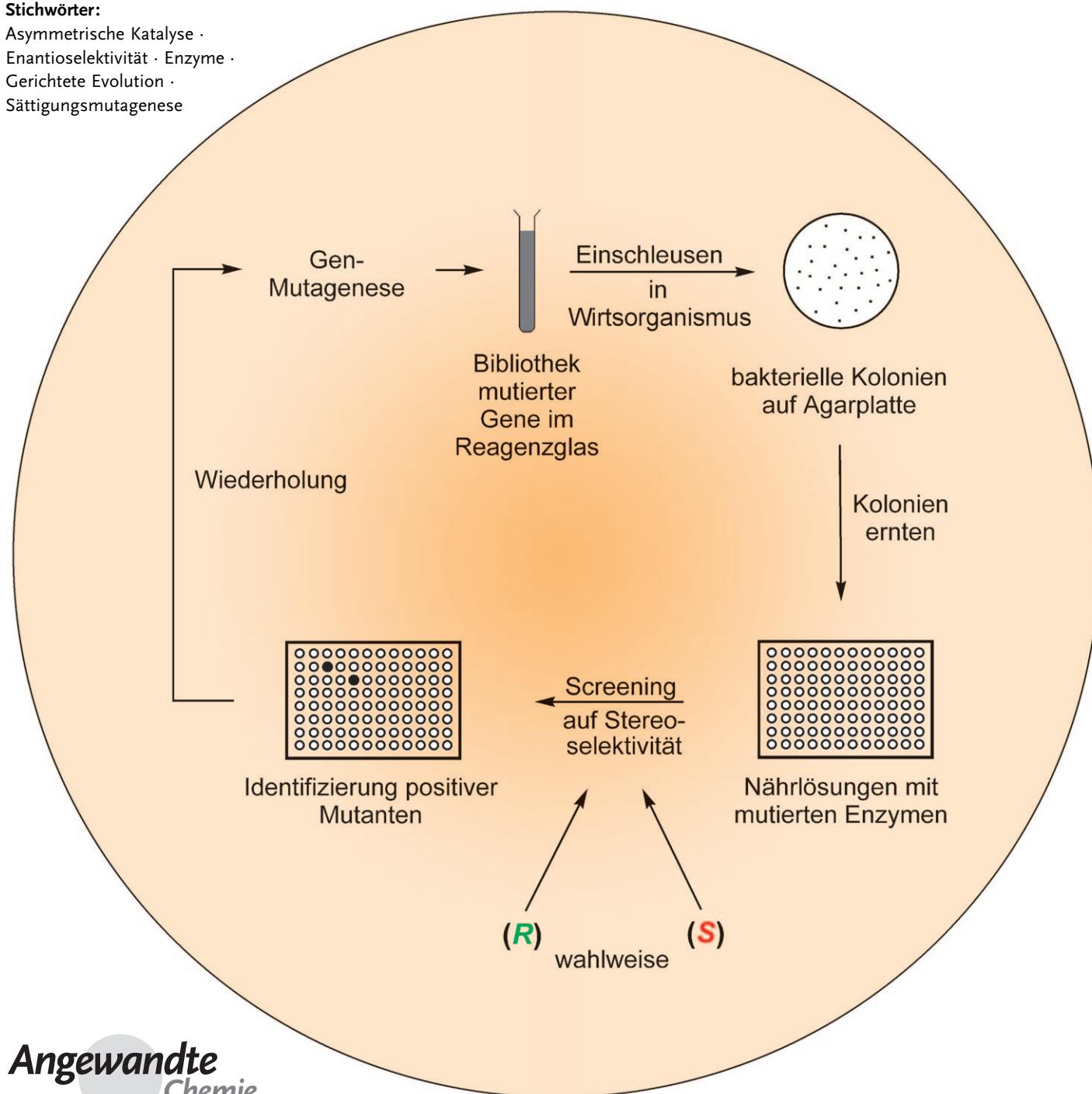


Gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme: Eine ergiebige Katalysator-Quelle für asymmetrische Reaktionen

Manfred T. Reetz*

Stichwörter:

Asymmetrische Katalyse ·
Enantioselektivität · Enzyme ·
Gerichtete Evolution ·
Sättigungsmutagenese



Asymmetrische Katalyse spielt eine Schlüsselrolle in der modernen synthetischen organischen Chemie, wobei künstliche Katalysatoren und Enzyme die zwei wichtigsten Optionen darstellen. Die Verwendung von Enzymen in der organischen Chemie und Biotechnologie hat in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts stark zugenommen, oft blieb jedoch der Anwendungsbereich aus mehreren Gründen eingeschränkt. Dazu gehören begrenzte Substratakzeptanz, geringe oder fehlende Stereoselektivität, unzureichende Stabilität und manchmal Produktinhibierung. Während der vergangenen 15 Jahre wurde die genetische Technik der gerichteten Evolution so weit entwickelt und verfeinert, dass all diese Probleme angegangen und in der Regel gelöst werden können. Sie basiert auf wiederholende Zyklen von Genmutagenese, Expression und Screening (oder Selektion). Der vorliegende Aufsatz fokussiert auf gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme, ein fundamental neuer Ansatz zur asymmetrischen Katalyse. Der Schwerpunkt liegt auf Methodenentwicklung in dem Bemühen, diese Art der Katalysator-Optimierung einfacher, schneller und effizienter als in der Vergangenheit zu gestalten. Die neueren Methoden bescheren dem Chemiker und dem Biotechnologen robuste und selektive Katalysatoren für eine Vielzahl von nützlichen Anwendungen.

Aus dem Inhalt

1. Einführung	145
2. Erste Beispiele für gerichtete Evolution enantioselektiver Enzyme	148
3. Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) als wirksame Strategie in der gerichteten Evolution	153
4. Sättigungsmutagenese an distalen Orten jenseits der Bindungstasche	169
5. ISM zur Erhöhung der Thermostabilität von Enzymen	174
6. Lektionen aus der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme	175
7. Schlussfolgerungen und Perspektiven	176

1. Einführung

Methodenentwicklung in der synthetischen organischen Chemie beschert dem Chemiker einen immer größer werdenden Werkzeugkasten bestehend aus Reagentien, Katalysatoren und Techniken, die effiziente Stoffumwandlungen ermöglichen und somit zum ökonomischen und ökologischen Fortschritt in der industriellen Chemie beitragen. Asymmetrische Katalyse spielt bei diesem Bemühen eine zentrale Rolle, wobei synthetische Katalysatoren^[1] und Enzyme^[2] die zwei wichtigsten Optionen sind. Gegenwärtig ist es unmöglich, allgemeine Richtlinien für die beste Wahl eines chiralen Katalysators zu empfehlen, denn die Entscheidung hängt von der Natur der jeweiligen Problemstellung ab. So spielt es z. B. eine Rolle, ob der Katalysator im kleinen Labormaßstab oder in einem industriellen Verfahren eingesetzt werden soll. Enzyme sind nicht dazu befähigt, die vielen präparativ nützlichen Stoffumwandlungen zu katalysieren, die Übergangsmetallkatalysatoren ermöglichen, wie es z. B. bei der Synthese komplexer Naturstoffe praktiziert wird!^[3] Vielmehr sind sie auf Reaktionen der Standard-Enzymtypen beschränkt, nämlich Oxidoreduktasen (Reduktion bzw. Oxidation), Transferasen (Transfer von Aldehyd-, Keton-, Acyl-, Zucker-, Phosphoryl- oder Methylgruppen), Hydrolyse (Spaltung oder Bildung von Estern, Amiden, Lactonen, Lactamen, Epoxiden, Nitrilen, Anhydriden, Glycosiden), Lyasen (Addition/ Eliminierung von kleinen Molekülen), Isomerasen (Isomerisierung, z. B. Racemisierung, Epimerisierung) und Ligasen (Bildung von C-C-, C-O-, C-S-, C-N-Bindungen). Dies ist alles, was die Natur benötigt, um einfache und hoch komplexe

Moleküle zu synthetisieren! Kann dies jemals von Chemikern erreicht werden unter ausschließlicher In-vitro-Verwendung von Enzymen?

Die Anwendung von Enzymen in der synthetischen organischen Chemie und Biotechnologie leidet traditionell an folgenden Einschränkungen.^[2] 1) Eine gegebene Verbindung wird aufgrund zu enger Substratbreite des Enzyms nicht akzeptiert. 2) Die Enzymaktivität ist zufriedenstellend, aber die Stereoselektivität erweist sich als unzureichend. 3) Das Enzym ist nicht stabil genug, um unter den Prozessbedingungen das volle Katalysepotential zu entfalten. 4) Produktinhibierung verhindert hohen Umsatz (geringe TON).

Während der letzten 10–15 Jahre wurde die genetische Technik der gerichteten bzw. gelenkten In-vitro-Evolution so weit entwickelt und verfeinert, dass all diese Probleme angegangen werden können.^[4] Die Methode, oft auch als „Evolution im Reagenzglas“ genannt, versucht die natürliche Evolution zu imitieren, indem wiederholende Zyklen von Genmutagenese, Expression und Screening (oder Selektion) durchlaufen werden, bis die gewünschte Verbesserung des Biokatalysators erreicht worden ist. Die zugrundeliegende

[*] Prof. Dr. M. T. Reetz

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+ 49) 208-306-2985
E-Mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de
Homepage: http://www.mpi-muelheim.mpg.de/mpikofo_home.html

Logik ist völlig anders als bei der herkömmlichen Form des Protein-Engineerings unter Verwendung der lange bekannten ortsspezifischen Mutagenese, die auf rationalem Design beruht, jedoch keineswegs allgemein wirksam ist.^[5] In der Anfangsphase der gerichteten Evolution stand das Ziel im Vordergrund, die Stabilität von Enzymen zu erhöhen.^[6,7] Kurz danach fing meine aus organischen Chemikern bestehende Gruppe an, sich ebenfalls für gerichteten Evolution zu interessieren, jedoch in Bezug auf eine ganz andere katalytische Eigenschaft, nämlich Enantioselektivität.^[8] Danach wird das Gen eines stereo-unselektiven Enzyms einer geeigneten Genmutagenese unterworfen mit Bildung einer so genannten Genbibliothek, die im anschließenden Schritt in einen bakteriellen Wirt wie z.B. *Escherichia coli* eingeschleust wird. Nach dem Ausplattieren auf Agarplatten werden die Transformanten geerntet, exprimiert und mit einem Screeningverfahren auf Stereoselektivität einer gegebenen asymmetrischen Reaktion getestet. Das Gen einer verbesserten Mutante dient dann als Ausgangspunkt (Templat) für einen weiteren Zyklus. Der evolutionäre Prozess wird so lange fortgeführt, bis das gewünschte Ausmaß an Stereoselektivität erreicht worden ist (Schema 1).^[8,9] Es ist der Verlass auf den

Bei der Verwirklichung dieses Darwinistischen Ansatzes zur asymmetrischen Katalyse galt es, zwei Herausforderungen zu meistern. Erstens mussten wir Hochdurchsatz-*ee*-Assays entwickeln, die damals nicht existierten.^[8-10] Zweitens war es erforderlich, effiziente Strategien zum Durchmustern des Protein-Sequenzraumes zu entwickeln, denn dies steht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Screeningaufwand. Bis heute ist Screening der Engpass der gerichteten Evolution, sei es bei der Bestimmung der Stereoselektivität, der Aktivität oder der Thermostabilität. Die Zahl der Enzymvarianten (Mutanten) N eines aus X Aminosäuren bestehenden Enzyms wird bei maximaler Diversität vom Algorithmus $N = 19^M X!/(X-M)!M!$ beschrieben, wobei M für die Gesamtzahl von Aminosäuresubstitutionen pro Enzym-Molekül steht.^[4] Wendet man dies z.B. auf ein aus 300 Aminosäuren bestehendes Enzym an, so ergeben sich unter Berücksichtigung von 20 proteinogenen Aminosäuren 5700 mögliche Mutanten wenn nur eine Aminosäure ausgetauscht wird, eine Zahl, die bei zwei oder drei Austauschprozessen auf 16 Millionen bzw. 30 Milliarden ansteigt.^[4]

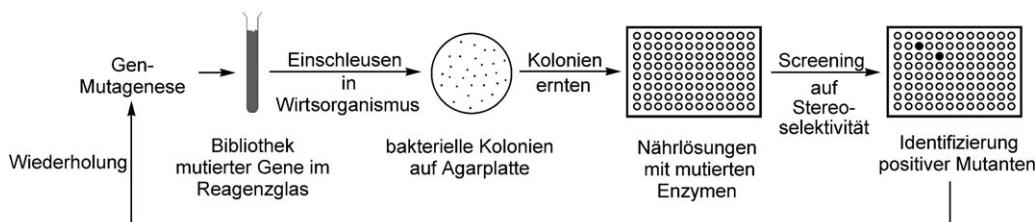
Ursprünglich wurde Zufallsmutagenese mithilfe von Chemikalien, Licht oder Mutatorstämmen induziert.^[4] Heute

ist die meist verwendete Genmutagenesemethode die so genannte fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (epPCR), bei der die Genauigkeit des PCR-Prozesses durch Variation der $MgCl_2$ -Konzentration (oder $MnCl_2$) und/oder der Nucleotidmengen gezielt gestört wird.^[4,11]

Die Fehlerrate kann

empirisch gesteuert werden. Im Zuge der ersten Beispiele für genetische Enzymoptimierung^[6] wurden bestimmte Genmutagenesemethoden angewendet, um die Thermostabilität von Enzymen zu erhöhen. Jedoch wurden, mit wenigen Ausnahmen,^[6f] lediglich Mutanten der ersten Generation erzeugt bzw. getestet, was (noch) keine Evolution beinhaltet. In einer wichtigen, im Jahre 1993 erschienenen Arbeit beschrieben Arnold und Mitarbeiter mehrere epPCR-Zyklen bei niedriger Mutageneserate, um die Robustheit der Protease Subtilisin E in Gegenwart des enzymschädigenden Lösungsmittels Dimethylformamid zu erhöhen.^[7] Da epPCR auf das gesamte Gen bzw. Enzym zielt, kann es als „Schrotflinten-Methode“ bezeichnet werden.^[4] Aufgrund der Entartung des genetischen Codes und anderer Faktoren werden jedoch manche Aminosäuren bevorzugt bzw. andere benachteiligt.^[12]

Eine völlig andere Vorgehensweise ist DNA-Shuffling, eine von Stemmer^[13-14] entwickelte rekombinante Methode, in der z.B. zunächst zwei Gene mithilfe einer DNase zerlegt werden unter Bildung von doppelsträngigen Oligonucleotidfragmenten aus 10–50 Basenpaaren.^[4] Diese werden im Zuge eines PCR-Prozesses amplifiziert. Wiederholende Zyklen von Strangtrennung und Zusammenführung („reannealing“) in Gegenwart einer DNA-Polymerase gefolgt von einer abschließenden PCR-Amplifizierung führen zur Zusammen-



Schema 1. Einzelne Stufen der gelenkten Evolution stereoselektiver Enzyme.^[8,9]

evolutionären Druck, der diesen Ansatz als „rational“ erscheinen lässt, ganz anders als bei der herkömmlichen Entwicklung von synthetischen chiralen Katalysatoren. Letztere beruht auf korrekter Abschätzung sterischer und elektronischer Effekte oder auf kombinatorischen Methoden.^[1]

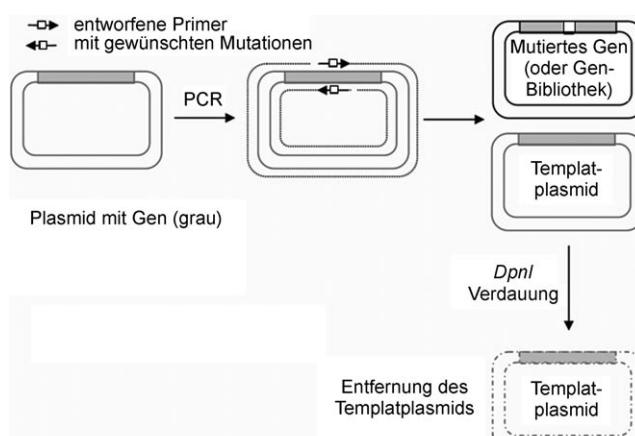


Manfred T. Reetz wurde 1943 in Deutschland geboren, studierte Chemie in den USA (1965 Bachelor an der Washington University/St. Louis und 1967 Master an der University of Michigan/Ann Arbor), um dann bei Ulrich Schöllkopf 1969 in Göttingen zu promovieren. Nach einem Postdoktorat bei Reinhard W. Hoffmann in Marburg habilitierte er sich dort im Jahre 1974 und trat danach eine C3-Professur in Bonn an. Ab 1980 wirkte er als C4-Professor für Organische Chemie an der Universität Marburg. 1991 wechselte er an das Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr, das er als Geschäftsführender Direktor

1993–2002 umstrukturierte mit der Bildung von fünf Abteilungen. Als Direktor der Abteilung Synthetische Organische Chemie forscht er auf dem Gebiet der gerichteten Evolution stereoselektiver Enzyme und der kombinatorischen Übergangsmetallkatalyse.

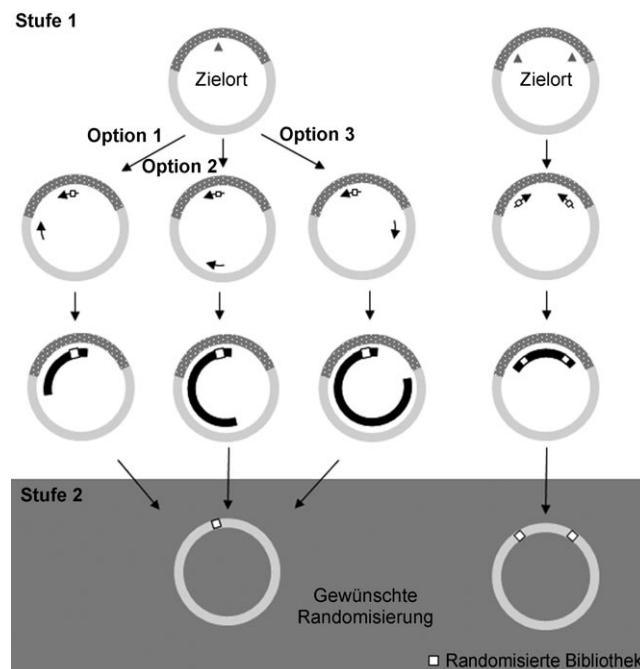
setzung vollständiger Genmutanten. „Family Shuffling“ ist eine besonders effiziente Variante, in der homologe Gene verschiedener Spezies gewählt werden unter Bildung von Mutantenbibliotheken, die durch hohe katalytische Diversität charakterisiert sind.^[14]

Eine weitere häufig genutzte Methode ist die Sättigungsmutagenese, manchmal auch als Kassettenmutagenese oder kombinatorische Sättigungsmutagenese bekannt.^[4,15] Sie beinhaltet die Aminosäure-Randomisierung an einer vorherbestimmten Position im Enzym, was die Einführung aller weiteren 19 proteinogenen Aminosäuren unter Bildung fokussierter Mutantenbibliotheken bedeutet. Die Erweiterung durch gleichzeitige Randomisierung von zwei oder mehreren Aminosäurepositionen, also Sättigungsmutagenese an einem im Enzym definierten Ort („site“) ist ebenfalls möglich. Sättigungsmutagenese basiert auf strukturellen, mechanistischen und/oder bioinformatischen Daten, denn nur so kann die passende Wahl der vermutlichen Randomisierungsorte sinnvoll getroffen werden. Es geht um ein Zusammenspiel von rationalem Design und „blinder“ Evolution. Seit Mitte der 1980er Jahre wurden viele molekularbiologische Varianten der Sättigungsmutagenese entwickelt, allgemein unter Verwendung entsprechender Oligonucleotide.^[4,15] Entartete Primer müssen entworfen und (kommerziell) hergestellt werden, mit denen die genetische Information entsprechend den gewünschten bzw. codierten Mutationen in das Plasmid eines Enzyms eingeführt wird. Die gegenwärtig am häufigsten genutzte Methode ist das sogenannte QuikChange-Protokoll von Stratagene,^[16] das auf ältere Arbeiten aufbaut.^[4,15] Ursprünglich wurde es zur konventionellen ortsspezifischen Einführung einer bestimmten Aminosäure entwickelt, QuikChange kann jedoch auch zur gleichzeitigen Randomisierung von bis zu fünf Aminosäurepositionen genutzt werden. Die Vorgehensweise ist in Schema 2 skizziert. Meistens wählt man NNK-Codon-Degeneration (N: Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin; K: Guanin/Thymin), die alle gängigen 20 proteinbildenden Aminosäuren codieren. Alternative Codon-Degenerationen sind ebenfalls möglich, insbesondere wenn ein reduziertes Aminosäure-Alphabet verwendet werden soll (Abschnitt 3.3).



Schema 2. Die experimentellen Stufen der Sättigungsmutagenese nach dem QuikChange-Verfahren.^[16]

In manchen Fällen funktioniert das QuikChange-Verfahren nicht.^[17] Es gelang uns z. B. nicht, zwei deutlich voneinander ferngelegene Orte gleichzeitig zu randomisieren, ferner verursachten große Plasmide ähnliche Probleme. Um solche schwer zu amplifizierenden Template dennoch erfolgreich zu nutzen, modifizierten und erweiterten wir vorangegangene Methoden unter Verwendung von nicht-überlappenden Oligonucleotiden.^[15d–f] Das aus zwei Stufen bestehende Verfahren ist in Schema 3 dargestellt.^[17] In der



Schema 3. Methode zur Sättigungsmutagenese schwer zu amplifizierender Template.^[17] Gestrichelte Teile repräsentieren das Gen; hellgrau: Vektor-Rückgrat; schwarz: gebildeter Megaprimer. In der ersten Phase der PCR lagern sich sowohl der mutagene Primer (weiße Vierecke) deuten randomisierte Positionen an) als auch der Antiprimer (oder ein weiterer mutagener Primer, im rechten Teil des Schemas) an das Template an, und die amplifizierte Sequenz wird als Megaprimer in der zweiten Stufe verwendet. Schließlich wird das Templateplasmid mit *Dpn*I verdaut und die resultierende Bibliothek in einem bakteriellen Wirt transformiert. Das Schema auf der linken Seite illustriert die drei verschiedenen Optionen bei der Wahl der Megaprimergröße für die Randomisierung an einem einzigen Ort. Das Schema rechts zeigt die Vorgehensweise für den Fall einer simultanen Randomisierung an zwei Orten.

ersten Stufe verbinden sich sowohl der mutagene Primer und der Antiprimer, die nicht komplementär sind, mit dem Template. Die amplifizierte Sequenz wird dann in der zweiten Stufe als Megaprimer verwendet. In diesem einfachen Vorgang können Orte bestehend aus einer oder mehrerer Aminosäurepositionen in einem einzigen PCR-Schritt randomisiert werden, und zwar unabhängig von ihrer Position in der Gensequenz. In einer vergleichenden Studie wurden die Vorteile dieser neuen Methode relativ zum QuikChange-Verfahren und verwandten Techniken unter Verwendung von vier verschiedenen Enzymen beleuchtet (Lipasen aus *Candida antarctica* und *Pseudomonas aeruginosa*, Epoxidhydro-

lase aus *Aspergillus niger* sowie P450-BM3).^[17] Wir haben für solche „schwierigen“ Template auch ein zweites Verfahren zur Sättigungsmutagenese entwickelt und auf die Enoat-Reduktase YqjM erfolgreich angewendet (Abschnitt 3.4).^[18] Es basiert auf der von Li und Elledge entwickelten Klonierungsmethode (SLIC), die von Sequenz und Ligation unabhängig ist.^[19] Ein Satz von Primern bestehend aus den gewünschten degenerierten Codons wird eingesetzt, um einen Teil des YqjM-Gens zu amplifizieren, wobei pET21a-YqjM als Templat dient. Danach werden der Rest des Gens und der Vektor mit einem zweiten Satz von Primern amplifiziert, die etwa 30 Nucleotid-Identitäten mit dem ersten Paar aufweisen. Nach Eliminierung des Templaats werden die beiden PCR-Produkte getrennt mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Ferner werden der Vektor und der Pool von degenerierten Inserts neu gemischt und in *E. coli*-RecA inkubiert, ein Verfahren, das die Zusammensetzung von homologen Einzelsträngen *in vitro* unterstützt. Schließlich erfolgt die Transformation im *E. coli*-DH5 α -Stamm.^[18]

Die Größe einer Bibliothek kann zwischen mehreren hundert und einigen Millionen variieren, je nachdem, wieviel Laborarbeit investiert werden soll.^[4] Im Falle sehr großer Bibliotheken entstehen empfindliche Screeningprobleme,^[10] insbesondere wenn es um Enantioselektivität geht. Im Prinzip können Selektionssysteme sehr große Zahlen bewältigen (10^6 – 10^7),^[4] jedoch müssen diese so konzipiert sein, dass der Wirtsorganismus immer dann einen Wachstumsvorteil erfährt, wenn er eine Mutante mit verbessertem katalytischen Profil beherbergt. Leider ist die Entwicklung effizienter Selektionssysteme keine triviale Aufgabe, insbesondere wenn es um die Verbesserung der Stereoselektivität geht. Tatsächlich wurde trotz gewisser Fortschritte noch keine allgemein gültige Lösung dieses Problems gefunden.^[21]

Die von uns und anderen Arbeitsgruppen entwickelten *ee*-Screeningsysteme wurden an anderer Stelle zusammengefasst.^[9c, 10] Zur Illustration sei hier lediglich das Mülheimer Verfahren erwähnt, das auf Massenspektrometrie (MS) basiert und in günstigen Fällen etwa 5000 *ee*-Bestimmungen pro Tag ermöglicht.^[22] Da Enantiomere identische Massen aufweisen, können die relativen Mengen einer (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Verbindung mit konventionellen MS-Techniken nicht bestimmt werden. Sind jedoch die Substrate isotopenmarkiert, dann können die Unterschiede in den Massenspektren von Pseudoenantiomeren problemlos detektiert bzw. die Peaks integriert werden. Die Methode ist auf Desymmetrisierung von *meso*-Verbindungen mit reaktiven enantiotopen Gruppen und auf kinetische Racematspaltungen beschränkt. Allerdings muss die Versuchsanordnung für jedes neue Substrat und Produkt optimiert werden. Ferner ist ein relativ teures MS-Instrument mit Multiplexing-Einrichtung erforderlich. Bislang wurde noch kein allgemein anwendbares *ee*-Screeningsystem entwickelt, ein Hinweis darauf, dass die Forschung auf diesem anspruchsvollen Gebiet weitergehen muss. Mitteldurchsatz bedeutet *ee*-Screening von typischerweise 300–800 Proben pro Tag, was häufig mit automatisierter Gaschromatographie (GC)^[23a] oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)^[23b] möglich ist. Im Falle von fokussierten Mutantenbibliotheken hoher Qualität reicht dies aus (Abschnitt 3). Es ist stets

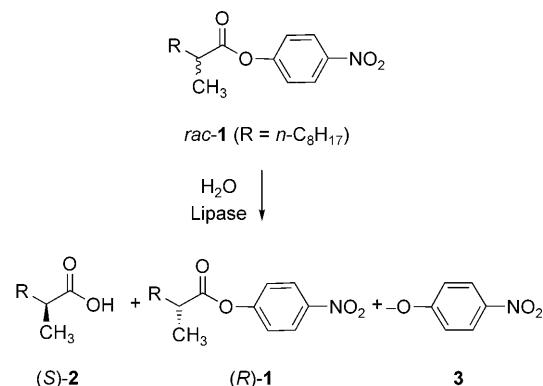
ratsam, Vorabtests für Aktivität vorzuschalten, vorzugsweise direkt auf den Agarplatten.^[10b]

Eine völlig andere Vorgehensweise, um das entscheidende Problem des Hochdurchsatz-Screenings zu lösen, bezieht sich auf Pooling. Dabei werden multiple Proben simultan analysiert, gefolgt von Dekonvolution solcher Pools, die die Anwesenheit von Treffern bzw. verbesserten Mutanten („Hits“) signalisieren. Ein interessanter Ansatz wurde von Bommarius beschrieben, der auf Monte-Carlo-Simulationen beruht.^[24] Im Allgemeinen ist dabei ein empfindlicher Aktivitätstest erforderlich. Die Technik dürfte immer dann erfolgreich sein, wenn die Hintergrundaktivität minimiert wird, sodass eine zuverlässliche Detektion kleiner Aktivitätssteigerungen gewährleistet wird. Kürzlich haben wir eine alternative Poolingstrategie beschrieben (Abschnitt 3.4.1).^[18]

Der Schwerpunkt des vorliegenden Aufsatzes liegt auf Methodenentwicklung zur Steigerung der Effizienz der gerichteten Evolution. Rasche Gewinnung von stereoselektiven (Bio)katalysatoren ist nicht nur eine Aufgabe der Grundlagenforschung. Auch die Industrie benötigt einen zuverlässigen Zugang zu katalytischen Prozessen innerhalb definierter Zeitspannen.

2. Erste Beispiele für gerichtete Evolution enantioselektiver Enzyme

In einer „proof-of-principle“-Studie stellten wir uns das Ziel, die Enantioselektivität der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) als Katalysator bei der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung des Esters **rac-1** zu erhöhen.^[8] Wildtyp(WT)-PAL zeigt einen Selektivitätsfaktor von nur $E = 1.1$ zugunsten von (*S*)-**2** (Schema 4). Nach vier epPCR-



Schema 4. Hydrolytische Racematspaltung von *rac-1* katalysiert durch PAL-Mutanten.^[8]

Zyklen bei niedriger Fehlerrate konnten wir eine Mutante mit vier Punktmutationen Val47Gly/Ser149Gly/Ser155Leu/Phe259Leu und einem Selektivitätsfaktor von $E = 11$ identifiziert.

Da die fünfte epPCR-Runde nur eine geringe Steigerung der Enantioselektivität bewirkte ($E=13$), galt es, bessere Strategien zu entwickeln. Daher investierten wir mehrere Jahre der Forschung, um verschiedene Ansätze zu testen,

unter anderem Sättigungsmutagenese an den vier im epPCR-Vorgang identifizierten empfindlichen Stellen („hot spots“).^[25] In einem Fall erwies sich das Prozedere als erfolgreich, speziell als Folge der Randomisierung an Position 155 weit entfernt vom aktiven Zentrum des Enzyms ($E=20$), in anderen Fällen konnten jedoch keine verbesserten Mutanten gefunden werden. Die Idee, auf epPCR-identifizierte „hot spots“ zu fokussieren, wurde auch von Arnold und Miyazaki in einer Studie zur Thermostabilisierung experimentell realisiert.^[26] Seitdem wurde diese Strategie des Öfteren in der gerichteten Evolution angewendet. Sie leidet jedoch unter dem Nachteil, dass epPCR allgemein zur Akkumulation von überflüssigen Mutationen führt, sodass Sättigungsmutagenese nicht immer positiv verläuft.

In einem zukunftsträchtigen Experiment wurde eine fokussierte Mutantenbibliothek durch Sättigungsmutagenese an einem Ort bestehend aus Aminosäurepositionen 160–163 direkt neben der Bindungstasche von PAL generiert (Abbildung 1).^[28] Dazu wurde die übliche NNK-Codon-Degenera-

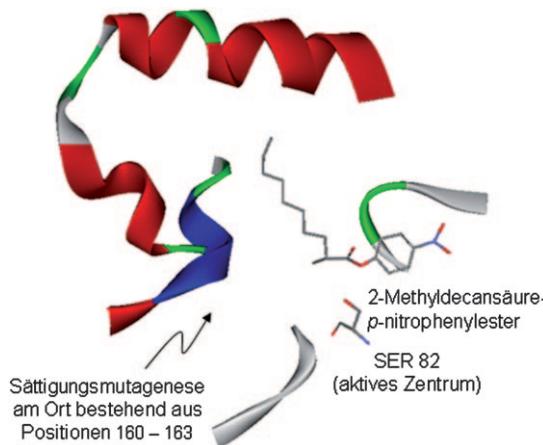


Abbildung 1. PAL-Bindungstasche,^[27] die den Säure-Teil von *rac-1* beherbergt. Gekennzeichnet ist der Aminosäure-Abschnitt 160–163, der durch Sättigungsmutagenese simultan randomisiert wurde, um die Enantioselektivität der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von *rac-1* zu steigern.^[28] Ser82 als Teil der katalytischen Triade Asp/His/Ser greift im geschwindigkeits- und konfigurationsbestimmenden Schritt nucleophil die Carbonylfunktion an unter Bildung eines kurzlebigen Oxyanions.

tion verwendet. Nach dem Screening von 5000 Transformanten wurde eine Mutante Glu160Ala/Ser161Asp/Leu162Gly/Asn163Phe mit einem E -Wert von 30 identifiziert. Dies war der erste Fall einer fokussierten Bibliothek, die durch Sättigungsmutagenese direkt an der Bindungstasche eines Enzyms mit dem Ziel generiert wurde, die Enantioselektivität zu steigern.^[28] Das positive Ergebnis diente als Zeichen dafür, dass Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums einen größeren Einfluss auf die Stereoselektivität ausüben als solche, die ferngelegen sind. Unsere Vermutung wurde später durch eine statistische Analyse von Kazlauskas et al. untermauert,^[29] und es ist eine heute allgemein akzeptierte Hypothese, die in jüngster Zeit durch eine Studie von Dalby et al. erneut bestätigt wurde.^[30]

In weiteren Versuchen berücksichtigen wir erneut den Ort 155/162 und generierten als Folge der simultanen Randomisierung zwei Mutanten mit E -Werten von 30 bzw. 34.^[28] Diese und andere frühe Versuche in unseren Laboratorien suggerierten, dass Randomisierung an einer Stelle gefolgt von Mutagenese durch epPCR oder erneuter Randomisierung eine nützliche Strategie zum Durchmustern des Protein-Sequenzraumes ist.^[25,28] Jedoch haben wir diesen Ansatz erst einige Jahre später mit der Entwicklung der iterativen Sättigungsmutagenese (ISM)^[31] systematisiert (Abschnitt 3), eine Vorgehensweise, die sich als weitaus erfolgreicher als ursprünglich angenommen erwiesen hat!

