

Gerichtete Evolution von Enzymen

Uwe T. Bornscheuer*

Enzyme werden in der organischen Synthese zunehmend eingesetzt.^[1] Ihre hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität bei milden Reaktionsbedingungen in Kombination mit einer stetig steigenden kommerziellen Verfügbarkeit zu akzeptablen Preisen macht diese Biokatalysatoren zu einer attraktiven Alternative zu chemischen Katalysatoren.

In der Natur hat die Evolution seit Milliarden von Jahren eine ständige Anpassung der Organismen und der zur biologischen Funktion nötigen Proteine an Herausforderungen der Umwelt gesichert. Aus natürlichen Quellen isolierte Enzyme genügen jedoch nicht immer den Ansprüchen, die an eine effiziente organische Synthese gestellt werden. Zur gezielten Verbesserung der Enzymeigenschaften, z.B. hinsichtlich Aktivität, Thermo- oder Lösungsmittelstabilität sowie Regio- oder Stereoselektivität, wird zunehmend die Methode des Protein-Designs eingesetzt. In jüngster Zeit wurde hierfür die gerichtete Evolution (directed evolution) als neuer und besonders eleganter kombinatorischer Ansatz beschrieben (Abb. 1).^[2] Dabei werden durch moderne molekularbiologische Techniken Enzyrbibliotheken erzeugt, die in Kombination mit einem Assaysystem die Identifizierung verbesserter Biokatalysatoren ermöglichen. Im Unterschied zum bereits länger etablierten rationalen Ansatz der ortsspezifischen Mutagenese (Abb. 1) sind für die gerichtete Evolution keine Strukturdaten des Enzyms und keine Kenntnisse über die Beziehungen zwischen Aminosäuresequenz, Struktur und Katalysemechanismus nötig. Zudem ist die ortsspezifische Mutagenese eine zeitaufwendige Methode, da nur vergleichsweise wenige Enzymvarianten in einem angemessenen Zeitraum hergestellt werden können.

Als Voraussetzungen für eine gerichtete Evolution sind eine möglichst effiziente Mutationsstrategie zur Herstellung

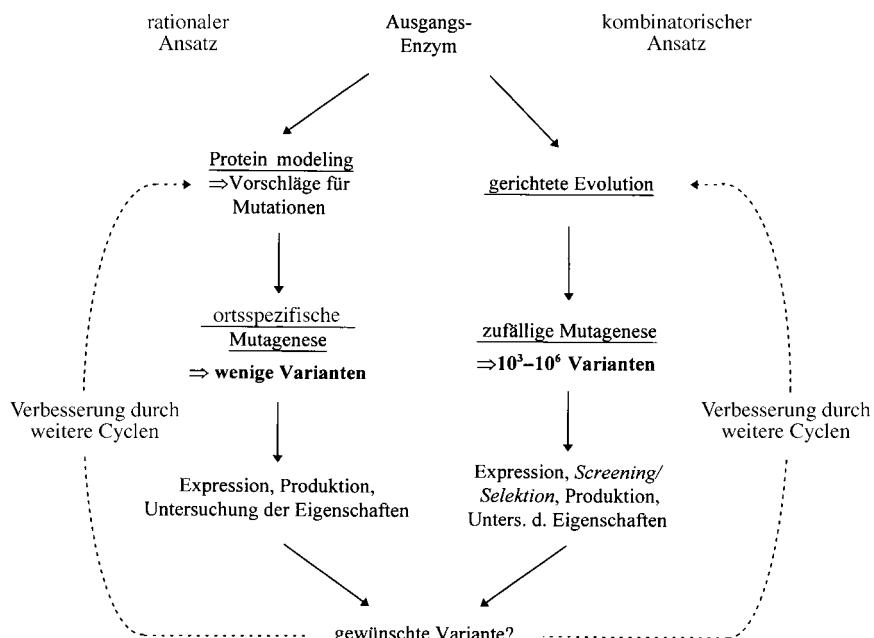


Abb. 1. Vergleich von rationalem und kombinatorischem Ansatz zur Mutagenese von Enzymen.

eines Enzyms mit verbesserten Eigenschaften, die funktionelle Expression des Proteins in einem mikrobiellen Wirtsorganismus und ein schnelles und zuverlässiges Assaysystem zur Identifizierung von Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften aus einem Pool von ca. 10⁶ Varianten und mehr zu nennen (Abb. 1).^[2c]

Zwei Strategien zur Herstellung verbesserter Enzymvarianten, die auch als asexuelle und sexuelle Evolution^[2d] bezeichnet werden, sind beschrieben worden (Abb. 2). Bei der asexuellen Evolution wird durch zufällige Mutagenese, die möglichst auf das für das gewünschte Protein codierende Ausgangsgen beschränkt wird, eine Enzyrbibliothek hergestellt und anschließend auf verbesserte Eigenschaften durchmustert. Die in der ersten Generation gefundenen besten Enzyme können in nachfolgenden Mutationsrunden optimiert werden. Dies setzt jedoch eine weitere Verbesserung der Varianten der ersten Generation durch Einführung neuer und Deletionen sich als negativ erweisender Mutationen voraus (Abb. 3).

