

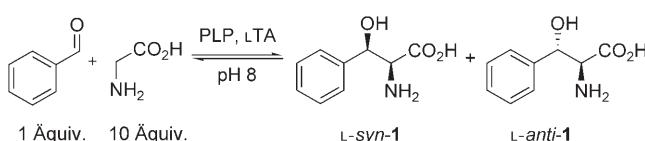
Überwindung der thermodynamischen und kinetischen Limitierungen Aldolase-katalysierter Reaktionen durch multienzymatische dynamische kinetische asymmetrische Umwandlungen**

Johannes Steinreiber, Martin Schürmann, Michael Wolberg, Friso van Assema, Christoph Reisinger, Kateryna Fesko, Daniel Mink und Herfried Griengl*

Die Natur verwendet bestimmte Enzyme für die Bildung und Spaltung von C-C-Bindungen von Aldolen,^[1] und mehr als 40 solcher Aldolasen wurden bis jetzt charakterisiert.^[2] Sie bieten einen biokatalytischen Zugang zu α -Hydroxycarbonylverbindungen,^[1] allerdings ist eine Anwendung in der Synthese häufig durch die Lage des Gleichgewichts eingeschränkt (thermodynamische Limitierung).^[3] Darüber hinaus bestehen auch kinetische Limitierungen, wenn die Reaktionsgeschwindigkeiten für die Bildung der Stereoisomere nicht unterschiedlich genug sind, um hohe Stereoselektivitäten zu gewährleisten.

Wir zeigen hier, wie diese Limitierungen für die untersuchte Reaktion – die durch Threonin-Aldolasen (TAs) katalysierte Synthese von β -Hydroxy- α -aminosäuren aus Glycin und Aldehyden – überwunden werden können. Alle glycin-abhängigen Aldolasen benötigen Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), um die reversible Aldolreaktion von Glycin mit dem Akzeptoraldehyd zu katalysieren. Als Modellreaktion be-

schreiben wir die Umwandlung von Benzaldehyd zu Phenylserin (**1**; Schema 1). Einige natürliche L- und D-Threonin-Aldolasen (LTA bzw. DTA, EC 4.1.2.5)^[4] und eine gentech-



Schema 1. Durch L-Threonin-Aldolase katalysierte Synthese von L-Phenylserin (**1**).

nisch veränderte DTA (ausgehend von Alanin-Racemase)^[5] sind bis jetzt untersucht worden, und es konnte gezeigt werden, dass alle TAs eine Vielzahl aromatischer und aliphatischer Aldehyde umsetzen.^[6] Wenn ein zehnfacher Überschuss von Glycin über Benzaldehyd verwendet wird, beträgt die Ausbeute 85% (LTA, optimierte Bedingungen), da das Gleichgewicht auf die Seite des Aldols verschoben wird.^[7] Der Prozess könnte auch durch kontinuierliches Entfernen des Produkts zu höheren Ausbeuten optimiert werden.^[8]

Eine bessere Lösung, um die thermodynamische Limitierung zu überwinden, ist die Verschiebung des Gleichgewichts zur „Aldol“-Seite durch eine gekoppelte irreversible Reaktion der anfänglich gebildeten β -Hydroxyaminosäure **1**. LTA, DTA und die meisten Enzyme des Aminosäurestoffwechsels weisen eine hohe C_α-Selektivität auf (L/D), während die C_β-Selektivität von LTA und DTA niedrig ist (kinetische Limitierung, syn/anti).^[6] Kürzlich konnten wir zeigen, dass mit der DTA aus *Alcaligenes xylosoxidans*^[9] die kinetische Limitierung überwunden und diastereomererenreiches D-syn-**1** erhalten wird.^[7] Mit LTA ist die Enantioselektivität am NH₂-gebundenen Kohlenstoffatom ausgezeichnet (ee > 99 %), wogegen die Umwandlung der Aldehyd- zur Hydroxygruppe mit niedriger Enantioselektivität erfolgt. Dies führt zu einem Diastereomerenverhältnis L-syn-**1**/L-anti-**1** von 60:40.^[7] Ein gekoppelter C_β-selektiver Schritt würde helfen, auch diese Limitierung zu überwinden.

