

Das Zusammenspiel zwischen einer multifunktionalen Dehydratase-Domäne und einer C-Methyltransferase bewirkt die Doppelbindungsverschiebung in der Ambruticin-Biosynthese

Gesche Berkhan, Christian Merten, Claudia Holec und Frank Hahn*

Abstract: Die Doppelbindungsverschiebung ist eine wichtige Modifizierung während der Polyketidbiosynthese. Insbesondere für *cis*-AT-PKS vom Typ I ist nur wenig über die enzymatischen Mechanismen bekannt. Wir präsentieren unsere *In-vitro*-Studien zur Doppelbindungsverschiebung während der Ambruticin-Biosynthese. Die multifunktionale AmbDH4-Domäne katalysiert aufeinander folgende Dehydratisierung, Epimerisierung und Enoylisomerisierung. Das erhaltene 3-Enthioat wird durch α -Methylierung, katalysiert durch die C-Methyltransferase AmbM, aus dem Gleichgewicht entfernt. Dieser thermodynamisch eigentlich ungünstige Prozess wird jedoch durch die hohe und aufeinander abgestimmte Substratspezifität der beteiligten Enzyme ermöglicht. AmbDH4 ist eng verwandt mit DH-Domänen, wobei erste mechanistische Studien vermuten lassen, dass die Doppelbindungsisomerisierung, ähnlich wie bei EI-Domänen aus *trans*-AT-PKS, über die Verschiebung eines einzelnen Protons verläuft.

Polyketide bilden eine vielfältige Gruppe aus Naturstoffen mit hoher pharmakologischer Relevanz. Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ I bauen während der Polyketidbiosynthese hoch funktionalisierte Grundgerüste auf. Diese multimodularen Mega-Enzymkomplexe vollbringen die Rückgrat-Verlängerung durch decarboxylierende Claisen-artige Kondensationen, katalysiert im Zusammenspiel von Ketosynthase-(KS)- und Acyltransferase(AT)-Domänen sowie Acyl-Trägerproteinen (ACP). Der erhaltene β -Ketothioester kann individuell durch die reduktive Schleife, bestehend aus Ketoreduktase(KR)-, Dehydratase(DH)- und Enoylreduktase-

(ER)-Domänen, funktionalisiert werden. Weitere Modifizierungen am Grundgerüst können durch unkonventionelle PKS-Domänen oder „Tailoring“-Enzyme erfolgen.^[1-5]

Eine solche Modifizierung ist die Verschiebung einer Doppelbindung aus der ursprünglich durch die PKS eingebrachten Position. Erste Studien hierzu erfolgten zu den *trans*-AT-PKS-Produkten Bacillaen (**1**), Rhizoxin (**2**) und Corallopyronin A (**4**) sowie zum *cis*-AT-PKS-Produkt Ansamitocin (**5**, Abbildung 1). Für die Biosynthese von Bacillaen (**1**) und

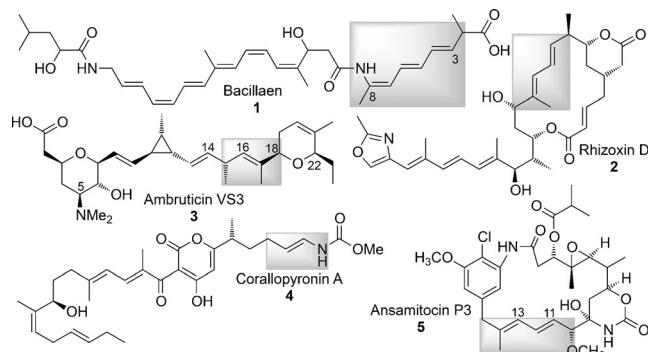


Abbildung 1. Ausgewählte Polyketide mit verschobenen Doppelbindungen.^[3,6-10]

