

## Halogenase-Aktivität

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201605635

Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201605635



## Ein Hochdurchsatz-Fluoreszenz-Assay zur Bestimmung der Aktivität von Tryptophan-Halogenasen

Christian Schnepel, Hannah Minges<sup>+</sup>, Marcel Frese<sup>+</sup> und Norbert Sewald<sup>\*</sup>

In memoriam Klaus Burger

**Abstract:** Die Anwendung von Tryptophan-Halogenasen für die enzymatische Halogenierung hat noch gravierende Limitierungen. Diese könnten mittels gerichteter Evolution überwunden werden, jedoch bedarf die Durchmusterung großer Mutantenbibliotheken eines robusten Hochdurchsatz-fähigen Testsystems. Im Hinblick darauf wurde eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung als quantitativer Halogenase-Assay auf Basis der Bildung eines fluoreszierenden Aryltryptophans entwickelt. Die Methode wurde für die Anwendung im *E.-coli*-Lysat ohne intermediäre Aufarbeitung optimiert und ermöglicht es, halogenierte Tryptophanderivate mit hoher Spezifität in der Mikrotiterplatte quantitativ nachzuweisen. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurde eine thermostabile Tryptophan-6-Halogenase gefunden, indem mittels fehlerbehafteter PCR eine Mutantenbibliothek erzeugt wurde, die mithilfe der fluorogenen Kreuzkupplung auf erhöhte Thermostabilität durchmustert wurde. Diese Methode lieferte eine verbesserte Enzymvariante mit deutlich gesteigerter Stabilität sowie 2.5-fach verbesserter Aktivität.

Im Laufe der Evolution hat sich in der Natur ein umfangreicher Baukasten zur biokatalytischen C-H-Funktionalisierung entwickelt, der auch für die chemo-enzymatische Synthese unter milden Reaktionsbedingungen genutzt werden kann.<sup>[1]</sup> In diesem Kontext ist z. B. die enzymatische Halogenierung von hohem Interesse, weil der biochemische Prozess lediglich Sauerstoff, den Kofaktor FADH<sub>2</sub> sowie Halogenidsalze für die nachhaltige Synthese von Arylhalogeniden erfordert, um mit oftmals hoher Regiospezifität Halogensubstituenten in organische Verbindungen einzufügen.<sup>[2]</sup> Die wegweisenden Arbeiten der Gruppen von van Pée und Walsh trugen maßgeblich zur Entdeckung und Charakterisierung der Flavin-abhängigen Tryptophan-Halogenasen bei, die einen beeindruckenden Halogenierungsmechanismus offenbarten.<sup>[3–7]</sup> Dies ebnete den Weg, um diese Biokatalysatoren für die Halogenierung von L-Tryptophan (Trp) und ver-

wandten Derivaten für die organische Synthese zu erschließen.<sup>[8,9]</sup> Leider ist ihre praktische Anwendbarkeit durch geringe Effizienz und unzureichende Stabilität stark begrenzt. Wir konnten dieses Manko teilweise beheben, indem wir 2015 die Stabilität der Trp-7-Halogenase RebH durch vernetzte Enzymaggregate steigerten, womit die beliebig skalierbare regioselektive Bromierung bis zum Gramm-Maßstab möglich war.<sup>[10]</sup> Lewis et al. verfolgten hingegen zufallsbasierte Mutagenese, um die Thermostabilität und Lebensdauer von RebH zu verbessern.<sup>[11]</sup> Dies führte zu einer stabileren Mutante mit höherer thermischer Stabilität, die aber eine verringerte katalytische Effizienz aufwies. Neuere Ansätze trugen dazu bei, auf Basis rationaler und zufallsbasierter Strategien das Substratspektrum in Richtung verschiedener aromatischer Substrate zu erweitern.<sup>[12,13]</sup> Dennoch waren die anfänglichen Bestrebungen, verbesserte Halogenasen durch gerichtete Evolution auf Basis von UHPLC-Screenings zu konstruieren, wegen des geringen Durchsatzes stark begrenzt. Gewöhnlich beruhen effiziente und robuste Testsysteme auf Kolorimetrie oder Fluoreszenz und erlauben mit großem Erfolg, deutlich größere Mutantenbibliotheken in Mikrotiterplatten, Zellsortierern oder direkt auf Agarplatten zu selektionieren.<sup>[14–18]</sup> Für die Halogenasen wurde als Alternative zu einem HPLC-basierten Assay die Addition von Aminin an Chinone berichtet, die es ermöglichte, die Halogenierung von Arylaminen kolorimetrisch zu verfolgen.<sup>[19]</sup> Vor kurzem wurde außerdem von Lewis et al. über ein MALDI-ToF-MS-Testverfahren berichtet, in dem Deuterium-markiertes Tryptamin als Substrat verwendet wurde, um die Regioselektivität von RebH durch gerichtete Evolution zu modifizieren.<sup>[20]</sup>

