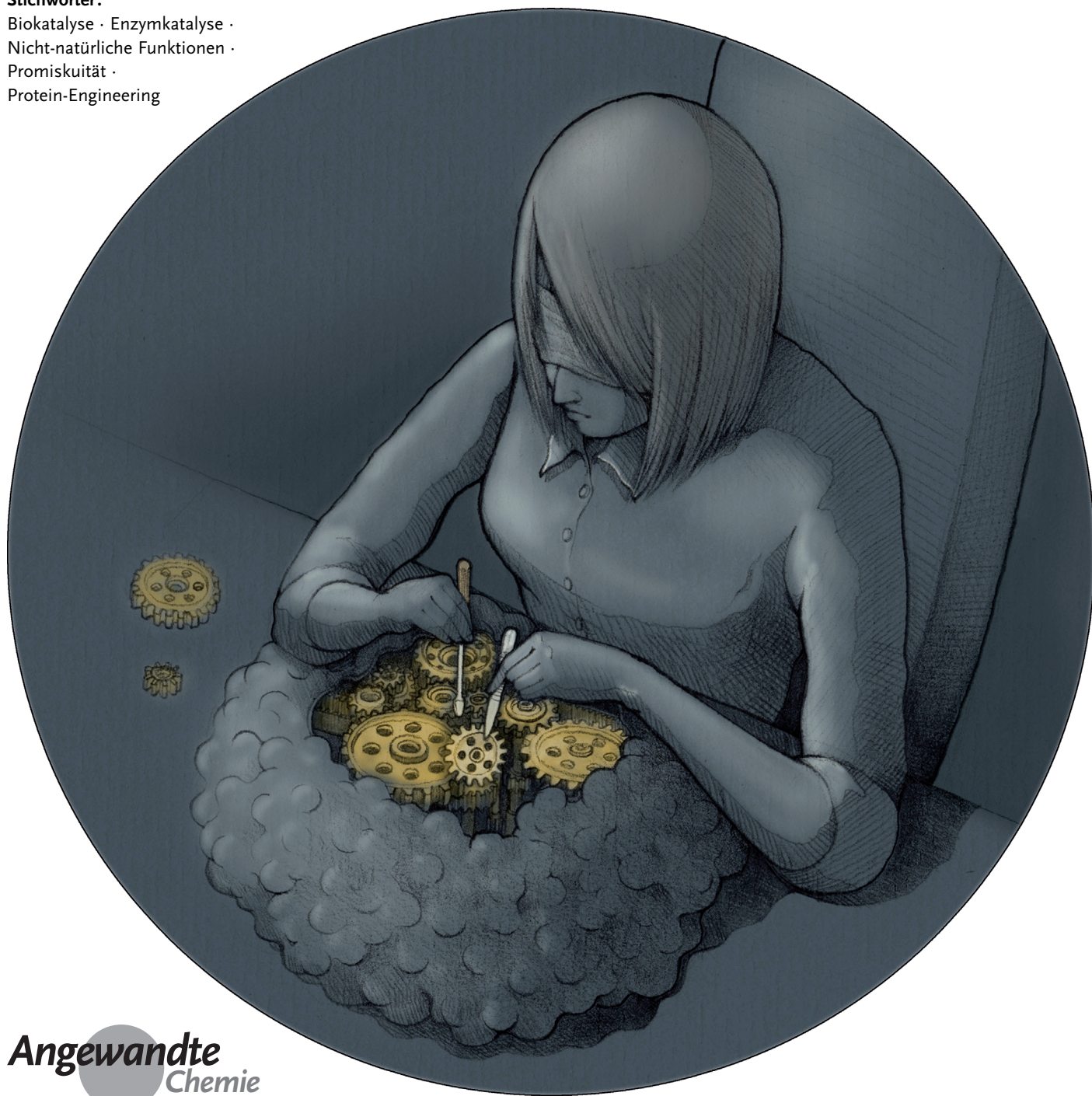


# Ausdehnung des Enzym-Universums: Zugang zu nicht-natürlichen Reaktionen durch mechanismusgeleitete, gerichtete Evolution

*Hans Renata, Z. Jane Wang und Frances H. Arnold\**

**Stichwörter:**

Biokatalyse · Enzymkatalyse ·  
Nicht-natürliche Funktionen ·  
Promiskuität ·  
Protein-Engineering



**H**ohe Selektivitäten und ausgezeichnete Kontrolle des Reaktionsverlaufs regen Chemiker dazu an, in der organischen Synthese Biokatalysatoren einzusetzen. Viele nützliche Reaktionen sind auf diese Weise jedoch nicht zugänglich, weil sie im Repertoire der Natur nicht vorkommen. In diesem Aufsatz werden wir einen evolutiven Ansatz zur Entwicklung von Enzymen beschreiben, die solche nicht-natürlichen Reaktionen katalysieren. Wir beginnen mit Beispielen dafür, wie die Natur neue katalytische Funktionen entdeckt hat und wie solche evolutiven Fortschritte im Labor nachvollzogen wurden, indem man von existierenden Enzymen ausging. Wir untersuchen dann nicht-natürliche Enzymaktivitäten, die für die chemische Synthese entdeckt und verwendet wurden, wobei wir uns auf Reaktionen ohne natürliches Pendant konzentrieren. Wir zeigen Beispiele, wie nicht-natürliche Aktivitäten durch gerichtete Evolution verbessert wurden, indem der Prozess nachgeahmt wurde, mit dem die Natur neue Katalysatoren erzeugt. Zum Schluss beschreiben wir noch Entdeckungen nicht-natürlicher katalytischer Funktionen, die künftig Chancen auf eine Ausdehnung des enzymatischen Universums bieten können.

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3409
2. Der Ansatz der Natur zur Erzeugung neuer Enzyme	3410
3. Die Ausdehnung des Enzym-Universums mithilfe mechanistischer Ähnlichkeiten und gerichteter Evolution	3414
4. Neue Chancen am Horizont?	3420
5. Schlussfolgerungen	3423

## 1. Einleitung

Angefüllt mit Methoden der Natur zur Katalyse chemischer Transformationen illustrieren unsere wachsenden genomischen Datenbanken, wie die Evolution chemische Innovation in Form neuer Enzyme schafft. Die heutige enorme biokatalytische Vielfalt ist Produkt einer Evolution aus urtümlichen Enzymen, deren Mechanismen inzwischen mit beispielloser Genauigkeit aufgeklärt werden. Die Enzymevolution findet ebenfalls noch immer statt und ist auf die Zukunft gerichtet: neue Enzyme erscheinen laufend als Antwort auf (oft vom Menschen gemachte) Herausforderungen, die es zu überleben gilt (z.B. durch Antibiotikaresistenzen), oder auf neue Nischen, die man besetzen kann (z.B. durch Abbau menschengemachter Verbindungen). Mit Blick auf die Innovationsfähigkeit der Natur und die äußerst eingeschränkten Fähigkeiten des Menschen, neue Enzyme zu entwerfen, plädieren wir dafür, evolutive Strategien anzuwenden, um Enzyme zu erzeugen und für menschliche Anwendungen zu optimieren.

Gerichtete Evolution ist ein leistungsfähiger Ansatz des Protein-Engineerings, der seit fast zwei Jahrzehnten mit viel Erfolg eingesetzt wird, um Enzyme für die chemische Synthese nachzujustieren.<sup>[1]</sup> Die einfache Strategie, Mutationen durch iterative Mutagenese anzuhäufen und nach den gewünschten Funktionen zu suchen, kann relevante Eigenschaften – Aktivität gegenüber nicht-natürlichen Substraten, Enantioselektivität, Produktselektivität, Stabilität usw. – effizient optimieren und dabei geschickt unsere tiefe Unkenntnis darüber umgehen, wie diese Eigenschaften in der Aminosäuresequenz des Enzyms codiert sind. Wenn Chemiker diese Enzyme in der Synthese einsetzen wollen, müssen die Katalysatoren den Alternativen überlegen oder mindestens gleichwertig sein. Oft ist dies eine hohe Hürde, die mit einem „rationalen“ Ansatz regelmäßig verfehlt wurde, bei der

sich die gerichtete Evolution aber zumindest – wenn man einen guten Ausgangspunkt hat – als zielführend erweist.<sup>[2]</sup> Folgerichtig werden Enzyme in der chemischen Synthese zunehmend dort genutzt, wo sie signifikante Vorteile für „grüne“ Prozesse,<sup>[3]</sup> für die Produktion von Chemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen<sup>[4]</sup> und für die Synthese komplexer Naturstoffe bieten.

Die gerichtete Evolution kann genutzt werden, um bestehende Enzyme zu diversifizieren und Varianten zu erzeugen, die in nicht-natürlicher Umgebung aktiv sind, die nicht-natürliche Substrate umsetzen oder die nicht-natürliche Selektivitäten aufweisen. Wie aber sollen wir ganz neue Enzyme herstellen, darunter auch solche, die in der Natur unbekannte Reaktionen katalysieren? Der Vorrat der Natur an Katalysatoren ist riesig und noch nicht vollständig durchforstet; neue Enzyme werden ständig entdeckt. Chemiker nutzen allerdings eine Reihe von Reaktionen, für die es keine natürlichen biokatalytischen Entsprechungen geben mag, entweder, weil die Natur noch keinen Bedarf für sie hatte (unsere Ziele und Bedürfnisse könnten sich von denen eines Mikroorganismus oder eines Baumes unterscheiden) oder weil funktionelle Gruppen und Reagentien erforderlich sind, die man in der belebten Natur normalerweise nicht findet. Wir wollen damit anfangen, diese Lücke zwischen Enzymen, die wir in der Natur finden, und solchen, die wir gerne hätten, die aber vielleicht nicht existieren, zu schließen. Wir glauben, dass wir mit dem, was wir von der Natur über die Entwicklung neuer Katalysatoren gelernt haben, die Evolution neuer Enzymfamilien im Labor beflügeln können. Wir veranschauli-

[\*] Dr. H. Renata, Dr. Z. J. Wang, Prof. Dr. F. H. Arnold  
Division of Chemistry and Chemical Engineering  
California Institute of Technology  
1200 E. California Blvd. MC 210-41, Pasadena, CA 91125 (USA)  
E-Mail: fha@cheme.caltech.edu

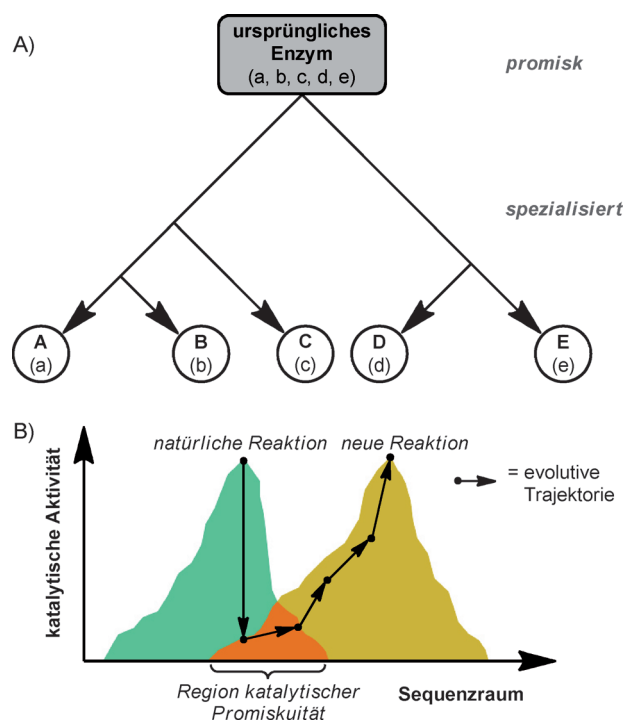


chen diesen Evolutionsansatz zur Katalysatorentdeckung mit einigen Beispielen aus dem Repertoire der Natur. In einigen Fällen haben Wissenschaftler Sequenzen und Wege der Funktionsentwicklung aufgeklärt, die vorhandene Enzyme miteinander in Beziehung setzen, um zu zeigen, wie sich die natürliche Funktion von einer zur nächsten entwickelt haben kann.

Kann uns dieses Wissen helfen, ins Unbekannte hinauszutreten und Biokatalysatoren zu generieren, die bislang in der natürlichen Welt noch nicht entdeckt worden sind? Dass die Antwort ein nachdrückliches „Ja!“ ist, wird an einigen eindrucksvollen Beispielen für Enzyme verdeutlicht, die entworfen wurden, um Reaktionen ohne natürliches Analogon zu katalysieren. Am Ende beschreiben wir noch einige nicht-natürliche Aktivitäten, die vielleicht einen Blick auf künftige Enzymfamilien gewähren.

## 2. Der Ansatz der Natur zur Erzeugung neuer Enzyme

Mit katalytischer Promiskuität beschreibt man die Fähigkeit eines Enzyms, außer seiner natürlichen Funktion auch Reaktionen zu katalysieren, die verschiedene funktionelle Gruppen am Substrat angreifen und über verschiedene Übergangszustände und/oder reaktive Zwischenstufen verlaufen. 1976 formulierte Jensen die Vermutung, dass sich frühe Enzyme durch eine breite Substrat- und Reaktionsspezifität auszeichneten und dass die natürliche Selektion diese unterschiedlichen Aktivitäten herausgriff und nachjustierte und so die heutigen Enzyme mit ihren spezifischen katalytischen Funktionen hervorbrachte (Abbildung 1 A).<sup>[5]</sup> Doch auch die „modernen“ Enzyme sind nicht so spezifisch wie meist vermutet – viele von ihnen können in ihren aktiven Zentren andere Transformationen katalysieren und zeigen (wenn auch meist nur geringe) katalytische Promiskuität.<sup>[6]</sup> Es gibt inzwischen viele Indizien dafür, dass diese oft wie ein glücklicher Zufall daher kommende katalytische Promiskuität tatsächlich entscheidend für die Evolution neuer Enzyme ist, bildet sie doch die Plattform für die Evolution neuer Funktionen durch natürliche Selektion (Abbildung 1 B).<sup>[7]</sup>



**Abbildung 1.** A) Divergierende Entwicklung eines ursprünglichen Enzyms mit breiten katalytischen Aktivitäten (a, b, c, d, e) zu stärker spezialisierten Enzymen (A, B, C, D, E), die vor allem eine bestimmte Reaktion katalysieren. B) Beziehung zwischen katalytischer Promiskuität und der Evolution einer neuen Funktion. Eine bestimmte Proteinssequenz kann mehrere Reaktionen katalysieren. Unter geeigneten Umständen kann ein Katalysator mit einem niedrigen Anteil an promisker Aktivität durch Mutation und natürliche (oder künstliche) Selektion so verbessert werden, dass er für eine neue Funktion spezialisiert wird. Eine ausführliche Diskussion findet sich in Lit. [8].

