

Reaktionsspezifität von Enzymen

Untreue Enzyme in der Biokatalyse: mit alten Enzymen zu neuen Bindungen und Synthesewegen

Uwe T. Bornscheuer* und Romas J. Kazlauskas*

Stichwörter:

Biosynthese · Biotransformationen · Enzymkatalyse ·
Molecular Modeling · Proteine

Mit der Entdeckung hochstereoselektiver Enzyme mit breiter Substratspezifität hat sich die Biokatalyse in den letzten Jahrzehnten rasant entwickelt. Ein neues Forschungsgebiet beschäftigt sich mit Enzymen, die eine breite Reaktionsspezifität bei der Katalyse alternativer Reaktionen aufweisen. Oft unterschätzt, spielt diese katalytische Promiskuität (*catalytic promiscuity*) eine natürliche Rolle in der Evolution und in manchen Fällen auch in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. In diesem Kurzaufsatz werden Beispiele für katalytische Promiskuität mit aktuellen und möglichen Anwendungen in der Synthese vorgestellt. Kombiniert mit Protein-Engineering könnten dank dieser Eigenschaft die Verwendungsmöglichkeiten von Enzymen in der organischen Synthese deutlich erweitert werden.

1. Einleitung

Die Beobachtung, dass viele Enzyme eine breite Substratspezifität aufweisen, führte in den letzten 20 Jahren zu einer stark wachsenden Zahl von Arbeiten auf dem Gebiet der Biokatalyse, vor allem im Bereich der organischen Synthese. Die Identifizierung einiger Enzyme mit hoher Stereoselektivität in Bezug auf eine große Menge präparativ nützlicher Verbindungen führte zu neuen Anwendungen in der Synthese.

Eine aktuelle Fragestellung auf dem Gebiet der Biokatalyse betrifft die Reaktionsspezifität von Enzymen: Kann ein einzelnes aktives Zentrum mehr als nur eine bestimmte chemische Umsetzung katalysieren? Können kleine Änderungen im aktiven Zentrum den Ablauf anderer chemischer

Prozesse an dieser Stelle ermöglichen? In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, dass diese „katalytische Promiskuität“ (*catalytic promiscuity*) bei Enzymen sehr häufig auftritt.^[1] Dieser Kurzaufsatz behandelt die katalytische Promiskuität im Zusammenhang mit der Biokatalyse, d. h. mit enzymkatalysierten Reaktionen, die für die organische Synthese nützlich sind oder sein können. Wir stellen Proteine vor, die mehrere katalytische Eigenschaften aufweisen, sowie Proteine, bei denen kleine Änderungen (meist ein Austausch von Metallionen oder eine positionsgerichtete Mutagenese) zu neuen katalytischen Eigenschaften führen. Zu den beeindruckendsten Beispielen gehören Reaktionen zur C-C-Bindungsknüpfung, Oxidationen mithilfe hydrolytischer Enzyme und Glycosyltransferreaktionen.

2. Einteilung der katalytischen Promiskuität

Die katalytische Promiskuität von Enzymen beruht auf der Eigenschaft ihrer aktiven Zentren, mehrere eindeutige chemische Umsetzungen zu katalysieren. Diese können sich bezüglich der Art der gebildeten oder gespaltenen Bindung und/oder des Katalysemechanismus unterscheiden – meistens unterscheiden sie sich in beidem. So wird z. B. durch Zugabe von Vanadiumionen eine Phosphatase zu einer Oxidase, die in der Lage ist, enantioselektive Oxidationen von Sulfiden zu katalysieren (dies wird in Abschnitt 4.2 im Detail diskutiert). An diesen beiden Reaktionen sind unterschiedliche funktionelle Gruppen beteiligt (anstelle der P-O-Bindung in einem Phosphatester wird die O-O-Bindung in Wasserstoffperoxid gespalten) und die Reaktionsmechanismen unterscheiden sich deutlich (Hydrolyse bzw. Oxidation).

[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer

Institut für Chemie und Biochemie
Abteilung Technische Chemie und Biotechnologie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Soldmannstraße 16, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-80066
E-mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

Prof. Dr. R. J. Kazlauskas
University of Minnesota
Department of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics
1479 Gortner Avenue, 174 Gortner Lab, St. Paul, MN 55108 (USA)
Fax: (+1) 612-625-5780
E-mail: rjk@umn.edu

In Abbildung 1 ist die katalytische Promiskuität anhand der Unterschiede in den beteiligten funktionellen Gruppen und bezüglich des Katalysemechanismus veranschaulicht (für ausgewählte Beispiele siehe Tabelle 1). Die Lage der Reaktionen in dieser Graphik folgt einer subjektiven Einschätzung

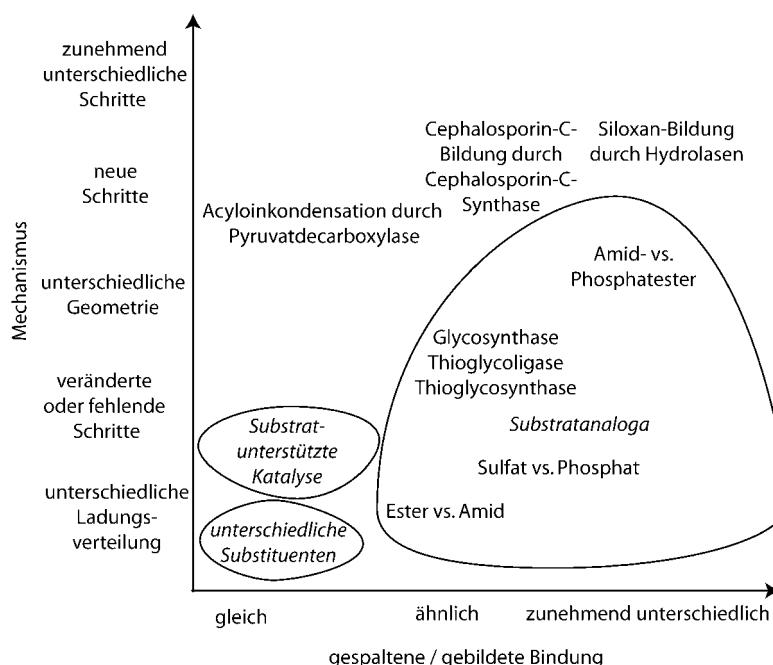


Abbildung 1. Einteilung katalytischer Promiskuität. Diese kann mit einer Reaktion an einer anderen funktionellen Gruppe und/oder einer Änderung im Katalysemechanismus verbunden sein. Die Kreise verdeutlichen den Typ der katalytischen Promiskuität (kursiv). Tabelle 1 listet ausgewählte Beispiele auf.

zung, da die Ähnlichkeit von funktionellen Gruppen und Reaktionswegen, deren Details oft unbekannt sind, ebenfalls nur subjektiv beurteilt werden kann. Dennoch hilft diese Einteilung, die Typen der katalytischen Promiskuität zu unterscheiden.

Die größte Gruppe bilden die Umsetzungen von Verbindungen mit ähnlichen funktionellen Gruppen. Beispielsweise katalysieren viele Proteasen auch die Hydrolyse von Estern. In beiden Fällen unterscheiden sich die gespaltenen Bindungen (C-N vs. C-O), der Katalysemechanismus ist aber sehr wahrscheinlich ähnlich. Mehrere Metalloproteasen katalysieren auch die Hydrolyse von P-O-^[2] oder P-F-Bindungen.^[3]



Romas Kazlauskas, geboren 1956, studierte Chemie am Massachusetts Institute of Technology, wo er auch promovierte. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei George Whitesides an der Harvard-Universität arbeitete er bei der General Electric Company (1985–88) und an der McGill University in Montreal (1988–2003). Zurzeit ist er Associate Professor für Biochemie, Molekularbiologie und Biophysik an der University of Minnesota, Twin Cities. Sein Spezialgebiet ist die enantioselektive organische Synthese unter Verwendung von Enzymen.

