

SONDERDRUCK

aus

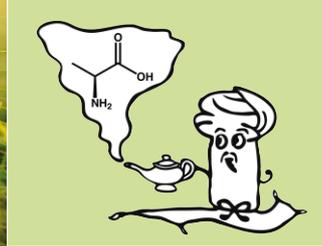
4 | 2021

VBio

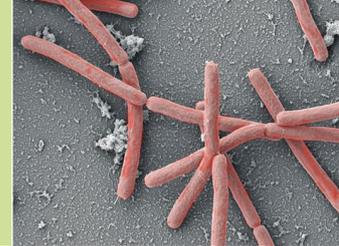
Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland



NACHHALTIGKEIT
Genomeditierte
Lebensmittel



BIOTECHNOLOGIE
Nicht-kanonische
Aminosäuren



**MIKROBE DES
JAHRES**
Methanothermobacter

BIOLOGIE

IN UNSERER ZEIT



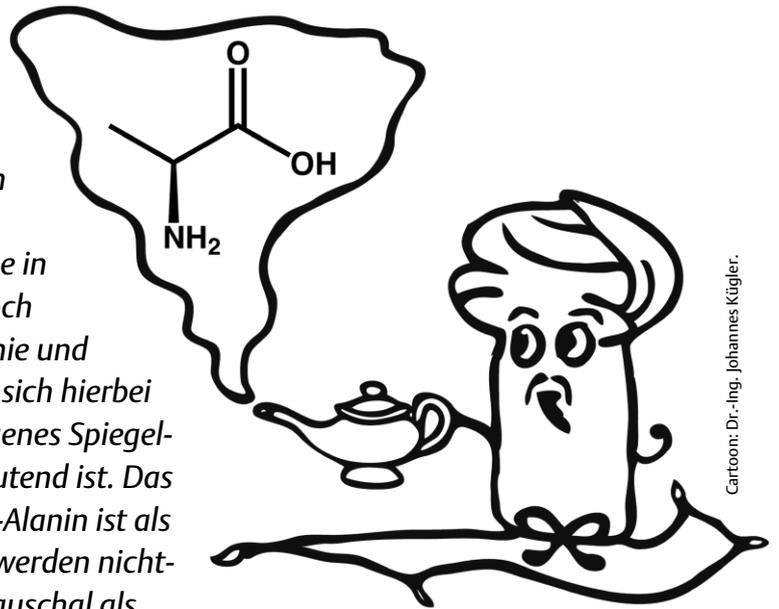
Schwarmintelligenz

Vorkommen, Nutzung und Produktion nicht-kanonischer Aminosäuren

Alanins Wunderlampe

JENS RUDAT | ULRIKE ENGEL

Proteine bestehen aus Aminosäuren. Alanin ist die zweithäufigste proteinogene Aminosäure (nach Leucin) und strukturell die zweiteinfachste (siehe Aufmacher). Zudem wird angenommen, dass Alanin eine der ältesten Aminosäuren in der Evolution des Lebens ist, die als Baustein für die Proteinbiosynthese in den genetischen Code aufgenommen wurde. Dennoch bleibt es vielen Studierenden außerhalb der Biochemie und vielleicht noch der Mikrobiologie verborgen, dass es sich hierbei explizit um L-Alanin handelt, dessen nicht-proteinogenes Spiegelbild D-Alanin für Bakterien mindestens ebenso bedeutend ist. Das ebenfalls nicht-proteinogene Konstitutionsisomer β -Alanin ist als Bestandteil des Coenzym A gar ubiquitär. Dennoch werden nicht-proteinogene Aminosäuren in vielen Lehrbüchern pauschal als „unnatürlich“ bezeichnet. Dabei finden sich in allen bekannten Lebensformen zahlreiche Varianten in Naturstoffen mit unterschiedlichster Funktion, wobei oft gerade die fein abgestimmte Mischung aus „ähnlich, aber eben doch ein bisschen anders“ die jeweilige Aufgabe in der Zelle ausmacht. Dies ist auch für die Medikamentenentwicklung von großer Bedeutung.



Cartoon: Dr.-Ing. Johannes Kügler.

Ohne Proteine – abgeleitet vom griechischen *proteios* = erstrangig – keine Enzyme, damit auch kein Stoffwechsel, keine Strukturen innerhalb der Zellen, kein gezielter Transport, keine Bewegung, (Immun-)Abwehr oder Regulation! Auch die Informationsträger der Biologie – DNA und die zahlreichen RNA-Varianten – werden von nicht wenigen Wissenschaftlern auf dem Gebiet der präbiotischen Evolution als Weiterentwicklung ursprünglicher Peptidnucleinsäuren (► PNA) angesehen. Entsprechende Theorien, aber auch zahlreiche experimentelle Befunde hierzu gelangen insbesondere dem Vater der präbiotischen Chemie Stanley Miller (Miller-Experiment), der neben dem Peptidgerüst als Vorläufer des heutigen (Desoxy-)Riboserückgrats auch ► Hydantoine (s. u.) bzw. Hydantoinsäure als mögliche Basis der Pyrimidinbasen erkannte. Diese wiederum können wahrscheinlich als PNA-Bestandteil Wasserstoffbrücken mit Purinbasen heutiger DNA-/RNA-Stränge ausbilden sowie selbst aus ► N-Carba-

moylaminosäuren gebildet werden [1]. Proteine und Aminosäuren sind daher auch im evolutionsgeschichtlichen Sinne als „erstrangig“ anzusehen.

In den Zellen aller bekannten Lebensformen werden Proteine anhand eines genetischen Bauplans an Ribosomen synthetisiert. In ca. 3,8 Milliarden Jahren Evolution des Lebens haben sich lediglich 22 Aminosäuren herauskristallisiert, deren Anlieferung und Verknüpfung zu Proteinen in den Zellen aller bekannten Lebensformen durch spezifische tRNAs ermöglicht wird, und die deshalb das Gros der natürlich vorkommenden Aminosäuren ausmachen. Für zwei davon – Pyrrolysin (Pyl), das in Enzymen des Methanstoffwechsels eine Rolle spielt, sowie Selenocystein (Sec) – sind spezielle Sekundärstrukturen im Proteinbauplan (mRNA) erforderlich, die zur Umwidmung eines Stopcodons führen (siehe Ausblick). Der Einbau der anderen 20 proteinogenen Standardamino-säuren ist durch den genetischen Code eindeutig vorgeschrieben, gleich-

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 385 erklärt.

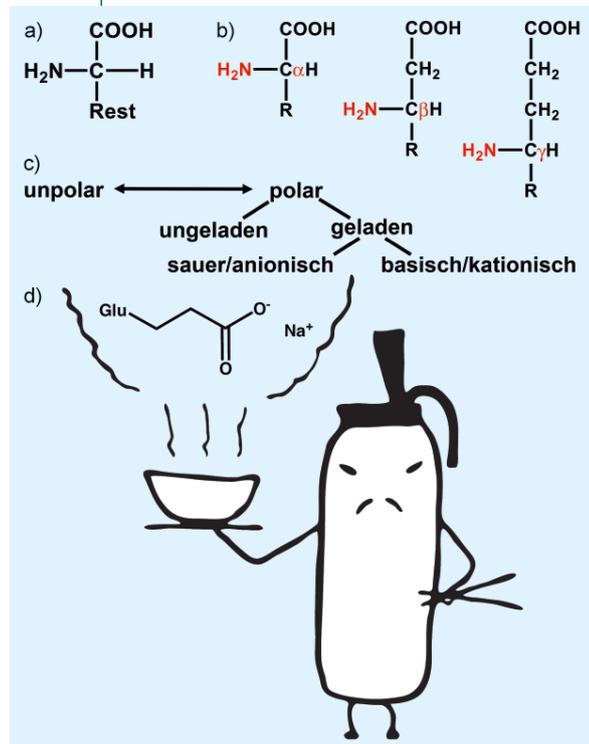
wohl nicht jedes Codon in allen Organismen verwendet wird (was sich ebenfalls nutzen lässt, vgl. wiederum den Ausblick am Ende des Artikels). Man spricht hier auch von *kanonischen* Aminosäuren (quasi „Aminosäuren von der Stange“ von griech. *kanón* = Rohrstab, Stange) oder auch von „proteinogenen“ Aminosäuren.

Die ▶ Alanin-Welt-Hypothese erklärt, warum die Natur nur diese 20 kanonischen Aminosäuren für die ribosomale Proteinsynthese ausgewählt hat [2]. Die meisten von ihnen sind Alaninderivate, die sich zum Aufbau der heute häufigsten Sekundärstrukturen von Proteinen eignen: den stabilen α -Helices und den β -Faltblättern, wobei α und β nichts mit der Konfiguration der Aminogruppe zu tun haben, sondern lediglich die zeitliche Reihenfolge der Entdeckung dieser Strukturen dokumentieren. Als experimenteller Beleg dieser Hypothese gilt das Alaninscanning: Hierbei werden gezielt Aminosäuren eines Proteins gegen Alanin ausgetauscht, wobei in der Regel die Sekundärstrukturen erhalten bleiben. Kommt es trotzdem zu einer massiven Strukturänderung und/oder einem Verlust der Proteinfunktion (z. B. der katalytischen Aktivität, falls es sich um ein Enzym handelt), hat man eine für dieses Protein essentielle Aminosäure detektiert.