### 2.1. Die Evolution der Atrazin-Chlorhydrolase (AtzA)

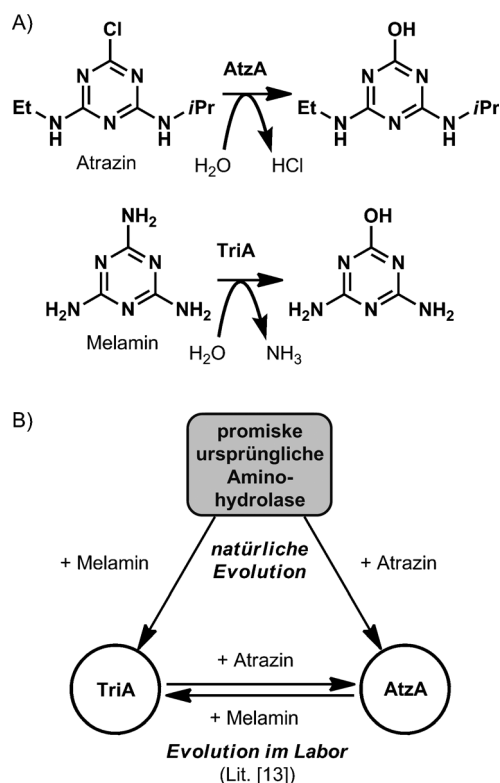
Die Evolution der Atrazin-Chlorhydrolase (AtzA) ist eine der am besten untersuchten Fallstudien darüber, wie die Natur die katalytische Promiskuität zur Schaffung neuer Enzyme nutzt. Das in den späten 1950er Jahren eingeführte, gut wirksame Herbizid Atrazin erschien zunächst biologisch praktisch nicht abbaubar. Seit 1993 jedoch wurde an verschiedenen Stellen ein rascher Atrazinabbau durch Bodenmikroben beobachtet. Dieses Phänomen wurde dem Enzym AtzA zugeschrieben.<sup>[9]</sup> Dieses katalysiert die Hydrolyse der C-Cl-Bindung in Atrazin (Abbildung 2 A) durch eine nuc-



Hans Renata erhielt seinen B.A. 2008 von der Columbia University für Forschungen unter Anleitung von Prof. Tristan H. Lambert. 2013 promovierte er in Chemie am The Scripps Research Institute bei Prof. Phil S. Baran. Inzwischen ist er Postdoktorand im Labor von Prof. Frances H. Arnold am California Institute of Technology.



Z. Jane Wang erhielt ihren B.S. in Chemie 2007 vom California Institute of Technology. Sie promovierte mit Arbeiten in organischer und metallorganischer Chemie bei Prof. F. Dean Toste und Prof. R. Bergman an der University of California, Berkeley. Sie befasste sich mit neuen Methoden zur Knüpfung von C-O- und C-N-Bindungen mit Übergangsmetallkomplexen. Vor kurzem beendete sie ihre Arbeit als Postdoktorandin am California Institute of Technology bei Professor Frances H. Arnold.



**Abbildung 2.** A) Chlorhydrolaseaktivität von AtzA und Aminohydrolaseaktivität von TriA. B) TriA und AtzA (98 % Aminosäureidentität) lassen sich wahrscheinlich auf einen gemeinsamen Ursprung zurückführen, der TriA ähnelt. Die katalytischen Funktionen können mit wenigen Aminosäureaustauschen ineinander überführt werden.<sup>[13]</sup>

leophile aromatische Substitution mit einem  $\text{Fe}^{2+}$ -aktivierten Wassermolekül.

Die Aminosäuresequenz von AtzA aus *Pseudomonas* sp. ADP stimmt zu 98 % mit jener der Melamindeaminase (TriA) überein, eines Enzyms, das ursprünglich aus dem *Pseudomonas*-sp.-Stamm NRRL B-12227 isoliert worden war. TriA katalysiert die Hydrolyse der C-N-Bindung von Melamin, einer anderen nicht-natürlichen Verbindung, die zunächst in den 1939er Jahren als nicht biologisch abbaubar eingestuft wurden, die aber zu der Zeit, als Atrazin erstmals eingeführt wurde, als wenig abbaubar galt.<sup>[10]</sup> Die beiden Enzyme unterscheiden sich nur in neun von 475 Aminosäuren.<sup>[11]</sup> Diese starke Übereinstimmung und die Tatsache, dass beide Enzyme in mindestens einer gemeinsamen Bakterien-

art zu finden sind, lässt vermuten, dass sich AtzA aus TriA oder aus einem gemeinsamen Vorfahren, der TriA ähnelt, entwickelt hat (Abbildung 2B); damit könnten sich die Bakterien eine neue Möglichkeit eröffnen, diese synthetischen Verbindungen als Stickstoffquelle zu nutzen.<sup>[12]</sup>

Der Fortschritt vom Melamin- zum Triazinabbau steht für die Herausbildung einer neuen katalytischen Funktion: von der Spaltung einer C-N-Bindung (Aminohydrolase, EC 3.5.4) zur Spaltung einer C-Cl-Bindung (Chlorhydrolase, EC 3.8). Es gibt in der Natur zwar noch andere Chlorhydrolasen; diese nutzen als Nucleophil aber typischerweise eine Carboxylatgruppe anstelle des von einem zweiwertigen Metall aktivierten Wassers, wie es in AtzA vorkommt. Letzteres ist typisch für die Aminohydrolasefamilie (darunter z. B. TriA), die ein zweiwertiges Metallkation wie  $\text{Zn}^{2+}$  für die Wasseraktivierung in einer nucleophilen aromatischen Substitution nutzt. Die Ähnlichkeit zwischen den aktiven Zentren von TriA und AtzA, die sich aus einer Homologiemodellierung ableiten lässt, bekräftigt zusätzlich die Vermutung, dass sich AtzA aus einer ursprünglichen Aminohydrolase entwickelt hat (Abbildung 2B).

TriA und AtzA unterscheiden sich an neun Positionen, allerdings reichen nach einer Untersuchung von Scott et al.<sup>[13]</sup> zwei Mutationen aus, um TriA in ein Enzym mit Atrazin-Chlorhydrolaseaktivität vergleichbar mit AtzA umzuwandeln. Die Mutationen Cys331Ser und Asp328Asn, die nach der Homologiemodellierung im aktiven Zentrum liegen, verbessern  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  für die Atrazinhydrolyse drastisch von 60 auf fast  $10000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , während die Melaminhydrolyseaktivität fast verschwindet. Außerdem zeigten Scott et al., dass man zu einer Atrazin-Chlorhydrolase gelangen kann, indem man positive Einzelmutationen in einem einfachen Marsch „bergauf“ ausgehend von TriA ansammelt. Die Cys331Ser-Mutation alleine verbesserte  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  für die Atrazinhydrolyse auf fast das 30-Fache. Die zusätzliche Einführung der Asp328Asn-Mutation erbrachte eine weitere sechsfache Verbesserung der katalytischen Effizienz.

Diese Mutationen im aktiven Zentrum verursachen eine drastische Verschiebung von einer Aminohydrolase- zu einer Chlorhydrolaseaktivität. Scott et al. begründeten dies so, dass das Gespann aus Asn und Ser (die Positionen 328 und 331 in AtzA) die Abspaltung eines Chloridanions durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken unterstützt, während Asp und Cys in TriA die Freisetzung von Ammoniak durch eine Protonenverschiebung ermöglichen, wobei der Thiolrest von Cys331 ein Proton auf die Abgangsgruppe  $\text{NH}_2^-$  überträgt und durch Asp328 reprotoniert wird. Da  $\text{NH}_2^-$  eine schlechte Abgangsgruppe ist ( $\text{p}K_{\text{a}} = 34$ ), ist die Protonierung durch den saureren Cys-Rest für den Reaktionsablauf notwendig.

Es wurde bereits eine Reihe funktionell diverser Enzym-Superfamilien beschrieben.<sup>[14]</sup> Die Elemente einer Superfamilie haben eine strukturelle Faltung gemeinsam, und man nimmt an, dass sie ihre Funktionalität ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren diversifiziert haben, indem sie eine Serie katalytisch promiskter Zwischenstufen durchlaufen haben. Die meisten bekannten Enzyme aus einer Superfamilie, die unterschiedliche Reaktionen katalysieren, haben viel mehr Sequenzänderungen angehäuft als das AtzA/TriA-Paar. Weite Sequenzabstände machen es viel aufwändiger,



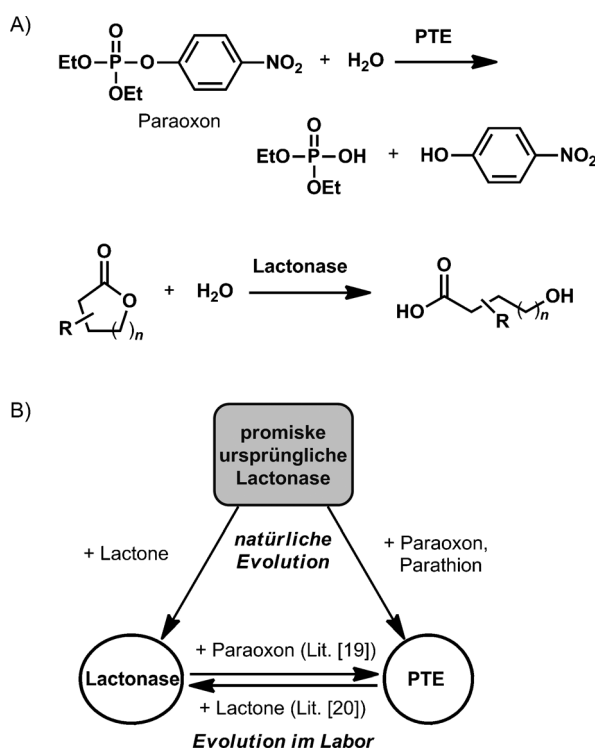
Frances H. Arnold ist Dickinson Professor of Chemical Engineering, Bioengineering and Biochemistry am California Institute of Technology. Nach ihrer Promotion 1985 bei Henry Blanch an der University of California, Berkeley, war sie Postdoktorandin bei Ignacio Tinoco (Berkeley) und John Richards (Caltech). Ihre Arbeitsschwerpunkte sind Proteinevolution und Biokatalyse. Sie wurde in die U.S. National Academies of Engineering (2000), Medicine (2004) und Sciences (2008) gewählt. Sie ist Trägerin der National Medal of Technology und erhielt 2011 den Draper Prize in Engineering.



einfache evolutive Entwicklungspfade aufzuzeigen oder die Funktionen des Ausgangsenzyms festzulegen. Mehrere Forschergruppen haben diese Herausforderung jedoch angenommen und mit Protein-Engineering und besonders mit gerichteter Evolution gezeigt, wie im Zusammenhang mit bestehenden Enzymen eine Funktion in eine andere überführt werden kann.

## 2.2. Evolution einer Phosphotriesterase (PTE)

Ein anderes Enzym, das wahrscheinlich erst vor kurzer Zeit aufgetaucht ist, ist die Phosphotriesterase (PTE), die zuerst in Bodenbakterien identifiziert wurde, die auf synthetischen Organophosphat-Pestiziden wie Parathion und Paraaxon als einziger Phosphorquelle wachsen können (Abbildung 3 A).<sup>[15]</sup> Bedenkt man die erst seit kurzer Zeit erfolgte



**Abbildung 3.** A) Hydrolysereaktionen, die von PTE und Lactonase katalysiert werden. B) Mögliche evolutive Beziehung zwischen Lactonase und PTE und die Umwandlung ineinander im Labor.<sup>[19,20]</sup>

Freisetzung von Parathion und Paraaxon in die Umwelt sowie die Tatsache, dass PTE sie in nahezu diffusionskontrollierter Geschwindigkeit hydrolysiert, kommt man zu dem Schluss, dass PTE erst von kurzem aus einem älteren Enzym entstanden ist, das sich durch eine promiske Organophosphat-Hydrolyseaktivität auszeichnet. Das Ausgangsenzym ist noch unbekannt; bislang wurde kein sehr enges Sequenzhomologes gefunden.

Die PTE aus *Pycnoclavella diminuta* ist ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-fassförmig gefaltet und enthält ein zweikerniges Metallzentrum, das vielen Elementen der Amidohydrolase(AHS)-Superfamilie, die verschiedene Substratklassen hydrolysieren, gemeinsam

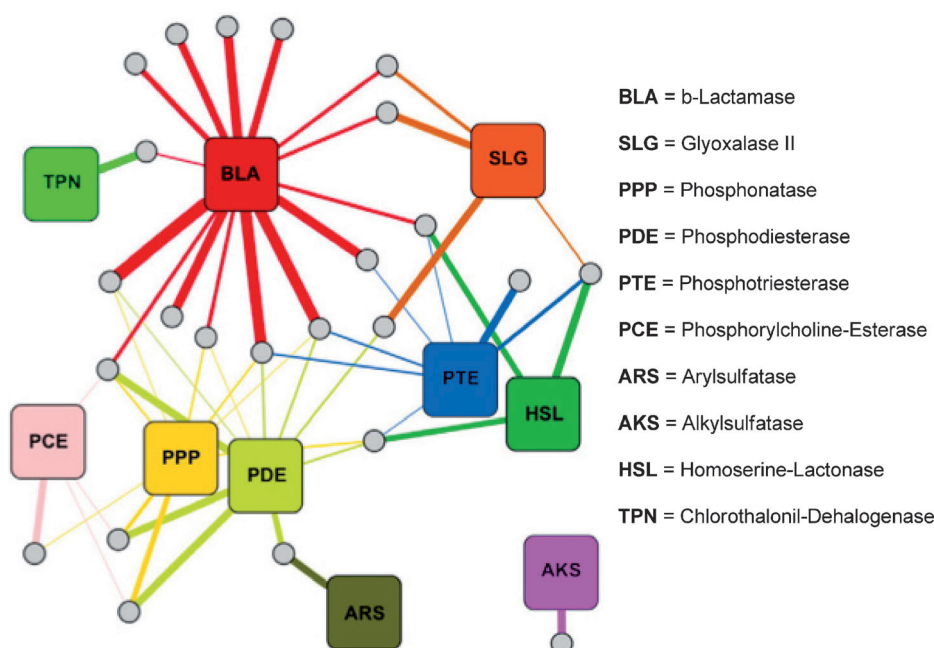
ist.<sup>[16]</sup> Afriat et al. stellten die Hypothese auf, dass die promiske Lactonaseaktivität dieser PTE der Überrest der ursprünglichen Quelle und eine Spur zur Ausgangsfunktion sein könnte.<sup>[17]</sup> Sie zeigten, dass die drei mikrobiellen Enzyme, die die nächsten bekannten Homologen der *P. diminuta*-PTE sind (ca. 30 % Sequenzidentität), tatsächlich hochaktive Lactonasen sind und auch unterschiedlich starke promiske Organophosphathydrolyseaktivität aufweisen. Diese Phosphotriesterase-ähnlichen Lactonasen (phosphotriesterase-like lactonases, PLLs) sind besonders aktiv gegenüber *N*-Acylhomoserinlactonen, die eine entscheidende Rolle beim bakteriellen Quorum-Sensing spielen.<sup>[18]</sup> Afriat et al. vermuteten, dass sich PTE aus der schwachen promiskuen Aktivität einer bakteriellen PLL entwickelt haben könnte.

Raushel et al. versuchten die Umwandlung einer PLL mit einer niedrigen Organophosphat-spaltenden Aktivität zu einer PTE experimentell nachzuvollziehen.<sup>[19]</sup> Mit einer Kombination aus rationaler und Zufallsmutagenese konnten sie die PLL von *Deionococcus radiodurans* (*Dr*PLL) in ein Enzym umwandeln, das eine um fünf Größenordnungen höhere PTE-Aktivität als die Wildtyp-*Dr*PLL hat und nur um eine Zehnerpotenz schwächer die Wildtyp-PTE ist. Das aktivste Enzym trug nur sieben Mutationen verglichen mit der Wildtyp-*Dr*PLL, von denen drei ausreichten, um die PTE-Aktivität um das Hundertfache zu steigern. Tawfik et al. zeigten, dass die Umwandlung bereits möglich ist, wenn man eine rekombinante Variante der PTE von *P. diminuta* als difunktionale PTE/PLL durch Umformung der Schleifen im aktiven Zentrum herstellt.<sup>[20]</sup>

Ähnlich wie AtzA soll auch PTE als Reaktion auf die Freisetzung synthetischer Verbindungen mit dem Potenzial, als neue Nahrungsquelle zu dienen, entstanden sein (Abbildung 3 B). Anders als AtzA und TriA hat PTE aber nur eine geringe Sequenzidentität mit dem nächsten bekannten Homologen, das man für eine Lactonase hält. Obwohl sich die bekannten PTE- und PLL-Enzyme an Hunderten von Aminosäurepositionen unterscheiden und außerdem die Struktur und Anordnung der Schleifen im aktiven Zentrum durch Deletionen und/oder Insertionen sehr verschieden sind, überlappen die Funktionen und können durch gerichtete Evolution und rationales Design ineinander überführt werden. Dass dies im Labor möglich ist, zeigt, wie einfach auch in der Natur aus einer promiskuen PLL eine PTE werden kann.<sup>[19]</sup> Das Beispiel macht auch deutlich, wie einfach eine ursprüngliche Restaktivität durch die Anhäufung günstiger Mutationen verstärkt werden kann.

