

- berg, R. Hoffmann, *Inorg. Chem.* **1998**, *17*, 1080; b) A. W. Ehlers, E. J. Baerends, F. M. Bickelhaupt, U. Radius, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 210.
- [5] a) H. Braunschweig, T. Wagner, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 904; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 825; b) H. Braunschweig, B. Ganter, *J. Organomet. Chem.* **1997**, *545*, 163; c) H. Braunschweig, M. Müller, *Chem. Ber.* **1997**, *130*, 1295; d) H. Braunschweig, C. Kollann, U. Englert, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 465; e) H. Braunschweig, C. Kollann, K. W. Klinkhammer, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1523; f) H. Braunschweig, M. Koster, *J. Organomet. Chem.* **1999**, 588, 213; für Übersichtsartikel siehe g) H. Braunschweig, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1786; h) H. Braunschweig, M. Colling, *J. Organomet. Chem.* **2000**, *614*, 18; i) H. Braunschweig, M. Colling, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *223*, 1.
- [6] H. Braunschweig, C. Kollann, U. Englert, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3355; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3179.
- [7] H. Braunschweig, M. Colling, C. Kollann, H. G. Stammler, B. Neumann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2359; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2298.
- [8] A. H. Cowley, V. Lomelí, A. Voigt, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6401.
- [9] G. J. Irvine, C. E. F. Rickard, W. R. Roper, A. Williamson, L. J. Wright, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 94.
- [10] a) A. K. Bandyopadhyay, R. Khattar, J. Puga, T. P. Fehlner, A. L. Rheingold, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 465; b) C. E. Housecroft, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *143*, 297.
- [11] Kristallstrukturdaten von **2**: $C_{14}H_{27}BCrO_5Si_4$, MoK α -Strahlung ($\lambda = 0.7107 \text{ \AA}$, Graphitmonochromator), $T = 203(2) \text{ K}$, $0.2 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}$, trigonal, Raumgruppe $P3_1$; $a = 9.659(3)$, $b = 9.659(3)$, $c = 23.235(11) \text{ \AA}$, $V = 1877.5(12) \text{ \AA}^3$, $Z = 3$, $\rho_{\text{calcd}} = 1.195 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 6.66 \text{ cm}^{-1}$, $F(000) = 708$, 9777 gemessene Reflexe ($2.43 < \theta < 25.09$), 4406 unabhängige Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$, 226 Variablen. Transmissionsfaktoren: $T_{\text{max}} = 1.00000$, $T_{\text{min}} = 0.744666$. Intensitäten gemessen mit Bruker-axs-SMART-Diffraktometer. Struktur mit Direkten Methoden gelöst (SHELXS-97). Verfeinerungen mit dem SHELXL-97-Paket mit anisotropen Temperaturfaktoren für alle Nichtwasserstoffatome, Wasserstoffatome mit festen isotropen Temperaturfaktoren in berechneten Positionen ($C-H = 98 \text{ pm}$, $U_{\text{iso}}(H) = 1.3 U_{\text{iso}}(C)$). $R1$ ($I > 2\sigma(I)$) = 0.0627, $wR2$ (alle Daten) = 0.1596; $GOF = 0.985$. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-163495“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [12] SCF-Berechnungen: GAUSSIAN-98-Programmaset auf einem Cluster von Workstations. Die totalen Energien E_h und ZPVE (in Hartrees, in Klammern) wurden alle auf B3LYP-Niveau mit 6-31G(d,p) Basissätzen für Nichtmetallatome und mit CEP-31G für Chrom berechnet: (CO)₅CrBSiH₃: ekliptisch – 969.371737 (0.07050), gestaffelt – 969.371677 (0.07047); (CO)₅CrBSi(SiH₃)₃: ekliptisch – 1841.480006 (0.122903), gestaffelt – 1841.479976 (0.122852); Gaussian 98 (Revision A.7), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Ciosowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998**.
- [13] J. M. Maher, R. P. Beatty, N. J. Cooper, *Organometallics* **1985**, *4*, 1354.
- [14] W. Strohmeyer, J. F. Guttenberger, H. Blumenthal, G. Albert, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 3419.
- [15] C. Kollan, Dissertation, RWTH Aachen, Deutschland, **1999**.

