

# Enantiokomplementäre Enzyme: Klassifizierung, molekulare Grundlage der Enantiopräferenz und Prognosen für spiegelbildliche Biotransformationen

Paul F. Mugford, Ulrike G. Wagner, Yun Jiang, Kurt Faber\* und Romas J. Kazlauskas\*

Asymmetrische Synthesen · Biotransformationen ·  
Enantioselektivität · Protein-Engineering ·  
Proteinstrukturen

**E**ine häufig zitierte Schwäche der Biokatalyse ist das Fehlen spiegelbildlicher Enzyme, um in asymmetrischen Synthesen jedes der beiden Enantiomere herstellen zu können. Als Lösung für dieses Problem hat die Natur enantiokomplementäre Enzyme entwickelt – also Enzympaare, die dieselben Reaktionen katalysieren, aber entgegengesetzte Enantiomere bevorzugen. Diese Proteine sind nicht spiegelbildlich, aber sie enthalten funktionell spiegelbildliche aktive Zentren. Um spiegelbildliche aktive Zentren zu erhalten, kann die Natur die Position der Bindungsstellen und/oder der wichtigsten katalytischen Gruppen verändern. Dieser Kurzaufsatz stellt Röntgenkristallstrukturen von enantiokomplementären Enzymen vor und klassifiziert diese nach der Anordnung der spiegelbildlichen aktiven Zentren in vier Gruppen.

## 1. Einführung

Reine Enantiomere werden entweder über eine Racematspaltung oder eine asymmetrische Synthese hergestellt. Bei der Racematspaltung erhält man beide Enantiomere, allerdings mit einer theoretischen Ausbeute von nur 50 %,

asymmetrische Synthesen ergeben nur ein Enantiomer mit einer theoretischen Ausbeute von 100 %. Diese höhere theoretische Ausbeute kann die Kosten senken und die Umweltbelastung reduzieren.

Eine Schwäche der asymmetrischen Synthese ist die Wahrscheinlichkeit von 50 %, dass das resultierende Enantiomer das falsche ist. Sind chemische Reagentien oder Katalysatoren beteiligt, ist die Lösung einfach: Man setzt das Reagens oder den Katalysator in der richtigen enantiomeren Form ein, um das gewünschte Enantiomer herzustellen. In der Biokatalyse ist diese Vorgehensweise nicht möglich – enantiomere Biokatalysatoren kommen in der Natur nicht vor. Diese Einschränkung wird oft als ein schwerwiegender Nachteil der Biokatalyse angeführt.

Zwar kommen enantiomere Biokatalysatoren in der Natur nicht vor, dieser Kurzaufsatz zeigt aber, dass enantiokomplementäre Biokatalysatoren überraschend häufig sind. Enantiokomplementäre Biokatalysatoren haben funktionell spiegelbildliche aktive Zentren und katalysieren die gleichen Reaktionen, es werden aber entgegengesetzte Enantiomere gebildet. Solche enantiokomplementären Biokatalysatoren heben die Einschränkung auf, die durch das Fehlen von spiegelbildlichen Biokatalysatoren entsteht.

Ein weiterer Grund zur Untersuchung von enantiokomplementären Enzymen ist die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Katalyse. Enantiokomplementäre Enzyme katalysieren die gleichen Reaktionen, haben aber möglicherweise unterschiedliche Proteinstrukturen und/oder ver-

[\*] Dr. U. G. Wagner, Prof. Dr. K. Faber  
Institut für Chemie, Universität Graz  
Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)  
Fax: (+43) 316-380-9840  
E-Mail: kurt.faber@uni-graz.at

Dr. P. F. Mugford, Y. Jiang, Prof. R. J. Kazlauskas  
Department of Biochemistry  
Molecular Biology & Biophysics and the Biotechnology Institute  
University of Minnesota  
1479 Gortner Avenue, Saint Paul, MN 55108 (USA)  
Fax: (+1) 612-625-5780  
E-Mail: rjk@umn.edu



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (fünf weitere Bilder, in denen die aktiven Zentren von enantiokomplementären Enzymen verglichen werden, sowie dreidimensionale Pymol-Modelle von allen Bildern) sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

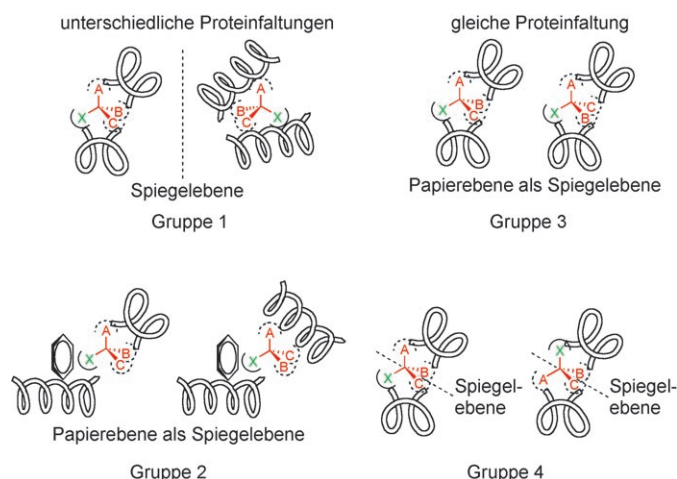
schiedene funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum. Das Erkennen von Gemeinsamkeiten in beiden Enzymen gibt Einblicke in die essenziellen Elemente der Katalyse.

In diesem Kurzaufsatz untersuchen und klassifizieren wir 14 natürliche Paare enantiokomplementärer Enzyme (Tabelle 1). Der Schwerpunkt liegt auf Enzymen, die in der Synthese verwendet werden und bei denen die Röntgenkristallstrukturen von zumindest einem Partner bekannt sind. Weiterhin beschäftigen wir uns mit Wegen zur Entdeckung oder zum Entwurf neuer Paare von enantiokomplementären Enzymen. Auf der Grundlage eines Einteilungsschemas empfehlen wir eine paarweise Mutagenese im aktiven Zentrum als vielversprechenden Weg zu neuen enantiokomplementären Enzymen.

## 2. Einteilungsvorschlag

Abbildung 1 schlägt eine Einteilung von einigen Paaren enantiokomplementärer Enzyme vor. In bisherigen Arbeiten wurden enantiokomplementäre Enzyme für den jeweiligen Fall verglichen; dies ist der erste Versuch, die Strategie der Natur zu systematisieren. In allen Fällen sind die aktiven Zentren von enantiokomplementären Enzympaaren funktionelle Spiegelbilder, da die Substrate spiegelbildlich sind. Verwendet man jedoch die Proteinstruktur oder einen Cofaktor als Referenz, kann man die Ähnlichkeit dieser spiegelbildlichen aktiven Zentren erkennen; man sieht, durch den Tausch welcher Positionen im aktiven Zentrum ein enantiokomplementäres aktives Zentrum gebildet wird. Durch die Definition, welche Positionen getauscht werden, wird die molekulare Grundlage der entgegengesetzten Enantiopräferenz klassifiziert. Die Hintergrundinformationen enthalten ein Flussdiagramm zur Klassifizierung von enantiokomplementären Enzymen.

Bei den Beispielen der Gruppe 1 finden sich verschiedene Proteinfaltungen<sup>[1]</sup> um spiegelbildliche aktive Zentren nachzubauen. Da die Faltungen der Proteine unterschiedlich sind, gibt es keinen Bezugspunkt für einen Vergleich und man kann nicht sagen „was passiert ist“. Diese Beispiele umfassen wirkliche Spiegelbilder, hergestellt durch chemische Synthese von Enzymen aus D-Aminosäuren (z.B. HIV-Protease und *ent*-HIV-Protease) oder natürliche funktionell spiegelbildliche aktive Zentren, bei denen die Aminosäuren unter-



**Abbildung 1.** Einteilung von enantiokomplementären Enzympaaren entsprechend der Gestalt ihrer aktiven Zentren. X steht für einen Substituenten, der direkt an Bindungsbildung und -bruch beteiligt ist, während A, B und C für nichtreagierende Substituenten stehen. Der Benzolring im Schema der Gruppe 2 steht für einen Cofaktor wie Flavin, Pyridoxin oder Nicotinamid.

schiedlich sein können, deren chemische Rollen aber ähnlich bleiben (*R*- und *S*-selektive Hydroxynitrilysasen). Enthalten die Enzyme Cofaktoren, dann befinden sich die aktiven Zentren in den Enzympaaren an den gegenüberliegenden Seiten des Cofaktors, sodass die aktiven Zentren mit dem Cofaktor Spiegelbilder darstellen.

Gruppe 2 enthält ebenfalls Fälle, bei denen sich die Proteinfaltungen unterscheiden, allerdings wird ein Cofaktor als Bezugspunkt verwendet (z.B.  $\alpha$ -Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase, mit Nicotinamid als Bezugspunkt). Die aktiven Zentren sind auf der gleichen Seite des Cofaktors, weshalb die aktiven Zentren mit dem Cofaktor zwar keine Spiegelbilder sind, die aktiven Zentren ohne Cofaktor jedoch sehr wohl. Da die reagierenden Substituenten sich in beiden Enzymen gegenüber dem Cofaktor befinden müssen, muss das aktive Zentrum zwei nicht reagierende Substituenten austauschen um ein Spiegelbild zu erzeugen. Oft sind die Domänen, die die Cofaktoren positionieren, sehr ähnlich, auch wenn es die Domänen der aktiven Zentren nicht sind. In



Kurt Faber wurde 1953 in Klagenfurt geboren. Er studierte Chemie an der Karl-Franzens-Universität Graz, wo er 1982 promovierte. Nach einem Postdoktorandenjahr an der Memorial University of Newfoundland (Kanada) kehrte er nach Graz zurück. Dort arbeitete er an der Technischen Universität, die ihn 1997 zum außerordentlichen Professor ernannte. Seit 1998 leitet er als ordentlicher Professor an der Universität Graz eine Forschungsgruppe, die sich mit Biokatalysatoren für die Transformation von nichtnatürlichen Verbindungen beschäftigt. Er war Gastwissenschaftler an Universitäten in Tokio, Exeter, Trondheim, Stockholm und Minnesota.



Foto: Tim Rummelhoff

Romas Kazlauskas, geboren 1956, promovierte in Chemie am Massachusetts Institute of Technology und war als Postdoktorand in der Gruppe von George Whitesides an der Harvard University. Er arbeitete für General Electric (1985–1988) sowie an der McGill University Montreal in Kanada (1988–2003) und hat gegenwärtig die Professur für Biochemie, Molekularbiologie und Biophysik an der University of Minnesota, Twin Cities, inne. Er wirkte als Gastwissenschaftler an der Universität Stuttgart und am Royal Institute of Technology in Stockholm. Sein Forschungsschwerpunkt liegt in enantioselektiven organischen Synthesen unter Verwendung von Enzymen.

