DIE ERSTE *R*-SELEKTIVE HYDROXYNITRIL-

Lyase mit α/β -Hydrolasefaltung

- Charakterisierung biochemischer Eigenschaften und Struktur-Funktionsbeziehungen -

> Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> > vorgelegt von Jennifer Nina Andexer aus Haan

> > > November 2007

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie

der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Koreferenten: Prof. Dr. G. Groth

Prof. Dr. J. Pleiss

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2008

ZUSAMMENFASSUNG

Hydroxynitril-Lyasen (HNLs) katalysieren die enantioselektive Spaltung von Cyanhydrinen. In der technischen Biokatalyse werden die C-C-Bindungs-knüpfenden Enzyme zur Synthese von chiralen Cyanhydrinen eingesetzt. Bisher sind verschiedene HNLs aus Pflanzen isoliert worden, die sich strukturell und mechanistisch in verschiedene Gruppen einteilen lassen. Die HNLs aus *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta* gehören zur Familie der α/β -Hydrolasen und dienten als Ausgangspunkt für eine sequenzbasierte Suche nach neuen HNLs. Im Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wurden über 20 ähnliche uncharakterisierte Sequenzen gefunden, sieben davon wurden kloniert und heterolog in *Escherichia coli* exprimiert.

Mit einem für Hochdurchsatzanwendungen neu entwickelten Aktivitätstest wurden die potenziellen Enzyme bezüglich der Spaltung von verschiedenen Cyanhydrinen untersucht. Die bei einem der Enzyme beobachtete HNL-Aktivität bestätigte sich in der Synthesereaktion. Im nächsten Schritt wurde das neue Enzym (*At*HNL) aufgereinigt, biochemisch charakterisiert und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie an der Universität Rostock hinsichtlich der Synthese verschiedenster Cyanhydrine untersucht. Das neue Enzym erwies sich dabei überraschenderweise als *R*-selektiv hinsichtlich der Synthese und Spaltung von Cyanhydrinen. Dies ist bemerkenswert, da die *S*-Selektivität bisher als eines der charakteristischen Merkmale von HNLs mit α/β -Hydrolasefaltung galt.

Ein breites Substratspektrum und gute Stabilität unter Reaktionsbedingungen sind wichtige Eckpunkte für die Beurteilung der Eignung eines Biokatalysators für die technische Anwendung. Im Hinblick auf das Substratspektrum ist die *At*HNL vergleichbar mit den bereits in technischen Prozessen eingesetzten HNLs, allerdings zeigt sie insbesondere im sauren pH-Bereich geringere Stabilität.

Um die Unterschiede in der Stereoselektivität zu verstehen und eine Basis für die Verbesserung des Enzyms mittels rationalem Design zu erhalten, wurde die Struktur der *At*HNL in Kooperation mit der Abteilung für Strukturbiologie der Universität Graz röntgenkristallographisch mit einer Auflösung von 2,5 Å gelöst. Aufgrund von Dockingstudien wurde ein im Vergleich zu den homologen Enzymen abgewandelter Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, der in ersten Experimenten mit Punkt-mutationen experimentell verifiziert werden konnte.

ABSTRACT

Hydroxynitrile lyases (HNLs) catalyze the enantioselective cleavage of cyanohydrins. Due to their ability to form C-C bonds these enzymes are technically used for the synthesis of optically active cyanohydrins. So far, different HNLs have been isolated from plants. These HNLs can be divided in various groups depending on their structure and mechanism. In a sequence-based approach, the HNLs from *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta*, belonging into the group of α/β -hydrolases, were used as starting enzymes for the identification of novel HNLs. In the genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* over 20 uncharacterized sequences were found. Seven of them were cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli*.

All enzymes were tested for their HNL-activity against various cyanohydrin substrates in a newly developed assay system which is also applicable for high-throughput screening. For one enzyme the observed HNL-activity was subsequently verified in the synthetic reaction. Additionally, the new enzyme (*At*HNL) was purified and biochemically characterized. In a collaboration with the Department of Technical Chemistry (University of Rostock) the synthesis of different cyanohydrins was examined. Interestingly, the enzyme is strictly *R*-selective whereas until now, *S*-selectivity was a characteristic property of HNLs with an α/β -hydrolase fold.

A broad range of substrates and good stability under reaction conditions are important for the use of enzymes as biocatalysts in technical approaches. Concerning the substrate range, *At*HNL is comparable with other HNLs, already used in technical processes. However, the *At*HNL shows some differences in stability, especially concerning acidic pH ranges.

To understand the reversed enantioselectivity and to create a model for rational design, the structure of the enzyme was elucidated by x-ray-crystallography with a 2.5 Å resolution. This work was done in collaboration with the institute for structure biology at the University of Graz. Based on docking-studies a reaction mechanism differing from the homologous enzymes *Me*HNL and *Hb*HNL could be proposed .The catalytic mechanism could be verified in initial experiments with point mutations.

PUBLIKATIONEN

- J.-K. Guterl, J. N. Andexer, T. Sehl, J. von Langermann, I. Frindi-Wosch, T. Rosenkranz, J. Fitter, K. Gruber, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl (2008): Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile-lyases with α/βhydrolase fold. *Eingereicht bei J. Biotechnol.*
- 2. **J. Andexer**, J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl (2007): An *R*-selektive hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β-hydrolase fold. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 46. 8679-8681.
- 3. **J. Andexer**, J.-K. Guterl, M. Pohl, T. Eggert (2006): A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity. *Chem. Commun.* 40. 4201-4203.

PATENTANMELDUNGEN

1. **J. Andexer**, T. Eggert (2006): (*R*)-Hydroxynitril-Lyase aus Brassicaceen. Deutsche Patentanmeldung DE 10 2006 058 373.6.

POSTER

- J.-K. Guterl, G. Horeis, K. Gruber, C. Kratky, J. Andexer, T. Eggert, M. Pohl: First steps towards the optimization of the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. BIOTRANS (Oviedo/ Spanien, 8.7. – 13.7.2007).
- 2. N. Richter, **J. Andexer**, O. Thum, K. Doderer, M. Pohl, K.-E. Jaeger, T. Eggert: Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B in organic and aqueous media. VAAM-Tagung (Osnabrück, 1.4. – 4.4.2007).
- J.-K. Guterl, J. Andexer, T. Eggert, M. Pohl: Improving the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by directed evolution for technical applications. BIOCAT (Hamburg, 3.9. – 7.9.2006).
- 4. **J. Andexer**, J.-K. Guterl, M. Pohl, T. Eggert: High-throughput screening assay for hydroxynitrile lyases. VAAM-Tagung (Jena, 19.3. 22.3.2006).
- 5. J. Andexer, J.-K. Guterl, M. Pohl, T. Eggert: Directed evolution of a plant hydroxynitrile lyase for industrial applications. Industrial Biocatalysis in Pharmacy and Fine Chemistry (Nimes/ Frankreich, 8.9. – 10.9.2005).

INHALTSVERZEICHNIS

Ζι	Isam	menfass	sung	111
Ał	ostrac	xt		. IV
Pι	ublika	tionslist	e	V
In	halts	/erzeich	nis	. VI
Ał	okürz	ungen		. IX
1.	Einle	eitung		1
	1.1.	Hydrox von Cy	ynitril-Lyasen katalysieren die Spaltung und Synthese /anhydrinen	1
		1.1.1.	In der Natur helfen HNLs bei der Abwehr von Herbivoren	2
			1.1.1.1. Cyanogene Glykoside werden aus Aminosäuren aufgebaut	2
			1.1.1.2. HNLs sind am Abbau von cyanogenen Glykosiden beteiligt	3
		1.1.2.	HNLs als Katalysatoren in der angewandten Biokatalyse	5
			1.1.2.1. Chirale Cyanohydrine als Bausteine	6
			1.1.2.2. Eckpunkte für technische Prozesse mit HNLs	7
			1.1.2.3. Anforderungen an HNLs für den technischen Einsatz	8
			1.1.2.4. Alternativen zur enzymatischen Cyanhydrinsynthese	9
	1.2.	Struktu konver	ren und Mechanismen von HNLs – Beispiele für divergente und gente Evolution	9
		1.2.1.	FAD-haltige HNLs sind mit den Glukose-Methanol-Cholin Oxidoreduktasen verwandt	.10
		1.2.2.	Die HNL aus <i>Linum usitatissimum</i> zeigt Ähnlichkeiten zu zinkabhängigen Alkoholdehydrogenasen	.11
		1.2.3.	HNLs mit α/β-Hydrolase-Faltungsmotiv	.12
			1.2.3.1. Die HNLs aus <i>Manihot esculenta</i> und <i>Hevea brasiliensis</i> ähneln einander sehr	.14
			1.2.3.2. Die HNL aus Sorghum bicolor zeigt Homologie zu den Serin-Carboxypeptidasen	.15

		1.2.4.	Theorie zur Entwicklung der HNLs aus verschiedenen	\$
	4.0	A		,
	1.3.	Ansatze	e zur identilizierung neuer Enzyme	
	1.4.	Motivat	ion und Ziel der Arbeit19)
2.	Ein r	neuer HI	NL-Aktivitätstest:	
	A hig	gh-throu	ghput screening assay for hydroxynitrile lyase activity21	
3.	Synt	hese vo	n <i>R</i> -Cyanhydrinen mit der <i>At</i> HNL:	
	An F	R-selectiv	ve hydroxynitrile lyase from Arabidopsis thaliana with an	
	α/β-ł	nydrolas	e fold25	5
4.	Verg	leich vo	n <i>At</i> HNL und <i>Me</i> HNL:	
	Une	en Twir	ns: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile	`
	iyase		/p-nyurolase lolu28	,
_	01.1	1		
5.	Stru	ktur und	Mechanismus der AtHNL:	
	The thalia	crystal s a <i>na</i>	tructure of the <i>R</i> -selective hydroxynitrile lyase from <i>Arabidopsis</i>)
6	Disk	ussion	45	R
0.	48			
	0.1.	vergien	Developmenter FINE-Aktivitätstests	,
		6.1.1.	zeitaufwändig)
		6.1.2.	Spektroskopische kontinuierliche Assavs sind auf aromatische	
			Substrate beschränkt)
		6.1.3.	Assays zum Nachweis von Blausäure sind universell einsetzbar50)
			6.1.3.1. Der erste hochdurchsatzfähige universelle Assay auf HNL-Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt50)
	6.2.	Identifiz	zierung neuer Enzyme – Strategien und Probleme	>
	6.3.	Sequer	nzen mit Ähnlichkeiten zu HNLs in Arabidopsis53	3
		6.3.1.	Gene mit Sequenzähnlichkeit zu HbHNL und MeHNL sind am	
			einfachsten zu finden 54	L

	6.3.2.	Pahnl-ähnliche Gene sind an der Blütenentwicklung beteiligt	.55	
	6.3.3.	ADH-homologe Sequenzen könnten auch HNL-Aktivität haben	.56	
	6.3.4.	SCP-verwandte Proteine erfüllen verschiedene Aufgaben in Arabidopsis	.56	
	6.3.5.	Welche Funktion könnte eine HNL in Arabidopsis haben?	.57	
6.4.	Die <i>At</i> ⊦	INL ist im Gegensatz zu <i>Me</i> HNL und <i>Hb</i> HNL <i>R</i> -spezifisch	.58	
	6.4.1.	Die Struktur der <i>At</i> HNL	.58	
		6.4.1.1. Das Strukturmodell reicht zur Klärung des Mechanismus nicht aus	.59	
		6.4.1.2. Die Kristallstruktur der <i>At</i> HNL konnte bis zu 2.5 Å aufgelöst werden	.60	
	6.4.2.	Die katalytische Triade wird in der <i>At</i> HNL anders als in der <i>Hb</i> HNL genutzt	.61	
6.5.	Die <i>At</i> ⊦	INL ist eine gute Alternative für die Synthese von <i>R</i> -Cyanhydrinen	.64	
6.6.	Ausblic	k	.66	
Literaturverzeichnis				
Danksagung73				
Lebens	lauf		.74	

ABKÜRZUNGEN

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
<i>At</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus Arabidopsis thaliana
cDNA	copyDNA
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
FAD	Flavinadenosindinucleotid
GC	Gaschromatographie
GMC	Glukose-Methanol-Cholin
<i>Hb</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus Hevea brasiliensis
HNL	Hydroxynitril-Lyase
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
HTS	Hochdurchsatz-Screening
<i>Lu</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus Linum usitatissimum
MeHNL	Hydroxynitril-Lyase aus Manihot esculenta
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MTP	Mikrotiterplatte
NAD	Nicotinamidadenosindinucleotid
<i>Pa</i> HNL	Hydroxynitril-Lyase aus Prunus amygdalus
RNA	Ribonukleinsäure
SbHNL	Hydroxynitril-Lyase aus Sorghum bicolor
SCP	Serin-Carboxypeptidase
UDPG	Uridindiphosphatglukose
ZnADH	Zink-abhängige Alkoholdehydrogenase

EINLEITUNG

Biokatalysatoren gewinnen als Alternative zu klassischen Methoden in der chemischen Industrie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Neben den milderen Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert etc.) liegt einer der Hauptvorteile für den Einsatz von Enzymen in ihrer Stereoselektivität. Bereits gut etabliert ist die Anwendung von Lipasen und Proteasen in der kinetischen Racematspaltung (HATTI-KAUL *et al.*, 2007; POLLARD und WOODLEY, 2007).

Mittlerweile werden auch C-C-Bindungs-knüpfende Enzyme technisch genutzt, die im Folgenden näher beschrieben werden, da die stereoselektive C-C-Verknüpfung ausgehend von achiralen Vorstufen mit konventionellen chemischen Methoden nur schwer zu realisieren ist (FESSNER, 1998; PURKARTHOFER *et al.*, 2007).

1.1. HYDROXYNITRIL-LYASEN KATALYSIEREN DIE SPALTUNG UND SYNTHESE VON CYANHYDRINEN

Hydroxynitril-Lyasen (HNLs) werden auch Oxynitrilasen genannt und gehören zur Enzymklasse der Aldehyd-Lyasen (EC 4.1.2). Sie katalysieren die reversible stereoselektive Spaltung eines Cyanhydrins (Hydroxynitrils) zu Aldehyden oder Ketonen und Blausäure (Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: HNL-katalysierte reversible Spaltung von chiralen Cyanhydrinen in eine Carbonylkomponete (Aldehyd oder Keton) und Blausäure.

1.1.1. IN DER NATUR HELFEN HNLS BEI DER ABWEHR VON HERBIVOREN

HNLs sind in den so genannten cyanogenen Pflanzenspezies weit verbreitet. In diesen Pflanzen liegen die Cyanhydrine chemisch gebunden in Form von cyanogenen Glykosiden, oder seltener cyanogenen Lipiden, vor. Aus anderen Organismen (Bakterien und Insekten) sind zwar cyanogene Glykoside und teilweise auch Cyanhydrine bekannt, bisher aber keine HNLs. So wurden z.B. aus einer *Zygaena*-Art (ein Nachtfalter) cyanogene Glykoside und eine β -Glykosidase, die die Abspaltung des Zuckerrestes katalysieren kann (\rightarrow 1.1.1.2), isoliert, die Existenz einer HNL ist aber noch nicht bewiesen worden (NAHRSTEDT, 1988). Auch beim Tausendfüßler *Aphelonia corrugata* gibt es Hinweise auf HNL-Aktivität (BECKER und PFEIL, 1966).

1.1.1.1. CYNANOGENE GLYKOSIDE WERDEN AUS AMINOSÄUREN AUFGEBAUT

Die Biosynthese von cyanogenen Glykosiden geht von α-Aminosäuren, vorwiegend Valin, Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin, aus. Durch zwei Cytochrome wird zunächst ein Aldoxim als Intermediat und dann das entsprechende Cyanhydrin gebildet. Dieses Produkt wird im abschließenden Schritt mittels einer Uridindiphosphatglukose (UDPG) Glykosyltransferase glykosiliert. Als Zuckerrest wird meist Glukose verwendet, es gibt jedoch auch cyanogene Glykoside, die auf Disacchariden aufbauen (Tabelle 1.1, Abbildung 1.2).

Der Biosyntheseweg des cyanogenen Glykosids Dhurrin (Tabelle 1.1) aus Sorghum bicolor (Hirse) ist im Detail bekannt und die entsprechenden Proteine (zwei mikrosomale Cytochrome sowie eine lösliche UDPG-Glykosyltransferase) sind isoliert und charakterisiert worden. Mittels gentechnischer Methoden wurden die Enzyme für den gesamten Biosyntheseweg von Dhurrin in der nicht-cyanogenen Pflanze Arabidopsis thaliana exprimiert. Daraus resultierten Arabidopsis-Varianten, die das cyanogene Glykosid in zur Hirse vergleichbaren Mengen akkumulierten. Zusätzlich sind diese transgenen Pflanzen zur Cyanogenese befähigt und zeigen aufgrund dessen eine Resistenz gegenüber bestimmten Fraßfeinden (TATTERSALL et al., 2001).

CYANOGENES GLYKOSID	STRUKTURFORMEL	ENTHALTENES CYANHYDRIN	Spezies
Amygdalin		Mandelonitril	Prunus sp.
Prunasin		Mandelonitril	Prunus sp.
DHURRIN		<i>p</i> -Hydroxy- mandelonitril	Sorghum bicolor
Linamarin		Acetoncyanhydrin	Linum usitatissimum Hevea brasilensis Manihot esculenta
LOTAUSTRALIN		2-Butanon- cyanhydrin	Linum usitatissimum Hevea brasilensis

Tabelle 1.1: Aufbau ausgewählter pflanzlicher cyanogener Glykoside (CONN, 1981; GREGORY, 1999).

1.1.1.2. HNLS SIND AM ABBAU VON CYANOGENEN GLYKOSIDEN BETEILIGT

Um die Freisetzung toxischer Blausäure aus den cyanogenen Glykosiden zu kontrollieren, sind diese und die katabolen Enzyme in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert. Erst durch die Zerstörung der Zellstruktur, z.B. verursacht durch das Anfressen durch Tiere, treffen Enzyme und Substrat aufeinander (GRUHNERT *et al.*, 1994). Im Prozess der Cyanogenese werden die Cyanhydrine aus den cyanogenen Glykosiden durch eine β -Glykosidase freigesetzt und anschließend spontan oder durch HNL-Katalyse in die Carbonylkomponente und Blausäure gespalten (Abbildung 1.2). Die spontane Zersetzung des Cyanhydrins wird durch Temperaturen über 25°C und Basen katalysiert (CHOLOD, 1993). Im schwach sauren Zellmilieu (pH 5-6) wird die Reaktion durch die HNL-katalysierte Spaltung allerdings deutlich beschleunigt. Diese schnelle Freisetzung von Blausäure ist für die Pflanze vorteilhaft, da die Reaktion als Abwehrmechanismus gegenüber Herbivoren und Mikroorganismen dient.



Abbildung 1.2: Anabolismus, Katabolismus und Entgiftungsmechanismen von cyanogenen Glykosiden. Der Biosyntheseweg erfolgt ausgehend von Aminosäuren, der Abbau wird durch β -Glykosidasen und HNLs katalysiert. Die für die Abwehr von Fraßfeinden verantwortlichen Verbindungen sind rot gekennzeichnet. Abbildung modifiziert aus HICKEL *et al.* (1996) und POULTON (1990).

Nicht nur das freigesetzte Cyanid, welches für fast alle Organismen toxisch ist, da es die funktionelle Häm-Gruppe der Cytochromoxidase in der Atmungskette blockiert (BERG *et al.*, 2003), sondern auch die freigesetzten Carbonylverbindungen bzw. daraus resultierende Verbindungen wie β -Cyanoalanin (Abbildung 1.2) wirken als Abwehrmittel (NAHRSTEDT, 1985).

Darüber hinaus dient das freigesetzte Cyanid wahrscheinlich als Stickstoffquelle für die Synthese von Aminosäuren. Der Stickstoff der cyanogenen Verbindung wird durch die Reaktion mit Serin oder Cystein refixiert und das entstandene β-Cyanoalanin kann als Asparaginvorstufe in den Aminosäurestoffwechsel eingeschleust werden (Abbildung 1.2, POULTON, 1990). Diese Refixierung des Stickstoffs kann gleichsam als Entgiftungsmechanismus angesehen werden. Ein alternativer Prozess, der vor allem bei Säugetieren, Mikroorganismen und Insekten auftritt, ist die durch das Enzym Rhodanese katalysierte Reaktion der Blausäure mit Thiosulfat zu Thiocyanat und Sulfit. Diesen Prozess der Cyanidentgiftung findet man bei Pflanzen nur selten (Abbildung 1.2, HICKEL *et al.*, 1996).

1.1.2. HNLS ALS KATALYSATOREN IN DER ANGEWANDTEN BIOKATALYSE

Wöhler und Liebig beobachteten schon 1837 die Zerlegung des Amygdalins aus Mandeln durch Extrakte der Bittermandel (Emulsin) in eine Zuckerkomponente, Benzaldehyd und Blausäure (WÖHLER und LIEBIG, 1837).

Vor fast einem Jahrhundert beschrieb Rosenthaler die erste Verwendung der HNL aus Mandeln ("Emulsin") zur asymmetrischen Synthese von (*R*)-Mandelonitril (ROSENTHALER, 1908). In den 1960er und 1970er Jahren wurden die HNLs aus Mandeln und Hirse näher charakterisiert und bezüglich ihrer Fähigkeit zur Synthese chiraler Cyanohydrine untersucht (BECKER und PFEIL, 1966; SEELY und CONN, 1971). Seit den 1990er Jahren verstärkte sich das Interesse an HNLs zum Einsatz in synthetischen Reaktionen. Ihre Fähigkeit zur Knüpfung von C-C-Bindungen macht chirale Cyanohydrine zugänglich, die wichtige Bausteine für verschiedene pharmazeutische und agrochemische Produkte sind (JOHNSON *et al.*, 2000). Einige Produkte werden bereits im technischen Maßstab mit HNLs hergestellt. So wird z.B. die HNL aus *Hevea brasiliensis* (\rightarrow 1.2.3.1) zur Synthese von (*S*)-3-Phenoxybenzaldehyd-Cyanhydrin, das eine Pyrethroidvorstufe ist, eingesetzt. Der Prozess wird von der Firma DSM (NL) mit einer Jahresproduktion von 10 Tonnen gefahren, verwendet werden dabei ganze Zellen im Zweiphasensystem mit Puffer und Methyl *tert*-butylether (LIESE *et al.*, 2006; PURKARTHOFER *et al.*, 2007).

Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit von HNLs ist die für die *Hb*HNL beschriebene Katalyse der "Henry-Reaktion", der Addition von Nitromethan oder –ethan an Aldehyde (PURKARTHOFER *et al.*, 2006).

1.1.2.1. CHIRALE CYANOHYDRINE ALS BAUSTEINE

Chirale Cyanohydrine sind multifunktionale optisch aktive Verbindungen, die eine Vielzahl von Folgereaktionen, sowohl an der Hydroxyl- als auch an der Nitrilgruppe ermöglichen (Abbildung 1.3). Dies macht sie zu wertvollen synthetischen Bausteinen für die präparative organische Synthese.



Abbildung 1.3: Einige wichtige Folgereaktionen, die ausgehend von chiralen Cyanhydrinen zugänglich sind. Abbildung modifiziert aus PURKARTHOFER *et al.* (2007).

Ein Beispiel für eine Folgereaktion an der Hydroxylgruppe ist die intramolekulare Zyklisierung eines Bromcyanhydrins zu 2-Cyanotetrahydrofuran und –pyran. Diese Verbindungen werden als Bausteine in Synthesen von Naturprodukten wie Terpenoiden, Pheromonen und für die Herstellung von Antibiotika verwendet.

Prominente Beispiele zu Reaktionen an der Nitrilgruppe sind die säurekatalysierte Hydrolyse zu α -Aminosäuren oder die Reduktion zu β -Aminoalkoholen (Abbildung 1.3, GREGORY, 1999).

1.1.2.2. ECKPUNKTE FÜR TECHNISCHE PROZESSE MIT HNLS

Die Herausforderung in der Anwendung von HNLs in industriellen Prozessen liegt darin, die spontane und nicht-enzymkatalysierte Bildung von racemischem Cyanhydrin zu unterdrücken. Diese unselektive chemische Reaktion wird durch pH-Werte über 5 und Temperaturen über 25°C stark beschleunigt (CHOLOD, 1993). Daher werden enzymatische Synthesen zumeist bei pH-Werten unter 5 und Temperaturen unter 15°C durchgeführt (WILLEMAN *et al.*, 2000).

Zahlreiche Reaktionssysteme sind für die enzymatische Cyanhydrinsynthese beschrieben worden. Neben wässrigen Reaktionssystemen bei leicht sauren Pufferbedingungen (KRAGL *et al.*, 1990) und der Katalyse in reinen organischen Lösungsmitteln (EFFENBERGER *et al.*, 1987) haben sich stark durchmischte Zweiphasensysteme als sehr vorteilhaft für die HNL-katalysierte Synthese von erwiesen (BAUER *et al.*, 2002). Als organische Lösungsmittel werden z.B. Diisopropylether oder Ethylacetat verwendet. Darüber hinaus wurden in letzter Zeit Synthesereaktionen in unkonventionellen Lösungsmitteln, wie ionischen Flüssigkeiten, beschrieben (GAISBERGER *et al.*, 2004).

Ein großes Problem beim Anpassen im Labor entwickelter Prozesse an industrielle Maßstäbe stellt die Blausäure dar. Das Arbeiten mit freier Blausäure erfordert aufwändige Genehmigungsverfahren (POECHLAUER, 1998). Als praktikabel bezüglich der Arbeitssicherheit haben sich bisher nur einfache Satzreaktoren erwiesen (VON LANGERMANN *et al.*, 2007). Alternative Cyanidquellen sind z.B. Acetoncyanhydrin, Trimethylsilylcyanid oder Cyanoformiate, nichtsdestotrotz bleibt HCN die günstigste und effektivste Cyanidquelle (PURKARTHOFER *et al.*, 2007).

7

Bezüglich der Präparation des Biokatalysators gibt es vielfältige Studien und Anwendungsbeispiele, wobei in etablierten Prozessen, wie der Synthese von (*S*)-3-Phenoxybenzaldehydcyanhydrin mit der HNL aus *Hevea brasiliensis*, meist isoliertes Enzym zum Einsatz kommt, das nach Ablauf eines Reaktionszyklus entsorgt wird (PURKARTHOFER *et al.*, 2007). Neben klassischen Techniken wie der Immobilisierung des Biokatalysators an verschiedenen Trägermaterialien, wie Silicagel oder Nitrozellulose (SCHMIDT und GRIENGL, 1999) sind in letzter Zeit auch Methoden, wie die Herstellung von quervernetzten Enzymaggregaten (MATEO *et al.*, 2004) oder die Einkapselung von HNLs in Sol-Gel-Matrizes (VEUM *et al.*, 2004) beschrieben worden.

Um in technischen Prozessen als Katalysator wirken zu können, müssen die eingesetzten HNLs bestimmte Vorraussetzungen erfüllen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.1.2.3. ANFORDERUNGEN AN HNLS FÜR DEN TECHNISCHEN EINSATZ

Wie bereits beschrieben (\rightarrow 1.1.2.2) werden die Enzyme in technischen Prozessen meist bei niedrigen Temperaturen und vor allem bei möglichst niedrigen pH-Werten eingesetzt, um die nichtkatalysierte HCN-Addition, die zu achiralen Produkten führt, zu unterdrücken. Niedrige pH-Werte sind für die Stabilität der Enzyme oft ein Problem. Darüber hinaus ist die Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln von Vorteil, da viele Prozesse in Zweiphasensystemen oder in reinen organischen Lösungsmitteln ablaufen. Nicht zuletzt muss der Biokatalysator eine möglichst große Stabilität gegenüber mechanischen Belastungen (Scherkräfte) aufweisen, da viele Prozesse in herkömmlichen Rührkesseln durchgeführt werden (POECHLAUER, 1998). Um universell einsetzbar zu sein, sollten die Enzyme ein breites Substratspektrum aufweisen und die Substrate mit möglichst hoher Enantioselektivität umsetzen. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Entscheidung für oder gegen einen Prozess mit einem Biokatalysator ist die Wirtschaftlichkeit, so sollte der Kostenanteil für den Katalysator nicht mehr als 10% der Gesamtkosten betragen (POECHLAUER, 1998). Um diese Kosten so gering wie möglich zu halten, ist eine heterologe Expression in einem mikrobiellen (möglichst prokaryotischen) System der Isolation des Enzyms aus Pflanzenmaterial vorzuziehen. Da die biokatalytische Cyanhydrinsynthese ohne Cofaktoren auskommt, entfallen hier diesbezügliche Kosten.

