

- Triphenylmethyl, Tf = Trifluormethylsulfonyl, Bn = Benzyl, LDBB = Di-*tert*-butylbiphenyllithium, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, MsCl = Methansulfonylchlorid, LiHMDS = Lithiumhexamethyldisilazid.
- [5] D. A. Evans, E. Vogel, J. V. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6120–6123.
 - [6] Die Umsetzung des (*E*)-Borenolats von **1** mit Isobutyraldehyd verlief mit geringerer Diastereoselektivität (2:1).
 - [7] Ein hohes Maß an 1,2-Diastereoselektion bei der Addition von Nucleophilen an α -Methyl- β -methylensubstrate wurde festgestellt: a) F. Sato, Y. Takeda, H. Uchiyama, Y. Kobayashi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1132–1134; b) F. Sato, M. Kusakabe, Y. Kobayashi, *ibid.* **1984**, 1130–1131; c) F. Sato, M. Kusakabe, T. Kato, Y. Kobayashi, *ibid.* **1984**, 1331–1332.
 - [8] a) D. A. Evans, J. L. Duffy, M. J. Dart, unveröffentlichte Ergebnisse; b) D. A. Evans, J. V. Nelson, t. Taber, *Top. Stereochem.* **1982**, *13*, 1–115; c) W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4151–4157.
 - [9] K. Ganesan, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7162–7169.
 - [10] Der Aldehyd **2** wurde ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt. Chromatographie von **2** an Kieselgel führte zur Isomerisierung zum α,β -ungesättigten Aldehyd.
 - [11] Die Desilylierung wurde vorzeitig abgebrochen; ein geringer Anteil (15 %) der monosilylierten Verbindung (Hydroxygruppe an C₅) wurde zurückgewonnen.
 - [12] Zur Entfernung einer Tritylschutzgruppe mit Et₃AlCl siehe: H. Köster, N. D. Sinha, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2641–2644.
 - [13] Die Verwendung von wäßrigem Rochelle-Salz war während der Isolierung notwendig, um die Organoaluminiumsalze vor dem Einengen zu entfernen, denn sonst isomerisierte das Spiroketal Aluminium-vermittelt zum unerwünschten diaxialen Anomer.
 - [14] Nicht umgesetzter Aldehyd **5** (11 %) wurde ebenfalls diastereomerenrein zurückgewonnen.
 - [15] Die mäßige Ausbeute dieser Reaktion kann teilweise auf Schwierigkeiten bei der Isolierung der polaren Trihydroxycarbonsäure beim Arbeiten in kleinem Maßstab zurückgeführt werden. Die DC-Kontrolle der Reaktion deutet auf eine saubere und einheitliche Umsetzung hin.
 - [16] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989–1993.
 - [17] Das erste Produkt der Reaktion ist der entsprechende C₁-TES-Ester, der während der Reinigung an Kieselgel gespalten wird.
 - [18] Wir danken Professor G. R. Pettit für eine Probe von natürlichem Spongistatin **2**.
 - [19] Wir danken Professor M. Kobayashi für Kopien der Spektren von natürlichem Althohyrtin **C**.
 - [20] Eine noch spätere Einführung der Seitenketten nach der Lactonisierung der Seco-Carbonsäure erscheint zwar zunächst möglich, doch haben erste Untersuchungen dieser alternativen Route ergeben, daß die Epoxidierungs/Allylstannan-Additionssequenz am Makrocyclus schwieriger ist.

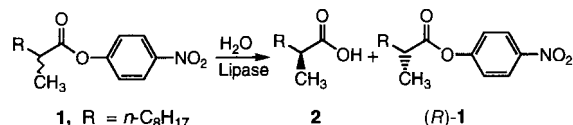
Erzeugung enantioselektiver Biokatalysatoren für die Organische Chemie durch In-vitro-Evolution

Manfred T. Reetz,* Albin Zonta, Klaus Schimossek, Klaus Liebeton und Karl-Erich Jaeger*

