

# Isoenzyme der Schweineleberesterase zeigen bemerkenswerte Unterschiede in ihrer Enantioselektivität\*\*

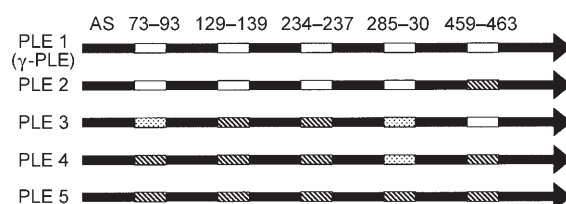
Anke Hummel, Elke Brüsehaber, Dominique Böttcher, Harald Trauthwein, Kai Doderer und Uwe T. Bornscheuer\*

Esterasen und Lipasen sind häufig verwendete Biokatalysatoren, denn sie akzeptieren ein breites Spektrum an Substraten, sind üblicherweise stabil in organischen Lösungsmitteln und zeigen oft hohe Stereoselektivitäten sogar für nichtnatürliche Substrate.<sup>[1]</sup> Während eine große Zahl von Lipasen kommerziell erhältlich ist, gibt es nur wenige gut untersuchte Carboxylesterasen, unter denen die Schweineleberesterase (pig liver esterase, PLE) wegen ihrer Vielseitigkeit die wichtigste Rolle in industriellen Prozessen spielt.<sup>[2]</sup> Ein Hauptnachteil beim Einsatz der PLE ist ihre Heterogenität, d. h. die Tatsache, dass sie aus verschiedenen Isoenzymen besteht.<sup>[3]</sup> Diese unterscheiden sich im isoelektrischen Punkt, im Molekulargewicht, der Empfindlichkeit gegen Inhibitoren und – am wichtigsten – in ihrer Substratspezifität.<sup>[3b]</sup>

Vor einigen Jahren berichteten wir über die Klonierung und rekombinante Expression des  $\gamma$ -Isoenzyms der PLE ( $\gamma$ -PLE) in *Pichia pastoris*<sup>[4]</sup> und kürzlich über diejenigen in *Escherichia coli*.<sup>[5]</sup> Damit war es uns gelungen, das unerwünschte Auftreten unterschiedlicher PLE-Isoenzyme sowie störender anderer Hydrolasen, wie sie in den kommerziellen Präparationen gefunden werden, zu vermeiden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass sich die rekombinante  $\gamma$ -PLE in ihren Enantioselektivitäten gegenüber Estern sekundärer Alkohole stark von der natürlichen Mischung von Isoenzymen unterscheidet.<sup>[6]</sup> Dies veranlasste uns dazu, die bis dato unbekannten Sequenzen für die anderen PLE-Isoenzyme zu identifizieren. Zunächst verwendeten wir Tandem-Massenspektrometrie<sup>[7]</sup> von PLE-Proben, die mithilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Tatsächlich führte dies zur Bestimmung einiger Aminosäurepositionen, wie V236P/A237G, die eine erhöhte Enantioselektivität be-

wirken. Allerdings erschien die Aufklärung der kompletten Proteinsequenz über diesen Ansatz sehr schwierig.

Zur Identifizierung der Gene, die für die unbekannten Isoenzyme der Schweineleberesterase kodieren, wurde zunächst die cDNA aus der Schweineleber-mRNA über eine Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) hergestellt. Die cDNA diente ausschließlich als Templat für die Amplifikation von PLE-homologen Genen unter Verwendung von Primern, die auf der bekannten  $\gamma$ -PLE-Sequenz basieren (GenBank-Zugangscode X63323). Um die funktionelle Expression in *E. coli* zu ermöglichen, wurden die N-terminale Signalsequenz (18 Aminosäuren) und das C-terminale ER-Retentionssignal (vier Aminosäuren, HAEL; ER = endoplasmatisches Retikulum) entfernt. Die Amplifikation zeigte im Agarosegel eine einzelne DNA-Bande bei etwa 1.6 kbp, was der Größe des  $\gamma$ -PLE-Gens entspricht. Die Fragmente wurden zuerst in den pET101/D-TOPO-Vektor und später für die funktionelle Expression in pET15b kloniert und sequenziert. Dabei konnten vier neue Sequenzen identifiziert werden (als PLE 2 bis PLE 5 bezeichnet), die 3–21 ausgetauschte Aminosäuren im Vergleich zur  $\gamma$ -PLE (hier als PLE 1 bezeichnet) enthalten.<sup>[8]</sup> Abbildung 1 zeigt schematisch, dass die ausgetauschten Aminosäuren nicht zufällig über das Protein verteilt liegen, sondern in bestimmten, konservierten Regionen zu finden sind.



