

Eine *R*-selektive Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* mit α/β -Hydrolase-Faltung**

Jennifer Andexer, Jan von Langermann, Annett Mell, Marco Bocola, Udo Kragl,*
Thorsten Eggert* und Martina Pohl*

Hydroxynitril-Lyasen (HNLs) katalysieren die enantioselektive Knüpfung von C-C-Bindungen von Aldehyden oder Ketonen mit HCN zu chiralen Cyanhydrinen, die vielseitige Bausteine für Produkte der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie darstellen.^[1] Zu den wichtigsten der aus Cyanhydrinen zugänglichen Verbindungen gehören chirale α -Hydroxsäuren wie Mandelsäurederivate,^[1e,f,2a] *m*-Phenoxybenzaldehyde^[2c] oder Strukturen mit aliphatischen Brücken zwischen Aldehydfunktion und aromatischem Ring, die zur Synthese von „Prilen“ verwendet werden.^[2d] Die natürliche Funktion der HNLs ist dagegen die als Cyanogenese bezeichnete Spaltung von Cyanhydrinen. Die bisher bekannten HNLs können in zwei Gruppen unterteilt werden: *R*-selektive Enzyme, die sich von Oxidoreduktasen ableiten, wie die HNLs aus verschiedenen *Rosaceae*^[2] und aus *Linum usitatissimum*,^[3a] sowie *S*-selektive HNLs, die sich aus Hydrolasen mit α/β -Hydrolase-Faltung entwickelt haben, wie die Enzyme aus *Hevea brasiliensis* (*HbHNL*),^[3b] *Manihot esculenta* (*MeHNL*),^[3c] und *Sorghum bicolor* (*SbHNL*).^[3d] Wir stellen hier die erste Ausnahme von dieser Regel vor: Das aus der nichtcyanogenen Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-

schmalwand) stammende Enzym gehört strukturell zu den α/β -Hydrolasen, ist aber *R*-selektiv.

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach chiralen Cyanhydrinen ist das Interesse an neuen stereoselektiven HNLs stark gestiegen. Geeignete Biokatalysatoren müssen ein breites Substratspektrum aufweisen und sollten einfach und preiswert produziert werden können. Diesen Anforderungen entsprechen momentan die *S*-selektiven Enzyme *HbHNL* und *MeHNL*: Sie können in bakteriellen Wirten wie *Escherichia coli* exprimiert werden und setzen zahlreiche aliphatische und aromatische Aldehyde und Ketone um.^[4] Ein ähnlich breites Substratspektrum weisen einige *R*-selektive HNLs aus verschiedenen *Prunus*-Arten auf (*P. amygdalus* (*PaHNL*) und *P. mume* (*PmHNL*)). Diese Enzyme werden bisher in Form von Pflanzenextrakten (entfettetes Samenmehl) verwendet. Die *PaHNL* (Isoenzym 5) kann zudem heterolog in *Pichia pastoris* exprimiert werden.^[2a,e]

Kürzlich wurde über verschiedene Ansätze berichtet, neue HNLs in Rohextrakten von cyanogenen Pflanzen zu identifizieren, wodurch einige neue Enzymquellen entdeckt wurden.^[5] Versuche, neue HNLs ausgehend von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Enzymen zu finden, waren hingegen bisher nicht erfolgreich.^[6,7]

Im Genom der nichtcyanogenen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sind einige Gensequenzen identifiziert worden, die Ähnlichkeit zu *MeHNL* und *HbHNL* aufweisen.^[7] Im Zuge unserer Untersuchungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen von α/β -Hydrolasen haben wir einige dieser Gene kloniert und in *E. coli* exprimiert. Überraschenderweise zeigte das Protein AAN13041 (Genbank) eine hohe Aktivität gegenüber Mandelonitril und katalysierte zudem die Spaltung von einigen anderen Cyanhydrinen, wie Cyclohexanon- und *m*-Phenoxybenzaldehyd-Cyanhydrin, während Acetaldehyd-, Propionaldehyd- und Acetoncyanhydrin nicht oder nur schlecht umgesetzt wurden.^[8]

Eine Aktivitätsprüfung ergab, dass das neue Enzym die enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen aus aromatischen und aliphatischen Aldehyden sowie Ketonen mit hoher *R*-Selektivität und guten bis ausgezeichneten Umsätzen katalysiert (Tabelle 1).^[9] Das ganze Spektrum an substituierten Benzaldehyden wird mit sehr hoher Aktivität und Enantioselektivität umgesetzt. Sogar mit Substraten wie **3**, **4** oder **6**, die auch ohne den Biokatalysator zum Cyanhydrin reagieren, wurden Enantiomerenüberschüsse von 99% *ee* erzielt, was auf eine hohe enzymatische Aktivität schließen lässt. Der vollständige Umsatz sperriger Substrate gelang durch eine geringfügige Verlängerung der Reaktionszeit. Bisher wurden alle Reaktionen bei pH 5 ausgeführt, durch eine Senkung des pH-Wertes könnte die nichtenzymatische Reaktion aber noch