Die Entwicklung chiraler Katalysatoren für die enantioselektive Synthese optisch aktiver Verbindungen ist von großem akademischen^[1] und industriellen^[2] Interesse. Trotz weltweit intensiver Forschung auf dem Gebiet der homogenen Übergangsmetallkatalyse ist die Zahl der wirklich effizienten enantioselektiven Katalysatoren begrenzt. Aufgrund fehlender allgemeiner Prinzipien ist bei der Entwicklung eines einzigen hochwirksamen chiralen Katalysators die arbeits-

aufwendige Herstellung und Erprobung von sehr vielen Liganden erforderlich. Als Alternative bieten sich Biokatalysatoren an, die jedoch naturgemäß eine begrenzte Substratspezifität aufweisen.^[3] Durch ortsspezifische Mutagenese können in Einzelfällen Verbesserungen hinsichtlich Enzymaktivität und Selektivität herbeigeführt werden, nicht jedoch eine allgemeine Lösung des Problems, denn das Verfahren erfordert detaillierte Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur des Enzyms und dessen Wirkmechanismus sowie ein gewisses Maß an Intuition bei der Wahl der auszutauschenden Aminosäure.^[4] Wir beschreiben hier einen neuen Ansatz zur Entwicklung enantioselektiver Katalysatoren: die In-vitro-Evolution als Methode zur schrittweisen Erhöhung der Enantioselektivität eines gegebenen unselektiven Biokatalysators.^[5] Das dabei zugrunde liegende Prinzip – „Evolution im Reagensglas“ – erfordert keine Kenntnisse der Enzymstruktur oder des Katalysarmechanismus. Das Verfahren der In-vitro-Evolution^[6] wurde schon zur Steigerung der thermischen Stabilität und Aktivität von Enzymen erfolgreich angewendet.^[7,8] Die Kombination geeigneter molekularbiologischer Methoden zur Zufallsmutagenese und Gen-Expression mit einem effizienten Screening-System zur raschen Identifizierung von enantioselektiven Mutanten bildet die Basis unserer Strategie.^[5]

Als Testreaktion wählten wir die enantioselektive Hydrolyse von racemischem 2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylester **1**. Die freie (*S*)-konfigurierte Säure gehört zu einer Klasse von chiralen Verbindungen, die bei der Herstellung von bestimmten Pharmazeutika, Pflanzenschutzmitteln und chiralen Bausteinen in der organischen Synthese Anwendung finden.^[2] Als Biokatalysator wurde eine Lipase aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 verwendet, die im prozessierten Zustand aus 285 Aminosäuren besteht.^[9] Das Wildtyp-Enzym weist eine Enantioselektivität (*ee*) von nur 2 % zugunsten der (*S*)-konfigurierten Säure **2** auf.



Die Zahl von Mutanten eines gegebenen Enzyms, bei dem in jedem Enzymmolekül eine Aminosäure gegen eine der 19 verbliebenen ausgetauscht wurde, ergibt sich nach Gleichung (a), mit *N* = Zahl der Mutanten, *M* = Zahl der ausge-

$$N = 19^M X! / [(X - M)! M!] \quad (\text{a})$$

tauschten Aminosäuren pro Enzymmolekül (in diesem Fall 1) und *X* = Zahl der Aminosäuren im Enzym. Demnach enthält eine entsprechende Mutantenbibliothek der *P. aeruginosa*-Lipase 5415 Mutanten. Obwohl eine solche Bibliothek an sich schon relativ klein ist, ergeben unsere Untersuchungen, daß bereits beim Screening einer noch geringeren Zahl von Mutanten Katalysatoren mit deutlich verbesserter Enantioselektivität erhalten werden können.

Unter Anwendung der sogenannten fehlerhaften Polymerase-Kettenreaktion (fPCR)^[10] wurde das aus 933 Basenpaaren bestehende Lipase-Gen einer Zufallsmutagenese unterworfen.^[11a] Dazu wurde die Mutationsfrequenz durch Veränderung der PCR-Reaktionskomponenten sowie -bedingungen, z. B. durch Variation der Mg²⁺-Konzentration, empirisch so eingestellt, daß statistisch ein bis zwei Basenaustau-

* Prof. M. T. Reetz, Dr. A. Zonta, Dipl.-Chem. K. Schimossek
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr
Telefax: Int. + 208/306-2985
E-mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de

* Priv.-Doz. Dr. K.-E. Jaeger, Dipl.-Biol. K. Liebeton
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität
D-44780 Bochum
Telefax: Int. + 234/7094-425
E-mail: karl-erich.jaeger@ruhr-uni-bochum.de

sche pro Lipase-Gen eingeführt wurden, was zu einer Substitution von bis zu zwei Aminosäuren pro Lipasemolekül führen könnte. Diese an sich niedrige Zahl von Mutationen pro Lipasemolekül wurde gewählt in der Annahme, daß eine Identifizierung der selten auftretenden Mutationen mit positivem Effekt nicht durch die häufiger auftretenden Mutationen mit negativem Effekt verhindert würde. Die mutierten Gene wurden in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert, in *E. coli* amplifiziert und nach Transformation in *P. aeruginosa* exprimiert.^[5,11b] Alle so produzierten bakteriellen Klone wurden kultiviert, wobei theoretisch jede einzelne Kolonie eine mutierte Lipase produziert.

