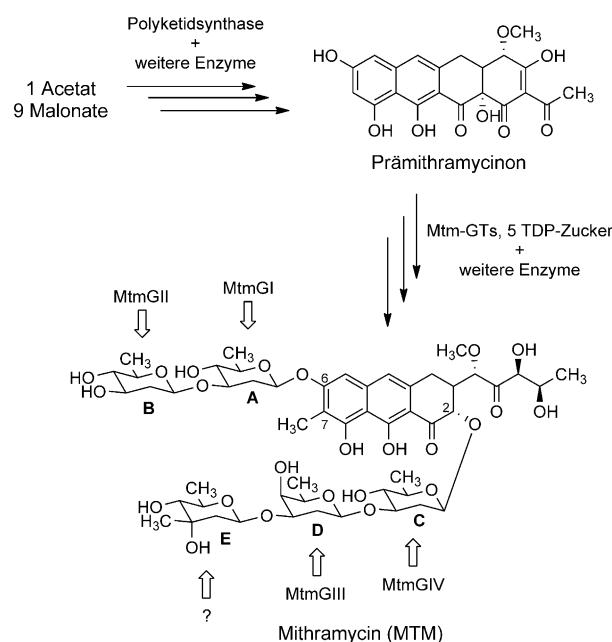


Zusammenwirken zweier difunktionaler Enzyme bei Aufbau und Verknüpfung von Desoxyzuckern des Antitumor-Antibiotikums Mithramycin**

Guojun Wang, Pallab Pahari, Madan K. Kharel, Jing Chen, Haining Zhu, Steven G. Van Lanen und Jürgen Rohr*

Durch Glycosyltransferasen (GTs) katalysierte Glycosylierungsreaktionen gehören zu den wichtigsten Strukturmodifikationen, die oft notwendig sind für die Entfaltung biologischer Aktivitäten von Naturstoffen.^[1] Die meisten GTs sind strikt substrat- und regiospezifisch, es gibt aber einige Beispiele, wo überraschend breite Substratspezifitäten gefunden wurden, die für kombinatorisch-biosynthetische Ansätze genutzt werden können.^[1b,c]

Mithramycin (MTM), ein hochglykosiertes Aureolsäure-Antikrebs-Antibiotikum, besteht aus einem tricyclischen Aglykon mit zwei Alkylseitenketten, das über den Polyketidweg aufgebaut wird. An dieses geknüpft sind in 6- und 2-Position fünf Zuckerbausteine (drei D-Olivosen, eine D-Oliose und eine D-Mycarose) in Form einer Disaccharid-Zucker A and B) und einer Trisaccharid-Kette (Zucker C-E; Schema 1).^[2] Diese Zuckerketten sind essenziell für die Fähigkeit von MTM, an DNA zu binden und diese zu vernetzen, wodurch Replikations- und Transkriptionsvorgänge verhindert werden.^[3] Etliche Studien wurden durchgeführt, um den biosynthetischen Aufbau dieser MTM-Saccharidketten aufzuklären. Gen-Inaktivierungsexperimente führten zu der Erkenntnis, dass MtmGIV den ersten Glykosylierungsschritt katalysiert (Verknüpfung von Zucker C), gefolgt von dem Transfer von Zuckerbaustein D durch MtmGIII.^[4] Nach Fertigstellung des Trisaccharids transferieren dann MtmGI und MtmGII die beiden D-Olivose-Bausteine (Zucker A und B) des Disaccharids.^[5] Jedoch verblieb Unklarheit bezüglich des Transfers des D-Mycarose-Baustein (Zucker E) der Trisaccharidkette, dem keine GT zugeordnet werden konnte. MtmGIV wurde als verantwortlich für diesen Schritt vorgeschlagen,^[6] doch es blieben erhebliche Zweifel; denn eine Doppelrolle einer GT, die zwei verschiedene Zucker-Donor-



Schema 1. Überblick über die Biosynthese und Struktur von MTM. Zuckerbausteine A, B und C: D-Olivose; Zucker D: D-Oliose; Zucker E: D-Mycarose.

und zwei erheblich unterschiedliche Akzeptorsubstrate verwendet, war bislang nicht bekannt. Bis vor kurzem gab es auch noch Lücken im Wissen über den Biosyntheseweg von D-Olivose, dem wichtigsten Zuckerbaustein von MTM. Jedoch konnte eine Rekonstitution der Biosynthese von Thymidindiphosphat(TDP)-D-Olivose unter Verwendung von Enzymen des MTM-Biosyntheseweges oder von funktionell-äquivalenten Homologen (Schema 2)^[7] klären, dass MtmC die 4-Ketoreduktion katalysiert. Zuvor war MtmC nur als S-Adenosylmethionin(SAM)-abhängige C-Methyltransferase beschrieben worden, die zur Biosynthese des verzweigten D-Mycarose-Bausteines (Zucker E) beiträgt.^[6] MtmTIII agiert dort als einmalige 4-Ketoreduktase und folgt unmittelbar dem MtmC-katalysierten Schritt (Schema 2).^[6]

