

Evolution im Reagenzglas – Biokatalysatoren auf dem Vormarsch

Prof. Dr. Manfred T. Reetz

Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim/Ruhr

Katalysatoren, meine sehr verehrten Damen und Herren, kommen nicht nur in Autos vor – sie bilden auch das Herz der Chemie. Katalysatoren sind Substanzen, die chemische Reaktionen und damit Stoffumwandlungen ermöglichen und/oder beschleunigen, ohne selbst verbraucht zu werden. Sie werden bei der Herstellung von Medikamenten, Pflanzenschutzmitteln, Kunststoffen und Farbstoffen eingesetzt, um nur einige Beispiele zu nennen. Katalysatoren steuern mehr als 80% aller großtechnischen Prozesse in der chemischen Industrie.

Die Chemiker haben für ihre jeweiligen Zwecke Tausende von Katalysatoren entwickelt – aber nicht alle sind wirklich effizient und umweltfreundlich. Viele liefern nämlich nicht nur das gewünschte Produkt der Stoffumwandlung, sondern gleichzeitig auch Nebenprodukte, die als Abfall in aufwändigen Verfahren entsorgt werden müssen. Andere Katalysatoren entfalten ihre Wirkung erst bei hohen Temperaturen oder müssen in toxischen Lösungsmitteln eingesetzt werden. Dies alles bedeutet letztendlich einen Mehraufwand an Energie und Rohstoffen sowie eine Belastung für die Umwelt.

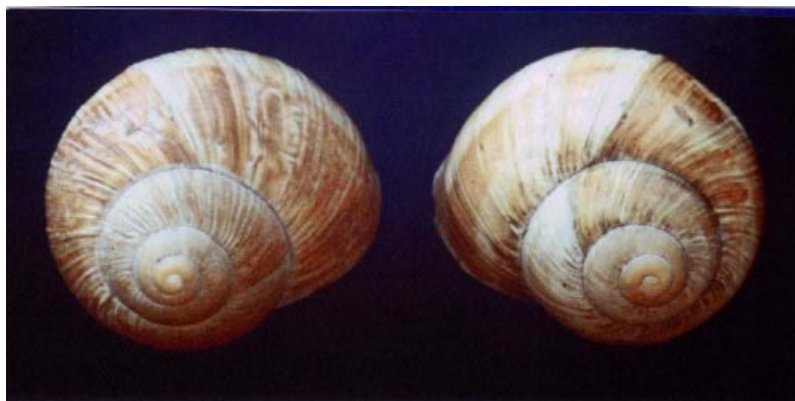
Die Suche nach neuen und besseren Katalysatoren gehört deshalb weltweit zu den Schlüssel-Forschungsgebieten, wobei die unterschiedlichsten Wege beschritten werden. Ich möchte im Folgenden einen grundsätzlich neuen Ansatz auf dem Gebiet der Katalysatorforschung vorstellen. Dabei machen wir von den Prinzipien der Evolution Gebrauch, das heißt, wir lernen von der Natur und ahmen sie im Reagenzglas nach.

Was Evolution ist, dürfte allgemein bekannt sein. Vereinfacht dargestellt, führen stets aufs Neue wiederholende Zyklen von Mutation (also Änderung des Erbguts) und Selektion zum Überleben des Tüchtigeren. Unter dem Schlagwort Darwinismus sind diese Vorgänge auch dem Laien bekannt. Die Evolution hat mit ihrer unglaublichen Kraft Wirkungen in der Natur entfaltet, die auch den Fachmann noch immer in Erstaunen versetzen. Im Lauf von Milliarden Jahren sind nämlich auf molekularer Ebene hochkomplizierte biologische Systeme entstanden, ohne die kein Leben möglich wäre. Alle Lebensvorgänge, also sämtliche chemischen Prozesse in der belebten Welt, werden von Biokatalysatoren, insbesondere von Enzymen, ausgelöst und mit außergewöhnlicher Präzision gesteuert.

In meinen Ausführungen werde ich nicht über die Physik oder Mathematik der Evolution in der Natur berichten. Das haben andere erforscht, allen voran Manfred Eigen im Göttinger Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie. Übrigens hat Eigen vor langer Zeit vorausgesagt, dass es so etwas wie eine künstliche Evolutionsmaschine geben müsste. Wir Chemiker vom Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim haben uns die Frage gestellt, ob wir

Abb. 1: Chiral (abgeleitet vom griechischen $\chi\epsilon\iota\rho$ = Hand) ist ein Objekt oder ein Molekül, wenn es mit seinem Spiegelbild nicht zur räumlichen Deckung gebracht werden kann. Bild aus H. Brunner, Rechts oder Links, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Wiley-VCH-Verlages.



die Prinzipien der Evolution im Reagenzglas nachahmen und für unsere speziellen Zwecke in der Katalyse nutzen können.

Zuerst möchte ich sichergehen, dass wir die gleiche Sprache sprechen und verstehen. Deshalb seien drei Begriffe erklärt, die bei unseren Forschungsarbeiten eine zentrale Rolle spielen. Zunächst zur Bedeutung des Begriffs *Chiralität*. Er kommt vom griechischen Wort *cheir* und bedeutet Hand oder Händigkeit. Unsere beiden Hände sind ein Beispiel dafür. Sie sehen zwar gleich aus, sind aber dennoch verschieden. Man kann sie drehen und wenden, wie man will, die rechte und die linke Hand sind Bild und Spiegelbild voneinander und lassen sich räumlich nicht zur Deckung bringen, sie sind *chiral*. Deshalb passt ein „linker“ Handschuh nicht über die rechte Hand.

Diese Eigenschaft, Chiralität genannt, zeigen auch viele andere, in der Natur, Architektur und Kunst vorkommende Strukturen oder makroskopische Objekte, so zum Beispiel die Gehäuse von Weinbergschnecken. Ebenso wie die meisten anderen Schneckenarten haben die Häuser von Weinbergschnecken eine einheitliche rechtshändige Windungsart (**Abb. 1**, links). Doch es gibt – wenn auch sehr selten – Ausnahmen, wo das Schneckenhaus (im Bild rechts) aus einer linkshändigen Spirale besteht. Die beiden Objekte lassen sich nicht zur räumlichen Deckung bringen, sie sind *chiral*.

Wir befassen uns jedoch mit Chemie. Hier existiert eine Vielzahl von Verbindungen, also von Molekülen, die *chiral* sind. Sie verhalten sich wie Bild und Spiegelbild und können nicht zur räumlichen Deckung gebracht werden. Daraus lässt sich ein weiterer Begriff definieren. Solche Moleküle nennt man *Enantiomere*, abgeleitet vom griechischen *enantios* (entgegengesetzt). Um unseren kurzen Sprachkurs abzuschließen, sei noch der Begriff *Racemat* erläutert. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch, das zu jeweils 50% aus zwei Enantiomeren besteht.

Die Moleküle der synthetischen organischen Chemie und der Biochemie sind häufig *chiral*. Der gängigste Fall tritt dann auf, wenn ein tetraedrisch gebundenes Kohlenstoffatom im Molekül vier verschiedene Nachbarn hat (in der **Abbildung 2** mit a, b, c, d bezeichnet) – die Chemiker sprechen von Resten oder Substituenten. Wie das Schema deutlich macht, sind solche Verbindungen „automatisch“ *chiral*, denn Bild und Spiegelbild sind nicht zur räumlichen Deckung zu bringen. In dem Schema zeigen die gestrichelten Bindungslinien nach hinten und die fettgemalten nach vorne, während die normal gezeichnete-

ten Linien in der Ebene des Papiers liegen. Durch diese Darstellungsweise können chirale Moleküle als dreidimensionales Bild und Spiegelbild wiedergegeben werden.

