



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2007 021 149 A1 2008.11.06

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2007 021 149.1

(22) Anmeldetag: 05.05.2007

(43) Offenlegungstag: 06.11.2008

(51) Int Cl.⁸: **C07C 65/28** (2006.01)

C07C 43/23 (2006.01)

C07C 50/32 (2006.01)

C12P 7/66 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

A61K 31/085 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

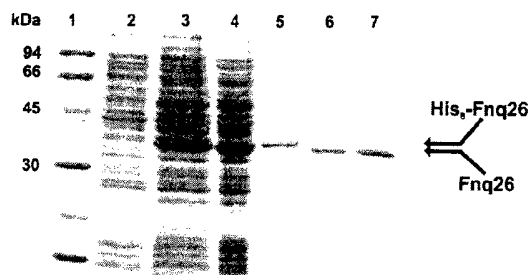
(71) Anmelder:
Universität Tübingen, 72074 Tübingen, DE

(72) Erfinder:
Heide, Lutz, Prof. Dr., 72074 Tübingen, DE;
Haagen, Yvonne, 72070 Tübingen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung prenylierter aromatischer Verbindungen, sowie Substanzen, die nach diesem Verfahren herstellbar sind**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von prenylierten aromatischen Verbindungen mithilfe eines neuen Biokatalysators, der Prenyltransferase Fnq26, Verbindungen, die mit diesem Verfahren hergestellt werden können, sowie ihre Verwendung in der Pharmazie. Fnq26 wurde aus *Streptomyces cinnamonensis* heterolog exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Die enzymatische Aktivität von Fnq26 ist im Gegensatz zu bekannten Prenyltransferasen nicht von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig. Fnq26 katalysiert Prenylierung aromatischer Verbindungen, wobei die Prenylreste über C-1'- oder C-3'-Atom direkt an den aromatischen Ring oder über C-1'-Atom an den Sauerstoff einer Hydroxylgruppe des aromatischen Substrates gekoppelt werden. Auf diese Weise können, ausgehend von wenigen aromatischen Substraten, mehrere unterschiedliche Verbindungen synthetisiert werden, von denen viele neue für die Pharmazie interessante Substanzen darstellen.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von prenylierten aromatischen Verbindungen mithilfe eines neuen Biokatalysators, der Prenyltransferase Fnq26, Verbindungen, die mit diesem Verfahren hergestellt werden können, sowie ihre Verwendung in der Pharmazie.

[0002] In der Natur hat sich im Laufe der Evolution eine große Diversität von Naturstoffen verschiedener Quellen entwickelt. Pflanzliche, bakterielle und pilzliche Sekundärstoffe sind seit der Antike aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Aktivitäten von Interesse und werden in den verschiedensten Lebensbereichen eingesetzt. Aus medizinischer Sicht haben Naturstoffe unser Leben immer wieder dramatisch verändert, indem sie zum einen als Arzneistoffe zur Bekämpfung vieler Krankheiten zur Verfügung stehen, zum anderen aber auch selbst die Ursache von Erkrankungen sind.

[0003] Naturstoffe werden je nach ihrem Ursprung und ihrem Biosyntheseweg in verschiedene Klassen eingeteilt. Die größte Klasse unter den Naturstoffen, die Terpene, war schon seit jeher von großem Interesse, da Terpene unterschiedlichste biologische Aktivitäten und medizinische Eigenschaften besitzen (Sacchetti & Poulter 1997). Neben den reinen Terpenen stellen Hybrid-Naturstoffe mit isoprenoiden Resten ebenfalls eine große Stoffgruppe dar. Viele in der Vergangenheit und Gegenwart eingesetzte Arzneistoffe gehören in diese Klasse (siehe Tabelle 1). Neben den klassischen Naturstoffen tragen aber auch Coenzyme (Ubichinon und Plastochinon) und Vitamine (Tocopherol, Phyllochinon und Menachinon) Reste terpenoiden Ursprungs.

[0004] Streptomyceten sind gram-positive Bodenbakterien und gehören zu den wichtigsten Naturstoffproduzenten und produzieren als bakterielle Sekundärstoffe etliche biologisch aktive Substanzen (Hopwood 2007). Ihre Biosynthese-Gene kommen in der Regel geclustert vor und sind dadurch leicht zugänglich für genetische Manipulation. Auch Streptomyceten produzieren einige Terpene bzw. Hybrid-Terpene. Mittlerweile sind mehrere Substanzen bekannt, die eine oder mehrere unterschiedlich lange Prenylseitenketten in ihren Strukturen enthalten, wie z. B. Cumarine (Novobiocin und Psoralen), Naphthochinone (Naphterpin, Furaquinocin, Napyradiomycin und Furanonaphthochinon I), Phenazine (Lavanducyanin, Aestivophoenin und Endophenazine A-C) und andere aromatische Substrate. Die Prenylierung von aromatischen Verbindungen aus anderen Biosynthesewegen ist mitverantwortlich für die Entstehung einer großen Vielfalt von Sekundärstoffen in der Natur. Oftmals führt die Prenylierung von Aromaten durch die Einführung einer weiteren C-C-Bindung sowie einer oder mehrerer Doppelbindungen zu einer Veränderung der biologischen Aktivität (Botts et al., 2005b). Solche Strukturen können verschiedene Effekte in Zellen haben und auf diese Weise antioxidativ, antiinflammatorisch, antiviral, antiproliferativ und/oder antineoplastisch wirken.

Tab. 1: Isorenoid-Hybride und ihre biologische Aktivität

Naturstoff	Quelle	Isoprenoid-Hybrid	Biolog. Aktivität
Khellin	Pflanzlich	Polyketid	bronchospasmolytisch
Mycophenolsäure	Pilzlich	Polyketid	immunsuppressiv
Tetrahydrocannabinol	Pflanzlich	Polyketid	narkotisch, antiemetisch
Rotenon	Pflanzlich	Isoflavonoid	insektizid
Psoralen	Pflanzlich	Cumin	photosensibilisierend
Novobiocin	Bakteriell	Cumin	antibiotisch
Lucidin	Pflanzlich	Anthrachinon	mutagen
Emetin	Pflanzlich	Isochinolinalkaloid	emetisch
Ergometrin	Pilzlich	Ergotalkaloid	Uterotonikum
Reserpin	Pflanzlich	Indolalkaloid	antihypertensiv
Vincristin	Pflanzlich	Indolalkaloid	antineoplastisch
Strychnin	Pflanzlich	Indolalkaloid	toxisch
Lyngbyatoxin	Bakteriell	Indolalkaloid	inflammatorisch
Chinin	Pflanzlich	Chinolinalkaloid	Antimalaria
Camptothecin	Pflanzlich	Chinolinalkaloid	Topoisomeraseinhibitor

[0005] Prenyltransferasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die die Alkylierung von elektronenreichen Systemen durch Isoprendiphosphate katalysieren. Als Prenylakzeptor kommen Isopentenylidiphosphat (IPP), Prenyldiphosphate höherer Ordnung, aromatische Moleküle oder Proteine in Frage.

