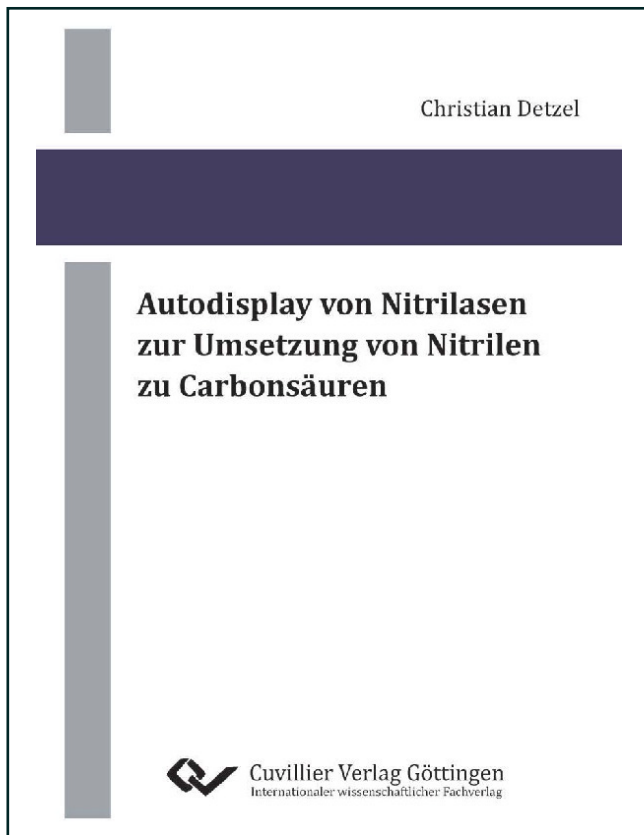




Christian Detzel (Autor)

Autodisplay von Nitrilasen zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/497>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

III. Einleitung

Die Verwendung von Enzymen zur Katalyse chemischer Reaktionen ist bereits seit der Antike bekannt (Buchholz *et al.*, 2005). Trotz der langen Anwendung wurde die Biokatalyse erst im des 19. Jahrhundert auf eine wissenschaftliche Basis gestellt. Wegführend waren die Arbeiten von Berzelius, der 1835 erkannte, dass die Hydrolyse von Stärke durch das Enzym Diastase eine katalytische Reaktion darstellte, sowie von Kühne, der 1878 erstmals dieser Klasse aktiver Substanzen den Namen Enzym gab (Bornscheuer und Buchholz, 2005).

Etwa zur gleichen Zeit begann auch die industrielle Vermarktung von standardisierten Enzym-Präparationen. Die Anzahl der verwendeten Enzyme in der organischen Synthese blieb jedoch bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts recht überschaubar. Dies änderte sich erst mit der Entwicklung neuer Technologien auf dem Gebiet der Immobilisierung von Enzymen, die nun aufgrund ihrer erhöhten Stabilität und Wiederverwendbarkeit erstmals wirtschaftlich verwendet werden konnten (Buchholz *et al.*, 2005).

Zusätzlichen Auftrieb erhielt die industrielle Biokatalyse durch die Fortschritte in der Gentechnologie in den 1970ern. Die damals entwickelten Methoden der rekombinanten DNA-Technologie und des Gentransfers eröffneten die Möglichkeit, Proteine heterolog in Mikroorganismen zu exprimieren. Durch Überexpression rekombinanter Proteine, die bis zu 50 % des gesamten zellulären Proteingehaltes ausmachen können (Makrides, 1996), konnten hohe Produktivitätszunahmen erzielt werden. Aufgrund seiner sehr gut untersuchten Genetik, kurzen Generationszeiten und einfachen Handhabung ist das Gram-negative Enterobakterium *Escherichia coli* der zur Expression rekombinanter Proteine am häufigsten eingesetzte Organismus (Choi *et al.*, 2006). Der Einsatz von Mikroorganismen als Ganzzell-Biokatalysatoren hat den Vorteil, dass die meist kostenintensive Aufreinigung der Enzyme entfällt und sie aufgrund ihrer selbstreplikativen Fähigkeiten in fast unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen.

