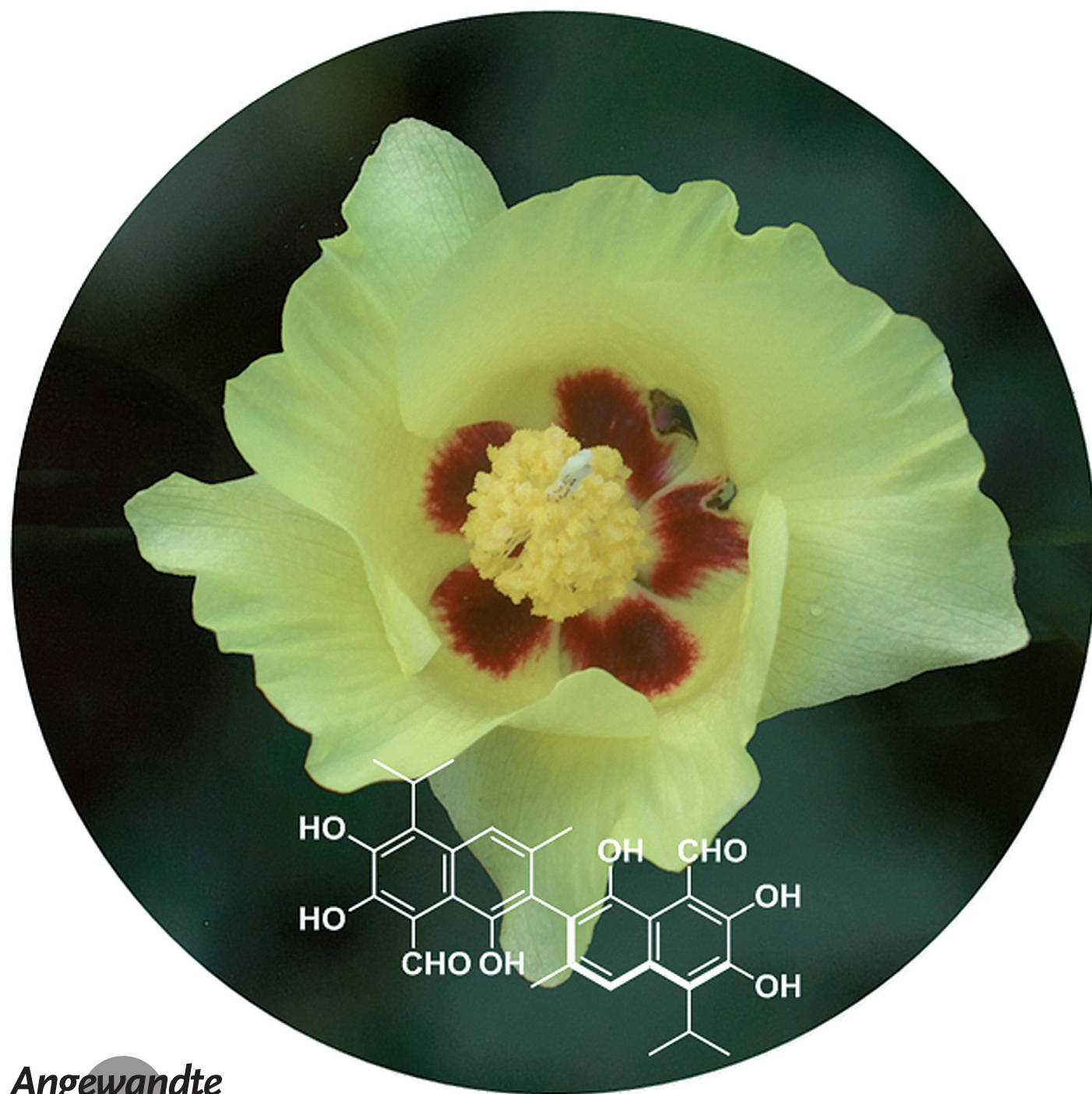


Dirigierende Proteine aus Baumwolle (*Gossypium* sp.) für die atropselektive Synthese von Gossypol

