

Künstliche Metalloenzyme

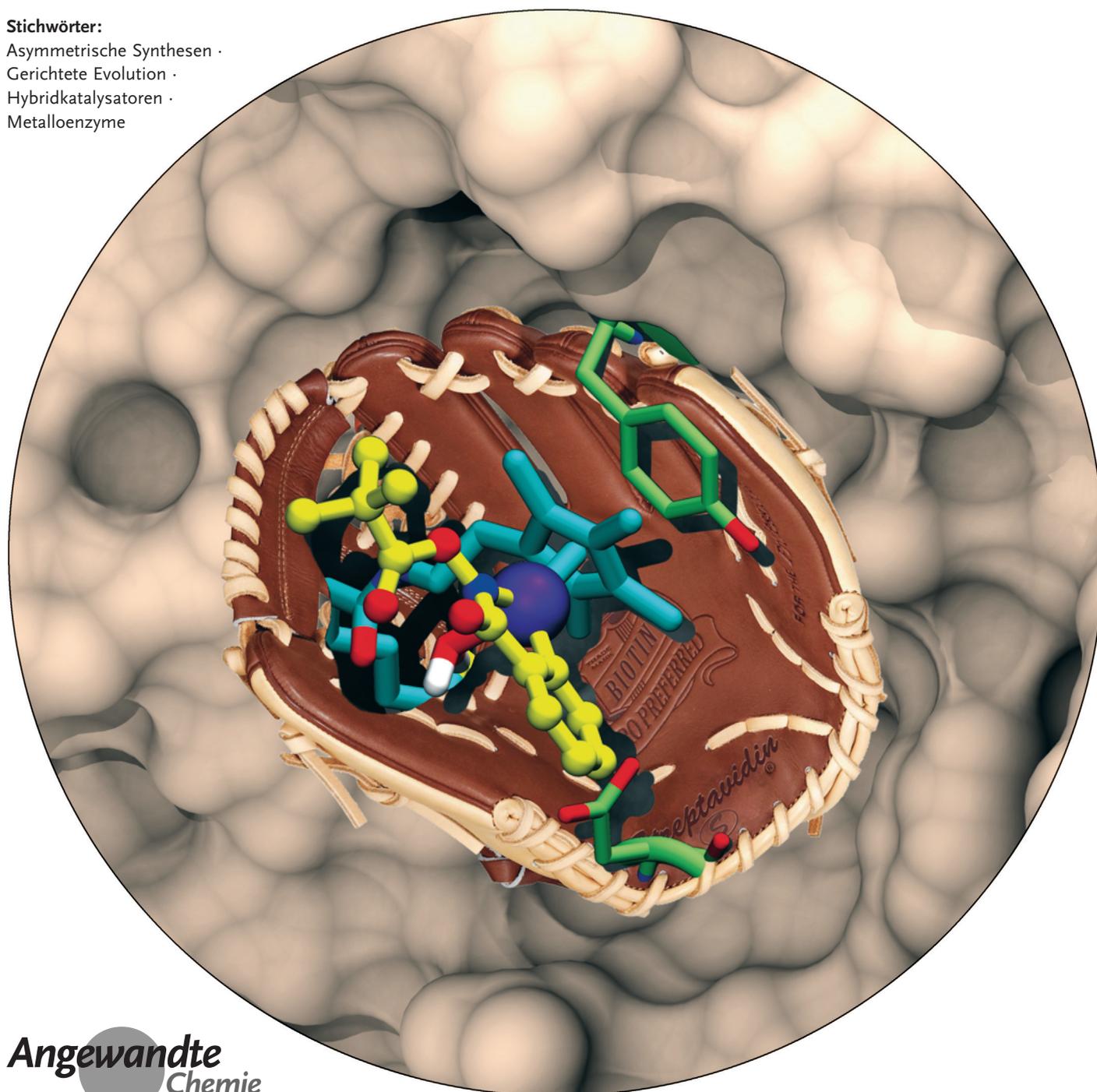
Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201508816
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201508816

Genetische Optimierung von Metalloenzymen: Weiterentwicklung von Enzymen für nichtnatürliche Reaktionen

Todd K. Hyster* und Thomas R. Ward*

Stichwörter:

Asymmetrische Synthesen ·
Gerichtete Evolution ·
Hybridkatalysatoren ·
Metalloenzyme



In der letzten Dekade fanden künstliche Metalloenzyme einige Aufmerksamkeit als eine mögliche Lösung für ungeklärte Probleme der organischen Synthesechemie. Während gängige Übergangsmetallkatalysatoren meist nur die erste Koordinationssphäre nutzen, um Reaktivität und Selektivität zu kontrollieren, können künstliche Metalloenzyme sowohl die erste als auch die zweite Koordinationssphäre modulieren. Dieser Unterschied manifestiert sich in den teilweise einzigartigen Reaktivitätsprofilen künstlicher Metalloenzyme. Dieser Aufsatz fasst die Versuche zusammen, die zweite Koordinationssphäre künstlicher Metalloenzyme durch genetische Modifizierungen der Proteinsequenz anzupassen. Es werden erfolgreiche Versuche und kreative Wege zur Überwindung aufgetretener Schwierigkeiten hervorgehoben.

1. Einleitung

Die Biokatalyse hat sich von einem Forschungsbereich, der die natürlichen katalytischen Eigenschaften von Enzymen beobachtet, zu einem Bereich entwickelt, der die Reaktivität existierender Enzyme erweitert und gänzlich neue Enzyme mit bisher aus der Natur unbekannter Reaktivität zur Verfügung stellt.^[1] Diese Entwicklung wurde wesentlich durch Fortschritte in der Molekularbiologie sowie bei systematischen Methoden zur Veränderung von Proteineigenschaften durch iterative Zyklen genetischer Modifizierung (d. h. gerichtete Evolution) angeregt.^[2,3] Ursprünglich sollten durch gerichtete Evolution eine Erweiterung der Lösungsmitteltoleranz, Erhöhung der Temperaturstabilität, Vergrößerung der Substratbreite und Steigerung der Reaktionsselektivität (Enantio-, Diastereo-, Regio- und Chemo-selektivität) erreicht werden.^[3] Die über gerichtete Evolution zugänglichen Katalysatoren ermöglichen Synthesemethoden mit höherer Effizienz gegenüber derjenigen von niedermolekularen Katalysatoren.^[4] Eine Haupteinschränkung für die weitergehende Einführung biokatalytischer Prozesse ist die Bandbreite an damit zugänglichen Reaktionen.

Die begrenzte Reaktionsbandbreite stand in der letzten Dekade im Mittelpunkt intensiver Forschungsarbeiten.^[5] Das Streben nach katalytischer Promiskuität in der Biokatalyse hat sich weitgehend auf die Suche nach neuen Reaktionen konzentriert, deren Mechanismen über Zwischenstufen verlaufen, die denen der natürlichen Reaktion ähneln. Am besten zeigt sich dies in der Literatur zu Lipasen, in der gewöhnliche Hydrolasen als effektive Katalysatoren für Aldol-, Michael- sowie Mannich-Reaktionen und viele andere etabliert werden.^[6] Nach der Entdeckung neuer Reaktivität kann die promiskuitive Funktion durch umfangreiches Protein-Engineering weiter optimiert werden.^[2d,7] Ungeachtet seiner Effektivität ist dieser Ansatz auf Reaktionen beschränkt, die mechanistische Ähnlichkeiten mit natürlichen Reaktionen aufweisen. Folglich ist eine große Zahl nichtnatürlicher Reaktionen mit dieser Methode unzugänglich. Dies gilt besonders für die Fülle an Übergangsmetall-katalysierten Reaktionen. Ein Ansatz, um diese Reaktionen zu erfassen, sieht vor, ein Übergangsmetall – in Form künstlicher oder natür-

licher Metalloenzyme – im aktiven Zentrum eines Proteins zu platzieren und danach dessen Fähigkeit zur Katalyse von Reaktionen zu erforschen, die vom Metallcofaktor eigenständig katalysiert werden können.

Ein frühes Beispiel hierfür war die Bildung künstlicher Metalloenzyme, bei denen ein katalytisch aktives Übergangsmetall selektiv in ein Proteingerüst eingebaut wird. Mitte der 1970er Jahre zeigten die Gruppen von Kaiser und Whitesides, dass solche Hybridkatalysatoren gebildet werden können und katalytische Aktivität für Oxidations- und Reduktionsreaktionen aufweisen.^[8,9] Seit diesen grundlegenden Arbeiten haben sich die Studien größtenteils darauf konzentriert, verschiedene Übergangsmetallkomplexe selektiv über koordinative, kovalente oder supramolekulare Verankerung in vielfältige Proteingerüste einzuführen, während die katalytische Aktivität des Metalls erhalten bleibt oder gar verbessert wird.^[10] Ein komplementärer Ansatz nutzt Proteine mit natürlicher Affinität zu einem Cofaktor, der in Abwesenheit des Proteingerüsts nichtnatürliche Reaktionen katalysieren kann. Beide Ansätze bilden nur den ersten Schritt bei der Entwicklung von Metalloenzymkatalysatoren, die nichtnatürliche Reaktionen katalysieren können. Um eine Hybridverbindung zu generieren, die sowohl von der Protein- als auch von der Übergangsmetallkomponente profitiert, muss der Proteinteil für die gewünschten Merkmale gentechnisch hergestellt werden. Während die genetische Modifizierung natürlicher Enzyme im akademischen und industriellen Bereich routinemäßig angewendet wird, gilt dies nicht für künstliche Metalloenzyme.^[11] Die vielleicht größte Herausforderung hinsichtlich der gerichteten Evolution künstlicher Metalloenzyme besteht darin, die katalytische Effizienz des Cofaktors in Gegenwart ungereinigter Protein-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7469
2. Natürliche Metalloenzyme, die nichtnatürliche Reaktionen katalysieren	7470
3. Supramolekulare Kupplung	7474
4. Kovalente Verankerung	7478
5. Künstliche Hydrolasen	7479
6. Ausblick	7480

[*] Prof. T. K. Hyster
Department of Chemistry, Princeton University
Princeton, NJ 08544 (USA)
E-Mail: thyster@princeton.edu
Prof. T. R. Ward
Departement Chemie, Universität Basel
Spitalstrasse 51, CH-4056 Basel (Schweiz)
E-Mail: thomas.ward@unibas.ch

proben aufrechtzuerhalten.^[12] Tatsächlich werden viele metallorganische Cofaktoren in Gegenwart zellulärer Extrakte (z.B. DNA, Proteine, Metabolite, Lipide) inhibiert. Dies macht die Verwendung gereinigter Proteinproben zur Optimierung künstlicher Metalloenzyme unabdingbar, was wiederum die Anzahl an Proben limitiert, die gesichtet werden können, da die parallele Proteinreinigung zeitaufwendig ist.

Der vorliegende Aufsatz fasst die Bestrebungen zur genetischen Optimierung künstlicher Metalloenzyme hinsichtlich ihrer katalytischen Reaktivität und Selektivität zusammen. Genetische Modifizierungen von Proteingerüsten zur Kupplung mit einem Übergangsmetall (d.h. Biokonjugation) wurden kürzlich zusammengefasst und werden hier nicht weiter diskutiert.^[10] Unser Anliegen ist, breit anwendbare Strategien zur gentechnischen Herstellung von Metalloenzymen aufzuzeigen. Letztlich sollten diese auf andere Metalloenzymtypen übertragbar sein, um so das Feld von der reinen Suche nach effektiven Hybridkatalysatoren hin zur Nutzung dieser Systeme für die Lösung von Problemen zu erweitern, die derzeit weder mit niedermolekularen Katalysatoren noch mit Enzymen zu bewältigen sind. Zwei komplementäre Strategien werden hier behandelt: 1) das Umfunktionieren natürlicher Metalloenzyme für nichtnatürliche Reaktionen (Abschnitte 2 und 6) sowie 2) das Einführen eines abiotischen Cofaktors in ein Proteingerüst, um künstliche Metalloenzyme herzustellen (Abschnitte 3–5). Künstliche Metalloenzyme aus chemisch (d.h. durch Festphasensynthese) synthetisierten Wirtproteinen/-peptiden wurden kürzlich besprochen und werden hier nicht vorgestellt.^[10] Der Fokus dieses Aufsatzes liegt auf den gentechnischen Strategien zur Optimierung der Leistungsfähigkeit (künstlicher) Metalloenzyme.