## 2.3. Katalytische Promiskuität in der MBL-Superfamilie

In einer umfassenden Untersuchung darüber, wie sich katalytische Funktionen in der Metall- $\beta$ -Lactamase(MBL)-Superfamilie von  $\alpha\beta/\beta\alpha$ -Proteinen überschneiden, verglichen Tokuriki und Baier die Aktivitäten von 24 Enzymen aus 15 Unterfamilien.<sup>[21]</sup> Sie fanden, dass viele Enzyme der MBL-Superfamilie trotz ihrer niedrigen Sequenzhomologien (ca. 5–35 %) in geringem Umfang die verschiedenen Reaktionen entfernt verwandter Enzyme zusätzlich zu den eigenen katalysieren (Abbildung 4). Auch hier spiegelt sich als ein



**Abbildung 4.** Enzyme der MBL-Superfamilie sind untereinander funktionell stark verknüpft, wie von Tokuriki und Baier gezeigt wurde.<sup>[21]</sup> Die unterschiedlichen Reaktionen, die von den Enzymen der Superfamilie katalysiert werden, sind durch promiske Enzyme, die zwei oder mehr Reaktionen katalysieren, miteinander verbunden (graue Kreise). Adaptiert aus Lit. [21].

Grundmotiv der Enzymevolution wider, dass die Architektur des aktiven Zentrums in einer Superfamilie oft zumindest teilweise erhalten bleibt.<sup>[22]</sup> Die meisten der hier betrachteten Enzyme haben noch das zweikernige aktive Zentrum für eine Aktivierung eines Wassermoleküls durch ein zweiwertiges Metallion. Die beobachteten promiskuen Aktivitäten resultieren also vermutlich aus den gemeinsamen Eigenschaften der aktiven Zentren in den Superfamilienenzymen. Die MBL-Superfamilie enthält auch eine PTE-Familie, die wahrscheinlich aus Lactonasen entstand, parallel zu den PTEs aus der AHS-Superfamilie. Hier handelt es sich vermutlich um ein Beispiel einer konvergenten Evolution einer neuen Funktion.<sup>[23]</sup>

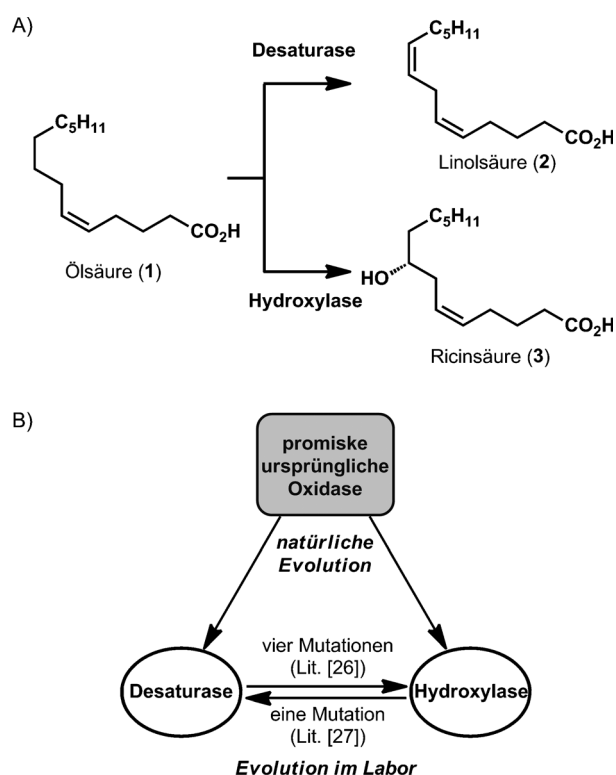
Abbildung 4 veranschaulicht das stark verbundene Netzwerk überlappender Funktionen in dieser Superfamilie. Vermutlich entwickelten sich diese Enzyme aus einem gemeinsamen Vorfahren über eine Serie promiskuer Zwischenstufen. Promiskuität kommt in dieser Enzymfamilie noch immer häufig vor, und wenn man das Ausmaß der funktionellen Überlappungen betrachtet, ist die Annahme vernünftig, dass man innerhalb des Netzwerks durch gerichtete Evolution von einer katalytischen Funktion zu anderen gelangen kann. Und tatsächlich konnten Park et al. zeigen, dass sich eine Glyoxalase II aus dieser Familie durch gerichtete Evolution in ein Enzym mit hoher  $\beta$ -Lactamaseaktivität umwandeln ließ.<sup>[24]</sup>

#### 2.4. Die Evolution einer Hydroxylase aus einer Desaturase

Oleatdesaturasen und -hydroxylasen sind integrale Membranenzyme mit zwei Eisenionen (Abbildung 5 A), die die Modifikation von Ölsäure (1) zu den entsprechenden

dehydrierten und hydroxylierten Produkten Linolsäure (2) und Ricinsäure (3) katalysieren. Sie kommen normalerweise in höheren Pflanzen vor und sind eng verwandte Mitglieder einer funktionell diversen Nicht-Häm-Enzymfamilie mit zwei Eisenionen. Die beiden Reaktionen sind auch mechanistisch verwandt: Beide werden durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms eingeleitet.<sup>[25]</sup> Im nachfolgenden Schritt unterscheiden sie sich, denn bei der Desaturierung wird ein weiteres Wasserstoffatom abgespalten, während die Hydroxylierung über einen radikalischen Rebound- und Sauerstoffübertragungs-Mechanismus abläuft.

Wird die Hydroxylase LFAH12 aus *Lesquerella fendleri* in Hefe exprimiert, weist sie eine nicht unerhebliche Desaturaseaktivität zusätzlich zur natürlichen Hydroxylaseaktivität auf, sodass zweifach ungesättigte Fettsäuren



**Abbildung 5.** A) Desaturierungs- und Hydroxylierungsreaktionen von Ölsäure, katalysiert von der Desaturase FAD2 und der Hydroxylase LFAH12. B) Vier Mutationen erhöhen die Hydroxylaseaktivität der *A. thaliana*-Desaturase FAD2 signifikant, und eine einzige Mutation in der Oleathydroxylase LFAH12 genügt für eine deutliche Steigerung der Desaturaseaktivität.<sup>[26, 27]</sup>

und hydroxylierte Fettsäuren etwa zu gleichen Teilen entstehen.<sup>[26,27]</sup> Im Unterschied dazu katalysiert die Desaturase FAD2 aus *Arabidopsis thaliana* fast ausschließlich die Desaturasereaktion, und nur geringe Mengen des Hydroxylierungsprodukts können nachgewiesen werden (das Produktverhältnis Hydroxylierung/Desaturierung beträgt 0.006). Diese beiden Enzyme sind mit etwa 81 % Sequenzidentität nahe verwandt. In einem Sequenzvergleich der beiden Enzyme mit einigen anderen Hydroxylasen und Desaturasen konnten mehrere hochkonservierte Reste in den Desaturasen identifiziert werden, die sich aber von den Hydroxylasen unterscheiden.<sup>[26]</sup> Darauf aufbauend wurden sieben Reste von FAD2 an den entsprechenden Positionen in LFAH12 eingeführt. Die so hergestellte Variante zeigte überwiegend Desaturaseaktivität. Eine weitere Mutationsanalyse ergab, dass nur sechs Mutationen LFAH12 in eine Desaturase umwandeln konnten (Abbildung 5B). Umgekehrt reichen vier Mutationen aus, um FAD2 in eine Hydroxylase umzuwandeln. Weitere Untersuchungen von Broadwater et al.<sup>[27]</sup> ergaben, dass die Hydroxylaseaktivität in FAD2 durch eine einzige Mutation enorm verstärkt werden konnte.

Dieses Desaturase-Hydroxylase-Beispiel zeigt, wie einfach verwandte Enzyme mit überlappenden Aktivitäten ineinander überführt werden können, ähnlich wie bei den Beispielen der Atrazin-Chlorhydrolase und der Phosphotriesterase. Es war nicht nötig, für die Evolution der neuen Funktionen die ursprünglichen Enzyme zu identifizieren und aufzulisten, denn die neuen Enzyme wurden im Labor ausgehend von existierenden verwandten Enzymen erhalten. Wie diese Beispiele vermuten lassen, können wenige Mutationen ausreichend sein, um ein existierendes Enzym in ein neues mit unterschiedlicher, aber mechanistisch verwandter Aktivität zu verwandeln.<sup>[22]</sup>

Wir haben hier an einigen ausgewählten Beispielen aufgezeigt, wie sich Enzyme ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren in verschiedene Richtungen hin zu Enzymen entwickeln können, die unterschiedliche Reaktionen katalysieren, vor allem dann, wenn die Aktivitäten wenigstens ein wenig überlappen. Die Natur tut das gleiche, und in den Laborexperimenten lässt sich demonstrieren, wie leicht dies ist. Auch wenn die Natur vielleicht nicht die gleichen Wege oder Startpunkte genommen hat, zeigen die Laborversuche, wie ein neues Enzym entstehen und sich entwickeln kann, wenn Gelegenheiten für einen Selektionsvorteil bestehen. In der Folge werden wir diskutieren, wie mit dieser Strategie Enzyme hergestellt werden können, die Reaktionen katalysieren, die in der Natur noch nicht gefunden wurden.

### 3. Die Ausdehnung des Enzym-Universums mithilfe mechanistischer Ähnlichkeiten und gerichteter Evolution

Viele „moderne“ Enzyme haben flexible aktive Zentren mit einem gewissen Anteil an promiskiten Aktivitäten als Eigenart ihrer Mechanismen.<sup>[28]</sup> Daher können, wie die oben beschriebenen Beispiele zeigen, verwandte Enzyme, die sich im Verlaufe einer divergenten natürlichen Evolution in Richtung zu verschiedenen Funktionen entwickelten, oft mit

nur wenigen Mutationen entlang eines bergauf führenden evolutiven Entwicklungswegs ineinander überführt und optimiert werden. Weil die katalytische Promiskuität verbreitet ist, bietet die heute verfügbare, breite Auswahl an Biokatalysatoren die gleichen oder vielleicht sogar größere Gelegenheiten für Innovationen als die Enzyme aus einem frühen Evolutionsstadium. Ebenso wie die Natur können auch wir diese reiche Quelle an Ausgangsmaterialien zur Entwicklung neuer Katalysatoren nutzen.

Nehmen wir kurz an, die Atrazin-Chlorhydrolase sei in der Natur noch nicht entdeckt worden. Hätte man ihr Erscheinen erwarten und sie im Labor herstellen können, bevor sie in der Natur gefunden wurde? Betrachtet man die Ähnlichkeit der Substratstruktur (ein heterocyclischer *s*-Triazin-kern) und des Reaktionstyps (Hydrolyse), könnte man logischerweise eine Aminohydrolase wie TriA als Ausgangspunkt für eine gerichtete Evolution testen. Weil Atrazin eine bessere Abgangsgruppe enthält ( $\text{Cl}^-$  gegenüber  $\text{NH}_2^-$ ), könnte die Hydrolyse einfacher verlaufen als bei Melamin. Tatsächlich zeigt TriA eine geringe Atrazin-Chlorhydrolase-Nebenaktivität ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 60 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). Von hier aus könnte man eine zufällige oder regiospezifische Sättigungsmutagenese mit einem spektroskopischen Hochdurchsatztest auf das Hydrolyseprodukt koppeln,<sup>[29]</sup> um so Varianten mit zunehmender Aktivität zu identifizieren. Wie Scott et al. nachweisen konnten, genügen bereits zwei Mutationen, um die Chlorhydrolaseaktivität von TriA etwa auf das 200-Fache zu steigern.<sup>[13]</sup>

Setzt man nun voraus, dass mit nur wenigen Mutationen eine neue, mechanistisch verwandte katalytische Funktion einem Enzym verliehen werden kann, das bereits eine geringe Aktivität dieser Funktion aufweist, hängt ein evolutionsorientierter Ansatz zur Entdeckung neuer Katalysatoren von der Identifizierung eines geeigneten Ausgangspunkts ab – also von einem verfügbaren Enzym, das eine neue Funktion übernehmen kann. Um ein solches Enzym zu finden, kann man nach mechanistischen Ähnlichkeiten zwischen einer bestehenden Aktivität und der gewünschten Transformation, für die noch kein Enzym bekannt ist, suchen. Und weil niedrige katalytische Aktivitäten bei promiskiten Enzymen in vielen Fällen durch gezielte Veränderungen der Proteinsequenz verbessert werden können, ist die Annahme vernünftig, dass eine nicht-natürliche, aber mechanistisch verwandte promiske Aktivität auf ähnliche Art verbessert werden kann.

In einigen Arbeitsgruppen wird dieser Ansatz tatsächlich verfolgt. Er basiert auf der katalytischen Promiskuität von Enzymen und der Ähnlichkeit zwischen den Mechanismen der natürlichen und der erwünschten Reaktion, um daraus neue Enzyme zu generieren. In einigen Fällen hatte das Ausgangsenzym jedoch nicht die gewünschte promiske Aktivität, und die Forscher mussten sich auf ihre chemische Intuition verlassen, dass die erwünschte Funktion möglich sein und mit einer oder wenigen Mutationen erreichbar sein sollte. In diesem Abschnitt werden wir einige Beispiele für neue nicht-natürliche Funktionen beschreiben, die mit diesem am Mechanismus orientierten Vorgehen entdeckt wurden und die anschließend durch Protein-Engineering und speziell durch gerichtete Evolution zu brauchbaren Katalysatoren entwickelt wurden.



### 3.1. Epoxidringöffnung mit einer Halohydrin-Dehalogenase

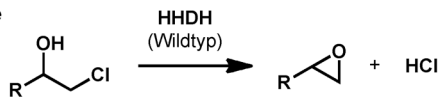
Wildtyp-Halohydrin-Dehalogenasen (HHDHs) katalysieren die Bildung von Epoxiden aus den entsprechenden Chlor- und Bromhydrinen.<sup>[30]</sup> Röntgenstrukturen von Halohydrin-Dehalogenasen aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 lassen auf je eine Bindestelle für das Epoxid und das Halogenidanion schließen,<sup>[31]</sup> was es möglich macht, mit Pseudohalogeniden unterschiedlicher Größe die Epoxidringöffnung als Umkehrreaktion auszulösen. Janssen et al. fanden tatsächlich heraus, dass dieses Enzym zahlreiche nicht-natürliche Nucleophile wie Azid, Nitrit, Cyanat und Thiocyanat akzeptiert,<sup>[32]</sup> die Autoren nutzten diese für eine kinetische Racematspaltung verschiedener Epoxide unter Bildung ringgeöffneter Produkte mit hoher Enantioselektivität (Abbildung 6A). Außerdem wurde eine hohe Selektivität für eine Öffnung an der terminalen Position beobachtet. Im Fall von Arylepoxid-Substraten stand dieser Befund im

Gegensatz zur unkatalysierten Ringöffnung, bei der ein nucleophiler Angriff meist in Benzyldition erfolgt.