Rhizoxin (**2**) wurde durch *In-vivo*-Studien gezeigt, dass die verschobene Polyeneinheit schrittweise, durch unmittelbare Isomerisierung zuvor isoliert eingeführter Doppelbindungen, erfolgt.^[6,7,11] Während die ersten Isomerisierungsschritte in beiden Fällen scheinbar durch multifunktionale DH-Domäne katalysiert werden, erfolgt die finale Verschiebung durch ein „Verschiebungsmodul“, welches auf das primäre DH-Produkt einwirkt. Verschiebungsmodule enthalten Enoylisomerase(EI)-Domänen als katalytisch aktive Einheit (BaeEI16 oder RhiE-EI). Keatinge-Clay et al. veröffentlichten kürzlich eine detaillierte Untersuchung der PksEI14-Struktur (ein nahe Homologes von BaeEI16) und stellten einen hypothetischen Mechanismus vor.^[9] Eine konformativ flexible Histidin-Seitenkette in der aktiven Tasche verschiebt ein Proton zwischen der α - und γ -Position des PKS-Intermediates.^[9] Diese Hypothese wurde durch *In-vitro*-Experimente gestützt, in denen die Rückreaktion verfolgt wurde. Schäferle et al. zeigten, dass CorEI3 aus der Biosynthese von Corallopyronin A (**4**) die Verschiebung einer einzelnen, zuvor gebildeten Doppelbindung in die Konjugation zum Stickstoff eines Methylcarbamates katalysiert.^[10] Basierend auf den Ergebnissen von *In-vivo*-Supplementierungsstudien wurde für Ansamitocin eine vinyloge Dehydratisierung während der PKS-kata-

[*] G. Berkhan, Prof. Dr. F. Hahn

Professur für Organische Chemie (Lebensmittelchemie)
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth (Deutschland)
und
Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe, Leibniz Universität Hannover
Schneiderberg 38, 30167 Hannover (Deutschland)
E-Mail: frank.hahn@oci.uni-hannover.de
Homepage: <http://www.oci.uni-hannover.de/hahn-group.html>

Dr. C. Merten
Ruhr-Universität Bochum, Organische Chemie 2
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)

C. Holec
Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich
Stettener Forst, Geb. 15.8, 52426 Jülich (Deutschland)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)
 eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201607827> zu finden.

lysierten Verlängerung postuliert.^[8,12] Bis heute konnte die thermodynamisch nicht begünstigte Vorwärtsreaktion allerdings nicht *in vitro*, durch Reaktion einer EI-Domäne mit realistischen Substratanaloga bestätigt werden.

Die antifungalen Ambruticine (Ambruticin VS3 (**3**), Abbildung 1) sind myxobakterielle *cis*-AT-Typ-I-PKS-Produkte mit einer interessanten Leitstruktur für die Entwicklung neuer Antimykotika.^[13–15] Der Ambruticin-Biosyntheseweg beinhaltet zudem zahlreiche bis jetzt nicht aufgeklärte enzymatische Schritte.^[16] Das „Ostfragment“ besteht aus einem Dihydropyranring verknüpft mit einer 1,4-Dienyl-Seitenkette (C13 bis C17 in **3**). In vorausgegangenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass die Pyranbildung durch die bifunktionale Domäne AmbDH3 geschieht, welche aufeinanderfolgende Dehydratisierung und Oxa-Michael-Addition zu **7** katalysiert (Abbildung 2a).^[3]

