

***N*-Hydroxydiamine – Bausteine für Wirkstoffsynthesen aus bio-basierten Quellen**

Artur Maier, Sarah Wansel, Alvaro Gomez Baraibar, Carolin Mügge, Dirk Tischler*

AG MIKROBIELLE BIOTECHNOLOGIE, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

An enzymatic cascade from ω -amino aminoacids 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 puts handles on future reaction engineering tasks.

Funktionalisierte aliphatische Diamine

Aminosäuren mit einer ω -Amino-Seitenkette, wie Ornithin (Orn) und Lysin (Lys), stellen Rohstoffquellen für funktionalisierte aliphatische Diamine dar. Durch Decarboxylierung können die Diamine Putrescin (Put, 1,4-Butandiamin, aus Orn) und Cadaverin (Cad, 1,5-Pentandiamin, aus Lys) generiert werden. **(1)** Aminosäure-Decarboxylasen können hierbei ausgezeichnete Ausbeuten erwirken. Eine selektive Monofunktionalisierung von nur einer Aminogruppe im Anschluss stellt eine weitgrößere 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 Hydroxytriazinen mit biologischer Aktivität, zu erhalten. **(3)**

Die hohe Substratselektivität 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 wollen wir nutzbar machen und erstmals den Teil der Siderophor-Biosynthese als semi-natürliche Kaskade einsetzen. Unser Ziel war es, das Potential von NMOs im Zusammenspiel von Kofaktor-Regeneration und weiteren Enzymen zu erforschen und erste Schritte in Richtung derer biotechnologischer Nutzung zu gehen. Es sollten die Rahmenbedingungen für eine erfolgreiche *N*-Hydroxylierungen abgesteckt und geeignete Systeme für die Substrat-Bereitstellung mittels Aminosäure-Decarboxylasen sowie zur Regeneration von Kofaktoren gefunden werden.

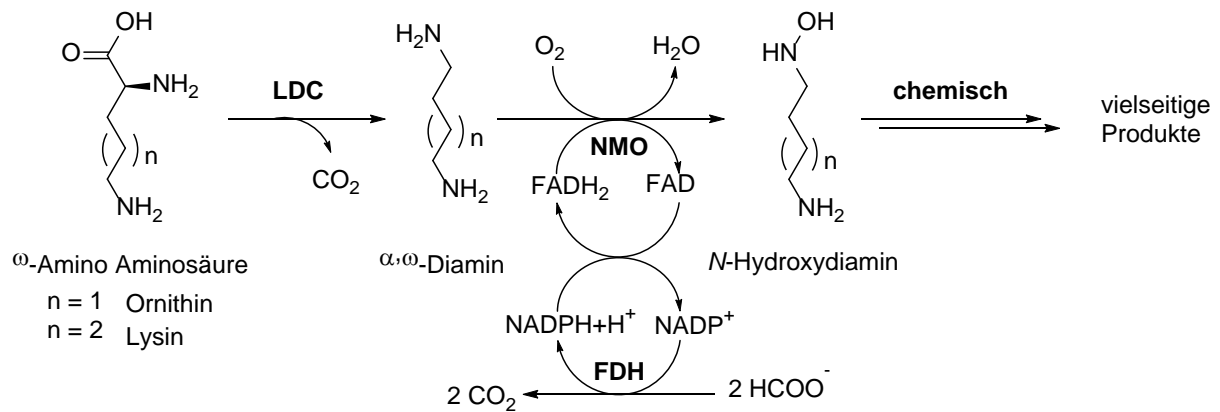


Abb. 1 Enzymkaskade zu *N*-Hydroxydiaminen. Ornithin/Lysin können mit LDCs und NMOs über α,ω -Diamine zu *N*-Hydroxydiaminen umgesetzt werden. NMO ist FAD-abhängig, was mithilfe von NADPH regeneriert wird. Letzteres wird durch Formiat-Dehydrogenase (FDH) unter Verbrauch von Formiat bereitgestellt.

***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 Lys und Orn, aber auch die Diamine Cad und Put, mit Sauerstoff um. Die für die Reaktion benötigten Redox-Äquivalente werden durch Nikotinamidadeninucleotide (NAD(P)H) bereitgestellt. NAD(P)H reduziert Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), so erzeugtes FADH_2 kann zum Umsatz des terminalen Amins mit Sauerstoff unter Generierung von Wasser verwendet werden. Aus vorläufigen Studien zur Aktivität zweier NMOs, *TheA* aus *Thermocrispum agreste* **(7)** und *GorA* aus *Gordonia rubripertincta* **(2)** wurde *GorA* als geeigneter Katalysator für die Umwandlung von Put in *N*-Hydroxy-Put identifiziert. Das Enzym konnte durch rekombinante Expression aus *E. coli* und Aufreinigung über Ni-Affinitätschromatographie gewonnen werden.