2. Natürliche Metalloenzyme, die nichtnatürliche Reaktionen katalysieren

2.1. Cytochrom-P450-Enzyme

Cytochrom-P450-Proteine sind weit verbreitete und leistungsstarke Enzyme, die Olefine, Heteroatome und inerte C-H-Bindungen mit molekularem Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel oxidieren.^[13] Wesentlich für diese Reaktivität ist der Eisenporphyrin-Häm-Cofaktor. Außer der Oxygenierung katalysieren Eisenporphyrine auch die Cyclopropanierung von Alkenen mit Diazoestern.^[14]

Arnold untersuchte die Fähigkeit von Cytochrom-P450-Enzymen, Carben-transferreaktionen zu katalysieren.^[15] In einer bahnbrechenden Arbeit wurde P450_{BM3} als effektiver Katalysator zur Cyclopropanierung von Styrolen mit Ethyldiazoacetat (EDA) als Carbenquelle unter anaeroben Bedingungen beschrieben, der ein Produkt mit geringem Umsatz und niedriger Selektivität (TTN 5; TTN = total turnover number, Gesamtwechsellzahl) lieferte.^[16] Eine einzelne Mutation des konservierten distalen Threonins (T268), das bei der natürlichen Reaktivität vermutlich den Protonentransfer erleichtert, zu Alanin (P450_{BM3}-T268A) ermöglichte die *trans*-selektive Cyclopropanierung mit hoher Ausbeute und Enantioselektivität (Abbildung 1, oben). Ausgehend von einer Variante, die

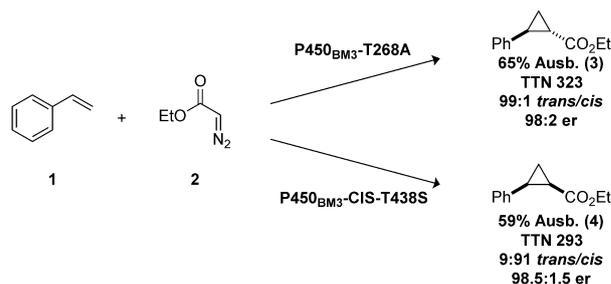


Abbildung 1. Umfunktionieren von Cytochrom P450 zu einer künstlichen Cyclopropanase unter anaeroben Bedingungen. Die katalytische Leistung wird durch genetische Modifizierung der zweiten Koordinationssphäre des Hämcofaktors verbessert. Während die *trans*-Selektivität eine Punktmutation benötigt (oben), enthält die *cis*-Cyclopropanase 15 Mutationen gegenüber WT-P450_{BM3} (unten). P450_{BM3}-CIS-T438S = V78A, F87V, P142S, T175I, A184V, S226R, H236Q, E252G, T268A, A290V, L353V, I366V, T438S, E442K.

14 Mutationen des Wildtyps (WT) enthielt (P450_{BM3}-CIS), wurde bevorzugt das *cis*-Diastereomer mit mäßiger Ausbeute und Diastereoselektivität, aber exzellenter Enantioselektivität erhalten. Die Einführung von Serin an Position T438 (P450_{BM3}-CIS-T438S) verbesserte das Diastereomerenverhältnis auf > 9:1 sowie die Enantioselektivität und die Ausbeute (Abbildung 1, unten). Eine kleine Bibliothek strukturell verschiedener P450_{BM3}-Mutanten ermöglichte die selektive Cyclopropanierung einer Vielfalt von Styrolen. Diese Bibliothek erwies sich auch als effektiv für die Insertion von Carbenen in N-H-Bindungen.^[17] Erste mechanistische Studi-



Todd K. Hyster erhielt seinen B.S. 2008 von der University of Minnesota. Sein Masterstudium absolvierte er an der Colorado State University unter Anleitung von Prof. Tomislav Rovis. Während seines Studiums verbrachte er einige Zeit als Marie Curie Fellow in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas R. Ward an der Universität Basel. Nach seiner Promotion 2013 trat er der Arbeitsgruppe von Prof. Frances H. Arnold am California Institute of Technology als NIH Postdoc bei. 2015 begann er seine unabhängige Karriere an der Princeton University.



Thomas R. Ward promovierte an der ETH Zürich (bei L. M. Venanzi, 1991). Nach zwei Postdoktoraten (bei R. Hoffmann, Cornell Univ., und C. Floriani, Univ. Lausanne) begann er 1993 seine unabhängige Karriere an der Universität Bern als Stipendiat im Rahmen einer Alfred Werner Assistant Professorship. Er war Professor an der Universität Neuchâtel (2000–2008), bevor er an die Universität Basel wechselte. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die Bildung und Optimierung künstlicher Metalloenzyme durch Verankerung abiotischer Cofaktoren in Wirtproteinen.

en lassen vermuten, dass Fe^{II} der Ruhezustand des Hämcofaktors ist. Diese Eigenschaft bedeutet eine Herausforderung, wenn versucht wird, das Häm unter physiologischen Bedingungen von Fe^{III} zu Fe^{II} zu reduzieren, da Cytochrom-P450-Enzyme einen komplizierten Gating-Mechanismus aufweisen, um in Abwesenheit von Substrat einen Elektronentransfer zu verhindern. Angesichts der geringen Affinität der Substrate zum aktiven Zentrum des Proteins ist die gewünschte Konformationsänderung unmöglich.

Um diese Reduktion zu ermöglichen, untersuchten Arnold et al. den Einfluss der Hämbindung auf das Redoxpotential des Hämcofaktors.^[18] Bemerkenswerterweise wird durch Mutation des Cysteins zum isosteren Serin das Redoxpotential von -430 mV ($E^{\circ}\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}_{\text{Cys}}$) zu -293 mV ($E^{\circ}\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}_{\text{Ser}}$) verschoben. Die entstandene $\text{P450}_{\text{BM3}}\text{-C400S}$ -Variante, als P411_{BM3} bezeichnet (nach der Verschiebung der diagnostischen CO-Soret-Bande), weist ein für das biologische Reduktionsmittel NADPH ausreichendes Redoxpotential ($E^{\circ}_1 = -320\text{ mV}$) auf. Weiterhin zeigt P411_{BM3} eine schwache Oxygenaseaktivität und verhindert somit die ungewünschte Bildung von Styroxiden. Die Effizienz, mit der P411_{BM3} die erwünschte Umwandlung katalysiert, ist etwa viermal höher als die von P450_{BM3} (Abbildung 2, oben). Bei hohen Substratkonzentrationen bewirkte der beste Katalysator ($\text{P411}_{\text{BM3}}\text{-CIS-T438S}$) die *cis*-selektive Cyclopropanierung mit $\text{TTN} > 67000$ und mit nahezu der gleichen Selektivität, wie sie mit der $\text{P450}_{\text{BM3}}\text{-CIS-T438S}$ -Variante (90:10 d.r., 99% *ee*) erreicht wurde. Kristallographische Daten lassen vermuten, dass die Mutation des axialen Cysteins zu Serin keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtfaltung des Proteins ausübt (0.52 Å r.m.s.-Abweichung von P450_{BM3} ; r.m.s. = quadratischer Mittelwert). Die Einführung der entscheidenden axialen Serinmutation in andere P450-Gerüste liefert Katalysatoren, welche die Cyclopropanierung wirksamer katalysieren als das ursprüngliche Metalloenzym.^[19]

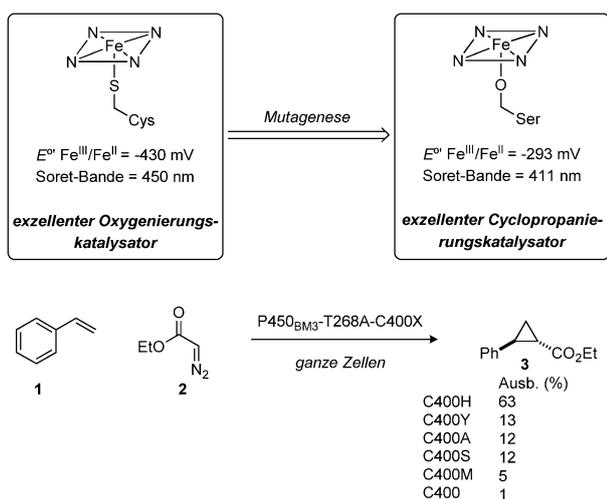


Abbildung 2. Oben: Mutation des axialen Cysteins C400 zu Serin beeinflusst das Redoxpotential des Hämrestes beträchtlich und verschiebt die Soret-Bande von 450 nach 411 nm. Das umfunktionierte Cytochrom P411 hat seine Monooxygenase- komplett zugunsten einer Cyclopropanierungsaktivität verloren. Unten: Aktivität verschiedener axialer Liganden für die Styrol-Cyclopropanierung.

Die axiale Mutation wurde auf Reste erweitert, die nicht zu Cystein isoster sind.^[20,21] Dieser geringe Screening-Aufwand führte zur Identifizierung von Histidin (d.h. T268A-C400H) für das effizienteste künstliche Metalloenzym zur Cyclopropanierung von Styrol mit EDA (Abbildung 2, unten).^[70] Diese entwickelte Variante wurde in der formalen Synthese von Levomilnacipran angewendet, bei der T268A-C400H die Cyclopropanvorstufe mit exzellenter Ausbeute und Diastereoselektivität, aber mäßiger Enantioselektivität lieferte. Nach drei Durchgängen einer ortsgerichteten Sättigungsmutagenese, die auf Reste innerhalb des aktiven Zentrums im Protein gerichtet war, wurde eine Variante (T268A-C400H-T438W-V78M-L181V, genannt Hstar) identifiziert, die selbst unter aeroben Bedingungen die Cyclopropanvorstufe von Levomilnacipran in hoher Ausbeute und mit exzellenter Enantioselektivität ergab (Abbildung 3). Erfreulicherweise, und im Unterschied zu vielen Biokatalysatoren, ist Hstar ein recht allgemeiner Katalysator, der für eine Reihe substituierter Acrylamide hohe Ausbeuten und Selektivitäten liefert.^[22]

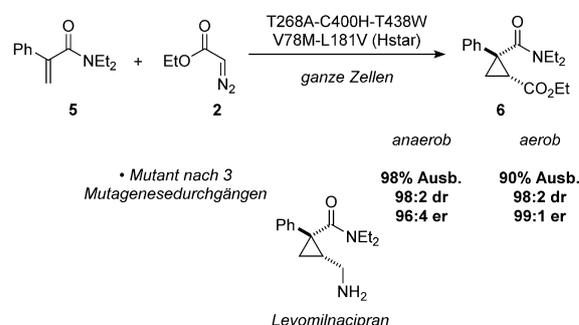


Abbildung 3. Gerichtete Evolution der künstlichen Cyclopropanase Hstar zur Synthese einer Vorstufe von Levomilnacipran.

Das P411-Gerüst ist auch bei Nitrentferreaktionen leistungsfähig. Arnold et al. stellten fest, dass $\text{P411}_{\text{BM3}}\text{-T268A}$ die C-H-Aminierung von 1,3,5-Triethylbenzolsulfonylazid (**7**) in Benzylposition ermöglichte, wenn auch in mäßiger Ausbeute.^[23] P450_{BM3} -basierte Katalysatoren erwiesen sich bei diesem Reaktionstyp – im Unterschied zum Carbentransfer – als ineffizient. Die Veränderung des Proteingerüsts zu einer Variante mit 15 zusätzlichen Mutationen von WT- P450_{BM3} ($\text{P411}_{\text{BM3}}\text{-CIS-T438S}$) erhöhte die Ausbeute auf etwa 70% ($\text{TTN} 430$) mit exzellenter Enantioselektivität (87% *ee*; Abbildung 4) in Ganzzellen. Bei Nitrentferreaktionen im aktiven Zentrum des Proteins ist die Architektur des aktiven Zentrums entscheidend. Arnold et al. beschrieben, dass **7** trotz der geringeren Bindungsdissoziationsenergien der späteren Substrate (85 gegenüber 83 kcal mol^{-1}) effektiver ist als Triisopropylbenzolsulfonylazid (**9**). Fasan et al. beobachteten in späteren Arbeiten mit anderen P450-Varianten ($\text{P450}_{\text{BM3}}\text{-FL\#62}$) den entgegengesetzten Trend: Hier war **9** effektiver als **7** (Abbildung 4).^[24] Mögliche Erklärungen für diesen Unterschied gehen von der unterschiedlichen Hämbindung in den beiden Studien oder von den unterschiedlichen Strukturen der aktiven Zentren in den jeweils verwendeten Varianten aus.