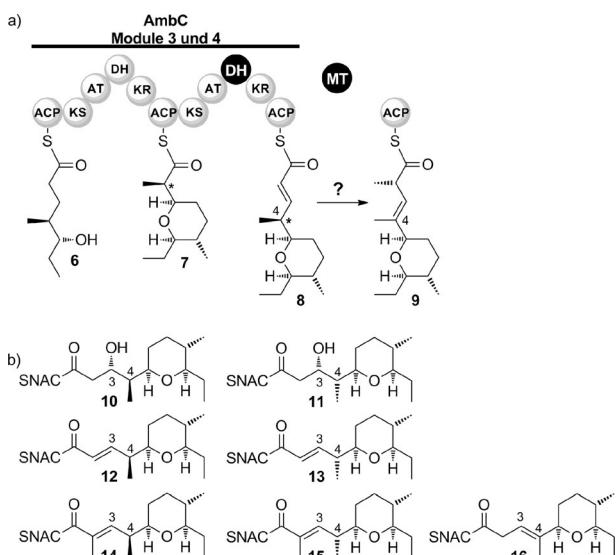


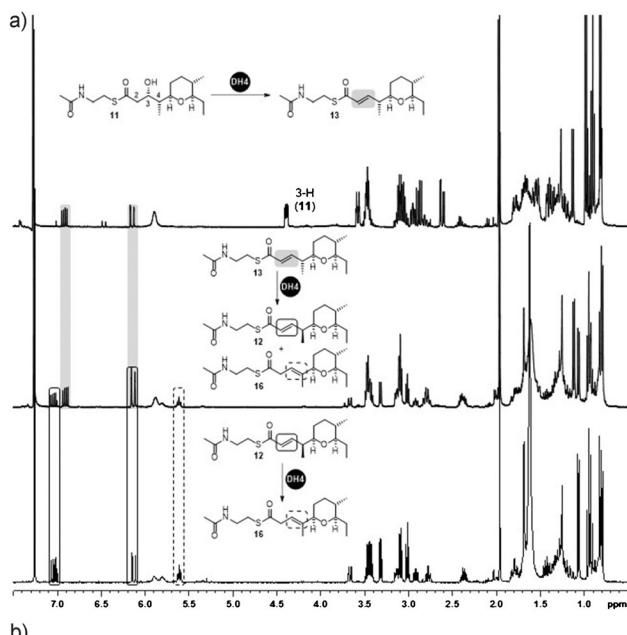
Abbildung 2. a) Ausschnitt aus dem postulierten Ambruticin-Biosyntheseweg. AmbDH4 und AmbM sind schwarz hervorgehoben.
b) Struktur der synthetischen Substratsurrogate **10–15** und des Enzymproduktes **16**. SNAC: *N*-Acetylcysteamin.

Die Einführung der verschobenen Doppelbindung zwischen C16 und C17 in **3** muss somit während der Prozessierung in Modul 4 erfolgen (Schema S1). Modul 4 beinhaltet neben einer Malonyl-CoA spezifischen AT- auch eine KR- und eine DH-Domäne, was den α,β -ungesättigten Thioester **8** als dessen primäres Produkt nahelegt (Abbildung 2a).^[16] Die Verzweigung an C15 der Ambruticin-Grundstruktur muss folglich durch nachträgliche Methylierung erfolgen, für welche die C-Methyltransferase (C-MT) AmbM als einleuchtender Kandidat im *amb*-Gencluster codiert ist.

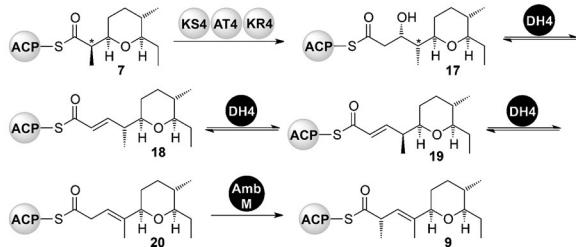
Wir begannen unsere Untersuchungen mit *In-vitro*-Studien, in denen wir die vermeintlich beteiligten Enzyme mit synthetisch gewonnenen Substratsurrogaten zur Reaktion brachten. Alle Substrate wurden zur Imitierung der ACP-gebundenen Form der Biosyntheseintermediate als *N*-Acetylcysteamin(SNAC)-Thioester synthetisiert. Das charakteristische LED-Motiv in der AmbKR4-Aminosäuresequenz

weist auf eine 3-D-Konfiguration der AmbDH4-Vorstufe hin.^[17,18] Es wurden sowohl 4-D- als auch 4-L-konfigurierte Substratserien synthetisiert (Abbildung 2b, Schema S1–S9), wobei jede Serie die 3-D-konfigurierte AmbDH4-Vorstufe (**10** oder **11**), das (*E*)-konfigurierte DH-Produkt (**12** oder **13**) und die α -methylierte Variante von letzterem (**14** und **15**) beinhaltete. Die C4-Epimere wurden jeweils als racemisches, trennbares Gemisch synthetisiert. Die 4-D-konfigurierten Substrate **10** und **12** wurden zusätzlich stereoselektiv hergestellt, wobei der Schlüsselschritt die AmbDH3-katalysierte, stereoselektive Synthese des SNAC-Analogs von Pyran **7** war. Die absolute Konfiguration von **10** und **11** wurde zusätzlich durch VCD-Spektroskopie bestätigt (Abbildungen S1 und S2). Die Grenzen von AmbDH4 wurden in Analogie zu vorherigen Studien ermittelt, und die Gene *ambDH4* und *ambM* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert.^[3,5,19–22] AmbDH4 wurde unmittelbar nach Reinigung mittels Affinitätschromatographie in den Aktivitätstests eingesetzt. AmbM wurde aufgrund von Verlusten an Enzymaktivität während der Reinigung direkt in Form des Totallysates verwendet (Abbildungen S3 und S4).