Isabelle Effenberger, Bin Zhang, Ling Li, Qiang Wang, Yuxiu Liu, Iris Klaiber,
Jens Pfannstiel, Qingmin Wang* und Andreas Schaller*



Abstract: Gossypol dient der Abwehr von Schädlingen und Pathogenen in Baumwollpflanzen. Seine Biosynthese umfasst die oxidative Kupplung von Hemigossypol, die zu zwei Atropisomeren führt. In vivo dominiert (+)-Gossypol, was auf eine stereochemisch kontrollierte Biosynthese schließen lässt. Ziel dieser Studie waren die Identifizierung der Faktoren für die Bildung von (+)-Gossypol sowie die Untersuchung ihres Potenzials für die Synthese asymmetrischer Biaryle. Die Kupplung von Hemigossypol mit Laccase und O₂ als Oxidationsmittel in Gegenwart eines dirigierenden Proteins (DIR) von *Gossypium hirsutum* (GhDIR4) verläuft atroposelektiv. (+)-Gossypol wurde mit >80% ee erhalten, während in Abwesenheit von GhDIR4 nur racemisches Gossypol entstand. Die Identifizierung von GhDIR4 unterstreicht die Bedeutung von DIRs im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen und könnte ein erster Schritt zur Entwicklung von DIRs für die Synthese axial-chiraler Binaphthyle sein.

Biologisch aktive Naturstoffe enthalten häufig axial-chirale Biarylbindungen, und entsprechende Substanzen sind lohnende Ziele für die organische Synthese. Die Biosynthese von Biarylen verläuft meist über die oxidative Kupplung von Phenolen oder Naphtholen. Auch in der organischen Synthese bietet die oxidative Phenolkupplung einen direkten Zugang zu Biarylen, ist hier aber durch mangelnde Regio- und Enantioselektivität sowie durch unerwünschte Nebenreaktionen limitiert. Dies macht neue Strategien für die enantioselektive Synthese von Biarylen erforderlich.^[1] Für biotechnologische Ansätze zur enantioselektiven Biarylsynthese stellt die Natur ein breites Spektrum biosynthetischer Hilfsmittel bereit, das bisher aber kaum genutzt worden ist.^[2]

In biologischen Systemen gibt es wenigstens zwei Mechanismen, die Regio- und Enantioselektivität bei oxidativen Kupplungsreaktionen vermitteln. Beim ersten Mechanismus können die oxidierenden Enzyme selbst, nämlich Cytochrom-P450-abhängige Enzyme oder Laccasen, für die erforderliche Selektivität sorgen. Die intramolekulare Kupplung von (*R*)- und (*S*)-Reticulin während der Morphin- bzw. Magnaflorin-Biosynthese sowie die intermolekulare Kupplung zur Bildung von Bisbenzylisochinolin-Alkaloiden werden z. B. von hochspezifischen pflanzlichen Cytochrom-P450-abhängigen

Oxidasen katalysiert.^[3] In *Aspergillus niger* katalysiert ein P450-Protein die stereoselektive Kupplung von Dimethylsiderin als vorletzten Schritt der *P*-(+)-Kotanin Biosynthese,^[4] und in Streptomyceten sind P450-Proteine für die regio- und enantioselektive Bildung von Biaryl-Prä-Anthrachinonen verantwortlich.^[5] In *Daldinia eschscholzii* ist es eine Laccase, deren Präferenz für spezifische Naphtholdimerradikale zu einem Enantiomerenüberschuss von (–)-Dalesconolen führt.^[6] Beim zweiten Mechanismus werden zunächst durch unspezifische oxidierende Enzyme die Radikale gebildet, deren regio- und enantioselektive Kupplung im Anschluss durch so genannte dirigierende Proteine (DIRs) vermittelt wird. Die Entdeckung der DIRs im Jahr 1997 änderte gängige Vorstellungen zur Kontrolle von Phenoxylradikalkupplungen im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen.^[7] Das Konzept ist jedoch nicht unumstritten, weil eine Beteiligung von DIRs bisher nur für eine Reaktion nachgewiesen worden ist, nämlich die Kupplung zweier Coniferylalkoholradikale zu entweder (+)- oder (–)-Pinoresinol.^[7,8] Hier wird nun gezeigt, dass DIRs darüber hinaus auch für die atroposelektive Bildung von Gossypol verantwortlich sind, was auf eine weitergehende Rolle von DIRs im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel schließen lässt.