Aufgrund der begrenzten Anwendbarkeit vorangegangener Tests sahen wir uns veranlasst, einen universellen Halogenase-Assay für das Zellysate zu entwickeln, der überwiegend unabhängig von anderen funktionellen Gruppen sein und den eingeführten Halogensubstituenten spezifisch modifizieren sollte. Daher wendeten wir uns Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen zu, die sich durch eine ausreichende Bioorthogonalität auszeichnen.<sup>[21,22]</sup> Wir nahmen an, dass das resultierende Biaryl-Reaktionsprodukt deutlich unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften aufweisen sollte, wie bereits von Goss et al. demonstriert wurde.<sup>[23]</sup> Insbesondere die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung (SMK) sollte für diesen Zweck geeignet sein, weil der Katalysator wässrige Reaktionsmedien toleriert, die eingesetzten Boronsäuren überwiegend stabil und keine Schutzgruppen erforderlich sind.<sup>[24]</sup> Die Forschungsgruppen von Goss und O'Connor hatten zuvor die SMK zur Derivatisierung von Naturstoffen genutzt, um

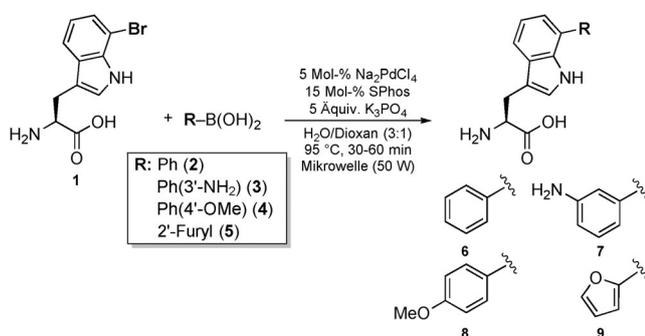
[\*] C. Schnepel, H. Minges,<sup>[+]</sup> Dr. M. Frese,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. N. Sewald  
Organische und Bioorganische Chemie  
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld  
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)  
E-Mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de  
Homepage: <http://www.uni-bielefeld.de/chemie/oc3sewald/>

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen (detaillierte Beschreibung der experimentellen Vorschriften) und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605635> zu finden.

funktionalisierte Peptide und Indolalkaloide zu synthetisieren.<sup>[25,26]</sup> Darauf aufbauend veröffentlichten wir jüngst eine Eintopfsynthese bestehend aus In-situ-Bromierung, SMK und *N*<sup>α</sup>-Boc-Schutzung, mit der wir Aryl-substituierte Tryptophane herstellen konnten.<sup>[27]</sup> Unabhängig von unseren Arbeiten verwendeten Lewis et al. parallel Rohextrakte der halogenierten Verbindungen zur Arylierung und Buchwald-Hartwig-Aminierung oder Alkoxylierung.<sup>[28]</sup> Eine umfassende Studie von Micklefield et al. beschäftigte sich mit der Katalysator-kontrollierten C-H-Funktionalisierung bestehend aus Biohalogenierung und SMK im Eintopfprozess.<sup>[29]</sup> Dabei stellte sich heraus, dass die räumliche Trennung von Halogenase und Metallkatalysator ein vielversprechender Ansatz ist, um die intrinsische Inkompatibilität von enzymatischer Halogenierung und Metallkatalyse zu überwinden.

Zur Entwicklung des Halogenase-Assays begannen wir, verschiedene Aryltryptophane herzustellen, um geeignete Sonden für den Test zu identifizieren (Abbildung 1). Die Synthese der C7-substituierten Verbindungen **6–9** gelang mit