Für biotechnologische Ansätze muss ein Regenerationssystem für das $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ -Redoxpaar eingesetzt werden, das mit den anderen Schritten der Kaskade kompatibel ist. Formiat-Dehydrogenase 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 boidinii* (*CboFDH* D195Q/Y196H) mit der Fähigkeit, das $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ Paar umzusetzen. **(8, 9)** Wildtyp-*CboFDH* ist inaktiv gegenüber NADP^+ , die hier genutzte Variante kann beide Nicotinamid-Cofaktoren umsetzen. Auch wenn die FDH-Variante weniger aktiv gegenüber NADP^+ als gegenüber NAD^+ ist (spez. Aktivitäten von $0,64 \pm 0,03 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ vs. $1,03 \pm 0,05 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), kann hiermit ein hinreichend effizientes Regenerationssystem für die gewünschte Anwendung bereitgestellt werden.

Zur Etablierung der *N*-Hydroxylierung von Put zu *N*-Hydroxy-Put wurde ein einfach durchzuführendes Testsystem genutzt. Initiale Aktivitätsbestimmungen wurden durchgeführt, indem die Konzentration von NADPH spektrophotometrisch bei 340 nm 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 Kompatibilität der Bedingungen für *GorA* und der *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 netto-Reduktion von zugefügtem NADPH (Sättigung von GorA mit Substrat) eine graduelle Anreicherung des reduzierten Cofaktors erreicht und das kontinuierliche Betreiben der Hydroxylierungsreaktion sichergestellt werden. Der entsprechende charakteristische Verlauf des NADPH Tests wies auf eine intakte Enzymkaskade hin (vgl. Abb. 2c: typischer Reaktionsverlauf). Weiterhin wurde die Bildung von *N*-Hydroxy-Putramin mithilfe von LC-MS Analytik nachgewiesen.

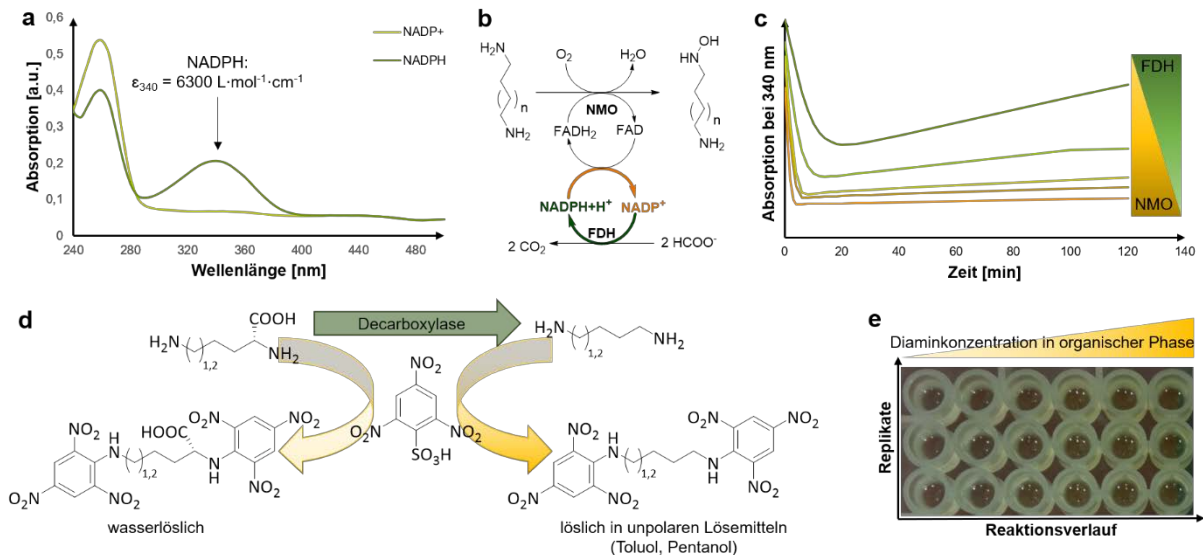


Abb. 2 UV-Vis basierte Methoden für die Kaskadenentwicklung. Oben, NADPH Bildung: (a) NADP⁺ und NADPH haben definierte UV-Vis Spektren. (b,c) Die Konzentration von NADPH kann bei 340 nm in operando verfolgt werden. Unten, TNBS-Test: (d) Reaktion der zwei Analyten Aminosäure und Diamin mit TNBS, (e) Verfolgen der Diamin-Bildung in der organischen Phase.