Selbst geübte Chemiker müssen sehr genau hinschauen, um den Unterschied zwischen zwei Enantiomeren zu erkennen.

Schließlich unterscheiden sie sich nur in der räumlichen Anordnung ihrer Bausteine. Sie haben die gleiche chemische Formel, und die meisten physikalischen Eigenschaften wie zum Beispiel Siedepunkt, Löslichkeit und Dichte sind identisch. Enantiomere lassen sich nicht einfach durch Destillation trennen. Erst wenn ein anderes chirales Medium oder Molekül mit ihnen wechselwirkt, offenbaren sie ihre chirale Natur, wobei das Ausmaß des Effekts sehr klein oder recht ausgeprägt sein kann. Im günstigsten Fall ist es wie der Handschuh, der nur auf die eine Hand passt.

Solche Effekte können drastische physiologische Folgen haben. So ist die Beziehung zwischen Chiralität und biologischer Wirkung ein faszinierendes Phänomen. Von den Tausenden von Beispielen in der Natur und in der synthetischen organischen Chemie seien nur zwei genannt: Der chirale Naturstoff „Limonen“ riecht in der enantiomeren R-Form nach Orangen, während die spiegelbildliche S-Form in Zitronen vorkommt und für deren Duft Eigenschaften verantwortlich ist (Abb. 3, oben). (Die R- beziehungsweise S-Bezeichnung – abgeleitet vom Lateinischen *rectus* = rechts/*sinister* = links – ist Teil eines Nomenklatorsystems zur Beschreibung der tatsächlichen räumlichen Anordnung der Substituenten am Chiralitätszentrum; das ältere D- beziehungsweise L-Nomenklatorsystem – lateinisch *dexter* = rechts/*laevulus* = links – wird heute immer noch für manche Substanzklassen verwendet.)

Besonders dramatisch zeigte sich die unterschiedliche Wirkung chiraler Moleküle im biologischen System bei der Tragödie, die das Pharmazetikum Thalidomid (bekannt als „Contergan“) ausgelöst hat. Es war Mitte der fünfziger Jahre als Racemat, also als Eins-zu-Eins-Gemisch beider Enantiomere, auf dem Markt. Nach Einnahme des Medikaments brachten Schwangere Neugeborene mit verheerenden Missbildungen zur Welt („Contergan-Kinder“). Erst später stellte sich bei Tierversuchen heraus, dass zwar die R-Form die gewünschte positive Wirkung als Schlaf- bzw. Beruhigungsmittel hervorruft, das spiegelbildliche S-Enantiomer dagegen teratogen wirkt (Abb. 3, unten).

In der Natur produzieren Organismen in der Regel nur eine enantiomere Form einer chiralen Verbindung. Ein eindrucksvolles Beispiel sind die Aminosäuren, die praktisch nur in der L-enantiomeren Form vorkommen (Abb. 4). Es sind die zwanzig gängigen Aminosäuren mit 20 jeweils unterschiedlichen R-Resten, die als Bausteine des Lebens fungieren. Sie bilden Ketten von Polyaminosäuren, die als

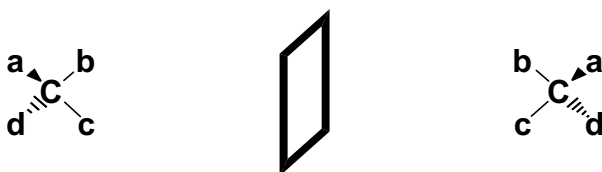
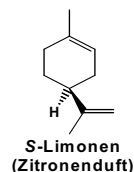
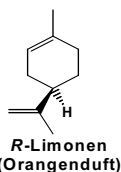
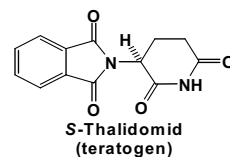
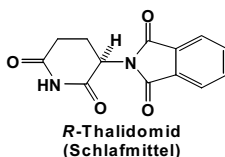


Abb. 2: Enantiomere sind chirale Moleküle, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten und nicht zur räumlichen Deckung gebracht werden können. Ein Racemat ist eine 1:1 Mischung aus den jeweiligen beiden Enantiomeren. Die fett gezeichnete Bindung zwischen Atom a und C ragt aus der Papierebene hinaus, die „gestrichelte“ Bindung liegt hinter der Papierebene.

Abb. 3: Einzelne Enantiomere unterscheiden sich oft erheblich in ihren biologischen Eigenschaften: R-Limonen riecht nach Orangen, S-Limonen nach Zitronen. Vom Wirkstoff Thalidomid (Handelsname: Contergan) wirkt nur das eine Enantiomer als Schlafmittel, S-Thalidomid verursacht schwere Missbildungen.



Contergan-Tragödie:



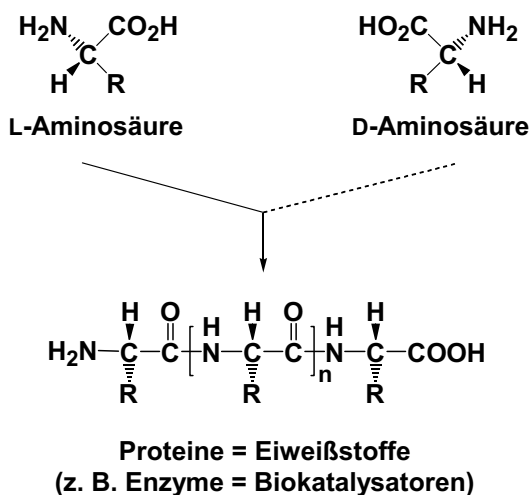


Abb. 4: Auch Aminosäuren, die Bausteine der Eiweiße, sind chiral. In Organismen kommen nur L-Aminosäuren vor.

rauf, dass in Zukunft nur noch das wirklich aktive Enantiomer eines chiralen Wirkstoffs auf den Markt gebracht wird. Dies ist mit ein Grund für das enorme Interesse an der Entwicklung katalytischer Verfahren, welche die eine oder die andere enantiomere Form einer gegebenen Verbindung wahlweise zugänglich machen. Zwar ist eine Trennung der beiden Anteile eines Racemats mit chromatographischen Methoden grundsätzlich möglich, erfordert jedoch einen hohen Aufwand unter Verwendung großer Mengen von organischen Lösungsmitteln.

Problemstellung: ein neues Katalyse-Konzept

Weltweit stehen die Chemiker vor einer echten Herausforderung: Gesucht werden Katalysatoren, die eine enantioselektive Stoffumwandlung ermöglichen. Logischerweise müssen solche Katalysatoren selbst chiral sein. Die Praxis zeigt aber, dass die überwältigende Mehrheit der künstlichen chiralen Katalysatoren keineswegs Reaktionen hoch-enantioselektiv katalysieren, vielmehr bewirken sie lediglich eine kleine beziehungsweise unzureichende Anreicherung der Enantiomere.

Bei einer enantioselektiven Katalyse ergeben sich zwei Vorgehensweisen:

1. Bei der Synthese des chiralen Zielmoleküls wird nur eine enantiomere Form gebildet.
2. Ein schon hergestelltes Racemat wird katalytisch so umgesetzt, dass bei 50% Umsatz nur die eine enantiomere Form abreagiert hat unter Bildung eines leicht abtrennbaren Produkts (kinetische Racematspaltung).

Bei solchen streng asymmetrischen Verfahren muss – wie oben schon gesagt – der Katalysator selbst chiral sein und darüber hinaus seine chirale Information auf das Reaktionsprodukt zu 100% übertragen. Dies zu bewirken, ist jedoch außerordentlich schwierig.

Proteine (Eiweißstoffe) bekannt sind, darunter die so genannten Enzyme, die ihrerseits die Stoffumwandlungen eines Organismus katalysieren beziehungsweise regulieren. Da die Bausteine des Enzyms nur aus L-Aminosäuren bestehen, ist das Enzym selbst chiral und kommt nur in einer enantiomeren Form vor. Dies ist eine Folge der Evolution!