**Abbildung 1.** Synthese von C7-Aryl-substituierten Tryptophanderivaten.

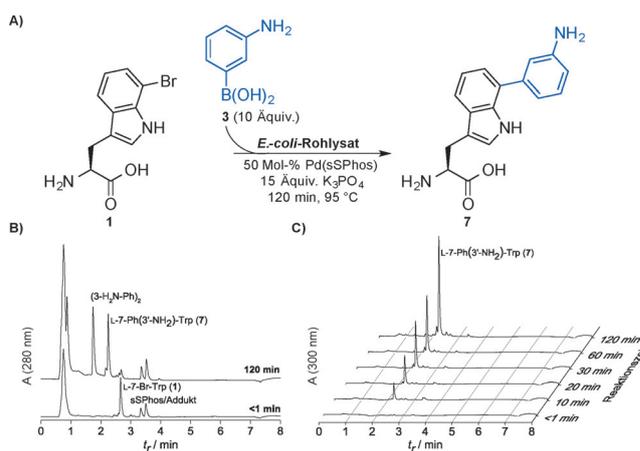
5 Mol-%  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  zusammen mit dem Buchwald-Liganden sPhos,<sup>[30,31]</sup> 2 Äquiv. Boronsäure sowie  $\text{K}_2\text{CO}_3$  oder  $\text{K}_3\text{PO}_4$ . Die UV-absorptionsspektroskopische Untersuchung zeigte für Trp und die meisten der untersuchten Derivate eine starke Absorption unterhalb  $\lambda = 225$  nm (Tabelle 1; SI1 in den Hintergrundinformationen). Trp und **1** wiesen außerdem ein Maximum bei  $\lambda = 280$  nm auf, während die Spektren der Derivate **6–9** bathochrom zu  $\lambda = 300–320$  nm verschoben waren. Anhand dieser Beobachtungen ließ sich der starke Einfluss der eingeführten Aryl-Gruppe auf die spektroskopischen Eigenschaften erkennen (Tabelle 1). Obwohl **9** die größte Rotverschiebung des Spektrums aufwies, entschieden wir uns, stattdessen das Anilinderivat **7** näher zu untersuchen. Diese vielversprechende Zielverbindung für den Halogenase-

**Tabelle 1:** Übersicht der spezifischen UV-Absorptionsmaxima von Tryptophan und seinen C7-substituierten Derivaten bei pH 7 und 20 °C.

R-B(OH) <sub>2</sub>	Verbindung	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]
–	L-Tryptophan	280
–	L-7-Bromtryptophan ( <b>1</b> )	284
<b>2</b>	L-7-Phenyltryptophan ( <b>6</b> )	300
<b>3</b>	L-7-(3'-Aminophenyl)tryptophan ( <b>7</b> )	300
<b>4</b>	L-7-(4'-Methoxyphenyl)tryptophan ( <b>8</b> )	297
<b>5</b>	L-7-(2'-Furyl)tryptophan ( <b>9</b> )	317

Assay zeichnet sich durch erhöhte Wasserlöslichkeit aus, und zudem ermöglicht es die zusätzliche  $\text{NH}_2$ -Gruppe, halogenierte Indole, die im Allgemeinen nur schwer ionisierbar sind, durch LC-MS nachzuweisen.

Die nachfolgende Anwendung der SMK im Bakterienrohlysat war anspruchsvoll. Wir begannen die Optimierung der Reaktionsbedingungen im *E. coli*-Lysat mit der Tryptophan-Halogenase RebH. Diese wurde zur Bromierung von 5 mM Trp eingesetzt, um in situ **1** mit >99% Endumsatz zu generieren (SI2). Dieses Rohlysat, das die bromierte Verbindung **1** enthielt, fungierte in folgenden Experimenten als Modellsystem für die SMK (Abbildung 2 A). Die schrittweise



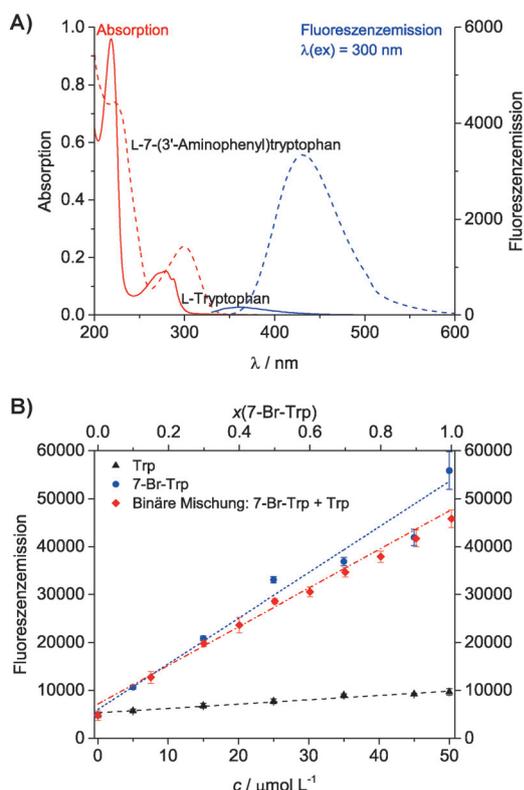
**Abbildung 2.** A) SMK zwischen Arylhalogenid **1** und Boronsäure **3** im *E. coli*-Lysat. B) Das Diagramm der RP-HPLC bei  $\lambda = 280$  nm für die Kreuzkupplung im Rohlysat zeigt annähernd vollständigen Umsatz von **1** nach 120 min Inkubation bei 95 °C. Die erfolgreiche Synthese von **7** wurde mittels LC-MS sowie durch Vergleich mit authentischem Standard bestätigt. Spuren von Chlortryptophan verblieben im Lysat, und das Homokupplungsprodukt 3,3'-Diaminobiphenyl wurde als dominantes Nebenprodukt identifiziert. C) Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Kreuzkupplung bei  $\lambda = 300$  nm detektiert in dem Bereich des Spektrums lediglich das Produkt **7** ( $t_{\text{R}} = 2.2$  min), dessen Synthese quantitativ nachverfolgt werden kann. sSPhos = Natrium 2'-Dicyclohexylphosphanyl-2,6-dimethoxy-1,1'-biphenyl-3-sulfonat-Hydrat.

Optimierung (siehe Hintergrundinformationen für eine detaillierte Beschreibung) ergab schließlich eine robuste Synthesevorschrift, die für die Screening-Reaktion im Lysat anwendbar war. Die verbesserten Reaktionsbedingungen lieferten >98% Endumsatz zum Produkt **7** nach 120 min, wie durch HPLC und LC-MS gezeigt, während geringe Mengen Chlortryptophan nicht umgesetzt wurden und als Nebenreaktion die Sauerstoff-induzierte Homokupplung der Boronsäure vorherrschte. Das HPLC-Signal bei 3.3 min ließ sich dem wasserlöslichen sPhos-Liganden zuordnen. Außerdem wurde ein Addukt zwischen dem Liganden und **3** als Nebenprodukt identifiziert (Abbildung 2B; SI6). Die zusätzliche Untersuchung des Reaktionsfortschritts über die UV-Absorption bei  $\lambda = 300$  nm (Abbildung 2C) ermöglichte es, die Bildung des Chromophors **7** spezifisch zu beobachten, während die Ausgangsverbindung sowie andere Reaktionskomponenten in diesem Spektralbereich nicht detektiert wurden. Diese Ergebnisse stellten einen essenziellen Aus-

gangspunkt für die weitere Entwicklung des Hochdurchsatz-Halogenase-Tests dar.

Zusätzlich wurden die Fluoreszenzeigenschaften von **7** untersucht, wobei sich ein Emissionsmaximum von  $\lambda = 430$  nm für eine Anregung im Bereich zwischen  $\lambda = 280$  und  $300$  nm ergab. Im Unterschied dazu zeigte Trp keine Fluoreszenz in diesem Spektralbereich (Abbildung 3 A; SI7). Zudem ist erwähnenswert, dass die Fluoreszenz von Bromtryptophan (**1**) deutlich schwächer war als die anderer Derivate. Demzufolge wäre ein Fluoreszenz-Assay, der lediglich auf der Einführung des Br-Substituenten beruht, aufgrund hoher Autofluoreszenz zellulärer Kontaminationen ungeeignet.

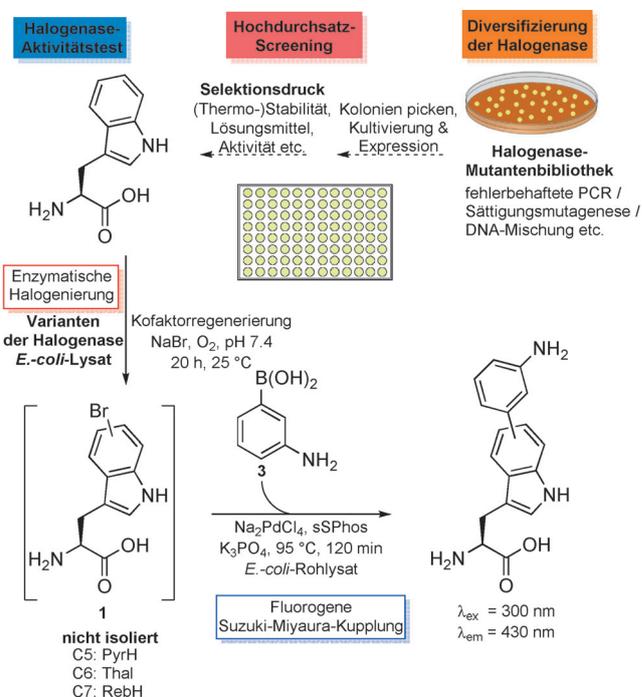
Im Hinblick auf die Hochdurchsatz-Anwendung wurde die Konzentrationsabhängigkeit im Mikrotiterplattenformat untersucht. Lysat-Proben, die entweder Trp oder **1** enthielten, wurden mit Boronsäure **3** unter Anwendung der zuvor optimierten Bedingungen zur SMK inkubiert und nach Reaktionsende am Mikrotiterplattenleser durch Fluoreszenzmessung ausgewertet (Abbildung 2 A). Das Fluoreszenzsignal nahm mit der Konzentration der bromierten Aminosäure



**Abbildung 3.** UV-Absorptions- (rot) und Fluoreszenzemissionsspektrum (blau,  $\lambda_{ex} = 300$  nm). Das Absorptionsspektrum von **7** (-----) ist gegenüber dem von Trp (—) bathochrom verschoben, mit  $\lambda_{max} = 300$  nm sowie einem rotverschobenen Fluoreszenzemissionsmaximum bei  $\lambda_{max} = 425$  nm, während Trp nur schwache Fluoreszenz in diesem Bereich zeigt. B) Die Kalibrierung des Fluoreszenzsignals ( $\lambda_{ex} = 300$  nm;  $\lambda_{em} = 430$  nm) auf die Konzentration bestätigt die Spezifität für die bromierte Aminosäure im Hochdurchsatztest (untere Achse: Konzentration von Trp oder Bromtryptophan **1**) sogar in einem binären Gemisch aus Trp und dem bromierten Derivat (obere Achse: molares Verhältnis von 7-Bromtryptophan).

**1** zu, während Kontrollproben mit Trp insgesamt nur schwache Fluoreszenz zeigten (Abbildung 3 B). Zur weiteren Validierung testeten wir RebH-Lysat, das gleichzeitig die beiden Komponenten Trp und **1** in variierendem molarem Verhältnis enthielt. Es resultierte eine analoge lineare Abhängigkeit des Emissionssignals bei  $\lambda = 430$  nm von der Produktkonzentration, das durch nicht-bromiertes Trp in der binären Mischung unbeeinflusst blieb. Um das Anwendungsspektrum zu erweitern, wendeten wir den Assay auch auf die Trp-5- und Trp-6-Halogenasen PyrH<sup>[32]</sup> bzw. Thal<sup>[33]</sup> an. Entsprechend zum oben beschriebenen Verfahren wurden die C5- und C6-Aryl-substituierten Isomere zu Verbindung **7** synthetisiert. Trotz der weniger begünstigten Kupplung in der elektronenreichen C5-Position und schwächerer Fluoreszenz waren auch die C5- und C6-substituierten Analyten geeignet, um die PyrH- und Thal-Aktivität im Lysat nachzuweisen (SI8–10).

Abschließend strebten wir an, eine thermostabile Tryptophan-6-Halogenase durch Anwendung der fluorogenen SMK zu erzeugen, und entwickelten eine geeignete Hochdurchsatz-Strategie (Abbildung 4). Um die Durchführung des Tests zu vereinfachen, wurden versiegelte Mikrotiterplatten zur Durchführung der SMK in einem Trocknungs-ofen bei  $95^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt, wodurch ein erhöhter Durchsatz möglich war. Eine Thal-Mutantenbibliothek mit durchschnittlich zwei Mutationen wurde durch fehlerbehaftete Polymerasekettenreaktion (PCR) erzeugt, und die resultierenden Bakterienkolonien wurden in der Mikrotiterplatte zur Expression der Genvarianten kultiviert. Nach der Zellyse wurden die Bibliotheken 20 min bei  $49^{\circ}\text{C}$  behandelt, um auf erhöhte Thermostabilität zu selektionieren, denn in vorherigen Experimenten war gezeigt worden, dass der Wildtyp oberhalb

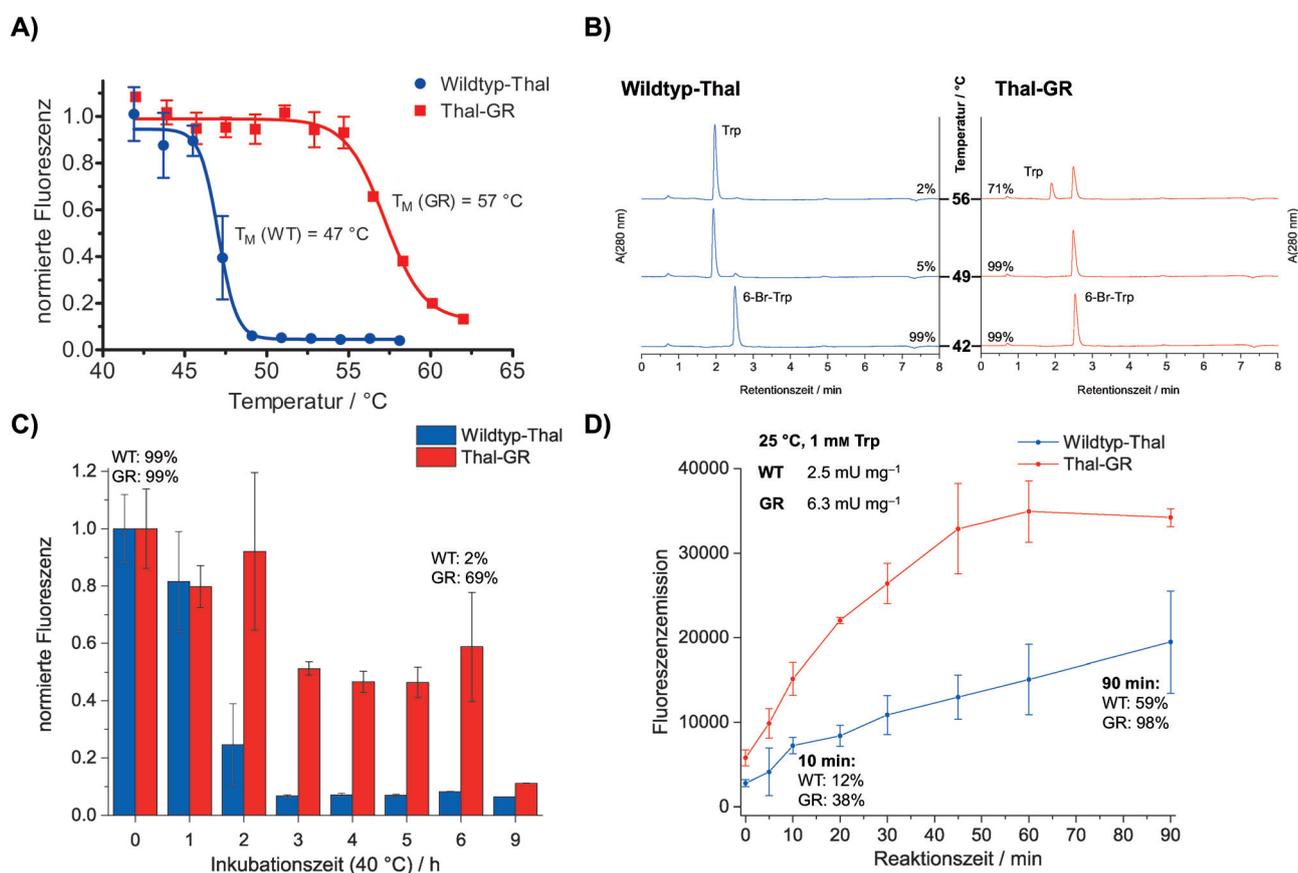


**Abbildung 4.** Schema zur gerichteten Evolution von Halogenasen unter Anwendung der SMK für den Nachweis der Enzymaktivität. Mit Hilfe dieser Methode wird der Selektionsprozess der Mutantenbibliotheken deutlich vereinfacht.

45 °C die katalytische Aktivität vollständig verliert. Die hitzebehandelten Thal-Bibliotheken wurden zur Bromierung von 5 mM Trp bei 25 °C eingesetzt, gefolgt von der Hochdurchsatz-SMK, um den verbliebenen Substratumsatz in der Mikrotiterplatte zu bestimmen. Parallel dazu wurden Kontrollplatten ohne vorherige Wärmebehandlung analog untersucht, um Expressionsmutanten vorab ausschließen zu können. Die Durchmusterung von 300 Klonen führte schließlich zu einer Thal-Variante mit deutlich erhöhtem Endumsatz. Sequenzierung der Plasmid-DNA des entsprechenden Klons ergab die beiden Punktmutationen S359G und K374R (im weiteren Verlauf als Thal-GR bezeichnet), die näher untersucht werden sollten. Da sich die Einführung eines selten verwendeten AGA-Basentriplets, das für R374 codiert, negativ auf die Proteinausbeute auswirkte, musste dieses gegen das in *E. coli* häufiger genutzte CGT-Codon ausgetauscht werden, wodurch eine vergleichbar hohe Genexpression wie beim Wildtyp erreicht wurde (SI11).