Die beste PAL-Mutante ($E=51$) wurde evolviert durch eine Strategie bestehend aus epPCR bei hoher Fehlerrate in Kombination mit DNA-Shuffling unter simultaner Randomisierung an den Positionen 155/162.^[28] Die (S)-selektive Mutante ist durch sechs Punktmutationen gekennzeichnet, wobei nur eine (Leu162Gly) in der Nähe der Bindungstasche gelegen ist. Dies überraschte uns, verbindet man doch Enantioselektivität mit Emil Fischers Schloss-Schlüssel-Prinzip. Eine QM/MM-Studie deckte nicht nur den Ursprung der erhöhten Enantioselektivität auf („Relay“-Mechanismus), sie sagte auch voraus, dass von den sechs Punktmutationen nur zwei erforderlich sein dürften, nämlich Ser53Pro und Leu162Gly.^[32] Sodann wurde die Doppelmutante mit konventioneller ortsspezifischer Mutagenese generiert, wobei sich herausstellte, dass sie mit $E=63$ (S) sogar noch enantioselektiver ist! Wir betrachteten dies als Triumph der Theorie, wurden jedoch angesichts der Anhäufung von vier überflüssigen Mutationen davon überzeugt, dass unsere bisherige Mutagenese-Strategie nicht wirklich effizient sein konnte.^[32b] Wie schon dargelegt, dürften überflüssige Mutationen in der gerichteten Evolution gar nicht so ungewöhnlich sein, obgleich diese Facette nur selten beleuchtet wird.^[4] Die Entstehung solcher Mutationen bedeutet überflüssiges Arbeiten im Labor sowie Mehraufwand beim Screening. Auf dem Weg zur besten PAL-Mutante mussten etwa 50000 Transformanten gescreent werden.^[4f,28] In ähnlicher Weise gelang uns die Umkehrung der Richtung der Enantioselektivität. So evolvierten wir (R)-selektive PAL-Mutanten mit E -Faktoren von 4–5,^[9b] und kurz darauf eine Variante mit $E=30$ (R).^[33]

Mit den oben skizzierten Strategien wandten wir uns anderen Enzymen zu, insbesondere Monooxygenasen für enantioselektive Baeyer-Villiger(BV)-Reaktionen^[34] und Sulfoxidationen von prochiralen Thioethern.^[23b] Biochemiker hatten schon vor langer Zeit den Mechanismus von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (BVMOs) weitestgehend aufgeklärt,^[35] und organische Chemiker haben diese Enzyme bei etlichen Desymmetrisierungsreaktionen prochiraler Ketone und/oder bei oxidativen kinetischen Racematspaltungen unter selektiver Bildung von enantiomeren Estern oder Lactonen angewendet.^[36] Die am häufigsten eingesetzte BVMO ist Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO) aus *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871. Wie auch bei anderen BVMOs handelt es sich um ein Enzym mit einer Flavin-(FAD)- und einer NADPH-Bindungsdomäne.^[35,36] Das enzymgebundene FAD reagiert mit Sauerstoff unter Bildung eines Alkylhydroperoxids, das sich nucleophil an die Carbo-

nylfunktion des Ketons anlagert unter Entstehung des Criegee-Intermediats, gefolgt von der üblichen Fragmentierung/Umlagerung und Freisetzung des Esters oder Lactons. Reduktion des oxidierten Flavins durch NADPH regeneriert das aktive FAD. Zum Zeitpunkt unserer ersten Studie über gerichtete Evolution enantioselektiver BVMOs existierte noch keine einzige Röntgenstrukturanalyse einer BVMO.^[34] Daher waren wir gezwungen, epPCR anzuwenden. Als Enzym wählten wir CHMO und als Testreaktion die oxidative Desymmetrisierung von 4-Hydroxycyclohexanon. Zu jener Zeit setzten wir uns das anspruchsvolle Ziel, die wenig selektive WT-CHMO ($ee = 9\%$ (*R*)) in hoch (*R*)- und (*S*)-selektive Mutanten wahlweise umzuwandeln. Dies gelang auch, wobei mehrere (*R*)- und (*S*)-selektive Mutanten evolviert werden konnten mit Enantioselektivitäten im Bereich von jeweils 80–90 %.^[34]

Die Generierung von (*R*)- und (*S*)-selektiven CHMO-Mutanten auf optionaler Basis ist ein weiteres beachtenswertes Beispiel für gerichtete Evolution. Mindestens so eindrucksvoll wäre es jedoch, wenn eine gegebene Mutante eine breite Substratazeptanz aufweisen würde. Deshalb prüften wir z. B. die Einzelmutante Phe432Ser als Katalysator bei der BV-Reaktion weiterer Ketone, so auch 4-substituierte Cyclohexanonderivate (Methyl, Ethyl, Methoxy, Chlor, Brom, Iod). Tatsächlich erwiesen sich alle BV-Desymmetrisierungen als hoch enantioselektiv ($ee = 95\text{--}99\%$).^[34] Später wurde die gleiche Mutante bei strukturell recht unterschiedlichen Ketonen ebenfalls erfolgreich getestet (Tabelle 1).^[37] Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass das klassische Credo der gerichteten Evolution, „you get what you screen for“,^[4] ergänzt werden muss durch den Folgesatz, „you may get more than what you screen for“. Gerade Chemiker benötigen Katalysatoren, die nicht nur für eine einzige Verbindung bzw. Reaktion wirksam sind.

In einem parallelen Projekt untersuchten wir mit der gleichen epPCR-Strategie die asymmetrische CHMO-katalysierte Sulfoxidation von prochiralen Thioethern des Typs **4** unter Bildung des entsprechenden chiralen Sulfoxids **5** (Schema 5).^[23b] WT-CHMO zeigt eine Enantioselektivität von nur 14 % *ee* zugunsten von (*R*)-**5**. Mehrere hoch (*R*)- und (*S*)-selektive Mutanten konnten evolviert werden (jeweils 98–

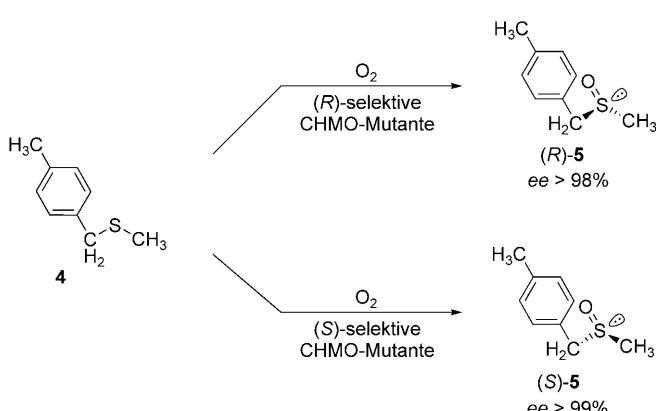
Tabelle 1: Oxidative Desymmetrisierung von Substraten unter Verwendung der CHMO-Mutante 1K2-F5 (Phe432Ser) mit Luftsauerstoff als Oxidationsmittel in einem Ganzzellenprozess.^[37]

Substrat	<i>ee</i> [%]
	94
	99
	91
	97
	78
	96
	> 99
	> 99
	> 99
	99 ^[a]

[a] Unveröffentlichte Ergebnisse von C. Clouthier, M. M. Kayser und M. T. Reetz.

99 % *ee*). Somit wird abermals demonstriert, dass gerichtete Evolution nicht nur die Erhöhung, sondern auch die Umkehrung der Stereoselektivität einer enzymkatalysierten Reaktion möglich macht. Interessanterweise zeigte sich, dass eine der besten (*R*)-selektiven Mutanten (Phe432Ser) mit 99 % *ee* die gleiche ist, die wir in dem ersten Projekt zur Steuerung der BVMO-Stereoselektivität unabhängig identifiziert hatten. In einigen Fällen wurden bei der asymmetrischen Sulfoxidation eine unerwünschte Überoxidation unter Bildung des entsprechenden Sulfons beobachtet (bis zu 20 %).^[23b] Deshalb wurde eine zusätzliche epPCR-Runde angeschlossen, wobei im Screening auf Chemoselективität geachtet wurde. So konnte die unerwünschte Sulfonbildung auf weniger als 5 % gedrückt werden unter Beibehaltung der hohen Enantioselektivität. Dies ist das erste Beispiel für die Eliminierung einer unerwünschten Nebenreaktion mithilfe der gerichteten Evolution.

In diesen und in anderen BVMO-katalysierten asymmetrischen Transformationen werden üblicherweise ganze Zellen verwendet, sodass die Notwendigkeit eines In-vitro-NADPH-Regenerationssystems entfällt.^[34–37] Diese Enzyme sind in der Regel zu empfindlich, als dass sie in isolierter Form problemlos eingesetzt werden können. Leider wurde die Mehrzahl der organischen Chemiker nicht dazu ausgebildet,



Schema 5: Enantioselektive Sulfoxidation mit CHMO-Mutanten unter Verwendung von Luftsauerstoff als Oxidant in einem Ganzzellenprozess.^[23b]

mit ganzen Zellen zu hantieren! Daher nahmen wir mit großem Interesse die bahnbrechenden Publikationen von Fraaije, Janssen und Mitarbeitern über die Isolierung und Charakterisierung der ersten thermostabilen BVMO zur Kenntnis, der so genannten Phenylaceton-Monoxygenase (PAMO).^[38] Sie ist auch die erste, die mit einer Röntgenstrukturanalyse charakterisiert wurde, wie Malito, Mattevi et al. berichteten.^[39] Wir spekulierten, dass diese Entdeckung eine neue Tür auf dem Gebiet der BVMO-Forschung öffnen würde, käme doch die Möglichkeit in Betracht, isolierte PAMO in Verbindung mit einem In-vitro-NADPH-Regenerationssystem bestehend aus einer robusten Alkoholdehydrogenase und Isopropylalkohol als Reduktionsmittel einzusetzen. Leider akzeptiert PAMO praktisch nur Phenylaceton und einige Arylacetonederivate. So reagiert z.B. 2-Phenylcyclohexanon extrem langsam auch bei verlängerten Reaktionszeiten mit <10% Umsatz (7 Umg⁻¹), ferner beträgt die Enantioselektivität nur *E* = 1.5. Andere Substrate wie 2-Alkylcyclohexanonderivate reagieren überhaupt nicht. Mechanistisch wurde anhand der Röntgenstrukturanalyse von PAMO vorgeschlagen, dass Arg337 das Criegee-Intermediat in der Bindungstasche des Enzyms stabilisiert.^[39] Dieser Hinweis versetzte uns in die Lage, die stereochemischen Ergebnisse der CHMO-Mutante Phe432Ser zu deuten. Ein Homologiemodell der CHMO wurde mithilfe der Röntgenstruktur der PAMO konstruiert (Abbildung 2).^[39] Wir vermuteten, das Serin in der Mutante Phe432Ser eine Wasserstoffbrücke mit Arg337 bildet, wodurch die Bindungstasche der mutierten CHMO eine neue Form annimmt.^[40] Ein wichtiger struktureller Unterschied zwischen den beiden Monoxygenasen liegt in der Tatsache, dass PAMO, nicht aber CHMO, über einen verlängerten Peptidabschnitt in Form eines Loop-Segments (Positionen 440–444) direkt neben der Bindungstasche verfügt. Diese „Ausbauung“ kann dafür verantwortlich sein, dass die üblichen bzw. größeren Substrate in der Bindungstasche von PAMO keinen Platz finden. Deshalb wendeten wir uns zunächst dem rationalen Design zu und stellten mithilfe der ortspezifischen Mutagenese Mutanten her, bei denen einige Aminosäuren im kritischen Loop fehlen. Dieser Ansatz war nur zum Teil erfolgreich,^[40] weswegen wir uns später wieder der gelenkten Evolution unter Einsatz neuer Strategien zuwendeten (Abschnitt 4.2).^[41,42]

Während der letzten zehn Jahre haben andere Arbeitskreise mitgeholfen, das Konzept der gerichteten Evolution

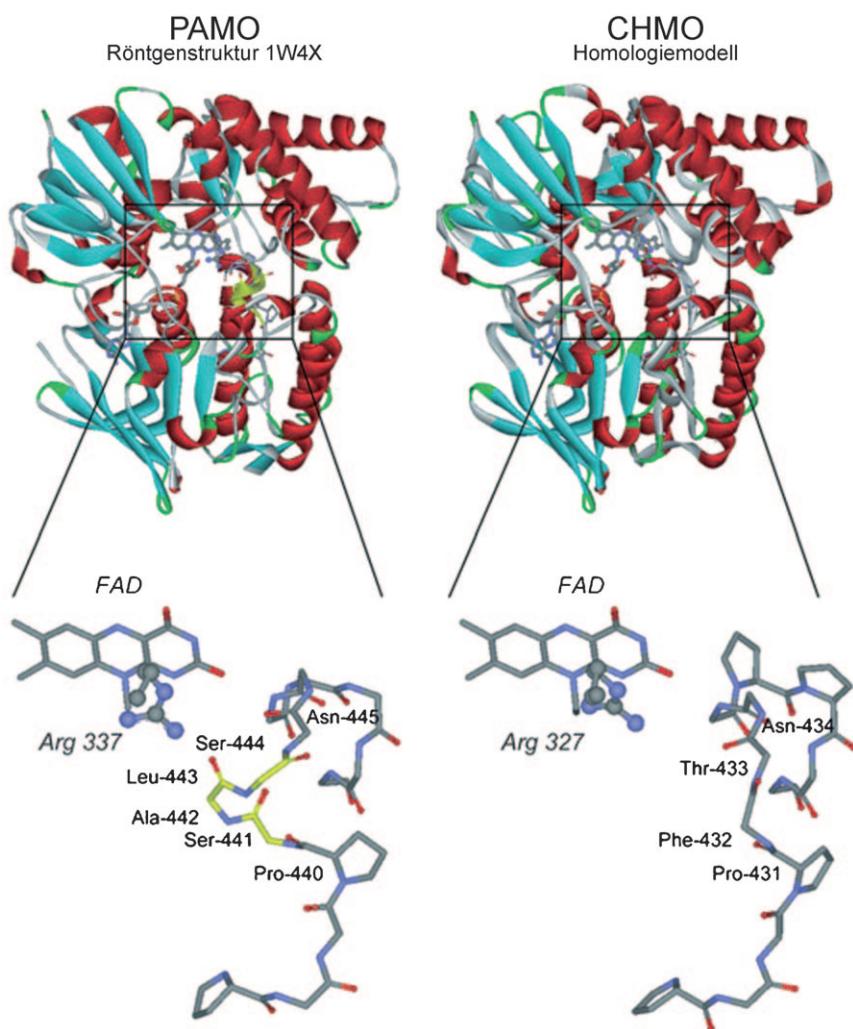
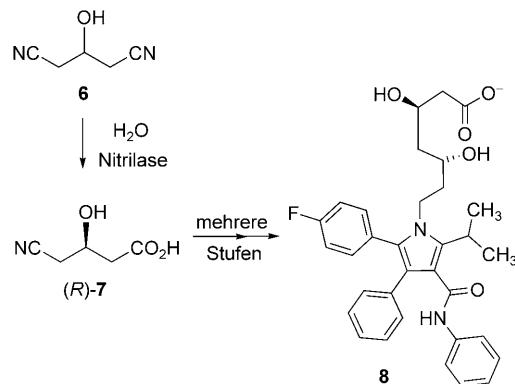


Abbildung 2. Vergleich der Kristallstruktur von PAMO^[39] (links) mit dem Homologiemodell von CHMO^[40] (rechts) mit 40% Sequenzidentität. Der obere Teil zeigt die jeweilige Faltung der beiden Enzyme, der untere Teil fokussiert auf die katalytisch aktive Stelle zusammen mit dem FAD-Cofaktor als fettgemalte Striche und dem katalytisch aktiven Arginin. Die gelbe Farbe kennzeichnet die Anwesenheit von zwei weiteren Aminosäuren in dem Arginin-stabilisierenden Loop von PAMO im Vergleich zur CHMO.

stereoselektiver Enzyme als Katalysatoren in der synthetischen organischen Chemie zu verallgemeinern unter Verwendung der oben skizzierten Mutagenese-Strategien. Diese Fortschritte schließen Enzyme ein vom Typ Esterase,^[29,43] Lipase,^[44a,b] Hydantoinase,^[45] Epoxidehydrolase,^[46] Nitrilase,^[47] Aldolase,^[48] Monoamin-Oxidase,^[49] Baeyer-Villiger-Monoxygenase,^[50] Transaminase,^[51] Benzoylformat-Decarboxylase,^[52] Phosphotriesterase,^[53] P450,^[54] Reduktase,^[55] Oxynitrilase^[56] und Meerrettich-Peroxidase.^[57] Zirkularpermutation, also die intramolekulare Neuplatzierung der C- und N-Termini eines Proteins, wurde zur Erhöhung der Enantioselektivität der Lipase aus *Candida antarctica* B (CALB) erfolgreich angewendet.^[44c] All diese Beiträge wurden anderswo in Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[58] Lediglich ausgewählte Beispiele seien hier erwähnt, um das zentrale Thema dieses Aufsatzes in den richtigen Rahmen zu stellen.

Eine wichtige Studie, die bei der Firma Diversa (Verenium) durchgeführt wurde, bezieht sich auf die gerichtete Evolution einer Nitrilase als Katalysator zur Desymmetrisierung des prochiralen Dimitrils **6** unter Bildung von (*R*)-**7**,^[47] welches als Intermediat bei der Synthese des Cholesterinsenkers Lipitor (**8**) dient (Schema 6). Die ursprünglichen

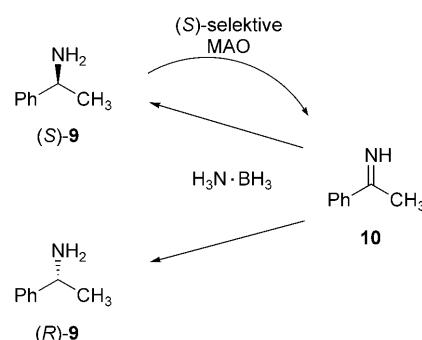


Schema 6. Bildung der chiralen Verbindung (*R*)-**7** als Baustein in der Synthese des Cholesterinsenkers Lipitor (**8**), katalysiert durch eine Nitrilase-Mutante.^[47]

Patente zum Schutz des Medikaments und des Syntheseweges laufen demnächst aus, ein Grund für Generika-Firmen in den Wettlauf einzutreten (>\$12 Milliarden Umsatz pro Jahr). Nachdem Genom-Bibliotheken aus verschiedenen Quellen ausgewertet wurden, standen etwa 200 aktive Nitrilasen mit moderaten bis sehr guten Enantioselektivitäten zur Verfügung. Eine der besseren Nitrilasen führte zur Bildung des gewünschten Produkts (*R*)-**7** mit 94.5 % ee. Wurde jedoch die Reaktion bei einer industriell praktischen Konzentration von 2.25 M durchgeführt, so nahm sowohl die Aktivität als auch die Enantioselektivität ab (nur noch 87.8 % ee). Dies wurde als Zeichen einer unerwünschten Produktinhibierung gedeutet. Der rettende Anker war die gerichtete Evolution, denn die systematische Sättigungsmutagenese an allen 330 Aminosäurepositionen führte zum Erfolg. Unter Einsatz des Mülheimer MS-Screeningsystems^[22] wurden etwa 31000 Klone getestet, in diesem Fall mit einem ¹⁵N-markierten Substrat.^[47] Dabei wurden etwa 17 verbesserte (*R*)-selektive Mutanten identifiziert. Die beste Variante, Ala190His, zeigte eine hervorragende Leistung unter Prozessbedingungen, denn innerhalb von 15 h wurde bei erhöhter Konzentration ein vollständiger Umsatz bei 98 % ee erzielt. Dieses Beispiel zeigt, dass Produktinhibierung, die gelegentlich in der Biotechnologie bedauerlicherweise auftritt, mithilfe der gerichteten Evolution aufgehoben werden kann, in diesem Fall sogar mit dem Ansteigen der Enantioselektivität.^[47]

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel für gelenkte Evolution enantioselektiver Enzyme beruht auf der genetischen Manipulation einer Monoamin-Oxidase, die in der Natur die Racemisierung von Aminosäuren katalysiert. Sowohl (*R*)- als auch (*S*)-selektive Monoamin-Oxidasen sind bekannt, die die Enantiomerisierung von (*R*)- bzw. (*S*)-konfigurierten Aminosäuren katalysieren. Diese Eigenschaft haben Turner und Mitarbeiter in einem cleveren Deracemisierungsschema ge-

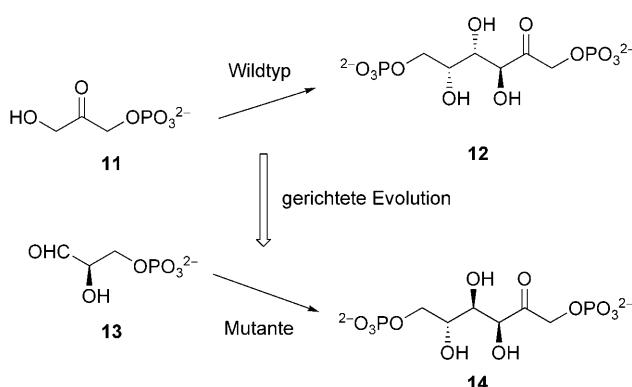
nutzt unter Bildung von Aminen mit extrem hohen ee-Werten (Schema 7).^[49a] Achirale Reduktionsmittel wie NaBH₄, NaB(CN)H₃ oder H₃NBH₃ wurden in Gegenwart (*R*)- oder (*S*)-selektiver Monoamin-Oxidasen eingesetzt. Da sich die



Schema 7. Turner-System zur Deracemisierung chiraler Amine.^[49]

Aktivität des WT-Enzyms im Falle von Substraten des Typs Phenylethylamin (*rac*-9) sowie die Enantioselektivität als lediglich moderat erwiesen, wurde gerichtete Evolution herangezogen. Infolge mehrerer Mutagenesezyklen mit dem Mutatorstamm XL1 Red aus *E. coli* gefolgt von Transformation der Plasmidbibliothek in *E. coli* wurden etwa 150000 bakterielle Kolonien bzw. Transformanten auf Aktivität unter Einsatz eines kolorimetrischen Vorabtests evolviert. Danach wurden die aktiven Treffer auf Enantioselektivität getestet. Das Verfahren führte zu gleich mehreren sehr aktiven Mutanten, die nahezu vollständige Enantioselektivität aufwiesen (> 98 % ee).^[49a] Später wurde festgestellt, dass einige (*R*)- und (*S*)-selektive Mutanten eine erstaunlich breite Substrat-akzeptanz aufweisen, sogar im Falle der schwierigen Klasse der tertiären Amine.^[49b] Dieses einfache zweistufigen Eintopfverfahren wird von Ingenza kommerzialisiert. Die experimentelle Plattform wurde seitdem erweitert unter Einbeziehung anderer Mutagenesemethoden.^[49c,49]

Schließlich sei das Beispiel eines ganz anderen Enzymtyps erwähnt, nämlich die von Wong und Mitarbeitern erstmals beschriebene gerichtete Evolution stereoselektiver Aldolasen.^[48a,b] Seitdem hat sich das Thema zu einem faszinierenden Forschungsfeld entwickelt.^[48] Ein ungewöhnlicher Fall bezieht sich auf die Umkehrung der Diastereoselektivität einer Aldolase unter Beibehaltung der vollständigen Enantiomerenreinheit der Produkte, wie es dem Arbeitskreis von Berry gelungen ist.^[48c,d] Von der WT-Tagatose-1,6-biphosphat-Aldolase wusste man, dass sie die Aldoladdition von **11** an den chiralen Aldehyd **13** stereoselektiv unter Bildung des Aldols **12** katalysiert. Um das diastereomere Aldolprodukt **14** zu gewinnen (Schema 8), wurden drei Runden von DNA-Shuffling durchlaufen. Das Screening-Verfahren führte zu Mutanten mit der gewünschten Stereoselektivität, d. h., eine „Tagatose-Aldolase“ wurde in eine „Fructose-Aldolase“ genetisch überführt. Labor-Evolution stereoselektiver Aldolasen ist von offenkundigem Wert bei der Synthese komplexer stereoisomerer Produkte. Man kann auf weitere Fortschritte auf diesem neuen Teilgebiet der gerichteten Evolution gespannt sein.^[48g]



Schema 8. Gerichtete Evolution von Aldolase-Mutanten, die eine Umkehrung der Diastereoselektivität bewirken.^[48c–f]

All diese sowie weitere Beispiele für gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme erwiesen sich als erfolgreich.^[4g, 58] In den Studien spielte Effizienz beim Durchmustern des Protein-Sequenzraums praktisch keine Rolle, denn dies war nicht das primäre Ziel. Tatsächlich wurden nur wenige Studien durchgeführt, um die verschiedenen Mutagenesemethoden und Strategien im Hinblick auf Bibliothekqualität und Ausmaß des Screeningaufwands zu vergleichen.^[4, 58, 59] Wir definieren die Qualität einer Mutantenbibliothek als Funktion der Trefferfrequenz und der Katalysatorverbesserung.^[58, 60] Qualität lässt sich nur im Lichte des Screeningaufwands sinnvoll definieren. In diesem Bemühen haben einige Gruppen Computerprogramme entwickelt, z. B. SCHEMA,^[61] ProSAR,^[62] FamClash,^[63a] GLUE-IT und PEDEL-AA^[63b] und andere^[63c–h] sowie die von uns vorgestellten Verfahren CASTER und B-FITTER.^[20, 60]

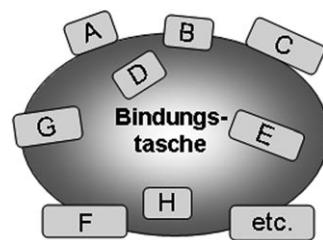
In diesem Aufsatz liegt der Schwerpunkt auf unseren Beiträgen zur Entwicklung effizienterer Methoden in der gerichteten Evolution, insbesondere zur Kontrolle der Stereoselektivität und der Substratbreite (Aktivität). Wir sind davon überzeugt, dass in diesem Bemühen die von uns entwickelte iterative Sättigungsmutagenese (ISM) durch ungewöhnlich hohe Effizienz ausgezeichnet ist.^[18, 20, 31, 60] Anwendungen aus unserem Arbeitskreis und neuerdings auch aus anderen Gruppen werden präsentiert. Wenn möglich, wird die neue Methode mit älteren bzw. klassischen Vorgehensweisen verglichen, insbesondere was Effizienz, Einfachheit und Geschwindigkeit bei der Evolution hoher Stereoselektivität angeht.

3. Iterative Sättigungsmutagene (ISM) als wirksame Strategie in der gerichteten Evolution

3.1. Allgemeines Konzept

Unsere ursprüngliche Forschung mit der Lipase PAL hatte unter anderem gezeigt, dass die Sättigungsmutagenese ein nützliches Werkzeug bei der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme nach Schema 1 ist.^[28, 58a] Eine rege Diskussion hinsichtlich der Vorteile von nah- versus ferngelegenen Mutationen entfaltete sich.^[29, 58a] Zu jener Zeit über-

sahen wir jedoch die eigentliche Perspektive, die Sättigungsmutagenese an Orten rundum der Bindungstasche eines Enzyms ermöglicht – denn der Ansatz wurde nicht verallgemeinert. Erst im Jahre 2005 haben wir mit der Entwicklung des Combinatorial Active-Site Saturation Tests (CAST) den ersten Schritt zur Systematisierung unternommen.^[64] Es handelt sich um die plannmäßige Berücksichtigung aller Aminosäurepositionen, die die Bindungstasche umgeben. Dies steht im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, in denen lediglich der eine oder andere Ort im Enzym randomisiert wurde, wie wir (Abbildung 1)^[28] und andere Arbeitskreise praktiziert hatten.^[4, 65] Die Illustration in Schema 9 zeigt alle mutmaßlichen Orte an der Bindungstasche eines



Schema 9. Allgemeines CASTing-Schema.^[18, 31, 60, 64] Die Orte A, B, C usw. befinden sich in nächster Nähe zur Bindungstasche und können aus einer oder mehreren Aminosäurepositionen bestehen. Die Seitenketten der Aminosäuren zeigen in der Regel auf das Innere der Bindungstasche.

Enzyms, wobei jeder aus einer oder mehreren Aminosäurepositionen bestehen kann. Somit ist CASTing ein nützliches Akronym, das die Struktur-basierte Systematisierung von fokussierten Sättigungsbibliotheken am aktiven Zentrum beschreibt,^[18, 31, 60, 64] im Unterschied zur Sättigungsmutagenese an ferngelegenen Orten oder Regionen im Enzym (Abschnitte 4.3 und 5).

Im Lichte früherer Studien über fokussierte Mutantenbibliotheken zur Kontrolle der Enantioselektivität^[9, 25, 28] oder Aktivität,^[28, 65] spekulierten wir, dass die durch CASTing gesicherte Systematisierung die schnellste und effizienteste Methode in der gerichteten Evolution sein würde. Wir gingen davon aus, dass sich auf diesem Wege die Struktur und die Dynamik einer Bindungstasche beliebig manipulieren ließen unter struktureller Neugestaltung des „Schlosses“ in Emil Fischers Schloss-Schlüssel-Postulat (oder in Koshlands „induced fit“-Modell).^[64] In einer grundlegenden Studie zur Erweiterung der Substratbreite eines Enzyms wählten wir erneut die Lipase aus *Ps. aeruginosa* (PAL), diesmal unter Anwendung der CAST-Methode. Mithilfe der PAL-Kristallstruktur^[27] wurden fünf potenzielle Randomisierungsorte A, B, C, D und E identifiziert, jeder bestehend aus zwei Aminosäurepositionen (Abbildung 3). Vergleicht man diese Strategie mit unserer ursprünglichen Vorgehensweise, in der lediglich ein willkürlich ausgesuchter Randomisierungsort an der PAL-Bindungstasche berücksichtigt wurde (Abbildung 1), so wird das CASTing-Prinzip klar. Das spezielle Ziel der Untersuchung war es, die Substratbreite so zu erweitern, dass auch sperrige Ester, die von WT-PAL gar nicht akzeptiert werden, rasche Hydrolysen eingehen. Tatsächlich

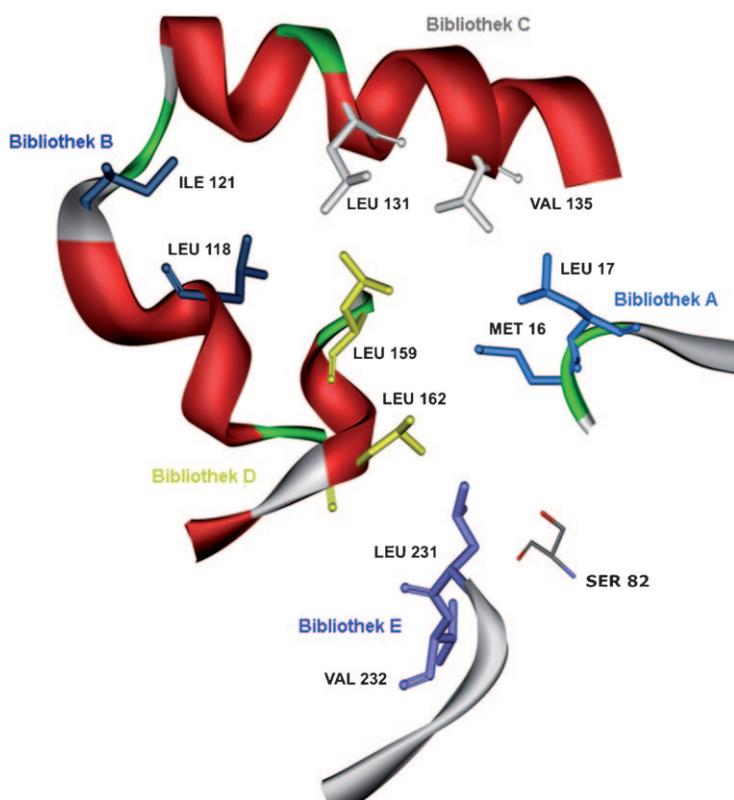
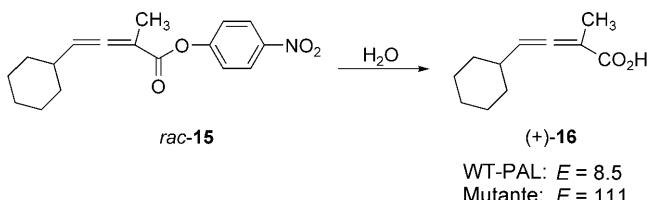


Abbildung 3. CAST-Orte A, B, C, D und E in der Lipase PAL.^[64]

wurden in zwei der Bibliotheken (A und D) Treffer gefunden, ein eindrucksvolles Beispiel für die Verwendung der gerichteten Evolution zur Lösung klassischer Probleme dieser Art.^[64] In einigen Fällen wurde auch ein beachtliches Maß an Stereoselektivität beobachtet, obgleich dies nicht das Ziel der Versuche war.