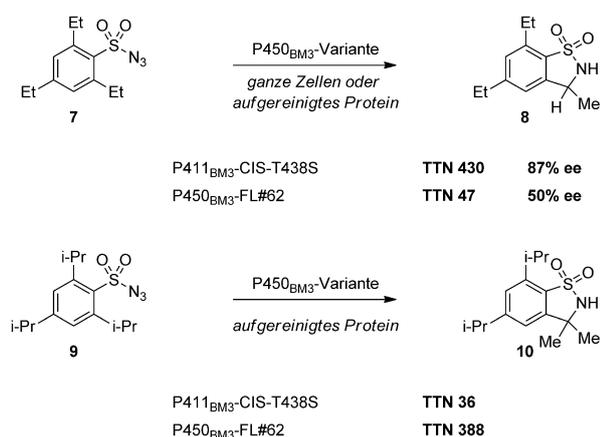


Abbildung 4. Durch die Cytochrome P411_{BM3} und P450_{BM3} katalysierte Nitreninsertion. P411_{BM3}-CIS-T438S = V78A, F87V, P142S, T175I, A184V, S226R, H236Q, E252G, T268A, A290V, L353V, I366V, C400S, T438S, E442K. P450_{BM3}-#FL62 = V87A, F81S, A82V, F87A, P142S, T175I, A180T, A184V, A197V, F205C, S226R, H236Q, E252G, R255S, A290V, L353V.

Die ersten Arbeiten zur P450-katalysierten C-H-Aminierung beschrieben ausschließlich die Aminierung der schwächsten vorhandenen C-H-Bindung im Substrat. Arnold et al. fanden heraus, dass durch systematische Anpassung der Architektur am aktiven Zentrum die starken C-H-Bindungen in Gegenwart von schwachen C-H-Bindungen selektiv aminiert werden konnten.^[25] Eine Aminierung der starken homobenzylischen C-H-Bindungen kann mit dem Dipropylbenzolsulfonimidat **11** erreicht werden, wenn eine P411-Variante mit Phenylalanin an Position I263F eingesetzt wird (97:3 Selektivität gegenüber der Aminierung in Benzylposition; Abbildung 5). Unter Verwendung von P411_{BM3}-F87A-T268A kann die Selektivität zugunsten der Aminierung in Benzylposition für dasselbe Substrat umgekehrt werden. Eine solch bemerkenswerte Regiodivergenz ist mit niedermolekularen Katalysatoren schwer zu erreichen – dies zeigt, dass biokatalytische Methoden solche mit niedermolekularen Katalysatoren ergänzen können.

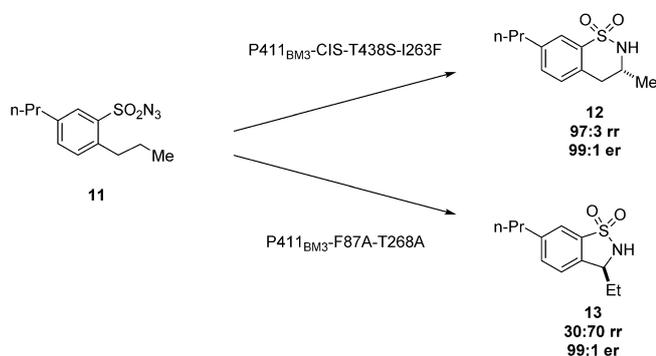


Abbildung 5. Durch Cytochrom P411_{BM3} katalysierte, regioselektive Nitreninsertion. P411_{BM3}-CIS-T438S-I263F = V78A, F87V, P142S, T175I, A184V, S226R, H236Q, E252G, I263F, T268A, A290V, L353V, I366V, C400S, T438S, E442K.

Während in den ersten Arbeiten zur P450- und P411-katalysierten C-H-Aminierung relativ starre Sulfonylazide als Substrate genutzt wurden, entdeckten Fasan et al., dass flexiblere Carbonazidate mit P450_{BM3}-FL#62 in moderater Ausbeute in Oxazolidinone umgewandelt werden können.^[26] Viele Carbonazidate fungierten als effektive Substrate mit Wechselzahlen zwischen 6 und 100, aber geringer Enantioselectivität. Die Leichtigkeit der Synthese eröffnete die Möglichkeit, den Mechanismus enzymkatalysierter Aminierungen zu untersuchen. Mechanistische Studien mit *cis*- und *trans*-Homoallylcarbonazidaten (**14** bzw. **15**) zeigen eine Isomerisierung zum *trans*-Oxazolidinon **16**, was vermuten lässt, dass die Reaktion über eine C-H-Abstraktion verläuft, wobei sich zunächst ein langlebiges Allyl- oder Benzylradikal bildet, woraufhin eine Radikalrekombination erfolgt (Abbildung 6). Außerdem lassen kinetische Isotopeneffekte auf die C-H-Abstraktion als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt schließen.

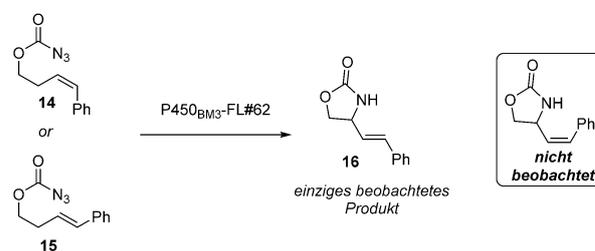


Abbildung 6. Mechanistische Studien zur P450_{BM3}-FL#62-katalysierten Aminierung von C-H-Bindungen lassen auf die Bildung eines langlebigen Allyl- oder Benzylradikals schließen.

Serin-gebundene P411_{BM3}-Spezies können ebenfalls intermolekulare Nitrentansferreaktionen katalysieren. Arnold et al. beschrieben, dass Tosylazid (TsN₃, **18**) und Sulfide unter P411_{BM3}-Katalyse in moderater Ausbeute Sulfimide liefern können (Abbildung 7).^[27] Die Struktur des aktiven Zentrums ist für die Katalyse des intermolekularen Nitrentransfers wesentlich. Nicht optimierte aktive Zentren lieferten als Hauptprodukt ein Sulfonamid, das durch Reduktion des entsprechenden Azids gebildet wurde. Man vermutet, dass diese Reduktion über einen Elektronentransfer von der Reduktasedomäne des P411 auf das Eisennitrenoid erfolgt. In Gegenwart eines optimierten aktiven Zentrums wird die Sulfimidierung konkurrenzfähig zur Nitrenoidreduktion. Hammett-Untersuchungen ergaben eine strenge Korrelation zwischen der elektronischen Natur des Sulfids und der Geschwindigkeit der Sulfimidierung, wobei elektronenreiche Sulfide schneller als elektronenneutrale amidiert wurden.

Die Sulfimidierung diente als Zugang zu anspruchsvolleren Alken-Aziridinierung (Abbildung 7).^[28] Während die in den Studien zur Sulfimidierung ermittelten Proteingerüste nur Spuren von Aziridinen ergaben, führte der Einbau von I263F ins aktive Zentrum zu einer erheblichen Menge an Aziridin, jedoch mit moderater Enantioselectivität. Nach zwei Runden ortsspezifischer Sättigungsmutagenese an Zielgruppen im aktiven Zentrum wurde eine Variante identifiziert, die Aziridine mit exzellenter Enantioselectivität liefert.

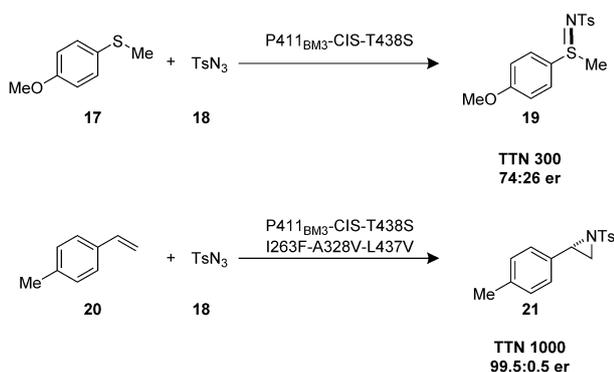


Abbildung 7. Sulfimidierung und Aziridinierung – katalysiert durch Cytochrom-P411_{BM3}-Varianten.

Anders als bei der Sulfimidierung, wo die Substratbandbreite durch die elektronische Struktur des Substrats weitgehend festgelegt ist, toleriert der optimierte Aziridinierungskatalysator eine Reihe von Alkenen, wobei die elektronische Struktur wenig Auswirkungen auf Effizienz und Selektivität der Reaktion hat.

2.2. Myoglobin-katalysierte Reaktionen

Myoglobin ist ein Hämprotein, das in Säugetieren als Sauerstoffträger ohne katalytische Funktion fungiert. Hinsichtlich der Hämbindung ist Myoglobin strukturell mit Peroxygenasen verwandt, bei denen das Eisenzentrum des Häms von einem Histidinrest ligiert wird. Trotz dieser Gemeinsamkeiten ist Myoglobin bei Oxidationen weniger wirksam als Peroxidasen.^[29] Dies resultiert wohl aus der fehlenden Substratbindungsspalte und dem schlecht positionierten proximalen Histidin, das für die Bildung von Compound I benötigt wird. Hayashi et al. nahmen an, dass das Fehlen einer Bindungsspalte kompensiert werden könnte, indem man die polaren Carboxylate des Häms durch unpolare, aromatische Gruppen ersetzt.^[30] Durch Entfernen des Cofaktors und Rekonstitution mit einem „doppelflügeligen Cofaktor“ erreichten sie eine höhere Reaktivität für die Oxidation von 2-Methoxyphenol. Diese Verbesserung wurde einer gesteigerten Substrataffinität (Abnahme von K_m) zugeschrieben. Um die Reaktivität des Komplexes zu erhöhen, erforschten Hayashi et al. Mutationen des proximalen Histidins. Durch die Mutation von Histidin 64 zu Asparaginsäure (H64D) wurde die Peroxidaseaktivität von Myoglobin verstärkt (Abbildung 8). Weiterhin steigerte der Austausch des natürlichen Cofaktors gegen den doppelflügeligen Cofaktor die Peroxidaseaktivität beinahe um das 400-Fache.

Imidazol-gebundene Eisenporphyrine sind als effiziente niedermolekulare Katalysatoren für Carbentransfers bekannt.^[31] Fasan und Sreenilayam ermittelten, dass Myoglobin in Gegenwart von EDA sowie verschiedenen primären und sekundären Anilinen Carbeninsertionen in N-H-Bindungen effizienter als Häm allein bewirken kann (Abbildung 9).^[32] Wie bereits erwähnt, ist das Fehlen einer Bindungsspalte ein Nachteil des WT-Myoglobins. Ein aktives Zentrum kann durch Mutation des konservierten distalen Histidins zu Valin

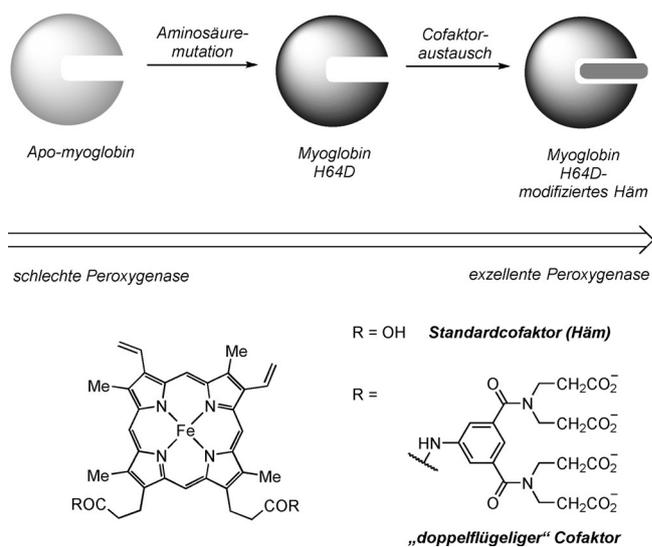


Abbildung 8. Umwandlung von Myoglobin in eine Peroxygenase durch chemogenetische Optimierung.