Proben des gereinigten Proteins wurden 20 min bei Temperaturen zwischen 40.0 und 62.5 °C behandelt und danach bei 25 °C auf Bromierungsaktivität getestet, um die

Denaturierung des Enzyms zu bestimmen. Dabei fanden wir, dass der halbmaximale Inaktivierungspunkt ( $T_M$ ) von 47 °C (Wt-Thal; Wt = Wildtyp) auf 57 °C (Thal-GR) zunahm (Abbildung 5A). Während die Aktivität von Wt-Thal oberhalb 45 °C stetig unter 5% sank, erreichte die thermostabile Variante Thal-GR bei 49 °C > 99% Endumsatz und erreichte bei 56 °C noch 71% Umsatz (Abbildung 5B). Außerdem untersuchten wir die Lebensdauer der Halogenase durch Inkubation bei 40 °C für unterschiedliche Zeiträume und setzten den Biokatalysator anschließend zur Bromierung bei Raumtemperatur ein. Während das Wt-Enzym bereits nach 2–3 h signifikant an Aktivität verloren hatte, wie auch durch Präzipitatbildung sichtbar wurde, war Thal-GR noch nach 6 h Inkubation aktiv mit 69% Endumsatz (Abbildung 5C). Die Untersuchung der Enzymaktivität belegte einen raschen Anstieg des bromierten Produkts innerhalb von 90 min, während Wt-Thal nur 59% des Substrats in diesem Zeitraum umsetzte (Abbildung 5D). Aus dem linearen Bereich bestimmten wir die spezifische Aktivität, wobei hervorzuheben ist, dass Thal-GR eine 2.5-fach höhere Aktivität als Wt-Thal aufwies. Dieser Befund bestätigte zweifelsfrei, dass wir einen



**Abbildung 5.** Bestimmung der Katalysatoreigenschaften von Wt-Thal und Thal-GR. A) Fluoreszenzdaten, die mit dem Endumsatz nach 20-stündiger Inkubation bei 25 °C korrelieren, wurden auf eine Kontrollreaktion ohne vorherige Wärmebehandlung mit vollem Endumsatz normiert. Die sigmoidale Regression ergibt, dass die Denaturierungstemperatur von Thal-GR um 10 K erhöht ist. B) Das Diagramm der RP-HPLC der Halogenierungsreaktion nach thermischer Inkubation belegt die erhöhte thermische Beständigkeit von Thal-GR. C) Das Ergebnis der Langzeitinkubation bei 40 °C indiziert die erhöhte Katalysatorlebensdauer von Thal-GR für mindestens 6 h. D) Der zeitliche Reaktionsverlauf bei 25 °C demonstriert, dass Thal-GR eine ca. 2.5-fach höhere Aktivität aufweist und bereits nach 90 min vollen Umsatz erreicht. Reaktionsbedingungen: A/B/C: 5 mM Trp, 30 µM (A) oder 11 µM Thal (B/C); D: 1 mM Trp, 7 µM Thal. Allgemeine Bedingungen: 2.5 U mL<sup>-1</sup> PrnF, 1 U mL<sup>-1</sup> ADH, 10 µM FAD, 1 mM NAD<sup>+</sup> mit 30 mM NaBr und 5% iPrOH bei 25 °C. Die Reaktionsansätze wurden über SMK entsprechend Abbildung 4 ausgewertet. Der relative Umsatz wurde mittels HPLC aus dem Flächenverhältnis der Signale von Trp zu 6-Bromtryptophan berechnet.

signifikant effizienteren Halogenierungskatalysator erhalten hatten. Darüber hinaus wiesen wir nach, dass die Mutationen nicht die Regioselektivität von Thal beeinflussten und L-6-Bromtryptophan als einziges Isomer isoliert wurde (siehe Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend erfordert die Optimierung von Halogenasen durch gerichtete Evolution einen einfachen Assay für das Hochdurchsatzformat, um allgemeine Defizite der chemo-enzymatischen Halogenierung überwinden zu können. Daher konzentrierten sich unsere Anstrengungen auf die Entwicklung eines robusten Kreuzkupplungsbasierten Testsystems mit einem spektroskopischen Nachweis im Zelllysate. Dafür identifizierten wir das Kupplungsprodukt aus 3-Aminophenylboronsäure (**3**) und Bromtryptophan als geeignete Fluoreszenzsonde und entwickelten einen Halogenase-Aktivitätstest mit hoher Spezifität für 5-, 6- und 7-Bromtryptophan im Mikrotiterplattenformat. Im Unterschied zu zuvor publizierten Halogenase-Assays<sup>[19,20]</sup> bietet die fluorige SMK eine einfache und rasche Durchmusterung von Klonbibliotheken mit breitem Anwendungsspektrum. Lediglich die Inkubation in einem Ofen ist nötig, um einen nahezu unbegrenzten Durchsatz zu ermöglichen, ohne dass spezialisierte Laborausstattung erforderlich ist. Wir gehen davon aus, dass unser Assay leicht auf andere Substrate anwendbar ist; dies bedarf jedoch vorheriger Kalibrierung mit einem geeigneten Standard. Mit diesem neuartigen Hochdurchsatztest fanden wir schließlich mittels Zufallsmutagenese eine thermostabile Trp-6-Halogenasevariante mit einem Schmelzpunkt von 57 °C. Die Doppelmutante S359G/K374R ist durch signifikant höhere Aktivität und eine verlängerte Katalysatorlebensdauer gekennzeichnet. Somit konnten wir die Praxistauglichkeit des neuen Kreuzkupplungs-Assays demonstrieren, und ebenso trugen unsere Ergebnisse dazu bei, allgemeine Schwächen der enzymatischen Halogenierung in Angriff zu nehmen. Künftig werden wir uns mit der weiterführenden Optimierung von Halogenasen für die C-H-Funktionalisierung beschäftigen, um diese vielversprechende Enzymklasse in der Zukunft in mehrstufige Synthesen zu integrieren.