**Tabelle 1:** Einige natürliche enantiokomplementäre Enzympaare, die strukturell charakterisiert wurden.

Enzyme	Katalysierte Reaktion(en)	Gleiche Proteinfaltung <sup>[a]</sup>	Gruppe
R- und S-selektive Hydroxynitrilysen; pdb 1ju2 und 1yb6	Addition von Blausäure an Aldehyde und Ketone (Mandelonitril, $E \approx 200$ (R); 2-Cyclohexyl-2-hydroxyethannitril, $E \approx 200$ (S))	Nein; Oxidoreduktase-Faltung mit Flavin und $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung	1
Methioninsulfoxidreduktasen A und B; pdb 1fv2 und 1l1d	Reduzierung von Protein Methioninsulfoxid zu Methioninen, MsrA $E \approx 10$ (S), MsrB bevorzugt (R), keine quantitativen Daten.	Nein; $\beta$ -Faltblatt flankiert von drei $\alpha$ -Helices und antiparallele $\beta$ -Ketten, angeordnet in zwei Faltblättern, die gemeinsam ein „Fass“-förmiges Zentrum bilden	1
Lipase und Subtilisin; pdb 1lpm und 1cse	Hydrolyse von Estern sekundärer Alkohole; Acylierung von sekundären Alkoholen in nichtwässrigen Medien (z. B. Hydrolyse von Menthylacetat mit CRL, $E > 100$ (1R); Acylierung von 1-Phenylethanol mit Subtilisin Carlsberg in Dioxan, $E = 25$ (S))	Nein; $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung und Subtilisin-Faltung	1
D-Aminosäureoxidase und Flavocytochrom b2; pdb 1c0p und 1fcb	Flavinabhängige Oxidation von $\alpha$ -Aminosäuren zu Iminen und Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat, $E$ hoch.	Nein; $p$ -Hydroxybenzoathydroxylase- und $(\alpha/\beta)_8$ -„Fass“-Topologie für FCB	1
L-Aspartataminotransferase und D-Aminosäuretransferase; pdb 1ajs und 3daa	Pyridoxal-abhängiger Transfer von Ammoniak zwischen Aminosäuren und den entsprechenden 2-Ketosäuren; L-AAAT: L-Aspartat, $E \approx 10^6$ ; D-AAAT: $E$ hoch.	Nein; Aminotransferase-Faltung I und IV	1
Hydratase 1 (Crotonase) und Hydratase 2; pdb 1mj3 und 1pn4	Addition von Wasser an <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA; Crotonyl-CoA, $E > 20$ (L); <i>trans</i> -2-Decanoyl-CoA: $E$ hoch (D)	Nein; Crotonase-Faltung für Hydratase 1 und „Hot-dog“-Faltung für Hydratase 2	1
(R)- und (S)- $\alpha$ -Hydroxysäurereduktase; pdb 1dx1 und 1hyh	Nicotinamid-abhängige Reduktion von 2-Ketoisocaproinsäure zu 2-Hydroxyisocaproinsäure, $E > 200$ (R), $E$ hoch (S).	Nein; Ähnlichkeit nur in der Nicotinamid-Bindungsdomäne (7% Sequenzidentität, Z-Wert 6.1 für 120 von 330 Aminosäuren)	2
L- und D-Lactatdehydrogenasen; pdb 1ez4 und 2dl1	Nicotinamid-abhängige Reduktion von Pyruvat zu Lactat, $E = 46$ (D); $E$ hoch (L).	Nein; Ähnlichkeit nur in der Nicotinamid-Bindungsdomäne (13% Sequenzidentität, Z-Wert 6.0 für 119 von 333 Aminosäuren)	2
D-Lactatdehydrogenase und Flavocytochrom b2; pdb 1f0x und 1fcb	Flavinabhängige Oxidation von Lactat zu Pyruvat, $E$ hoch.	Nein; Faltblatt mit sieben Ketten umgeben von sieben $\alpha$ -Helices und $(\alpha/\beta)_8$ -„Fass“-Topologie für FCB	2
D- und L-Aminosäure-oxidasen; pdb 1c0p und 2i1d	Flavinabhängige Oxidation von Aminosäuren zu Iminen, $E$ hoch.	Nein; D-Aminosäureoxidase-Domäne und Aminoxidase-Domäne; Ähnlichkeit nur in der Flavin-Bindungstasche	2
Naphthalindioxygenase und Toluoldioxygenase; pdb 1o7p	Nicht-Häm-Eisen-katalysierte Dihydroxylierung von 1,2-Dihydronaphthalin; Sulfoxidation von Alkylarylsulfiden; benzyliche Hydroxylierung von Indan-2-ol, $E > 50$ (1R,2S) für NDO und $E > 50$ (1S,2R) für TDO.	Ziemlich sicher; 35% Sequenzidentität, aber keine gelöste Struktur für TDO	3
Aminotransferasen für verzweigt-kettige L- und D-Aminosäuren; pdb 1kt8 und 3dda	Pyridoxal-abhängiger Transfer von Ammoniak zwischen Aminosäuren und den entsprechenden 2-Ketosäuren, $E > 100$ für Isoleucin.	Ja; jeweils Faltung IV (19% Sequenzidentität, Z-Wert 27 für 269 von 365 Aminosäuren, 2.1 Å mittlere Abweichung der $C_\alpha$ -Positionen)	3
D- und L-Hydantoinasen; pdb 1k1d und 1gkr	Hydrolyse von 5-monosubstituierten Hydantoinen zu N-Carbamyl- $\alpha$ -aminosäuren, $E > 50$ (D) für Phenylalaninvorstufen.	Ja; beide haben ein „TIM-Fass“ und Urease-Untereinheit-C-Domäne (34% Sequenzidentität, Z-Wert 52 für 435 von 460 Aminosäuren, 2.1 Å mittlere Abweichung der $C_\alpha$ -Positionen)	3
Vanillylalkoholoxidase und $p$ -Kresolmethylhydroxylase; pdb 2vao und 1diq	Flavinabhängige benzyliche Hydroxylierung von 4-Ethylphenol, $E = 32$ (R) und $E \approx 2$ (S).	Ja; 33% Sequenzidentität, Z-Wert 48 für 513 von 555 Aminosäuren, 1.5 Å mittlere Abweichung der $C_\alpha$ -Positionen	4

[a] Die Strukturen wurden mit DALI Lite verglichen: <http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/>.

diesen Fällen wurde einer existierenden Cofaktorbindungsdomäne ein neues aktives Zentrum hinzugefügt.

Die letzten beiden Gruppen umfassen Enzyme mit gleicher Proteinstruktur. Diese dienen als Bezugspunkt und zeigen, wie sich die Proteine auseinanderentwickelten, um enantiokomplementäre aktive Zentren zu bilden. In Gruppe 3 wechseln die Bindungsstellen von Substituenten, die nicht direkt an der Katalyse beteiligt sind, wie oben die Plätze (z. B. Aminosäureoxidase). In Gruppe 4 wechselt eine katalytische Gruppe den Platz (z. B. ein Carboxylat in Vanillylalkohol-Oxidase/*p*-Kresylmethyl-Hydroxylase).

### 3. Beispiele

#### 3.1. Gruppe 1: Unterschiedliche Faltung der Proteine erzeugt spiegelbildliche aktive Zentren

Das naheliegende enantiokomplementäre Enzym ist ein echtes Enantiomer eines Enzyms. Die ribosomale Biosynthese kann keine echten spiegelbildlichen Enzyme aus D-Aminosäuren erzeugen, wohl aber die chemische Synthese. In den 90er Jahren wurden die D-Formen von HIV-Protease (99 Aminosäuren)<sup>[2]</sup> und Oxalocrotonat-Tautomerase (62 Aminosäuren) synthetisiert.<sup>[3]</sup> Die enantiomeren HIV-Proteasen katalysierten die Hydrolyse enantiomerer Peptide, während die enantiomeren Oxalocrotonat-Tautomerasen die allylische 1,2-Protonenumlagerung in D<sub>2</sub>O mit umgekehrter Enantiopräferenz katalysierten. Auf ähnliche Weise synthetisierten Seelig et al.<sup>[4]</sup> die nichtnatürliche L-Form eines 49mer-Ribozyms, das eine Diels-Alder-Cycloaddition mit einer, verglichen mit der natürlichen D-Form, umgekehrten Enantiopräferenz katalysierte. Die Faltung dieser Enzyme ist enantiomer (z. B. links- und rechtsgängige Helices), sodass die Proteinstrukturen unterschiedlich sind. Die chemische Synthese von enantiomeren Enzymen ist derzeit zu kostspielig und zu langsam, doch in Zukunft könnte die Herstellung eines enantiokomplementären Ribosoms den Weg für die Synthese von Enzymen aus D-Aminosäuren ebnen.

Die natürlichen Proteine der Gruppe 1 sind keine echten spiegelbildlichen Proteine, sondern unterschiedliche Proteinstrukturen, die konvergierten, um ein funktionell spiegelbildliches aktives Zentrum zu bilden (Tabelle 1). Beispielsweise katalysieren enantiokomplementäre Hydroxynitrilysasen die Addition von Blausäure an Aldehyde und Ketone unter Bildung enantiomerer Cyanhydrine.<sup>[5]</sup> Die *R*-selektiven Hydroxynitrilysasen stammen aus der Familie der *Rosaceae* (Mandel, Kirsche, Pflaume usw.), sind mit den Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen (GMC) entfernt verwandt und enthalten den Redoxcofaktor Flavinadeninindinucleotid (FAD). Das Flavin spielt nur für die Struktur eine Rolle und scheint ein evolutionärer Überrest zu sein. Die *S*-selektiven Hydroxynitrilysasen stammen aus *Hevea brasiliensis* (Gummibaum), *Manihot esculenta* (Maniok), *Sorghum bicolor* (Hirse) und *Linum usitatissimum* (Flachs). Sie enthalten kein FAD und gehören strukturell zur Klasse der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen. Die Röntgenstrukturen der *Hevea*-<sup>[6]</sup> und *Prunus*-Hydroxynitrilysasen<sup>[7,8]</sup> zeigen, dass beide die Cyanhydrin-Bildung durch allgemeine Säure-Base-Katalyse beschleunigen und

beide die Carbonylverbindung ähnlich positionieren, wobei das Cyanid jedoch an gegenüberliegenden Seiten der Carbonylgruppe angreift und daher enantiomere Cyanhydrine hervorbringt (Abbildung 2).

