



Ganzzellen-Biokatalysator für stereoselektive C-H-Aminierungen

Peter Both, Hanna Busch, Paul P. Kelly, Francesco G. Mutti, Nicholas J. Turner und Sabine L. Flitsch*

Abstract: Enantiomerenreine, chirale Amine sind unentbehrliche Bausteine in bioaktiven Pharmazeutika, und ihre Synthese aus einfachen Startmaterialien ist daher von großem Interesse. Eine der vielversprechendsten Strategien ist die chemisch anspruchsvolle, stereoselektive Synthese chiraler Amine durch eine C-H-Aminierung. Hier berichten wir über den Einsatz einer Multienzym-Kaskade, generiert in einer einzelnen bakteriellen Ganzzelle, die es möglich macht, stereoselektive Aminierungen in Benzylposition mit *ee*-Werten von 97.5 % zu katalysieren. Die Kaskade nutzt dabei vier heterolog exprimierte, rekombinante Enzyme, wobei die nötigen Kofaktoren von der Wirtszelle bereitgestellt werden und Isopropylamin als Aminodonor extern zugegeben wird. Diese Kaskade repräsentiert damit das erste Beispiel eines erfolgreichen De-novo-Designs eines einzelnen Ganzzellen-Biokatalysators für die formale stereoselektive C-H-Aminierung.

Die stereoselektive C-H-Aminierung ist eine sehr vielversprechende Synthesestrategie für die Umsetzung von einfachen Startmaterialien hin zu hochwertigen, chiralen Aminobausteinen und hat daher großes Interesse in der organischen Chemie auf sich gezogen. Die bisher erfolgreichsten chemischen Strategien umfassen dabei intramolekular und Übergangsmetall-katalysierte Reaktionen^[1] mit einer breiten Vielzahl an chemischen^[2] und enzymatischen^[3,4] Katalysatoren. Das Ziel dieser Studie war die Konstruktion de-novo-biosynthetischer Multienzym-Kaskaden, deren genereller Aufbau durch retrosynthetische Aspekte geleitet wurde.^[5] Dies führte zu der Konstruktion eines einzelnen bakteriellen Zellsystems, das die stereoselektive C-H-Aminierung in Benzylposition ausgehend von einfachen, nicht-funktionalisierten organischen Substraten unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und Isopropylamin katalysieren kann (Abbildung 1).

Abbildung 1 zeigt die Modellkaskade, die insgesamt vier Enzyme einschließt und basierend auf früheren Arbeiten unserer und anderer Gruppen^[4,6–13] konstruiert wurde. Um die Benzylalkohole **2a–e** zu generieren, wird hierbei zunächst die initiale C-H-Aktivierung durch eine selbstversorgende Cytochrom-P450-Monooxygenase katalysiert. Im nächsten Schritt werden diese von zwei enantiokomplementären Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zu den Ketonen **3a–e** oxidiert. Da die C-H-Aktivierung nicht immer stereoselektiv verläuft, wurde der Einsatz von zwei ADHs als notwendig erachtet, um die Gesamtausbeute zu steigern. Zuletzt wurde eine Transaminase (ATA) genutzt, um die Amine **4a–e** mit der gewünschten Stereoselektivität zu erhalten. Nach unserem Wissen repräsentiert dieses System das erste Beispiel einer Kaskade aus vier Enzymen, wodurch die Frage aufgeworfen wurde, ob diese Enzyme in einem einzelnen Ganz-

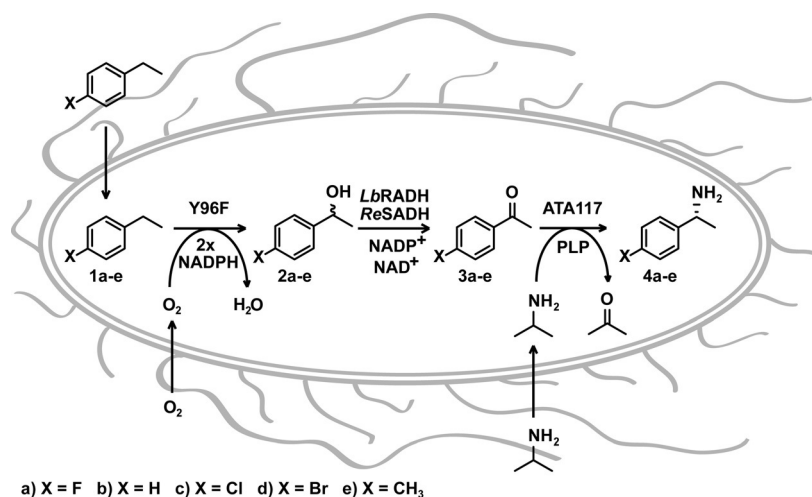


Abbildung 1. *E. coli*-BL21 (DE3)-Zellen, die eine Monooxygenase [Y96F], R- und S-selektive Alkoholdehydrogenasen [LbRADH und ReSADH] sowie eine ω -Transaminase [ATA117] beherbergen und damit fähig sind, 4-substituierte Ethylbenzolderivate **1a–e** in entsprechende Alkohole **2a–e**, Ketone **3a–e** und letztlich Amine **4a–e** umzusetzen.

zellensystem miteinander kompatibel sind, bedenkt man die komplexe Nachfrage nach Kofaktoren, den Transport von Substrat und Produkt durch die Zellwand, die metabolische Stabilität sowie die potenzielle Toxizität der Intermediate und Produkte.

Basierend auf ihrer bereits bekannten Komplementarität bezüglich der Substraterkennung wurden die Enzyme sorgfältig ausgewählt. Das erste Enzym ist eine konstruierte, chimäre, selbstversorgende P450-Monooxygenase (Y96F)^[9] bestehend aus der katalytischen Domäne P450camY96F, an die eine reduzierende Domäne aus *Rhodococcus* sp.

[*] Dr. P. Both, H. Busch, Dr. P. P. Kelly, Dr. F. G. Mutti, Prof. N. J. Turner, Prof. S. L. Flitsch
School of Chemistry, Manchester Institute of Biotechnology, The University of Manchester
131 Princess Street, Manchester M1 7DN (Vereinigtes Königreich)
E-Mail: Sabine.Flitsch@manchester.ac.uk

Hintergrundinformationen und ORCID IDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201510028> zu finden.

(RhFRed) gekoppelt wurde. Dieses Enzym produziert ein nichtracemisches Gemisch der Alkohole **2a–e** mit einer generellen Präferenz für das *R*-Enantiomer.^[10] Für den nächsten Schritt wurden zwei Alkoholdehydrogenasen mit komplementärer Stereoselektivität ausgewählt. *LbRADH* aus *Lactobacillus brevis* ist bekannt für die Oxidation von *R*-Alkoholen unter Verbrauch von NADP⁺,^[11] wohingegen *ReSADH* aus *Rhodococcus erythropolis* *S*-Alkohole unter Verbrauch von NAD⁺ als Kofaktor oxidiert.^[8,12] Der finale Schritt der stereoselektiven Bildung chiraler Amine wird durch eine ω -Transaminase ATA-117 aus *Arthrobacter* sp. katalysiert, wobei zusätzlich sowohl ein Aminodonor als auch Pyridoxal-5-phosphat (PLP) benötigt werden.^[13]

Der Reaktionspfad wurde zunächst in *Escherichia coli* eingeführt (Abbildung 1), wobei Abbildung 2 zeigt, dass hierbei ein System aus zwei Plasmiden genutzt wurde. Um mögliche Probleme wie eine ineffiziente Transkription und/

sion zu gewährleisten, da diese toxisch für bakterielle Zellen sein kann.

Die Protein-Gelelektrophorese sowie der Western Blot der löslichen Fraktionen des Zelllysats der *E. coli*-BL21-(DE3)-Zellen mit beiden Plasmiden nach der Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zeigten die Banden, die aufgrund des Molekulargewichts der Enzyme zu erwarten waren (Abbildung S3). Das Ganzzellensystem wurde daraufhin auf die Umsetzung des Substrats **1a** zum Produkt **4a** getestet, womit die Aktivität der durch die Plasmide pCDF/Y96F und pPB01/ *ReSADH* + *LbRADH* + ATA117 kodierten Kaskade gemessen werden konnte. Hierbei wurde Produkt **4a** durch den Vergleich mit dem käuflich erworbenen Standard des Amins **4a** in jeder Probe gaschromatographisch nachgewiesen (Abbildungen 3 und S9).

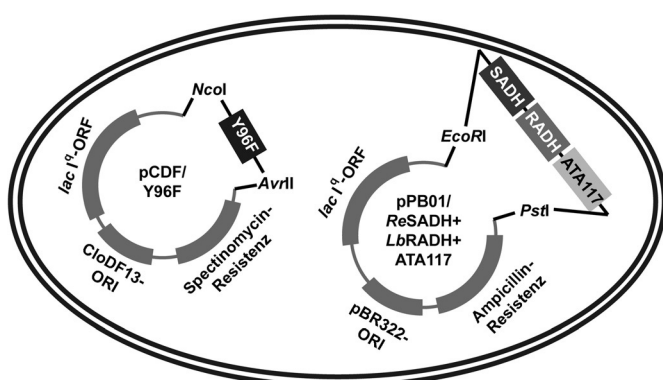


Abbildung 2. *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, cotransformiert mit zwei Plasmiden: Ein Plasmid beherbergt eine Monooxygenase [Y96F], das andere trägt die *R*- und *S*-selektiven Alkoholdehydrogenasen [*LbRADH* und *ReSADH*] sowie die ω -Transaminase [ATA117]. ORF = offener Leserahmen (open reading frame), ORI = Replikationsursprung (origin of replication).

oder Translation zu vermeiden, wurde ein monocistronisches Design gewählt. Dies sichert eine unabhängige Regulation eines jeden Gens durch das jeweilige Operon (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Für die Mehrheit der Kaskade wurde ein neues Plasmid, pPB01, konstruiert, das keine regulatorischen Elemente in direkter Nähe der Restriktionschnittstellen *EcoRI* und *PstI* aufweist. Das Plasmid pPB01 ist abgeleitet vom Plasmid pTrcHis (Lifetechnologies) und trägt den pBR322-ORI, das Gen für Ampicillin-Resistenz sowie das Gen des *lac*-Repressors, wodurch es mit jedem Operon reguliert werden kann, das den *lac*-Operator für die Regulation der Expression nutzt. Dieses Plasmid ermöglicht die Einführung von Operonen im BioBrick-Format für eine schnelle Klonstrategie.^[14] Durch diese Methode wurde das finale Konstrukt pPB01/*ReSADH* + *LbRADH* + ATA117, das drei neue Gene trägt (Abbildung S2), generiert und gemeinsam mit dem Plasmid pCDF/Y96F, welches das P450-Gen trägt, in *E. coli* eingeführt. Diese Zwei-Plasmid-Strategie wurde gewählt, um eine bessere Kontrolle der P450-Expres-

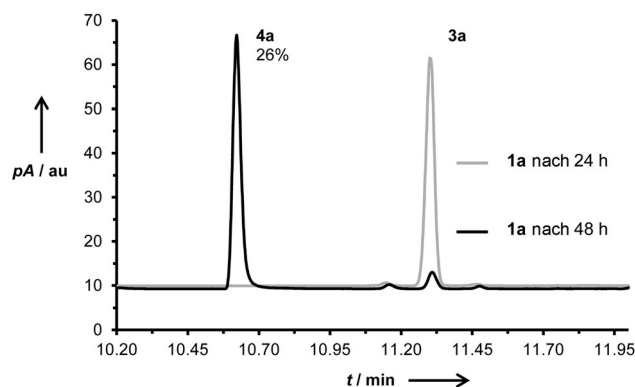


Abbildung 3. Gaschromatogramm der optimierten Ganzzellen-Bio-transformation von Substrat **1a** nach 24 und 48 h. Reaktionsbedingungen: 300 mg mL⁻¹ Zellkonzentration, 1 mM Substratkonzentration in 50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7.4 mit der Zugabe von 200 mM Isopropylamin nach 24 h (inkubiert bei 20 °C und 220 rpm).

Um die Reaktionsbedingungen zu optimieren, wurden die Auswirkungen einer Vielzahl von Parametern anhand der Modellumsetzung des Substrats **1a** zu **4a** untersucht. Ebenfalls wurden diverse Parameter für ein verbessertes Zellwachstum getestet, wobei 16 h Expressionszeit der Proteine in BL21(DE3)-Zellen bei 20 °C die besten Umsetzungen ergaben. Die Induktion mit 0.4 mM IPTG erfolgte bei OD₆₀₀ = 0.6 des m9-Minimal-Mediums, das zuvor mit 2 mM MgSO₄, 0.2 mM CaCl₂ und 3 mM FeCl₃ versetzt worden war. Zusätzlich wurden 0.5 mM 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) bei der Induktion zugegeben (Hintergrundinformationen unter 1D).

Der Einsatz von Isopropylamin (IPA) als Aminodonor ergab bessere Umsetzungen als mit Alanin, weshalb fortan ausschließlich IPA in allen Optimierungsexperimenten genutzt wurde (Tabelle 1). Ein starker Verlust an Aktivität zeigte, dass IPA den ersten P450-katalysierten Schritt inhibiert. Dies konnte minimiert werden, indem das Substrat **1a** (alle Substrate wurden von einer 500 mM Stammlösung in DMSO zugegeben) und der Aminodonor IPA in konsekutiven Schritten zugefügt wurden. So wurde die Reaktionslösung mit dem jeweiligen Substrat zunächst 24 h bei 20 °C in verschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert, die zum einen

Tabelle 1: Umsetzung von **1a–e** und **2a** in die jeweiligen Amine **4a–e** unter Verwendung der Kaskade aus den Enzymen Y96F, LbRADH, ReSADH und ATA117.

Substrat	Aminodonor	Umsetzung zu den Aminen 4a–e [%] ^[a]
2a	IPA	45
1a	L-Ala	0
1a	IPA	26
1b	IPA	17
1c	IPA	14
1d	IPA	15
1e	IPA	5

[a] Ausbeute ermittelt durch Gaschromatographie nach 48 h.

sowohl genügend Kopfraum und damit eine ausreichende Zufuhr an molekularem Sauerstoff bereitstellen und zum anderen den Verlust der flüchtigen Substrate minimieren. Im zweiten Schritt wurde 200 mM IPA zu der Biotransformation gegeben und erneut 24 h bei 20 °C, basierend auf dem Bericht von Koszelewski et al., inkubiert.^[13e] Zusätzlich wurde der Einfluss der externen Zugabe von PLP als Kofaktor untersucht, wobei sich allerdings zeigte, dass die Ausbeute hierdurch nicht verbessert werden konnte. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass *E. coli* große Mengen an endogenem PLP produziert, wodurch eine externe Zugabe überflüssig wird.^[15]

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu bestimmen, wurden die Auswirkungen diverser Komponenten wie der Zellkonzentration (Abbildung S5), Aminodonorkonzentration (Abbildung S6) sowie Substratkonzentration (Abbildung S7) getestet, wobei die beste Umsetzung in Tabelle 1 und Abbildung 3 dargestellt ist. Wird racemisches 1-(4-Fluorphenyl)ethanol (**2a**) anstelle des Substrats **1a** als Ausgangsstoff genutzt, wird eine Umsetzung von 45 % in das finale Amin **4a** beobachtet, wobei 18 % des nicht umgesetzten Ketonintermediats **3a** und keinerlei Spuren des Alkohols **2a** verbleiben (Abbildung S9). Da niedrigere Ausbeuten (26 %) erzielt werden, wenn Substrat **1a** eingesetzt wird, ist zu vermuten, dass der erste, Y96F-katalysierte Schritt die Gesamtumsetzung limitiert. Es wurde daher versucht, die Aktivität der Monooxygenase zu steigern, indem höhere Konzentrationen von 5-ALA bei der Induktion zugesetzt wurden oder eine Glucose-Dehydrogenase II aus *Bacillus megaterium* als mögliches Kofaktorrecycling-System coexprimiert wurde; allerdings ergab keiner der beiden Ansätze eine Verbesserung.

Die Transaminase ATA117 ist bekannt für eine ausgeprägte R-Selektivität, und das Produkt **4a** konnte mithilfe von Gaschromatografie an chiraler Phase mit einem *ee*-Wert von 97.5 % als R-konfiguriert bestätigt werden (Abbildung 4). Um den Substratumfang der Kaskade zu erweitern, wurde der Umsatz einer kleinen Auswahl an Ethylbenzolderivaten **1b–e** zu den Aminen **4b–e** (5–17 %) untersucht (Tabelle 1).

Zusammenfassend wurde eine neue biokatalytische Kaskade, basierend auf der Coexpression von vier Genen in einer einzelnen bakteriellen Zelle, entwickelt, die eine Umsetzung der Ethylbenzolderivate **1a–e** in die enantiomerenreinen R-1-Phenylethanamine **4a–e** in Ausbeuten von bis zu 26 % er-

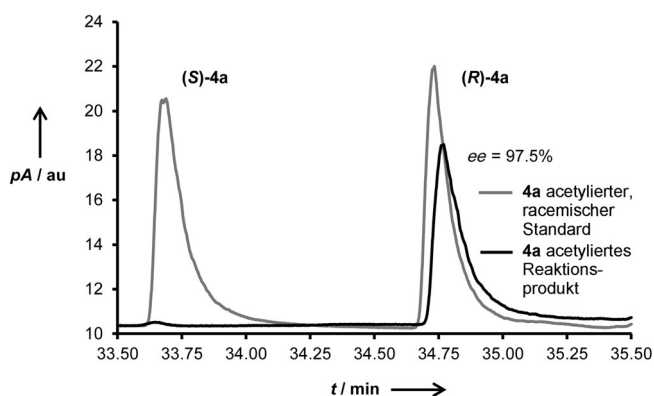


Abbildung 4. Gaschromatographie an chiraler Phase der acetylierten Biotransformationsprodukte **4a** im Vergleich mit handelsüblichen, acetylierten Standards.

möglicht. Bis auf die externe Zugabe von Isopropylamin und molekularem Sauerstoff bedarf es keiner weiteren Kofaktoren, und weder die Substrate, Kofaktoren und Intermediate noch die Produkte zeigen eine signifikante negative Auswirkung auf die Biotransformation. Die flexible und generische Gestaltung der Kaskade wird eine einfache Substitution der individuellen Enzyme mit Homologen oder Mutanten erlauben und bietet damit den Ausgangspunkt für das Design und die Konstruktion alternativer Kaskaden für die enantioselektive C-H-Aminierung anderer Substrate.

Danksagung

Die Arbeiten erhielten eine Förderung der Innovative Medicine Initiative Joint Undertaking no. 115360 sowie des European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) und EFPIA companies. Wir danken Dr. Andrew Collis (GSK) für die hilfreichen Diskussionen über das Plasmid- und Operondesign. N.J.T. und S.L.F. danken der Royal Society für Wolfson Research Merit Awards.

Stichwörter: Aminierungen · Biokatalyse · Chirale Amine · Enzymkaskaden · Ganzzellen-Biotransformation

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1511–1513
Angew. Chem. **2016**, 128, 1533–1536

- [1] M.-L. Louillat, F. W. Patureau, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 901.
- [2] R. A. Green, J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3768; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 3839.
- [3] a) C. C. Farwell, R. K. Zhang, J. A. McIntosh, T. K. Hyster, F. H. Arnold, *ACS Cent. Sci.* **2015**, 1, 89; b) R. Singh, J. N. Kolev, P. A. Sutera, R. Fasan, *ACS Catal.* **2015**, 5, 1685.
- [4] M. Schrewe, N. Ladkau, B. Bühler, A. Schmid, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 1693.
- [5] N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 285.
- [6] K. Tauber, M. Fusch, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 4030.
- [7] S. Klatte, V. F. Wendisch, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 5578.

- [8] C. A. Müller, A. Denning, T. Welters, T. Winkler, A. J. Ruff, W. Hummel, H. Gröger, U. Schwaneberg, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 196.
- [9] a) A. Robin, V. Köhler, A. Jones, A. Ali, P. P. Kelly, E. O'Reilly, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1494; b) E. O'Reilly, V. Köhler, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2490; c) E. J. Basom, J. W. Spearman, M. C. Thielges, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 6620.
- [10] P. P. Kelly, A. Eichler, S. Herter, D. C. Kranz, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1713.
- [11] a) K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 317; b) M. Reuter, A. Prokoph, J. Kasprzak, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, H. Vorbrodt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 4723; c) V. Erdmann, U. Mackfeld, D. Rother, A. Jakoblinert, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 106; d) B. Li et al., *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6750; e) F. G. Mutti, T. Knaus, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science* **2015**, *349*, 1525.
- [12] a) K. Abokitse, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 380; b) C. A. Müller, B. Akkapurathu, T. Winkler, S. Staudt, W. Hummel, H. Gröger, U. Schwaneberg, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1787.
- [13] a) M. D. Truppo, N. J. Turner, J. D. Rozzell, *Chem. Commun.* **2009**, *16*, 2127; b) M. D. Truppo, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1280; c) E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2479; d) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10890; e) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9477.
- [14] a) G. Røkke, E. Korvald, J. Pahr, O. Oyås, R. Lale, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1116*, 1; b) BioBrick ist ein Markenzeichen von The BioBricks Foundation (<http://www.biobricks.org>).
- [15] J. Kim, J. P. Kershner, Y. Novikov, R. K. Shoemaker, S. D. Copley, *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*, 436.

Eingegangen am 27. Oktober 2015

Online veröffentlicht am 21. Dezember 2015