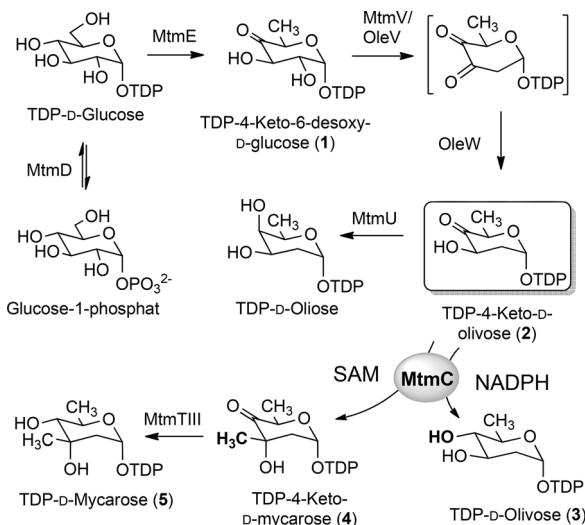
Um die exakten Rollen von MtmGIV, MtmC und MtmTIII beim Aufbau der Trisaccharidkette zu klären, haben wir nun den Biosyntheseweg von D-Mycarose *in vitro* rekonstituiert. MtmC wurde überproduziert in *Escherichia coli* wie zuvor beschrieben,^[7] gereinigt bis fast zur Homogenität (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) und dann bezüglich seiner C-Methyltransferase-Aktivität getestet.

[*] Dr. G. Wang, Dr. P. Pahari,^[†] Dr. M. K. Kharel, Prof. Dr. S. G. Van Lanen, Prof. Dr. J. Rohr
Department of Pharmaceutical Sciences
College of Pharmacy, University of Kentucky
789 South Limestone Street, Lexington, KY 40536 (USA)
E-Mail: jrohr2@email.uky.edu

Dr. J. Chen, Prof. Dr. H. Zhu
Department of Biochemistry, University of Kentucky
Lexington, KY, 40536 (USA)

[†] Aktuelle Adresse: Synthetic Organic Chemistry Division
CSIR North East Institute of Science and Technology
Jorhat, Assam, 785006 (Indien)

[**] Diese Arbeit wurde gefördert durch die NIH (CA 091901 für J.R.).
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201205414> zu finden.



Schema 2. Biosyntheseweg der MTM-Zuckerbausteine. Beachtlicherweise spielt MtmC eine Doppelrolle als C-Methyltransferase und 4-Ketoreduktase.

tet, unter Verwendung von TDP-4-Keto-d-Olivose (**2**, Schema 2) und SAM als Substraten. **2** wurde ausgehend von TDP-4-Keto-6-desoxy-d-glucose (**1**) hergestellt, unter Verwendung des Enzympaares OleV/OleW (wobei OleV ein MtmV-Homolog des Oleandomycinweges ist)^[8] und eines NADPH-Regenerationssystems bestehend aus Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD).^[7]

Das Substrat **2** wurde verbraucht, wenn MtmC mit reinem **2** und SAM inkubiert wurde, jedoch konnte kein neues TDP-Zucker-Produkt detektiert werden (Abbildung S2). Wenn dagegen reines **2** durch eine Rohpräparation (OleV/OleW-Reaktionen zur In-situ-Herstellung von **2**) ersetzt wurde, konnte ein neues Produkt beobachtet werden, das zusammen mit TDP-d-Olivose (**3**) eluiert (Abbildung 1, Spur b). Dieses neue Produkt konnte nicht weiter reduziert werden, weder durch MtmTIII noch chemisch mit NaBH₄ (Abbildung 1, Spur c und d), sodass ein Keto-Zucker-Derivat ausgeschlossen werden konnte. Das Produkt wurde schließlich durch ¹H-NMR-Spektroskopie als **3** identifiziert (siehe die Hintergrundinformationen). Seine Bildung kann durch die zuvor

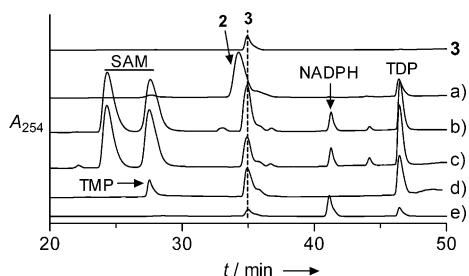


Abbildung 1. HPLC-Spuren von Zuckerreaktionen, die von MtmC katalysiert werden. a) rohes **2** ohne MtmC; b) rohes **2** + MtmC + SAM + NADPH; c) Hinzugabe von MtmTIII und NADPH zu (b); d) Hinzugabe von NaBH₄ zu (b); e) MtmC + reines **2** + NADPH. A₂₅₄: Absorption bei 254 nm Wellenlänge.