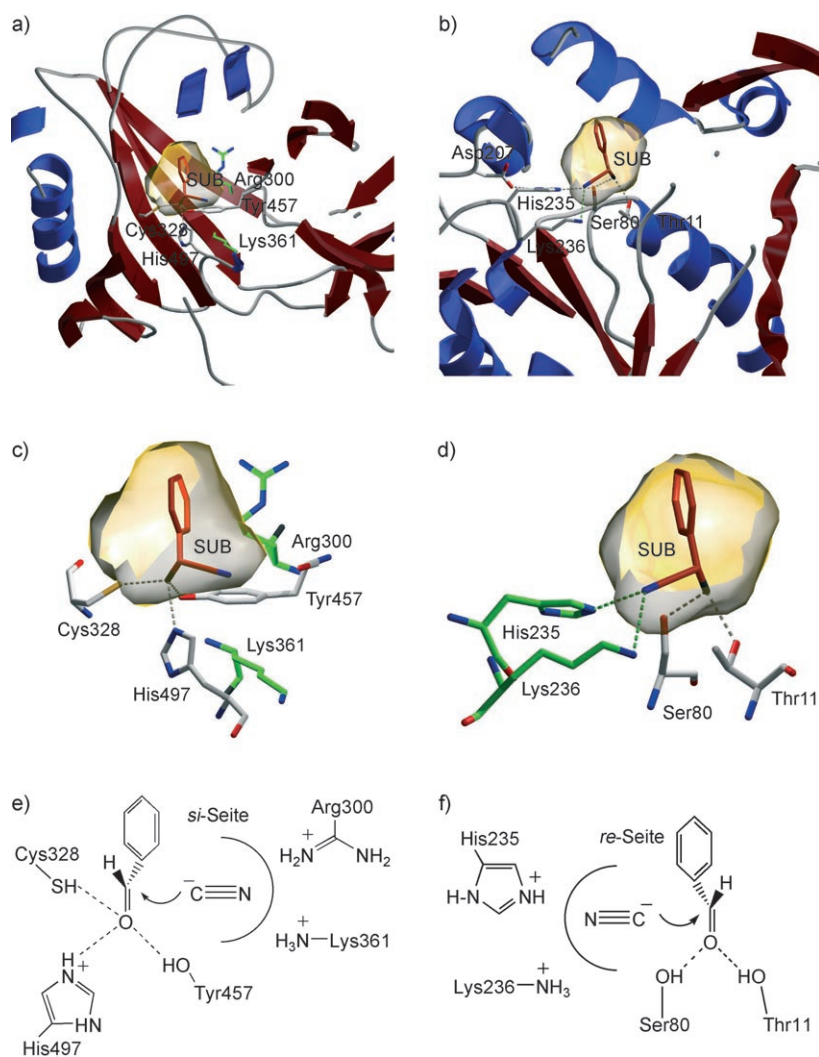
Methioninsulfoxid-Reduktasen (MsrA und MsrB) reduzieren durch Luftoxidation gebildete Methioninsulfoxide in Proteinen, um deren ursprüngliche katalytische Aktivität und Konformation wiederherzustellen. Die MsrAs reduzieren die Methioninsulfoxide mit *S*-Konfiguration am Schwefel [(*S*)-MetO], während die MsrBs die Methioninsulfoxide mit *R*-Konfiguration am Schwefel [(*R*)-MetO]<sup>[9]</sup> reduzieren. Die beiden Msrs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Proteinfaltung, haben aber spiegelbildliche aktive Zentren<sup>[10]</sup> (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). In beiden aktiven Zentren befinden sich ein Tryptophanrest, der den Methylsubstituenten am Sulfoxid bindet, Wasserstoffbrückendonoren, die das Sulfoxid-Sauerstoffatom binden, und ein katalytischer Cysteinrest, der das Sulfoxid-Schwefelatom angreift. In den meisten Fällen sind MsrAs und MsrBs unterschiedliche Enzyme, aber in *Neisseria gonorrhoeae* enthält ein Protein beide aktiven Zentren in verschiedenen Domänen.

Lipasen und Subtilisine sind Beispiele für enantiokomplementäre Enzyme, die nichtnatürliche Substrate umsetzen. Beide sind Serinhydrolasen, enthalten eine katalytische Ser-His-Asp-Triade und eine Bindungsstelle für Oxyanionen, und beide reagieren nach einem ähnlichen Mechanismus über einen Acyl-Enzym-Komplex als Zwischenstufe. Beide Enzyme katalysieren die Hydrolyse nichtnatürlicher Substrate, z. B. Ester von sekundären Alkoholen, haben aber gegenläufige Enantiopräferenzen.<sup>[11]</sup> Dieses enantiokomplementäre Verhalten der Lipasen und Subtilisine wurde genutzt, um entgegengesetzte Enantiomere von sekundären Alkoholen zu synthetisieren.<sup>[12]</sup> In den jüngsten Beispielen wurden dynamische kinetische Racematspaltungen verwendet. Bei diesen Verfahren, die der asymmetrischen Synthesen äquivalent sind, wird ein Enantiomer mit hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit erhalten.<sup>[13]</sup>

Lipasen und Subtilisine haben eine unterschiedliche Struktur, die dreidimensionale Anordnung ihrer katalytischen Triaden ist aber spiegelbildlich.<sup>[14]</sup> Beide haben nur begrenzten Platz für einen der Substituenten des sekundären Alkohols, aber die spiegelbildliche Orientierung der katalytischen Zentren bevorzugt entgegengesetzte Enantiomere. (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen zeigt katalytisch produktive Orientierungen für das *S*-Enantiomer eines Esters eines spirocyclischen sekundären Alkohols im aktiven Zentrum von Subtilisin Carlsberg<sup>[15]</sup> und einen (1*R*)-Menthylester im aktiven Zentrum der *Candida-rugosa*-Lipase.<sup>[16]</sup>)

Zwei Beispiele für enantiokomplementäre Enzympaare in Gruppe 1, die einen Cofaktor enthalten, sind die Aminosäure-Aminotransferasen (AAATs), die Pyridoxal als Cofaktor enthalten, und D-Aminosäure-Oxidase/Flavocytochrom b2 mit Flavin als Cofaktor. L-Aspartat-Aminotransferase<sup>[17]</sup> und *Bacillus*-D-Aminosäure-Aminotransferase<sup>[18]</sup> haben unterschiedliche Proteinfaltungen und spiegelbildliche aktive Zentren (siehe Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Das Substrat und der katalytische Lysinrest befinden sich in den beiden Aminotransferasen auf gegen-





**Abbildung 2.** a,b) Umgebung des aktiven Zentrums mit gebundenem Mandelonitril (orange) von R-Hydroxynitrilase aus der Mandel (PDB-Name 1ju2) und S-Hydroxynitrilase aus dem Gummibaum (PDB-Name 1yb6). c,d) Vergrößerte Ansicht der Substratbindung der R- und S-Hydroxynitrilase. Unterschiedliche Arten von Wasserstoffbrücken positionieren die Hydroxygruppe des Mandelonitrils (oder das Carbonyl-Sauerstoffatom des Benzaldehyds für die entgegengesetzte Reaktion) [Cys328, His497 und Tyr457 in R-HNL/Ser80 und Thr11 in S-HNL]. Eine hydrophobe Bindungsstelle (hinten, gelb) positioniert die Phenylgruppe des Substrats (SUB). Während S-HNL eine ausgeprägte positiv geladene Bindungstasche, gebildet von Lys236 und His235, hat, wird das negativ geladene Cyanid in R-HNL durch das elektrostatische Potential von (positiv geladenen) Arg300 und Lys361, die sich außerhalb der Wasserstoffbrückenabstände befinden, stabilisiert. e,f) Das Schema der Koordinationssphäre der R-HNL und S-HNL zeigt, dass der nucleophile Angriff des Cyanids von gegenüberliegenden Seiten erfolgt, während das prochirale Substrat in beiden Enzymen gleich positioniert ist.

überliegenden Seiten des Pyridoxal-Cofaktors, sodass das aktive Zentrum und der Cofaktor zusammen Spiegelbilder sind. (Ein anderes Paar von enantiokomplementären AAATs gehört zur Gruppe 2, Abschnitt 3.2.) D-Aminosäure-Oxidase (D-AAO)<sup>[19]</sup> und Flavocytochrom b2 (FCB)<sup>[20,21]</sup> katalysieren mechanistisch ähnliche Reaktionen: die Oxidationen von Alanin (D-AAO) und Lactat (FCB), bei denen eine  $\text{NH}_2\text{-CH}$ - und eine  $\text{OH-CH}$ -Gruppe oxidiert werden. Die Röntgenstrukturanalysen zeigen funktionell spiegelbildliche aktive

Zentren für Alanin in D-AAO und für Pyruvat in FCB (siehe Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen).