Aminosäuren – Bausteine des Lebens, aber auch Werkzeuge von SARS-CoV-2

Korrekt müssten die in gängigen Lehrbüchern als Aminosäuren bezeichneten Moleküle α -Aminocarbonsäuren heißen: Die Carboxylgruppe am Beginn der Kohlenstoffkette bestimmt die Klassifikation als Säure, am angrenzenden C_2 -Atom – historisch α -C-Atom oder einfach C_α – befindet sich eine Aminogruppe (Abbildung 1a). Ist die Aminogruppe weiter von der Carboxylgruppe entfernt, spricht man von einer β -Aminosäure (β -AS), γ -Aminosäure usw. (Abbildung 1b). Außerdem hängen an diesem C_α noch ein H-Atom sowie der so genannte Rest „R“. Wenn dieser nicht gerade ein weiteres H ist wie bei Glycin, liegen vier unterschiedliche Substituenten am C_α vor und somit ein ▶ Chiralitätszentrum (Abbildung 2). Neben der Position der Aminogruppe beruhen alle Unterschiede der Aminosäuren auf den chemischen Eigenschaften des Restes, anhand dessen Polarität bzw. Ionisierbarkeit die Aminosäuren klassifiziert werden (Abbildung 1c). Diese Klassifizierung ist von erheblicher Bedeutung bei der gezielten Modifikation von Proteinen, z. B. von industriell genutzten Enzymen: Die Reste sind sowohl für die Wechselwirkungen mit dem Substrat verantwortlich (katalytische Spezifität), als auch für zahlreiche Wechselwirkungen innerhalb des Proteinmoleküls und damit für dessen Stabilität unter gegebenen Reaktionsbedingungen. So kann z. B. der Austausch eines großen unpolaren Restes im aktiven Zentrum gegen einen kleineren (etwa Leucin gegen Alanin) Platz für ein größeres Substrat schaffen, ohne die sonstigen katalytischen Eigenschaften zu verändern. Die Einführung geladener Aminosäuren kann durch ionische Wechselwirkungen zu veränderter Proteinfaltung und modifizierten

ABB. 1 | KLASSIFIZIERUNG VON AMINOSÄUREN



a) Allgemeine Struktur einer proteinogenen Aminosäure. b) Klassifizierung von Aminosäuren anhand der Entfernung der Aminogruppe von der Carboxylgruppe. c) Klassifizierung von Aminosäuren anhand der chemischen Eigenschaften ihrer Reste. d) Beileibe nicht nur in der asiatischen Küche beliebt, aber zweifellos Innovationstreiber der asiatischen Vorreiterchaft der Aminosäureproduktion: Der Geschmacksverstärker Mononatriumglutamat als Folgeprodukt der sauren α -L-Aminosäure Glutaminsäure; gezeigt ist der saure, negativ geladene Rest mit Na^+ als Gegenion. Cartoon: Dr.-Ing. Johannes Kügler.

IN KÜRZE

- Da Proteine 50 Prozent der Biotrockenmasse darstellen, sind proteinogene Aminosäuren nach Wasser die **häufigsten Moleküle der belebten Natur**.
- Diese auch als „kanonisch“ bezeichneten Aminosäuren leiten sich wahrscheinlich überwiegend von Alanin ab (**Alanin-Welt-Hypothese**), tragen wie dieses die Aminogruppe am α -Kohlenstoffatom und sind L-konfiguriert.
- Weitaus weniger bekannt und häufig, aber für alle Lebensformen ebenfalls unverzichtbar, sind die **nicht-kanonischen Aminosäuren (nkAS)**: Diese tragen entweder eine ungewöhnliche funktionelle Gruppe, oder die Aminogruppe ist anders positioniert als bei den proteinogenen Aminosäuren.
- nkAS entstehen in speziellen Stoffwechselwegen und sind von der Translation ausgeschlossen; in natürlichen Proteinen findet man sie daher nur als **Ergebnis posttranslationaler Modifikationen**.
- nkAS sind Bestandteil zahlreicher **Naturstoffe und Pharmaprodukte**, im Gegensatz zu proteinogenen Aminosäuren in der Regel nicht durch mikrobielle Fermentation herstellbar und auch chemisch nur bedingt zugänglich.
- **Optimierte Enzyme** ermöglichen einen wirtschaftlichen Zugang zu diesen besonderen Molekülen und damit zu essentiellen Medikamenten wie Amoxicillin.
- Ein allgemeinverständliches **Video über enzymbasierte Verfahren** für die Herstellung von nkAS für semisynthetische Antibiotika ist hier zu sehen: <https://www.youtube.com/watch?v=BSXJbYU3UwM>

Bindungseigenschaften führen. Aktuell hält die Mutation „E484K“ in Varianten des Coronavirus SARS-CoV-2 die Welt in Atem: In den in Südafrika bzw. Brasilien vorherrschenden Varianten B.1.351 (Beta) und P.1 (Gamma) ist im 1273 Aminosäuren umfassenden viralen Spikeprotein an Position 484 die negativ geladene Glutaminsäure (E) gegen ein positiv geladenes Lysin (K) ausgetauscht, was die Bindung von Antikörpern beeinträchtigt [3]. Diese Mutation wurde kürzlich auch in Großbritannien nachgewiesen als Sonderform der B.1.1.7-Variante (Alpha). „Dabei vermutet man, dass die derzeit erhältlichen Impfstoffe gegen diese Variante eine geringere Wirksamkeit aufweisen könnten“ [4].

Industrielle Produktion proteinogener Aminosäuren und die Bedeutung der Chiralität

Aminosäuren erlangen nicht nur im Verbund Bedeutung, sondern erfüllen auch als Einzelmoleküle wichtige Funktionen und bilden eine der bedeutendsten Produktklassen

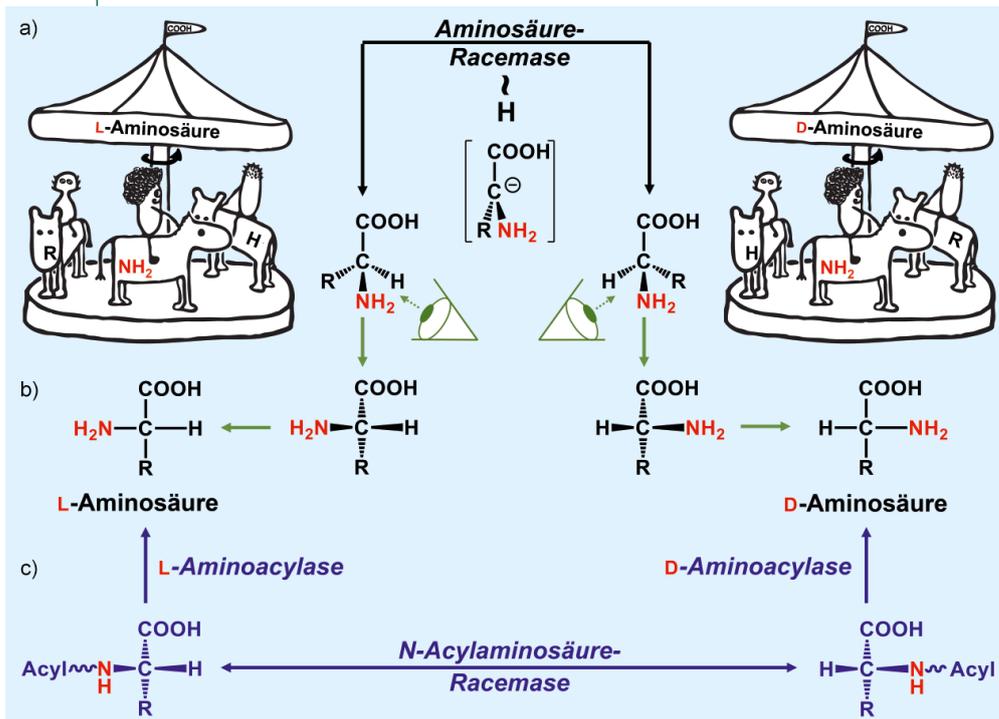
der Biotechnologie. Die bei weitem größten Margen werden durch mikrobielle Fermentation produziert, insbesondere Glutaminsäure (als Geschmacksverstärker Mononatriumglutamat, Abbildung 1d) und Lysin (Viehfutter) mit mehreren Millionen Tonnen pro Jahr. Bereits in den 1950ern wurde in Japan *Corynebacterium glutamicum* als natürlicher Produzent identifiziert und entsprechend benannt. Heute dienen optimierte Stämme dieses „Arbeitspferdes der Biotechnologie“ als Produktionsplattform für zahlreiche Aminosäuren [5, 6].

Hierbei spielt die Stereochemie der Aminosäuren eine wichtige Rolle (vgl. Abbildung 2): Die beiden Enantiomere (Spiegelbildisomere) eines chiralen Moleküls sind wie linke und rechte Hand, die sich nicht zur Deckung bringen lassen (Altgriechisch χείρ (*cheir*) = die Hand). Emil Fischer entwickelte Anfang des 20. Jahrhunderts ein Konzept zur zweidimensionalen Abbildung dreidimensionaler Strukturformeln, das insbesondere für Zucker und Aminosäuren bis heute Bestand hat. Dabei wird das Molekül so als Kette aufgezeichnet, dass das am höchsten oxidierte

Kohlenstoffatom oben steht (bei Aminosäuren ist dies die Carboxylgruppe). Vom darunterliegenden C-Atom (für proteinogene Aminosäuren das Stereozentrum C_α) zeigen nun vertikale Linien hinter die Projektionsebene, horizontale aus ihr heraus (vgl. Abbildung 2b). In dieser Projektion zeigt bei allen proteinogenen Aminosäuren die Aminogruppe nach links: Es sind α-L-Aminosäuren.