beobachtete 4-Ketoreduktase-Aktivität von MtmC erklärt werden. Diese Reduktion fand auch statt, wenn MtmC mit reinem **2** und NADPH inkubiert wurde (Abbildung 1, Spur e). Obwohl es unmöglich war, ausgehend von reinem **2** und SAM ein methyliertes MtmC-Produkt zu finden, war aus dem Verschwinden von **2** zu schließen, dass eine Reaktion stattgefunden hatte, die offenbar zu einem instabilen Produkt führte. Es ist möglich, dass die axiale 3-OH-Gruppe, die gleichzeitig mit der 3-Methylierung gebildet wird, das proximale Phosphat angriff und die Phosphodiesterbindung spaltete, wobei der durch HPLC-UV detektierbare Thymidin-Chromophor (Abbildung S2) verloren ging, analog zu einem Mechanismus, den andere und wir kürzlich identifiziert haben.^[9]

Wir erhofften nun, diese Instabilität des methylierten Zuckerproduktes durch Kupplung der Methylierungsreaktion mit dem erwarteten MtmGIV-Glycosyltransfer zu umgehen. Wir versuchten deshalb, das Enzym MtmGIV in *E. coli* überzuproduzieren. Dieser Ansatz führte zwar zu einem löslichen Protein, das aber inaktiv war. Auch der Versuch, funktionelles MtmGIV über *S. lividans* TK64 zu gewinnen, schlug fehl, aber es gelang, das *mtmGIV*-Gen in der *S. argillaceus*-Δ*mtmGIV*-Mutante M3G4 überzuexprimieren. Diese Mutante produziert Prämithramycinon (**6**, Schema 1 und 3),^[4] und die Komplementation mit *mtmGIV* restaurierte die MTM-Produktion vollständig, was auch bedeutete, dass aktives MtmGIV überproduziert wurde (Abbildung S3). MtmGIV konnte aus dieser komplementierten Mutante isoliert und nahezu zur Homogenität gereinigt werden (Abbildung S4).

Zunächst wollten wir die Glycosyltransferase-Aktivität von MtmGIV überprüfen, indem wir seine erste Glykosylierungsreaktion (Schema 3) testeten, nämlich den Transfer von d-Olivose (Zucker C) auf das Akzeptorsubstrat **6**. Inkubation von MtmGIV mit **6** und purem **3** führte zum Auftreten eines neuen Peaks (Abbildung 2, Spur a) mit einem [M-H]⁻-Ion bei *m/z* 543.1 (Abbildung S5), dessen HRMS- (Tabelle S1) und ¹H-NMR-Spektren (Abbildung S6) konsistent mit der

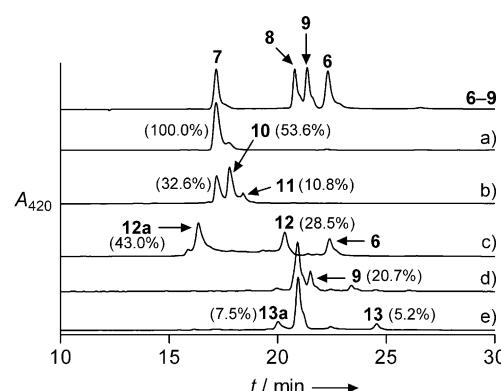
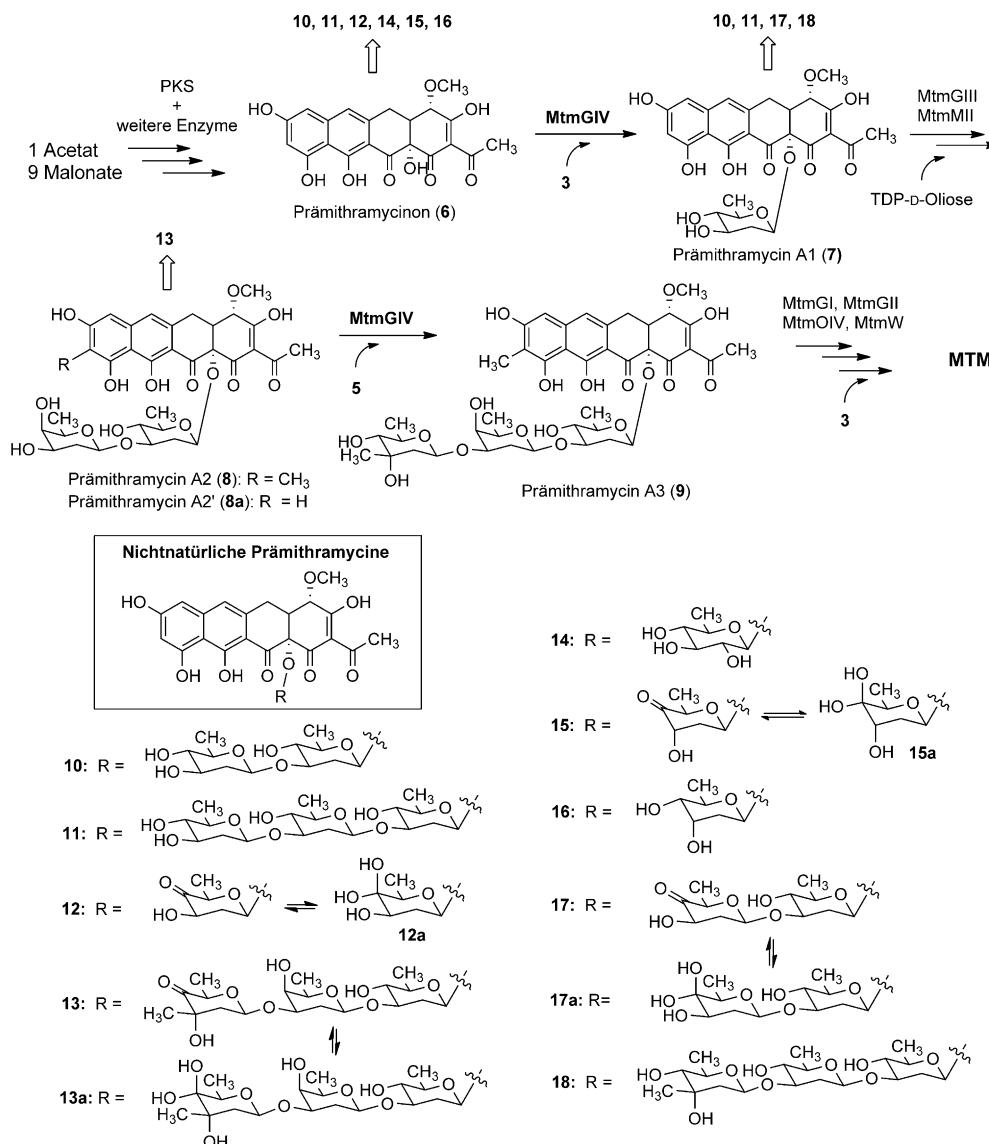