[*] J. von Langermann, A. Mell, Prof. Dr. U. Kragl

Institut für Chemie
Universität Rostock
Albert-Einstein-Straße 3a, 18059 Rostock (Deutschland)

Fax: (+49) 381-498-6452

E-Mail: udo.kragl@uni-rostock.de

Homepage: <http://www.chemie.uni-rostock.de/kragl>

Dr. T. Eggert

evocatal GmbH

Merowingerplatz 1a, 40225 Düsseldorf (Deutschland)

E-Mail: t.eggert@evocatal.com

Homepage: www.evocatal.com

J. Andexer, Dr. M. Pohl

Institut für Molekulare Enzymtechnologie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

52426 Jülich (Deutschland)

Fax: (+49) 2461-612940

E-Mail: ma.pohl@fz-juelich.de

Homepage: www.iet.uni-duesseldorf.de

Dr. M. Bocola

Universität Regensburg

Institut für physikalische Biochemie 2

Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)

[**] Die Autoren danken der Gruppe von Ute Höcker (Universität Düsseldorf, Botanik IV) für die cDNA und mRNA von *Arabidopsis*.

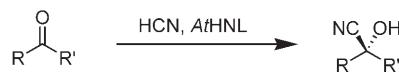
 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Tabelle 1: AtHNL-Substratspektrum.^[a]

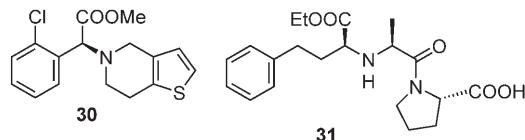
Substrat	<i>t</i> [h]	<i>X</i> _{enz} ^[b] [%]	<i>ee</i> (<i>R</i>) [%]	<i>X</i> _{nenz} ^[b] [%]
				
R = H	1	2	>99	>99
R = <i>o</i> -F	2	2	>99	99
R = <i>o</i> -Cl	3	2	>99	99
R = <i>o</i> -Br	4	6	99	98
R = <i>o</i> -I	5	3	>99	>95
R = <i>m</i> -F	6	2	>99	>99
R = <i>m</i> -Cl	7	3	99	>99
R = <i>m</i> -Br	8	6	99	95
R = <i>m</i> -I	9	6	98	93
R = <i>m</i> -PhO	10	22	83	>95
R = <i>p</i> -F	11	2	>99	>99
R = <i>p</i> -Cl	12	2	>99	>99
R = <i>p</i> -Br	13	3	99	>99
R = <i>p</i> -I	14	6	99	92
R = <i>p</i> -HO	15	3	96	97
R = <i>p</i> -MeO	16	22	87	68
				
17	22	97	96	97
				
18	22	99	68	97
				
19	6	68	n.b. ^[c]	6
				
20	6	99	98	78
				
21	22	56	>95	0
				
22	3	53	n.b. ^[c]	0
				
23	22	0	–	0
				
24	6	48	95	2
				
25	22	2	–	0
				
26	3	94	– ^[d]	76
				
27	22	7	n.b.	0
				
28	22	8	95	0
				
29	3	1	–	0

[a] Alle Reaktionen wurden in einem Zweiphasensystem ausgeführt, Umsätze (*X*) und Enantiomerenüberschüsse (*ee*) wurden durch Gaschromatographie ermittelt.^[9] n.b. = nicht bestimmt. [b] enz: enzymatisch; nenz: nichtenzymatisch. [c] Enantiomerentrennung durch GC (Chiraldex-Kapillarsäule, G-PN- γ -Cyclodextrin, Propionyl) war nicht möglich. [d] Achirales Produkt.

weiter zurückgedrängt werden. Trotzdem ist der für *o*-Chlorbenzaldehyd-Cyanhydrin ermittelte *ee*-Wert bereits höher als in früheren Arbeiten mit optimierter *PaHNL*^[2a] oder mit dem Wildtypenzym.^[10] Durch anschließende Hydrolyse erhält man (*R*)-*o*-Chlormandelinsäure, eine Schlüsselverbindung in der Synthese des Antithrombotikums Clopidogrel (**30**). Das aus **18** resultierende Cyanhydrin kann zu dem α -Hydroxyester umgesetzt werden, der ein Baustein für ACE-Inhibitoren wie Enalapril (**31**) ist (Schema 1).



R' = H, Me



Schema 1. AtHNL-katalysierte Synthese von chiralen Cyanhydrinen und Beispiele für daraus abgeleitete Wirkstoffe.