Oft findet sich daher in der Literatur der Hinweis, natürliche Aminosäuren seien allesamt L-konfiguriert (lat. *laevus*: links) und D-Aminosäuren (D-AS, lat. *dexter*: rechts) entsprechend „unnatürlich“. Korrekt ist, dass zur Proteinbiosynthese ausschließlich L-Aminosäuren (und das achirale Glycin) angeliefert werden, weshalb Proteine üblicherweise auch nur aus diesen bestehen. Allerdings finden sich verschiedenste nicht-kanonische Aminosäuren (nkAS) in zahlreichen Naturstoffen (Tabelle 1) wie übrigens auch bei Experimenten zur präbiotischen Evolution (s. o.) sowie in extraterrestrischem Material; die Bezeichnung „unnatürlich“ ist daher abwegig. Tatsächlich bilden nkAS nicht selten den Pharmakophor der betreffenden Naturstoffe, weshalb diese Verbindungsklasse seit langem im Fokus der Medikamentenentwicklung steht.

ABB. 2 | CHIRALITÄT VON AMINOSÄUREN



a) L-Aminosäuren lassen sich auch durch noch so langes Drehen nicht mit D-AS zur Deckung bringen. Aminosäure-Racemasen können jedoch die Figuren auf dem Karussell neu arrangieren, indem sie ein H-Atom entfernen und an anderer Stelle wieder anmontieren. b) Zeigt in der Fischer-Projektion die Aminogruppe nach links, spricht man von L-Aminosäuren; zeigt sie nach rechts, von D-Aminosäuren. Das Auge zeigt den Blickwinkel, den man auf das Karussell nehmen muss, um von der dreidimensionalen Strukturdarstellung auf die Fischer-Projektion zu kommen. c) An der Aminogruppe acylierte Aminosäuren (N-Acyloxyaminosäuren) können mittels Aminoacylasen stereoselektiv hydrolysiert werden. Durch Kopplung von N-Acyloxyaminosäureracemase und stereoselektiver Aminoacylase kann aus einem Acyloxyaminosäureracemat die reine Aminosäure mit 100 Prozent Ausbeute gewonnen werden (dynamisch-kinetische Resolution): Hierbei kristallisiert die Aminosäure unter Bedingungen, bei denen die N-Acyloxyaminosäure in Lösung bleibt. Cartoons in a): Dr.-Ing. Johannes Kügler.

TAB 1. NATURSTOFFE MIT BZW. AUS NICHT-KANONISCHEN AMINOSÄUREN (nkAS)

Verbindungs-kategorie	Verbindung	nkAS (z.T. mehrere)	Wirkung; Anmerkung
Biopolymere	Murein	2,6-Diaminopimelinsäure, D-Alanin, D-Isoglutamin, D-Glutaminsäure	Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand
	Kollagen	L-4-OH-Prolin, L-4-OH-Lysin	Festigkeit in tierischem Bindegewebe
Lipopeptide	Bacillomycine	D-Asparagin, D-Tyrosin, D-Serin	bakterielle Fungizide aus <i>Bacillus subtilis</i>
	Daptomycin	D-Alanin, D-Lysin, D-Asparaginsäure	Tensid; Antibiotikum bei Hautinfektionen
	Surfactin	D-Leucin	Tensid
Lantibiotika	Nisin u. a.	Lanthionin (Addition von Cystein an Dehydroalanin)	Porenbildner (Zellmembran)
Diketopiperazine (zyklische Dipeptide)	Verruculogen	6-Methoxy-Tryptophan	Mykotoxin (<i>Aspergillus</i>)
	Roquefortin C	Dehydrohistidin	Mykotoxin (<i>Penicillium</i>)
	Barettin	6-Bromotryptophan	Schwammtoxin als Fraßschutz (<i>Geodia baretta</i>)
Cyclodepsipeptide	Pacli-/Docetaxel (Taxol/Taxotere®)	2-OH- β -Phenylalanin bzw. Phenylisoserin	Alkaloid der pazifischen Eibe; Chemotherapeutika
	Jaspamid/Chondramid	β -Tyrosin sowie D-2-Bromotryptophan	Abwehrstoff (Fraßschutz) in marinen Schwämmen; auch in Myxobakterien
	Dihydroperiphyllin	(S)- β -Phenylalanin	
	Andrimid	(R)- β -Phenylalanin	
	Astin A–C	(R)- β -Phenylalanin	
Giftstoffe		Ibotensäure	Mykotoxin (Fliegenpilz)
		Hypoglycin	Toxin in unreifen Litschi
		Azetidin-2-carbonsäure	Toxin in Maiglöckchen
		β -N-Methylamino-Alanin	Neurotoxin in Cyanobakterien
Freie nkAS auch im Menschen		L-Thyroxin	Schilddrüsenhormon
		β -Alanin	Endprodukt des Pyrimidinabbaus; Baustein für Coenzym A
		γ -Aminobuttersäure (GABA)	Neurotransmitter

Nicht-kanonische Aminosäuren (nkAS) – Bausteine der Pharmaindustrie

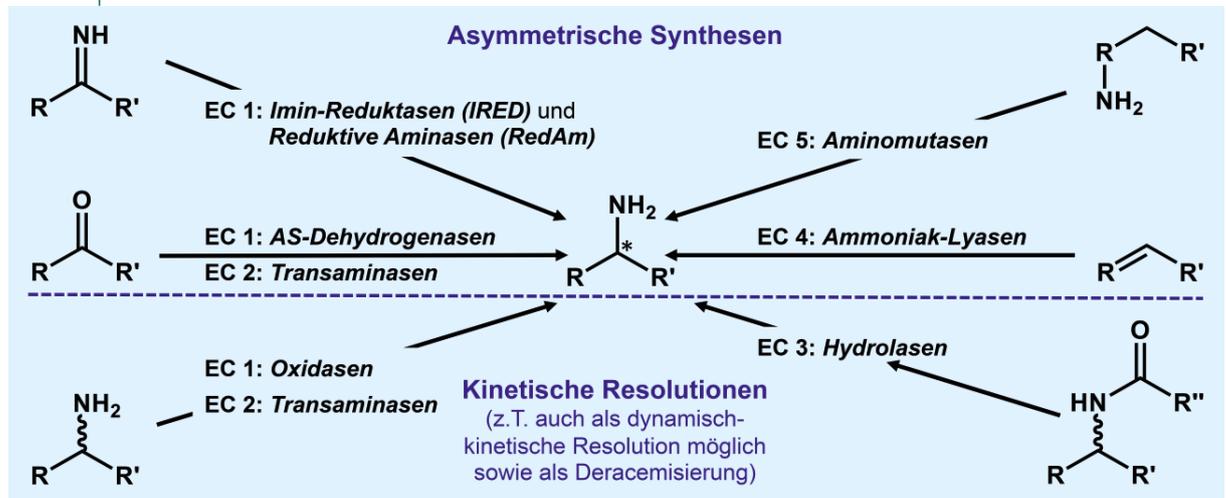
Rund 40 Prozent der auf dem Markt befindlichen Medikamente tragen mindestens eine chirale Aminogruppe, bei den Neuzulassungen niedermolekularer Pharmaka sind es sogar 90 Prozent [7]. Die hohen Reinheitsanforderungen für Pharmaka haben zur Entwicklung zahlreicher enzymatischer Verfahren zur Synthese enantiomerenreiner Amine geführt. Die Herstellung erfolgt dabei oft auf Basis einer nkAS (Tabelle 2), zum einen aus chemisch-verfahrenstechnischen Gründen: Aminosäuren lassen sich oft gut kristallisieren und dadurch einfacher als viele Amine in hoher Reinheit und Stabilität gewinnen (vgl. Legende von Abbildung 2). Durch Verknüpfung der Carboxylgruppe als Ester oder Amid ist zudem der Einbau einer Aminosäure in größere Strukturen vergleichsweise unkompliziert. Darüber hinaus spielt der Aminosäurerest, also die Seitenkette am C_{α} , oft eine Schlüsselrolle, wenn ein Naturstoff als Leitstruktur dient. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass der Einbau von D-AS wie auch von β -AS eine Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau bewirkt (vgl. bakterielle Zellwand, Abbildung 6). Dies nutzt man auch bei der Synthese von ► Peptidmimetika: Bahnbrechend war hier die

Synthese und biologische Evaluierung eines β -Peptids als Analogon des menschlichen Wachstumshormons, das tatsächlich vom Hormonrezeptor erkannt wurde – mit höherer Stabilität als das natürliche α -Peptid, gern zitiert als „beta hält besser“. Eine Zusammenstellung enzymatischer Wege zu chiralen Aminen und Aminosäuren ist in Abbildung 3 gezeigt; die bedeutendsten Gruppen der nkAS werden im Folgenden vorgestellt.

Nicht-kanonische α -L-Aminosäuren: Parkinsonmedikamente und Herbizide

L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, Abbildung 4) ist die meistverwendete reine nkAS und besitzt auch in fernen Kreisen einen gewissen Bekanntheitsgrad. Grund hierfür ist die erfolgreiche Anwendung zur Behandlung der Parkinson-Krankheit: Bei dieser kann der Neurotransmitter Dopamin nicht mehr produziert werden, der im Stoffwechsel durch Decarboxylierung aus L-DOPA gebildet wird. Da die Blut-Hirn-Schranke für geladene Moleküle undurchlässig ist, kann Dopamin nicht als Medikament von außen appliziert werden. Stattdessen erfolgt die Gabe von L-DOPA, üblicherweise in Kombination mit einem Decarboxylasehemmstoff, um den vorzeitigen körperl-

ABB. 3 | ENZYME ALS SCHLÜSSEL ZUR AMINOSÄURESYNTHESE



Die gängigsten enzymatischen Wege zur Herstellung chiraler Amine ($R' = H$) und Aminosäuren ($R' = -COOH$) bzw. für β -Aminosäuren ($R' = -CH_2-COOH$). R = beliebiger organischer Rest; EC: Enzymklasse gemäß Enzyme Commission.