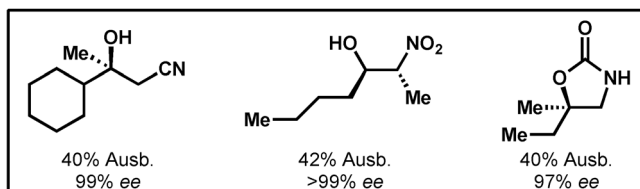
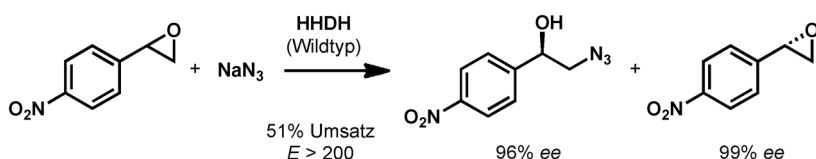
2007 veröffentlichten Wissenschaftler von Codexis den Einsatz von HHDH zur asymmetrischen Synthese von Ethyl-(R)-4-cyan-3-hydroxybutyrat (**6**),<sup>[33]</sup> einem wichtigen Zwischenprodukt bei der Herstellung des Cholesterinsenkers Atorvastatin. Sie konnten die niedrige Aktivität des Wildtyp-Enzyms für die Cyanylierung von **5** durch gerichtete Evolution so steigern, dass der Prozess mit ca. 4.000-fach höherer Volumenproduktivität als beim Wildtyp-Enzym ablief (Abbildung 6B).<sup>[34]</sup> Das Enzym katalysiert die Umsetzung von **6** mit >99.9% ee mit einer Substratbeladung von 130 g L<sup>-1</sup>.

Die promiske Cyanylierungsaktivität von HHDH wurde durch eine Kombination von Enzymstrukturanalyse und Analogie zu verwandten Ringöffnungen mit nicht-natürlichen Pseudohalogenid-Nucleophilen entdeckt. Die niedrige Cyanylierungsaktivität der Wildtyp-HHDH konnte danach enorm durch gerichtete Evolution verbessert werden, indem günstige Mutationen auf einem Bergaufweg zur neuen Funktion akkumuliert wurden.

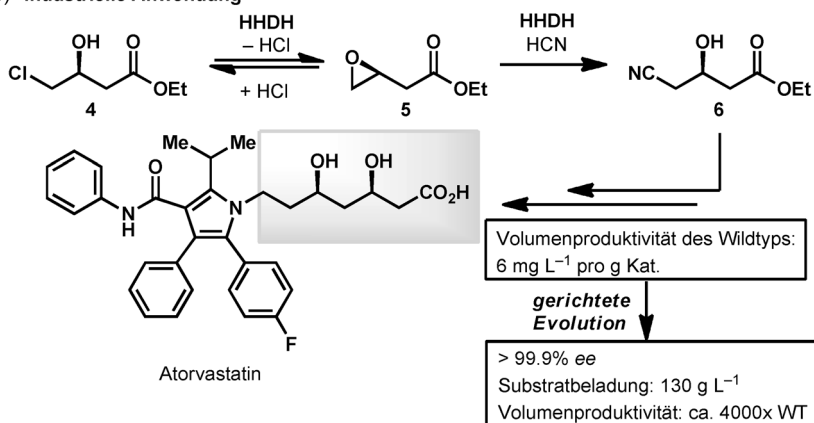
#### A) natürliche Katalyse



#### nicht-natürliche Katalyse



#### B) industrielle Anwendung



**Abbildung 6.** A) Promiske Epoxidringöffnungsaktivität von Wildtyp-HHDH.<sup>[32]</sup> B) Verwendung von HHDH zur Synthese der Atorvastatin-Seitenkette und Verbesserung der Volumenproduktivität mit gerichteter Evolution.<sup>[33]</sup>

### 3.2. Die Synthese von Thiooligosacchariden mit einer konstruierten Glycosidase

Eine gute Strategie zur Einführung einer neuen Aktivität kann sein, ein reaktives Zwischenprodukt auf einen anderen Reaktionsweg umzuleiten, so, wie es die Natur mit den Hydroxylase- und Desaturaseenzymen vorgemacht hat. Ein schönes Beispiel dazu findet sich in einer frühen Arbeit von Withers et al. Bei der Analyse des Katalysiemechanismus von konfigurationserhaltenden  $\beta$ -Glycosidasen und der gezielten Modifikation der entscheidenden katalytischen Reste konnten Withers et al. ein reaktives Zwischenprodukt der Hydrolyse glycosidischer Bindungen zur Synthese von Thiooligosacchariden umlenken.<sup>[35]</sup>

Thiooligosaccharide sind als Kohlenhydratmimetika mit einer stabileren und hydrolyseresistenteren Glycosidbindung von Interesse.<sup>[36]</sup> Sie sind allerdings schwierig zu synthetisieren, weil für ihre Herstellung meist Schutzgruppen und ein hohes Maß an stereochemischer Kontrolle am anomeren Zentrum notwendig sind. Einige wenige Enzyme sind bekannt, die die Bildung der C-S-Bindung in natürlichen Thioglycosiden katalysieren, doch es gibt nur sehr wenige Veröffentlichungen über ihren Einsatz für die Herstellung von Thiooligosacchariden.<sup>[37]</sup>

Glycosidasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Glycosidbindungen und sind hauptsächlich am Abbau kohlenhydratbasierter Biomasse beteiligt. Bei

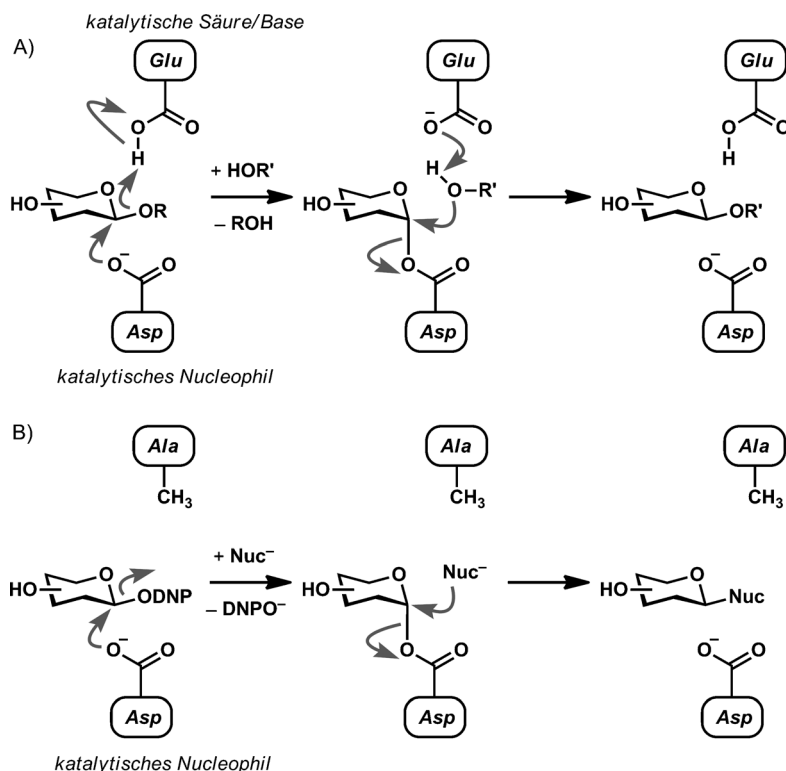
niedriger Wasserkonzentration sind diese Enzyme auch in der Lage, einen Glycosid austausch zu katalysieren.  $\beta$ -Glycosidasen, die diese Reaktion unter Konfigurationserhalt am anomeren Zentrum katalysieren, nutzen für die enzymatische Hydrolyse und die Glycosid austauschreaktion einen doppelten Substitutionsmechanismus, in dem ein katalytisches Nucleophil zuerst die austretende Aglycongruppe ersetzt und ein katalytischer Säure/Base-Rest das eintretende Wasser oder Glycosidnucleophil aktiviert, das anschließend die neue anomere Bindung bildet (Abbildung 7A).<sup>[38]</sup>

Um eine neue Aktivität zu generieren, ist es hilfreich (aber nicht zwingend erforderlich), wenn das Ausgangsenzym diese bereits in gewissem Umfang als promiske Aktivität aufweist. In einem solchen Fall muss der Katalysemechanismus jedoch die Übernahme der neuen Aktivität ohne große Anpassung ermöglichen. Durch Substitution des katalytischen Säure/Base-Glutaminrestes durch einen inerten Alaninrest (Abbildung 7B) formten Withers et al. das aktive Zentrum der  $\beta$ -Glycosidase von *Agrobacterium* sp. (Abg) und von  $\beta$ -Mannosidase (Man2A) aus *Cellulomonas fimi* so um, dass diese nur die Glycosylierung aktivierter Dinitrophenyl(DNP)-Glycosid-Donoren und Desoxythiozucker als Akzeptoren katalysierten. Erstere erfordern keine Säureaktivierung, da die Abgangsgruppe gut genug ist, um vom katalytischen nucleophilen Rest verdrängt zu werden. Der Desoxyzucker andererseits enthält ein stark nucleophiles Thiol, das für die Knüpfung der Glycosidbindung keine Basenkatalyse benötigt.

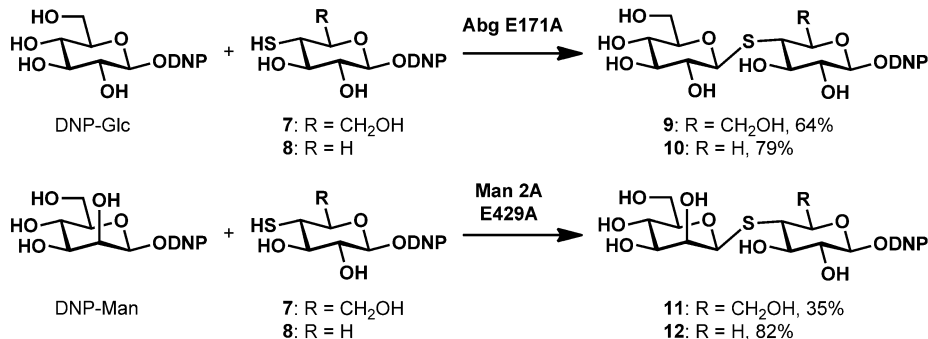
Beide Glycosidasemutanten katalysierten die Reaktion von DNP-Glucose und DNP-Mannose mit den Glycosidakzeptoren **7** und **8** in guten bis ausgezeichneten Ausbeuten (Abbildung 8). Bemerkenswert ist, dass keine Schutzgruppen an den freien Hydroxygruppen der Glycosiddonoren und -akzeptoren erforderlich sind. In weiteren Arbeiten zeigten Withers et al., dass Mutationen am katalytischen Säure/Base-Rest die Thioglycoligaseaktivitäten dieser konfigurationserhaltenden  $\beta$ -Glycosidasen verstärken können.<sup>[39]</sup>

### 3.3. Carben- und Nitrentansferreaktionen mit Cytochrom-P450-Enzymen

Metalloporphyrinkomplexe, die lange als synthetische Modelle für Cytochrom-P450-Enzyme verwendet wurden,

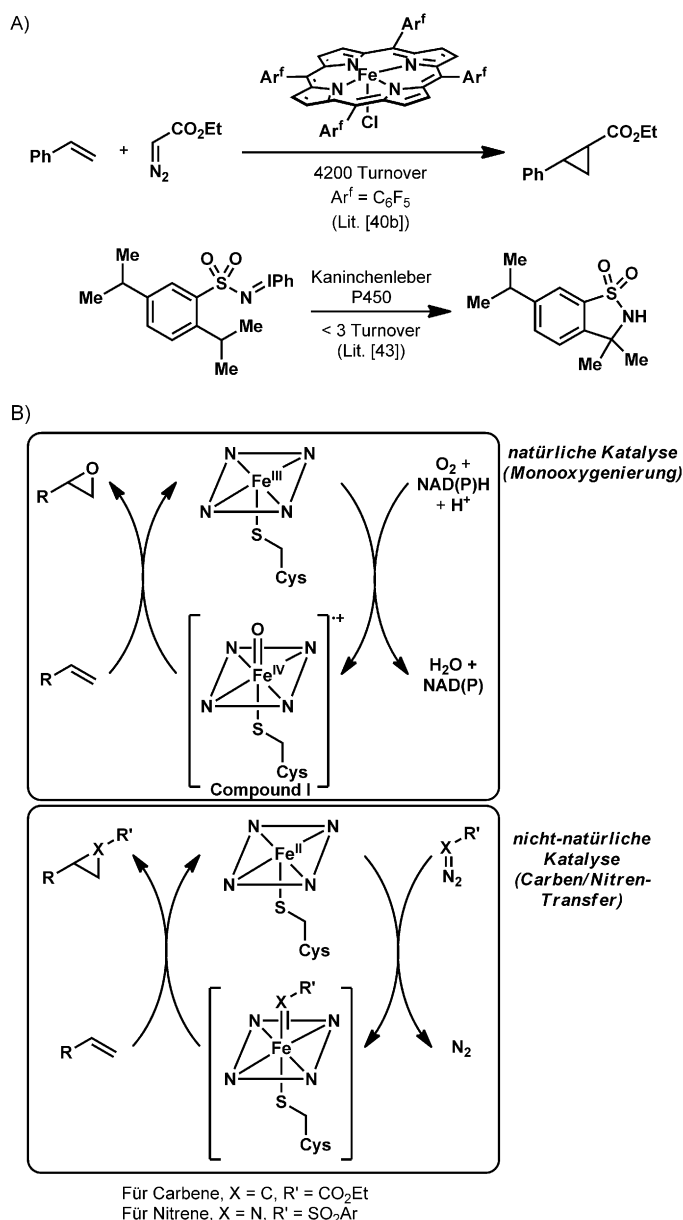


**Abbildung 7.** A) Mechanismus konfigurationserhaltender Wildtyp- $\beta$ -Glycosidasen, die katalytische Säure/Base- und katalytische nucleophile Reste bereitstellen; R' = H oder ein anderer Zucker bei niedriger Wasserkonzentration.<sup>[38]</sup> B) Mechanismus künstlicher Thioglycoligasen, von denen ein katalytischer Säure/Base-Rest entfernt wurde; DNP = Dinitrophenyl; Nuc = Desoxythiozucker-Nucleophil als Akzeptor.<sup>[35]</sup>



**Abbildung 8.** Verwendung künstlicher Thioglycoligasen zur Synthese von Thiodisacchariden.<sup>[35]</sup> Die Ausbeuten wurden nach Peracetylierung der Thiodisaccharide bestimmt. Wildtypenzyme katalysieren diese Reaktion nicht.

katalysieren auch chemische Reaktionen, die keine natürlichen Gegenstücke haben. So ist beispielsweise die Reaktion von Metalloporphyrinen (darunter auch Eisenporphyrine) mit Diazoverbindungen zu reaktiven Metall-Carbenoid-Zwischenstufen für Cyclopropanierungen gut dokumentiert (Abbildung 9A).<sup>[40]</sup> Während Carbene im Allgemeinen zu reaktiv für eine weitere Charakterisierung sind, erwiesen sich einige dieser Metall-Carbenoide als stabil genug für eine Isolierung und Röntgenstrukturanalyse.<sup>[41]</sup> Diese isolierten Metall-Carbenoide sind an der Cyclopropanierung beteiligt, was darauf schließen lässt, dass metalloporphyrinkatalysierte



**Abbildung 9.** A) Beispiele für die Reaktivität von Carbenen und Nitrenen mit Eisenporphyrinen.<sup>[40b, 43]</sup> B) Vergleich der Monooxygenierungsaktivität und der nicht-natürlichen Carben/Nitren-Transferreaktion von P450-BM3. Oberer Kasten: Reaktion von Fe<sup>III</sup> (aus P450-BM3) mit O<sub>2</sub> und NAD(P)H zu Compound I, der aktiven Zwischenstufe für die Monooxygenierung. Unterer Kasten: Reaktion von reduziertem Fe<sup>II</sup> mit einer aktivierten Verbindung, gefolgt von der Abspaltung von N<sub>2</sub>, erzeugt eine postulierte Carbenoid- oder Nitrenoid-Verbindung.