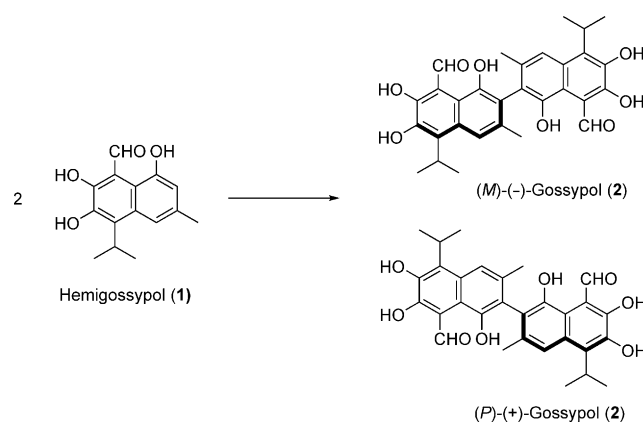
Der Naturstoff Gossypol (**2**; Schema 1) kommt in Blüten, Samen, Wurzeln und Blättern der Baumwollpflanze vor, wo er der chemischen Abwehr von Insekten und Pathogenen dient.^[9] Das große Interesse an **2** gründet einerseits auf seinen vielfältigen pharmakologischen Wirkungen und andererseits auf seiner Toxizität für Mensch und Tier, die eine Nutzung von Öl und Proteinen der Baumwollsamens als Nahrungs- und Futtermittel einschränkt.^[10] Die Biosynthese von **2** geht von Farnesylpyrophosphat aus und umfasst die Bildung von 8-Hydroxy-(+)- δ -cadinen durch Cadinen-Synthase sowie die P450-Monooxygenase CYP706B1.^[11] Wenigstens ein weiteres P450-Protein ist an den nachfolgenden Schritten zur Synthese von Hemigossypol (**1**) beteiligt, aus dem in einer Peroxidase-katalysierten, bimolekularen Radikalkupplung **2** gebildet wird.^[12] Wegen der eingeschränkten Rotation um die zentrale C-C-Bindung des tetra-*ortho*-substituierten Biarylsystems entstehen dabei zwei Atropisomere, nämlich (+)- und (–)-**2**. Mit der bemerkenswerten Ausnahme der (+)-**2**-Synthese durch asymmetrische Ullmann-Kupplung chiraler Oxazolin-

[*] I. Effenberger, Prof. Dr. A. Schaller
Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen
Universität Hohenheim (260)
70593 Stuttgart (Deutschland)
E-Mail: andreas.schaller@uni-hohenheim.de

I. Klaiber, Dr. J. Pfannstiel
Serviceeinheit Massenspektrometrie
Universität Hohenheim (690)
70593 Stuttgart (Deutschland)

Dr. B. Zhang, Dr. L. Li, Q. Wang, Prof. Dr. Y. Liu, Prof. Dr. Q. Wang
State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry
Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin)
Nankai University, Tianjin 300071 (V.R. China)
E-Mail: wangqm@nankai.edu.cn

Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507543> zu finden.



Schema 1. Die oxidative Kupplung von **1** resultiert in zwei Atropisomeren von **2**.

aktivierter Naphthyle liefert die organische Synthese in der Regel eine racemische Mischung der beiden Isomere,^[13] wohingegen die Biosynthese von **2** einer stereochemischen Kontrolle zu unterliegen scheint. Dabei wird eine Beteiligung von DIRs vermutet, und in Proteinextrakten aus Embryonen und Blütenblättern der Baumwolle konnte in der Tat eine die Bildung von (+)-**2** vermittelnde DIR-Aktivität nachgewiesen werden.^[12c,14] Allerdings konnten die für die atropselektive Biosynthese von **2** verantwortlichen Proteine bislang nicht identifiziert werden; darin bestand nun das Ziel der vorliegenden Studie.

