

Gentechnologie

Ansatz der synthetischen Biologie zur fermentativen Produktion von D-Phenylglycin

YVONNE MAST

LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH, BRAUNSCHWEIG UND TU BRAUNSCHWEIG

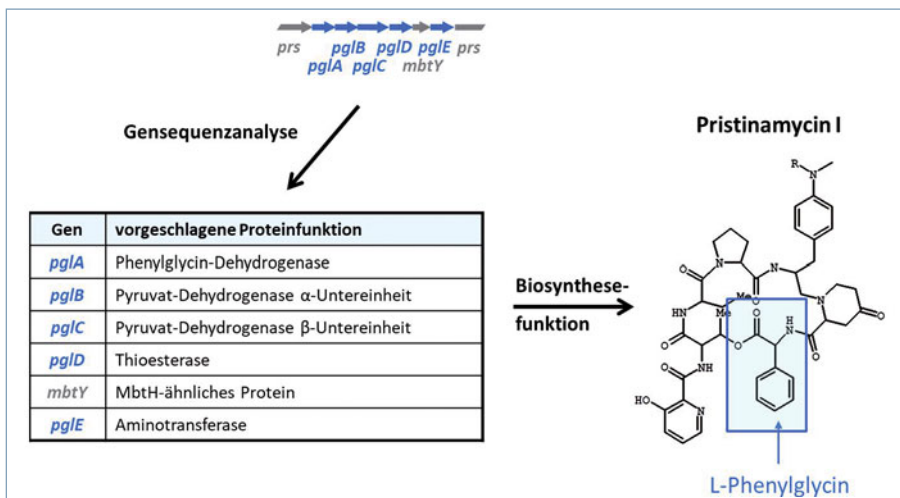
D-phenylglycine is an industrially important non-proteinogenic amino acid, which so far can only be produced by classical or chemo-enzymatic synthesis. Based on the new identified L-phenylglycine biosynthetic pathway from the pristinamycin producer *Streptomyces pristinaespiralis* and a stereoinverting aminotransferase gene (*hpgAT*) from *Pseudomonas putida*, an artificial D-phenylglycine operon was constructed, which can be used for the fermentative production of D-phenylglycine.

DOI: 10.1007/s12268-020-1361-y
© Die Autorin 2020

■ Aminosäuren sind Bausteine sämtlicher Proteine und wichtige Ausgangsstoffe für die chemische sowie Lebensmittelindustrie. Bislang wurden mehr als 900 natürliche Aminosäuren identifiziert [1], von denen die 20 Standardamino-säuren, die für die Proteinbiosynthese verwendet werden (proteinogene Aminosäuren), nur zwei Prozent ausmachen. Die Mehrheit der nicht-proteinoge-

nen Aminosäuren dient als Bausteine für zahlreiche verschiedene bioaktive Naturstoffe, wie Antibiotika [2]. Gerade nicht-proteinogene Aminosäuren, wie D-Aminosäuren, sind von industrieller Bedeutung und finden zunehmend Einsatz bei der Herstellung von Pharmazeutika, Aromastoffen, Süßstoffen oder Insektiziden. Der wachsende Bedarf an nicht-proteinogenen Aminosäuren ist auf die

stetig alternde Weltbevölkerung zurückzuführen, mit der ein gesteigerter Bedarf an diätischen und pharmazeutischen Ergänzungsmitteln einhergeht. Eine dieser industriell relevanten Aminosäuren ist D-Phenylglycin (D-Phg). D-Phg wird zur Produktion zahlreicher semisynthetischer β -Lactam-Antibiotika, wie Penicilline und Cephalosporine, verwendet. Die Aminosäure wird weltweit in einem Gesamtvolumen von über 5.000 Tonnen pro Jahr hergestellt [3]. Bislang basiert die D-Phg-Produktion ausschließlich auf klassischer bzw. chemo-enzymatischer Synthese, ausgehend von petrochemischen Rohstoffen [4]. Diese konventionelle Methode beinhaltet mehrere Prozessierungsschritte und ist mit dem Einsatz zahlreicher Chemikalien und Lösungsmittel sowie dem Anfallen giftiger Abfallstoffe verbunden. Nachhaltiger und umweltschonender wäre ein biokatalytisches Produktionsverfahren, bei dem mithilfe von Mikroorganismen die Aminosäure fermentativ auf Grundlage von nachwachsenden Rohstoffen wie Glucose hergestellt wird. Ein solches fermentatives Produktionsverfahren war bis vor Kurzem nicht möglich, da die Gene für die Phg-Biosynthese nicht bekannt waren.