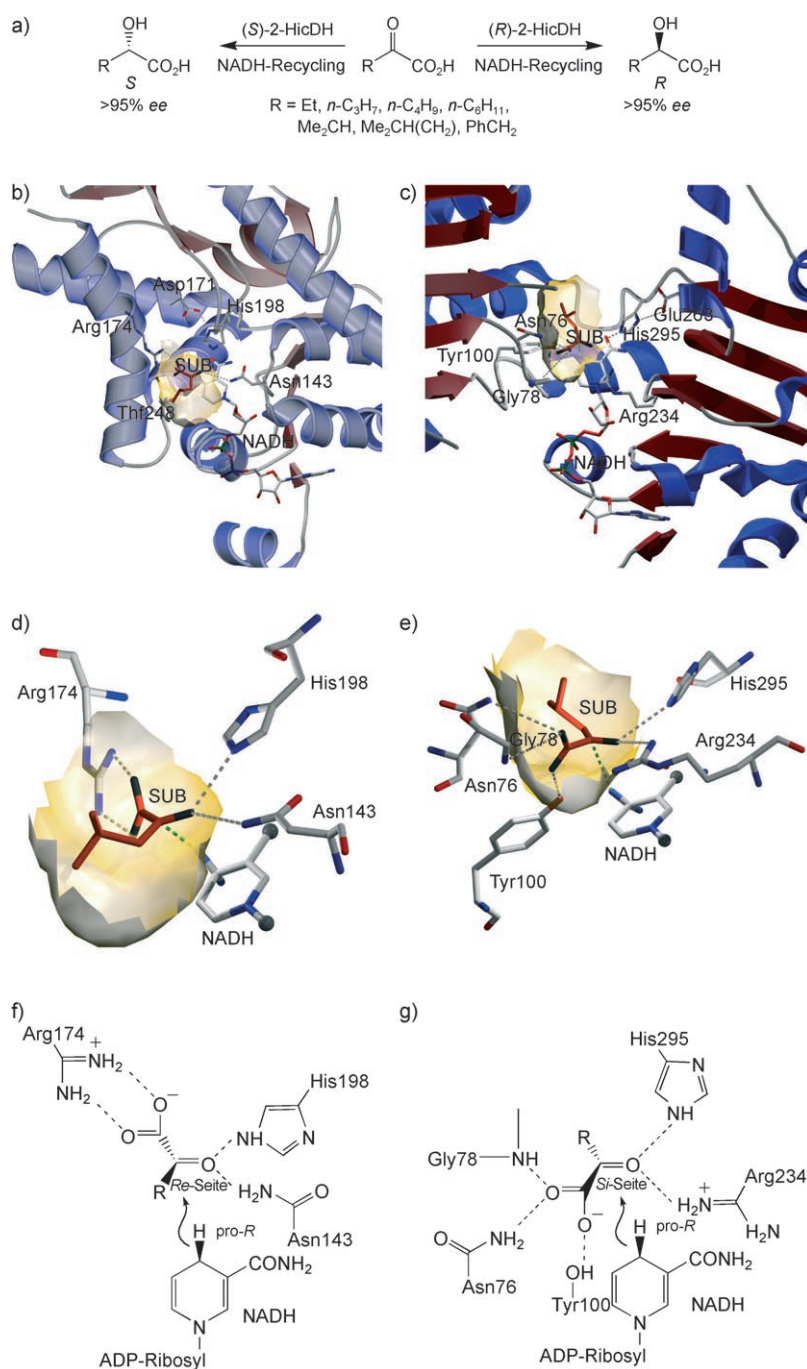
Die Hydratasen 1 und 2 katalysieren die Michael-Addition von Wasser an gegenüberliegenden Seiten von *trans*-2-Enoyl-Coenzym A.<sup>[22]</sup> Die Proteinstrukturen sind nicht verwandt, und die aktiven Zentren sind funktionelle Spiegelbilder. (In Lit. [23] findet man ein gutes Bild, das die beiden vergleicht.)

### 3.2. Gruppe 2: unterschiedliche Proteinfaltungen mit ausgetauschten Positionen der Bindungsstellen

Gruppe 2 umfasst ebenfalls unterschiedliche Proteinfaltungen, das aktive Zentrum in den enantiokomplementären Enzymen ist jedoch auf der gleichen (*re*- oder *si*-)Seite des Cofaktors. Die katalytischen Gruppen des Proteins sind annähernd spiegelbildlich, aber das komplette aktive Zentrum ist nicht annähernd spiegelbildlich, da der Cofaktor nicht auf die andere Seite gewechselt ist. Die Spiegelebene, die die beiden aktiven Zentren ineinander überführt (die Papierebene in Abbildung 1), gilt nicht für den Cofaktor.

S- und R- $\alpha$ -Hydroxycarbonsäure-Dehydrogenasen (wie 2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenasen, HicDHs) katalysieren die enantiokomplementäre Reduktion einer großen Gruppe von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren,<sup>[24]</sup> haben aber unterschiedliche Proteinfaltungen. (R)-HicDH gehört zur Familie der tetrameren L-Lactatdehydrogenasen,<sup>[25]</sup> während (S)-HicDH zu den D-spezifischen  $\text{NAD}^+$ -abhängigen 2-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenasen zählt.<sup>[26]</sup> Die beiden HicDHs binden den Nicotinamid-Cofaktor ähnlich und positionieren den  $\alpha$ -Carbonylrest des Substrats über Wasserstoffbrücken (zu Asn143 bei (S)-HicDH, zu Arg234 bei (R)-HicDH; Abbildung 3). Die hydrophobe Seitenkette des Substrats passt in die große hydrophobe Tasche, die Carboxylatgruppe des Substrats wird entweder durch eine ionische Wechselwirkungen (zu Arg174 in (S)-HicDH) oder durch ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk (über Gly78, Asp76 und Tyr100 bei (R)-HicDH) gebunden. Durch den Positionswechsel der Carboxylatbindungsgruppen und der hydrophoben Tasche wird das Substrat so gedreht, dass die entgegengesetzte Seite der Carbonylgruppe zum Nicotinamid zeigt. In beiden Fällen gibt das Dihydronicotinamid das pro-R-Wasserstoffatom an die Carbonylgruppe ab. Ein ähnlicher Wechsel von Carboxylat- und Substituentenbindungsstellen bedingt die Enantiokomplementarität der zur NAD-Familie gehörenden Lactatdehydrogenasen,<sup>[27]</sup> welche die gleiche Reaktion katalysieren, aber kleinere Substituenten wie  $\text{R} = \text{Methyl}$  bevorzugen.

In der Gruppe 1 haben wir Hefe-D-AAO und Flavocytochrom b2 als Beispiel für ein Paar mit spiegelbildlichen aktiven Zentren bei unterschiedlichen Proteinfaltungen genannt. Hefe-D-AAO und Schlangengift-L-AAO bilden ebenfalls ein



**Abbildung 3.** a) Enantiokomplementäre Reduktion von  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren unter Verwendung von (R)- und (S)-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenasen. Die Umgebung des aktiven Zentrums der (S)-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (Modell b, PDB-Name 1hyh enthält das berechnete Substrat) und (R)-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (Modell c, PDB-Name 1dxy), das die entgegengesetzte Ausrichtung des Substrats 2-Oxoisocaproat (SUB, orange) zeigt. d,e) Schwerpunkt auf den aktiven Zentren. Die  $\alpha$ -Carbonylgruppe wird durch Wasserstoffbrücken (Asn143 und His198/Arg234 und His295, in dieser Reihenfolge) in deckungsgleicher Orientierung positioniert. Die große Seitenkette ist in einer lipophilen Tasche (gelb) mit entgegengesetzten Orientierungen (vorne und hinten) untergebracht, während das Carboxylatende mit entgegengesetzten Ausrichtungen durch eine Salzbrücke oder ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk (Arg174 bzw. Gly78, Asn76 und Tyr100) fixiert ist. Der Angriff des pro-R-Hydrids von NADH auf C <sub>$\alpha$</sub>  geschieht in beiden Enzymen von der Unterseite her (grün gekennzeichnet). Die Substituenten von NADH sind vereinfachend durch Kugeln wiedergegeben. f,g) Schema des Koordinationsbereichs einer  $\alpha$ -Ketocarbonsäure, gebunden an (S)- und (R)-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase.

enantiokomplementäres Paar, das als Beispiel für Gruppe 2 dient. D-AAO und L-AAO haben unterschiedliche Aminosäuresequenzen und Domänenfaltungen. In den Röntgenkristallstrukturanalysen dieser beiden AAOs<sup>[28]</sup> befinden sich die gebundenen Substrate jeweils auf der gleichen Seite des Flavins. Um einen direkten Hydridtransfer zu ermöglichen, befindet sich das  $\alpha$ -C-Atom des Aminosäuresubstrats über der *re*-Seite von N5 (siehe Abbildung S5a in den Hintergrundinformationen). Um der enantiomeren Konfiguration des Substrats Rechnung zu tragen, haben die Substratbindungsgruppen – Arginin und die hydrophobe Region – ihre Plätze getauscht.

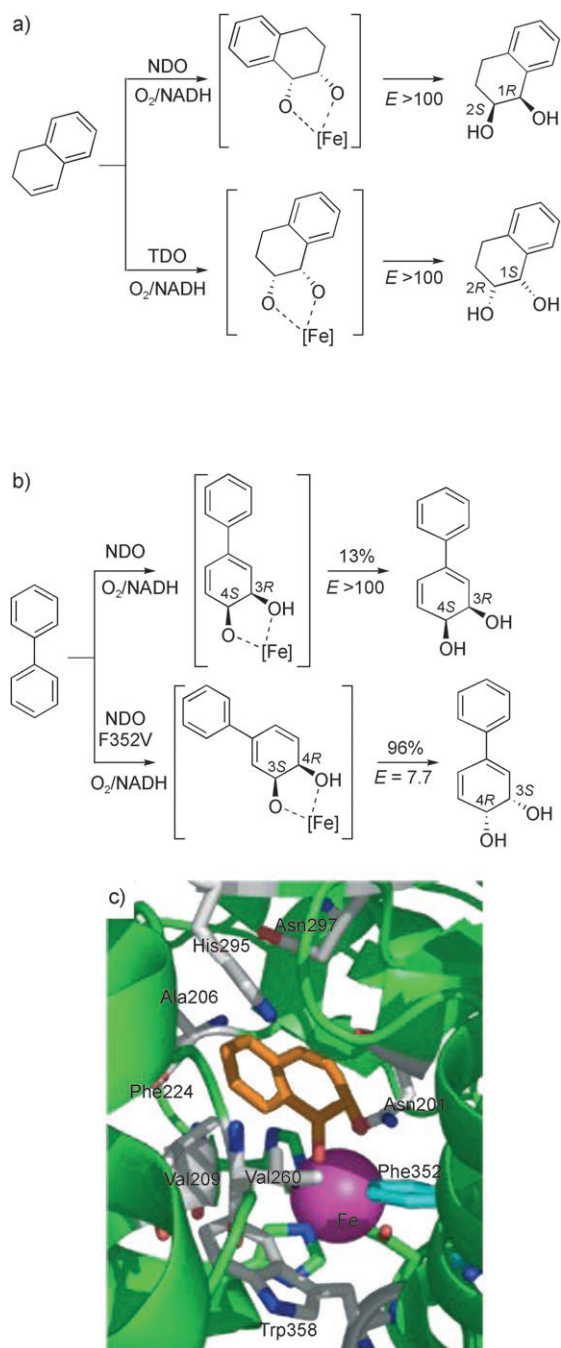
Die andere Flavinoxidase aus der Gruppe 1, Flavocytochrome b2, bildet mit der membrangebundenen D-Lactatdehydrogenase aus *E. coli*.<sup>[29]</sup> ebenfalls ein enantiokomplementäres Paar. Die Lactatbindungsstelle ist bei beiden Enzymen auf der gleichen Seite des Flavins, also passt dieses Paar vermutlich auch in Gruppe 2.