Decarboxylierung: Diamine durch Lysin-Decarboxylasen

Um Substrate für die *N*-Hydroxylierung bereitzustellen wurden vier bekannte Lysin-Decarboxylasen (LDCs; EC4.1.1.18) auf Aktivität gegenüber Lys und Orn untersucht: DAD_Ps aus *P. simplex*, GorB aus *G. rubripertincta* CWB2, CadA aus *E. coli* (*E. coli*) K12AG1, 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 colorimetrischer 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 Produktbildungsrate gegenüber Lys 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). Variation von Medium und Salzkonzentration brachte eine Reduzierung der Enzymleistung mit sich, trotzdem konnten Aktivitäten von 48 U/mg unter Kaskadenbedingungen erreicht werden.

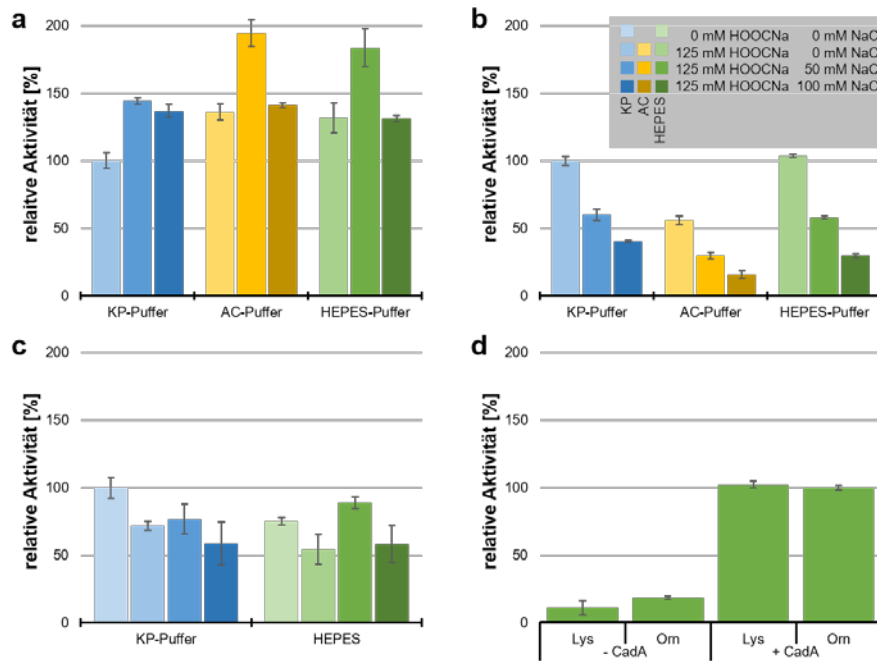


Abb. 3 Spez. Aktivität der Enzymsysteme. (a) NMO Aktivität: *GoraA*, (b) FDH Aktivität: *CboFDH*, beides mit NADPH Assay. (c) LDC Aktivität: *CadA* mit TNBS-Test. (d) Aktivität der Enzyme unter Kaskadenbedingungen (HEPES Puffer, 50 mM, pH 8, 50 mM NaCl, 125 mM Formiat, 10 mM Aminosäure). Puffer: Kaliumphosphat (KP), Ammoniumcarbonat (AC) und HEPES, Salze: Natriumformiat (HCOONa) und NaCl.

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 zeigte es sich als sinnvoll, die zwei enzymatischen Schritte sequentiell zu betreiben. Auf diese Weise konnte, der für die Decarboxylierung nachteilhafte, für die Hydroxylierung aber nötige, hohe Salzgehalt im ersten Teil vermieden und eine effiziente Bereitstellung des Intermediates Put gewährleistet werden. Durch Verfolgen des NADPH-Gehaltes in der Reaktion wurde Enzymaktivität nachgewiesen. Kontrollen ohne *CadA* schlossen ein falsch-positives Ergebnis aufgrund von Aminosäure-Hydroxylierung oder Entkopplung der NADPH-Bildung durch Anwesenheit der Decarboxylase aus.