L-Aminosäure-Decarboxylasen sind im hohen Grade substratspezifisch. Nur für L-Tyrosin-Decarboxylase (L-TyrDC, PLP-abhängig) wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Hydroxygruppe in der β -Position und aromatische Substituenten toleriert werden.^[10] L-TyrDC ist hochspezifisch für das NH₂-gebundene Kohlenstoffatom, indem nur das L-Enantiomer umgesetzt wird. L-TyrDC kann deshalb verwendet

[*] Dr. J. Steinreiber, Dr. C. Reisinger, Prof. H. Griengl
Angewandte Biokatalyse – Kompetenzzentrum GmbH
Petersgasse 14, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-873-8740

E-Mail: herfried.griengl@a-b.at
Homepage: <http://www.a-b.at>

Dr. M. Schürmann, F. van Assema, Dr. D. Mink
DSM Pharmaceutical Products
Advanced Synthesis, Catalysis & Development
P.O. Box 18, 6160 MD Geleen (Niederlande)

Dr. M. Wolberg
DSM Pharma Chemicals, ResCom
Donaustaufer Straße 378, 93055 Regensburg (Deutschland)

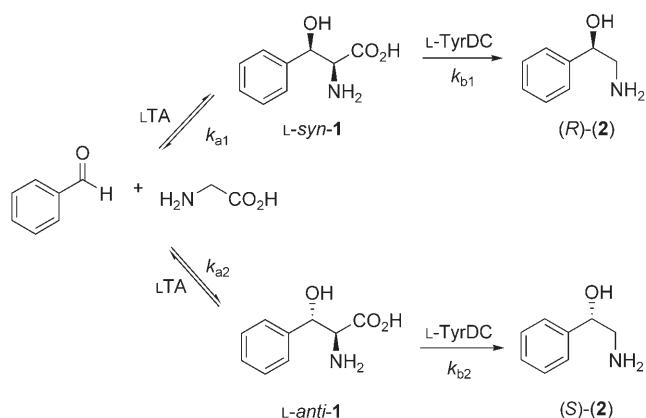
K. Fesko
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Graz
Stremayrgasse 16, 8010 Graz (Österreich)

[**] Wir danken der Österreichischen Forschungsförderungsgesellschaft (FFG), dem Land Steiermark, der Steirischen Wirtschaftsförderung (SFG) und der Stadt Graz für Unterstützung durch das Kplus-Programm sowie dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF, Projekt W901-B05 DK Molecular Enzymology) und der Europäischen Kommission (Marie Curie Industrial Host Fellowship für M.S. und M.W.) für finanzielle Unterstützung. Marcel Wubbolts, Theo Sonke und Kurt Faber danken wir für nützliche Diskussionen sowie Karl Gruber und Michael Uhl für das Modell der L-Threonin-Aldolase im Inhaltsverzeichnisbild.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

werden, um racemisches DL-syn-1 zum 2-Amino-1-phenylethanol (*R*)-2 mit einer maximalen Ausbeute von 50% umzusetzen, wobei D-syn-1 zurückbleibt.^[10] Bei Zugabe von DTA wird das nicht umgesetzte Diastereomer, D-syn-1, in einer parallelen kinetischen Racematspaltung zu Benzaldehyd und Glycin abgebaut, was die Rezyklierung von D-syn-1 ermöglicht.^[11,12]

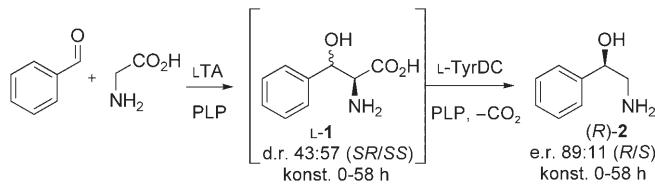
Außer mit dieser einfachen Racematspaltung von DL-syn-1 kann die thermodynamische Limitierung auch durch die Kombination einer LTA-katalysierten Aldolreaktion mit einer In-situ-Decarboxylierung mit L-TyrDC überwunden werden. Damit wird das Aldolgleichgewicht auf die Seite der L-Aldolprodukte verschoben, und es resultieren höhere Umsätze. L-TyrDC (aus *Enterococcus faecalis* V583)^[13] und LTA (aus *Pseudomonas putida*)^[14] wurden kloniert und in *Escherichia coli* überexprimiert. Als Modellreaktion untersuchten wir die neuartige bienzymatische Synthese von 2 aus Benzaldehyd und Glycin unter Anwendung der reversiblen LTA-katalysierten Aldolreaktion (Zwischenprodukte L-syn-1 und L-anti-1) und einer gekoppelten irreversiblen Decarboxylierung (Schema 2). Im Produkt dieser formalen Eintopf-



Schema 2. Synthese von 2-Amino-1-phenylethanol (**2**) unter Verwendung von L-Threonin-Aldolase und L-Tyrosin-Decarboxylase.