Abbildung 2. HPLC-Spuren der MtmGIV-katalysierten Glycosylierungsreaktionen, mit **6** (a–c) oder **8** (d,e) als Akzeptorsubstrat. a) MtmGIV + **6** + **3**; b) MtmGIV + **6** + Überschuss an **3** (0.8 mM); c) MtmGIV + **6** + **2**; d) MtmGIV + **8** + *in situ* erzeugtes **5**; e) MtmGIV + **8** + *in situ* erzeugtes **4**. In Klammern sind Umsätze [%] angegeben. A₄₂₀: Absorption bei 420 nm Wellenlänge.



Schema 3. Vorgeschlagene Biosynthesewege für den Aufbau der MTM-Trisaccharid-Seitenkette und Strukturen nichtnatürlicher glykosylierter Prämithramycine.

Struktur von Prämithramycin A1 (**7**) waren, wodurch die Enzymaktivität von MtmGIV und dessen Rolle als Initiator der Trisaccharidkette bestätigt wurden. Wie erwartet waren die Kontrollproteine, die aus M3G4-Zellen gewonnen wurden, die nur den leeren Vektor enthielten, nicht in der Lage, **6** zu glykosylieren. Es zeigte sich, dass MtmGIV optimal bei pH 8 reagiert (Abbildung S7). Bei Überschussmengen von **3** bewirkte MtmGIV interessanterweise auch eine mehrfache, iterative Übertragung von D-Olivosyl-Einheiten auf **6**, was zu Di- und Triolivosyl-Prämithramycinonen (**10** und **11**, Schema 3) führte (Abbildung 2, Spur b). Die Strukturen **10** und **11** wurden durch HRMS bestätigt (Tabelle S1).

Weil einige früher isolierte MTM-Derivate Ketozucker in C- und E-Position enthielten,^[6] wollten wir auch testen, ob MtmGIV Ketoolivose (**2**) übertragen kann. Der Test mit Akzeptorsubstrat **6** und Donorsubstrat **2** ergab zwei neue Produkte, die im LC-MS-Retentionszeiten (t_{Ret}) von 20.3 und 16.3 min aufwiesen (Abbildung 2, Spur c). Die entsprechen-