Von Zhu et al. wurden in Sea-Island-Baumwolle (*G. barbadense*) zwei cDNAs (GbDIR1 und GbDIR2) identifiziert, die Sequenzähnlichkeit zu bekannten DIRs aufweisen. Die entsprechenden Gene wurden hier als Kandidaten für eine Beteiligung an der Gossypol-Biosynthese in Betracht gezogen, da ihre Expression ebenso wie die Bildung von Gossypol in Reaktion auf Pathogenbefall induziert wird.^[9,15] Ausgehend von der Sequenz von GbDIR1 und 2 wurde GhDIR4 kloniert, das am nächsten verwandte Homologe in *G. hirsutum* var. marie-galante, einer Sorte der Hochland-Baumwolle, die (+)-**2** in > 90 % ee enthält. Das offene Leseraster von GhDIR4 wurde um eine Hexahistidin-Markierung verlängert und in einer transgenen pflanzlichen Zellkultur exprimiert. Rekombinantes GhDIR4 wurde aus Zellwandextrakten bis zur Homogenität gereinigt (Abbildung S18a der Hintergrundinformationen). Der N-Terminus des gereinigten Proteins wurde massenspektrometrisch identifiziert, wodurch die Spaltstelle des Signalpeptids zwischen Ser22 und Gln23 lokalisiert werden konnte (Abbildung S19). Unterschiede im apparenten Molekulargewicht unter denaturierenden (SDS-PAGE; 31 kDa, Abbildung S18a) und nativen Bedingungen (Gelfiltration; 125 kDa, Abbildung S18b) deuteten auf ein Homotetramer als den nativen Zustand von GhDIR4 hin. Angesichts der kürzlich gelösten Kristallstruktur eines trimeren (+)-Pinoresinol-bildenden DIR der Erbse kann aber die Möglichkeit eines Homotrimers nicht ausgeschlossen werden.^[16]

Zur Untersuchung einer möglichen „dirigierenden Aktivität“ wurde das Produktspektrum der oxidativen Kupplung von **1** in An- und Abwesenheit von GhDIR4 verglichen. Nach Ein-Elektronen-Oxidation von **1** durch Laccase aus *Trametes versicolor* mit O₂ als Oxidationsmittel entstand *rac*-**2**, wenn kein DIR zugegen war. Nach Versetzen mit GhDIR4 wurde bevorzugt (+)-**2** gebildet (Abbildung 1a). Mit steigenden Konzentrationen an GhDIR4 stieg der Enantiomerenüberschuss von (+)-**2** auf über 80 % ee (Abbildung 1b). Nach Hitze-Inaktivierung von GhDIR4 oder bei Einsatz von DIRs, die an der Lignanbiosynthese beteiligt sind, wurde lediglich *rac*-**2** beobachtet (Abbildung S20b). Andererseits erwies sich GhDIR4 als inaktiv mit Coniferylalkohol als Substrat (Abbildung S20c). Die Daten zeigen, dass es sich bei GhDIR4 um ein neues DIR handelt, das der oxidativen Kupplung von **1** Atropselektivität verleiht. Seine Spezifität für (+)-**2** ist in Einklang mit dem Überschuss dieses Isomers in *G. hirsutum* var. marie-galante.

Ein enantio-komplementäres (–)-**2**-bildendes DIR wäre in Pflanzen zu erwarten, die einen Überschuss eben dieses Isomers aufweisen. Die meisten Baumwollarten produzieren