Umgekehrt spalten einige Esterasen die C-N-Bindung in β-Lactamen,^[4] und Proteasen können die S-O-Bindung^[5] in Sulfiten oder die S-N-Bindung in Sulfonamiden spalten.^[6] Im industriellen Maßstab nutzt die BASF AG eine Lipase, die normalerweise die C-O-Bindung in Triglyceriden spaltet, um

Amine durch enantioselektive Acylierung – in der eine C-N-Verknüpfung entsteht – mithilfe einer Racematspaltung zu trennen.^[7] Asparaginase, die das primäre Amid in der Seitenkette von Asparagin spaltet, spaltet auch das Nitril in einem analogen Substrat, β-Cyanalanin.^[8] Pyruvatkinase, die den Transfer von Phosphorylgruppen katalysiert, kann auch Sulfurylgruppen übertragen.^[9] Einige Phosphatasen katalysieren auch die Hydrolyse von Sulfatresten.^[10] Enzyminhibitoren von Serinhydrolasen, z.B. Phosphate, fallen nicht hierunter, da hier nur selten eine katalytische Umsetzung stattfindet.

Bei anderen Reaktionstypen muss eine Veränderung des Mechanismus stattfinden. Beispielsweise führt die Entfernung eines für die Katalyse essenziellen Aminosäurerestes zu einer enormen Verlangsamung der Reaktion, aber diese wird nicht ganz aufgehoben. Die verbleibende, wenig effiziente Reaktion muss also einem anderen Weg folgen. So bleibt auch nach einer Mutation, bei der ein Cystein- gegen einen Asparaginrest ausgetauscht wurde, in einer Phosphatase etwas Aktivität erhalten.^[11] Ein weiterer Reaktionstyp ist die substratunterstützte Katalyse, bei der nur Substrate umgesetzt werden, die eine fehlende funktionelle Gruppe im Protein ersetzen, die dann aktiv an der Katalyse beteiligt ist.^[12] Bei einigen Reaktionen

deutet der stereochemische Verlauf auf unterschiedliche Reaktionswege hin: Zum Beispiel setzen Epoxidhydrolasen ein Enantiomer unter Inversion des Stereozentrums und das andere Enantiomer unter Retention um.^[13] Die Wege müssen sich folglich unterscheiden, auch wenn die Details noch ungeklärt sind.

Selbst die Bindung von Proteinen kann mitunter Reaktionen katalysieren, was eindeutig eine Änderung des Mechanismus bedeutet – fand vorher keine Substratspaltung statt, so wird nun zumindest ein gewisses Maß an Spaltung beobachtet. Beispielsweise katalysiert Rinderserumalbumin die Ringöffnung von Benzisoxazolen (Kemp-Eliminierung),



Uwe Bornscheuer, geboren 1964, studierte Chemie an der Universität Hannover, wo er 1993 am Institut für Technische Chemie promovierte. Nach einem Postdoc-Aufenthalt in Nagoya, Japan, wechselte er an das Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, an der er sich 1998 habilitierte. Seit 1999 ist er Professor für Technische Chemie und Biotechnologie an der Universität Greifswald. Er interessiert sich für die Anwendung von Biokatalysatoren bei der Synthese optisch aktiver Verbindungen und bei Lipidmodifizierungen.

Tabelle 1: Ausgewählte Beispiele für katalytische Promiskuität in einem einzelnen Enzym.

Enzym	Enzymklasse	Normale Aktivität	Promiskutive Aktivität	Lit.
Prolin-Aminopeptidase	Metallohydrolase (zwei Mn ²⁺)	C-N-Hydrolyse in Prolinamiden	P-F-Hydrolyse in Diisopropylfluorophosphat	[3]
Aminopeptidase	Metallohydrolase (zwei Zn ²⁺)	C-N-Hydrolyse in Amiden	P-O-Hydrolyse in Bis(<i>p</i> -nitrophenyl)phosphat	[2]
Pyruvatkinyase	Metalloenzym (Mn ²⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺)	Phosphoryltransfer von Phosphoenolpyruvat	Sulfuryltransfer von Sulfoenolpyruvat; auch Phosphoryltransfer auf Fluoride, Hydroxamine oder α -Hydroxycarbonsäuren	[9]
<i>o</i> -Succinylbenzoat-Synthase	Metalloenzym (Mn ²⁺)	Dehydratisierung von 2-Hydroxy-6-succinyl-2,4-cyclohexadiencarboxylat	Racemisierung von <i>N</i> -Acylaminosäuren	[35]
Methanmonooxygenase	Häm-frei, Dieisen	Hydroxylierung von Methan	Epoxidierung, <i>N</i> -Oxidbildung, Dehalogenierung, Desaturation benzylischer Substrate	[47]
pflanzl. Steroyl-Acylcarrier-Protein- Δ^9 -Desaturase	Häm-frei, Dieisen	Desaturation von C9-C10-Bindungen in Stearinsäure zu Ölsäure	Sulfoxidierung von 9-Thia- oder 10-Thianaloga von Stearat und Hydroxylierung von 9-Fluoranaloga	[45, 46]
Cephalosporin-C-Synthase	Metalloenzym (Häm-frei Fe, 2-Oxoglutarat-abhängig)	Oxidative Ringerweiterung des Fünfrings zum Sechsring, Hydroxylierung einer Methylgruppe	Eine der beiden normalen Aktivitäten	[42]
Lipase, Esterase	Serinhydrolase	Esterhydrolyse	β -Lactamhydrolyse	[4]
Lipase, Chymotrypsin	Serinhydrolase	Triglycerid oder Peptidhydrolyse	Aldoladdition oder Michael-Addition	[27, 30]
Subtilisin	Serinhydrolase	Peptidhydrolyse	Sulfinamidhydrolyse	[6]
Lipase, Trypsin	Serinesterase	Triglycerid oder Peptidhydrolyse	Oligomerisierung von Si(CH ₃) ₂ (OEt) ₂ , Dimerisierung von Si(CH ₃) ₃ OCH ₃	[31, 32]
Pepsin	Aspartathydrolase	Amidhydrolyse	Sulfithydrolyse	[5]
Asparaginase	Thr-Lys-Asp-Triade	C-N-Hydrolyse in Asparagin zu Aspartat	C≡N-Hydrolyse in β -Cyanalanin zu Aspartat	[8]
Epoxidhydrolase	Asp-His-Asp-Triade	Hydrolyse von Epoxiden unter Inversion der Konfiguration	Hydrolyse von Epoxiden unter Retention der Konfiguration	[13]
Oxynitrilase	Ser-His-Asp-Triade	Addition von Cyanid an Aldehyde	Addition von Cyanid an Imine	[34]
Aldolase-katalytischer Antikörper	Lys	Aldolreaktion	Kemp-Eliminierung	[18]
Serin-Hydroxymethyl-Transferase	Pyridoxal-abhängig	Transfer von C _β von Serin auf Tetrahydropteroylglutamat	Threonin-Retroaldolreaktion, Decarboxylierung von Aminomalonat, Racemisierung von Alanin, Transaminierung von Alanin und Pyruvat	[25]
Pyruvat-Decarboxylase	Thiamin-abhängig	Decarboxylierung von Pyruvat	Acyloinkondensation von Acetaldehyd und Benzaldehyd	[21–23]