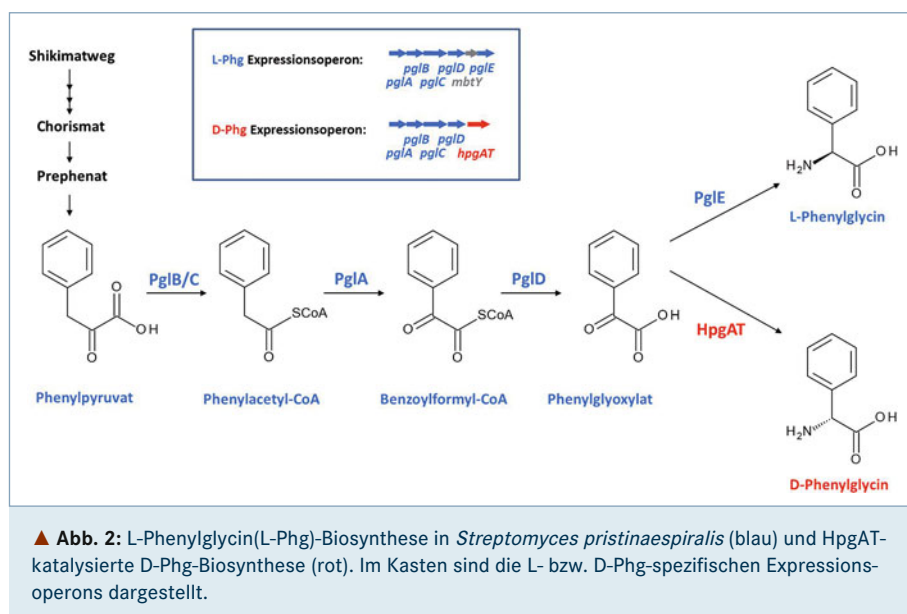


▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung des L-Phenylglycin(L-Phg)-Operons aus *Streptomyces pristinaespiralis* (oben) und zugehörige Proteinfunktionen (Tabelle). Die Phg-Gene (*pgl*) sind blau hervorgehoben, andere Pristinamycin-spezifische Biosynthesegene (*prs*, *mbtY*) sind grau dargestellt. Rechts ist die chemische Struktur von Pristinamycin I mit dem Phenylglycin-Baustein (blau) gezeigt.

Bioressourcen als Quelle neuer Stoffwechselwege

Die seltene, nicht-proteinogene Aminosäure L-Phenylglycin kommt natürlicherweise nur als Bestandteil von mikrobiellen Naturstoffen vor, wie den Streptogramin-Antibiotika Pristinamycin I (**Abb. 1**) und Virginiamycin S oder dem bicyklischen Antibiotikum Dityromycin. Im Zuge der Charakterisierung des Pristinamycin-Biosynthese-Genclusters aus dem Actinomyceten *Streptomyces pristinaespiralis* wurden fünf Gene (*pglA*, *pglB*, *pglC*, *pglD* und *pglE*) gefunden, die für die L-Phg-Biosynthese codieren (**Abb.**, [5, 6]). Als Ausgangssubstanz der L-Phg-Biosynthese dient das Produkt des Shikimat-Biosyntheseweges Phenylpyruvat, welches durch den Pyruvatdehydrogenase-ähnlichen Komplex PglB/C zu Phenylacetyl-CoA umgesetzt wird (**Abb. 2**). Die Phenylglycindehydrogenase

PgIA katalysiert die Reaktion von Phenylacetyl-CoA zu Benzoylformyl-CoA, das in einem nachfolgenden Schritt von der Thioesterase PgID unter Abspaltung des CoA-Restes in Phenylglyoxylat überführt wird. In einem letzten Reaktionsschritt wird Phenylglyoxylat von der Aminotransferase PglE in L-Phenylglycin umgewandelt (Abb. 2). Bei dieser Transaminierungsreaktion wird L-Phenylalanin als Aminogruppendonor verwendet, wobei Phenylpyruvat als Reaktionsprodukt anfällt, das anschließend wieder in den Phg-Biosyntheseweg eingespeist werden kann [7]. Dieses Modell beschreibt den ersten bekannten natürlichen Phg-Biosyntheseweg. Die Entdeckung dieses Biosyntheseweges zeigt exemplarisch, wie wichtig Bioressourcen für das Auffinden neuer Stoffwechselwege sind.