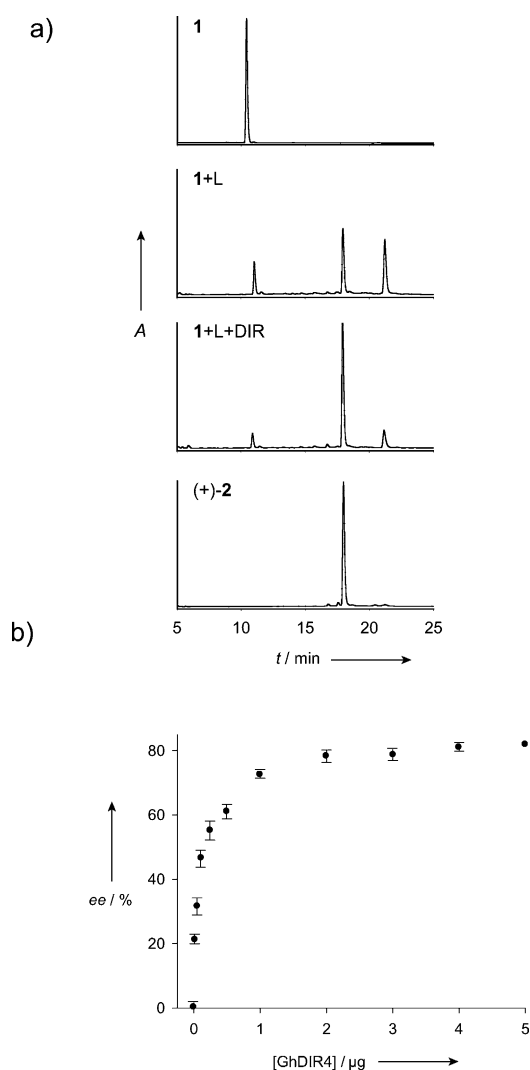


Abbildung 1. Nachweis der dirigierenden Aktivität. Die Enantiomerenzusammensetzung von **2** nach oxidativer Kupplung von **1** wurde durch Derivatisierung mit einem chiralen Amin und nachfolgender Trennung der entstehenden Schiff-Basen durch Umkehrphasen-HPLC bestimmt. a) Gezeigt sind HPLC-Profile für das Substrat (**1**), die Reaktion mit Laccase/O₂ (**1** + L), die Reaktion mit Laccase/O₂ und GhDIR4 (**1** + L + DIR) und einen (+)-**2**-Standard. b) Enantiomerenüberschuss von (+)-**2** in Abhängigkeit von der Menge an GhDIR4.

jedoch (+)- und (–)-**2** in einem Verhältnis von 3:2. *G. barbadense* ist eine seltene Ausnahme. Ein Überschuss an (–)-**2** von 30–35 % in wenigstens einigen seiner Organe lässt auf die mögliche Präsenz eines (–)-**2**-bildenden DIR in dieser Art schließen.^[17] Daher wurde hier das Pathogen-induzierbare GbDIR1 von *G. barbadense* kloniert, ebenso wie GaDIR1 aus *G. arboreum*, einer Spezies, die über den üblichen 3:2-Überschuss an (+)-**2** verfügt. Die beiden neuen DIRs wurden exprimiert (Abbildung 2a), und ihre Aktivität wurde mit der von GhDIR4 verglichen (Abbildung 2b). Wie GhDIR4 vermittelt auch GaDIR1 die Bildung von (+)-**2**, was mit dem Überschuss dieses Isomers in *G. arboreum* in Einklang ist (Abbildung 2b). Für GbDIR1 konnte keine dirigierende Aktivität bei der oxidativen Kupplung von **1** nachgewiesen werden. Dieses Protein scheint daher nicht zur Gossypol-

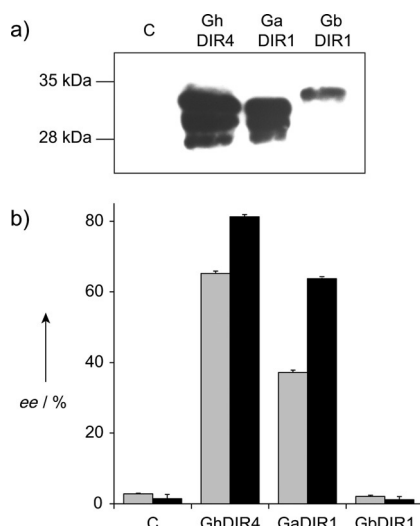


Abbildung 2. Aktivität von GaDIR1 und GbDIR1 im Vergleich zu der von GhDIR4. a) Western Blot von Proteinextrakten (1 µg) aus Blättern von *N.-benthiana*-Pflanzen nach Agro-Infiltration zur Expression der jeweiligen DIRs oder der Kontroll-Infiltration (C). Mehrfachbanden repräsentieren differentiell glykosylierte Isoformen der DIRs. b) Dirigierende Aktivität in Blattextrakten als Enantiomerenüberschuss von (+)-2. Graue und schwarze Balken entsprechen 10 bzw. 30 µg Gesamtprotein der Blattextrakte.