Cyclopropanierungen über Metall-Carbenoid-Zwischenstufen verlaufen.

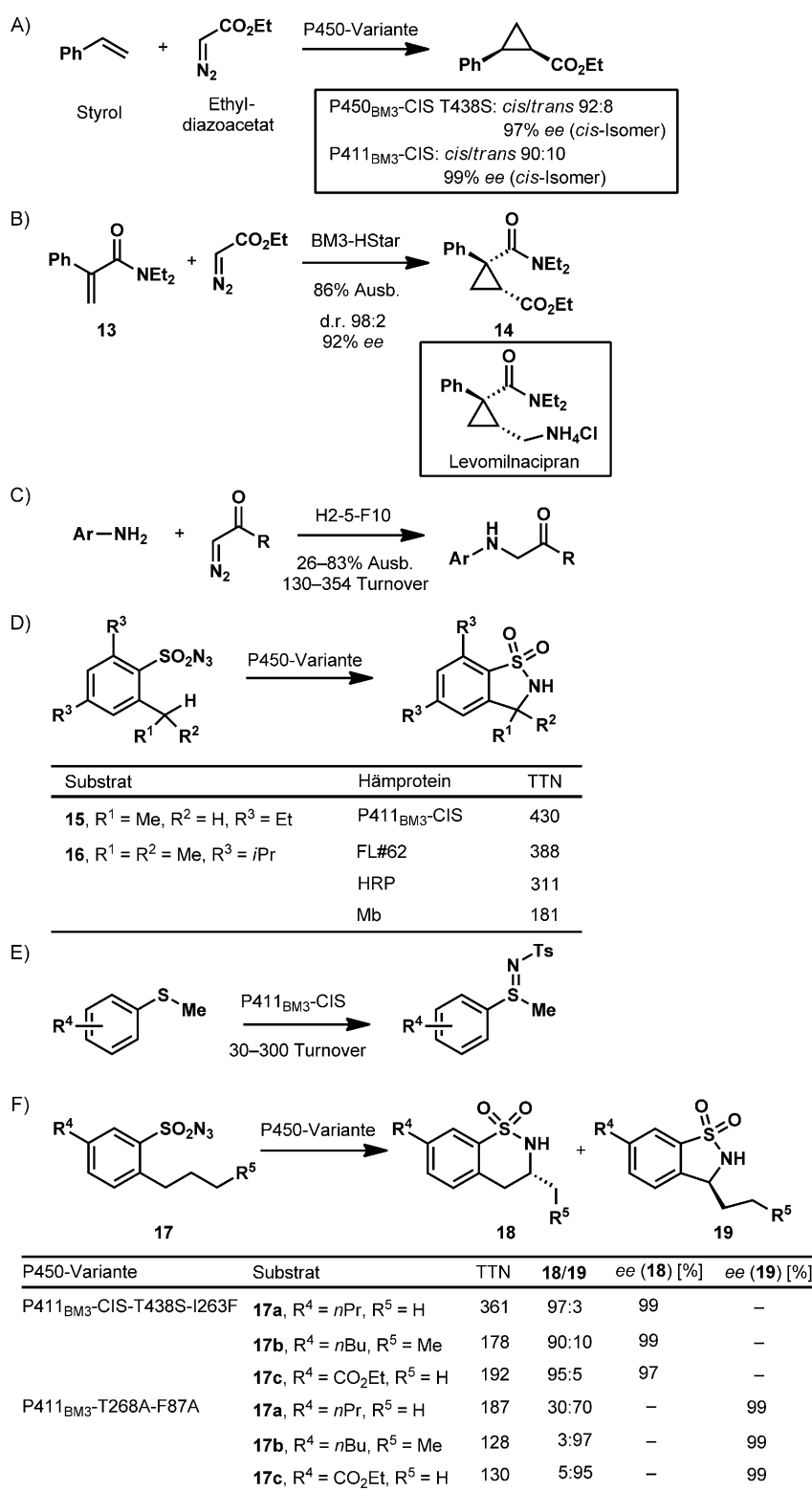
Metalloporphyrine bilden in Gegenwart aktivierter Verbindungen wie Azide oder Iminoiodinane auch reaktive Nitrenoide. Breslow und Gellman zeigten als erste, dass *meso*-Tetraphenylporphyrineisen(III)-chlorid intra- und intermolekulare Nitrenübertragungen katalysieren kann, wenn es mit Iminoiodinane umgesetzt wird.<sup>[42]</sup> wobei Metall-Nitrenoide wahrscheinlich die Zwischenstufen sind. In einer Folgearbeit

von Dawson et al. wurde nachgewiesen, dass ein Cytochrom P450 aus Kaninchenleber die gleiche Nitren-Übertragungsreaktion katalysieren kann, wenn auch mit sehr niedrigem Durchsatz.<sup>[43]</sup> Wegen der Ähnlichkeit zwischen Carben/Nitren und Oxen (des Freier-Sauerstoff-Äquivalents der reaktiven Spezies bei P450-Monooxygenasereaktionen) bezüglich der elektronischen Konfiguration und daher Elektrophilie (Abbildung 9B) vermuteten wir, dass Cytochrom-P450-Enzyme eine promiske Aktivität für Carben- und Nitrenübertragungen haben könnten und dass solche Aktivitäten durch Protein-Engineering verbessert werden könnten. In einer Mischung von Ethyldiazoacetat und Styrol in Gegenwart von Wildtyp-P450-BM3 aus *B. megaterium* entstand in Spuren das entsprechende Cyclopropanderivat.<sup>[44]</sup> In weiteren Arbeiten wurde bestätigt, dass verschiedene Hämproteine und sogar freies Häm eine Olefin-Cyclopropanierung in Wasser katalysieren können.<sup>[45]</sup> Von besonderem Interesse sind aber einige Wildtyp-P450-Enzyme, deren Diastereoselektivität sich von der des freien Häms unterscheidet und die auch eine gewisse Enantioinduktion aufweisen.<sup>[44, 45]</sup> Die ungewöhnliche Selektivität der P450-Enzyme deutet darauf hin, dass die Cyclopropanierung im aktiven Zentrum stattfindet und dass die Geometrie des aktiven Zentrums die Konfiguration des Reaktionsprodukts kontrolliert. Wir hielten diese P450-Varianten daher als Ausgangsenzyme für geeignet zum Protein-Engineering und zur Entwicklung einer neuen Enzymfamilie, die Diazoverbindungen für Carbenübertragungen auf organische Moleküle aktivieren kann.<sup>[44, 46–50]</sup>

Mutationen steigern die nicht-natürliche Cyclopropanierungsaktivität von P450-BM3 drastisch. Die Substitution des distalen Threoninrestes Thr286, der eine entscheidende Rolle im natürlichen Katalysezyklus für die Monooxygenierung spielt, durch Alanin verbesserte die Wechselzahl mehr als 60-fach. Weitere Bearbeitung des aktiven Zentrums führte zur Variante P450<sub>BM3</sub>-CIS-T438S, die die Cyclopropanierung von Styrol in ausgezeichneter Ausbeute, Diastereoselektivität und Enantioselectivität katalysiert (Abbildung 10A). Eine Mutation am axialen Cystein-Liganden verbesserte die Cyclopropanierungsaktivität am stärksten. Wird Cystein in Position 400 von P450-BM3 durch Serin ersetzt (Cys400Ser), verschiebt sich die charakteristische Absorption bei  $\lambda = 450$  nm im CO-Differenzspektrum nach  $\lambda = 411$  nm; daher werden die Katalysatoren mit Serin-Ligand als „P411“ bezeichnet. Die Serin-Mutation ermöglicht auch die Reduktion des Eisen-Häm-Komplexes unter zellulären Bedingungen zum aktiven Fe<sup>2+</sup>-Katalysator; daher ist eine Cyclopropanierung mit ganzen Zellen, die diese Proteine exprimieren, möglich. Die Styrol-Cyclopropanierung wurde von einem P411-Enzym im Gramm-Maßstab in 72 % Ausbeute und mit Wechselzahlen von etwa 67000 katalysiert; damit reicht das Enzym an die aktivsten bekannten Rhodium-Katalysatoren heran.<sup>[46]</sup>

Die enzymkatalysierte Cyclopropanierung wurde bei der formalen Synthese von Levomilnacipran, einem Inhibitor der Serotonin- und Norepinephrin-Wiederaufnahme, der für die klinische Behandlung von Depressionen zugelassen ist, ge-





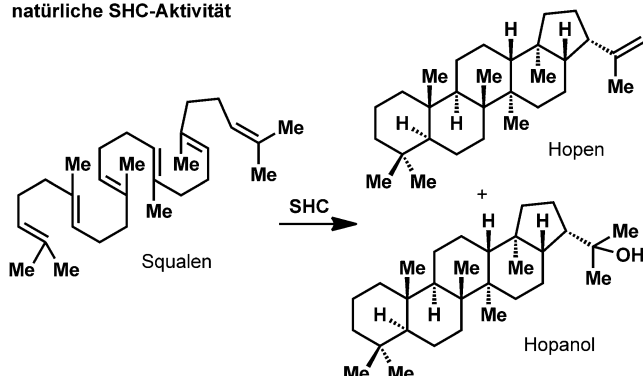
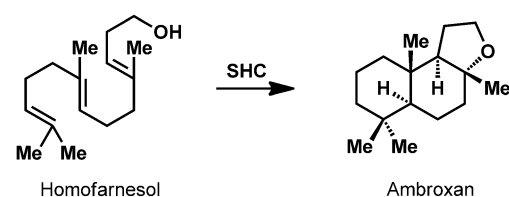
**Abbildung 10.** P450-katalysierte nicht-natürliche Carben- und Nitrenübertragungen: A) Styrolyclopropanierung;<sup>[44,46]</sup> B) Cyclopropanierung von *N,N*-Diethyl-2-phenylacrylamid als Synthesewischenstufe für Levomilnacipran;<sup>[47]</sup> C) N-H-Insertion;<sup>[49]</sup> D) intramolekulare C-H-Aminierung;<sup>[50a,51]</sup> E) intermolekulare Sulfimidierung;<sup>[50b]</sup> F) regioselektive C-H-Aminierung durch verschiedene P450-Varianten.<sup>[50c]</sup>

nutzt.<sup>[47]</sup> Eine Variante von P450-BM3 mit nur fünf Aminosäuremutationen, darunter der Austausch des proximalen Cysteinrestes gegen Histidin, katalysierte die Cyclopropanierung von *N,N*-Diethyl-2-phenylacrylamid (**13**) in 86 % Ausbeute und mit 92 % Enantioselektivität im präparativen Maßstab (Abbildung 10B). Der im Labor entwickelte Katalysator BM3-Hstar führte die Cyclopropanierung in Gegenwart von Sauerstoff durch und zeigte eine Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, die im gleichen Bereich liegt wie die der Monooxygenierung durch das Wildtyp-P450-BM3 (Wechselzahl > 1000 pro Minute). Die Untersuchung einer Auswahl von 2-Phenylacrylamid-Derivaten zeigte, dass BM3-Hstar ein recht allgemeiner Cyclopropanierungskatalysator ist, der Substrate mit unterschiedlichen sterischen und elektronischen Eigenschaften umsetzt.<sup>[48]</sup>

Carbeninsertion in Aryl-N-H-Bindungen, eine andere Reaktion, die von Eisenporphyrinen katalysiert wird, kann auch von Varianten von P450-BM3 katalysiert werden.<sup>[49]</sup> Die P411-Variante H2-5-F10 setzte eine solche Insertionsreaktion mit bis zu 83 % Ausbeute und 354 Reaktionszyklen *in vitro* um (Abbildung 10C). Freies Fe-Protoporphyrin IX kann an Anilin N-H-Insertionen katalysieren und produziert eine Mischung aus Einfach- und Doppelinserionsprodukten. Im Unterschied dazu erhält man mit dem Enzym nur ein Produkt mit einer Insertion. Dies unterstreicht die Bedeutung der Proteinbindetasche für die Selektivitätskontrolle.

Nach der ersten Publikation von Dawson et al.<sup>[43]</sup> verbesserten McIntosh et al. die katalytische Wirksamkeit von P450-BM3 für die intramolekulare C-H-Aminierung mit Sulfonylaziden als Nitren-Vorstufe stark.<sup>[50a]</sup> Für die Umsetzung des Azids **15** erwiesen sich die Mutationen an Schlüsselpositionen wie Thr268 in Helix I (Thr268Ala) und dem proximalen Cystein-Liganden an der prosthetischen Hämgruppe (Cys400Ser) als ausschlaggebend für die Verbesserung der Gesamtwechselzahl (total turnover number, TTN) bei der Aminierung (Abbildung 10D). Die Variante P411<sub>BM3</sub>-CIS katalysierte die Aminierung mit bis zu 87 % Enantioselektivität und 430 Reaktionszyklen. Die gleiche Variante konnte auch die Nitrenübertragung von *p*-Toluolsulfonylazid auf eine Reihe von

## natürliche SHC-Aktivität


Neumann und Simon<sup>[54]</sup> (1986)


**Abbildung 11.** Cyclisierung von Squalen durch SHC und von Homofarnesol durch eine promiske Aktivität von SHC.<sup>[54]</sup>

Thioethern unter Bildung der entsprechenden Sulfimide mit Wechselzahlen von 30–300 katalysieren (Abbildung 10E).<sup>[50b]</sup> Da freies Häm diese Sulfimidierung überhaupt nicht katalysiert, spielen die Liganden des Häm-Cofaktors im Protein und/oder das Protein selbst die entscheidende Rolle beim Modulieren der Reaktivität der Nitrenoid-Verbindung.

Einer unabhängigen Untersuchung von Fasan et al. zufolge kann die intramolekulare C-H-Aminierung des Sulfonylazids **16** durch eine andere Variante von P450-BM3 (FL#62) katalysiert werden, obwohl diese nicht die Mutationen Thr268Ala und Cys400Ser trägt.<sup>[51a]</sup> Die Untersuchungen der Autoren zum Substratspektrum der intramolekularen C-H-Aminierung mit FL#62 ergaben, dass der Biokatalysator eine Reihe von Substituenten am Arylring toleriert. In einer nachfolgenden Veröffentlichung wird weiter berichtet, dass die C-H-Aminierung am Azid **16** mit guten Wechselzahlen auch mit Myoglobin (Mb) oder Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert werden kann.<sup>[51b]</sup> Während Wildtyp-Myoglobin keine nachweisbare Enantioselektivität für die Aminierung mit **16** aufwies, konnte durch Einführung der Mutationen His64Val und Val68Ala eine überraschende, gute Enantioinduktion (60% *ee* mit **16**) erzielt werden. Diese Befunde lassen vermuten, dass auch andere Hämproteine sehr geeignete Plattformen für die Entdeckung neuer Katalysatoren für nicht-natürliche Reaktionen sind.