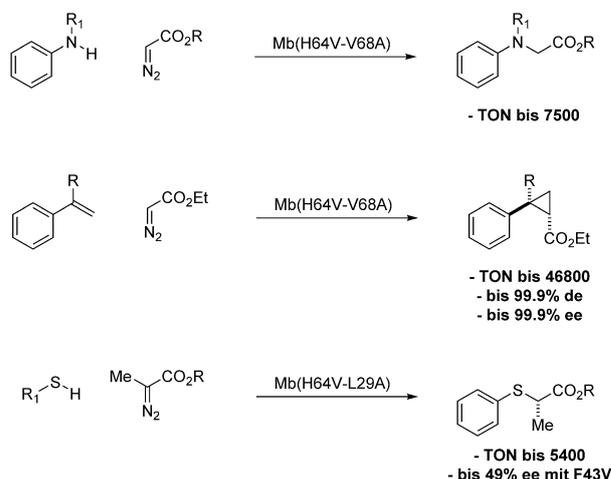


Abbildung 9. Myoglobin-katalysierte Carbeninsertion in N-H-Bindungen, Alkene und S-H-Bindungen.

(H64V) und Mutation eines flankierenden Valins zu Alanin (V68A) gestaltet werden. Der verbesserte Katalysator liefert exzellente Umsätze (TTN bis zu 7500). Außerdem verknüpft er effektiv substituierte Styrole mit EDA und ergibt *trans*-Cyclopropane in hoher Ausbeute (TTN > 46000) sowie mit hervorragender Diastereoselektivität und Enantioselektivität (Abbildung 9).^[33] Mechanistische Studien lassen darauf schließen, dass die Cyclopropanierung über eine elektrophile Eisen-Carbenoid-Zwischenstufe geschieht. Diese ähnelt stark der für niedermolekulare Katalysatoren vorgeschlagenen Zwischenstufe.

Außer der N-H-Insertion und der Cyclopropanierung katalysiert Myoglobin auch die Insertion von Carben in S-H-Bindungen.^[34] Für die S-H-Insertion ist jedoch L29A-H64V die beste Variante. Sie zeigt bei einer Reihe substituerter aromatischer und aliphatischer Thiole Aktivität, was weder

bei der N-H-Insertion noch bei der Cyclopropanierung möglich ist. Zudem ergeben sterisch anspruchsvolle Cyclohexyl-, *tert*-Butyl- und Benzyl-substituierte Diazoester exzellente Ausbeuten. Eine kurze Sichtung der Mutanten des aktiven Zentrums lieferte eine Variante (F43V), die in der Lage ist, diese Umsetzung asymmetrisch auszuführen.

Wie P450-Cytochrome kann Myoglobin über einen Nitrentransfer C-H-Aminierungen bewirken, jedoch in geringer Ausbeute.^[35] Mutation des konservierten, distalen Histidins zu Valin (H64V) hat eine leichte Steigerung der katalytischen Aktivität zur Folge. Durch Veränderung des aktiven Zentrums kann die Enantioselektivität der Insertion moduliert werden. Allgemein ist Myoglobin in Reaktionen mit Nitrenspezies weniger effektiv als in solchen mit Carbenoidspezies. Daher tauschten Fasan et al. den Hämfaktor gegen Mn- und Co-Häminspezies, die bekanntermaßen bei Aminierungen unter organischen Bedingungen effektiver sind. Allerdings zeigten sich diese weniger effektiv als Fe-Häm.

3. Supramolekulare Kupplung

3.1. Biotin-Streptavidin-basierte künstliche Metalloenzyme

Einige der bestuntersuchten künstlichen Metalloenzyme nutzen die starke, nichtkovalente Wechselwirkung zwischen Streptavidin (Sav) und biotinylierten Metallkomplexen.^[36] Die wegweisende Arbeit von Whitesides und Wilson zeigte, dass $[\text{Rh}(\text{NBD})(\text{Biot-L})] \subset \text{Avidin (Avi)}$ (NBD = Norbornadien) die Hydrierung von Acetamidoacrylsäure (**22**) zu (*R*)-Acetamidoalanin (**24**) mit moderater Enantioselektivität (bis zu 41 % *ee*) katalysiert.^[9] (C bezeichnet die supramolekulare Aufnahme des Metallcofaktors in das Wirtprotein.) Ward et al. wiederholten diese Reaktion, doch nicht mit Avidin als Wirtprotein, sondern mit Streptavidin. Streptavidin ist wie Avidin ein homotetrameres Protein mit hoher Affinität für Biotin ($K_a > 10^{13} \text{ M}^{-1}$).^[37] Es unterscheidet sich von Avidin in seiner Dielektrizitätskonstanten ($pI = 6.2$ für Sav gegenüber $pI = 10.4$ für Avi) und der einfachen rekombinanten Expression in *E. coli*. Nach dem Wechsel von Avi auf Sav unter sonst ähnlichen Reaktionsbedingungen beobachteten Ward et al., dass $[\text{Rh}(\text{cod})(\text{Biot-L})] \subset \text{WT-Sav}$ (cod = Cycloocta-1,5-dienyl) **24** in quantitativer Ausbeute und mit 92 % *ee* lieferte (Abbildung 10).^[38] Mit diesem Hybridkatalysator gelang auch die Reduktion von Acetamidozimtsäure (**23**) zu (*R*)-Acetamidophenylalanin (**25**) mit 84 % Umsatz und 93 % *ee*.^[39]

Ward et al. erkannten, dass eine Modifizierung des Aminosäure-Abstandhalters, der das Metall mit dem Biotinanker verbindet, die chemische Umgebung, in der sich der Metallcofaktor innerhalb des „aktiven Zentrums“ des Streptavidins befindet, drastisch verändern kann. Die Feineinstellung kann durch genetische Modifizierung erreicht werden.^[39,40] Zum Beispiel lieferte die Sättigung der Bindungsstelle an Position S112 mit $[\text{Rh}(\text{cod})(\text{Biot-L})]$ die beiden genetischen Mutanten S112G und S112A, die eine höhere Enantioselektivität für das *R*-Enantiomer von **23** und **24** aufwiesen (Abbildung 10). Dennoch blieben Versuche, das andere Enantiomer allein durch genetische Modifizierungen zu erhalten, erfolglos. Die Untersuchung von 18 chemischen Linkern lieferte $[\text{Rh}$ -

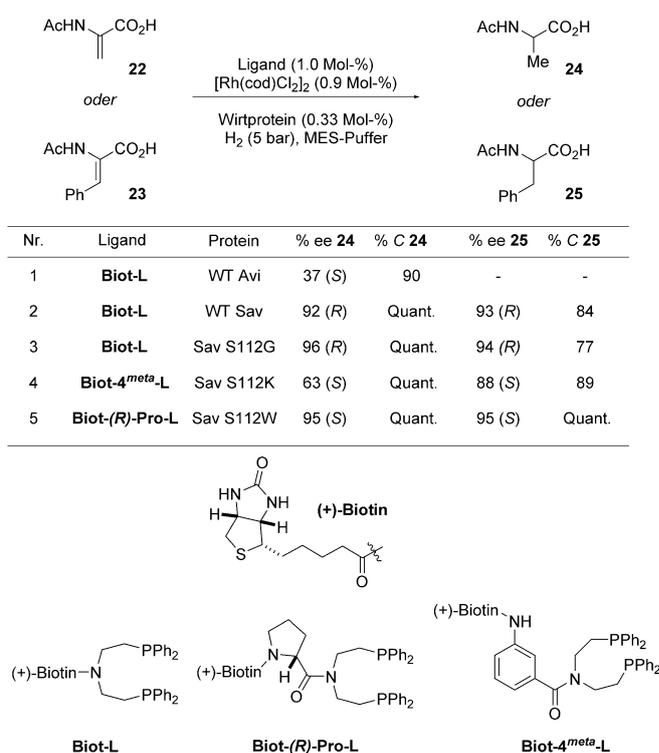


Abbildung 10. Künstliche Hydrogenase durch Einbau eines biotinylierten Rh-Diphosphin-Restes in Sav-Varianten. C = Umsatz, MES = 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure.

(cod)(**Biot-4^{meta}-L**) und $[\text{Rh}(\text{cod})(\text{Biot-(R)-Pro-L})]$, die bevorzugt das *S*-Enantiomer bildeten.^[41] Eine Sichtung von Sav-Isoformen führte zur Identifizierung von $[\text{Rh}(\text{cod})(\text{Biot-(R)-Pro-L})] \subset \text{S112W}$, das beide Produkte in quantitativer Ausbeute und mit 95 % *ee* ergab (Abbildung 10).

Eine anschließende Studie von Reetz et al. verfolgte eine Strategie der gerichteten Evolution, um $[\text{Rh}(\text{cod})(\text{Biot-L})] \subset \text{Sav}$ für die enantioselektive Reduktion von Methylacetamidoacrylat zu optimieren.^[42] Allerdings erforderten Komplikationen während der Proteinexpression die Verwendung kleiner, durch Sättigungsmutagenese erhaltener Bibliotheken anstelle großer, durch fehleranfällige Polymerasekettenreaktion entstandener Bibliotheken. Reetz et al. wählten Positionen in geringer Entfernung zum aktiven Zentrum aus (z. B. N49, L110, S112, L124). In der ersten Runde wurde S112G als positive Mutation identifiziert; diese liefert das Produkt mit 35 % *ee* zugunsten des *R*-Enantiomers (gegenüber 23 % *ee* für WT-Sav). In der zweiten Mutageneserunde entstand eine Doppelmutante N49V-S112G, die das Produkt mit 54 % *ee* ergab. Wurde N49V alleine bewertet, zeigte es die beste Enantioselektivität in der Studie (65 % *ee*). Nach zwei Mutageneserunden konnte in Gegenwart von $[\text{Rh}(\text{cod})(\text{Biot-L})] \subset \text{SavN49H-L124F}$ das andere Enantiomer (*S*)-Acetamidoalaninmethylester mit 7 % *ee* hergestellt werden.

Aufbauend auf der Hydrierung von Alkenen untersuchten Ward et al. biotinylierte, Aminosulfonamid-gebundene Klavierstuhlkomplexe als Katalysatoren zur Transferhydrierung von Ketonen.^[43] Die Transferhydrierung unterscheidet

sich mechanistisch von der klassischen Hydrierung insofern, als sich das Substrat nicht koordinativ an das Metallzentrum anlagert. Stattdessen verläuft die Reaktion vermutlich über einen konzertierten Übergangszustand, wobei das Hydrid vom Metallatom gleichzeitig mit einem Protonentransfer vom Aminliganden übertragen wird. Eine Familie racemischer *at*-Metall-*N*-Sulfonamid-1,2-ethylen-diamin-Komplexe wurde aus gewöhnlichen Rh-, Ir- und Ru-Klavierstuhlkomplexen synthetisiert und auf Streptavidin-Isoformen untersucht. Eine Biotinylierung an der *para*-Position des Sulfonamids lieferte allgemein reaktivere Komplexe. Zudem ergaben Aren-überdachte Rutheniumkomplexe die höchste Ausbeute. Das überdachende Aren beeinflusst die Enantiopräferenz der Reaktion mit $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ und $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$, welche die entgegengesetzten Enantiomere begünstigen. Dieser Effekt ist in Verbindung mit genetischen Mutationen besonders ausgeprägt. Beispielsweise liefert $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{WT-Sav}$ bei der Reduktion von *p*-Methylacetophenon das Produkt mit 89% *ee* für das *R*-Enantiomer, während $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{WT-Sav}$ dasselbe Produkt generiert, jedoch mit nur 29% *ee* (*R*). Wird dieselbe Reaktion mit S112A durchgeführt, begünstigt $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A}$ das *R*-Enantiomer mit 91% *ee*, während $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A}$ nun das gleiche Enantiomer mit 41% *ee* liefert.

Diese Enantiopräferenz kann umgekehrt werden, wenn Lysin anstelle von Alanin eingesetzt wird: $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112K}$ begünstigt mit 10% *ee* die Bildung des *S*-Enantiomers, während $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A}$ das *R*-Enantiomer mit 63% *ee* ergibt. Es wird vermutet, dass die Gegenwart kationischer Gruppen in enger Nachbarschaft zum Metallzentrum die für die Enantioselektivität wesentliche Wechselwirkung verändert. Befinden sich hydrophobe Reste nahe des Metalls, könnten C-H $\cdots\pi$ -Wechselwirkungen für die Selektivität verantwortlich sein. Diese Wechselwirkung wird wahrscheinlich von Kation $\cdots\pi$ -Wechselwirkungen übertroffen, wenn sich Lysin nahe dem aktiven Zentrum befindet. Eine Kristallstruktur des Streptavidin-gebundenen Metallkomplexes zeigte, dass die Reste K121 und L124 dicht am Metallzentrum positioniert sind.

