

Gerichtete Evolution von Iridium-substituiertem Myoglobin: vielseitige künstliche Metalloenzyme für enantioselektive C-C-Kupplungen

Thomas R. Ward*

Bioanorganische Chemie · C-H-Aktivierung ·
Künstliche Enzyme · Metalloenzyme

In den vergangenen zehn Jahren fanden künstliche Metalloenzyme (ArMs; „artificial metalloenzymes“) zunehmend Aufmerksamkeit als Alternativen zu herkömmlichen homogenen Katalysatoren und Enzymen.^[1,2] ArMs werden durch den Einbau eines abiotischen metallischen Kofaktors in ein Wirtprotein gebildet. Bis kürzlich wurden drei komplementäre Strategien für den Aufbau von ArMs erfolgreich angewendet: 1) kovalente Verankerung, bei welcher der metallgebundene Ligand kovalent an das Protein gebunden wird (Schema 1 a);^[3] 2) supramolekulare Verankerung, welche auf einer hochaffinen Wechselwirkung zwischen dem Wirtprotein und dessen Partner (oder Inhibitor) beruht (Schema 1 b);^[4] und 3) koordinative Verankerung, wobei Aminosäureseitenketten an ein Metall binden und dieses aktivieren (Schema 1 c).^[5] Hartwig und Mitarbeiter haben nun eine vielseitige Metallsubstitutionsstrategie beschrieben, die bei natürlichen Hämproteinen angewendet werden kann und diese drei Ansätze ergänzt.^[6]

ArMs kombinieren die vorteilhaften Eigenschaften von homogenen Katalysatoren und Enzymen. Der Kofaktor kann jedes Element des Periodensystems enthalten, was das verfügbare Reaktionsrepertoire von ArMs im Vergleich zu den natürlichen Biokatalysatoren erheblich erweitert. Darüber hinaus wurden sowohl chemische als auch genetische Optimierungsmethoden erfolgreich zur Leistungsverbesserung von ArMs angewendet.^[1,2] Allerdings werden die in der metallorganischen Chemie so beliebten Münzmetalle durch verschiedene Zellkomponenten, darunter Glutathion, inhibiert. Daraus folgt, dass die Wirtproteine (teilweise) aufgereinigt werden müssen, bevor der abiotische Kofaktor hinzugefügt wird, wodurch ein erheblicher Engpass für gerichtete Evolutionsmethoden entsteht, die typischerweise auf dem Screening großer Mutationsbibliotheken beruhen.

Watanabe, Lu und Hayashi machten sich die planare Struktur von Häm (Eisen-Protoporphyrin IX; im Folgenden Fe-PIX) zu Nutze und substituierten diesen vielseitigen Kofaktor durch eine Reihe planarer, mehrzähliger Analoga oder Hämderivate, um ArMs für eine Vielzahl von Trans-

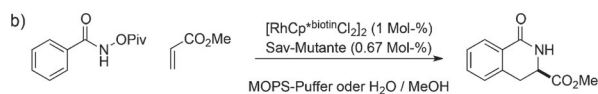
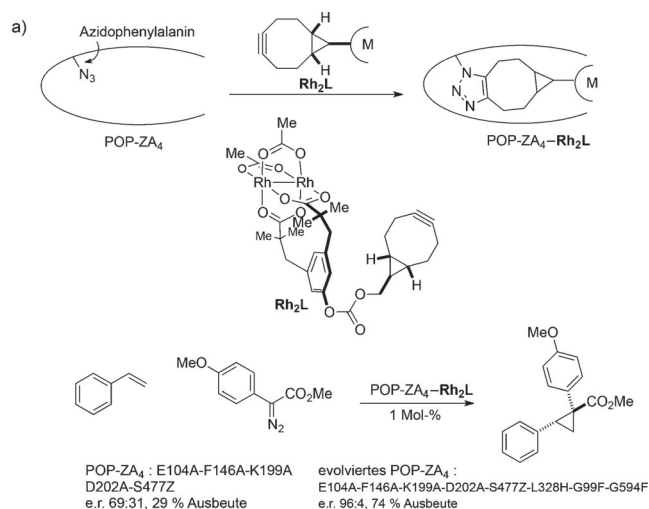
formationen zu erhalten. Der Fokus der Optimierungsanstrebungen lag dabei hauptsächlich auf der chemischen Modifikation des Kofaktors, weniger auf der gerichteten Evolution des Wirtproteins (Schema 2 a).^[7]

Basierend auf der isolobalen Analogie zwischen {Fe=O}- und Eisencarbon- oder Nitrenfragmenten setzten Arnold und Mitarbeiter und später Fasan und Mitarbeiter umfunktioniertes Cytochrom P450 und Myoglobin (Mb) zur Katalyse verschiedener abiotischer Transformationen ein, einschließlich enantioselektiver Cyclopropanierungen und Nitren-Insertionen (Schema 2 b,c,d).^[2,8] Im Unterschied zu ArMs sind solche umfunktionierten Enzyme mit Zellbestandteilen vollständig kompatibel und können daher einem Screening unterzogen und in vivo oder in Zelllysaten evolviert werden. Diese elegante Strategie ist somit nur durch die intrinsische Reaktivität des Fe-PIX-Kofaktors begrenzt, angereichert durch eine Feinabstimmung mittels gentechnischer Maßnahmen.

