



### Robert Winkler

Jahrgang 1975. 1995–1999 Biotechnologie-Studium an der FH Jena. Nach zwei Jahren bei ProThera GmbH und Dragenopharm GmbH Master-Kurs in Biochemical Engineering in Birmingham, GB mit einem DAAD-Stipendium. 2004–2007 Promotion bei Prof. Dr. C. Hertweck am Hans-Knöll-Institut Jena; dort Leiter der Gruppe Massenspektrometrie.

■ Mit Nitroverbindungen werden meist TNT, Farbstoffe und Pflanzenschutzmittel assoziiert. Neben diesen chemisch synthetisierten Produkten gibt es aber auch natürliche Nitrosubstanzen mit oft bemerkenswerten Bioaktivitäten.

Während der Abbau von Nitroverbindungen durch Mikroorganismen gründlich erforscht wurde, lag die Biosynthese von Nitroverbindungen bisher weitgehend im Dunklen. Die vermutlich wichtigste Route führt von einem primären Amin über N-Oxygenierung zur Nitrogruppe. AurF ist als N-Oxygenase an der Biosynthese des antifungalen, insektiziden und zytotoxischen Aureothins in *Streptomyces thioluteus* beteiligt und war Gegenstand meiner Dissertation.

Die *at-line*-Analyse von Kulturüberständen mittels Chromatografie und Massenspektrometrie sowie Fütterungsstudien bewiesen,

## VAAM-Promotionspreis 2008

# Biosynthese von Nitroverbindungen

ROBERT WINKLER

LEIBNIZ INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG UND INFektionsBIOLOGIE E. V. – HANS-KNÖLL-INSTITUT (HKI), JENA

dass als Intermediate ein Hydroxylamin sowie höchstwahrscheinlich eine Nitrosoverbindung auftreten. Es wird also in jedem Schritt nur ein einzelnes Sauerstoffatom übertragen. Damit konnte erstmals in einem vollständigen Reaktionsweg gezeigt werden, dass eine schrittweise N-Monooxygenierung zur Nitrogruppe führt<sup>[1]</sup>.

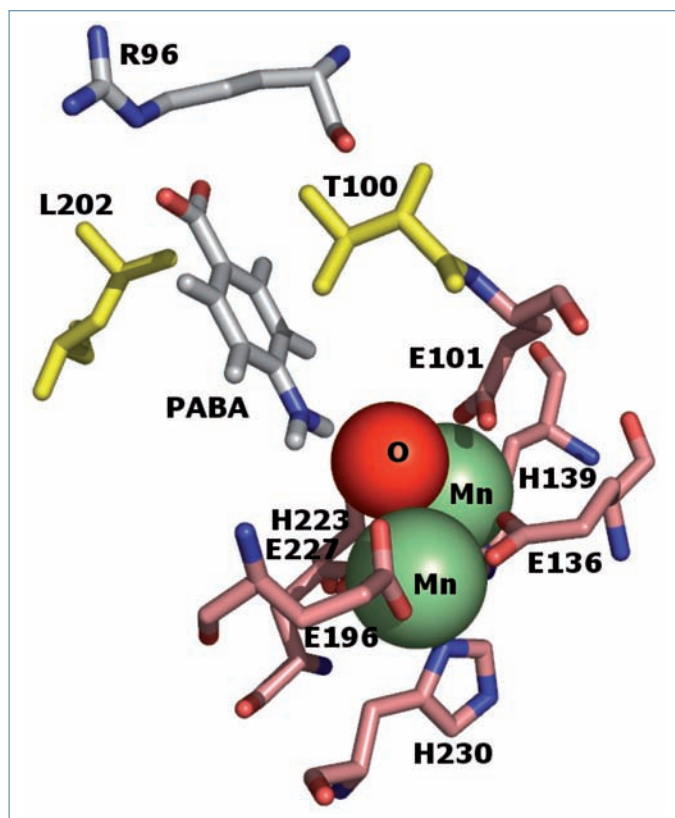
Diese N-Oxygenierung ist dabei streng chemo- und regioselektiv. Es gelang, das Enzym als Fusionsprotein in *Escherichia coli* zu produzieren und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu aktivieren. Nach der Immobilisierung von AurF konnte in einem kontinuierlichen Prozess aus einer Mischung von Stellungsisomeren das native *para*-Substrat selektiv N-oxidiert werden<sup>[2]</sup>. Auf rein chemischem Weg wäre dies nicht in einem Schritt möglich.

Die Charakterisierung des Proteins ergab, dass es sich bei AurF um ein Homodimer mit

einem binuklearen Mangan-Cluster in jeder Untereinheit handelt. Damit klärten wir sowohl die erste Struktur einer N-Oxygenase als auch einer binuklearen Mangan-abhängigen Monooxygenase auf. Mittels Mutagenese-Studien wiesen wir sowohl die Koordination der Manganatome als auch die Substratbindung funktionell nach (**Abb. 1**).

Elektronenspin-Resonanz-Messungen bestätigten, dass Mangan tatsächlich an der katalytischen Aktivität beteiligt ist. Folglich konnten wir einen radikalbasierten Mechanismus in Analogie zu P450 und binuklearen Eisenenzymen vorschlagen<sup>[3]</sup>.

Da sich AurF besonders zur schonenden und selektiven N-Oxidation an sensiblen Substanzen – auch in größerem Maßstab – eignet, ergeben sich nun innovative Möglichkeiten für die Chemo-Biosynthese und die Biokatalyse. ■



◀ **Abb. 1:** Blick in das aktive Zentrum der N-Oxygenase AurF. Insgesamt sieben Aminosäurereste sind an der Koordination des binuklearen Manganzentrums (grün) beteiligt. Das Substrat *para*-Aminobenzoat (PABA) wird über zwei ungeladene Aminosäuren sowie eine Salzbrücke mit Arginin positioniert. Dadurch gelangt nur die Aminogruppe in *para*-Position zu einer sauren Gruppe in die Nähe des Sauerstoffradikals (rot) und wird oxidiert.

## Literatur

- [1] Winkler, R., Hertweck, C. (2005): Sequential enzymatic oxidation of aminoarenes to nitroarenes via hydroxylamines. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44: 4083–4087.
- [2] Winkler, R., Richter, M. E., Knüpfer, U., Merten, D., Hertweck, C. (2006): Regio- and chemoselective enzymatic N-oxygenation *in vivo*, *in vitro*, and *in flow*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45: 8016–8018.
- [3] Winkler, R., Zocher, G., Richter, I., Friedrich, T., Schulz, G. E., Hertweck, C. (2007): A binuclear manganese cluster that catalyzes radical-mediated N-oxygenation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46: 8605–8608.

## Korrespondenzadresse:

Dr. Robert Winkler  
Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V.  
Hans-Knöll-Institut (HKI)  
Abteilung Biomolekulare Chemie  
Beutenbergstraße 11a  
D-07745 Jena  
Tel.: 03641-532-1033  
Fax: 03641-532-0800  
robert.winkler@hki-jena.de  
www.hki-jena.de

Sponsoren des VAAM-Promotionspreises 2008 waren die Firmen:  
Evonik Degussa, Sanofi-Aventis, BASF, Bayer Schering, Lonza, New England Biolabs.