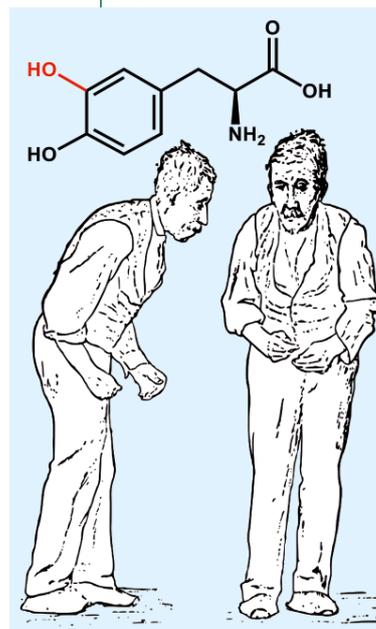
eigenen Abbau zu verzögern. Nach Passieren der Blut-Hirn-Schranke erfolgt am Wirkort die Decarboxylierung zu Dopamin [6, 7]. Die Behandlung mit L-DOPA ist seit den 1960ern etabliert, das Kombipräparat mit Decarboxylasehemmern wurde 1977 in die WHO-Liste der unentbehrlichen Arzneimittel aufgenommen. Jährlich werden > 250 t L-DOPA durch unterschiedliche Verfahren hergestellt: Die ersten Produktionsprozesse erfolgten rein chemisch durch asymmetrische Hydrierung (Monsanto Co.), für deren Entwicklung insbesondere im Zusammenhang mit der enantiomerenreinen Synthese von L-DOPA 2001 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde. Ab den 1990ern wurde dieser Prozess durch ein fermentatives Verfahren ersetzt, bei dem ein rekombinantes Pflanzenpathogen (*Erwinia herbicola* mit veränderter Transkriptionsregulation) die geringe Umsatzrate und mäßige Enantioselektivität des bis dahin verwendeten Rubidiumkatalysators bei Weitem übertraf und ausgehend von Catechol Raum-Zeit-Ausbeuten von $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ermöglichte (Ajinomoto Co., Inc.). Neuere Prozessentwicklungen zielen auf die Verwendung immobilisierter Enzyme (in diesem Fall Tyrosinhydroxylase) ausgehend von der fermentativ produzierten proteino-genen Aminosäure L-Tyrosin ab.

Glufosinat ist eine von L-Glutaminsäure abgeleitete α -Aminosäure. Die Aufnahme bewirkt eine Hemmung der pflanzlichen Glutamin-

synthetase, was weite Teile des Aminosäurestoffwechsels blockiert, so dass zunächst das Blattgewebe und letztlich die gesamte Pflanze abstirbt. Durch Einbringen eines mikrobiellen Gens für das Enzym Phosphinothricinacetyltransferase (PAT) in Nutzpflanzen werden diese resistent gegen Glufosinat. Analog zum Einsatz von Glyphosat (vormals Monsanto, nun Bayer AG) in Verbindung mit gentechnisch modifiziertem Saatgut ist es also auch hier mög-

lich, das Wachstum von Unkraut zu unterdrücken, ohne dass die Nutzpflanze beeinträchtigt wird. Dies gelang der Bayer-Tochter CropScience z. B. für eine Reissorte (LL-62: PAT-Reis). Obwohl schätzungsweise 20–30 Prozent der Agrochemikalien grundsätzlich über eine chirale Aminofunktion verfügen, wird aus Kostengründen (erheblich geringere Gewinnspanne als bei Medikamenten) überwiegend das Racemat eingesetzt. Da letztlich aber eine Wirkung auf Lebewesen mit von Chiralität geprägtem Metabolismus erfolgt, sollte der Einsatz enantiomerenreiner Produkte hier ebenfalls zu erhöhter Wirksamkeit bei deutlich geringeren Nebeneffekten führen; die ausschließliche Anwendung des wirksamen Enantiomers (für Glufosinat: L-Enantiomer) würde zudem die aufzuwendende Herbizidmenge halbieren. Die Herstellung von L-Glufosinat via ω -Transaminasen (ω -TA) ist als \triangleright Deracemisierung von *rac*-Glufosinat etabliert: Dabei wird das unerwünschte D-Enantiomer

ABB. 4 | LEBENSQUALITÄT DURCH nkAS



L-DOPA (3-Hydroxy-Tyrosin) wird zur Behandlung von Morbus Parkinson eingesetzt [7, Abbildungsnachweis siehe 8].

über eine D-Aminosäureoxidase (DAAO) zur korrespondierenden α -Ketosäure oxidiert, die ihrerseits durch eine (S)-selektive ω -TA zum L-Glufosinat aminiert wird (Abbildung 5). Diese Technologie wurde mit Umweg über die Zuvasyntha Ltd. vor kurzem (September 2020) von der BASF übernommen: „*Glu-L™ ermöglicht ein verbessertes, hochkonzentriertes Produkt zur Bekämpfung von unerwünschten Unkräutern und reduziert dabei signifikant die benötigte Menge Produkt um bis zu 50 %*“ [9].

α -D-Aminosäuren (D-AS): Fruchtbarkeitsmittel und semisynthetische Penicilline

Die oben erwähnte erheblich erhöhte Proteaseresistenz von Peptiden durch Einbau von D-AS ist bei oraler Applikation von Medikamenten von hoher Bedeutung. So bietet sich ein weites Feld zur Modifikation potenzieller Wirkstoffe, die z. T. auch nach der relevanten D-AS benannt sind: So beinhaltet Histrelin (OrionPharma GmbH) ein D-Histidin, Leuprorelin (vormals Abbott Laboratories, später Sanofi S.A.) ein D-Leucin. Beide Medikamente sind synthetische Nachbauten des Gonadotropin freisetzenden Hormons (GrH) und werden zur Behandlung von Prostatakrebs (Histrelin) bzw. Brust- und Gebärmutterkrebs (Leuprorelin) eingesetzt. Ein weiterer Vertreter dieser Wirkstoffklasse (Cetrorelix/Merck KGaA) verhindert bei der *in vitro*-Fertilisation einen vorzeitigen Anstieg des luteinisierenden Hormons (LH) und damit einen ungewollt frühen Eisprung. Diese Verbindung ist ein synthetisches Dekapeptid und enthält gleich fünf D-AS, die zudem allesamt einen nicht-kanonischen Rest tragen. Das Potenzmittel Tadalafil wird aus D-Tryptophan synthetisiert. D-Tryptophan wird durch kinetische Resolution mit Hilfe des Enzyms Tryptophanase gewonnen, das selektiv aus einer racemischen Mischung nur das L-Tryptophan spaltet (Daicel Corp.). Praktisch unmittelbar nach Ablauf des Patentschutzes wurde ein neues Herstellungsverfahren mittels ω -TA veröffentlicht. Unter seinem Handelsnamen Cialis® (Eli Lilly & Co.) hat Tadalafil als mutmaßlich erste Verbindung aus D-AS Eingang in die Popkultur gefunden [10].

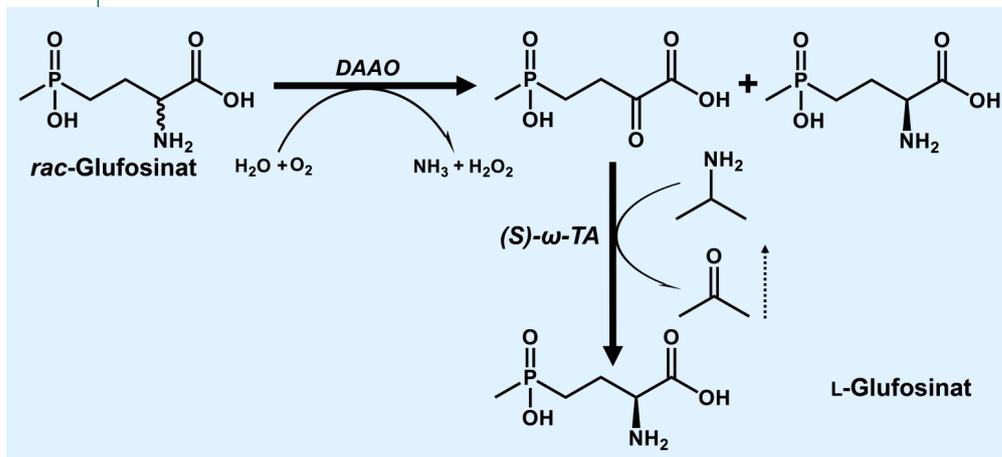
D-Alanin ist als zentrale Komponente der bakteriellen Zellwand der Angriffspunkt aller Penicilline und Cephalosporine und damit rund der Hälfte der auf dem Markt befindlichen Antibiotika [5]. Diese β -Lactam-Antibiotika ähneln strukturell einem D-Ala-D-Ala-Dimer und verhindern die Zellwandneubildung durch irreversible Bindung des Enzyms Transpeptidase. Da die äußere Membran Gramnegativer Bakterien eine Barriere für natürliche β -Lactam-Antibiotika darstellt, sind diese fast ausschließlich gegen Gram-positive Bakterien wirksam, obwohl der Wirkmechanismus bei Gram-negativen identisch greifen würde. Dies führte zur Entwicklung halbsynthetischer β -Lactam-Antibiotika, die ihrerseits den Markt für die biotechnologische Produktion von D-AS öffnete: D-Phenylglycin (D-PheGly) und *para*-Hydroxy-D-Phenylglycin (*p*OH-D-

