

# Enzympromiskuität: ein P450-Enzym als Carbentransferkatalysator

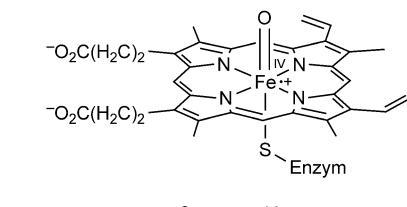
Gheorghe-Doru Roiban und Manfred T. Reetz\*

Cyclopropanierungen · Cytochrome · Enzymkatalyse · Enzympromiskuität · Stereoselektivität

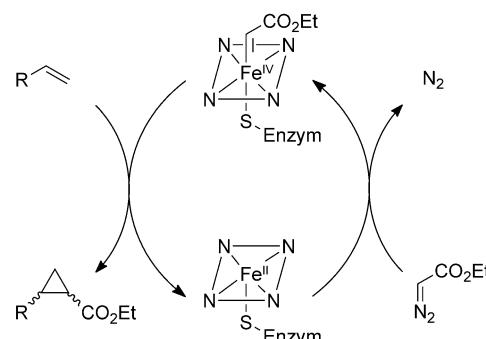
**E**nzyme werden als Biokatalysatoren bei vielen Stoffumwandlungen in der organischen Synthesekemie eingesetzt, sind aber nicht dazu befähigt, die meisten wichtigen Reaktionen zu katalysieren, die durch (chirale) Übergangskomplexe vermittelt werden. Dies ist einer der Gründe, warum die auf dem Gebiet der Enzympromiskuität tätigen Wissenschaftler seit geraumer Zeit versuchen, Enzyme oder Proteine dazu zu bringen, in der Natur nicht vorkommende Reaktionstypen zu katalysieren.<sup>[1]</sup> Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, so auch das Design artifizieller Metalloenzyme.<sup>[2]</sup> Beispiele sind Serumalbumin/Fe<sup>III</sup>-Corrol-Komplexe<sup>[2a]</sup> oder apo-Myoglobin/Cr<sup>III</sup>-Salophen-Komplexe<sup>[2b]</sup> als Katalysatoren für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bedingte asymmetrische Sulfoxidierung sowie Serumalbumin/Cu<sup>II</sup>-Phthalocyanin-Komplexe als Katalysatoren für enantioselektive Diels-Alder-Reaktionen.<sup>[2c]</sup> Die jeweiligen Proteine sind inaktiv. Das De-novo-Design von Enzymen mit oder ohne Metallzentren ist ein weiterer erwähnenswerter Ansatz.<sup>[1e,f]</sup>

Der jüngste Beitrag zu dem Gebiet der promiskutiven Enzymreaktionen unter Anwendung eines anderen Ansatzes wurde von Arnold et al. veröffentlicht.<sup>[3]</sup> Die Autoren konnten zeigen, dass unter anaeroben Bedingungen die Fe-Häm-Einheit eines Cytochrom-P450-Enzyms als Katalysator für die Cyclopropanierung von Olefinen wirken kann. Normalerweise katalysieren P450-Monooxygenasen die O<sub>2</sub>-vermittelte oxidative C-H-Aktivierung (R-H → R-OH), einen radikalischen Prozess, der von einem katalytisch aktiven Intermediat („Compound I“) eingeleitet wird.<sup>[4]</sup> Eine Epoxidierung von Olefinen ist ebenfalls möglich, ein Vorgang, bei dem das O-Atom des gleichen reaktiven Intermediats direkt auf die olefinische π-Bindung übertragen wird.

In der in diesem Highlight vorgestellten Studie haben die Autoren in Analogie zur Epoxidierung die Idee entwickelt, P450-BM3 als Katalysator für Carbentransfer-Reaktionen zu testen.<sup>[3]</sup> Die Forscher erwarteten eine Reaktion des katalytisch aktiven Fe<sup>II</sup>-Häms mit Carbenquellen wie Diazoessig-



Compound I



**Schema 1.** Vorgesehene P450-katalysierte Cyclopropanierung von Olefinen.<sup>[3]</sup>

ester under Bildung eines reaktiven Fe-Carbenoids in der höheren Oxidationsstufe Fe<sup>IV</sup>, welches das entsprechende Carben auf das Olefin transferieren sollte (Schema 1). Als Modellreaktion diente die Umsetzung von Diazoessigsäureethylester (**1**) mit Styrol (**2**), die zu vier Produkten führen kann: den *cis*-Enantiomeren (*R,S*)- und (*S,R*)-**3** sowie den *trans*-Enantiomeren (*R,R*)- und (*S,S*)-**4** [Gl. (1)]. Dies ist die gleiche Reaktion, die von Nozaki, Noyori und Mitarbeitern 1966 gewählt worden war, um die erste asymmetrische Übergangsmetall-katalysierte Umwandlung zu realisieren.<sup>[5a]</sup> Diese Arbeit hatte den Grundstein für das Gebiet der Übergangsmetallkatalyse gelegt.<sup>[5b]</sup> Seitdem wurden Cyclopropanierungen mit effizienteren Liganden unter Einsatz von Metallen wie Cu, Rh, Ru und sogar Au optimiert.<sup>[6]</sup> Mittlerweile sind bereits hohe Stereoselektivitäten und Aktivitäten erreicht worden, weshalb die präparativen Probleme auf diesem Gebiet im Wesentlichen als gelöst gelten.

