

Biokatalyse

N-Hydroxydiamine – vielseitige Bausteine für Wirkstoffsynthesen

ARTUR MAIER, SARAH WANSEL, ALVARO GOMEZ BARAIBAR, CAROLIN MÜGGE, DIRK TISCHLER

AG MIKROBIELLE BIOTECHNOLOGIE, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

An enzymatic cascade from ω -amino amino acids towards monohydroxylated α,ω -diamines gives highly interesting materials for processing into fine chemicals. With two simple UV-vis spectroscopy-based screening methods, enzyme candidates with a compatibility window to perform a three-enzyme cascade from lysine and ornithine to the desired products were identified. The results give first insight into the feasibility of the desired cascade and put handles on future reaction engineering tasks.

DOI: 10.1007/s12268-020-1374-6
© Die Autoren 2020

■ Aminosäuren mit einer ω -Aminoseitenkette, wie Ornithin (Orn) und Lysin (Lys), stellen Rohstoffquellen für funktionalisierte aliphatische Diamine dar. Durch Decarboxylierung können die Diamine Putrescin (Put, 1,4-Butandiamin) aus Ornithin und Cadaverin (Cad, 1,5-Pentandiamin) aus Lysin generiert werden [1]. Aminosäure-Decarboxylasen können hierbei ausgezeichnete Ausbeuten erwirken. Eine selektive Monofunktionalisierung von nur einer Aminogruppe im Anschluss stellt eine weit größere Herausforderung dar. Mit einer N-hydroxylierenden Monooxygenase (NMO) ist es z. B. möglich,

eine der beiden terminalen Aminofunktionen zu hydroxylieren [2] und so eine Grundchemikalie für weitere Anwendungen, etwa der Herstellung von Hydroxytriazenen mit biologischer Aktivität, zu erhalten [3].

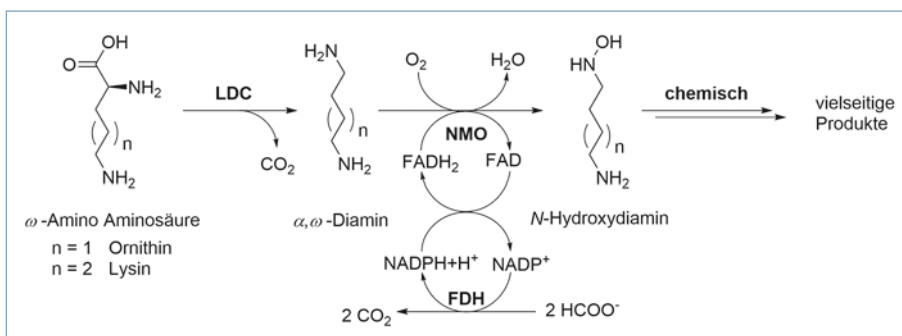
Die hohe Substratspezifität und eine geringe Aktivität der genannten Enzyme waren bisher Hürden für Anwendungen. Actinobakterien setzen NMOs in ihrer Siderophor-Biosynthese ein, die eine gewisse Promiskuität im Substratspektrum bei vergleichsweise hohen Aktivitäten aufzeigen [2]. Diese Enzymklasse wollten wir nutzbar machen und erstmals den Teil der Sidero-

phor-Biosynthese als semi-natürliche Kaskade einsetzen. Unser Ziel war es, das Potenzial von NMOs im Zusammenspiel von Kofaktorregeneration und weiteren Enzymen zu erforschen und erste Schritte in Richtung ihrer biotechnologischen Nutzung zu gehen. Es sollten die Rahmenbedingungen für erfolgreiche N-Hydroxylierungen abgesteckt und geeignete Systeme für die Substratbereitstellung mittels Aminosäure-Decarboxylasen sowie zur Regeneration von Kofaktoren gefunden werden.