den $[M-H]^-$ -Ionen mit m/z 541.1 bzw. 559.1 (Abbildung S5) und die dazugehörigen HRMS-Daten (Tabelle S1) bestätigten die Summenformeln für das erwartete 4-Keto-D-olivosyl-Prämithramycinon ($C_{27}H_{26}O_{12}$, **12**, Schema 3) und sein Hydrat ($C_{27}H_{28}O_{13}$, **12a**), was bewies, dass MtmGIV sowohl den 4-Ketozucker als auch den normalen reduzierten Zucker auf das Akzeptorsubstrat **6** übertragen kann. Diese Flexibilität von MtmGIV bezüglich des Zuckerdonorsubstrats wurde hier zum ersten Mal in vitro demonstriert. Um zu testen, ob die 4-Ketoreduktion des C-Zuckers während der MTM-Biosynthese vor oder nach der MtmGIV-katalysierten Reaktion stattfindet, wurden kinetische Studien durchgeführt. Die Resultate zeigten eine komplett Reaktion von **3** innerhalb von 0.5 h, während die Reaktion mit **2** minimal 8 h benötigte (Abbildung S8), was für den reduzierten TDP-Zucker **3** als das bevorzugte Donorsubstrat von MtmGIV spricht. Diese Schlussfolgerung wurde weiterhin durch Einzelsubstrat-Kinetiksexperimente bestätigt. Die Reaktionen mit beiden

Substraten folgten typischen Michaelis-Menten-Kinetiken, mit $K_M = (0.25 \pm 0.04)$ mM und $k_{\text{cat}} = (2.2 \pm 0.1)$ min⁻¹ bezüglich **3** sowie $K_M = (0.21 \pm 0.04)$ mM und $k_{\text{cat}} = (0.11 \pm 0.02)$ min⁻¹ bezüglich **2** (Abbildung S8).

Nachdem die erste Funktion von MtmGIV, der D-Olivosyl-Transfer auf das Akzeptorsubstrat **6**, bestätigt war, wandten wir uns dem zweiten für MtmGIV postulierten Glykosyltransfer zu: Es galt zu testen, ob eine Mischung der Enzyme MtmC, MtmTIII und MtmGIV in der Lage ist, 1) *in situ* TDP-D-Mycarose aus **2** zu synthetisieren und 2) den Mycarosyltransfer auf Prämithramycin A2 (**8**, Schema 3) zu katalysieren. Als MtmC, MtmTIII und MtmGIV mit **2**, dem Akzeptorsubstrat **8**, SAM und NADPH inkubiert wurden, zeigte die HPLC-Analyse einen neuen Peak für eine Verbindung, die gemeinsam mit Prämithramycin A3 (**9**) eluierte (Abbildung 2, Spur d). Das LC-MS zeigte ein $[M-H]^-$ -Ion bei m/z 831.3 (Abbildung S5), was konsistent ist mit der Summenformel $C_{41}H_{52}O_{18}$ von **9**. Diese wurde auch durch

HRMS (Tabelle S1) und ^1H -NMR-Spektroskopie (Abbildung S9) bestätigt.

Die Daten beweisen, dass MtmGIV tatsächlich zwei Glykosylierungsschritte der MTM-Biosynthese katalysiert, wobei zwei strukturell unterschiedliche Zuckerbausteine auf zwei wesentlich unterschiedliche Akzeptormoleküle übertragen werden. MtmGIV scheint dabei eng mit MtmC zu kooperieren, was uns veranlasste, MtmC weiter zu untersuchen. Die C-Methyltransferase-Aktivität von MtmC wurde weiter getestet durch Weglassen von MtmTIII und NADPH aus der oben beschriebenen Reaktionsmischung, die nun nur noch aus MtmC, MtmGIV, **2**, **8** und SAM bestand. Diese Enzymmischung erzeugte zwei neue Produkte, mit HPLC-Peaks bei $t_{\text{Ret.}} = 24.3$ bzw. 19.8 min lieferten (Abbildung 2, Spur e). Die LC-MS-Analyse dieser Peaks ergab $[M-\text{H}]^-$ -Ionen mit m/z 829.3 und 847.4 (Abbildung S5), die mit den Summenformeln $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{O}_{18}$ für 4-Keto- D -Mycarosyl-Prämitramycin A2 (**13**, Schema 3) bzw. seiner Hydratform ($\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{O}_{19}$, **13a**) übereinstimmten, was durch HRMS (Tabelle S1) bestätigt wurde. Die Resultate bewiesen, dass ein Methyltransfer auf **2** erfolgt war, was Keto- D -Mycarose ergab, und dass auch im zweiten MtmGIV-katalysierten Schritt ein Ketozucker übertragen werden konnte. Die Glykosylierung erfolgt auch mit Prämitramycin A2' (**8a**, Schema 3) als Akzeptorsubstrat (Abbildung S10). Indirekt bestätigten diese Versuche auch *in vitro* die Funktion von Ketoreduktase MtmTIII für die D -Mycarose-Biosynthese, die zuvor aufgrund eines *mtmTIII*-Inaktivierungsexperiments postuliert worden war,^[6] was zur Akkumulation von 4E-Ketomitramycin führte.