Eine Hochdurchsatz-Screening-Methode zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen**

Markus Baumann, Rainer Stürmer und Uwe T. Bornscheuer*

Hydrolytische Enzyme sind vielseitige Biokatalysatoren und finden zunehmend Anwendung in der organischen Synthese.^[1] Innerhalb dieser Enzymklasse werden Lipasen und Esterasen häufig eingesetzt, weil sie ein breites Spektrum nichtnatürlicher Substrate akzeptieren, meist sehr stabil in organischen Lösungsmitteln sind und gute bis exzellente Stereoselektivität in der kinetischen Racematspaltung oder der Asymmetrisierung prostereogener Verbindungen aufweisen. Durch den enormen Fortschritt gentechnischer Methoden ist die Zahl (kommerziell) erhältlicher Biokatalysatoren sprunghaft angestiegen. Jedoch macht dies das Auffinden geeigneter Enzyme durch Reaktionen im Labormaßstab gefolgt von z. B. einer GC- oder HPLC-Bestimmung der optischen Reinheiten zu einer mühsamen und zeitaufwändigen Aufgabe. Zusätzlich verlangen die kürzlich entwickelten Methoden zur gerichteten (molekularen) Evolution^[2] hoch entwickelte Testmethoden für das Hochdurchsatz-Screening (HTS) von Bibliotheken, die üblicherweise 10^4 – 10^6 Mutanten enthalten.

Zur raschen Bestimmung der Enantioselektivität E (auch als Enantiomerenverhältnis bezeichnet)^[3] wurden verschiedene Testformate entwickelt. Kazlauskas und Janes bestimmten die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in der Hydrolasekatalysierten Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl-Derivaten reiner chiraler Carbonsäuren („Quick E “) in Gegenwart von Resorufintetradecanoat, um durch diese Konkurrenzreaktion genauere E -Werte zu erhalten.^[4] Andere verwendeten chromophore^[5] oder fluorophore Substrate^[6] zur Identifizierung enantioselektiver Hydrolasen. Obwohl die Bestimmungen mit diesen Substanzen gewöhnlich sehr empfindlich sind, liegt ein großer Nachteil im Vorhandensein voluminöser Reste, die üblicherweise erheblich von denen „wahrer“ Substrate, z. B. eines Acetats, abweichen. Folglich besteht die Gefahr, dass die identifizierten „geeigneten“ Enzyme bei der Umsetzung des „wahren“ Substrates andere Selektivitäten aufweisen.

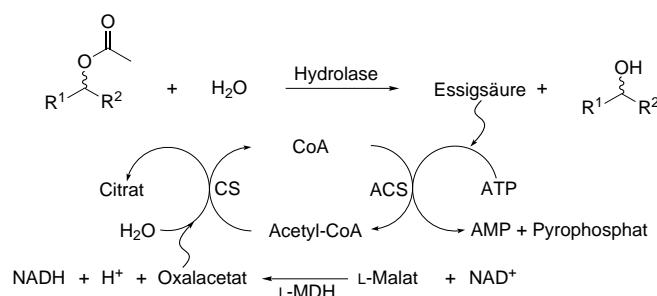
[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Institut für Chemie und Biochemie
Abt. Technische Chemie & Biotechnologie
Universität Greifswald
Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-4373
Internet: <http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech>
E-mail: bornsche@mail.uni-greifswald.de

M. Baumann
Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart (Deutschland)
Dr. R. Stürmer
BASF AG, Abt. Biotechnologie
Ludwigshafen (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg und von der BASF AG, Ludwigshafen, unterstützt. Wir danken Prof. R. D. Schmid (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) für wertvolle Diskussionen.

Um dieses Problem zu umgehen, setzten Kazlauskas und Mitarbeiter einen allgemeiner anwendbaren Test ein, in dem sowohl Acetate chiraler Alkohole als auch Ester chiraler Carbonsäuren in Gegenwart von *p*-Nitrophenol als pH-Indikator umgesetzt wurden.^[7] Ein schrittweises Screening auf enantioselektive Hydrolasen mit Bromthymolblau als pH-Indikator zur Identifizierung aktiver Enzyme gefolgt von einer gaschromatographischen Bestimmung der Enantioselektivität wurde kürzlich von uns beschrieben.^[8] Andere Methoden basieren auf der zeitaufgelösten IR-thermographischen Bestimmung der Enantioselektivität^[9] oder dem Einsatz von Pseudoenantiomeren, bei denen eine Form isotopenmarkiert wurde, in Kombination mit einer massenspektrometrischen Analyse.^[10] Der große Vorteil liegt hier darin, dass wahre *E*-Werte bestimmt werden, aber diese Methode benötigt deuterierte, reine Enantiomere, und die notwendigen Geräte sind sehr teuer. Kürzlich wurde ein Super-HTS durch Kapillarelektrophorese mit chiralen Cyclohextrinen beschrieben, bei dem optisch reine, Fluorescein-isothiocyanat-markierte Amine bestimmt wurden.^[11] Bislang ist dieses System auf Amine beschränkt, und auch die hierfür erforderlichen Geräte sind recht teuer.