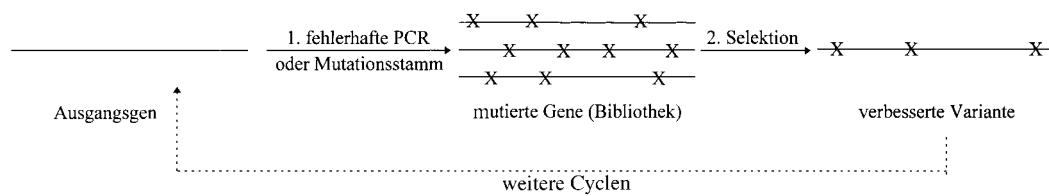
Die sexuelle Evolution hingegen geht von einem Pool homologer Ausgangsgene aus. Diese können aus einer asexuellen Evolution hervorgegangen oder von nahe ver-

[*] Dr. U. T. Bornscheuer

Institut für Technische Biochemie der Universität
Allmandring 31, D-70569 Stuttgart
Fax: (+ 49) 711-685-3196
E-mail: itubo@po.uni-stuttgart.de

HIGHLIGHTS

Gerichtete Evolution durch Erzeugung sequentieller Generationen (asexuelle Evolution)



Gerichtete Evolution durch In-vitro-Rekombination oder DNA shuffling (sexuelle Evolution)

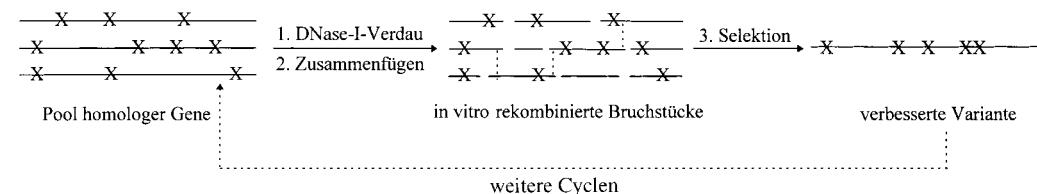


Abb. 2. Methoden zur gerichteten Evolution von Enzymen. Durch asexuelle Evolution werden in einem Ausgangsgen, z.B. durch fehlerhafte PCR oder Verwendung von Mutationsstämmen, zufällig Punktmutationen eingeführt. Die daraus resultierende Enzyrbibliothek wird anschließend auf verbesserte Enzymvarianten durchmustert. Bei der sexuellen Evolution wird ein Pool homologer Gene durch partiellen DNase-I-Verdau in Fragmente gespalten, die dann durch PCR in vitro zu einer Bibliothek von Enzymvarianten mit unterschiedlichen Mutationsmustern rekombiniert werden. (Mit Veränderungen aus Lit. [2d,3a] übernommen.)

wandten natürlichen Sequenzen sowie von Enzymvarianten abgeleitet sein, die durch rationales Design hergestellt wurden. Das Prinzip dieses DNA shuffling oder gene shuffling^[3] basiert auf einem partiellen DNase-I-Verdau und einer nachfolgenden Rekombination der Bruchstücke durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR). Das Ziel ist die Akkumulation positiver und die Eliminierung negativer Mutationen (Abb. 2 und 3). Nachteilig sind die nicht immer gegebene Verfügbarkeit homologer Gene, die Kontrolle des DNase-Verdaus zur Herstellung von Bruchstücken optimaler Größe und Probleme mit der Ligationseffizienz bei der PCR. Eine weitere, kürzlich beschriebene Strategie zur In-vitro-Mutagenese und Rekombination basiert auf einer modifizierten PCR-Vorschrift. Diese Staggered-extension-process(StEP)-Methode ermöglicht die Herstellung vollständiger Gene, die unterschiedliche Sequenzinformationen tragen. Dies wird, neben der Verwendung homologer Ausgangsgene, vor allem durch kurze Reaktionszeiten und Verwendung unterschiedlicher DNA-Template bei der PCR erreicht.^[4]