TAB 2. INDUSTRIELL BZW. PHARMAKOLOGISCH BEDEUTENDE α KAS
[ZUSAMMENGESTELLT NACH 5–7 UND 13–15]

α -L-Aminosäuren (nicht-proteinogener Rest)	Medikament: Anwendung/Funktion
L-DOPA	Levodopa: Parkinsonmedikament
L-Glufosinat (Phosphinothricin)	Totalherbizid (Einsatz derzeit als Racemat)
L- <i>tert</i> -Leucin	u. a. Atazanavir: HIV-Proteasehemmer
L-Homophenylalanin	„Prils“: ACE-Hemmer (Blutdrucksenker)
L-Diaminopropansäure	Imidapril: ACE-Hemmer (s. o.)
L-Homocystein	Omapatrilat: ACE-Hemmer (s. o.)
L- α -Aminobuttersäure	Levetiracetam: Antiepileptikum
L- <i>p</i> -NO ₂ -Phenylalanin	Zolmitriptan: gegen Migräne
L-Pipecolinsäure	Ropivacain: Lokalanästhetikum
(S)-Phenyl-L-Cystein	Nelfinavir: HIV-Proteaseinhibitor
L-Azetidin-2-carbonsäure	Ximelagatran: Gerinnungshemmer
α -D-Aminosäuren	
D-Tryptophan	Tadalafil (Cialis™): gegen erektile Dysfunktion
D-Citrullin	Cetrorelix: <i>in vitro</i> -Fertilisation
D-Phenylglycin (D-PheGly)	Ampicillin, Cefaclor: Breitbandantibiotika
<i>para</i> -Hydroxy-D-Phenylglycin (<i>p</i> -OH-D-PheGly)	Amoxicillin: Breitbandantibiotikum
D-Valin	Fluvalinat: Insektizid (Milbenbefall)
D-Glutaminsäure	Spiroglumid: Angstlöser, Beruhigungsmittel
D-Serin → daraus: Cycloserin	Psychotherapeutikum bei Angststörungen
D-Prolin	Eletriptan: Migränemedikament
D-Cyclohexylalanin	verschiedene Gerinnungshemmer
D-Phenylalanin	Nateglinid: Antidiabetikum
D- <i>p</i> -Cl-Phenylalanin und D-3-(2'-Naphthyl-)Alanin	Abarelix: Prostatakrebstherapeutikum
β -Aminosäuren bzw. nicht- α -Aminosäuren	
β -Alanin	Carnosin (Muskelaufbau)
β -Phenylalanin bzw. 3-Phenylisoserin	Taxol® und Taxotere® (Chemotherapeutika)
β -Tyrosin + Isoleucin + 2,3-Diaminopropansäure	Edeine (Antibiotika)
α -Methyl- β -Alanin (3-NH ₂ -Isobuttersäure)	Cryptophycin (Chemotherapeutikum)
3-NH ₂ -2-OH-4-Phenylbuttersäure	Bestatin (Proteasehemmer)
2-NH ₂ -cyclohex-3-en-1-carbonsäure	BAY 10-8888 (Fungizid)
3-NH ₂ -5-Methyloktansäure	Imagabalin (Kandidat gg. Angststörung)
3-NH ₂ -4,4-Dimethylpentansäure	PB2-Inhibitor (Virostatikum)
γ -Aminobuttersäure (GABA)	Neurotransmitter

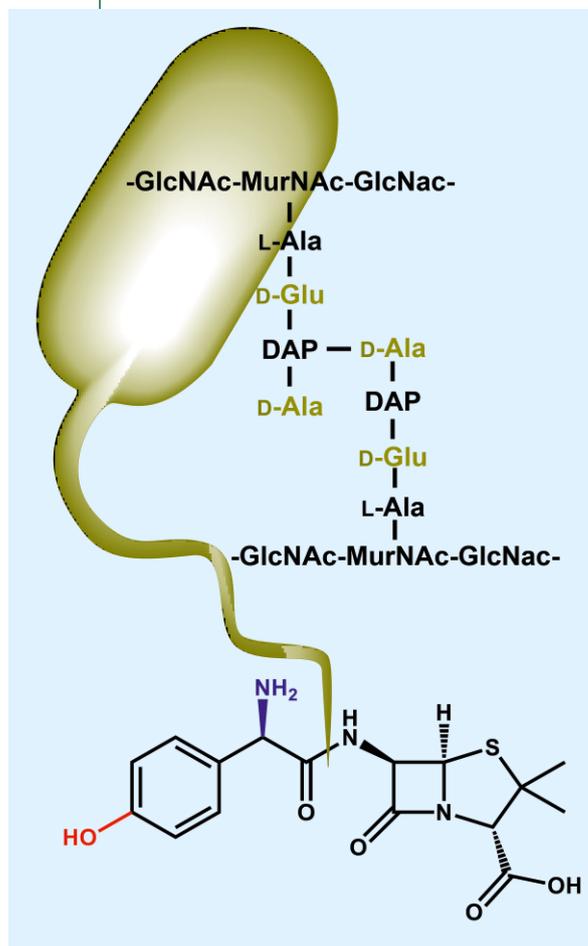
PheGly) werden als Seitenketten der halbsynthetischen Penicilline Ampicillin und Amoxicillin benötigt, D-PheGly außerdem für das halbsynthetische Cephalosporin Cefaclor. Dabei werden die natürlichen Seitenketten der fermentativ mit Schimmelpilzen hergestellten β -Lactame abgespalten und durch eine dieser beiden D-AS ersetzt

ABB. 5 | **nkAS IN DER LANDWIRTSCHAFT**



Patentierte [9] Deracemisierung von racemischem Glufosinat zum Totalherbizid L-Glufosinat: Eine D-spezifische Aminosäure-Oxidase (DAAO) setzt D-Glufosinat zur korrespondierenden α -Ketosäure um, während L-Glufosinat nicht oxidiert wird. Die Ketosäure wird anschließend durch eine (S)-spezifische ω -TA zu L-Glufosinat aminiert. Die Reaktionsfolge ist irreversibel, da der Aminodonor Isopropylamin in leicht flüchtiges Aceton umgesetzt wird, das aus der Reaktion verdunstet – technisch vermutlich beschleunigt durch Anlegen eines Unterdrucks und/oder erhöhte Temperaturen, die durch Verwendung thermostabilsierter ω -TA ermöglicht werden.

ABB. 6 | **nkAS ALS SEGEN UND FLUCH FÜR BAKTERIEN**



(Abbildung 6). Es resultieren Breitbandantibiotika mit verringerten Nebenwirkungen.

Beide Aminosäuren werden durch das Hydantoinaseverfahren im Multi-tausend-Tonnen-Maßstab produziert [11]. Dieser enzymatische Kaskadenprozess (Abbildung 7) wurde in den 1960ern in Japan als Alternative zur damals noch in den Kinderschuhen befindlichen fermentativen Produktion von L-Glutaminsäure (s. o.) entwickelt. Aufgrund der vornehmlichen Stereoselektivität der beteiligten Enzyme erwies sich die Synthese von D-AS aber als wesentlich lukrativer. Die Weiterentwicklung dieses Prozesses zu zellfreien Systemen mit isolierten Enzymen ist Bestandteil unserer Arbeit [12]. Darüber hinaus erforschen wir einen möglichen Zugang zu β -AS durch einen modifizierten Hydantoinaseprozess: Hierbei werden statt der fünfgliedrigen Hydantoin

sechsgliedrige Pyrimidinderivate umgesetzt [11]. Die hierbei demonstrierte Promiskuität der Hydantoinaseaktivität für DNA-Bestandteile und mögliche Vorläufer weist auf einen frühen evolutiven Ursprung der Hydantoinasen hin, deren natürliche Funktion trotz jahrzehntelanger industrieller Nutzung und entsprechend intensiver Erforschung nach wie vor ungeklärt ist [1].

β -Aminosäuren (β -AS) bzw. nicht- α -AS – Bodybuilding und Krebsmedikamente

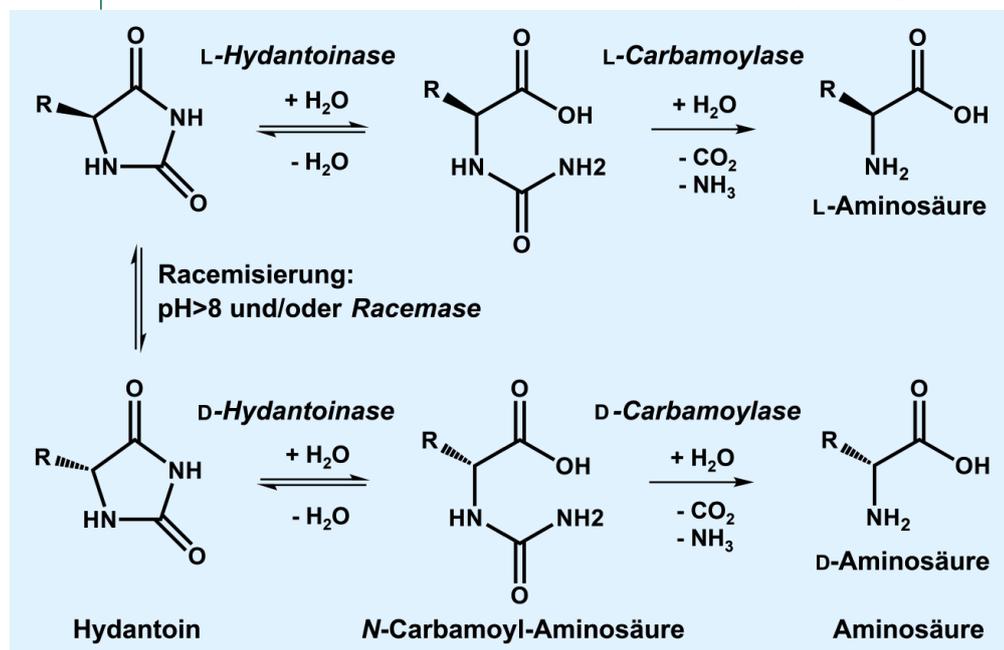
β -Alanin (β -Ala) ist die einfachste β -AS (3-Aminopropan-säure) und hat im Gegensatz zu α -Ala kein Chiralitätszentrum; daher gibt es keine Unterscheidung zwischen D- und L- β -Ala. Das Molekül entsteht im Nukleotidstoffwechsel beim Abbau der Pyrimidinbasen Uracil und Cytidin. β -Ala ist außerdem Bestandteil der Pantothensäure (Vitamin B₅), die in der Zelle weiter zu Coenzym A verarbeitet wird. In