Etwa 1000 so erhaltene Mutanten sollten nun auf ihre Eignung als enantioselektive Katalysatoren bei der Testreaktion geprüft werden. Um diese schwierige Aufgabe innerhalb einer überschaubaren Zeitspanne zu erledigen, mußte zunächst ein effizientes Testsystem entwickelt werden, denn die herkömmlichen, auf flüssig- oder gaschromatographischer Trennung basierenden Methoden sind angesichts der Zahl der zu erwartenden Proben ungeeignet. Dazu wurden zunächst die 96 Tröge kommerziell erhältlicher Mikrotiter-Platten paarweise mit den Kulturüberständen von Lipase-Mutanten gefüllt und nachfolgend mit 0.01M Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)/HCl-Puffer (pH = 7.5) und den in DMF gelösten enantiomerenreinen (*R*)- sowie (*S*)-Substraten beschickt. Auf diese Weise konnten bis zu 48 Mutanten pro Mikrotiter-Platte parallel getestet werden. Die enzymkatalysierte Hydrolyse ließ sich spektrophotometrisch für jedes (*R*)/(*S*)-Reaktionspaar durch Messung der Absorption des *p*-Nitrophenolat-Ions bei 410 nm zeitlich verfolgen. Abbildung 1 zeigt die Wirkung der ursprünglichen Wildtyp-Lipase

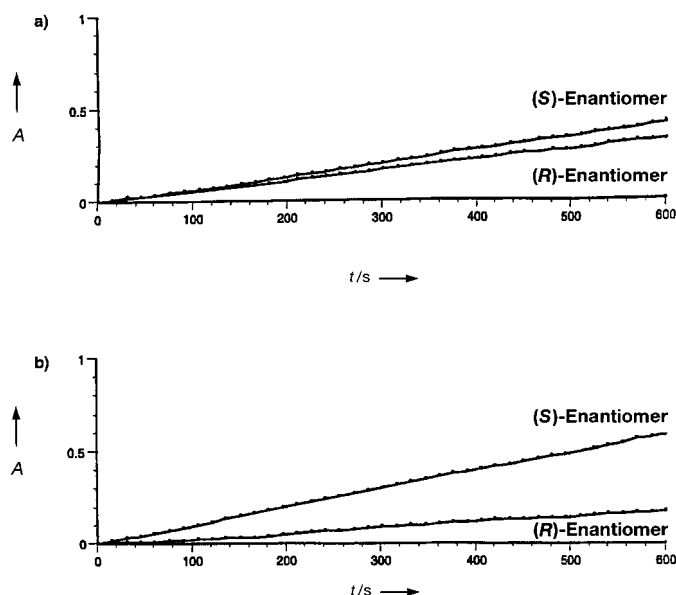


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Lipase-katalysierten Hydrolyse von (*R*)- und (*S*)-Ethern 1. a) Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa*, b) verbesserte Mutante der 1. Generation.

sowie den typischen Reaktionsverlauf einer verbesserten Mutante. Obwohl die relativen Steigungen der jeweiligen Geraden als Maß für die Enantioselektivität herangezogen werden können, haben wir sie aufgrund unterschiedlicher Fehlerquellen nur als qualitativen Hinweis genutzt. Von 1000 getesteten Mutanten der ersten Generation wiesen 12 eine erhöhte Enantioselektivität auf. Die Enantioselektivität wur-

de durch Hydrolyse des Racemats 1 in Gegenwart der entsprechenden Mutanten-Lipasen im Labormaßstab und nachfolgende gaschromatographische Analyse an chiralmodifizierten Kapillarsäulen exakt bestimmt. Für die beste Mutante, P1B01-E4, wurde eine Enantioselektivität von 31 % *ee* bestimmt.

Der Klon mit der jeweils höchsten Enantioselektivität wurde ausgewählt und für die folgende Mutagenese-Runde verwendet (Tabelle 1). Abbildung 2 zeigt, daß es gelang, die Enantioselektivität von 2 % *ee* des Wildtyp-Enzyms in nur vier Generationen auf 81 % *ee* zu steigern.

Tabelle 1. Screening-Ergebnisse.