Zunächst waren Acetophenonderivate die einzigen Substrate, mit denen eine hohe Enantioselektivität erreicht wurde. Um die Selektivität der Dialkylketonreduktion zu erhöhen, wurde die iterative Sättigungsmutagenese eingesetzt (Abbildung 11).^[44] Aufgrund der Beobachtung, dass das überdachende Aren verschiedene Enantiopräferenzen begünstigen kann, führten Ward et al. eine Sättigungsmutagenese an $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ und $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ mit 4-Phenyl-2-butanon durch. Um den Screening-Prozess zu beschleunigen, wurde die Streptavidinmutante aus rohen Zellextrakten mittels Biotin-Sepharose-Trägerpartikeln extrahiert. Liegt Sav im Überschuss vor, besetzt das Sepharose-gebundene Biotin nur eine Biotin-Bindungs-

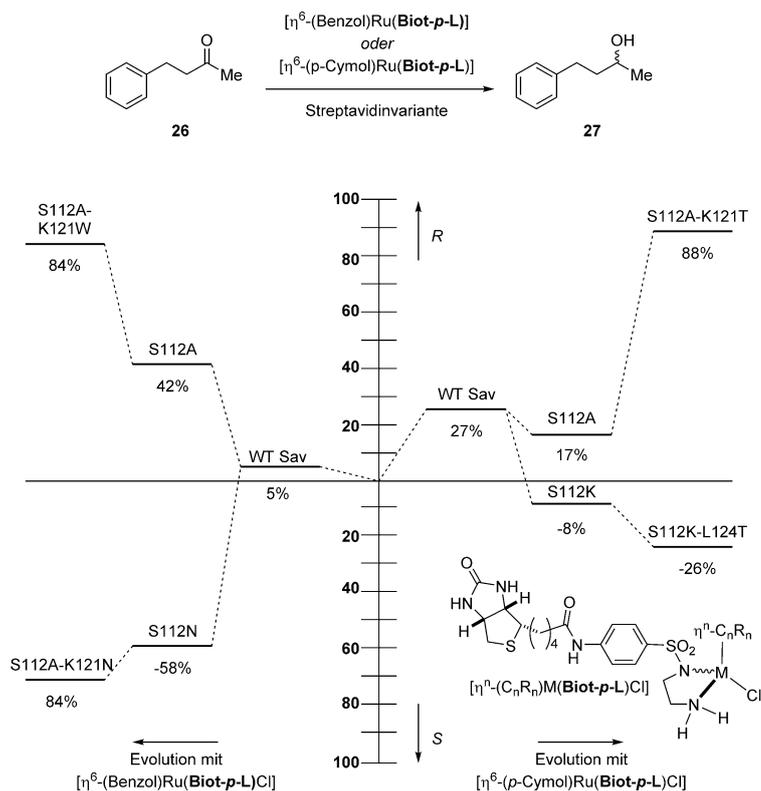


Abbildung 11. Entwicklungsweg für die meisten hochselektiven, künstlichen Transferhydrogenasevarianten zur Reduktion von 4-Phenyl-2-butanon (26).

stelle und lässt die anderen drei Stellen frei für die Katalyse. Es wurde schnell erkannt, dass die S112A- und S112K-Varianten mit beiden Areneinheiten die entgegengesetzten Enantiomere – allerdings mit geringer Enantioselektivität – begünstigen. Als diese Mutationen mit den Sättigungsmutagenese-Bibliotheken der Positionen K121 und L124 kombiniert wurden, erreichte man wesentlich höhere Enantioselektivitäten. Zum Beispiel lieferte $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A-K121T}$ mit 88% *ee* das *R*-Enantiomer, während $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112K-L124T}$ das *S*-Enantiomer mit geringer Enantioselektivität (26% *ee*) begünstigte. Die Selektivität für das *S*-Enantiomer kann mithilfe von $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A-L121N}$ auf 72% *ee* verbessert werden. Eine einzelne Mutation zu $[(\eta^6\text{-Benzol})\text{Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{S112A-L121W}$ führt interessanterweise zur Begünstigung des *R*-Enantiomers mit 84% *ee*. Insgesamt zeigt diese Studie, wie wesentlich es in Bezug auf die Selektivität ist, die genetische Komponente künstlicher Metalloenzyme zu optimieren.

Reduktion von Alkenen und Ketonen mit künstlichen Metalloenzymen ergänzt die Enzymreaktionen, die gewöhnlich für industrielle Umsetzungen verwendet werden (Enoat-Reduktasen und Ketoreduktasen).^[45] Deutlich weniger untersucht sind die Imin-Reduktasen, die erst kürzlich entdeckt wurden.^[46] Dagegen ist schon lange bekannt, dass Transferhydrierung die enantioselektive Reduktion von Iminen bewirkt. Mit $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}] \subset \text{WT-Sav}$ ($\text{Cp}^* = \text{C}_5\text{Me}_5$) konnte die Hydrierung cyclischer Iminen in quantitativer

Ausbeute und mit moderater Enantioselektivität (57% *ee* (*R*)) durchgeführt werden.^[47] Die genetische Optimierung liefert eine verbesserte Selektivität: [Cp*Ir(Biot-*p-L*)Cl] \subset S112A ergibt das *R*-Produkt mit 91% *ee* und TTN > 4000 (Abbildung 12). Eine Punktmutation mit [Cp*Ir(Biot-*p-L*)Cl] \subset S112K liefert das entgegengesetzte Enantiomer mit 78% *ee* zugunsten des *S*-Enantiomers.

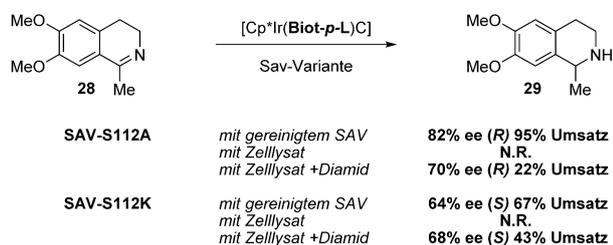


Abbildung 12. Reduktion von Dehydrosalsolidin (**28**) zu Salsolidin (**29**) mithilfe einer Sav-basierten künstlichen Imin-Reduktase, entweder mit gereinigten Proben oder mit Diamid-vorbehandelten Zellysaten. N.R. = keine Reaktion.

Um die Enantiomerenreinheit des Amins zu verbessern, kann die künstliche Imin-Reduktase an eine Amin-Oxidase (Monoamin-Oxidase, MAO) gekoppelt werden.^[48] In dieser Kaskade oxidiert die hochselektive MAO selektiv das *S*-Amin zurück zum Imin, um schließlich das enantiomerenreine *R*-Amin zu bilden (Abbildung 13). Dieser Ansatz bietet eine elegante Lösung für die Herausforderung, biokatalytische Prozesse mit der Katalyse durch niedermolekulare Übergangsmetalle zu kombinieren. Allgemein wird angenommen, dass sich Übergangsmetalle und Enzyme wechselseitig hemmen.^[49] Durch Kompartimentierung des metallorganischen Cofaktors innerhalb eines Proteingerüsts wird die Inaktivierung verhindert. Zudem können damit beide Reaktionen in einer einzigen Phase ablaufen, sodass kein Mehrphasensystem benötigt wird.^[50,51]

Eine anspruchsvolle Aufgabe bei der Entwicklung künstlicher Metalloenzyme besteht darin, den Aktivitätsver-

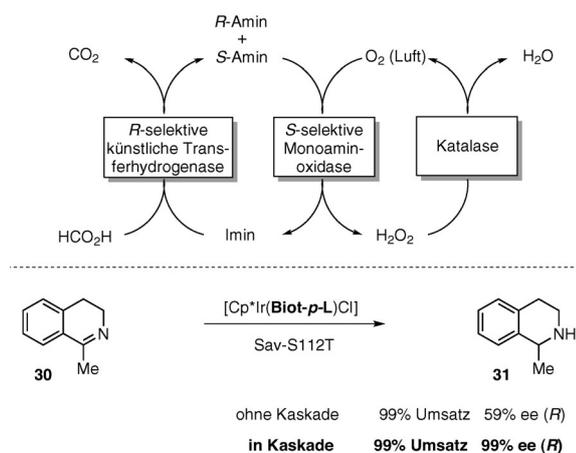


Abbildung 13. Eine künstliche Transferhydrogenase in einer Kaskade mit einer selektiven Monoaminoxidase liefert enantiomerenreine cyclische *R*-Amine.

lust durch den Einbau des Metalls in das aktive Zentrum eines Proteins zu überwinden. Im Fall der Imin-Reduktase ist der freie Metallcofaktor etwa 20× aktiver als das künstliche Metalloenzym in WT-Sav (vgl. $k_{\text{cat}} = 21 \text{ min}^{-1}$; $K_m = 34 \text{ mM}$ mit $k_{\text{cat}} = 1 \text{ min}^{-1}$; $K_m = 5 \text{ mM}$ für den freien Cofaktor bzw. [Cp*Ir(Biot-*p-L*)Cl] \subset WT-Sav).^[52] Ward et al. vermuteten, dass geladene Reste innerhalb des aktiven Zentrums die Affinität des unpolaren Substrats zu selbigem vermindern. Zur Lösung dieses Problems wurden hydrophobe Reste ins aktive Zentrum eingebaut, um die Polarität der Tasche zu vermindern. Die Einführung von Alaninresten an S112 und K121 (S112A-K121A) verbesserte die katalytische Effizienz wesentlich, was sich in einem Anstieg von k_{cat} (24 min^{-1}) und einem Abfall von K_m (15 mM) widerspiegelte (Abbildung 14). Insgesamt lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass eine Veränderung des aktiven Zentrums die Aktivität des Metalls verbessern kann, ohne die direkte Metallkoordination zu beeinträchtigen.

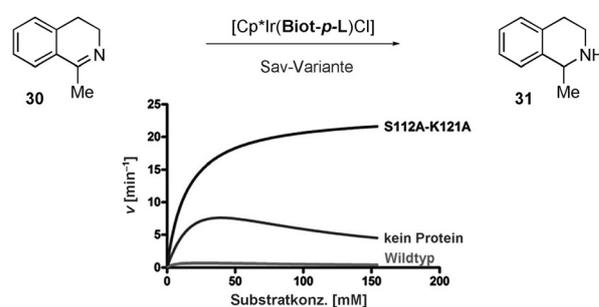


Abbildung 14. Die gentechnische Einführung von Resten innerhalb des Biotin-bindenden Vestibüls ermöglicht eine signifikante Verbesserung der katalytischen Effizienz einer künstlichen Imin-Reduktase auf Grundlage der Biotin-Streptavidin-Technologie. Wiedergabe mit Genehmigung der ACS.^[52]

Die Metallkoordination ist ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Planung aktiver künstlicher Metalloenzyme. Wird das Metall anstelle eines Aminosulfonamidliganden durch einen η^6 -Aren- oder η^5 -Cyclopentadienliganden an Biotin gebunden, entsteht ein weniger aktiver Metallkomplex zur Transferhydrierung von Iminen. Ward et al. nahmen an, dass die Koordination von Histidinresten an den Metallteil die Aktivität bewahren könnte.^[53] Nach Einbau von Histidin an S112 (z. B. d. h. S112H) nahm der Umsatz gegenüber dem für den Wildtypkomplex um ein 10-Faches zu, und (*S*)-Salsolidin (**29**) entstand in quantitativer Ausbeute und mit 55% *ee*. Interessanterweise wurde die Enantioselektivität bei Einbau des Histidins an Position K121 (K121H) umgekehrt, sodass (*R*)-Salsolidin (**29**) in quantitativer Ausbeute und mit 79% *ee* gebildet wurde (Abbildung 15). Die Auswertung der Kristallstrukturen beider Varianten belegt, dass das Metall je nach Position des Histidinrestes sehr unterschiedliche Ausrichtungen innerhalb des chiralen, Biotin-bindenden Vestibüls annimmt, was für die entgegengesetzten Enantioselektivitäten verantwortlich sein könnte. Während Metalloenzyme allgemein auf der genetischen Modifizierung der zweiten Koordinationssphäre beruhen, weist diese Studie darauf hin, dass die genetische Optimierung der *ersten* Koordinations-

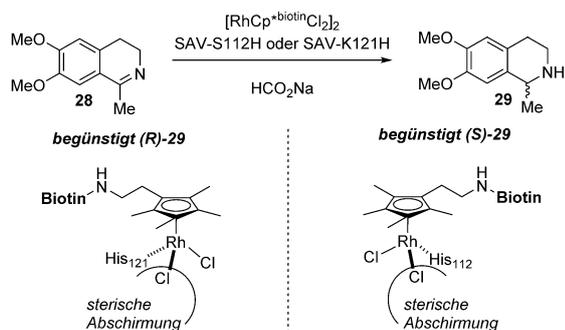


Abbildung 15. Die Aktivierung latenter künstlicher Metalloenzyme durch Koordination eines Histidinrestes liefert künstliche Imin-Reduktasen. Die Position des koordinierenden Restes bestimmt die Enantiopräferenz der Reduktion. $\text{Cp}^*\text{biotin} = \text{Me}_4\text{C}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBIOTIN}$.

sphäre genutzt werden kann, um Reaktivität und Selektivität von künstlichen Metalloenzymen zu steigern.