Aminomethylierung von Benzaldehyd bleibt das hydroxy-substituierte Chiralitätszentrum erhalten, während das zweite Chiralitätszentrum „verloren“ geht, da die α -Aminofunktion in eine terminale Gruppe überführt wird. Durch die hohe *syn/anti*-Selektivität der L-TyrDC (10:1, siehe Hintergrundinformationen) kann die niedrige C_β -Selektivität der Aldolase wettgemacht werden. Die hier beschriebene Umwandlung ist unseres Wissens die erste bienzymatische Racematspaltung von Diastereomeren. Ein ähnlicher Prozess mit einer organokatalytischen Methode wurde als dynamische kinetische asymmetrische Umwandlung (DYKAT) bezeichnet.^[15,16] Für dynamische Prozesse ist es von größter Bedeutung, dass die Gleichgewichtseinstellung (k_{a1} und k_{a2}) deutlich schneller abläuft als der irreversible Schritt (k_{b1} und k_{b2}). Nur so können hohe Selektivitäten erhalten und die theoretische Ausbeute eines Stereoisomers von 100% erreicht werden.^[17] In Gleichgewichtsstudien wurde nachgewiesen, dass die LTA-katalysierte *syn/anti*-Umwandlung von **1** schnell verläuft (siehe Hintergrundinformationen).

In einem ersten Versuch, die thermodynamische Limitierung mithilfe der DYKAT-Methode zu überwinden, untersuchten wir die Kompatibilität von LTA und L-TyrDC. Tatsächlich konnte die Gleichgewichtsreaktion von Benzaldehyd mit Glycin zu L-syn-1/L-anti-1 durch die irreversible Decarboxylierung zur Produktseite verschoben werden. Nach 58 Stunden hatte sich der Benzaldehyd vollständig in die Zwischenprodukte L-syn-1/L-anti-1 (8%) und das Endprodukt (*R*)-2 (91%) umgewandelt (Schema 3). Damit konnten

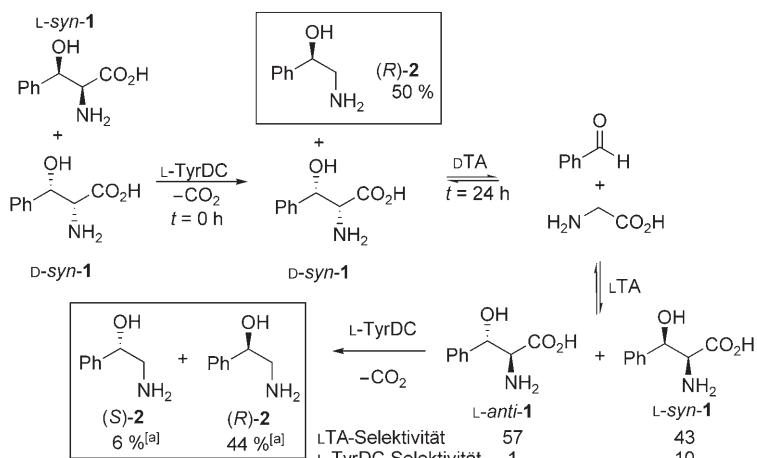


Schema 3. Umwandlung von Benzaldehyd zu den Zwischenprodukten L-syn-1/L-anti-1 und zum Endprodukt (*R*)-2. Reaktionsbedingungen: Benzaldehyd 100 mM, Glycin 1 M, LTA 38 U, L-TyrDC 0.4 U, PLP 50 μ M, pH 5.5, 25 °C; Ausbeute, Diastereomerenverhältnis (d.r.) und Enantiomerenverhältnis (e.r.) wurden mit HPLC bestimmt.

wir zeigen, dass die Kombination von LTA und L-TyrDC für die quantitative Umwandlung von Aldehyden in 1,2-Aminoalkohole anwendbar ist. Interessanterweise wird die niedrige C_β -Selektivität von LTA (*R/S* 60:40) im bienzymatischen Prozess etwas verändert (*R/S* 43:57). Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass L-syn-1 (2*S,3R*) schneller zu (*R*)-2 umgesetzt wird als L-anti-1 (2*S,3S*) zu (*S*)-2 und dadurch das *anti/syn*-Verhältnis der Zwischenprodukte L-syn-1/L-anti-1 leicht verschoben wird.

Mit der beschriebenen Vorgehensweise wurde die niedrige Selektivität an der β -Position durch die stereoselektive Decarboxylierung auf 89:11 (*R/S*) verbessert. Die Stereoisomerenverhältnisse von L-1 (d.r.) und 2 (e.r.) waren während der Reaktion konstant, was belegt, dass tatsächlich ein wirkungsvoller dynamischer Prozess stattfindet.