Substrat **18** ergibt einen etwas niedrigeren *ee*-Wert als die Verbindung **17**, was darauf hindeutet, dass die enzymatische Reaktion langsamer ist; in diesem Fall ist eine Anpassung der Reaktionsbedingungen, vor allem des pH-Werts erforderlich. Die Aktivität wird ebenso durch eine längere Seitenkette bei aliphatischen Aldehyden reduziert, dies hat aber keinen Einfluss auf die Stereoselektivität. Gegenüber aliphatischen und aromatischen Ketonen ist das Enzym weniger aktiv.

Um die Ähnlichkeiten und Unterschiede bezüglich der Reaktionsmechanismen und Stereoselektivitäten von AtHNL und den strukturell ähnlichen, aber *S*-selektiven Enzymen *HbHNL* und *MeHNL* zu verstehen, wurde ein Homologiemodell erstellt, das auf der Kristallstruktur der *HbHNL*^[9,11] beruht. Der Vergleich der beiden Strukturen lässt in der AtHNL eine typische katalytische Triade aus Ser81, Asp208 und His236 erkennen (Abbildung 1).

Diese Aminosäuren wurden durch gerichtete Mutagenese gegen nichtfunktionelle, aber sterisch ähnliche Reste ausge-

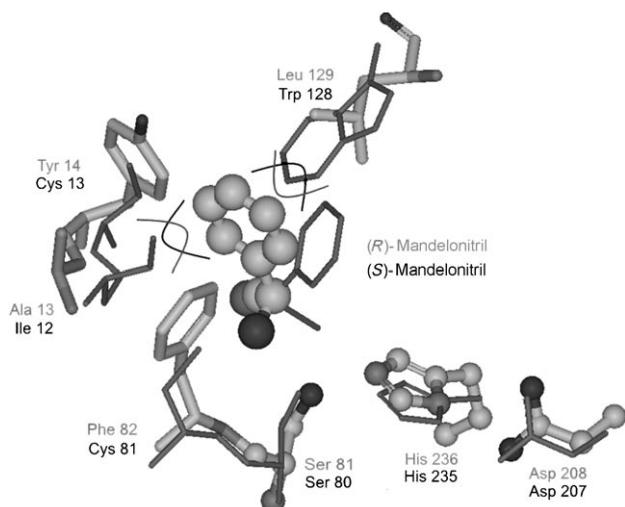


Abbildung 1. Überlagerung der *HbHNL*-Kristallstruktur (dunkelgrau, dünne Linien)^[11] und des AtHNL-Strukturmodells (hellgrau, dicke Struktur). Gezeigt sind die katalytische Triade (Ser/His/Asp) und die Aminosäurereste, die mit gebundenem Mandelonitril in Kontakt stehen: (*R*)-Mandelonitril im AtHNL-Modell und (*S*)-Mandelonitril in der *HbHNL*-Kristallstruktur (1YB8). Im AtHNL-Modell ist zwischen Leu 129 und Ala 13 eine mögliche Bindetasche für (*R*)-Mandelonitril vorhanden, die in der *HbHNL*-Struktur durch Trp 128 und Ile 12 blockiert wird.

tauscht. Die entstandenen Varianten (Ser81Ala, Asp208Asn, His236Phe) zeigen nur noch eine geringe Restaktivität (unter 2%), was die Funktion der entsprechenden Aminosäuren für die Katalyse bestätigt.^[9] In *HbHNL* wurde Lys236 als ein weiterer für die Katalyse wichtiger Aminosäurerest identifiziert;^[11a] dieser Rest ist in *AtHNL* durch Met237 ersetzt.

Zur Untersuchung der Unterschiede in der Stereoselektivität wurde auf der Grundlage der *HbHNL*-Struktur mit (*S*)-Mandelonitril ein Strukturmodell für *AtHNL* mit gebundenem (*R*)-Mandelonitril erstellt.^[9,11] Im Vergleich zur *HbHNL* sind zwei Seitenketten der potenziellen Substratbindetasche in der *AtHNL* ausgetauscht: Anstelle von Trp128 und Cys13 (*HbHNL*) sind in der *AtHNL* Leu129 und Tyr14 zu finden (Abbildung 1). Anhand des Modells kann die strikte *S*-Selektivität der *HbHNL* folgendermaßen erklärt werden: Die Positionierung von Trp128 und Ile12 verhindert die Bindung von (*R*)-Mandelonitril im aktiven Zentrum. Darüber hinaus besteht Grund zu der Annahme, dass die aromatischen Seitenketten von Tyr14 und Phe82 (*R*)-Mandelonitril in der postulierten *AtHNL*-Bindungstasche stabilisieren.