**Stichwörter:** Eintopfsynthesen · Gerichtete Evolution · Halogenasen · Hochdurchsatz-Screening · Kreuzkupplungen

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14159–14163  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 14365–14369

- [1] J. C. Lewis, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2003–2021.
- [2] V. Weichold, D. Milbredt, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6374–6389; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 6482–6498.
- [3] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300–2302; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2380–2382.
- [4] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *Science* **2005**, *309*, 2216–2219.
- [5] E. Yeh, S. Garneau, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3960–3965.
- [6] E. Yeh, L. C. Blasiak, A. Koglin, C. L. Drennan, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1284–1292.
- [7] S. Flecks, E. P. Patallo, X. Zhu, A. J. Ernyei, G. Seifert, A. Schneider, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9533–9536; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9676–9679.
- [8] J. T. Payne, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5271–5274; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5379–5382.
- [9] M. Frese, P. H. Guzowska, H. Voß, N. Sewald, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1270–1276.
- [10] M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 298–301; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 302–305.
- [11] C. B. Poor, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1286–1289.
- [12] J. T. Payne, C. B. Poor, J. C. Lewis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4226–4230; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4300–4304.
- [13] S. A. Shepherd, C. Karthikeyan, J. Latham, A.-W. Struck, M. L. Thompson, B. R. K. Menon, M. Q. Styles, C. Levy, D. Leys, J. Micklefield, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3454–3460.
- [14] M. Konarzycka-Bessler, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1418–1420; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1449–1451.
- [15] E. Fernández-Álvarez, R. Snajdrova, H. Jochens, T. Davids, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8584–8587; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8742–8746.
- [16] S. C. Willies, J. L. White, N. J. Turner, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7564–7567.
- [17] R. Lauchli, K. S. Rabe, K. Z. Kalbarczyk, A. Tata, T. Heel, R. Z. Kitto, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5571–5574; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5681–5684.
- [18] M. S. Weiß, I. V. Pavlidis, C. Vickers, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11847–11853.
- [19] J. Hosford, S. A. Shepherd, J. Micklefield, L. S. Wong, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16759–16763.
- [20] M. C. Andorfer, H. J. Park, J. Vergara-Coll, J. C. Lewis, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3720–3729.
- [21] C. D. Spicer, T. Triemer, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 800–803.
- [22] A. Dumas, C. D. Spicer, Z. Gao, T. Takehana, Y. A. Lin, T. Yasukohchi, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3916–3921; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4008–4013.
- [23] A. D. Roy, R. J. M. Goss, G. K. Wagner, M. Winn, *Chem. Commun.* **2008**, 4831–4833.
- [24] N. Miyaura, T. Yanagi, A. Suzuki, *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 513–519.
- [25] A. D. Roy, S. Grüşchow, N. Cairns, R. J. M. Goss, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12243–12245.
- [26] W. Runguphan, S. E. O'Connor, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2850–2853.
- [27] M. Frese, C. Schnepel, H. Minges, H. Voß, R. Feiner, N. Sewald, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1799–1803.
- [28] L. J. Durak, J. T. Payne, J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1451–1454.
- [29] J. Latham, J.-M. Henry, H. H. Sharif, B. R. K. Menon, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11873.
- [30] T. E. Barder, S. D. Walker, J. R. Martinelli, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4685–4696.
- [31] K. L. Billingsley, K. W. Anderson, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3484–3488; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3564–3568.
- [32] S. Zehner, A. Kotzsch, B. Bister, R. D. Stüssmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445–452.
- [33] C. Seibold, H. Schnerr, J. Rumpf, A. Kunzendorf, C. Hatscher, T. Wage, A. J. Ernyei, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. V. Pée, *Biotransform.* **2006**, *24*, 401–408.

Eingegangen am 10. Juni 2016

Online veröffentlicht am 13. September 2016