Generation	Zahl der getesteten Klone	Zahl der positiven Klone	Bezeichnung des ausgewählten Klons
1	1000	12	P1B01-E4
2	2200	10	P2B08-H3
3	2400	1	P3B13-D10
4	2000	6	P4B04-H3

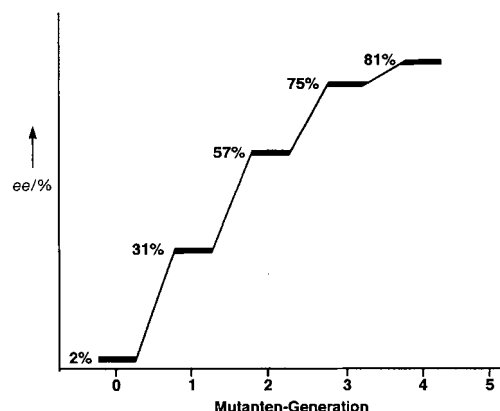


Abb. 2. Sequentieller Anstieg der Enantioselektivität bei der Testreaktion mit 1 im Verlauf der Mutagenese-Experimente. (Die *ee*-Werte beziehen sich auf die jeweils beste Mutante bei einer Reaktion in einem Umsatzbereich von 20–30 %; die entsprechenden *E*-Werte betragen 1.00, 2.10, 4.40, 9.40 bzw. 11.3.)

Angesichts der Tatsache, daß nur vier Mutanten-Generationen erzeugt und dabei nur relativ wenige Mutanten getestet wurden, sind die bisher erhaltenen Ergebnisse bemerkenswert. Zur weiteren Erhöhung der Enantioselektivität beschreiten wir gegenwärtig mehrere Wege: 1) umfassenderes Screening; 2) Erzeugung weiterer Mutanten-Generationen; 3) DNA-Shuffling^[6b,7] als alternative Mutagenese-Methode und 4) Sättigungsmutagenese^[12] (systematischer Austausch an den mutierten Stellen gegen alle verbliebenen Aminosäuren). Eine Voraussage, welcher der vier Wege am schnellsten zu einer weiteren Erhöhung der Enantioselektivität führen wird, ist gegenwärtig nicht möglich.^[13] Untersuchungen zur Sequenzierung der Mutanten-Gene sowie die Modellierung der dreidimensionalen Struktur der Mutanten-Proteine sind ebenfalls im Gange.

Lipasen aus unterschiedlichen Organismen werden bekanntlich als Katalysatoren bei der enantioselektiven Synthese von chiralen Estern, Alkoholen, Aminen, Diolen, Diestern, Diaminen, Aminoalkoholen, α - und β -Aminosäure-Derivaten sowie Cyanhydrinen routinemäßig eingesetzt, allerdings nicht immer mit brauchbaren *ee*-Werten.^[3,14] Des-

halb eröffnet unsere Methode, die nicht auf Lipasen beschränkt sein dürfte, neue Perspektiven für die Organische Chemie. Die hier beschriebene evolutive Optimierung der Enantioselektivität kann nun mit der Suche nach erhöhter Enzymstabilität und -aktivität systematisch kombiniert werden.^[15] Entscheidend bei allen Bemühungen auf diesem neuen Betätigungsfeld ist die Entwicklung weiterer Screening-Methoden.^[15,16]

Eingegangen am 30. Oktober 1997 [Z11106]

Stichwörter: Asymmetrische Katalyse • Enzymkatalyse • Lipasen • Screening-Verfahren • Zufallsmutagenesen