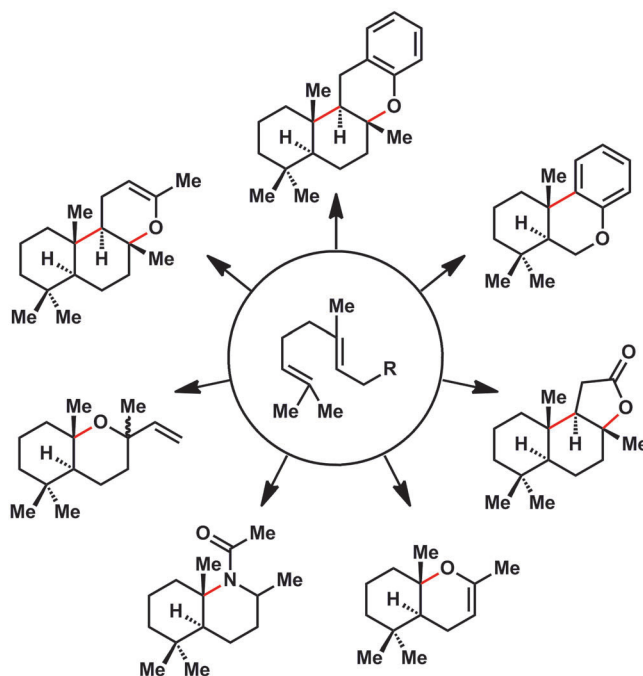
Hyster et al. zeigten in einer aktuellen Arbeit, dass die Regioselektivität dieser enzymkatalysierten C-H-Aminierung durch Mutationen nachjustiert werden kann (Abbildung 10F).<sup>[50c]</sup> Die Variante P411<sub>BM3</sub>-CIS-T438S-I263F katalysierte die C-H-Aminierung der Substrate **17a–c** in der Homobenzyl-Position mit ausgezeichneter Regio- und Enantioselektivität. Die Variante P411<sub>BM3</sub>-T268A-F87A hatte dagegen eine starke Präferenz für eine C-H-Aminierung in

der Benzylposition, ebenfalls mit großer Regio- und Enantioselektivität. Eine gezielte Modifizierung des aktiven Zentrums kann die Konformation der reaktiven Zwischenstufe also so weit verändern, dass der Katalysator die thermodynamische Neigung zur Reaktion an der Benzylposition überwinden kann. (Die Dissoziationsenergie der benzyli-schen C-H-Bindung ist um mehr als 10 kcal mol<sup>-1</sup> niedriger als die der nicht-benzyli-schen Bindung).

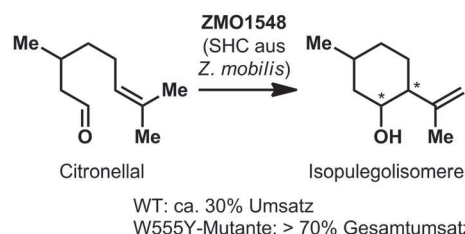
## 3.4. Umlenkung der Cyclisierung mit Terpensynthasen

Die Squalen-Hopen-Cyclase (SHC) katalysiert die kationische Polycyclisierung von Squalen zu den pentacyclischen Produkten Hopene und Hopanol (Abbildung 11), eine Reaktion, die nach Hauer et al. sehr an die durch chirale Brønsted-

- A) Hauer et al.<sup>[55]</sup> Hoshino et al.<sup>[56]</sup>  
SHC-katalysierte Cyclisierung terpenähnlicher Substrate



- B) Siedenburg et al.<sup>[57, 58]</sup>  
SHC-katalysierte Prins-Cyclisierung von Citronellal



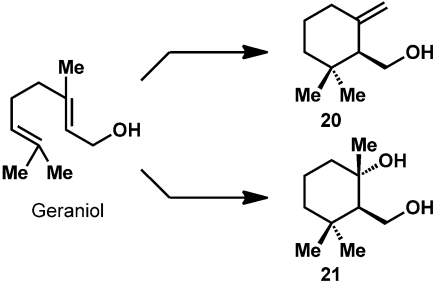
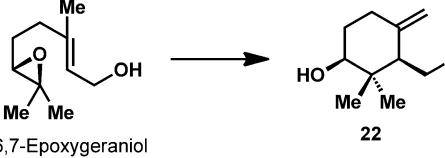
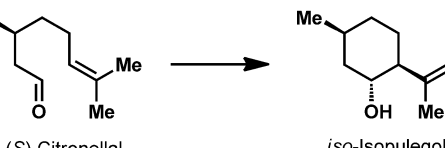
**Abbildung 12.** A) SHC-katalysierte Cyclisierung terpenähnlicher Substrate; die rot markierten Bindungen wurden während der Reaktion gebildet.<sup>[54–56]</sup> B) SHC-katalysierte Prins-Cyclisierung von Citronellal zur Herstellung von Isopulegol, einer Vorstufe von Menthol, und die Steigerung der Aktivität durch Mutation.<sup>[57, 58]</sup>

Säuren katalysierten Polycyclisierungen erinnert.<sup>[52]</sup> Die Kristallstruktur von SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*) wurde 1997 gelöst,<sup>[53]</sup> aber ihre Promiskuität ist schon seit 1986 bekannt, als Neumann und Simon zeigten, dass Homofarnesol von SHC zu Ambroxan, einem wertvollen Duftstoff, cyclisiert werden kann.<sup>[54]</sup> Diese Reaktion kann als promisk bezüglich des Substrats und der Enzymkatalyse angesehen werden, denn der Angriff durch ein internes Nucleophil beendet die Cyclisierungsreaktion.

Hauer et al. untersuchten die inhärente Promiskuität dieses Enzyms mit einer Auswahl terpenähnlicher Substrate, um neue carbocyclische Gerüste herzustellen (Abbildung 12A). Durch Variation der terminierenden Gruppen für die Cyclisierungsreaktion konnten sie eine SHC-katalysierte Cyclisierung verschiedener nicht-natürlicher Substrate in niedriger bis mäßiger Ausbeute erreichen.<sup>[54,55]</sup> Das Substratspektrum der SHC-katalysierten Cyclisierung wurde auch von Hoshino et al. untersucht.<sup>[56]</sup>

SHC zeigt auch eine schwache Aktivität für die Prins-Cyclisierung von Citronellal zu Isopulegol.<sup>[57]</sup> Siedenburg et al. führten eine ortsgerechte Sättigungsmutagenese an drei Resten im aktiven Zentrum der SHC aus *Z. mobilis* (ZMO1548) durch, um die Bildung von Isopulegolisomeren aus racemischem Citronellal zu verbessern (Abbildung 12B).<sup>[58]</sup> Zwei Aminosäurepositionen wurden als wichtig für eine gesteigerte Isopulegolbildung erkannt: Die Trp555Tyr-Mutation ergab mehr als 70 % Gesamtumsatz zu einem Isomerengemisch von Isopulegol gegenüber ca. 30 % beim Wildtyp-Enzym. Die Phe486Cys-Variante lieferte mehr als 50 % Gesamtumsatz mit einer leicht verbesserten Diastereoselektivität.

In einer ganz aktuellen Untersuchung veränderten Hauer et al.<sup>[59]</sup> eine SHC aus *A. acidocaldarius* (*AacSHC*), um die katalytische Aktivität für mehrere unterschiedliche Modi einer Brønsted-Säure-katalysierten Cyclisierung, darunter die Prins-Cyclisierung von (*S*)-Citronellal (Abbildung 13), zu verbessern. Beim Durchmustern einer Bibliothek von Enzymvarianten, die durch die Mutation verschiedener Aminosäuren in der Umgebung des katalytischen Asp376 hergestellt worden war, entdeckten die Autoren Varianten mit stark verbesserten Aktivitäten für diverse Cyclisierungen. Die Tyr420Trp-Gly600Phe-Mutante katalysierte die Cyclisierung von 6,7-Epoxygeranion zum Cyclohexanoid **22** mit 78 % Umsatz, was einer etwa 140-fachen Verbesserung gegenüber dem Wildtyp entspricht. Ähnlich katalysierte die Ile261Ala-Mutante die Prins-Cyclisierung von (*S*)-Citronellal

Transformation	Umsatz mit WT <i>AacSHC</i> [%]	Mutante	Umsatz [%]
 <p>Geraniol</p> <p>20</p> <p>21</p>	0.40 ± 0.03	F365C	15 ± 0.72
	n.d.	G600F	68 ± 3.1
 <p>6,7-Epoxygeraniol</p> <p>22</p>	0.57 ± 0.13	Y420W	54 ± 0.42
		Y420W-G600F	78 ± 2.1
 <p>(<i>S</i>)-Citronellal</p> <p>iso-Isopulegol</p>	0.59 ± 0.03	I261A	11 ± 0.01

**Abbildung 13.** *AacSHC*-Cyclisierungsreaktionen von Substraten mit funktionellen Gruppen wie Epoxiden und Aldehyden als Initiatoren sowie Identifizierung von Enzymvarianten mit verbesserter Cyclisierungsaktivität.<sup>[59]</sup>

zu *iso*-Isopulegol mit 11 % Umsatz, einer etwa 20-fachen Verbesserung gegenüber dem Wildtyp-Enzym. Es wird interessant sein zu verfolgen, ob diese nicht-natürliche Cyclisierungsaktivität von SHC oder anderen Terpensynthasen noch mehr ausgeweitet werden kann, um auch andere Elektrophile als Initiatoren zu akzeptieren.<sup>[60]</sup>

#### 4. Neue Chancen am Horizont?

Biokatalytische Transformationen machen gegenwärtig nur ein kleines, allerdings wachsendes Segment industriell relevanter chemischer Prozesse aus. Um das Potenzial der Biokatalyse für eine nachhaltige Chemie jedoch vollständig zu nutzen, muss die Auswahl an enzymkatalysierten Transformationen um bisher nicht aus der Natur bekannte Umwandlungen erweitert werden. Die beschriebenen Beispiele verdeutlichen einen evolutiven Ansatz, der einige Merkmale des Weges nachvollzieht, auf dem die Natur neue Katalysatoren erzeugt. Wir haben das Gefühl, dass wir bislang kaum die Oberfläche der Möglichkeiten angekratzt haben, denn die Promiskuität von Aktivitäten unter den Enzymen ist weit verbreitet und kann durch Protein-Engineering und besonders durch gerichtete Evolution verbessert werden. Die chemische Intuition wird uns bei der Suche helfen.

Mehrere aktuelle Entdeckungen von neuartigen promiskiden und nicht-natürlichen Enzymaktivitäten demonstrieren das Potenzial für künftige Biokatalysator-Entwicklungen. Die folgenden Beispiele befinden sich zwar noch in frühen Stadien, sind aber dennoch wichtige Belege für das Konzept der Promiskuität und haben das Potenzial für spätere Anwen-



dungen. In Fällen, wo Wildtyp-Enzyme nicht-natürliche Reaktionen katalysieren, ist es absolut möglich, ihre Aktivität mit Protein-Engineering und gerichteter Evolution zu verstärken, ihre Selektivität abzustimmen und ihren Nutzen für die Synthese zu erhöhen.

#### 4.1. C-H-Funktionalisierung durch SyrB2-Halogenase

Ähnlich wie im Beispiel der Hydroxylase/Desaturase gibt es in der Natur die Gabelung des Reaktionspfades für Halogenierung und Hydroxylierung mit  $\text{Fe}^{\text{II}}$ - und  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen ( $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -)Enzymen. Ein  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Enzym aus dem Syringomycin-Biosyntheseweg von *Pseudomonas syringae* B301D, SyrB2, katalysiert die Halogenierung der terminalen Methylgruppe von L-Threonin, das am Trägerprotein SyrB1 hängt.<sup>[61]</sup> Dieses Enzym ist mit  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Hydroxylasen verwandt, die einen fast identischen Reaktionsmechanismus nutzen. Beide Reaktionen beginnen mit einer einleitenden Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom Substrat durch eine  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ -Oxo-Zwischenstufe und bilden ein kohlenstoffzentriertes Radikal (Abbildung 14).<sup>[62]</sup> Der nachfolgende Schritt bestimmt, welches Produkt entsteht: Eine homolytische Kupp-

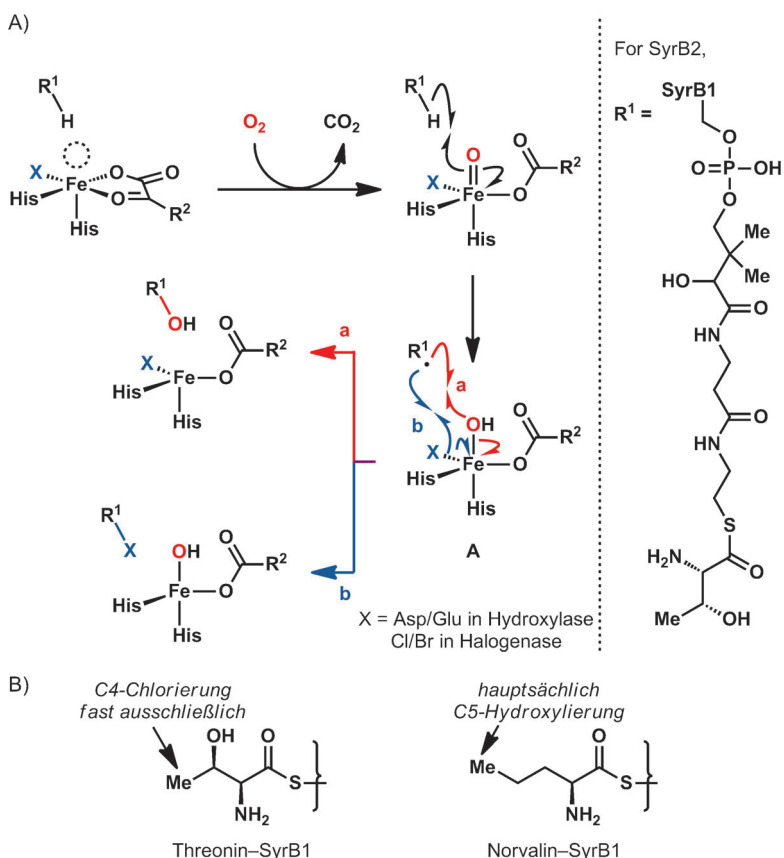
lung mit einem Hydroxo-Liganden ergibt das hydroxylierte Produkt (Weg a), während die Kupplung mit einem Halogenido-Liganden das chlorierte oder bromierte Produkt ergibt (Weg b). Ein grundlegender Unterschied zwischen den beiden Enzymen liegt in der Beteiligung eines koordinierenden Asp/Glu-Restes in  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Hydroxylasen, während diese Position in der SyrB2-Halogenase von einem nicht-koordinierenden Ala-Rest eingenommen wird. Dadurch hat das  $\text{Fe}$ -Zentrum hier eine zusätzliche Koordinationsstelle, an der sich das Halogenid-Anion befindet, das anschließend ins Produkt eingebaut wird. Wegen dieser Ähnlichkeiten in Struktur und Mechanismen schlugen Walsh et al. vor, dass sich die  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Halogenase aus der  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Hydroxylase entwickelt haben soll.<sup>[63]</sup>

Mit Threonin als Substrat bildet SyrB2 bemerkenswert selektiv 4-Chlor-L-threonin, vermutlich, weil der Hydroxylradikal-Rebound von Zwischenprodukt **A** (Abbildung 14 A) nicht mit dem Halogenradikal-Rebound konkurriert. Ersetzt man das nicht-koordinierende Ala in SyrB2 durch Glu, bildet sich ein Hydroxylase-ähnliches Metallzentrum, allerdings erwies sich die Mutante als ineffiziente Hydroxylase.<sup>[64]</sup> Mit dem Wildtyp-SyrB2-Substrat Norvalin, einer Aminosäure mit fünf Kohlenstoffatomen, entstand fast ausschließlich das

Hydroxylierungsprodukt (Abbildung 14 B). Dies deutet auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen Substrat und dem aktiven Zentrum des Proteins hin, das die Selektivität zwischen Hydroxylierung und Halogenierung bestimmt. Zur weiteren Untermauerung dieser Beobachtung wurde das koordinierende Asp in der Prolyl-4-Hydroxylase (ebenfalls ein  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Enzym) durch Ala substituiert. Die entstehende Mutante war inaktiv.<sup>[65]</sup> Trotz der angenehmen evolutionen Beziehung zwischen den beiden Enzymen funktioniert die vereinfachende Strategie, eine freie Koordinationsstelle für die Halogenidbindung zu schaffen, um aus einer Hydroxylase eine Halogenase zu machen, nur in sehr speziellen Fällen.

Es sind inzwischen viele  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Hydroxylasen entdeckt worden, die unterschiedliche Arten von Substraten umsetzen; bei manchen ist es auch nicht nötig, dass die Substrate an ein Trägerprotein gebunden sind.  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Halogenasen kommen dagegen relativ selten in der Natur vor. Eine Umwandlung von Hydroxylasen in Halogenasen würde eine schnelle Diversifizierung der von  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Enzymen gebildeten Sekundärmetaboliten ermöglichen. Zu diesen Metaboliten gehören auch wertvolle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sowie modifizierte Aminosäuren und Nucleobasen.<sup>[66]</sup>

Die Chemie von SyrB2 kann auch auf nicht-natürliche Funktionen erweitert werden. Matthews et al. zeigten kürzlich, dass Wildtyp-SyrB2 in Gegenwart von  $\text{N}_3^-$  oder  $\text{NO}_2^-$  eine radikalische Azid- oder Nitratübertragung auf Substrate (L-2-Aminobutyrat, L-Threonin und L-Norvalin), die an SyrB1 gebunden sind, in geringen Aus-



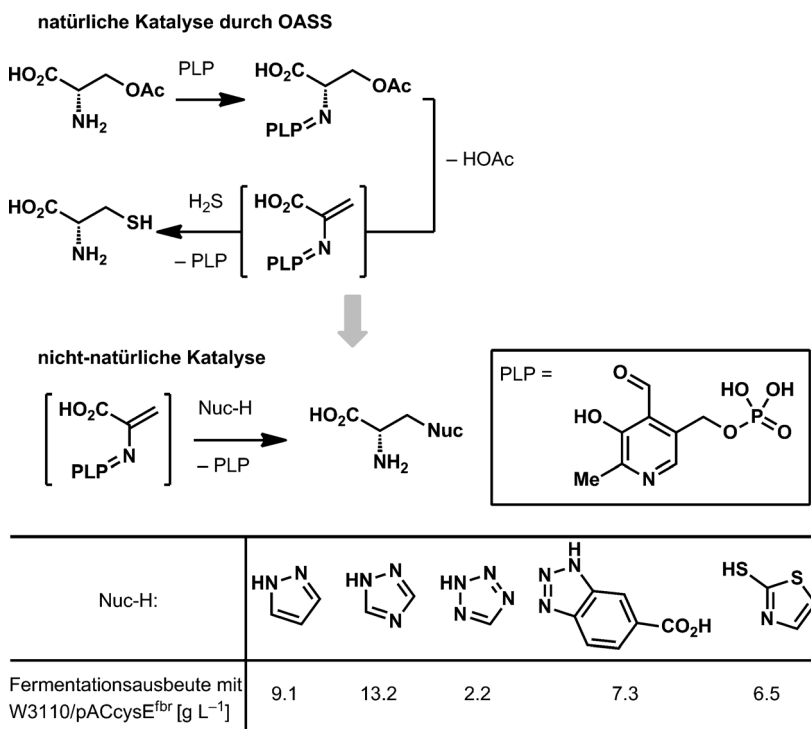
**Abbildung 14.** A) Mechanismus der  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Hydroxylase (Weg a, rot) und der  $\text{Fe}/\alpha\text{KG}$ -Halogenase (Weg b, blau); das gemeinsame reaktive Zwischenprodukt **A** kann entlang zweier Wege abreagieren, je nach den Liganden um das  $\text{Fe}$ -Zentrum.<sup>[62]</sup> B) Unterschiedliches Reaktionsprodukt SyrB2-katalysierter Reaktionen von Threonin-SyrB1 und Norvalin-SyrB1; dies ist ein Hinweis auf das komplexe Zusammenspiel zwischen Proteinfaltung und Substratpositionierung bei der Festlegung des Produktes der SyrB2-katalysierten Reaktion.

beuten und mit niedrigen Wechselzahlen katalysieren kann.<sup>[67]</sup> Diese Reaktivität erinnert an die radikalische C-N-Kupplung in der Synthesechemie, für die es angesichts von Literaturbeispielen wahrscheinlich ist, dass viele stickstoffhaltige Verbindungen (wie Azide und Nitrilsalze) wichtige Reaktionspartner in Radikalkupplungen sein können.<sup>[68]</sup> An diesem Punkt erfordert die enzymkatalysierte Reaktion allerdings eine Bindung des Substrats an ein Trägerprotein, und die Ausbeuten sind sogar unter Bedingungen für einen einzigen Reaktionsumlauf gering. Berücksichtigt man außerdem die offensichtliche Komplexität der Substratpositionierung im aktiven Zentrum, um das Ergebnis Fe/αKG-Enzym-katalysierter Reaktionen festzulegen, dürfte die Optimierung dieser neuen Nitrierungen und Azidierungen anspruchsvoll sein.

#### 4.2. Synthese nicht-natürlicher Aminosäuren mit O-Acetylserin-Sulphydrylase und Tryptophan-Synthase

Natürliche und nicht-natürliche Aminosäuren sind wichtige Bestandteile vieler aktiver pharmazeutischer Wirkstoffe (active pharmaceutical ingredients, APIs); sie machen etwa 18 % aller Bausteine in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie aus.<sup>[69]</sup> Natürliche L-Aminosäuren werden hauptsächlich durch Fermentation und Extraktion aus Rohmaterialien gewonnen. Nicht-natürliche Aminosäuren (unnatural amino acids, UAAs) dagegen werden meist chemisch synthetisiert, weil es keine Biosynthesewege gibt, um die nicht-natürlichen Seitenketten einzuführen. Es wurden viele Syntheseverfahren für die Herstellung von UAAs entwickelt, letztlich aber hängt die kommerzielle Produktion von einer asymmetrischen Hydrierung oder einer Racematspaltung ab.<sup>[70]</sup> Diese Verfahren erfordern oft den Einsatz von Schutzgruppen (die anschließend abgespalten werden müssen) und Katalysatoren, die für neue Zielverbindungen de novo entworfen werden müssen. Die Entwicklung von Biosynthesewegen für UAAs könnte die Produktion möglicherweise vereinfachen.

O-Acetylserin-Sulphydrylase (OASS; die Bezeichnung Cystein-Synthase ist ebenfalls gängig) ist ein Pyridoxalphosphat(PLP)-abhängiges Enzym, das den abschließenden Schritt der Cysteinbiosynthese katalysiert.<sup>[71]</sup> Nach der Bildung eines Aldimins aus O-Acetylserin und PLP wird die Acetatgruppe von O-Acetylserin abgespalten; es entsteht ein Aminoacrylat-Zwischenprodukt, das anschließend mit H<sub>2</sub>S zu L-Cystein reagiert (Abbildung 15). In den späten 1960er Jahren stellten Giovanelli und Mudd<sup>[72a]</sup> sowie Thompson und Moore<sup>[72b]</sup> unabhängig voneinander fest, dass diese Enzymklasse auch die Synthese von S-substituierten Cysteinderivaten katalysiert, was auf eine wenig ausgeprägte Substratspezifität der Enzyme schließen lässt. Heterocyclische, β-substituierte Alanine sind zwar selten, kommen aber natürlicher-



**Abbildung 15.** Synthese nicht-natürlich β-substituierter Alaninderivate mit Acetylserin-Sulphydrylase und Fermentationsausbeuten mit dem *E.-coli*-Stamm W3110/pACcysE<sup>fbt</sup>.<sup>[75]</sup>

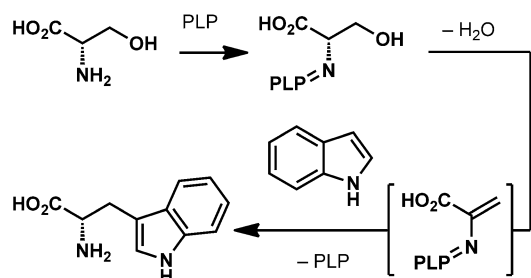
weise in Pflanzen vor.<sup>[73]</sup> Die Aufklärung der Biosynthese dieser nicht-proteinogenen Aminosäuren ergab, dass sie durch die Kondensation von O-Acetyl-L-Serin mit den entsprechenden Nucleophilen gebildet werden.

Ausgehend von der Annahme, dass dieser Syntheseweg mit der OASS eine reaktive Zwischenstufe und den Reaktionsmechanismus gemeinsam hat, zeigten Ikegami et al. in einer Reihe von Veröffentlichungen, dass die OASS von höheren Pflanzen tatsächlich die Synthesen von β-(Pyrazol-1-yl)-L-alanin, L-Quisqualinsäure, L-Mimosin und verschiedenen anderen nicht-proteinogenen Aminosäuren in niedrigen Ausbeuten katalysieren kann.<sup>[74]</sup> In einer nachfolgenden Arbeit demonstrierte Maier,<sup>[75]</sup> dass der gesamte metabolische Stoffwechselweg modifiziert werden kann, um die niedrigen Titer zu verbessern. Bislang wurde jedoch noch keine Arbeit veröffentlicht, in der die Verbesserung der UAA-Ausbeute mithilfe eines künstlichen OASS-Enzyms beschrieben ist. Röntgenstrukturen von CysK1 und CysM, beides Cysteinsynthasen, lassen auf einen Substrattunnel schließen, der wahrscheinlich als Durchgang für eintretende Nucleophile wirkt.<sup>[76]</sup> Eine Optimierung dieses Substrattunnels für Nucleophile verschiedener Größe könnte eine alternative Route bieten, um die Produktion von UAAs zu verbessern.

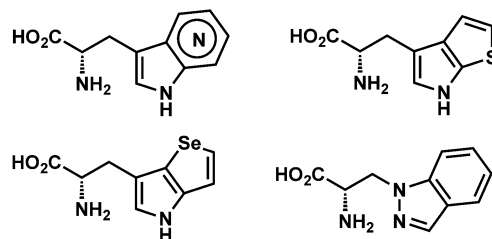
Die Tryptophan-Synthase katalysiert die Bildung von Tryptophan nach einem Mechanismus, der demjenigen der OASS stark ähnelt. In der β-Untereinheit des Enzyms folgt auf die Kondensation von Serin mit PLP eine Dehydratation zu einer Aminoacrylat-Zwischenstufe, die im Anschluss eine Konjugat-Addition mit Indol eingeht.<sup>[77]</sup> Ebenso wie die OASS enthält die Tryptophansynthase einen hydrophoben

Tunnel für Indol. Das Wildtyp-Enzym kann die Produktion verschiedener Tryptophan-Analoga katalysieren, wenn die entsprechenden heterocyclischen Nucleophile wie Thienopyrrole, Azaindole und Indazole eingesetzt werden (Abbildung 16).<sup>[78]</sup> Allerdings ist noch eine Optimierung des Enzyms

#### Katalysestrategie der Tryptophan-Synthase



#### ausgewählte Beispiele von Analoga, die mit Wildtyp-Tryptophan-Synthase hergestellt wurden



**Abbildung 16.** Mechanismus der Tryptophan-Synthase und einige repräsentative UAAs, die mit der Wildtyp-Tryptophan-Synthase hergestellt wurden.<sup>[77,78]</sup>

erforderlich, um das Verfahren praktikabel zu machen. Wie bei der OASS könnten gerichtete Evolution und Protein-Engineering dieses Enzym besser geeignet für die UAA-Herstellung machen.

## 5. Schlussfolgerungen

Während der letzten fünfzig Jahre haben Chemiker kreative präparative Lösungen gefunden, die in der Natur nicht vorkommen. Wir glauben, dass wenigstens einige dieser Reaktionen in biologische Systeme importiert werden könnten. Die Herausforderung beim Entwurf von Enzymen für nicht-natürliche chemische Reaktionen besteht darin, dass es kein anderes Enzym gibt, das den Entwicklungsprozess inspirieren oder leiten könnte; der Erfolg hängt vom Glück ab (nämlich der zufälligen Entdeckung einer interessanten promiskuen Aktivität), einem mühevollen Suchen nach Enzymen mit nicht-natürlichen Aktivitäten, oder besser, von chemischer Intuition und einem Design auf der Basis bekannter präparativer Transformationen. Der Transfer von Carbenen und Nitrenen durch modifiziertes Cytochrom P450 ist ein gutes Beispiel dafür, wie neue Enzyme mit einem Ansatz generiert werden können, der die Natur nachahmt und auf chemischen Kenntnissen beruht: Studien mit Übergangsmetallkatalysatoren und mechanistischen Ähnlichkeiten lieferten die Anregungen, die Promiskuität der natürlichen P450-

Enzyme gab einen Startpunkt und Protein-Engineering sowie gerichtete Evolution stellten die Mittel zur Verfügung, um Reaktivität und Selektivität abzustimmen. In ähnlicher Weise dienten die verschiedenen Synthesemethoden für die C-N-Kupplung (für die es keinen natürlichen Gegenpart gibt) als Motivation, um ein enzymatisches Äquivalent in der SyrB2-Halogenase zu untersuchen.

Aber kann jedem wenig aktiven Enzym chemisch oder evolutiv eine hohe Aktivität verliehen werden? Dies ist sicher nicht der Fall. Ansonsten könnten alle schwach aktiven, am Computer entworfenen Enzyme,<sup>[79]</sup> katalytischen Antikörper oder Rinderserumalbumin im Labor zu hoher Effizienz evolviert werden. Weil wir aber die Merkmale eines effizienten Gerüsts oder einer Ausgangsverbindung für das Design oder die Evolution der katalytischen Eigenschaften noch nicht vollständig verstehen,<sup>[80]</sup> halten wir es für klug, mit Enzymgerüsten zu beginnen, bei denen die Fähigkeit zur Evolution bereits nachgewiesen worden ist (d.h., sie haben sich auf natürlichem Wege zur Katalyse verschiedener Reaktionen auseinander entwickelt). Die Erfahrung lehrt, dass Enzyme wie die Cytochrome P450 oder Vertreter anderer funktionell diverser Superfamilien, die sich bereits zur Katalyse vieler verschiedener Reaktionen auseinander entwickelt haben, auch im Labor einfach weiterentwickelbar sind, zumindest, wenn die Reaktionen mechanistische Gemeinsamkeiten aufweisen.<sup>[81]</sup> Dies schließt die Evolution katalytischer Aktivitäten mit ein, zu denen es kein natürliches Pendant gibt, wie die Olefin-Cyclopropanierung mit Diazoverbindungen oder die Cyanylierung über eine Epoxid-Ringöffnung. Wenn ein bestimmtes Enzym nicht die gewünschte promiske Aktivität zeigt, kann man diese vielleicht bei anderen Enzymen aus der Familie oder sogar in nahen Verwandten finden, wie dies für die MBL-Familie<sup>[21]</sup> und die P450-Enzyme gezeigt wurde.<sup>[45]</sup>

Wir können nun einige allgemeine Richtlinien für die Entwicklung von Enzymen für nicht-natürliche Reaktionen skizzieren:

- 1) Suche für eine vorgegebene Reaktion nach den wichtigen Eigenschaften, die diese Transformation ermöglichen, z.B. ein Eisencarbenoid für die Cyclopropanierung, die säurekatalysierte Bildung des Oxoniumions in der Prins-Reaktion oder auch etwas so Einfaches wie die Gegenwart eines Michael-Akzeptors für die UAA-Synthese.
- 2) Stelle sicher, dass diese Eigenschaft oder dieses Schlüsselintermediat in einem Enzym auf der Basis bekannter Reaktivität oder mechanistischer Analogie vorkommt; z.B. sind Carbene isoelektronisch zu Oxen, dem Schlüsselintermediat der Monooxygenierung, oder die Brønsted-Säureaktivierung ist der entscheidende Schritt für viele Terpensynthese-Cyclisierungen.
- 3) Evaluieren Varianten des Enzyms oder nah verwandte Enzyme bezüglich der gewünschten promiskuen Aktivität.
- 4) Setze gerichtete Evolution ein, um die nicht-natürliche Aktivität zu verbessern oder die Selektivität abzustimmen.

