid verbunden sind, eingebettet in polycyclische aromatische Systeme oder substituiert mit stark elektronenziehenden Resten wie beispielsweise Nitrogruppen.^[10] Es ist durchaus denkbar, dass das aktive Zentrum von UbiD die elektronischen und entropischen Voraussetzungen für die [3+2]-Cycloaddition des *p*-Hydroxybenzoesäure-Derivats und des prFMN-Azomethin-Ylids bereitstellt. Tatsächlich konnten wir im aktiven Zentrum von UbiD basische Reste identifizieren, welche die vorgeschlagene Reaktionssequenz stützen könnten (Schema 3B; siehe auch Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass biomimetische Studien und biosynthetische Betrachtungen überzeugende Argumente für [3+2]-Cycloadditionen in der Natur geliefert haben. Das erste Beispiel einer biokatalytischen [3+2]-Cycloaddition wurde allerdings während der Untersuchung einer auf den ersten Blick einfach erscheinenden enzymatischen Decarboxylierungsreaktion entdeckt. Alles in allem werden diese Erkenntnisse die Suche nach verwandten Reaktionen in Biosynthesewegen und die Entwicklung von biomimetischen Syntheserouten anspornen.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 12550–12552
Angew. Chem. **2015**, 127, 12732–12734

- [1] a) H. J. Kim, M. W. Ruszczycky, S. H. Choi, Y. N. Liu, H. W. Liu, *Nature* **2011**, 473, 109–112; b) C. A. Townsend, *ChemBioChem* **2011**, 12, 2267–2269; c) N. Preiswerk, T. Beck, J. D. Schulz, P. Milovnik, C. Mayer, J. B. Siegel, D. Baker, D. Hilvert, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA **2014**, 111, 8013–8018; d) H. Oikawa, T. Tokiwano, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 321–352.

- [2] a) S. Strych, G. Journot, R. P. Pemberton, S. C. Wang, D. J. Tantillo, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5079–5083; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 5168–5172; b) P. A. Roethle, P. T. Hernandez, D. Trauner, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5901–5904; c) A. Y. Hong, C. D. Vanderwal, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 7306–7309; d) P. P. Painter, R. P. Pemberton, B. M. Wong, K. C. Ho, D. J. Tantillo, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 432–435; e) E. H. Krenske, A. Patel, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 17638–17642.
- [3] a) M. D. White, K. A. Payne, K. Fisher, S. A. Marshall, D. Parker, N. J. Rattray, D. K. Trivedi, R. Goodacre, S. E. Rigby, N. S. Scrutton, S. Hay, D. Leys, *Nature* **2015**, 522, 502–506; b) K. A. P. Payne, M. D. White, K. Fisher, B. Khara, S. S. Bailey, D. Parker, N. J. W. Rattray, D. K. Trivedi, R. Goodacre, R. Beveridge, P. Barran, S. E. J. Rigby, N. S. Scrutton, S. Hay, D. Leys, *Nature* **2015**, 522, 497–501.
- [4] R. Meganathan, *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, 203, 131–139.
- [5] N. Mukai, K. Masaki, T. Fujii, M. Kawamukai, H. Iefuji, *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, 109, 564–569.
- [6] a) M. Gulmezian, K. R. Hyman, B. N. Marbois, C. F. Clarke, G. T. Javor, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 467, 144–153; b) F. Lin, K. L. Ferguson, D. R. Boyer, X. N. Lin, E. N. Marsh, *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1137–1144.
- [7] R. A. Leppik, I. G. Young, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1976**, 436, 800–810.
- [8] M. Baunach, J. Franke, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 2604–2626; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 2640–2664.
- [9] C. T. Walsh, T. A. Wenciewicz, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 175–200.
- [10] J. H. Ryan, *Arkivoc* **2015**, 160–183.

Eingegangen am 31. Juli 2015

Online veröffentlicht am 7. September 2015