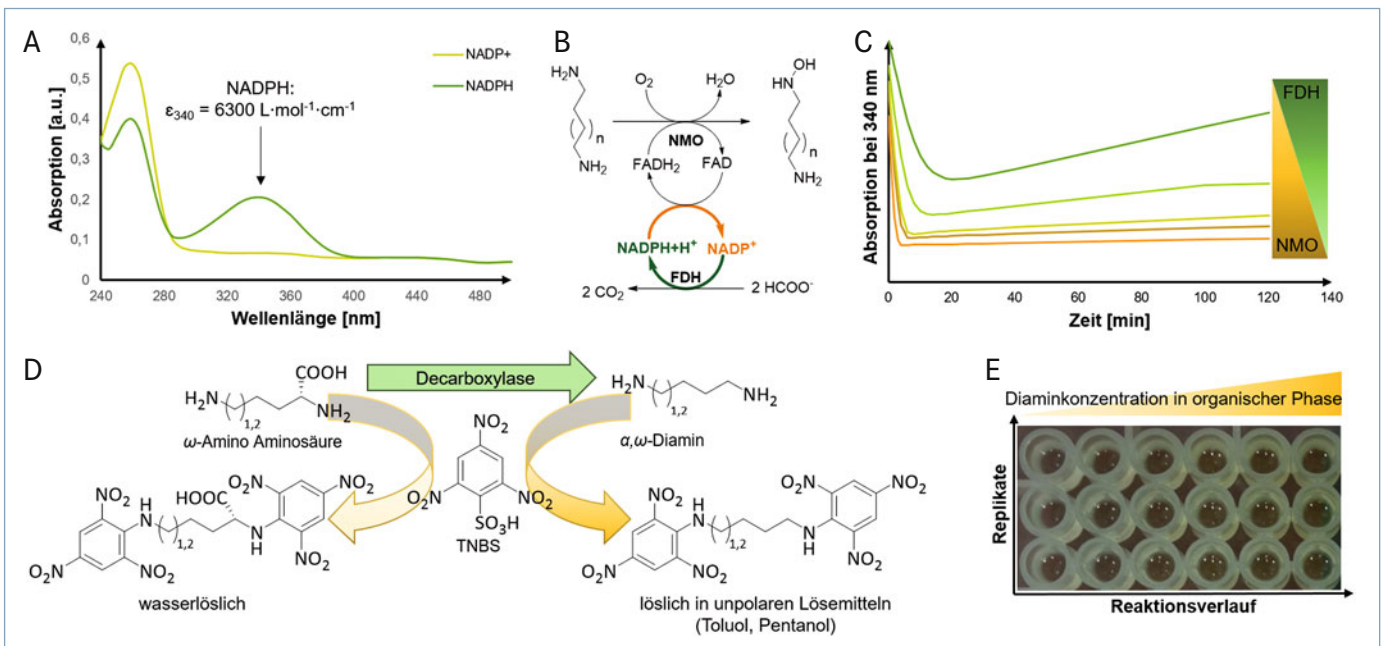
N-Hydroxylierung: N-Hydroxylase und NADPH-Regeneration

NMOs (EC 1.14.13.B10) [4] gehören zu den Flavin-abhängigen Enzymen mit einem engen Substratspektrum [5]. Sie spielen eine Rolle in der Siderophor-Synthese von Bakterien und Pilzen sowie in der Immunantwort von Pflanzen [6]. Traditionell setzen sie Aminosäuren wie Lysin und Ornithin, aber auch die Diamine Cadaverin und Putrescin, mit Sauerstoff um. Die für die Reaktion benötigten Redoxäquivalente werden durch Nikotinamidadeninindinukleotide (NAD(P)H) bereitgestellt. Mithilfe von NAD(P)H reduziert die NMO Flavinadeninindinukleotid (FAD), so erzeugtes FADH₂ kann zum Umsatz des terminalen Amins mit Sauerstoff unter Generierung von Wasser verwendet werden. Aus vorläufigen Studien zur Aktivität zweier NMOs – *TheA* aus *Thermocristum agreste* [7] und *GorA* aus *Gordonia rubripertincta* [2] – wurde *GorA* als geeigneter Katalysator für die Umwandlung von Putrescin in N-Hydroxyputrescin identifiziert. Das Enzym konnte durch rekombinante Expression aus *Escherichia coli* und Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie gewonnen werden.