Eine Racematspaltung von DL-syn-1 durch die beschriebene Eintopf-Zweienzym-DYKAT ist wegen der hohen L-Selektivität von LTA und L-TyrDC nicht möglich. Nur L-syn-1 wird in einer kinetischen asymmetrischen Umwandlung (KAT) umgesetzt, und das D-Enantiomer bleibt zurück. Hierdurch wird der Aminoalkohol (*R*)-2 zwar mit exzellenten ee-Werten (> 99%) erhalten, die Ausbeute ist aber auf maximal 50% begrenzt. Um eine höhere Maximalausbeute bei gleichbleibend hohen ee-Werten zu erreichen, wurde ein neuartiges Eintopf-Dreienzym-Verfahren getestet (Schema 4). Eine anfängliche KAT (L-TyrDC) von L-syn-1 liefert enantiomerenreines (*R*)-2 (50%). Nach der Zugabe der Aldolasen LTA und DTA^[9] nach 24 Stunden überführt nun eine Dreienzym-DYKAT (L-TyrDC, LTA/DTA) das nicht umgesetzte D-syn-1 (50%) in Benzaldehyd und Glycin, danach in L-syn-1/L-anti-1 und schließlich in (*R*)-2/(*S*)-2. Theoretisch sollte durch diese Racematspaltung von DL-syn-1 mit verzögriger Zugabe von LTA und DTA unter Berücksichtigung der Resultate des Eintopf-Zweienzym-Protokolls (*R/S* 89:11) ein ee-Wert von 88% (*R*, Schema 3) des Aminoalkohols 2 erhalten werden. Das nachstehende Beispiel zeigt, dass bei



Schema 4. Theoretische Ausbeute der Synthese von **(R)-2** bei Anwendung der KAT/DYKAT-Methode [88 % ee: 94 % **(R)-2**, 6 % **(S)-2**]. [a] Angenommene C_β-Selektivität der gekoppelten LTA/L-TyrDC-Reaktion: 89:11 (*R/S*) (siehe Schema 3).

Zugabe aller drei Enzyme bei Reaktionsbeginn (pH 5.5) ein leicht höherer ee-Wert von **2** (82 % *R*) verglichen mit dem DYKAT-Verfahren erreicht wird, bei jedoch geringerer Ausbeute von 44% (Tabelle 1, Nr. 1). Die niedrige Ausbeute könnte durch inhibierende Effekte von MnCl₂ oder dTA auf L-TyrDC erklärt werden; Untersuchungen hierzu sind im Gange. Die verzögerte Zugabe von LTA/dTA (nach 24 h) lieferte enantiomerenreines **2** (Tabelle 1, Nr. 2 und 11, ee > 99% *R*) bei erhöhter Ausbeute (HPLC 67%; isoliertes Produkt 58%). Ähnliche Resultate wurden auch bei pH 6.0 und 6.5 erreicht (Tabelle 1, Nr. 3–6). Höhere pH-Werte (7.0 und 7.5, Nr. 7–10) führten zu beträchtlich geringeren Ausbeuten. Dies kann damit erklärt werden, dass die Aktivität von L-

TyrDC bei pH > 6.5 stark abnimmt (pH-Optimum 5.5). Der exzellente ee-Wert von **2** bei gleichzeitig hoher Ausbeute (pH 5.5–6.5) belegt, dass alle drei Enzyme effektiv zusammenwirken. Damit kann die kinetische Limitierung – die niedrige C_β-Selektivität in einer LTA-katalysierten Reaktion – überwunden und enantiomerenreines **(R)-2** mit Ausbeuten über 50% erhalten werden.

Mit den hier beschriebenen Methoden gelingt es, die thermodynamischen (DYKAT) und die kinetischen Limitierungen (KAT/DYKAT) der durch L-Threonin-Aldolase katalysierten Reaktionen zu überwinden. Die erste bienzymatische DYKAT beruht auf der Kombination einer Aldolase niedriger Diastereoselektivität mit einer hochspezifischen Decarboxylase. Damit konnten wir das „Aldol“-Gleichgewicht der Reaktion von Benzaldehyd mit Glycin zu quantitativen Umsätzen führen und gleichzeitig die niedrige C_β-Selektivität stark erhöhen. Mithilfe der KAT/DYKAT-Methode erhielten wir ausgehend von DL-syn-1 den enantiomerenreinen Aminoalkohol **(R)-2** in guter Ausbeute. In bereits angefangenen Tests untersuchen wir weitere Akzeptoraldehyde, um synthetisch wertvolle enantiomerenangereicherte 1,2-Aminoalkohole zu erhalten.