Bedingt durch fast identische Retentionszeiten der Substrate **12**, **13** und **16** bei der HPLC-MS-Analyse wurden alle Enzymaktivitätstests im semipräparativen Maßstab (ca. 3 mg Startmaterial) durchgeführt, und durch NMR-Spektroskopie wurden sowohl der Umsatz als auch die Konstitution und Konfiguration der Reaktionsprodukte eindeutig bestimmt (Schema 1). Der Stabilitätsnachweis von **10–15** erfolgte durch enzymfreie Inkubation unter den Bedingungen des Enzymtests (Abbildungen S5, S6, S13–16). AmbDH4 katalysierte die selektive Dehydratisierung des 3-Hydroxythioesters **11** zum 2-*E*-Enthioat **13** (ca. 27% Umsatz, Abbildung S15 und Schema 1a). Diese Beobachtung ist überraschend, da in vorherigen Studien eindeutig gezeigt wurde, dass Verbindung **7** 2-D-konfiguriert ist.^[3] Eine Epimerisierung der in **7** und **8** hervorgehobenen Stereozentren muss also während der Prozessierung durch AmbAT4, AmbKS4 und AmbKR4 erfolgen (Schema 1b). Diese Epimerisierung wurde im Lauf dieser Studie nicht weiter untersucht. Die Inkubation von 4-L-konfiguriertem **13** mit AmbDH4 ergab eine Mischung mit dessen C4-Epimer **12** und dem 3-*E*-Enthioat **16** im Verhältnis 41:32:27 (Abbildung S16 und Schema 1a). Die Inkubation von **12** mit AmbDH4 führte ausschließlich zur Bildung von **16** (~33% Umsatz, Abbildung S17 und Schema 1a), was ausschließt, dass es sich bei **12** um ein Abfallprodukt der Biosynthese handelt. Entsprechend ergab die Umsetzung von **16** mit AmbDH4 ausschließlich Verbindung **12** (ca. 48% Umsatz, Abbildung S19). Keines der Substrate **10**, **14** und **15** ergab einen Umsatz in der Reaktion mit AmbDH4, was nahelegt, dass deren Aktivität stark von der Substratkonfiguration an C4 und dem Methylierungsgrad an C2 abhängt. Diese Ergebnisse zeigen, dass AmbDH4 eine außergewöhnliche dreifache katalytische Aktivität aufweist und aufeinanderfolgend als Dehydratase, Epimerase und Enoylisomerase fungiert (Schema 1b). Sie stehen in deutlichem Gegensatz zu vorherigen Studien, in denen PKS-DH-Domänen eine geringe Substratspezifität bezüglich der Konstitution im Polyketidanteil von Substraten zeigten.^[3,19–22]



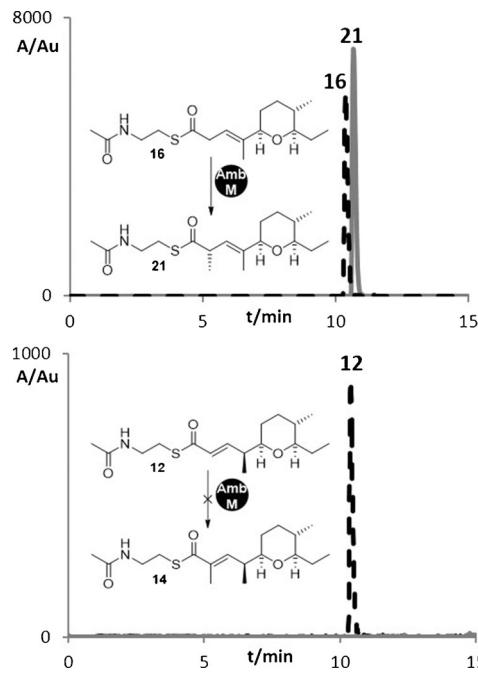
b)



Schema 1. a) ^1H -NMR-Analyse (400 MHz, CDCl_3) der Enzymaktivitäts-
tests im semipräparativen Maßstab mit AmbDH4: oben: Umsetzung
von **11** zu **13**; Mitte: Umsetzung von **13** zu **12** und **16**; unten: Umsetzung
von **12** zu **16**. b) Postulierter Verlauf der Biosynthese von **7** zu **9**.