Basierend auf der hier gezeigten ungewöhnlichen Substratflexibilität von MtmGIV in der MTM-Biosynthese, wollten wir nun die Substratspezifität von MtmGIV genauer untersuchen, indem wir andere Akzeptoren und weitere TDP-Zucker-Donorsubstrate prüften. Die Glykosylierung von Zuckerbaustein C auf **6** wurde zunächst mit einer Gruppe von TDP-aktivierten Zuckern getestet (Abbildung S11). Ein neuer Peak mit $t_{\text{Ret.}} = 16.2$ min wurde mit TDP- D -Chinovose als Donor beobachtet (Abbildung 3, Spur a). Das $[M-\text{H}]^-$ -Ion bei m/z 558.9 (Abbildung S5) ist dabei konsistent mit der Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$ für D -Chinovosyl-Prämitramycin (**14**), was durch HRMS (Tabelle S1) bestätigt wurde. Wir präparierten auch zwei TDP-Zucker mit axialer 3-OH-

Gruppe, TDP-4-Keto- D -Digitoxose und TDP- D -Digitoxose (Abbildung S11). Der zuerst genannte Zucker wurde *in situ* durch Inkubation von **1** mit OleV und EryBII (eine 3-Ketoreduktase des Erythromycin-Biosyntheseweges) hergestellt.^[10] Die LC-MS Analyse ergab zwei neue Peaks bei $t_{\text{Ret.}} = 20.4$ und 16.6 min (Abbildung 3, Spur b), mit $[M-\text{H}]^-$ -Ionen mit m/z 541.0 bzw. 559.0 (Abbildung S5), die die Summenformeln $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ von 4-Keto- D -Digitoxosyl-Prämitramycin (**15**) und seiner Hydratform ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$, **15a**; Tabelle S1) bestätigten. Der zuletzt genannte Zucker wurde unter den gleichen Bedingungen, jedoch unter Hinzunahme von MtmTIII und NADPH, hergestellt. Die LC-MS-Analyse ergab einen neuen Peak mit $t_{\text{Ret.}} = 17.2$ min (Abbildung 3, Spur c) und einem $[M-\text{H}]^-$ -Ion bei m/z 543.2 (Abbildung S5), was die Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$ von D -Digitoxosyl-Prämitramycin (**16**) bestätigte. Die Strukturen von **15** und **16** wurden ferner durch HRMS (Tabelle S1) bestätigt. Zusammengenommen zeigen unsere Versuche, dass MtmGIV über eine ungewöhnlich breite Substratspezifität bezüglich der stereochemischen Konfiguration der 3-Position von Zuckerdonoren verfügt, aber rigoros die Konfiguration der 4-Position kontrolliert und 2,6-Dideoxy- D -Zucker bevorzugt.

Die gleiche Gruppe TDP-aktivierter Zucker wurde auch hinsichtlich der zweiten von MtmGIV katalysierten Glykosylierungsreaktion getestet, für die wir den Transfer auf beide potenziellen Disaccharid-Akzeptorsubstrate, **8** und **8a**, überprüften. Überraschenderweise konnte MtmGIV hier außer **4** und **5** keine anderen TDP-Zucker umsetzen (Tabelle S2). Am meisten wunderten wir uns, dass MtmGIV nicht einmal D -Digitoxose übertrug, obwohl MTM-Analoga mit D -Digitoxose in E-Position zuvor beschrieben wurden.^[2b, 11]

Unserer Beobachtung folgend, dass MtmGIV mehrere sequenzielle D -Olivosyltransferschritte mit dem Akzeptor **6** ausführen kann, und so mono-, di- und triglykosillierte MTMs erzeugt, testeten wir auch, ob MtmGIV das Monosaccharid **7** als Akzeptorsubstrat toleriert (Schema 3). In Gegenwart von **3** und **7** produzierte MtmGIV umgehend die Verbindungen **10** und **11** (Abbildung 4, Spur a, und S12). Inkubation von MtmGIV mit **7** und dem Ketozucker **2** ergab zudem zwei weitere neue Produkte mit $t_{\text{Ret.}} = 20.5$ und 16.9 min (Abbildung 4, Spur b). Diese Produkte waren mit **17a** und **17** identifiziert, was durch HRMS bestätigt wurde. Spur c zeigt die Spuren, die durch Hinzufügen von MtmC, MtmTIII, SAM und NADPH zu Spur b erhalten wurden. Hierbei entstand ein neuer Peak mit $t_{\text{Ret.}} = 17.2$ min, der mit **18** identifiziert wurde. Spur d zeigt die Spuren, die durch Hinzufügen von MtmC und NADPH zu Spur b erhalten wurden. Hierbei entstand ein neuer Peak mit $t_{\text{Ret.}} = 16.6$ min, der mit **15a** identifiziert wurde.

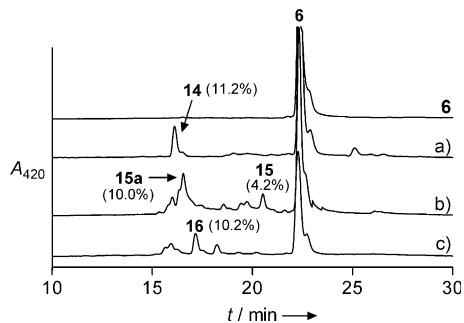


Abbildung 3. HPLC-Spuren der Substratflexibilitätsstudien von MtmGIV mit **6** als Akzeptorsubstrat. a) MtmGIV + **6** + TDP- D -Chinovose; b) MtmGIV + **6** + *in situ* erzeugte TDP-4-Keto- D -digitoxose; c) MtmGIV + **6** + *in situ* erzeugtes TDP- D -Digitoxose.