[0006] Besonders aus dem Sekundärstoffwechsel konnten bisher nur sehr wenige Prenyltransferasen identifiziert werden, die aromatische Substrate prenylieren, und entsprechend sind die evolutionären Zusammen-

hänge und die Reaktionsmechanismen in dieser Enzymklasse noch weitgehend unverstanden.

[0007] Erst kürzlich wurde eine neue Gruppe von aromatischen Prenyltransferasen entdeckt (Hopwood 2007). Zu dieser Gruppe gehören NovQ und CloQ (Pojer et al., 2003), die die Verknüpfung von Dimethylallyldiphosphat und 4-Hydroxyphenylpyruvat in der Biosynthese der Aminocoumarinantibiotika katalysieren, und Orf2, das an der Biosynthese von Naphterin beteiligt ist (Kuzuyama et al., 2005). Alle diese Enzyme sind lösliche, monomere Biokatalysatoren. Die Entdeckung dieser Enzymklasse könnte einen großen Einfluss auf die Herstellung prenylierter aromatischer Substanzen haben, da diese Enzyme für die Erstellung von Substanzbibliotheken prenylierter aromatischer Substanzen für die Arzneistoffentwicklung sehr nützlich sein könnten (Botts et al., 2005a; Koehl 2005). Damit könnten sehr aufwändige und teure chemische Synthesen ersetzt werden.

[0008] In den letzten Jahren kam es wegen häufiger und falscher Anwendung von Antibiotika zu einer rasanten Resistenzentwicklung bei pathogenen Bakterien. So werden Infektionen durch multiresistente gram-positive Bakterien, wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder *Enterococcus faecium* immer häufiger. Es besteht deswegen eine dringende Notwendigkeit, neue strukturell unterschiedliche Antibiotika zu finden bzw. herzustellen.

[0009] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, gezielt neue Prenyltransferasen zu identifizieren und zu charakterisieren, mit denen es möglich ist, in einem enzymatischen Verfahren aromatische Substrate umzusetzen und neue für die pharmazeutische Anwendung interessante Verbindungen, insbesondere mit antibakterieller Wirkung, herzustellen.

[0010] Diese Aufgabe wird durch die Identifizierung und Charakterisierung der Prenyltransferase Fmq26 gelöst, mit der durch enzymatische Katalyse verschiedene niedermolekulare aromatische Substrate in unterschiedlicher Weise prenyliert und auf diese Weise neue Strukturen hergestellt werden können.

[0011] Die Prenyltransferase Fmq26 wird durch das Gen *fmq26* kodiert, das in die Biosynthese von Furanonaphthochinon I involviert ist (Haagen et al., 2006) und zur erst kürzlich entdeckten neuen Gruppe von aromatischen Prenyltransferasen gehört (Hopwood 2007). Die vorliegende Erfindung beschreibt nun die Herstellung neuer potentiell biologisch aktiveren Strukturen durch enzymatische Umsetzung aromatischer Substrate mit der neu entdeckten Prenyltransferase Fmq26.

[0012] Zur Charakterisierung wurde Fmq6 aus *Streptomyces cinnamonensis* als Histidin-Fusionsprotein heterolog exprimiert, über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend wurde der His-Tag mit Thrombin abgespalten (Abb. 1).

[0013] Es konnte von uns gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von Fmq26 im Gegensatz zur bereits bekannten Prenyltransferase Orf2 nicht von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig ist (Abb. 4). Dies stellt einen wichtigen Vorteil der Fmq26 Prenyltransferase gegenüber Orf2 und den schon länger bekannten Membran-gebundenen, Magnesium-abhängigen Prenyltransferasen (Wessjohann & Sonntag 1996) für den Einsatz in chemo-enzymatischen Synthesen dar.

[0014] Es konnte ferner von uns gezeigt werden, dass Fmq26 als Substrat aromatische Verbindungen umsetzt (s. Ausführungsbeispiele). Fmq26 wurde dann für die Herstellung unterschiedlicher prenylierter aromatischer Verbindungen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass zum einen das Enzym in der Lage ist, eine sog. „normale“ Prenylierung zu katalysieren, das heißt, dass die C-C-Verknüpfung über C-1' des Prenyldiphosphat stattfindet. Zum anderen wurde von uns gezeigt, dass Fmq26 auch eine sog. „reverse“ Prenylierung zwischen C-3' des Prenyldiphosphates und dem aromatischen Substrat katalysiert. Besonders diese Eigenschaft macht die Prenyltransferase Fmq26 sehr interessant, da sie die Herstellung von neuen Verbindungen ermöglicht. Außerdem wird die Verknüpfung der beiden Substrate über eine C-O-Bindung zwischen C-1' des Prenyldiphosphates und dem Sauerstoff einer Hydroxylgruppe des aromatischen Substrates katalysiert (Abb. 3). Auf diese Weise können ausgehend von wenigen verschiedenen aromatischen Substraten mehrere unterschiedliche Reaktionsprodukte synthetisiert werden.

[0015] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung prenylierter aromatischer Verbindungen mithilfe der Prenyltransferase Fmq26. Dazu werden ein aromatisches Substrat und eine prenylierende Substanz mit Fmq26 unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Als prenylierende Substanz wird bevorzugt Geranylpyrophosphat eingesetzt. Die Verwendung einer Substanz mit fünf C-Atomen (Dimethylallyldiphosphat) ist auch möglich. Die Inkubationszeit kann je nach Substrat und Reaktionsbedingungen variieren und liegt bevor-

zugt zwischen 30 min und 5 Stunden. Die geeignete Synthese-Temperatur liegt zwischen 20°C und 40°C, die optimale Temperatur beträgt zwischen 25°C bis 35°C, insbesondere um 30°C. Im Gegensatz zu bekannten Methoden wird beim erfindungsgemäßen Verfahren kein Magnesium oder andere zweiwertigen Kationen benötigt. Der Reaktionsansatz wird nach Ablauf der Reaktionszeit extrahiert und die enzymatischen Produkte z. B. mit Hilfe von chromatographischen Methoden (z. B. HPLC) analysiert.