Das Konzept der Proteinkoordination für verbesserte Reaktivität wurde genutzt, um ein künstliches Metalloenzym für die Rh^{III} -katalysierte C-H-Aktivierung von Aminen zur Herstellung von Dihydroisochinolonen zu entwickeln (Abbildung 16).^[54] Mit solchen katalytischen Systemen werden



Nr.	Variante	Ausb. (%)	er
1	-	< 5	-
2	WT	< 5	-
3	N118K-K121E	99	82:18
4	S112Y-K121E	95	91:9

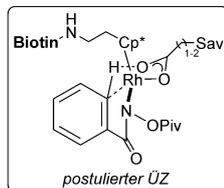


Abbildung 16. Eine künstliche Benzannulase aus dem Einbau einer biotinylierten $\{\text{Cp}^*\text{Rh}^{\text{III}}\}$ -Gruppe in Sav. Der Einbau einer basischen Gruppe an Position 121 führt zu einer hundertfachen Steigerung der Geschwindigkeit. MOPS = 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, ÜZ = Übergangszustand.

alle drei verfügbaren Koordinationsstellen des Klavierstuhlkomplexes für den Ablauf der Reaktion benötigt. Deshalb sind die Möglichkeiten für einen exogenen Liganden, Stereokontrolle zu gewähren, begrenzt. Ward, Rovis et al. stellten fest, dass ein biotinylierter $\{\text{Cp}^*\text{Rh}\}$ -Rest in Gegenwart von WT-Sav ein enantiomerenangereichertes Produkt, jedoch in geringer Ausbeute, lieferte. Aufgrund der Tatsache, dass die elektrophile C-H-Aktivierung eine Base, oft ein Carboxylat, erfordert, um den C-H-Aktivierungsvorgang zu erleichtern, wurden Aspartat- und Glutamatreste in die Nähe des Metallzentrums eingeführt. Durch den Einbau von Asparaginsäure (K121D) wurde die Produktivität gesteigert. Die aktivste Variante, N118K-K121E, ergab einen fast 100-fachen Aktivitätsanstieg gegenüber WT-Sav. Durch Kombination mit dem sterisch anspruchsvollen Tyrosin an Position S112 wurde eine Mutante (S112Y-K121E) gefunden, die eine

hohe Ausbeute und Enantioselektivität für das gewünschte Produkt bot. Dies ist das erste Beispiel für einen enantioselektiven Rh^{III} -C-H-Aktivierungsprozess sowie für den Einbau einer mechanistisch essenziellen Gruppe in das Proteingerüst eines künstlichen Metalloenzym.

Künstliche Metalloenzyme können auch andere Reaktionen katalysieren, die man gewöhnlich als streng beschränkt auf die Katalyse mit niedermolekularen Verbindungen ansah. Dies ist der Fall bei der allylischen Alkylierung von 1,3-Diphenylallylacetat (**35**; Abbildung 17).^[55] Es ist allgemein

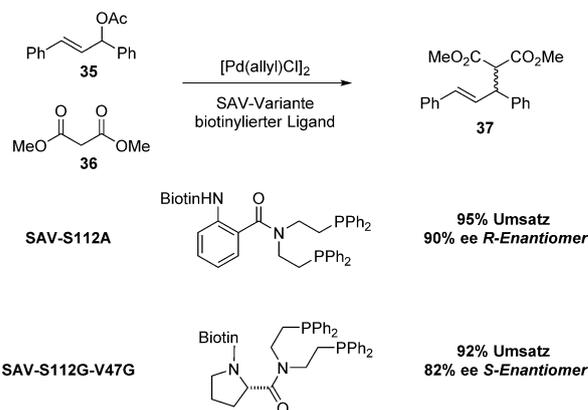


Abbildung 17. Eine künstliche allylische Allylase auf Grundlage der Biotin-Streptavidin-Technologie.

bekannt, dass weiche Nucleophile direkt am η^3 -gebundenen Allylteil angreifen, anstatt durch Metallkoordination und nachfolgende reduktive Eliminierung zu reagieren. Ward et al. beobachteten, dass ein biotinylierter Bis(phosphin)-Ligand in Kombination mit einem Palladiumkatalysator die Allylierung in hoher Ausbeute und mit moderater Selektivität bewirkt. Die Mutante S112A lieferte das alkylierte Produkt **37** mit exzellenter Enantioselektivität. Eine einzelne Mutation S112Q ergab das entgegengesetzte (*R*)-**37** mit 31% *ee*. Einführung eines enantiomerenreinen (*R*)-Prolin-Abstandhalters zwischen den Biotinanker und den Palladiumkomplex, kombiniert mit der doppelten Mutante S112G-V47G, führte zu einer Steigerung der Enantioselektivität zugunsten des *R*-Enantiomers (bis zu 82% *ee* (*R*)).

Streptavidin-basierte künstliche Metalloenzyme können auch als effektive Katalysatoren für enantioselektive Suzuki-Reaktionen unter Bildung von Atropisomeren fungieren (Abbildung 18). Als Modellreaktion wurde 1-Iodnaphthalin an 2-Methoxy-1-naphthalinboronsäure gekuppelt. Nach Sichtung einer kleinen Bibliothek einzähliger, biotinylierter Liganden boten elektronenreiche Di-*tert*-butylphosphine die beste Ausbeute. Die Prüfung von Einfachmutanten an Position S112 und K121 offenbarte moderate Enantioselektivitäten für K121E (76% *ee* (*R*)). Durch Kombination dieser Mutation mit Mutationen an Position S112 oder N118 wurde mit S112Y-K121E eine Mutante erhalten, die eine quantitative Ausbeute mit 90% *ee* lieferte. Dieser Hybridkatalysator wirkt bei vielen Aryliodiden effizient und ergibt hohe Ausbeuten.^[56]

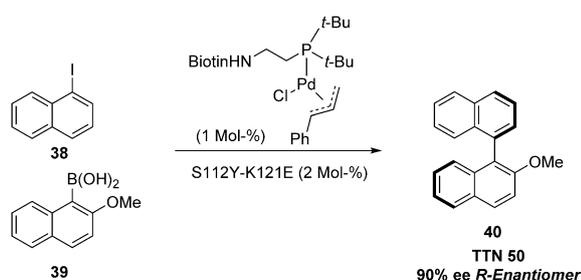


Abbildung 18. Eine künstliche Suzukiase auf Basis der Biotin-Streptavidin-Technologie. Zwei Punktmutationen verbessern die Enantioselectivität von 58 auf 90% *ee*.

3.2. Humane Carboanhydrase

Die humane Carboanhydrase katalysiert die reversible Umwandlung von CO_2 zu Bicarbonat.^[57] Sulfonamide hemmen bekanntlich diese Aktivität durch Koordination ihres Stickstoffatoms an das katalytisch aktive Zinkzentrum. Ward et al. entwickelten eine Familie von Aminopyridin- und Sulfonamid-Pyridin-Liganden, die kovalent an *p*-Arylsulfonamide gebunden sind, und prüften ihre Wirkung auf die Transferhydrierung von Iminen. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Sulfonamid-Pyridin-Liganden erhalten; durch Mutagenese der flankierenden Reste konnte die Ausbeute oder Enantioselectivität nicht verbessert werden (TTN 55, 32% *ee*; Abbildung 19). Die Röntgenkristallstruktur der künstlichen Imin-Reduktase zeigte eine nur teilweise Besetzung des Klavierstuhlrestes innerhalb der trichterförmigen hCAII-Bindungsstelle. Die Autoren vermuteten, dass dies durch die flache Potentialenergiehyperfläche aufgrund mangelnder stabilisierender Wechselwirkungen zwischen Klavierstuhl und Wirtprotein verursacht werden könnte. Ein Computer-Screening in Zusammenarbeit mit der Baker-Gruppe führte zur Identifizierung von acht Mutationen (L60V-A65T-N67W-E69Y-Q92F-L140M-L197M-C205S), für die eine Verbesserung der Cofaktor...hCAII-Wechselwirkungen prognostiziert wurde.^[58] Diese Varianten wurden exprimiert und auf ihre Affinität zum Sulfonamid-tragenden Cofaktor getestet. Sowohl die Affinität als auch die Aktivität und die Selektivität konnten gegenüber den Werten für die

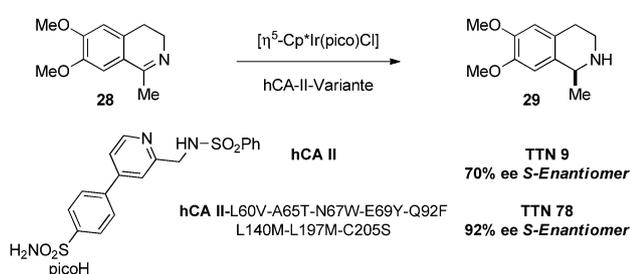


Abbildung 19. Künstliche Imin-Reduktase auf Basis des Sulfonamid-Carboanhydrase-Paars. Ein Computer-gestütztes Screening führt zur Identifizierung von entscheidenden Resten und ermöglicht eine deutliche Verbesserung der Affinität, Aktivität und Enantioselectivität des Iridium-basierten Hybrids.

WT-hCA II gesteigert werden, und es entstand das Produkt mit 92% *ee* (Abbildung 19).

4. Kovalente Verankerung

4.1. LmrR-basierte Metalloenzyme

Roelfes et al. mutmaßten, dass die hydrophobe Pore des Transkriptionsrepressors aus *L. lactis* (Lactococcal multidrug resistance regulator, LmrR) eine effektive Umgebung für die Herstellung künstlicher Metalloenzyme bieten könnte.^[59] Sie wählten LmrR, der im dimeren Zustand eine flache, hydrophobe Pore bildet, um künstliche Metallcofaktoren aufzunehmen. Infolge der Einführung eines Cysteinrestes in das hydrophobe aktive Zentrum wurde ein Cu^{II} -Phenanthrolin-Rest in die hydrophobe Pore biokonjugiert. Zunächst wurde der Komplex bei der kupferkatalysierten Diels-Alder-Reaktion des Ketons **41** mit Cyclopentadien getestet. Unter optimierten Bedingungen lieferte das Metalloenzym ein Produkt mit exzellentem Umsatz, hoher *endo*-Selektivität und hervorragender Enantioselectivität. Nach Mutation des flankierenden Valinrestes zu Alanin (V15A) stieg die *endolexo*-Selektivität bei wenig Verlust hinsichtlich Umsatz oder Enantioselectivität an (Abbildung 20). Dieses Gerüst wurde auch

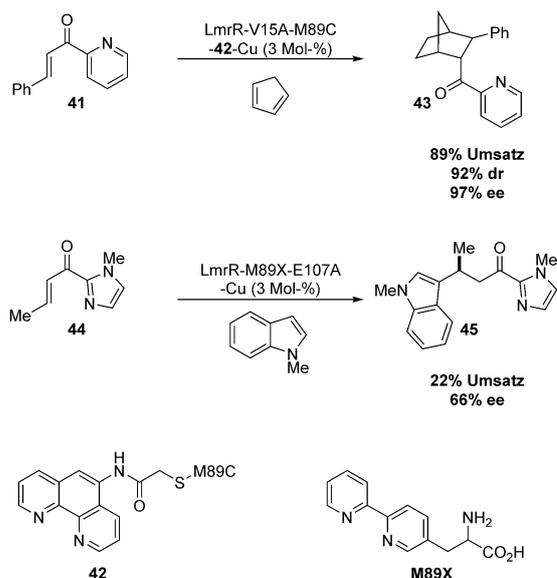


Abbildung 20. Mit LmrR als Wirtprotein entwickelten Roelfes et al. entweder ein Phenanthrolin über Biokonjugation oder ein Bipyridylalanin mittels AMBER-Cdon-Suppression. Das resultierende künstliche Metalloenzym katalysiert eine Diels-Alder-Cycloaddition und eine asymmetrische Friedel-Crafts-Alkylierung.

in einer kupferkatalysierten Oxa-Michael-Addition verwendet, wobei hier jedoch bei flankierender Mutation kein Anstieg in Selektivität oder Ausbeute erzielt wurde.^[60]

Bei diesen ersten Arbeiten nutzten Roelfes et al. die Biokonjugation des Liganden in das aktive Zentrum, um das Metallzentrum in der hydrophoben Pore zu lokalisieren. Der

Nachteil dieses Ansatzes ist der zusätzliche Schritt zur Herstellung des Katalysators. Eine Alternative bietet die gentechnische Herstellung einer nichtnatürlichen Aminosäure mit einer Seitenkette, die das Metallatom binden kann. Mittels AMBER-Codon-Suppression und einer Bipyridylalanin-Aminosäure entwickelten Roelfes et al. ein künstliches Metalloenzym, das in der Lage war, die vinyloge Friedel-Crafts-Reaktion eines Michael-Akzeptors mit Indol in moderater Ausbeute zu katalysieren.^[61] Die Sichtung verschiedener Mutationen im aktiven Zentrum führte zur Variante M89X-E107A, die das Produkt mit 66% *ee* lieferte. Der Gesamtumsatz konnte durch Einführung einer weiteren Mutation, M89X-N19A-E107A, auf 58% gesteigert werden, allerdings zu Lasten der Enantioselektivität (14% *ee*).