Hartwig und Mitarbeiter machten sich in ihrer aktuellen Arbeit die vielseitigen chemischen Eigenschaften von Edelmetallporphyrinen zu Nutze und berichteten über die Anwendung der Metallsubstitutionsstrategie auf Hämproteine.^[6] Die Substitution von Eisen in Fe-PIX durch verschiedene Metalle ([M]-PIX) ermöglichte es den Autoren, künstliche Metalloenzyme für enantioselektive C-C-Kupplungen zu erzeugen und zu evolviere. Die Reaktion von Diazoalkanoat mit [M]-PIX liefert das entsprechende $\text{RO}_2\text{CR}=[\text{M}]\text{-PIX}$. Besitzt das Substrat eine *ortho*-Alkylethergruppe, findet eine intramolekulare C-H-Insertion unter Bildung der enantiomerenangereicherten Dihydrobenzofurane statt (Schema 3 a). Addition eines Alkens an $\text{RO}_2\text{CR}=[\text{M}]\text{-PIX}$ führt zur Bildung von enantio- und diastereomerenangereicherten Cyclopropanen (Schema 3 b).

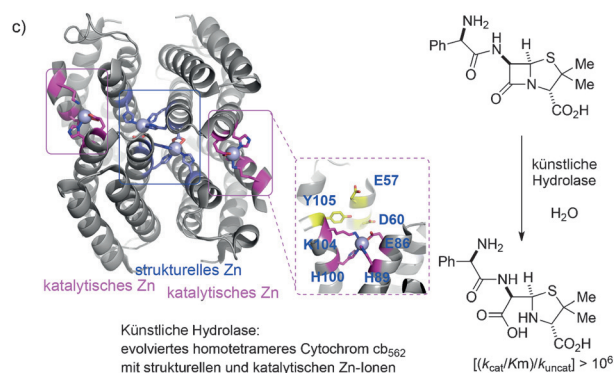
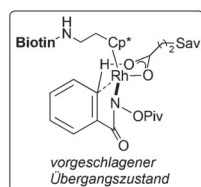
Screenings, in denen die Metallgruppierung und das Hämprotein variiert wurden, führten zur Identifizierung von {IrMe} und Myoglobin als aussichtsreichste Kombination. Im Anschluss daran wurde eine gentechnische Optimierung der katalytischen Funktion vorgenommen. Das proximale His93, das normalerweise an Fe-PIX gebunden ist, wurde mutiert, wobei entweder koordinierende oder nicht-koordinierende Aminosäuren eingeführt wurden. His93Ala und His93Gly wurden als vielversprechendste Varianten identifiziert. Aufeinanderfolgende Runden iterativer Mutagenese zielten dar-

[*] Prof. Dr. T. R. Ward
Department of Chemistry, University of Basel
Spitalstrasse 51, 4051 Basel (Schweiz)
E-Mail: thomas.ward@unibas.ch



Eintrag	Sav-Mutante	Umsatz (%)	e.r.
1	-	< 5	-
2	WT	< 5	-
3	N118K-K121E	99	82:18
4	S112Y-K121E	95	91:9