CASTing wurde auch zur Enantioselektivitätssteigerung der Cyclopentanon-Monooxygenase (CPMO) als Biokatalysator bei der oxidativen Desymmetrisierung von 4-Methyl- und 4-Acetoxy-cyclohexanon angewendet. WT-CPMO zeigt bei diesen Reaktionen Enantioselektivitäten von nur 46 % ee bzw. 5 % ee. Der CAST-Ansatz erwies sich als erfolgreich, denn schon sehr kleine Mutantenbibliotheken bestehend aus nur 150 Transformanten führten zu Treffern mit > 90 % ee.^[66]

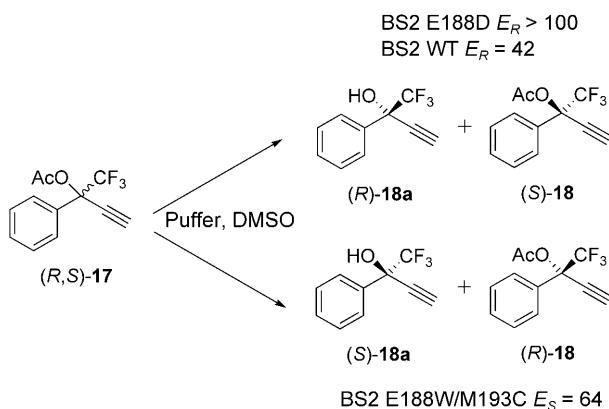
In einer weiteren Studie untersuchten Bäckvall et al. die PAL-katalysierte hydrolytische kinetische Racematspaltung des axial-chiralen Esters **rac-15** (Schema 10).^[67] Die Lipase weist bei der Reaktion einen Selektivitätsfaktor von nur $E = 8.5$ auf. Lediglich 600 Transformanten aus Bibliothek D



Schema 10. PAL-katalysierte hydrolytische kinetische Racematspaltung des axial-chiralen Esters **15**.^[67]

(Abbildung 3) mussten in dem üblichen Screening-Verfahren geprüft werden, um eine hoch enantioselektive Mutante zu identifizieren ($E = 111$). Somit war es nicht erforderlich, weitere CAST-Orte der Sättigungsmutagenese zu unterwerfen (obwohl theoretisch interessant).^[67]

Ein weiteres Beispiel für die Systematisierung auf CAST-Basis bezieht sich auf die Umkehrung der Enantioselektivität der Esterase aus *Bacillus subtilis* (BS2) als Katalysator bei der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung des tertiären Acetats **rac-17** (Schema 11).^[68a] WT-BS2 zeigt akzeptable Enantioselektivität zugunsten von *(R)*-**18** ($E = 42$), die in einer vorangegangenen Studie mittels rationalem Design unter Generierung der Einzelmutante Glu188Asp auf $E > 100$ gesteigert werden konnte.^[68b] Mithilfe der Röntgenstruktur von BS2 wählten Bornscheuer und Mitarbeiter in der neueren Studie zunächst mehrere potenzielle CAST-Orte aus.^[68a] Ein Ort bestehend aus drei Aminosäurepositionen (Glu188, Ala190 und Met193) wurde dann mit Sättigungsmutagenese randomisiert, weil diese räumlich am nächsten zur katalytischen Triade und zur Bindungstasche gelegen sind. Simultane Randomisierung unter Verwendung der NNK-Codon-Degeneration ergibt theoretisch $20^3 = 8000$ strukturell unterschiedliche Mutanten, aber nur 1100 Klone



Schema 11. Hydrolytische kinetische Racematspaltung des Esters **rac-17** unter Verwendung von BS2-Mutanten.^[68]

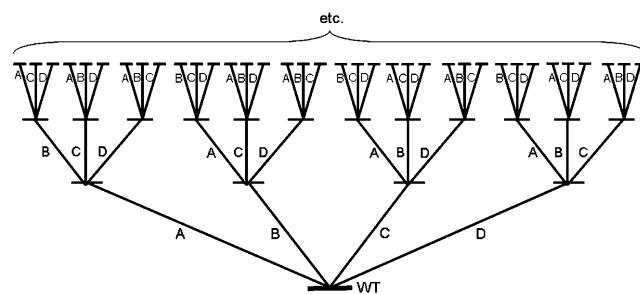
(Transformanten) wurden gescreent. Erstaunlicherweise wurden selbst in einer solch kleinen Bibliothek Mutanten mit umgekehrter Enantioselektivität zugunsten von *(S)*-**18** entdeckt, z.B. die Doppelmutante Glu188Trp/Met193Cys ($E = 64$). Dabei wurde ein faszinierender epistatischer Effekt im Zuge der Dekonvolution aufgedeckt. Während die Einzelmutante Glu188Trp moderate *(S)*-Selektivität aufweist, bevorzugt die andere Einzelmutante Met193Cys das *(R)*-konfigurierte Substrat ($E = 16$). Daher ist ein dramatischer kooperativer Effekt im Spiel! Die Autoren stellten ferner fest, dass die Doppelmutante als ausgezeichneter Katalysator bei der Reaktion weiterer tertiärer Substrate fungiert, ohne dass dabei zusätzliche Mutagenesversuche erforderlich waren.^[68a]

Zahlreiche andere Studien über die Verwendung der Sättigungsmutagenese für praktische und mechanistische Anwendungen sind in jüngerster Zeit erschienen, obgleich eine Systematisierung im Sinne von CASTing nicht angestrebt wurde.^[69] An dieser Stelle ist es wichtig in Erinnerung zu rufen, dass die Generierung und das Screening einer anfänglichen Sättigungsbibliothek streng genommen noch keine gerichtete Evolution beinhaltet, obwohl in günstigen Fällen schon recht gute Ergebnisse erzielt werden können. Was ist im Normalfall zu tun, um noch bessere Mutanten zu evolvieren?

Zwei Strategien für das weitere Vorgehen sind möglich, egal ob es um die weitere Steigerung der Aktivität oder Erhöhung der Stereoselektivität geht. Eine Möglichkeit besteht darin, die gefundenen Punktmutationen von zwei Mutanten aus zwei verschiedenen CAST-Bibliotheken mithilfe der ortspezifischen Mutagenese in der Hoffnung zu kombinieren, dass sich die jeweiligen positiven Einflüsse addieren. Diese Art, evolutionären Druck auf das System auszuüben, ist einfach durchzuführen, denn neue Mutantenbibliotheken sind nicht erforderlich. Wir haben diesen Ansatz bei der Steigerung der Aktivität von früher evolvierten PAL-Mutanten^[64] als Katalysatoren in der Hydrolyse von sperrigen Estern erfolgreich getestet.^[70] So wurden Punktmutationen von Mutanten aus den Bibliotheken A und D kombiniert unter Generierung neuer Varianten, die tatsächlich den gewünschten Effekt hinsichtlich der Erweiterung der Substratakzeptanz zeigen.^[70] Wahrscheinlich hängt dies damit zusammen, dass die Bindungstasche räumlich erweitert wurde, obgleich der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. Es sei bemerkt, dass es nicht unbedingt die Einführung einer Aminosäure mit sterisch kleinerer Seitengruppe ist, die zur Vergrößerung einer Bindungstasche führt, wie herkömmlich angenommen. Vielmehr können subtile Effekte im Spiel sein, z.B. ein „Wegdrehen“ bestimmter Seitenketten weg von der Wand der Bindungstasche, einfach weil neue H-Brücken oder π - π -Wechselwirkungen an anderer Stelle die Oberhand gewinnen.^[70] Das Kombinieren von Mutationen kann also erfolgreich sein, hat aber Grenzen, denn die dabei bewirkte strukturelle Diversität ist begrenzt und kann sogar das Gegenteil bewirken.

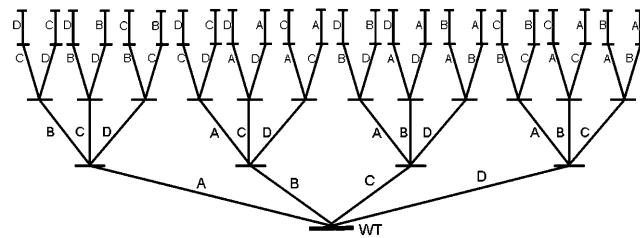
Eine zweite Strategie erschien uns attraktiver, nämlich die Idee der iterativen Sättigungsmutagenese (ISM). Statt von einem vermeintlichen Randomisierungsort zu anderen zu wechseln ohne dabei methodisch vorzugehen, wie wir es in unserem ursprünglichen PAL-Projekt getan hatten^[25,28] und wie einige andere Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Zielen es ebenso praktiziert hatten,^[4,65,69] war nun Systematisierung als Kerngedanke von ISM angesagt.^[18,20,31,60,71] Schema 12 illustriert den Fall, in dem vier Randomisierungsorte A, B, C und D involviert sind. Das Gen einer verbesserten Mutante aus einer Bibliothek wird als Ausgangspunkt (Templat) für Randomisierungsexperimente an den anderen Orten verwendet, wobei dieser Prozess so lange systematisch weitergeführt wird, bis die gewünschte Katalysatorverbesserung erreicht worden ist.

In der dritten und in den darauffolgenden Generationen steigt die Zahl der Bibliotheken in einer nicht-konvergierenden Art. Jedoch vereinfacht sich das Schema grundsätzlich.



Schema 12. Prinzip der iterativen Sättigungsmutagenese (ISM), illustriert für den Fall von vier Randomisierungsorten A, B, C und D. Jeder Ort kann aus einer oder mehreren Aminosäurepositionen bestehen.^[18,20,31,60,71]

lich, wenn in jedem aufwärts steigenden ISM-Pfad jeder Ort nur einmal „besucht“ wird. Schema 13 macht deutlich, dass ein solches System konvergiert, und dass lediglich 64 durch Sättigungsmutagenese erzeugte Bibliotheken involviert sind.^[18,20,31,60,71] Wie wir sehen werden, ist es nicht erforderlich, alle 64 Bibliotheken zu generieren.



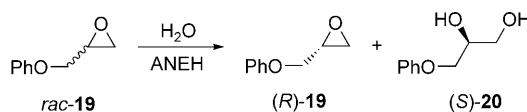
Schema 13. Vereinfachtes ISM-Schema bestehend aus vier Randomisierungsorten A, B, C und D, wobei in jedem Pfad jeder Ort nur einmal berücksichtigt wird.^[18,20,31,60,71]

Auf molekularer Ebene spielt sich Folgendes ab: In den Bibliotheken der ersten Generation werden Treffer mit strukturell veränderten Bindungstaschen erzeugt. Bei jeder weiteren Generation reagiert das System epistatisch auf additive, partiell additive, antagonistische oder kooperative Wechselwirkungen zwischen den neuen und alten Mutationen.^[60,71-73] Am günstigsten ist es, wenn kooperative Effekte, also mehr als additive Wechselwirkungen, wirksam sind. Die bisherige Erfahrung zeigt, dass genau dies in ISM-Pfaden eintritt. Synergie dieser Art kann auf zwei Wegen zustande kommen. Denkbar sind Wechselwirkungen zwischen den eingewechselten Aminosäuren innerhalb eines Satzes von Punktmutationen, aber auch und insbesondere zwischen den jeweiligen Sätzen von Punktmutationen. Ersterer Effekt ist logischerweise nur dann möglich, wenn der Randomisierungsort aus mindestens zwei Aminosäurepositionen besteht. Im Unterschied zu anderen Mutagenesestrategien, wie z.B. epPCR, wird im fokussierten Vorgehen der ISM-Methode die Wahrscheinlichkeit maximiert, Kooperativität zu bewirken. Die korrekte Wahl der Randomisierungsorte richtet sich nach der Katalysatoreigenschaft, die optimiert werden soll. Wird die Erhöhung oder die Umkehrung der Stereoselektivität angestrebt oder die Erweiterung der Substratbreite (Aktivität), so wird CASTing herangezogen (Schema 9). Es ist aber

auch möglich, CASTing dahingehend zu erweitern, dass Aminosäurepositionen in der zweiten Sphäre („second sphere residues“) gewählt werden (Abschnitt 4.2).^[42] Ferner besteht die Möglichkeit, die Gestalt der Bindungstasche zu verändern, indem Randomisierung an einer ferngelegenen Stelle im Enzym vorgenommen wird, die zu einem allosterischen Effekt führt in Abwesenheit eines Effektormoleküls^[73] (Abschnitt 4.3). Bislang wurde ISM hauptsächlich im Rahmen des CASTing-Konzepts experimentell realisiert. ISM kann aber auch herangezogen werden, um ganz andere katalytische Parameter zu steuern, so z. B. Thermostabilität oder Robustheit in Gegenwart von enzymenschädigenden organischen Lösungsmitteln. Dazu wird im Zuge der B-FIT-Methode ein anderes Kriterium zur Bestimmung der optimalen Randomisierungsorte herangezogen (Abschnitt 5).^[20]

3.2. Erstes Beispiel für ISM

Das erste Beispiel für ISM bezieht sich auf die gerichtete Evolution der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* (ANEH) als Katalysator in der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von **rac-19** (Schema 14).^[31] WT-ANEH fa-



Schema 14. ANEH-katalysierte hydrolytische kinetische Racematspaltung von **rac-19**.^[31]

vorisiert die Bildung von **(S)-20**, jedoch mit schlechter Enantioselektivität ($E=4.6$). Mit Jacobsens chiralem Salen-Komplex verfügt der Chemiker über einen exzellenten Katalysator für Ringöffnungen von Epoxiden.^[74] Unser Ziel war es jedoch, das ISM-Konzept im Labor mit einer einfachen Modellreaktion zu testen und mit anderen Strategien zu vergleichen. In einer vorangegangenen Studie unter Verwendung der gleichen Reaktion mit ANEH als Katalysator hatten wir epPCR als Mutagenesemethode angewendet und nach dem Screening von 20 000 Transformanten eine lediglich leicht verbesserte Mutante identifizieren können ($E=11$).^[46a] Die Röntgenstruktur von WT-ANEH weist die Bindungstasche als einen relativen schmalen Tunnel auf,^[75] was möglicherweise der Grund dafür ist, dass dieses Enzym als „schwierig“ gilt.

Sechs CAST-Orte A, B, C, D, E und F wurden mithilfe der Röntgenstruktur (Abbildung 4) identifiziert, wobei jeder aus zwei oder drei Aminosäurepositionen besteht.^[31]

Der beste Treffer aus den sechs Mutantenbibliotheken kam aus B ($E=14$), und er wurde dann als Templat für die Sättigungsmutagenese am Ort C verwendet. Weitere aufeinanderfolgende Randomisierungsversuche an den Orten D, F und E führten zu der besten Mutante LM202 mit ungewöhnlich hoher Enantioselektivität ($E=115$), wobei die Reihenfolge

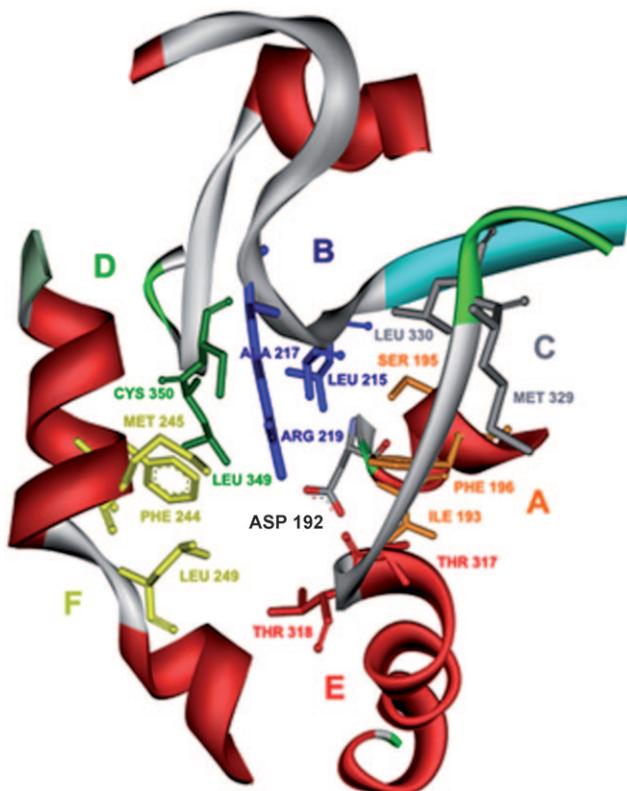
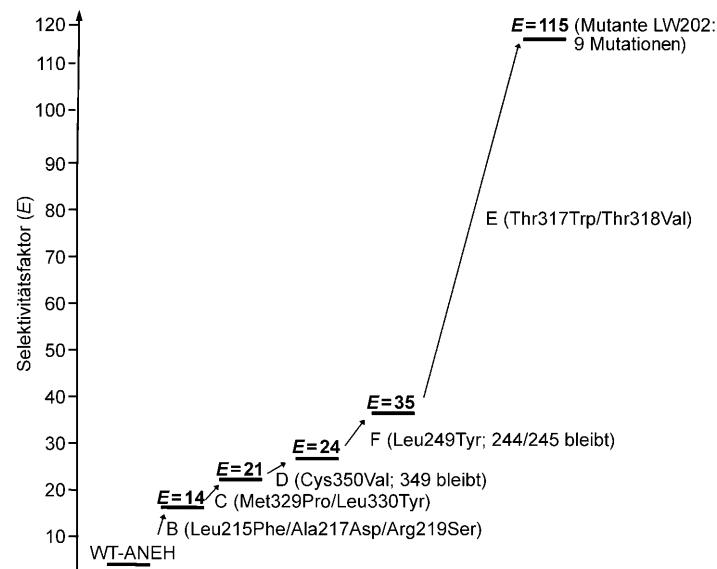


Abbildung 4. CAST-Orte A–F^[31] der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* (ANEH), ausgesucht mithilfe der Röntgenstrukturanalyse des Wildtyps.^[75] Asp192 (schwarz) initiiert den geschwindigkeits- und konfigurationsbestimmenden nucleophilen Angriff an dem weniger substituierten C-Atom von **rac-19**.

willkürlich gewählt wurde.^[31] Wie in Schema 15 zu erkennen ist, akkumulieren fünf Sätze von Mutationen unter Bildung von LW202 mit insgesamt neun einzelnen Punktmutationen. Da die Enantioselektivität schon so stark gestiegen war,

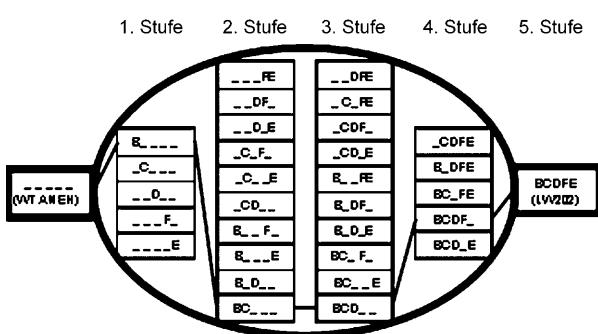


Schema 15. ISM-basierte Evolution enantioselektiver ANEH-Mutanten als Katalysatoren zur hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von **rac-19**.^[31]

haben wir Ort A oder gar andere ISM-Pfade nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden etwa 20 000 Transformanten gescreent, was zufälligerweise der gleichen Zahl entspricht, die in unserer ersten epPCR-basierten Studie erforderlich war.^[46a] Da die Ergebnisse deutlich überlegen sind, $E = 115$ versus $E = 11$, vermuteten wir, dass ISM eine ungewöhnlich effiziente Methode ist.^[31]

Aus diesen Beobachtungen ergaben sich drei fundamentale Fragen: 1) Was ist der Grund für die deutlich erhöhte Enantioselektivität auf molekularer Ebene? Dazu haben wir eine detaillierte mechanistische und strukturelle Studie^[76] durchgeführt, über die in Abschnitt 6 berichtet wird. 2) Ist $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ der einzige Pfad im gesamten ISM-Schema, der zu verbesserten Mutanten führt? Die Frage wird gegenwärtig in unserem Labor untersucht; vorläufige Ergebnisse zeigen, dass viele Wege zum Erfolg führen.^[77a] 3) Setzt man die fünf Sätze von Mutanten so zusammen, dass daraus alle theoretisch denkbaren Permutationen (Kombinationen) entstehen, ist der ursprüngliche Pfad $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ der einzige, der von WT-ANEH zur besten Mutante LW202 führt? Die folgende Analyse zeigt, dass die Erforschung aller Pfade dieser Art sowie die quantitative Erfassung epistatischer Wechselwirkung entlang eines gegebenen Pfades mithilfe einer vollständigen Dekonvolution die Möglichkeit bietet, die Natur von ISM zu beleuchten. Tatsächlich stellte sich heraus, dass die Anwendung einer solchen Dekonvolutionsstrategie als eine Art Qualitätskontrolle für beliebige Mutantenbibliotheken in der gerichteten Evolution dient.^[72]

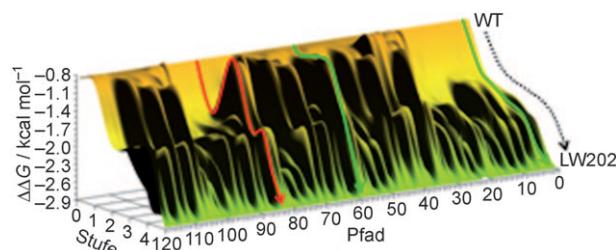
Betrachtet man die fünf Sätze von Punktmutationen, die in fünf Stufen des ISM-Vorgangs zu LM202 führen (Schema 15), so wird klar, dass theoretisch $5! = 120$ Pfade vom WT-ANEH zu dieser besten Mutante existieren. Deshalb sind 30 Mutanten relevant, deren Mutationssätze permutativ zusammengesetzt werden können (Schema 16).^[72] Unter Einsatz der ortspezifischen Mutagenese wurden 26 neue Mutanten hergestellt und in der Modellreaktion von *rac-19* getestet. Es geht also um neue Mutanten, jedoch nicht um neue Aminosäureaustauschprozesse. Die Mutanten, die den Varianten B, BC, BCD und BCDF entsprechen, standen schon aus unserer ursprünglichen Studie zur Verfügung.



Schema 16. Die 30 möglichen Mutanten als Zwischenstufen zwischen WT-ANEH und der Enzymvariante LW202 unter Verwendung der fünf Sätze von Punktmutationen (Schema 15).^[72] Die verbindenden Linien deuten den ursprünglichen Pfad $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ an, der eine von insgesamt 120 Möglichkeiten darstellt.

Diese Vorgehensweise erlaubte uns, alle relevanten *E*-Faktoren sowie die entsprechenden Werte für die freie Enthalpie ($\Delta\Delta G^\ddagger$) zu ermitteln, und so eine „Fitness-Landschaft“ experimentell zu konstruieren.

Eine Fitness-Landschaft dieses Typs beinhaltet eine sechsdimensionale Fläche (Mutationssätze B, C, D, E und F sind unabhängige Vektoren, und $\Delta\Delta G^\ddagger$ ist eine unabhängige Variable), deren graphische Darstellung schwierig ist. Wir versuchten dies so weit wie möglich in Schema 17 anschaulich



Schema 17. Energieprofile der zwei Typen von Pfade in der Fitness-Landschaft, die WT-ANEH und Mutante LW202 verbinden:^[72] Energetisch bevorzugt (grün) wie im ursprünglichen Pfad $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ (Nummer 2) oder $D \rightarrow C \rightarrow F \rightarrow E \rightarrow B$ (Nummer 60) und energetisch benachteiligt (rot) wie in $E \rightarrow C \rightarrow F \rightarrow D \rightarrow B$ (Nummer 84).

zu gestalten, indem alle Stufen der 120 Pfade ausgehend vom WT-ANEH (oben) bis zur Mutante LW202 (unten) entsprechend angeordnet sind. Nach dem Kartieren der Energieprofile aller 120 Mutationspfade identifizierten wir zwei Typen von Pfade. Der energetisch bevorzugte Typ erweist eine kontinuierliche Abnahme der freien Enthalpie auf, also ohne lokale Minima, wie z.B. in dem ursprünglichen Pfad $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ oder typischerweise auch im Falle von $D \rightarrow C \rightarrow F \rightarrow E \rightarrow B$ (Schema 17, grüne Pfade). Der zweite Pfadtyp ist energetisch benachteiligt, denn er weist lokale Minima auf. Ein typisches Beispiel ist Pfad $E \rightarrow C \rightarrow F \rightarrow D \rightarrow B$ (Schema 17, roter Pfad). Ermittelt man die erste Ableitung der $\Delta\Delta G^\ddagger$ -Werte auf jeder Stufe eines Pfaides, so sind die Ergebnisse mit der vorangegangenen Analyse voll im Einklang.^[72]

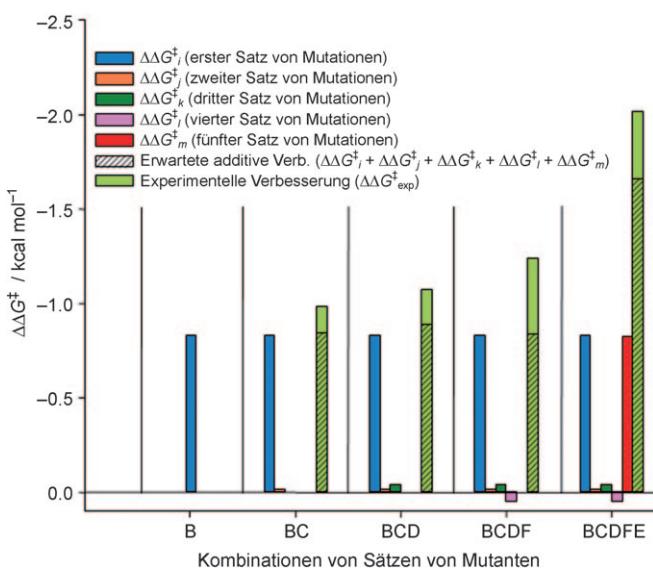
Die in unserer Studie veröffentlichte komplette Fitness-Landschaft weist einige bemerkenswerte Merkmale auf.^[72] Am wichtigsten ist der Befund, dass 55 verschiedene Pfade energetisch bevorzugt sind, was 45 % aller Möglichkeiten entspricht, von WT-ANEH zu bester Mutante LM202 zu gelangen. Dies ist ein hervorragendes „Abschneiden“, da ja die angewandte Dekonvolutionsstrategie keine neuen Aminosäureaustauschprozesse zulässt. Sollten letztere Vorgänge zugelassen werden, so kann man sich vorstellen, dass sehr viele ISM-Pfade zum Erfolg führen würden (was gegenwärtig untersucht wird). Die zurzeit vorliegenden Daten zeigen jetzt schon, dass gerichtete Evolution unter Verwendung von ISM, auch in einer restriktiven Art unter Verwendung von reduzierten Codon-Degenerationen, zu erstaunlich vielen energetisch günstigen Paden führt. Der Vergleich mit anderen Systemen, die zu anderen Schlussfolgerungen kommen,^[78] ist aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Systemen problematisch.

Alle epistatischen Wechselwirkungen^[79] entlang eines gegebenen Pfades können quantitativ ermittelt werden, denn die freie Enthalpie der Wechselwirkung (ΔG^{\ddagger}_{ij}) zwischen zwei Mutationssätzen i und j [Gl. (1)] ist experimentell zugänglich:^[72]

$$\Delta G^{\ddagger}_{ij} = \Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{exp}} - (\Delta \Delta G^{\ddagger}_i + \Delta \Delta G^{\ddagger}_j) \quad (1)$$

wobei $\Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{exp}}$ die Differenz der Aktivierungsenergie zwischen den Reaktionen beider Enantiomere ist (experimentell erhalten durch die binäre Kombination), während $\Delta \Delta G^{\ddagger}_i$ und $\Delta \Delta G^{\ddagger}_j$ die experimentellen Energien der einzelnen Sätze beinhalten. Die Werte für ΔG^{\ddagger}_{ij} -Wechselwirkungen sind entweder ein Maß für kooperative (synergistische) Effekte ($\Delta G^{\ddagger}_{ij} < 0$), additive Effekte ($\Delta G^{\ddagger}_{ij} = 0$, also keine Interaktion), partiell additive Effekte ($\Delta G^{\ddagger}_{ij} > 0$ und $|\Delta \Delta G^{\ddagger}_i|$ und $|\Delta \Delta G^{\ddagger}_j| < |\Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{exp}}|$), oder sie deuten antagonistische Effekte an ($\Delta G^{\ddagger}_{ij} > 0$ und $|\Delta \Delta G^{\ddagger}_i|$ oder $|\Delta \Delta G^{\ddagger}_j| > |\Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{exp}}|$).

Schema 18 illustriert den Fall des ursprünglichen Pfades B → C → D → F → E.^[72] Es ist ersichtlich, dass auf jeder evolutionären Stufe der kombinierte Einfluss der Mutationssätze mehr als additiv ist. Synergismus (Kooperativität) ist also der



Schema 18. Thermodynamischer Zyklus [Gl. (1)], der die Wechselwirkungen zwischen den fünf Mutationssätzen auf jeder Stufe des energetisch günstigen Pfades B → C → D → F → E widerspiegelt.^[72]

Grund dafür, dass die Enantioselektivität in so drastischer Weise ansteigt. Tatsächlich wissen wir heute, dass hier und in anderen Fällen diese Eigenschaft ganz charakteristisch ist für ISM-Prozesse. Starke kooperative Effekte sind auch im Falle der anderen Pfade im Spiel. Keiner der fünf Mutationssätze ist überflüssig, d. h. alle sind erforderlich, um die hohe von LW202 gezeigte Enantioselektivität zu erreichen, was in anderen Studien der gerichteten Evolution unter Verwendung herkömmlicher Mutagenesemethoden und Strategien keineswegs der Fall ist. Die Analyse der energetisch benachteiligten Pfade ist ebenfalls erhellend. Es zeigte sich, dass lokale

Minima durch das Auftreten von antagonistischen Effekten bewirkt werden. Jedoch treten auch bei solchen Pfaden später starke kooperative Effekte auf, die zum „Erreichen“ der Zielmutante LW202 entscheidend beitragen. Es ist ferner möglich, aus einem lokalen Minimum herauszukommen, und zwar durch Zurückkehren um einen Schritt („backtracking“) und Überspringen auf einen anderen bzw. günstigeren Pfad.^[72]

3.3. Oversampling und das Zahlenproblem der gerichteten Evolution

Das Konzept des „Oversamplings“ in der gerichteten Evolution bezieht sich auf die Zahl der Mutanten bzw. Transformanten, die gescreent werden müssen, um einen bestimmten Prozentsatz einer gegebenen Mutantenbibliothek wirksam abzudecken („Coverage“); sie ist unabhängig von der angewendeten Mutagenesemethode.^[4, 60, 80] In unseren ersten Publikationen und in den Berichten anderer Gruppen über Sättigungsmutagenese wurde dieser Aspekt praktisch nicht berücksichtigt, schließlich waren die experimentellen Ergebnisse positiv. Beim Versuch, die Qualität einer Mutantenbibliothek zu maximieren, ist es jedoch geboten, Oversampling zu berücksichtigen, denn dies ist eng mit dem Screeningproblem verbunden. Glücklicherweise existieren auf Poisson-Verteilung basierende Algorithmen, die beim Entwerfen und Evaluieren von Mutantenbibliotheken diverser Art hilfreich sind.^[80b-d] Da die Bevorzugung bzw. Benachteiligung bestimmter Aminosäuren („amino acid bias“) im Protein nicht berücksichtigt wird, gelten die berechneten Ergebnisse lediglich als Annäherung. Die Zahlen sind jedoch nützlich, denn klare Trends werden sichtbar. Das Ausmaß des Oversamplings beim Screening von Sättigungsbibliotheken hängt von der verwendeten Codon-Degeneration ab. Üblicherweise wird NNK-Codon-Degeneration verwendet (Abschnitt 1), welche 32 Codons und ein Stop-Codon beinhaltet, die alle 20 proteinogenen Aminosäuren als Bausteine im Randomisierungsprozess kodieren. Es ist jedoch auch möglich, ein reduziertes Aminosäure-Alphabet zu verwenden,^[81] was einen großen Einfluss auf das Ausmaß an Oversampling zur Folge hat, das für das Abdecken eines bestimmten Prozentsatzes einer Bibliothek erforderlich ist („%-Coverage“).^[60, 71] Als Beispiel einer reduzierten Aminosäurebibliothek sei die NDT-Codon-Degeneration erwähnt (D: Adenin/Guanin/Thymin; T: Thymin) mit nur zwölf Codons und der Codierung von zwölf Aminosäuren, nämlich Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Arg, Ser und Gly. Dies entspricht einer strukturell gut austarierten Mischung aus Bausteinen mit polaren, nicht-polaren, aromatischen und lipophilen Seitenketten.