[0016] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten beispielsweise durch Inkubation von Fmq26 mit GPP und Flaviolin (**Abb. 2A**) oder 1,3-Dihydroxynaphthalin (1,3-DHN; **Abb. 2B**) neue Substanzen synthetisiert werden. Das entstandene Reaktionsprodukt aus dem Ansatz mit 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA; **Abb. 2C**) ist zwar in der Literatur schon beschrieben, wurde jedoch bislang mittels einer umständlichen chemischen Synthese hergestellt (Parker et al., 1977).

[0017] Die massenspektrometrischen Daten zeigten eindeutig, dass es sich bei den enzymatischen Produkten der drei verschiedenen Substrate um einfach geranylierte Verbindungen handelt (siehe Anhang, Tabelle 6). Der Reaktionsmaßstab wurde nun vergrößert und die enzymatischen Produkte präparativ gereinigt, um aufzuklären, an welcher Position und in welcher Weise die Substrate prenyliert sind. Die gereinigten Substanzen wurden mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert.

[0018] Die Molekulargewichte der beiden prenylierten Produkte 1 und 2 (**Abb. 3**) wurde mittels MS-Spektrometrie auf $342\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bestimmt, was exakt der erwarteten Masse für ein einfach geranyliertes Produkt entspricht.

[0019] Flaviolin besitzt drei aromatische Protonen. Im ^1H -NMR-Spektrum sind die beiden Signale der Protonen an Position 6 und 8 des Flaviolingerüsts gekoppelt, wohingegen das Signal des Protons an Position 3 als Singulett erscheint. Der Hauptpeak im Chromatogramm des Reaktionsansatzes mit Flaviolin (**Abb. 2A**, **Abb. 1**) hat dieselben Signale wie Flaviolin für 6-H und 8-H, jedoch ist das Signal an Position 3 verschwunden, was darauf hindeutet, dass die Geranylseitenkette an Position 3 von Flaviolin gebunden ist. Stattdessen erscheinen zwei Signale zweier chemisch verschiedener vinyli-scher Protonen (4.93 und 4.86 ppm) an Position 1' der Prenylseitenkette, die beide mit dem Proton an Position 2' koppeln, was in einem Doppeldublett für dieses Proton resultiert (6.29 ppm; 10.8 und 17.8 Hz). Diese Signale sind typisch für eine sog. „reverse“ Prenylierung, d. h. dass die Geranylseitenkette nicht über C-1' sondern über C-3' mit Flaviolin verknüpft ist (**Abb. 3A**). Solche Strukturen sind in der Literatur beschrieben und diese Daten stimmen mit den hier berichteten überein (Cardellina et al., 1979; Unsöld & Li 2006).

[0020] Im Inkubationsansatz mit Flaviolin zeigt sich ein weiteres Produkt (**Abb. 2A**, **Abb. 2**), das dieselbe Masse hat wie 1. Das ^1H -NMR-Spektrum dieser Substanz zeigt die typischen Signale zweier chemisch identischer Protonen (3.16 ppm) an Position 1' des Geranylseitenrestes, die mit dem Proton an Position 2' koppeln, weshalb dessen Signal als breites Triplett (5.12 ppm) erscheint (siehe Anhang, Tabelle 2). Diese Signale sind so auch in der Literatur für reguläre Prenylierungen beschrieben (Inouye et al., 1979) und es kann davon ausgegangen werden, dass der Prenylrest von Produkt 2 regulär über C-1' mit Flaviolin verknüpft ist (**Abb. 3A**).

[0021] Im Reaktionsansatz mit 1,3-Dihydroxynaphthalin entstanden ebenfalls zwei Produkte (**Abb. 2B**, **Abb. 3** und **Abb. 4**). Auch hier zeigen die massenspektrometrischen Daten, dass es sich um zwei Substanzen mit demselben Molekulargewicht von $296\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ handelt. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (siehe Anhang, Tabellen 3 und 4) zeigen, dass es sich um O-prenylierte Substanzen handelt, bei denen der Prenylrest regulär über C-1' des Geranyldiphosphat verknüpft ist (**Abb. 3B**).

[0022] Genauso konnte für das enzymatische Produkt 5 (**Abb. 2C**, 5) aus dem Inkubationsansatz mittels MS-Spektrometrie wie erwartet die Molekulargewicht von $274\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bestimmt werden. Das ^1H -NMR-Spektrum (siehe Anhang, Tabellen 5) dieser Substanz zeigt deutlich, dass es sich auch hierbei um eine regulär O-prenylierte Substanz handelt (**Abb. 3C**).

[0023] Die synthetisierten Substanzen 1 bis 4 sind neu und könnten wegen ihrer biologisch aktiver, insbesondere wegen antibiotischer Eigenschaften, Anwendung in der Pharmazie, z. B. als Antibiotikum, finden.

[0024] Ein großer Vorteil der Verwendung von Prenyltransferase Fmq26 bei der Herstellung von prenylierten aromatischen Verbindungen liegt erstens darin, dass ihre enzymatische Aktivität unabhängig von Magnesiumionen ist. Zweitens ist die Prenyltransferase Fmq26 in der Lage, verschiedene niedermolekulare aromatische Moleküle in unterschiedlicher Weise zu prenylieren. Sie stellt somit ein effizientes Werkzeug dar, um gezielt aromatische Moleküle strukturell zu verändern und auf diese Weise neue für die Pharmazie potentiell interes-

sante Substanzen herzustellen.

[0025] Weitere Vorteile, Merkmale und Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung werden nachstehend anhand der Ausführungsbeispiele mit Bezug auf die Zeichnungen beschrieben. In den Zeichnungen zeigen:

[0026] Abb. 1: SDS-Gel nach Reinigung von Fnq26. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion mit IPTG, Spur 4: lösliches Protein nach Induktion mit IPTG, Spur 5: Eluat nach Ni-Affinitätschromatographie, Spur 6: Spur nach Thrombin-Spaltung, Spur 7: gereinigtes Protein;

[0027] Abb. 2: HPLC Chromatogramme von Prenyltransferaseassays mit Fnq26. Oben: Inkubation mit nativem Enzym. Unten: Hitzeinaktiviertes Enzym; A: Inkubation von Fnq26 mit Flaviolin und Geranyldiphosphat; B: Inkubation von Fnq26 mit 1,3-Dihydroxynaphthalin und Geranyldiphosphat; C: Inkubation von Fnq26 mit 4-Hydroxybenzoesäure und Geranyldiphosphat;

[0028] Abb. 3: Strukturen der neu hergestellten Verbindungen. A: enzymatische Produkte aus der Inkubation von Fnq26 mit Flaviolin und Geranyldiphosphat; B: enzymatische Produkte aus der Inkubation von Fnq26 mit 1,3-Dihydroxynaphthalin und Geranyldiphosphat; C: enzymatisches Produkt aus der Inkubation von Fnq26 mit 4-Hydroxybenzoesäure und Geranyldiphosphat;

[0029] Abb. 4: Abhängigkeit der Aktivität von Fnq26 von Zusätzen in verschiedenen Konzentrationen.