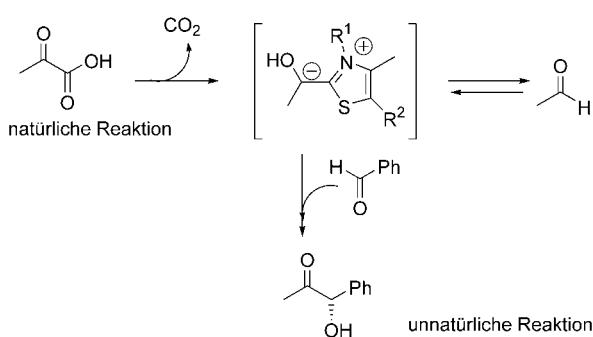
die β -Eliminierung von 3-Ketobutyl-Umbelliferylethern (eine nützliche Reaktion in Enzymtests^[14]) und die (schwach) enantioselektive Oxidation von Aminen zu Aminoxiden mit Natriumperiodat.^[15] Myoglobin (ein sauerstofftragendes Hämprotein) katalysiert langsame Oxidationen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid.^[16] Eine positionsgerichtete Mutagenese zur Verschiebung eines distalen Histidins (Leu29His/His64Leu) erhöhte die Reaktionsgeschwindigkeit um mehr als das 20-fache und führte zu einer deutlich höheren Enantioselektivität. Die Oxidation von Thioanisol ergab das entsprechende Sulfoxid mit 97 % ee, und die Oxidation von *cis*- β -Methylstyrol lieferte das Epoxid mit 99 % ee.^[17] Alle katalytischen Antikörper sind Beispiele für bindende Moleküle, die auch Reaktionen katalysieren können. Interessanterweise katalysiert ein Antikörper, der eine Aldoladdition über nucleophile Katalyse ermöglicht (Bildung einer Imingruppe zwischen der Carbonylgruppe des Substrats und einem Lysinrest), auch eine Kemp-Eliminierung. Dazu muss das Lysin auch als Base fungieren.^[18] Ein anderer katalytischer Antikörper, der eine Decarboxylierung katalysiert, ermöglicht auch eine Esterhydrolyse.^[19]

Prinzipiell führen kleine Änderungen in der Substratspezifität eines Enzyms zu subtilen Veränderungen der Elektro-

nenverteilung im Übergangszustand und können somit ebenfalls als Beispiele für katalytische Promiskuität verstanden werden. Diese Unterschiede sind aber meist deutlich kleiner als bei den hier berücksichtigten Beispielen.

3. Katalytische Promiskuität innerhalb des gleichen Proteins

Ein klassisches Beispiel für katalytische Promiskuität ist die Pyruvatdecarboxylase aus Hefe, die nicht nur die Decarboxylierung von Pyruvat, sondern auch die Verknüpfung von Acetaldehyd mit Benzaldehyd zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol, einer Zwischenstufe der Ephedrinsynthese, katalysiert (Schema 1) und folglich auch eine Lyaseaktivität aufweist.^[20] Diese Acyloinkondensation läuft über einen zusätzlichen Schritt ab (die Bildung einer C-C-Bindung), der nicht in der natürlichen Reaktionsfolge vorkommt. Obwohl Neuberg und Hirsch diese Reaktion bereits 1921 in ganzen Hefezellen entdeckten,^[21] wurde erst kürzlich Pyruvatdecarboxylase als hierfür verantwortliches Enzym identifiziert.^[22] Diese Reaktion zeigt auch, dass die alternativen Substrate (Acetaldehyd und Benzaldehyd) deutlich größer als das natürliche Substrat

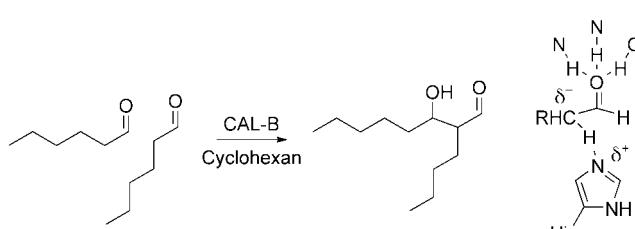


Schema 1. Pyruvatdecarboxylase, ein Thiamin-abhängiges Enzym, katalysiert auch die enantioselektive Acyloin-Kondensation von Acetaldehyd und Benzaldehyd.^[23]

(Pyruvat) sein können. Vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch einer einzigen Aminosäure in der stabileren Pyruvatdecarboxylase aus *Xymomonas mobilis*, die diese Lyasereaktion nicht katalysiert, eine Lyaseaktivität erzeugt werden kann.^[23]

Pyridoxal-abhängige Enzyme sind ein weiteres klassisches Beispiel für katalytische Promiskuität. In den meisten Pyridoxal-abhängigen Enzymen führt diese zusätzliche funktionelle Gruppe im aktiven Zentrum zur Bildung eines Aldimin-Intermediates, dass nur über einen Weg abreagiert.^[24] In einigen Fällen kann dieses Aldimin aber über unterschiedliche Pfade weiterreagieren: So katalysiert die Serinhydroxymethyltransferase auch eine Threonin-Retroaldolreaktion, die Decarboxylierung von Aminmalonat und die Racemisierung von Alanin.^[25] Die positionsgerichtete Mutagenese einer Alanin-Racemase verringerte deren Racemaseaktivität und steigerte die sonst nur geringe Transaminase-Aktivität.^[26]

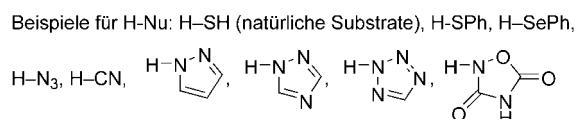
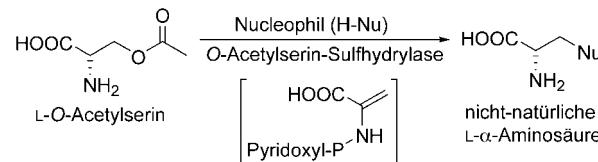
Eine weitere Reaktion zur C-C-Bindungsknüpfung ist die Aldoladdition von Hexanal, die durch Lipase B aus *Candida antarctica* katalysiert wird.^[27] Die Reaktion verlief zwar nicht enantioselektiv, aber mit einer anderen Diastereoselektivität als die spontane Reaktion (Schema 2). Die Autoren



Schema 2. Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) katalysiert eine Aldoladdition von Hexanal. Diese Nebenreaktion ist zwar $>10^5$ -mal langsamer als die natürliche Reaktion (die Hydrolyse eines Triglycerids), allerdings mindestens 10-mal schneller als die durch einen katalytischen Antikörper mit Aldolase-Aktivität vermittelte Reaktion. Rechts ist der berechnete Übergangszustand für die Enolatbildung gezeigt.

vermuteten, dass die Aldoladdition kein Serin im aktiven Zentrum benötigt – tatsächlich führte ein Austausch von Serin gegen Alanin (Ser105Ala) zu einer etwa zweimal höheren Aldoladditions-Aktivität.

Eine Reaktion, durch die mehrere unterschiedliche Bindungen geknüpft werden können, ist die durch eine *O*-Acetylserin-Sulphydrylase katalysierte Michael-Addition von Nucleophilen (Schema 3). Die natürliche Aufgabe dieses Pyridoxal-haltigen Enzyms ist die Cystein-Biosynthese aus



Schema 3. Die Michael-Addition alternativer Nucleophile durch *O*-Acetylserin-Sulphydrylase an ein Aminoacrylat-Intermediat erzeugt nicht-natürliche Aminosäuren.