Viele der heutigen Medikamente, Pflanzenschutzmittel und sonstigen Wirkstoffe sind chiral. Allein der Markt an chiralen Pharmazeutika beläuft sich weltweit auf 100 Milliarden US-Dollar pro Jahr. In vielen Fällen ist nur die eine enantiomere Form aktiv, während das andere Enantiomer wirkungslos ist und somit unnötigen Ballast für den Körper darstellt. Seit der Contergan-Katastrophe hat der Gesetzgeber zu Recht nicht nur schärfere Kontrollen durchgesetzt, er dringt auch da-

Dem Chemiker stehen zwei Optionen zur Verfügung:

1. Die Entwicklung und Verwendung von chiralen Übergangsmetall-Katalysatoren; oder
2. die Verwendung von aus Mikroorganismen isolierten Enzymen (**Abb. 5**).

Aus beiden Bereichen wurden durchaus beachtliche Erfolge gemeldet, jedoch ist man von einer allgemeinen Lösung des Problems weit entfernt. Dies hängt damit zusammen, dass die meisten künstlich hergestellten Übergangsmetall-Katalysatoren ihre chirale Information nur teilweise auf das synthetische Produkt übertragen und somit zu unzulänglichen Enantioselektivitäten führen.

Dagegen zeigen die in der Natur vorkommenden Enzyme (Wildtyp) Enantioselektivitäten von 100% – allerdings nur dann, wenn es sich um natürliche Substrate handelt. Der Chemiker möchte jedoch diese Enzyme dahingehend „zweckentfremden“, dass sie bei künstlichen, das heißt, in der Natur nicht vorkommenden Stoffumwandlungen eingesetzt werden. Dies gelang in einer Reihe von Fällen mit hoher Enantioselektivität, es ist jedoch keineswegs die Regel. Viele künstliche Substrate werden zwar von Enzymen umgesetzt, leider jedoch mit schlechter Enantioselektivität. Die Evolution hat den Chemikern nicht den Gefallen getan, beliebige Stoffumwandlungen selektiv zu katalysieren.

Eine nachträgliche strukturelle Manipulation des Enzyms mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese, gleichbedeutend mit dem gezielten Austausch einer Aminosäure gegen eine der anderen 19 natürlichen Vertreter, schafft meistens keine Abhilfe. Dies hängt damit zusammen, dass es keine zuverlässige Theorie gibt, mit der vorausgesagt werden kann, welche Aminosäure(n) auszutauschen ist (sind).

Man kann vielleicht fragen, warum manche Substrate enantioselektiv umgesetzt werden und andere eben nicht. Der große Chemiker und erste deutsche Chemie-Nobelpreisträger (der übrigens bei der Gründung der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft im Jahr 1911 eine aktive Rolle gespielt hat) Emil Fischer (1852–1919) hat als erster dazu eine Theorie entwickelt. Nach seinem Modell verhalten sich Enzym und Substrat räumlich wie Schloss und Schlüssel (**Abb. 6**). Passt das Substrat (Schlüssel) räumlich nicht vollständig zum Schloss (Enzym), versagt die Katalyse. Heute weiß man, dass dies nicht ganz korrekt

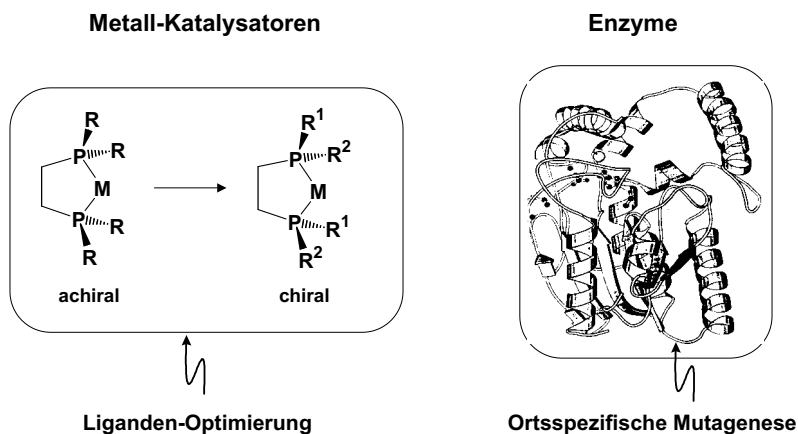
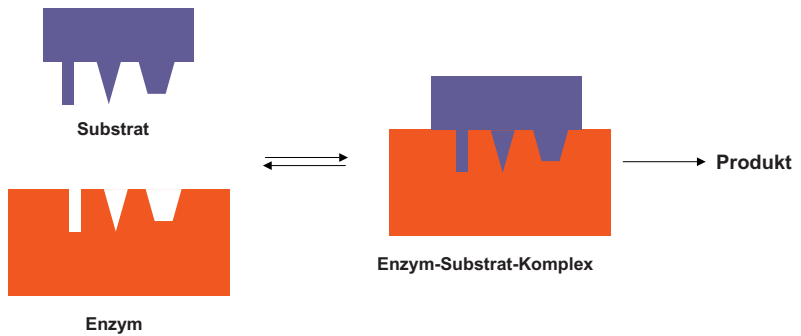


Abb. 5: Wie entwickelt man enantioselektive Katalysatoren? Für den Chemiker gibt es zwei Optionen: Die Entwicklung von chiralen Übergangsmetall-Katalysatoren oder die Verwendung von aus Mikroorganismen isolierten Enzymen, die evolutionär weiterentwickelt werden.

Abb. 6: Warum sind biochemische Stoffumwandlungen enantioselektiv? Schematische Darstellung des Schlüssel-Schloss-Prinzips, das Emil Fischer 1894 entwickelt hat. Diese Modellvorstellung stimmt freilich nur in groben Zügen.



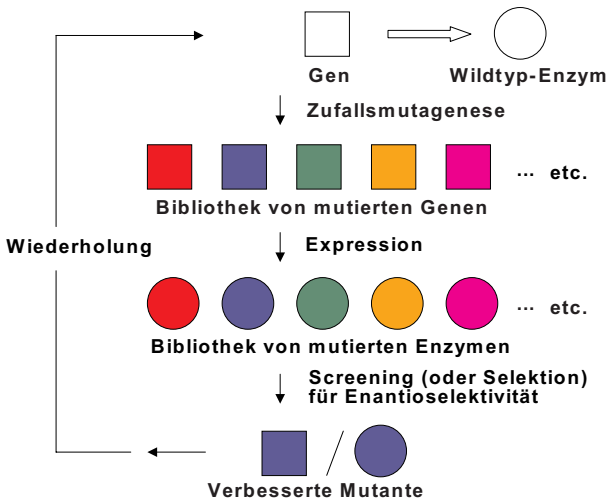
ist (vergleiche das Koshland-Modell der induzierten Anpassung), aber in groben Zügen stimmt es.

Wir haben einen grundsätzlich neuen Ansatz in der enantioselektiven Katalyse konzipiert. Dabei wollen wir von der Natur lernen, in dem wir die Prinzipien der Evolution im Reagenzglas (*in vitro*) nachahmen. Das zugrunde liegende Prinzip ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt. Ausgangspunkt ist eine vorgegebene Stoffumwandlung, $A \rightarrow B$, die zwar von einem in der Natur vorkommenden Enzym katalysiert wird, jedoch mit fehlender oder schlechter Enantioselektivität. Das Gen (DNA-Abschnitt), welches das Enzym kodiert, wird im Reagenzglas der Zufallsmutagenese unterworfen unter Erzeugung einer Ansammlung von mutierten Genen, die man Bibliothek nennt. Diese werden im zweiten Schritt des Verfahrens in Bakterien (zum Beispiel *E. coli*) eingeschleust, die dann Tausende von mutierten Enzymen produzieren, also Varianten mit randomisiert ausgetauschten Aminosäuren.