Die wohl wichtigste Methode zur asexuellen Evolution ist die fehlerhafte Polymerasekettenreaktion (error-prone PCR).^[5] Durch Einstellung nicht-optimaler Reaktionsbedingungen in der PCR kann beispielsweise die Fehlerhäufigkeit der *Thermus-aquaticus*(Taq)-Polymerase von 0.001–0.02 % unter Standardbedingungen auf über 1 % gesteigert werden (Abb. 2).^[5b] Diese In-vitro-Methode ist sehr einfach durchzuführen, kann auf die für das Zielprotein codierende Nucleotidsequenz oder auch auf kleinere Bereiche beschränkt werden und ermöglicht die Einstellung der Mutationshäufigkeit. Nachteilig sind der nicht-statistische Austausch der Nucleotide und eine häufig geringe Effizienz bei der Ligation der PCR-Produkte. Allerdings können hier modifizierte PCR-Vorschriften Abhilfe leisten.^[5c,6]

Die alternativ einsetzbaren Mutationsstämme weisen Defekte in ihren DNA-Reparaturmechanismen auf, die während der Replikation zum fehlerhaften Einbau von Nucleotiden

führen. Durch Verwendung von Plasmiden, die das Gen des interessierenden Proteins enthalten, wird die Mutation auf diesen Bereich beschränkt. Die Verwendung von Mutationsstämmen, die z. B. als *Escherichia coli*-Variante *Epicurian coli* XL1-Red^[7] (Stratagene, La Jolla, USA) käuflich sind, ist zwar im Vergleich zur fehlerhaften PCR einfacher und unproblematischer, aber die Mutationshäufigkeit kann nicht eingestellt werden. Zusätzlich können durch Mutationen an anderen Stellen des Plasmids, z.B. in der Promotorregion, Defekte, aber auch Verbesserungen erzeugt werden. Es stehen also eine ganze Reihe von Verfahren zur Herstellung von Enzymvarianten zur Verfügung. Allerdings ist noch nicht geklärt, welches die geeignete Methode ist.

Die Zahl möglicher Enzymvarianten, die durch eine gerichtete Evolution erzeugt werden können, wächst exponentiell mit der Größe des Enzyms und der Zahl der Aminosäuren, die gleichzeitig ausgetauscht werden. Selbst für ein kleines Protein aus 200 Aminosäuren können bereits bei nur drei Substitutionen theoretisch über 9 Milliarden Varianten hergestellt werden.^[2c] Diese können in der Regel nicht mehr mit herkömmlichen, arbeitsintensiven Methoden wie HPLC oder Gaschromatographie analysiert werden. Daher ist ein effizientes Screeningsystem gemäß dem von Arnold aufgestellten ersten Lehrsatz der gerichteten Mutagenese, „You only get what you screen for!“, von entscheidender Bedeutung.^[8] Eine Selektion kann beispielsweise auf einer veränderten Antibiotika-Resistenz^[9] oder auf dem Wachstum auf Mangelmedien^[10] beruhen. Besonders relevant für Fragestellungen aus der organischen Synthese sind solche Assays, die beim Screening eine direkte Information über die Enzymeigenschaften liefern. So ist eine Identifizierung von Lipasevarianten mit verbesserter Stereoselektivität durch Messung des Verhältnisses der Hydrolysegeschwindigkeiten von enantiomerreinen (*R*)- und (*S*)-*p*-Nitrophenylestern möglich.^[11] Auch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie^[12] dürfte das Auffinden aktiver Enzymvarianten in einer Bibliothek