Erste Untersuchungen an *AtHNL*-Varianten zeigen, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure nicht ausreicht, um die Stereoselektivität des Enzyms umzukehren. Mit der Variante Tyr14Cys konnte weiterhin nur (*R*)-Mandelonitril synthetisiert werden. Experimente mit der entsprechenden Doppelmutante (Tyr14Cys/Leu129Trp) und die Bestimmung der Kristallstruktur des Enzyms sind in Arbeit, da das Homologiemodell nicht präzise genug ist, um die diskutierten Aktivitäts- und Selektivitätsunterschiede zu erklären.

Wir haben hier eine neue *R*-spezifische HNL (Enzymklassifizierung: E.C. 4.2.1.-) aus *Arabidopsis thaliana* und ihre Anwendung in der Biokatalyse beschrieben. Das Enzym ist für die Herstellung von *R*-Cyanhydrinen eine gute Alternative zu bekannten *R*-spezifischen HNLs wie der *PaHNL*,^[2e] da es durch induzierte Genexpression in *E. coli* leicht in ausreichenden Mengen herstellbar ist und ein breites Substratspektrum aufweist (aliphatische und aromatische Aldehyde und Ketone).^[14] Diese erste *R*-spezifische HNL mit α/β -Hydrolase-Faltung verspricht nach Bestimmung der Kristallstruktur interessante Einblicke in den Reaktionsmechanismus solcher Enzyme.

Eingegangen am 4. April 2007,
veränderte Fassung am 20. Mai 2007
Online veröffentlicht am 1. Oktober 2007

Stichwörter: Cyanhydrine · Enzymkatalyse · Gen-Engineering · Hydroxynitril-Lyase · Oxynitrilase

- [1] a) M. Sharma, N. N. Sharma, T. C. Bhalla, *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 279; b) H. Griengl, H. Schwab, M. Fechter, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 252; c) M. H. Fechter, H. Griengl, *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 287; d) M. North, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 147; e) H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 547; f) G. Coppola, H. Schuster, *α -Hydroxy Acids in Enantioselective Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [2] a) A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. Pöchlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubbolts, H. Schwab, K. Gruber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4963–4966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4815; b) S. Nanda, Y. Kato, Y. Asano, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10908; c) J. Aleu, A. J. Bustillo, R. Hernandez-Galan, I. G. Collado, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 2037; d) R. Weis, R. Gaisberger, W. Skranc, K. Gruber, A. Glieder, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4778; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4700; e) *PaHNL* ist Cofaktor-abhängig und erfordert posttranskriptionale Modifizierungen, etwa die Bildung einer Disulfidbrücke und Glykosylierungen.
- [3] a) J. Albrecht, I. Jansen, M. R. Kula, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1993**, *17*, 191; b) M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, H. Griengl, S. D. Kohlwein, H. Schwab, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *799*, 707; c) J. Hughes, F. J. Carvalho, M. A. Hughes, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311*, 496; d) H. Wajant, K. W. Mundry, K. Pfenningmaier, *Plant Mol. Biol.* **1994**, *26*, 735.
- [4] a) S. Förster, J. Roos, F. Effenberger, H. Wajant, A. Sprauer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 493; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 437; b) M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, R. Bona, K. Rumbold, J. Luckl, H. Griengl, S. D. Kohlwein, H. Schwab, *Protein Expression Purif.* **1997**, *11*, 61; c) R. J. H. Gregory, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3649.
- [5] a) Y. Asano, K. Tamura, N. Doi, T. Ueatrongchit, A. H. Kittikun, T. Ohmiya, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 2349; b) L. Hernandez, H. Luna, F. Huis-Teran, A. Vazquez, *J. Mol. Catal. B* **2004**, *30*, 105.
- [6] B. Reiter, A. Glieder, D. Talker, H. Schwab, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 778.
- [7] U. Wäspi, B. Misteli, M. Hasslacher, A. Jandrositz, S. D. Kohlwein, H. Schwab, R. Dudler, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 32.
- [8] Die Mandelonitril-Spaltung wurde nach Bauer et al. ermittelt;^[12] die Spaltung anderer Cyanhydrine wurde mit einem System zur HCN-Detektion gemessen.^[13]
- [9] Experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [10] L. M. van Langen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 823.
- [11] a) K. Gruber, G. Gartler, B. Krammer, H. Schwab, C. Kratky, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20501; b) G. Gartler, C. Kratky, K. Gruber, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 87.
- [12] M. Bauer, H. Griengl, W. Steiner, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62*, 20.
- [13] J. Andexer, J. K. Guterl, M. Pohl, T. Eggert, *Chem. Commun.* **2006**, 4201.
- [14] *AtHNL* und seine Anwendungen sind Gegenstand einer Patentanmeldung: (J. Andexer, T. Eggert, evocatel GmbH, Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 058 373.6, **2006**).