Es folgt dann der schwierige Schritt des Identifizierens der enantioselektiven Enzym-Variante. Im Schema ist es das blau gekennzeichnete Enzym. Die anderen Enzym-Varianten werden aussortiert, das heißt, in unserem Schema „überlebt“ nur der blaue Vertreter. Sodann wird das entsprechende (blaue) Gen erneut der Zufallsmutagenese unterworfen, wodurch ein evolutionärer Druck entsteht. Solche Zyklen werden beliebig oft durchlaufen, bis sich das gewünschte Maß an Enantioselektivität eingestellt hat. Die Stärke des Ansatzes liegt darin, dass Kenntnisse weder über die dreidimensionale Struktur des Enzyms noch über den Mechanismus der Enzymkatalyse erforderlich sind. Es ist allein der evolutionäre Druck, der den rationalen Charakter des Verfahrens kennzeichnet.

Die Herausforderung bei der Konstruktion einer solchen „Maschine“ liegt in zwei Bereichen. Einmal müssen Strategien entwickelt werden, wie die (in den letzten zehn bis zwölf Jahren bekannt gewordenen) molekularbiologischen Methoden zur Zufallsmutagenese optimal angewendet wer-

Abb. 7: Schema der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme im Reagenzglas.



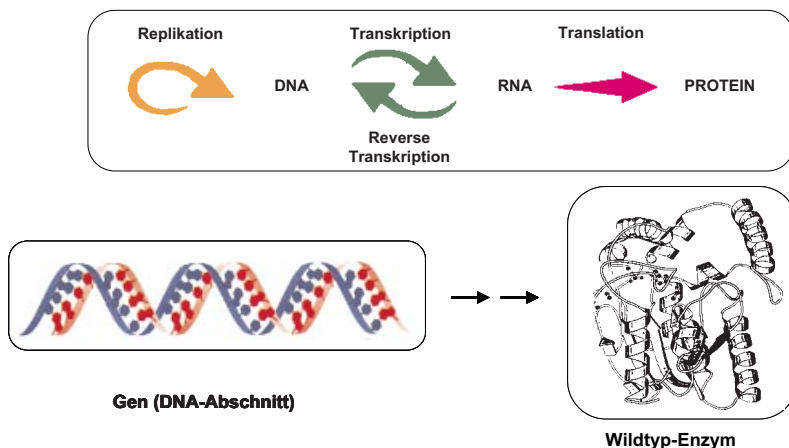


Abb. 8: Vereinfachtes Schema des Flusses der genetischen Information.

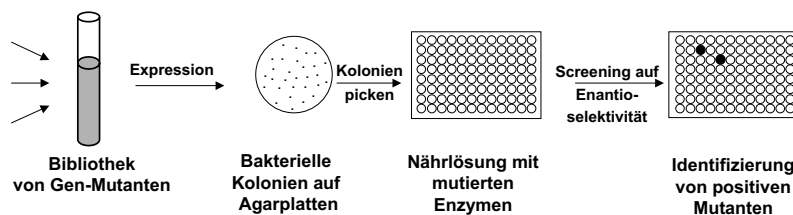
den können. Zum anderen müssen Hochdurchsatz-Screening-Systeme zur Erfassung der Enantioselektivität von Tausenden von Enzymen bei einer gegebenen Reaktion ($A \rightarrow B$) entwickelt werden. Als wir vor knapp fünf Jahren am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung unser Projekt begannen, gab es solche Assays nicht. Die modernsten analytischen Methoden erlaubten damals lediglich 20 bis 30 Bestimmungen pro Tag.

Zunächst einige kurze Kommentare zu den molekularbiologischen Methoden. Es sei an das Grundprinzip der Biologie erinnert, nämlich an den Fluss der genetischen Information (**Abb. 8**). Ein Gen ist ein DNA-Abschnitt, ein „Computerprogramm“, denn über die Transkription zu RNA und nachfolgender Translation werden die „programmierten“ Proteine und somit auch die Enzyme in der belebten Welt erzeugt.

Die in der Natur vorkommende DNA-Replikation kann nach der Methode des Nobelpreisträgers Kary Mullis mithilfe der so genannten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Reagenzglas perfekt nachgeahmt werden. Es ist aber auch möglich, gezielt „Fehler“ einzubauen, wie D. W. Leung, E. Chen und D. V. Goeddel im Jahr 1989 zeigen konnten (Leung et al., 1989). Somit besteht eine einfache Möglichkeit, Gen-Mutanten zu erzeugen, wobei die Mutagenese-Rate empirisch eingestellt werden kann. Die Methode wurde in den neunziger Jahren von Frances Arnold genutzt, um Proteine mit höherer thermischer und chemischer Stabilität zu evolvieren. Weitere Mutagenese-Methoden beziehen sich zum Beispiel auf Sättigungsmutagenese, wonach eine gezielt ausgesuchte Position im Enzym gesättigt wird. Man kann dann sicher sein, dass alle 20 gängigen Aminosäuren an der vorgegebenen Position eingebaut werden unter Bildung einer kleinen Bibliothek von Enzym-Mutanten. Schließlich sei das von W. P. C. Stemmer im Jahre 1994 beschriebene rekombinante Verfahren erwähnt, das unter der Bezeichnung DNA-Shuffling bekannt geworden ist. Auch mit dieser Methode lassen sich Proteine Gen-manipulieren.

Was das schwierige Problem des Screenings angeht, so hat mein Arbeitskreis in den letzten Jahren mehrere Hochdurchsatz-Assays konzipiert und in die Praxis umgesetzt. Diese und andere Systeme wurden Anfang des Jahres in einem Übersichtsartikel im Detail beschrieben (M. T. Reetz, 2001). Sie seien hier nicht näher erläutert.

Abb. 9: Die gerichtete Evolution im Experiment erfolgt in einem Dreischritt von Mutagenese, Expression der veränderten Enzyme und Screening: Die durch Zufallsmutagenese erzeugten Mutanten werden auf Nährstoffplatten (Agarplatten) angezüchtet. Die Nährlösung der einzelnen Kolonien, die die mutierten Enzyme enthält, wird auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen übertragen. Durch eine Farbreaktion oder sonstigen Assay werden positive Mutanten, die eine erhöhte Enantioselektivität aufweisen, herausgefunden.

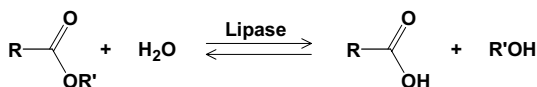


Und nun zur Umsetzung des in Abbildung 7 gezeigten Schemas: In der Praxis wenden wir eine Mutagenese-Methode im Reagenzglas an. Danach schleusen wir die mutierten Gene in Bakterien ein, plattieren sie auf Agarplatten aus, sammeln und platzieren die Bakterienkolonien in die Vertiefungen von Mikrotiterplatten im 96er Format, führen die Stoffumwandlung, $A \rightarrow B$, mit den so erzeugten Enzym-Varianten durch und screenen (**Abb. 9**). Was das Einsammeln der Bakterienkolonien angeht, so verwendeten wir in der Anfangsphase des Projekts einfach Zahnstocher (wir hatten einen höheren Verbrauch als alle Restaurants im Ruhrgebiet!). Erst kürzlich schafften wir einen Roboter (Kolonienpicker) an, der diese mühselige Arbeit übernommen hat.