Zur Aufklärung der Rolle der C-MT AmbM führten wir Umsetzungen von AmbM mit **12** und **16** durch, in denen eine Umsetzung nur für das 3-Enthioate **16** festgestellt wurde (Schema 2, Abbildungen S6–S11). Gemeinsam mit der Unfähigkeit von AmbDH4, die methylierten Substrate **14** und **15** zu akzeptieren, legt diese Spezifität ein Szenario nahe, in dem AmbDH4 zunächst ein Gleichgewicht zwischen **17–20** einstellt. Aufgrund der strikten Substratspezifität von AmbM entfernt dieses ausschließlich 3-Enthioat **20** aus dem Gleichgewicht und wandelt es um in **9**. Dieses Zusammenspiel ermöglicht die Doppelbindungsverschiebung trotz Verlust der Konjugation zum Thioester. Im Einklang hiermit ist, dass weder 15-Desmethyl-Derivate noch solche mit einem konjugierten 13,15-Dien aus dem Wildtyp *Sorangium cellulosum* So ce10 isoliert wurden.^[16] Die Verschiebung der Doppelbindung und die α -Methylierung sind offensichtlich eng miteinander verknüpfte Ereignisse, die vor Weitergabe des Modul-4-Produktes an Modul 5 vollständig ablaufen müssen.

Aminosäure-Sequenzvergleiche zu repräsentativen DH- und EI-Domänen zeigten, dass AmbDH4 sowohl die DH-charakteristische katalytische Diade, bestehend aus His18 und Asp182, als auch die Einheiten Pro27 und His186 aufweist (Abbildung S22).^[9,10] In EI-Domänen sind diese Einheiten zu Leu/Val27, Asp182 und Leu/Val186 mutiert. Kea-



Schema 2. HPLC-MS-Analyse der Inkubation von AmbM mit den Thioestern **16** und **12**.

tinge-Clay et al. wiesen Pro27 eine Schlüsselrolle zu. Dieses beschränkt die Flexibilität von His18 in der aktiven Tasche von DH-Domänen und verhindert dadurch den Protonentransfer zwischen C2 und C4 des Substrates. In EI-Domänen ist Pro27 zu den sterisch weniger anspruchsvollen Leu oder Val mutiert. Eine phylogenetische Analyse zeigte eine enge Verwandtschaft von AmbDH4 zu AmbDH2 und AmbDH3 und lediglich geringe Nähe zu EI-Domänen (Abbildung S23).

Erste mechanistische Details zur Enoyl-Isomerisierung wurden durch Inkubationsexperimente in deuteriertem Puffer gewonnen (Abbildung S19 und S20).^[9,10] Während Verbindung **12** binnen 16 Stunden keinen spontanen H-zu-D-Austausch zeigte, erfuhr 3-Enthioat **16** einen spontanen H-2-zu D-2-Austausch und ergab eine Mischung von **16** und **2,2-D₂-16** (46:54). Inkubation von **12** mit AmbDH4 in deuteriertem Puffer ergab eine komplexe Mischung aus **12**, **16** und verschiedenen deuterierten Verbindungen. Reinigung mittels semipräparativer HPLC ergab zwei Fraktionen, jeweils bestehend aus **12** oder **16** sowie deren deuterierten Kongeneren. In der Fraktion mit **12** betrug der Deuterierungsgrad an C2 und C4 je 55 %. In der Fraktion mit **16** fand sich eine zusätzliche monodeuterierte Verbindung, deren Bildung auf die Einwirkung von AmbDH4 zurückzuführen sein muss (**16**-2-D-**16**/2,2-D₂-**16** (43:37:20)). Es war nicht möglich zu bestimmen, ob und in welchem Verhältnis die beiden 2-D-Epimere von **16** gebildet wurden.

Die Aktivität von AmbDH4 führt im Vergleich zur spontan ablaufenden Hintergrundreaktion zur Verringerung des Deuterierungsgrades in **16** von 54 % auf 49 % und bringt daher nicht aktiv Deuterium ins Molekül ein (Schema S10). Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass ein D₂O-Molekül aus dem Puffer oder eine prädeuterierte Aminosäure-Seitenkette am katalytischen Prozess beteiligt ist.^[9] Die Akkumulation

von 2-D-**16** und die Deuterierung an C2 und C4 in **12** zeigen, dass AmbDH4 aktiv H/D zwischen diesen beiden Positionen verschiebt. Obwohl His18 ein einleuchtender Kandidat wäre, kann zum jetzigen Zeitpunkt über die Natur der entscheidenden Aminosäure nur spekuliert werden (Schema S10b). Mit Blick auf die Ergebnisse des Aminosäure-Sequenzvergleichs beruht die Fähigkeit zur Enoylisomerisierung wohl auf subtilen Veränderungen des aktiven Zentrums von AmbDH4 im Vergleich zu anderen DH-Domänen.