### 3.3. Gruppe 3: gleiche Proteinfaltung mit vertauschten Positionen der Bindungsstellen

Sowohl Naphthalindioxygenase (NDO) als auch Toluoldioxygenase (TDO) katalysieren die Dihydroxylierung ungesättigter Verbindungen; bei der Dihydroxylierung von 1,2-Dihydronaphthalin entstehen jedoch entgegengesetzte Enantiomere mit ausgezeichneter Enantioselektivität ( $E > 100$ , Abbildung 4a).<sup>[30]</sup> Vermutlich unterscheidet sich die bevorzugte Substratorientierung in den beiden Dioxygenasen, wodurch die entgegengesetzten Seiten des Substrats mit dem katalytisch aktiven Eisenzentrum in Kontakt kommen. Eine Röntgenstrukturanalyse von TDO steht noch aus, aber die beiden Enzyme haben eine Sequenzidentität von 35 % und ihre Proteinfaltung ist höchstwahrscheinlich gleich. Acht Aminosäurereste in der Substratbindungsstelle unterscheiden sich bei NDO und TDO (Abbildung 4c), wodurch wahrscheinlich eine entgegengesetzte Substratorientierung verursacht wird. NDO und TDO zeigen auch eine entgegengesetzte Enantiopräferenz bei der Oxidation von Alkylarylsulfiden zu Sulfoxiden<sup>[31]</sup> und bei der benzyllischen Hydroxylierung von 2-Indanol.<sup>[32]</sup>

Im Einklang mit dieser Vorstellung von unterschiedlichen Substratausrichtungen wurde durch die zielgerichtete Mutagenese von NDO seine Enantiopräferenz bei der 3,4-





**Abbildung 4.** Enantiokomplementäre Oxidationen, die von Naphthalindioxygenase (NDO) und Toluoldioxygenase (TDO) katalysiert werden. a) NDO katalysiert die Dihydroxylierung von Dihydronaphthalin mit hoher Selektivität für das 1R,2S-Enantiomer, während die verwandte Toluoldioxygenase (TDO) das 1S,2R-Enantiomer bevorzugt. Die vertauschten Orientierungen des Produkts (in Klammern) bieten dem katalytischen Eisenzentrum gegenüberliegende Substratseiten an und sind wahrscheinlich der Grund für die entgegengesetzte Enantiopräferenz. b) NDO katalysiert die 3,4-Dihydroxylierung von Biphenyl (Nebenprodukt, gezeigt) mit hoher Stereoselektivität ( $E > 100$ ; 3R,4S). Die Phe352Val-Mutante kehrt die Enantiopräferenz um ( $E = 7.7$ ; 3S,4R). c) Röntgenstruktur einer Naphthalindioxygenase (grün) als Komplex mit einem dihydroxylierten Produkt (1,2-Dihydrodionaphthalin, orangefarbene Kohlenstoffatome) am Eisenatom (magenta) des aktiven Zentrums (PDB-Name 1o7p). Die Substratbindungsstelle der Toluoldioxygenase unterscheidet sich von NDO in acht Aminosäurepositionen. Sieben dieser Positionen sind mit grauen Kohlenstoffbindungen dargestellt, eine weitere, Phe224, befindet sich außerhalb des abgebildeten Ausschnitts (siehe 3D-Computermodell in den Hintergrundinformationen). Phe352 (cyan) ist die Mutationsstelle, an der die Enantioselektivität des NDO für die 3,4-Dihydroxylierung von Biphenyl umgedreht wird.

Dihydroxylierung von Biphenyl umgedreht. Wildtyp-NDO katalysiert die stark enantioselektive Dihydroxylierung von Biphenyl sowohl in 2,3-Position (87 %, Hauptprodukt, nicht gezeigt), als auch in 3,4-Position (13 %, Nebenprodukt,  $E > 100$ ; siehe Abbildung 4b). Ein Austausch von Phe352 gegen Valin in NDO veränderte die Regioselektivität, sodass das 3,4-dihydroxylierte Produkt als Hauptprodukt (96 %) gebildet und die Enantioselektivität umgedreht wurde (allerdings nur mit  $E = 7.7$ ).<sup>[33]</sup> Die Änderung der Enantioselektivität wird vermutlich durch eine veränderte Substratorientierung bedingt, da Phe352 einen Teil der Substratbindungsstelle bildet (Abbildung 4b).<sup>[34]</sup>

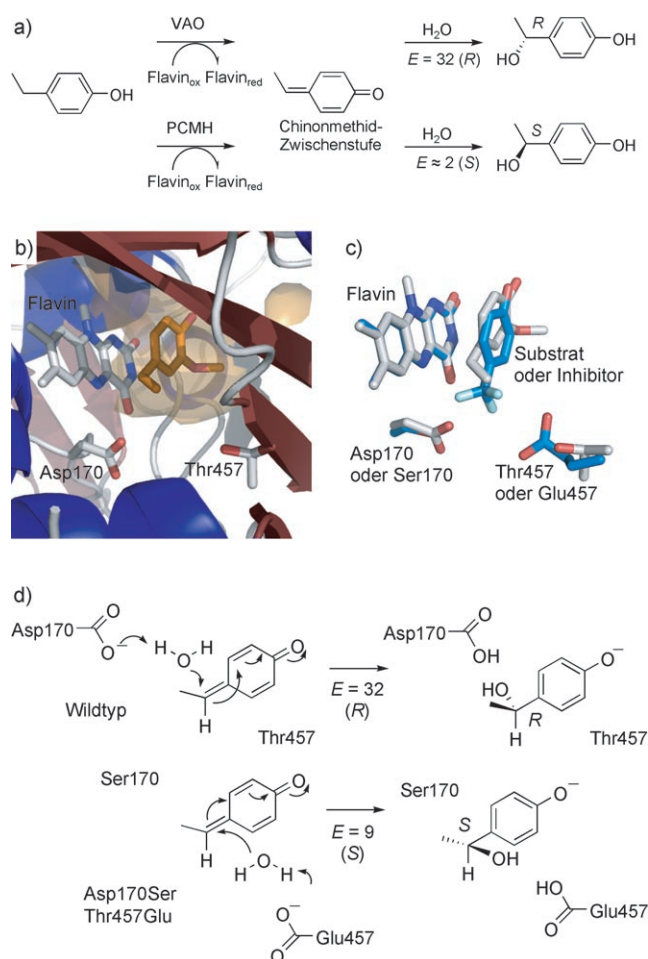
*Bacillus*-D-Aminosäure-Aminotransferase (siehe Gruppe 1, Abschnitt 3.1) bildet ebenfalls mit der Verzweigtketten-L-Aminosäure-Aminotransferase ein enantiokomplementäres Paar.<sup>[35]</sup> Beide haben die gleiche Proteinfaltung (Typ IV) und positionieren das Substrat an der *re*-Seite des PLP (siehe Abbildung S5b in den Hintergrundinformationen). Der Wechsel der Bindungsstellen für das  $\alpha$ -Carboxylat und die Seitenkette kehrt die Enantiopräferenz um.

Vor kurzem haben Andexer et al. eine *R*-selektive Hydroxynitrillyase beschrieben, die eine ähnliche Sequenz – und vermutlich 3D-Struktur – wie die *S*-selektive Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* hat.<sup>[36]</sup> Die Umkehr der Enantioselektivität wurde mit einem Wechsel der Bindungsstellen des Wasserstoffatoms und der aromatischen Seitenketten des Substrats (z. B. Benzaldehyd) erklärt.

Hydantoinasen bilden „TIM-Fass“-Strukturen und katalysieren die enantioselektive Hydrolyse von 5-monosubstituierten Hydantoinen zu *N*-Carbamoyl- $\alpha$ -amino-säuren.<sup>[37]</sup> Die meisten Hydantoinasen sind *D*-selektiv, aber die Hydantoinase aus *Arthobacter aurescens* bevorzugt das *L*-Enantiomer von 5(3'-Indoymethyl)hydantoin, einer Vorstufe von *L*-Tryptophan. Ein Modell auf der Grundlage von Röntgenkristallstrukturen deutet darauf hin, dass die Hydantoin-Seitenkette in den beiden Enzymen an unterschiedlichen Stellen bindet.<sup>[38]</sup>

#### 3.4. Gruppe 4: gleiche Proteinfaltung mit ausgetauschter Position einer katalytischen Gruppe

Vanillylalkohol-Oxidase (VAO) katalysiert die enantioselektive Oxidation von 4-Ethylphenol zu (*R*)-1-(4'-Hydroxyphenyl)ethanol ( $E = 32$ ),<sup>[39]</sup> während die strukturell verwandte *p*-Kresylmethylhydroxylase (PCMH) das *S*-Enantiomer bildet ( $E \approx 2$ , Abbildung 5).<sup>[40,41]</sup> Die beiden Enzyme haben 32 % Sequenzidentität, und die Röntgenkristallstrukturen zeigen ähnliche aktive Zentren und weisen auf ähnliche Reaktionsmechanismen hin.<sup>[42]</sup> Beide Enzyme enthalten einen Flavincofaktor, der Phenol zu einer Chinonmethid-Zwischenstufe oxidiert. Im nächsten Schritt bindet Wasser an eine Seite des Chinonmethids und bildet so den Alkohol als Produkt. Die Röntgenstrukturen zeigen in VAO einen Aspartatrest in der Nähe einer



**Abbildung 5.** Die Flavoenzyme Vanillylalkoholoxidase (VAO) und *p*-Kresylmethylhydroxylase (PCMH) katalysieren beide die Oxidation von 4-Ethylphenol, bilden aber enantiomere Alkohole. a) Die Oxidation umfasst zuerst eine Oxidation zu einem Chinonmethid gefolgt von der Addition von Wasser zur Bildung des Alkohols. b) Die Röntgenstruktur der Wildtyp-VAO (PDB-Name 2vao) zeigt den Cofaktor Flavin (graue Stäbe), das Substratanalogon 2-Methoxy-4-vinylphenol (orangefarbene Stäbe) und zwei Schlüsselasminosäuren der Katalyse, Asp170 und Thr457 (graue Stäbe). c) Die zielgerichtete Mutagenese einer katalytischen Gruppe invertiert die Enantiopräferenz. Die Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen der Wildtyp VAO (graue Stäbe) und der Asp170Ser/Thr457Glu-Doppelmutante (blaue Stäbe, PDB-Name 1e0y) zeigt die Carboxylate auf entgegengesetzten Seiten des Substratanalogons. d) Der Reaktionsmechanismus umfasst die durch die Carboxylatgruppe von Asp170 katalysierte Addition eines Wassermoleküls, das an der *re*-Seite (hinten) der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung bindet, um den *R*-Alkohol zu bilden. Zielgerichtete Mutagenese brachte das Carboxylat auf die gegenüberliegende Seite des Chinonmethids und kehrte die Enantiopräferenz um.