4.2. Prolyl-Oligopeptidase

Üblicherweise befinden sich die Metallcofaktoren künstlicher Metalloenzyme nahe der Oberfläche des gewählten Proteins. Dies kann zwar vorteilhaft für eine selektive Katalyse sein, jedoch könnte ein Metall, das stärker im aktiven Zentrum eingebettet ist, einen selektiveren Katalysator ergeben. Unter Verwendung spannungskatalysierter Azid-Alkin-Cycloadditionen entwickelten Lewis et al. erstmals kovalent an Proteine gebundene Metallcofaktoren, bei denen L-4-Azidophenylalanin genetisch über AMBER-Codon-Suppression eingeführt wurde (Abbildung 21 a).^[62] Die Autoren fanden heraus, dass durch Mutation der nichtnatürlichen Aminosäuregruppe an Position 477 (Z477) und Erweiterung des aktiven Zentrums durch den Einbau von Alanin an vier Positionen (E104, F146, K199 und D202) ein Rh^{II}-Dimer ins aktive Zentrum der Prolyl-Oligopeptidase von *Pyrococcus furiosus* eingeführt werden kann.^[63] Das resultierende Protein mit fünf Mutationen konnte die Cyclopropanierung von Styrol mit Donor-Akzeptor-Diazoestern in moderater Ausbeute und Enantioselektivität bewirken. Wenn Histidin im aktiven Zentrum an Position 328 (H328) eingefügt wurde, vermutlich um die konformative Freiheit einzuschränken und ein Rhodiumzentrum zu blockieren, erhöhte sich die Enantioselektivität auf 47% *ee* bei moderater Ausbeute. Der Einbau von Phenylalaninresten im aktiven Zentrum (F99-F594 oder F99, F97) optimierte die Reaktion zu 74% Ausbeute und 92% *ee*. Zu bemerken ist, dass diese Mutationen auch das Ausmaß der Diazohydrolyse deutlich senken, und zwar von 2:1 zugunsten der Hydrolyse mit den vier Alanin-Mutationen auf ca. 5:1 zugunsten der Cyclopropanierung mit der besten Variante.

5. Künstliche Hydrolasen

Metallohydrolasen sind in der Natur ubiquitär vorhanden und haben verschiedene Funktionen im zellulären Stoffwechsel. Es gibt viele Klassen, die verschiedene Metalle enthalten, um die gewünschten

Umwandlungen zu erreichen. Kim et al. entwickelten eine neue β -Lactamase aus einer Glyoxalase.^[64] Diese Enzyme unterscheiden sich sowohl im Metallcofaktor als auch in der Beschaffenheit des aktiven Zentrums. Die Forscher verwendeten eine dreistufige Sequenz, um dieses neue Enzym zu erhalten. Zuerst entfernten sie die für die Substraterkennung in der Glyoxylase II nötige C-terminale Domäne. Nach diesem Schritt war die Aktivität des Enzyms gegenüber dem natürlichen Substrat vollkommen unterdrückt. Der zweite Schritt war die Einführung von Mutationen, um die Affinität zu Zink zu steigern. Dies wurde durch den Einbau von zwei Cysteinresten sowie eines Tyrosins und einer Asparaginsäure zur Stabilisierung der Zinkbindung erreicht. Basierend auf einem Sequenzabgleich mit anderen Metallo- β -Lactamasen wurde schließlich eine neue Schleife eingebaut. Im letzten Schritt wurden mehrere Reste randomisiert, um die Feineinstellung für ausgewählte β -Lactamsubstrate zu ermöglichen. Nach der Überprüfung von 2.1×10^7 Mutanten wurden 13 positive Varianten identifiziert. Die beste Variante hatte die meisten der Mutationen in der Substratbindungsdomäne.

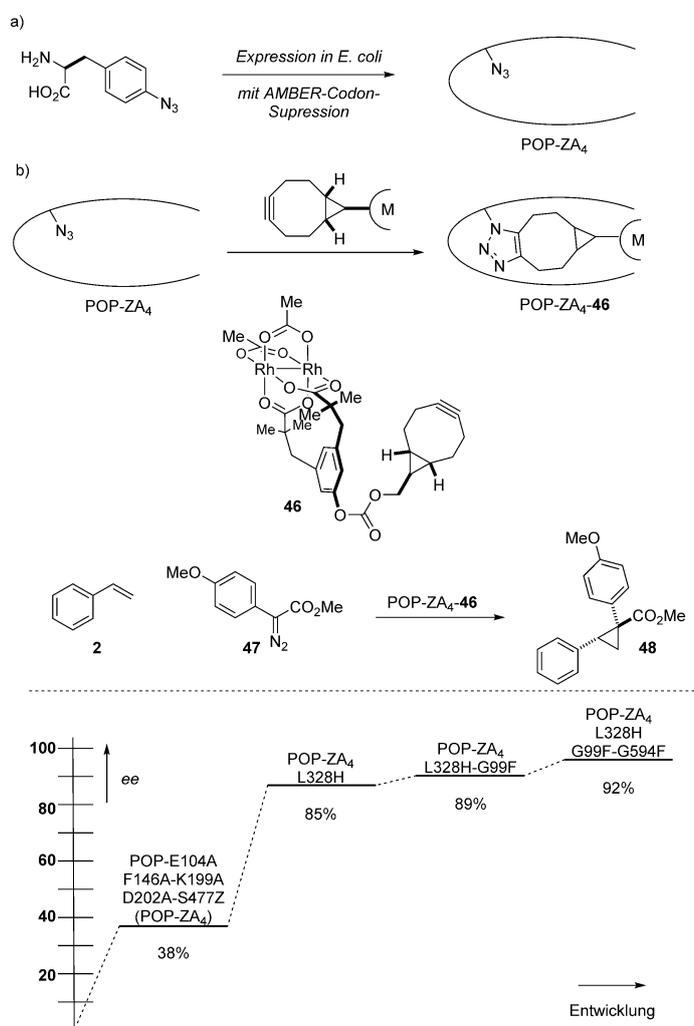


Abbildung 21. Entstehungsgeschichte der genetisch optimierten, künstlichen Cyclopropanase mit Prolyl-Oligopeptidase aus *Pyrococcus furiosus* (POP) als Wirtprotein.

Man könnte sich vorstellen, eine komplett neue Proteinfaltung zu entwickeln, um künstliche Metalloenzyme herzustellen. Dies ist besonders anspruchsvoll, da sich tertiäre und quartäre Proteinstrukturen schwer vorhersagen lassen. Tezcan und Song haben die Bildung von quartären Strukturen über Metallkoordination vorhergesagt, bestätigt und genutzt (Abbildung 22).^[65] Im Verlauf dieser Studien wurden Me-

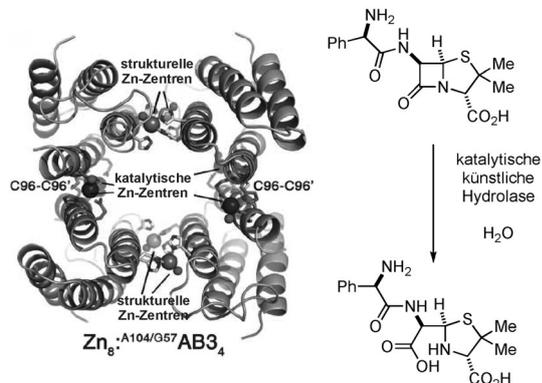


Abbildung 22. Eine künstliche Metallohydrolase aus supramolekularer Anordnung (PDB 4U9D).

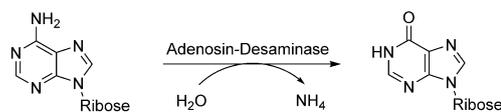
tallbindungen für die Herstellung und Aufrechterhaltung der Quartärstruktur eingesetzt, während andere Metallzentren als Katalysatoren fungierten. In den künstlichen Faltungen, die von Zink und cb562 (ein Häm-haltiges Vier-Helix-Bündel) generiert wurden, konnte beträchtliche Aktivität gegenüber *p*-Nitrophenylacetat und Ampicillin beobachtet werden, wenn flankierende Lysinreste zu Alanin mutiert wurden. Mutation von Resten proximal zur katalytisch aktiven Zink-Bindungsstelle lieferte eine Mutante mit ausgezeichneter Aktivität.

Metalloproteine ohne katalytische Funktion können mittels gerichteter Evolution zur Katalyse befähigt werden. Szostak und Seelig entdeckten, dass ausgehend von einem Retinoid-X-Rezeptorprotein durch Randomisierung der beiden Schleifen innerhalb seiner Zinkfingerdomäne eine RNA-Ligase-Aktivität induziert werden kann.^[66] Dazu wurde eine In-vitro-Selektion auf Basis eines mRNA-Displays durchgeführt. In diesen Studien wurde die kodierende mRNA kovalent an ihr kodiertes Protein gebunden. Reverse Transkription mit einem modifizierten Primer bindet das Substrat an den Protein/mRNA-Katalysator. Bei Behandlung mit einem kurzen RNA-Fragment und einem biotinylierten RNA-Fragment kuppeln die Proteine, die zur Katalyse der Reaktion in der Lage sind, das biotinylierte Fragment an das Fragment der reversen Transkription. Nach Selektion und Amplifikation kann der beste Katalysator identifiziert werden. Nach 17 Runden gerichteter Evolution wurde eine RNA-Ligase produziert, die einen Katalysator mit mehrfachen Turnover und einer zweimillionenfachen Steigerung gegenüber dem Startkomplex lieferte. Dieser einzigartige Ansatz demonstriert das Potenzial, vollkommen neue Reaktivitäten zu erreichen.

Auch Computer-gestütztes Design wurde genutzt, um die Enzymfunktion zu ändern. Baker et al. stützten sich auf

Rechnungen, um die Zink-haltige Adenosin-Desaminase aus Mäusen in eine Organophosphat-Hydrolase umzufunktionieren (Abbildung 23).^[71] Eine Suche in der Proteindaten-

ursprüngliche Funktion



neue Funktion

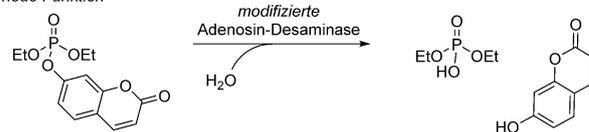


Abbildung 23. Eine künstliche Metallophosphatase nach Computer-gestütztem Design, kombiniert mit gerichteter Evolution.

bank (PDB) nach Proteinen, die Zinkzentren mit einer offenen Koordinationsstelle enthalten, lieferte in Kombination mit Rosetta-Design, um ein zur Geometrie des Substrats passendes aktives Zentrum zu formen, zwölf verschiedene Ergebnisse. Sechs der zwölf Konstrukte wurden als lösliche Proteine exprimiert, doch nur eines zeigte die gewünschte Reaktivität. Um die Reaktivität weiter zu verbessern, wurden zwölf Positionen nahe dem aktiven Zentrum mutiert, von denen fünf durch Computer-gestützte Rechnungen ermittelt wurden. Diese zwölf Sättigungsbibliotheken lieferten drei verbesserte Mutanten. Diese wurden unter Bildung einer Mutante mit 40-fach erhöhter Aktivität gegenüber dem Ursprungsprotein kombiniert. Durch eine zusätzliche Runde fehlerhafter Polymerasekettenreaktion wurden drei weitere Mutationen identifiziert. Eine letzte Runde Sättigungsmutagenese lieferte eine gegenüber dem Ursprungsprotein mehr als 2500-fach verbesserte Variante. Ein Vergleich der Kristallstruktur mit dem berechneten Modell bestätigte die ausgezeichnete Vorhersagekraft (einschließlich der Orientierung der Seitenketten) des Rosetta-Designs.