Um das Verhältnis von %-Coverage und Ausmaß des Oversamplings zu veranschaulichen, unabhängig vom verwendeten Codon und Art der Mutagenese, haben wir von den schon erwähnten statistischen Methoden Gebrauch gemacht. Der bekannte Algorithmus^[80b] zum Abschätzen der Vollständigkeit als Funktion der Zahl von Transformanten (Klone), die gescreent werden müssen, T , kann in Gleichung (2) transformiert werden, wobei P_i die Wahrscheinlichkeit

llichkeit einer bestimmten Sequenz in der Bibliothek darstellt und F_i die Frequenz bedeutet.^[60b]

$$T = -\ln(1-P_i)/F_i \quad (2)$$

Indem F_i substituiert wird, gelangt man zur Gleichung (3), wobei V für die Zahl der Genmutanten in einer Bibliothek steht:

$$T = -V \ln(1-P_i) \quad (3)$$

Diese Beziehung definiert die Korrelation zwischen der Zahl von Mutanten V einer gegebenen Bibliothek und der Zahl der Transformanten T , die gescreent werden müssen, um ein bestimmtes Ausmaß an Vollständigkeit zu erreichen. Daraus ergibt sich der von uns definierte Oversampling-Faktor O_f (Gl. (4)).^[60b]

$$O_f = T/V = -\ln(1-P_i) \quad (4)$$

Berechnet man O_f als Funktion von %-Coverage, so ergibt sich die in Abbildung 5 wiedergegebene Kurve.^[60b] Man erkennt, dass z. B. bei 95 % Coverage der O_f -Faktor etwa 3 beträgt, d. h., ein dreifacher Überschuss von Transforman-

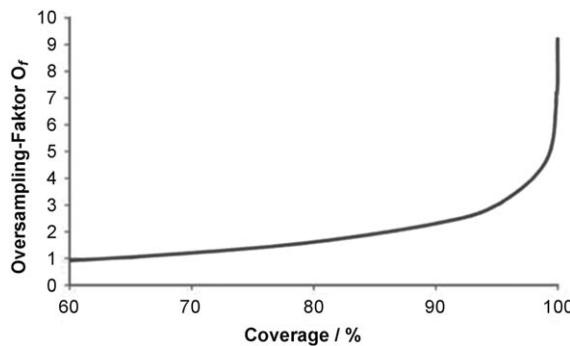


Abbildung 5. Beziehung zwischen %-Coverage einer Mutantenbibliothek und Oversampling-Faktor O_f .^[60b]

ten müsste gescreent werden. Aufgrund des exponentiellen Charakters der Beziehung steigt der O_f -Faktor bei > 95 % Coverage drastisch an. Natürlich kann es vorkommen, dass deutlich verbesserte Enzym-Mutanten auch bei geringer Coverage gefunden werden, doch sollten Entscheidungen hinsichtlich des Screening-Aufwands im Lichte der in Abbildung 5 gezeigten Kurve getroffen werden.

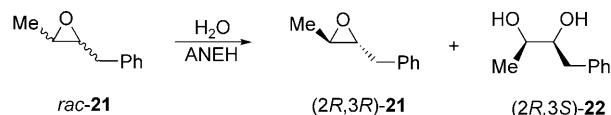
Für den Fall der simultanen Randomisierung an Orten bestehend aus mehr als einer Aminosäureposition berechneten wir für NNK- und NDT-Bibliotheken die Zahl der zu evaluierenden Transformanten, die einer 95 %igen Abdeckung (Coverage) des relevanten Protein-Sequenzraumes entspricht (Tabelle 2).^[60] Der potenzielle Screening-Aufwand unterscheidet sich stark, je nachdem ob NNK oder NDT verwendet wird. Im Falle eines Orts bestehend aus drei Aminosäurepositionen ist bei Verwendung von NNK-Codon-Degeneration das Screening von fast 10000 Transformanten erforderlich, um 95 % Coverage zu gewährleisten. Demge-

Tabelle 2: Oversampling für 95 % Coverage als Funktion der NNK- und NDT-Codon-Enartung (unter der Annahme, dass keine Aminosäuren bevorzugt oder benachteiligt werden).^[60b]

Zahl der Aminosäure-positionen an einem Ort	NNK Codons	Benötigte Transformanten	NDT Codons	Benötigte Transformanten
1	32	94	12	34
2	1028	3066	144	430
3	32768	98163	1728	5175
4	1048576	3141251	20736	62118
5	33554432	100520093	248832	745433
6	>1.0×10 ⁹	>3.2×10 ⁹	>2.9×10 ⁶	>8.9×10 ⁶
7	>3.4×10 ¹⁰	>1.0×10 ¹¹	>3.5×10 ⁷	>1.1×10 ⁸
8	>1.0×10 ¹²	>3.3×10 ¹²	>4.2×10 ⁸	>1.3×10 ⁹
9	>3.5×10 ¹³	>1.0×10 ¹⁴	>5.1×10 ⁹	>1.5×10 ¹⁰
10	>1.1×10 ¹⁵	>3.4×10 ¹⁵	>6.1×10 ¹⁰	>1.9×10 ¹¹

genüber beträgt die Zahl im Falle von NDT lediglich 5000. Wir haben die unterschiedlichen Verhältnisse von NNK versus NDT im Bereich von 0 % bis 95 % Coverage errechnet.^[60b] Die Ergebnisse dienen als Leitfaden bei der Planung von ISM-Experimenten.^[60b] In ähnlicher Weise ist die Analyse anderer Codon-Degenerationen mithilfe des CASTER-Computerprogramms möglich.^[20,60b]

Die Frage nach der relativen Qualität von NNK- versus NDT-Bibliotheken ist entscheidend, denn sie kann praktische Konsequenzen haben. Deshalb entwarfen wir folgendes Experiment: Sowohl eine NNK- als auch eine NDT-Bibliothek von ANEH-Mutanten wurde generiert, und in beiden Fällen wurden lediglich 5000 Transformanten gescreent, entsprechend 15 % bzw. 95 % Coverage.^[60b] Als Modellreaktion diente die hydrolytische Racematspaltung des *trans*-disubstituierten Epoxids **rac-21** unter bevorzugter Bildung von (2*R*,3*S*)-**22** (Schema 19). Da WT-ANEH eine äußerst niedrige Aktivität aufweist, bestand das unmittelbare Ziel darin, erhöhte Aktivität bei merklicher Stereoselektivität zu erzeugen. Zwei gleich große Bibliotheken wurden durch Sättigungsmutation am Ort B in WT-ANEH durchgeführt (Abschnitt 3.2, Abbildung 4). Es handelt sich dabei um die gleichzeitige Randomisierung von drei Aminosäurepositionen. Dabei stellte sich heraus, dass die Häufigkeit von Treffern mit verbesserter Aktivität und Enantioselektivität im Falle der NDT-Bibliothek deutlich höher ist als bei NNK. Etwa 25 aktive Mutanten mit *E*-Faktoren zwischen 56 und 200 wurden identifiziert.^[60b] Synthetisch betrachtet ist das Ergebnis ebenfalls bedeutsam, denn der Jacobsen-Katalysator



Schema 19. Hydrolytische kinetische Racematspaltung von **rac-21** katalysiert von Mutanten der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* (ANEH).^[60b]

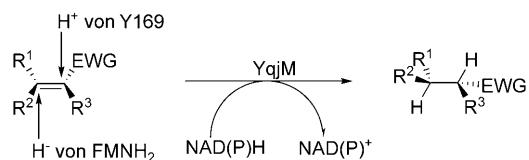
vermag nicht, *trans*-disubstituierte Epoxide des Typs *rac*-**21** umzusetzen.^[74] Die Vorteile eines reduzierten Aminosäure-Alphabets zur Lösung des Zahlenproblems der gerichteten Evolution wurden auch in anderen Studien demonstriert (Abschnitte 3.4.1 und 4.2).^[18,41,66]

3.4. Weitere Beispiele für ISM

Nach der positiven Erfahrung mit ISM stellten sich bei der Planung weiterer Forschung gleich mehrere Fragen: Wie allgemein ist die Strategie? Wie sollen die durch CAST-Analyse identifizierten Aminosäurepositionen in Mutagenese-Orte gruppiert werden? Funktioniert ISM auch im Falle von Enzymen, bei denen Domänenbewegungen für die katalytische Funktion essenziell sind? Wie soll ISM gehandhabt werden, wenn zwei verschiedene katalytische Eigenschaften gleichzeitig optimiert werden sollen? Lässt sich ISM in Form von iterativem CASTing anwenden, um ganz andere Eigenschaften zu optimieren wie z.B. Selektivität beim Binden von Cofaktoren oder anderen Molekülen? Wir haben zu diesen Fragen eine Reihe von Projekten durchgeführt (Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2), und andere Gruppen haben ebenfalls zur Verallgemeinerung des ISM-Konzepts beigetragen (Abschnitte 3.4.3 bis 3.4.10).

3.4.1. Erweiterung der Substratakzeptanz und Erhöhung der Enantioselektivität einer Enoat-Reduktase

Die biokatalytische asymmetrische Reduktion konjugierter Olefine mithilfe von Enoat-Reduktasen aus verschiedenen Quellen^[2,82] ist eine gangbare Alternative zur Übergangsmetallkatalyse^[83] und Organokatalyse.^[84] Ein interessanter Fall betrifft die gelenkte Evolution^[18] der 37.4 kDa großen Enoat-Reduktase YqjM aus *Bacillus subtilis*,^[82b] eines homologen „Old Yellow Enzyme“. Wie andere Enoat-Reduktasen, ist auch YqjM flavinabhängig. FMNH₂ liefert ein Hydrid an die eine π -Seite eines aktivierten Olefins, während das Proton unter *trans*-Addition von der anderen Seite angelagert wird. Die Röntgenstrukturanalyse des YqjM führte zur Schlussfolgerung, dass Tyr169 als Protonquelle dient (Schema 20).^[82c] Damit die Umwandlung stattfindet, muss die

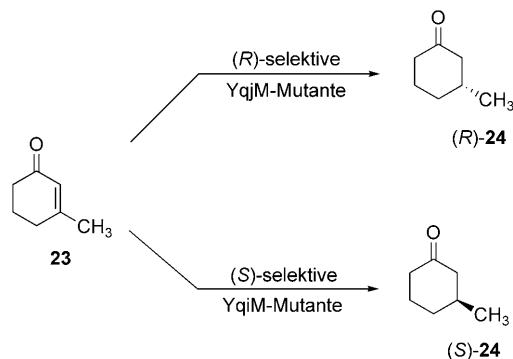


Schema 20. Mithilfe der YqjM-Röntgenstruktur abgeleiteter Reaktionsmechanismus der asymmetrische Olefinreduktion.^[82]

Carbonylfunktion des Substrats durch Wasserstoffbrücken ausgehend von His164 und His167 aktiviert werden.

Leider zeigt WT-YqjM nur geringe oder gar keine Aktivität sowie moderate Enantioselektivität bei vielen Substraten von praktischem Interesse. So erfolgt z.B. die Reduktion von 3-Methylcyclohexenon (**23**) nur langsam mit unbefriedi-

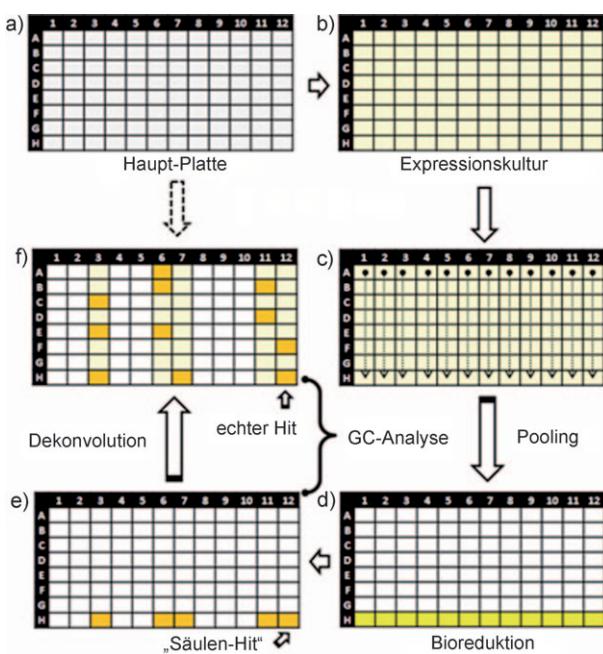
gender Stereoselektivität (76 % ee zugunsten von (*R*)-**24**) (Schema 21).^[82d] Wir stellten uns gleich mehrere Ziele, nämlich die Erhöhung der Enzymaktivität sowie Verbesserung und Umkehrung der Enantioselektivität der Modellreaktion. Gleichzeitig sollten die so evolvierten (*R*)- und (*S*)-selektiven Mutanten auch effiziente Katalysatoren bei der asymmetrischen Reduktion anderer Substrate sein.



Schema 21. Modellreaktion bei der gerichteten Evolution enantioselektiver Mutanten der Enoat-Reduktase YqjM.^[18]

Obwohl ISM naturgemäß relativ kleine Mutantenbibliotheken erfordert, wollten wir das Screening-Aufkommen noch weiter durch Pooling^[24] (Abschnitt 1) reduzieren. Ausgehend von der von Phizicky vorgestellten Idee,^[85] wonach prädefinierte Pools von Proteinen aus Genomsequenzen gescreent werden, entwickelten wir ein stufenweises GC-basiertes Protokoll (Schema 22).^[18] Die Anwendung unserer Methode auf das YqjM-Projekt, in dem 96er Mikrotiterplatten verwendet wurden, ging eindeutig mit geringerem Screening einher. Die Analyse einer vollständigen Spalte von acht gepoolten Vertiefungen („wells“) ließ den Schluss zu, dass weniger als 50 % der Proben hätten gescreent werden müssen. Somit ließ sich der Screeningaufwand mehr als halbieren. Die Vorteile einer solchen Poolingstrategie machen sich besonders bemerkbar, wenn Randomisierungsorte falsch gewählt werden, weil dann diese rasch eliminiert werden können. Anstelle von 96 GC-Analysen sind dann nur 12 erforderlich.^[18]

Nach Analyse der YqjM-Röntgenstruktur mit *p*-Hydroxybenzaldehyd (pHBA) als Inhibitor^[82c] identifizierten wir 20 Aminosäurepositionen für mögliche Sättigungsmutagenese (Abbildung 6). Als Richtlinie diente dabei der Abstand zwischen Aminosäure und Inhibitor. Die Aminosäuren der Triade His164/His167/Tyr169 wurden ausgeschlossen, da sie direkt am katalytischen Geschehen beteiligt sind. Die ausgewählten Aminosäurepositionen wurden grob in drei Gruppen aufgeteilt:^[18] 1) eine „heiße Zone“ bestehend aus Positionen Cys26, Tyr28, Ile69, Asp73 und Thr70 sowie zu einem geringeren Maß Met25, Met27 und Glu111, wobei die entsprechenden Seitenketten am nächsten zu dem β -C-Atom des Substrats situiert sind; 2) eine vermutlich „weiche Zone“ bestehend aus Ala60, Ala104 und Ala106 sowie Lys109, wobei die Seitenketten der Alanin-Einheiten vermutlich direkt auf das α -C-Atom des Substrats zeigen; 3) eine möglicherweise „indifferente Zone“ bestehend aus Leu103,



Schema 22. Protokoll für Screening unter Pooling von definierten Zellkulturen überexprimierter YqjM-Mutanten.^[18] a) Auswählen und Inokulation einzelner Kolonien. B) Induktion der Expression von YqjM-Mutanten. C) Zurückgewinnung durch Zentrifugieren einzelner Zellenpellets und Kombinieren aller acht Zellenpellets einer Spalte. D) Aufbrechen der Zellen und Inkubation von 12 Biotransformationen pro Platte durch Zugabe der erforderlichen Reagentien. E) Extraktion des Produkts mit organischen Solvens und GC-Analyse.

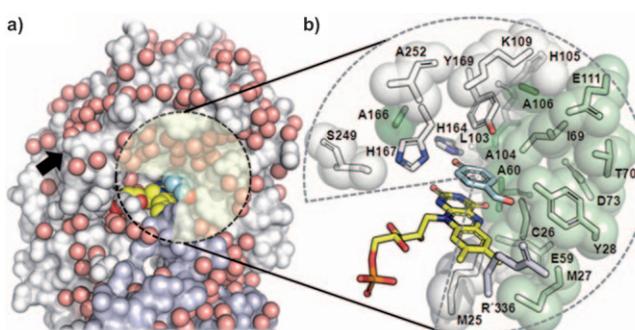


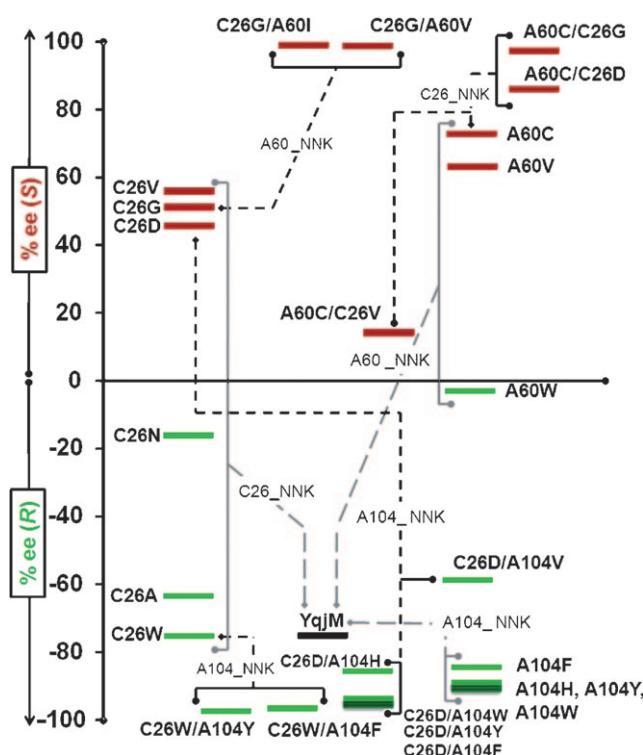
Abbildung 6. Die 20 Aminosäuren in der Nähe der Bindungstasche von YqjM, die für Sättigungsmutagenese im Zuge von CASTing ausgewählt wurden.^[18] a) Raumfüllendes Modell von YqjM (Kette A: hellgrau; Kette B: hellblau; rote Kugeln: H_2O -Moleküle; gelbe Kugeln: FMN; blaue Kugeln: *p*-Hydroxybenzaldehyd als Inhibitor). Einige H_2O -Moleküle am Eingang zur Bindungstasche wurden zur besseren Übersicht weggelassen. Der schwarze Pfeil deutet ein fernes Loop an. b) Vergrößerter Blick auf das katalytisch aktive Zentrum. Grün gekennzeichnete Aminosäure-Positionen führen bei der Sättigungsmutagenese zu Treffern, nicht aber die grau gekennzeichneten.

His105, Ala166, Ser249, Gly251, Ala258 und Arg336, wobei letztere zur Kette B gehört.

In jeder ISM-Studie muss entschieden werden, wie die einzelnen Aminosäurepositionen für die vorgesehene Sättigungsmutagenese gruppiert werden sollen. Im vorliegenden Fall könnte man z.B. zehn Orte bestehend aus je zwei Posi-

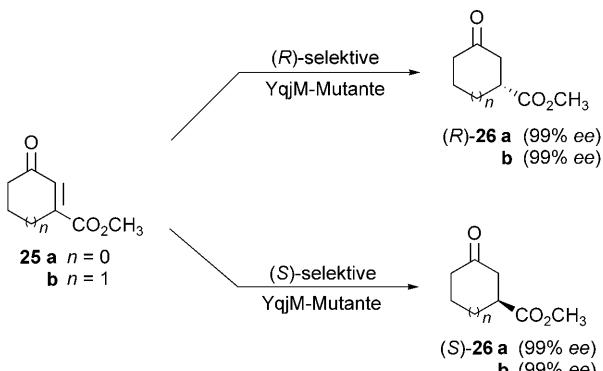
tionen wählen. Wie schon dargelegt, kann ISM unter Verwendung von Orten bestehend aus mehreren Aminosäurepositionen zu starken kooperativen Effekten führen (Abschnitt 3.2).^[72] Wie in Abschnitt 3.3 dargelegt, benötigen jedoch solche Orte ein höheres Maß an Oversampling als es bei einzelnen Aminosäurepositionen der Fall ist (was allerdings durch die Verwendung eines reduzierten Aminosäure-Alphabets wieder kompensiert werden kann).^[60] Im vorliegenden Fall optierten wir für 20 Orte mit je einer Aminosäureposition und wendeten NNK-Codon-Degeneration an (20 Aminosäuren als Bausteine), was das Screening von nur 100 Transformanten für 95 % Coverage benötigt.^[18] In einem weiteren Versuch wurden zwei Aminosäurepositionen, Cy26 und Ala60, gleichzeitig randomisiert, diesmal unter Verwendung der NDT-Codon-Degeneration (12 Aminosäuren als Bausteine) (Abschnitt 3.3). Dabei wurde unsere SLIC-basierte Methode zur Sättigungsmutagenese eingesetzt. Da die Modellverbindung **23** praktisch gar nicht von WT-YqjM reduziert wird (lediglich 1.2 % Umsatz unter den Bedingungen der 96er Mikrotiterplatten), wurde das Screeningsystem so konstruiert, dass Aktivität gemessen wurde.

Unter Anwendung des Pooling-Protokolls gekoppelt mit automatisierter GC-Analyse gelang die Erfassung der Enzymaktivität und anschließend der Enantioselektivität von je 100 Transformanten in den ersten 20 Mutantenbibliotheken. Dabei wurden bemerkenswerte Beobachtungen gemacht: 1) Von den 20 Bibliotheken erwiesen sich 9 als ergiebig, denn sie beherbergten besonders viele Treffer. 2) Sowohl (*R*)- als auch (*S*)-selektive Mutanten wurden identifiziert, oft in einer und derselben Bibliothek, ein Zeichen dafür, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure die Richtung der Enantioselektivität umkehren kann. 3) Erstaunlich hohe Enantioselektivitäten wurden in dieser ersten Mutagenese-Generation beobachtet mit *ee*-Werten von bis zu 91 % (*R*) und 84 % (*S*), obwohl kooperative Effekte noch gar nicht möglich sind. Eine begrenzte Zahl von ISM-Versuchen wurde dann in der zweiten Runde durchgeführt, speziell indem die Gene der aktiveren (jedoch nicht aktivsten) Treffer als Template für die Randomisierung an anderen aus einer Aminosäureposition bestehenden Orten eingesetzt wurden. Es ist keineswegs immer ratsam, den allerbesten Treffer für die nächste Runde zu verwenden, insbesondere wenn zwei verschiedene Katalyse-Eigenschaften gleichzeitig optimiert werden müssen, z.B. Aktivität und Enantioselektivität (siehe unten). Eine vollständige ISM-Systematisierung wurde im vorliegenden Fall nicht vorgenommen, auch wurden keine alternativen Gruppierungen getestet. Schon nach dem Screening von lediglich 5000 Transformanten wurden aktive (*R*)- und (*S*)-selektive Mutanten mit > 95 % *ee* identifiziert (Schema 23). Man erkennt ferner, dass verschiedene Pfade zu hochselektiven Mutanten führen, die jeweils unterschiedliche Aminosäureaustauschprozesse (Sequenzen) beinhalten. Schließlich wird ersichtlich, dass nur die Doppelmutanten der zweiten Generation zu solch guten Ergebnissen führen, gleichbedeutend mit dem Vorhandensein von starken kooperativen Effekten. Dieser Befund deutet darauf hin, dass eine Gruppierung der 20 Aminosäurepositionen in 10 Orte bestehend aus je zwei Aminosäuren die bessere Wahl gewesen wäre, was allerdings noch untersucht werden muss.



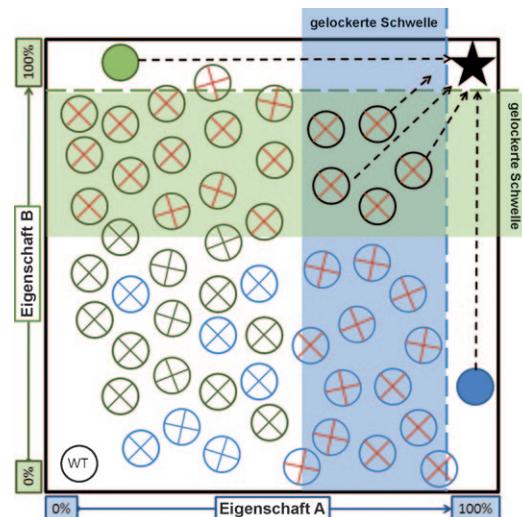
Schema 23. Anwendung von ISM auf die YqjM-katalysierte Bioreduktion von **23** als Modellreaktion.^[18] Hellgrauw Striche deuten die erste Mutageneserunde an, die schwarz gestrichelten die zweite Runde.

Einige der Mutanten wurden als Katalysatoren für die asymmetrische Reduktion weiterer Substrate wie 3-Alkylcyclohexenon-Derivaten und anderen Verbindungen getestet. In erstaunlich vielen Fällen wurden sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Selektivität beobachtet (93–99 % *ee*). Typisch sind Substrate **25a,b** (Schema 24).^[18] Hier zeigt sich erneut, dass Mutanten, die lediglich für ein bestimmtes Substrat evolviert wurden, als effiziente Katalysatoren für recht unterschiedliche Verbindungen dienen können bzw. eine präparativ interessante Substratbreite aufweisen. Erneute Mutagenesevereuche sind dabei nicht erforderlich.



Schema 24. Asymmetrische Reduktion der Ketoester **25a,b** mit YqjM-Mutanten, die ursprünglich für die Reaktion der Modellverbindung **23** evolviert wurden.^[18]

Wann immer in der gerichteten Evolution zwei Parameter verbessert werden müssen, wie im vorliegenden Fall bezüglich Aktivität und Enantioselektivität, sind zwei unterschiedliche Strategien möglich. Sequenzielle versus simultane Katalysatoroptimierung sind die beiden Optionen. Im vorliegenden Fall der simultanen Evolution erhöhter Aktivität und Enantioselektivität war es essenziell, nicht allzu strenge Auswahlkriterien anzulegen. Vielmehr wurden YqjM-Mutanten ausgesucht, die im Screening-Vorgang unterschiedliche Enzymaktivitäten zeigten. Es wurden also nicht die alleraktivsten Mutanten für die darauffolgende Generation eingesetzt. Die „beste“ Mutante ist nämlich nicht unbedingt die optimalste.^[18] Insbesondere wenn Orte bestehend aus einer einzigen Aminosäureposition der Sättigungs mutagenese unterworfen werden, ist es ratsam, eine Kollektion von Treffern zu berücksichtigen, die hohe sowie moderate Aktivitäten aufweisen. Diese können dann auf Enantioselektivität getestet werden, noch vor der nächsten Mutagene serunde. Solche nicht-verworfenen Mutanten („lateraler Treffer“) erinnern an die von Tawfik,^[86] Arnold^[87] und De Priesto^[88] vorgeschlagene Theorie des „neutralen Drifts“. Wir erkennen auch eine Beziehung zum Konzept der Quasispezies von Eigen und Schuster,^[89] das kürzlich von Mannervik und Kurtovic in ihrer Arbeit über gerichtete Evolution her angezogen wurde.^[90] Unsere im Falle der YqjM-Studie er folgreich verwendete Strategie ist in Schema 25 verallgemeinert. Im oberen rechten Teil des Schemas befinden sich die gewünschten Mutanten mit zwei verbesserten Katalysatoreigenschaften A und B.



Schema 25. Bevorzugte Vorgehensweise bei der simultanen Optimierung von zwei Katalysatoreigenschaften A und B.^[18] Der schwarze Stern symbolisiert die gewünschte bzw. doppelt optimierte Mutante; blaue und grüne gestrichelte Linien: hohe Schwellen; blaue und grüne schraffierte Rechtecke: gelockerte Schwellen; blau und grün gefüllte Kreise: beste Mutante bezogen auf Eigenschaft A bzw. B, die nicht für weitere Mutagenesevereuche verwendet werden: blaue und grüne Kreise mit roten Kreuzen: Mutanten mit verbesserten Eigenschaften A bzw. B; schwarze Kreise mit roten Kreuzen: Mutanten mit simultan verbesserten Eigenschaften A und B; schwarze gestrichelte Pfeile: zweite Mutageneserunde.

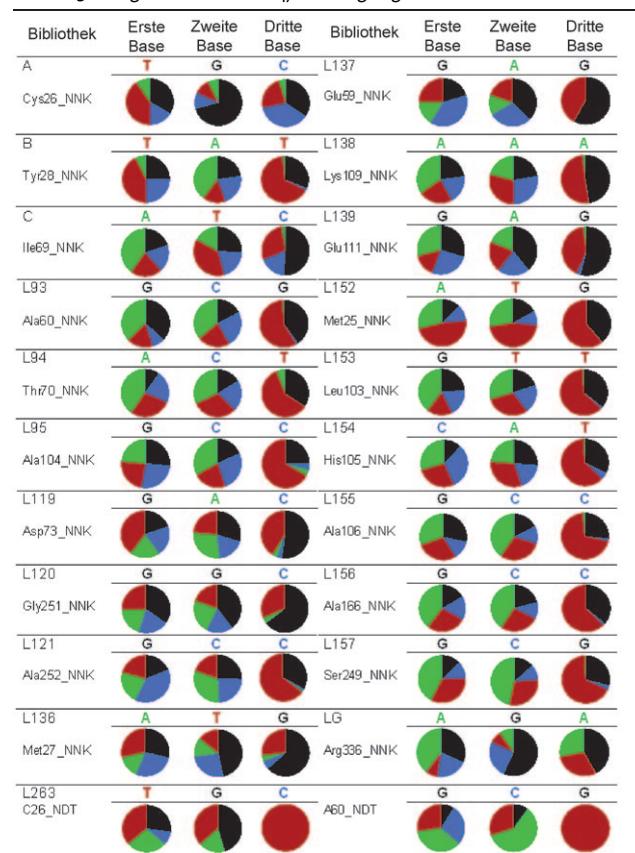
Schließlich wurde in dieser ISM-Studie auch die Frage nach der Qualität der Bibliotheken bezogen auf Aminosäure-Bevorzugung bzw. Benachteiligung gestellt.^[18] Da der experimentelle Aufwand groß ist, wurden Qualitätskontrollen dieser Art praktisch nie durchgeführt. Mit der zunehmenden Betonung auf Effizienz in der gelenkten Evolution^[4,18,20,59,60] sind jedoch Untersuchungen dieser Art lohnend. Tatsächlich dienen solche Checks dazu, unnötiges Screening zu verhindern, ganz im Sinne des Mottos „Es hat keinen Sinn, nach etwas zu suchen, das nicht existiert“!^[18] Beispielsweise erfordern Bibliotheken, in denen das zirkulare Templat nicht vollständig eliminiert worden ist, deutlich mehr Oversampling. Zu viele WT-Klone vermindern die Qualität einer Bibliothek. Noch schlimmer ist es, wenn bestimmte Codons unterrepräsentiert oder gar nicht in der Bibliothek vorhanden sind, denn dann wird sogar ein erhöhtes Oversampling das Problem nicht lösen. Deshalb ist irgendeine Form der Qualitätskontrolle außerordentlich hilfreich, auch wenn sie nicht durchgehend vollständig ist.

Die Extraktion und Analyse aller Plasmide in einer gegebenen Mutantenbibliothek bedeutet eine enorme wenn nicht unlösbare Aufgabe. In einer arbeitsmäßig vereinfachten Kontrolle überprüften wir die Qualität von Mutantenbibliotheken dadurch, dass Sequenzanalysen von gepoolten Plasmiden für jede Bibliothek vor der Transformation im Expressionsstamm durchgeführt wurden.^[18] Wie erwartet bei Sättigungsversuchen, sind die vier Basen nicht gleich verteilt, wie es idealerweise für Adenin (A), Thymin (T) Cytosin (C) und Guanin (G) (Tabelle 3) sein sollte. Eine gewisse Ungleichverteilung (5–10 %) kann schon aufgrund einer möglichen unsachgerechten Verteilung der synthetischen Primer resultieren. Ein weiteres Problem entsteht, wenn ein Teil des zirkularen Templat am Ende des Prozesses die Verdauung überlebt und transformiert wird. Schließlich werden manche Aminosäuren bevorzugt bzw. andere benachteiligt, wenn die gepoolten Primer unterschiedliche Annealing-Effizienzen aufweisen. Beim YqjM-Projekt wurden im Falle der Bibliotheken an den Orten A und B (NNK-Codon-Degeneration) auch zwei ANK-Bibliotheken generiert mit dem Ziel, das unterrepräsentierte Adenin zu kompensieren. Bei der simultanen Randomisierung an zwei voneinander weit entfernten Orten in YqjM (Positionen 26 und 60) wurde unsere SLIC-basierte Methode angewendet und einzelne Kolonien zur Sequenzierung geerntet. Die Ergebnisse zeigten unter anderem, dass die gewünschte vollständige Eliminierung des pET21a-YqjM-WT-Templats stattgefunden hat mit nur geringerer Ungleichverteilung einiger Basen bzw. Codons.^[18]

3.4.2. Rückkehr zur *Ps.-aeruginosa*-Lipase (PAL)

Wie in Abschnitt 2 dargelegt, diente die Lipase aus *Ps. aeruginosa* (PAL) jahrelang als Modellenzym beim Testen unterschiedlicher Mutagenesemethoden und Strategien, wobei stets die hydrolytische kinetische Racematspaltung des Esters **rac-1** als Modellreaktion verwendet wurde. Deshalb bot sich an, dieses Katalysatorsystem erneut zu nutzen, diesmal unter Einsatz von ISM. Das Ziel war, die neue Methode mit den ursprünglich extensiv verwendeten Strategien direkt zu vergleichen. Ferner galt es, alle theoretisch denkbaren

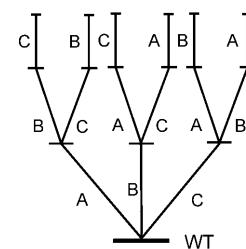
Tabelle 3: Degeneration der YqjM Sättigungsbibliotheken.^{[a][18]}



[a] Der Prozentsatz jeder Base wurde aus den Sequenzierungsdaten der gepoolten Plasmide für jede Bibliothek errechnet. Farbcodes: grün Adenin; rot Thymin; schwarz Guanin; blau Cytosin. Die Ergebnisse der simultanen Randomisierung an zwei Positionen wurden durch die Sequenzanalyse von elf individuellen Klonen erhalten.