1.1.2.4. ALTERNATIVEN ZUR ENZYMATISCHEN CYANHYDRINSYNTHESE

Alternativen zu HNLs in der Synthese von chiralen Cyanhydrinen sind Umsetzungen mit chiralen Metallkomplexen oder cyclischen Dipeptiden als Katalysatoren (CHEN und FENG, 2006; POECHLAUER *et al.*, 2004). Darüber hinaus können racemische Cyanhydrine durch kinetische Racematspaltung mittels Lipasen getrennt werden (NORTH, 2003). Da in letzter Zeit aber die Verfügbarkeit von HNLs immer besser geworden ist und mit ihnen die höchsten Enantiomerenüberschüsse erzielt werden können, spielen andere Katalysatoren allerdings nur untergeordnete Rollen in der Synthese von optisch aktiven Cyanhydrinen (EFFENBERGER *et al.*, 2000; von LANGERMANN *et al.*, 2007).

1.2. STRUKTUREN UND MECHANISMEN VON HNLS – BEISPIELE FÜR DIVERGENTE UND KONVERGENTE EVOLUTION

Zur Klassifizierung von HNLs können verschiedene Kriterien herangezogen werden. Eine klassische Untergliederung basiert auf der Anwesenheit von Flavinadenosindinucleotid (FAD), das in den Enzymen von *Rosaceen* als strukturell, nicht jedoch als katalytisch wichtiger Cofaktor gebunden wird. Alle bisher bekannten Vertreter dieser Gruppe sind *R*-selektiv (HICKEL *et al.*, 1996; SHARMA *et al.*, 2005). Ein weiteres cofaktorhaltiges Enzym ist die ebenfalls *R*-selektive HNL aus *Linum usitatissimum* (Leinsamen), für die Zinkionen und Nicotinamidadenosindinucleotid (NAD(H)) als strukturell und/ oder katalytisch bedeutende Cofaktoren diskutiert werden (BREITHAUPT *et al.*, 1999). Demgegenüber gibt es Vertreter ohne Cofaktoren, wie die Enzyme aus *Manihot esculenta* (Maniok), *Hevea brasiliensis* (Parakautschukbaum) und *Sorghum bicolor* (Hirse), die *S*-selektiv sind (SHARMA *et al.*, 2005).

Durch die Analyse der Kristallstrukturen vieler HNLs konnten in letzter Zeit große Fortschritte in der Aufklärung der Reaktionsmechanismen gemacht werden. Allgemein wurde schon in frühen Studien (BECKER und PFEIL, 1966) postuliert, dass es zwei Voraussetzungen für HNL-Aktivität gibt: Dies sind zum einen eine Base, durch die die Hydroxylgruppe des Cyanhydrins deprotoniert wird und zum anderen eine positive Ladung, durch die das freiwerdende Cyanidion stabilisiert wird.

Tabelle 1.2 fasst wichtige Eigenschaften ausgewählter HNLs zusammen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Tabelle 1.2: Ausgewählte HNLs und ihre Eigenschaften

	<i>Me</i> HNL	<i>HB</i> HNL	PAHNL	<i>Lu</i> HNL	SBHNL
URSPRUNGS- ORGANISMUS	<i>Manihot esculenta</i> (Maniok)	Hevea brasiliensis (Parakaut- schukbaum)	Prunus amygdalus (Bittermandel)	<i>Linum usitatissimum</i> (Leinsamen)	Sorghum bicolor (Hirse)
Selektivität	S	S	R	R	S
Molekular- gewicht/ Untereinheit	29 kDa	29 kDa	61 kDa	46 kDa	33 kDa/ 23 kDa
COFAKTOREN	-	-	FAD	Zn ²⁺ , NAD (?)	
Glykosilie- Rung	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja
QUARTÄR- STRUKTUR	Homo- tetramer (?)	Homodimer	Monomer	Homodimer	Hetero- tetramer
Kristall- struktur	Lauble <i>et al.</i> , 1999 & 2001a	Wagner <i>et al.</i> , 1996	Dreveny <i>et al.</i> , 2001	In Arbeit (Gruber, pers. Mitteilung)	Lauble <i>et al.</i> , 2002
Wirte für Heterologe Expression	E. coli P. pastoris S. cerevisiae	E. coli P. pastoris S. cerevisiae	P. pastoris	E. coli P. pastoris	
NATÜRLICHES Substrat	Aceton- cyanhydrin	Aceton- cyanhydrin	Mandelonitril	Aceton- cyanhydrin	4-Hydroxy- mandelonitril
SUBSTRAT- SPEKTRUM	aliphatische/ aromatische Aldehyde & Methylketone	aliphatische/ aromatische Aldehyde & Methylketone	aliphatische/ aromatische Aldehyde & Methylketone	aliphatische Aldehyde & Methylketone	aromatische Aldehyde & Methylketone
ÄHNLICHKEIT	α/β-Hydrolase	α/β-Hydrolase	GMC-Oxido- reduktase	Zn-ADH	SCP α/β-Hydrolase

1.2.1. FAD-HALTIGE HNLS SIND MIT GLUKOSE-METHANOL-CHOLIN OXIDOREDUKTASEN VERWANDT

FAD-enthaltende HNLs sind bisher ausschließlich in Pflanzen aus der Familie der *Rosaceen* entdeckt worden, sie sind ausnahmslos *R*-selektiv und haben auch sonst ähnliche Eigenschaften. Das molekulare Gewicht dieser glykosylierten Proteine liegt

zwischen 50 und 80 kDa, sie kommen in der Pflanze meist in mehreren Isoformen vor und katalysieren die Spaltung von (R)-Mandelonitril als natürliches Substrat (HICKEL et al., 1996; SHARMA et al., 2005). Der Cofaktor FAD ist vermutlich ein evolutionäres Relikt, da er nicht an der Katalyse beteiligt ist (DREVENY et al., 2002). Er ist jedoch essentiell für die Enzymaktivität und dient der Stabilisierung der Enzymstruktur. Die Röntgenstruktur des Enzyms aus Prunus amygdalus (bittere Mandel, PaHNL) zeigt eine deutliche Ähnlichkeit zur Familie der Glukose-Methanolauch Cholin (GMC) Oxidoreduktasen, der die PaHNL hinsichtlich der Aminosäuresequenz zu ca. 30% ähnlich ist (DREVENY et al., 2001; ZAMOCKY et al., 2004). Das aktive Zentrum wurde durch verschiedene Methoden nahe des Isoalloxazinsrings des FADs und einer konservierten Histidinseitenkette lokalisiert (DREVENY et al., 2002). Diese wird im Mechanismus als generelle Base postuliert, die die Hydroxylgruppe des Substrates deprotoniert. Als Cyanid-stabilisierende, positive Ladung konnte kein spezieller Aminosäurerest identifiziert werden; dieser Effekt wird einem durch mehrere weiter entfernt liegende Aminosäurereste ausgebildeten positiven elektrostatischen Potenzial zugeschrieben.

1.2.2. DIE HNL AUS *LINUM USITATISSIMUM* ZEIGT ÄHNLICHKEITEN ZU ZINKABHÄNGIGEN ALKOHOLDEHYDROGENASEN

Eine weitere cofaktorhaltige HNL ist das Enzym aus *Linum usitatissimum* (Leinsamen, *Lu*HNL), das sequenziell und strukturell starke Ähnlichkeit zu Zinkabhängigen Alkohol-Dehydrogenasen (ZnADHs) aufweist. Einige für die ZnADH-Aktivität notwendige Aminosäuren sind konserviert, allerdings zeigt die *Lu*HNL keine ADH-Aktivität und kann auch nicht durch spezifische ADH-Inhibitoren beeinflusst werden. Neben den konservierten Aminosäureresten für die Zinkbindung findet man zusätzlich noch eine ADP-bindende Domäne ($\beta\alpha\beta$ -Motiv), die auch für die HNLs aus der *Rosaceen*-Familie beschrieben ist (BREITHAUPT *et al.*, 1999; TRUMMLER und WAJANT, 1997). Die Frage, ob an dieser Stelle ein NAD als Cofaktor gebunden wird, konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden. Ähnlich wie bei den FAD-haltigen HNLs aus *Rosaceen*, könnte das NAD in der *Lu*HNL als strukturelles Element dienen (HEIM, 2002).

Untersuchungen zum Substratspektrum zeigten bisher, dass die LuHNL R-selektiv ist und nur aliphatische Aldehyde und Ketone akzeptiert (ALBRECHT *et al.*, 1993). Im

Gegensatz dazu wird in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung beschrieben, dass das Enzym aromatische Substrate, bei denen die aromatische Gruppe durch Methylengruppen vom Carbonylkohlenstoffatom getrennt ist, S-selektiv umsetzt (ROBERGE *et al.*, 2007).

Es ist wahrscheinlich, dass in naher Zukunft auch Aussagen über den Mechanismus und die Cofaktoren der *Lu*HNL möglich sind, da die Aufklärung der Kristallstruktur weit fortgeschritten ist (persönliche Mitteilung, K. Gruber, Universität Graz).

1.2.3. HNLS MIT α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv

Dieses Strukturmotiv wurde erstmals 1992 von OLLIS *et al.* beschrieben und fasst eine ganze Enzymfamilie mit verschiedenen Aktivitäten (Tabelle 1.3) zusammen, denen allen das gleiche Faltungsmotiv (Abbildung 1.4) zu Grunde liegt. Kernstück des aktiven Zentrums ist die so genannte katalytische Triade, bestehend aus einem nucleophilen Aminosäurerest (meist Serin), einem sauren Rest (Aspartat oder Glutamat) und einem konservierten Histidin. Die grundlegende minimale α/β -Hydrolasefaltung (VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001), die sich aus zentralen β -Faltblatt-Strukturen, die mit α -Helices verbunden sind, zusammensetzt, wird je nach Enzymklasse noch durch zusätzliche Strukturelemente erweitert (NARDINI und DIJKSTRA, 1999).



Abbildung 1.4: Die α/β -Hydrolase Faltung. Das grundlegende Faltungsmotiv besteht aus zentral gelegenen β -Faltblatt-Strukturen, die durch α -Helices verbunden sind. Es kann an den mit grünen

durchbrochenen Linien gekennzeichneten Stellen durch zusätzliche Strukturelemente erweitert werden. Abbildung modifiziert nach NARDINI und DIJKSTRA (1999).

Tabelle 1.3: Wichtige Vertreter aus der Familie der α/β -Hydrolasen. Tabelle modifiziert aus BUGG (2004). Erläuterungen im Text.

ENZYM	KATALYTISCHE Aminosäure (Nucleophil)	Aktiviertes Molekül	KATALYSIERTE REAKTION/ BEISPIEL	
ESTERASE	Ser	H ₂ O	Ester + H₂O ≕Säure + Alkohol	
LIPASE	Ser	H ₂ O	Ester + H ₂ O \Longrightarrow Säure + Alkohol $R \xrightarrow{O} R' + H_2O \rightleftharpoons OH + HO-R'$	
SERIN-CARBOXY- PEPTIDASE	Ser	H ₂ O	Peptid + H ₂ O \Longrightarrow Peptid + Aminosäure H_2 H_2	
Haloalkan- Dehalogenase	Asp H ₂ O Halogenalkan Halogenalkan Halogenalkan Hac—cH ₂ cl + H ₂ O		Halogenalkan + H₂O़ → Alkohol + X ⁻ н₃с—сн₂сі + н₂о → н₃с—сн₂он + сі ⁻	
EPOXID- HYDROLASE	Asp	H ₂ O	Epoxid + H ₂ O \Longrightarrow 1,2-Diol R \longrightarrow H ₂ O \Longrightarrow R \longrightarrow OH	
Hydroxynitril- Lyase	Ser	HCN	Cyanhydrin \Longrightarrow Aldehyd + HCN $\downarrow \qquad \qquad$	
HALOPEROXIDASE	Ser	H ₂ O ₂	Säure + H ₂ O ₂ \Longrightarrow Persäure \rightarrow HOX $\stackrel{R}{\longrightarrow}$ $\stackrel{OH}{\longrightarrow}$ + H ₂ O ₂ \rightleftharpoons $\stackrel{CI^{-}}{\longrightarrow}$ HO-cl	
COFAKTOR- UNABHÄNGIGE 2,4-DIOXYGENASE	Ser	O ₂	Heteroaromat + $O_2 \implies \text{Ringöffnung} + \text{CO}$	

Nach der Theorie von Bugg kommen die vielfältigen durch diese Enzymfamilie katalysierten Reaktionen dadurch zustande, dass durch unterschiedliche Mechanismen jeweils ein kleines Molekül (z.B. Wasser oder Blausäure) aktiviert wird. Je nachdem, um welches Molekül es sich handelt, wird eine bestimmte katalytische Strategie angewendet (BUGG, 2004). So fungiert das katalytische Serin bei Lipasen und Esterasen als echtes Nukleophil und bildet mit dem Substrat einen kovalent gebundenen Übergangszustand, bei anderen Vertretern (z.B. einigen HNLs) tritt es nur als Protonendonator auf (\rightarrow 1.2.3.1), während die eigentliche reaktive Spezies das katalytische Histidin ist. Tabelle 1.3 fasst die wichtigsten Vertreter der α/β -Hydrolase Familie und einige ihrer Eigenschaften zusammen.

1.2.3.1. DIE HNLS AUS *MANIHOT ESCULENTA* UND *HEVEA BRASILIENSIS* ÄHNELN EINANDER SEHR

Die α/β -Hydrolase-verwandten HNLs aus *Manihot esculenta* (Maniok, *Me*HNL) und Hevea brasiliensis (Parakautschukbaum, HbHNL) gehören neben der PaHNL zu den am besten charakterisierten HNLs. Die Primärstrukturen sind zu 77% identisch und beide Enzyme sind S-selektiv. Die Kristallstrukturen beider HNLs sind gelöst, zusätzlich sind verschiedene Strukturen von Punktmutanten und einige Enzym-Substrat- bzw. -Inhibitor-Komplexe veröffentlicht (LAUBLE et al., 2001a & b; WAGNER et al., 1996; ZUEGG et al., 1999). Trotz der fast identischen Strukturen gibt es für die beiden Proteine differierende Modelle für den katalytischen Mechanismus (Abbildung 1.5). Gesichert scheint, dass das Histidin der katalytischen Triade ein Proton vom katalytischen Serin abstrahiert, das durch das Proton des gebundenen Substrats ersetzt wird. Das katalytische Histidin kann so also als die aktive Base betrachtet werden. Unterschiede in den Theorien ergeben sich bezüglich der Stabilisierung und Freisetzung des Blausäuremoleküls. Beim für die MeHNL postulierten Modell wird das Cyanid nicht weiter stabilisiert, sondern greift direkt das vom Histidin abstrahierte Proton an und wird als HCN freigesetzt (LAUBLE et al., 2001b). Dieser Schritt verläuft im HbHNL-Modell über den Austausch mit einem "zentralen" Wassermolekül, das in der Struktur ohne Substrat beschrieben wurde. Dieses Wassermolekül ist über Wasserstoffbrückenbindungen an das katalytische Histidin und einen Lysinrest gebunden, der nach dem Austausch des Wassers durch das Substrat die Cyanidgruppe stabilisiert. Dieser Lysinrest ist in der MeHNL zwar auch vorhanden, seine aktive Rolle an der Katalyse wird aber kontrovers diskutiert (GARTLER *et al.*, 2007; GRUBER *et al.*, 2004).



Abbildung 1.5: Vorgeschlagene Katalysemechanismen für die *Hb*HNL (schwarz/ orange) und die *Me*HNL (schwarz). Dargestellt ist die Spaltung von Acetoncyanhydrin (blau). Für die *Hb*HNL ist beim Enzym ohne Substrat im aktiven Zentrum ein Wassermolekül beschrieben, das durch einen Lysinrest und das katalytische Histidin koordiniert wird (1). Im nächsten Schritt wird das Cyanhydrin gebunden und im *Hb*HNL-Modell gegen das Wassermolekül ausgetauscht (2). Vermittelt durch das katalytische Serin wird nun das Hydroxylgruppenproton des Substrats durch das katalytische Histidin abstrahiert und auf die Cyanidgruppe übertragen, die im *Hb*HNL-Modell durch den Lysinrest stabilisiert wird (3). Abschließend werden die entstandene Blausäure und die Carbonylkomponente (hier Aceton) nacheinander freigesetzt, im*Hb*HNL-Modell erfolgt erneut der Austausch mit einem Wassermolekül (4). Die Rolle des für die *Hb*HNL postulierten "zentralen Wassermoleküls" und die Beteiligung des Lysinrestes im aktiven Zentrum sind im Falle der *Me*HNL nicht vollständig geklärt. Abbildung modifiziert aus GRUBER *et al.* (2004).

1.2.3.2. DIE HNL AUS SORGHUM BICOLOR ZEIGT HOMOLOGIE ZU DEN SERIN-CARBOXY-PEPTIDASEN

Ebenfalls zu den α/β -Hydrolasen wird die HNL aus Sorghum bicolor (SbHNL) gezählt, die Sequenzähnlichkeiten zu Serincarboxypeptidasen (SCPs) aufweist. Die Tatsache, dass die SbHNL eine SCP-Nebenaktivität hat, unterstützt die Vermutung, dass diese HNL von SCPs abstammt (HEIM, 2002; POHL et al., 2007). Im Gegensatz zu der MeHNL und HbHNL weist das aus zwei Dimeren bestehende heterotetramere essentielle posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung. Enzym Disulfidbrücken und proteolytische Prozessierung auf (HICKEL et al., 1996; WAJANT et al., 1994). Obwohl die SbHNL auch eine α/β -Hydrolase-Struktur mit konservierter katalytischer Triade hat, kann der für die MeHNL bzw. HbHNL angenommene Mechanismus nicht komplett übertragen werden, da die sterischen Verhältnisse im aktiven Zentrum anders sind. Der Theorie nach abstrahiert das Sauerstoffatom eines Tryptophans im aktiven Zentrum als Base das Proton des Substrates, welches dann mittels eines Wassermoleküls auf die freiwerdende Nitrilgruppe übertragen wird (LAUBLE et al., 2002). Wie die anderen α/β -Hydrolase-verwandten Enzyme ist die SbHNL S-selektiv, akzeptiert aber nur aromatische Substrate (NIEDERMEYER und KULA, 1990).

1.2.4. THEORIE ZUR EVOLUTION DER HNLS AUS VERSCHIEDENEN VORLÄUFERPROTEINEN

Während die Entwicklung der HNLs also als konvergente Evolution betrachtet werden kann, sind die einzelnen Gruppen (α/β -Hydrolasen, GMC-Oxidoreduktasen, Zn-abhängige ADHs) durch divergente Evolution aus einem jeweiligen gemeinsamen Vorfahren entstanden (Abbildung 1.6).



Abbildung 1.6: Theorie zur Entstehung verschiedener HNLs durch konvergente Evolution. Die einzelnen HNLs haben sich durch divergente Evolution in verschiedenen Strukturfamilien entwickelt. Neben den oben genannten Enzymen, die allesamt bezüglich ihrer Sequenz und Struktur weitgehend charakterisiert sind, sind noch weitere HNLs beschrieben, die aber meist nur aus Pflanzenmaterial aufgereinigt und hinsichtlich ihrer Substratpräferenzen untersucht wurden. Dazu gehören die Enzyme aus *Ximenia americana* (Falsches Sandelholz, KUROKI und CONN, 1989) und dem Goldtüpfelfarn *Phlebodium aureum* (WAJANT *et al.*, 1995) sowie einige in den letzten Jahren mittels systematischer Ansätze identifizierte Enzyme, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.

1.3. ANSÄTZE ZUR IDENTIFIZIERUNG NEUER ENZYME

Grundsätzlich können neue Enzyme, z.B. für die Anwendung in der Biotechnologie, auf zweierlei Arten gefunden werden. Im direkten Ansatz können potenzielle Quellen für neue Katalysatoren unmittelbar untersucht werden, indem aus dem entsprechenden Organismus alle löslichen Enzyme extrahiert und der gewonnene Rohextrakt auf die gesuchte Aktivität hin getestet wird. Im Falle von HNLs wurden große Mengen cyanogener Pflanzen gesammelt, zu Rohextrakten aufbereitet und auf HNL-Aktivität untersucht (Asano *et al.*, 2005a; HICKEL *et al.*, 1997b). Mittels dieser Methode wurden einige neue Quellen für *R*- und *S*-selektive Enzyme gefunden. Die meisten neuen *R*-spezifischen HNLs kommen aus der Familie der

Rosaceen, neben verschiedenen Prunus-Arten (z.B. P. persica (Pfirsich) und P. domestica (Pflaume)) sind unter anderem Rohextrakte aus den Samen von Sorbus aucuparia (Vogelbeere) und Eriobotrya japonica (Wollmispel) positiv auf HNL-Aktivität gestestet worden (ASANO *et al.*, 2005b; HERNANDEZ *et al.*, 2004). Eingehender untersucht wurde vor allem das *R*-selektive Enzym aus *P. mume* (Japanische Aprikose, NANDA *et al.*, 2005 & 2006) und Guanabana-Präparationen, die zur Synthese von (*S*)-Cyanhydrinen verwendet werden können (SoLís *et al.*, 2003).

Die Alternative zum Identifizieren neuer Enzyme durch das oben beschriebene Vorgehen ist der sequenzbasierte Ansatz, der auf dem Vergleich der Proteinsequenzen bekannter Enzyme mit Sequenzdatenbanken beruht. So können bisher uncharakterisierte Proteine, die Ähnlichkeiten zu Biokatalysatoren mit der gesuchten Aktivität aufweisen, gefunden, kloniert und auf die entsprechende Aktivität getestet werden.

Eine interessante Variante beider Methoden ist die Identifizierung neuer Enzyme aus dem Metagenom. Bei diesem Ansatz wird bakterielle DNA direkt aus z.B. Bodenproben isoliert und in geeignete Expressionssysteme kloniert. Der Vorteil ist, dass die gesamte Vielfalt an Organismen erfasst werden kann, denn nur ein Bruchteil (<1%) der Bakterien lässt sich mit konventionellen Methoden kultivieren. Die klonierten DNA-Bibliotheken können nun entweder funktionsbasiert (heterologe Expression und Aktivitätstest) oder sequenzbasiert (PCR-Methoden mit DNA-Konsensussequenzen von bekannten Genen) auf die gesuchte Aktivität hin untersucht werden (YUN und RYU, 2005).

Nicht gänzlich neue Enzyme, aber solche mit verbesserten oder veränderten Eigenschaften, lassen sich mit Methoden der gerichteten Evolution herstellen. Durch verschiedene Mutagenesemethoden, z.B. fehlerhafte PCR oder DNA-Shuffling, werden große Variantenbibliotheken erstellt, die heterolog exprimiert und anschließend auf die gesuchte Aktivität hin untersucht werden (JAEGER *et al.*, 2001).

In jedem Fall ist zur schnellen Identifizierung und ersten Charakterisierung eines potenziellen neuen Enzyms ein leistungsfähiger Enzymtest nötig. Zur Durchmusterung von aus gerichteter Evolution entstandenen Variantenbibliotheken oder von Metagenomproben ist zudem ein Hochdurchsatztest sinnvoll, der in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt werden kann. Darüber hinaus ist es von Vorteil,

18

wenn mit ein und dem selbem Test die Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten untersucht werden kann, da ansonsten Gefahr besteht, interessante Kandidaten zu übersehen.

Für HNLs sind drei verschiedene Testsysteme etabliert: Die genaueste Methode ist sicherlich die direkte Analyse der Substrate und Produkte mittels effizienter Chromatographiemethoden, z.B. der Gaschromatographie (GC). Alternativ kann bei aromatischen Substraten (z.B. im System Benzaldehyd/ Mandelonitril) die direkte Abbzw. Zunahme der durch die Carbonylkomponente verursachten Absorption im UV-Bereich beobachtet werden (BAUER *et al.*, 1999) oder es werden Testsysteme verwendet, die die entstandene Blausäure detektieren (SELMAR *et al.*, 1987).

1.4. MOTIVATION UND ZIEL DER ARBEIT

Wie einleitend beschrieben, stellen Hydroxynitril-Lyasen eine sehr heterogene Enzymklasse dar, die nicht nur für die industrielle Biotechnologie, sondern auch in wissenschaftlicher Hinsicht bezüglich ihrer Entstehung durch konvergente und divergente Evolution sowie unterschiedlicher Katalysemechanismen sehr interessant ist. Ein Ziel der Arbeit war es deshalb, neue Quellen für HNLs zu finden, die identifizierten Enzyme ausführlich biochemisch zu charakterisieren und mit bereits beschriebenen HNLs zu vergleichen. Neue HNLs sind bisher ausschließlich mit funktionsbasierten Ansätzen gefunden worden; in dieser Arbeit sollte der sequenzbasierte Ansatz verfolgt werden. Besonderes Augenmerk galt Enzymen, die Ähnlichkeiten zu den HNLs aus Hevea brasiliensis und Manihot esculenta aufweisen. Diese Enzyme gehören in die Familie der α/β -Hydrolasen, deren breite Diversität bezüglich der katalysierten Reaktionen an ähnlichen aktiven Zentren ein großes Potenzial für die Entdeckung neuer HNL-Varianten hinsichtlich geänderter Substratund Stereoselektivität birgt. Darüber hinaus stellt die breite Datenbasis, die bereits für diese Enzymfamilie bezüglich Struktur-Funktionsbeziehungen verfügbar ist eine gute Ausgangsbasis zur Modellierung von Strukturen und Mechanismen dar. Zudem haben sich HNLs mit α/β -Hydrolasefaltung als robuste, einfach rekombinant zugängliche und vielseitig einsetzbare Biokatalysatoren für die Herstellung von chiralen Cyanhydrinen erwiesen, da sie keine Cofaktoren und aufwändigen posttranslationalen Modifizierungen benötigen.

Um potenzielle HNLs schnell zu identifizieren, war es zunächst notwendig, ein Testsystem zu entwickeln, in dem Zellrohextrakte mit verschiedenen Substraten getestet werden können. Das Testsystem sollte auf dem Nachweis von HCN beruhen, um potenzielle HNLs einfach bezüglich der Spaltung verschiedener Cyanhydrine untersuchen zu können. Ein entsprechendes hochdurchsatzfähiges Testsystem war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht beschrieben.

Auf diesem Wege identifizierte neue Enzyme müssen anschließend auf ihre Syntheseaktivität von Cyanhydrinen und insbesondere auch auf ihre Stereoselektivität hin untersucht werden, um sie als echte HNL klassifizieren zu können.

War dies erfolgreich, folgen im nächsten Schritt die umfassende biochemische Charakterisierung und der Vergleich mit anderen HNLs. Um Rückschlüsse auf strukturelle und mechanistische Aspekte ziehen zu können, muss ein plausibles

20

Strukturmodell entwickelt oder im günstigsten Fall die Struktur der Enzyme röngtenkristallographisch gelöst werden. Auf Basis dieser Modelle entwickelte Hypothesen zum Mechanismus bedürfen im Anschluss der experimentellen Verifizierung z.B. durch die Charakterisierung geeigneter Enzymvarianten mit Punktmutationen.