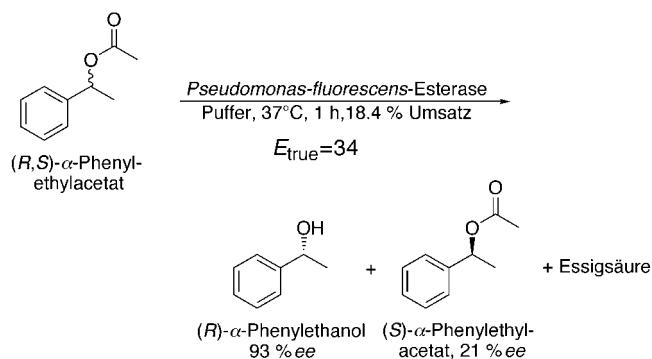
Wir beschreiben nun ein neues Testformat, das auf einer gekoppelten enzymatischen Umsetzung basiert (Schema 1). Zunächst wird durch eine Lipase oder Esterase aus einem



Schema 1. Die Hydrolase-katalysierte Reaktion setzt Essigsäure frei, die in Gegenwart von ATP und Coenzym A (CoA) durch Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Citratsynthase (CS) katalysiert die Reaktion zwischen Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat. Das für diese Reaktion notwendige Oxalacetat wird aus L-Malat und NAD⁺ durch L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Essigsäurebildung kann folglich durch Messung des Anstiegs der Absorption bei 340 nm infolge der Zunahme der NADH-Konzentration ermittelt werden. Die scheinbare Enantioselektivität *E*_{app} kann durch Verwendung optisch reiner (*R*)- oder (*S*)-Acetate bestimmt werden.

chiralen Ester Essigsäure freigesetzt, welche anschließend in einer Kaskade von Enzymreaktionen – basierend auf einem kommerziell verfügbaren und preiswerten Testkit, das ursprünglich für die Lebensmittelanalytik entwickelt wurde – abreagiert.^[12] Dadurch wird die in der ursprünglichen Hydrolyse freigesetzte Essigsäure stöchiometrisch in NADH überführt, welches leicht durch eine spektrophotometrische Messung bei 340 nm quantifiziert werden kann.

Zur Überprüfung dieses Testformats wurde die Hydrolyse von (*R,S*)-*α*-Phenylethylacetat **1** durch eine rekombinante Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE)^[13a] als Modellreaktion ausgewählt (Schema 2). Früheren Ergebnissen zu-



Schema 2. Modellreaktion für die Evaluierung des gekoppelten enzymatischen Acetat-Tests. Der GC-Analyse zufolge weist die Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* unter diesen Bedingungen eine hohe (*R*)-Selektivität (*E*_{true} = 34) auf.

folge wird dieses Substrat von PFE mit guter Enantioselektivität umgesetzt.^[14]

Erste Hydrolysen wurden im mL-Maßstab mit gefriergetrockneter PFE (1 mg mL⁻¹), 50 mM (*R,S*)-**1** und dem Essigsäure-Testkit wie im Experimentalteil beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden Umsatz und Enantiomerenüberschüsse gaschromatographisch bestimmt (Schema 2). Bei Inkubation von (*R,S*)-**1** bei pH 8.1 in Gegenwart der Testkit-Komponenten, aber ohne die PFE entsteht kein NADH. Daher kann eine Autohydrolyse von **1** ausgeschlossen werden. Kontrollexperimente ergaben, dass weder Aktivität noch Enantioselektivität der PFE durch die Komponenten des Testkits beeinflusst wurden (Daten nicht gezeigt). Der maximale Anstieg der Absorption bei 340 nm lag bei ca. 0.3 pro Minute und entspricht der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, die mit diesem gekoppelten Esterase/Testkit-System bestimmt werden kann. Für eine höhere Genauigkeit wird jedoch eine niedrigere Geschwindigkeit empfohlen. Umsetzungen in Mikrotiterplatten (MTP) ergaben nahezu lineare^[15] Anstiege der Absorption bei 340 nm über 10 Minuten bei einer Esterasekonzentration von 2 mg mL⁻¹ PFE (gefriergetrockneter Zellrohextrakt) und unterschiedlichsten Konzentrationen an (*R,S*)-**1** (5–50 mg mL⁻¹; Abbildung 1). Dieses Testformat ist darüber hinaus auch für die Quantifizierung der Umsetzung weiterer chiraler Ester sekundärer