Enzymkatalysierte Reaktionen weisen dabei entscheidende Vorteile gegenüber der klassischen Synthese auf. So erfolgen die Reaktionen unter milden Bedingungen wie Raumtemperatur, Atmosphärendruck, neutralem pH-Wert, sowie in wässrigen Systemen, was oftmals den Einsatz organischer Lösungsmittel stark reduziert.

Die Leistungsfähigkeit enzymatischer Prozesse belegt eindrucksvoll die biokatalytische Umsetzung von Glucose zu Fructose durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Isomerase. Mit einer Jahresproduktion von mehr als 10.000.000 Tonnen ist

dies eine der mengenmäßig bedeutendsten enzymatisch katalysierten Reaktionen überhaupt (Buchholz *et al.*, 2005).

Weitere Vorteile enzymkatalysierter Reaktionen sind die hohen Enantio-, Regio- und Chemoselektivität, die aufgrund der hohen Substratspezifität von Enzymen erreicht werden können. Dabei kommt gerade der Enantioselektivität eine ständig steigende Bedeutung für die pharmazeutische Industrie zu. Um die von den Zulassungsbehörden (z.B. FDA und EMEA) geforderte Unbedenklichkeit des Arzneimittels gewährleisten zu können, ist es häufig notwendig ein enantiomerenreines Produkt auf den Markt zu bringen. Im Jahr 2000 lagen über 50 % der 500 weltweit meistverkauften Medikamente in enantiomerenreiner Form vor (O'Brien und Vanasse, 2000). Berücksichtigt man zusätzlich noch, dass in ca. 80 % aller organischen Synthesen Katalysatoren verwendet werden, erhält man eine ungefähre Vorstellung des riesigen Potentials der Biokatalyse (Gates, 1992).

Betrachtet man die Enzymklassen, die in der industriellen Biokatalyse Verwendung finden, so stellen Hydrolasen mit etwa 42 % den größten Anteil dar (Straathof *et al.*, 2002). Dabei kommt der zu den CN-Hydrolasen zählenden Klasse der Nitrilasen eine ständig wachsende Bedeutung zu, da die von ihnen gebildeten Produkte in einer Vielzahl organischer Synthesen wichtige Zwischenprodukte darstellen (Martínková *et al.*, 2008).

1. Nitrilasen

Nitrilasen (EC 3.5.5.1) katalysieren die Hydrolyse von Nitrilen zu den korrespondierenden Carbonsäuren und Ammoniak (Abbildung 1).

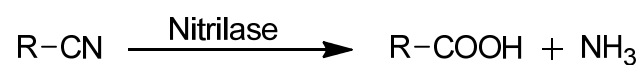


Abbildung 1: Reaktionsschema der Nitrilase-Reaktion.

Diese enge Definition wurde jedoch in den letzten Jahren erweitert, da gezeigt werden konnte, dass bei einigen Nitrilasen in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat neben der korrespondierenden Carbonsäure, auch das Amid in unterschiedlichem Verhältnis gebildet werden kann (Pollmann *et al.*, 2002).

1.1. Entdeckung und physiologische Rolle

Eine enzymatische Aktivität in Pflanzen, die ein Nitril zu einer Carbonsäure hydrolysiert, wurde zum ersten Mal von Thimann und Mahadevan (1958) bei dem Versuch, die Biosynthese des Pflanzenhormons Indol-3-essigsäure aufzuklären, beschrieben. Das für diese Aktivität verantwortliche Enzym wurde aus Gerste (*Hordeum vulgare*) angereichert und ist aufgrund seiner Aktivität gegenüber Indolacetonitril zuerst als Indolacetonitrilase bezeichnet worden. Da Untersuchungen an weiteren Substraten zeigten, dass das Enzym ein viel größeres Substratspektrum aufwies, wurde es in Nitrilase umbenannt (Mahadevan und Thimann, 1964; Thimann und Mahadevan, 1964). Gingen Thimann und Mahadevan noch davon aus, dass Nitrilaseaktivität eher die Ausnahme, als die Regel in Pflanzen ist, konnte durch moderne Sequenzanalyse gezeigt werden, dass Nitrilasen ubiquitär in landbewohnenden Pflanzen vorkommen (Piotrowski, 2008).