Biosynthese beizutragen und ist möglicherweise an der Kupplung anderer Substrate beteiligt. Damit steht die Identifizierung eines (–)-2-bildenden DIR nach wie vor aus. Als mögliche Quelle für eine solche Aktivität sollten Pflanzen in Betracht gezogen werden, die (–)-2 in einem deutlicheren Überschuss akkumulieren, wie *Thespesia danis*, ein Baum im östlichen Afrika.^[18]

In der hier vorgestellten Arbeit wurden DIRs der Baumwolle kloniert und charakterisiert, die der Laccase-katalysierten oxidativen Kupplung von 1 Atropselektivität verleihen. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung von DIRs für die stereochemische Kontrolle des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen. Von der Entdeckung (+)-2-bildender DIRs bis zur Entwicklung von DIRs als Hilfsmittel für die Synthese axial-chiraler Binaphthole wird es zweifellos ein langer Weg sein. Erste wichtige Schritte sind mit der Entwicklung effizienter Expressionssysteme für die DIR-Produktion^[19] und mit dem Einsatz ortsgerichteter Mutagenese für die gezielte Veränderung der DIR-Selektivität jedoch bereits gemacht.^[20] Im Hinblick auf die Verwendung von Baumwollsaamen als Proteinquelle für die menschliche und tierische Ernährung ergibt sich mit der Identifizierung von Genen für die Bildung von (+)-2 die Möglichkeit der gentechnischen Veränderung von Baumwolle, mit dem Ziel, das toxische (–)-2 zu Gunsten erhöhter Spiegel an (+)-2 zu eliminieren, wodurch eine erfolgreiche Abwehr von Schädlingen und Pathogenen gewährleistet bleibt.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHA 591/10-1) und durch ein Graduiertenstipendi-

um des Landes Baden-Württemberg für I.E. gefördert; weitere Unterstützung erfolgte durch die „National Natural Science Foundation of China“ (21132003, 21372131) und den „Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education“ (20120031110010).

Stichwörter: Biaryle · Biosynthese · C-C-Kupplungen · Dirigierende Proteine · Enantioselektivität

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14660–14663
Angew. Chem. **2015**, *127*, 14660–14874

- [1] a) J. A. Ashenhurst, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 540–548; b) G. Bringmann, T. Gulder, T. A. M. Gulder, M. Breuning, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 563–639; c) T. Wezeman, S. Brase, K.-S. Masters, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 6; d) M. C. Kozłowski, B. J. Morgan, E. C. Linton, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3193–3207.
- [2] H. Aldemir, R. Richarz, T. A. M. Gulder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8286–8293; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8426–8433.
- [3] a) R. Gerardy, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1992**, *32*, 79–86; b) A. Gesell, M. Rolf, J. Ziegler, M. L. Díaz Chávez, F.-C. Huang, T. M. Kutchan, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24432–24442; c) N. Ikezawa, K. Iwasa, F. Sato, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8810–8821; d) P. F. Kraus, T. M. Kutchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2071–2075; e) R. Stadler, M. H. Zenk, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 823–831.
- [4] C. Gil Girol, K. M. Fisch, T. Heinekamp, S. Günther, W. Hüttel, J. Piel, A. A. Brakhage, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9788–9791; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9926–9929.
- [5] A. Präg, B. A. Grüning, M. Häckh, S. Lüdeke, M. Wilde, A. Luzhetskyy, M. Richter, M. Luzhetskyy, S. Günther, M. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6195–6198.
- [6] W. Fang, S. Ji, N. Jiang, W. Wang, G. Y. Zhao, S. Zhang, H. M. Ge, Q. Xu, A. H. Zhang, Y. L. Zhang, Y. C. Song, J. Zhang, R. X. Tan, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1039.
- [7] a) L. B. Davin, H. B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, N. G. Lewis, *Science* **1997**, *275*, 362–366; b) L. B. Davin, N. G. Lewis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 398–406.
- [8] a) B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202–204; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 207–209; b) B. Pickel, A. Schaller, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8427–8438.
- [9] a) R. D. Stipanovic, J. D. Lopez, Jr., M. K. Dowd, L. S. Puckhaber, S. E. Duke, *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 959–968; b) S. Hagenbucher, D. M. Olson, J. R. Ruberson, F. L. Wäckers, J. Romeis, *Crit. Rev. Plant Sci.* **2013**, *32*, 458–482; c) L. S. Puckhaber, M. K. Dowd, R. D. Stipanovic, C. R. Howell, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7017–7021.
- [10] X. Wang, C. P. Howell, F. Chen, J. Yin, Y. Jiang in *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 58 (Hrsg.: S. L. Taylor), Academic Press, New York, **2009**, S. 215–263.
- [11] a) X. Y. Chen, Y. Chen, P. Heinsein, V. J. Davisson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *324*, 255–266; b) P. Luo, Y. H. Wang, G. D. Wang, M. Essenberg, X. Y. Chen, *Plant J.* **2001**, *28*, 95–104.
- [12] a) T. A. Wagner, J. Liu, R. D. Stipanovic, L. S. Puckhaber, A. A. Bell, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2594–2598; b) T. A. Wagner, J. Liu, L. S. Puckhaber, A. A. Bell, H. Williams, R. D. Stipanovic, *Phytochemistry* **2015**, *115*, 59–69; c) C. R. Benedict, J. Liu, R. D. Stipanovic, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 356–361.
- [13] a) A. I. Meyers, J. J. Willemsen, *Chem. Commun.* **1997**, 1573–1574; b) A. I. Meyers, J. J. Willemsen, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10493–10511; c) J. D. Edwards, J. L. Cashaw, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2283–2285; d) J. D. Edwards, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3798–3799; e) M. C. Venuti, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3124–3127; f) J. A. Veech, R. D. Stipanovic, A. A. Bell, *J. Chem. Soc.*

- 1976, 4, 144–145; g) L. Li, Y. Liu, Q. Wang, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 8014–8021; h) C. Li, T. Chen, B. Li, G. Xiao, W. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3792–3796; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 3863–3867.
- [14] J. Liu, R. D. Stipanovic, A. A. Bell, L. S. Puckhaber, C. W. Magill, *Phytochemistry* **2008**, 69, 3038–3042.
- [15] L. Zhu, X. Zhang, L. Tu, F. Zeng, Y. Nie, X. Guo, *J. Plant Pathol.* **2007**, 89, 41–45.
- [16] K. W. Kim, C. A. Smith, M. D. Daily, J. R. Cort, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 1308–1318.
- [17] a) R. D. Stipanovic, L. S. Puckhaber, A. A. Bell, A. E. Percival, J. Jacobs, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 6266–6271; b) J. W. Jaroszewski, T. Strøm-Hansen, S. H. Hansen, O. Thastrup, H. Kofod, *Planta Med.* **1992**, 58, 454–458; c) Q. B. Cass, E. Tiritan, S. A. Matlin, E. C. Freire, *Phytochemistry* **1991**, 30, 2655–2657.
- [18] K. Sprogøe, D. Stærk, H. L. Ziegler, T. H. Jensen, S. B. Holm-Møller, J. W. Jaroszewski, *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 516–519.
- [19] C. Kazenwadel, J. Klebensberger, S. Richter, J. Pfannstiel, U. Gerken, B. Pickel, A. Schaller, B. Hauer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 7215–7227.
- [20] K.-W. Kim, S. G. A. Moinuddin, K. M. Atwell, M. A. Costa, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 33957–33972.

Eingegangen am 12. August 2015

Online veröffentlicht am 13. Oktober 2015