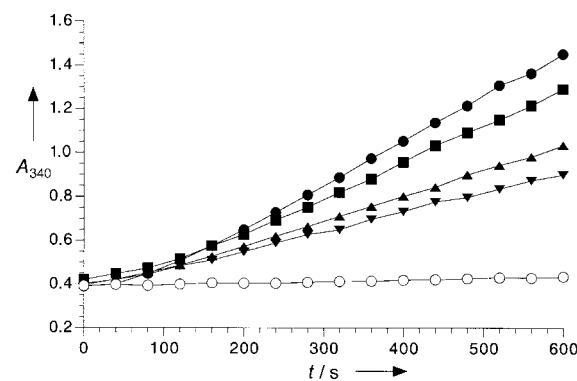
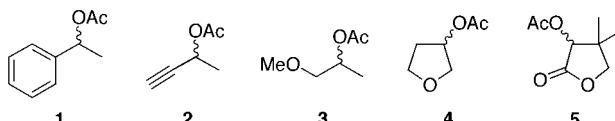


Abbildung 1. Nahezu linearer zeitlicher Anstieg der NADH-Konzentration bei der Umsetzung von Essigsäure aus der PFE-katalysierten Hydrolyse von (*R,S*)-**1** (ohne (○), 5 (▼), 10 (▲), 25 (■), 50 mg mL⁻¹ (●)). Ohne die Esterase findet keine Hydrolyse statt.

Alkohole geeignet (Schema 3). Hierfür wurde Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) als Katalysator gewählt, da dieses Enzym eine häufig eingesetzte Lipase ist.^[16] Die gekoppelte Umsetzung der Acetate (*R,S*)-**2**–(*R,S*)-**5** zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten in der Reihe **2** > **3** > **4** > **5** abnehmen (Abbildung 2). Dieser Befund stimmt mit unseren früheren Ergebnissen überein^[8] und zeigt auch, dass das Testformat zur Identifizierung aktiver Hydrolasen geeignet ist.



Schema 3. Die zur Evaluierung des Tests verwendeten Acetate **1**–**5**.

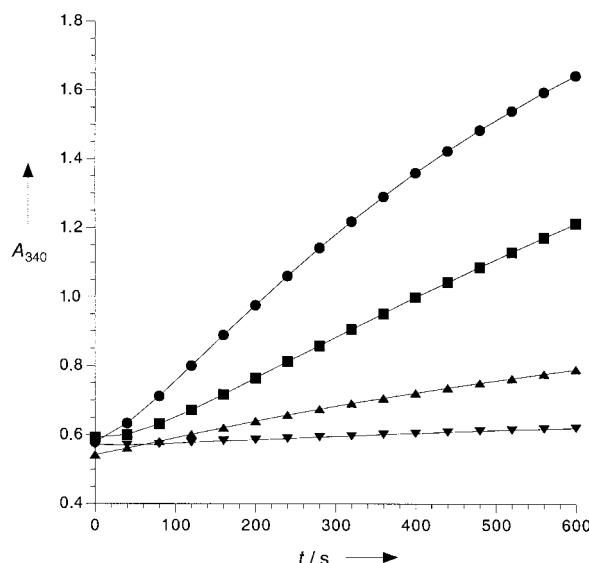


Abbildung 2. Übertragung des Testformats auf die CAL-B-katalysierte Hydrolyse der Acetate (*R,S*)-**2**–(*R,S*)-**5** (0.5 mg mL^{-1}): **2** (●), **3** (■), **4** (▲), **5** (▼).

Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Essigsäure-Freisetzung aus den reinen Enantiomeren (*R*- und (*S*)-**1** (5 mg mL^{-1}) bei einer Esterasekonzentration von 1 mg mL^{-1} PFE (gefriergetrockneter Zellrohextrakt) im HTP-Format ergibt einen nahezu ausschließlichen Anstieg der Absorption für das (*R*)-Enantiomer, was die hohe Enantioselektivität der PFE widerspiegelt (Abbildung 3A). Die scheinbare Enantioselektivität wurde zu $E_{\text{app}} = 30^{[17]}$ berechnet. Dies entspricht nahezu dem wahren E -Wert von $E_{\text{true}} = 34$, der durch GC-Analyse bestimmt wurde (Schema 2). Als Nächstes wurde ein PFE-enthaltender Kulturüberstand aus einer Vertiefung auf zwei verteilt, um sicherzustellen, dass für beide Enantiomere die gleiche Enzymkonzentration eingesetzt wurde. Mit dem Kulturüberstand waren die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten herabgesetzt, und die Enantioselektivität war niedriger ($E_{\text{app}} = 21$; Abbildung 3B). Dies kann durch Verunreinigungen aus der Kultivierung, z.B. Zelltrümmer oder Medienbestandteile, erklärt werden, die die Quantifizierung der Essigsäure beeinflussen. Allerdings muss betont werden, dass mit diesem Testformat die Enan-

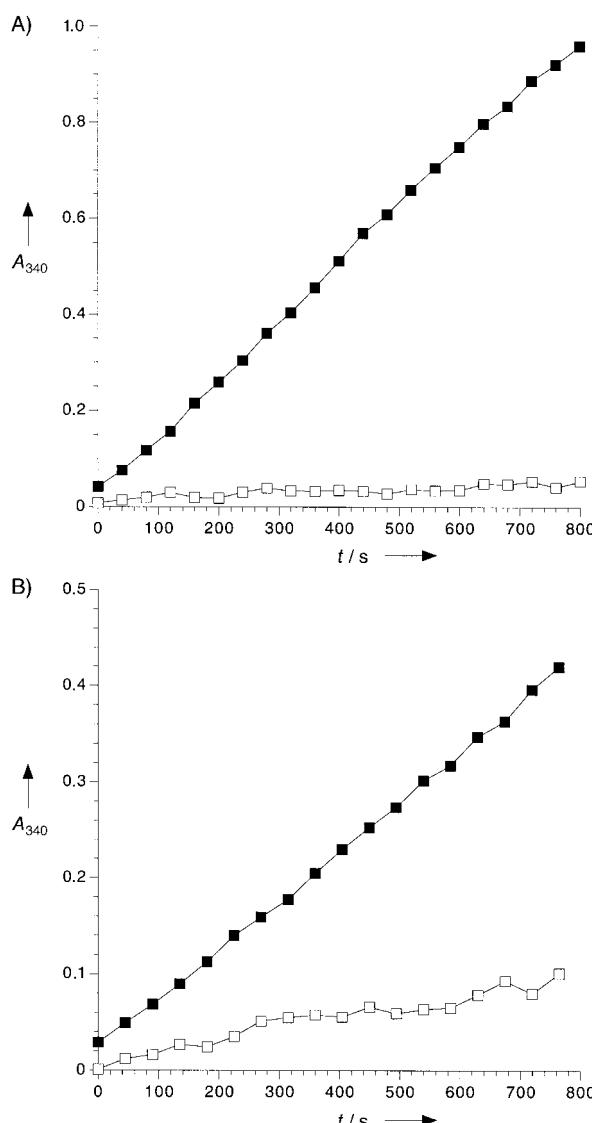


Abbildung 3. Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten unter Verwendung von optisch reinem (*R*)- oder (*S*)-**1** (5 mg mL^{-1} ; ■ bzw. □). Die Reaktionen wurden mit gefriergetrocknetem Zellrohextrakt der PFE (A) oder mit PFE-enthaltendem Kulturüberstand (B) durchgeführt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen.

tioselektivität direkt in einem Zellrohextrakt bestimmt werden kann. Dies hat den Vorteil, dass das Testformat problemlos auf das Hochdurchsatz-Screening von Bibliotheken aus einer gerichteten Evolution übertragen werden kann. Das Problem der geringeren Genauigkeit bei Verwendung des unbehandelten Kulturüberstandes kann durch einen in das MTP-Format integrierten Reinigungsschritt, z.B. unter Nutzung des an das Gen der reifen PFE klonierten His-tags, gelöst werden. Allerdings macht dies den Test zeitaufwändiger und teurer.

Als Nächstes untersuchten wir die Anwendung dieses Testformats auf die Bestimmung der E -Werte in der Umsetzung von **3** unter Verwendung von 16 Lipasen und Esterasen. Wie die Daten in Tabelle 1 zeigen, stimmen die scheinbaren E -Werte E_{app} mit den gaschromatographisch an einer chiralen Säule bestimmten E_{true} -Werten gut überein. Im Einklang mit

Tabelle 1. Vergleich der Enantioselektivitäten, die über die Enzymkaskade (E_{app}) und durch GC-Analyse (E_{true}) in der kinetischen Racematspaltung von (R,S)-1-Methoxy-2-propylacetat mit verschiedenen Lipasen und Esterasen bestimmt wurden.

Enzym ^[a]	E_{app} [%]	E_{true} [%]	Konfig. ^[b]
CVL	7.5	4.9	R
Chirazyme L6	13.7	12.1	R
Chirazyme L10	3.3	2.4	R
Chirazyme L12	4.0	5.1	R
Chirazyme E1	2.1	2.6	S
Chirazyme E2	2.2	1.9	S
Chirazyme E3	1.1	1.4	R/S ^[c]
Chirazyme E4	2.0	2.3	R
PFE	1.4	1.2	R
CAL-B	80	100	R

[a] CVL = Lipase aus *Chromobacterium viscosum*; PFE = rekombinante Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*^[13a]; CAL-B = Lipase B aus *Candida antarctica*; die folgenden Enzyme wiesen keine oder sehr geringe Aktivität auf: „Acid esterase“ (Amano), „Acylase“ (Amano ACS), die Lipase aus *Aspergillus niger* (Amano A), die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus*^[13b] sowie Chirazyme L7 und L8. [b] Konfiguration des schneller reagierenden Enantiomers. [c] R laut MTP-Test, S laut GC-Analyse; man beachte, dass Substrat und Produkt nahezu racemisch waren.

unseren früheren Befunden^[8] erwies sich lediglich CAL-B als geeignet für eine effiziente Racematspaltung von **3**.

Laut Abbildung 3 reicht eine Analysenzeitz von weniger als 3–4 Minuten pro Test (plus 1–2 Minuten für die Pipettierschritte) aus, um die Enantioselektivitäten zu bestimmen. Folglich können in einer 96er Mikrotiterplatte 45 Enzyme (zwei Vertiefungen pro Biokatalysator, sechs Vertiefungen für Kontrollen) analysiert werden. Damit können mindestens 540 E_{app} -Werte pro Stunde bestimmt werden, was der Durchmusterung von ca. 13 000 Mutanten pro Tag entspricht.^[18] Zusätzlich ist der Test recht preiswert, da eine Reaktion weniger als 0.10 € kostet (Katalogpreis).

Darüber hinaus sollte diese Methode nicht auf die Bestimmung der Aktivität und Enantioselektivität von Esterasen oder Lipasen beschränkt sein. Einige weitere Enzymreaktionen, die unter Freisetzung von Essigsäure verlaufen, wie die Protease- oder Amidase-katalysierte Hydrolyse von Amiden, sollten mit dem hier beschriebenen Prinzip quantifiziert werden können.

Experimentelles

Materialien: Die racemischen Acetate (R,S)-**1**–(R,S)-**3** wurden in der jeweils höchsten erhältlichen Reinheit kommerziell bezogen. Die Acetate (R,S)-**4** und -**5** sowie optisch reines (R)- und (S)-**3** wurden ausgehend von den entsprechenden Alkoholen nach Standardvorschriften hergestellt. Optisch reines (R)- und (S)-**1** wurden von der BASF AG (Ludwigshafen) bereitgestellt. Alle Enzyme – mit Ausnahme von PFE und BSE, die durch Expression in *E. coli* wie in Lit. ^[13] beschrieben hergestellt wurden – waren kommerziell erhältlich.

Das Testkit zur Bestimmung der freigesetzten Essigsäure (ursprünglich von Roche Diagnostics, Penzberg, hergestellt und vertrieben) wurde von der R-Biopharm GmbH (Darmstadt) bezogen und entsprechend der Herstelleranleitung eingesetzt (siehe unten). Die NADH-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 340 nm im mL-Maßstab in einem Ultraspec-3000-Photometer (Pharmacia Biotech Ltd., Uppsala, Schweden) und im µL-Maßstab in einem Fluorimeter (FLUOstar, BMG LabTechnologies, Offenburg) bestimmt.

Umsetzungen racemischer Substrate zur Bestimmung der E_{true} -Werte: Hierzu wurden enzymkatalysierte Hydrolysen von (R,S)-**1** und (R,S)-**3** wie in Lit. [8] beschrieben durchgeführt. Umsatz und Enantiomerenüberschüsse (ee) wurden durch GC-Analyse von Proben der Reaktionsgemische bestimmt. Die Enantioselektivitäten (E_{true} -Werte) wurden hieraus wie von Chen et al. angegeben^[3] berechnet.

Allgemeine Vorschrift zur Bestimmung von Essigsäure in MTP-Tests: Zu einer Mischung der Testkit-Komponenten (150 µL) wurde eine Lösung von PFE (20 µL, 2 mg mL⁻¹, falls nicht anders angegeben) oder CAL-B (2 mg mL⁻¹) pipettiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe einer Lösung von **1**–**5** (20 µL, Konzentrationen sind im Text und in den Abbildungslegenden in mg mL⁻¹ angegeben) in Natriumphosphatpuffer (10 mM, pH 7.3) gestartet. Als Kontrollen dienten Mischungen des Testkits mit Puffer oder dem Zelllysat nichtinduzierter *E. coli*, das das Gen enthielt, das die rekombinante PFE kodiert. In gleicher Weise wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten für optisch reines (R)- und (S)-**1** sowie (R)- und (S)-**3** bestimmt. Für Umsetzungen mit einem Zellrohextrakt wurde die PFE in Mikrotiterplatten in Anlehnung an die Herstellung im Schüttelkolben-Maßstab^[13a] exprimiert. Allerdings betrug das Kultivierungsvolumen nur 200 µL pro Vertiefung, und die Zellen wurden durch zwei Gefrier-Aufbau-Cyclen aufgeschlossen. Abschließend wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und die Überstände für den Test eingesetzt.

Eingegangen am 21. Mai 2001 [Z17149]

- [1] a) R. N. Patel, *Stereoselective Biocatalysis*, Marcel Dekker, New York, **2000**; b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **2000**; c) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [2] a) U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137–143; b) U. T. Bornscheuer, *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 84–96; c) U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3285–3288; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3105–3108; d) F. H. Arnold, A. A. Volkov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54–59; e) J. D. Sutherland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 263–269; f) M. B. Tobin, C. Gustafsson, G. W. Huisman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 421–427.
- [3] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.
- [4] L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4560–4561.
- [5] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832.
- [6] a) E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1029–1033; b) F. Badalassi, D. Wahler, G. Klein, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4233–4236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4067–4070.
- [7] a) L. E. Janes, A. C. Löwendahl, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2324–2331; b) A. M. F. Liu, N. A. Somers, R. J. Kazlauskas, T. S. Brush, F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, G. P. Horsman, A. Mezzetti, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 545–556.
- [8] M. Baumann, B. Hauer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4781–4790.
- [9] M. T. Reetz, M. H. Becker, K. M. Kühlung, A. Holzwarth, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2792–2795; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2647–2650.
- [10] M. T. Reetz, M. H. Becker, H. W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1872–1875; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1758–1761.
- [11] M. T. Reetz, K. M. Kühlung, A. Dege, H. Hinrichs, D. Belder, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4049–4052; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3891–3893.
- [12] H.-O. Beutler in *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 6, 3. Aufl. (Hrsg.: H. U. Bergmeyer), VCH, Weinheim, **1984**, S. 639–645.
- [13] a) N. Krebsfänger, F. Zocher, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *21*, 641–646; b) Y. Amaki, H. Nakano, T. Yamane, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *40*, 664–668.
- [14] N. Krebsfänger, K. Schierholz, U. T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.* **1998**, *60*, 105–111.
- [15] Der Test ergibt auch dann einen linearen Anstieg, wenn steigende Konzentrationen von Natriumacetat verwendet werden; siehe auch

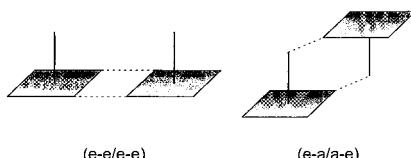
- Lit. [12] und die Gebrauchsanweisung des kommerziellen Testkits zur Genauigkeit der Methode.
- [16] E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 181–204.
- [17] Die E_{app} -Werte sind gegeben durch das Verhältnis der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten, die aus der Hydrolyse der reinen (*R*)- oder (*S*)-Enantiomere bestimmt wurden. E_{true} -Werte sind aus der kinetischen Racematspaltung abgeleitet und beinhalten folglich auch die Konkurrenzreaktion zwischen beiden Enantiomeren um das aktive Zentrum des Enzyms.
- [18] Mehr als 50000 Mutanten können pro Tag durchgemustert werden, wenn die Analysenzeit auf ca. 1 Minute pro Test verringert wird und die Pipettierschritte schneller durchgeführt werden können.

Magnetische Wechselwirkungen als supramolekulare Funktion: Struktur und magnetische Eigenschaften wasserstoffverbrückter zweikerniger Kupfer(II)-Komplexe**

Winfried Plass,* Axel Pohlmann und Jens Rautengarten
Professor Ernst-Gottfried Jäger zum 65. Geburtstag gewidmet

Wasserstoffbrückenbindungen spielen eine Schlüsselrolle bei Wechselwirkungen in biologischen Systemen, in der supramolekularen Chemie und beim Kristall-Engineering.^[1] Daher sind sie auch für das Verständnis der Eigenschaften entsprechender magnetischer Materialien wichtig.^[2] Insbesondere konnte für einige Kupfer(II)-Koordinationsverbindungen gezeigt werden, dass die Variation supramolekularer Wechselwirkungen die magnetischen Eigenschaften der durch diese Wechselwirkungen gebildeten Koordinationspolymere entscheidend beeinflusst.^[3]

Kupfer(II)-Komplexe sind wohl untersucht; dabei wurden für zweikernige Einheiten nur zwei Anordnungen für Wasserstoffbrückenbindungen nachgewiesen (Schema 1). Entspre-



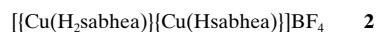
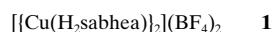
Schema 1. Schematische Darstellung der für zweikernige Kupfer(II)-Komplexe mit quadratisch-planarer Koordinationsumgebung der Kupfer(II)-Ionen nachgewiesenen Wasserstoffbrückenbindungsmuster (e: äquatoriale Position, a: apicale Position).