J. ANDEXER, J. K. GUTERL, M. POHL UND T. EGGERT (2006)

CHEMICAL COMMUNICATIONS 40, 4201-4203

A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity

Jennifer Andexer, Jan-Karl Guterl, Martina Pohl and Thorsten Eggert*

Received (in Cambridge, UK) 2nd June 2006, Accepted 7th August 2006 First published as an Advance Article on the web 29th August 2006 DOI: 10.1039/b607863j

A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity accepting a wide range of HNL-substrates is presented, which is useful either for enzyme fingerprinting or screening of huge variant libraries generated in metagenome or directed evolution approaches.

Hydroxynitrile lyases (HNLs) naturally occur in plants integrated in microbial and herbivore defense mechanisms by HCN-release due to cyanohydrin cleavage. Some HNLs are biochemically characterized in detail concerning substrate specificity and enantioselectivity. The HNLs from Prunus species, like P. amygdalus (bitter almond)^{1a} and *P. mume* (Japanese apricot)^{1b} as well as the HNL from Linum usitatissimum (flax)^{1c} show (R)- selectivity, whereas the other HNLs from Sorghum bicolor (millet),^{1d} Hevea brasiliensis (para rubber tree)^{le} and Manihot esculenta (cassava)^{lf} show (S)-selectivity towards different cyano-hydrins. Since the reverse reaction is also catalyzed by HNLs, these enzymes are valuable catalysts for the synthesis of cyanohydrins, which are versatile chiral building blocks in the pharmaceutical and agrochemical industries.¹ Apart from their availability, the application of HNLs is often restricted by their substrate range and low stability under technical conditions.

Novel or improved HNLs can be found by screening plants for appropriate enzymes,² by directed evolution, rational design, or by metagenomic approaches.³ However, one major necessity for all these strategies is a simple and powerful high-throughput screening (HTS) assay to identify potential novel or better performing HNLs. So far HNL-activity has usually been determined by GCor HPLC-analysis,^{2a} which is not practical in high-throughput. In addition, a spectrophotometric assay based on HCN-detection using the well-known König reaction^{4,5} has been described. However, this assay was applied in a total reaction volume of 10 mL which is not suitable for high-throughput screening approaches. Furthermore, only acetone cyanohydrin has been used so far as a substrate.⁶ Another spectrophotometric assay for activity towards benzaldehyde cyanohydrin is available, detecting the increase in absorption of the released benzaldehyde at 280 nm wavelength.7 Although this assay is applicable for high-through-put, it is restricted to aromatic substrates only and requires microtiter plate (MTPs) which are transparent in the UV. Furthermore, recently a colony assay, based on NADH-fluores-cence has been developed to detect HNL-activity towards benzaldehyde cyanohydrin.8

Here, we describe an HNL assay in MTP format (200 $\mu L),$ which allows screening in high-throughput using automated

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2006

pipetting workstations. The broad applicability of the assay is demonstrated using different aliphatic and aromatic cyanohydrins (Fig. 1); two of them were achiral, four of them were used as a racemic mixture and furthermore benzaldehyde cyanohydrin was applied as (R)- and (S)-enantiomers to detect the enantioselectivity of recombinant HNL from *Manihot esculenta* (*Me*HNL) which was used as a model.

The assay consists of two parts, first the biotransformation step yielding HCN by cyanohydrin cleavage; subsequently HCN is detected spectrophotometrically at 600 nm wavelength in MTPs (Fig. 1). The crucial parameter in the cyanohydrin cleavage reaction is the pH, because many cyanohydrins decompose at pH > 6.0, whereas on the other hand the enzyme activity and stability



Fig. 1 Schematic overview of the assay system. A: Biotransformation step. The cyanohydrin 1 is enzymatically converted to a carbonyl compound 2 and HCN. Six different cyanohydrins (3: acetaldehyde cyanohydrin, 4: propionaldehyde cyanohydrin, 5: benzaldehyde cyanohydrin, 6: 3-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin, 7: acetone cyanohydrin, 8: cyclohexanone cyanohydrin) were tested with *Me*HNL. B: Cyanidedetermination step (modified according to Markley *et al.*¹²): cyanide anions are oxidized by N-chlorosuccinimide 9 (stabilized with succinimide 10) to cyanide cations, which react with isonicotinic acid 11 forming a dialdehyde 12, which is coupled to two molecules of barbituric acid 13 to form the dye 14 which is measured spectrophotometrically at 600 nm.

Institute of Molecular Enzyme Technology, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich, 52426, Jülich, Germany. E-mail: t.eggert@fz-juelich.de; Fax: +49 (2461) 612490; Tel: +49 (2461) 612939

are significantly impaired at pH < 5.0. Therefore, assaying cyanohydrin cleavage at pH 5.0 to 5.5 is a good compromise.^{6,7}

The assay is sufficiently sensitive to screen HNL-libraries using crude cell extracts. For the purpose of library screening, first the enzymatic reaction using E. coli crude cell extracts containing overexpressed MeHNL is performed, thereby a certain amount of cyanide is liberated from the cyanohydrin substrate. Therefore, 140 µL citrate-phosphate buffer pH 5.0, 10 µL of HNL containing crude cell extracts and 10 µL cyanohydrin solution (final concentration 15 mM) are mixed and incubated at room temperature for 5 min. By addition of 10 µL of mix I (N-chlorosuccinimide 9/succinimide 10) the biotransformation step is stopped,⁹ thereby oxidizing the liberated CN⁻ to CN⁺. After 2 min the colorimetric detection step is started by adding 30µL of mix II (isonicotinic acid 11/barbituric acid 13).¹⁰ Subsequently, the rate of color formation is measured spectrophotometrically over 20 min at 600 nm using a microtiter plate reader. The dye 14 is stable for at least 2 hours. Barbituric acid 13 is applied instead of the alternatively used dye compound 3-methyl-1-phenyl-5-pyrazo-lone in HCN-detection,11,12 because the latter is unsuitable at pH-values below 7.13 Isonicotinic acid is a well suited alternative to the widely used pyridine.⁶

Instead of measuring the spectrophotometric properties of the resulting aldehyde or ketone, the major advantage of this assay is the possibility of analyzing HNL-activity towards virtually any cyanohydrin by detecting the liberated HCN. This makes the assay suitable for a vast substrate screening as well as for detection of new or improved activities in enzyme libraries obtained by rational design or directed evolution. We have used our HTS-assay to determine *Me*HNL-activity towards six different aromatic and aliphatic cyanohydrins. All substrates were converted by *Me*HNL with **5** and **7** being the best substrates. The high selectivity of *Me*HNL towards the (*S*)-enantiomer of benzaldehyde cyanohy-drin **5** is obvious when (*R*)-**5** and (*S*)-**5** are used separately in the assay (Fig. 2).

Furthermore, the assay allows calculation of specific enzymatic activity, since color development in the HCN-detection step is proportional to the amount of cyanide in the solution. Time dependent cyanohydrin conversion was calculated based on a



Fig. 2 Spectrophotometric detection of hydroxynitrile lyase activity. Microtiter plate with different substrates **3–8** (see Fig. 1). Control: autolysis of the respective cyanohydrin (without enzyme). For reactions 10 μ L of *E. coli* crude cell extracts containing over-expressed *Me*HNL were used. Faint blue to purple color represents an increasing amount of cyanide. The application of enantiomerically pure substrates can be used to estimate the enantioselectivity of the biocatalyst as demonstrated in the



Fig. 3 Spectrophotometric detection of acetone cyanohydrin 7 cleavage using different amounts of purified *Me*HNL (––– 50 ng, – Δ – 250 ng). A: The increase in absorbance at 600 nm over 20 min is shown. The amount of liberated cyanide is calculated from the linear part of the curve. Autolysis of the respective cyanohydrin is detected in a control without enzyme (– Δ –) and subtracted from the slope values of the samples. B: Hyperbolic cyanide calibration curve and linearization by double reciprocal presentation.

cyanide standard curve (K₂[Zn(CN)₄]) (Fig. 3A) by correlating the rate of color formation at 600 nm with the cyanide concentration. For this purpose the hyperbolic standard curve was linearized in a double reciprocal diagram (Fig. 3B). For purified *Me*HNL¹⁴ the calculated specific activity for acetone cyanohydrin 7 was 130 \pm 30 U/mg, which is consistent with data from the literature, giving values between 92 U/mg and 260 U/mg¹⁵ depending on the assay conditions. Comparison of the specific activities towards different substrates in Table 1 clearly demonstrates the highest catalytic activity of *Me*HNL towards the natural substrate acetone cyanohydrin. However, it must be taken into account that substrates **3–6** were applied as racemic mixtures containing 50% of the non-favored enantiomer, whereas substrates **7** and **8** are achiral.

Table 1Results of cyanohydrin cleavage catalyzed by MeHNL.Substrates 3-8 (15 mM, see Fig. 1) were incubated with purifiedMeHNL.¹⁴

Substrate	Specific activity [U/mg]
3	1.3 (±0.4)
4	0.4 (±0.2)
5	19.1 (±4.9)
6	0.1 (±0.04)
7	130.0 (±30.0)
8	1.0 (±0.4)

In summary, a novel HCN-based high-throughput screening assay for HNL activity was developed. The assay is useful to detect activity and enantioselectivity of HNLs theoretically towards any cyanohydrin substrate. Limitations might occur in the case of hydrophobic substrates due to poor water solubility. This problem can be overcome by the use of emulsifying agents like gum arabic. As tested, the increased turbidity has no influence on the formation and spectrophotometric detection of the dye (data not shown). Therefore, the assay is useful for both preparing enzyme fingerprints and screening large variant libraries generated in metagenome or directed evolution approaches. The assay is highly sensitive; at least 5 ng of purified MeHNL representing 1 mU of enzyme activity was reliably detectable in the assay. Furthermore, the assay is robust and easy to handle without the necessity of expensive equipment; however, it is possible to automate the test by using pipetting robots in order to increase the sample throughput.

The work was partly supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) in the project "Biokatalytische Hydrocyanierung & Hydroformylierung (BioHydroForm)" and the DFG Graduiertenkolleg 1166 "BioNoCo". The authors thank Julich Chiral Solutions GmbH for providing the hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta, Clariant GmbH for supplying cyanohydrins and Prof. Dr U. Kragl (University of Rostock) for synthesis 11 J. Epstein, Anal. Chem., 1947, 19, 272-274 of enantiomerically pure benzaldehyde cyanohydrin.

Notes and references

1 (a) A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. Poechlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubbolts, H. Schwab and K. Gruber, Angew. Chem., Int. Ed., 2003. 42, 4815-4818; (b) S. Nanda, Y. Kato and Y. Asano, Tetrahedron, 2005, 61, 10908-10916; (c) H. Breithaupt, M. Pohl, W. Bönigk, P. Heim, K. L. Schimz and M. R. Kula, J. Mol. Catal. B: Enzym., 1999, 6, 315-332; (d) H. Lauble, B. Miehlich, S. Förster, H. Wajant and F. Effenberger, Biochemistry, 2002, 41, 12043-12050; (e) M. Hasslacher, C. Kratky, H. Griengl, H. Schwab and S. D. Kohlwein, Proteins: Struct., Funct., Genet., 1997, 27, 438-449; (f) H. Bühler, F. Effenberger,

S.Förster, J.Roos and H.Wajant, ChemBioChem, 2003,4,211-216;(g) H. Griengl, H. Schwab and M. Fechter, Trends Biotechnol., 2000, 18, 252–256; (h) M. Sharma, N. N. Sharma and T. C. Bhalla, *Enzyme Microb. Technol.*,2005,**37**,279–294; (i) F.Effenberger, S.Förster and H. Wajant, Curr. Opin. Biotechnol., 2000, 11, 532-539.

- 2 (a) Y.Asano, K.Tamura, N.Doi, T.Ueatrongchit, A.H.-Kittikun and T. Ohmiya, Biosci., Biotechnol., Biochem., 2005, 69, 2349-2357; (b) A.Hickel, G.Heinrich, H.Schwab and H.Griengl, Biotechnol. Tech., 1997, 11, 55-58
- 3 (a) K.-E.Jaeger, T.Eggert, A.Eipper and M.T.Reetz, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55, 519–530; (b) P.Berglund and S.Park, Curr. Org. Chem., 2005, 9, 325-336; (c) P.Lorenz and J.Eck, Nat. Rev. Microbiol., 2005, 3, 510-516.
- 4 W. König, J. Prakt. Chem., 1904, 69, 105-137.
- 5 A L A Essers Acta Hortic 1994 375, 97-104
- 6 D.Selmar, F.J.Carvalho and E.E.Conn, Anal. Biochem., 1987, 166, 208-211
- 7 M. Bauer, H. Griengl and W. Steiner, Biotechnol. Bioeng., 1999, 62, 20 - 29
- 8 C. Reisinger, F. van Assema, M. Schuermann, Z. Hussain, P. Remler and H. Schwab, J. Mol. Catal. B: Enzym., 2006, 39, 149-155
- 9 (a) M. A. Lischwe and M. T. Sung, J. Biol. Chem., 1977, 252, 4976-4980; (b) Incubation of MeHNL with 5mM N-chlorosuccinimide shows complete inactivation after 10 min.
- 10 Assay solutions: citrate-phosphate buffer: 24.3 mL 0.1 M citric acid, 25.7mL 0.2M K₂HPO₄ and 100mL H₂O;Substrate solution: 300mM cvanohydrin in 0.1 M citric acid. Insoluble substrates were emulsified by adding 20 µg/mL gum arabic; Mix I: 100 mM N-chlorosuccinimide with 10-fold excess of succinimide (w/w); Mix II: 65mM isonicotinic acid, 125 mM barbituric acid in 0.2 M NaOH.
- 12 B. Markley, C.E. Meloan, J.L. Lambert and Y.C. Chiang, Anal. Lett., 1987, 20, 1225-1236.
- 13 J.H. Bradbury, M.G. Bradbury and S.V. Egan, Acta Hortic., 1994, 537, 87-96
- 14 Enriched MeHNL solution (provided by Julich Chiral Solutions GmbH) was further purified by anion exchange chromatography on a Q-sepharose FF column at pH 5.7 using a modified protocol from S.Förster, J.Roos, F.Effenberger, H.Wajant and A.Sprauer, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1996, 35, 437-438.
- 15 (a) H. Wajant, S. Förster, H. Böttinger, F. Effenberger and K.Pfizenmaier, Plant Sci., 1995, 108, 1-11; (b) J.Hughes, J.H.Lakey and M. A. Hughes, Biotechnol. Bioeng., 1997, 53, 332-338.





J. ANDEXER, J. VON LANGERMANN, A. MELL, M. BOCOLA, U.KRAGL, T. EGGERT UND M. POHL (2007)

ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION 46, 8679-8681

An *R*-Selective Hydroxynitrile Lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -Hydrolase Fold**

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

Hydroxynitrile lyases (HNLs) catalyze the stereoselective formation of C-C bonds between HCN and aldehydes or ketones vielding chiral cyanohydrins, which are versatile building blocks for the pharmaceutical and agrochemical industries.^[1] Among the most important cyanohdrins are chiral α -hydroxy acids such as substituted mandelic acids,^[1e,f, 2a] *m*-phenoxybenzaldehyde derivatives,^[2c] and structures with additional aliphatic linkers between the aldehyde moiety and aromatic ring which are useful for the synthesis of "prils".^[2d] In nature HNLs catalyze the cleavage of cyanohy- drins, known as cyanogenesis. The currently known HNLs can be divided into two groups : R-selective enzymes evolved from oxidoreductase ancestors, such as HNLs from various Rosaceae^[2] and from Linum usitatissimum,^[3a] and S-selective enzymes derived from hydrolases with an α/β -hydrolase fold; these encompassing the enzymes from Hevea brasiliensis (HbHNL),^[3b] Manihot esculenta (MeHNL),^[3c] and Sorghum bicolor (SbHNL).^[3d] Here we present the first exception to this accepted rule with the first *R*-selective HNL containing an α/β -hydrolase fold from the noncyanogenic plant Arabidopsis thaliana (mouseear cress).

Owing to the growing demand for chiral compounds like cyanohydrins there is a strong motivation to identify new stereoselective HNLs with a broad substrate range which can

[*]	J. von Langermann, A. Mell, Prof. Dr. U. Kragl Institute of Chemistry, University of Rostock Albert-Einstein-Strasse 3a, 18059 Rostock (Germany) 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 DDsseldorf (Germany) E-mail: t.eggert@evocatal.com
	Homepage: www.evocatal.com J. Andexer, Dr. M. Pohl Institute of Molecular Enzyme Technology Heinrich-Heine University of Düsseldorf 52426 Jülich (Germany) Fax: (+49)2461-612-940 E-mail: ma.pohl@fz-juelich.de Homepage: www.iet.uni-duesseldorf.de
	Dr. M. Bocola University of Regensburg Department of Physical Biochemistry 2 UniversitOtsstrasse 31, 93053 Regensburg (Germany)
[**]	The authors thank the group of Ute Höcker (University of Düsseldorf, Botanik IV) for providing <i>Arabidopsis</i> cDNA and

mRNA.

under http://www.angewandte.org or from the author.

be easily and economically produced. These demands are fulfilled by the currently available *S*-selective enzymes *Hb*HNL and *Me*HNL: they can be expressed in bacterial hosts like *Escherichia coli* and accept a broad range of aromatic and aliphatic aldehydes as well as ketones.^[4] A similar broad substrate range has been reported for the *R*selective HNLs isolated from some *Prunus* species (*P. amygdalus* (*Pa*HNL) and *P. mume* (*Pm*HNL)). These biocatalysts are either used as defatted seed meals or, in the case of *Pa*HNL (isoenzyme 5), are expressed in the yeast *Pichia pastoris*.^[2a,e]

Recently, several approaches were reported to identify new HNLs for biocatalytic processes by screening different cyanogenic plant extracts for HNL activity, yielding some new enzyme sources.^[5] Attempts to identify new enzymes based on sequence similarities to known HNLs have not yet been successful.^[6,7]

Several sequences similar to *Me*HNL and *Hb*HNL are found in the genome of the noncyanogenic model plant *Arabidopsis thaliana*.^[7] In the course of our studies on structure–function relationships of a/b-hydrolases we cloned several genes encoding *Arabidopsis* proteins with high sequence similarity to *Me*HNL and *Hb*HNL and expressed them in *E. coli*. Unexpectedly, one of them (gene bank entry: AAN13041) shows high activity towards mandelonitrile and catalyzes also the cleavage of some other cyanohydrins derived from cyclohexanone and *m*-phenoxybenzaldehyde, while acetaldehyde, propionaldehyde, and acetone cyanohydrin are poor substrates.^[8]

A subsequent investigation of the cyanohydrin-forming activity revealed that the new enzyme is highly R-selective with a broad substrate range including various aromatic and aliphatic aldehydes as well as ketones, which are converted to R-cyanohydrins with good to excellent yields and mainly excellent enantioselectivities (Table 1).^[9] As can be seen, a whole range of substituted benzaldehydes are converted with excellent activity and enantioselectivity. There was no optimization of the reaction time, but substrates such as 3, 4, and 6, which react even in the absence of the enzyme, gave products with 99% ee indicating a high enzymatic activity towards these substrates. To obtain complete conversion of substrates with the more bulky substituents the reaction time had to be increased slightly. It should be also noted that the reaction was performed at pH 5. Lowering the pH could of course suppress the nonenzymatic reaction even further. But even at pH 5 the ee obtained is higher for o-chlorobenzaldehyde cyanohydrin than that in earlier studies with optimized PaHNL^[2a] or with the wild-type enzyme.^[10] Subsequent hydrolysis yields (R)-o-chloromandelic acid, which is a key



Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 1-4
Substrate		<i>t</i> [h]	X _{en7} ^[b] [%]	ee (R) [%]	Xnenz ^[b] [%]
<u> </u>			CIIZ L''J		iieliz t
R=H	1	2	>99	> 99	14
R=o-F	2	2	>99	99	17
R=o-Cl	3	2	>99	99	26
R = o - Br	4	6	99	98	42
R = 0 - I P = m F	5	3	>99	> 95	20
R = m - Cl	7	2	~ 99 QQ	> 99	7
R = m - Br	8	6	99	2 00 95	9
R= <i>m</i> -I	9	6	98	93	5
R=m-PhO	10	22	83	>95	0
R=p-F	11	2	>99	>99	7
R=p-Cl	12	2	>99	>99	4
R = p - Br	13	3	99	>99	4
R = p - l - p - l - p - p - l - p - p - p -	14	6	99	92	1
R = p - OH - R = n - OH - R =	15	ა 22	90 87	97 68	3 14
	17	22	97	96	97
U I			01	00	01
	18	22	99	68	97
(j)_o	19	6	68	n.d. ^[c]	6
\sim	20	6	99	98	78
	21	22	56	> 95	0
\sim	22	3	53	n.d. ^[c]	0
Land L	23	22	0	-	0
	24	6	48	95	2
~~~~Ľ	25	22	2	-	0
<>>=0	26	3	94	_[d]	76
	27	22	7	n.d.	0
	28	22	8	95	0
ĭ	29	3	1	_	0

[a] All conversions were performed in a two-phase system; conversion (*X*) and enantiomeric excess (ee) were determined by gas chromatography.^[9] n.d. = not determined. [b] enz: enzymatic; nenz: nonenzymatic.
 [c] Separation of enantiomers by the Chiraldex capillary GC column (G-PN-g-cyclodextrin, propionyl) was not possible. [d] Achiral product.

intermediate for the antithrombotic agent clopidogrel (30). The cyanohydrin of 18 can be transferred to the corresponding  $\alpha$ -hydroxyester, which is a building block of ACE inhibitors such as enalapril (31; Scheme 1).

The reaction of substrate 18 is somewhat less selective than that of 17, indicating that the enzymatic reaction is slower and therefore the reaction conditions, primarily the pH, must be fine-tuned. Also an increasing chain length of the aliphatic aldehydes reduces the activity but not the stereose-



Scheme 1. AtHNL-catalyzed synthesis of chiral cyanohydrins and examples of compounds obtained after subsequent reactions.

lectivity. In comparison, the enzyme is less active towards aliphatic and aromatic ketones.

In order to rationalize similarities and differences concerning the reaction mechanism and stereoselectivity of *At*HNL relative to the structurally similar, but S-selective *Hb*HNL and *Me*HNL, a homology model was created, based on the crystal structures of *Hb*HNL.^[9,11] A comparison of both structures suggests a typical catalytic triad consisting of Ser 81, Asp 208, and His 236 also in *At*HNL (Figure 1).



*Figure 1*. Overlay of the crystal structure of *Hb*HNL (dark gray, thin lines)^[11] and the structural model of *At*HNL (light gray, thick rods). The catalytic triad (Ser/His/Asp) and the residues in contact with bound mandelonitrile are shown: (*R*)-mandelonitrile in the *At*HNL model and (*S*)-mandelonitrile in the crystal structure of *Hb*HNL (1YB8). *At*HNL reveals a specific binding pocket for (*R*)-mandelonitrile between Leu 129 and Ala 13 which is blocked by Trp 128 and Ile 12 in *Hb*HNL.

These residues were exchanged by nonfunctional, but sterically similar residues using site-directed mutagenesis, and the resulting variants (Ser81Ala, Asp208Asn, His236Phe) showed drastically impaired catalytic activity (<2%), supporting their catalytically important function.^[9] A further catalytically important residue (Lys236), which has been identified in *Hb*HNL,^[11a] is replaced by Met237 in *At*HNL.

To analyze the differences in stereoselectivity a structural model of AtHNL with (R)-mandelonitrile bound to the active

site was created based on the structure of *Hb*HNL containing (*S*)-mandelonitrile.^[9,11] In comparison to *Hb*HNL, two side chains of the potential substrate-binding pocket in *At*HNL are exchanged. These are Trp 128 and Cys13 in *Hb*HNL, which are replaced by Leu129 and Tyr14, respectively, in *At*HNL (Figure 1). The strict *S*-selectivity of *Hb*HNL can be understood from the constructed model, since Trp128 and Ile 12 sterically hinder the binding of (*R*)-mandelonitrile. On the other hand, it can be expected that the aromatic side chains of Tyr14 and Phe 82 might stabilize (*R*)-mandelonitrile in the binding pocket of *At*HNL.

In first experiments with an AtHNL variant (Tyr14Cys) still exclusively (*R*)-mandelonitrile was produced, suggesting that a single exchange is not sufficient to alter the stereoselectivity of AtHNL. Studies on a double mutant (Tyr14Cys/ Leu129Trp) and the crystal structure of the enzyme are in progress. The homology model is not yet accurate enough to explain the differences in activity or substrate selectivity as discussed before.

We have described a novel *R*-specific HNL (E.C. 4.2.1.–) from *Arabidopsis thaliana* and its application in biocatalytic processes. The enzyme is a good alternative to currently known *R*-selective HNLs, such as *Pa*HNL,^[2e] for the production of *R*-cyanohydrins as it is readily available in technically relevant amounts by overexpression in *E. coli*. Its broad substrate range includes aliphatic and aromatic aldehydes as well as ketones.^[14] As the first *R*-specific HNL based on an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold, its structure will provide valuable information concerning the enzyme mechanism of  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold based HNLs.

Received: April 4, 2007 Revised: May 20, 2007 Published online: ◆◆ ◆◆, 2007

Keywords: cyanohydrins · enzyme catalysis · genetic engineering · hydroxynitrile lyases · oxynitrilases

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, *a-Hydroxy Acids in Enantioselective Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.

- [2] a) A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. PHchlauer, 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) *Pa*HNL is cofactor dependent and requires posttranslational modifications, such as formation of a disulfide bond and glycosylations.
- [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. Pfizenmaier, *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. Wyspi, B. Misteli, M. Hasslacher, A. Jandrositz, S. D. Kohlwein, H. Schwab, R. Dudler, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 32.
- [8] Mandelonitrile cleavage was measured according to Bauer et al.^[12] cleavage of other cyanohydrins was detected with an HCN-based assay system.^[13]
- [9] For experimental details see the Supporting Information.
- [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 and its application have been filed for patent (J. Andexer, T. Eggert, evocatal GmbH, German patent application DE 10 2006 058 373.6, 2006).

## UNEVEN TWINS: COMPARISON OF TWO ENANTIO COMPLEMENTARY HYDROXYNITRILE-LYASES WITH

## $\alpha/\beta$ -hydrolase fold



J. K. Guterl, J. N. Andexer, T. Sehl, J. von Langermann, I. Frindi-Wosch, T. Rosenkranz, J. Fitter, K. Gruber, U. Kragl, T. Eggert und M. Pohl (2008)

EINGEREICHT BEI JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

#### Uneven Twins: Comparison of two enantiocomplementary Hydroxynitrile

#### Lyases with $\alpha/\beta$ -Hydrolase Fold

Jan-Karl Guter^{1,*}, Jennifer N. Andexer^{1,*}, Torsten Sehl¹, Jan von Langermann², Ilona Frindi-Wosch¹, Tobias Rosenkranz³, Jörg Fitter³, Karl Gruber⁴, Udo Kragl², Thorsten Eggert⁵, Martina Pohl¹

Hydroxynitrile Iyases (HNLs) are applied in technical processes for the synthesis of chiral cyanohydrins. Here we describe the thorough characterization of the recently discovered *R*-hydroxynitrile Iyase from *Arabidopsis thaliana* and its *S*-selective counterpart from *Manihot esculenta* (*M*eHNL) concerning their properties relevant for technical applications. The results are compared to available data of the structurally related *S*-HNL from *Hevea brasiliensis* (*Hb*HNL), which is frequently applied in technical processes. Whereas substrate ranges are highly similar for all three enzymes, the stability of *M*eHNL with respect to higher temperature and low pH-values is superior to the other HNLs with  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold. This enhanced stability is supposed to be due to the ability of *M*eHNL to form tetramers in solution, while *Hb*HNL and *At*HNL are dimers. The different inactivation pathways, deduced by means of circular dichroism, tryptophan fluorescence and static light scattering further support these results. Our data suggest different possibilities to stabilize *M*eHNL and *At*HNL is stabilized by addition of polyols. In addition, the molecular reason for the inhibition of *M*eHNL and *Hb*HNL by acetate could be elucidated, whereas no such inhibition was observed with *At*HNL.

#### Keywords:

asymmetric carboligation; cyanohydrins; enzyme catalysis; enzyme stability; oxynitrilase

#### Introduction

Hydroxynitrile lyases (HNL, EC 4.1.2.X) catalyze the cleavage of cyanohydrins into a carbonyl compound and HCN, which represents the second step in cyanogenesis and acts as a plant defence mechanism against microbial and herbivore attack. The reverse reaction is used in biotechnological processes for the production of chiral cyanohydrins, which are versatile chiral building blocks in pharmaceutical and agrochemical industry (Fechter and Griengl, 2004, Purkarthofer et al., 2007, Sharma et al., 2005).

¹Institute of Molecular Enzyme Technology, Heinrich-Heine University Duesseldorf, Juelich Forschungszentrum, D-52426 Juelich, Germany

²Department of Chemistry, University of Rostock, Albert-Einstein-Str. 3a, D-18059 Rostock, Germany

³Institute of Neurosciences and Biophysics (INB-2), Juelich Forschungszentrum, D-52425 Juelich, Germany

⁴Institute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University Graz, Humboldtstr. 50/3, A-8010 Graz, Austria

⁵evocatal GmbH, Merowingerplatz 1a, D-40225 Duesseldorf, Germany

*These authors contributed equally to this article

#### Correspondence:

PD Dr. Martina Pohl Institute of Molecular Enzyme Technology, Heinrich-Heine University Düsseldorf Jülich Forschungszentrum D-52426 Jülich, Germany Fax: (+) 49 2461 61 2490 Email: ma.pohl@fz-juelich.de www.iet.uni-duesseldorf.de

The availability of several *R*- and *S*-selective enzymes allows the production of a broad range of chiral cyanohydrins. The most frequently used enzymes in technical processes are the *R*-HNL from *Prunus amygdalus* (bitter almond) (Glieder et al., 2003) and the S-HNLs from *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) (Hasslacher et al., 1996b, Purkarthofer et al., 2007). Besides, the S-HNL from *Manihot esculenta* (cassava) (Hughes et al., 1994) is also used in few technical applications (Daussmann et al., 2006)

HNLs are a well known example for convergent enzyme evolution, generating a common enzymatic activity in different structural frame works. Until recently it was assumed that *R*-selective enzymes derived from oxidoreductase precursors, are whereas S-selective enzymes belong to the structural class of  $\alpha/\beta$ -hydrolases (Ollis et al., 1992). The first exception from this rule was recently discovered with a new HNL (AtHNL) in Arabidopsis thaliana (mouse-ear cress) (Andexer et al., 2007), which contains several genes with high sequence similarity to HNLs with an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold derived from Hevea brasiliensis (HbHNL) and Manihot esculenta (MeHNL) (Wäspi et al., 1998). One of these gene products (AtHNL) shows pronounced HNL-activity with respect to the cleavage and formation of chiral cyanohydrins (Andexer et al., 2007). Despite the striking sequence similarity of 45% identical and 68% similar amino acid residues relative to the Sselective HbHNL and MeHNL, AtHNL is strictly Rselective. The putative active site residues serine-81, aspartate-208 and histidine-236 forming the catalytic triad were confirmed by site-directed mutagenesis (Andexer et al., 2007) and preliminary results regarding the crystal structure (unpublished results) additionally prove that AtHNL belongs to the family of  $\alpha/\beta$ -hydrolases.

Beside the substrate range of the synthesis reaction, which was extensively described for PaHNL (Dreveny et al., 2002, Weis et al., 2004) as well as for all three  $\alpha/\beta$ -hydrolase enzymes (Schmidt et al., 1996, Andexer et al., 2007, Förster et al., 1996), a detailed knowledge about the catalysts' stability and inactivating parameters is important. Such data are a prerequisite to design optimal reaction conditions for technical applications or to overcome limitations by mutagenesis, as was demonstrated for the most widely used HNLs from Prunus amygdalus and Hevea brasiliensis (Hickel et al., 1997, Glieder et al., 2003). In contrast to this, only few and incomplete data are available for the HNL from Manihot esculenta, whereas such data are complete missing for AtHNL. To fill this gap, these enzymes were comparatively characterized concerning parameters relevant for application, such as substrate range, kinetic behaviour, influences of different buffer salts, pH and temperature on stability and activity. Emphasis was laid on the stability and inactivation mechanisms at low pH, as the enzymatic production of most cyanohydrins requires low pH-values and temperatures below 10°C to keep the products stable (Cholod, 1993) and to suppress the unselective chemical side reaction (Bühler et al., 2003, Kragl et al., 1990, Niedermeyer and Kula, 1990, Willeman et al., 2000).

#### Materials and methods

**Preparation of Arabidopsis cDNA:** cDNA was prepared from mRNA from *Arabidopsis* seedlings (kindly provided by the institute for botany IV, University of Düsseldorf) with the "RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas).

Cloning of AtHNL and MeHNL: The genes of interest were amplified from cDNA (AtHNL) respective an existing construct (MeHNL) by PCR with specific (AtHNL: 5': TATACCATGGAGAGprimers GAAACATCACTTCGTGTTAGTTCACA, 3': TA-TACTCGAGTTAC ATATAATCGGTGGCAATAG-MeHNL: CAGAGAG: 5': ATATTCTA-GAAATAATTTTG TTTAACTTTAAGAAGGAGATA-TACCATGGTAACTGCACATTTTTT, 3': ATATC-GTTATCAAGCATAAGCATCAGC) TCGA and cloned into pET28a (Novagen) vectors. PCRs were performed according to a standard protocol using with either Turbo Pfu Polymerase (Stratagene) or Phusion Polymerase (Finnzymes). Amplified genes were restricted with respective restriction endonucleases (Fermentas) and ligated with the equally restricted vectors (T4 DNA ligase, Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Genes were sequenced (Sequiserve, Vaterstetten) prior to transformation of competent E. coli BL21(DE3) cells via electroporation.

**Expression:** An over-night culture (LB-medium + kanamycine (50µg/mL) (pET28a) or ampicilline (100 µg/mL) (pET22b)) was inoculated with a single colony and incubated for 16 h at 37°C. The main culture was inoculated with the overnight culture (1:20) and induced with IPTG (0.4 mM) when an optical density at 580 nm of 0.6 was reached. After 20 h growth at 25°C, 150 rpm, cells were harvested and stored at -20°C. Expression was checked by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. For separation of soluble and insoluble proteins, cells were lysated by ultrasonification and centrifuged for 20 min at

14,000 rpm. To obtain larger amounts of cells, BL21(DE3)_pAtHNL and BL21(DE3)_pMeHNL were fermented using a standard fed-batch fermentation protocol (Korz et al., 1995). From a 15 L fermentation 1.95 kg (MeHNL) and 1.75 kg (AtHNL) cell were harvested, respectively, containing a total activity of 2 GU (MeHNL) and 2 GU (AtHNL), respectively (measured with crude cell extracts using the mandelonitrile cleavage assay).

#### Purification of recombinant proteins:

AtHNL: 20 g BL21(DE) pAtHNL cells were resuspended in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6) and lysated by ultrasonification (4 x 5 min at 70 W/cm² on ice with an ultrasonic processor UP200S and a sonotrode S14D (Dr. Hielscher GmbH)). After centrifugation (35,000 g, 4°C, 45 min), the resulting crude extract (ca. 30 ml) was desalted on Sephadex G-25 (1L bed volume, potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6)). Subsequently, anion exchange chromatography on Q-Sepharose (column: 25 ml bed volume) was performed, which was equilibrated with potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6; buffer A). After elution of non-bound proteins, AtHNL containing fractions were eluted with a linear NaCl gradient in the same buffer (buffer B: buffer A + 1 M NaCI). AtHNL-containing fractions eluted with a NaCl concentration of 150 mM. Combined fractions with HNL-activity were desalted on a Sephadex G-25 column (1L bed volume, potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6)) and subsequently lyophilized or concentrated by pressure dialysis with a Diaflo YM10 filter (Amicon) to a final protein concentration of 10 mg/ml. Protein determination was performed according to Bradford (Bradford, 1976). Purified AtHNL (90% purity) exhibits a specific activity of 70-90 U/mg toward mandelonitrile.

MeHNL: 10 g BL21(DE3) pMeHNL cells were resuspended in potassium phosphate buffer (40 mL, 10 mM, pH 7.5), and treated as described for AtHNL. For desalting of the crude cell extract potassium phosphate (10 mM, pH 7.5) was used. Fractions with HNL activity were loaded on a Q-Sepharose anion-exchange column (bed volume 27 ml) (Amersham Biosciences), which was equilibrated with potassium phosphate (10 mM, pH 7.5). MeHNL was eluted with a potassium phosphate gradient (10 - 50 mM, pH 7.5). One fraction of the active peak, eluted at 50 mM potassium phosphate, was lyophilized and stored at -20°C. The residual part was concentrated by pressure dialysis with a Diaflo YM10 filter (Amicon) to a final protein concentration of 7 mg/ml. The purified protein (95% purity) has a specific activity of ca. 40-60 U/mg towards mandelonitrile.

#### Assays for hydroxynitrile lyase activity

**Cleavage of mandelonitrile in aqueous medium:** The increase of the benzaldehyde concentration was measured continuously at 280 nm in quartz glass cuvettes following a published protocol (Hanefeld et al., 2001). In brief: citrate phosphate buffer (700  $\mu$ l) (100 mL contain: 24.3 mL 0.1 M citric acid, 0.2 M K₂HPO₄, ad. 100 mL deionized water, final pH 5.0) is mixed with the enzyme solution (100  $\mu$ l) in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6). The reaction was started by addition of the mandelonitrile solution (200  $\mu$ l; 67 mM mandelonitrile in citrate phosphate buffer, pH 3.5) and monitored for 1 min. Subsequently, the activity was calculated using the molar extinction coefficient of benzaldehyde  $(1,376 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ .

1 unit of HNL activity is defined as the amount of enzyme which converts 1 µmol mandelonitrile per minute in citrate phosphate buffer, pH 5, 25°C. All measurements were performed with a minimum of triplicates; blanks with all components except HNL were always determined twice. To determine kinetic parameters it was necessary to increase the amount of substrate in the assay to > 15 mM. To achieve this, the assay composition was changed as follows: citrate phosphate buffer (100 µl, pH 5), enzyme solution (100 µl), mandelonitrile solution (different mandelonitrile concentrations, 800 µl); with this setup substrate concentrations up to 53 mM are possible. Data from kinetic measurements were fitted using the program ORIGIN 7G (OriginLab Corporation), for both cleavage reactions and MeHNL-catalyzed formation of mandelonitrile the standard Michaelis-Menten equation was used. In contrast, the AtHNL-catalyzed synthesis of mandelonitrile was fitted with a formula including substrate surplus inhibition and cooperativity:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]^h}{K_S^h + S^h + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)^h}$$

V: velocity (U) Vmax: maximal velocity (U) [S]: substrate concentration (mM) KS: equilibrium constant h: Hill coefficient K_i: inhibition constant

**Cleavage of further cyanohydrins:** The substrate range for the cleavage reaction was investigated using a microtiter plate assay based on the detection of HCN (Andexer et al., 2006). Commercial available cyanohydrins (acetone cyanohydrin, lactonitrile, cyclohexanone cyanohydrin, *m*-phenyoxybenzaldehyde cyanohydrin, propionaldehyde cyanohydrin) were employed as substrates, which were in some cases (e.g. acetone cyanohydrin) of technical grade quality and contained varying amounts of the corresponding carbonyl compounds.

Synthesis reaction: Preparation of HCN: The required amount of HCN was freshly distilled in a well ventilated hood. Sodium cyanide (4 g) was dissolved in deionized water (10 mL) and sulphuric acid (5 M, 10 mL) was added drop wise within 2 minutes. Afterwards the reaction mixture was heated up to 75°C and formed HCN was trapped and stored at 5°C. For the removal of water traces a spatula tip of sodium sulphate was added. All waste solutions were collected and disposed. An electrochemical HCN-detector (Micro III G203, GfG-Gesellschaft für Gerätebau mbH, Dortmund, Germany) was placed into the hood for continuous monitoring. All stock solutions (enzyme, benzaldehyde and hydrogen cyanide) were prepared with citrate buffer (50 mM, pH 4.0) (for MeHNL) or citrate phosphate buffer (50 mM pH 5.0) (for AtHNL), which were optimal for the corresponding enzyme. All solutions were stored at 0°C. The stock solution of hydrogen cyanide was prepared directly before the measurements. The enzymatic assay was performed with an UV/VIS-spectrometer (Specord 200, analytik jena, Jena, Germany), which was equipped with an external thermostatization (25°C). The benzaldehyde solution was pre-warmed to 25°C directly before the measurement. After addition of the hydrogen cyanide (700 mM) and the enzyme stock solution, the decrease of the extinction at 280 nm was followed for 2 min. For concentrations up to 15 mM benzaldehyde 1 mm quartz cuvettes and above 15 mM benzaldehyde 0.2 mm quartz cuvettes were used. The non-enzymatic reaction was measured individually and subtracted. All measurements were done in triplicates and averaged. Standard deviations were always less than 5%.

**Determination of the temperature and pHdependent initial rate activities:** Temperature and pH-dependent initial rate activities were determined with the mandelonitrile cleavage assay. All measurements were performed in triplicates. Blanks for each variation (pH and T) were measured in duplicates with buffer instead of enzyme. The rate of this non-enzymatic reaction increased continuously with pH. Measurements above pH 7 were not possible due to the fast decomposition of mandelonitrile in the absence of enzyme.

Determination of the temperature and pHdependent stability: Stock solutions (1 mg/ml) of the lyophilized enzyme were prepared in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6). Stock solutions were diluted 1:10 with the corresponding incubation buffers, which were incubated at different temperatures (in potassium phosphate buffer) or at different pH-values using citrate phosphate buffer. Temperature and pH were checked prior and after the start of incubation. Aliquots were removed in defined intervals and subjected to the standard assay (mandelonitrile cleavage, pH 5); For each sample, the soluble protein concentration was determined according to Bradford (Bradford, 1976) after a centrifugation step (13,000 rpm, 3 min in a table-top centrifuge). Activation energies were calculated from the linear part of temperature dependent initial rate activities using the Arrhenius equation.

**Isoelectric focusing:** Isoelectric points were determined with Novex® isoelectric focusing gels (pH 3.5 – 10.5) from Invitrogen according to the supplier's instructions.

For *At*HNL and *Me*HNL equal isoelectric points at pH 5.3 were determined.

Circular dichroism measurements: The CD spectra of MeHNL and AtHNL were recorded with a Jasco Spectropolarimeter J-810 with a scan speed of 50 nm min⁻¹. Protein concentrations were adjusted to 0.1 mg ml⁻¹ for both enzymes. Spectra were recorded between 210 and 280 nm using a quartz cell with 2 mm pathway (Hellma, Germany), averaged over two scans and corrected for the buffer signal. Data analysis was performed with the Spectra Manager program (Jasco). For the determination of the thermal transition temperature the temperature of the protein samples was increased every 5 min in 5°C-steps from 25°C at the beginning of the experiment to 90°C and the loss of  $\alpha$ -helical structure was observed at 222 nm. The thermal transition temperature was estimated by plotting the relative ellipticity of the samples at 222 nm against the temperature using a Boltzmann-function to fit the experimental data. To determine structural changes of both proteins upon incubation at different pH-values, spectra were recorded over a period from 60 to 300 min and the loss of  $\alpha$ -helical structure was observed at 222 nm. Due to strong absolute absorption the CD signal is erroneous below 210 nm possible changes of  $\beta$ -sheets or random coils were not visible under the conditions applied.

Fluorescence spectroscopy: Tryptophan fluorescence was measured using a RF-1501 fluorospectrometer (Shimadzu, Duisburg, Germany). For the attenuation of the exciting beam an UG1 filter (Schott, Mainz, Germany) was applied. During the measurements the temperature was controlled (25°C) using an external thermal element (F25, Julabo, Seelbach, Germany). The excitation wavelength was 295 nm; emission spectra were recorded between 305 and 450 nm applying a bandwidth of 10 nm in both cases. Measurements were performed using quartz cells with an optical path length of 1 cm (Hellma, Germany). The resulting fluorescence spectra were corrected for the respective buffer signals. The concentration of the enzymes was adjusted to 0.1 mg ml⁻¹ for both proteins. Data analysis was performed using ORIGIN Software.

*Light scattering:* To estimate the degree of enzyme aggregation an RF-1501 fluorospectrometer (Shimadzu, Duisburg, Germany) was employed to measure the elastic scattering at 500 nm. For this purpose the same experimental setup was used as for the fluorescence measurement with the exception of the UG1 filter element.

#### **Results and Discussion**

#### Substrate ranges and kinetic parameters

Since the substrate range of the cleavage reaction of MeHNL has only partially been investigated (Hughes et al., 1994, Bühler et al., 2003), a qualitative comparison of the enzymes' substrate ranges concerning the cleavage reaction of various commercially available cyanohydrins was carried out employing an HCN-based microtiter plate assay (Andexer et al., 2006). The substrate ranges of MeHNL and AtHNL are almost equal concerning cyclic and aromatic cyanohydrins (mandelonitrile and cyclohexanone cyanohydrin), which are transformed with moderate to high activities in both cases. Compounds with sterically more demanding substituents like m-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin and *p*-hydroxymandelonitrile are converted with lower activity (Bühler et al., 2003). Besides, aliphatic cyanohydrins, such as lactonitrile and propionaldehyde cyanohydrin are only poor substrates for both enzymes under the conditions tested. The most striking difference is the low activity of AtHNL toward acetone cyanohydrin, the natural substrate of MeHNL, which is discussed below.

Concerning the formation of cyanohydrines both HNLs accept a broad range of substituted benzaldehydes, also with sterically demanding substituents, heterocyclic substrates, as well as aliphatic aldehydes and aromatic and aliphatic methyl ketones and show good performance in aqueous/organic two-phase systems with diisopropyl ether as the organic phase (Andexer et al., 2007, Bühler et al., 2003, Förster et al., 1996).

In order to gain deeper insight into the kinetic behaviour of both enzymes, kinetic parameters have been determined exemplarily for the cleavage as well as for the synthesis of mandelonitrile (Tab. 1, Fig. S1, Additional Material). Concerning the cleavage of mandelonitrile hyperbolic v/[S]-plots were obtained in both cases in citrate phosphate buffer with K_M-values in the same range. V_{max} values for the mandelonitrile cleavage were determined with 70-90 U/mg for *At*HNL and 40-60 U/mg for *Me*HNL; for *Hb*HNL and *Me*HNL similar kinetic parameters were described (Yan et al., 2003, Bauer et al., 1999).

Table 1. Kinetic parameters for MeHNL and AtHNL,
measured in the standard assay (s. Methods).

	MeHNL	AtHNL
Cleavage		
V _{max} [U/mg]	50 (± 10)	80 (± 10)
K _m [mM]	4.1 (± 0.7)	1.4 (± 0.3)
Synthesis		
V _{max} [U/mg]	17.5 (± 1.4)	15.3 (± 1.9)
K _m (BA) [mM]	5.9 (± 1.5)	6.0 (± 0.6)
K _m (HCN) [mM]	179 (+ 29)	n.d.

Note: Cleavage experiments were performed with racemic mandelonitrile

In contrast, remarkable differences of the v/[S]-plots for the formation of mandelonitrile have been observed. While *Me*HNL shows a hyperbolic curve, the curve of *At*HNL is sigmoidal at low substrate concentrations and decreases in the presence of higher substrate concentrations, suggesting cooperativity and surplus inhibition by benzaldehyde (Fig. S1B, Additional Material). However, kinetic parameters obtained for the synthesis reaction are again almost similar. These results demonstrate that *At*HNL is a fully active HNL despite its origin from a noncyanogenic plant.