O-Acetylserin durch Eliminierung von Acetat unter Bildung eines Acrylat-Intermediates. Eine Michael-Addition des Sulfoxidnucleophils führt dann zu Cystein, jedoch reagieren auch andere Nucleophile wie Thiole, Selenole, Azide, Cyanide und einige aromatische *N*-Heterocyclen mit diesem Intermediat, wobei nicht-natürliche Aminosäuren gebildet werden. Folglich katalysiert dieses Enzym bei gleichem Mechanismus nicht nur die Bildung von C-S-Bindungen, sondern auch die von C-Se-, C-C- und C-N-Bindungen.^[28] Kürzlich gelang es Maier, einen *E.coli*-Stamm für die Durchführung dieser nicht-natürlichen Reaktion zu erzeugen. Eine normale Kultivierung lieferte die Ausgangsverbindung *O*-Acetylserin und das Enzym; die Addition von Nucleophilen ergab nicht-natürliche Aminosäuren in 45–91% Ausbeute.^[29] Lipasen katalysieren auch die Michael-Addition unterschiedlicher Nucleophile an 2-(Trifluormethyl)propensäure.^[30]

Unter Bildung von Si-O-Si-Bindungen katalysierten Lipasen^[31] oder Trypsin^[32] die Kondensation von Silanolen bzw. Alkoxy silanen. Trypsin katalysierte die Hydrolyse und die Kondensation von Trimethylethoxysilan zu Hexamethylsiloxan in Wasser (Schema 4). Silanole und Alkoxy silane sind

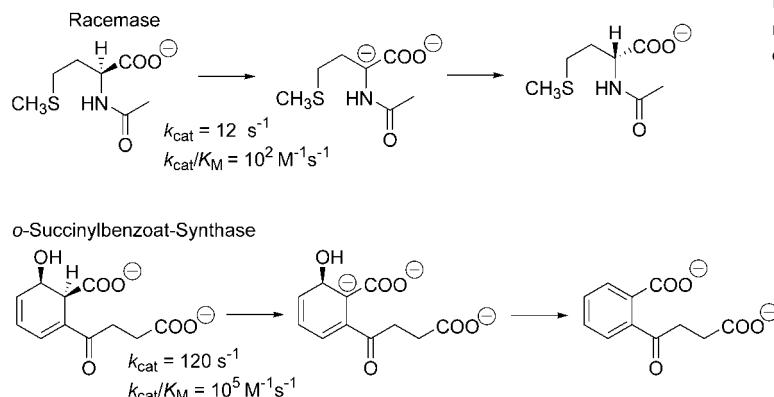


Schema 4. Trypsinkatalysierte Hydrolyse und Kondensation von Trimethylethoxysilan zu Hexamethyldisiloxan in Wasser.

zwar bereits von Natur aus sehr reaktiv und gehen eine spontane oder peptidvermittelte Kondensation ein,^[33] die trypsin-katalysierte Reaktion war jedoch noch mindestens 10-mal schneller als die spontane Reaktion. Das aktive Zentrum von Trypsin muss an der Kondensation beteiligt sein, da in Gegenwart von trypsin-spezifischen Inhibitoren keine Katalyse auftrat und auch nicht alle Trypsine diese Reaktion katalysieren: Trypsin aus Schweinen war aktiv, Trypsin aus dem atlantischen Kabeljau inaktiv.

Oxynitrilase katalysiert normalerweise die Addition von Cyaniden an Aldehyde, kann aber auch mit moderater Stereoselektivität (3–4:1) die Addition von Cyaniden an Imine vermitteln.^[34]

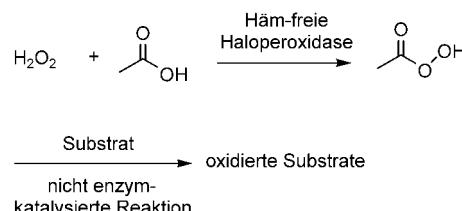
Eine falsche Zuordnung der Enzymfunktion aufgrund von katalytischer Promiskuität erfolgte bei einem ursprünglich als *N*-Acylaminosäure-Racemase identifizierten Enzym.^[35] Gerlt und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass dieses Enzym um den Faktor 1000 effizienter eine Dehydratisierung unter Bildung von *o*-Succinylbenzoat katalysiert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Bildung eines Succinylbenzoates die eigentliche Aufgabe des Enzyms ist (Schema 5). Ein Wechsel der *N*-Acylaminosäure von *N*-Acetylmethionin (dem bislang besten Substrat für die Racemaseaktivität) zu *N*-Succinylphenylglycin, das der Succinylbenzoatvorstufe näher kommt, führte zu einer 1000-fachen Steigerung der Geschwindigkeit



Schema 5. Ein Enzym, das als *N*-Acylaminosäure-Racemase beschrieben wurde, ist 1000-mal effizienter bei der Dehydratisierung von *o*-Succinylbenzoat. Beide Reaktionsmechanismen verlaufen über ein ähnliches anionisches Intermediat.

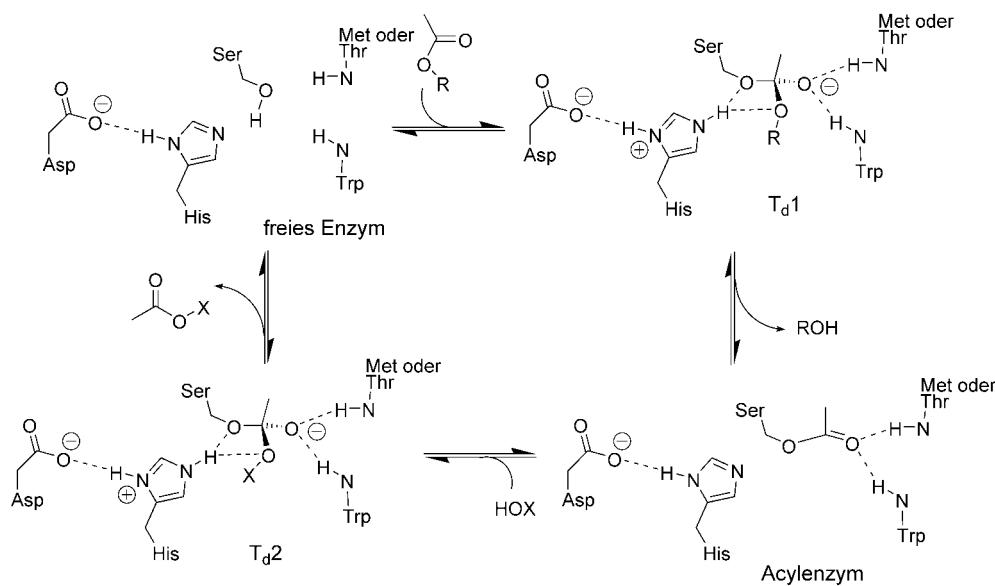
der Racemisierungsreaktion, vergleichbar mit jener der Succinylbenzoat-Reaktion.

Die katalytische Aktivität von Esterasen und Lipasen, die die Hydrolyse von Estern katalysieren, überlappt mit jener von Häm-freien Haloperoxidasen. Diese katalysieren Oxidationen durch Wasserstoffperoxid über eine Peroxocarbonssäure-Zwischenstufe (Schema 6). So zeigen eine Esterase aus



Schema 6. Häm-freie Haloperoxidasen katalysieren die Bildung von Peroxocarbonssäuren über einen esteraseähnlichen Mechanismus. Die nachfolgende Oxidation des Substrates mit der Persäure erfolgt möglicherweise nicht enzymkatalysiert.