Pfade eines definierten ISM-Schemas zu untersuchen.^[91] Da die komplexe Analyse eines ISM-Systems bestehend aus vier Orten einen erheblichen Arbeitsaufwand beinhaltet (Schema 13), haben wir das Schema auf drei Orte reduziert. Dies beinhaltet sechs evolutionäre Pfade und erfordert maximal 15 Randomisierungsbibliotheken (Schema 26).^[91] Im vorliegenden Fall bestehen die drei Orte A, B und C aus je zwei Aminosäurepositionen (Bezeichnung entspricht nicht Abbildung 3).

Nach dem Screening von nur 10000 Transformanten wurde eine sehr aktive und hoch enantioselektive PAL-Mu-



Schema 26. ISM-System bestehend aus drei Orten A, B und C.^[91]

tante evolviert mit einem Selektivitätsfaktor von $E = 594$ zugunsten von (S)-2.^[91] Dieser Wert wurde durch kinetische Untersuchungen von (R)- und (S)-1 ermittelt, denn die Anwendung der Sih-Gleichung ist bei einer solch hohen Enantioselektivität nicht sinnvoll. Das Ergebnis ist deutlich besser als die früher evolvierte Mutante ($E = 51$), die mithilfe von epPCR, DNA-Shuffling und Sättigungsmutagenese erhalten wurde, und die das Screening von 50000 Transformanten erforderlich gemacht hatte.^[28, 58a] Der Grund für die enorm erhöhte Enantioselektivität der neuen Mutante muss völlig anders sein als im Falle der ursprünglich evolvierten Variante, denn im vorliegenden Fall sind ferngelegene Mutationen ausgeschlossen. ISM scheint erneut die Methode der Wahl zu sein, eine Schlussfolgerung, die angesichts der extensiven Vergleichsdaten berechtigt ist.^[91]

3.4.3. Erhöhung und Umkehrung der Enantioselektivität der Lipase A aus *Candida antarctica*

In der bislang einzigen Studie zur gerichteten Evolution der Lipase aus *Candida antarctica* A (CALA) setzten Bäckvall und Mitarbeiter iteratives CASTing ein, um die (S)-Selektivität der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung des Esters **rac-27** zu erhöhen, aber auch umzukehren (Schema 27).^[92a] WT-CALA führt zu einem Selektivitätsfaktor von $E = 5.1$ zugunsten von (S)-28. Mithilfe der Kristallstruktur von CALA^[93] definierten die Autoren sechs Orte für Sättigungsmutagenese an der Bindungstasche, in einem Fall auch am Eingang und am C-Terminus (Deckel): Phe233/Gly237, Ile336/Val337, Phe149/Ile150 und Leu225/Thr221. Im Falle der simultanen Randomisierung an zwei Aminosäurepositionen wurde NDT-Codon-Degeneration gewählt, ansonsten NNK. In der ersten Randomisierungsrunde erwiesen sich die zwei besten Mutanten als (S)-selektiv (Thr64Met/Phe233Asn/Gly237Leu: $E = 19$) bzw. umgekehrt (R)-selektiv (Phe233Leu/Gly237Tyr: $E = 27$). Es sei erwähnt, dass die

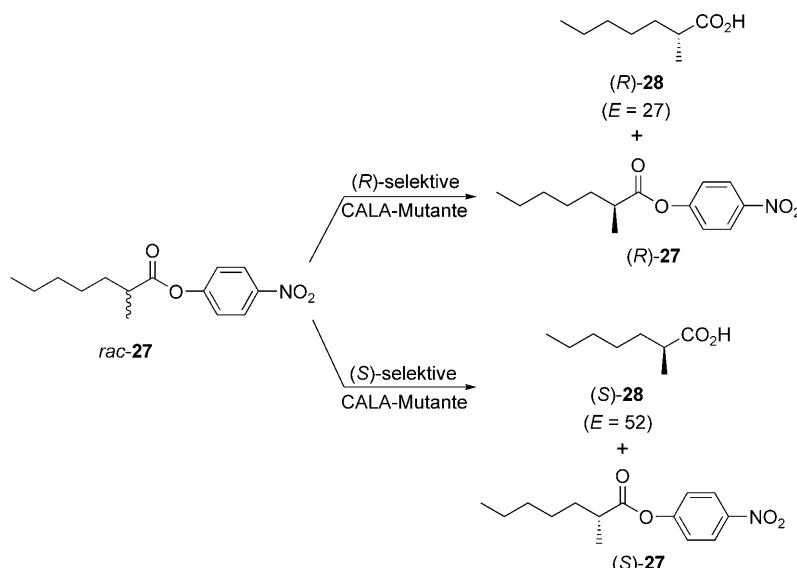
Punktmutation Thr64Met aus einem „Falscheinbau“ während des PCR-Vorgangs herrührt, einem Phänomen, das in der gerichteten Evolution gelegentlich beobachtet wird.^[4] Es wurde angenommen, dass diese Mutation die Stereoselektivität nicht beeinflusst. Verwendeten die Autoren das Gen der Mutante Thr64Met/Phe233Asn/Gly237Leu als Templat für die darauffolgende Sättigungsmutagenese am Ort 149/150, so wurde eine (S)-selektive Mutante (Thr64Met/Phe233Asn/Gly237Leu//Phe149Ser/Ile150Asp) mit deutlich erhöhter Enantioselektivität identifiziert ($E = 52$).^[92a] Diese Ergebnisse sind insbesondere deshalb bemerkenswert, weil nur eine sehr kleine Zahl von Transformanten gescreent werden musste. Eine umfangreichere Durchsuchung der eng definierten Protein-Sequenzraumes dürfte zu zusätzlichen Verbesserungen führen, und tatsächlich wurde dies später auf der Basis weiterer ISM-Experimente erreicht.^[92b]

3.4.4. Erweiterung der Substratbreite und Erhöhung der Enantioselektivität einer Arylmalonat-Decarboxylase

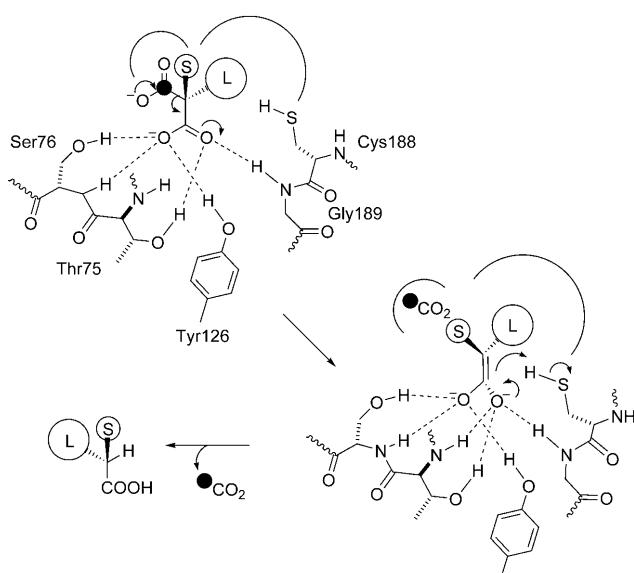
Die asymmetrische Decarboxylierung prochiraler α -disubstituierter Malonsäuren ermöglicht eine elegante Route zu chiralen Carbonsäuren. Dazu wurden verschiedene metallkatalysierte und organokatalytische enantioselektive decarboxylierende Protonierungsreaktionen (EDP) beschrieben, bislang blieben jedoch die jeweiligen Stereoselektivitäten moderat.^[94] Demgegenüber erwies sich Enzymkatalyse auf der Basis der Arylmalonat-Decarboxylase (AMDase) aus *Bordetella bronchiseptica* in einigen Fällen als hoch enantioselektiv.^[2, 95] Obwohl Enzyme dieses Typs robust sind und keine Cofaktoren erfordern, leiden sie alle unter begrenzter Substratkzeptanz, denn die Anwesenheit eines α -Arylsubstituenten ist stets erforderlich. So wäre z.B. der Ersatz der Aryl- durch eine Alkenylgruppe von großem präparativem Wert. Leys, Micklefield, Hauer und Mitarbeiter haben einen großen Schritt in diese Richtung unternommen, indem sie

ISM auf die AMDase anwendeten.^[96] In Kenntnis der Kristallstruktur der AMDase wurde zunächst ein Mechanismus postuliert, bei dem ein intermediäres Enolat-Dianion enantioselektiv protoniert wird (Schema 28). Eine kleine (S) und große (L) Höhle als Teile der Bindungstasche beherbergen die kleinen (S) bzw. großen (L) Substituenten des Substrats, z.B. Methyl- bzw. Phenylgruppen.

Fünf Aminosäurepositionen wurden im Zuge der CAST-Analyse für Sättigungsmutagenese identifiziert: Pro14, Pro15 und Gly190 an der großen solvensexponierten Aryl-Höhle sowie Val43 und Met159 an der kleineren hydrophoben Höhle (Abbildung 7 A).^[96] Ein erstes grobes Screening wurde mit Phenylmalonsäure ohne Bildung eines neuen Stereoenzentrums durchgeführt, um Aktivität zu messen, obwohl später prochirale Substrate mit Alkenyl- statt Phenylgruppen umgesetzt wurden. Zunächst wurden drei getrennte NNK-Bibliotheken an den Positionen 14, 15 und 190 generiert und jeweils etwa 100 Transformanten



Schema 27. Hydrolytische kinetische Racematspaltung von **rac-27** durch CALA-Mutanten.^[92]



Schema 28. Postulierter Mechanismus der AMDase, wobei S und L kleine bzw. große Substituenten symbolisieren.^[96]

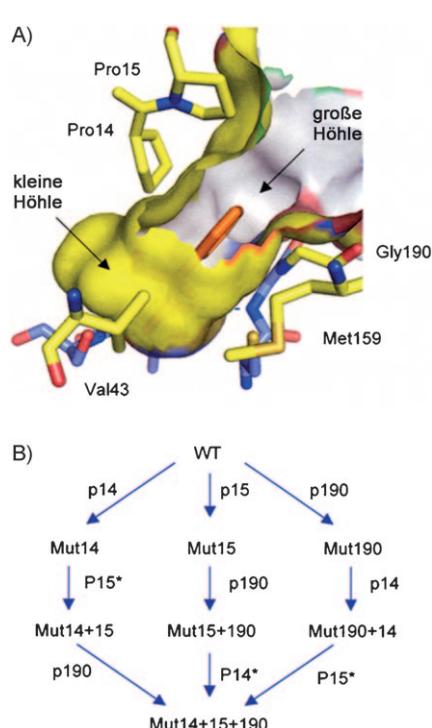
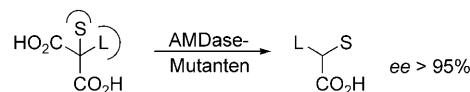


Abbildung 7. A) Aktives Zentrum der AMDase aus *B. bronchiseptica* mit großer und kleiner Höhle als Teil der Bindungstasche. B) Mutagenese-Strategie basierend auf ISM.^[96]

auf Aktivität im Vorabtest gescreent. Einige der so identifizierten bzw. aktiveren Mutanten wurden anschließend als Ausgangspunkt für Sättigungsmutagenese an anderen Orten verwendet. In einigen – aber nicht allen – Fällen wurde der ISM-Prozess bis in die dritte Generation fortgesetzt. Es handelt sich also um ein ISM-Schema mit drei Randomisie-

rungsorten, so wie im Falle der PAL-Untersuchung (Schema 26, Abschnitt 3.4.2), jedoch diesmal mit Orten bestehend je aus einer Aminosäureposition. Allerdings wurden nicht alle Pfade untersucht, was auch nicht unbedingt erforderlich ist. Im Falle der Sättigungsmutagenese an Orten in der Nähe der kleinen hydrophoben Höhle wurden verbesserte Mutanten mit Aminosäuresubstitutionen an der Position 159 identifiziert, jedoch keine an der Position 43. Als die Gene dieser Mutanten als Template für Randomisierung an Position 49 verwendet wurden, ließen sich keine verbesserten Varianten nachweisen. Die Möglichkeit, einen Link zwischen Positionen 14/15/190 und 49/159 herzustellen, wurde nicht geprüft. Hingegen gelangen andere ISM-Experimente unter Evolvierung hoch aktiver Mutanten (Aktivitätsfaktor von bis zu 51). Die begrenzte ISM-Übung ist in Abbildung 7B zusammengefasst.^[96]

Entscheidend ist der Befund, dass die so evolvierten Mutanten deutlich erhöhte Aktivität bei der Reaktion von 2-Alkyl-2-alkenyl- und 2-Amino-2-phenylmalonsäure-Derivaten relativ zur WT-AMDase zeigen unter Beibehaltung hoher Stereoselektivität (> 95 % ee) (Schema 29). Die Doppelmu-



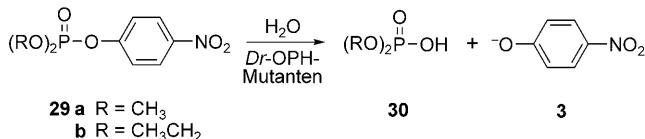
Schema 29. Durch AMDase-Mutanten katalysierte enantioselektive Decarboxylierung von prochiralen Malonsäure-Derivaten.^[96]

tante Pro14Val/Pro15Gly erwies sich als ein vielseitiger Biokatalysator, was auch auf molekularer Ebene erklärt wurde. Es ist wahrscheinlich, dass weitere ISM-Versuche zu noch besseren Katalysatoren führen würden. Diese strukturbasierte Methode könnte auch dazu eingesetzt werden, die Richtung der Enantioselektivität umzukehren, was von großem präparativem Wert wäre.

3.4.5. Veränderung der Substratakzeptanz der Amidohydrolase aus *Deinococcus radiodurans* mit Generierung einer Phosphotriesterase

In diesem Abschnitt wird eine kürzlich erschienene Studie beschrieben, in der ISM zur Erhöhung der Enantioselektivität einer sehr langsamen „Fremdreaktion“ genutzt wird. Nach den bahnbrechenden Arbeiten von Rauschel zur gerichteten Evolution von Phosphotriesterasen als Katalysatoren beim Abbau von Organophosphaten (Pestizide und chemische Kampfstoffe)^[53] wurde entdeckt, dass eine Amidohydrolase aus *Deinococcus radiodurans* (*Dr-Oph*) ebenfalls Phosphotriesterase-Aktivität zeigt.^[97] Allerdings erwies sich die Aktivität, wie so oft im Falle von promiskuen enzymkatalysierten Reaktionen,^[98] als ausgesprochen gering. Da *Dr-Oph* ungewöhnlich thermostabil ist und hohe Konzentrationen von Phosphoestern toleriert, lag es nahe, die Aktivität mithilfe der gerichteten Evolution zu steigern. In einer breit angelegten und sorgfältig durchgeführten Studie, die Kinetik, DSC-Experimente sowie Röntgenstrukturanalysen einschloss, setzte Mesecar und Mitarbeiter rationale ortsspezifische Mutage-

nese, epPCR und ISM ein.^[97] Dabei dienten die entgiftenden Hydrolysen des Methyl- (**29a**) und des Ethylparaoxons (**29b**) als Modellreaktionen. Das Ziel war es, die *Dr*-OPH-Aktivität beim Abbau dieser sehr langsam reagierenden Verbindungen deutlich zu steigern (Schema 30).



Schema 30. Entgiftende Hydrolyse von Methyl- und Ethylparaoxon (**29a-b**) mittels Katalyse durch *Dr*-OPH-Mutanten.^[97]

Sättigungsmutagenese an ausgewählten CAST-Orten erwies sich als erfolgreich, insbesondere im Zuge von drei iterativen Runden. Nach dem Screening von 30000 Transformanten wurden mehrere hochaktive Mutanten identifiziert. So wurde die Enzymaktivität bei der Reaktion von **29a** und **29b** um einen Faktor von 322 bzw. 126 erhöht. Nebenbei wurde auch eine gesteigerte Spezifität festgestellt. Mithilfe der Röntgenstrukturen von WT-*Dr*-OPH und Mutanten gelang es, das drastisch veränderte Katalyseprofil auf molekularer Ebene zu erklären. Obwohl ein systematisches Vorgehen nicht angestrebt wurde, sind die praktischen Ergebnisse eindrucksvoll. Deshalb zogen die Autoren den Schluss, dass ISM die ideale Methode der gerichteten Evolution ist.^[97]

3.4.6. Änderung der Coenzym-Bindungsspezifität einer Xylose-Reduktase

ISM ist nicht nur zur Steuerung der Stereoselektivität und/oder die Substratakzeptanz (Aktivität) bestens geeignet. Wie Lin und Mitarbeiter berichteten, ist die Methode auch dann erfolgreich, wenn eine Änderung der Bindungsspezifität eines Coenzymes angestrebt wird.^[99] Als konkretes Ziel sollte ein Wechsel von NADPH- zu NADH-Spezifität einer NADPH-abhängigen Xylose-Reduktase aus *Pichia stipitis* (PsXR) bewirkt werden. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Fermentation von Xylose unter Bildung von Bioethanol. Da die Xylose der zweithäufigste erneuerbare Zucker auf Erden ist, hat ihre Fermentation großes wirtschaftliches Potenzial.^[100] Der Fermentationsprozess ist leider mit praktischen Problemen behaftet, denn der Wirtsorganismus *Saccharomyces cerevisiae* kann Xylose nicht effizient verwerten. Aus diesem Grund wurden unter anderem Gene in den Xylose-Metabolismus von anderen Organismen eingeschleust. Dies wiederum machte einen NADPH→NADH-Wechsel erforderlich, denn so dürfte die inhärente Redox-Uausgeglichenheit im Stoffwechsel aufgehoben werden.^[99] Da keine Kristallstruktur von PsXR zur Verfügung stand, wurden zunächst mithilfe der Röntgendiffraktionsdaten einer verwandten Xylose-Reduktase aus *Candida tenuis*^[101] (76 % Homologie) ein Homologiemodell erstellt. Auf dieser Basis wurden sechs Aminosäurepositionen identifiziert, die vermutlich an der Komplexierung des Coenzymes teilnehmen: Gln219,

Glu223, Lys270, Ser271, Asn272 und Arg276. Diese wurden in drei Gruppen von je zwei Aminosäurepositionen eingeteilt (Abbildung 8).^[99]

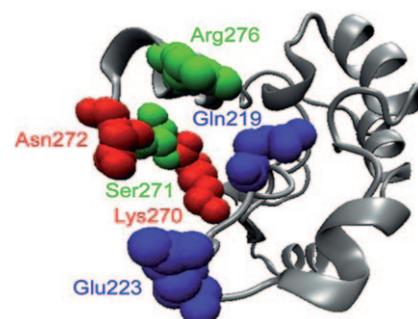


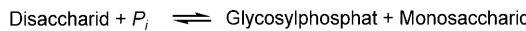
Abbildung 8. Sechs Aminosäuren der Xylose-Reduktase PsXR, die vermutlich an der Komplexierung von NADPH/NADH beteiligt sind.^[99] Diese wurden im ISM-Prozess in drei Orte mit je zwei Aminosäure-Positionen gruppiert (rot, grün und blau).

Das komplette ISM-Schema aus drei Orten, 270/272, 271/276 und 219/223, besteht aus sechs verschiedenen Pfaden und 15 Sättigungsbibliotheken (vgl. Schema 26, Abschnitt 3.4.2). Es ist aber nicht nötig, alle Wege zu untersuchen. Unter Verwendung von NNK-Codon-Degeneration wählten die Autoren den Pfad (270/272)→(271/276)→(219/223) und screenten in jeder Bibliothek ungefähr 1400 Transformanten entsprechend 75 % Coverage. Die erste Mutantenbibliothek enthielt (mindestens) eine verbesserte Mutante, Lys270Ser/Asn272Pro, deren Gen als Templat in der nächsten Mutationsrunde am Ort 271/276 verwendet wurde. Dies ergab die vierfache Mutante Lys270Ser/Asn272Pro/Ser271Gly/Arg276Phe, die NADH um einen Faktor 13 bevorzugte. Dies entspricht einer 42-fachen Verbesserung, wie die entsprechenden k_{cat}/K_M -Werte zeigten. Die kinetische Analyse deutete darauf hin, dass der Wechsel der Coenzymspezifität durch k_{cat}^{NADPH} bewirkt wird. Die letzte Sättigungsrounde am Ort 219/223 führte zu keiner merklich verbesserten Mutante. Die Autoren postulieren zu recht, dass dies keineswegs dafür spricht, dass 219/223 kein empfindlicher Ort („hot site“) ist; andere ISM-Pfade können durchaus dort positive Mutationen aufweisen.^[99] Weitere ISM-Versuche dürften noch bessere Resultate liefern, jedoch war das praktische Problem schon gelöst. Die beste Mutante kann nun in einen rekombinanten Xylose-fermentierenden *S. cerevisiae*-Stamm zusammen mit PsXDH kloniert werden unter Bildung eines modifizierten Stoffwechsels mit optimierten Redoxeigenschaften.^[99] Dies ist das erste Beispiel für die Anwendung von ISM zur Änderung der Spezifität eines Coenzymes. Aufgrund der Einfachheit des Verfahrens dürften weitere Fälle dieser Art in Zukunft folgen.

3.4.7. Umwandlung einer Cellobiose- in eine Lactose-Phosphorylase

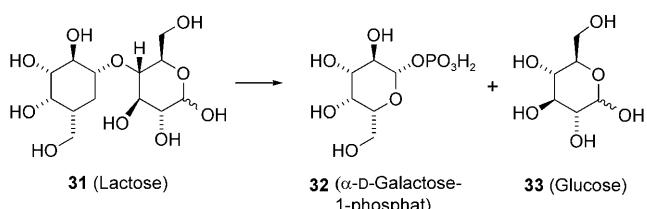
Disaccharidphosphorylaser (DSPs) sind eine spezielle Klasse von Enzymen (E.C. 2.4.1), die die reversible Phosphorylyse von Disacchariden katalysieren mit Bildung eines

Glycosylphosphats und eines Monosaccharids (Schema 31). Sie nehmen an dem energieeffizienten Metabolismus von Kohlenhydraten teil. DSPs sind auch dazu befähigt, Glycosyltransfer- und Glycosylhydrolysereaktionen zu katalysieren. So wurden sie immer wieder bei präparativ bedeutsamen Umwandlungen eingesetzt, die sonst mit herkömmlichen Methoden der organischen Synthesechemie nicht realisierbar sind.



Schema 31. Selektive Disaccharidphosphorylase-katalysierte Spaltungsreaktionen.^[102]

Es ist bestens bekannt, dass DSPs keine Lactose (31) als bevorzugtes Substrat akzeptiert.^[102] Dies ist bedauerlich, denn sonst bestünde ein billiger und einfacher Weg zum wertvollen Produkt α -D-Galactose-1-phosphat (α Gal1P, 32) (Schema 32). Lediglich ein einziges phosphorolytisches



Schema 32. Selektive Bildung von α -D-Galactose-1-phosphat (32) aus Lactose (31), katalysiert von einer mittels ISM evolvierten Mutante einer Cellobiose-Phosphorylase.^[104]

Enzym ist dazu befähigt, diese hoch selektive Reaktion zu katalysieren, nämlich die α Gal1P in der Muttermilch, die allerdings nicht in genügend großen Mengen gewonnen werden kann.^[103] De Groot, Vandamme, Soltaert und Mitarbeiter haben dazu eine clevere Strategie entwickelt.^[104] Mithilfe der gerichteten Evolution wurde eine Cellobiose-Phosphorylase (CP) in eine aktive Lactose-Phosphorylase (LP) überführt. Zunächst prüften sie epPCR, wendeten sich jedoch dann der Sättigungsmutagenese in Form von ISM zu.

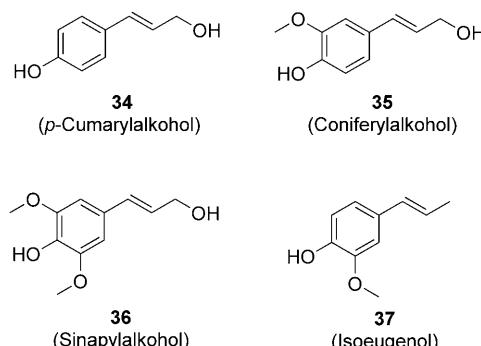
Die Forscher wählten die CP aus *Cellulomonas uda* als Enzym, welches eine äußerst geringe Aktivität bei der gewünschten Umsetzung von Lactose (31) aufweist.^[104] Es sei darauf hingewiesen, dass sich Cellobiose und Lactose lediglich an der Konfiguration der C4-Hydroxygruppe unterscheiden. Die CP aus *C. uda* ist ein mechanistisch gründlich untersuchtes Enzym und kann in *E. coli* sehr gut exprimiert werden. Obwohl die Autoren nicht auf eine Kristallstruktur zurückgreifen konnten, stellten sie ein zuverlässiges Homologiemodell auf, wodurch die Anwendung von ISM möglich wurde. Zunächst wurde jedoch eine andere Strategie verfolgt, indem epPCR auf die Region zwischen Aminosäuren Thr216 und Val757 fokussiert wurde, also auf alle Positionen innerhalb von 15 Å vom katalytischen Zentrum. Bei einer Mutageneserate von 6.4 DNA Mutationen/kp wurden etwa 10^5 DNA-Klone erzeugt. Es handelt sich um eine Zufallsmutation, jedoch mit ausgeprägter Bevorzugung von GC→N-Mutationen (89%). Die beste Mutante (LP1) mit erhöhter

Lactose-Aktivität hat sechs Punktmutationen, Ala397Val/Thr508Ala/Ala512Thr/Asp557Asn/Asn667Thr/Gly681Ser, und zeigt eine dreifache Steigerung der spezifischen Lactose-Aktivität relativ zu WT-CP.^[104] Partielle Dekonvolution der sechs Punktmutationen ergab, dass einige überflüssig sind. Diese negative Begleiterscheinung bei der Anwendung von epPCR überrascht nicht (Abschnitt 2).

Die Autoren lenkten dann ihr Augenmerk auf die Mutante Thr508Ala/Asn667Thr, die bei der Dekonvolution zugegangen waren und die ein gewisses Maß an Lactose-Aktivität aufwies. Diese beiden direkt an der Bindungstasche befindlichen Positionen wurden für ISM-Versuche ausgewählt. In diesem Fall wurde NNS-Codon-Degeneration verwendet (S: Cytosin/Guanin), welche alle 20 proteinogenen Aminosäuren kodiert. NNS beinhaltet 32 Codons und ein Stop-Codon und wurde in der Studie anstelle der sonst üblichen NNK-Codon-Degeneration gewählt, weil sie für das angewendete Expressionssystem besser geeignet ist. In einem ersten Experiment wurde Position 667 randomisiert unter Verwendung des WT-CP-Gens. Dabei dienten Lactose und KH_2PO_4 als Substrate. Insgesamt wurden 96 Transformanten gescreent mit dem Ergebnis, dass sich Asn667Ala als die beste Mutante erwies. Gegenüber Lactose ist sie deutlich aktiver als WT-CP und mindestens zweimal aktiver als die Einzelmutante Asn667Thr. ISM wurde dann initiiert, indem das Gen der Variante Asn667Ala als Templat für die Sättigungsmutagenese an der Position 508 verwendet wurde. Dies führte zur Doppelmutante Asn667Ala/Thr508Ile mit erhöhter LP- und CP-Aktivität. Bemerkenswerterweise zeigt diese Mutante eine 7.5-fache spezifische Lactose-Aktivität relativ zum WT-Enzym.^[104] Kinetische Untersuchungen zeigten, dass die gesteigerte LP-Aktivität auf einem erhöhten k_{cat} -Wert beruht.^[104] Zur Erklärung der Ergebnisse wurde ein anschauliches Modell vorgeschlagen. Ein extensiveres ISM-basiertes Suchprogramm dürfte zu noch besseren Ergebnissen führen.

3.4.8. Modifizierung der Lignin-Biosynthese für bessere Verwendung von Pflanzen zur Papierherstellung, Biokraftstoff-Produktion und Landwirtschaft

Die Pflanzenkomponente Lignin ist ein unregelmäßiges racemisches Biopolymer bestehend aus hydroxylierten und O-methylierten Phenylpropan-Einheiten, die durch oxidative Kupplung von drei verschiedenen Hydroxycinnamylalkoholen (Monolignolen) entstehen, nämlich *p*-Cumaryl- (34),



Coniferyl- (**35**) und Sinapylalkohol (**36**).^[105] Sie unterscheiden sich im Ausmaß des *O*-Methyltransferase-katalysierten Vorgangs in der Biosynthese von Lignin. Freie *para*-Hydroxyfunktionen sind bei der oxidativen Bildung und Kupplung von Phenoxyradikalen unter Bildung des Biopolymers erforderlich. Um Pflanzenmaterial bei der Produktion von Papier und Biokraftstoffen sowie allgemein in der Agrikultur besser zu nutzen, sollte die relative Menge an chemisch labilem S-Lignin erhöht werden. Im Prinzip kann dies dadurch erreicht werden, dass eine 4-*O*-Methyltransferase erzeugt wird, die dazu befähigt ist, die Methylierung von *para*-Hydroxygruppen der als Vorstufen dienenden Monolignole zu katalysieren. In diesem Sinne beinhaltet die Änderung der Lignin-Biosynthese eine enorme Herausforderung, die von Liu und Bhuiya kürzlich angenommen wurde.^[106] Sie setzten gerichtete Evolution auf der Basis von ISM ein, um die gewünschte *para*-Regioselektivität einer 4-*O*-Methyltransferase als Katalysator bei der *O*-Methylierung von Monolignolen zu bewirken. Zum Zwecke des Screenings wurde Isoeugenol (**37**) verwendet.

Isoeugenol-4-*O*-methyltransferase (IEMT) aus *Clarkia breweri* wurde als das zu optimierende Enzym gewählt, da es die 4-*O*-Methylierung des strukturell verwandten Isoeugenols (**37**) katalysiert. Mit dem Ziel, die Substratbreite so zu erweitern, dass auch Monolignole akzeptiert werden unter Beibehaltung der strengen Regioselektivität, wurden zunächst einige „rationale“ Ansätze probiert. So wurden z. B. Sequenzfragmente ausgetauscht, allerdings ohne Erfolg. Nach Erzeugung eines Homologiemodells wurden sieben Aminosäurepositionen für die Sättigungsmutagenese ausgesucht. Die sieben Bibliotheken wurden auf Coniferylalkohol-Aktivität gescreent, wobei insgesamt 30 aktive Mutanten entdeckt wurden. Die zwei aktivsten Varianten erwiesen sich als Thr133Leu und Glu165Phe. Um eine weitere Aktivitätssteigerung zu evolvieren, wurden einige ISM-Experimente durchgeführt. So wurde die Glu165Phe Mutante als Templat zur Sättigungsmutagenese an den anderen sechs Positionen verwendet, ferner Thr133Leu als Ausgangspunkt für die Randomisierung an Position 165. Dies ergab mehrere deutlich verbesserte Doppelmutanten. Einige zeigten zufälligerweise Kombinationen von Einzelmutationen, so z. B. Thr133Leu/Glu165Phe und Thr133Leu/Glu165Ile. Diese wurden in einer letzten ISM-Runde verwendet, um Randomisierungen an den Positionen 139 und 175 durchzuführen. Gleich mehrere verbesserte Mutanten wurden identifiziert, unter anderem die Dreifachmutante Thr133Leu/Glu165Ile/Phe175Ile als bester Katalysator. Kinetische Studien zeigten, dass diese Mutante eine 70-fach erhöhte Aktivität bei der Reaktion von **35** und **36** relativ zum WT aufweist unter Beibehaltung der vollständigen *para*-Selektivität. Die Neugestaltung der Bindungstasche ist in Abbildung 9 dargestellt mit Kennzeichnung der entscheidenden Mutationen an den Positionen 133, 165 und 175. Interessant wäre eine alternative ISM-Strategie, wonach die Einzelpositionen in Randomisierungsorte bestehend aus zwei oder drei Positionen gruppiert werden. Die gegenwärtigen Ergebnisse sind aber an sich schon so eindrucksvoll, dass die Anwendung in Pflanzen möglich erscheint.^[106]

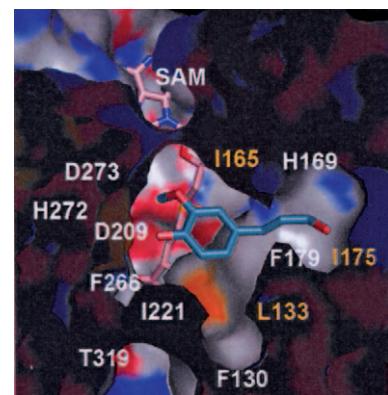


Abbildung 9. Durch ISM umgestaltete Bindungstasche von IEMT.^[106] Gekennzeichnet sind die Punktmutationen der Mutante Thr133 Leu/Glu165Ile/Phe175Ile (gelb/orange) und das durch Docking eingelagerte Substrat **34** (blau/rot).