Noch vor der Publikation von Arnold et al.<sup>[3]</sup> wurde über die Bildung und Reaktivität von Metallcarbenoiden in Porphyrinen berichtet.<sup>[7]</sup> Beispielsweise konnten Kodadek, Woo et al. zeigen, dass achirale Fe<sup>II</sup>-Porphyrin-Komplexe die Mo-

[\*] Dr. G.-D. Roiban, Prof. Dr. M. T. Reetz

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung

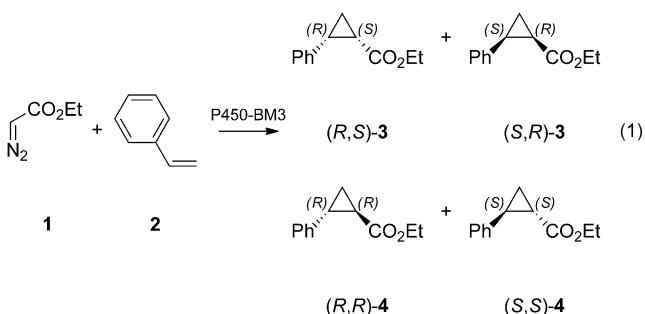
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)  
und

Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg

Hans-Meerwein Straße, 35032 Marburg (Deutschland)

E-Mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de

Homepage: <http://www.kofo.mpg.de/de/forschung/organische-synthese>



dellreaktion **1 + 2 → 3 + 4** katalysieren (*trans/cis* bis zu 13:1).<sup>[7b]</sup> Ferner konnten sie nachweisen, dass die für den Carbentransfer erforderlichen Fe<sup>II</sup>-Porphyrin-Komplexe Sauerstoff-empfindlich sind und somit leicht in die katalytisch inaktive Fe<sup>III</sup>-Form übergehen. Deshalb muss unter Inertgasbedingungen gearbeitet werden, oder es müssen stöchiometrische Mengen eines Reduktionsmittels verwendet werden.<sup>[7b,c]</sup> Relevant ist auch die Beobachtung, dass Fe-Häm-Carbenoide in P450-Enzymen vorkommen können. So wurde postuliert, dass beim P450-katalysierten Metabolismus des 1,3-Benzodioxols ein kurzlebiges 1,3-Benzodioxol-2-carbenoid am Fe-Häm beteiligt ist.<sup>[8]</sup> In einer neueren Arbeit beschrieben Carreira und Morandi eine praktische Methode zur Cyclopropanierung von Olefinen bei Verwendung von *in situ* generiertem Diazomethan unter basischen Bedingungen (KOH) und Einsatz verschiedener Carbentransferkatalysatoren, so auch eines Fe<sup>III</sup>-Porphyrin-Komplexes.<sup>[7e]</sup> Sollte für die Katalyse tatsächlich eine vorgeschaltete Reduktion zu Fe<sup>II</sup> erforderlich sein,<sup>[7b,c]</sup> so ist ungeklärt, wie in diesem System Elektronentransfer stattfindet.<sup>[7e]</sup>

Unabhängig von diesen mechanistischen Fragen erwies sich die Strategie von Arnold et al. als erfolgreich.<sup>[3]</sup> Alle Reaktionen wurden in einer Inertgasatmosphäre in wässrigem Medium mit Methanol als Kosolvens und Natriumdiethionit als Reduktionsmittel durchgeführt. Unter Verwendung von P450-BM3 und Mutanten, die in vorangegangenen Studien für andere Substrate generiert worden waren, wurden eine akzeptable Aktivität und mäßige Stereoselektivität beobachtet. Die Selektivität ließ sich durch Sättigungsmutagenese steigern.<sup>[3]</sup> Die beste Mutante führte bevorzugt zum *cis*-Produkt **(S,R)-3** mit hoher Diastereoselektivität (92:8) und Enantioselektivität (97% ee).<sup>[3]</sup> Die Ausbeuten lagen bei 30–60 %. Weitere Substrate wurden ebenfalls getestet, jedoch erwiesen sich Diastereo- und Enantioselektivität hierbei als schlecht.<sup>[3]</sup>