## Influence of the temperature on activity and stability

Temperature-dependent stability and activity are important key factors for process development as well as for evaluation of general structural stability of enzymes.

As demonstrated in Fig. 1A, the specific activity of AtHNL is 10-20% higher compared to MeHNL at  $\leq$  30°C. While the initial rate activity of MeHNL increases up to 60°C, the highest activity of AtHNL is already achieved at 35°C. Consequently, the activation energy for the cleavage of mandelonitrile of AtHNL (15 kJ mol⁻¹) is significantly lower compared to MeHNL (24 kJ mol⁻¹).

Temperature stability was followed for up to 7 days in the range of 0-60°C. While both enzymes are stable in the range of 0-20°C, differences in stability are obvious at 37°C, were AtHNL shows only 10% (6.6 h) of the half-life time of MeHNL (Tab. 2). Similar low half-life times (4–11 h) at 40°C were reported for HbHNL (Bauer et al., 1997). At 50°C a rapid inactivation is observed with both enzymes under investigation. To investigate the inactivation mechanisms, residual activities were followed parallel to the soluble protein concentrations, demonstrating a concomitant decrease of both parameters (data not shown). The results suggest that the inactivation of both enzymes is caused by (partial) unfolding and aggregation at higher temperatures, which leads to exposure of e.g. buried hydrophobic residues causing aggregation (Volkin and Middaugh, 1992). To further support these results, temperature dependent unfolding of both HNLs was examined by circular dichroism (CD) spectroscopy (Fig. 1B) yielding thermal transition temperatures of  $69.3 \pm 0.47^{\circ}$ C for *M*eHNL and 57.0  $\pm$  0.22°C for *At*HNL, which demonstrates the significantly higher thermostability of *M*eHNL.

**Table 2.** Half-life times (h) of *M*eHNL and *At*HNL deduced from stability measurements performed at different temperatures over 2-4 d. The enzymes were incubated in potassium phosphate buffer (10 mM, pH 6.0), residual activities were determined using the mandelonitrile cleavage assay.

Tomporaturo [°C]	<i>M</i> eHNL τ1/2	<i>At</i> HNL τ1/2
	[h]	[h]
0	>96 [a]	>96 [a]
4	>96 [a]	>96 [a]
10	>96 [a]	>96 [a]
20	>96 [a]	80
30	>48 [a]	33
37	64	6.6
50	2.7	0.3
60	0.5	<0.16

[a] Half-life time was not exceeded within the given time

period.



**Figure 1: Influence of temperature. A:** Initial rate activities for *Me*HNL ( $\diamond$ ) and *At*HNL ( $\diamond$ ) at different temperatures. Activities refer to the cleavage of mandelonitrile. **B:** Determination of thermal transition temperatures of *Me*HNL ( $\diamond$ , —) and *At*HNL ( $\diamond$ , ---), following the loss of  $\alpha$ helical structure with CD-spectroscopy (222 nm). Temperature was increased in 5°C steps every 5 min, relative unfolding was derived from ellipticity values at 222 nm. For experimental details see Materials and methods.

#### **Buffer effects**

Since buffers may have a severe impact on the activity and stability of enzymes, the influences of four buffer salts (citrate phosphate, potassium phosphate, glutamate and acetate buffer) were studied at pH 5. As indicated in Fig. 2B the initial rate activities of both enzymes are almost comparable, except in acetate buffer. Acetate is a known inhibitor for *Hb*HNL, which is highly similar to *Me*HNL (Hickel et al., 1997, Schall, 1996). In our experiments MeHNL also shows clearly impaired activity in the presence of acetate, whereas no such effect was observed with AtHNL. Nevertheless, MeHNL is very stable in acetate buffer (Fig. 2B) and the inhibition is completely reversible upon dilution in e.g. citrate phosphate buffer. These data explain the significantly higher K_M values for mandelonitrile (30 mM in contrast to 1-5 mM in citrate phosphate) which are reported in acetate buffer compared to other buffers (Lauble et al., 2002, Yan et al., 2003), suggesting that acetate acts as a competitive inhibitor.



**Figure 2: Influences of buffer and pH. A:** pH-optima of *Me*HNL ( $\bullet$ ) and *At*HNL ( $\diamond$ ) referring to pH-dependent initial rate activities for the cleavage of mandelonitrile measured in citrate phosphate buffer (pH 3.4 – 6.5) at 25°C. **B:** pH-dependent stability of *Me*HNL (dark grey) and *At*HNL (light grey) as half-life times (h) shown up to 50 h. Enzymes were incubated in different buffers and pH-values at room temperature for up to 10 d. Residual activity was determined using the cleavage assay with mandelonitrile. A: acetate buffer, CP: citrate phosphate buffer, G: glutamate buffer, PP: potassium phosphate buffer. Initial rate activities in the respective buffers at pH 5 are indicated with black horizontal bars. For experimental details see Materials and methods.

This hypothesis is further supported by the respective 3D structure of MeHNL (pdb entry 1dwp), containing an acetate ion in the active site. Comparisons with other structures of HbHNL and MeHNL with bound substrates reveal a very similar binding position and mode (Fig. S2, Additional Material). In MeHNL and HbHNL all amino acids involved in substrate stabilization are conserved, namely Thr-11, Ser-80 and Cys-81 (Lauble et al., 2001). Among these the strongest interactions are given by Thr-11 as well as Ser-80, which both were shown to be essential for catalytic activity (Gruber et al., 2004, Lauble et al., 2001, Wajant and Pfizenmaier, 1996). From these only the catalytically important serine (Ser-81) is present in the Arabidopsis enzyme (Fig. 3). Since acetate is a convenient buffer frequently used in industrial biotransformations, we were interested in the molecular reasons for acetate inhibition of MeHNL (or HbHNL, respectively). Therefore, the only variant targeting the non essential Cys-81 (MeHNL Cys81Ala) was tested concerning its sensitivity toward acetate; however this variant is also inhibited by acetate (data not shown).

Together with the previously reported inverted enantioselectivity of *At*HNL these results indicate that the mechanism of substrate binding for *At*HNL differs from those of *M*eHNL and *Hb*HNL. Additionally, the insensitivity of *At*HNL toward acetate may be related to its poor conversion of acetone cyanohydrin, since acetate and acetone cyanohydrin are bound at similar positions in the active site. The crystal structure of *At*HNL may provide a more detailed picture of the catalytic mechanism of this enzyme and the differences to its *S*-selective counterparts.

#### pH-effects

As mentioned above, the choice of the buffer and the pH value are critical factors for HNL-based processes. In order to identify appropriate parameters the pH-optima, stability and inactivation mechanisms have been determined for both enzymes. In citrate phosphate buffer, *At*HNL exhibits a broad

optimum between pH 5.75-6.5 and is almost inactive below pH 5, whereas *M*eHNL has a clear optimum at pH 5.75 and shows still 40% of its

maximal activity at pH 4, which agrees well with the literature (Wajant et al., 1995, Hughes et al., 1997) (Fig. 2A).In addition to the initial rate activity at different pH-values the pH-dependent stability of both enzymes was investigated using different buffers in the range of pH 4-6 (Fig. 2B). The stability of *M*eHNL at pH 4 for several hours indicates that the drastically impaired activity below pH 4 (Fig. 2A) is not a result of a fast enzyme inactivation during the initial rate measurement. The same holds for *At*HNL at pH 5.0.

The significant higher stability of *Me*HNL is also obvious in comparison to data published for *Hb*HNL, were e.g. a half-life time of ca. 4 h at pH 5.0 under similar conditions was reported (Bauer et al., 1997).

#### Analysis of pH-dependent inactivation processes

To elucidate whether structural changes of *At*HNL and *Me*HNL are induced at low pH-values, acidic inactivation and aggregation processes of both proteins were followed by different methods. Due to the differences in pH-stability of both HNLs, appropriate pH-values for these studies were chosen according to a half-life time of 2 h. Thus, pH 4.0 was selected for *Me*HNL, whereas inactivation of *At*HNL was studied at pH 5.4. The activity of both enzymes decreased immediately after starting the incubation (Fig. 4).

In case of *At*HNL this loss of activity is directly coupled to a loss of soluble protein content due to fast enzyme aggregation, which was followed by SLS and determination of soluble protein content (Fig. 4A, Fig. S5, Additional Material). To determine whether this aggregation process is initiated by (partial) unfolding of the secondary and/or tertiary structure, circular dichroism and tryptophan fluorescence spectra were recorded

Athnl : MERKHHFVLVHMAYHGAWIWYKLKPLLESAGHRVTAVELAASGIDPRPIQAVETVDEYSKPLIET : 65 ****:*. *******************************
<pre>MeHNL : LEKLPQGEKVIIVGE SCAGLNIAIAADRYVDKIAAGVFHNSLLPDTVHSPSYTVEKLLESFPDWR : 129 HbHNL : LEALPPGEKVILVGE SCGGLNIAIAADKYCEKIAAAVFHNSVLPDTEHCPSYVVDKLMEVFPDWK : 129 AtHNL : LKSLPENEEVILVGF SFGGINIALAADIFPAKIKVLVFLNAFLPDTTHVPSHVLDKYMEMPGGLG : 130</pre>
MeHNL : DTEYFTFINITGETITTMKLGFVLLRENLFTKCTDGEYELAKMVMRKGSLFQNVLAQRPKFTEKG : 194HbHNL : DTTYFTYT-KDGKEITGLKLGFTLLRENLYTLCGPEEYELAKMLTRKGSLFQNILAKRPFFTKEG : 193AtHNL : DCEFSSHETRNG-TMSLLKMGPKFMKARLYQNCPIEDYELAKMLHRQGSFFTEDLSKKEKFSEEG : 194* : :. * :: :*:* ::: :*: * ::*:*****: *:**:* : *::******
<ul> <li>Mehnl : YGSIKKVYIWTDQDKIFLPDFQRWQIANYKPDKVYQVQGGDHKLQLTKTEEVAHILQEVADAYA : 258</li> <li>Hbhnl : YGSIKKIYVWTDQDEIFLPEFQLWQIENYKPDKVYKVEGGDHKLQLTKTKEIAEILQEVADTYN : 257</li> <li>Athnl : YGSVQRVYVMSSEDKAIPCDFIRWMIDNFNVSKVYEIDGGDHMVMLSKPQKLFDSLSAIATDYM : 258</li> <li>***::::*: ::*: ::* * * *:: .***::**** : *:*.:: . *. :* *</li> </ul>

**Figure 3: Alignment of AtHNL, MeHNL and HbHNL.** Identical (*) and conserved (: / .) amino acids are marked. The catalytic triad is indicated with black circles ( $\bullet$ ). Anticipated interacting residues (PISA/ PQS-server) between monomers (dimer assembly) are highlighted grey (for *At*HNL the respecting residues are inferred from sequence similarities); interacting residues for tetramer formation from two dimers are indicated with boxes (black: chain A, grey: chain B in asymmetric unit). Calculations are based on pdb-entries 1dwo (*Me*HNL) and 1qj4 (*Hb*HNL).

Although three tryptophan residues are present in AtHNL only a very slight change of the fluorescence emission maximum was detectable, although a strong shift (331 nm - 347 nm) was observed in the presence of 6 M guanidinium hydrochloride, which is supposed to induce complete unfolding. A likely explanation for this is the fast and strong aggregation of AtHNL, which probably prevents exposure of the tryptophan residues to the solvent.Besides, strong structural changes are indicated by the CDsignal at 222 nm, referring to the α-helical content, which decreased significantly at pH 5.4 (Fig. 4A, Fig. S3, Additional Material). Quantification of this effect is difficult due to the influence of arising aggregates in the solution, since these may also cause changes in the spectral shape and magnitude (Kelly et al., 2005). However, these data clearly indicate that the deactivation of AtHNL at slightly acidic pH is a result of pronounced structural unfolding.

By contrast, MeHNL shows only moderate unfolding at pH 4 occurring directly after mixing, as was indicated from the CD and the fluorescence spectra (Fig. 4B, Fig. S3-4, Additional Material). Whereas also with MeHNL progressive aggregation was observed at pH 4, as was deduced from SLS and determination of the soluble protein concentration (Fig. 4B, Fig. S5, Additional Material),, aggregation began not immediately after starting the incubation at pH 4, but with a delay of about 2 h. In contrast to AtHNL structural changes of MeHNL are considerable slower and overall less pronounced. Based on these results we propose a modified inactivation process for MeHNL at low pH, which starts with fast but only minor changes of the secondary structure followed by slower changes of the tertiary structure and resulting in a time-delayed aggregation process.

For the related *Hb*HNL, acid-induced aggregation (Hickel et al., 1997) as well as unfolding of the tertiary structure followed by disintegration of the sec-

ondary structure (Hanefeld et al., 2001) was proposed.

In summary, *Me*HNL shows a slower and less pronounced unfolding and aggregation process, whereas more pronounced structural changes were observed for *At*HNL and *Hb*HNL. These differences in the structural stability may be explained by differences in the quaternary structure of these enzymes, since a higher oligomeric state has been shown to enhance protein stability (Vieille and Zeikus, 2001).

#### Native quaternary structures

Although the monomeric subunits of MeHNL, AtHNL and HbHNL show equal molecular weights of 29.2 kDa consisting of 257-258 amino acids (Andexer et al., 2007, Hasslacher et al., 1996a, Hughes et al., 1994), respectively, they differ concerning their subunit assembly, which was deduced from size exclusion chromatography. While AtHNL and HbHNL (Lauble et al., 2001) appear as dimers (50 kDa) in the native state, MeHNL showed hydrodynamic volumes consistent with 96-100 kDa (measured with size exclusion HPLC and FPLC). The molecular size of MeHNL was a matter of debate since many years and molecular weights in solution ranging from 92 kDa (trimer) (Hughes et al., 1994) over 102 kDa (Chueskul and Chulavatnatol, 1996) to 124 kDa (tetramer) (Wajant et al., 1995) were reported, while a dimer is present in the asymmetric unit in the crystalline state (Lauble et al., 2002). The association state of multimeric proteins can be predicted using different tools such as the PQS-server (Henrick and Thornton, 1998) and the PISA-server (Krissinel and Henrick, 2007). Both tools were used in order to predict the potential association state of MeHNL based on the seven available crystal structures from the protein data bank (www.pdb.org). According to the PQS-server (Henrick and Thornton, 1998), the most likely guaternary arrangement in all (but one, pdb entry 1dwg) deposited structures of MeHNL is tetrameric. These tetramers are built

up from two dimers, the original one present in the asymmetric unit and a second one generated by a crystallographic two-fold axis. In contrast to that, analysis of the crystal structures with the alternative PISA-server (Krissinel and Henrick, 2007) reveals the dimer as the most probable assembly. These different results suggest that binding of two dimers forming the tetramer is quite weak which led to the assumption that a mixture of dimeric and tetrameric forms may exist in solution. At first glance a coexistence of dimers and tetramers should result in two distinct peaks in SEC, but it has been reported for other multimeric proteins that a fast equilibrium between two association forms results in the detection of an intermediate molecular weight (Guo et al., 2007, Hejtmancik et al., 2004, Waheed and Vonfigura, 1990). In order to elucidate this further, the amino acids incorporated into the association of the dimers and potential tetramers of MeHNL, AtHNL and HbHNL were compared. Whereas the residues at the interfaces between the monomers are conserved in all three enzymes, some residues involved in the tetramer formation, e.g. Asn-52, Ile-139 and Thr-140, in MeHNL are not conserved in the other enzymes (Fig. 3). These sequence differences might be sufficient to alter the association behaviour of the otherwise highly similar enzymes. Results obtained with histone deacetylase 4 (Guo et al., 2007) and GFP (Zacharias et al., 2002) demonstrated that the exchange of only one or few amino acid may result in different oligomeric states.

#### Attempts to stabilize HNLs at low pH values

With regard to the technical use of HNLs a good stability of these enzymes in acidic environment is desirable. One possibility to increase the stability of a biocatalyst in solution is the addition of protectants like polyols (Polizzi et al., 2007). Consequently, saccharose and sorbitol were tested as stabilizing components for AtHNL and MeHNL. Whereas the stabilizing effect on MeHNL was less pronounced, a good stabilization of AtHNL is achieved, which is indicated by a more than 36-fold increase of the half-life time at pH 5.4 from 2 h without additive to > 72 h in the presence of e.g. sorbitol (200 mg/mL) (details in Tab. S1, Additional Material). Although MeHNL was not significantly stabilized by the additives tested, the stability of this enzyme could be improved drastically by using it as cell-free crude extract, which improved the half-life time at pH 4 from 2 h to > 48 h. At pH 4 many of the E. coli cell proteins precipitate, which is immediately visible by an increasing turbidity of the solution. It should be mentioned that the precipitable aggregates contain the complete MeHNL-activity leading to the assumption that MeHNL is stabilized by entrapment in aggregates of E. coli cell proteins. No such effect was observed with AtHNL as the stability of the enzyme in crude cell extracts did not differ from the purified preparation, probably being due to a less degree of cell protein aggregation at pH 5.4.



Figure 4: Time dependent effect of low pH on structure and activity. Left ordinate: Decrease of native enzyme content, measured with the standard activity assay ( $\blacksquare$ ), CD-spectroscopy (ellipticity at 222 nm,  $\blacklozenge$ ) and fluorescence spectroscopy ( $\square$ ). Right ordinate: Increase of aggregation, expressed as insoluble protein content (Bradford assay of soluble protein content,  $\bullet$ ) and SLS-measurements ( $\circ$ ). A: *At*HNL at pH 5.4, B: *M*eHNL at pH 4.0. Definitions of relative scales: *Activity assay*: 100%: activity (stock solution) at t=0; 0%: no activity. *Insoluble protein content*: 100%: no soluble protein; 0%: 100% soluble protein (stock solution) at t=0; *CD and fluorescence*: 100%: native sample (for *M*eHNL: pH 6.0, *At*HNL: pH 6.4), 0%: sample denaturated with 6 M guanidinium hydrochloride. *SLS*: 100%: detection limit of spectrometer; 0%: signal at t=0.

For *Hb*HNL plant crude cell extracts as well as polyols were reported to have a positive effect on the stability toward low pH (Hickel et al., 1997). Also immobilisation techniques like cross-linked enzyme aggregates or encapsulation in sol-gel matrices have been successfully tested (Cabirol et al., 2006, Chmura et al., 2006, Veum et al., 2004). Furthermore, the successful application of crude cell extracts from an *Hb*HNL-expressing *Pichia pastoris* culture in the synthesis of cyanohydrins in a microchannel reactor was reported, suggesting that this kind of enzyme preparation could be an alternative to the immobilized forms (Koch et al., 2008).

Detailed knowledge of the inactivation processes is a prerequisite to improve a biocatalysts' performance in technical processes either by reaction- or by enzyme engineering. Our studies demonstrate that *M*eHNL shows the highest stability among the HNLs with  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold. This may be due to the potential of *M*eHNL to form a tetrameric quaternary structure which is in equilibrium with the usually observed dimeric species in solution. As the amino acid residues mediating the dimer-dimer interaction are different in *M*eHNL, *At*HNL and *Hb*HNL mutagenesis in this area represents a possible starting point for rational attempts to stabilize  $\alpha/\beta$ hydrolase HNLs. Beside this rational approach we demonstrated that the stability of *At*HNL toward low pH values can be improved by addition of sorbitol and saccharose, whereas *Me*HNL is significantly stabilized in crude cell extracts.

In general, reaction conditions have to be adjusted according to the requirements of the respective system. As the pH-dependent stability of cyanohydrins are as different as the velocities of the chemical side reactions, knowledge of these parameters is important to adjust appropriate reaction conditions. In the case of *m*-phenoxy cyanohydrin synthesis the chemical side reaction is very slow and the product is stable also in the neutral pH range. This allows the enzymatic reaction to be carried out at neutral pH at the pH- and stability optimum of the enzyme which increases the half-life time of HNLs significantly (Von Langermann et al., 2008).

#### Acknowledgements

The authors thank Julich Chiral Solutions/Codexis for providing MeHNL-DNA and Sabine Kruschinski for excellent technical assistance. This work was partially supported by the BMBF in frame of project "Biokatalytische Hydrocyanierung & Hydroformylierung (BioHydroForm) FKZ 0313402C" and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in frame of Graduiertenkolleg 1166 "BioNoCo".

#### References

- Andexer, J., Guterl, J. K., Pohl, M. and Eggert, T. (2006) A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity. *Chem. Commun.* 40, 4201-4203.
- Andexer, J., von Langermann, J., Mell, A., Bocola, M., Kragl, U., Eggert, T. and Pohl, M. (2007) An Rselective hydroxynitrile lyase from Arabidopsis thaliana with an α/β-hydrolase fold Angew. Chem. Int. Ed. 46, 8679-8681.
- Bauer, M., Geyer, R., Boy, M., Griengl, H. and Steiner, W. (1997) Stability of the enzyme (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. J. Mol. Catal. B: Enzym. 5, 343-347.
- Bauer, M., Griengl, H. and Steiner, W. (1999) Kinetic studies on the enzyme (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis using initial rate methods and progress curve analysis. Biotechnol. Bioeng. 62, 20-29.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Bühler, H., Effenberger, F., Förster, S., Roos, J. and Wajant, H. (2003) Substrate specificity of mutants of the hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta. Chembiochem 4, 211-216.
- Cabirol, F. L., Hanefeld, U. and Sheldon, R. A. (2006) Immobilized hydroxynitrile lyases for enantioselective synthesis of cyanohydrins: Sol-gels and cross-linked enzyme aggregates. Adv. Synth. Catal. 348, 1645-1654.
- Chmura, A., van der Kraan, G. M., Kielar, F., van Langen, L. M., van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2006) Cross-linked aggregates of the hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta: Highly active and robust biocatalysts. Adv. Synth. Catal. 348, 1655-1661.
- Cholod, M. S. (1993) Cyanohydrins. IN Company, R. a. H. (Ed.) Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Inc.
- Chueskul, S. and Chulavatnatol, M. (1996) Properties of alpha-hydroxynitrile lyase from the petiole of cassava

(Manihot esculenta Crantz). Arch. Biochem. Biophys. 334, 401-405.

- Daussmann, T., Rosen, T. C. and Dunkelmann, P. (2006) Oxidoreductases and hydroxynitrilase lyases: Complementary enzymatic technologies for chiral alcohols. Eng. Life Sci. 6, 125-129.
- Dreveny, I., Kratky, C. and Gruber, K. (2002) The active site of hydroxynitrile lyase from Prunus amygdalus: modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis. Protein Sci. 11, 292-300.
- Fechter, M. H. and Griengl, H. (2004) Hydroxynitrile lyases: Biological sources and application as biocatalysts. Food Technol. Biotech. 42, 287-294.
- Förster, S., Roos, J., Effenberger, F., Wajant, H. and Sprauer, A. (1996) The first recombinant hydroxynitrile lyase and its application in the synthesis of (S)cyanohydrins. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35, 437-439.
- Glieder, A., Weis, R., Skranc, W., Poechlauer, P., Dreveny, I., Majer, S., Wubbolts, M., Schwab, H. and Gruber, K. (2003) Comprehensive step-by-step engineering of an (R)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. 42, 4815-4818.
- Gruber, K., Gartler, G., Krammer, B., Schwab, H. and Kratky, C. (2004) Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the alpha/beta-hydrolase superfamily: the three-dimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of LYS236. J. Biol. Chem. 279, 20501-20510.
- Guo, L., Han, A. D., Bates, D. L., Cao, J. and Chen, L. (2007) Crystal structure of a conserved N-terminal domain of histone deacetylase 4 reveals functional insights into glutamine-rich domains. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 104, 4297-4302.
- Hanefeld, U., Stranzl, G., Straathof, A. J., Heijnen, J. J., Bergmann, A., Mittelbach, R., Glatter, O. and Kratky, C. (2001) Electrospray ionization mass spectrometry, circular dichroism and SAXS studies of the (S)hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. Biochim. Biophys. Acta 1544, 133-142.
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Griengl, H., Kohlwein, S. D. and Schwab, H. (1996a) Molecular cloning of the full-length cDNA of (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. Functional expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae and identification of an active site residue. J. Biol. Chem. 271, 5884-5891.
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Griengl, H., Kohlwein, S. D. and Schwab, H. (1996b) (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 799, 707-712.
- Hejtmancik, J. F., Wingfield, P. T. and Sergeev, Y. V. (2004) beta-Crystallin association. Exp. Eye Res. 79, 377-383.
- Henrick, K. and Thornton, J. M. (1998) PQS: a protein quaternary structure file server. Trends Biochem. Sci. 23, 358-361.
- Hickel, A., Graupner, M., Lehner, D., Hermetter, A., Glatter, O. and Griengl, H. (1997) Stability of the hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis: a fluorescence and dynamic light scattering study. Enzyme Microb. Technol. 21, 361-366.
- Hughes, J., Carvalho, F. J. and Hughes, M. A. (1994) Purification, characterization, and cloning of alphahydroxynitrile lyase from cassava (Manihot esculenta Crantz). Arch. Biochem. Biophys. 311, 496-502.
- Hughes, J., Lakey, J. H. and Hughes, M. A. (1997) Production and characterization of a plant alphahydroxynitrile lyase in Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng. 53, 332-338.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. and Price, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. Biochim. Biophys. Acta 1751, 119-139.
- Koch, K., van den Berg, R. J. F., Nieuwland, P. J., Wijtmans, R., Wubbolts, M. G., Schoemaker, H. E.,

Rutjes, F. P. J. T. and van Hest, J. C. M. (2008) Enzymatic synthesis of optically pure cyanohydrins in microchannels using a crude cell lysate. Chem. Eng. J. 135, S89-S92.

- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A. and Deckwer, W. D. (1995) Simple fed-batch technique for high cell-density cultivation of Escherichia coli. J. Biotechnol. 39, 59-65.
- Kragl, U., Niedermeyer, U., Kula, M. R. and Wandrey, C. (1990) Engineering aspects of enzyme engineering: Continuous asymmetric C-C bond formation in an enzyme-membrane-reactor. Ann. N. Y. Acad. Sci. 613, 167-175.
- Krissinel, E. and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. 372, 774-797.
- Lauble, H., Miehlich, B., Förster, S., Kobler, C., Wajant, H. and Effenberger, F. (2002) Structure determinants of substrate specificity of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta. Protein Sci. 11, 65-71.
- Lauble, H., Miehlich, B., Förster, S., Wajant, H. and Effenberger, F. (2001) Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta in complex with acetone cyanohydrin. Protein Sci. 10, 1015-1022.
- Niedermeyer, U. and Kula, M. R. (1990) Enzyme-catalyzed synthesis of (S)-cyanohydrins. Angew. Chem. Int. Ed. 29, 386-387.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I. and Schrag, J. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. Protein Eng. 5, 197-211.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M. and Chaparro-Riggers, J. F. (2007) Stability of biocatalysts. Curr. Opin. Chem. Biol. 11, 220-225.
- Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C. and Griengl, H. (2007) Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 309-320.
- Schall, M. (1996) Isolation & characterization of a (S)hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. Graz, Karl-Franzens University.
- Schmidt, M., Hervé, S., Klempier, N. and Griengl, H. (1996) Preperation of optically active cyanohydrins using the (S)-hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. Tetrahedron 52, 7833-7840.
- Sharma, M., Sharma, N. N. and Bhalla, T. C. (2005) Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. Enzyme Microb. Technol. 37, 279-294.
- Veum, L., Hanefeld, U. and Pierre, A. (2004) The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis in a sol-gel matrix. Tetrahedron 60, 10419-10425.

- Vieille, C. and Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65, 1-43.
- Volkin, D. B. and Middaugh, C. R. (1992) The effect of temperature on protein structure. IN Ahern, T. J. and Manning, M. C. (Eds.) Stability of protein pharmaceuticals. Chemical and physical pathways of protein degradation. New York, Plenum press.
- Von Langermann, J., Guterl, J. K., Pohl, M., Wajant, H. and Kragl, U. (2008) Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values. Bioprocess. Biosyst. Eng. 31, 155-161.