3.4.9. Umwandlung einer Cyclodextrin-Glucanotransferase in eine α -Amylase

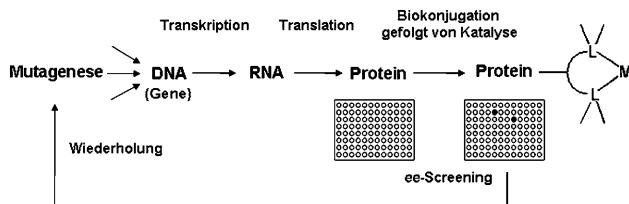
In einer aufschlussreichen Studie über Vor- und Nachteile der epPCR versus Sättigungsmutagenese gelang es Dijkhuijzen und Mitarbeiter, eine Cyclodextrin-Glucanotransferase in eine α -Amylase umzuwandeln.^[107] Unter Einsatz einer Serie von kleinen Sättigungsbibliotheken an Positionen direkt an der Bindungstasche und Anwendung der ISM-Strategie wurde der angestrebte Selektivitätswechsel glatt erreicht. Dabei wurden lediglich zwischen 320 und 720 Transformanten gescreent. Im Gegensatz dazu führten deutlich größere epPCR-Bibliotheken nur zu einer geringen Verbesserung des katalytischen Profils.

3.4.10. Umkehrung der Enantioselektivität der Esterase aus *Burkholderia gladioli*

In einer kürzlich erschienenen Studie berichteten Schwab und Mitarbeiter über den glücklichen Versuch, die Enantioselektivität der Esterase aus *Burkholderia gladioli* (EstB) als Katalysator bei der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von Methyl- β -hydroxyisobutyrat umzukehren.^[108] Sie demonstrierten einmal mehr, dass die Kombination von Strukturdaten eines Enzyms und iterative Randomisierung an korrekt ausgewählten Positionen eine überzeugende Strategie in der gerichteten Evolution ist. Tatsächlich wurde zunächst epPCR getestet, aber dies war nicht sonderlich erfolgreich, um die (*S*)-Selektivität der WT-EstB in eine hoch (*R*)-selektive Mutante zu überführen. Demgegenüber führten mehrere ISM-Runden an der Bindungstasche von EstB zu einer Mutante mit einem Selektivitätsfaktor von $E=29$. Studien dieser Art sind deshalb wichtig, weil Chemiker sowohl (*R*)- als auch (*S*)-selektive Katalysatoren auf optionaler Basis benötigen.

3.4.11. Anwendung von ISM in der gerichteten Evolution von Hybrid-Katalysatoren

Eine klare Einschränkung der Biokatalyse besteht darin, dass Enzyme nicht dazu befähigt sind, die vielen asymmetrischen Stoffumwandlungen zu katalysieren, die mit der Übergangsmetallkatalyse möglich sind (Abschnitt 1).^[1,2] Um diese Lücke zu schließen, haben wir vor einiger Zeit das Konzept der gerichteten Evolution enantioselektiver Hybrid-Katalysatoren vorgeschlagen (Schema 33).^[109] Seit Jahrzehn-



Schema 33. Konzept der gerichteten Evolution von Hybrid-Katalysatoren, bei dem der Fluss der manipulierten genetischen Information vom Gen zum Übergangsmetallkatalysator entscheidend ist.^[109,112,113]

ten war bekannt, dass Ligand-Metall-Einheiten an Proteine kovalent oder nichtkovalent verankert werden können.^[110] Das erste Beispiel war das Whitesides-System, bei dem ein biotinylierter Diphosphan-Rhodium-Komplex nichtkovalent an Avidin gebunden ist.^[111] Der so hergestellte supramolekulare Komplex diente als Katalysator für die asymmetrischen Hydrierung eines prochiralen Olefins. Obwohl sich die Enantioselektivität als moderat erwies (33–44 % ee), wurde mit dieser bahnbrechenden Arbeit eine Tür für weitere Forschungen aufgestoßen.^[110,111b] Leider führt eine solche Prozedur lediglich zu einem einzigen Katalysator, dessen Enantioselektivität eine Sache des Zufalls ist. Das in Schema 33 skizzierte Konzept bietet eine Lösung dieses Problems an. Es bedeutet, dass die Darwinistischen Prinzipien der gerichteten Evolution herangezogen werden können, um die Stereoselektivität eines synthetischen Übergangsmetallkatalysators zu optimieren. Parallel zu diesem Konzept hat Ward das Whitesides-System weiterentwickelt, indem die Spacerlänge zwischen Rh-Ligand und Biotin variiert sowie ortsspezifische Mutagenese angewendet wurde.^[111b]

Bei der praktischen Verwirklichung des Darwinistischen Konzepts (Schema 33) müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt werden.^[109c,112,113] Das Expressionssystem muss ergiebig sein, denn in den Vertiefungen der verwendeten Mikrotiterplatten ist deutlich mehr Protein erforderlich als normalerweise in der gerichteten Evolution üblich. Dies hängt damit zusammen, dass Übergangsmetallkatalysatoren normalerweise deutlich weniger aktiv sind als Enzyme, d.h., erheblich mehr Hybrid-Katalysator ist erforderlich! Ferner ist in Schema 33 ein einfacher Hochdurchsatz-Reinigungsschritt erforderlich. Schließlich sollte die Biokonjugation quantitativ verlaufen. Obwohl nicht alle Voraussetzungen erfüllt wurden, gelang uns „proof-of-principle“ durch Anwendung des Whitesides-Systems.^[112] Die fehlende Voraussetzung war ein genügend produktives Expressionssystem für Avidin oder Streptavidin, das bis zum heutigen Tag nicht existiert. Wir

waren daher gezwungen, die gerichtete Evolution nicht mit den üblichen Mikrotiterplatten durchzuführen, sondern mit großen Erlenmeyerflaschen! So konnten nur sehr kleine Mutantenbibliotheken erzeugt und gescreent werden. Trotz dieser Einschränkung gelang es, mithilfe der ISM-Strategie und Verwendung eines reduzierten Aminosäure-Alphabets (NDT-Codon-Degeneration) in drei Stufen die Enantioselektivität einer asymmetrischen Olefin-Hydrierung von 23 % ee auf 65 % ee schrittweise zu steigern.^[112] Weitere Forschung unter Verwendung anderer Wirtproteine ist auf diesem interessanten Forschungsgebiet angesagt, insbesondere im Hinblick auf andere Typen von Übergangsmetallkatalysierten Reaktionen. Die bisherigen Beiträge zu diesem Thema wurden kürzlich zusammengefasst.^[109c]

4. Sättigungsmutagenese an distalen Orten jenseits der Bindungstasche

4.1. Struktur-basierte Vorgehensweisen zur Sättigungsmutagenese an ferngelegenen Orten im Enzym

Bislang haben wir mit Randomisierungsorten zu tun, die sich direkt an der Bindungstasche eines Enzyms befinden. Trotz der Erfolge stellte sich die Frage, ob Sättigungsmutagenese zur Steuerung der Stereoselektivität und Substratakzeptanz auch an distalen Orten denkbar ist. Es war bekannt, dass im Falle von epPCR und DNA-Shuffling solche Mutationen tatsächlich vorkommen können (Abschnitt 2).^[4,25,28,33,58,114] Für eine sinnvolle Anwendung der Sättigungsmutagenese ist jedoch ein strukturbasierter Ansatz notwendig. Die Herausforderung besteht darin, zuverlässige Kriterien für die korrekte Wahl der Randomisierungsorte zu entwickeln. Wir haben dazu zwei verschiedene Strategien entworfen, die die Dynamik von Enzymen berücksichtigen. In einem Fall fokussiert man auf Aminosäurepositionen, die sich direkt hinter den normalen CAST-Positionen befinden, also in der zweiten Sphäre („second sphere residues“).^[42] Diese sind nicht in direktem Kontakt mit dem in der Bindungstasche befindlichen Substrat, jedoch immer noch nicht weiter als 10–15 Å entfernt. Mutationen an solchen Orten könnten durchaus die Gestalt der Bindungstasche beeinflussen.

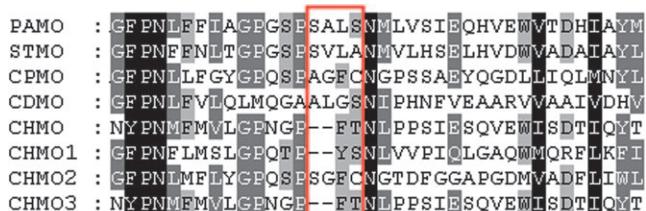
Der zweite Ansatz für eine rationale Entscheidung hinsichtlich der Wahl eines ferngelegenen Randomisierungsorts basiert auf allosterischen Effekten in Abwesenheit von Effektor-Molekülen.^[73] Man wählt ein Randomisierungsort aus, von dem man aufgrund mechanistischer und struktureller Kenntnisse erwarten kann, dass dort Mutationen zu Bewegungen von Enzymdomänen führen werden. Dies beinhaltet eine echte Herausforderung, denn die korrekte Wahl erfordert eine detaillierte Analyse der dreidimensionalen Struktur des Enzyms.

4.2. Sättigungsmutagenese an Aminosäurepositionen in der zweiten Sphäre

PAMO ist die erste und bislang einzige thermostabile Baeyer-Villiger-Monoxygenase (BVMO) (Abschnitt 2).

Damit besteht die Möglichkeit, die Verwendung von ganzen Zellen zu umgehen, nämlich durch Entwicklung eines In-vitro-Verfahrens bestehend aus isoliertem Enzym und einem NADPH-Regenerationssystem^[38-41] mit einer sekundären Alkoholdehydrogenase und Isopropylalkohol als Reduktionsmittel. Da PAMO praktisch nur Phenylacetone und ähnliche lineare Arylketone akzeptiert, stellten wir uns das Ziel, die Substratbreite dieses robusten Enzyms zu erweitern. Die genetische Manipulation von Cofaktor-abhängigen Enzymen ist generell schwieriger als die von Cofaktor-unabhängigen Proteinen, insbesondere weil erstere oft ausgeprägte dynamische Strukturveränderungen im Zuge der Katalyse eingehen. Unser erster Versuch zum Protein-Engineering der PAMO bestand darin, den Loop zwischen den Positionen 441 und 444 neben der Bindungstasche zu kürzen (Abschnitt 2, Abbildung 2), jedoch war diese rationale Vorgehensweise nur teilweise erfolgreich.^[40]

Der zweite Versuch bezog sich auf die Optimierung des Loops mithilfe von CASTing, in diesem Fall mit Fokus auf „first-sphere“-Aminosäuren im Teilssegment 441–444.^[41] Randomisierung eines Vier-Positionen-Orts unter Verwendung von NNK-Codon-Degeneration würde zwecks 95 % Coverage das Screening von 3.1 Millionen Transformanten erfordern (Abschnitt 3.3, Tabelle 2). Die Anwendung von NDT-Codon-Degeneration böte sich als Alternative an, denn nur 62000 Transformanten wären für 95 % Coverage erforderlich. Die Gruppierung der vier Einzelpositionen in Segmente ist eine weitere Option. Beim Versuch, das Zahlenproblem der gerichteten Evolution zu lösen, wählten wir einen bioinformatikgestützten Ansatz, in dem zunächst ein Sequenzvergleich von acht BVMOs in der relevanten Loop-region vorgenommen wurde (Schema 34).^[41] An den vier



Schema 34. Sequenzvergleich von acht BVMOs (das Loop-Segment 441–444 ist rot gekennzeichnet).^[41]

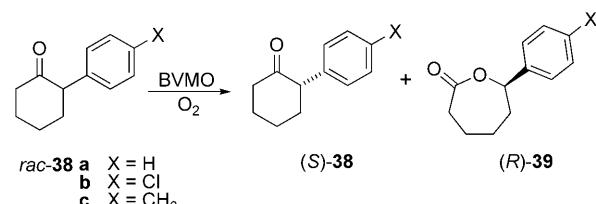
Positionen 441, 442, 443 und 444 kommen nur bestimmte konservierte Aminosäuren-Kombinationen vor, nämlich Ser/Ala, Ala/Val/Gly/Leu, Leu//Phe/Gly/Tyr bzw. Ser/Ala/Cys/Thr. Entsprechende Codon-Degenerationen wurden ausgesucht, die diese Aminosäuren codieren, wobei zusätzlich eine begrenzte Zahl weiterer Aminosäuren zwecks höherer struktureller Diversität berücksichtigt wurde (Tabelle 4).^[41]

Wir stellten uns die Aufgabe, PAMO-Mutanten zu evolvieren, die 2-Arylcyclohexanon-Derivate wie **rac-38a–c** rasch umsetzen unter enantioselektiver Bildung der Lactone **39a–c** (Schema 35). WT-PAMO ist ein ausgesprochen schlechter Katalysator, denn im Falle von **rac-38a** beträgt der Umsatz auch bei verlängerten Reaktionszeiten (2 Tage) und erhöhten Mengen an Enzym weniger als 10 %, und dies bei fehlender

Tabelle 4: Wahl der Codon-Degeneration an jeder Position im PAMO-Loop-Segment 441–444.^[41] Codon-Degenerationen: A (Adenin); B (Cytosin/Guanin/Thymin); C (Cytosin); G (Guanin); S (Cytosin/Guanin). Zur Definition von K und N, siehe Text.

Aminosäure-positionen	Codon-Degeneration	verschlüsselte Aminosäure	Codons	Oversampling für 95 % Coverage
441	KCA	A, S	864	2587
442	KBG	S, A, L, V, W, G		
443	BGC	F, H, L, V, Y, G, D, R, C		
444	NSC	S, A, P, T, R, G, C		

Enantioselektivität ($E = 1.2$ (S)). Mit den gewählten Codon-Degenerationen müssten für 95 % Coverage etwa 2600 Transformanten für die Sättigungsmutagenese im Loop-Seg-



Schema 35. Oxidative kinetische Racematspaltung katalysiert durch PAMO-Mutanten.^[41]

ment 441–444 gescreent werden. Wir untersuchten lediglich 1700 und waren dennoch fündig. Diese informatikgestützte Strategie ergab mehrere leicht verbesserte (S)-selektive Mutanten, z.B. Ser441Ala/Ala442Leu/Leu443Val/Ser444Ala ($E = 2.9$; 36 % Umsatz/24 h), sowie ein Satz von Mutanten mit umgekehrter Enantioselektivität, z.B. Ser441Ala/Ala442Trp/Leu443Tyr/Ser444Thr ($E = 70$; 46 % Umsatz/24 h). Diese beiden Mutanten enthalten je vier ausgetauschte Aminosäuren, jedoch wurden auch (R)-selektive Mutanten identifiziert, die lediglich zwei oder drei Punktmutationen enthalten. Einige Mutanten wurden bei der oxidativen kinetischen Racematspaltung des Substrats **rac-38b** getestet, ohne dass dabei neue Mutageneseversuche durchgeführt wurden. In diesen Fällen waren die Ergebnisse noch besser, denn fünf unterschiedliche Mutanten zeigten E -Werte von > 130 , z.B. Ser441Ala/Ala442Trp/Leu443Tyr/Ser444Thr ($E > 200$; 59 % Umsatz/24 h). Ferner wurde gezeigt, dass die Einführung der Punktmutationen nicht zur Abnahme der Thermostabilität führt.^[41]

Diese Studie beweist die Nützlichkeit eines bioinformatikgestützten Ansatzes zur Sättigungsmutagenese. Der Erfolg war jedoch begrenzt, denn weitere Substrate wie das *p*-Tolylanalogen **rac-38c** ließ sich nicht zur Reaktion bringen. Eine Möglichkeit für zukünftige Untersuchungen besteht in der Gruppierung der vier Aminosäurepositionen 441, 442, 443 und 444 in zwei Randomisierungsorte A und B bestehend aus je zwei Positionen, gefolgt von ISM. Diese Art des systema-

tischen Vorgehens würde zwei unterschiedliche ISM-Pfade erfordern, A→B und B→A, die theoretisch zu unterschiedlichen Mutanten mit verbesserten katalytischen Profilen führen könnten.

An diesem Punkt stellten wir jedoch Überlegungen dieser Art zurück und griffen eine ganz andere Idee auf, nämlich Aminosäuren in der zweiten Sphäre („second sphere“) zu berücksichtigen (erweitertes CASTing).^[42] Allerdings ist es aufgrund der Dynamik von Enzymen nicht einfach, solche Stellen im Enzym einwandfrei zu identifizieren. In der Hoffnung, ein realistisches Bild der PAMO-Bindungstasche und ihrer unmittelbaren Umgebung zu gewinnen, führten wir „induced-fit-docking“-Experimente durch mit Phenylacetin als Substrat.^[42] Das Ergebnis deutete darauf hin, dass das gebundene Substrat sowie das katalytisch wichtige Arg337, welches das Criegee-Intermediat stabilisiert, beide an der *re*-Seite des Flavins (FAD) vorkommen. Ferner konnten wir zwei mutmaßliche „second-sphere“-Aminosäuren direkt hinter dem Loop-Abschnitt 441–444 identifizieren, nämlich Pro437 und Pro440 (Abbildung 10).

Statt das übliche **rac-38a** als Modellverbindung zu verwenden, stellten wir uns die Frage, ob die erheblich „schwierigeren“ Substrate **rac-40a–i** nicht auch zur Reaktion gebracht werden können (Schema 36). 2-Alkylcyclohexanon-Derivate werden vom WT-PAMO nicht akzeptiert. Das

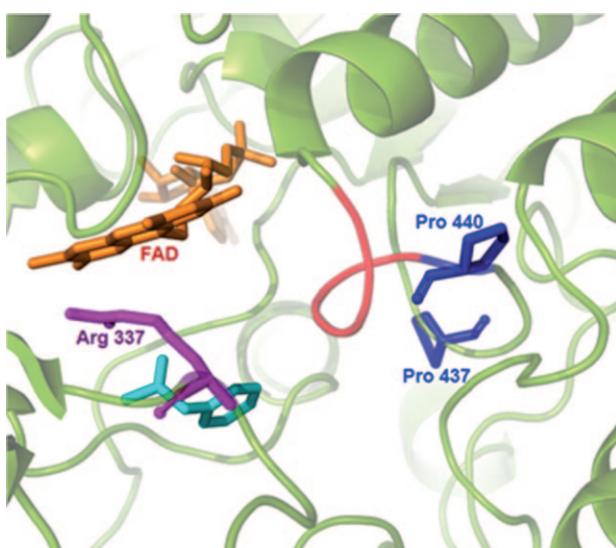
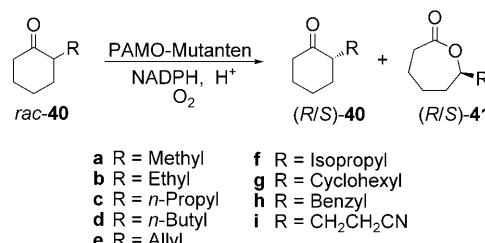


Abbildung 10. Bindungstasche von PAMO mit den mutmaßlichen „second-sphere“-Aminosäuren Pro437 und Pro440 (blau) sowie Phenylacetin (türkis) als Substrat, erstellt durch „induced fit docking“.^[42] Die rote Schleife symbolisiert den Loop-Abschnitt 441–444.

Keton **rac-40b** wurde als Testsubstrat bei den Randomisierungsexperimenten an Positionen 437 und 440 eingesetzt. Wir hofften, dass im Falle eines Erfolges die entsprechenden Mutanten auch im Falle der anderen Ketone **40** wirksam sein würden. Zwei getrennte fokussierte Mutantenbibliotheken wurden mittels der üblichen Sättigungsmutagenese unter Verwendung der NNK-Codon-Degeneration erzeugt, wobei in beiden Fällen je 200 Transformanten für >95% Coverage gescreent wurden.^[42]



Schema 36. Oxidative kinetische Racematspaltung von **rac-40a–i**.^[42]

Während die Sättigungsbibliothek an der Position 437 zu keinen deutlich verbesserten PAMO-Mutanten führte, erwiesen sich die Ergebnisse im Falle der zweiten Position (440) als erfreulich, denn eine überraschend große Zahl von aktiven Treffern wurde registriert, wobei zehn sequenziert wurden. Dabei zeigten fünf Mutanten deutlich erhöhte Aktivität bei exzellenter Enantioselektivität (Tabelle 5).^[42] Da die übliche Sättigungsmutagenese manche Aminosäuren benachteiligt, erschien es möglich, dass die eine oder andere verbesserte Mutante nicht gebildet worden war. Daher wurden alle „fehlenden“ Mutanten mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese gezielt hergestellt und in der Modellreaktion **40b**→**41b**

Tabelle 5: Oxidative kinetische Racematspaltung von **rac-40b** unter Verwendung von PAMO-Mutanten aus der Sättigungsbibliothek (Einträge 1–5) und aus ortsspezifischer Mutagenese (Einträge 6 und 7), in beiden Fällen an der Position 440.^[42]

Nr.	Mutante	<i>E</i> -Wert	<i>K_m</i> [mM]	<i>k_{cat}</i> [s ⁻¹]	<i>k_{cat}</i> / <i>K_m</i> [M ⁻¹ s ⁻¹]
1	Pro440Phe	26	0.89	1.2	1300
2	Pro440Leu	>200	1.6	0.72	450
3	Pro440Ile	>200	2.7	0.66	240
4	Pro440Asn	34	2.2	1.5	680
5	Pro440His	>200	1.0	0.83	830
6	Pro440Trp	>200	1.3	1.3	1000
7	Pro440Tyr	95	1.9	1.1	580

getestet. Von neun relevanten Fällen, Pro440Ala, Pro440Val, Pro440Ser, Pro440sp, Pro440Glu, Pro440Gln, Pro440Tyr, Pro440Trp und Pro440Met, erwiesen sich lediglich zwei als aktiv, nämlich Pro440Tyr und Pro440Trp (Tabelle 5, Einträge 6 und 7). Somit wird klar, dass Sättigungsmutagenese unter Verwendung des QuikChange-Protokolls gekoppelt mit genügend hohem Oversampling zur Abdeckung von >95% der Mutantenbibliothek zu mindestens 80% Trefferidentifizierung führt. Information dieser Art ist neu, sollte aber bei zukünftigen Sättigungsmutagenese-Experimenten berücksichtigt werden.

Die besten Mutanten wurden anschließend als Katalysatoren bei der oxidativen Racematspaltung der anderen 2-Alkylcyclohexanon-Derivate getestet (Schema 36). In allen Fällen wurden erstaunlich hohe Aktivität und ausgeprägte Enantioselektivität beobachtet (*E*=30–200). Sogar das seltige 2-Cyclohexylcyclohexanon (**rac-40g**) reagiert rasch und mit hoher Stereoselektivität, z.B. *E*=69 (Mutante Pro440Ile), *E*=119 (Mutante Pro440Tyr) und *E*>200 (Mutante Pro440Leu). Bestimmte bicyclische Ketone ließen sich

ebenfalls mit hoher Stereoselektivität oxidieren. Schließlich sei erwähnt, dass die Erhöhung der Aktivität und Enantioselektivität nicht auf Kosten der hohen PAMO-Stabilität einhergeht.^[42]

Die oben dargelegten Daten wurden alle in einem *In-vitro*-System erhalten, in dem isolierte PAMO-Mutanten in Kombination mit einem ebenso robusten NADPH-Regenerationssystem eingesetzt wurden. Zur Regeneration des Cofaktors wurde die thermostabile sekundäre Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* mit Isopropylalkohol als Reduktionsmittel verwendet. Somit stellt diese Studie einen großen Schritt zu ökonomisch und ökologisch nützlichen BVMO-bedingten BV-Reaktionen in der organischen Chemie und Weißen Biotechnologie dar, ohne dass dabei ganze Zellen eingesetzt werden müssen.^[42]

Es sei angemerkt, dass die Industrie häufig Systeme mit ganzen Zellen bevorzugt, aber auch in diesen Fällen sind BVMOs mit erhöhter Thermostabilität erwünscht, denn die Lebensdauer solcher Systeme unter Prozessbedingungen ist ganz klar länger. Alle Mutageneseversuche wurden auf zwei Randomisierungsorte fokussiert unter Anwendung eines einzigen Substrats (*rac-38b*), wobei insgesamt lediglich 400 Transformanten gescreent werden mussten.^[42] Dennoch bleibt abzuwarten, ob Sättigungsmutagenese an Aminosäurepositionen in der zweiten Sphäre als effiziente Strategie verallgemeinert werden kann und ob ISM bei diesem Ansatz erfolgreich sein wird.

4.3. Durch Sättigungsmutagenese erzeugte Allosterei-induzierende Mutationen an ferngelegenen Positionen

Allosterei wird als positiv- oder negativ-kooperatives Geschehen in Proteinen definiert, das zu einer strukturellen Änderung der Bindungstasche führt als Folge der Anlagerung einer Verbindung (Effektor) an einer ferngelegenen Stelle.^[115] Viele experimentelle und rechnerische Techniken wurden herangezogen, um die Einzelheiten dieses Phänomens aufzudecken, unter anderem die Methode der gerichteten Evolution.^[116] Ein ganz anderer Ansatz wäre es, gerichtete Evolution heranzuziehen, um allosterische Kommunikation durch geeignete Mutationen an ferngelegenen Stellen im Enzym zu bewirken, die mit Konformationsänderungen einhergehen. Somit könnte es möglich sein, die Struktur und Dynamik am aktiven Zentrum in Abwesenheit eines Effektors zu ändern bzw. ein neues Katalyseprofil herbeizuführen.^[73] Ferngesteuerte Effekte wurden schon in der gerichteten Evolution von Enzymen mit erhöhter Enantioselektivität und/oder Aktivität beobachtet,^[4,25,28,33,58,114] jedoch wurden sie nicht mit allosterischen Effekten in Zusammenhang gebracht. Unsere Überlegungen schienen nicht ganz abwegig zu sein, denn verwandte allosterische Effekte kommen in der Natur vor, so z.B. bei einigen durch Mutationen verursachten Krankheiten. Diese können entweder die Funktion eines allosterischen Enzyms außer Kraft setzen, oder sie können das Gegenteil bewirken, indem sie Konformationsänderungen hervorrufen, die zur Aktivierung führen in Abwesenheit eines Effektors. Das G-Protein ist ein solcher Fall.^[115a] Dennoch ist es keine triviale Aufgabe, distale Orte in einem Enzym zu

identifizieren, an denen Randomisierung zu Mutationen führt, die allosterische Effekte auslösen.

Um diese unkonventionelle Möglichkeit zu testen, wählten wir einmal mehr Phenylaceton-Monoxygenase (PAMO) und analysierten sorgfältig die Röntgenstruktur.^[73] Bei der Suche nach geeigneten Orten für Sättigungsmutagenese machten wir Gebrauch von einigen in der Literatur bekannten Aussagen hinsichtlich der Beziehung zwischen der Bewegung der NADP-Bindungsdomäne und dem Katalysemechanismus der PAMO.^[39] So lenkten wir unser Augenmerk auf bestimmte Mutationsstellen weit weg vom aktiven Zentrum. Interessanterweise ließ die PAMO-Kristallstruktur erkennen, dass die Zahl der Möglichkeiten begrenzt ist. Eine logische Option wäre es, auf Peptidsequenzen zwischen bestimmten sekundären Elementen zu fokussieren („hinge regions“), jedoch bestehen diese im Falle von PAMO und anderen BVMOs aus hoch konservierten Sequenzen. Deshalb haben wir eine andere Strategie verfolgt, nämlich potenzielle Randomisierungsorte zwischen der NADP- und der FAD-Bindungsdomäne ausfindig zu machen. Mutationen könnten dazu führen, dass Domänen enger zusammenrücken, wodurch gleichzeitig die Gestalt der Bindungstasche geändert wird (Abbildung 11).^[73]

Die Röntgenstruktur von WT-PAMO^[39] weist mehrere anziehende Kontakte zwischen den NADP- und FAD-Bindungsdomänen auf, die nicht weit weg von der „hinge“-Region sind.^[73] Sie befinden sich zwischen dem Loop-Segment Trp177-Glu180 (NADP-Domäne) und dem Loop-Segment Tyr56-Tyr60 (FAD-Domäne), wobei die π -Kation-Wechselwirkung zwischen His179 und Arg59 ein Beispiel ist.

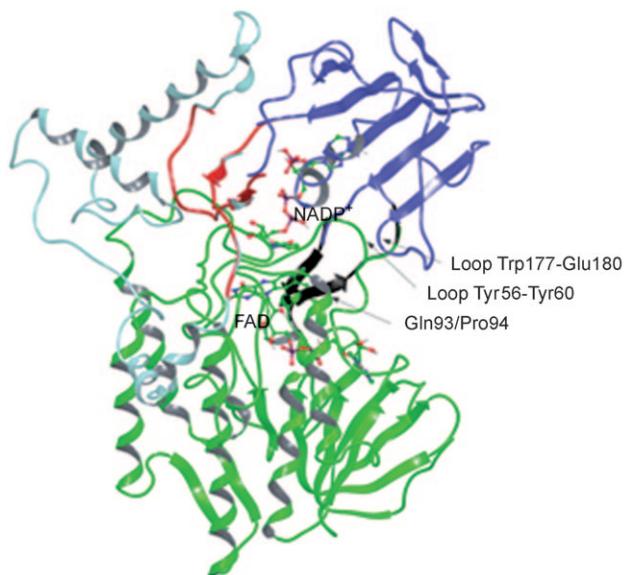


Abbildung 11. Darstellung der unterschiedlichen Domänen der PAMO^[73] (FAD-Domäne: grün; NADPH-Domäne: dunkelblau; helicale Domäne: hellblau). Die NADP- und FAD-Bindungsdomänen sind miteinander verbunden durch zwei antiparallele β -Stränge in einer Scharnier-artigen Anordnung („hinge“; schwarz). Die NADP-Bindungsdomäne und die helicalen Domänen können als zwei getrennte Einheiten betrachtet werden, die durch zwei Segmente miteinander verbunden sind (rot). Die ausgewählte Randomisierungsstelle Gln93/Pro94 in der N-terminalen Region der α -Helix ist ebenfalls gekennzeichnet.

Direkt dahinter und in losem Kontakt mit dem Loop-Segment Tyr56–Tyr60 ist der N-terminale Bereich (Ala91–Glu95) einer α -Helix, der naturgemäß ein riesiges sekundäres Element darstellt. Wir erwarteten, dass geeignete Mutationen in diesem Teil der Helix zu starken anziehenden Wechselwirkungen zwischen Loop-Segment Trp177–Glu180 führen würden (Abbildung 11).^[73] Daher wurde Gln93/Pro94 als Randomisierungsort gewählt (Abbildung 12). Diese Entscheidung wurde auch deshalb getroffen, weil die benachbarte Aminosäure an Position 92 das letzte Glied eines langen Loops ist, das sich parallel zum Loop-Segment Asp–Tyr befindet, das wiederum in direktem Kontakt zum Flavinring steht. Docking-Simulationen mit Phenylaceton in der Bin-

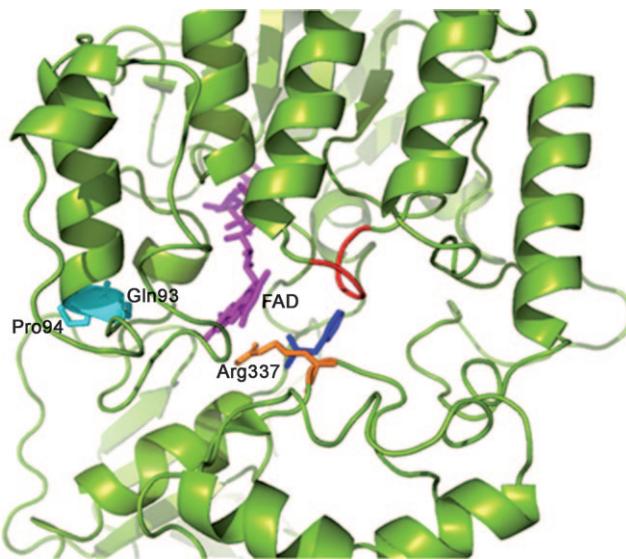


Abbildung 12. Auszug aus der Röntgenstruktur von PAMO mit Kennzeichnung des gewählten Randomisierungsorts Gln93/Pro94^[73] (türkis), FAD (lila), Arg337 (orange), Phenylaceton (grau) und Loop-Segment 441–444, an dem in einer vorangegangenen Studie Mutationen erfolgte (rot).

dungstasche von WT-PAMO deuteten darauf hin, dass das Substrat etwa 18 Å von Position 93 entfernt ist.^[73]

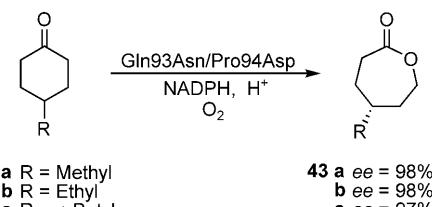
Als Ergebnis dieser Analyse wurden die Aminosäurepositionen des Orts 93/94 gleichzeitig mithilfe der Sättigungsmutagenese randomisiert. Dazu wählten wir NDT-Codon-Degeneration, d.h. ein reduziertes Aminosäure-Alphabett bestehend aus zwölf Bausteinen (Abschnitt 3.3), die ein Oversampling von lediglich 400 Transformanten zwecks 95 % Coverage der entsprechenden Mutantenbibliothek erfordert. Unter Verwendung der Modellreaktion bzw. der oxidativen kinetischen Racematspaltung von 2-Ethylcyclohexanon (**rac-40b**) (Schema 36) in Verbindung mit einem NADPH-Regenerationssystem bestehend aus einer thermostabilen sekundären Alkoholdehydrogenase mit Isopropylalkohol als Reduktionsmittel in einem In-vitro-Prozess, wurden etwa 400 Klone gescreent. Dabei wurden zwei Treffer identifiziert. Die aktiveren Mutante Gln93Asn/Pro94Asp wurde bei allen weiteren Untersuchungen verwendet. In der Reaktion von **rac-40b** unter bevorzugter Bildung von (*S*)-**41b** zeigt

diese Doppelmutante einen Selektivitätsfaktor von $E=50$. Bemerkenswert ist auch der Befund, dass die Mutante eine erstaunlich breite Substratakzeptanz (Aktivität) aufweist bei jeweils hoher Stereoselektivität, denn alle die in Schemata 36 und 37 gezeigten Verbindungen ließen sich glatt umgesetzt (Tabelle 6 sowie Schema 37).^[73] Weitere Aktivitätssteigerungen sind unter Verwendung von ISM oder DNA-Shuffling denkbar.