Als Enzym wählten wir eine Lipase. Dabei handelt es sich um eine Klasse von Enzymen, welche die Hydrolyse (Reaktion mit Wasser) von Carbonsäureestern unter Bildung der entsprechenden Carbonsäure und des Alkohols katalysieren (**Abb. 10**). Lipasen sind lebenswichtige Enzyme mit der Aufgabe, Fette in der Nahrung von Mikroorganismen und höheren Lebewesen (auch im menschlichen Verdauungstrakt) zu spalten und somit einer Verwertung zuzuführen. Man hat Lipasen auch bei der Reaktion von künstlichen Carbonsäureestern erfolgreich eingesetzt, wobei Chiralität entweder im Säure- oder im Alkohol-Teil vorhanden sein kann.

Wie eingangs angedeutet, lassen sich jedoch viele Substrate nicht enantioselektiv umsetzen. Ein Beispiel aus der Lipase-Katalyse zeigt die **Abbildung 11**. Hier handelt es sich um eine kinetische Racematspaltung. Der gezeigte Ester wird als Racemat in der hydrolytischen Reaktion eingesetzt. Idealerweise würde nach einem Umsatz von 50% nur ein Enantiomer reagiert haben, zum Beispiel der S-Ester, so dass dann der R-Ester leicht von der S-Säure abgetrennt werden könnte. Die Realität zeigt jedoch, dass die bakterielle Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* zwischen den beiden Enantiomeren kaum zu unterscheiden vermag. Der Selektivitätsfaktor E , der die relative Reaktionsgeschwindigkeit von S- bezüglich R-Substrat widerspiegelt, hat den Wert von nur 1,1 zugunsten der S-Säure (**Abb. 11**). Ein E -Wert von 1,0 würde gar keine Enantioselektivität bedeuten.

Wir stellten uns der Herausforderung, dieses unselektive Enzym mithilfe der gerichteten Evolution in eine hoch-enantioselektive Variante umzuwandeln. Dazu war zunächst ein Gedankenexperiment erforderlich, das mit dem so genannten Proteinsequenz-Raum zu tun hat. Wie hoch sollte die Mutationsrate sein? Unsere Lipase besteht aus 285 Aminosäuren. Man stel-



1. **Biologische Funktionen: Hydrolyse von Triglyceriden**
2. **Industrielle Verarbeitung von Fetten**
3. **Detergentien**
4. **Organische Synthesechemie**
 - a) **Regioselektivität**
 - b) **Enantioselektivität**

le sich eine Perlenkette aus 285 Perlen vor, wobei es 20 verschiedenfarbige Vertreter gibt – entsprechend den 20 gängigen Aminosäuren. Wenn alle denkbaren Aminosäuren- (bzw. Perlen-) Austauschprozesse im Gedankenexperiment zugelassen werden, gäbe es 20^{285} verschiedene Möglichkeiten der Permutation, das wären fast „unendlich“ viele verschiedene Enzym-Mutanten (Perlenketten). Bei dem Austausch nur einer einzigen

Perle (Aminosäure), also bei der geringsten strukturellen Änderungen im Enzym (beziehungsweise in der Perlenkette), gäbe es schon 5415 Möglichkeiten. Im Falle von zwei bzw. drei Austauschprozessen (Perlen oder Aminosäuren) erhöht sich die Zahl drastisch auf 14,6 Millionen beziehungsweise 52,3 Milliarden! Deshalb haben wir uns zunächst für eine niedrige Mutationsrate mithilfe der epPCR entschieden. Nach Expression in *E. coli*/*P. aeruginosa* wurden etwa 2000 Enzym-Mutanten als Katalysatoren für die Modellreaktion des chiralen Esters geprüft. Es wurden gleich mehrere Mutanten mit gesteigerter Enantioselektivität identifiziert, darunter die selektivste mit einem E-Wert von 2,1. Dies bedeutet, dass wir eine Mutante erzeugt hatten, die zur Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit des S-Esters relativ zum R-Ester führt (Abb. 12).

Die entscheidende Frage war nun, ob wiederholte Zyklen von Mutagenese/Screening zu einem evolutionären Druck führen und somit eine stufenweise Verbesserung der Enantioselektivität induzieren würden. Unsere Experimente bestätigten diese Erwartung. **Abbildung 13** zeigt das erste Beispiel für die gerichtete Evolution eines enantioselektiven Enzyms. In nur vier Zyklen von Mutagenese/Screening erhöhte sich der Selektivitätsfaktor von $E = 1,1$ auf $E = 11,3$ (M. T. Reetz et al., 1997).

In der fünften Generation wurden mehr als 6000 Mutanten erzeugt, was zu einer weiteren Steigerung der Enantioselektivität führte. Aus energetischen Gründen wird es natürlich immer schwieriger, weitere Verbesserungen zu bewirken. Es ist wie beim Besteigen eines hohen Berges, die letzten Meter sind die schwierigsten! Deshalb galt es, noch bessere Methoden zur Erforschung beziehungsweise zum Durchsuchen des Proteinsequenzraumes bezüglich der Enantioselektivität zu entwickeln.

Abbildung 14 zeigt ein schematisches beziehungsweise vereinfachtes Bild des Problems. Der „Enantioselektivitätsbaum“ besteht aus vielen Ästen und Zweigen, wobei das Problem darin besteht, den kürzesten (oder wenigstens einen kurzen) Weg nach oben zu finden. Angesichts der Größe des Proteinsequenzraums können Zweifel aufkommen. Eines ist jedoch sicher: Wir suchen nicht die Nadel im Heuhaufen, denn es dürfte sehr viele Mutanten unseres Wildtyp-Enzyms geben, die alle die vorgegebene Modellreaktion mit genügend hoher Enantioselektivität katalysieren. (Kinetische Racematspaltungen sind industriell dann interessant, wenn der Selektivitätsfaktor E mehr als 30 beträgt.)

Als Erstes versuchten wir, zwei verschiedene Mutagenesemethoden zu kombinieren, speziell epPCR und Sättigungsmutagenese. Dazu waren zu-

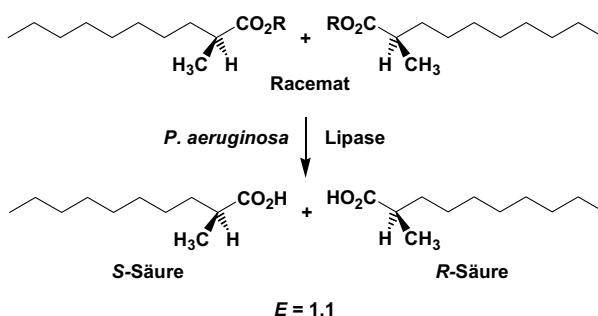


Abb. 11: Lipasen reagieren von sich aus meist nicht enantioselektiv. Im Beispiel wurde eine Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* getestet. Der Selektivitätsfaktor lag lediglich bei 1,1 – ein Faktor von 1,0 würde bedeuten, dass gar keine Enantioselektivität vorliegt.

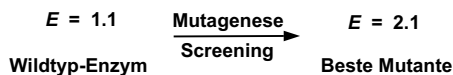


Abb. 12: Aus dem Wildtyp-Enzym mit dem Selektivitätsfaktor 1,1 wurde durch Mutagenese eine Mutante mit dem Selektivitätsfaktor 2,1 gewonnen.