- Waheed, A. and Vonfigura, K. (1990) Rapid Equilibrium between Monomeric, Dimeric and Tetrameric Forms of the 46-Kda Mannose 6-Phosphate Receptor at 37-Degrees-C - Possible Relation to the Function of the Receptor. Eur. J. Biochem. 193, 47-54.
- Wajant, H., Förster, S., Böttinger, H., Effenberger, F. and Pfizenmaier, K. (1995) Acetone cyanohydrin lyase from Manihot esculenta (cassava) is serologically distinct from other hydroxynitrile lyases. Plant Sci. 108, 1-11.
- Wajant, H. and Pfizenmaier, K. (1996) Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem. 271, 25830-25834.
- Wäspi, U., Misteli, B., Hasslacher, M., Jandrositz, A., Kohlwein, S. D., Schwab, H. and Dudler, R. (1998) The defense-related rice gene Pir7b encodes an alpha/beta hydrolase fold protein exhibiting esterase activity towards naphthol AS-esters. Eur. J. Biochem. 254, 32-37.
- Weis, R., Poechlauer, P., Bona, R., Skranc, W., Luiten, R., Wubbolts, M., Schwab, H. and Glieder, A. (2004) Biocatalytic conversion of unnatural substrates by recombinant almond R-HNL isoenzyme 5. J. Mol. Catal. B: Enzym. 29, 211-218.
- Willeman, W. F., Hanefeld, U., Straathof, A. J. J. and Heijnen, J. J. (2000) Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)mandelonitrile by Prunus amygdalus hydroxynitrile lyase. Enzyme Microb. Technol. 27, 423-433.
- Yan, G., Cheng, S., Zhao, G., Wu, S., Liu, Y. and Sun, W. (2003) A single residual replacement improves the folding and stability of recombinant cassava hydroxynitrile lyase in E. coli. Biotechnol. Lett. 25, 1041-1047.
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. Science 296, 913-916.





J. ANDEXER, N. STAUNIG, T.EGGERT, C. KRATKY, M. POHL UND K. GRUBER

MANUSKRIPT IN VORBEREITUNG

# The crystal structure of the *R*-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*

Jennifer Andexer¹, Nicole Staunig², Thorsten Eggert³, Christoph Kratky², Martina Pohl¹ and Karl Gruber^{2*}

¹Institute for Molecular Enzyme Technology, University of Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich, D-52426 Jülich, Germany

²Department of Chemistry, University of Graz, Humboldtstraße 50/3, A-8010 Graz, Austria

³evocatal GmbH, Merowingerplatz 1a, D-40225 Düsseldorf, Germany

#### Abstract

The *R*-selective HNL from *Arabidopsis thaliana* was crystallized and its structure solved to a resolution of 2.5 Å. To understand the mode of substrate binding and the altered enantioselectivity of *At*HNL in comparison to the homologous *S*-selective enzymes from *Hevea brasiliensis* and *Manihot esculenta*, docking calculations were performed resulting in a complex of *At*HNL with mandelonitrile. In comparison to the *S*-selective enzymes, the substrate molecule interacts with different residues. Based on this enzyme-substrate complex a catalytic mechanism for *At*HNL is proposed, where the cyanohydrin substrate is directly deprotonated via the catalytic histidine. Further, several *At*HNL variants are described to support the theoretical model.

#### Introduction

Hydroxynitrile lyases (HNLs) catalyze the cleavage of cyanohydrins into the corresponding carbonyl compound and hydrocyanic acid (HCN) (Figure 1). In nature, this reaction acts as a defense mechanism of plants against herbivores and microorganisms. The reverse reaction is used for the stereoselective C-C-bond formation of HCN with aldehydes or ketones yielding chiral cyanohydrins as versatile building blocks for e.g. the pharmaceutical and agrochemical industries (Sharma et al. 2005; Purkarthofer et al. 2007).



Figure 1: HNL-catalyzed cleavage and synthesis of chiral cyano-hydrins.

HNLs are a quite diverse group of enzymes which have evolved through convergent evolution (Wajant and Effenberger 1996). At least four different groups are known to date; the FAD-dependent *R*-HNLs isolated from various *Rosaceae* (EC 4.1.2.10) are related to glucose-methanol-cholin oxidoreductases (Dreveny et al. 2002) and the *R*-selective enzyme from *Linum usitatissimum* (EC 4.1.37) shares high similarity with zinc-dependent alcohol-dehydrogenases (Breithaupt et al. 1999).

The serin-carboxypeptidase-like S-HNL from Sorghum bicolor (4.1.2.11, Lauble et al. 2002) as well as the S-selective enzymes from Manihot esculenta (cassava, MeHNL, Lauble et al. 2001a) and Hevea brasiliensis (para rubber tree, *Hb*HNL, Wagner et al. 1996), both 4.1.2.39, contain the  $\alpha/\beta$ hydrolase fold pattern (Ollis et al. 1992). This structural motif is characterized by a central  $\beta$ -sheet which is surrounded by  $\alpha$ -helices and a catalytic triad most often consisting of Ser, His and Asp. MeHNL and HbHNL are among the best characterized HNLs, they share 77% sequence identity and are also structurally very similar. Based on their crystal structures, mechanistic proposals for both enzymes have been developed. According to these models, the catalytic histidine acts as a base to deprotonate the catalytic serine, which subsequently deprotonates the cyanohydrin substrate. In an early proposed general mechanism for HNL activity the necessity for a positive charge to stabilize the cyanide is assumed (Becker and Pfeil 1966). In the mechanistical model for HbHNL Lys-236 is proposed for this function, whereas in case of MeHNL the involvement of a lysine residue is still a matter of discussion (Lauble et al. 2001b; Gruber et al. 2004). Figure 2 shows the mechanism proposed for *Hb*HNL.

Recently, a hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* (mouse-ear cress) was described (*At*HNL), sharing high sequence homology with *Me*HNL and *Hb*HNL (~45% identity), but is *R*-selective (Andexer et al. 2007a). All residues of the catalytic triad are conserved, but some other amino acids



Figure 2: Proposed mechanism for *Hb*HNL. For the homologous *Me*HNL the role of the "central" water molecule and the involvement of Lys-236 are controversially discussed. (Figure according to Gruber et al. 2004, for details see text).

supposed to play an important role in the catalytic mechanism proposed for *Me*HNL and *Hb*HNL are exchanged, including the controversial lysine (methionine in *At*HNL). In order to understand the molecular basis for the altered enantioselectivity and to elucidate whether the catalytic mechanism follows the same principles, *At*HNL was crystallized and the substrate mandelonitrile was docked into the active site.

#### **Materials and Methods**

#### Crystal Structure Analysis

AtHNL was expressed in *E. coli* BL21(DE3) as described previously (Andexer et al. 2007a). The enzyme was purified from the crude cell extract using standard column chromatography techniques (ion exchange, size exclusion). Samples used for the crystallization trials contained the enzyme at a concentration of 20 mg/ml in 10 mM acetate puffer, pH 6. Protein concentration was determined according to Bradford (Bradford 1976). Diffraction quality crystals were obtained using sitting drop vapor diffusion with reservoir solution consisting of 10-18% PEG-3350 in 100mM BisTris at pH 6.

Before flash freezing, crystals were soaked for about 30 seconds in a solution consisting of the reservoir solution plus 25% glycerol for cryoprotection. A diffraction data set extending to 2.5 Å resolution was collected at cryogenic temperatures using synchrotron radiation at the EMBL beamline X13 at the DESY in Hamburg. Data reduction involved the programs DENZO and SCALEPACK (Otwinowski and Minor 1997) as well as software from the CCP4 suite

(CCP4 1994). At first the data were processed as orthorhombic C222₁ (a=63.57 Å, b=77.77 Å, c=223.28 Å), but statistical analyses indicated the presence of significant twinning. The data were thus reprocessed in the monoclinic spacegroup  $P2_1$  (a=50.25 Å, b=223.31 Å, c=50.20 Å,  $\beta$ =101.47°) and the twinning transformation 1, -k, h was identified. For structure solution the data were detwinned using the program DETWIN from the CCP4 suite assuming a twinning fraction of 0.448.

A homology model of AtHNL was built using the program Modeller 8v1 (Marti-Renom et al. 2000) based upon structures of the HNLs from Hevea brasiliensis (HbHNL, PDB-code: 1QJ4) and Manihot esculenta (MeHNL, PDB-code: 1DWP) as well as of the salicylic acid binding protein from tobacco (PDB-code: 1XKL) as templates sharing sequence identities between 44 and 49% with AtHNL. Molecular replacement using PHASER yielded an unequivocal solution with four protein molecules in the asymmetric unit. The structure was refined using Phenix (Adams et al. 2002) against the original twinned data. The final refined value for the twinning fraction was 0.481. Model building and fitting steps involved the graphics program Coot (Emsley and K. 2004) using  $\sigma_A$ -weighted  $2F_o$ - $F_c$  and  $F_o$ -F_c electron density maps (Read 1986). R_{free}-values (Kleywegt and Brunger 1996) were computed from 5% randomly chosen reflections not used for the refinement. Special care was taken that reflections related by the twinning transformation were both contained in the test set. Non-crystallographic symmetry (NCS) restraints were applied throughout the refinement. A total of 68 well defined water molecules and a chloride atom were included into the model. In all four chains, the first two N-terminal residues were not visible in the electron density, in two chains the last C-terminal residue is missing. A Ramachandran plot shows almost all residues in core and allowed regions with the exception of Ser-81, which was observed in the disallowed region of  $\phi/\psi$ -space. This residue is located in the so called nucleophile elbow which is known to require a somewhat strained main chain conformation in  $\alpha/\beta$ -hydrolases (Ollis et al. 1992). Details of the data collection, processing and structure refinement are summarized in Table 1.

#### Table 1: Summary of crystallographic data.

	<i>At</i> HNL
X-ray source	EMBL-X13
wavelength (Å)	0.8081
temperature	100 K
spacegroup	C222 ₁
cell parameters	
a(Å)	50.25
b(Å)	223.31
c(Å)	50.20
β(°)	101.47
resolution range (outer shell)	25.0-2.5 (2.56-2.50)
R _{sym}	0.071 (0.210)
$I/\sigma(I)$	18.9 (4.8)
completeness (%)	89.6 (87.5)
redundancy	3.4 (2.9)
unique reflections	33106
$R/R_{free}$ (%)	15.9/21.0
Rms devs from ideality	
bond lengths (Å)	0.006
bond angles (°)	0.9
dihedral angles (°)	16.6
planarity (Å)	0.004
Average B values	
protein	28.0
water	15.8
PDB accession code	???

#### Modeling of Substrate Complexes

Of the four crystallographically independent AtHNL molecules the one with the lowest average B factor was chosen for the docking calculations using AutoDock v4 (Morris et al. 1998). Aspartate, glutamate, arginine and lysine residues were treated as charged, protonation and tautomeric states of histidine residues were chosen in order to optimize hydrogen bonding interactions with surrounding residues. A molecular model of (R)-mandelonitrile was built and optimized using the program Sybyl v6.8 (Tripos Inc.). During the docking simulations the protein was kept rigid, and the position and orientation of the substrates as well as two torsion angles (for the phenyl- and the OH-group) were allowed to vary. A hybrid genetic algorithm with phenotypic local search (designated as a Lamarckian genetic algorithm (Morris et al. 1998) was applied in 50 independent simulations with populations consisting of 300 random structures and a maximum number of generations of 300. The best individual of each generation automatically survived, the mutation and crossover rates were set to 0.02 and 0.80 respectively. The probability for performing a local search (up to 300 iterations) was 10%. A cluster analysis with an rmsd-cutoff of 1.0Å was performed. The resulting complex structures were further optimized using AMBER v9 (Case et al. 2006).

#### Introduction of point mutations

Point mutations were introduced using the QuickChange PCR protocol from Stratagene (Quikchange® II Site Directed Mutagenesis Kit). For amplification Pfu-Turbo polymerase from Stratagene was employed; p*Athnl*, containing the AtHNL-gene in the vector pET28a (Novagen) was used as a template and mutagenesis primers are summarized in Table 2.

 Table 2: Created AtHNL variants and respective mutagenesis primers.

Variant	5' Primer	3' Primer
Asn12Thr	CGTGTTAGTTCA- CACCGCTTAT- CATGGAGC	GCTCCATGA- TAAGCGGTGTGA ACTAACACG
Met237Lys	GGCGGAGATCA- CAAAGTGATGCT CTCCAAACC	GGTTTGGAGAG- CAT- CACTTTGTGATCT CCGCC
Met237Leu	GGCGGAGAT- CACCTGGTGATG CTCTCCAAACC	GGTTTGGAGAG- CATCAC- CAGGTGATCTCC GCC

#### Results

#### **Overall structure**

We determined the crystal structure of the HNL from Arabidopsis thaliana to a resolution of 2.5 Å. Based on sequence similarities and mutational analyses of putative active site residues an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold was assumed for AtHNL, which is clearly confirmed by the crystal structure. With rmsdeviations of 0.8 Å (for a superposition of 237 Ca-atoms) the structure is very similar to those of the HNLs from Hevea brasiliensis (HbHNL, PDB-code: 1QJ4) and from Manihot esculenta (MeHNL, PDB-code: 1EB9), consistent with the high level of amino acid sequence similarity (67%). The clearest differences between the structures are found in a loop at the entrance of the active site (Figure 3). The asymmetric unit consists of four protein molecules forming two independent dimers. Analyses of the interaction surfaces using the Pisa-server (Krissinel et al. 2007) yielded interface areas of approximately 870  $Å^2$  in both cases. Contacts between the two protein chains are mostly hydrophobic in nature but also include a salt-bridge interaction between Lys-24 of one molecule and Glu-165 of the other. According to the Pisaanalysis this interfaces get a complexation significance score (CSS) of 1.0 indicating that the dimeric arrangement is also likely to be present in solution, which has been verified by size-exclusion chromatography (Andexer et al. 2007b). Similarly, crystal structures of *Me*HNL also contain dimers in the respective asymmetric units, whereas a single polypeptide chain forms the asymmetric unit in *Hb*HNL structures (Wagner et al. 1996; Lauble et al. 2001a). In the latter case, however, corresponding dimers are formed through crystallographic symmetry.



**Figure 3:** Superposition of the structures of the hydroxynitrile lyases from *Arabidopsis thaliana* (*At*HNL, magenta) and from *Hevea brasiliensis* (*Hb*HNL, cyan). This figure was prepared using the program PyMol (DeLano 2002).

#### **Docking calculations**

To elucidate the mode of substrate binding docking calculations were carried out to identify low-energy binding modes of (R)-mandelonitrile to the active site of AtHNL. The calculations revealed a single cluster of binding modes.

Possible polar interactions between substrate and enzyme are shown in Figure 4. In this model the cyanohydrin's hydroxyl group is hydrogen bonded to His-236, and also interacts with the amide group of Asn-12. The cyano group is orientated toward the main chain NH-groups of Phe-82 and Ala-13. The phenyl group is bound in a mostly hydrophobic pocket (Figure 4).



**Figure 4:** Stereo representation of the modeled complex of *At*HNL with (*R*)-mandelonitrile. Residues of the catalytic triad (Ser81-His236-Asp208) as well as residues forming polar interactions with the bound substrate are shown in orange; residues which build up the mostly hydrophobic pocket housing the phenylring of the substrate are shown in white. Green dashed lines signify possible hydrogen bonding interactions. This figure was prepared with the program PyMol (DeLano 2002).

#### **Comparison to HbHNL-complexes**

In comparison to the substrate complexes of the other HNLs with  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold this substrate binding mode shows some differences; in HbHNL (or MeHNL) the hydroxyl group interacts with the catalytic serine (Ser-80 in *Hb*HNL) instead of the catalytic histidine and with a threonine (Thr-11 in HbHNL) which corresponds to Asn-12 in AtHNL. Most surprisingly, the cyano group is orientated into the opposite direction compared to the situation in HbHNL, where it interacts with Lys-236. The latter residue is exchanged by Met-237 in AtHNL, which does not interact with the substrate. Although the substrates are differently orientated in AtHNL and *Hb*HNL, the phenyl ring of the mandelonitrile molecule binds in the same position. In Figure 4 the amino acids forming the putative hydrophobic pocket in *At*HNL are indicated. Taken together, the substrate molecule is bound in the same position in both enzymes, but due to the different enantiomeric forms rotated by 180° regarding the orientation of its cyano- and hydroxyl group (Figure 5).



**Figure 5:** Stereo representation of the superposition of modeled complex of *At*HNL (yellow) with (*R*)-mandelonitrile (orange) and the experimentally determined complex of *Hb*HNL (magenta) with (*S*)-mandelonitrile (blue). Green dashed lines signify possible hydrogen bonding interactions. This figure was prepared with the program PyMol (DeLano 2002).

#### Mutational analysis

In order to understand the molecular catalytic mechanism, several variants with point mutations were planned and created by site directed mutagenesis. In Table 3, mechanistically important amino acids in *At*HNL and *Hb*HNL, created variants and residual activity of the variants are summarized. Mutation of catalytic triad residues yielded inactive enzyme (Andexer et al. 2007a); trials to introduce active site residues present in *Hb*HNL (Asn12Thr, Met237Lys) also yielded inactive enzyme, possibly due to formation of insoluble protein in inclusion bodies. Mutation of Met-237 to Leu does not impair activity in comparison to the wildtype, in *Hb*HNL this mutation (Lys236Leu) leads to inactive enzyme.

#### Discussion

HNLs seem to have evolved convergently from different ancestral proteins. Four groups have been characterized intensively to date; all exhibit different catalytic mechanisms,

#### STRUKTUR UND MECHANISMUS DER ATHNL

but some general requirements for HNL-activity can be found fulfilled in all of them (Gruber and Kratky 2004).

AtHNL is the first HNL with  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold which is *R*-selective. Until now, *S*-selectivity was one characteristic property of HNLs containing this structural motif, which leads to the question if the altered enantioselectivity is the only difference or if the catalytic mechanism must be also changed to convert (*R*)-cyanohydrins. An involvement of the proposed catalytic triad (Ser-81, Asp-208, His-236) was already confirmed by site-directed mutagenesis (Andexer et al. 2007a), so that a similar mechanism is likely.

In the absence of experimental structures of enzyme substrate complexes docking calculations with (R)-mandelonitrile were carried out. Such calculations have previously been applied successfully to model substrate complexes of different HNLs (Gruber 2001, Dreveny et al. 2002). In the case of *Hb*HNL the docking results have been confirmed by subsequent structure analyses (Gruber et al. 2005; Gartler et al. 2007) increasing our confidence in the correctness of the modeled substrate binding modes.

**Table 3:** Residual activity of created *At*HNL variants relative to wildtype activity. Initial rate activities were measured as described previously (Andexer et al. 2007a).

Residue in <i>At</i> HNL	Corresponding residue in <i>Hb</i> HNL	Variant ( <i>At</i> HNL)	Residual activity
Asn-12	Thr-11	Asn12Thr	<2 %
Met-237	Lys-236	Met237Lys	<2%, IB
		Asn12Thr/Met237Lys	<2 %, IB
		Met237Leu	100%
Ser-81*	Ser-80	Ser81Ala	<2%
Asp-208*	Asp-207	Asp208Asn	<2%
His-236*	His-235	His236Phe	<2%

* Andexer et al. 2007a

#### Putative catalytic mechanism of AtHNL

Based on this enzyme-substrate complex, we propose a catalytic mechanism for AtHNL shown in Figure 6. Because of the altered substrate binding mode, the hydroxyl and cyano groups are orientated in approximately opposite positions compared to HbHNL (Figure 5); the hydroxyl group is not in hydrogen bond proximity to the catalytic serine, but rather to the catalytic histidine. So it is very likely that in AtHNL the catalytic histidine directly acts as the general base and not via the serine hydroxyl group as in HbHNL or MeHNL.

Furthermore, the hydroxyl group of the substrate is bound by the carboxamide group of Asp-12. The corresponding residue in *Hb*HNL is Thr-11 which interacts there also with the substrate's hydroxyl group.

The exchange of Asn-12 for Thr, however, leads to a positional shift of the hydrogen bond donor (hydroxyl vs. amide) forming a binding site for the OH-group of the substrate remote from the catalytic serine and closer to the catalytic histidine (Figure 5).



**Figure 6:** Proposed mechanism of AtHNL. In contrast to the HbHNL model, the substrate interacts directly with the catalytic histidine. The hydroxyl group is stabilized by Asn-12, for stabilization of the cyano group the backbone amid groups of Ala-13 and Phe-82 are proposed (helix dipole). For further details see text.

To support these hypotheses, several AtHNL variants were tested for their activity. The exchange of Asn-12, which is supposed to interact with the hydroxyl group and to stabilize the substrate during conversion to threonine, the corresponding residue in HbHNL, should cause drastically impaired or no residual activity, because the substrate cannot be correctly positioned. Actually, the resulting variant shows no HNL activity any more. In HbHNL, a pivotal role for the electrostatic interaction with the cyano group of the substrate (or the cyanide ion respectively) has been ascribed to Lys-236. In AtHNL, this residue is replaced by a methionine (Met-237) necessitating a different way of providing the electrostatic stabilization which is supposed to be crucial for the catalysis of cyanohydrin cleavage (Becker and Pfeil 1966). The active site of AtHNL does not contain a positively charged residue that could take the role of Lys-236 in HbHNL. On the other hand, however, the cyano group lies in close proximity of the backbone amide groups of Ala-13 and Phe-82 (Figure 4), which are located at the N-terminal end of an  $\alpha$ -helix. These hydrogen bonding interactions and the helix dipole very likely build up the positive electrostatic potential which stabilizes the cyano group. After abstraction from the hydroxyl group through His-236, the substrate's proton is transferred via Ser-81 to the simultaneously formed cyanide (Figure 6).

#### Attempts to change the enantioselectivity

On the other hand, with this mutation it should be possible to bind (S)-mandelonitrile, provided that the cyano group can be stabilized on the other side of the active center. By introducing the mutations Asn12Thr and Met237Lys, for both functional groups (hydroxyl and cyano group) of (S)-mandelonitrile the necessary stabilizing residues should be present. Unfortunately, both the single mutant Met237Lys and the double mutant are produced in form of inclusion bodies in *E. coli*. This may be due to incorrectly fold or instable proteins. In the *Hevea* enzyme, the respective Lysresidue forms a salt bridge with Glu-79, which is not present in *At*HNL. Introduction of this additional salt brige should be possible by creating the triple mutant Asn12Thr/ Phe80Glu/Met237Lys. The characterization of this variant is currently in progress.

#### Other HNL-homologous enzymes in Arabidopsis

Parallel with AtHNL several other enzymes with similarities to HbHNL and MeHNL were cloned and expressed in E. coli. None of them shows HNL-activity, although in all cases the catalytic triad is conserved. Taking a closer look to the alignment, neither the crucial residues proposed for Sselectivity (Thr-11 and Lys-236 in HbHNL) nor those for Rselectivity (Asn-12 in AtHNL) can be found in one of these proteins.

#### Acknowledgements

We acknowledge financial support from the Austrian Science Foundation (FWF) through the project P17132. X-ray diffraction data were collected at the EMBL beamline X13 (c/o DESY, Hamburg, Germany). We are indebted to the EMBLstaff (especially Andrea Schmidt) for their help in data collection. For help with enzyme purification we thank Ilona Frindi-Wosch.

#### References

- Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.-W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., and Terwilliger, T.C. 2002. PHE-NIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* D58: 1948-1954.
- Andexer, J., von Langermann, J., Mell, A., Bocola, M., Kragl, U., Eggert, T., and Pohl, M. 2007a. An R-selective hydroxynitrile lyase from Arabidopsis thaliana with an α/β-hydrolase fold *Angew. Chem. Int. Ed.* DOI: 10.1002/anie.200701455.
- J. Andexer, Guterl, J.-K., Sehl, T., von Langermann, J., Frindi-Wosch, I., Kruschinski, S., Bogo, E., Rosenkranz T., Fitter, J., Kragl, U., Eggert, T., and Pohl, M. 2007b. Comparative biochemical characterization of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β-hydrolase fold. *Submitted Chembiochem*.
- Becker, W., and Pfeil, E. 1966. Über das Flavinenzym D-Oxynitrilase. *Biochem. Z.* 346: 301-321.
- Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breithaupt, H., Pohl, M., Bönigk, W., Heim, P., Schimz,
  K.L., and Kula, M.R. 1999. Cloning and expression of
  (R)-hydroxynitrile lysae from Linum usitatissimum (flax).
  J. Mol. Catal. B: Enzym. 6: 315-332.
- Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham III, T.E., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Merz, K.M., Pearlman, D.A., Crowley, M., et al. **2006**. AMBER 9. University of California, San Francisco.
- CCP4. 1994. The CCP4 suite programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **D50**: 760-763.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA (http://www.pymol.org).
- Dreveny, I., Kratky, C., and Gruber, K. 2002. The active site of hydroxynitrile lyase from Prunus amygdalus: modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Sci.* 11: 292-300.
- Emsley, P., and K., C. 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* D60: 2126-2132.
- Gruber, K., Gartler, G., Krammer, B., Schwab, H., and Kratky, C. 2004. Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the alpha/beta-hydrolase superfamily: the threedimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of LYS236. *J. Biol. Chem.* 279: 20501-20510.
- Gruber, K., and Kratky, C. **2004**. Biopolymers for biocatalysis: Structure and catalytic mechanism of hydroxynitrile lyases. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **42**: 479-486.
- Kleywegt, G.J., and Brunger, A.T. 1996. Checking your imagination - Applications of the free R-value. *Structure* 4: 897-904.
- E. Krissinel and K. Henrick 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol. 372, 774-797.

#### STRUKTUR UND MECHANISMUS DER ATHNL

- Lauble, H., Förster, S., Miehlich, B., Wajant, H., and Effenberger, F. 2001a. Structure of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta in complex with substrates acetone and chloroacetone: implications for the mechanism of cyanogenesis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57: 194-200.
- Lauble, H., Miehlich, B., Förster, S., Wajant, H., and Effenberger, F. 2001b. Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta in complex with acetone cyanohydrin. *Protein Sci.* 10: 1015-1022.
- Lauble, H., Miehlich, B., Förster, S., Wajant, H., and Effenberger, F. 2002. Crystal structure of hydroxynitrile lyase from Sorghum bicolor in complex with the inhibitor benzoic acid: a novel cyanogenic enzyme. *Biochemistry* 41: 12043-12050.
- Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., and Sali, A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 291-325.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., and Olson, A.J. **1998**. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free-energy function. *J. Comput. Chem.* **19**: 1639-1662.

- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., and Schrag, J. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5: 197-211.
- Otwinowski, Z., and Minor, W. **1997**. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.* **276**: 307-326.
- Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C., and Griengl, H. 2007. Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 309-320.
- Read, R.J. **1986.** Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr.* **A42**: 140-149.
- Sharma, M., Sharma, N.N., and Bhalla, T.C. **2005.** Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. *Enzyme Microb. Tech.* **37**: 279-294.
- Wagner, U.G., Hasslacher, M., Griengl, H., Schwab, H., and Kratky, C. **1996**. Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from Hevea brasiliensis. *Structure* **4**: 811-822.
- Wajant, H., and Effenberger, F. **1996**. Hydroxynitrile lyases of higher plants. *Biol. Chem.* **377**: 611-617.