Ausführungsbeispiele

Chemikalien

[0030] 1,3-Dihydroxynaphthalin (Acros Organics, Geel, Belgien), Geranyldiphosphat (GPP) wurde nach Woodside et al. (1993) synthetisiert. Flaviolin wurde aus *Pseudomonas putida* (pFG154-1) nach Gross et al. (2006) isoliert.

Genetische Methoden

[0031] *Escherichia coli* XL1Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) und *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden für die Klonierung und Expression benutzt.

[0032] Standardmethoden für DNA Isolation und Manipulation wurden ausgeführt wie von Sambrook et al. (2001) und Kieser et al. (2000) beschrieben. Die Isolation von Plasmiden wurde mit Ionenaustauschersäulen (Nucleobond AX Kit; Macherey-Nagel) durchgeführt.

Konstruktion des Expressionskonstruktes pLW37 sowie heterologe Expression und Reinigung von rekombinantem Protein Fnq26

[0033] fnq26 wurde mit folgenden Primern mittels PCR amplifiziert:

for 5'- TGGATCCATGATGTCTGGGAACCGCCG-3' und
rev 5'- CCTCGAGTCTAGAGGGTCAGGAACGGCCGCCG-3'.

[0034] Die BamHI und XhoI Schnittstellen sind jeweils unterstrichen. Das PCR Produkt wurde in pGEMT (Promega, Deutschland) ligiert, wodurch das Plasmid pLW35 entstand. pLW35 wurde dann mit BamHI und XhoI geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pHis8 (Jez et al., 2000) ligiert, wodurch das Expressionsplasmid pLW27 entstand.

[0035] pLW37 wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert und die Zellen in 1 L TB Medium (50 µg·mL⁻¹ Kanamycin) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Abkühlung auf 20°C mit 0,5 mM IPTG. Sechs Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet (2700 × g, 10 min, 4°C) und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden mit 30 mL Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol, 1% Tween 20, 0,5 mg·mL⁻¹ Lysozym, 2 mM 1,4-Dithiothreitol, 0,5 mM PMSF) versetzt und bei 4°C unter Rühren aufgetaut (20–30 min). Die Mischung wurde anschließend so lange mit Ultraschall (Branson Sonifier 250) behandelt, bis eine niedrig viskose Mischung entstand und die DNA zerstört war (etwa 30 min). Das Homogenisat wurde 45 min bei 55.000 × g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Eine PD-10 Säule (d = 1,6 cm) wurde mit

1,5 mL 50%-iger Ni-NTA-Suspension (Qiagen, Hilden, Deutschland) befüllt und mit 7,5 mL Lysepuffer äquilibriert und danach die lösliche Proteinfraction aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 18 mL Waschpuffer (20 mM Imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1% Tween 20, 2 mM 1,4-Dithiothreitol) gewaschen. Danach wurde zweimal mit 2 mL Elutionspuffer (250 mM Imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 10 mM (1-mercaptoethanol) eluiert. Der His₆-Tag wurde mit 2U Thrombin (für 35 mg Protein) 16 Stunden gegen Dialysepuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol) bei 4°C dialysiert. Das dialysierte Protein wurde zur Entfernung des Thrombins erst über eine Benzamidin-Sepharose-Säule (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Schweden) und dann zur Entfernung des His-Tags über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt und der Durchfluß mittels Amicon Centriprep YM-10 (Millipore) konzentriert. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex-200-Säule (Pharmacia XR26K 26/60) aufgetragen. Als Fließmittel diente Tris-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT). 15 mg gereinigtes Protein Fnq26 wurden erhalten.

Aktivitätsnachweis von gereinigtem Protein Fnq26 und Analytik

[0036] Der Standardreaktionsansatz (50 μ L) enthielt 100 mM Na-TAPS (pH 8,5), 0,5 mM Flaviolin (bzw. 4 mM 1,3-DHN oder 2 mM 4-HBA), 2 mM GPP, 10 mM Ascorbinsäure und 10–50 μ g gereinigtes Fnq26. Nach Inkubation für 10 min bei 30°C wurde die Reaktion mit 100 μ L Ethylacetat/Ameisensäure (975:25) abgestoppt. Nach vortexen und zentrifugieren wurde die organische Phase zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Methanol gelöst und mittels HPLC analysiert. Es wurde eine Eclipse XDB-C18 Säule (150 \times 4,6 mm, 5 μ m, Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ und einem linearen Gradient von 20 bis 100% Acetonitril in 1%-iger Ameisensäure verwendet. Detektiert wurde bei 288 nm (für Flaviolin und 1,3-DHN) oder bei 260 nm (für 4-HBA).

Untersuchung des Einflusses von zweiwertigen Kationen auf die enzymatische Aktivität

[0037] Einem Standardreaktionsansatz (s. oben) wurden divalente Kationen wie Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ oder Mn²⁺ (10 mM Endkonzentration) zugesetzt. Einem Standardreaktionsansatz ohne Zusatz von Kationen wurde EDTA, in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt.

Strukturaufklärung und Charakterisierung

[0038] 50 mL des oben beschriebenen Reaktionsansatzes wurden für 3 Stunden bei 30°C inkubiert und danach 200 mL Ethylacetat/Ameisensäure (975:25) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und die enzymatischen Produkte wurden mittels präparativer HPLC (Multospher 120 RP 18 Säule, 250 \times 8 mm, 5 μ m, CS Chromatographie Service, Düren, Deutschland) gereinigt. Es wurde eine Flußrate von 2,5 mL·min⁻¹ und ein linearer Gradient von 70 bis 100% Acetonitril in 1%-iger Ameisensäure über 30 min verwendet.

[0039] Die Produkte wurden mit ¹H- und ¹³C-NMR Spektroskopie und LC-MS/MS Analyse identifiziert.

[0040] Für die LC-MS/MS Analyse wurde eine GromSil 120 Säule (150 \times 2 mm, 3 μ m) mit einer Flußrate von 0,2 mL min⁻¹ und einem linearen Gradient von 0 bis 100% von Fließmittel B in Fließmittel A über 22 min (A: 10% Acetonitril in 0,1% Ameisensäure; B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril) verwendet. Die Massenspektren wurden an einem Electrospray (ES)-Massenspektrometer Finnigan LCQ Duo (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) im negativen Ionisierungsmodus aufgenommen.

[0041] ¹H- und ¹³C-NMR Spektren wurden an einem Avance 400 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) mit CD₃CN bzw. CD₃OD als Lösungsmittel aufgenommen (400 MHz).

Literatur

- Botta, B., Monache, G. D., Menendez, P. & Boffi, A. (2005a). Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 606–608.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005b). Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem* 12, 717–739.
- Cardellina, J. H., Marner, F. J. & Moore, R. E. (1979). Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. *Science* 204, 193–195.
- Gross, F., Luniak, N., Perlova, O., Gaitatzis, N., Jenke-Kodama, H., Gerth, K., Gottschalk, D., Dittmann, E. & Müller, R. (2006). Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. *Arch. Microbiol.* 185, 28–38.

Haagen, Y., Glück, K., Fay, K., Kammerer, B., Gust, B. & Heide, L. (2006). A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042. *Chembiochem* 7, 2016–2027.

Hopwood, D. A. (2007) *Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K. & Matsumura, H. (1979). Quinones and related compounds in higher plants. Part 8. Biosynthesis of shikonin in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 18, 1301–1308.

Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000). Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* 39, 890–902.

Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.

Koehl, P. (2005). Relaxed specificity in aromatic prenyltransferases. *Nat. Chem. Biol* 1, 71–72.

Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005). Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* 435, 983–987.

Parker, R. A., Kariya, T., Grisar, J. M. & Petrow, V. (1977). 5-(Tetradecyloxy)-2-furancarboxylic acid and related hypolipidemic fatty acid-like alkyloxyarylcarboxylic acids. *J. Med. Chem.* 20, 781–791.

Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chef, H., Walsh, C. T., Li, S. -M. & Heide, L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2316–2321.

Sacchettini, J. C. & Poulter, C. D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788–1789.

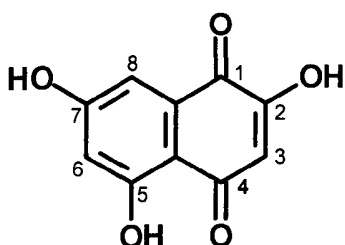
Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Unsöld, I. A. & Li, S. M. (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* 7, 158–164.

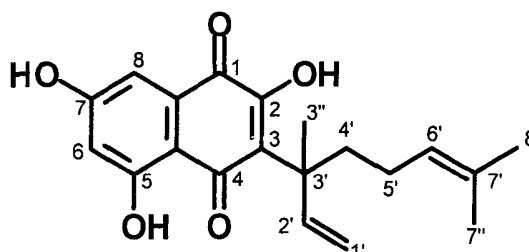
Wessjohann, L. & Sontag, B. (1996). Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from overproducing strains of *Escherichia coli*: method development and substrate specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 1697–1699.

Woodside, A. B., Huang, Z. & Poulter, C. D. (1993). Trisammonium geranyl diphosphate. *Organic Syntheses* 66, 211–215.

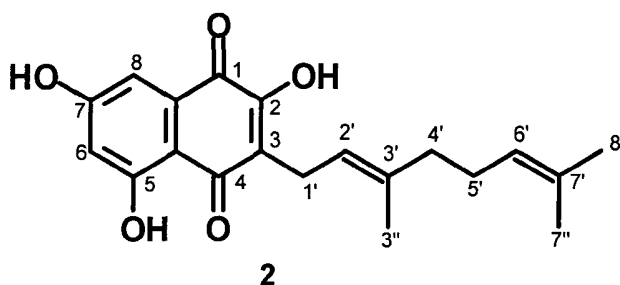
Anhang



Flaviolin



1



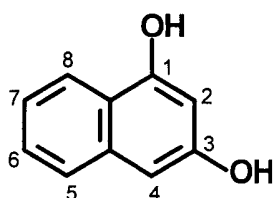
2

[0042]

Tabelle 2: ¹H-NMR Daten von Flaviolin und seinen prenylierten Produkten 1 und 2

Proton	Flaviolin δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 1 δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 2 δ , Multiplizität (J/Hz)
H-3	6.12; s	-	-
H-6	6.61; d (2.4)	6.57; d (2.3)	6.56; d (2.0)
H-8	7.05; d (2.4)	6.99; d (2.3)	7.00; d (2.0)
2H-1'		4.93; 1H, d (17.8)	3.16; 2H, d (6.6)
		4.86; 1H, d (10.8)	
H-2'		6.29; dd (10.8; 17.8)	5.12; br t (6.6)
CH ₃ -3''		1.54; s	1.73; s
2H-4'		2.09; m	2.03; m
2H-5'		1.92; m	1.96; m
H-6'		5.05; br t (7.1)	5.03; br t (6.6)
CH ₃ -7''		1.48; s	1.53; s
CH ₃ -8'		1.53; s	1.58; s

Die Spektren wurden bei 400 MHz in CD₃CN aufgenommen. δ in ppm.



1,3- Dihydroxynaphthalin

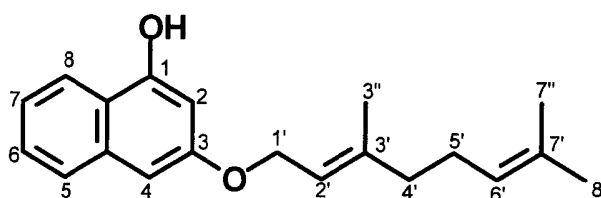
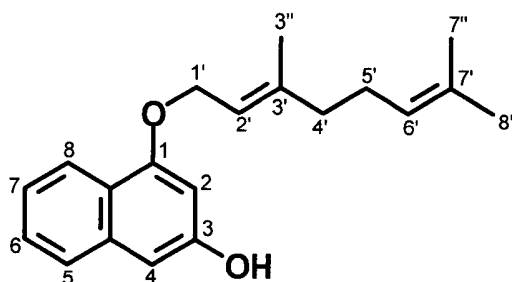
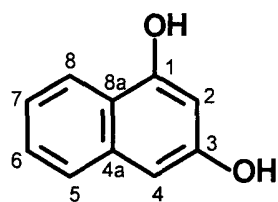
**3****4**

Tabelle 3: ¹H-NMR Daten von 1,3-Dihydroxynaphthalin und seinen prenylierten Produkten 3 und 4

Proton	1,3-Dihydroxynaphthalin δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 3 δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 4 δ , Multiplizität (J/Hz)
H-2	6.50; d (2.0)	6.54; d (1.8)	6.52; d (1.8)
H-4	6.66; d (2.0)	6.71; d (1.8)	6.76; d (1.8)
H-5	7.56; d (8.2)	7.58; d (8.2)	7.67; d (8.2)
H-6	7.35; ddd (1.3; 6.9; 8.2)	7.37; ddd (1.3; 6.9; 8.2)	7.40; ddd (1.3; 6.9; 8.2)
H-7	7.20; ddd (1.3; 6.9; 8.2)	7.22; ddd (1.3; 6.9; 8.2)	7.26; ddd (1.3; 6.9; 8.2)
H-8	8.06; d (8.2)	8.08; d (8.2)	8.08; d (8.2)
2H-1'		4.73; d (6.4)	4.66; d (6.6)
H-2'		5.62; br t (6.4)	5.55; br t (6.6)
CH ₃ -3''		1.84; s	1.82; s
2H-4' + 2H-5'		2.18; 4H, m	2.17; 4H, m
H-6'		5.16; br t (6.6)	5.15; br t (6.6)
CH ₃ -7''		1.65; s	1.65; s
CH ₃ -8'		1.70; s	1.68; s

Die Spektren wurden bei 400 MHz in CD₃OD aufgenommen. δ in ppm.



1,3- Dihydroxynaphthalin

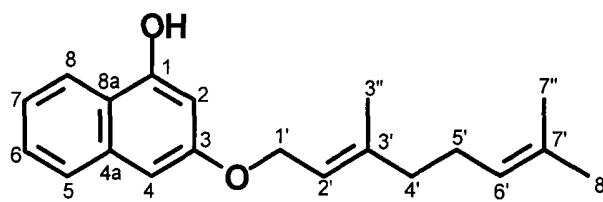
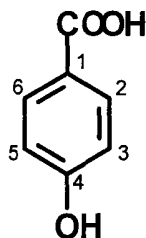
**3**

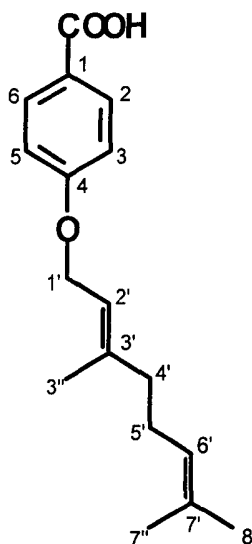
Tabelle 4: ^{13}C -NMR Daten von 1,3-Dihydroxynaphthalin und seinem prenylierten Produkt 3

C-Atom	1,3-Dihydroxynaphthalin (ppm)	Produkt 3 (ppm)
C1	157.2	157.5
C2	102.0	102.5
C3	156.2	157.2
C4	101.9	99.9
C4a	137.7	137.4
C5	127.9	128.1
C6	127.3	127.3
C7	123.5	123.4
C8	122.9	122.7
C8a	122.1	121.5
C1'		66.5
C2'		123.3
C3'		142.5
C3''		18.2
C4'		41.0
C5'		27.8
C6'		125.4
C7'		133.0
C7''		17.1
C8'		26.3

Die Spektren wurden bei 100 MHz in CD_3OD aufgenommen. δ in ppm.



4-Hydroxybenzoesäure



5

Tabelle 5: ^1H -NMR Daten von 4-Hydroxybenzoesäure und ihrem prenylierten Produkt 5

Proton	4-Hydroxybenzoesäure δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 5 δ , Multiplizität (J/Hz)
H-2 + H-6	7.86; 2H, br d (8.8)	7.90; 2H, br d (8.8)
H-3 + H-5	6.77; 2H, br d (8.8)	6.86; 2H, br d (8.8)
2H-1'		4.82; d (7.1)
H-2'		5.49; br t (7.1)
CH_3 -3''		1.81; s
2H-4' + 2H-5'		2.16; 4H, m
H-6'		5.14; br t (6.7)
CH_3 -7''		1.64; s
CH_3 -8'		1.69; s

The spectra were taken at 400 MHz in CD_3OD . δ in ppm.

Tabelle 6: MS-Daten von Flaviolin, 1,3-Dihydroxynaphthalin, 4-Hydroxybenzoesäure und ihren prenylierten Produkten 1, 2, 3, 4 and 5

Substanz	Signale m/z (%)
Flaviolin	205[M-H] ⁻ (100), 177 (80), 161 (2), 133 (13)
Produkt 1	341[M-H] ⁻ (100), 272 (20), 258 (10), 257 (11), 323 (7)
Produkt 2	341[M-H] ⁻ (100), 323 (8), 272 (40), 258 (4), 219 (4)
1,3-Dihydroxynaphthalin	159 [M-H] ⁻ (100), 323 (8), 115 (11)
Produkt 3	295[M-H] ⁻ (74), 159 (36), 158 (100)
Produkt 4	295[M-H] ⁻ (60), 159 (38), 158 (100)
4-Hydroxybenzoesäure	137[M-H] ⁻ (100), 93 (48)
Produkt 5	273[M-H] ⁻ (73), 229 (8), 137 (8), 136 (100), 135 (16), 92 (27)