Seite der Zwischenstufe und in PCMH einen Glutamatrest in der Nähe der gegenüberliegenden Seite. Es wird angenommen, dass diese (katalytisch äquivalenten) Carboxylatgruppen ein Wassermolekül ausrichten, um in VAO den *R*-Alkohol und in PCMH den *S*-Alkohol zu erhalten. Die Lage dieser Carboxylate auf entgegengesetzten Seiten des Substrats weist darauf hin, dass die entgegengesetzte Enantiopräferenz auf die umgekehrte Anordnung der katalytischen Aminosäuren

zurückzuführen ist. Van den Heuvel und Mitarbeiter überprüften diese Hypothese, indem sie die Enantiopräferenz der VAO durch zielgerichtete Mutagenese umkehrten.<sup>[43]</sup> Sie stellten eine Doppelmutante (Asp170Ser/Thr457Glu) der VAO her, bei der das Aspartat von der einen Seite der Zwischenstufe entfernt und ein Glutamat auf der anderen Seite eingefügt wurde. Erwartungsgemäß zeigte diese Doppelmutante die umgekehrte Enantioselektivität und bildete (*S*)-1-(4'-Hydroxyphenyl)ethanol mit  $E = 9$  (Abbildung 5).

Alle vier Einteilungen beruhen auf der Annahme, dass ein Platztausch zweier Gruppen am Stereozentrum die enantio-komplementäre aktive Stelle erzeugt, da das zu den vorhandenen Beispielen passt. Es könnte möglich sein, ein enantio-komplementäres Enzym durch den Tausch von nur einer Stelle zu schaffen, aber dafür liegen noch keine strukturanalytisch charakterisierten Beispiele vor. Diese Hypothese wird in den Hintergrundinformationen erörtert.

## 4. Entdeckung und Herstellung neuer enantiokomplementärer Enzyme

### 4.1. Warum enantiokomplementäre Enzyme existieren

Enantiokomplementäre Enzyme könnten von der Natur gebildet werden, um einen evolutionären Vorteil zu schaffen, vielleicht entstehen sie aber auch zufällig. Ein evolutionärer Vorteil wäre die Möglichkeit, beide Enantiomere einer Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle mithilfe von enantiokomplementären Aminosäureoxidasen oder Aminotransferasen zu verwerten. Die Fähigkeit zur Aktivierung beider Epimere von Proteinen, die Methioninsulfoxide enthalten, dürfte ein ähnlicher Überlebensvorteil sein. Enantiokomplementäre Epoxidhydrolasen können an der Entgiftung von chiralen Xenobiotika beteiligt sein.<sup>[44]</sup> Ein Enzym, das keine Enantioselektivität zeigt, würde ähnliche Vorteile bringen, diese Option kommt in der Natur jedoch selten vor – vielleicht wären nichtenantioselektive Enzyme aufgrund ungenauer Positionierung des Substrats schlechte Katalysatoren.<sup>[45]</sup>

Ein Fall, bei dem Enantiokomplementarität keinen offensichtlichen evolutionären Vorteil (oder Nachteil) bietet, liegt dann vor, wenn die Synthese von jedem der beiden Enantiomere das metabolische Ziel erreicht. Beispielsweise werden Arene durch Naphthalin- oder Toluol-Dioxygenasen und Vanillylalkohol durch Vanillylalkohol-Oxidase und *p*-Kresylmethylhydroxylase zu achiralen Kataboliten umgesetzt, egal welches Enantiomer in der anfänglichen Oxidation gebildet wurde. Auf ähnliche Weise erzeugen Hydratasen chirale Zwischenstufen für die Synthese und Oxidation von Fettsäuren, deren Konfiguration in späteren Reaktionsschritten wieder verlorengeht. Filppula et al. ersetzten das Hefeenzym, das die zweite und dritte Reaktion der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren über eine L-3-Hydroxyacyl-CoA-Zwischenstufe katalysiert, durch das entsprechende Rattenenzym, das die gleichen Reaktionen über eine L-3-Hydroxy-Zwischenstufe katalysiert.<sup>[46]</sup> Beide stereochemischen Alternativen ermöglichten den Hefezellen, auf Ölsäure zu wachsen. Die Freisetzung von Cyanid aus Hydroxynitrilen zur Verteidigung gegen Fraßfeinde ist ähnlich wirksam, gleich ob



sie von *R*- oder *S*-Hydroxynitrilen ausgeht; der metabolische Zweck der Lactatdehydrogenase bei der Glykolyse ist die Regenerierung von  $\text{NAD}^+$ . Lactat ist ein Abfallprodukt, es können also beide Enantiomere verwendet werden.

Ein weiteres Beispiel, bei dem Enantiokomplementarität keinen offensichtlichen evolutionären Vorteil (oder Nachteil) bietet, sind Reaktionen mit nichtnatürlichen Substraten, da hierbei evolutionäre Zwänge keine Rolle spielen. Beispielsweise ist die ursprüngliche Aufgabe der Lipasen die Lipidhydrolyse und die der Subtilisine die Peptidhydrolyse; ihr Verhalten gegenüber sekundären Alkoholen ist irrelevant für ihre ursprüngliche Aufgabe und rein zufällig. Ähnlich ist die ursprüngliche Aufgabe der Hydantoinasen („Dihydropyrimidinasen“) vermutlich der Abbau von (achiralen) Purinen und Pyrimidinen, weshalb deren Enantioselektivität gegenüber Hydantoinen in der Natur keine vorrangige Rolle spielt.

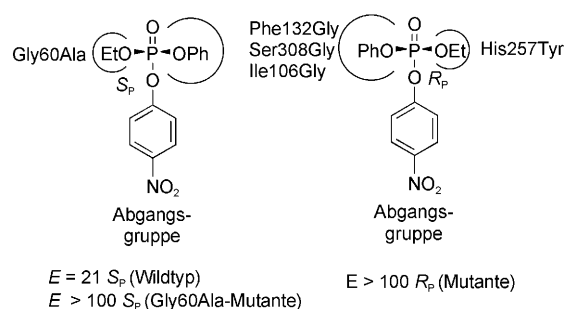
#### 4.2. Die Entdeckung neuer enantiokomplementärer Enzymopaare in der Natur

Neben den oben diskutierten, strukturell beschriebenen enantiokomplementären Enzymen gibt es viele Beispiele, für die keine Strukturdetails bekannt sind. Enantiokomplementäre Terpencyclasen bilden entweder Enantiomere von  $\alpha$ -Pinen<sup>[47]</sup> oder von einem Bornylpyrophosphat.<sup>[48]</sup> Bäcker<sup>[49]</sup> und andere Hefen<sup>[50]</sup> enthalten *L*- und *D*-selektive Reduktasen, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketoester oft hoch enantioselektiv reduzieren. Verschiedene Bakterienstämme enthalten enantiokomplementäre Baeyer-Villiger-Monooxygenasen.<sup>[51]</sup>

Diese überraschende Häufigkeit von enantiokomplementären Enzymopaaren lässt darauf schließen, dass es viel mehr natürliche Beispiele gibt und dass die Wahrscheinlichkeit, durch Screening von Umweltproben neue Paare zu entdecken, ziemlich hoch ist. Kürzlich wurden bei einem Screening 137 neue *R*- oder *S*-selektive Nitrilasen identifiziert. Die Einteilung dieser Nitrilasen in monophyletische Gruppen zeigte, dass tendenziell die meisten Mitglieder einer solchen Gruppe dieselbe Enantiopräferenz hatten.<sup>[52]</sup>

#### 4.3. Die Konstruktion von Enzymen mit entgegengesetzter Enantiopräferenz

Durch den Austausch der Position entweder der Bindungsstellen oder einer katalytischen Gruppe mithilfe von „Protein-Engineering“ konnte die Enantiopräferenz von synthetisch nutzbaren Enzymen umgekehrt werden (Tabelle 2). Raushel und Mitarbeiter wechselten beispielsweise die Enantioselektivität von Organophosphor-Hydrolase (OPH) durch Austauschen der Bindungsstellen (Abbildung 6). OPH zeigt eine moderate Enantioselektivität ( $E = 21$ ) gegenüber Phosphattriestern wie Ethylphenyl-4-nitrophenylphosphat.<sup>[53]</sup> Die Hydrolyse bevorzugt das  $S_P$ -Enantiomer des Substrats, es entsteht allerdings ein achirales Produkt, ein Phosphodiester. Die Substratbindungstasche hat sowohl eine kleine als auch eine große Untereinheit.<sup>[54]</sup> Um die Enantiopräferenz umzukehren, vergrößerten Raushel und Mitarbeiter zuerst die kleine Untereinheit durch den Austausch dreier Aminosäuren



**Abbildung 6.** Organophosphorhydrolase katalysiert die enantioselektive Hydrolyse von Phosphattriestern. Das Wildtypenzym bevorzugt das  $S_P$ -Enantiomer des Ethylphenyl-4-nitrophenylphosphats ( $E = 21$ ). Die Verkleinerung der kleinen Untereinheit durch eine Gly60Ala-Mutation erhöht die Enantioselektivität. Dagegen bewirkt die Umkehrung der Größen der Untereinheiten durch die vier gezeigten Mutationen eine Umkehrung der Enantioselektivität.

ren, wodurch die Enantioselektivität ausgeschaltet wurde. Dann verkleinerten sie die große Untereinheit durch den Austausch von Histidin gegen Tyrosin, wodurch die Enantioselektivität für das  $R_P$ -Enantiomer auf  $E > 100$  erhöht wurde. Eine ähnliche Mutante zeigte eine umgekehrte Enantiopräferenz gegenüber Methylphenylphosphonates-tern.<sup>[55]</sup>

Eine solche paarweise Mutagenese im aktiven Zentrum könnte die beste Strategie zur Umkehr der Enantiopräferenz sein, da so die Position nicht nur eines, sondern zweier Substituenten des chiralen Substrats gewechselt wird. Tatsächlich kehrten multiple Mutationen die Enantioselektivität von Meerrettich-Peroxidase,<sup>[56]</sup> Lipase aus *Burkholderia cepacia*<sup>[57,58]</sup> und Esterasen aus *Burkholderia gladioli*<sup>[59]</sup> und *Bacillus subtilis*<sup>[60]</sup> um. Von den neun Beispielen in Tabelle 2 enthalten nur zwei eine einfache Mutation: eine Phe352Val-Mutation im aktiven Zentrum von Naphthalindioxygenase, die deren Enantiopräferenz bei der Hydroxylierung von Biphenyl umkehrte,<sup>[33]</sup> und eine Trp104Ala-Mutation im aktiven Zentrum der Lipase B aus *Candida antarctica*, die deren Enantiopräferenz bei der Acylierung von 1-Phenylethanol umkehrte.<sup>[61]</sup> In beiden Fällen sank die Enantioselektivität von einem hohen Wert ( $E > 100$ ) auf einen mittelmäßigen ( $E = 7.7$  bzw.  $6.6$ ), was darauf hinweist, dass zusätzliche Mutationen auf der anderen Seite des aktiven Zentrums die Selektivität für das neue Enantiomer steigern könnten. Einige Versuche, die Enantioselektivität durch den Tausch der Bindungsstellen umzukehren, waren nur teilweise erfolgreich ( $E$ -Werte unter 5).<sup>[62–65]</sup> Diese Beispiele sind in Tabelle 2 nicht angeführt, ebenso wie zahlreiche Beispiele, an denen Diastereomere beteiligt sind, auch wenn die Mutationen die Enantioselektivität in Bezug auf ein Zentrum umkehren, da das Vorliegen zusätzlicher Stereozentren die Interpretation erschwert. Ein Wechsel des Lösungsmittels kann die Enantioselektivität ebenfalls umkehren (siehe z.B. Lit. [66]). Höchstwahrscheinlich geschieht dies durch Änderungen der Solvatisierung von Substratregionen, die dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Diese Methode betrifft nur jene Substituenten, die mit dem Lösungsmittel in Kontakt stehen, und war nicht so erfolgreich wie die gentechnische Veränderung der Proteine.