Rechnergestützte Verfahren könnten diesen Entdeckungsprozess unterstützen, möglicherweise bei der Auswahl geeigneter Ausgangsenzyme.<sup>[82]</sup>



Natürlich sind Evolution und Protein-Engineering an bestehenden Enzymen nicht die einzig möglichen Ansätze, um neue Enzyme zu generieren. Es gibt gute Fortschritte bei künstlichen Metalloenzymen und dem De-novo-Entwurf von Enzymen, aber es bleiben erhebliche Hindernisse bestehen, besonders bei der Entwicklung präparativ nutzbarer Katalysatoren und solcher, die auch in Zellen aktiv sind. Daher glauben wir, dass der evolutive Ansatz, den wir hier beschrieben haben, einen wesentlichen Vorteil hat: Ausgangspunkt für ein neues Enzym ist ein vorhandenes Enzym, das funktionell in einem mikrobiellen Wirt exprimiert wird und das durch gerichtete Evolution oder wenigstens durch genetische Modifikation verbessert werden kann. Die Chance, die neue Funktion im Labor zu entwickeln und dabei einen brauchbaren Katalysator zu erhalten, steigt erheblich, wenn man von einem evolvierbaren Gerüst (einem bestehenden aktiven Zentrum) ausgeht. Der evolutive Ansatz, den wir beschrieben haben, ist auf Systeme beschränkt, für die es ein geeignetes Ausgangsenzym gibt. Steht dieses aber zur Verfügung, kann der Fortschritt zu nutzbaren Katalysatoren sehr schnell vonstatten gehen.<sup>[33,47]</sup> Die Entwicklungen auf dem Gebiet der künstlichen Metalloenzyme und des De-novo-Enzymdesigns sind ausgezeichnet in den Übersichtsartikeln in Lit. [83,84] beschrieben.

Mit den Fortschritten in mechanistischer Enzymologie verstehen wir die chemische Basis der Enzymkatalyse mittlerweile besser. Dies wird uns helfen, Mechanismen und Zwischenstufen auszuwählen, um Enzyme für die nicht-natürliche Katalyse zu „kapern“. Auch Protein-Engineering und Enzymevolution entwickeln sich schnell weiter. Mit diesen Hilfsmitteln in Händen sehen wir interessanten Zeiten entgegen, in denen wir die Lücke zwischen dem chemischen Repertoire der Natur und der Welt der Synthese überbrücken werden.

*Unsere Forschung wird gefördert vom Department of the Navy, Office of Naval Research (grant N00014-11-10205), dem Jacobs Institute for Molecular Engineering for Medicine at Caltech, der Gordon and Betty Moore Foundation (Grant GBMF2809 an die Caltech Programmable Molecular Technology Initiative) und der National Science Foundation, Office of Chemical, Bioengineering, Environmental and Transport Systems SusChEM Initiative (grant CBET-1403077). Z.J.W. erhielt ein Ruth L. Kirschstein-Stipendium von den National Institutes of Health (F32EB015846). Wir danken Prof. Dan S. Tawfik, Prof. Bernhard Hauer, Dr. John A. McIntosh, Dr. Andrew R. Buller, Dr. Sheel C. Dodani und Dr. Christopher K. Prior für ihre hilfreichen Vorschläge und Diskussionen. Der Inhalt dieser Veröffentlichung liegt allein in der Verantwortung der Autoren und gibt nicht die offizielle Meinung der fördernden Institutionen wieder.*

Eingegangen am 25. September 2014  
Online veröffentlicht am 3. Februar 2015

Übersetzt von Dr. Burkard Neuss, Jülich

- [1] a) J. C. Moore, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 458–467; b) Z. Shao, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 513–

- 518; c) F. H. Arnold, *Chem. Eng. Sci.* **1996**, *51*, 5091–5102; d) F. H. Arnold, J. C. Moore, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, *58*, 1–14; e) M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; f) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496.
- [2] 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) 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; c) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194; d) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177–3180; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3309–3312; e) N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567–573.
- [3] R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713–724.
- [4] a) E. J. Steen, Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S. B. del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature* **2010**, *463*, 559–562; b) P. P. Peralta-Yahya, F. Zhang, S. B. del Cardayre, J. D. Keasling, *Nature* **2012**, *488*, 320–328; c) S. Atsumi, T. Hanai, J. C. Liao, *Nature* **2008**, *451*, 86–89; d) S. Y. Lee, J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim, K. S. Jung, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *101*, 209–228.
- [5] R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409–425.
- [6] a) P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91–R105; b) S. D. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265–272.
- [7] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471–505.
- [8] D. S. Tawfik, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 692–696.
- [9] J. L. Seffernick, L. P. Wackett, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12747–12753.
- [10] A. M. Cook, H. Grossenbacher, R. Hutter, *Experientia* **1983**, *39*, 1191–1198.
- [11] J. L. Seffernick, M. L. De Souza, M. J. Sadowsky, L. P. Wackett, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2405–2410.
- [12] N. Udiković-Kolić, C. Scott, F. Martin-Laurent, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1175–1189.
- [13] a) C. Scott, C. J. Jackson, C. W. Coppin, R. G. Mourant, M. E. Hilton, T. D. Sutherland, R. J. Russell, J. G. Oakeshott, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2184–2191; > b) S. Noor, M. C. Taylor, R. J. Russell, L. S. Jermini, C. J. Jackson, J. G. Oakeshott, C. Scott, *PLoS One* **2012**, *7*, e39822.
- [14] A. E. Todd, C. A. Orengo, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 1113–1143.
- [15] C. M. Serdar, D. T. Gibson, D. M. Munneke, J. H. Lancaster, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *44*, 246–249.
- [16] C. M. Seibert, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6383–6391.
- [17] L. Afriat, C. Roodveldt, G. Manco, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2006**, *45*, 13677–13686.
- [18] M. B. Miller, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 165–199.
- [19] M. M. Meier, C. Rajendran, C. Malisi, N. G. Fox, C. Xu, S. Schlee, D. P. Barondeau, B. Höcker, R. Sterner, F. M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11670–11677.
- [20] L. Afriat-Jurnou, C. J. Jackson, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6047–6055.
- [21] F. Baier, N. Tokuriki, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2442–2456.
- [22] a) P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, *Adv. Protein Chem.* **2001**, *55*, 1–28; b) J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 10–18.
- [23] M. Elias, D. S. Tawfik, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 11–20.
- [24] H.-S. Park, S.-H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, H.-S. Kim, *Science* **2006**, *311*, 535–538.
- [25] J. Shanklin, J. E. Guy, G. Mishra, Y. Lindqvist, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18559–18563.

- [26] P. Broun, J. Shanklin, E. Whittle, C. Somerville, *Science* **1998**, 282, 1315–1317.
- [27] J. A. Broadwater, E. Whittle, J. Shanklin, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 15613–15620.
- [28] M. Ben-David, M. Elias, J. J. Filippi, E. Duñach, I. Silman, J. L. Sussman, D. S. Tawfik, *J. Mol. Biol.* **2012**, 418, 181–196.
- [29] M. L. De Souza, M. J. Sadowsky, L. P. Wackett, *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 4894–4900.
- [30] J. E. T. Van Hylckama Vlieg, L. Tang, J. H. L. Spelberg, T. Smilda, G. J. Poelarends, T. Bosma, A. E. J. van Merode, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 5058–5066.
- [31] a) R. M. de Jong, J. J. W. Tiesinga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, *EMBO J.* **2003**, 22, 4933–4944; b) R. M. de Jong, J. J. W. Tiesinga, A. Villa, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13338–13343.
- [32] a) J. H. L. Spelberg, J. E. T. van Hylckama Vlieg, L. Tang, D. B. Janssen, R. M. Kellogg, *Org. Lett.* **2001**, 3, 41–43; b) G. Hasnaoui-Dijoux, M. M. Elenkov, J. H. L. Spelberg, B. Hauer, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1048–1051.
- [33] 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.
- [34] a) R. J. Fox, *J. Theor. Biol.* **2005**, 234, 187–199; b) R. J. Fox, *Protein Eng.* **2003**, 16, 589–597.
- [35] M. Jahn, J. Marles, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 352–354; *Angew. Chem.* **2003**, 115, 366–368.
- [36] Z. J. Witczak, *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 165–178.
- [37] a) G. Vic, D. H. G. Crout, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 2513–2516; b) J. B. Kempton, S. G. Withers, *Biochemistry* **1992**, 31, 9961–9969.
- [38] D. E. Koshland, *Biol. Rev.* **1953**, 28, 416–436.
- [39] J. Müllegger, M. Jahn, H.-M. Chen, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, 18, 33–40.
- [40] a) J. L. Maxwell, K. C. Brown, D. W. Bartley, T. Kodadek, *Science* **1992**, 256, 1544–1547; b) J. R. Wolf, C. G. Hamaker, J.-P. Djukic, T. Kodadek, L. K. Woo, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9194–9199.
- [41] a) Y. Li, J.-S. Huang, Z.-Y. Zhou, C.-M. Che, X.-Z. You, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13185–13193; b) Z. Guo, X. Guan, J.-S. Huang, W.-M. Tsui, Z. Lin, C.-M. Che, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 11320–11331.
- [42] R. Breslow, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6728–6729.
- [43] E. W. Svastits, J. H. Dawson, R. Breslow, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6427–6428.
- [44] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, 339, 307–310.
- [45] T. Heel, J. A. McIntosh, S. C. Dodani, J. T. Meyerowitz, F. H. Arnold, *ChemBioChem* **2014**, 15, 2556–2562.
- [46] P. S. Coelho, Z. J. Wang, M. E. Ener, S. A. Baril, A. Kannan, F. H. Arnold, E. M. Brustad, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 485–487.
- [47] Z. J. Wang, H. Renata, N. E. Peck, C. C. Farwell, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6810–6813; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 6928–6931.
- [48] H. Renata, Z. J. Wang, R. Z. Kitto, F. H. Arnold, *Catal. Sci. Technol.* **2014**, 4, 3640–3643.
- [49] Z. J. Wang, N. E. Peck, H. Renata, F. H. Arnold, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 598–601.
- [50] a) J. A. McIntosh, P. S. Coelho, C. C. Farwell, Z. J. Wang, J. C. Lewis, T. R. Brown, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9309–9312; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 9479–9482; b) C. C. Farwell, J. A. McIntosh, T. K. Hyster, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8766–8771; c) T. K. Hyster, C. C. Farwell, A. R. Buller, J. A. McIntosh, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 15505–15508.
- [51] a) R. Singh, M. Bordeaux, R. Fasan, *ACS Catal.* **2014**, 4, 546–552; b) M. Bordeaux, R. Singh, R. Fasan, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 5697–5704.
- [52] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, M. Seitz, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 293–300.
- [53] a) K.-U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, C. Feil, K. Poralla, *Protein Sci.* **1997**, 6, 722–724; b) K. U. Wendt, *Science* **1997**, 277, 1811–1815.
- [54] S. Neumann, H. Simon, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1986**, 367, 723–730.
- [55] a) M. Seitz, P.-O. Syren, L. Steiner, J. Klebensberger, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2013**, 14, 436–439; b) M. Seitz, J. Klebensberger, S. Siebenhaller, M. Breuer, G. Siedenburg, D. Jendrossek, B. Hauer, *J. Mol. Catal. B* **2012**, 84, 72–77.
- [56] Y. Yonemura, T. Ohyama, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 440–446.
- [57] G. Siedenburg, D. Jendrossek, M. Breuer, B. Juhl, J. Pleiss, M. Seitz, J. Klebensberger, B. Hauer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 1055–1062.
- [58] G. Siedenburg, M. Breuer, D. Jendrossek, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 1571–1580.
- [59] S. C. Hammer, A. Marjanovic, J. M. Dominicus, B. M. Nestl, B. Hauer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, DOI: 10.1038/nchembio.1719.
- [60] a) W. S. Johnson, R. B. Kinnel, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3861–3862; b) J. A. Bender, A. E. Blize, C. C. Browder, S. Giese, F. G. West, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2430–2431; c) R. R. Knowles, S. Lin, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5030–5032; d) W.-W. Qiu, K. Surendra, L. Yin, E. J. Corey, *Org. Lett.* **2011**, 13, 5893–5895; e) M. A. Schafroth, D. Sarlah, S. Krautwald, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20276–20278.
- [61] F. H. Vaillancourt, J. Yin, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 10111–10116.
- [62] S. D. Wong, M. Srnc, M. L. Matthews, L. V. Liu, Y. Kwak, K. Park, C. B. Bell III, E. E. Alp, J. Zhao, Y. Yoda, S. Kitao, M. Seto, C. Krebs, J. M. Bollinger, E. I. Solomon, *Nature* **2013**, 499, 320–323.
- [63] F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3364–3378.
- [64] M. L. Matthews, C. S. Neumann, L. A. Miles, T. L. Grove, S. J. Booker, C. Krebs, C. T. Walsh, J. M. Bollinger, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 17723–17728.
- [65] K. L. Gorres, K. H. Pua, R. T. Raines, *PLoS One* **2009**, 4, e7635.
- [66] M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, Jr., *Chem. Rev.* **2004**, 104, 939–986.
- [67] M. L. Matthews, W.-C. Chang, A. P. Layne, L. A. Miles, C. Krebs, J. M. Bollinger, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 209–215.
- [68] a) E. K. Leggans, T. J. Barker, K. K. Duncan, D. L. Boger, *Org. Lett.* **2012**, 14, 1428–1431; b) J. Waser, H. Nambu, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8294–8295.
- [69] C. Boswell, *Chem. Market Reporter* June 14 (1999), S. 9–11.
- [70] K. Drauz, *Chimia* **1997**, 51, 310–314.
- [71] C.-H. Tai, P. F. Cook, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 49–59.
- [72] a) J. Giovanelli, S. H. Mudd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 31, 275–280; b) J. F. Thompson, D. P. Moore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 31, 281–285.
- [73] F. Ikegami, I. Murakoshi, *Phytochemistry* **1994**, 35, 1089–1104.
- [74] a) I. Murakoshi, M. Kaneko, C. Koide, F. Ikegami, *Phytochemistry* **1986**, 25, 2759–2763; b) F. Ikegami, M. Mizuno, M. Kihara, I. Murakoshi, *Phytochemistry* **1990**, 29, 3461–3465; c) I. Murakoshi, F. Ikegami, M. Kaneko, *Phytochemistry* **1985**, 24, 1907–1911.
- [75] T. H. P. Maier, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 422–427.
- [76] a) R. Schnell, W. Oehlmann, M. Singh, G. Schneider, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 23473–23481; b) M. T. Claus, G. E. Zocher, T. H. P. Maier, G. E. Schulz, *Biochemistry* **2005**, 44, 8620–8626.

- [77] M. F. Dunn, D. Niks, H. Ngo, T. R. M. Barends, I. Schlichting, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, 33, 254–264.
- [78] R. S. Phillips, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 2787–2792.
- [79] a) L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Rothlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas III, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2008**, 319, 1387–1391; b) E. A. Althoff, L. Wang, L. Jiang, L. Giger, J. K. Lassila, Z. Wang, M. Smith, S. Hari, P. Kast, D. Herschlag, D. Hilvert, D. Baker, *Protein Sci.* **2012**, 21, 717–726; c) G. Kiss, N. Çelebi-Ölçüm, R. Moretti, K. N. Houk, D. Baker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5700–5725; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5810–5836.
- [80] D. Baker, *Protein Sci.* **2010**, 19, 1817–1819.
- [81] J. A. McIntosh, C. C. Farwell, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 126–134.
- [82] S. Chakraborty, B. J. Rao, *PLoS One* **2012**, 7, e32011.
- [83] a) M. Dürrenberger, T. R. Ward, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 99–106; b) J. Bos, G. Roelfes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 135–143.
- [84] H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 221–228.