Die bakterielle Zellwand enthält zahlreiche D-AS. Ihre Neubildung in wachsenden Zellen wird durch Penicillin behindert. Semisynthetische Penicilline wie Ampicillin (Amino-Penicillin) und Amoxicillin (Aminopenicillin mit zusätzlicher Hydroxygruppe) wirken gegen eine erheblich größere Vielzahl von Erregern (Breitbandantibiotika). Die zur Produktion erforderlichen nkAS D-PheGly und pOH-D-PheGly werden durch das Hydantoinaseverfahren hergestellt (siehe Abbildung 7) und nach Abspaltung der natürlichen Seitenkette angehängt (Spaltungs-/Bindungsstelle siehe Endpunkt der Bakteriengeißel im Molekül). D-Glu, D-Ala: D-Enantiomere der proteinogenen Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin; DAP: 2,6-Diaminopimelinsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; MurNAc: N-Acetylmuramin.

allen bislang sequenzierten Genomen sind Enzyme kodiert, die Coenzym A benötigen; β -Ala ist folglich für alles Leben essentiell. Im Menschen findet sich β -Ala mit Histidin verknüpft zum Dipeptid Carnosin in millimolarer Konzentration in Hirn und Muskeln. In letzteren spielt Carnosin eine erhebliche Rolle als Puffer; dabei verhindert die β -Peptidbindung eine Hydrolyse durch Proteasen. β -Ala ist limitierend für den Aufbau des Carnosins und daher als Nahrungsergänzungsmittel insbesondere im Kraftsport populär; Studien legen zudem eine Verringerung des Muskelabbaus im Alter durch die Gabe von β -Ala nahe. Die industrielle Produktion von β -Ala erfolgt durch Ringöffnung von Propiolacton mit Ammoniak, wobei die Abwesenheit eines Chiralitätszentrums für diese rein chemische Synthese von Vorteil ist.

β -Phenylalanin (β -Phe) verfügt im Gegensatz zu β -Ala über ein Chiralitätszentrum. Folglich könnte man hier eine D- und L-Form unterscheiden, wobei aber die Fischer-Konvention bei β -AS üblicherweise nicht zur Anwendung kommt. Stattdessen gibt man entweder die absolute Konfiguration (*R*)/(*S*) oder den Drehsinn (+/-) an. (*R*)-(+)- β -Phe ist Baustein zahlreicher Naturstoffe, insbesondere der Taxane. Einer dieser aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isolierten Wirkstoffe (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb) wird erfolgreich zur Chemotherapie bei Brust- und Eierstockkrebs eingesetzt, ebenso das halbsynthetische Taxotere[®] (Sanofi S.A.) gegen Prostatakrebs. Hierbei bindet die β -AS als Spindelgift an Mikrotubuli, blockiert die Zellteilung und treibt die Krebszelle in die Apoptose. Die effiziente Herstellung dieser Moleküle als bedeutendste Chemotherapeutika mit einem Jahresumsatz von mehreren Mrd. US-Dollar ist seit ihrer Entdeckung Gegenstand intensiver Forschung: *T. brevifolia* ist global kaum verbreitet, wächst sehr langsam, und enthält nur geringe Mengen Taxol - und dies ausschließlich in der Rinde, wo es der Eibe als Fraßschutz dient. Der Baum muss also entrindet und damit getötet werden, was eine nachhaltige Gewinnung unmöglich macht: Aus sechs gefällten 100jährigen Bäumen kann nur 1 g Taxol zur Behandlung eines einzigen Patienten sehr aufwendig extrahiert werden, was tatsächlich über Jahre den Stand der Technik zur Ermöglichung klinischer Studien darstellte. Als Folge wurde *T. brevifolia* Anfang der 1990er Jahre auf die Liste der bedrohten Arten gesetzt, bevor eine halbsynthetische Produktion aus dem Alkaloidanteil Baccatin III und dem als β -Lactam eingesetzten β -AS-Anteil etabliert werden konnte (Ojima-Holton-Kopplung/Bristol-Myers

ABB. 7 | ALLGEMEINES SCHEMA DES HYDANTOINASEVERFAHRENS [NACH 11]



Die konsekutive Hydrolyse kostengünstiger racemischer Hydantoine führt je nach Stereoselektivität der verwendeten Hydantoinasen und Carbamoylasen zu L-AS (oben) oder D-AS (unten).

Squibb). Baccatin III kann aus den Nadeln der Eibe gewonnen werden sowie neuerdings biotechnologisch aus Mikroorganismen und Zellkulturen.

Die Synthese von reinem β -Phe wie auch von anderen β -AS erfolgt derzeit als ▶ kinetische Resolution von *N*-acylierten β -AS mittels Lipasen (u. a. Evonik-Degussa GmbH), deren Ausbeute naturgemäß auf maximal 50 Prozent beschränkt ist. Als mögliche Alternative arbeiten wir (und andere) an einer ▶ asymmetrischen Synthese mittels ω -TA, die eine theoretische Ausbeute von 100 Prozent ermöglichen könnte. Dementgegen steht, dass die potenzielle Ausgangssubstanz - eine β -Ketosäure - zur spontanen Decarboxylierung neigt und daher kein stabiles Edukt darstellt. Daher wurde versucht, stattdessen den stabilen β -Ketoester zu aminieren. Hierbei erwies es sich als problematisch, dass das aktive Zentrum der ω -TA als R' (vgl. Abbildung 3) nur kleine organische Reste akzeptiert; schon das „-CH₂-COOH“ bewegt sich hier am Größenslimit. In Kooperation mit der Uni Greifswald wurden zwei für große Seitenketten optimierte ω -TA zum Einsatz gebracht, gewissermaßen mit „aufgebohrtem“ aktiven Zentrum, je eine mit (*S*)- bzw. (*R*)-Selektivität. Damit glückte die Synthese beider β -Phe-Ester [13], die mittels Umesterung leicht an Folgeprodukte gekoppelt bzw. in diese eingebaut werden könnten - z. B. an die OH-Gruppe des Alkaloidanteils des Baccatin III (vgl. Abbildung 8). Des Weiteren gelang uns die gleichzeitige Reinigung und Immobilisierung einer für β -Phe aktiven ω -TA aus dem Bodenbakterium *Variovorax paradoxus* an funktionellen Magnetpartikeln, was eine erleichterte Prozessführung mit

guter Wiederverwendbarkeit ermöglicht [14]. Dasselbe Enzym konnte zudem mittels gezielter Mutagenese auf Basis von Proteinfaltungsalgorithmen thermostabilisiert werden. Dies ermöglicht oft höhere Raum-Zeit-Ausbeuten, da bei erhöhter Temperatur sowohl die Substratlöslichkeit als auch die Enzymaktivität verbessert werden (vgl. auch Abbildung 5). Generell versprechen ω -TA einen guten Zugang zu nkAS, da die in den vergangenen Jahren erheblich intensivierten Strukturuntersuchungen an diesen Enzymen eine Vorhersage modifizierter Substratsätze ermöglichen: Hierzu haben wir in Kooperation mit der Universität Stuttgart eine frei zugängliche Datenbank „ ω TAED: omega-Transaminase Engineering Database“ mit Struktur-Funktionsbeziehungen erstellt und veröffentlicht [15].

Ausblick: Modifizierte Proteine und technische Enzyme aus nkAS

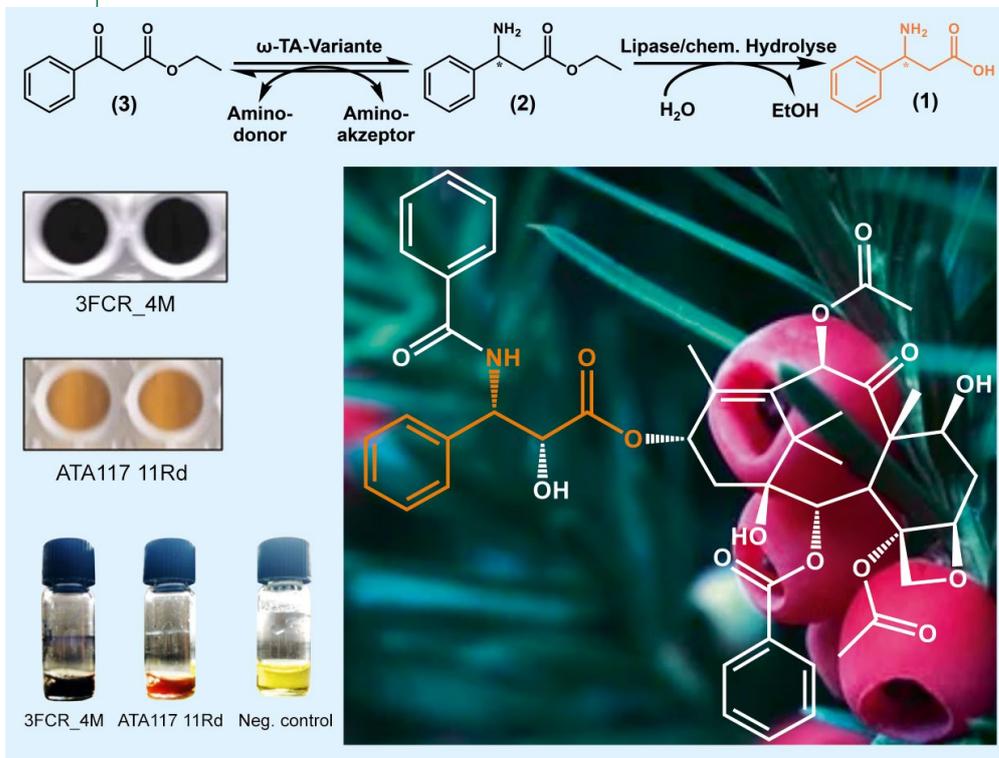
Für eine Weiterverwendung der nkAS stellt sich die Frage nach einem Einbau in Proteine und andere funktionelle Moleküle. Diese Problematik ergibt sich weniger in der chemischen Industrie (der Carbonylkohlenstoff ist leicht nukleophil angreifbar), als vielmehr in der produzierenden

Zelle, denn in der Regel sind nkAS von der Proteinbiosynthese ausgeschlossen. „In der Not frisst der Teufel Fliegen“ gilt allerdings auch für Bakterien: Modifizierte Kolibakterien, die man in einem Minimalmedium mit sehr geringen Konzentrationen bestimmter Aminosäuren zur Anzucht brachte, die sie selbst nicht herstellen konnten, zeigten nach Überführung in dasselbe Medium mit nkAS eine bereitwillige Aufnahme dieser „Fremdbausteine“. Bei zeitgleicher Induktion der Überexpression eines technischen Enzyms wurden in dieses tatsächlich nkAS eingebaut. Die so erzeugten Lipasen zeigten eine aus vorherigen Strukturuntersuchungen antizipierte Stabilisierung gegenüber erhöhten Temperaturen (bis zu 20 °C) und bis zu drei Einheiten verändertem pH-Wert bei mindestens identischer Aktivität [16].

Ein weiterer Ansatz ist die Ausschaltung selten genutzter Codons, um Möglichkeiten zur genetischen Kodierung von nkAS zu schaffen: So gibt es beispielsweise sechs Codons für Serin, die in verschiedenen Lebensformen unterschiedlich häufig genutzt werden. Hohe Beachtung erfuh hier die Totalsynthese eines modifizierten *Escherichia coli*-Genoms, das mit vier Serin-Codons und zwei (statt drei) Stopcodons auskommt (ohne UAG, das in *E. coli*

ohnehin kaum verwendet wird) und zu lebensfähigen, gleichwohl langsam wachsenden Kulturen führt [17]. Die resultierenden *E. coli* Syn61 (61 Codons statt 64) konnten mit Hilfe einer orthogonalen Pyrrolysin-tRNA-Synthetase aus dem methanogenen Archaeon *Methanosarcina mazei* (mit mutiertem Anticodon, so dass auf eingeschleuster Plasmid-DNA das im Genom vollständig ersetzte Serin-Codon TCG genutzt werden konnte) eine nkAS in Proteine einbauen. Bei dieser handelte es sich um das Lysin-Derivat *N*- ϵ -(((2-Methylcycloprop-2-en-1-yl)methoxy)carbonyl)-L-Lysin. Ebenfalls auf das UAG-Stopcodon (*amber*) zielt das orthogonale amber-Suppressor-tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paar aus einem anderen Methanogenen (*Methanococcus jannaschii*) mit der Fähigkeit zum Pyrrolysin-Einbau. Dieses wird genutzt, um in Hamstereizellen (CHO) gezielt monoklonale Antikörper mit acetylierten und azidolierten Aminosäuren zu modifizieren (v. a. *p*-Acetyl- und *p*-Azido-Phenylalanin). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, punktgenau Antikörper-Wirkstoff-Konjugate herzustellen [Übersicht in 18]. Dies könnte die hochspezifische und nebenwirkungsarme Krebsbehandlung mit solchen

ABB. 8 | nkAS IM KAMPF GEGEN KREBS



Das umsatzstärkste Chemotherapeutikum Paclitaxel (Taxol®) enthält als Pharmakophor ein modifiziertes β -Phenylalanin (1). In einem Screening optimierter ω -TA mit dem nach Umsetzung schwarz präzipitierenden Aminodonor OXD gelang die enantioselektive Synthese von β -Phenylalanin-Ethylester (2) durch Aminierung des korrespondierenden β -Ketoesters (3) mit Hilfe des (*S*)-selektiven Enzyms 3FCR sehr gut (schwarze Reaktionsgefäße) sowie mit geringerem Umsatz auch durch das (*R*)-selektive Enzym ATA117 (orange-braune Reaktionsgefäße). Abbildungen aus [13], Foto der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* aus <https://pixabay.com>

Konjugaten, die die Chemotherapeutika praktisch ausschließlich am gewünschten Wirkort deponieren (tumorspezifische ► Chemoimmunkonjugate), erheblich wirtschaftlicher gestalten: Bei Antikörperkonjugaten über kanonische Aminosäuren entstehen immer Mischprodukte, aus denen das wirksamste aufwändig gereinigt werden muss (zumal sich mit Mischungen kaum reproduzierbare Ergebnisse erzielen lassen). Zahlreiche Chemoimmunkonjugate befinden sich derzeit in klinischen Studien, so dass hieraus vermutlich schon bald eine hohe wirtschaftliche Bedeutung erwachsen kann – wie auch andere Anwendungen dieser in höchstem Maße ortsselektiven Modifikation von Proteinen.

Angesichts dieser Fortschritte bzgl. Codon-Emanzipation und gezielter Modifikation von tRNAs und tRNA-Synthetasen ist es derzeit tatsächlich eher die fehlende nachhaltige und skalierbare Verfügbarkeit enantiomerenreiner nkAS, die einer kosteneffizienten biotechnologischen Anwendung dieser ► Erweiterung des genetischen Codes entgegensteht [19]. Enzymen wird bei der Bewältigung dieser Herausforderung die Schlüsselrolle zugesprochen (was uns zu Abbildung 3 zurückbringt) – zumal langfristig die intrazelluläre Synthese von nkAS mit der Erweiterung des genetischen Codes gekoppelt werden könnte. Für Forschungszwecke ist dieser Zweig der synthetischen Biologie längst Stand der Technik: In der Neurobiologie werden durch Erweiterung des genetischen Codes photoaktive oder fluoreszierende Aminosäuren wie Dansylalanin genutzt, um durch Einbau in licht- oder stromsensitive Enzyme Membrandepolarisationen sichtbar zu machen – seit einigen Jahren auch in Hirnen lebender Mäuse [20].

Nachdem die Bezeichnung „unnatürliche“ Aminosäuren ohnehin schon kaum berechtigt war, verschwimmen nun auch die Grenzen der weiteren Terminologie: Zumindest in begrenztem Umfang kann der Mensch mittlerweile auch bestimmen, welche Aminosäuren er als proteinogen einsetzen will. Die Vielstimmigkeit des Kanons hat also beträchtlich zugenommen, und künftige Dirigenten müssen auch über kompositorische Fähigkeiten verfügen.

Zusammenfassung

Als nicht-kanonische Aminosäuren (nkAS) fasst man alle Aminosäuren zusammen, die nicht über den genetischen Standardcode kodiert sind und entsprechend nicht über die zelluläre Proteinbiosynthese (Translation) in Proteine eingebaut werden. Die physiologisch und damit auch pharmakologisch bedeutendsten nkAS sind α -L-AS mit nicht genetisch kodierten Resten, α -D-AS sowie β -AS. Prominente Beispiele sind das Parkinsonmedikament L-DOPA, D-Phenylglycinderivate als Seitenketten von Ampicillin und Amoxicillin (bei Kindern meistverschriebene Antibiotika), sowie β -Phenylalanin in den meisteingesetzten Chemotherapeutika Taxol® und Taxotere® (u. a. gegen Brust- und Prostatakrebs). Die oft unbekanntes Biosynthesewege für nkAS und die schwierige Übertragbarkeit auf standardisierte Verfahren mit etablierten Produktionsstämmen erwies sich

GLOSSAR

Alanin-Welt-Hypothese: Nach dieser sind die heutigen α -L-konfigurierten proteinogenen Aminosäuren chemische Derivate des Alanins, durch das sich die vorherrschenden Sekundärstrukturen von Proteinen am stabilsten realisieren lassen.

Asymmetrische Synthese: Ein Molekül wird zielgerichtet mit einer festgelegten räumlichen Struktur hergestellt.

β -Lactam-Antibiotika: Die mit Abstand meistverwendeten Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) tragen als zentralen Baustein den β -Lactamring (zyklische β -Aminosäure).

Chemoimmunkonjugate: An bestimmte Krebszellen bindende Antikörper, an die z. B. über nkAS an einer bestimmten Stelle ein Cytostatikum gebunden ist – also eine Substanz, die die Zelle am Wachstum hindert. Damit ist eine Chemotherapie mit deutlich geringeren Nebenwirkungen möglich, da das Cytostatikum tumorspezifisch nur die Krebszellen erreicht.