Für biotechnologische Ansätze muss ein Regenerationssystem für das NADPH/NADP⁺-Redoxpaar eingesetzt werden, das mit den anderen Schritten der Kaskade kompatibel ist. Formiatdehydrogenase (FDH) ist grundsätzlich geeignet für die Bereitstellung von reduziertem NADH zur Aktivierung von FAD (Abb. 1). In unseren Studien nutzten wir nun eine Variante der FDH aus *Candida*



▲ **Abb. 1:** Enzymkaskade zur Herstellung von N-Hydroxydiaminen. Ornithin und Lysin können mit Lysindecarboxylasen (LDCs) und N-hydroxylierenden Monooxygenasen (NMOs) über α,ω -Diamine zu N-Hydroxydiaminen umgesetzt werden. Die NMO ist FAD-abhängig, was mithilfe von NADPH regeneriert wird. Letzteres wird durch Formiatdehydrogenase (FDH) unter Verbrauch von Formiat bereitgestellt.



▲ **Abb. 2:** UV-Vis-basierte Methoden für die Kaskadenentwicklung. **A–C,** NADPH-Bildung. NADP⁺ und NADPH haben definierte UV-Vis-Spektren (A). Die Konzentration von NADPH kann bei 340 nm *in operando* verfolgt werden (B, C). NMO: N-hydroxylierende Monoxygenase; FDH: Formiatdehydrogenase. **D, E,** TNBS-Test. Reaktion der zwei Analyten Aminosäure und Diamin mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS; D) und Verfolgen der Diaminbildung in der organischen Phase (E).

bovidii (CboFDH D195Q/Y196H) [8, 9]. Die Wildtyp-CboFDH ist inaktiv gegenüber NADP⁺, die hier genutzte Variante kann hingegen beide Nicotinamid-Kofaktoren umsetzen. Auch wenn die FDH-Variante weniger aktiv gegenüber NADP⁺ als gegenüber NAD⁺ ist (spezifische Aktivitäten von $0,64 \pm 0,03 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ versus $1,03 \pm 0,05 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), kann hiermit ein hinreichend effizientes Regenerationssystem für die gewünschte Anwendung bereitgestellt werden.

Zur Etablierung der N-Hydroxylierung von Putrescin zu N-Hydroxyputrescin wurde ein einfach durchzuführendes Testsystem genutzt. Initiale Aktivitätsbestimmungen wurden durchgeführt, indem die Konzentration von NADPH spektrophotometrisch bei 340 Nanometer verfolgt wurde: Für die NMO-Teilreaktion wurde die Abnahme, für die FDH-Teilreaktion die Zunahme an NADPH in der Reaktionslösung beobachtet (**Abb. 2A–C**). Zunächst wurden verschiedene Reaktionsbedingungen für beide Enzyme unabhängig untersucht. Besonderes Augenmerk lag auf der Kompatibilität der Bedingungen für *GorA* und die CboFDH-Variante. Hierfür wurde der Einfluss des am pH-Optimum von *GorA* (pH 8) eingesetzten Puffers sowie der Zusatz von Salzen als Stabilisatoren variiert (**Abb. 3A, B**). Als geeignete Kaskadenbedingungen wurden 50 mM HEPES-Puffer (pH 8,0) mit einem erhöhten Salzgehalt (50 mM NaCl und 125 mM Formiat)

gefunden. Um im *GorA/CboFDH*-System eine möglichst effiziente Bereitstellung von FADH₂ zu gewährleisten, wird *CboFDH* im Überschuss eingesetzt. Im zeitlichen Verlauf kann so nach einer anfänglichen Nettoerduktion von zugefügtem NADPH (Sättigung von *GorA* mit Substrat) eine graduelle Anreicherung des reduzierten Kofaktors erreicht und das kontinuierliche Betreiben der Hydroxylierungsreaktion sichergestellt werden. Der entsprechende charakteristische Verlauf des NADPH-Tests wies auf eine intakte Enzymkaskade hin (**Abb. 2C**: typischer Reaktionsverlauf). Weiterhin wurde die Bildung von N-Hydroxyputrescin mithilfe von Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)-Analytik nachgewiesen.