Nächste Schritte zu Feinchemikalien

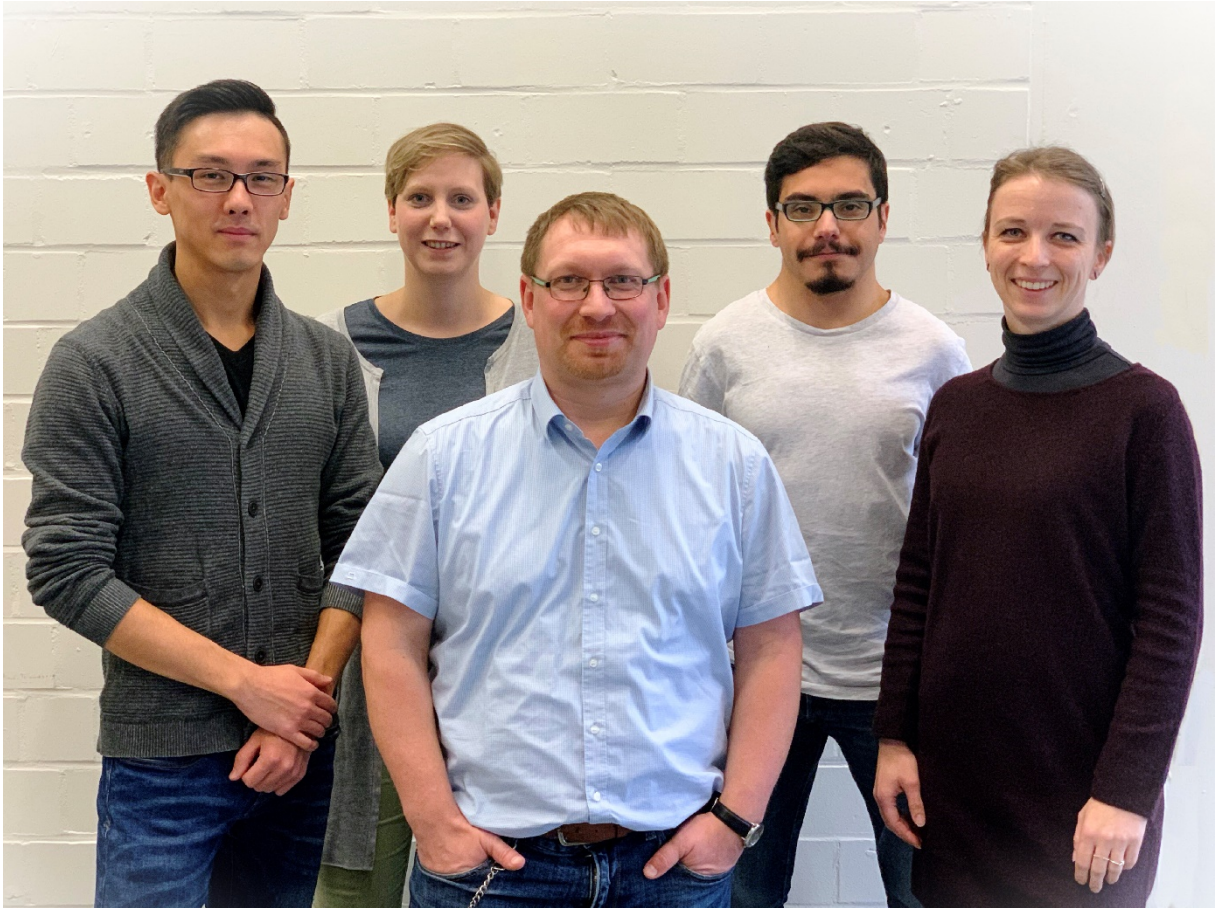
Die von uns im Enzym-Kaskadenansatz hergestellten hydroxylierten Diamine können in weiteren Schritten zu wertvollen Feinchemikalien funktionalisiert werden. Erste Versuche zur chemischen Kopplung eines Diazoniumsalzes führten erfolgreich zu Hydroxytriazenen und eröffnen uns eine weite Bandbreite an Möglichkeiten, *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 (PtJ-TRI/1141ng006) gefördert.

Literatur

1. Wendisch VF, Mindt M, and 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 and Purohit DN (2002) Synthesis and Antimicrobial Activities of Some Hydroxytriazenes: A New Class of Biologically Active Compounds. *Anal Sci* 17icas:i789–i791
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-Hydroxypipelicolic Acid Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell* 173:456–469.e16
7. Heine T, Mehnert M, Schwabe R, et al (2017) Thermochelin, a Hydroxamate Siderophore from *Thermocristum 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, Armas R de, et al (2001) Determination by high performance liquid chromatography of ornithine and lysine decarboxylases in sugar cane juices. *Chromatographia* 53:S260–S265



Das Team Mikrobielle Biotechnologie beschäftigt sich mit dem Identifizieren, Beschreiben und Anwenden neuer Biokatalysatoren mit Fokus auf Biotransformation von aromatischen Verbindungen und Redox-Enzymen. V.l.n.r.: Artur Maier, Sarah Wansel, Dirk Tischler, Alvaro Gomez Baraibar, Carolin Mügge

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Dirk Tischler

AG Mikrobielle Biotechnologie

Ruhr-Universität Bochum

Universitätsstraße 150

44780 Bochum

Tel.: 0234-32-22656

dirk.tischler@rub.de