Dies ist eine faszinierende Machbarkeitsstudie, deren Ziel nicht die Verbesserung herkömmlicher Verfahren war<sup>[5b,6]</sup> – vielmehr galt es zu zeigen, dass das Design ungewöhnlicher Enzympromiskuität möglich ist. Der Beleg für das Auftreten des postulierten Fe-Carbens und für den vorgeschlagenen Mechanismus steht noch aus, ebenso wie die Untersuchung weiterer Reaktionstypen sowie anderer Häm-gebundener Metalle. Ein bis heute ungelöstes Problem bei nahezu allen Fällen von Enzympromiskuität ist, dass solche Biokatalysatoren nur eine geringe Aktivität aufweisen.<sup>[1–3]</sup> So verlaufen z.B. Diels-Alder-Reaktionen mit künstlichen Metalloenzyme auf der Basis von Cu<sup>II</sup>-Phthalocyanin-Komplexen in Serumalbuminen zwar mit hoher Enantioselektivität

(>95 % ee), jedoch ist die Aktivität recht gering.<sup>[2c]</sup> Traditionelle chirale Cu<sup>II</sup>-Katalysatoren nach Evans et al. sind wesentlich aktiver und zugleich hoch enantioselektiv bei ähnlichen Diels-Alder-Reaktionen.<sup>[9]</sup> Die Entwicklung allgemeiner Methoden zur Erhöhung der Aktivität und Stereoselektivität promiskuitiver Enzyme bleibt ein anspruchsvolles Ziel, auch im Falle des De-novo-Designs.<sup>[1e,f]</sup>

Eingegangen am 6. Februar 2013  
Online veröffentlicht am 16. April 2013

- [1] Übersichten über verschiedene Ansätze zur Enzympromiskuität:  
a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156–6165; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032–6040; b) O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471–505; c) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391–3401; d) T. Heinisch, T. R. Ward, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 184–199; e) G. Kiss, N. Celebi-Ölcüm, R. Moretti, D. Baker, K. N. Houk, *Angew. Chem.* **2013**, DOI: 10.1002/ange.201204077; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, DOI: 10.1002/anie.201204077; f) H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.02.012.
- [2] a) A. Mahammed, Z. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2883–2887; b) M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1035–1038; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005–1008; c) M. T. Reetz, N. Jiao, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2476–2479; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2416–2419.
- [3] a) P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, *339*, 307–310; siehe auch Kommentare zu dieser Studie:  
b) A. R. H. Narayan, D. H. Sherman, *Science* **2013**, *339*, 283–284;  
c) R. Johnson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 151.
- [4] Neuere Übersichten über P450-Enzyme:  
a) A. W. Munro, H. M. Girvan, A. E. Mason, A. J. Dunford, K. J. McLean, *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 140–150; b) J. M. Caswell, M. O'Neill, S. J. Taylor, T. S. Moody, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.01.028.
- [5] a) H. Nozaki, S. Moriuti, H. Takaya, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7*, 5239–5244; b) R. Noyori, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 83–98; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 79–92.
- [6] a) H. Lebel, J.-F. Marcoux, C. Molinaro, A. B. Charette, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 977–1050; b) A. Caballero, A. Prieto, M. M. Diaz-Requejo, P. J. Perez, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 1137–1144; c) M. L. Rosenberg, A. Krivokapic, M. Tilset, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 547–550; d) B. Morandi, A. Dolva, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2162–2163; e) C. X. Wang, B. S. Wan, *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57*, 2338–2351; f) D. H. Ringger, P. Chen, *Angew. Chem.* **2013**, DOI: 10.1002/ange.201209569; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, DOI: 10.1002/anie.201209569.
- [7] Porphyrin-artige Fe-Carbenoid-Intermediate bei der Cyclopropanierung:  
a) H. J. Callot, E. Schaeffer, *Nouv. J. Chim.* **1980**, *4*, 307–309; b) J. R. Wolf, C. G. Hamaker, J.-P. Djukic, T. Kodadek, L. K. Woo, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9194–9199; c) P. Tagliatesta, A. Pastorini, *J. Mol. Catal. A* **2003**, *198*, 57–61; d) T. S. Lai, F. Y. Chan, P. K. So, D. L. Ma, K. Y. Wong, C. M. Che, *Dalton Trans.* **2006**, 4845–4851; e) B. Morandi, E. M. Carreira, *Science* **2012**, *335*, 1471–1474.
- [8] Fe-Carbenoid-Intermediate bei P450-Enzymen:  
a) R. M. Philpot, E. Hodgson, *Mol. Pharmacol.* **1972**, *8*, 204–214; b) C. R. Wolf, D. Mansuy, W. Nastainczyk, G. Deutschmann, V. Ullrich, *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 698–705; c) D. Mansuy, *Pure Appl. Chem.* **1980**, *52*, 681–690.
- [9] D. A. Evans, S. J. Miller, T. Lectka, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6460–6461.