## DISKUSSION

Eine *R*-selektive HNL mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ist in zweierlei Hinsicht eine interessante Entdeckung. Zum einen war die *S*-Selektivität von mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen verwandten HNLs bisher als eines ihrer charakteristischen Merkmale anerkannt, zum anderen ist *Arabidopsis* die erste nicht-cyanogene Pflanze, aus der eine funktionelle HNL isoliert werden konnte, die zudem bezüglich ihrer Aktivität und ihres Substratspektrums mit den in der technischen Biokatalyse eingesetzten HNLs vergleichbar ist. Einen Überblick über die durchgeführten Arbeiten gibt Abbildung 6.1.



**Abbildung 6.1:** Überblick über die durchgeführten Arbeiten. Die in Fachzeitschriften veröffentlichten, eingereichten oder als Manuskript vorliegenden Schwerpunkte der Arbeit sind den entsprechenden Kapiteln der Arbeit zugeordnet.

#### 6.1. VERGLEICH VERSCHIEDENER HNL-AKTIVITÄTSTESTS

Wie in Kapitel 1.3 dargestellt, sind grundsätzlich drei Möglichkeiten etabliert, HNL-Aktivität zu detektieren. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Systeme sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

## 6.1.1. DER DIREKTE NACHWEIS MIT CHROMATOGRAPHISCHEN METHODEN IST ZEITAUFWÄNDIG

Der direkte Nachweis der gebildeten Produkte bzw. die Abnahme der Edukte mit empfindlichen Analysemethoden wie der Gaschromatographie (GC) ist gut zur ausführlichen Charakterisierung eines Enzyms bezüglich seines Substratspektrums sowie zur exakten Analyse der Enantiomerenüberschüsse der Edukte und Produkte geeignet, zum Durchmustern von Variantenbibliotheken aber nicht praktikabel, da neben der an sich schon relativ langen Analysezeit die Proben auch noch aufgearbeitet und derivatisiert werden müssen. Diese Derivatisierung, z.B. mit fluorierten Säureanhydriden ist zur Stabilisierung der Cyanhydrine gegenüber den hohen Temperaturen während der GC notwendia. Eine vereinfachte Analysemethode wurde von Asano et al. vorgestellt, bei der die Derivatisierung durch den Einsatz der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wegfällt, allerdings alle Proben weiterhin einzeln aufgearbeitet und vermessen werden müssen (Asano et al., 2005b). Die bisher beschriebenen Verfahren werden meist zur Analyse der auch auf Synthesereaktion eingesetzt, theoretisch die können aber Spaltungsrichtung übertragen werden (Abbildung 1.1).

### 6.1.2. SPEKTROSKOPISCHE KONTINUIERLICHE ASSAYS SIND AUF AROMATISCHE SUBSTRATE BESCHRÄNKT

Im Gegensatz dazu sind die klassischen spektrophotometrischen Enzymtests hauptsächlich auf die Beobachtung der Spaltungsreaktion ausgelegt. Ein großer Vorteil des Aktivitätstests ausgehend von Mandelonitril (BAUER *et al.*, 1999) ist, dass die Reaktion direkt verfolgt wird und nicht an andere Reaktionen gekoppelt werden muss, auf diese Weise können einfach kinetische Messungen erfolgen. Gemessen wird die Zunahme der Benzaldehydkonzentration bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption des korrespondierenden Cyanhydrins sehr gering und stört das

50

Messergebnis nicht. Neben der strikten Limitierung dieses Systems auf aromatische Substrate ist ein weiterer Nachteil, dass die Messung im UV-Bereich stattfindet und daher teure Küvetten bzw. Mikrotiterplatten (MTPs) aus Quarzglas verwendet werden müssen. Prinzipiell ist der Test auch in MTPs im Hochdurchsatz anwendbar (persönliche Mitteilung, J. Guterl, Universität Düsseldorf). Eine Alternative zu den empfindlichen und teuren MTPs aus Quarzglas sind MTPs mit einem Boden aus spezieller Folie, die für DNA-Bestimmungen im UV-Bereich eingesetzt werden (z.B. UV-Star® von Greiner Bio One). Der Assay kann ebenfalls zum Nachweis der Synthesereaktion angewendet werden; in diesem Fall wird die Abnahme der Benzaldehydkonzentration beobachtet (KRAGL, 1987).

#### 6.1.3. ASSAYS ZUM NACHWEIS VON BLAUSÄURE SIND UNIVERSELL EINSETZBAR

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden, die auf dem Nachweis der Carbonylkomponente oder der Cyanhydrine beruhen, werden andere Assays zum Nachweis von Blausäure eingesetzt. Diese haben den Vorteil, unabhängig von den jeweiligen spektroskopischen Eigenschaften der Substrate bzw. Produkte zu funktionieren und eignen sich insbesondere für den Aktivitätsnachweis mit aliphatischen Cyanhydrinen. Einen guten Überblick über die Methodenvielfalt zur Bestimmung von Blausäure gibt der Übersichtsartikel von SINGH und WASI (1986).

### 6.1.3.1. DER ERSTE HOCHDURCHSATZFÄHIGE UNIVERSELLE ASSAY AUF HNL-AKTIVITÄT WURDE IM RAHMEN DIESER ARBEIT ENTWICKELT

Einer der bekanntesten Nachweise von Cyanid beruht auf der so genannten "König-Reaktion" und wird zur Detektion von HNL-Aktivität mit dem Substrat Acetoncyanhydrin angewandt (SELMAR *et al.*, 1987). Der bisher nur im 10 mL-Maßstab beschriebene Test wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert, an das MTP-Format angepasst und die Anwendung als Hochdurchsatztestsystem (HTS-Assay) mit Zellrohextrakten gezeigt ( $\rightarrow$  KAPITEL 2). Erstmals wurde der modifizierte Test zur raschen Charakterisierung des Substratspektrums eingesetzt. Da viele Cyanhydrine nur schlecht in wässrigen Systemen löslich sind, war es zunächst schwierig, gleiche Konzentrationen verschiedener Substrate in Lösung zu bringen. Dieses Problem wurde durch den Zusatz eines einfachen Emulgators (Gummi Arabicum) gelöst. Die entstehende Trübung beeinflusst die Testgenauigkeit nicht. Kurz nach der Veröffentlichung des neuen Assays wurde ein weiterer Test publiziert, der auf dem Nachweis von Blausäure durch die Bildung von "Berliner Blau" basiert (KRAMMER et al., 2006). Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit beschriebenen Test wird dieser Test direkt mit Bakterienkolonien durchgeführt, die HNL exprimieren. Zu untersuchende Klone müssen also nicht in Flüssigmedien angezogen werden. Allerdings wird der Arbeitsaufwand durch das Übertragen der Kolonien auf eine Membran und den recht komplexen Sandwichaufbau des Tests erhöht. Vorteilhaft ist, dass auch dieser semiquantitative Test prinzipiell mit allen Substraten durchgeführt werden kann, dies wurde bisher für Mandelonitril und *m*-Phenoxymandelonitril gezeigt. Um die Löslichkeit zu erhöhen, wurde Dimethylformamid (DMF) zugesetzt. Der Einsatz organischer Lösungsmittel ist in Hochdurchsatz-Screeningassays normalerweise eher kontraproduktiv, da die Gefahr besteht, verbesserte Varianten zu identifizieren, die nicht etwa das betreffende Substrat besser umsetzen, sondern nur stabiler gegenüber dem zugesetzten Lösungsmittel sind. Da allerdings meist Enzyme für die Anwendung in technischen Prozessen gesucht werden, die ohnehin in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden, kann dieses Problem sogar als zusätzlicher Vorteil betrachtet werden (KRAMMER et al., 2006). Beachtet werden muss allerdings, dass damit nur die Stabilität des Biokatalysators gegenüber einem bestimmten Lösungsmittel (in diesem Fall DMF) erzielt wird, das dann nicht zwingend im späteren Prozess zum Einsatz kommt.

Tabelle	6.1:	Vergleich	verschiedener	Nachweissyste	eme von	HNL-Aktivität.	Dargestellt	sind die
Genauig	keit (l	bei quantita	ativen Bestimm	nungen) der ein	zelnen Te	ests, die Möglio	chkeit, das S	System in
Hochdur	chsat	zverfahren	einzusetzen,	die Universalitä	t bezügli	ch der Auswah	nl an Substr	aten, der
Zeitaufw	and u	nd die Mög	ichkeit, Anfang	gsreaktionsgesc	hwindigke	eiten zu messen	ı.	

	CHROMATOGRAPHIE		Spektrophotometrie		FILTERASSAY
	GC	HPLC	UV	KÖNIG- REAKTION	BERLINER BLAU
Genauigkeit	hoch	hoch	Mittel	mittel	semiquantitativ
HTS-FÄHIGKEIT	nein	nein	begrenzt	ja	ja
Universalität	ja	ja	Aromaten	ja	ja
ZEITAUFWAND	hoch	hoch	gering	mittel	mittel
ANFANGSREAKTI ONSGESCHWIN- DIGKEIT	indirekt	indirekt	direkt	indirekt	nein

Da alle als HTS-Systeme verwendbaren Tests ausschließlich die Spaltungsreaktion erfassen, ist es wichtig, positive Klone bzw. Enzyme umgehend auch auf deren Synthesekapazität von Cyanhydrinen zu testen. Zum einen kann von echter HNL-Aktivität erst ausgegangen werden, wenn diese in beiden Richtungen bestätigt wurde, da die in Rohextrakten gemessene schwache Spaltungsaktivität gegenüber Cyanhydrinen auch auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen sein kann ( $\rightarrow$  KAPITEL 4, HICKEL *et al.*, 1997b). Zum anderen spielt neben der reinen Aktivität des Enzyms seine Enantioselektivität eine große Rolle, die genauen Enantiomerenüberschüsse können nur mit quantitativen analytischen Verfahren (z.B. GC) bestimmt werden.

#### 6.2. IDENTIFIZIERUNG NEUER ENZYME – STRATEGIEN UND PROBLEME

Wie einleitend ( $\rightarrow$  1.3) beschrieben, gibt es verschiedene Strategien, neue Enzyme zu identifizieren: Grundsätzlich können sie in funktionsbasierte Verfahren wie die Analyse von Extrakten z.B. cyanogener Pflanzen und sequenzbasierte Methoden unterteilt werden. In dieser Arbeit wurde letztere verfolgt, dabei ist es unerlässlich, die kodierende DNA-Sequenz der zu durchsuchenden Gensequenz zu kennen. Im Vergleich zum funktionsbasierten Verfahren birgt dies gleichzeitig den Vorteil, dass man direkt das zum Protein bzw. zur Proteinaktivität zugehörige Gen kennt und dieses nicht noch über zeitaufwändige Methoden identifizieren muss, um es z.B. heterolog in Bakterien exprimieren zu können.

Der große Nachteil der sequenzbasierten Methode ist, dass keine gänzlich neuen Proteine entdeckt werden können, sondern nur solche, die Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzen aufweisen. Vom Gesichtspunkt der Arbeitszeit gesehen, ist der funktionsbasierte Ansatz bis zum Entdecken der gesuchten Funktion weniger aufwändig, da zunächst keine zeitraubenden Klonierungs- und Expressionsexperimente durchzuführen sind. Diese werden allerdings spätestens dann notwendig, wenn das Protein in großem Maßstab produziert werden soll, z.B. für die technische Anwendung.

Cyanogenese wurde bisher in mehr als 3000 Pflanzenarten aus über 100 Familien entdeckt, nur für einen Bruchteil dieser Organismen wurden bisher aber auch HNLs beschrieben (ASANO *et al.*, 2005b; SHARMA *et al.*, 2005). Die funktionsbasierte systematische Untersuchung cyanogener Pflanzenarten auf HNL-Aktivität war also

nicht immer erfolgreich, denn nicht alle cyanogenen Pflanzen scheinen über funktionelle HNLs zu verfügen, die die in den verwendeten Tests benutzten Substrate akzeptieren (ASANO *et al.*, 2005b). Da das Freisetzen von HCN aus dem Cyanhydrin auch nicht-enzymkatalysiert erfolgt, ist es möglich, dass es in den untersuchten Pflanzenspezies tatsächlich keine HNLs gibt.

In Sequenzdatenbanken wie der Genbank am NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) oder der "EMBL Nucleotide Sequence Database" (http://www.ebi.ac.uk/embl) sind viele verschiedene Gene mit Sequenzähnlichkeiten zu HNLs annotiert, allerdings ist dies keine Garantie für eine tatsächlich HNL-Aktivität. Diese muss im Einzelnen experimentell überprüft werden. So weist z.B. das *Oryza sativa* stammende Gen *pir7b* deutliche Ähnlichkeit (56%) zur *M*eHNL bzw. *Hb*HNL auf, jedoch zeigt das Genprodukt nachweislich keine HNL-Aktivität (WÄSPI *et al.*, 1998).

Die meisten in den Datenbanken hinterlegten Gen- bzw. Proteinsequenzen stammen aus Modellorganismen wie *Drosophila melonogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, deren Genome komplett sequenziert sind. So ist es nicht verwunderlich, dass sich beim Durchsuchen der Datenbanken viele Gene finden, die aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* stammen (PENNISI, 2000).

#### 6.3. SEQUENZEN MIT ÄHNLICHKEITEN ZU HNLS IN ARABIDOPSIS

die Durchsucht Sequenzdatenbanken auf Proteinebene mit man den Schlüsselwörtern "Arabidopsis" und "Hydroxynitrile Lyase", findet man auf Anhieb 16 Proteinsequenzen, die als putative HNLs annotiert sind. Führt man einen Sequenzvergleich mit dem Programm BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), beschränkt auf das Arabidopsis-Genom und mit der MeHNL-Proteinsequenz als Suchsequenz, durch, erhält man über 20 Treffer mit Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene von über 50% (s. KAPITEL 4), von denen einige aber doppelt auftreten. Neben MeHNL- bzw. HbHNL-ähnlichen Proteinen gibt es auch Sequenzen im Arabidopsis-Genom, die Ähnlichkeiten zu anderen HNLs aufweisen, worauf in 6.3.2-4 näher eingegangen wird.

## 6.3.1. GENE MIT SEQUENZÄHNLICHKEIT ZU HBHNL UND MEHNL SIND AM EINFACHSTEN ZU FINDEN

Im Arabidopsis-Genom fallen zunächst Gene mit Sequenzähnlichkeiten zu den HNLs aus Manihot esculenta und Hevea brasiliensis auf, die beide zur Familie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gehören ( $\rightarrow$  1.2.3.1). Da viele Proteine aus dieser Familie bisher kloniert und mit Erfolg in Mikroorganismen funktional überexprimiert wurden, waren die Aussichten, dass dies auch mit den MeHNL- bzw. HbHNL-ähnlichen Enzymen aus Arabidopsis funktioniert, recht gut, insbesondere da diese beiden HNLs bereits in verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Wirten mit guten Ausbeuten exprimiert werden können (Tabelle 1.2) und weder Cofaktoren noch problematische posttranslationale Modifikationen erforderlich sind.

Im Lauf dieser Arbeit wurden sieben Gene aus dieser Gruppe aus der cDNA von *Arabidopsis*-Keimlingen kloniert, erfolgreich in *E. coli* exprimiert und auf HNL-Aktivität getestet. Eines von ihnen erwies sich tatsächlich als funktionale HNL ( $\rightarrow$  KAPITEL 3 & 4).

Da für Proteine mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung viele verschiedene Aktivitäten beschrieben sind (Tabelle 1.3, HOLMQUIST, 2000; OLLIS et al., 1992), sollte mit Hilfe weiterer Enzymtests geprüft werden, ob die entsprechenden Proteine andere für  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen typische Aktivitäten zeigen. Hierbei wurden die Zellrohextrakte mit verschiedenen Tests untersucht, die typische Substrate für Lipasen, Esterasen, Phospholipasen, Proteasen, Epoxidhydrolasen, Haloalkan-Dehalogenasen, Phosphatasen und Peroxidasen enthalten ( $\rightarrow$  KAPITEL 4)¹. Dass bei diesem Ansatz keine Aktivitäten entdeckt wurden, muss nicht zwangsläufig heißen, dass die Enzyme keine katalytische Aufgabe in Arabidopsis erfüllen. Mit den durchgeführten Tests wurden nicht alle für  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen bekannten Aktivitäten erfasst und zudem jeweils nur wenige Substrate getestet. Noch nicht beschriebene Funktionen oder spezielle Substratpräferenzen können bei solchen HTS-Verfahren nie ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz werden alle Proteine in Arabidopsis exprimiert, da sie sonst nicht aus einer cDNA-Bank hätten kloniert werden können. Die Gene sind überwiegend homogen über alle fünf Chromosomen von Arabidopsis verteilt, nur auf dem zweiten Chromosom fällt eine Anhäufung von HNL-ähnlichen Genen auf (Abbildung 6.2), die auch untereinander sehr ähnlich sind. Dies legt den Schluss

¹ Die verschiedenen Aktivitätstests wurden in Zusammenarbeit mit Eliane Bogo am Institut für Molekulare Enzymtechnologie durchgeführt.

nahe, dass sie im Verlauf der Evolution durch Genduplikation entstanden sind. Ein weiteres kleines Cluster, bestehend aus einem Gen und einem unvollständigem Gen (Pseudogen), wird auf dem vierten Chromosom beschrieben (TERRYN *et al.*, 1999).



**Abbildung 6.2:** Verteilung *Me*HNL-ähnlicher nicht-redundanter Sequenzen auf den Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*. Die Abbildung wurde mit Hilfe des "Chromosome Map Tools" auf der TAIR-Homepage (www.arabidopsis.org) erstellt. Die Bezeichnungen entsprechen ebenfalls der TAIR-Nomenklatur. Mit * sind die in Clustern auftretenden Gene markiert, das Cluster auf dem vierten Chromosom besteht aus dem Gen At4g37150 und einem Pseudogen (nicht eingezeichnet).

#### 6.3.2. PAHNL-ÄHNLICHE GENE SIND AN DER BLÜTENENTWICKLUNG BETEILIGT

Das Gen HOTHEAD, das in *Arabidopsis* eine Rolle in der Blütenentwicklung spielt, und einige verwandte Sequenzen weisen etwa 50% Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu der FAD-abhängigen HNL aus *Prunus serotina* bzw. zu anderen GMC Oxidoreduktase homologen Proteinen auf ( $\rightarrow$  1.2.1, KROLIKOWSKI *et al.*, 2003). Das Genprodukt wurde noch nicht auf HNL-Aktivität getestet, es wäre jedoch sehr interessant zu klären, ob es zusätzlich zu seiner beschriebenen Aktivität noch andere katalytische Fähigkeiten hat. Andere Genprodukte in *Arabidopsis* sind direkt als putative FAD-haltige HNLs annotiert, z.B. das Protein mit der Zugangsnummer ABE65766. Unter rein wissenschaftlichen Aspekten ist die Frage, ob es unter diesen Genen funktionelle HNLs gibt, sehr interessant; aufgrund der komplizierteren Struktur ist die Wahrscheinlichkeit, dass die entsprechenden Enzyme problemlos in für den technischen Einsatz ausreichenden Mengen in mikrobiellen Wirten produziert werden können, allerdings gering.

#### 6.3.3. ADH-HOMOLOGE SEQUENZEN KÖNNTEN AUCH HNL-AKTIVITÄT HABEN

Auch zur HNL aus *Linum usitatissimum* ( $\rightarrow$  1.2.2) ähnliche Sequenzen lassen sich in *Arabidopsis* finden. Aufgrund der großen Sequenzähnlichkeit zu ADHs sind diese allerdings immer als putative ADHs annotiert, weisen zum Teil aber Ähnlichkeiten bis zu 54% auf Aminosäureebene mit der *Lu*HNL auf, dies trifft z.B. auf die Proteine mit den Zugangsnummern AAM13113, ABM06039 und AAU15136 zu.

## 6.3.4. SCP-verwandte Proteine erfüllen verschiedene Aufgaben in Arabidopsis

Eine in den letzten Jahren intensiv untersuchte Gruppe von *Arabidopsis*-Genen sind die Gene, die für die Familie der Serin-Carboxypeptidase (SCP) verwandten Proteine kodieren. SCPs katalysieren ursprünglich die Spaltung C-terminaler Peptidbindungen von Peptiden oder Proteinen. Für einige verwandte Proteine sind allerdings auch andere Funktionen wie z.B. Acyltransferaseaktivität beschrieben. Auch die HNL aus *Sorghum bicolor* gehört zu den SCP-ähnlichen Proteinen. Insgesamt finden sich in *Arabidopsis* 51 zu dieser Gruppe gehörende Gene, von denen bisher nur wenige charakterisiert sind (FRASER *et al.*, 2005). Wie im Fall der oben beschriebenen mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen verwandten HNL-ähnlichen Proteine ( $\rightarrow$  6.3.1) kann man auch bei den SCP-kodierenden Genen das Auftreten von Genclustern beobachten. In ihnen befinden sich homologe Gene mit unterschiedlichen Substratspezifitäten, die sich wahrscheinlich im Laufe der Evolution divergent entwickelt haben (FRASER *et al.*, 2007). Die meisten der bisher bei diesen Proteinen und ihren Homologen aus anderen Pflanzen bestimmten Aktivitäten spielen in Stoffwechselwegen eine Rolle,

die mit Abwehrmechanismen zu tun haben, so z.B. einige SCPs in Tomaten, deren Expression bei Verletzung des Pflanzengewebes durch Jasmonsäure induziert wird (FRASER *et al.*, 2005). Das Vorhandensein von HNLs würde diesem Spektrum an Aktivitäten eine weitere Funktion, die mit Schutzmechanismen gegenüber Schädlingen verbunden ist, hinzufügen. Auch hier wäre das Klonieren und die heterologe Expression einer solchen potenziellen HNL mit einem Risiko verbunden, da das Protein wie die *Sb*HNL eine umfangreiche post-translationale Modifikation erfordern und sich daher vermutlich nur schlecht in Mikroorganismen exprimieren lassen könnte.

#### 6.3.5. WELCHE FUNKTION KÖNNTE EINE HNL IN ARABIDOPSIS HABEN?

Über die natürliche Funktion der *At*HNL kann bisher nur spekuliert werden, da sich in der physiologischen Umgebung des Enzyms keine entsprechenden Substrate befinden. Eine katalytische Funktion als HNL ist so sehr unwahrscheinlich, andere Aktivitäten wie z.B. Lipase- oder Proteaseaktivität wurden mit den eingesetzten Standardsubstraten wie Tributyrin, *p*-Nitrophenylpalmitat und Milchpulver auch nicht entdeckt (→ KAPITEL 4). Eine denkbare Möglichkeit ist, dass *Arabidopsis* im Laufe der Evolution die Fähigkeit zur Cyanogenese verloren hat, die katabolen Enzyme aber noch vorhanden sind und sozusagen als evolutionäres Relikt betrachtet werden können.

Betrachtet man die Verteilung der bekannten HNL-enthaltenden Pflanzen in der Systematik, fällt auf, dass über zwei Drittel zur Unterklasse der *Rosidae* (Rosenähnliche) gerechnet werden. Hierzu gehören mit Ausnahme der *Sb*HNL alle klassischen HNLs ( $\rightarrow$  1.2), sowie viele der neu beschriebenen Spezies, z.B., *Mammea americana* (Mammiapfel, SoLIS *et al.*, 1998), *Vicia sativa* (Futterwicke, HAN *et al.*, 2006), *Passiflora edulis* (Maracuja) oder *Baliospermum montanum* (Danti, ASANO *et al.*, 2005b). Die Familie der *Brassicaceen*, zu der *Arabidopsis thaliana* gehört, ist ebenfalls in dieser Unterklasse zu finden. Diese Verwandtschaft legt die Vermutung nahe, dass sich die einzelnen Familien aus Vorfahren mit funktionalen HNLs entwickelt, die HNL-Aktivität aber nur in manchen Familien über die Entwicklungsgeschichte hinweg erhalten blieb. Inwieweit die neu beschriebenen HNLs strukturell mit den  $\alpha/\beta$ -Hydrolase verwandten Enzymen, wie sie bisher aus den Familien der *Euphorbiaceen* (*Me*HNL, *Hb*HNL) und den *Brassicaceen* (*At*HNL) bekannt sind, übereinstimmen, ist noch nicht bekannt. Da sich HNLs aus verschiedenen Vorläuferproteinen in einem Prozess der konvergenten Evolution entwickelt haben, ist es genauso gut möglich, dass bei den neuen Enzymen strukturelle Verwandtschaften zu bekannten HNLs oder gänzlich neue Strukturmotive gefunden werden.

#### 6.4. DIE ATHNL IST IM GEGENSATZ ZU MEHNL UND HBHNL R-SPEZIFISCH

Der auffälligste Unterschied zwischen der hier beschriebenen *At*HNL und den sequenzähnlichen Enzymen *M*eHNL und *Hb*HNL ist die invertierte Enantioselektivität. Bisher galt die *S*-Selektivität der HNLs mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung als eine deren charakteristischen Eigenschaften ( $\rightarrow$  1.2.3). Bezüglich des Substratspektrums gibt es zwischen der *At*HNL und den homologen Enzymen keine großen Unterschiede, beide Enzyme setzen sowohl aliphatische als auch aromatische Substrate mit hohen Enantiomerenüberschüssen um ( $\rightarrow$  KAPITEL 3)². Auch im Hinblick auf physikalische Eigenschaften wie Molekulargewicht oder isoelektrischem Punkt sind die Enzyme ähnlich. Die Stabilität des neuen Enzyms gegenüber Einflüssen wie pH-Wert und Temperatur wurde im Laufe der Arbeiten besonders betrachtet, mit dem Ergebnis, dass die *At*HNL im Vergleich zur *M*eHNL bezüglich pH-Werten unter 5 und Temperaturen über 30°C weniger stabil ist³. Im Gegensatz zur *M*eHNL und *Hb*HNL (HICKEL *et al.*, 1997a) wird die *At*HNL allerdings durch Acetat nicht inhibiert ( $\rightarrow$  KAPITEL 4).

#### 6.4.1. DIE STRUKTUR DER ATHNL

Die Kenntnis der atomaren Struktur eines Enzyms ist häufig die Grundlage für Theorien und Modelle zum katalytischen Mechanismus. Darauf aufbauend können durch rationales Design Eigenschaften des Biokatalysators, wie Substratspezifität oder Enantioselektivität verändert oder erweitert werden. Ein Beispiel hierzu ist die auf rationalem Design beruhende Verbesserung der HNL aus *Prunus amygdalus* bezüglich des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses in der Synthese von

 ² Die Untersuchungen zum Substratspektrum der AtHNL in der Synthese wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für technische Chemie der Universität Rostock im Arbeitskreis von Prof. Dr. Udo Kragl von Annett Mell und Jan von Langermann durchgeführt.
 ³ Alle Daten betreffend pH-Stabilitäten wurden zusammen mit Jan Guterl und Torsten Sehl am Institut

³ Alle Daten betreffend pH-Stabilitäten wurden zusammen mit Jan Guterl und Torsten Sehl am Institut für Molekulare Enzymtechnologie (Universität Düsseldorf) erhoben.

pharmakologisch aktiven "Prilen" (WEIS *et al.*, 2005). Bei der *At*HNL war die Auflösung der Struktur zudem sehr wichtig, um die molekulare Ursache für die invertierte Enantioselektivität zu identifizieren und so detailliertere Erkenntnisse über die Stereokontrolle von HNLs zu gewinnen.

#### 6.4.1.1. DAS STRUKTURMODELL REICHT ZUR KLÄRUNG DES MECHANISMUS NICHT AUS

Zunächst wurde auf Basis der Kristallstruktur der *Hb*HNL (pdb-Nummer: 1QJ4) ein Strukturmodell der *At*HNL erstellt ( $\rightarrow$  KAPITEL 3)⁴. Mit einer mittleren Abweichung der C_a-Atome von nur 0,2 Å, zeigt das Strukturmodell eine hohe Übereinstimmung mit der *Hb*HNL-Struktur und weist zudem auf eine große Genauigkeit hin. Aufgrund dieses Modells wurden Mutanten geplant, mit denen die putative katalytische Triade (Ser-81, Asp-208, His-236) experimentell verifiziert wurde. Weniger erfolgreich waren allerdings Mutationen, die zur Identifizierung von Aminosäureresten dienen sollten, die die Stereoselektivität der *At*HNL bestimmen. Angelehnt an die Struktur der *Hb*HNL mit gebundenem Substrat (pdb-Nummer: 1YB6) wurden beide Mandelonitril-Enantiomere in das *At*HNL-Modell gefittet.



**Abbildung 6.2:** Seitenketten im aktiven Zentrum der *At*HNL (grau), wie sie vom Strukturmodell vorhergesagt wurden, im Vergleich mit der Kristallstruktur der *Hb*HNL mit gebundenem (*S*)-Mandelonitril (magenta, 1YB6). Das in das *At*HNL-Strukturmodell modellierte Substrat (*R*)-Mandelonitril könnte durch die Aminosäurereste Tyr-14 und Leu-129 stabilisiert werden, was die *R*-Selektivität der AtHNL erklären könnte. Diese Theorie konnte experimentell nicht bestätigt werden und wurde später durch die Lösung der Kristallstruktur widerlegt. Abbildung modifiziert aus KAPITEL 3.

⁴ Das Strukturmodell wurde von Dr. Marco Bocola an der Universität Regensburg, Institut für Physikalische Biochemie 2, erstellt. Punktmutanten wurden zusammen mit Dr. Bocola geplant.

Aufbauend auf diesen Enzym-Substratkomplexen wurden die Reste Tyr-14 und Leu-129 identifiziert, die die *R*-Selektivität des Enzyms bedingen könnten (Abb. 6.2). Dies konnte allerdings durch die entsprechenden Punktmutanten nicht bestätigt werden. Sowohl die Variante Tyr14Cys ( $\rightarrow$  KAPITEL 3), die der Theorie nach mehr Platz für das Substrat bieten und so keine ausgeprägte Enantioselektivität mehr haben sollte, als auch die Doppelmutante Tyr14Cys/ Leu129Trp, in der die großen und kleinen Seitenketten vertauscht sind und die so die umgekehrte Stereopräferenz haben sollte, sind in Synthese- und Spaltungsreaktion unverändert *R*-selektiv. Für die Aufklärung des Enzymmechanismus ist die Genauigkeit des Modells in diesem Fall nicht ausreichend.

#### 6.4.1.2. DIE KRISTALLSTRUKTUR DER ATHNL KONNTE BIS ZU 2.5 Å AUFGELÖST WERDEN

Im nächsten Schritt wurde aus diesem Grund die Kristallisation und Röntgenstrukturuntersuchung angegangen ( $\rightarrow$  KAPITEL 5). In den Experimenten konnten Kristalle der AtHNL gewonnen werden, deren Röntgenstrukturanalyse eine Auflösung bis 2.5 Å ergab⁵. Bei Überlagerung mit dem zuvor entwickelten Strukturmodell ergibt sich eine mittlere Abweichung der C_{$\alpha$}-Atome von 0,93 Å. Diese Varianz ist an sich sehr gering, bei genauer Betrachtung des aktiven Zentrums zeigt sich allerdings, dass die Positionen einiger Aminosäureseitenketten (Leu-147, Tyr-14) im Modell falsch vorhergesagt worden sind, wodurch sich andere sterische Verhältnisse im aktiven Zentrum ergeben. Im Gegensatz zu den anhand des Modells modellierten Substratkomplexen wurde die Position des Substrates in der HbHNL-Struktur (pdb-Nummer: 1YB6) nicht als Orientierungspunkt verwendet, vielmehr wurde das Substrat mittels eines genetischen Algorithmus ausgehend von verschiedenen Startpunkten in die Kristallstruktur "gedockt". In allen Fällen wurde der im Folgenden und Kapitel 5 beschriebene Enzym-Substratkomplex als die Lösung mit der geringsten Bindungsenergie identifiziert, was auf die Plausibilität des Ergebnisses hinweist. Als Konsequenz daraus unterscheidet sich der resultierende Substratkomplex wesentlich von dem auf Basis des Strukturmodells erstellen Komplex. Hieraus ergibt sich, dass die Aminosäurereste Asn-12 und Met-237

⁵ Die Kristallisierung der *At*HNL wurde in Zusammenarbeit mit Nicole Staunig in der Arbeitsgruppe von Dr. Karl Gruber an der Universität Graz (Institut für Chemie, Abteilung Strukturbiologie) durchgeführt.

vermutlich im Wesentlichen für die *R*-Selektivität der *At*HNL verantwortlich sind ( $\rightarrow$  KAPITEL 5).

## 6.4.2. DIE KATALYTISCHE TRIADE WIRD IN DER ATHNL ANDERS ALS IN DER HBHNL GENUTZT

Aufgrund des in die Struktur modellierten Substrats (*R*)-Mandelonitril konnte eine Theorie zum Mechanismus der *At*HNL aufgestellt werden ( $\rightarrow$  KAPITEL 5)⁶. Für das strukturell verwandte Enzym *Hb*HNL ist die entsprechende Kristallstruktur des Substratkomplexes mit (*S*)-Mandelonitril beschrieben (1YB6). Wie in Abbildung 6.3 gezeigt, befindet sich der aromatische Ring des Substrats in der *At*HNL fast an der gleichen Position wie in der *Hb*HNL, allerdings sind Hydroxyl- und Cyanidgruppe aufgrund der gegensätzlichen Stereoselektivität vertauscht.



**Abbildung 6.3:** Überlagerung (Stereobild) der Enzym-Substrat-Komplexe von *At*HNL (mit (*R*)-Mandelonitril (hellbraun), modelliert in die Kristallstruktur (magenta)) und *Hb*HNL (mit (*S*)-Mandelonitril (blau), gebunden in der Kristallstruktur (gelb, pdb-Nummer: 1YB6)). Abbildung aus KAPITEL 5.

Wie in KAPITEL 5 ausführlich dargestellt, unterscheidet sich der für die *At*HNL postulierte Katalysemechanismus in einigen grundlegenden Punkten von dem der *Hb*HNL oder *Me*HNL. Am auffälligsten ist der andere Mechanismus der katalytischen