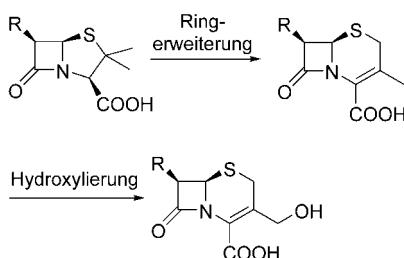
Pseudomonas fluorescens,^[36] eine Lactonase^[37] und viele Lipasen^[38] niedrige Peroxidaseaktivität in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und einer Carbonsäure. Im umgekehrten Fall weist zumindest eine Haloperoxidase auch eine niedrige Esteraseaktivität auf.^[39] Die Überlappung der katalytischen Aktivität dieser Enzyme ist auf ähnliche Übergangszustände und Acyl-Enzym-Intermediate in beiden Reaktionen zurückzuführen (Schema 7). In Esterasen wird das Acyl-Enzym-Intermediate durch Hydrolyse gespalten, während in Haloperoxidasen eine Perhydrolyse zur Peroxocarbonssäure führt. Die nachfolgende Oxidation eines Halogenids zu Hypochlorsäure durch diese Per-



Schema 7. Die Mechanismen der Ester-Hydrolyse durch Esterasen und der Ester-Peroxidation durch Häm-freie Haloperoxidasen verlaufen beide über ein Acyl-Enzym-Intermediat. In Esterasen ($X=H$) wird dieses Intermediat durch H_2O angegriffen, um die Hydrolyse zu vervollständigen. In Haloperoxidasen ($X=OH$) entsteht dieses Acyl-Enzym-Intermediat durch dem Reaktionsgemisch zugesetztes Acetat. Wasserstoffperoxid greift dieses Intermediat unter Bildung einer Persäure an. $R=Ph$ für Esterase, H für Haloperoxidase.

oxocarbonsäure ist möglicherweise nicht Enzym-katalysiert. Dennoch sind Esterasen und Lipasen effizienter bei der Esterhydrolyse und Haloperoxidases effizienter bei der Erzeugung von Peroxocarbonsäuren. Detaillierte Strukturanalysen einer Haloperoxidase^[40] und einer verwandten Esterase^[41] ergaben nur geringe Unterschiede in beiden aktiven Zentren – die Gründe für die unterschiedliche Effizienz der beiden Enzyme blieben offen.

Die katalytische Promiskuität spielt eine natürliche Rolle bei der Synthese einer Reihe von Sekundärmetaboliten: Beispielsweise erfolgt die Synthese des Antibiotikums Cephalosporin C in Eukaryoten durch ein einziges Enzym mit einem einzigen aktiven Zentrum. Dieses katalysiert zwei unterschiedliche Oxidationsreaktionen – die oxidative Ringweiterung des Fünfrings zum Sechsring und die Hydroxylierung einer Methylgruppe (Schema 8). Der Austausch ein-



Schema 8. Eine eukaryotische Häm-unabhängige, Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängige Cephalosporin-C-Synthase katalysiert zwei unterschiedliche Reaktionen am selben aktiven Zentrum.

zelner Aminosäuren kann zum Verlust der jeweiligen Aktivitäten führen.^[42] Dagegen sind bei der Cephalosporinsynthese in Prokaryoten für beide Schritte unterschiedliche Enzyme verantwortlich. Diese beiden Enzyme sind aber nahe Verwandte des bifunktionellen Enzyms aus Eukaryoten. Diese Häm-unabhängigen, Eisen(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Enzyme können sogar drei Funktionen übernehmen: Gibberellin-20-Oxidase katalysiert drei nachgeschaltete Oxidationen der C-20-Methylgruppe: zu einem Alkohol, dann zu einem Aldehyd und schließlich zu einem Carboxylat.^[43] Eine Clavaminsäure-Synthase katalysiert eine Hydroxylierung, eine oxidative Cyclisierung und eine Desaturierung.^[44]

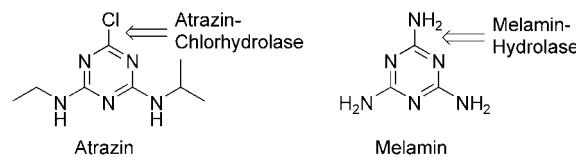
Andere Häm-freie oxidative Dieisenenzyme katalysieren ebenfalls ein breites Spektrum von Oxidationen. Beispielsweise katalysiert eine pflanzliche Steroyl-Acyl-Carrierprotein- Δ^9 -Desaturase nicht nur im Rahmen ihrer natürlichen Funktion die Desaturierung von Stearinsäure zu Ölsäure, sondern auch die Sulfoxidation von 9-Thia- oder 10-Thiasstearylanaologa^[45] und die Hydroxylierung von 9-Fluorstearylanaologa.^[46] Methanmonooxygenase, ein weiteres Häm-freies Dieisenenzym, katalysiert außer der Hydroxylierung von Methan auch ein breites Spektrum weiterer Oxidationen, unter anderem Epoxidierungen, N-Oxidbildungen, Dehalogenierungen und die Desaturierung benzylischer Substrate.^[47] Degradationsenzyme wie Cytochrom P450, die eine Eisenhämgruppe enthalten, katalysieren ebenfalls ein breites Spektrum an Oxidationen.

4. Katalytische Promiskuität in modifizierten Proteinen

4.1. Natürliche Evolution neuer katalytischer Aktivitäten

Die divergente Evolution ist ein natürlicher Prozess, der unterschiedliche Spezies aus gleichen Vorfahren erzeugt. Dieser Vorgang findet auch auf der molekularen Ebene bei der Generierung von Enzymen mit neuen katalytischen Eigenschaften statt. Neue Enzymaktivitäten entstehen durch Genduplikation, gefolgt von einer Evolution der neuen Aktivität für die so erzeugte Kopie.^[48] Zwei Vertreter für eine divergente Evolution sind die Superfamilie der α/β -Hydrolase-Faltungsenzyme^[49] und die der Enolasen.^[50] Die Enzyme mit α/β -Hydrolase-Faltung basieren generell auf einer nucleophilen Katalyse, umfassen aber ein breites Spektrum an Substraten und Reaktionstypen. Hierzu gehören Ester- oder Peptidhydrolyse (Serin-Nucleophil), Dehalogenierung und Epoxidhydrolyse (Aspartat-Nucleophil). Alle Enolase-Enzyme haben ähnliche aktive Zentren und katalysieren mithilfe eines divalenten Metallions generell die basenkatalysierte Abstrahierung eines Protons in α -Stellung zu einer Carbonsäuregruppe unter Bildung eines Enolintermediates. Beispiele für unterschiedliche Reaktionen, die von Enzymen der Enolase-Superfamilie katalysiert werden, sind Racemisierungen (Mandelsäure, *N*-Acylaminosäuren) und β -Eliminierungen (*o*-Succinylbenzoat-Synthase). Ein Beispiel für ein falsch zugeordnetes Enzym ist bereits in Abschnitt 3 erwähnt.

Ein Beispiel für eine erstaunliche schnelle natürliche Evolution einer neuen katalytischen Aktivität liefert eine Atrazin-Chlorhydratase (Schema 9).^[51] Ursprünglich wurde beobachtet, dass Atrazin – ein Herbizid, das seit den späten fünfziger Jahren verwendet wurde – im Boden nicht vollständig abgebaut wird. Seit 1953 finden sich jedoch eine Reihe von Berichten, die dessen raschen Abbau beschreiben. Das Schlüsselenzym für diese Biodegradation – Atrazin-Chlorhydratase, welche die C-Cl-Bindung spaltet – unterscheidet sich nur durch acht Aminosäuren von Melaminhydratase, welche die Hydrolyse der C-N-Bindung in Melamin katalysiert. Melaminhydratase weist eine niedrige Atrazin-Chlorhydratase-Aktivität auf, das neue Enzym zeigt jedoch keine nachweisbare Melaminhydratase-Aktivität mehr. Durch gerichtete Evolution konnte das Substratspektrum dieser Atrazin-Chlorhydratase auf Substrate mit C-S- und C-O-Bindungen erweitert werden.^[52] Ein weiteres Beispiel für eine rasche natürliche Evolution ist die Entstehung einer Phosphotriesterase, die das Insektizid Paraoxon abbaut.^[53]



Schema 9. Atrazin-Chlorhydratase ist in jüngster Zeit durch natürliche Evolution aus Melaminhydratase entstanden. Die „ältere“ Melaminhydratase (C-N-Bindungsspaltung) zeigt niedrige Atrazin-Chlorhydratase-Aktivität (C-Cl-Bindungsspaltung), aber die neue Atrazin-Chlorhydratase hat die Fähigkeit zur Spaltung von Melamin verloren.