**Tabelle 2:** Beispiele für „Protein-Engineering“ oder gerichtete Evolution, um die Enantiopräferenz umzukehren ( $E > 5$ ).

Enzym	Substrat	Produkt	Mutation(en)	Enantioselektivitäts- umkehrung	Gruppe
Organophosphorhydrolase	Ethylphenyl-4-nitrophenylphosphat	Ethylphenyldiphosphat (achiral)	His257Tyr Phe132Gly Ser308Gly Ile106Gly	$E = 21$ ( $S_P$ ) <sup>[a]</sup> zu $E > 100$ ( $R_P$ )	3, ändert Substratorientierung
Naphthalindioxygenase	Biphenyl (achiral)	cis-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobiphenyl	Phe352Val	$E > 100$ ( $3R,4S$ ) zu $E = 7.7$ ( $3S,4R$ )	3, ändert Substratorientierung
Merrettich-Peroxidase	Thioanisol	Methylphenylsulfoxid	Leu41His His42A	$E = 66$ ( $S$ ) <sup>[b]</sup> zu $E > 100$ ( $R$ )	3, ändert Substratorientierung
Lipase aus <i>Burkholderia cepacia</i>	1,4-Dihydropyridindiestere	1,4-Dihydropyridindicarbonsäuremonoester	Phe221Leu Val266Leu Leu287Ile	$E = 6.5$ ( $R$ ) zu $E > 100$ ( $S$ )	3, ändert Substratorientierung
Lipase aus <i>Burkholderia cepacia</i>	Ethyl-3-phenylbutyrat	3-Phenylbutyrat	Leu177Phe <sup>[c]</sup> Phe119Leu Leu167Gly Leu266Val	$E = 33$ ( $S$ ) zu $E = 38$ ( $R$ )	3, ändert Substratorientierung
Esterase aus <i>Burkholderia gladioli</i>	Methyl-2-hydroxy-2-methylpropanoat	2-Hydroxy-2-methylpropanensäure	Leu135Phe Ile152Asn Val351Ser His253Phe	$E = 6.1$ ( $S$ ) zu $E = 29$ ( $R$ )	3, ändert Substratorientierung
Esterase aus <i>Bacillus subtilis</i>	1,1,1-Trifluor-2-phenyl-3-butan-1-ylacetat	1,1,1-Trifluor-2-phenyl-3-butan-1-ol	Asp188Trp Met193Cys <sup>[d]</sup>	$E > 100$ ( $R$ ) zu $E = 64$ ( $S$ )	3, ändert Substratorientierung
Lipase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-Nitrophenyl-2-methyldecanoat	2-Methyldecanoat	17 Substitutionen <sup>[e]</sup>	$E = 51$ ( $S$ ) zu $E = 30$ ( $R$ )	3, ändert Substratorientierung
Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	1-Phenylethanol	1-Phenylethylbutyrat	Trp104Ala	$E \gg 200$ ( $R$ ) zu $E = 13$ ( $S$ )	3, ändert Substratorientierung
Vanillylalkoholoxidase	4-Ethylphenol (achiral)	4-(1'-Hydroxyethyl)phenol	Asp170Ser Thr457Glu	$E = 32$ ( $R$ ) zu $E = 9$ ( $S$ )	4, verschiebt die wichtigste katalytische Gruppe
Arylmalonatdecarboxylase	$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -(2-thienyl)malonsäure	$\alpha$ -(2-Thienyl)propionensäure	Gly74Cys Cys188Ser	$E > 100$ ( $S$ ) zu $E = 32$ ( $R$ )	4, verschiebt die wichtigste katalytische Gruppe

[a] Durch eine Gly60Ala-Mutation, welche die kleine Untereinheit verkleinerte, erhöhten Raushel und Mitarbeiter auch die  $S_P$ -Selektivität des Wildtyp-Enzyms auf über 100. [b] Das  $S$ -selektive Enzym ist die Phe41Leu-Mutante. Wildtyp-HRP hat eine niedrigere Enantioselektivität von  $E = 6$ . [c] Beide Varianten mit umgedrehter Enantioselektivität enthalten die vier aufgelisteten Mutationen. Eine enthält außerdem eine Thr251Ala-Mutation, während die andere eine Asp21Asn-Mutation enthält. Den Autoren zufolge haben diese zusätzlichen Mutationen wenig Einfluss auf die Enantioselektivität. [d] Der Wildtyp hat Glu188 anstelle von Asp188, aber die Asp188-Variante zeigt höhere Enantioselektivität für  $R$ :  $E > 100$  gegenüber  $E = 42$  für den Wildtyp. [e] Das Wildtyp-Enzym hat nahezu keine Enantioselektivität ( $E = 1.1$ ). In der  $R$ -selektiven Mutanten sind elf Aminosäuren des Wildtyp-Enzyms ausgetauscht, im  $S$ -selektiven Enzym sechs. Keine der Mutationen betrifft Aminosäuren im aktiven Zentrum.

Durch zielgerichtete Evolution wurde die Enantioselektivität von Enzymen ebenfalls umgekehrt. Wegen der Schwierigkeit, zusammenwirkende Mutationen zu erhalten, waren allerdings multiple Mutationen erforderlich. Reetz und Mitarbeiter veränderten die Enantioselektivität der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* drastisch.<sup>[67]</sup> Die Wildtyp-Lipase war gegenüber einem 2-Methyldecansäureester nicht selektiv ( $E = 1.1$ ). Wiederholte Zufallsmutationen unter Verwendung unterschiedlicher Strategien, kombiniert mit der Überprüfung der Wirksamkeit, ergaben zwei Varianten mit guter Selektivität gegenüber den entgegengesetzten Enantiomeren. Die  $R$ -selektive Lipase ( $E = 30$ ) unterschied sich vom Wildtyp an 11 Aminosäurepositionen, während die  $S$ -selektive Lipase ( $E = 51$ ) sich durch sechs anderen Substitutionen unterschied.

Der Austausch der katalytischen Gruppen ist ebenfalls eine effektive Methode, um die Enantiopräferenz umzukehren. Die Umkehr der Enantiopräferenz von Vanillylalkohol-Oxidase durch eine Doppelmuation wurde in Abschnitt 3.4 beschrieben. In einem weiteren Beispiel kehrten Ohta und

Mitarbeiter die Enantiopräferenz einer Arylmalonat-decarboxylase um, indem sie einen Cysteinrest auf die andere Seite des aktiven Zentrums verschoben.<sup>[68]</sup>

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Während manche Forscher die Enantioselektivität als elementare und schwer zu verändernde Eigenschaft der biologischen Katalyse betrachten, zeigen diese Beispiele, dass schon die Veränderung weniger Aminosäuren die Enantiopräferenz eines Enzyms umkehren kann. Im Hinblick auf das genetische Screening nach natürlichen enantiokomplementären Enzymen ist es nicht länger richtig, das Fehlen leicht verfügbarer „spiegelbildlicher“ Enzyme als einen Nachteil der Biokatalyse anzuführen.

Wir danken dem Biotechnologischen Institut der University of Minnesota und der US National Science Foundation (CHE-

0616560) für die finanzielle Unterstützung sowie dem Minnesota Supercomputing Institute für den Zugang zu Computern und Software.