Dieser Befund ist nicht weiter überraschend, berücksichtigt man die weite Verbreitung von Nitrilen, den Substraten der Nitrilasen, in der Natur. Nitrile werden dabei sowohl von Pflanzen, als auch von Mikroorganismen synthetisiert (Legras *et al.*, 1990). Ein Großteil der Nitrile liegen dabei als cyanogene Glykoside vor (Conn, 1979). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fraßfeinden bei Pflanzen und Mikroorganismen. Dies geschieht einerseits durch Freisetzung giftiger Blausäure aus der Hydrolyse von Nitrilen und andererseits durch den für die cyanogenen Glykoside typischen bitteren Geschmack (Zagrobelny *et al.*, 2008). Desweiteren sind cyanogene Glykoside eine Speicherform für Glucose und Stickstoff (Selmar *et al.*, 1988).

Alle bisher untersuchten pflanzlichen Nitrilasen lassen sich aufgrund ihrer Substratspezifität in zwei Gruppen einteilen. Einerseits in die Gruppe mit einer hohen katalytischen Aktivität gegenüber Arylacetonitrilen und in die Gruppe mit hoher katalytischer Aktivität gegenüber β -Cyanoalanin (Howden und Preston, 2009). Bisher am besten charakterisiert sind die Nitrilasen aus *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* besitzt vier unterschiedliche Nitrilasen, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung *Nit1–Nit4* benannt wurden und in der Pflanze unterschiedliche physiologische Bedeutung besitzen. Die ubiquitär in landbewohnenden Pflanzen vorkommenden *Nit4* Enzyme scheinen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Cyanid und somit der Wiederverwendung und Rückgewinnung von Stickstoff zu spielen (Piotrowski, 2008).

Im Laufe der Zeit nach Thimann's und Mahadevan's wegweisender Arbeit konnte Nitrilaseaktivität auch in Bakterien (Hook und Robinson, 1964; Robinson und Hook, 1964), Pilzen (z.B. *Aspergillus niger* (Thimann und Mahadevan, 1964) und

Saccharomyces cerevisiae (Churcher *et al.*, 1997)) und Archaeobakterien (Mueller *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Bakterien weisen jedoch deutlich seltener als Pflanzen Nitrilaseaktivität auf. Von über 150 sequenzierten Bakteriengenomen enthielten lediglich 10 Nitrilasegene (Podar *et al.*, 2005). Ein Großteil der bisher untersuchten mikrobiellen Nitrilasen mit Aktivität gegenüber aliphatischen Nitrilen wurde in den Genera *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Comamonas* und *Pseudomonas* nachgewiesen. Während Nitrilasen mit einer Aktivität gegen Arylacetonitrilen hauptsächlich in *Alcaligenes*, *Pseudomonas* und *Halomonas* gefunden wurden (Martínková und Křen, 2010). Aktivität gegenüber aromatischen Nitrilen konnte für *Klebsiella*, *Norcadia* und *Rhodococcus* nachgewiesen werden (Thuku *et al.*, 2009).

Da die bisherige Charakterisierung bakterieller Nitrilasen eher im Hinblick auf die Verwendbarkeit als Biokatalysator für industriell verwertbare Produkte geschah, ist die physiologische Rolle der bakteriellen Nitrilasen noch immer nur unvollständig aufgeklärt (Howden und Preston, 2009). Nitrilasen scheinen aber auch in Bakterien eine ähnliche physiologische Rolle wie in Pflanzen einzunehmen. Sie sind involviert in die Entgiftung von Nitrilen, die Rückgewinnung von Stickstoff und die Synthese von Pflanzenhormonen (Howden *et al.*, 2009a). Die Beobachtung von Banerjee *et al.* (2002), dass der Großteil der bisher charakterisierten mikrobiellen Nitrilasen nicht konstitutiv, sondern durch Nitrile induzierbar exprimiert werden, scheint die Vermutung zu bestätigen, dass die Nitrilasen an der Nährstoffversorgung und Detoxifikation beteiligt sind. Dies stimmt auch mit Untersuchungen überein, die an einigen Pseudomonaden durchgeführt wurden. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie eine Nitrilase vom Typ *Nit4* exprimieren, die eine hohe Sequenzhomologie mit Pflanzennitrilasen aufweist. Diese Nitrilase katalysiert die Hydrolyse von β -Cyanoalanin zu Asparaginsäure. Dadurch erhält das Bakterium die Fähigkeit in einer ansonsten toxischen, β -Cyanoalanin reichen Umgebung zu wachsen und dieses Substrat zur Stickstoffgewinnung einzusetzen (Howden *et al.*, 2009b).