4.2. Substitution des Metallions

Die Substitution eines Metallions kann ebenfalls die katalytische Aktivität verändern. Eines der ältesten Beispiele aus dem Jahr 1976 zeigt, dass der Austausch des Zn^{2+} -Ions im aktiven Zentrum einer Carboxypeptidase gegen ein Cu^{2+} -Ion dieses Enzym in eine langsame Oxidase überführt.^[54] Ein Austausch des Zn^{2+} -Ions im aktiven Zentrum von Thermolysin gegen deutlich größere Ionen wie Wolfram-, Molybdat- oder Selenationen generiert Enzyme, die die Oxidation von Thioestern zu Sulfoxiden mit Wasserstoffperoxid ermöglichen.^[55] Ein Austausch von Serin im aktiven Zentrum von Subtilisin gegen Selenomethionin führt zu Peroxidase-Aktivität.^[56]

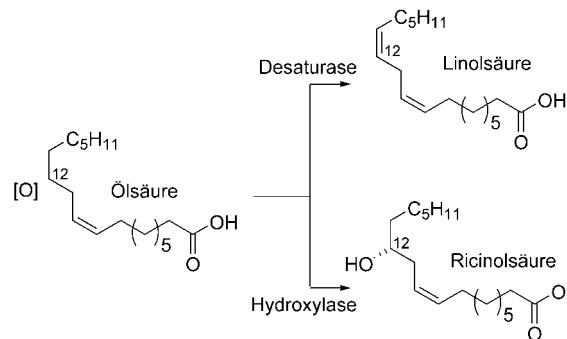
Ein weiteres Beispiel für überlappende katalytische Aktivitäten sind saure Phosphatasen und Vanadium-abhängige Haloperoxidasen.^[57,58] Die Aminosäuresequenzen, dreidimensionalen Strukturen und aktiven Zentren sind in beiden Enzymklassen sehr ähnlich. Vanadat bindet vermutlich an die gleiche Position im Protein wie ein Phosphatester, weil es leicht eine Struktur mit einer fünfachen Koordination des Vanadiumzentrums einnehmen kann, analog zum Übergangszustand der Phosphatesterhydrolyse. Das Vanadiumion katalysiert die Peroxidation durch Bindung des Peroxides an das Vanadiumzentrum, wodurch die Elektrophilie des Peroxides erhöht wird. Die Ähnlichkeit der beiden aktiven Zentren liefert auch eine Erklärung für die Fähigkeit von Vanadiumsalzen, Phosphatasen zu inhibieren, oder die Beobachtung, dass Phosphate Vanadium-abhängige Haloperoxidasen durch Austausch des Vanadiumions inaktivieren können.

Der Austausch der aktiven Zentren führt auch zu einem Austausch der katalytischen Aktivität dieser beiden Enzymklassen. Mehrere saure Phosphatasen zeigen nach Zugabe von Vanadiumionen eine niedrige Haloperoxidase-Aktivität,^[59] und umgekehrt zeigen Apo-Haloperoxidasen eine niedrige Phosphataseaktivität.^[60] Sheldon und Mitarbeiter berichteten über die enantioselektive Oxidation von Sulfiden zu Sulfoxiden durch eine Vanadiumion-substituierte Phytase.^[61] Jedoch war der veränderte Biokatalysator deutlich weniger aktiv als das echte Enzym: Die Umsatzgeschwindigkeiten bezüglich der Haloperoxidase-Aktivität einer vanadiumhaltigen Phosphatase waren 10^3 – 10^4 -mal niedriger als die einer echten Haloperoxidase; Entsprechendes gilt für die Phosphatase-Aktivität der Apo-Haloperoxidase im Vergleich zur einer echten Phosphatase. Diese großen Unterschiede belegen erwartungsgemäß, dass jedes Enzym für eine bestimmte katalytische Aktivität optimiert ist. Es ist allerdings trotz verfügbarer Röntgenstrukturdaten, wie im Falle der oben erwähnten Esterasen und Häm-freien Haloperoxidasen oft nicht klar, welche Struktureigenschaften für die unterschiedlichen optimierten Aktivitäten verantwortlich sind.

4.3. Enzym-Engineering

Einige Arbeitsgruppen versuchten, die divergente Evolution durch positionsgerichtete Mutagenese nachzuahmen. Ein Vergleich verwandter Enzyme mit unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten ermöglichte die Identifizierung von Res-

ten, die zu einer veränderten katalytischen Aktivität führten. Die Einführung solcher Reste in eines dieser Enzyme änderte dessen Aktivität; beispielsweise führte die Substitution von vier Aminosäuren in einer Fettsäuredesaturase gegen die entsprechenden Reste einer Fettsäurehydroxylase zu einer effizienten Hydroxylase (Schema 10).^[62] In einem anderen



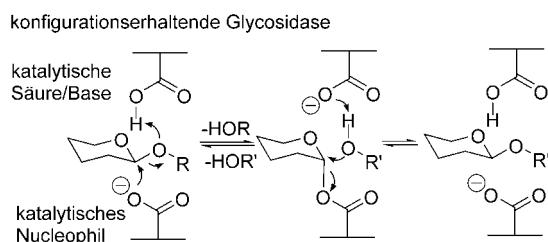
Schema 10. Sowohl Desaturasen als auch Hydroxylasen haben ein Di-eisenzentrum und oxidieren Ölsäure an der C-12-Position. Vier Mutationen in der Desaturase überführen diese in eine Hydroxylase.

Fall führte der Austausch einer einzelnen Aminosäure in einer L-Ala-D/L-Glu-Epimerase zur Einführung von *ortho*-Succinoylbenzoat-Synthase-Aktivität oder Muconsäure-Lactonisierungs-Enzym-Aktivität.^[63] Innerhalb der Familie von Glutathiotransferasen entstand durch die Einführung von Mutationen aus einer Transferase, die eine Michael-Addition katalysiert, ein Enzym, das eine nucleophile aromatische Substitution katalysiert.^[64] In gleicher Weise konnte eine Steroidisomerase-Aktivität in einer Glutathion-Transferase mit Peroxidase-Aktivität durch Einführung von fünf Mutationen erzeugt werden, die aus einer verwandten Steroidisomerase abgeleitet waren.^[65] Mutationen in einer Oxidosqualen-Cyclase führten zur Veränderung einer Position, die an der Abspaltung eines Protons beteiligt war, und damit zu unterschiedlichen Steroiden.^[66]

Eine wesentlich schwierigere Aufgabe ist die Überführung eines nicht katalytisch aktiven Proteins in eine Dehydratase mit niedriger Aktivität.^[67]

4.4. Glycosynthasen, Thioglycolasen und Thioglycosynthasen

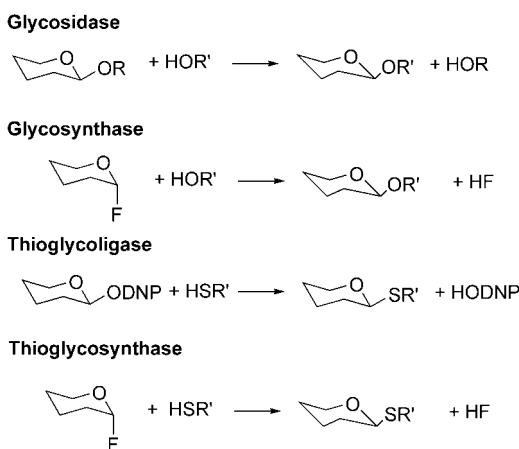
Konfigurationserhaltende β -Glycosidasen katalysieren normalerweise die Hydrolyse von β -glycosidischen Bindungen unter Retention der Konfiguration, katalysieren aber auch den Glycosid-Austausch in Systemen mit niedrigem Wassergehalt. Die Reaktion startet ausgehend von einem β -Glycosid (Zucker-OR), das mit einem Nucleophil (HOR') reagiert (Schema 11). Bei einer Hydrolyse ist dieses Nucleophil Wasser und bei Glycosidaustauschreaktionen ein zweites Glycosid. Diese Glycosidasen verwenden einen zweifachen Verdrängungsmechanismus mit einer katalytischen Säure/Base und einem katalytischen Nucleophil. Im ersten Schritt entsteht ein α -verknüpftes, kovalent gebundenes Intermediat durch Angriff des katalytischen Nucleophils an das β -Glyco-



Schema 11. Der Glycosidaustausch durch konfigurationserhaltende β -Glycosidasen ist charakterisiert durch einen zweifachen Austausch: Ein Glycosyldonor (β -Zucker-OR) bildet ein α -verknüpftes Glycosylenzym, das dann mit einem eintretenden Nucleophil (HOR') unter Bildung einer neuen β -glycosidischen Bindung (β -Zucker-OR') reagiert.

sid. Die katalytische Säure unterstützt diesen Schritt durch Protonierung der Abgangsgruppe. Im zweiten Schritt wird dieses kovalent gebundene Intermediat durch einen basenunterstützten Angriff des eintretenden Nucleophils – Wasser oder ein weiteres Glycosid – freigesetzt.