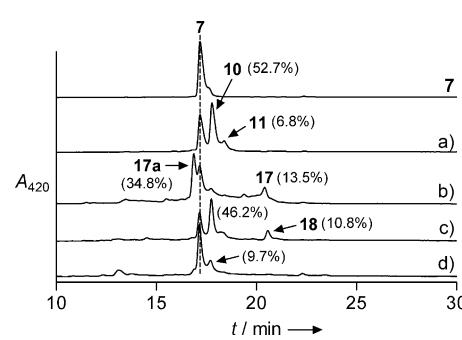


Abbildung 4. HPLC-Spuren der Substratflexibilitätsstudien von MtmGIV unter Verwendung von **7** als Akzeptorsubstrat. a) MtmGIV + **7** + **3**; b) MtmGIV + **7** + **2**; c) MtmGIV + **7** + *in situ* erzeugtes **3** und **5** durch Hinzufügen von MtmC, MtmTIII, SAM und NADPH zu (b); d) MtmGIV + **7** + *in situ* erzeugtes **3** durch Hinzufügen von MtmC und NADPH zu (b).

dung 4, Spur b). Die LC-MS-Analyse zeigte zwei $[M-H]^-$ -Ionen bei m/z 671.2 bzw. 689.1 (Abbildung S5), bestätigt durch HRMS (Tabelle S1), die die Summenformeln von 4-Keto-d-Olivosyl-Prämithramycin A1 (**17**, m/z 672.2, $C_{33}H_{36}O_{15}$) und seines Hydrats (**17a**, m/z 690.2, $C_{33}H_{38}O_{16}$) etablierten. Als wir jedoch testeten, ob MtmGIV d-Mycarose auf **7** übertragen kann, mit *in situ* erzeugtem **5**, zeigte das LC-MS statt des erwarteten d-Mycarosyl-Prämithramycins A1 (m/z 702.2) zwei Produkte, sichtbar als zwei Peaks mit $t_{\text{Ret.}} = 17.8$ und 20.7 min (Abbildung 4, Spur c) mit $[M-H]^-$ -Ionen bei m/z 673.2 bzw. 817.2 (Abbildung S5). Das erste Ion entspricht einem Disaccharid-Produkt, das eine weitere d-Olivose enthält, wobei MtmC offenbar eine Reduktion des Ketozuckers **2** statt der erwarteten Methylierung zu d-Mycarose katalysierte. Dasselbe Produkt entstand, wenn MtmTIII und SAM aus der Enzymmischung entfernt wurden (Abbildung 4, Spur d). Der zweite Peak entsprach nach HRMS-Analyse (Tabelle S1) einem Produkt mit Summenformel $C_{40}H_{50}O_{18}$, d.h. einem Trisaccharid (**18**), das durch sequenziellen d-Olivosyl- und d-Mycarosyl-Transfer gebildet wurde. Diese Resultate zeigten klar, dass MtmGIV allein die Bildung von Trisaccharid-Produkten katalysieren kann, während MtmC parallel sowohl TDP-d-Olivose als auch TDP-d-Mycarose aus **2** herstellen kann, unter Einsatz seiner 4-Ketoreduktase- bzw. C-Methyltransferase-Aktivitäten.

Zusammenfassend haben wir zwei Enzyme funktionell untersucht und zugeordnet, die bei der Biosynthese der MTM Trisaccharidkette eng miteinander kooperieren. Beide Enzyme spielen hierbei eine Doppelrolle. MtmGIV ist verantwortlich für die Übertragung von zwei unterschiedlichen Zuckerbausteinen, die als Zucker C und E in MTM eingebaut werden. MtmGIV arbeitet eng mit MtmC zusammen, das ein und dasselbe Substrat **2** entweder durch Reduktion oder Methyltransfer unter Verwendung des entsprechenden Co-substrates (NADPH bzw. SAM) in eines der Zucker-Donor-Substrate TDP-d-Olivose oder TDP-d-Mycarose umwandelt, je nachdem welche der beiden MtmGIV-Aktivitäten unterstützt wird. Einige wenige iterativ agierende GTs wurden zuvor in der Literatur beschrieben, zum Beispiel AveBI, AknK, LanGT1 oder LanGT4,^[12] alle diese Enzyme verwenden jedoch ein- und dasselbe Zucker-Donor-Substrat. Unseres Wissens ist MtmGIV die erste charakterisierte GT, die zwei deutlich unterschiedliche Akzeptor- und zwei unterschiedliche Donor-Substrate in einem Biosyntheseweg umsetzt. Die Entdeckung dieser beiden difunktionalen Enzyme erklärt zwei zuvor fehlende Aktivitäten, die für die MTM-Biosynthese essenziell sind, und die nicht einfach durch Bioinformatik-Analyse von Genprodukten vorhergesagt werden konnten. Auf der Grundlage der hier beschriebenen Resultate können wir einen vollständigeren Biosyntheseweg für MTM formulieren, und sie bereiten eine Plattform für chemoenzymatische Synthese neuer glykosylierter MTMs unter Ausnutzung der Substratflexibilität von MtmGIV. Neben den erwähnten GTs wurden auch andere difunktionale Enzyme beschreiben, zum Beispiel iterativ agierende Ketosynthasen, Cyclasen/Aromatasen und vor kurzem eine weitere Reduktase/Methyltransferase. Man kann vermuten, dass weitere multifunktionale Enzyme im