Das katalytische Potential der PAMO-Mutante Gln93Asn/Pro94Asp wurde auch zur Desymmetrisierung von 4-substituierten Cyclohexanonderivaten **42a–c** unter Bildung der Lactone **43a–c** (Schema 37) getestet. Es zeigte sich, dass in allen Fällen hohe Enantioselektivität erzielt wurde. Inter-

Tabelle 6: Oxidative kinetische Racematspaltung der Ketone **rac-38a,c** und **rac-40a–j**, katalysiert durch die PAMO-Mutante Gln93Asn/Pro94Asp.^[73] Zur Beachtung: Die *R/S*-Bezeichnung kann sich im Rahmen der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention umkehren; die absolute Konfiguration ist durch die Formeln angegeben.

Nr.	Substrat	spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Umsatz [%]	Restliches Keton		Lacton		E-Wert
				ee [%]	Abs. Konfig.	ee [%]	Abs. Konfig.	
1	rac-38a	64	45	38	S	95	R	92
2	rac-38c	40	17	2.7	S	18	R	1.5
3	rac-40a	35	15	46	R	91	S	25
4	rac-40b	49	21	25	R	95	S	50
5	rac-40c	42	37	37	R	95	S	68
6	rac-40d	51	36	14	R	92	S	40
7	rac-40e	24	23	19	R	94	R	42
8	rac-40f	39	15	17	R	>99	R	>200
9	rac-40g	48	42	43	S	86	R	25
10	rac-40h	58	43	58	S	98	R	>200
11	rac-40i	52	11	17	S	96	R	55



Schema 37. Desymmetrisierung prochiraler Ketone **42a–c** unter Verwendung der PAMO-Mutante Gln93/Pro94Asp.^[73]

essant ist auch der Befund, dass die absolute Konfiguration der Lactone durchweg umgekehrt ist als bei Katalyse unter Verwendung der thermolabilen CHMO.

Wichtig für industrielle Anwendung ist der Befund, dass die hohe Thermostabilität von WT-PAMO in der Mutante Gln93Asn/Pro94Asp beibehalten wird. Dekonvolutionsexperimente ergaben weiterhin, dass die entsprechenden Einzelmutanten, Gln93Asn bzw. Pro94Asp, keine messbare Aktivität als Katalysatoren bei der Modellreaktion von **rac-40b** aufweisen.^[73] Dies deutet auf einen starken kooperativen Effekt zwischen den beiden Punktmutationen in der Dop-

pelmutante Gln93Asn/Pro94Asp hin. Wäre eine andere Strategie hinsichtlich der Gruppierung der Aminosäurepositionen 93 und 94 gewählt worden, nämlich diese einzeln bzw. getrennt zu randomisieren, so wäre das Ergebnis mager geblieben.

Mit dem Ziel, den Ursprung der erhöhten Aktivität aufzudecken und somit unser ursprüngliches Postulat bezüglich der möglichen induzierten Allosterie zu überprüfen, haben wir Moleküldynamik(MD)-Simulationen mit WT-PAMO und der evolvierten Doppelmutante durchgeführt. Aus Platzmangel sei auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet.^[73] An dieser Stelle genügt die Aussage, dass signifikante Konformationsänderungen an den beiden Domänen tatsächlich stattfinden, die zu einer Neugestaltung der Bindungstasche führen. Der Vergleich der beiden Bindungstaschen ist in Abbildung 13 aufgeführt.^[73] Interessanterweise erinnern die konformativen Unterschiede an die kürzlich publizierte Kristallstruktur der CHMO aus einem *Rhodococcus*-Stamm mit gebundenem FAD und NADP⁺.^[117] Sie kommt in zwei verschiedenen Formen vor, entsprechend einer geschlossenen und offenen Konformation. Die Umwandlung der einen

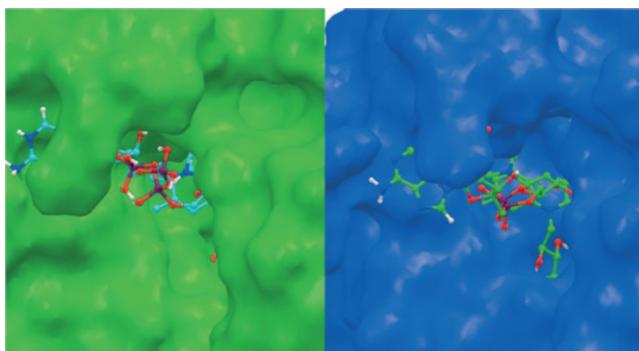


Abbildung 13. Vergrößerte Darstellung der Bindungstasche von WT-PAMO (links) und der evolvierten Mutante Gln93Asn/Pro94Asp (rechts) generiert mithilfe von MD-Simulationen.^[73]

Konformation in die andere bedingt die Bewegung des NADP⁺-Cofaktors, ganz wie der mutationsbedingte allosterische Effekt in unserem System. Die MD-Simulationen sind nicht nur im Einklang mit der synergistischen Wirkung der beiden Punktmutationen, die gemeinsam den allosterischen Effekt auslösen. Sie legen auch die lokalen strukturellen Änderungen an der Bindungstasche offen.^[73]

Um die Schlussfolgerung zu überprüfen, wurden sogenannte „covariance maps“ der Doppelmutante und der WT-PAMO konstruiert.^[73] Diese sind bekannte Indikatoren für die Existenz von korrelierten und antikorrelierten Bewegungen in Enzymen und somit nützlich beim Studium der Dynamik von Proteinen allgemein.^[116,118] In unserem Fall zeigt die „covariance map“ der Doppelmutante Gln93Asn/Pro93Asp unter anderem eine eindeutig erhöhte Korrelation zwischen dem Mutationsort und der FAD-Domäne sowie zwischen den beiden Cofaktoren, ganz anders als im Fall von

WT-PAMO. Dies stützt unser Modell hinsichtlich der induzierten Allosterie.^[73]

Somit zeigt diese Studie, dass es möglich ist, Sättigungsmutagenese an ferngelegenen Orten anzuwenden, um allosterische Effekte und somit die strukturelle Änderung einer Bindungstasche zu induzieren. Der Ansatz ist ganz anders als bei der üblichen CASTing-Methode, jedoch könnte diese Strategie auch bei anderen Enzymtypen wie z.B. bei P450-Enzymen erfolgreich sein.

5. ISM zur Erhöhung der Thermostabilität von Enzymen

Neben der Steuerung der Stereoselektivität und Aktivität (Substratakzeptanz) ist die Thermostabilität eine ebenso wichtige Eigenschaft von Enzymen, die in der organischen Chemie und Weißen Biotechnologie berücksichtigt werden muss.^[119] Deshalb wurden schon viele Versuche unternommen, die Thermostabilität von Proteinen zu steigern, wobei gerichtete Evolution eine zentrale Rolle eingenommen hat.^[119] Da sich ISM als eine besonders effiziente Methode zur Erhöhung der Enantioselektivität und der Aktivität erwiesen hat, war es von Interesse zu prüfen, ob ein analoges iteratives Verfahren auch bei der Steigerung der Thermostabilität wirksam sein kann. Dazu musste zunächst ein Kriterium gefunden werden, wonach geeignete Randomisierungsorte identifiziert werden können. In diesem Bemühen haben wir die Verwendung von B-Faktoren vorgeschlagen, die im Zuge von Röntgenstrukturanalysen zugänglich sind. Die in Proteinen vorkommenden Aminosäuren mit hohen B-Faktoren verfügen über eine relativ hohe Beweglichkeit. Da hyperthermostabile Enzyme bekanntlich rigider sind als mesothermostabile Analoga,^[119] galt es, durch Mutagenese die Flexibilität an solchen Orten zu reduzieren.^[20,120] Aus diesem Grund entwickelten wir die B-FIT-Methode zur Thermostabilisierung von Proteinen, bei der ISM auf Aminosäurenpositionen mit höchsten B-Faktoren angewendet wird. Dazu haben wir das Computerprogramm B-FITTER entwickelt. In einer ersten experimentellen Arbeit wurde B-FIT auf die Thermostabilisierung der Lipase aus *Bacillus subtilis* angewendet.^[20,120] Nach fünf ISM-Schritten und Screening der Überstände wurde ein hohes Maß an Thermostabilisierung erreicht. Die beste Mutante wurde vor der Charakterisierung gereinigt, was eine kurze Hitzebehandlung einschloss, um weniger stabile Proteine zu denaturieren bzw. auszufallen. Die anschließenden T_{50}^{60} -Messungen ergaben eine Stabilisierung von 45 °C. Später wurde im Rahmen einer theoretischen Studie nachgewiesen, dass der Effekt durch die mutationsbedingte Bildung eines kommunizierenden Aminosäure-Netzwerks auf der Oberfläche des Enzyms zustande gekommen ist.^[121] In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, dass B-FIT auch bei der Thermostabilisierung der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* (ANEH) erfolgreich ist (21 °C Thermostabilisierung).^[77a] Schließlich wurde B-FIT auch bei der Destabilisierung bzw. kontrollierten Thermolabilisierung angewendet, was in manchen Fällen von praktischer Bedeutung sein kann.^[122]

6. Lektionen aus der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme

Zwei Lektionen sind aus den oben beschriebenen Studien möglich. Erstens erlaubt die Beschäftigung mit Methodenentwicklung in der gerichteten Evolution einen Vergleich der verschiedenen Techniken und Strategien, insbesondere im Hinblick auf Effizienz. Die Evolution besserer Enzym-Mutanten ist aus praktischer Sicht ein bedeutsames Ziel, genauso wichtig ist es aber, ein Verständnis dafür zu entwickeln, warum die eine Methode effizienter ist als die andere. Im Falle von ISM ist es die gezielte Fokussierung der Sättigungsmutagenese in einem iterativen Verfahren, welches ausgeprägte kooperative Effekte induziert zwischen den herbeigeführten Mutationen und zwischen Sätzen von Punktmutationen. Ferner kommen überflüssige Mutationen praktisch nicht vor, ein weiterer Vorteil gegenüber epPCR.

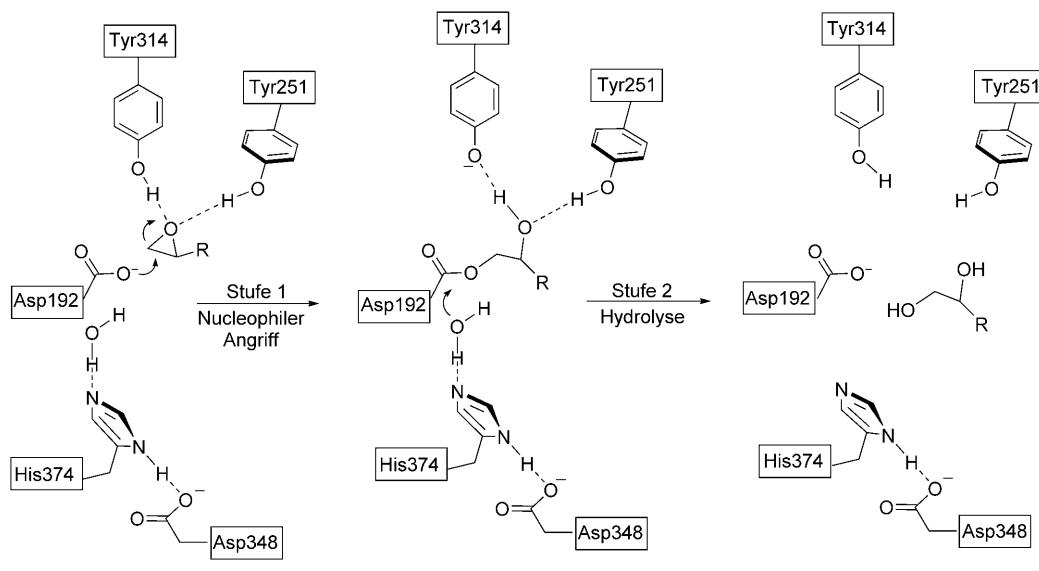
Der zweite Lerneffekt bezieht sich auf die Ursache der erhöhten Stereoselektivität von evolvierten Mutanten, denn solche Erkenntnisse erweitern unser Verständnis von Enzym-Mechanismen im Allgemeinen. Dies erfordert mechanistische Studien, die idealerweise Kinetik, Röntgenstrukturdaten und NMR-Untersuchungen sowie theoretische Analysen auf der Basis von QM/M-Studien und MD-Simulationen einschließen. Eine besonders sorgfältige Studie bezieht sich auf die QM/MM-Untersuchung der PAL-Mutante als Katalysator mit erhöhter Enantioselektivität bei der hydrolytischen Racematspaltung des Esters **rac-19** (Abschnitt 2). Ein „relay“-Mechanismus wurde zur Erklärung des Einflusses einer ferngelegenen Mutation postuliert, wodurch das Oxyanion des bevorzugten (*S*)-Substrats eine zusätzliche Stabilisierung durch eine neue H-Brücke erfährt. Details können in der Originalveröffentlichung^[32] und in Übersichtsartikeln^[58] nachgelesen werden. Leider war es in dieser Studie nicht möglich, mithilfe einer Kristallstruktur das vorgeschlagene Modell zu überprüfen. Dies trifft auf alle bisherigen Untersuchungen über gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme zu, mit Ausnahme der folgenden Untersuchung.

Kürzlich erschien unsere Studie über Mutanten der Epoxidhydrolase aus ANEH als Katalysator zur hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von **rac-19** (Abschnitt 3.2, Schema 14).^[76] WT-ANEH ist leicht (*S*)-selektiv ($E = 4.6$), während die beste in fünf ISM-Stufen evolvierte Mutante LM202 zu einem Selektivitätsfaktor von $E = 115$ führt (Schema 15). Kinetische Daten, MD-

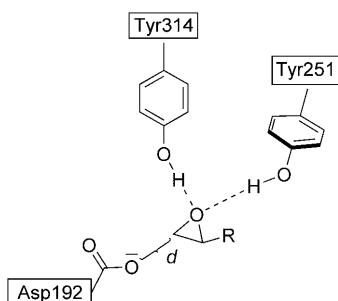
Simulationen, Molecular Modeling (MM), Inhibitionsversuche und Röntgenstrukturdaten von WT-ANEH und LW202 dienen zur Aufklärung der steigenden Stereoselektivität entlang der fünf Stufen des evolutionären Prozesses.^[76] Der grobe Mechanismus des WT-Enzyms war schon früher aufgrund der Röntgenstruktur in Abwesenheit eines Substrats oder Inhibitors postuliert.^[75,123] Zwei Tyrosine an Positionen 251 und 314 am Ende der schmalen tunnelartigen Bindungstasche binden und aktivieren das Substrat durch Wasserstoffbrücken zum Epoxid-O-Atom, gefolgt vom geschwindigkeits- und konfigurationsbestimmenden nucleophilen Angriff durch Asp192 an dem sterisch weniger abgeschirmten C-Atom. In einem zweiten Schritt erfolgt die rasche Hydrolyse des kurzlebigen Enzymesters (Schema 38).

Michaelis-Menten-Kinetik der besten Mutante LW202 ergab, dass die evolutionär erzeugte strukturelle Änderung zum völligen Erliegen der Reaktion des benachteiligten Enantiomers (*R*)-**19** führt.^[76] Dies entspricht einer idealen kinetischen Racematspaltung, eine Schlussfolgerung, die auch durch die experimentellen k_{cat}/K_M -Werte von WT-ANEH und LW202 gestützt ist. Zur Prüfung der Frage, wie die (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Substrate **19** in der schmalen Bindungstasche positioniert sind bzw. ob deutliche Unterschiede beim stufenweisen Übergang von WT-ANEH zu LW202 sichtbar werden, wurden MD-Simulationen durchgeführt. Die jeweilige Bindungsenergie dürfte sich aus den beiden H-Brücken ausgehend von Tyr251 und Tyr314 sowie aus weiteren Wechselwirkungen zusammensetzen. Wir ordneten der Entfernung zwischen dem angreifenden O-Atom des Asp192 und dem Epoxid-C-Atom, an dem die S_N2 -Reaktion abläuft, eine besondere Rolle zu (Schema 39).^[76] Ein kleiner Abstand d im Bereich von 3.5–4 Å ist für eine glatte Reaktion erforderlich. Dies könnte einem Nah-Angriff-Konformer („near-attack-conformer“) nach der Theorie von Bruice entsprechen.^[124]

MD-Berechnungen mit (*R*)- und (*S*)-**19** in getrennten Simulationen unter Berücksichtigung von WT-ANEH, den in-



Schema 38. Reaktionsmechanismus der ANEH.^[75,122]



Schema 39. Definition des Abstandes d im geschwindigkeits- und stereochemiebestimmenden Schritt einer ANEH-katalysierten Reaktion.^[76]

termediären Mutanten mit steigender Enantioselektivität (LW081, LW086, LW123 und LW44) sowie von LW202 deckten einen bemerkenswerten Trend auf.^[76] Der Abstand d im Falle des bevorzugten (*S*)-Substrats bleibt mehr oder weniger konstant, während im Falle des (*R*)-Substrats der entsprechende Wert im evolutionären Prozess bis auf $d = 5.4$ Å für LW202 kontinuierlich ansteigt. Dies bedeutet, dass zwar die aktivierende Wirkung durch Tyr251/Tyr314 erhalten bleibt, dass aber das nucleophile Asp192 in LM202 viel zu weit vom Substrat entfernt ist, als dass eine glatte S_N2 -Reaktion erfolgen kann. Diese Analyse steht im Einklang mit den Ergebnissen der Kinetik.

Glücklicherweise war es möglich, geeignete Kristalle von LW202 für eine Röntgenstrukturanalyse zu züchten.^[76] Der Vergleich mit der Kristallstruktur von WT-ANEH zeigte, dass die beiden Strukturen praktisch identisch sind. Jedoch erwies sich die jeweilige Gestalt der Bindungstasche als deutlich unterschiedlich (Abbildung 14). Modellierte man (*R*)- und (*S*)-19 in die WT-Bindungstasche (Abbildung 14a), so war es möglich, beide Enantiomere geometrisch problemlos einzulagern unter Beibehaltung der H-Brücken-Aktivierung durch Tyr251/Tyr314. Demgegenüber gelang dies im Falle der besten Mutanten LM202 nur mit dem bevorzugten Enantiomer (*S*)-19.^[76]

Das Modell lässt vermuten, dass strukturell unterschiedliche monosubstituierte Epoxide, nicht aber *trans*-1,2-disubstituierte Analoga des Typs *rac*-21 (Schema 19), ebenfalls mit LW202 glatte und enantioselektive Hydrolysereaktionen eingehen sollten. Dies wurde unter Verwendung von zwölf verschiedenen monosubstituierten Epoxiden bewiesen ($E = 22\text{--}90$), während WT-ANEH zu keinen akzeptablen Ergebnissen führte.^[76] Studien der gerichteten Evolution dieser Art sind nicht nur aus präparativer Sicht wichtig, sie sagen auch etwas über den Mechanismus von Enzymen aus. Im Falle der Epoxidhydrolyse waren die groben Züge des Mechanismus vorher schon bekannt, aber nun sind detaillierte Facetten hinsichtlich der genauen Substratpositionierung sowie Aktivierung sichtbar geworden.^[76]

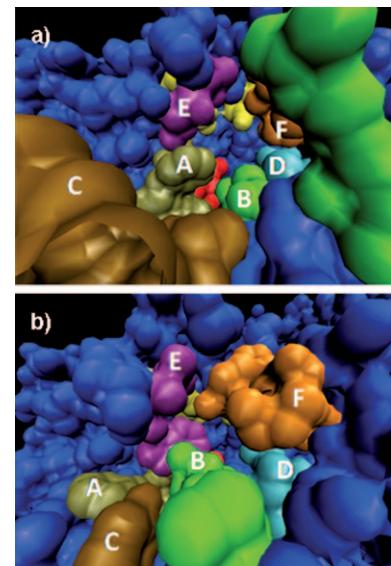


Abbildung 14. Ergebnisse der Röntgenstrukturanalysen.^[76] a) Leere Bindungstasche von WT-ANEH basierend auf der Röntgenstruktur; b) leere Bindungstasche von LW202 basierend auf der entsprechenden Röntgenstruktur. Katalytisch aktives Asp192: rot; aktivierende Tyr251/Tyr314: gelb; A–F deuten die Randomisierungsorte für CASTing an (Ort A wurde im evolutionären Pfad B → C → D → F → E nicht berücksichtigt).^[31]

7. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Die Anwendung von Biokatalysatoren in der organischen Chemie und Biotechnologie hat in den Jahren 1970 bis 1990 stark zugenommen, insbesondere als Katalysatoren bei asymmetrischen Reaktionen.^[2] Dennoch leidet die Biokatalyse unter notorischen Einschränkungen, denn oft werden unakzeptable Stereoselektivität, geringe Aktivität und/oder fehlende Thermostabilität festgestellt. Die rasche Entwicklung der gerichteten Evolution der letzten 15 Jahren hat dazu geführt, dass diese Probleme gelöst werden können. Nach den „proof-of-principle“-Studien zur Erhöhung der Stabilität von Enzymen in Gegenwart von denaturierenden Lösungsmitteln^[7] und Steigerung^[8,9] sowie Umkehrung der Enantioselektivität^[9b,33,45] führen weitere Beispiele zur Verallgemeinerung dieser überaus nützlichen Art des Protein-Engineerings.^[4,58] Die im Labor durchgeführte Evolution von stereo-selektiven Enzymen beinhaltet eine völlig neue Vorgehensweise für die Entwicklung von Katalysatoren für die asymmetrische Katalyse, so auch für eine Reihe von industriellen Verfahren.^[58]

In der frühen Forschungsphase der gerichteten Evolution stereo-selektiver Enzyme dienten überwiegend epPCR, DNA-Shuffling und Sättigungsmutagenese als Mutagenesemethoden.^[8,9,28,33,58] Effizienz spielte eine untergeordnete Rolle. Diese Vernachlässigung, die auch die anfängliche Forschung der gerichteten Evolution thermostabiler Enzyme charakterisierte,^[7,119b,c] ist verständlich. Das Bild hat sich jedoch in den letzten fünf Jahren schlagartig geändert. Denn die Forscher fingen an, auf „Qualität, nicht Quantität“ zu achten^[31,59f] Somit begann die Methodenentwicklung auf dem Gebiet der gerichteten Evolution. Auch die Industrie benötigt „rasche“

und effiziente Verfahren.^[4] Unser Beitrag dazu ist die iterative Sättigungsmutagenese (ISM) als Methode zur Steuerung der Stereoselektivität^[18,31,58-60] und Substratakzeptanz (Aktivität)^[18,58] sowie zur Erhöhung der Thermostabilität.^[20,77,120] ISM kann auch eingesetzt werden, um die Bindungseigenschaften von Proteinen zu steuern^[97,104,107] und Biosynthesewege in der Grünen Biotechnologie zu beeinflussen.^[106]

ISM beinhaltet die Bildung von fokussierten Mutantenbibliotheken, die durch Randomisierung an geeigneten Orten im Enzym mittels Sättigungsmutagenese in einem iterativen Verfahren generiert werden. Wir sowie andere Forschergruppen hatten schon früher Sättigungsmutagenese eingesetzt, auch indem von einem Ort im Enzym zum anderen „gewechselt“ wurde,^[25,28,58,59,65,69] allerdings fehlte das methodische Vorgehen. ISM bedeutet die Systematisierung von Sättigungsmutagenese, wobei unterschiedliche Kriterien bei der Auswahl der Randomisierungsorte beachtet werden müssen. Im Falle von Stereoselektivität und/oder Substratakzeptanz (Aktivität) haben wir zwei verschiedene Strategien entwickelt. Meistens gilt die systematische Berücksichtigung aller Aminosäurepositionen an der Bindungstasche (CASTing).^[64] Es können auch Aminosäurepositionen in der zweiten Sphäre gewählt werden.^[20,42] Ferngelegene Stellen, die zur Induzierung allosterischer Effekte in Frage kommen, stellen einen anderen Ansatz dar.^[73] Im Falle der Thermostabilisierung kann ISM ebenfalls eingesetzt werden, indem Randomisierung an Aminosäurepositionen mit hohen B-Faktoren durchgeführt wird (B-FIT-Methode) (Abschnitt 5).^[20,77,120] Selbstverständlich kann ISM mit anderen Methoden wie epPCR oder DNA-Shuffling kombiniert werden. Bislang zeigen alle ISM-Studien ein hohes Maß an Effizienz. Die Einschränkungen dieser strukturbasierten Methode sollten jedoch nicht außer Acht gelassen werden: Sie kann nur dann eingesetzt werden, wenn Strukturdaten oder Homologiemodelle vorhanden sind oder wenn sich ein bioinformatischer Ansatz anbietet. Ansonsten können epPCR, DNA-Shuffling oder andere Mutagenesemethoden zur Erhöhung der Stereoselektivität herangezogen werden.

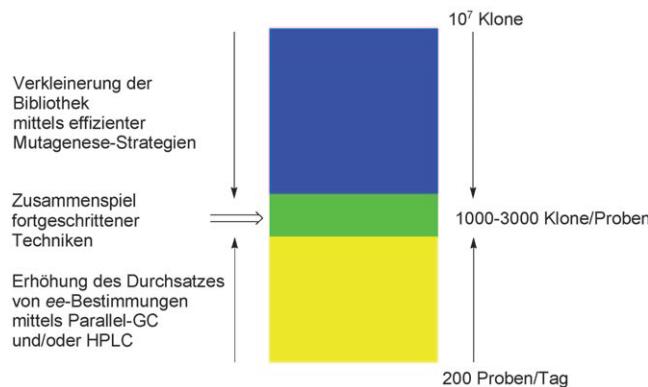
Bei der Durchführung von ISM kann ein weiteres Werkzeug genutzt werden, nämlich ein reduziertes Aminosäure-Alphabet unter Anwendung einer geeigneten Codon-Degeneration.^[18,60,66] Dies führt zur höheren Qualität der Mutantenbibliothek und erfordert deutlich weniger Screening,^[60] trotz eingeschränkter struktureller Diversität. Es ist auch möglich, den umgekehrten Weg zu beschreiten, indem die Einführung von nichtnatürlichen Aminosäuren mittels eines erweiterten genetischen Codes bewerkstelligt wird.^[125]

Als Hilfestellung beim Design von Sättigungsbibliotheken haben wir die Computerprogramme CASTER (für Stereoselektivität/Substratakzeptanz) und B-FITTER (für Thermostabilität)^[20,60] entwickelt, die gratis auf unserer Homepage abgerufen werden können (http://www.mpi-muelheim.mpg.de/mpikofo_home.html). Denkbar ist auch die Kombination von ISM und anderen computergestützten Verfahren wie ProSAR^[62] oder MAP.^[63e]

Im Zuge der Methodenentwicklung auf dem Gebiet der gerichteten Evolution ist es essenziell, die verschiedenen Methoden und Strategien zu vergleichen, vorzugsweise an ein und dem gleichen Enzym. Dies wurde im Falle von ISM

mehrfach getan. Ferner wurden die Gründe für die hohe Effizienz aufgedeckt. So wurden Fitness-Landschaften experimentell konstruiert, wodurch epistatische Effekte entlang aller relevanten Evolutionspfade quantitativ gemessen werden konnten.^[60,72,121] Es zeigte sich, dass Mutationen und Sätze von Mutationen kooperativ bzw. synergistisch wirken und so entscheidend zur Effizienz beitragen.^[60,72,121] Die Frage, wie ein Satz von Aminosäurepositionen zu Randomisierungsorten gruppiert werden sollen, haben wir ebenfalls beantwortet. In der Regel sind Orte bestehend aus zwei oder drei Aminosäurepositionen vorzuziehen.^[31,60,72] Überflüssige Sätze von Punktmutationen kommen in ISM-Experimenten nicht vor, ganz im Gegensatz zur epPCR.^[4,32b] Praktisch alle Sättigungsmutagenesemethoden führen zur Bevorzugung bzw. Benachteiligung bestimmter Aminosäuren. Um ein austariertes Verhältnis von Aminosäuren zu bewirken, bieten sich mehrere Möglichkeiten an, unter anderem der MAX-Ansatz,^[126] Sloning^[127a] oder „hand mixing“ von geeigneten Oligonucleotiden^[127b] sowie andere Möglichkeiten.^[77,69a] Es bleibt abzuwarten, ob sich der erhöhte Aufwand und die damit verbundenen zusätzlichen Kosten lohnen.

Jedes neue Evolutionsprojekt zur Steigerung der Stereoselektivität erfordert die Bereitstellung bzw. Entwicklung eines Mittel- oder Hochdurchsatz-Assays für *ee*-Bestimmungen.^[10] Manche sind kostspielig. Daher besteht unser gegenwärtiges Ziel darin, die Trapp-Methode^[128] zur Multiplexing-GC (und HPLC) für die Zwecke des Hochdurchsatz-Screenings von chiralen Verbindungen zu adaptieren.^[77] Wir hoffen, dadurch einen Durchsatz von mindestens 1000 bis 3000 Proben pro Tag routinemäßig zu erzielen. Da GC und HPLC zu den Standardausrüstungen eines chemischen und biologischen Labors gehören, dürfte das Screening-Problem ein für allemal gelöst sein, vorausgesetzt, man generiert Mutantenbibliotheken hoher Qualität wie in ISM (Schema 40).



Schema 40. Zusammenspiel von Mutagenesemethoden zur Generierung kleinerer und qualitätsmäßig besserer Mutantenbibliotheken und optimierter *ee*-Assays basierend auf Parallel-GC und/oder HPLC.

Einige weitere Punkte zur gerichteten Evolution sind erwähnenswert. In manchen Fällen können Enzyme nicht oder nur schlecht in den üblichen Expressionsstämmen wie *E. coli* exprimiert werden. Alternative Expressionsysteme müssen

dann entwickelt werden. Beispiele sind Meerrettich-Peroxidase (Hefe-Display) oder^[57] Oxynitrilasen (*Pichia pastoris*).^[129]

Schließlich bietet ISM Perspektiven, die jenseits der Evolution von Enantioselektivität, Aktivität (Substratakzeptanz) und Thermostabilität möglich sind.^[99,106] Eine faszinierende zukünftige Forschungsrichtung besteht in der Anwendung der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme^[4f,58] zur Änderung des Stoffwechsels („metabolic pathway engineering“).^[106,129] Die Veränderung bzw. Umkehrung der Stereoselektivität eines enzymkatalysierten Schrittes entlang eines Stoffwechselweges könnte theoretisch zu stereoisomeren Produkten führen, so z. B. bei der Herstellung von Wirkstoffen. ISM beinhaltet auch eine Strategie zur Änderung der Bindungseigenschaften von Proteinen^[99] oder Peptiden, was von Interesse bei medizinischen Fragestellungen ist. Schließlich bietet sich ISM in Form von B-FIT zur Thermostabilisierung von Enzymen oder allgemein von Proteinen an, die in der Bionanotechnologie oder in Organismen für die Wasserreinigung Verwendung finden.

Addendum: ISM wurde kürzlich zur Umkehrung der Enantioselektivität eines P450-Enzyms verwendet.^[130]

Ich danke meinen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern, deren Kreativität und Hartnäckigkeit zum Erfolg der hier beschriebenen Arbeiten beigetragen haben. Ihre Namen sind im Literaturverzeichnis enthalten. Mein Dank gilt ferner den Kollegen K.-E. Jaeger, W. Thiel, M. Bocola, M. Mihovilovic, B. Dijkstra, H. Rabitz, W. Quax, S. Mowbray, M. Arand, M. M. Kayser und O. Trapp für die fruchtbare Zusammenarbeit. Unsere Arbeiten wurden dankenswerterweise von der MPG, der DFG (Schwerpunkt 1170), der Deutsch-Israelischen Kooperation (DIP) und dem FCI finanziell unterstützt.

Eingegangen am 10. Februar 2010
Online veröffentlicht am 16. August 2010

- [1] a) R. Noyori, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2108–2123; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008–2022; b) K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2126–2135; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2024–2032; c) P. J. Walsh, M. C. Kozlowski, *Fundamentals of Asymmetric Catalysis*, University Science Books, Sausalito, **2009**; d) H.-U. Blaser, E. Schmidt, *Asymmetric Catalysis on Industrial Scales*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; e) A. Berkesel, H. Gröger, *Asymmetric Organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; f) D. W. C. MacMillan, *Nature* **2008**, *455*, 304–308; g) B. List, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1774–1779; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1730–1734.
- [2] a) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5. Aufl., Springer, Berlin, **2004**; b) K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, Vol. I–III, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2002**; c) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; d) J. Tao, G.-Q. Lin, A. Liese, *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; e) V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [3] Siehe z. B.: a) E. J. Corey, X.-M. Cheng, *The Logic of Chemical Synthesis*, Wiley, New York, **1995**; b) K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11929–11936;

c) S. J. Keding, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11937–11942; d) E. A. Peterson, L. E. Overman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11943–11948; e) B. M. Trost, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5813–5837; f) N. Z. Burns, P. S. Baran, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2896–2910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2854–2867.

- [4] Neuere Artikel über gerichtete Evolution:^[58] a) T. W. Johannes, H. Zhao, *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 261–267; b) S. Lutz, U. T. Bornscheuer, *Protein Engineering Handbook*, Vol. 1–2, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; c) N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567–573; d) C. Jäckel, P. Kast, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2008**, *37*, 153–173; e) S. Bershtein, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 151–158; f) P. A. Romero, F. H. Arnold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 866–876; g) M. T. Reetz in *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes* (Eds.: V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 21–63; h) L. G. Otten, F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 46–54; i) A. V. Shivange, J. Marienhagen, H. Mundhada, A. Schenk, U. Schwaneberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 19–25.
- [5] Beispiele für rationalen und/oder De-novo-Entwurf: a) F. Cendrone, A. Ménez, E. Quéméneur, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 405–410; b) T. Imanaka, H. Atomi in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, Vol. I (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 67–95; c) D. Rotticci, J. C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 766–770; d) T. Lanio, A. Jeltsch, A. Pingoud, *Protein Eng.* **2000**, *13*, 275–281; e) T. Ema, T. Fujii, M. Ozaki, T. Korenaga, T. Sakai, *Chem. Commun.* **2005**, 4650–4651; f) A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. Poehlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubbolts, H. Schwab, K. Gruber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4963–4966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4815–4818; g) S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2634–2643; h) J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 10–18; i) D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, *453*, 190–195; j) S. M. Lippow, B. Tidor, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 305–311; k) A. Vardi-Kilshtain, M. Roca, A. Warshel, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 495–500.
- [6] a) T. Alber, J. A. Wozniak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 747–750; b) M. Matsumura, S. Yasumura, S. Aiba, *Nature* **1986**, *323*, 356–358; c) B. C. Cunningham, J. A. Wells, *Protein Eng.* **1987**, *1*, 319–325; d) P. N. Bryan, M. L. Rollence, M. W. Pantoliano, J. Wood, B. C. Finzel, G. L. Gilliland, A. J. Howard, T. L. Poulos, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1986**, *1*, 326–334; e) M. H. Hecht, J. M. Sturtevant, R. T. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5685–5689; f) H. Liao, T. McKenzie, R. Hageman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 576–580.
- [7] K. Chen, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5618–5622.
- [8] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832.
- [9] a) M. T. Reetz, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1503–1509; b) M. T. Reetz, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1615–1622; c) M. T. Reetz in *Evolutionary Methods in Biotechnology* (Hrsg.: S. Brakmann, A. Schwienhorst), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 113–141.
- [10] a) M. T. Reetz in *Enzyme Assays—High-throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting* (Hrsg.: J.-L. Reymond), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 41–76; b) J.-L. Reymond, *Enzyme Assays—High-throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; c) H. Lin,

- V. W. Cornish, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4580–4606; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4402–4425; d) Y. L. Boersma, M. J. Dröge, W. J. Quax, *FEBS J.* **2007**, *274*, 2181–2195; e) S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3408–3436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3310–3335; f) J.-L. Raymond, V. S. Fluxà, N. Maillard, *Chem. Commun.* **2009**, 34–46.
- [11] a) D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique* **1989**, *1*, 11–15; b) R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1994**, *3*, S136–S140.
- [12] a) P. C. Cirino, K. M. Mayer, D. Umeno, *Methods Mol. Biol.* **2003**, *230*, 3–9; b) T. S. Wong, D. Roccatano, M. Zacharias, U. Schwaneberg, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 858–871; c) T. Eggert, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger in *Enzyme Functionality—Design, Engineering, and Screening* (Hrsg.: A. Svendsen), Marcel Dekker, New York, **2004**, S. 375–390; d) J. R. Cochran, Y.-S. Kim, S. M. Lippow, B. Rao, K. D. Wittrup, *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 245–253; e) Y. Fujii, Y. Yamasaki, M. Matsumoto, H. Nishida, M. Hada, K. Ohkubo, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1722–1727; f) D. A. Drummond, B. L. Iverson, G. Georgiou, F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 806–816; g) A. Gratz, J. Jose, *Anal. Biochem.* **2008**, *378*, 171–176; h) T. Vanhercke, C. Ampe, L. Tirry, P. Denolf, *Anal. Biochem.* **2005**, *339*, 9–14.
- [13] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389–391.
- [14] K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4068–4080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948–3959.
- [15] a) R. Georgescu, G. Bandara, L. Sun in *Directed Evolution Library Creation*, Vol. 231 (Hrsg.: F. H. Arnold, G. Georgiou), Humana Press, Totowa, **2003**, S. 75–83; b) C. N. Dominy, D. W. Andrews in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235 (Hrsg.: N. Casali, A. Preston), Humana Press, Totowa, **2003**, S. 209–223; c) M. A. Vandeyar, M. P. Weiner, C. J. Hutton, C. A. Batt, *Gene* **1988**, *65*, 129–133; d) R. D. Kirsch, E. Joly, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1848–1850; e) L. Zheng, U. Baumann, J.-L. Raymond, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e115; f) W.-C. Tseng, J.-W. Lin, T.-Y. Wei, T.-Y. Fang, *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 376–378; g) A. Hidalgo, A. Schließmann, R. Molina, J. Hermoso, U. T. Bornscheuer, *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, *21*, 567–576.
- [16] H. H. Hogrefe, J. Cline, G. L. Youngblood, R. M. Allen, *Bio-Techniques* **2002**, *33*, 1158–1165.
- [17] J. Sanchis, L. Fernández, J. D. Carballeira, J. Drone, Y. Gumiulya, H. Höbenreich, D. Kahakeaw, S. Kille, R. Lohmer, J. J.-P. Peyralans, J. Podtetenieff, S. Prasad, P. Soni, A. Taglieber, S. Wu, F. E. Zilly, M. T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 387–397.
- [18] D. J. Bougioukou, S. Kille, A. Taglieber, M. T. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3287–3305.
- [19] M. Z. Li, S. J. Elledge, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 251–256.
- [20] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891–903.
- [21] a) M. T. Reetz, H. Höbenreich, P. Soni, L. Fernández, *Chem. Commun.* **2008**, 5502–5504; b) Y. L. Boersma, M. J. Dröge, A. M. van der Sloot, T. Pijning, R. H. Cool, B. W. Dijkstra, W. J. Quax, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1110–1115.
- [22] a) M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1872–1875; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1758–1761; b) W. Schrader, A. Eipper, D. J. Pugh, M. T. Reetz, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 626–632.
- [23] a) M. T. Reetz, K. M. Kühling, S. Wilensek, H. Husmann, U. W. Häusig, M. Hermes, *Catal. Today* **2001**, *67*, 389–396; b) M. T. Reetz, F. Daligault, B. Brunner, H. Hinrichs, A. Dege, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4170–4173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4078–4081.
- [24] a) K. M. Polizzi, M. Parikh, C. U. Spencer, I. Matsumura, J. H. Lee, M. J. Realff, A. S. Bommarius, *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 961–967; b) K. M. Polizzi, C. U. Spencer, A. Dubey, I. Matsumura, J. H. Lee, M. J. Realff, A. S. Bommarius, *J. Biomol. Screening* **2005**, *10*, 856–864.
- [25] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 709–718.
- [26] K. Miyazaki, F. H. Arnold, *J. Mol. Evol.* **1999**, *49*, 716–720.
- [27] M. Nardini, D. A. Lang, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, B. W. Dijkstra, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31219–31225.
- [28] M. T. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3701–3703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3589–3591.
- [29] a) G. P. Horsman, A. M. F. Liu, E. Henke, U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1933–1939; b) S. Park, K. L. Morley, G. P. Horsman, M. Holmquist, K. Hult, R. J. Kazlauskas, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 45–54; c) R. J. Kazlauskas, *Chem. Listy* **2003**, *67*, 329–337.
- [30] J. Paramesvaran, E. G. Hibbert, A. J. Russell, P. A. Dalby, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 401–411.
- [31] M. T. Reetz, L.-W. Wang, in part M. Bocola, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1258–1263; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1236–1241; Erratum: M. T. Reetz, L.-W. Wang, in part M. Bocola, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2494.
- [32] a) M. Bocola, N. Otte, K.-E. Jaeger, M. T. Reetz, W. Thiel, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 214–223; b) M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K.-E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Bocola, N. Otte, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106–112.
- [33] D. Zha, S. Wilensek, M. Hermes, K.-E. Jaeger, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2001**, 2664–2665.
- [34] M. T. Reetz, B. Brunner, T. Schneider, F. Schulz, C. M. Cloutier, M. M. Kayser, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4167–4170; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4075–4078.
- [35] a) C. T. Walsh, Y.-C. J. Chen, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 342–352; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 333–343; b) P. C. Brzostowicz, D. M. Walters, S. M. Thomas, V. Nagarajan, P. E. Rouvière, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 334–342.
- [36] Übersichten über BVMO-katalysierte asymmetrische Reaktionen: a) M. M. Kayser, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 947–974; b) M. D. Mihovilovic, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1265–1287; c) R. Wohlgemuth, *Eng. Life Sci.* **2006**, *6*, 577–583.
- [37] M. D. Mihovilovic, F. Rudroff, A. Winniger, T. Schneider, F. Schulz, M. T. Reetz, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1221–1224.
- [38] a) M. W. Fraaije, J. Wu, D. P. H. M. Heuts, E. W. van Hellemond, J. H. L. Spelberg, D. B. Janssen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 393–400; b) F. Zambianchi, M. W. Fraaije, G. Carrea, G. de Gonzalo, C. Rodríguez, V. Gotor, G. Ottolina, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1327–1331; c) C. Rodríguez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 197–203.
- [39] E. Malito, A. Alfieri, M. W. Fraaije, A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13157–13162.
- [40] M. Bocola, F. Schulz, F. Leca, A. Vogel, M. W. Fraaije, M. T. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 979–986.
- [41] M. T. Reetz, S. Wu, *Chem. Commun.* **2008**, 5499–5501.
- [42] M. T. Reetz, S. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15424–15432.
- [43] a) E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1029–1033; b) M. Schmidt, D. Hasenpusch, M. Kähler, U. Kirchner, K. Wiggenhorn, W. Langel, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 805–809.
- [44] a) Y. Koga, K. Kato, H. Nakano, T. Yamane, *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 585–592; b) W.-C. Suen, N. Zhang, L. Xiao, V. Madison, A. Zaks, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 133–140; c) Z. Qian, S. Lutz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13466–13467.
- [45] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317–320.

- [46] a) M. T. Reetz, C. Torre, A. Eipper, R. Lohmer, M. Hermes, B. Brunner, A. Maichele, M. Bocola, M. Arand, A. Cronin, Y. Genzel, A. Archelas, R. Furstoss, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 177–180; b) B. van Loo, J. H. Lutje Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts, D. B. Janssen, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 981–990; c) E. Y. Lee, M. L. Shuler, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 318–327; d) L. Rui, L. Cao, W. Chen, K. F. Reardon, T. K. Wood, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3995–4003; e) M. Kotik, V. Štěpánek, P. Kyslik, H. Marešová, *J. Biotechnol.* **2007**, *132*, 8–15.
- [47] G. DeSantis, K. Wong, B. Farwell, K. Chatman, Z. Zhu, G. Tomlinson, H. Huang, X. Tan, L. Bibbs, P. Chen, K. Kretz, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476–11477.
- [48] a) S. Fong, T. D. Machajewski, C. C. Mak, C.-H. Wong, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 873–883; b) M. Wada, C.-C. Hsu, D. Franke, M. Mitchell, A. Heine, I. Wilson, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2091–2098; c) G. J. Williams, S. Domann, A. Nelson, A. Berry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3143–3148; d) G. J. Williams, T. Woodhall, L. M. Farnsworth, A. Nelson, A. Berry, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16238–16247; e) S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537–548; f) N. Ran, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6130–6139; g) A. Bolt, A. Berry, A. Nelson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 318–330.
- [49] a) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3309–3312; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177–3180; b) R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. C. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4955–4958; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807–4810; c) K. E. Atkin, R. Reiss, V. Koehler, K. R. Bailey, S. Hart, J. P. Turkenburg, N. J. Turner, A. M. Brzozowski, G. Grogan, *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1218–1231.
- [50] A. Kirschner, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 465–472.
- [51] a) C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305–309; b) G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Wu, *Chimia* **1999**, *53*, 584–589; zit. Lit.
- [52] a) B. Lingen, D. Kolter-Jung, P. Dünkelmann, R. Feldmann, J. Grötzing, M. Pohl, M. Müller, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 721–726; b) B. J. Stevenson, J.-W. Liu, D. L. Ollis, *Biochemistry* **2008**, *47*, 3013–3025.
- [53] a) M. Chen-Goodspeed, M. A. Sogorb, F. Wu, S.-B. Hong, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1325–1331; b) C. M. Hill, W.-S. Li, J. B. Thoden, H. M. Holden, F. M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8990–8991.
- [54] a) M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13442–13450; b) M. Landwehr, L. Hochrein, C. R. Otey, A. Kasrayan, J.-E. Bäckvall, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6058–6059; Übersichtsartikel über die gerichtete Evolution von P450-Enzymen: c) V. B. Urlacher, S. Lutz-Wahl, R. D. Schmid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 317–325; d) S. Kumar, J. R. Halpert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 456–464; e) E. M. J. Gillam, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 220–231; f) K. L. Tee, U. Schwaneberg, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2007**, *10*, 197–217.
- [55] a) H. Asako, M. Shimizu, N. Itoh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 805–812; b) R. Machielsen, N. G. H. Leferink, A. Hendriks, S. J. J. Brouns, H.-G. Hennemann, T. Daußmann, J. van der Oost, *Extremophiles* **2008**, *12*, 587–594; c) J. Liang, J. Lalonde, B. Borup, V. Mitchell, E. Mundorff, N. Trinh, D. A. Kochrekar, R. N. Cherat, G. G. Pai, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 193–198; d) J. Liang, E. Mundorff, R. Voladri, S. Jenne, L. Gilson, A. Conway, A. Krebber, J. Wong, G. Huisman, S. Truesdale, J. Lalonde, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 188–192.
- [56] a) M. Avi, R. M. Wiedner, H. Griengl, H. Schwab, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11415–11422; siehe auch: b) R. Gaisberger, R. Weis, R. Luiten, W. Skranc, M. Wubbolts, H. Griengl, A. Glieder, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 30–38.
- [57] E. Antipov, A. E. Cho, K. D. Wittrup, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17694–17699.
- [58] Übersichtsartikel über die gerichtete Evolution enantioselektiver Enzymen:^[4g] a) M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5716–5722; b) M. T. Reetz in *Advances in Catalysis*, Vol. 49 (Hrsg.: B. C. Gates, H. Knözinger), Elsevier, San Diego, **2006**, S. 1–69; c) M. T. Reetz, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5767–5778.
- [59] Beispiele für vergleichende Studien auf dem Gebiet der gerichteten Evolution:^[4] a) M. R. Parikh, I. Matsumura, *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 621–628; b) J. M. Joern, P. Meinhold, F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 643–656; c) T.-W. Wang, H. Zhu, X.-Y. Ma, T. Zhang, Y.-S. Ma, D.-Z. Wei, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *34*, 55–68; d) M. Zaccolo, D. M. Williams, D. M. Brown, E. Gherardi, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 589–603; e) S.-Y. Tang, H. Fazelinia, P. C. Cirino, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5267–5271; Artikel mit Betonung auf Qualität und nicht Quantität bei der Generierung von Mutanten: f) S. Lutz, W. M. Patrick, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 291–297.
- [60] a) M. T. Reetz, D. Kahakeaw, J. Sanchis, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 115–122; b) M. T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *Chem-BioChem* **2008**, *9*, 1797–1804.
- [61] G. Saab-Rincon, Y. Li, M. Meyer, M. Carbone, M. Landwehr, F. H. Arnold in *Protein Engineering Handbook* (Hrsg.: S. Lutz, U. T. Bornscheuer), Wiley-VCH, Weinheim, **2009**, S. 481–492.
- [62] R. J. Fox, S. C. Davis, E. C. Mundorff, L. M. Newman, V. Gavrilovic, S. K. Ma, L. M. Chung, C. Ching, S. Tam, S. Muley, J. Grate, J. Gruber, J. C. Whitman, R. A. Sheldon, G. W. Huisman, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 338–344.
- [63] a) M. C. Saraf, A. R. Horswill, S. J. Benkovic, C. D. Maranas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4142–4147; b) A. E. Firth, W. M. Patrick, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W281–W285; c) J. Damborsky, J. Brezovsky, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 26–34; d) J. F. Chaparro-Riggers, K. M. Polizzi, A. S. Bommaris, *Biotechnol. J.* **2007**, *2*, 180–191; e) T. S. Wong, D. Roccatano, U. Schwaneberg, *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 2645–2659; f) S. A. Funke, N. Otte, T. Eggert, M. Bocola, K.-E. Jaeger, W. Thiel, *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 509–514; g) G. L. Moore, C. D. Maranas, *AIChE J.* **2004**, *50*, 262–272; h) R. J. Hayes, J. Bentzien, M. L. Ary, M. Y. Hwang, J. M. Jacinto, J. Vielmetter, A. Kundu, B. I. Dahiyat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15926–15931.
- [64] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballera, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4264–4268; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192–4196.
- [65] Frühe Beispiele für Sättigungsmutagenese:^[10c, 26] a) D. K. Dube, L. A. Loeb, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5703–5707; b) S. Climie, L. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Pacanowska, P. Prapunwattana, S.-W. Cho, R. Stroud, D. V. Santi, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18776–18779; c) A. V. Teplyakov, J. M. van der Laan, A. A. Lammers, H. Kelders, K. H. Kalk, O. Misset, L. J. S. M. Mulleners, B. W. Dijkstra, *Protein Eng.* **1992**, *5*, 413–420; d) L. D. Graham, K. D. Haggett, P. A. Jennings, D. S. Le Brocq, R. G. Whittaker, P. A. Schober, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6250–6258; e) M. S. Warren, S. J. Benkovic, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 63–68; f) N. M. Antikainen, P. J. Hergenrother, M. M. Harris, W. Corbett, S. F. Martin, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1603–1610; g) E. M. Gabor, D. B. Janssen, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 571–579; h) L. Rui, L. Cao, W. Chen, K. F. Reardon, T. K. Wood, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46810–46817; i) A. R. Schmitzer, F. Lépine, J. N. Pelletier, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 809–819; j) T. S.

- Wong, K. L. Tee, B. Hauer, U. Schwaneberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 26e.
- [66] C. M. Clouthier, M. M. Kayser, M. T. Reetz, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8431–8437.
- [67] J. D. Carballeira, P. Krumlinde, M. Bocola, A. Vogel, M. T. Reetz, J.-E. Bäckvall, *Chem. Commun.* **2007**, 1913–1915.
- [68] a) S. Bartsch, R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1531–1534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1508–1511; b) B. Heinze, R. Kourist, L. Fransson, K. Hult, U. T. Bornscheuer, *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 125–131.
- [69] Neuere Beispiele für Sättigungsmutagenese mit unterschiedlichen Zielsetzungen: a) N. U. Nair, H. Zhao, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1213–1215; b) M. Di Lorenzo, A. Hidalgo, R. Molina, J. A. Hermoso, D. Pirozzi, U. T. Bornscheuer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7291–7299; c) M. Zumárraga, C. Vaz Domínguez, S. Camarero, S. Shleev, J. Polaina, A. Martínez-Arias, M. Ferrer, A. L. De Lacey, V. M. Fernández, A. Balles-teros, F. J. Plou, M. Alcalde, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2008**, *11*, 807–816; d) H.-M. Li, L.-H. Mei, V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *144*, 27–36; e) X. Qi, Y. Chen, K. Jiang, W. Zuo, Z. Luo, Y. Wei, L. Du, H. Wei, R. Huang, Q. Du, *J. Biotechnol.* **2009**, *144*, 43–50; f) F. Shozui, K. Matsumoto, T. Sasaki, S. Taguchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 1117–1124; g) K. Bajaj, P. C. Dewan, P. Chakrabarti, D. Goswami, B. Barua, C. Baliga, R. Varadarajan, *Biochemistry* **2008**, *47*, 12964–12973; h) S.-W. Oh, A.-U. Jang, C.-K. Jeong, H.-J. Kang, J.-M. Park, T.-J. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1401–1407; i) W. Wu, D. Zhu, L. Hua, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *61*, 157–161; j) S. Wu, A. J. Fogiel, K. L. Petrillo, R. E. Jackson, K. N. Parker, R. DiCosimo, A. Ben-Bassat, D. P. O'Keefe, M. S. Payne, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 717–720; k) G. J. Williams, R. D. Goff, C. Zhang, J. S. Thorson, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 393–401; l) A. Andreadeli, D. Platis, V. Tishkov, V. Popov, N. E. Labrou, *FEBS J.* **2008**, 275, 3859–3869; m) A. Yep, G. L. Kenyon, M. J. McLeish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5733–5738; n) D. Sabouard, V. Dugas, M. Jaber, J. Broutin, E. Souteyrand, J. Sylvestre, M. Delcourt, *BioTechniques* **2005**, *39*, 363–368.
- [70] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, J. J.-P. Peyralans, H. Höbenreich, A. Maichele, A. Vogel, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6031–6038.
- [71] M. T. Reetz in *Protein Engineering Handbook*, Vol. 2 (Hrsg.: S. Lutz, U. T. Bornscheuer), Wiley-VCH, Weinheim, **2009**, S. 409–439.
- [72] M. T. Reetz, J. Sanchis, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2260–2267.
- [73] S. Wu, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2775–2780.
- [74] E. N. Jacobsen, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 421–431.
- [75] J. Y. Zou, B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray, T. A. Jones, *Structure* **2000**, *8*, 111–122.
- [76] M. T. Reetz, M. Bocola, L.-W. Wang, J. Sanchis, A. Cronin, M. Arand, J. Zou, A. Archelas, A.-L. Bottalla, A. Naworyta, S. L. Mowbray, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7334–7343.
- [77] a) Y. Gumulya, geplante Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2010**; b) S. Kille, geplante Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, **2010**.
- [78] a) D. M. Weinreich, N. F. Delaney, M. A. DePristo, D. L. Hartl, *Science* **2006**, *312*, 111–114; b) E. R. Lozovsky, T. Chookajorn, K. M. Brown, M. Imwong, P. J. Shaw, S. Kamchonwongpaisan, D. E. Neafsey, D. M. Weinreich, D. L. Hartl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12025–12030.
- [79] a) D. C. Carter, G. Winter, A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, *Cell* **1984**, *38*, 835–840; b) J. A. Wells, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8509–8517; c) A. Horovitz, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, R121–R126; d) A. S. Mildvan, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14517–14520; e) C. M. Yuen, D. R. Liu, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 995–997.
- [80] a) L. Rui, Y. M. Kwon, A. Fishman, K. F. Reardon, T. K. Wood, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3246–3252; b) W. M. Pat- rick, A. E. Firth, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 105–112; c) A. D. Bosley, M. Ostermeier, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 57–61; d) M. Denault, J. N. Pelletier in *Protein Engineering Protocols*, Vol. 352 (Hrsg.: K. M. Arndt, K. M. Müller), Humana Press, Totowa, **2007**, S. 127–154.
- [81] a) K. U. Walter, K. Vamvaca, D. Hilvert, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37742–37746; b) T. Li, K. Fan, J. Wang, W. Wang, *Protein Eng.* **2003**, *16*, 323–330; c) S. Akanuma, T. Kigawa, S. Yokoyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13549–13553; d) S. S. Sidhu, A. A. Kossiakoff, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 347–354.
- [82] a) R. Stürmer, B. Hauer, M. B. Hall, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 203–213; b) J. F. Chaparro-Riggers, T. A. Rogers, E. Vazquez-Figueroa, K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1521–1531; c) A. Müller, R. Stürmer, B. Hauer, B. Rosche, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3380–3382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3316–3318; d) A. Fryszkowska, K. Fisher, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4295–4298; e) S. K. Padhi, D. J. Bougioukou, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3271–3280.
- [83] a) S.-M. Lu, C. Bolm, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7513–7516; b) T. Ohshima, H. Tadaoka, K. Hori, N. Sayo, K. Mashima, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2060–2066; c) S.-M. Lu, C. Bolm, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9052–9055; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8920–8923; d) C. J. Scheuermann née Taylor, C. Jaekel, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2708–2714; e) J. G. de Vries, C. J. Elsevier, *Handbook of Homogeneous Hydrogenation*, Vol. I–III, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; f) B. H. Lipshutz, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2916–2927.
- [84] a) J. B. Tuttle, S. G. Ouellet, D. W. C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12662–12663; b) N. J. A. Martin, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13368–13369.
- [85] M. R. Martzen, S. M. McCraith, S. L. Spinelli, F. M. Torres, S. Fields, E. J. Grayhack, E. M. Phizicky, *Science* **1999**, *286*, 1153–1155.
- [86] S. G. Peisajovich, D. S. Tawfik, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 991–994.
- [87] J. D. Bloom, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9995–10000.
- [88] M. A. DePristo, *HFSP J.* **2007**, *1*, 94–98.
- [89] M. Eigen, J. McCaskill, P. Schuster, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 6881–6891.
- [90] S. Kurtovic, B. Mannervik, *Biochemistry* **2009**, *48*, 9330–9339.
- [91] M. T. Reetz, S. Prasad, J. D. Carballeira, Y. Gumulya, M. Bocola, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9144–9152.
- [92] a) A. G. Sandström, K. Engström, J. Nyhlén, A. Kasrayan, J.-E. Bäckvall, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 413–420; b) K. Engström, J. Nyhlen, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038–7042.
- [93] D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109–119.
- [94] a) J. Blanchet, J. Baudoux, M. Amere, M.-C. Lasne, J. Rouden, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5493–5506; b) M. Amere, M.-C. Lasne, J. Rouden, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2621–2624; c) J. T. Mohr, T. Nishimata, D. C. Behenna, B. M. Stoltz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11348–11349.
- [95] a) K. Miyamoto, H. Ohta, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 475–481; b) Y. Terao, Y. Iijima, K. Miyamoto, H. Ohta, *J. Mol. Catal. B* **2007**, *45*, 15–20.
- [96] K. Okrasa, C. Levy, M. Wilding, M. Goodall, N. Baudendistel, B. Hauer, D. Leys, J. Micklefield, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7827–7830; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7691–7694.
- [97] R. Hawwa, S. D. Larsen, K. Ratia, A. D. Mesecar, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 36–57.
- [98] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156–6165; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032–6040; b) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231–238;

- c) O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498–508; d) I. Nobel, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157–167.
- [99] L. Liang, J. Zhang, Z. Lin, *Microb. Cell Fact.* **2007**, *6*, 36.
- [100] a) P. Kötter, M. Ciriacy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *38*, 776–783; b) M. Jeppsson, O. Bengtsson, K. Franke, H. Lee, B. Hahn-Hägerdal, M. F. Gorwa-Grauslund, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 665–673.
- [101] B. Petschacher, S. Leitgeb, K. L. Kavanagh, D. K. Wilson, B. Nidetzky, *Biochem. J.* **2005**, *385*, 75–83.
- [102] B. Henrissat, G. Davies, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 637–644.
- [103] M. Nishimoto, M. Kitaoka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 2101–2104.
- [104] M. R. M. De Goeve, M. De Baere, L. Hoflack, T. Desmet, E. J. Vandamme, W. Soetaert, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, *22*, 393–399.
- [105] a) R. A. Dixon, M. S. S. Reddy, *Phytochem. Rev.* **2003**, *2*, 289–306; b) J.-K. Weng, X. Li, N. D. Bonawitz, C. Chapple, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 166–172.
- [106] M.-W. Bhuiya, C.-J. Liu, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 277–285.
- [107] R. M. Kelly, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, *Biochemistry* **2007**, *46*, 11216–11222.
- [108] M. Ivancic, G. Valinger, K. Gruber, H. Schwab, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 109–122.
- [109] a) M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, M. Maywald, *Chimia* **2002**, *56*, 721–723; b) M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, A. Taglieber, F. Hollmann, R. J. G. Mondière, N. Dickmann, B. Höcker, S. Cerrone, M. C. Haeger, R. Serner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 552–564; c) Übersichtsartikel über die gerichtete Evolution von Hybrid-Katalysatoren: M. T. Reetz in *Topics in Organometallic Chemistry*, Vol. 25 (Hrsg.: T. R. Ward), Springer, Heidelberg, **2009**, S. 63–92.
- [110] Übersichten über synthetische Enzyme bestehend aus einem Wirt-Protein und eingeschlungenen Ligand-Metall-Einheiten:^[109c, 111b] a) D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081–3111; b) Y. Lu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 118–126.
- [111] a) M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306–307; b) J. Steinreiber, T. R. Ward in *Topics in Organometallic Chemistry*, Vol. 25 (Hrsg.: T. R. Ward), Springer, Heidelberg, **2009**, S. 93–112.
- [112] M. T. Reetz, J. J.-P. Peyralans, A. Maichele, Y. Fu, M. Maywald, *Chem. Commun.* **2006**, 4318–4320.
- [113] a) M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, M. Maywald, P. Maiwald, J. J.-P. Peyralans, A. Maichele, Y. Fu, N. Jiao, F. Hollmann, R. Mondière, A. Taglieber, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6404–6414; b) siehe Lit. [109b].
- [114] Ausgewählte Beispiele für distale Mutationen mit Auswirkung auf Enzymaktivitäten:^[4, 25, 28, 33, 58] a) S. Que, A. Okamoto, T. Yano, H. Kagamiyama, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2344–2349; b) I. Axarli, A. Prigipaki, N. E. Labrou, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 81–88; c) P. E. Tomatis, R. M. Rasila, L. Segovia, A. J. Vila, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13761–13766; d) L.-F. Wang, N. M. Goodey, S. J. Benkovic, A. Kohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15753–15758; e) siehe Lit. [49c].
- [115] a) C.-J. Tsai, A. del Sol, R. Nussinov, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 207–216; b) Q. Cui, M. Karplus, *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1295–1307; c) N. M. Goodey, S. J. Benkovic, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 474–482.
- [116] a) T. Ichiye, M. Karplus, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2004**, *11*, 205–217; b) J. Liu, R. Nussinov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 901–906; c) S. Hammes-Schiffer, S. J. Benkovic, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 519–541.
- [117] I. A. Mirza, B. J. Yachnin, S. Wang, S. Grosse, H. Bergeron, A. Imura, H. Iwaki, Y. Hasegawa, P. C. K. Lau, A. M. Berghuis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8848–8854.
- [118] T. Ichiye, M. Karplus, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, *11*, 205–217.
- [119] Übersichtsartikel über Protein-Engineering zur Erhöhung der Thermostabilität: a) T. Oshima, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 623–628; b) C. Ó'Fágáin, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 137–149; c) V. G. H. Eijsink, S. Gåseidnes, T. V. Borchert, B. van den Burg, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 21–30; d) A. S. Bommaris, J. M. Broering, *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 125–139; e) N. Amin, A. D. Liu, S. Ramer, W. Aehle, D. Meijer, M. Metin, S. Wong, P. Gualfetti, V. Schellenberger, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 787–793.
- [120] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, A. Vogel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7909–7915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7745–7751.
- [121] M. T. Reetz, P. Soni, J. P. Acevedo, J. Sanchis, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8418–8422; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8268–8272.
- [122] M. T. Reetz, P. Soni, L. Fernández, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1712–1717.
- [123] a) C. Morisseau, A. Archelas, C. Guittot, D. Faucher, R. Furstoss, J. C. Baratti, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *263*, 386–395; b) M. Arand, H. Hemmer, H. Dürk, J. Baratti, A. Archelas, R. Furstoss, F. Oesch, *Biochem. J.* **1999**, *344*, 273–280.
- [124] a) Übersicht über die Theorie von „near-attack-conformers“ in enzymkatalytischen Reaktionen: T. C. Bruice, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 139–148; b) MD-Studie über Epoxidhydrolasen: B. Schiøtt, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14558–14570.
- [125] a) J. K. Montclare, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4630–4633; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4518–4521; b) P. R. Chen, D. Groff, J. Guo, W. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4052–4055; c) R. K. McGinty, C. Chatterjee, T. W. Muir, *Methods Enzymol.* **2009**, *462*, 225–243; d) A. L. Stokes, S. J. Miyake-Stoner, J. C. Peeler, D. P. Nguyen, R. P. Hammer, R. A. Mehl, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 1032–1038; e) E. Kaya, K. Gutsmiedl, M. Vrabel, M. Müller, P. Thumbs, T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2858–2861.
- [126] M. D. Hughes, D. A. Nagel, A. F. Santos, A. J. Sutherland, A. V. Hine, *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 973–979.
- [127] a) J. Van den Brulle, M. Fischer, T. Langmann, G. Horn, T. Waldmann, S. Arnold, M. Fuhrmann, O. Schatz, T. O'Connell, D. O'Connell, A. Auckenthaler, H. Schwer, *BioTechniques* **2008**, *45*, 340–343; b) P. Iyidogan, S. Lutz, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4711–4720.
- [128] O. Trapp, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5706–5710; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5609–5613.
- [129] Übersichten über synthetische Biologie mit Fokus auf Stoffwechsel-Engineering: a) J. Kirby, J. D. Keasling, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2009**, *60*, 335–355; b) A. Baerga-Ortiz, B. Popovic, A. P. Siskos, H. M. O'Hare, D. Spitteler, M. G. Williams, N. Campillo, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 277–285; c) S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 594–606; d) A. Kern, E. Tilley, I. S. Hunter, M. Legiša, A. Glieder, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 6–29; e) S. Blanchard, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 263–271; f) C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811; g) A. Das, C. Khosla, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 631–639; h) C. H. Martin, D. R. Nielsen, K. V. Solomon, K. L. Jones Prather, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 277–286; i) E. J. Steen, Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S. B. del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature* **2010**, *463*, 559–563.
- [130] W. L. Tang, Z. Li, H. Zhao, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5461–5463.