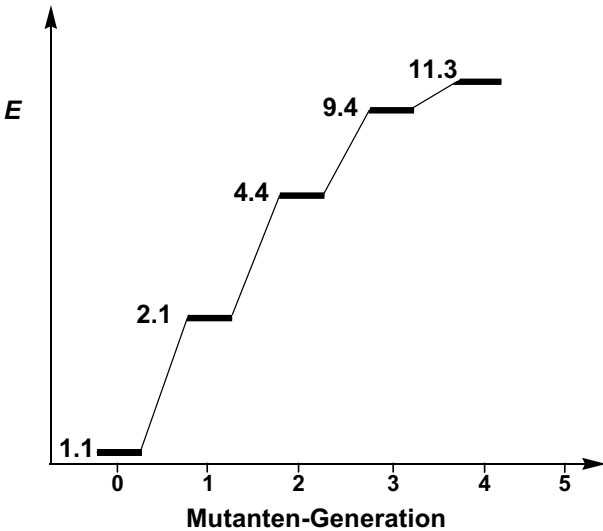
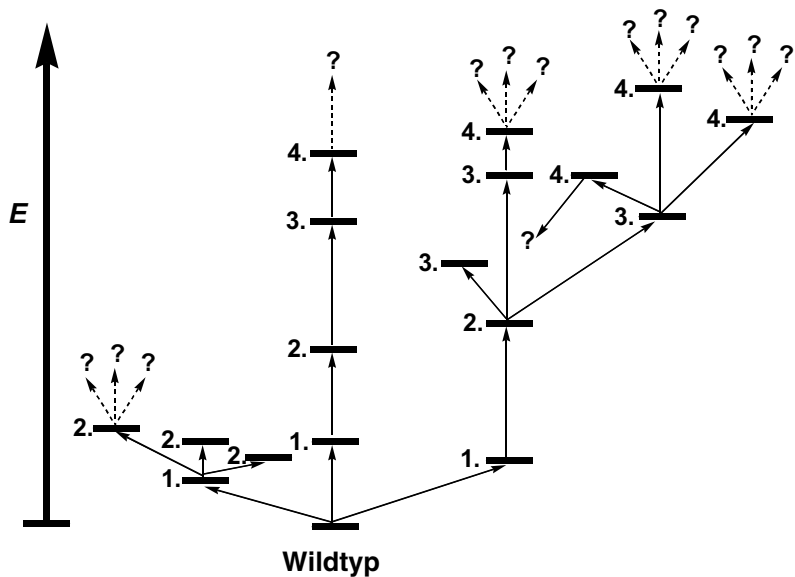


Abb. 13: Die Entwicklung des Selektivitätsfaktors E gegen die Mutanten-Generationen aufgetragen. Durch gerichtete Evolution wurde E in nur vier Generationen verzehnfacht.

Abb. 14: Schematische Darstellung des Proteinsequenzraumes. Das Problem besteht darin, in diesem „Enantioselektivitätsbaum“ den kürzesten Weg nach oben zu finden. Kinetische Racematspaltungen sind für die industrielle Anwendung mit einem Selektivitätsfaktor von 30 und mehr interessant.



nächst Studien zur Sequenzierung der enantioselektivsten, also der „Treffer“-Mutanten erforderlich. **Abbildung 15** fasst die Ergebnisse bezüglich der jeweils besten Mutanten der ersten vier Generationen zusammen.

Wir vermuteten, dass die so identifizierten Positionen im Enzym empfindliche Stellen darstellen („hot spots“), die für die jeweils beobachtete Erhöhung der Enantioselektivität verantwortlich sind, und dass aufgrund der eingeschränkten Größe der Mutanten-Bibliotheken und der Entartung des genetischen Codes die neu eingeführten Aminosäuren nicht unbedingt optimal sind. Konsequenterweise wurde dann eine Sättigungsmutagenese an den „hot spots“ durchgeführt. Nur ein Teil der Daten sei im Folgenden gezeigt.

Führt man zum Beispiel in der dritten Generation Sättigungsmutagenese an der Position 155 durch, so wird tatsächlich eine Verbesserung der Enantioselektivität von $E = 9,4$ auf 21 beobachtet, wobei Leucin gegen Phenylalanin ausgetauscht wird (**Abb. 16**). Die so verbesserte Mutante wurde dann einer epPCR-Mutagenese unterworfen mit dem Ergebnis, dass der E -Wert auf 26 anstieg. Weitere Versuche dieser Art mit anderen mutierten Genen ergaben eine kleine Familie von mutierten Lipasen, die alle E -Werte von 20 bis 26 zeigten. Somit wird klar, dass die Kombination von Mutagenesemethoden eine effizientere Strategie ist (K. Liebeton et al., 2000).

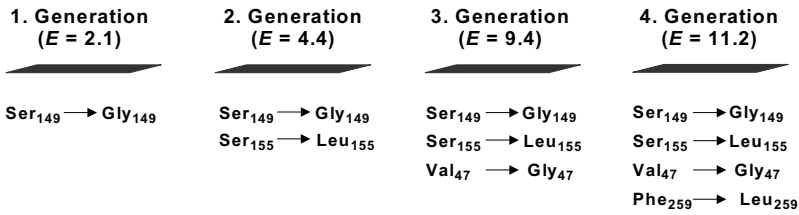


Abb. 15: Bestimmung der Aminosäure-Sequenz der mutierten Enzyme. Wir vermuten, dass die so identifizierten Positionen im Enzym (beispielsweise die Aminosäure an Platz 155) empfindliche Stellen („hot spots“) darstellen. Durch eine Sättigungsmutagenese haben wir versucht, die optimale Aminosäure an Position 155 zu finden.

Neueste Versuche auf der Basis der Kassetten-Mutagenese und des DNA-Shuffling, die hier nicht näher erläutert werden sollen, führten zu noch besseren Ergebnissen. So wurde eine Enzym-Mutante erzeugt, die bei der Katalyse der Modellreaktion einen Selektivitätsfaktor von $E > 51$ zugunsten der S-Säure zeigt (M. T. Reetz et al., 2001, im Druck). Schließlich gelang es sogar, die Richtung der Enantioselektivität umzukehren! Dies bedeutet, dass es möglich ist, Enzym-Mutanten zu erzeugen, die bevorzugt mit dem R-Ester in Wechselwirkung treten und somit eine R-selektive Esterhydrolyse einleiten (M. T. Reetz, et al, in Vorbereitung). Der in Abbildung 14 skizzierte Enantioselektivitätsbaum hat nicht nur Äste und Zweige, sondern auch Wurzeln! Die bisherigen Ergebnisse sind in **Abbildung 17** zusammengefasst.

Struktur/Selektivitätsbeziehungen

Obwohl unsere Methode zur Erzeugung von enantioselektiven Enzymen unabhängig von strukturellen Überlegungen ist, interessiert uns die Frage nach der Ursache der erhöhten Enantioselektivität. Zwar ist eine abschließende Diskussion noch nicht möglich, wir wissen aber heute schon einiges über die strukturellen Veränderungen am Enzym. Tatsächlich dürften sich Enzymologen und Theoretiker für unsere experimentellen Ergebnisse interessieren, denn Enantioselektivität ist eine empfindliche Sonde. Es stellte sich heraus, dass in vielen Fällen die Aminosäure-Austauschprozesse, die für erhöhte Enantioselektivität verantwortlich sind, auf der Oberfläche der globularen Lipase stattgefunden haben, also relativ weit weg von dem katalytisch aktiven Zentrum im Inneren des Enzyms. **Abbildung 18** zeigt die von Professor Bauke Dijkstra (Universität Groningen) gelieferte Röntgenstruktur-Analyse der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Wildtyp). Das aktive Zentrum ist mit Blau markiert, während die fünf Mutationen einer enantioselektiven Mutante ($E = 26$) gelb gekennzeichnet sind.

Dieser Befund war überraschend, denn bislang glaubte man, dass insbesondere die Aminosäuren in der Nähe des katalytisch aktiven Zentrums

Abb. 16: Durch Kombination verschiedener Mutagenese-Methoden verbessert sich der Selektivitätsfaktor E auf 26. An Position 155 erwies sich der Austausch von Leucin durch Phenylalanin als ideal.