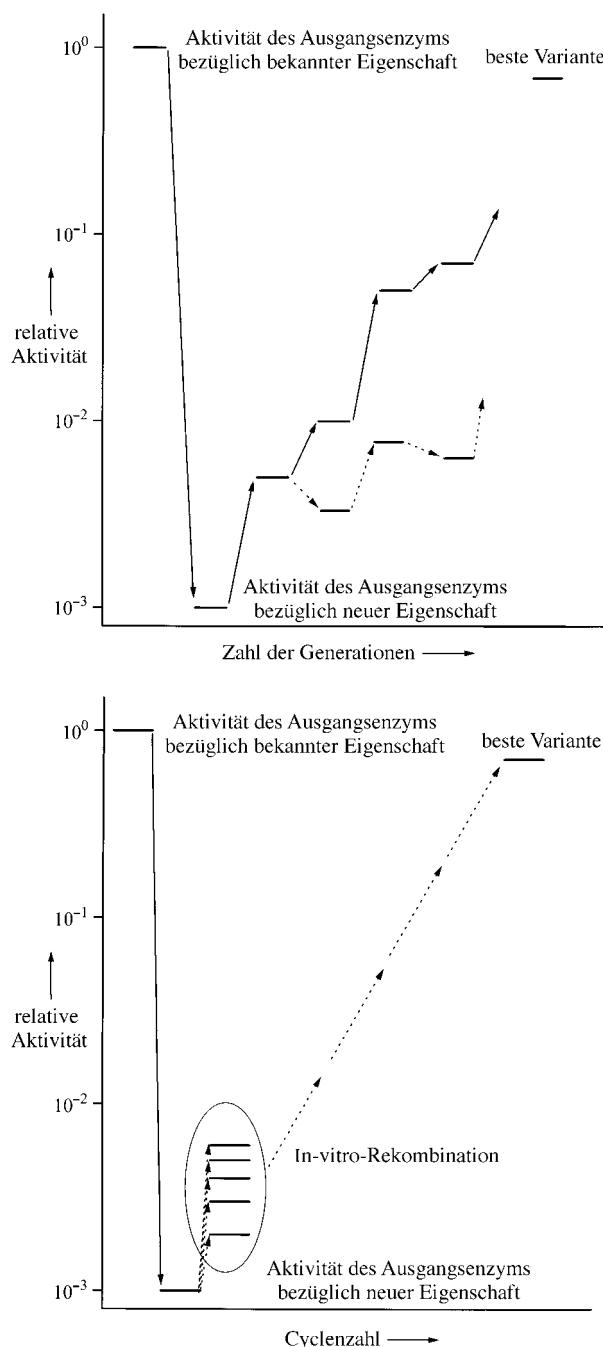


Abb. 3. Strategien zur Verbesserung eines Wildtyp-Enzyms durch Erzeugung sequentieller Generationen (asexuelle Evolution, oben) oder durch In-vitro-Rekombination durch DNA shuffling (sexuelle Evolution, unten). Bei der asexuellen Evolution kann es sowohl zu einer sukzessiven Verbesserung neuer Varianten (durchgezogene Pfeile) als auch zu einer Verschlechterung in nachfolgenden Generationen kommen (gestrichelte Pfeile). Für die sexuelle Evolution muß ein Pool homologer Varianten (Kreis) vor der In-vitro-Rekombination zur Verfügung stehen. (Mit Veränderungen aus Lit. [8] übernommen.)

erleichtern, da die bei der Reaktion auftretende Änderung der Fluoreszenz für einzelne Moleküle verfolgt werden kann.

Häufig kann eine Enzymbibliothek jedoch nicht direkt auf veränderte Eigenschaften durchmustert werden, wenn die Enzyme beispielsweise intrazellulär lokalisiert sind und eine Lyse der Zellen notwendig ist. Weitere Voraussetzungen zur Erfassung aller Varianten sind deren korrekte Prozessierung

und richtige Faltung, damit aktive Enzyme gebildet werden. Zudem sollten alle Enzymvarianten eine hinreichend hohe Stabilität und Aktivität unter den Assaybedingungen aufweisen.

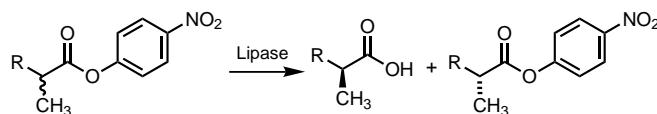
Die gerichtete Evolution von Enzymen ist ein neues und vor allem von der Biochemie dominiertes Forschungsgebiet. Dies mag erklären, warum es bisher nur sehr wenige Beispiele zur Lösung chemischer Fragestellungen gibt, die am Schluß dieses Beitrags vorgestellt werden. Aber auch für andere Probleme, vor allem für die technische Anwendung von Biokatalysatoren, ist die gerichtete Evolution eine attraktive Alternative zu den bekannten Methoden des Protein-Designs. So sind viele Enzyme nur in einem engen pH-Bereich stabil, weisen eine ungenügende temperaturabhängige Aktivität und Stabilität auf und sind nicht in jedem Lösungsmittel aktiv. Diese Defizite lassen sich nur sehr schwer durch eine ortsspezifische Mutagenese beheben. Hier kann die gerichtete Evolution schnell zum Auffinden verbesserter Enzyme beitragen.