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Sacchetti & Poulter 1997 [0003]
- Hopwood 2007 [0004]
- Botts et al., 2005b [0004]
- Hopwood 2007 [0007]
- Pojer et al., 2003 [0007]
- Kuzuyama et al., 2005 [0007]
- Botts et al., 2005a; Koehl 2005 [0007]
- Haagen et al., 2006 [0011]
- Hopwood 2007 [0011]
- Wessjohann & Sontag 1996 [0013]
- Parker et al., 1977 [0016]
- Cardellina et al., 1979 [0019]
- Unsöld & Li 2006 [0019]
- Inouye et al., 1979 [0020]
- Woodside et al. (1993) [0030]
- Gross et al. (2006) [0030]
- Sambrook et al. (2001) [0032]
- Kieser et al. (2000) [0032]
- Botta, B., Monache, G. D., Menendez, P. & Boffi, A. (2005a). Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. Trends Pharmacol. Sci. 26, 606–608 [0041]
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005b). Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. Curr. Med. Chem 12, 717–739 [0041]
- Cardellina, J. H., Marner, F. J. & Moore, R. E. (1979). Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. Science 204, 193–195 [0041]
- Gross, F., Luniak, N., Perlova, O., Gaitatzis, N., Jenke-Kodama, H., Gerth, K., Gottschalk, D., Dittmann, E. & Müller, R. (2006). Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. Arch. Microbiol. 185, 28–38 [0041]
- Haagen, Y., Glück, K., Fay, K., Kammerer, B., Gust, B. & Heide, L. (2006). A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in Streptomyces cinnamonensis DSM 1042. ChemBiochem 7, 2016–2027 [0041]
- Hopwood, D. A. (2007) Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford, UK: Oxford University Press [0041]
- Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K. & Matsumura, H. (1979). Quinones and related compounds in higher plants. Part 8. Biosynthesis of shikonin in callus cultures of Lithospermum erythrorhizon. Phytochemistry 18, 1301–1308 [0041]
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000). Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. Biochemistry 39, 890–902 [0041]
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000) Practical Streptomyces Genetics. Norwich, UK: John Innes Foundation [0041]
- Koehl, P. (2005). Relaxed specificity in aromatic prenyltransferases. Nat. Chem. Biol 1, 71–72 [0041]
- Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005). Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. Nature 435, 983–987 [0041]
- Parker, R. A., Kariya, T., Grisar, J. M. & Petrow, V. (1977). 5-(Tetradecyloxy)-2-furancarboxylic acid and related hypolipidemic fatty acid-like alkyloxyarylcboxylic acids. J. Med. Chem. 20, 781–791 [0041]
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chef, H., Walsh, C. T., Li, S. -M. & Heide, L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 2316–2321 [0041]
- Sacchetti, J. C. & Poulter, C. D. (1997). Creating isoprenoid diversity. Science 277, 1788–1789 [0041]
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press [0041]
- Unsöld, I. A. & Li, S. M. (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in As-

- pergillus fumigatus: gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. Chembiochem 7, 158–164 [0041]
- Wessjohann, L. & Sontag, B. (1996). Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from overproducing strains of Escherichia coli: method development and substrate specificity. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35, 1697–1699 [0041]
 - Woodside, A. B., Huang, Z. & Poulter, C. D. (1993). Trisammonium geranyl diphosphate. Organic Syntheses 66, 211–215 [0041]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung prenylierter aromatischer Verbindungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens ein aromatisches Substrat und mindestens eine prenylierende Substanz mit Prenyltransferase Fng26 inkubiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die prenylierende Substanz ein Prenyldi-phosphat mit 10 oder 5 C-Atomen ist.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die prenylierende Substanz ein Geranyldiphosphat oder ein Dimethylallyldiphosphat ist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das aromatische Substrat zur Substanzklasse Naphthochinon, Naphthalin oder Benzoesäure gehört.

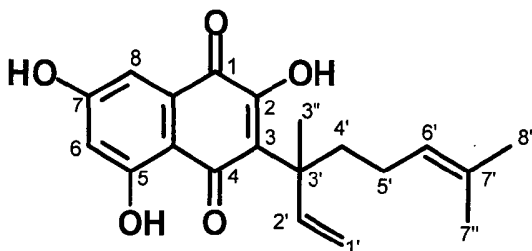
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das aromatische Substrat Flaviolin, 1,3-Dihydroxynaphthalin oder 4-Hydroxybenzoesäure ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Inkubation ohne Zusatz von zweiwertigen Kationen erfolgt.

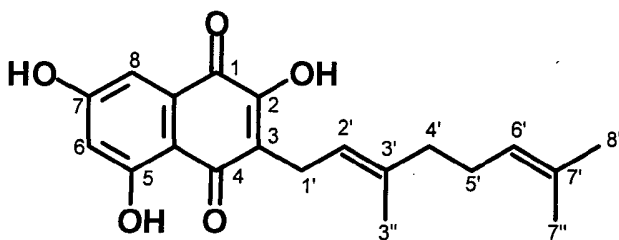
7. Verbindungen, hergestellt oder herstellbar nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

8. Verbindungen nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Prenylrest über sein C-1'- oder C-3'-Atom direkt an den aromatischen Ring, oder über sein C-1'-Atom an den Sauerstoff einer Hydroxylgruppe des aromatischen Substrates gekoppelt ist.

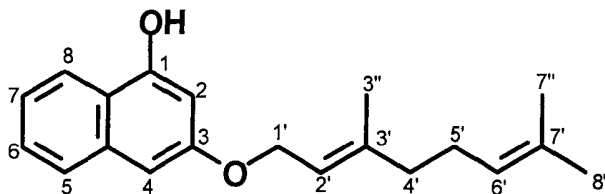
9. Verbindung nach Anspruch 7 mit der Strukturformel



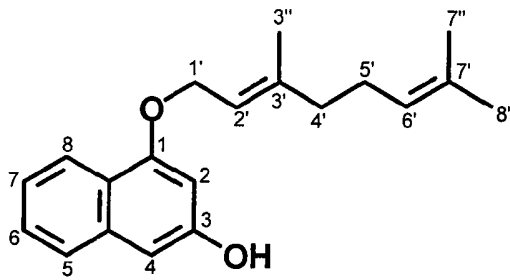
10. Verbindung nach Anspruch 7 mit der Strukturformel



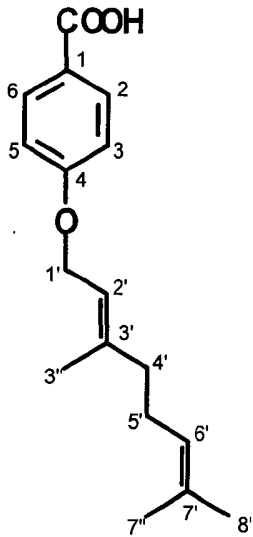
11. Verbindung nach Anspruch 7 mit der Strukturformel



12. Verbindung nach Anspruch 7 mit der Strukturformel



13. Verbindung hergestellt nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 mit der Strukturformel



14. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 7 bis 13 in der Pharmazie.

15. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 7 bis 13 als Antibiotikum.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

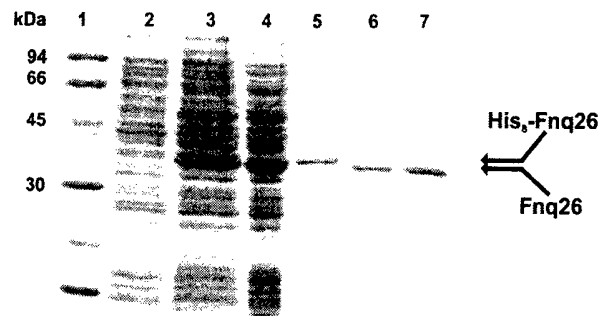


Abb. 1

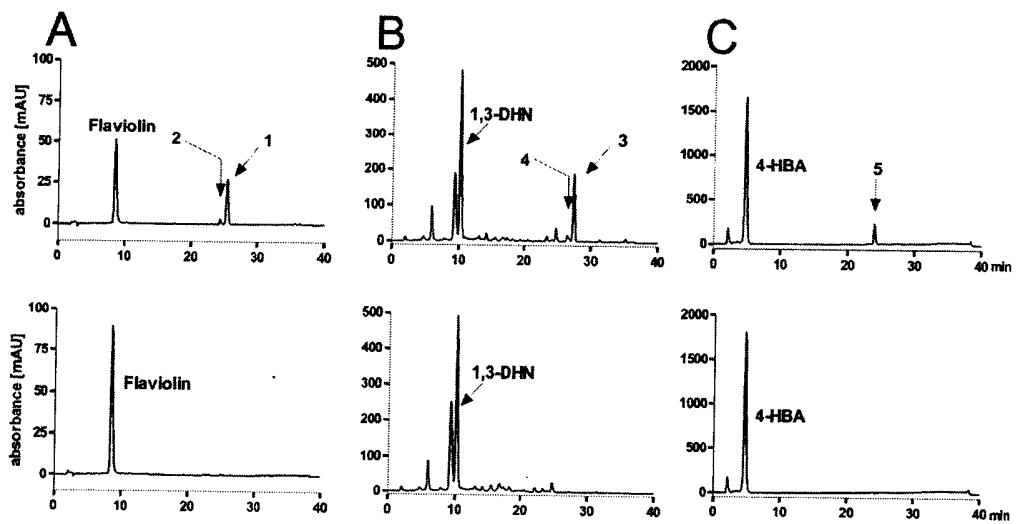


Abb. 2

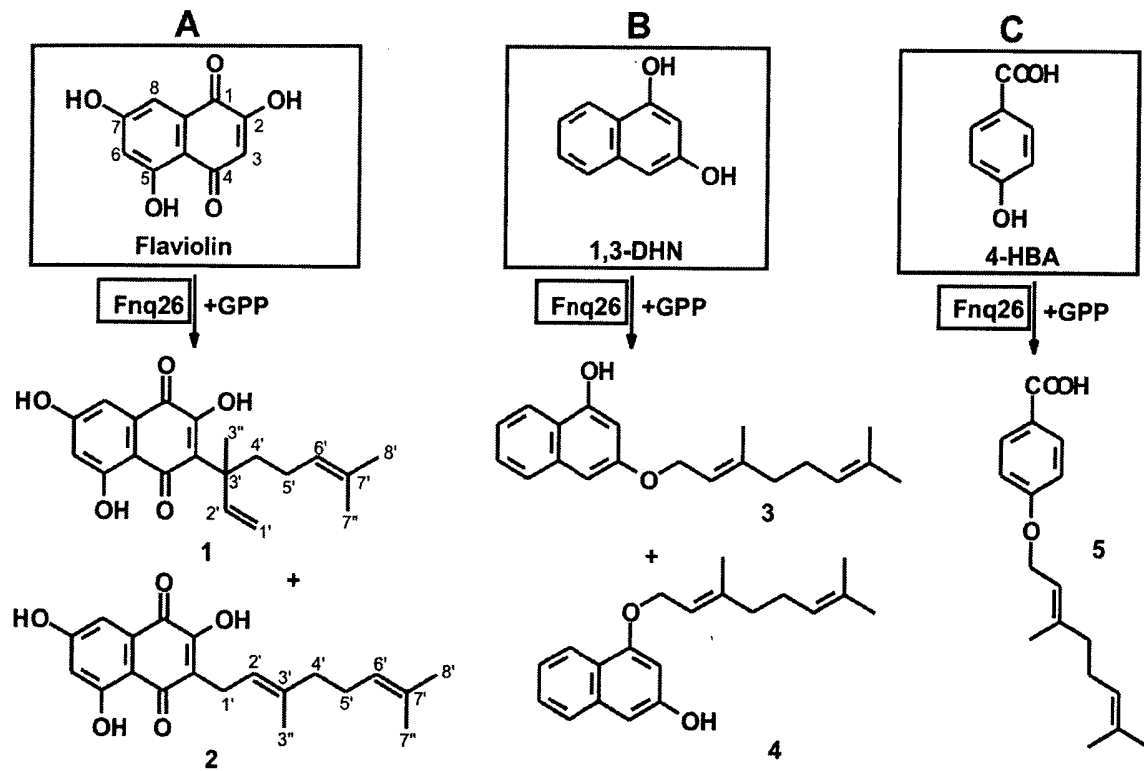


Abb. 3

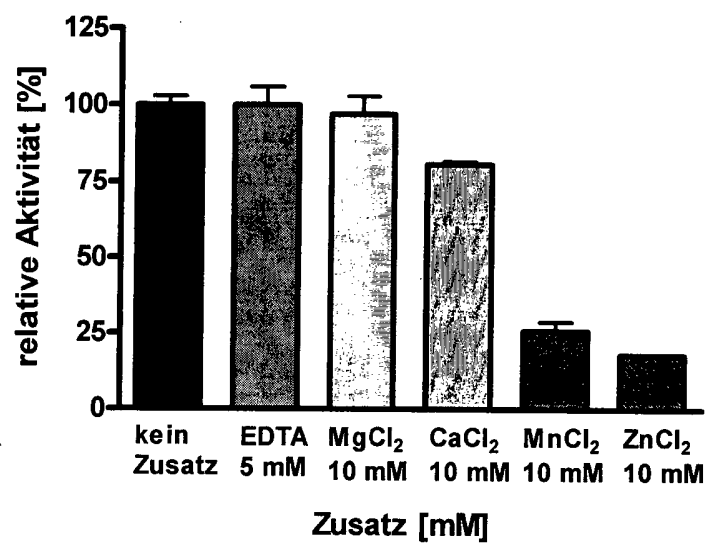


Abb. 4