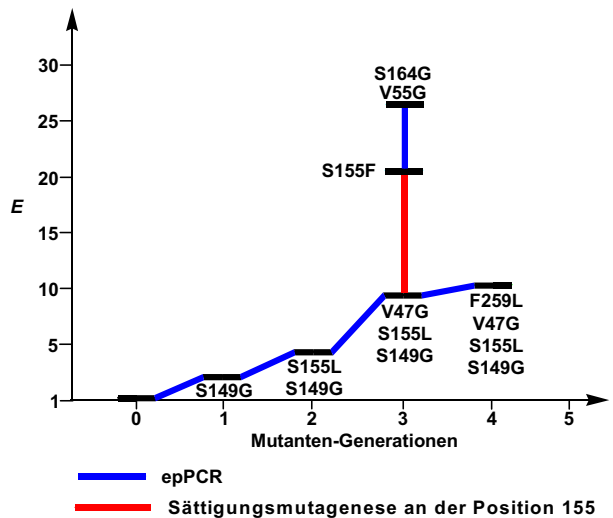
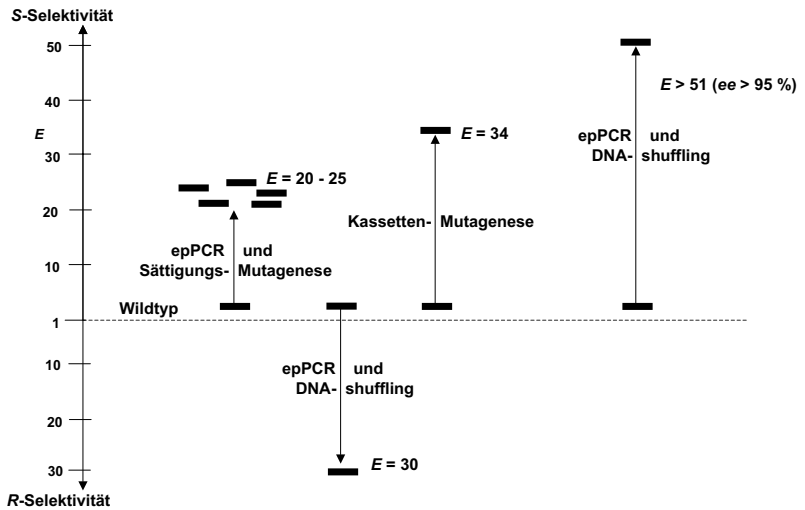
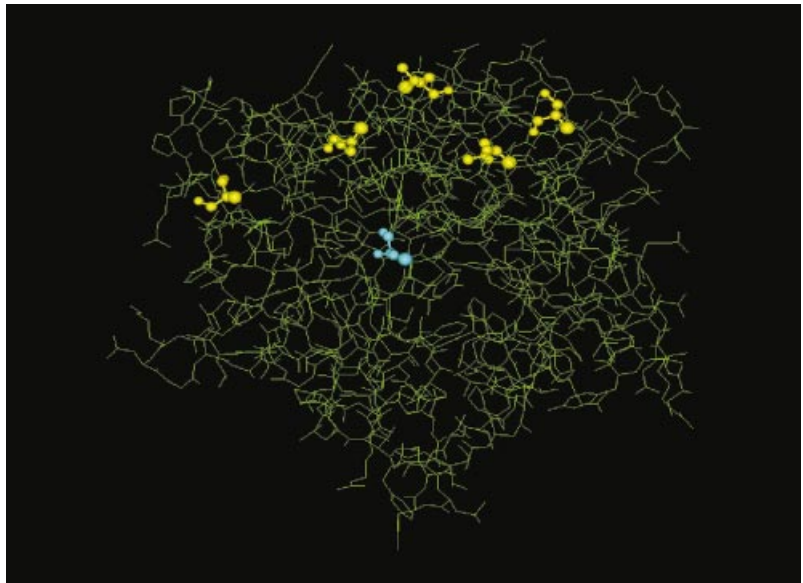


Abb. 17: Zusammenfassung unserer Ergebnisse: Mit der Kombination verschiedener Mutagenese-Methoden gelingt es, Enzyme mit einem Selektivitätsfaktor von größer 51 zu erzeugen. Auch eine Umkehr der Selektivität ist möglich: Statt S-Selektivität können wir gezielt eine R-Selektivität bewirken.



eines Enzyms für die jeweilige Enantioselektivität verantwortlich seien. Man denke an das Schloss/Schlüssel-Prinzip von Emil Fischer (Abb. 6)! Obwohl das letzte Wort noch nicht gesprochen worden ist (es fehlen noch die Röntgenstruktur-Analysen der enantioselektivsten Enzym-Mutanten), deuten Rechnungen auf der Basis von „molecular-modeling“ auf ein interessantes Phänomen hin: Die Aminosäure-Austauschprozesse an den fern gelegenen Positionen bewirken eine etwas andere Faltung des Enzyms, das heißt, es kommt zu einer strukturellen Umlagerung des Enzyms unter Bildung einer chiralen Tasche am aktiven Zentrum (K. Liebeton et al., 2000). Die Frage, ob es solche Effekte auch im Zuge der Evolution in der belebten Welt gibt, kann zurzeit nicht beantwortet werden.

Abb. 18: Röntgenstruktur der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (B. Dijkstra, Universität Groningen). Die fünf Mutationen der enantioselektiven Mutante sind gelb markiert, das katalytisch aktive Zentrum ist blau. Dass die Aminosäure-Austauschprozesse auf der Oberfläche des Enzyms stattfinden, ist überraschend, weil man bisher glaubte, dass für die Enantioselektivität Änderungen im aktiven Zentrum wesentlich seien.



Schlussfolgerungen und Perspektiven

Wir haben einen völlig neuen Ansatz zur Erzeugung von chiralen Katalysatoren für die Anwendung in der Organischen Chemie entwickelt. Im gewissen Sinne geht es um „Evolution in Reagenzglas“. Dabei werden die sonst üblichen Aspekte des „de novo designs“ auf dem Gebiet der Enzyme, nämlich elektronische und sterische Faktoren, die Möglichkeit von Wasserstoffbrücken, Solvenseffekte und Reaktionsmechanismen absichtlich ignoriert. Mit den heutigen unvollständigen Theorien kann die Enantioselektivität einer Enzym-katalysierten Reaktion nicht quantitativ vorausgesagt werden. Gerade deshalb kann unsere Methode als streng rational bezeichnet werden, zumal sie aufgrund des evolutionären Charakters weit über die Praxis der herkömmlichen kombinatorischen Katalyse hinausgeht. Es sind jedoch noch viele Probleme zu lösen.

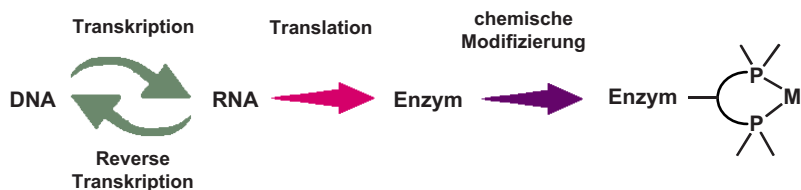
Zu den reizvollsten Herausforderungen der Zukunft gehören die Erforschung weiterer Screening- und vielleicht auch Selektionsmethoden, die Verwendung anderer Substrate und Enzyme und die Entwicklung verbesserter Methoden zur Untersuchung des Proteinsequenzraums bezüglich der Enantioselektivität einer gegebenen Stoffumwandlung. Es ist durchaus möglich, dass dann dem Chemiker ein funktionstüchtiges Werkzeug zur Verfügung stehen wird, mit dem hochselektive Biokatalysatoren für eine ökonomisch und ökologisch sinnvolle Anwendung in der organischen Chemie entwickelt werden können.