Das DNA shuffling als Methode zur sexuellen Evolution führte zur Herstellung einer Variante des grün-fluoreszierenden Proteins, deren Fluoreszenz um den Faktor 45 gegenüber dem Wildtyp erhöht war.^[13] Die Rekombination verschiedener nahezu identischer Cephalosporinase-Gene durch DNA shuffling steigerte die Moxalactam-Resistenz bis zum 540fachen des Ausgangswertes.^[9] Durch drei Cyclen sexueller Evolution konnte die von einem β -Lactamase-Gen codierte Cefotaxim-Resistenz von *E. coli* um den Faktor 16000 gesteigert werden.^[3b] Die Halbwertzeit der Protease Subtilisin E bei 65 °C wurde nach dem StEP-Verfahren durch In-vitro-Rekombination von zwei Subtilisin-E-Varianten um den Faktor 50 gesteigert.^[4] Ein Wachstumsassay wurde bei der Herstellung einer monomeren Chorismatmutase (CM) verwendet.^[10b] Dieses in der natürlichen Form als Dimer vorliegende Enzym katalysiert die Umsetzung von Chorismat zu Prephenat in der Biosynthese von L-Tyrosin (L-Tyr) und L-Phenylalanin (L-Phe). Durch gerichtete Evolution in Kombination mit einer Selektion auf einem Mangelmedium ohne L-Tyr und L-Phe wurde eine 100fach aktiver monomere CM-Variante identifiziert. Dies lieferte Informationen über den Einfluß der Topologie auf Struktur, Stabilität und Funktion des Proteins. Die Synthese neuer Antibiotika und anderer pharmakologisch wirksamer Verbindungen sollte durch die gerichtete Evolution von Polyketidsynthetasen (PKS) möglich sein. Mehrere PKS-Gene sind schon kloniert worden, und eine einfache Anwendung der hier beschriebenen Methoden zur gerichteten Evolution wurde bereits postuliert.^[14] Weitere Beispiele werden in einer Reihe von Übersichtsartikeln eingehend beschrieben.^[2]

Für die organische Synthese sind insbesondere die Veränderung der Stereoselektivität und Substratspezifität von Enzymen von Bedeutung, da hierdurch der Zugang zu einer Vielzahl optisch reiner Verbindungen ermöglicht wird, die von den Wildtyp-Enzymen nicht oder nur unzureichend synthetisiert werden.

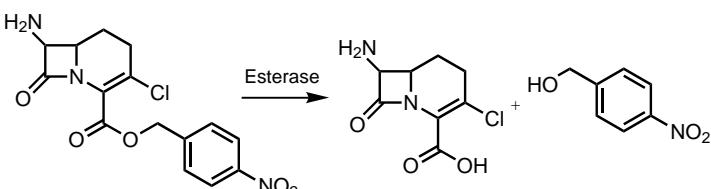
So gelang es, basierend auf dem oben beschriebenen stereoselektiven photometrischen Assay mit *p*-Nitrophenylestern, die Stereoselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bezüglich der Hydrolyse von racemischem

2-Methyldecanoat durch fehlerhafte PCR von 2 % ee (Wildtyp) auf 81 % ee (Mutante) zu steigern (Schema 1).^[11] Durch die gerichtete Evolution einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PF) mit dem Mutationsstamm *Epicurian coli* XL1-Red wurde eine Doppelmutante des Enzyms erzeugt,



Schema 1. Steigerung der Stereoselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 von 2 % ee auf 81 % ee bezüglich der Hydrolyse von racemischem 2-Methyldecanoat durch fehlerhafte PCR.^[11]

die die Hydrolyse eines sterisch gehinderten 3-Hydroxyesters mit mäßiger Reaktivität und Stereoselektivität katalysiert.^[10a] Der 3-Hydroxyester kann als Baustein in der Synthese von Epothilonen eingesetzt werden und wurde von 20 Hydrolasen einschließlich der Wildtyp-PF-Esterase nicht gespalten. Die Durchmusterung der Enzyrbibliothek basierte hier auf einer Kombination aus einem Indikator- und einem Wachstumsassay.^[10a] Eine Kombination von fehlerhafter PCR und DNA shuffling führte zur Herstellung einer stabileren und aktiveren Variante einer Esterase aus *Bacillus subtilis*.^[15] Diese Mutante hydrolysierte den *p*-Nitrobenzylester von Loracarbef, eines Cephalosporin-Antibiotikums, in 15 % Dimethylformamid mit einer im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ca. 150fach höheren Aktivität (Schema 2).^[8]