Ansatz der synthetischen Biologie zur Konstruktion eines D-Phg-Biosyntheseweges

Der natürliche L-Phg-Biosyntheseweg aus *S. pristinaespiralis* kann nun als Grundlage dazu dienen, das gewünschte enantiomere D-Phg herzustellen. Hierbei fungiert das natürliche L-Phg-Operon aus *S. pristinaespiralis* als Ausgangspunkt. Das endständige Aminotransferase-Gen *pglE* aus *S. pristinaespiralis* wird gegen das Gen *hpgAT* aus *Pseudomonas putida* ausgetauscht, welches für eine stereoinvertierende D-Aminotransferase codiert, die stereospezifisch Phenylglyoxylat zu D-Phg umsetzt (Abb. 2, [8, 9]). Beide Operons, sowohl das natürliche L-Phg-Operon aus *S. pristinaespiralis* als auch das gentechnologisch hergestellte D-Phg-Operon, wurden bereits erfolgreich in verschiedenen Actinomyceten exprimiert und die Phg-Produktion nachgewiesen [8]. Demnach bietet dieser gentechnologische Ansatz eine neue Möglichkeit zur nachhaltigen, fermentativen Produktion von D-Phg.

Nutzung der Phg-Gene zur Erzeugung neuer Antibiotika-Derivate

Neben der Verwendbarkeit der Phg-Gene zur fermentativen Aminosäureproduktion können die Gene aber auch zur Herstellung neuer Wirkstoffderivate genutzt werden. Pristinamycin wird als Notfallmedikament gegen hochresistente pathogene Keime eingesetzt [10]. Eine Möglichkeit, die Bioaktivität der Substanz zu verbessern bzw. Antibiotikaresistenzen zu begegnen, besteht darin, die chemische Struktur des Antibiotikums zu verändern. Pristinamycin ist allerdings

strukturell zu komplex für eine Derivatisierung durch chemische Synthese. Um neue, verbesserte Antibiotika-Derivate zu erzeugen, bietet sich hier das Mutasynthese-Verfahren an. Dabei werden alternative Start- oder Verlängerungsbausteine an einen mutierten Produzentenstamm verfüttert, der den ursprünglichen Baustein nicht mehr synthetisieren kann und auf diese Weise neue Produktderivate erzeugt. Phg ist ein essenzieller Bestandteil von Pristinamycin I und wichtig für dessen Bioaktivität. Durch Inaktivierung der Phg-Gene und die anschließende Fütterung der *S. pristinaespiralis*-Phg-Blockmutante mit unterschiedlichen Phg-Derivaten können zukünftig neue Pristinamycin-I-Analoga mit optimierten antibiotischen Eigenschaften erzeugt werden.

Danksagung

Die Projektarbeiten wurden vom Nachwuchsförderprogramm „Projektförderung für NachwuchswissenschaftlerInnen“ der Universität Tübingen (Deutsche Forschungsgemeinschaft, ZUK 63), der Baden-Württemberg Stiftung (BWST_WSF-035) und dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) (TTU 09.819) unterstützt.

Literatur

- [1] Lu Y, Freeland S (2006) On the evolution of the standard amino-acid alphabet. *Genome Biol* 7:102
- [2] Walsh CT, O'Brien RV, Khosla C (2013) Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew Chemie* 52:7098–7124
- [3] Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD et al. (2006) Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids. *J Am Chem Soc* 128:10923–10929

- [4] Wegman MA, Janssen MHA, van Rantwijk F et al. (2001) Towards biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Adv Synth Catal* 343:559–576
- [5] Mast Y, Weber T, Götz M (2011) Characterization of the 'pristinamycin supercluster' of *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microb Biotechnol* 4:192–206
- [6] Mast Y, Wohlleben W, Schinko E (2011) Identification and functional characterization of phenylglycine biosynthetic genes involved in pristinamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*. *J Biotechnol* 155:63–67
- [7] Osipenkov N, Kulik A, Mast Y (2018) Characterization of the phenylglycine aminotransferase PglE from *Streptomyces pristinaespiralis*. *J Biotechnol* 278:34–38
- [8] Moosmann D, Mokeev V, Kulik A et al. (2020) Genetic engineering approaches for the fermentative production of phenylglycines. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:3433–3444
- [9] Mast Y, Schinko E, Wohlleben W (2011) Verfahren zur fermentativen Produktion von D-Phenylglycin. Patent application DE102011007991A1
- [10] Mast Y, Wohlleben W (2014) Streptogramins – two are better than one! *Int J Med Microbiol* 304:44–50

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:



Prof. Dr. Yvonne Mast
Leibniz-Institut DSMZ –
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH
Abteilung Bioressourcen
für die Bioökonomie und
Gesundheitsforschung
Inhoffenstraße 7B
D-38124 Braunschweig
yvonne.mast@dsMZ.de