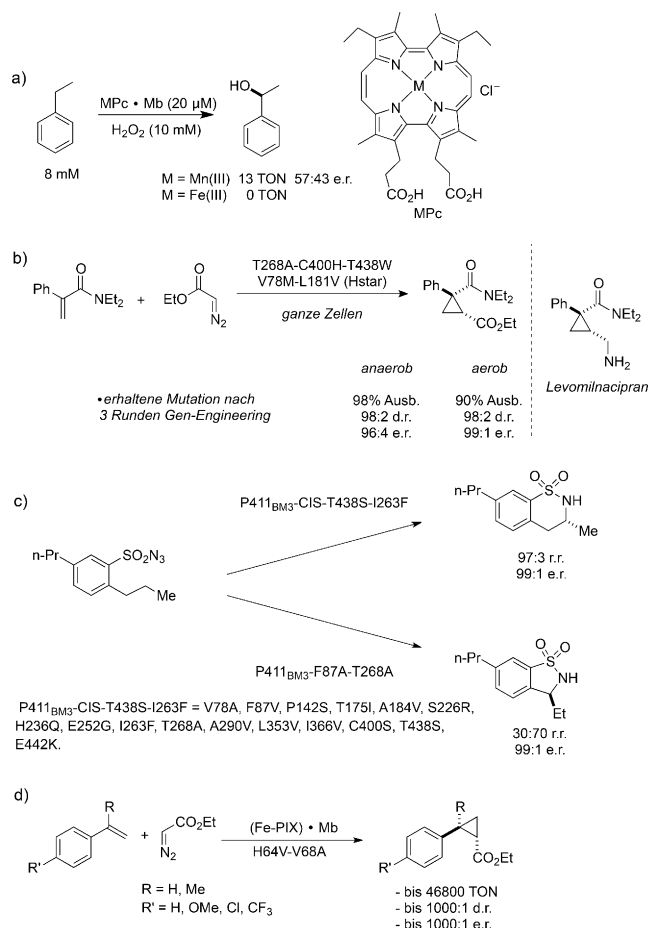
Sav = Streptavidin



Schema 1. Ausgewählte Beispiele für die gerichtete Evolution von ArMs: a) kovalente Verankerung an eine Azidophenylalanin-Gruppe in Propyl-OligoPeptidase (POP-ZA₄) zur enantioselectiven Cyclopropanierung. b) Supramolekulare Verankerung auf Basis der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung zur enantioselectiven C-H-Aktivierung. c) Koordinative Verankerung von Zink in Cytochrom cb₅₆₂ für Hydrolysereaktionen. Abdruck nach Lit. [2].

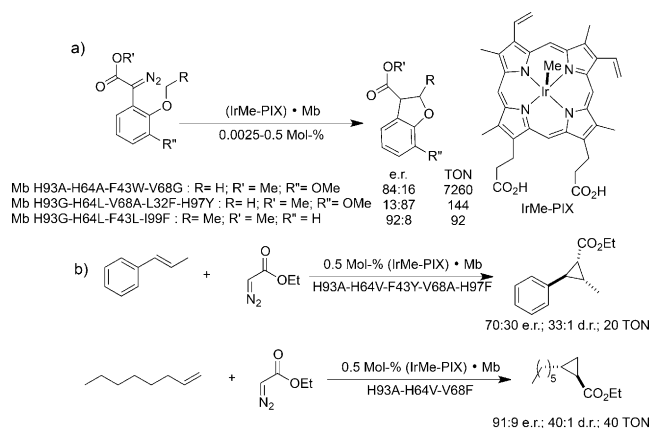
auf ab, die Substratbindungsstelle oberhalb der Porphyrin-ebene maßzuschneidern. Zu diesem Zweck wurden das distale His64 sowie die Positionen Leu32, Phe33, Phe43, Val68, His97 und Ile99 mittels einer fokussierten Bibliothek hydrophober und ungeladener Aminosäurereste mutiert. Insgesamt wurden fast 500 MeIr-PIX-Mb-Mutationen gescreent. Ausgewählte Ergebnisse der C-H-Insertion und Cyclopropanierung sind in Schema 3 a,b zusammengefasst.

Der Beitrag von Hartwig und Mitarbeitern weist mehrere faszinierende Merkmale auf, die im Folgenden herausgestellt werden sollen:



Schema 2. Umfunktionierung von Häm-haltigen Proteinen für neuartige Transformationen: a) C-H-Hydroxylierung mit Porphyrin-rekonstituiertem Myoglobin, Mpc-Mb. b) Cyclopropanierung zur Synthese einer Levomilnacipranvorstufe mit Cytochrom P450_{BM3}, das ein axiales Histiadin C400H trägt. c) Regioselective Nitren-Insertion mit Cytochrom P411_{BM3}, das ein axiales Serin C400S trägt. d) Cyclopropanierung von Stylderivaten durch Myoglobinmutationen. Abdruck nach Lit. [2].

1) Um das Screening zu beschleunigen, das letztlich zur gerichteten Evolution von MeIr-PIX-Mb führen sollte, wurde *Escherichia coli* unter Eisenmangelbedingungen bei



Schema 3. Die Substitution von Eisen in Myoglobin (Mb) durch Platinmetalle liefert vielseitige Metalloenzyme (MeIr-PIX)-Mb für a) C-C-Kupplungen und b) die Cyclopropanierung anspruchsvoller Substrate.

niedrigen Temperaturen angezogen. Dies ermöglichte die einfache Isolierung von apo-Mb-Mutationen, die durch den metallisierten [M]-PIX-Kofaktor komplementiert wurden. Die parallele Aufreinigung wurde durch Affinitätschromatographie auf einer Ni(NTA)-Säule (NTA = Nitrilotriacetat) durchgeführt. Diese Strategie ermöglicht es somit, die reichhaltige Chemie abiologischer PIX-Varianten mit den Stärken der gerichteten In-vitro-Evolution zu kombinieren.