- [1] Siehe z. B.: a) D. J. Berrisford, C. Bolm, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1159–1171; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1059; b) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley, New York, **1994**; c) A. Pfaltz, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 339–345.
- [2] a) *Chirality in Industry: The Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1992**; b) *Chirality in Industry II: Developments in the Commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1997**; c) A. Persidis, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 594–595; d) R. A. Sheldon, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Dekker, New York, **1993**; e) *Industrial Enzymology* (Hrsg.: T. Godfrey, S. West), 2. Aufl., Macmillan, London, **1996**.
- [3] a) H. G. Davies, R. H. Green, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry: The Use of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis*, Academic Press, London, **1989**; b) C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1994**; c) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**; d) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **1997**.
- [4] a) A. J. Russell, A. R. Fersht, *Nature (London)* **1987**, 328, 496–500; b) M. Holmquist, I. G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen, K. Hult, *J. Protein. Chem.* **1995**, 14, 217–224; c) H. D. Beer, G. Wohlfahrt, J. E. G. McCarthy, D. Schomburg, R. D. Schmid, *Protein Eng.* **1996**, 9, 507–517; d) Y. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kuroki, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 1063–1066; e) M. J. Haas, R. D. Joerger, G. King, R. R. Klein, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1996**, 799, 115–128.
- [5] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *DE-A* 19731990.4.
- [6] a) K. Chen, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5618; b) W. P. C. Stemmer, *Nature (London)* **1994**, 370, 389–391.
- [7] a) A. Cramer, G. Dawes, E. Rodriguez, Jr., S. Silver, W. P. C. Stemmer, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 436–438; b) W. P. C. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 10747–10751; c) J.-H. Zhang, G. Dawes, W. P. C. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 4504–4509.
- [8] a) J. C. Moore, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 458–467; b) F. H. Arnold, *Chem. Eng. Sci.* **1996**, 51, 5091–5102; c) Z. Shao, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 513–518; d) L. You, F. H. Arnold, *Protein. Eng.* **1996**, 9, 77–83; e) A. Shinkai, A. Hirano, K. Aisaka, *J. Biochem. (Tokyo)* **1995**, 120, 915–921.
- [9] a) K.-E. Jaeger, B. Schneidinger, K. Liebeton, D. Haas, M. T. Reetz, S. Philippou, G. Gerritse, S. Ransac, B. W. Dijkstra in *Molecular Biology of Pseudomonads* (Hrsg.: T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas, S. Silver), ASM Press, Washington, **1996**, S. 319–330; b) K.-E. Jaeger, K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, 46, 99–105.
- [10] a) D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique (Philadelphia)* **1989**, 1, 11–15; b) K. A. Eckert, T. A. Kunkel, *PCR Methods Appl.* **1991**, 1, 17–24; c) R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *ibid.* **1992**, 2, 28–33.
- [11] a) Zur fehlerhaften PCR-Mutagenese wurde das im Vektor pBluescript I IKS (Stratagene) befindliche Lipase-Gen mit den Oligonucleotiden A: 5'-GCGCAATTA ACCCTCACTAAAGGG AACAAA-3' und B: 5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGCGGAA-3' unter den in Lit. [6 a, 9] beschriebenen Bedingungen nach dem folgenden Programm amplifiziert: 2 min 98 °C (1 ×); 1 min 94 °C, 2 min 64 °C, 1 min 72 °C (25 ×); 7 min 72 °C (1 ×); b) *E. coli* JM109 wurde mit den in den Vektor pUCPL6A, ein pUCPKS-Derivat (A. A. Watson, R. A. Alm, J. S. Mattick, *Gene* **1996**, 172, 163–164), ligierten PCR-Produkten transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA aller Klone wurde *P. aeruginosa*-PABST7.1 (K.-E. Jaeger, B. Schneidinger, F. Rosenau, M. Werner, D. Lang, B. W. Dijkstra, K. Schimossek, A. Zonta, M. T. Reetz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, 3, 3–12) mit dieser DNA transformiert. Für die erneute Mutagenese wurde das Lipase-Gen des jeweils besten Klons einer Generation zurück in den Vektor pBluescript I IKS kloniert.
- [12] a) H. Flores, J. Osuna, J. Heitman, X. Soberon, *Gene* **1995**, 157, 295–301; b) M. S. Warren, S. J. Benkovic, *Protein Eng.* **1997**, 10, 63–68.
- [13] Es ist nicht gesagt, daß unsere derzeitige Strategie unter Verwendung der jeweils besten Mutante einer Generation tatsächlich optimal ist. Möglicherweise führt eine weniger selektive Mutante bei der darauf folgenden Mutagenese-Runde zu einem besseren Ergebnis.
- [14] a) W. Boland, C. Fröhl, M. Lorenz, *Synthesis* **1991**, 1049–1072; b) F. Theil, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2203–2227; c) *Lipases, Part A: Biotechnology* (Hrsg.: B. Rubin, E. A. Dennis), Academic Press, San Diego, **1997** (*Methods Enzymol.* **1997**, 284); d) *Lipases, Part B: Enzyme Characterization and Utilization* (Hrsg.: B. Rubin, E. A. Dennis), Academic Press, San Diego, **1997** (*Methods Enzymol.* **1997**, 286); e) E. N. Vulfson in *Lipases* (Hrsg.: P. Woolley, S. B. Petersen), Cambridge University Press, Cambridge, **1994**, S. 271–288; f) *Engineering of/with Lipases* (Hrsg.: F. X. Malcata), Kluwer, Dordrecht, **1996** (*NATO ASI Ser. Ser. E.* **1996**, 317).
- [15] Bei unseren Untersuchungen ist dies teilweise schon geschehen, denn wenig aktive Mutanten (die in manchen Fällen möglicherweise hohe Enantioselektivitäten aufweisen) werden im Zuge des Screening-Verfahrens „aus-sortiert“. Nur solche Mutanten wurden berücksichtigt, die unter den Reaktionsbedingungen innerhalb der ersten 10 min einen merklichen Umsatz mit erhöhter Enantioselektivität bewirken. Tatsächlich sind viele Mutanten nahezu gar nicht aktiv, was keineswegs überrascht.
- [16] L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4560–4561.