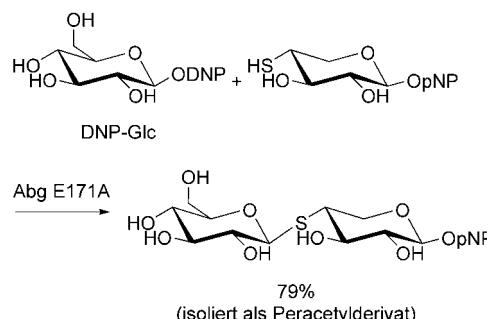
Durch die Ausschaltung von Schlüsselschritten in diesem Mechanismus kreierten Withers und Mitarbeiter drei neue Katalysatortypen (Schema 12). Der erste Typ, Glycosynthasen, entstand durch Entfernung des katalytischen Nucleophils (z.B. eine Glu-zu-Ala-Mutation).^[68] Dies verhindert die Bildung des kovalent gebundenen Intermediates und führt zu



Schema 12. Durch Ausschalten von Schlüsselschritten konnten neue katalytische Aktivitäten für eine konfigurationserhaltende β -Glycosidase geschaffen werden. Die Entfernung des katalytischen Nucleophils erzeugt eine Glycosynthese, von der nur α -Glycosylfluoride akzeptiert werden, vermutlich über einen direkten Austauschmechanismus. Die Entfernung der katalytischen Säure/Base ergab eine Thioglycoligase (nur starke eintretende Nucleophile wie Thiole reagieren). Die Entfernung sowohl des katalytischen Nucleophils als auch der katalytischen Säure/Base führt zu einer Thioglycosynthese (nur α -Glycosylfluoride und starke eintretende Nucleophile reagieren). DNP = 2,4-Dinitrophenyl.

einem stark veränderten Mechanismus. Normale Glycoside reagieren nicht mehr, α -Glycosylfluoride reagieren jedoch, vermutlich über einen direkten Austauschmechanismus. Glycosynthasen bilden analog zum Ausgangsenzym β -glycosidische Bindungen. Allerdings katalysieren Glycosynthasen

nicht mehr die Hydrolyse des Produktes, eines nicht-aktivierten Glycosids, und folglich können höhere Ausbeuten erreicht werden. Fünf verschiedene Glycosynthasen wurden beschrieben, die unterschiedliche Spezifitäten und Regioselektivitäten (Bildung von β -1,3- oder β -1,4-Bindungen) gegen α -Glycosylfluoride zeigten. Der zweite Typ neuer katalytischer Aktivität, die Thioglycoligase-Aktivität, kann durch Entfernung der katalytischen Säure/Base erhalten werden.^[69] Eine Aufgabe dieser katalytischen Säure/Base ist die Aktivierung des eintretenden Nucleophils. Die Entfernung dieses Aktivators schließt eine Reaktion mit normalen eintretenden Nucleophilen aus und verlangt starke Nucleophile wie Thiole. Der Austausch einzelner Aminosäuren in einer β -Glycosidase aus *Agrobacterium* sp. Abg (Mutation: E171A) ergab eine Variante, die *S*-glycosidisch-verknüpfte Produkte in hohen Ausbeuten erzeugt (Schema 13). Mit dem Wildtypenzym konnte kein Produkt gebildet werden, vermutlich aus sterischen Gründen wegen des großen Schwefelatoms. Schließlich führte die Entfernung sowohl des katalytischen Nucleophils als auch der katalytischen Säure/Base zu einer Thioglycosynthese, die nur ein α -Glycosylfluorid und einen Thiolacceptor umsetzt.^[70]



Schema 13. Eine Thioglycoligase ohne katalytische Säure/Base katalysiert keine Hydrolyse mehr. Bei Verwendung eines aktivierten Glycosyldonors kann das Fehlen des Protonendonors ausgeglichen werden. Der Einsatz eines nucleophilen Thiols ersetzt die fehlende Base, die das eintretende Nucleophil aktiviert. Folglich katalysiert diese Mutante nun die Bildung einer *S*-glycosidischen Bindung. pNP = 4-Nitrophenyl.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Katalytische Promiskuität in Enzymen kommt öfter vor als allgemein angenommen. Die Häufung katalytischer Reste in einem aktiven Zentrum kann zur Akzeptanz alternativer funktioneller Gruppen im Substrat und zu alternativen Reaktionswegen führen. Kleine Änderungen im aktiven Zentrum können die Bandbreite alternativer Reaktionswege zusätzlich enorm erweitern. In vielen, aber nicht in allen Fällen sind diese alternativen Reaktionswege langsamer als die natürliche Reaktion. Wir hoffen, dass dieser Kurzaufsatz dazu anregt, intensiver nach neuen Beispielen für katalytische Verwandtschaft bekannter Enzyme zu suchen und die verfügbaren Methoden des Protein-Engineerings und der gerichteten Evolution für die Erweiterung präparativer Anwendungen von Enzymen zu nutzen.

Wir danken Bernhard Hauer (BASF, Ludwigshafen) für nützliche Hinweise und Diskussionen. U.T.B. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 22. April 2004
Online veröffentlicht am 2. November 2004