Schema 2. Eine Kombination aus fehlerhafter PCR und DNA shuffling führt bei der Spaltung des *p*-Nitrobenzylesters von Loracarbef zu einer in 15 % DMF 150fach aktiveren Esterase aus *Bacillus subtilis*. Aus praktischen Gründen basiert der Assay auf der Hydrolyse des *p*-Nitrophenylesters.^[8,15]

Trotz dieser Erfolge sind zukünftig für eine breite Anwendung der gerichteten Evolution noch eine ganze Reihe von Problemen zu lösen. Zu nennen sind hier die weitere Optimierung der Methoden zur Erzeugung von Mutationen und zur Herstellung von Enzyrbibliotheken sowie die Entwicklung molekularbiologischer Techniken, die eine gerichtete Evolution für weitere mikrobielle Expressionssysteme ermöglichen. Von besonderer Bedeutung sind aber hocheffiziente Assaysysteme, ohne die die Herstellung von Enzyrbibliotheken wenig sinnvoll ist. Hier bieten sich die für das Hochdurchsatz-Screening in der kombinatorischen Chemie entwickelten Geräte und Vorschriften zur Automatisie-

zung sowie zur schnellen Durchmusterung großer Enzyrbibliotheken an. Dies wäre durch Verwendung von Fusionsproteinen, z.B. solcher mit dem leicht detektierbaren grünfluoreszierenden Protein,^[16] möglich.

Insgesamt gesehen ist die gerichtete Evolution eine vielversprechende Ergänzung zum bestehenden Repertoire des Protein-Designs. Es ist zu erwarten, daß sie entscheidend zur Entwicklung neuer und besserer Biokatalysatoren, aber auch zum besseren Verständnis von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen beitragen wird. Möglicherweise kann die gerichtete Evolution sogar zum biotechnologischen Äquivalent der kombinatorischen Chemie aufsteigen.

Stichwörter: Enzymkatalyse • Molekulare Evolution • Mutagenese

- [1] a) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Vol. 1 und 2 (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1995**; b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3. Aufl., Springer, Berlin, **1997**; c) H. G. Davies, R. H. Green, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry: The Use of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis*, 1. Aufl., Academic Press, London, **1989**; d) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, 1. Aufl., Pergamon, Oxford, **1994**; e) *Biotechnology*, Vol. 8: *Biotransformations* (Hrsg.: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. J. W. Stadler), VCH, Weinheim, **1998**.
- [2] a) W. P. C. Stemmer, *Bio/Technology* **1995**, *13*, 549–553; b) G. F. Joyce, *Sci. Am.* **1992**, *267*(6), 48–55; c) O. Kuchner, F. H. Arnold, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 523–530; d) F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125–131; e) A. Schwienhorst, *Biospektrum* **1998**, *4*, 44–47; f) S. Harayama, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 76–82.
- [3] a) W. P. C. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10747–10751; b) W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389–391.
- [4] H. Zhao, L. Giver, J. A. Affholter, F. H. Arnold, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 258–261.
- [5] a) D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique (Philadelphia)* **1989**, *1*, 11–15; b) R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Meth. Appl.* **1992**, *2*, 28–33; c) J. H. Spee, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 777–778.
- [6] J.-P. Vartanian, M. Henry, S. Wain-Hobson, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2627–2631.
- [7] A. Greener, M. Callahan, B. Jerpseth, *Methods Mol. Biol.* **1996**, *57*, 375–385.
- [8] F. H. Arnold, J. C. Moore, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, *58*, 1–14.
- [9] A. Crameri, S.-A. Raillard, E. Bermudez, W. P. C. Stemmer, *Nature* **1998**, *391*, 288–290.
- [10] a) U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 554–559; b) G. MacBeath, P. Kast, D. Hilvert, *Science* **1998**, *279*, 1958–1961.
- [11] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832.
- [12] M. Eigen, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5740–5747.
- [13] A. Crameri, E. A. Whitehorn, E. Tate, W. P. C. Stemmer, *Nature Biotechnol.* **1996**, *14*, 315–319.
- [14] C. Khosla, R. Caren, C. M. Kao, R. McDaniel, S.-W. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 122–128.
- [15] J. C. Moore, F. H. Arnold, *Nature Biotechnol.* **1996**, *14*, 458–467.
- [16] M. M. Enzelberger, F. Zocher, C. Schmidt-Dannert, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, B. Hauer, H. Eipel, *BIOforum* **1998**, *4*, 192–194.