- 2) Durch die Position des „künstlichen“ Kofaktors MeIr-PIX im natürlichen aktiven Zentrum von Myoglobin ist das abiotische Substrat vollständig in eine Proteinhöhle eingebettet. Dies ist ein Unterschied zu anderen Verankerungsstrategien, bei denen der Kofaktor oftmals stärker dem Lösungsmittel ausgesetzt ist und sich die Wechselwirkungen in der zweiten Koordinationssphäre zwischen Substrat und Wirtprotein somit deutlich weniger kontrollieren lassen.^[2–4] Die Verwendung fokussierter Mb-Bibliotheken mit Mutationen in der Nähe des Kofaktors MeIr-PIX ermöglichte es, das aktive Zentrum so zu gestalten, dass es zwei enantioselektive Reaktionen katalysiert, für die bisher noch kein natürliches Enzym bekannt war.
- 3) Ausgehend von einem aktiven, aber im Wesentlichen unselektiven MeIr-PIX-WT-Mb (WT = Wildtyp) konnten beide Enantiomere des Benzodihydrofuranprodukts durch gerichtete Evolution erhalten werden. Mehr als 7000 Turnover wurden erreicht. Dies unterstreicht eindrucksvoll, wie durch die Isolation des reaktiven Ir-Carbenzentrums die Deaktivierung des Katalysators verhindert wird. Ein Screening der fokussierten Mb-Bibliothek ermöglichte die Identifizierung der vielversprechenden (MeIr-PIX)-Mb-Variante für eine Vielzahl von Substraten: Die Ester-, Aren- und Alkoxy-Funktionalität konnte variiert werden, und in den meisten Fällen wurden gute Enantioselektivitäten erreicht (Schema 3a).
- 4) Mit internen Vinylarenen und nichtaktivierten Alkenen konnten enantio- und diastereoselektive Cyclopropanierungen durchgeführt werden. Eine große Stärke der Optimierungsstrategie liegt in der Modularität des Ansatzes, da dieselbe Bibliothek von M-PIX-Mb-Mutationen gegen eine Vielzahl von Reaktionen, Metallen und Substraten

gescreent werden kann, was letztendlich zur Identifizierung aussichtsreicher ArMs für verschiedenste Reaktionen führen kann (Schema 3b).

Obwohl Metallsubstitution bereits in der Vergangenheit zur Herstellung künstlicher Metalloenzyme verwendet wurde, blieb die katalytische Funktion der gewonnenen Enzyme limitiert. Die hier beschriebenen Ergebnisse belegen eindeutig die Vielseitigkeit dieser Strategie für die Erzeugung und Evolution von ArMs. In Anbetracht der großen Zahl Häm-abhängiger Proteine bietet dieser vielseitige Ansatz faszinierende Möglichkeiten zur Ergänzung anderer ArMs-Strategien (Schema 1). Ein Ziel könnte sein, künstliche Metalloenzyme in vivo zu erzeugen und zu evolvieren, um erheblich größere Mutationsbibliotheken zu screenen oder um ArMs im Kontext der synthetischen Biologie zu implementieren. Solche Anwendungen in vivo wären ein wichtiger Meilenstein in Richtung neuer Metabolismen und bleiben für edelmetallhaltige ArMs noch zu demonstrieren.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 14909–14911
Angew. Chem. **2016**, 128, 15131–15133

- [1] A. Ilie, M. T. Reetz, *Isr. J. Chem.* **2015**, 55, 51.
- [2] T. K. Hyster, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 7344; *Angew. Chem.* **2016**, 128, 7468.
- [3] P. Srivastava, H. Yang, K. Ellis-Guardiola, J. C. Lewis, *Nat. Commun.* **2015**, DOI: 10.1038/ncomms8789.
- [4] T. K. Hyster, L. Knörr, T. R. Ward, T. Rovis, *Science* **2012**, 338, 500.
- [5] W. J. Song, F. A. Tezcan, *Science* **2014**, 346, 1525.
- [6] H. M. Key, P. Dydio, D. S. Clark, J. F. Hartwig, *Nature* **2016**, 534, 534.
- [7] K. Oohora, Y. Kihira, E. Mizohata, T. Inoue, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 17282.
- [8] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3351; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 3408.
- [9] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, 339, 307.
- [10] M. Bordeaux, V. Tyagi, R. Fasan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 1744; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 1764.

Eingegangen am 26. Juli 2016

Online veröffentlicht am 4. Oktober 2016