Decarboxylierung: Diamine durch Lysindecarboxylasen

Um Substrate für die N-Hydroxylierung bereitzustellen, wurden vier bekannte Lysindecarboxylasen (LDCs; EC 4.1.1.18) auf ihre Aktivität gegenüber Lysin und Ornithin untersucht: DAD_Ps aus *Pimelobacter simplex*, *GorB* aus *G. rubripertincta* CWB2, *CadA* aus *Escherichia coli* K12 AG1 und *LdcC* aus *E. coli* BL21(DE3). Alle Enzyme konnten in *E. coli* produziert und nach Nickel-Affinitätschromatographie erfolgreich isoliert werden.

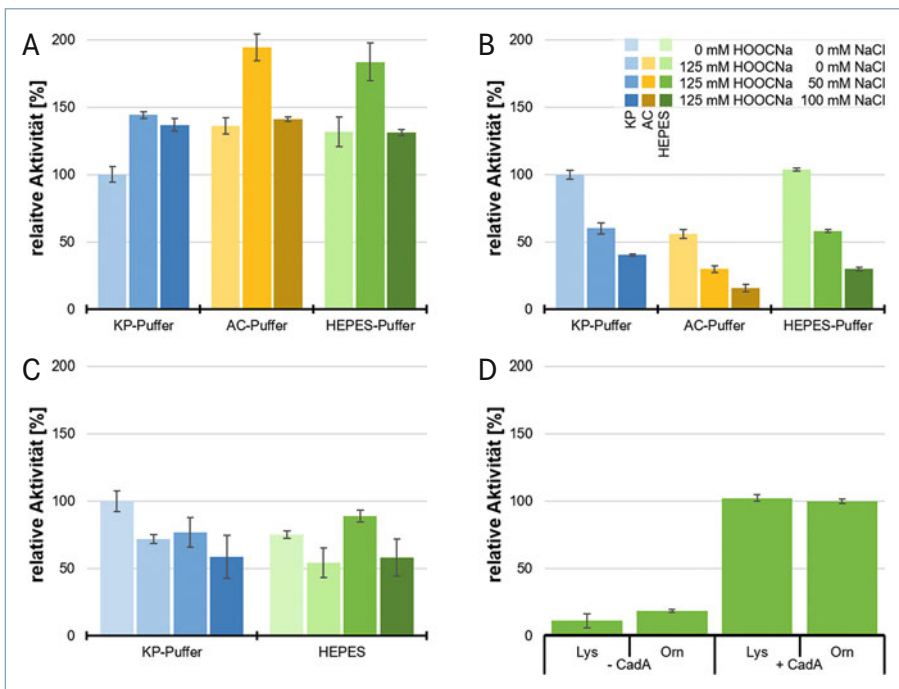
Für eine einfache und schnelle Bestimmung der Decarboxylierungsaktivität wurde

ein kolorimetrischer Test mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) im 96-Well-Format etabliert (**Abb. 2C, D**, [10, 11]). Dank der unterschiedlichen Löslichkeit von TNB-Aminosäure- und TNB-Diamin-Addukten in Toluol lassen sich die intensiv gelb gefärbten TNB-Diamin-Addukte photometrisch in Toluol nachweisen, während TNB-Aminosäure-Addukte wasserlöslich sind.

Basierend auf initialen Produktbildungsdaten gegenüber Lysin wurde *CadA* für die Kaskade gewählt, da es unter Standardbedingungen die höchste Umsatzrate (135 U/mg) zeigte. Um die Decarboxylierung in der Enzymkaskade ablaufen zu lassen, wurde die Aktivität von *CadA* unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht (**Abb. 3C**). Die Variation von Medium und Salzkonzentration brachte eine Reduzierung der Enzymleistung mit sich, trotzdem konnten Aktivitäten von 48 U/mg unter Kaskadenbedingungen erreicht werden.