Eine einzige Forschergruppe kann all diese Aufgaben nicht allein bewältigen. Deshalb freuen wir uns, dass andere Arbeitsgruppen begonnen haben, ebenfalls auf dem neuen Gebiet der gerichteten Evolution enantioselektiver Enzyme zu forschen (S. Fong, et al, 2000; O. May, et al, 2000; U. T. Bornscheuer et al., 1998). Parallel zu diesen Bemühungen haben wir angefangen, einen Schritt jenseits dieses Forschungsgebiets zu wagen. Vielleicht ist es typisch für die Naturwissenschaft allgemein, denn eine Fragestellung jagt die nächste. Die Frage, die wir uns gestellt haben, ist ungewöhnlich. Sie hat mit der Tatsache zu tun, dass die zwei in Abbildung 5 skizzierten Vorgehensweisen, nämlich die synthetische Übergangsmetall-Katalyse und die Enzym-Katalyse, aus der Sicht des Chemikers zwei verschiedene Welten mit jeweiligen Möglichkeiten und Grenzen darstellen. So werden zum Beispiel viele Reaktionstypen durch synthetische Übergangsmetall-Komplexe glatt katalysiert (obwohl nicht immer mit ausreichender Enantioselektivität), die bei der Enzym-Katalyse nicht denkbar sind. Selbstverständlich haben die auf dem Gebiet der Biokatalyse tätigen Chemiker und Biologen diese empfindliche Einschränkung akzeptiert.

Wir stellten uns nun die Frage, ob die von der Natur vorgegebene Einschränkung durchbrochen werden kann. Zur Erläuterung unseres Konzepts ist es erforderlich, sich den in Abbildung 8 skizzierten Fluss der genetischen Information erneut in Erinnerung zu rufen. Unsere bisherige Strategie war ja, ein relevantes Gen der Zufallsmutagenese zu unterwerfen, im Zuge eines geeigneten Expressionssystems Tausende von Enzym-Mutanten zu erzeugen und schließlich diese in einer Enzym-katalysierten Stoffumwandlung zu testen.

Im Rahmen des neuen Konzepts sollen jedoch die Enzym-Mutanten dahingehend chemisch modifiziert werden, dass achirale Übergangsmetall-Komplexe eingebaut werden. Dies ist eine wissenschaftliche und technologische Herausforderung, denn solche Implantierungen müssen an einer vorgegebenen Stelle im Enzym erfolgen, und dies tausendfach auf Mikrotiterplatten in kleinstem Maßstab. Im Fall einer erfolgreichen Übertragung wäre es dann möglich, Über-

Abb. 19: Ein neues Konzept für die Katalyseforschung: Enzym-Mutanten sollen chemisch durch den Einbau von Übergangsmetall-Komplexen modifiziert werden.



gangsmetall-Katalyse mit den modifizierten Enzymen zu betreiben, das heißt all die Reaktionstypen zu untersuchen, die normalerweise außerhalb der Enzymkatalyse angesiedelt sind. Eine von vielen Möglichkeiten wäre der Einbau von achiralen Diphosphin-Metallkomplexen (**Abb. 19**).

Die Rolle des Enzyms ist die eines molekularen Mantels beziehungsweise die eines äußeren Liganden. Der unmittelbare Diphosphin-Ligand ist zwar achiral, der Enzym-Mantel erzeugt jedoch eine chirale Umgebung am aktiven Metallzentrum, insbesondere wenn der Metall-Komplex in einer Tasche des Enzyms festgebunden wird. Es handelt sich also um Hybrid-Katalysatoren. Entscheidend ist jedoch die Tatsache, dass ein evolutionärer Druck auf die Metall-Katalyse ausgeübt werden kann, denn das Durchlaufen mehrerer Zyklen von Mutagenese/Metallkomplex Implantierung/Screening bietet sich an. Bei dieser unkonventionellen Art des Liganden-„Tunings“ kommt nicht nur Enantioselektivität in Frage, es können auch beliebige andere Formen der Selektivität optimiert werden. Möglicherweise eröffnet sich ein völlig neues Betätigungsfeld auf dem Gebiet der Katalyseforschung, denn das Konzept beinhaltet die Fusion von Molekularbiologie und metallorganischer Katalyse.

Abschließende Bemerkungen

Ich hoffe, es ist mir gelungen, unsere Forschung auf verständliche Art und Weise zu beschreiben. Es liegt mir am Herzen, noch einige allgemeine Bemerkungen zu machen. Die Max-Planck-Gesellschaft ist satzungsgemäß der Grundlagenforschung verpflichtet. In diesem Sinne steht unser Projekt stellvertretend für alle anderen wissenschaftlichen Arbeiten in unserer Forschungsorganisation. Tatsächlich haben wir mit den von mir vorgestellten Untersuchungen kein einziges Medikament, keinen einzigen Duftstoff, kein einziges Pflanzenschutzmittel hergestellt. Praktisches ist bisher nicht zu erkennen – wohl aber Erkenntniserweiterung, die vielleicht eines Tages in der Industrie in Form von ressourcenschonenden und umweltfreundlichen Katalysatoren Anwendung finden wird. Grundlagenforschung ist kein Luxus, sondern Notwendigkeit!

Zweitens: Weil Forschung sowohl von Fehlschlägen als auch von Fortschritten begleitet ist, erfahren junge Doktorandinnen und Doktoranden echte Erfolgserlebnisse, so auch meine Mitarbeiter. Ich behaupte ja keineswegs, dass sie die einzigen sind, die in unserer Spaß-Gesellschaft Freude haben. Ich bin mir aber sicher, dass sie eine tiefe Genugtuung erleben. Um so mehr stimmt es nachdenklich, wenn uns die Statistik zeigt, dass immer weniger begabte junge Leute die Naturwissenschaft als Studium wählen. Unser Präsident hat auf der Hauptversammlung der Max-Planck-Gesellschaft im vergangenen Jahr auf „die Grenzlosigkeit der Wissenschaften und die Knappheit der Talente“ hingewiesen.

Als dritten Punkt möchte ich daran erinnern, dass sich die Max-Planck-Gesellschaft in zunehmendem Maße für Kooperationen mit anderen Institutionen

öffnet, insbesondere was die Zusammenarbeit mit den Universitäten angeht. So arbeiten wir zum Beispiel mit dem Bochumer Biologen Privatdozent Dr. Karl-Erich Jäger, der Expressionssysteme entwickelt, erfolgreich zusammen, ebenso mit Professor Dr. Bauke Dijkstra (Universität Groningen), der ein Experte für die Röntgenstruktur-Analyse von Enzymen ist. Ich bin sehr dankbar, dass auf diesem Wege eine – auch im Sinne der Steuerzahler – fruchtbare Kooperation zustande gekommen ist.

Außerdem ist es mir eine besondere Freude, meinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihr unermüdliches Engagement und ihre kreativen Beiträge herzlich zu danken!

Literatur

U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of ephedrine, *Biotechnology and Bioengineering* 1998, *58*, 554–559. – S. Fong, T. D. Machajewski, C. C. Mak, C.-H. Wong, Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars, *Chemistry & Biology* 2000, *7*, 873–883. – D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction, *Technique (Philadelphia)* 1989, *1*, 11–15. – K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, Directed Evolution of an Enantioselective Lipase, *Chemistry & Biology* 2000, *7*, 709–718. – O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine, *Nature Biotechnology* 2000, *18*, 317–320. – M. T. Reetz, Kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselectiver Katalysatoren, *Angewandte Chemie* 2001, *113*, 292–320. – M. T. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K.-E. Jaeger, Gerichtete Evolution eines enantioselectiven Enzyms mit Hilfe der Kombinatorischen Multiplen Kassetten-Mutagenese, *Angewandte Chemie* 2001, im Druck. – M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, Erzeugung enantioselectiver Biokatalysatoren für die Organische Chemie durch In-vitro-Evolution, *Angewandte Chemie* 1997, *109*, 2961–2963.