Zusammenfassend beschreiben wir hier unsere In-vitro-Studien zur biosynthetischen Rolle der ungewöhnlichen PKS-Domäne AmbDH4 mit dreifacher katalytischer Aktivität, die als DH, Epimerase und EI agiert. Im Zusammenspiel mit der C-MT AmbM bewirkt sie die thermodynamisch ungünstige Kaskade aus Doppelbindungsverschiebung und Methylierung, die zur Bildung des 3-Methyl-1,4-pentadien-Fragmentes der Ambruticine führt. Die Resultate eines Inkubationsexperiments in deuteriertem Puffer lassen vermuten, dass der Enoylisomerisierung ein ähnlicher Protonenverschiebungsmechanismus zugrunde liegt, wie er für PksEI14 aus der Baccalaen-Biosynthese beschrieben wurde. Unsere Studien tragen zum Verständnis von Enoylisomerisierungen während der PKS-Prozessierung bei und vereinfachen weitere Studien ähnlicher Domänen in der Zukunft. Weitere mechanistische Details könnten durch strukturelle Studien der Domäne und In-vitro-Studien mit spezifisch deuterierten Substraten gewonnen werden. Das 3-Methyl-1,4-pentadien-Fragment ist häufig in reduzierten Polyketiden anzutreffen und wird oft durch aufwendige Bearbeitung von Roche-Ester-Bausteinen eingebracht. Die Verwendung des Enzympaares AmbDH4-AmbM könnte eine elegante Alternative für dessen Einführung im späten Stadium von Syntheserouten bieten.

Danksagung

Dies Projekt wurde durch das Emmy-Noether-Programm der DFG (HA 5841/2-1), das Marie-Curie-Programm der EU (Projekt-Nr.: 293430) und das Graduiertenkolleg MINAS (Promotionsstipendium für G.B.) gefördert. C.M. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie (FCI) für ein Liebig-Stipendium und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung durch das Exzellenzcluster RESOLV („Ruhr Explores Solvation“, EXC 1069). C.H. ist Trägerin eines Chemiefonds-Stipendium von dem FCI. Wir danken Gerald Dräger und der MS- sowie der NMR-Abteilung des OCI Hannover.

Stichwörter: Biosynthese · Dehydratasen · Enoylisomerasen · Methyltransferasen · Polyketide

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13589–13592
Angew. Chem. **2016**, *128*, 13787–13790

- [1] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811.
- [2] S. Friedrich, F. Hahn, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473–1508.
- [3] G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240–14244; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14464–14468.
- [4] T. Bretschneider, J. B. Heim, D. Heine, R. Winkler, B. Busch, B. Kusebauch, T. Stehle, G. Zocher, C. Hertweck, *Nature* **2013**, *502*, 124–128.
- [5] P. Pöplau, S. Frank, B. I. Morinaka, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13215–13218; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 13457–13460.
- [6] J. Moldenhauer, D. C. G. Götz, C. R. Albert, S. K. Bischof, K. Schneider, R. D. Süßmuth, M. Engeser, H. Gross, G. Bringmann, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1465–1467; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1507–1509.
- [7] B. Kusebauch, B. Busch, K. Scherlach, M. Roth, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1460–1464; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1502–1506.
- [8] F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812–3813.
- [9] D. C. Gay, P. J. Spear, A. T. Keatinge-Clay, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2374–2381.
- [10] F. Lohr, I. Jenniches, M. Frizler, M. J. Meehan, M. Sylvester, A. Schmitz, M. Gütschow, P. C. Dorrestein, G. M. König, T. F. Schäberle, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4175–4180.
- [11] J. Moldenhauer, X.-H. Chen, R. Borris, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8195–8197; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8343–8345.
- [12] P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carroll, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14236–14237.
- [13] L. Vetcher, H. G. Menzella, T. Kudo, T. Motoyama, L. Katz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3734–3736.
- [14] G. Höfle, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 941–945.
- [15] S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter, M. von Strandtmann, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 371–375.
- [16] B. Julien, Z.-Q. Tian, R. Reid, C. D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1277–1286.
- [17] P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657.
- [18] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79.
- [19] N. Kandziora, J. N. Andexer, S. J. Moss, B. Wilkinson, P. F. Leadlay, F. Hahn, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3563–3567.
- [20] O. Vergnolle, F. Hahn, A. Baerga-Ortiz, P. F. Leadlay, J. N. Andexer, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1011–1014.
- [21] C. R. Valenzano, Y.-O. You, A. Garg, A. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14697–14699.
- [22] X. Guo, T. Liu, C. R. Valenzano, Z. Deng, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14694–14696.

Eingegangen am 11. August 2016
 Online veröffentlicht am 27. September 2016