⁶ Das Modell zum Mechanismus der *At*HNL wurde von Dr. Karl Gruber (Karl-Franzens-Universität Graz, Strukturbiologie) entwickelt.

Triade, denn im Gegensatz zu den anderen Enzymen ( $\rightarrow$  1.2.3.1) wird in der *At*HNL das Proton der Hydroxylgruppe vermutlich direkt durch das katalytische Histidin angegriffen und nicht über das Serin der Triade als Zwischenschritt. Trotzdem ist die vollständige katalytische Triade an der Reaktion beteiligt, das Serin dient im nächsten Schritt dazu, das abstrahierte Proton auf die freie Cyanidgruppe zu übertragen.



**Abbildung 6.4:** Putativer Reaktionsmechanismus der *At*HNL. Im Gegensatz zur *Hb*HNL wird das Substrat direkt durch das katalytische Histidin deprotoniert. Die Hydroxylgruppe des Substrats wird durch die Amidgruppe von Asn-12, die Cyanidgruppe durch die Peptidbindungen der Aminosäuren Ala-13 und Phe-82 stabilisiert (1). Das katalytische Serin vermittelt die Übertragung des Protons auf
die Cyanidgruppe (2), so dass im Anschluss die Cabonylkomponente und HCN freigesetzt werden können (3). Abbildung modifiziert aus KAPITEL 5.

Die andere Positionierung der funktionellen Gruppen des Substrates hat nicht nur zur Folge, dass sich die Hydroxylgruppe in direkter Nähe zum katalytischen Histidin befindet, sondern auch, dass andere Aminosäurereste (Asn-12) ihre Stabilisierung sowie die der Cyanogruppe übernehmen (Abb. 6.3). Vor allem die positive Ladung zur Stabilisierung des Cyanids erfolgt in der *At*HNL vermutlich völlig anders als bei den bekannten HNLs. In der *At*HNL kommt hierfür nur ein Helixdipol in Frage ( $\rightarrow$  KAPITEL 5), während diese Stabilisierung in der *Hb*HNL durch eine positive geladene Seitenkette (Lys-236,  $\rightarrow$  1.2.3.1) bzw. durch ein eher diffuses positives Potenzial mehrerer Seitenketten in der *Pa*HNL ( $\rightarrow$  1. 2.2) erfolgt (GRUBER und KRATKY, 2004).

Das mechanistische Modell konnte durch experimentelle Daten bereits teilweise bestätigt werden. Erste Ergebnisse zeigen die Einbindung des Asn-12 in den katalytischen Mechanismus, wird mittels einer Punktmutation die korrespondierende Aminosäure von der HbHNL (Thr-11) eingeführt, zeigt die entsprechende Variante keine HNL-Aktivität mehr. Die Reste der katalytischen Triade Ser-81, Asp-208 und His-236 wurden schon aufgrund des Strukturmodells und Sequenzvergleichen mit nicht-funktionellen Resten substituiert. Da alle diese Varianten nur noch geringe Restaktivitäten zeigen, konnte so die Bedeutsamkeit dieser Reste für die Funktion des Proteins ebenfalls gezeigt werden ( $\rightarrow$  KAPITEL 3). Eine weitere interessante Fragestellung war, ob mit wenigen Aminosäureaustauschen eine Inversion der Stereoselektivität möglich ist. Der erste Versuch, die entsprechenden Aminosäuren Asn-12 und Met-237 gegen die in der MeHNL und HbHNL typischen Reste auszutauschen (Asn12Thr/ Met237Lys) schlug fehl, da die erzeugte Variante keinerlei Aktivität aufweist. Hierfür könnten jedoch vorrangig Probleme bei der Expression verantwortlich sein, denn die Enzymvariante lag in den E. coli-Zellen hauptsächlich unlöslich in Form von inclusion bodies vor, die übrigens auch bei der Einzelmutante Met237Lys auftraten. Bei genauer Betrachtung der HbHNL-Struktur fällt auf, dass der Lysinrest vermutlich durch eine Salzbrücke mit Glutamat in der richtigen Position stabilisiert wird, um während der Katalyse mit dem Cyanid interagieren zu können. Daher wäre die Dreifachmutante Asn12Thr/ Phe80Glu/ Met237Lys ein interessanter Kandidat für die invertierte Enantioselektivität.

Das vorgestellte Modell bietet weiterhin eine Erklärung dafür, dass von allen getesteten HNL-ähnlichen Enzymen aus *Arabidopsis* nur die *At*HNL aktiv ist, da nur in dieser Sequenz die genannten Aminosäurereste zur Stabilisierung des Substrates vorhanden sind. Weder Asn-12 für (*R*)-Cyanhydrine im *At*HNL-Modell noch Thr-11 (und Lys-237) für (*S*)-Cyanhydrine in der *Hb*HNL (und *Me*HNL) sind in den anderen Sequenzen, die alle eine konservierte katalytische Triade aufweisen, zu finden ( $\rightarrow$  KAPITEL 4 & 5).

### 6.5. DIE ATHNL IST EINE GUTE ALTERNATIVE FÜR DIE SYNTHESE VON (R)-CYAN-HYDRINEN

Eine neue R-selektive HNL mit einem breiten Substratspektrum stellt eine interessante Alternative zu den bisher in biokatalytischen Prozessen eingesetzten R-HNLs dar. In Tabelle 6.2 sind die Vor- und Nachteile der momentan in technischen Prozessen eingesetzten R-HNLs und der AtHNL zusammengefasst. Zur Synthese von (R)-Cyanhydrinen wird bisher hauptsächlich die PaHNL verwendet, weiterhin wird die ebenfalls *R*-selektive *Lu*HNL eingesetzt, deren großer Nachteil jedoch darin besteht, dass sie keine aromatischen Substrate akzeptiert, diese werden von der AtHNL jedoch sehr schnell und mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen umgesetzt. Bezüglich der Stabilität, vor allem im sauren pH-Bereich ist die AtHNL der PaHNL unterlegen, allerdings kann die AtHNL durch Zusatz von Stabilisatoren wie Sorbitol oder Saccharose stabilisiert werden ( $\rightarrow$  KAPITEL 4). Je nachdem, welches Cyanhydrin produziert werden soll, ist es nach neueren Erkenntnissen auch möglich, den Prozess bei höheren pH-Werten durchzuführen. So ist z.B. 3-Phenoxymandelonitril, dass von der AtHNL mit einem Enantiomerenüberschuss von 95% gebildet wird ( $\rightarrow$  KAPITEL 3) bei pH-Werten von 7 stabil. Es wurde gezeigt, dass unter diesen Bedingungen ein einzelnes Enantiomer produziert werden kann, ohne dass durch die chemische Hintergrundreaktion zusätzlich das Racemat entsteht (persönliche Mitteilung, J. von Langermann, Universität Rostock).

Ein großer Vorteil der *At*HNL liegt darin, dass sie in *E. coli* produziert werden kann, dieser Expressionswirt ist im Vergleich zum *Pichia*-System, im dem die *Pa*HNL exprimiert wird, weniger komplex. Versuche, die *Pa*HNL ebenfalls in *E. coli* zu exprimieren, führten bisher nur zu inaktivem Enzym (WEIS et al., 2005), was wahrscheinlich auf die nötigen posttranslationalen Modifikationen zurückzuführen ist.

Die *Lu*HNL kann zwar ebenfalls in *E. coli* produziert werden, allerdings mit deutlich niedrigeren Ausbeuten (persönliche Mitteilung, J. Guterl, Universität Düsseldorf).

Ein Vorteil der Expression der PaHNL im Pichia-System ist, dass das Enzym in den Kulturüberstand sekretiert und aus diesem gleich gewonnen werden kann. Das Enzym aus Arabidopsis katalysiert die Synthese von Cyanhydrinen sowohl in gereinigter Form als auch als Rohextrakt, so dass es auch in diesem Fall nicht notwendig ist, das Enzym aufzureinigen. Als schnelle und einfache Enzymaufbereitung hat sich das Lyophilisieren aufgeschlossener Fermentationszellen herausgestellt. Die Umsätze SO erreichten und Enantiomerenüberschüsse unterscheiden sich nicht vom gereinigten Enzym.

Enzym	PAHNL	<i>Lu</i> HNL	A7HNL
VORTEILE	+ breites Substratspektrum	+ Expression in <i>E. coli</i> möglich	+ breites Substratspektrum + gute Expression in <i>E. coli</i>
NACHTEILE	<ul> <li>eukaryotische Expres- sionssysteme notwendig</li> <li>posttranslationale</li> <li>Modifikationen</li> </ul>	<ul> <li>Substratspektrum</li> <li>beschränkt auf aliphatische</li> <li>Aldehyde und Ketone/</li> <li>Cyanhydrine</li> </ul>	- Stabilität gering bei pH < 5

Tabelle 6.2: Vergleich der in technischen Prozessen eingesetzten R-HNLs mit der AtHNL.

Eine weitere interessante Eigenschaft der *At*HNL ist die im Vergleich zur *M*eHNL deutlich höhere Aktivität in Acetatpuffer. Die Acetat-Inhibierung ist beim Einsatz der Enzyme in Syntheseprozessen oftmals ein Problem, da dieser Puffer aufgrund der guten Pufferkapazität im schwach sauren pH-Bereich und der geringen Molekülgröße des Pufferions (geringe Kohlenstofflast in den Abwässern) in der industriellen Synthese verwendet wird.

Viele Biokatalysatoren werden in Form von Immobilisaten oder quervernetzen Enzymaggregaten oder -kristallen (CLEAs bzw. CLECs) eingesetzt (CHMURA et al., 2006; MATEO et al., 2004). Diese Anwendungsformen erhöhen die Stabilität der Enzyme häufig und sind vielleicht eine Möglichkeit, die *At*HNL noch weiter für den Einsatz in der industriellen Synthese zu verbessern.

#### 6.6. AUSBLICK

Mit der biochemischen Charakterisierung und der Strukturaufklärung der AtHNL und der Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen HNL-Tests ist die nötige Basis geschaffen, um die Eigenschaften des Enzyms mit Methoden des rationalen Designs oder der gerichteten Evolution bezüglich Substratspektrum und Stabilität weiter zu verbessern. Ein lohnendes Ziel wäre hier z.B. die Erweiterung des Substratspektrums im Hinblick auf sterisch anspruchsvolle Ethylketone sowie die Stabilisierung gegenüber niedrigem pH.

Zur endgültigen Verifizierung der Substratbindung wäre zudem noch die Kristallisierung eines Enzym-Substrat-Komplexes sinnvoll. Durch die Auflösung einer Mandelonitril Kristallstruktur mit gebundenem könnte der vorgeschlagene Mechanismus überprüft werden. Versuche, die Stereoselektivität der AtHNL mit einigen wenigen Aminosäureaustauschen umzukehren, waren bisher nicht erfolgreich, da die Varianten nicht in löslicher Form exprimiert wurden. Im modellierten Substratkomplex konnten allerdings noch weitere Reste identifiziert werden, die direkt oder indirekt mit dem kritischen Lysin, das die Stabilisierung der Cyanidgruppe von (S)-Mandelonitril übernehmen soll, interagieren. Durch das Einbringen dieser Aminosäuren in die AtHNL könnte die Struktur soweit stabilisiert werden, dass die Umsetzung von (S)-Cyanhydrinen möglich wird.

Im Hinblick auf andere potenzielle HNLs aus *Arabidopsis thaliana* haben sich während der Arbeiten einige interessante Ansatzpunkte ergeben. Dies sind einerseits die mit anderen HNLs ähnlichen Sequenzen in der *At*HNL ( $\rightarrow$  6.3) und andererseits weitere  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-ähnliche Genprodukte, für die bisher keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte. Vor allem für die *Pa*HNL-und die SCP-ähnlichen Proteine stellt sich die Frage, ob diese neben ihren bereits beschriebenen Aufgaben noch eine HNL-Nebenaktivität besitzen.

### LITERATURVERZEICHNIS



- Albrecht J., Jansen I. und Kula M. R. (1993) Improved purification of an (*R*)oxynitrilase from *Linum usitatissimum* (flax) and investigation of the substrate range. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 191-203.
- Asano Y., Tamura K., Doi N., Ueatrongchit T., H-Kittikun A. und Ohmiya T. (2005b) Screening for new hydroxynitrilases from plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 2349-2357.
- Bauer M., Geyer R., Griengl H. und Steiner W. (2002) The use of Lewis cell to investigate the enzyme kinetics of an (S)-hydroxynitrile lyase in two-phase systems. Food Technol. Biotech. 40(1), 9-19.
- Bauer M., Griengl H. und Steiner W. (1999) Kinetic studies on the enzyme (*S*)hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* using initial rate methods and progress curve analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 20-29.
- Becker W. und Pfeil E. (1966) Über das Flavinenzym D-Oxynitrilase. *Biochem. Z.* **346**, 301-321.
- Berg J. M., Tymoczko J. L. und Stryer L. (2003) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Breithaupt H., Pohl M., Bönigk W., Heim P., Schimz K. L. und Kula M. R. (1999) Cloning and expression of (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum* (flax). *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6**, 315-332.
- Bugg T. D. (2004) Diverse catalytic activities in the alpha/beta-hydrolase family of enzymes: activation of H₂O, HCN, H₂O₂, and O₂. *Bioorg. Chem.* **32**, 367-375.
- Chen F.-X. und Feng X. (2006) Asymmetric synthesis of cyanohydrins. *Curr. Org. Synth.* **3**, 77-97.
- Chmura A., van der Kraan G. M., Kielar F., van Langen L. M., van Rantwijk F. und Sheldon R. A. (2006) Cross-linked aggregates of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*: Highly active and robust biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.* 348, 1655-1661.
- Cholod M. S. (1993) Cyanohydrins. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 7 (ed. R. a. H. Company), pp. 821-834. John Wiley & Sons, Inc.
- Conn E. E. (1981) Cyanogenic glycosides. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, pp. 479-500.
- Dreveny I., Gruber K., Glieder A., Thompson A. und Kratky C. (2001) The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like an oxidoreductase. *Structure* **9**, 803-815.
- Dreveny I., Kratky C. und Gruber K. (2002) The active site of hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*: modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Sci.* **11**, 292-300.
- Effenberger F., Förster S. und Wajant H. (2000) Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 532-539.

- Effenberger F., Ziegler T. und Förster S. (1987) Enzyme-catalyzed cyanohydrin synthesis in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **26**, 458-460.
- Fessner W. D. (1998) Enzyme mediated C-C bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 85-97.
- Fraser C. M., Rider L. W. und Chapple C. (2005) An expression and bioinformatics analysis of the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol.* **138**, 1136-1148.
- Fraser C. M., Thompson M. G., Shirley A. M., Ralph J., Schoenherr J. A., Sinlapadech T., Hall M. C. und Chapple C. (2007) Related *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acyltransferases display distinct but overlapping substrate specifities. *Plant. Physiol.* **144**, 1986-1999.
- Gaisberger R. P., Fechter M. H. und Griengl H. (2004) The first hydroxynitrile lyase catalysed cyanohydrin formation in ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2959-2963.
- Gartler G., Kratky C. und Gruber K. (2007) Structural determinants of the enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *J. Biotechnol.* doi:10.1016/j.biotec.2006.12.009.
- Gregory R. J. (1999) Cyanohydrins in nature and the laboratory: biology, preparations, and synthetic applications. *Chem. Rev.* **99**, 3649-3682.
- Gruber K., Gartler G., Krammer B., Schwab H. und Kratky C. (2004) Reaction mechanism of hydroxynitrile lyases of the alpha/beta-hydrolase superfamily: the three-dimensional structure of the transient enzyme-substrate complex certifies the crucial role of LYS236. *J. Biol. Chem.* **279**, 20501-20510.
- Gruber K. und Kratky C. (2004) Biopolymers for biocatalysis: Structure and catalytic mechanism of hydroxynitrile lyases. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **42**, 479-486.
- Gruhnert C., Biehl B. und Selmar D. (1994) Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. *Planta* **195**, 36-42.
- Han S. Q., Ouyang P. K., Wei P. und Hu Y. (2006) Enzymatic synthesis of (*R*)cyanohydrins by a novel (*R*)-oxynitrilase from *Vicia sativa* L. *Biotechnol. Lett.* 28, 1909-1912.
- Hatti-Kaul R., Tornvall U., Gustafsson L. und Borjesson P. (2007) Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.* **25**, 119-124.
- Heim P. (2002) Die Hydroxynitril-Lyasen aus *Linum usitatissimum* (Lein) und *Sorghum bicolor* (Hirse). Heinrich-Heine-Universität, Dissertation.
- Hernandez L., Luna H., Ruiz-Teran F. und Vazquez A. (2004) Screening for hydroxynitrile lyase activity in crude preparations of some edible plants. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **30**, 105-108.
- Hickel A., Graupner M., Lehner D., Hermetter A., Glatter O. und Griengl H. (1997a) Stability of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis:* a fluorescence and dynamic light scattering study. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 361-366.
- Hickel A., Hasslacher M. und Griengl H. (1996) Hydroxynitrile lyases: functions and properties. *Physiol. Plant.* **98**, 891-898.

- Hickel A., Heinrich G., Schwab H. und Griengl H. (1997b) Screening for hydroxynitrile lyases in plants. *Biotechnol. Tech.* **11**, 55-58.
- Holmquist M. (2000) Alpha/beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 209-235.
- Jaeger K. E., Eggert T., Eipper A. und Reetz M. T. (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 519-530.
- Johnson D. V., Zabelinskaja-Mackova A. A. und Griengl H. (2000) Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 103-109.
- Kragl U. (1987) Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymkatalysierten Cyanhydrinsynthese. Universität Bonn/ Forschungszentrum Jülich, Diplomarbeit.
- Kragl U., Niedermeyer U., Kula M. R. und Wandrey C. (1990) Engineering aspects of enzyme engineering: Continuous asymmetric C-C bond formation in an enzyme-membrane-reactor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **613**, 167-175.
- Krammer B., Rumbold K., Tschemmernegg M., Pöchlauer P. und Schwab H. (2006) A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high-throughput screening. *J. Biotechnol.* **129**, 151-161.
- Krolikowski K. A., Victor J. L., Wagler T. N., Lolle S. J. und Pruitt R. E. (2003) Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene HOTHEAD. *Plant J.* **35**, 501-511.
- Kuroki G. W. und Conn E. E. (1989) Mandelonitrile lyase from *Ximenia americana* L.: stereospecificity and lack of flavin prosthetic group. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 6978-6981.
- Lauble H., Decanniere K., Wajant H., Förster S. und Effenberger F. (1999) Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of hydroxynitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta*). Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 55, 904-906.
- Lauble H., Förster S., Miehlich B., Wajant H. und Effenberger F. (2001a) Structure of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with substrates acetone and chloroacetone: implications for the mechanism of cyanogenesis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57, 194-200.
- Lauble H., Miehlich B., Förster S., Wajant H. und Effenberger F. (2001b) Mechanistic aspects of cyanogenesis from active-site mutant Ser80Ala of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in complex with acetone cyanohydrin. *Protein Sci.* **10**, 1015-1022.
- Lauble H., Miehlich B., Förster S., Wajant H. und Effenberger F. (2002) Crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor* in complex with the inhibitor benzoic acid: a novel cyanogenic enzyme. *Biochemistry* **41**, 12043-12050.
- Liese A., Seelbach K. und Wandrey C. (2006) *Industrial Biotranformations*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mateo C., Palomo J. M., van Langen L. M., van Rantwijk F. und Sheldon R. A. (2004) A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 273-276.

- Nahrstedt A. (1985) Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Plant Syst. Evol.* **150**, 35-47.
- Nahrstedt A. (1988) Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. *Ciba F. Symp.* **140**, 131-150.
- Nanda S., Kato Y. und Asano Y. (2005) A new (*R*)-hydroxynitrile lyase from *Prunus mume*: asymmetric synthesis of cyanohydrins. *Tetrahedron* **61**, 10908-10916.
- Nanda S., Kato Y., and Asano Y. (2006) *Pm*HNL catalyzed synthesis of (*R*)-cyanohydrins derived from aliphatic aldehydes. *Tetrahedron: Asymmetry* **17**, 735-741.
- Nardini M. und Dijkstra B. W. (1999) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 732-737.
- Niedermeyer U. und Kula M. R. (1990) Enzyme-catalyzed synthesis of (S)-cyanohydrins. Angew. Chem. Int. Ed. 29, 386-387.
- North M. (2003) Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**, 147-176.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I. und Schrag J. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**, 197-211.
- Pennisi E. (2000) Sequence Plants join the genome sequencing bandwagon. *Science* **290**, 2054-2055.
- Poechlauer P. (1998) Synthesis of homochiral cyanohydrins in an industrial environment: Hydroxy nitrile lyases offer new options. *Chim. oggi* **16**, 15-19.
- Poechlauer P., Skranc W. und Wubbolts M. (2004) The large-scale biocatalytic synthesis of enantiopure cyanohydrins. In *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions* (ed. H. U. Blaser and E. Schmidt), pp. 151-164. Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Pohl M., Breithaupt H., Frölich B., Heim P., Iding H., Juchem B., Siegert P. und Kula M. R. (2007) Enzymes for carboligation - 2-ketoacid decarboxylases and hydroxynitrile lyases. In *Asymmetric Synthesis with Chemical and Biological Methods* (ed. D. Enders and K. E. Jaeger), pp. 327-340. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Pollard D. J. und Woodley J. M. (2007) Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* **25**, 66-73.
- Poulton J. E. (1990) Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94, 401-405.
- Purkarthofer T., Gruber K., Gruber-Khadjawi M., Waich K., Skranc W., Mink D. und Griengl H. (2006) A biocatalytic Henry reaction--The hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* also catalyzes nitroaldol reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 3454-3456.
- Purkarthofer T., Skranc W., Schuster C. und Griengl H. (2007) Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 309-320.
- Roberge C., Fleitz F., Pollard D. und Devine P. (2007) Synthesis of optically active cyanohydrins from aromatic ketones: evidence of an increased substrate

range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 208-214.

- Rosenthaler L. (1908) Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen. *Biochem. Z.* **14**, 238-253.
- Schmidt M. und Griengl H. (1999) Oxynitrilases: From cyanogenesis to asymmetric synthesis. *Top. Curr. Chem.* **200**, 193-226.
- Seely M. K. und Conn E. E. (1971) Metabolism of amino acids and amines: Hydroxynitrile lyase (Sorghum vulgare). In Methods in Enzymology Vol. XVIIB (ed. T. H. T. CW), pp. 239-244. Academic Press.
- Selmar D., Carvalho F. J. und Conn E. E. (1987) A colorimetric assay for alphahydroxynitrile lyase. *Anal. Biochem.* **166**, 208-211.
- Sharma M., Sharma N. N. und Bhalla T. C. (2005) Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 279-294.
- Singh H. B. und Wasi N. (1986) Detection and determination of cyanide A review. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **26**, 115-136.
- Solís A., Luna H., Pérez H. I. und Manjarrez N. (2003) Evaluation of guanabana (*Annona muricata*) seed meal as a source of (*S*)-oxynitrilase. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**, 2351-2353.
- Solis A., Luna H., Perez H. I., Manjarrez N., Sanchez R., Albores-Velasco M. und Castillo R. (1998) New sources of (*R*)-oxynitrilase: capulin (*Prunnus capuli*) and mamey (*Mammea americana*). *Biotechnol. Lett.* **20**, 1183-1185.
- Tattersall D. B., Bak S., Jones P. R., Olsen C. E., Nielsen J. K., Hansen M. L., Hoj P. B. und Moller B. L. (2001) Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* **293**, 1826-1828.
- Terryn N., Heijnen L., De Keyser A., Van Asseldonck M., De Clercq R., Verbakel H., Gielen J., Zabeau M., Villarroel R., Jesse T., Neyt P., Hogers R., Van Den Daele H., Ardiles W., Schueller C., Mayer K., Dehais P., Rombauts S., Van Montagu M., Rouze P. und Vos P. (1999) Evidence for an ancient chromosomal duplication in *Arabidopsis thaliana* by sequencing and analyzing a 400-kb contig at the APETALA2 locus on chromosome 4. *FEBS Lett.* **445**, 237-245.
- Trummler K. und Wajant H. (1997) Molecular cloning of acetone cyanohydrin lyase from flax (*Linum usitatissimum*). Definition of a novel class of hydroxynitrile lyases. *J. Biol. Chem.* **272**, 4770-4774.
- van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K. E. und Dijkstra B. W. (2001) The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *J. Mol. Biol.* **309**, 215-226.
- Veum L., Hanefeld U. und Pierre A. (2004) The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol-gel matrix. *Tetrahedron* **60**, 10419-10425.
- von Langermann J., Mell A., Paetzold E., Daußmann T. und Kragl U. (2007) Hydroxynitrile lyase in organic solvent-free systems to overcome thermodynamic limitations. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1418 - 1424.
- Wagner U. G., Hasslacher M., Griengl H., Schwab H. und Kratky C. (1996) Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Structure* **4**, 811-822.

- Wajant H., Förster S., Selmar D., Effenberger F. und Pfizenmaier K. (1995) Purification and characterization of a novel (*R*)-mandelonitrile lyase from the fern *Phlebodium aureum*. *Plant Physiol*. **109**, 1231-1238.
- Wajant H., Mundry K. W. und Pfizenmaier K. (1994) Molecular cloning of hydroxynitrile lyase from *Sorghum bicolor*. Homologies to serine carboxypeptidases. *Plant Mol. Biol.* **26**, 735-746.
- Wäspi U., Misteli B., Hasslacher M., Jandrositz A., Kohlwein S. D., Schwab H. und Dudler R. (1998) The defense-related rice gene Pir7b encodes an alpha/beta hydrolase fold protein exhibiting esterase activity towards naphthol AS-esters. *Eur. J. Biochem.* **254**, 32-37.
- Weis R., Gaisberger R., Skranc W., Gruber K. und Glieder A. (2005) Carving the active site of almond *R*-HNL for increased enantioselectivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4700-4704.
- Willeman W. F., Hanefeld U., Straathof A. J. J. und Heijnen J. J. (2000) Estimation of kinetic parameters by progress curve analysis for the synthesis of (R)mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 423-433.
- Wöhler F. und Liebig J. (1837) Über die Bildung des Bittermandelöls. Annalen der Pharmacie **22**, 1-24.
- Yun J. und Ryu S. (2005) Screening for novel enzymes from metagenome and SI-GEX, as a way to improve it. *Microb. Cell. Fact.* **4**, 8-12.
- Zamocky M., Hallberg M., Ludwig R., Divne C. und Haltrich D. (2004) Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene* **338**, 1-14.
- Zuegg J., Gruber K., Gugganig M., Wagner U. G. und Kratky C. (1999) Threedimensional structures of enzyme-substrate complexes of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Protein Sci.* **8**, 1990-2000.

# DANKE...

Viele haben mir während meiner Doktorarbeit geholfen. Bei einigen davon möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Ermöglichung der Durchführung meiner Arbeiten am Institut für Molekulare Enzymtechnologie, die guten Arbeitsbedingungen und die Übernahme der Berichterstattung.

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Groth für die engagierte Übernahme des Koreferats sowie bei meinem externen Gutachter Prof. Dr. Jürgen Pleiss.

Bei Frau PD Dr. Martina Pohl und Herrn PD Dr. Thorsten Eggert für die stete Diskussionsbereitschaft, die kompetente und freundschaftliche Betreuung sowie die Hilfe bei allen chemischen, molekularbiologischen und sonstigen Problem(ch)en.

Bei Herrn Dr. Karl Gruber, Nicole Staunig und allen anderen aus der Strukturbiologie an der KfU in Graz für die Hilfe beim Kristallisieren und die Lösung der Struktur der *At*HNL, wo ich einen Iohnenden "Österreich-Arbeits-Urlaub" verbracht und dabei noch Vieles über Proteinstrukturaufklärung gelernt habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Udo Kragl und seinem Arbeitskreis für die Möglichkeit, in Rostock Einblicke in die Welt der Synthesechemie und der Strukturbiologie zu erhalten, vor allem bei Annett und Jan, der immer bereit war, es dem Biologen in Äpfeln und Birnen zu erklären.

Bei Dr. Marco Bocola für das Strukturmodell und die ersten Versuche, das Protein ins Kristallgitter zu komplimentieren.

Bei allen Mitarbeitern des IMET und IBOC, die mir bei allen möglichen theoretischen und praktischen Problemen geholfen haben.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Eggert, Pohl und Leggewie, mit denen ich nicht nur im Labor- und Büroalltag eine tolle Zeit erlebt habe. Alle aufzulisten würde den Rahmen sprengen und nur einige zu nennen, kommt nicht in Frage.

Bei meinen anderen Freunden, die zusätzlich dafür gesorgt haben, dass die Freizeit neben der Arbeit nicht zu kurz kommt.

Bei meiner Familie, die mich immer meinen eigenen Weg hat suchen und finden lassen.

## LEBENSLAUF

#### PERSÖNLICHE DATEN

- Name:Jennifer Nina AndexerAnschrift:Auf den Pöthen 35, D-42553 Velbert
- Geburtsdaten: 22.05.1980 in Haan

### **PROMOTION**

ab 11/04: Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechologie der Universität Düsseldorf (im Forschungszentrum Jülich) unter der Leitung von Herrn Prof. Jäger, betreut von Frau PD Dr. Martina Pohl und Herrn PD Dr. Thorsten Eggert

Thema: Die erste *R*-Hydroxynitril-Lyase mit  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefaltung – Charakterisierung biochemischer Eigenschaften und Struktur-Funktionsbeziehungen –

### STUDIUM

07/03 – 04/04: Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Pflanzen der Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Strotmann, betreut von Herrn Prof. Georg Groth

> Thema: Charakterisierung der Histidinkinase-Domäne des ETR1-Rezeptorproteins aus *Arabidopsis thaliana*

1999-2004: Studiengang Biologie (Diplom) an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf Abschluss im April 2004 (Gesamtnote 1,7)

### SCHULAUSBILDUNG

- 1990-1999: Erzbischöfliches St.-Anna-Gymnasium in Wuppertal Abitur im April 1999 (Gesamtnote 1,8)
- 1986-1990: Grundschule in Wuppertal

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 09.11.2007