Eingegangen am 8. November 2007,

veränderte Fassung am 9. April 2008

Online veröffentlicht am 10. Oktober 2008

- [1] Die Proteinstrukturen wurden mit DALI verglichen: L. Holm, J. Park, *Bioinformatics* **2000**, *16*, 566–567.
- [2] R. C. L. Milton, S. C. F. Milton, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, *256*, 1445–1448; Kommentar: G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1484–1486; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1457–1459.
- [3] M. C. Fitzgerald, I. Chernushevich, K. G. Standing, S. B. H. Kent, C. P. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11075–11080.
- [4] B. Seelig, S. Keiper, F. Stuhlmann, A. Jäschke, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4764–4768; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4576–4579.
- [5] Übersicht: H. Griengl, A. Hickel, D. V. Johnson, M. Schmidt, C. Kratky, H. Schwab, *Chem. Commun.* **1997**, 1933–1940; H. Griengl, H. Schwab, M. Fechter, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 252–256.
- [6] K. Gruber, G. Gartner, B. Krammer, H. Schwab, C. Kratky, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20501–20510.
- [7] I. Dreveny, K. Gruber, A. Glieder, A. Thompson, C. Kratky, *Structure* **2001**, *9*, 803–815.
- [8] I. Dreveny, C. Kratky, K. Gruber, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 292–300.
- [9] Methioninsulfoxide sind Epimere, nicht Enantiomere, da sie die gleiche Konfiguration an C<sub>α</sub>, aber unterschiedliche Konfiguration an der Sulfoxidgruppe haben. Das enantiokomplementäre Verhalten von Msr bezieht sich auf die Reaktion am Stereozentrum des Sulfoxids. Übersicht: B. Kauffmann, A. Aubry, F. Favier, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2005**, *1703*, 249–260. Enantioselektivität: V. S. Sharov, D. A. Ferington, T. C. Squier, C. Schoneich, *FEBS Lett.* **1999**, *455*, 247–250; R. Grimaud, B. Ezraty, J. K. Mitchell, D. Lafitte, C. Briand, P. J. Derrick, F. Barras, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48915–48920.
- [10] W. T. Lowther, H. Weissbach, F. Etienne, N. Brot, B. W. Matthews, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 348–352.
- [11] Übersichten: R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, *J. Mol. Catal. B* **1997**, *3*, 65–72; T. Ema, K. Yamaguchi, Y. Wakasa, A. Yabe, R. Okada, M. Fukumoto, F. Yano, T. Korenaga, M. Utaka, T. Sakai, *J. Mol. Catal. B* **2003**, *22*, 181–192. für Beispiele, siehe Tabelle 1: S. Vorlova, U. T. Bornscheuer, I. Gatfield, J.-M. Hilmer, H.-J. Bertram, R. D. Schmid, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1152–1155; P. A. Fitzpatrick, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3166–3171; C. K. Savile, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12228–12229; siehe die Hintergrundinformationen, Tabelle S3.
- [12] M.-J. Kim, Y. I. Chung, Y. K. Choi, H. K. Lee, D. Kim, J. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11494–11495.
- [13] F. F. Huerta, A. B. E. Minidis, J.-E. Bäckvall, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321–331.
- [14] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. L. Sussman, K. H. G. Verschuere, A. Goldman, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 197–211.
- [15] P. F. Mugford, S. M. Lait, B. A. Keay, R. J. Kazlauskas, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 980–987.
- [16] M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180–3186.
- [17] S. Rhee, M. M. Silva, C. C. Hyde, P. H. Rogers, C. M. Metzler, D. E. Metzler, A. Arnone, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17293–17302; R. A. John, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1248*, 81–96.
- [18] D. Peisach, D. M. Chipman, P. W. Van Ophem, J. M. Manning, D. Ringe, *Biochemistry* **1998**, *37*, 4958–4967; S. Sugio, G. A. Petsko, J. M. Manning, K. Soda, D. Ringe, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9661–9669; K. Yonaha, H. Misono, T. Yamamoto, K. Soda, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 6983–6989.
- [19] S. Umhau, L. Pollegioni, G. Molla, K. Diederichs, W. Welte, M. S. Pilone, S. Ghisla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12463–12468; M. P. Simonetta, M. A. Vanoni, P. Casalin, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *914*, 136–142.
- [20] A. Mattevi, M. A. Vanoni, F. Todone, M. Rizzi, A. Teplyakov, A. Coda, M. Bolognesi, B. Curti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7496–7501; C. G. Mowat, A. Wehenkel, A. J. Green, M. D. Walkinshaw, G. A. Reid, S. K. Chapman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9519–9526.
- [21] Z. X. Xia, F. S. Mathews, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 837–863.
- [22] T. Fukui, N. Shiomi, Y. Doi, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 667–673; Y.-M. Qin, M. H. Poutanen, H. M. Helander, A.-P. Kvist, K. M. Siivari, W. Schmitz, E. Conzelmann, U. Hellman, J. K. Hiltunen, *Biochem. J.* **1997**, *321*, 21–28.
- [23] M. K. Koski, A. M. Haapalainen, J. K. Hiltunen, T. Glumoff, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24666–24672.
- [24] H. K. W. Kallwass, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 28–35; W. Hummel, H. Schutte, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *21*, 7–15; H. Schutte, W. Hummel, M. R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1984**, *19*, 167–176.
- [25] K. Niefind, H.-J. Hecht, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 256–281; U. Dengler, K. Niefind, M. Kiess, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 640–660.
- [26] C. Vinals, E. Depiereux, E. Feytmans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 182–188.
- [27] V. S. Stoll, M. S. Kimber, E. F. Pai, *Structure* **1996**, *4*, 437–447; K. Arai, T. Kamata, H. Uchikoba, S. Fushinobu, H. Matsuzawa, H. Taguchi, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 397–400; T. Bhowmik, J. L. Steele, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *41*, 432–439.
- [28] P. D. Pawelek, J. Cheah, R. Coulombe, P. Macheroux, S. Ghisla, A. Vrielink, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4204–4215; I. M. Moustafa, S. Foster, A. Y. Lyubimov, A. Vrielink, *J. Mol. Biol.* **2006**, *364*, 991–1002; siehe auch: H. Zhang, M. Teng, L. Niu, Y. Wang, Y. Wang, Q. Liu, Q. Huang, Q. Hao, Y. Dong, P. Liu, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 974–977; biologische Eigenschaften: G. Ponnudurai, M. C. M. Chung, N.-H. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *313*, 272–378.
- [29] O. Dym, E. A. Pratt, C. Ho, D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9413–9418; M. Futai, *Biochemistry* **1973**, *12*, 2468–2474.
- [30] D. S. Torok, S. M. Resnick, J. M. Brand, D. L. Cruden, D. T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5799–5805.
- [31] D. R. Boyd, N. D. Sharma, S. A. Haughey, M. A. Kennedy, B. T. McMurray, G. N. Sheldrake, C. C. R. Allen, H. Dalton, K. Sproule, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, *1*, 1929–1934.
- [32] N. I. Bowers, D. R. Boyd, N. D. Sharma, P. A. Goodrich, M. R. Grocock, A. J. Blacker, P. Goode, H. Dalton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, *1*, 1453–1461.
- [33] R. E. Parales, S. M. Resnick, C. Yu, D. R. Boyd, N. D. Sharma, D. T. Gibson, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5495–5504.
- [34] A. Karlsson, J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Science* **2003**, *299*, 1039–1042.
- [35] N. H. Yennawar, M. E. Conway, H. P. Yennawar, G. K. Farber, S. M. Hutson, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11592–11601; J. Davoodi, P. M. Drown, R. K. Bledsoe, R. Wallin, G. D. Reinhart, S. M. Hutson, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4982–4989.
- [36] J. Andexer, J. von Langermann, A. Mell, M. Bocola, U. Kragl, T. Eggert, M. Pohl, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8833–8835; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8679–8681.
- [37] C. Syltadt, O. May, J. Altenbuchner, R. Mattes, M. Siemann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 293–309; O. Keil, M. P.



- Schneider, J. P. Rasor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1257–1260.
- [38] Y. H. Cheon, H. S. Kim, K. H. Han, J. Abendroth, K. Niefind, D. Schomburg, J. Wang, Y. Kim, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9410–9417; J. Abendroth, K. Niefind, O. May, M. Siemann, C. Syltatk, D. Schomburg, *Biochemistry* **2002**, *41*, 8589–8597.
- [39] F. P. Drijfhout, M. W. Fraaije, H. Jongejan, W. J. H. van Berkel, M. C. R. Franssen, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 171–177.
- [40] A. Mattevi, M. W. Fraaije, A. Mozzarelli, L. Olivi, A. Coda, W. J. van Berkel, *Structure* **1997**, *5*, 907–920.
- [41] W. McIntire, D. J. Hopper, J. C. Craig, E. T. Everhart, R. V. Webster, M. J. Causer, T. P. Singer, *Biochem. J.* **1984**, *224*, 617–621.
- [42] L. M. Cunane, Z. Chen, N. Shamala, F. S. Mathews, C. N. Cronin, W. S. McIntire, *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 357–374.
- [43] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, M. Ferrer, A. Mattevi, W. J. H. van Berkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9455–9460.
- [44] F. Oesch, *Prog. Clin. Biol. Res.* **1983**, *135*, 81–105.
- [45] Eine Ausnahme ist die DL-2-Halogensäuredehalogenase, die das Halogenatom mit Wasser gleichermaßen langsam aus beiden Enantiomeren entfernt. ( $< 1 \text{ U mg}^{-1}$ ): V. Nardi-Dei, T. Kurihara, C. Park, N. Esaki, K. Soda, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 4232–4238. Racemasen sind eine weitere Ausnahme – einzelne Enzyme, die beide Enantiomere des Substrats mit ungefähr gleicher Effizienz unter Verwendung von funktionell symmetrischen aktiven Zentren umwandeln.
- [46] S. A. Filppula, R. T. Sormunen, A. Hartig, W.-H. Kunau, J. K. Hiltunen, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27453–27457.
- [47] M. A. Phillips, M. R. Wildung, D. C. Williams, D. C. Hyatt, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *411*, 267–276.
- [48] R. Croteau, D. M. Satterwhite, D. E. Cane, C. C. Chang, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13438–13445.
- [49] I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827–12832.
- [50] D. Zhu, Y. Yang, L. Hua, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4202–4205; D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 901–905.
- [51] P. Cernuchova, M. D. Mihovilovic, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1715–1719.
- [52] D. E. Robertson, J. A. Chaplin, G. DeSantis, M. Podar, M. Madden, E. Chi, T. Richardson, A. Milan, M. Miller, D. P. Weiner, K. Wong, J. McQuaid, B. Farwell, L. A. Preston, X. Tan, M. A. Snead, M. Keller, E. Mathur, P. L. Kretz, M. J. Burk, J. M. Short, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2429–2436.
- [53] M. Chen-Goodspeed, M. A. Sogorb, F. Wu, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1325–1331; M. Chen-Goodspeed, M. A. Sogorb, F. Wu, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1332–1339.
- [54] J. L. Vanhooke, M. M. Benning, F. M. Raushel, H. M. Holden, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6020–6025.
- [55] Y. Li, S. D. Aubert, E. G. Maes, F. M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8888–8889.
- [56] S.-I. Ozaki, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4487–4488; M. I. Savenkova, S. L. Newmyer, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24598–24603.
- [57] Y. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kuroono, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1063–1066.
- [58] Y. Koga, K. Kato, H. Nakano, T. Yamane, *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 585–592.
- [59] M. Ivancic, G. Valinger, K. Gruber, H. Schwab, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 109–122.
- [60] S. Bartsch, R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1531–1534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1508–1511.
- [61] A. O. Magnusson, M. Takwa, A. Hamberg, K. Hult, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4658–4661; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4582–4585.
- [62] R. Sakowicz, M. Gold, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2387–2394.
- [63] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317–320.
- [64] M. T. Reetz, B. Brunner, T. Schneider, F. Schulz, C. M. Clouthier, M. M. Kayser, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4167–4170; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4075–4078; .
- [65] S. A. Funke, A. Eipper, M. T. Reetz, N. Otte, W. Thiel, G. Van Pouderoyen, B. W. Dijkstra, K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Biotransform.* **2003**, *21*, 67–73.
- [66] C. K. Savile, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12228–12229.
- [67] D. Zha, S. Wilensek, M. Hermes, K. E. Jaeger, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2001**, 2664–2665.
- [68] Y. Terao, Y. Ijima, K. Miyamoto, H. Ohta, *J. Mol. Catal. B* **2007**, *45*, 15–20.