6. Ausblick

Jüngste Fortschritte der Gruppen von Arnold und Fasan versprechen eine große Zukunft für die Umnutzung bestehender Metalloproteinfunktionen, um präparativ nützliche, in der Natur bislang unbekannte Reaktionen zu katalysieren. Ihre Häm-haltigen Enzyme entwickelten eine Funktionsfähigkeit in zellulärer Umgebung; die umfunktionierten Enzyme können daher entweder in vivo oder in Gegenwart von Zelllysaten durchmustert werden. Dies bedeutet einen großen Vorteil für Zwecke der gerichteten Evolution, weil der Optimierungsprozess auf diese Weise signifikant beschleunigt wird. Dasselbe gilt für die Zn-haltigen künstlichen Hydrolasen, die entwickelt wurden, ohne dass eine aufwändige Reinigung der Proteinproben notwendig war.^[61–63]

Im Gegensatz dazu werden die meisten abiotischen, metallhaltigen Cofaktoren in Gegenwart zellulärer Extrakte gehemmt. Dieses Problem beschränkt auch den Einsatz von

Übergangsmetallkatalysatoren für chemisch-biologische Anwendungen.^[67] Interessanterweise bleibt die katalytische Funktion von Dirhodiumtetracarboxylat-Motiven in Zellysaten erhalten.^[68] Diese Eigenschaft haben Lewis et al. zur Entwicklung einer künstlichen Cyclopropanase elegant genutzt (Abbildung 21). Dies ist ein seltenes Beispiel für einen biokompatiblen Edelmetallkatalysator.^[69] Alternativ wurden chemische Reagentien (Michael-Akzeptoren oder Oxidationsmittel) genutzt, um Inhibitoren zu neutralisieren und damit das Screening von $[\text{Cp}^*\text{Ir}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ in Gegenwart von Zellysaten zu ermöglichen (Abbildung 12).^[12] Affinitätsmarker oder Chromatographie könnten für die parallele Aufreinigung von Wirtproteinen eingesetzt werden.^[42,44]

Aus unserer Sicht liegen die interessantesten Perspektiven bei künstlichen Metalloenzymen wohl auf dem Gebiet der synthetischen Biologie. Tatsächlich könnte die Ergänzung der metabolischen Pfade mit der katalytischen Leistung abiotischer Metallcofaktoren in vivo faszinierende Perspektiven für die Synthese von Biokraftstoffen oder Produkten hoher Wertschöpfung eröffnen. Vor der Realisierung gilt es allerdings noch folgende Aufgaben zu bewältigen: 1) Cofaktoraufnahme in vivo, 2) effiziente Biokonjugation des Cofaktors und 3) In-vivo-Kaskadenreaktionen, um künstliche Metalloenzyme und natürliche Enzyme zu verbinden.

Danksagung

T.R.W. dankt dem Schweizerischen Nationalfonds für die großzügige, dauerhafte Unterstützung der Forschung zu künstlichen Metalloenzymen.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7344–7357
Angew. Chem. **2016**, *128*, 7468–7482

- [1] a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185; b) J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 492.
- [2] a) R. E. Cobb, N. Sun, H. Zhao, *Methods* **2013**, *60*, 81; b) P. A. Romero, F. H. Arnold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 866; c) C. Jäckel, P. Kast, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 153; d) E. M. Brustad, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 201.
- [3] A. Currin, N. Swainston, P. J. Day, D. B. Kell, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1172.
- [4] a) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694; b) A. Zaks, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 130; c) A. Wells, H. P. Meyer, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 918; d) N. J. Turner, A. Wells, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 900; e) C. K. Savile et al., *Science* **2010**, *329*, 305; f) G. DeSantis et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476.
- [5] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 3408.
- [6] a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504; b) B. K. Liu, X. F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966.
- [7] S. K. Ma et al., *Green Chem.* **2010**, *12*, 81.
- [8] a) K. Yamamura, E. T. Kaiser, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 830; b) H. L. Levine, Y. Nakagawa, E. T. Kaiser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *76*, 64.
- [9] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
- [10] Aktuelle Übersichten: a) J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2954; b) M. Dürrenberger, T. R. Ward, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 99; c) T. Matsuo, S. Hirota, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5638; d) F. Yu, V. M. Cangelosi, M. L. Zastrow, M. Tegoni, J. S. Plegaria, A. G. Tebo, C. S. Mocny, L. Ruckthong, H. Qayyum, V. L. Pecoraro, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3495; e) O. Pàmies, M. Diéguez, J.-E. Bäckvall, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1567.
- [11] A. Ilie, M. T. Reetz, *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 51.
- [12] Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, E. Nogueira, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8928.
- [13] a) G.-D. Roiban, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2208; b) J. A. McIntosh, C. C. Farwell, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 126; c) R. Fasan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *13*, 637.
- [14] a) J. R. Wolf, C. G. Hamaker, J.-P. Djukic, T. Kodadek, L. K. Woo, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9194; b) B. Morandi, A. Dolva, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2162.
- [15] T. K. Hyster, F. H. Arnold, *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 14.
- [16] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, *339*, 307.
- [17] Z. J. Wang, N. E. Peck, H. Renata, F. Arnold, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 598.
- [18] 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.
- [19] T. Heel, J. A. McIntosh, S. C. Dodani, J. T. Meyerowitz, F. H. Arnold, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2556.
- [20] Z. J. Wang, H. Renata, N. E. Peck, C. C. Farwell, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6810; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6928.
- [21] J. A. McIntosh, T. Heel, A. R. Buller, L. Chio, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13861.
- [22] H. Renata, Z. J. Wang, R. Z. Kitto, F. H. Arnold, *Catal. Sci. Technol.* **2014**, *4*, 3640.
- [23] 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; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9479.
- [24] R. Singh, M. Bordeaux, R. Fasan, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 546.
- [25] T. K. Hyster, C. C. Farwell, A. R. Buller, J. A. McIntosh, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15505.
- [26] R. Singh, J. N. Kolev, P. A. Sutera, R. Fasan, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 1685.
- [27] C. C. Farwell, J. A. McIntosh, T. K. Hyster, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8766.
- [28] C. C. Farwell, R. K. Zhang, J. A. McIntosh, T. K. Hyster, F. H. Arnold, *ACS Cent. Sci.* **2015**, *1*, 89.
- [29] Versuche, Myoglobin in eine effiziente Peroxygenase umzuwandeln: S.-I. Ozaki, T. Matsui, Y. Watannabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9784.
- [30] H. Sato, T. Hayashi, T. Ando, Y. Hisaeda, T. Ueno, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 436.
- [31] T.-S. Lai, F.-Y. Chan, P.-K. So, D.-L. Ma, K.-Y. Wong, C.-M. Che, *Dalton Trans.* **2006**, 4845.
- [32] G. Sreenilayam, R. Fasan, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1532.
- [33] M. Bordeaux, V. Tyagi, R. Fasan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1744; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1764.
- [34] V. Tyagi, R. B. Bonn, R. Fasan, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2488.
- [35] M. Bordeaux, R. Singh, R. Fasan, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5697.
- [36] Übersichten: a) T. R. Ward, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 47; b) „Metal-Catalyzed Organic Transformations inside a Protein Scaffold Using Artificial Metalloenzymes“: V. K. K. Praneeth, T. R. Ward, *Coordination Chemistry in Protein Cages: Principles, Design, and Applications* (Hrsg.: T. Ueno, Y. Watanabe), Wiley-VCH, Weinheim, **2013**, S. 203–220.
- [37] Y. Pazy, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30892.

- [38] J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.
- [39] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U. E. Rusbandi, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7764; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7942.
- [40] M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14411.
- [41] U. E. Rusbandi, C. Lo, M. Skander, A. Ivanova, M. Creus, N. Humbert, T. R. Ward, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1923.
- [42] M. T. Reetz, J. J.-P. Peyralans, A. Maichele, Y. Fu, M. Maywald, *Chem. Commun.* **2006**, 4318.
- [43] a) C. Letondor, N. Humbert, T. R. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4683; b) C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320.
- [44] M. Creus, A. Pordea, T. Rossel, A. Sardo, C. Letondor, A. Ivanova, I. LeTrong, R. E. Stenkamp, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1400; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1422.
- [45] a) 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; b) O. W. Gooding, R. Voldari, A. Bautista, T. Hopkins, G. Huisman, S. Jenne, S. Ma, E. C. Mundorff, M. M. Savile, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 119; c) J. Liang, E. Mundorff, R. Voldari, S. Jenne, L. Gibson, A. Conway, A. Krebber, J. Wong, G. Huisman, S. Trusdell, J. Lalonde, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 188; d) R. Stuermer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 203; e) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585.
- [46] a) P. N. Scheller, S. Fademrecht, S. Hofelzer, J. Pleiss, F. Leipold, N. J. Turner, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2201; b) D. Wetzl, M. Berrera, N. Sandon, D. Fishlock, M. Ebeling, M. Müller, S. Hanton, B. Wirz, H. Iding, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1749.
- [47] a) M. Dürrenberger, T. Heinisch, Y. M. Wilson, T. Rossel, E. Nogueira, L. Knörr, A. Mutschler, K. Kersten, M. J. Zimbron, J. Pierron, T. Schirmer, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3026; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3082.
- [48] V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 93.
- [49] O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247.
- [50] a) C. A. Denard, M. J. Bartlett, J. Wang, L. Lu, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3817; b) C. A. Denard, H. Huang, M. J. Bartlett, L. Lu, Y. Tan, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 465; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 475.
- [51] a) S. Wallace, E. P. Balskus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7106; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 7212; b) G. Sirasani, L. Tong, E. P. Balskus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7785; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7919.
- [52] F. Schwizer, V. Köhler, M. Dürrenberger, L. Knörr, T. R. Ward, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1752.
- [53] J. M. Zimbron, T. Heinisch, M. Schmid, D. Hamels, E. S. Nogueira, T. Schirmer, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5384.
- [54] T. K. Hyster, L. Knörr, T. R. Ward, T. Rovis, *Science* **2012**, *338*, 500.
- [55] J. Pierron, C. Malan, M. Creus, J. Gradinaru, I. Hafner, A. Ivanova, A. Sardo, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 701; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 713.
- [56] A. Chatterjee, H. Mallin, J. Klehr, J. Vallapurackal, A. D. Finke, L. Vera, M. Marsh, T. R. Ward, *Chem. Sci.* **2016**, *6*, 673.
- [57] F. Monnard, E. Nogueira, T. Heinisch, T. Schirmer, T. R. Ward, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3269.
- [58] T. Heinisch, M. Pellizzoni, M. Dürrenberger, C. E. Tinberg, V. Köhler, J. Klehr, D. Häussinger, D. Baker, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10414.
- [59] J. Bos, F. Fusetti, A. J. M. Driessen, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7472; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7590.
- [60] J. Bos, A. García-Herraiz, G. Roelfes, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3578.
- [61] I. Drienovská, A. Rioz-Martínez, A. Draksharapu, G. Roelfes, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 770.
- [62] H. Yang, P. Srivastava, C. Zhang, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 223.
- [63] P. Srivastava, H. Yang, K. Ellis-Guardiola, J. C. Lewis, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7789.
- [64] H.-S. Park, S.-H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, H.-S. Kim, *Science* **2006**, *311*, 535.
- [65] W. J. Song, F. A. Tezcan, *Science* **2014**, *346*, 1525.
- [66] B. Seelig, J. W. Szostak, *Nature* **2007**, *448*, 828.
- [67] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108.
- [68] Z. T. Ball, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 560.
- [69] P. K. Sasmal, C. N. Streu, E. Meggers, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1581.
- [70] J. A. McIntosh, T. Heel, A. R. Buller, L. Chio, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13861–13865.
- [71] S. D. Khare, Y. Kipnis, P. J. Greisen, R. Takeuchi, Y. Ashani, M. Goldsmith, Y. Song, J. L. Gallaher, I. Silman, H. Leader, J. L. Sussman, B. L. Stoddard, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 29.

Eingegangen am 20. September 2015

Online veröffentlicht am 11. März 2016

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim