

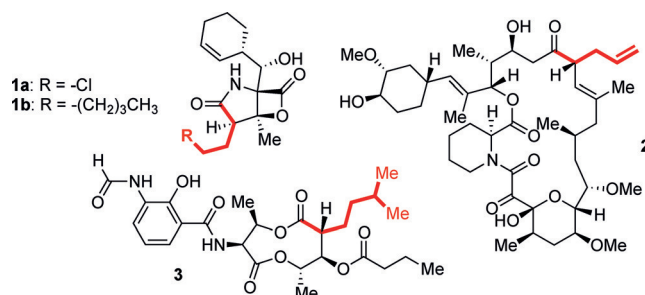
# Erweiterung der Strukturvielfalt von Polyketiden durch Einsatz modifizierter Carboxylase/Reduktase-Enzyme

Jana Kundert und Tobias A. M. Gulder\*

Crotonyl-CoA-Carboxylasen/Reduktasen · Metabolisches Engineering · Polyketid-Bioynthese

**P**olyketide sind eine der wichtigen Quellen essentieller Arzneistoffe, wie z. B. des Antibiotikums Erythromycin, des Cholesterin-senkenden Lovastatins oder des Antiparasitikums Avermectin. Die Biosynthese dieser Naturstoffe wird von multifunktionalen Enzymkomplexen, den Polyketidsynthasen (PKSs), katalysiert.<sup>[1]</sup> Trotz ihrer hoch diversen und oft sehr komplexen Strukturen werden Polyketide aus einfachen Acyl- und Malonylbausteinen aufgebaut, die entweder an Coenzym A (CoA) oder an zugehörige Acyl-Carrier-Proteine (ACPs) gebunden sind. Analog zur Fettsäurebiosynthese wird das entstehende Polyketid sukzessive durch decarboxylierende Claisen-Kondensation mit Malonat-abgeleiteten Elongationseinheiten verlängert. Im Falle der Polyketide modifizieren reduktive Enzyme die entstehenden  $\beta$ -Keto-Funktionalitäten jedoch durch partielle oder vollständige Reduktion, was zu ihrer beeindruckenden strukturellen Vielfalt führt. Weitere strukturelle Variabilität wird eingeführt durch den Einbau einer großen Auswahl verschiedener Startereinheiten, dem ersten Baustein eines Polyketid-Rückgrats.<sup>[2]</sup> Im Gegensatz dazu scheint die Strukturvielfalt der Elongationseinheiten sehr limitiert zu sein. In der Tat inkorporieren die meisten PKSs nur Malonyl- oder Methylmalonyl-CoA, und nur wenige Beispiele verwenden Ethylmalonyl-CoA, was zu H-, Me- oder Et-Substituenten führt. Nur selten finden auch ACP-gebundene Hydroxy-, Methoxy- oder Aminomalonate als Bausteine Verwendung. Allerdings enthalten manche Polyketide andere ungewöhnliche Seitenketten, die nicht durch den Einbau der genannten Elongationseinheiten erklärt werden können. Bekannte Beispiele hierfür sind die Proteasominhibitoren Salinosporamid A (**1a**) und Cinnabaramid A (**1b**) mit einer Chlorethyl- bzw. langkettigen Alkylgruppe, das Immunsuppressivum FK-506 (**2**) mit einer Allylgruppe oder Antimycin A<sub>7b</sub> (**3**), das eine verzweigte Alkyl-Seitenkette trägt (Abbildung 1).

Die entsprechenden 2-substituierten Malonate, die als PKS-Elongationseinheiten genutzt werden, werden durch reduktive Carboxylierung von C <sub>$\alpha$</sub>  in  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Acyl-

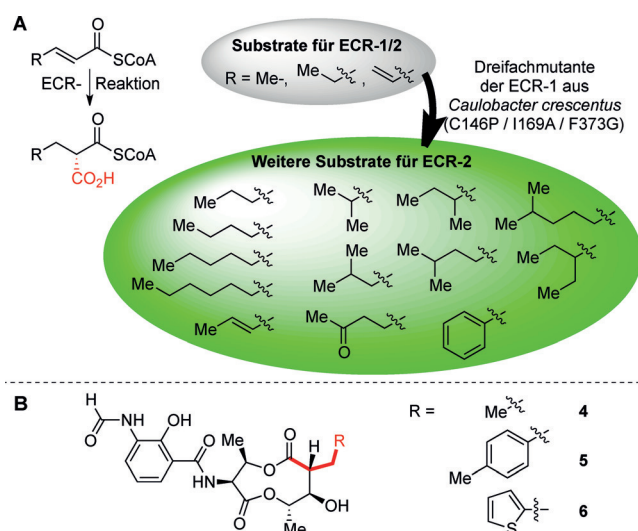


**Abbildung 1.** Auswahl von Polyketiden mit ungewöhnlichen Elongationseinheiten (rot markiert): Salinosporamid A (**1a**), Cinnabaramid A (**1b**), FK-506 (**2**) und Antimycin A<sub>7b</sub> (**3**).

CoAs generiert (Abbildung 2A). Diese bemerkenswerte Reaktion wird durch Crotonyl-CoA-Carboxylase/Reduktase-Homologe (CCRs, breiter definiert als Enoyl-CoA-Carboxylasen/Reduktasen = ECRs) katalysiert.<sup>[3]</sup> Die carboxylierende Aktivität solcher Enzyme wurde erst kürzlich von Fuchs, Alber und Mitarbeitern in *Rhodobacter sphaeroides* entdeckt, wo die prototypische CCR durch effiziente CO<sub>2</sub>-Fixierung im Primärmetabolismus Crotonyl-CoA zu (2S)-Ethylmalonyl-CoA umsetzt.<sup>[4]</sup> Kurze Zeit später etablierten Moore und Mitarbeiter diese Reaktion am Beispiel der Biosynthese der Chlorethyl-Malonyl-CoA-Elongationseinheit in **1a** als wichtiges Element zur strukturellen Diversifizierung von Polyketiden.<sup>[5]</sup> Seitdem tauchten viele weitere Beispiele für die Bereitstellung 2-substituierter Malonyl-CoAs für PKSs durch ECR-vermittelte Prozesse auf.<sup>[3]</sup> Zudem wurde das überraschend breite Substratspektrum natürlicher ECRs und der beteiligten, nachgeschalteten PKS-Domänen solcher Biosynthesewege zur Produktion neuer Naturstoffderivate in vivo genutzt.<sup>[5b,6]</sup> Jedoch blieb ein tieferes Verständnis des katalytischen Mechanismus der ECRs auf struktureller Ebene aus.

2012 gelang es Heinz und Müller et al., den katalytischen Prozess der ECRs durch detaillierte Analyse der ersten Kristallstruktur eines solchen Enzyms, CinF, aus der Biosynthese von **1b** im Komplex mit dessen Cofaktor NADP<sup>+</sup> und dem Substrat Octenoyl-CoA aufzuklären. Durch computergestützte Dockingstudien und mutagenetische Analyse identifizierten sie die Positionen E167 und N77 als essentiell für die Bindung und Aktivierung von CO<sub>2</sub>. Des Weiteren konnte in CinF eine ausgedehnte hydrophobe Tasche identifiziert

[\*] M. Sc. J. Kundert, Prof. Dr. T. A. M. Gulder  
Biosystems Chemistry, Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM) at the Department of Chemistry  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)  
E-Mail: tobias.gulder@ch.tum.de  
Homepage: <http://www.biosystemchemie.ch.tum.de>



**Abbildung 2.** A) Erforschung und Erweiterung des Substratspektrums von ECR-1/2.<sup>[8]</sup> B) Produktion neuer Antimycine **5** und **6** durch ECR-Manipulation.<sup>[10]</sup>

werden, die das große Octenoyl-Substrat aufnehmen kann. Während in Referenz-CCRs, welche die Carboxylierung von Crotonyl-CoA katalysieren, diese Tasche durch F370 und I171 blockiert ist, finden sich in CinF an diesen Stellen die kleineren Aminosäuren G362 und A163. Punktmutationen an diesen Positionen zu größeren Aminosäuren führten zu einem kompletten Verlust der carboxylierenden Aktivität gegenüber Octenoyl-CoA, während ein Teil der Aktivität gegenüber Crotonyl-CoA bestehen blieb. Diese Studien definierten zum ersten Mal zwei Positionen in ECRs, die entscheidend für die Substrat-Erkennung und -Bindung sind.<sup>[7]</sup>

In einer umfassenden Studie, die dem Verständnis und der Modulierung des Substratspektrums von ECRs des Primär- (ECR-1) und des Sekundärmetabolismus (ECR-2) gewidmet war, gelang es Erb et al. kürzlich, drei Positionen innerhalb des aktiven Zentrums zu identifizieren, die eine Unterscheidung dieser beiden ECR-Gruppen erlauben:<sup>[8]</sup> I169, F373 und C146 in ECR-1, die in ECR-2 durch A169, G373 und P146 ersetzt sind.<sup>[9]</sup> Durch Untersuchung der Aktivität von je vier Homologen aus der ECR-1- und ECR-2-Gruppe (inklusive SalG/CinF aus der Biosynthese von **1a/b**) gegenüber einer großen Auswahl an Enoyl-CoA-Thioestern in vitro, konnte gezeigt werden, dass das Substratspektrum der ECR-1-Enzyme auf lineare C-4- und C-5-Enoyl-CoAs begrenzt ist. Dagegen akzeptierten Enzyme der ECR-2-Gruppe zusätzlich eine breite Auswahl langkettiger, verzweigter und anderweitig substituierter Substrate (Abbildung 2A). Die einzige Ausnahme stellte SalD dar, dessen Substratspektrum eher dem der ECR-1-Gruppe ähnelte, was angesichts der kurzen, natürlichen SalG-Substrate auch zu erwarten war.

Um die Rolle der oben erwähnten Aminosäuren in der Substraterkennung zu verifizieren, generierten Erb et al. Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten, in denen die entscheidenden Aminosäuren aus ECR-2-Enzymen in das ECR-1-Enzym CcrCc eingeführt wurden. In der Tat konnte eine graduelle Steigerung der Substrattoleranz von den individuellen Einzelmутanten hin zur Dreifachmutante beobachtet

werden. Letztere zeigte ein vergleichbar breites Substratspektrum wie ein echtes Mitglied der ECR-2-Klasse. Während die katalytische Effizienz der Dreifachmutante in Bezug auf Crotonyl-CoA zwar um das etwa 2000-fache sank, lag der Umsatz der längeren Substrate im Bereich des ECR-2-Referenzenzym *EcrSh*. Bei In-vivo-Untersuchungen mithilfe eines geeigneten bakteriellen Modellsystems, in dem zum Überleben die ECR-1-vermittelte Fixierung von C<sub>1</sub>-Substraten essentiell ist, war die Fitness der Doppel- und Dreifachmutanten stark reduziert. Dies veranschaulicht schön die feine Abstimmung katalytischer Aktivitäten für Substrate aus dem Primär- im Vergleich zum Sekundärmetabolismus und könnte zu dem evolutionären Druck führen, der den Erhalt der kleinen Tasche im aktiven Zentrum von ECR-1-Systemen bedingt.

In einer unmittelbar nachfolgenden Publikation von Abe et al. wurde über die Struktur-basierte Umprogrammierung des ECR-Homologen AntE aus der Antimycin-Biosynthese berichtet.<sup>[10]</sup> Im Vergleich der Kristallstrukturen von AntE und CinF<sup>[7]</sup> befand sich bei AntE in der Kavität nahe der NADPH- und CO<sub>2</sub>-Bindungsstelle die kleinere Aminosäure A182 (L in CinF). In In-vitro-Studien zeigte sich bei A182G-Mutation ein Erhalt der  $\alpha,\beta$ -Reduktase-Aktivität, während die entscheidende Carboxylase-Funktion verloren ging. Eine Mutation A182L schränkte das Substratspektrum auf Crotonyl-CoA ein und erhöhte gleichzeitig signifikant die Carboxylase-Selektivität. Diese Resultate deuten auf die Wichtigkeit von A182 für die Einstellung der Reduktase-versus Carboxylase-Aktivität hin, wahrscheinlich durch Verhinderung des Eintritts von Wasser in das aktive Zentrum, das als Protonendonator im Reduktionsprozess fungieren würde.<sup>[4b]</sup> Zusätzlich identifizierten Abe et al. V350 (entspricht G362 in CinF) als eine geeignete Position zur Modifikation des Substratspektrums von AntE. Bemerkenswerterweise führte eine V350G-Mutation zu einem Enzym, das sogar in der Lage war, das sperrige 3-Indoylacryloyl-CoA in vitro als Substrat zu akzeptieren.

Um die Bedeutung dieser Resultate für die strukturelle Diversifizierung von Polyketiden zu testen, wurde in einem Antimycin-produzierenden Stamm Wildtyp-AntE in unabhängigen Experimenten gegen die Mutanten A182L und V350G ausgetauscht. Während die A182L-Mutation zur selektiven Produktion von Ethyl-substituiertem Antimycin **4** führte (das aus dem Einbau von Crotonyl-CoA-abgeleitetem Ethylmalonyl-CoA resultierte), verschob die V350G-Mutation das Produktspektrum hin zu längeren und verzweigten Seitenketten. Besonders bedeutend war, dass die Zugabe von *p*-Methylzimtsäure oder 3-(2-Thienyl)acrylsäure zu den Mutantenstämmen zur Produktion von mg-Mengen der neuen Antimycin-Derivate **5** bzw. **6** führte. Dies beweist zum ersten Mal, dass veränderte ECRs zur signifikanten Erweiterung des Spektrums verwendbarer PKS-Elongationseinheiten genutzt werden können, was in diesem Fall zur Produktion der ersten heterocyclischen und substituierten aromatischen Antimycine führte.

Die oben vorgestellten Arbeiten zeigen im Detail, wie minimale Manipulationen in aktiven Zentren von ECRs zu einer enormen Erweiterung des Substratspektrums führen können. Diese Methodik hat großes Potential im Hinblick auf

die gezielte Manipulation von Polyketidstrukturen. Das von Erb<sup>[8]</sup> identifizierte charakteristische Motiv der promiscuen ECRs-2 wird in Zukunft helfen, solche PKS-Systeme zu identifizieren, die den Einbau strukturell diverser  $\beta$ -substituierter Malonate erlauben, wie im Falle der Antimycine von Abe gezeigt.<sup>[10]</sup> Jedoch müssen noch viele Herausforderungen überwunden werden, um diese Methode zu einem generellen Werkzeug zur Modifikation von PKS-Systemen auszubauen. Hierzu gehört die potentielle Inkompatibilität ungewöhnlicher Bausteine mit nachfolgenden PKS-Prozessen oder Korrekturmechanismen,<sup>[8,10]</sup> das Entwickeln von ECR-Selektivität für ein erwünschtes Substrat anstelle einer generellen Erweiterung des Substratspektrums, oder der Einbau der biosynthetischen ECR-Logik in klassische PKS-Systeme, die sonst keine  $\beta$ -substituierten Malonate als Bausteine verwenden. Es wird interessant sein, die Entwicklung dieser Methodik in nächster Zukunft zu beobachten.

### Danksagung

Unsere Forschungen werden durch die DFG (Emmy-Noether-Programm, CISP) unterstützt. J.K. dankt der Jürgen-Manchot-Stiftung für ihr Promotionsstipendium.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 858–860  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 868–870

- 
- [1] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811.  
[2] B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70–99.

- [3] a) Y. A. Chan, A. M. Podevels, B. M. Kevany, M. G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 90–114; b) M. C. Wilson, B. S. Moore, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 72–86.  
[4] a) T. J. Erb, I. A. Berg, V. Brecht, M. Müller, G. Fuchs, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10631–10636; b) T. J. Erb, V. Brecht, G. Fuchs, M. Müller, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8871–8876.  
[5] a) A. S. Eustáquio, R. P. McGlinchey, Y. Liu, C. Hazzard, L. L. Beer, G. Florova, M. M. Alhamadsheh, A. Lechner, A. J. Kale, Y. Kobayashi, K. A. Reynolds, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12295–12300; b) Y. Liu, C. Hazzard, A. S. Eustáquio, K. A. Reynolds, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10376–10377.  
[6] Ausgewählte Beispiele: a) A. S. Eustáquio, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3936–3938; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4000–4002 (Salinosporamide); b) S. Rachid, L. Huo, J. Herrmann, M. Stadler, B. Köpcke, J. Bitzer, R. Müller, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 922–931 (Cinnabaramide); c) Y. Yan, J. Chen, L. Zhang, Q. Zheng, Y. Han, H. Zhang, D. Zhang, T. Awakawa, I. Abe, W. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12308–12312; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12534–12538 (Antimycin).  
[7] N. Quade, L. Huo, S. Rachid, D. W. Heinz, R. Müller, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 117–124.  
[8] D. M. Peter, L. S. von Borzyskowski, P. Kiefer, P. Christen, J. A. Vorholt, T. J. Erb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13457–13461; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13659–13663.  
[9] Nummerierung hier entsprechend der von CcrCc aus *Caulobacter crescentus*; I169/F373 entspricht I171/F370 in CinF.  
[10] L. Zhang, T. Mori, Q. Zheng, T. Awakawa, Y. Yan, W. Liu, I. Abe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13462–13465; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13664–13667.

Eingegangen am 9. November 2015

Online veröffentlicht am 11. Dezember 2015