Zusammenhang mit dem Sekundärmetabolismus darauf warten, entdeckt zu werden. Nur wenige solcher Enzyme wurden bislang biochemisch untersucht.^[9a,13]

Eingegangen am 9. Juli 2012
Online veröffentlicht am 20. September 2012

Stichwörter: 4-Ketoreduktase · C-Methyltransferase · Difunktionale Enzyme · Glycosyltransferase · Mithramycin

- [1] a) V. Kren, T. Rezanka, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 858–889; b) C. J. Thibodeaux, C. E. Melancon III, H. W. Liu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9960–10007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9814–9859; c) R. W. Gantt, P. Peltier-Pain, J. S. Thorson, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1811–1853.
- [2] a) J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 41–54; b) L. E. Núñez, S. E. Nybo, J. Gonzalez-Sabin, M. Pérez, N. Méndez, A. F. Braña, M. He, F. Morís, J. A. Salas, J. Rohr, C. Méndez, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5813–5825.
- [3] M. Sastry, R. Fiala, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 674–689.
- [4] G. Blanco, E. Fernandez, M. J. Fernandez, A. F. Brana, U. Weissbach, E. Künzel, J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Mol. Gen. Genet.* **2000**, *262*, 991–1000.
- [5] M. Nur-e-Alam, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 632–636.
- [6] L. L. Remsing, J. Garcia-Bernardo, A. M. Gonzalez, E. Künzel, U. Rix, A. F. Braña, D. W. Bearden, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1606–1614.
- [7] G. Wang, M. K. Kharel, P. Pahari, J. Rohr, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2568–2571.
- [8] I. Aguirrebalaga, C. Olano, N. Allende, L. Rodriguez, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1266–1275.
- [9] a) P. Guyett, J. Glushka, X. Gu, M. Bar-Peled, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1072–1078; b) X. Chi, P. Pahari, K. Nonaka, S. G. Van Lanen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14452–14459.
- [10] F. Lombó, M. Gibson, L. Greenwell, A. F. Braña, J. Rohr, J. A. Salas, C. Méndez, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1709–1718.
- [11] a) I. Baig, M. Pérez, A. F. Braña, R. Gomathinayagam, C. Damodaran, J. A. Salas, C. Méndez, J. Rohr, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 199–207; b) M. Pérez, I. Baig, A. F. Braña, J. A. Salas, J. Rohr, C. Méndez, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2295–2304.
- [12] a) C. Zhang, C. Albermann, X. Fu, J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16420–16421; b) W. Lu, C. Leimkuhler, M. Oberthür, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4548–4558; c) A. Luzhetskyy, M. Fedoryshyn, C. Dürr, T. Taguchi, V. Novikov, A. Bechthold, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 725–729.
- [13] a) P. C. Dorrestein, S. G. Van Lanen, W. Li, C. Zhao, Z. Deng, B. Shen, N. L. Kelleher, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10386–10387; b) Y. Chen, K. Fan, Y. He, X. Xu, Y. Peng, T. Yu, C. Jia, K. Yang, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1055–1060; c) Y. H. Chen, C. C. Wang, L. Greenwell, U. Rix, D. Hoffmeister, L. C. Vining, J. Rohr, K. Q. Yang, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22508–22514; d) A. Mayer, T. Taguchi, A. Linnenbrink, C. Hofmann, A. Luzhetskyy, A. Bechthold, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2312–2315; e) L. Zhu, B. Ostash, U. Rix, M. Nur-e-Alam, A. Mayers, A. Luzhetskyy, C. Méndez, J. A. Salas, A. Bechthold, V. Fedorenko, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 631–638; f) J. He, M. Muller, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16742–16743; g) N. Tibrewal, T. E. Downey, S. G. Van Lanen, E. Ul Sharif, G. A. O'Doherty, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12402–12405; h) B. D. Ames, T. P. Korman, W. Zhang, P. Smith, T. Vu, Y. Tang, S. C. Tsai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5349–5354.