Besonders gut untersucht ist die Fähigkeit von Bakterien das Pflanzenhormon Indol-3-essigsäure (IAA) zu synthetisieren. IAA kontrolliert so wichtige physiologische Prozesse wie das Zellwachstum und -teilung, sowie die Gewebedifferenzierung in Pflanzen (Spaepen *et al.*, 2007). Andererseits ist IAA ein wichtiger Pathogenitätsfaktor vieler Bakterien. Für einige Bakterienstämme konnte die Produktion von IAA durch den Nitrilase-abhängigen Indol-3-acetonitril-Weg (IAN) nachgewiesen werden. (Kobayashi *et al.*, 1993; Howden *et al.*, 2009b). Die Bedeutung dieses Syntheseweges für die Bakterien ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird, dass erhöhte Konzentrationen von IAA zu Veränderungen der

Pflanzenphysiologie und in letzter Konsequenz zu einem verbesserten Nährstoffangebot für das Bakterium führen.

Auch in Säugetieren konnten Nitrilase Homologe vom Typ *Nit1* nachgewiesen werden. Lange Zeit war die Funktion dieser Homologe bei Säugetieren völlig unklar. Eine Wende leitete erst die Entdeckung der NitFhit Fusionsproteine in *Caenorhabditis elegans* ein (Pekarsky *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um Fusionsproteine, die aus einer C-terminalen Fhit-Domäne („fragile histidine triad“) und einer N-terminalen Nitrilase-Domäne mit Homologie zu bakteriellen und pflanzlichen Nitrilasen, bestehen. Mit der Entschlüsselung ihres Signaltransduktionsweges konnte in Säugetieren eine Tumorsupprimierende Wirkung nachgewiesen werden (Sun *et al.*, 2009).

1.2. Superfamilie der Nitrilasen

Nitrilasen werden nach ihrer Substratspezifität grob in drei Gruppen eingeteilt (Kobayashi und Shimizu, 1994). Dabei wird zwischen Nitrilasen, die aromatische, aliphatische und Arylacetonitrile als Substrate umsetzen, unterschieden.

Durch die Zunahme an Sequenzinformationen und Weiterentwicklungen im Bereich der computerunterstützten Datenbankanalyse entdeckten Bork und Koonin (1994) signifikante Sequenzhomologien zwischen Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen, aliphatischen Amidasen, β -Alanin-Synthasen und einigen anderen Enzymen mit unbekannter Funktion. Diese Enzyme fassten sie zur großen Gruppe der CN-Hydrolasen zusammen. Dieses Klassifizierungssystem wurde von Pace und Brenner (2001) verfeinert und der aktualisierten Datenlage angepasst. Sie fassten alle Mitglieder der CN-Hydrolasen unter dem Begriff „nitrilase superfamily“ zusammen. Aufgrund von Struktur-basierten Sequenzanalysen konnten sie die Mitglieder der „nitrilase superfamily“ 13 unterschiedlichen Gruppen zuordnen. Unter diesen Gruppen weist lediglich eine Gruppe, die „Nitrilase-Gruppe“ typische Nitrilaseeigenschaften auf, also die Fähigkeit zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren. Der größte Anteil (acht Gruppen) weist Amidaseeigenschaften auf. Bemerkenswert ist auch das Auftreten von Fusionsproteinen in 7 der 13 Gruppen. Dabei ist die Nitrilase-Domäne mit mindestens einer zusätzlichen Domäne fusioniert. Über die physiologische Bedeutung dieser Fusionsproteine ist bisher nur wenig bekannt.