Chiralitätszentrum: Chiralität ist die „Händigkeit“ eines Moleküls, dessen räumliche Anordnung eine Unterscheidung z. B. in Bild und Spiegelbild erlaubt, was bei Biomolekülen oft zu unterschiedlichen Funktionen in der Zelle führt. Als Chiralitäts- oder Stereozentrum bezeichnet man dabei denjenigen Punkt im Molekül, an dem diese besondere räumliche Anordnung vorliegt – meist in Form eines Kohlenstoffatoms mit vier unterschiedlichen Substituenten. Ein chirales Molekül kann auch mehrere Chiralitätszentren enthalten.

Deracemisierung: Ein Gemisch von Bild und Spiegelbild eines Moleküls (Racemat) wird so behandelt, dass eines der beiden gezielt in das andere überführt wird, so dass danach nur das reine Bild oder das reine Spiegelbild vorliegt.

Erweiterung des genetischen Codes (engineered genetic code): Adaptation der zellulären Proteinbiosynthese zum Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren (nkAS). Hierzu bedarf es einer tRNA zur Erkennung und Verarbeitung einer nkAS anhand eines modifizierten bzw. freien Codons (z. B. das in Kolibakterien selten genutzte Stopcodon UAG/amber) sowie einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase zur Beladung der tRNA mit der nkAS. Gegenstand aktueller Forschung sind zudem orthogonale Ribosomen mit einer höheren Toleranz für nkAS.

Hydantoin: Ein Stickstoffheterozyklus, aus dem nicht-kanonische α -Aminosäuren kostengünstig hergestellt werden können. Hydantoin ist dabei ein Kofferwort aus „Hydriertes Allantoin“, denn so gelang Adolf von Baeyer 1861 die erstmalige Synthese von Hydantoin.

Hydantoinaseverfahren: Ein wichtiger industrieller Prozess zur Gewinnung nicht-kanonischer Aminosäuren besteht aus einer Kaskadenreaktion der Enzyme Hydantoinase und N-Carbamoylase, die günstig herstellbare Hydantoine sequentiell stereoselektiv hydrolysieren.

Kinetische Resolution: Aus einem Gemisch von Bild und Spiegelbild eines Moleküls (Racemat) wird eines der beiden schneller oder sogar exklusiv umgesetzt, so dass das andere angereichert wird.

N-Carbamoylaminosäuren: Intermediate des Hydantoinase-Verfahrens: intramolekularer Ringschluss führt zu Hydantoinen, Hydrolyse zu Aminosäuren.

Peptidmimetika: Synthetische Moleküle mit peptidähnlichen Eigenschaften, aber meist erheblich höherer Stabilität (z. B. durch Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren) zur Untersuchung von funktionellen Peptiden in Zellen (z. B. von Peptidhormonen).

Pharmakophor: Molekülbestandteil eines Wirkstoffes, der mit der Zielstruktur interagiert.

PNA: Peptidnukleinsäuren mit Aminosäuren statt Zuckern; werden oft als Vorläufer der heutigen DNA und RNA angesehen.

ω -Transaminasen (ω -TA): Enzyme, die den Transfer einer Aminogruppe von einem Molekül auf ein anderes katalysieren und industriell zur Synthese chiraler Aminosäuren und Amine eingesetzt werden.

in der Vergangenheit als große Herausforderung für die industrielle Herstellung. Eine Schlüsselrolle in der Produktion spielen mittlerweile Enzyme; also ausgerechnet Werkzeuge aus kanonischen Aminosäuren – und künftig vielleicht auch aus nicht-kanonischen.

Summary

Alanin and the magic lamp – occurrence, utilization and production of non-canonical amino acids

Non-canonical amino acids (ncAA) are amino acids that are not part of the standard genetic code and thus are excluded from cellular protein biosynthesis (translation). Amino acids such as α -L-amino acids with non-encoded residues, α -D-amino acids, and β -amino acids are most important as cellular metabolites and thus as pharmaceuticals. L-DOPA (remedy against Parkinson disease), D-phenylglycine and derivatives as side chains of ampicillin and amoxicillin (the antibiotics mostly prescribed for children) as well as β -phenylalanine as pharmacophore of the chemotherapeutic agents Taxol® and Taxotere® (against breast and prostate cancer a. o.) are prominent examples. The biosynthetic pathways for ncAA – often unknown – and the difficult transfer to standardized techniques with established production strains proved as a major challenge for the industrial production of these molecules in the past. Nowadays, enzymes play a key role in ncAA's production; tools that have been composed of canonical amino acids so far – and maybe of non-canonical amino acids in the near future.

Schlagnworte:

Aminosäuren, Alanin-Welt-Hypothese, Hydantoinasen, Transaminasen, L-DOPA, Penicillin, Taxol®, erweiterter genetischer Code

Literatur

- [1] J. Rudat, U. Engel (2017). Hydantoinasen – von der präbiotischen Evolution zur Aminosäureproduktion, BIOSpektrum 01.17: 98–100.
- [2] V. Kubyskhin, N. Budisa (2019). Anticipating alien cells with alternative genetic codes: away from the alanine world, Curr Opin Biotechnol 60, 242–247.
- [3] R. E. Chen, X. Zhang, J. B. Case et al. (2021). Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies, Nat Med 27, 717–726, <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01294-w>
- [4] Robert-Koch-Institut, SARS-CoV-2: Virologische Basisdaten sowie Virusvarianten, abgerufen am 24.06.2021, https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Virologische_Basisdaten.html
- [5] G. Fuchs (2014). Allgemeine Mikrobiologie, 9. Aufl., Georg Thieme Verlag.
- [6] K. Drauz, I. Grayson, A. Kleemann, H.-P. Krimmer, W. Leuchtenberger, C. Weckbecker, Amino acids, In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 2012, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [7] S. Wu et al. (2020). Biokatalyse: Enzymatische Synthese für industrielle Anwendungen. Angew Chem 132, 2–37.
- [8] R. Gowers (1886). A Manual of Diseases of the Nervous System (London: J & A Churchill, 1886), Illustration gemeinfrei aus <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9086810>
- [9] BASF SE, BASF erwirbt von AgriMetis™ patentgeschützte L-Glufo-sinat-Ammonium Technologie. Pressemitteilung 14. September 2020: <https://www.basf.com/global/de/media/news-releases/2020/09/p-20-297.html>
- [10] D. Cameron et al., Girl from Oklahoma, In: S. Panther [Ed.]: Feel the Steel, 2009, Universal Records.
- [11] U. Engel, J. Rudat, C. Sylдатk, The Hydantoinase Process: Recent developments for the production of non-canonical amino acids. In: P. Grunwald (Ed.), Industrial biocatalysis, 2014, Chapter 22, 817–862, Pan Stanford Publ.
- [12] C. Slomka et al. (2017). Toward a cell-free hydantoinase process: screening for expression optimization and one-step purification as well as immobilization of hydantoinase and carbamoylase, AMB Expr 7, 122.
- [13] O. Buß et al. (2018). β -Phenylalanine ester synthesis from β -keto ester substrate using engineered ω -transaminases, Molecules 23, 1211.
- [14] S. Dold, L. Cai, J. Rudat (2017). One-step purification and immobilization of a β -amino acid aminotransferase using magnetic (M-PVA) beads, Eng Life Sci 16, 568–576.
- [15] O. Buß et al. (2018). The ω -transaminase engineering database (ω TAED): A navigation tool in protein sequence and structure space, Proteins 86, 566–580.
- [16] M. G. Hoesl et al. (2011). Lipase Congeners Designed by Genetic Code Engineering, ChemCatChem 3, 213–221.
- [17] J. Fredens et al. (2019). Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome, Nature 569, 514–518. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1192-5>
- [18] Q. Zhou (2017). Site-Specific Antibody Conjugation for ADC and Beyond, Biomedicines 5(4), 64. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5040064>
- [19] H. D. Biava et al. (2020). Tackling Achilles' Heel in Synthetic Biology: Pairing Intracellular Synthesis of Noncanonical Amino Acids with Genetic-Code Expansion to Foster Biotechnological Applications, ChemBioChem 21(9), 1265–1273. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900756>
- [20] I. Nikić-Spiegel (2020). Expanding the Genetic Code for Neuronal Studies, ChemBioChem 21, 3169–3179.

Verfasst von:



Jens Rudat, Jahrgang 1975, 1995–2000 Biologiestudium an der Universität Bonn, dortselbst anschließend Promotion im Fach Mikrobiologie, ab 2006 Gruppenleiter für Biokatalyse im Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik_2: Technische Biologie an der Universität Karlsruhe (seit 2009 Karlsruher Institut für Technologie/KIT), 2012 Ernennung zum Akademischen Rat auf Zeit.



Ulrike Engel, Jahrgang 1982, 2000–2006 Studium der Angewandten Naturwissenschaft an der TU Bergakademie Freiberg, 2007–2012 Promotion am Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik_2: Technische Biologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), 2012–2016 Post-Doc ebenda, seit 2016 DFG-Nachwuchsgruppenleiterin.

Korrespondenz:

Dr. Jens Rudat
BLT_2: Technische Biologie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fritz-Haber-Weg 4
76131 Karlsruhe
E-Mail: jens.rudat@kit.edu



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

**GEMEINSAM
FÜR DIE**

BIEWISSENSCHAFTEN

Gute Gründe, dem VBIO beizutreten:

- Werden Sie Teil des größten Netzwerks von Biowissenschaftlern in Deutschland
- Unterstützen Sie uns, die Interessen der Biowissenschaften zu vertreten
- Nutzen Sie Vorteile im Beruf
- Bleiben Sie auf dem Laufenden – mit dem VBIO-Newsletter und dem Verbandsjournal „Biologie in unserer Zeit“
- Treten Sie ein für die Zukunft der Biologie



www.vbio.de

Jetzt beitreten!