- [1] Übersicht: a) S. D. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265–272; b) A. Yarnell, *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 33–35; c) P. J. O'Brian, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91–R105.
- [2] a) H. I. Park, L.-J. Ming, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3097–3100; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2914–2916; b) A. Ercan, H. I. Park, L.-J. Ming, *Chem. Commun.* **2000**, 2501–2502.
- [3] T. C. Cheng, S. P. Harvey, G. L. Chen, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1636–1641.
- [4] PLE: M. Jones, M. I. Page, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 316–317; PFL: R. Brieva, J. Z. Crich, C. J. Sih, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1068–1075; CAL-B: a) W. Adam, P. Groer, H.-U. Humpf, C. R. Saha-Möller, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4919–4922; b) E. Forró, F. Fülöp, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1209–1212; c) S. Park, E. Forró, H. Grewal, F. Fülöp, R. J. Kazlauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 986–995.
- [5] T. W. Reid, D. Fahrney, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3941–3943.
- [6] P. F. Mugford, V. P. Magloire, R. J. Kazlauskas, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [7] Übersicht: M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kesseler, R. Stuermer, T. Zelinski, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806–843; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824.
- [8] R. C. Jackson, R. E. Handschumacher, *Biochemistry* **1970**, *9*, 3585–3590.
- [9] J. A. Peliska, M. H. O'Leary, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1604–1611.
- [10] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12369–12370.
- [11] Y. Romsicki, G. Scapin, V. Beaulieu-Audy, S. Patel, J. W. Becker, B. P. Kennedy, E. Asante-Appiah, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29009–29015.
- [12] Aktuelles Beispiel in der Biokatalyse: A. Magnusson, K. Hult, M. Holmquist, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4354–4355.
- [13] a) W. Kroutil, M. Mischitz, K. Faber, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 3629–3636; b) K. Faber, W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 377–382.
- [14] a) F. Hollfelder, A. J. Kirby, D. S. Tawfik, *Nature* **1996**, *383*, 60–62; b) G. Klein, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113–1116.
- [15] S. Colonna, N. Gaggero, J. Drabowicz, P. Lyzwa, M. Mikolajczyk, *Chem. Commun.* **1999**, 1787–1788.
- [16] D. C. Levinger, J.-A. Stevenson, L.-L. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2305–2306.
- [17] S. Ozaki, T. Matsui, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9784–9785; S. Ozaki, H.-J. Yang, T. Matsui, Y. Goto, Y. Watanabe, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 183–192.
- [18] L. C. James, D. S. Tawfik, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 2600–2607.
- [19] A. C. Backes, K. Hotta, D. Hilvert, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 1167–1174.
- [20] Übersicht: O. P. Ward, A. Singh, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 520–526.
- [21] C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.* **1921**, *115*, 282–310.
- [22] a) S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *Biocatalysis* **1988**, *1*, 321–331; b) D. H. G. Crout, H. Dalton, D. W. Hutchinson, M. Miyagoshi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 1329–1334.
- [23] G. Goetz, P. Iwan, B. Hauer, M. Breuer, M. Pohl, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 317–325.
- [24] Übersicht: H. Hayashi, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 463–473.
- [25] R. Contestabile, A. Paiardini, S. Pascarella, M. L. di Salvo, S. D'Aguanno, F. Bossa, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6508–6525.
- [26] G.-Y. Yow, A. Watanabe, T. Yoshimura, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B* **2003**, *23*, 311–319.
- [27] C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874–875.
- [28] a) F. Ikegami, I. Murakoshi, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1089–1104; b) D. H. Flint, J. F. Tuminello, T. J. Miller, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16053–16067.
- [29] T. H. P. Maier, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 422–427.
- [30] T. Kitazume, T. Ikeya, K. Murata, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1331–1333.
- [31] H. Nishino, T. Mori, Y. Okahata, *Chem. Commun.* **2002**, 2684–2685.
- [32] A. R. Bassindale, K. F. Brandstadt, T. H. Lane, P. G. Taylor, *Inorg. Biochem.* **2003**, *96*, 401–406.
- [33] N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, M. Sumper, *Science* **2002**, *298*, 584–586.
- [34] T. Lee, Y. Ahn, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1490–1492.
- [35] a) D. R. J. Palmer, J. B. Garrett, V. Sharma, R. Meganathan, P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1999**, *38*, 4252–4258; b) E. A. Taylor Ringia, J. B. Garrett, J. B. Thoden, H. M. Holden, I. Rayment, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2004**, *43*, 224–229.
- [36] I. Pelletier, J. Altenbuchner, *Microbiology* **1995**, *141*, 459–468.
- [37] M. Kataoka, K. Honda, S. Shimizu, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3–10.
- [38] a) F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587–4592; b) O. Kirk, L. S. Conrad, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1031–1033; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 977–979.
- [39] I. Pelletier, J. Altenbuchner, *Microbiology* **1995**, *141*, 459–468.
- [40] B. Hofmann, S. Tölzer, S., I. Pelletier, J. Altenbuchner, K.-H. van Pee, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 889–900.
- [41] J. D. Cheeseman, A. Tocilj, S. Park, J. D. Schrag, R. J. Kazlauskas, *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*(Pt7), 1237–1243.
- [42] M. D. Lloyd, S. J. Lipscomb, K. S. Hewitson, C. M. H. Hensgens, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15420–15426.
- [43] T. Lange, P. Hedden, J. E. Graebe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8552–8556.
- [44] M. D. Lloyd, K. D. Merritt, V. Lee, T. J. Sewell, B. Wha-Son, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, S. W. Elson, K. H. Baggaley, N. H. Nicholson, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10201–10220.
- [45] B. Behrouzian, P. H. Buist, J. Shanklin, *Chem. Commun.* **2001**, 401–402.
- [46] a) B. Behrouzian, B. Dawson, P. H. Buist, J. Shanklin, *Chem. Commun.* **2001**, 765–766; b) B. Behrouzian, C. K. Savile, B. Dawson, P. H. Buist, J. Shanklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3277–3283.
- [47] Y. Jin, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 717–725.
- [48] J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 209–246.
- [49] a) D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolov, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. L. Sussman, K. H. G. Verschueren, A. Goldman, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 197–211; b) M. Holmquist, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1*, 209–235.
- [50] P. C. Babbitt, M. S. Hasson, J. E. Wedekind, D. R. J. Palmer, W. C. Barrett, G. H. Reed, I. Rayment, D. Ringe, G. L. Kenyon, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16489–16501.
- [51] J. L. Seffernick, L. P. Wackett, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12747–12750.
- [52] S. Raillard, A. Krebber, Y. Chen, J. E. Ness, E. Bermudez, R. Trinidad, R. Fullem, C. Davis, M. Welch, J. Seffernick, L. P. Wackett, W. P. C. Stemmer, J. Minshull, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 891–898.
- [53] T. S. Scanlan, R. C. Reid, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 71–75.
- [54] K. Yamamura, E. T. Kaiser, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 830–831.

- [55] M. Bakker, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Can. J. Chem.* **2002**, 80, 622–625.
- [56] I. M. Bell, M. L. Fisher, Z. P. Wu, D. Hilvert, *Biochemistry* **1993**, 32, 3754–3762.
- [57] a) A. F. Neuwald, *Protein Sci.* **1997**, 6, 469–472; b) J. Littlechild, E. Garcia-Rodriguez, A. Dalby, M. Isupov, *J. Mol. Recognit.* **2002**, 15, 291–296.
- [58] W. Hemrika, R. Renirie, H. L. Dekker, P. Barnett, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2145–2149.
- [59] N. Tanaka, V. Dumay, Q. Liao, A. J. Lange, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 2162–2167.
- [60] R. Renirie, W. Hemrika, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 11650–11657.
- [61] a) F. van de Velde, L. Könemann, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Chem. Commun.* **1998**, 1891–1892; b) F. van de Velde, L. Könemann, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 67, 87–96.
- [62] a) P. Broun, J. Shanklin, E. Whittle, C. Somerville, *Science* **1998**, 282, 1315–1317; b) J. A. Broadwater, E. Whittle, J. Shanklin, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 15613–15620.
- [63] D. M. Z. Schmidt, E. C. Mundorff, M. Dojka, E. Bermudez, J. E. Ness, S. Govindarajan, P. C. Babbitt, J. Minshull, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2003**, 42, 8387–8393.
- [64] L. O. Nilsson, A. Gustafsson, B. Mannervik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9408–9412.
- [65] P. L. Pettersson, A.-S. Johansson, B. Mannervik, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 30019–30022.
- [66] a) E. A. Hart, L. Hua, L. B. Darr, W. K. Wilson, J. Pang, S. P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9887–9888; b) M. M. Meyer, R. Xu, S. P. T. Matsuda, *Org. Lett.* **2002**, 4, 1395–1398.
- [67] A. E. Nixon, S. M. Firestone, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3568–3571.
- [68] S. J. Williams, S. G. Withers, *Aust. J. Chem.* **2002**, 55, 3–12; für ältere Arbeiten zur Überführung eines invertierenden Enzyms in ein konfigurationserhaltendes Enzym siehe: R. Kuroki, L. H. Weaver, B. M. Matthews, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 1007–1011.
- [69] M. Jahn, J. Marles, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 366–368; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 352–354.
- [70] M. Jahn, H. Chen, J. Muellegger, J. Marles, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Chem. Commun.* **2004**, 274–275.