1.3. Aufbau und Reaktionsmechanismus

In Ermangelung von Nitrilase-Kristallstrukturen musste zur Aufklärung der Nitrilasestruktur auf Homologe zurückgegriffen werden. Beide bisher untersuchten

Proteine, das *C. elegans* NitFhit-Fusionsprotein (Pace *et al.*, 2000) und die N-carbamoyl-D-Aminosäure-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* (Wang *et al.*, 2001), wiesen dabei eine neuartige α - β - β - α Struktur des Monomers auf. Dabei sind zwei α -Helices außen angeordnet, die die innen liegenden zwei Lagen mit jeweils sechs β -Faltblättern zusammenhalten. Die Monomere aggregieren dabei zur typischen $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Sandwichstruktur der Dimere. Weitere Untersuchungen an Vertretern aus der „nitrilase superfamily“, die eine entfernte Verwandtschaft zu Nitrilasen aufwiesen, konnten belegen, dass die $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Struktur ein charakteristisches Merkmal dieser Enzymfamilie darstellt.

In Abbildung 2 ist die schematische Struktur der Nit-Domäne des NitFhit-Fusionsproteins dargestellt (Brenner, 2002). Gut zu erkennen ist die charakteristische $\alpha\beta\beta\alpha$ Struktur der vier Monomere, die zusammen die Nit-Domäne ausbilden. Das mit NS13 bezeichnete β -Faltblatt stellt die Fusionsstelle mit der Fhit-Domäne dar.

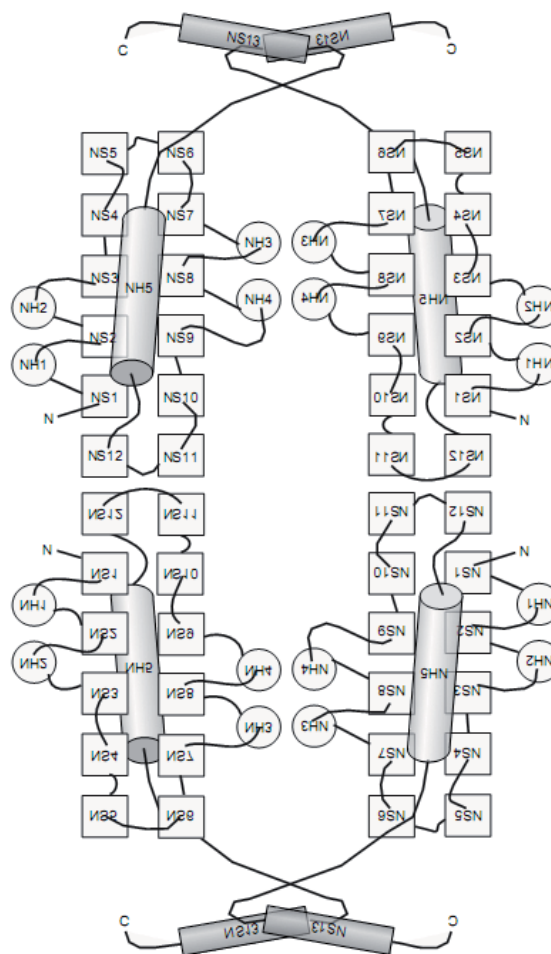


Abbildung 2: Schematische Struktur der tetrameren Nit-Domäne des NitFhit Fusionsproteins (Brenner, 2002). β -Faltblätter sind mit NS1–NS13 bezeichnet. α -Helices sind mit NH1 – NH5 bezeichnet. NS13 ist ein konservierter Bereich in der Gruppe 10 der „nitrilase superfamily“ und ist dort mit einer Fhit-Domäne fusioniert.