Drei-Enzym-Kaskade: von der Aminosäure zum N-Hydroxydiamin

Schließlich wurden erste Reaktionen im Kaskadenansatz realisiert (**Abb. 3D**). Aufgrund der vorher für alle Teilschritte gefundenen Bedingungen erwies es sich als sinnvoll, die zwei enzymatischen Schritte sequenziell zu betreiben. Auf diese Weise konnte der für die Decarboxylierung nachteilige, für die



▲ **Abb. 3:** Spezifische Aktivität der Enzymsysteme. **A,** Aktivität der N-hydroxylierenden Monoxygenase (NMO): *GorA*. **B,** Formiatdehydrogenase(FDH)-Aktivität: *CboFDH*, beides mit NADPH-Assay. **C,** Lysindecaboxylase(LDC)-Aktivität: *CadA* mit TNBS-Test (TNBS: 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure). **D,** Aktivität der Enzyme unter Kaskadenbedingungen (HEPES-Puffer, 50 mM, pH 8; 50 mM NaCl; 125 mM Formiat; 10 mM Aminosäure). Puffer: Kaliumphosphat (KP), Ammoniumcarbonat (AC) und HEPES, Salze: Natriumformiat (HCOONa) und NaCl.

Hydroxylierung aber nötige hohe Salzgehalt im ersten Teil vermieden und eine effiziente Bereitstellung des Intermediats Putrescin gewährleistet werden. Durch Verfolgen des NADPH-Gehalts in der Reaktion wurde die Enzymaktivität nachgewiesen. Kontrollen ohne *CadA* schlossen ein falsch-positives Ergebnis aufgrund von Aminosäurehydroxylierung oder Entkopplung der NADPH-Bildung durch Anwesenheit der Decarboxylase aus.

Nächste Schritte zu Feinchemikalien

Die von uns im Enzymkaskadenansatz hergestellten hydroxylierten Diamine können in weiteren Schritten zu wertvollen Feinchemi-

kalien funktionalisiert werden. Erste Versuche zur chemischen Kopplung eines Diazoniumsalzes führten erfolgreich zu Hydroxytriazinen und eröffnen eine weite Bandbreite an Möglichkeiten, N-Hydroxydiamine als wertvolle Ausgangsstoffe in verschiedenen Wertschöpfungsketten zu nutzen, z. B. für Komponenten mit antimikrobieller Wirkung.

Danksagung

Wir danken der DECHEMA (Max-Buchner-Stipendium MBFSt 3646). Das Projekt wird durch das Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen (Pjt-TRI/1141ng006) gefördert.

Literatur

- [1] Wendisch VF, Mindt M, Pérez-García F (2018) Biotechnological production of mono- and diamines using bacteria: recent progress, applications, and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:3583–3594
- [2] Esuola CO, Babalola OO, Heine T et al. (2016) Identification and characterization of a FAD-dependent putrescine N-hydroxylase (*GorA*) from *Gordonia rubripertincta* CWB2. *J Mol Catal B Enzym* 134:378–389
- [3] Goswami AK, Purohit DN (2002) Synthesis and antimicrobial activities of some hydroxytriazines: a new class of biologically active compounds. *Anal Sci* 17:1789–1791
- [4] Huijbers MME, Montersino S, Westphal AH et al. (2014) Flavin dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys* 544:2–17
- [5] Waldman AJ, Ng TL, Wang P et al. (2017) Heteroatom-heteroatom bond formation in natural product biosynthesis. *Chem Rev* 117:5784–5863
- [6] Hartmann M, Zeier T, Bernsdorff F et al. (2018) Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell* 173:456–469
- [7] Heine T, Mehnert M, Schwabe R et al. (2017) Thermochelin, a hydroxamate siderophore from *Thermococcus agreste* DSM 44070. *Solid State Phenom* 262:501–504
- [8] Andreadeli A, Platis D, Tishkov V et al. (2008) Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. *FEBS J* 275:3859–3869
- [9] Hoelsch K, Sührer I, Heusel M et al. (2013) Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2473–2481
- [10] Ngo TT, Brillhart KL, Davis RH et al. (1987) Spectrophotometric assay for ornithine decarboxylase. *Anal Biochem* 160:290–293
- [11] Legaz M-E, Fontaniella B, de Armas R et al. (2001) Determination by high performance liquid chromatography of ornithine and lysine decarboxylases in sugar cane juices. *Chromatographia* 53:S260–S265

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Artur Maier, Sarah Wansel, Dirk Tischler, Alvaro Gomez Baraibar und Carolin Mügge (v. l. n. r.).

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dirk Tischler
AG Mikrobielle Biotechnologie
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
D-44780 Bochum
dirk.tischler@rub.de