Eingegangen am 9. Oktober 2006
Online veröffentlicht am 24. Januar 2007

Stichwörter: Aldolreaktionen · Aminoalkohole · Biokatalyse · Lyasen · Threonin-Aldolase

Tabelle 1: Synthese von **(R)-2** im KAT/DYKAT-Verfahren.^[a]

Nr.	pH	Ausb. 2 [%]		Ausb. 2 [%] (80 h)	ee (<i>R</i>) [%] (80 h)
		(5 h)	(5 h)		
1 ^[b]	5.5	23		44	82
2 ^[c]	5.5	46	>99	67	>99
3 ^[b]	6.0	15		47	82
4 ^[c]	6.0	39	>99	57	>99
5 ^[b]	6.5	13		28	80
6 ^[c]	6.5	35	>99	58	>99
7 ^[b]	7.0	3	>99	11	82
8 ^[c]	7.0	25	>99	50	>99
9 ^[b]	7.5	<1	>99	4	>99
10 ^[c]	7.5	10	>99	24	>99
11 ^[c,d]	5.5	n.b. ^[f]	n.b. ^[f]	58 ^[e]	>99

[a] Reaktionsbedingungen: 1 mL Reaktionsvolumen, DL-syn-1 100 mM, Glycin 900 mM, PLP 50 μM, MnCl₂ 50 μM, 25 °C, LTA 19 U, dTA 6 U, L-TyrDC 0.4 U; Ausbeuten und ee-Werte wurden durch HPLC bestimmt.
[b] Zugabe von LTA/dTA bei Reaktionsbeginn. [c] Zugabe von LTA/dTA nach 24 h Reaktionszeit. [d] 5 mL Reaktionsvolumen. [e] Ausbeute des isolierten Produkts nach 100 h Reaktionszeit. [f] n.b.= nicht bestimmt.

- a) M. G. Silvestri, G. Desantis, M. Mitchell, C.-H. Wong, *Top. Stereochem.* **2003**, 23, 267–342; b) W.-D. Fessner in *Modern Aldol Reactions* (Hrsg.: R. Mahrwald), VCH, Weinheim, **2004**, S. 201–272.
- L. J. Whalen, C.-H. Wong, *Aldrichimica Acta* **2006**, 39, 63–71.
- M. Braun in *Modern Aldol Reactions* (Hrsg.: R. Mahrwald), VCH, Weinheim, **2004**, S. 1–62.
- Übersichtsartikel über Threonin-Aldolasen: J. Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Mol. Catal. B* **2000**, 10, 107–115.
- a) F. P. Seebeck, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10158–10159; b) F. P. Seebeck, A. Guainazzi, C. Amoreira, K. K. Baldridge, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6978–6980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6824–6826.
- a) B. T. Lotz, C. M. Gasparski, K. Peterson, M. J. Miller, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1107–1109; b) V. P. Vassilev, T. Uchiyama, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4081–4084; c) T. Kimura, V. P. Vassilev, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11734–11742.
- J. Steinreiber, K. Fesko, C. Reisinger, M. Schürmann, F. van Assema, M. Wolberg, D. Mink, H. Griengl, *Tetrahedron* **2007**, 63, 918–926.
- M. Bechthold, S. Makart, M. Heinemann, S. Panke, *J. Biotechnol.* **2006**, 124, 146–162.
- J. Q. Liu, M. Odani, T. Yasuoka, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 54, 44–51.
- T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), WO 9523869, **1995**; T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), US 5731175,

- 1998; T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), US 5846792, **1998**; T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), US 5874613, **1999**.
- [11] S. Ito, T. Nikaido, A. Matsuyama (Daicel Chemical Industries), JP 46076, **2001**.
- [12] Übersichtsartikel über parallele kinetische Racematspaltungen:
a) J. R. Dehli, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 365–370;
b) E. Vedejs, M. Jure, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4040–4069; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3974–4001.
- [13] a) T. Boerresen, N. K. Klausen, L. M. Larsen, H. Soerensen, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *993*, 108–115; b) N. Connil, Y. Le Breton, X. Dousset, Y. Auffray, A. Rince, H. Prevost, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3537–3544.
- [14] J. Q. Liu, S. Ito, T. Dairi, N. Itoh, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 702–708.
- [15] DYKAT: a) asymmetrische allylische Alkylierung: B. M. Trost, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1–14; b) chemoenzymatische Racematspaltung von 1,3-Diolen: M. Edin, J. Steinreiber, J.-E. Bäckvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5761–5766.
- [16] Organokatalytische DYKAT: E. Reyes, A. Cordova, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6605–6609.
- [17] a) O. Pamies, J.-E. Baeckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247–3261;
b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8291–8327.