Oligomerisierung ist aber nicht nur auf die NitFhit-Fusionsproteine beschränkt, sondern ist auch bei den bisher untersuchten mikrobiellen Nitrilasen ein häufig beobachtetes Strukturmerkmal. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wie z.B. der Nitrilase aus *Pyrococcus abyssi* (Mueller *et al.*, 2006) und *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (Stalker *et al.*, 1988a), sind die Dimere bei einem Großteil der bisher untersuchten mikrobiellen Nitrilasen inaktiv (Thuku *et al.*, 2009). Erst durch die Zusammenlagerung von 4–22 identischen Untereinheiten entsteht das aktive Enzym. Dabei lagern sich immer Dimere zu geradzahligen Vielfachen zusammen. Die Größe der Untereinheiten bewegt sich dabei, abhängig vom Enzym, im Bereich zwischen 30 und 45 kDa (O'Reilly und Turner, 2003). Über die tatsächliche Quartärstruktur der Nitrilasen ist bisher wenig bekannt. Für die rekombinante und aufgereinigte Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 konnte in vitro die Ausbildung einer linksgängigen Spiralstruktur nachgewiesen werden (Thuku *et al.*, 2007).

Über die funktionelle Bedeutung der Oligomerisierung gibt es noch keine gesicherten Erkenntnisse. Jandhyala *et al.* (2005) beobachteten eine Zunahme der Aktivität in Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad bei der Cyanid-Dihydratase aus *Bacillus pumilus* C1. Dass eine Vergrößerung des Komplexes mit einer Erhöhung der Enzymaktivität einhergeht ist ein häufig beschriebenes Phänomen der Nitrilasen aus *Rhodococcus* (Harper, 1977; Harper, 1985; Stevenson *et al.*, 1992). Weiterhin wäre es denkbar, dass die Bildung höherer Komplexe, wie für die Nitrilasen aus *Sorghum bicolor* nachgewiesen, zu einer Veränderung des Substratspektrums führen (Jenrich *et al.*, 2007). *S. bicolor* besitzt drei Isoformen von Nitrilasen, die einzeln inaktiv sind. Erst die Aggregation zu heteromeren Komplexen führt zur Bildung eines funktionellen Enzyms, dessen Substratspezifität je nach Zusammensetzung variiert.

Alle bisher untersuchten Mitglieder der „nitrilase superfamily“ besitzen drei hochkonservierte Aminosäuren (Cystein, Lysin und Glutamat) (Wang *et al.*, 2001; Brenner, 2002; Andrade *et al.*, 2007). Da diese bei den bisher zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen eine große räumliche Nähe aufweisen, wurde angenommen, dass sie im gefalteten Enzym eine katalytische Triade bilden. Ein hypothetischer Reaktionsmechanismus beginnt mit der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Cysteinrest der katalytischen Triade und dem Substrat (Nakai *et al.*, 2000). Durch die Addition von Wasser wird das Produkt unter Freisetzung von Ammoniak gebildet und vom Enzym losgelöst. Die Wasseradditionen erfolgen dabei vermutlich über ein negativ geladenes Intermediat mit tetraedrischer Geometrie. Die zwei anderen Aminosäuren der katalytischen Triade sind vermutlich an Protonen-Transferreaktionen (Glutamat) oder der Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes (Lysin) beteiligt (Abbildung 3).

Vom tetraedrischen Übergangszustand kann die Reaktion in Richtung der korrespondierenden Carbonsäure gehen (Abbildung 3 A), wenn der entstehende Thioester, nach Abspaltung von Ammoniak, nukleophil durch Wasser angegriffen wird. Unterbleibt der nukleophile Angriff durch ein Wassermolekül, dann zerbricht der tetraedrische Übergangszustand und das Amid wird entlassen (Abbildung 3 B). Osswald *et al.* (2002) konnten für pflanzliche Nitrilasen nachweisen, dass das Substrat einen wesentlichen Einfluss auf das Bildungsverhältnis von Carbonsäure zu Amid hat. Das Verhältnis wird zum Amid hin verschoben, wenn das Substrat elektronenabstoßende Substituenten enthält.

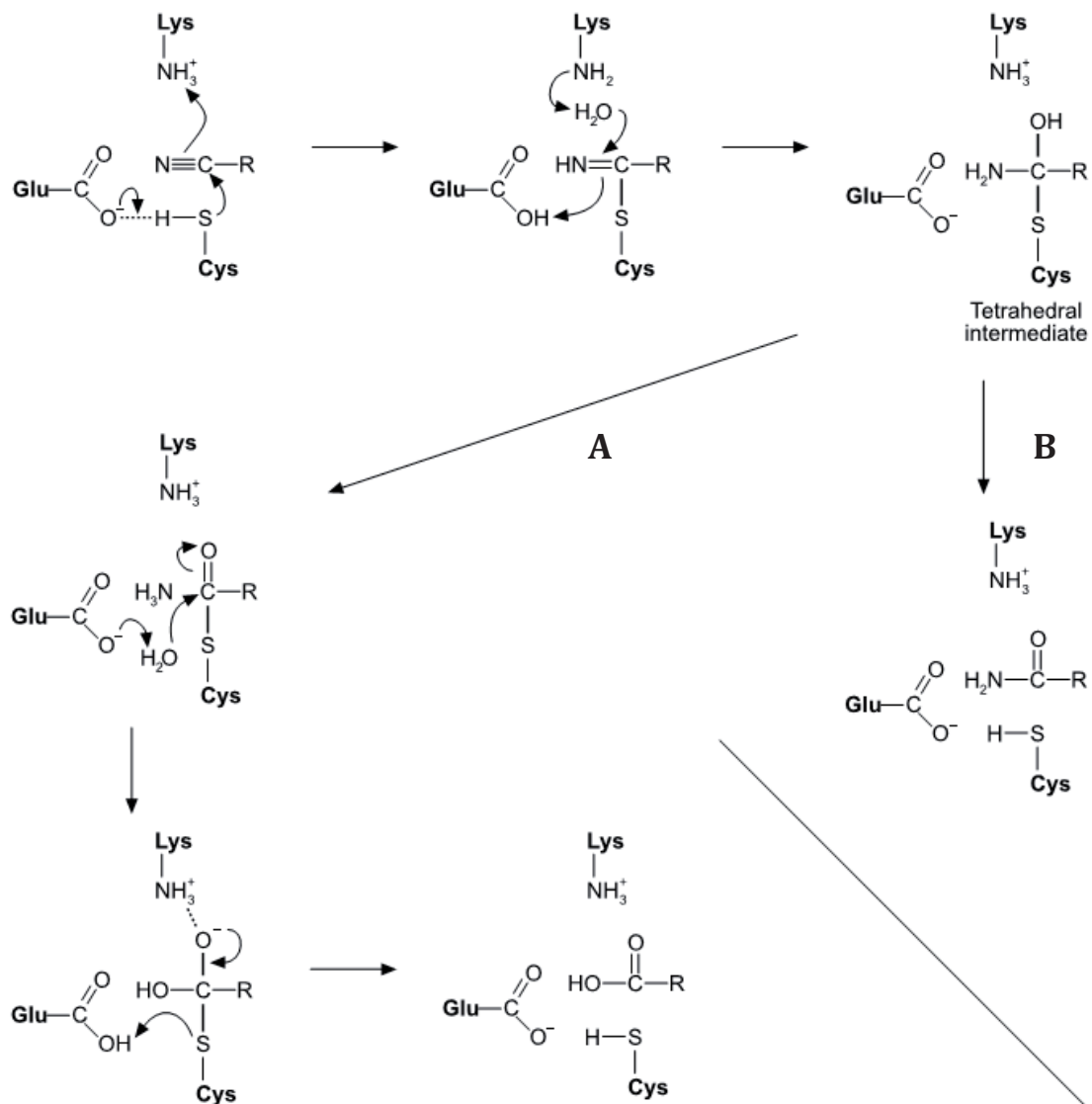


Abbildung 3: Hypothetischer Nitrilase-Reaktionsmechanismus (verändert nach Piotrowski (2008)). Die drei konservierten Aminosäuren der katalytischen Triade sind fettgedruckt dargestellt. Nach der Bildung des tetraedrischen Übergangszustandes kann die Reaktion entweder in Richtung der korrespondierenden Carbonsäure (A) oder bis zum Amid (B) ablaufen.