[*] Prof. Dr. W. Plass, Dipl.-Chem. A. Pohlmann,
Dipl.-Chem. J. Rautengarten
Fachbereich für Chemie und Biologie, Anorganische Chemie
Universität Siegen
Adolf-Reichwein-Straße, 57068 Siegen (Deutschland)
Fax: (+49) 271-740-2555
E-mail: plass@chemie.uni-siegen.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Dem John-von-Neumann-Institut für Computing danken wir für die großzügige Bereitstellung von Rechenzeit am Supercomputerzentrum des Forschungszentrums Jülich (Projekt: Magnetische Wechselwirkungen in Übergangsmetallverbindungen).

chend der durch Kupfer(II)-Ionen bevorzugten quadratisch-planaren Koordinationsumgebung mit der Möglichkeit eines oder zweier zusätzlicher apicaler Liganden können diese Wasserstoffbrücken entweder als äquatorial-äquatorial (e-e) oder als äquatorial-apical (e-a) bezüglich der Position der beteiligten Donor- und Acceptoratome bezeichnet werden. Betrachtet man die magnetischen Orbitale an jedem Kupfer(II)-Ion als durch die kurzen äquatorialen Bindungen festgelegt, was einem $d_{x^2-y^2}$ -Orbital mit möglicher Beimischung von d_{z^2} -Charakter entspricht, so würde eine qualitative Struktur-Eigenschafts-Beziehung eine antiferromagnetische Kopplung für (e-e/e-e)-verbrückte Anordnungen und schwache Wechselwirkungen, die von ferromagnetischer Natur sein sollten, für (e-a/a-e)-verbrückte Anordnungen vorhersagen. Die Größe der magnetischen Kopplung sollte zusätzlich von der Stärke der beteiligten Wasserstoffbrückenbindungen abhängig sein. Dieses Konzept stimmt mit den experimentell ermittelten magnetischen und Strukturdaten relevanter Systeme überein.^[4]

Um diese qualitative Struktur-Eigenschafts-Beziehung zu überprüfen, stellten wir den Kupfer(II)-Komplex des dreiwertigen, fünfzähligen Chelatliganden *N*-Salicylidien-2-(bis(2-hydroxyethyl)amino)ethylamin (H_3sabhe) her. Das resultierende selbstkomplementäre Komplexkation $[Cu(H_3sabhe)]^+$ konnte als wasserstoffverbrückter, zweikerniger Komplex **1** isoliert werden. Komplex **1** lässt sich in wässriger Lösung durch Deprotonierung reversibel in **2** überführen, den ersten dreifach wasserstoffverbrückten zweikernigen Kupfer(II)-Komplex.



Die Röntgenstrukturanalysen^[5] der isolierten Verbindungen **1**·0.5EtOH·0.25H₂O (**1a**) und **2**·H₂O (**2a**) ergaben in beiden Fällen eine wasserstoffverbrückte zweikernige Struktur für die kationischen Kupfer(II)-Komplexe (Abbildung 1). Die vorgebildete coplanare Anordnung dreier Donoratome des H_3sabhe -Liganden (O1, N1 und N2; vgl. Abbildung 1) legt die Orientierung der äquatorialen Ebene der verzerrt quadratisch-pyramidalen Koordinationsumgebung der Kupfer(II)-Ionen fest.^[6] Dies entspricht auch der beobachteten Verlängerung der apicalen Cu-O-Bindung um 25–30 pm gegenüber der entsprechenden äquatorialen Bindung (vgl. Abbildung 1). Die beiden Wasserstoffbrückenbindungen in **1** werden durch die äquatorial koordinierende Alkoholgruppe als Donor und durch das Phenolatsauerstoffatom als Acceptor gebildet; dies führt zu einem (e-e/e-e)-Verbrückungsmuster (vgl. Schema 1). Der O···O-Abstand liegt mit 260 pm im Bereich starker O-H···O-Wasserstoffbrückenbindungen.^[1f] In **1** sind die beiden apical koordinierenden Alkoholgruppen *cis* bezüglich der durch die Wasserstoffbrückenbindungen aufgespannten Ebene orientiert, wodurch deren Sauerstoffatome zur Bildung einer dritten Wasserstoffbrückenbindung bereits vororientiert sind (der interatomare Abstand zwischen O3 und O3A beträgt 353 pm).

Die Deprotonierung einer der beiden apicalen Alkoholgruppen, wie in **2** beobachtet, erhöht die Fähigkeit des