**Abbildung 1.** Die Unterschiede zwischen den Isoenzymen sind nicht zufällig verteilt, sondern liegen in konservierten Bereichen. Schwarz: homologe Bereiche, weiß: Änderungen in PLE 1 ( $\gamma$ -PLE), schraffiert: Änderungen in PLE 5, gepunktet: Variationen, die weder in PLE 1 noch in PLE 5 auftreten. AS = Aminosäure.

Nach der funktionellen Expression in *E. coli* beobachteten wir, dass die neuartigen Isoenzyme deutliche Unterschiede in ihren Eigenschaften, unter anderem in der spezifischen Aktivität gegenüber achiralen Estern, aufweisen: Alle spalten bevorzugt Tributyrin, aber PLE 4 und PLE 5 sind außerdem auch hochaktiv gegen Methylbutyrat und Ethylcaprylat.<sup>[8]</sup> Ebenso unterscheidet sich die Empfindlichkeit gegen bestimmte Inhibitoren beträchtlich: PLE 3–5 sind weniger empfindlich gegenüber Natriumfluorid und Physostig-

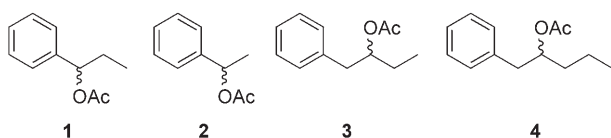
[\*] Dipl.-Biochem. A. Hummel, Dipl.-Biochem. E. Brüsehaber, Dr. D. Böttcher, Prof. U. T. Bornscheuer  
Institut für Biochemie  
Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse  
Universität Greifswald  
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)  
Fax: (+49) 3834-86-80066  
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de  
Homepage: <http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech>  
Dr. H. Trauthwein, Dr. K. Doderer  
Service Center Biocatalysis  
Evonik Degussa GmbH (Deutschland)

[\*\*] Wir danken der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (Projekte AZ13071 und AZ13141) für die finanzielle Unterstützung.

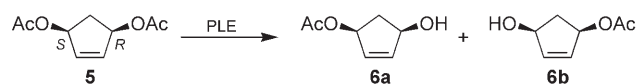
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

min als die anderen Isoenzyme, werden aber stärker durch Phenylmethylsulfonylfluorid inhibiert.<sup>[8]</sup> Das Verhältnis zwischen den spezifischen Aktivitäten für Methylbutyrat und Tributyrin sowie die Empfindlichkeit gegenüber den ausgewählten Inhibitoren wurden in der Literatur als wichtigste Merkmale zur Unterscheidung zwischen den Hauptfraktionen in der natürlichen PLE-Mischung –  $\alpha$ -PLE und  $\gamma$ -PLE<sup>[3b]</sup> – beschrieben. Damit lässt sich vermuten, dass PLE 4 oder PLE 5 der so genannten  $\alpha$ -PLE entsprechen.

Am wichtigsten für die organische Synthese sind jedoch die erheblichen Unterschiede in der Enantioselectivität, die beispielhaft anhand der kinetischen Racematspaltung von Estern sekundärer Alkohole (**1–4**; Schema 1) und der Desymmetrisierung von *meso*-Diacetat **5** (Schema 2) untersucht wurden.



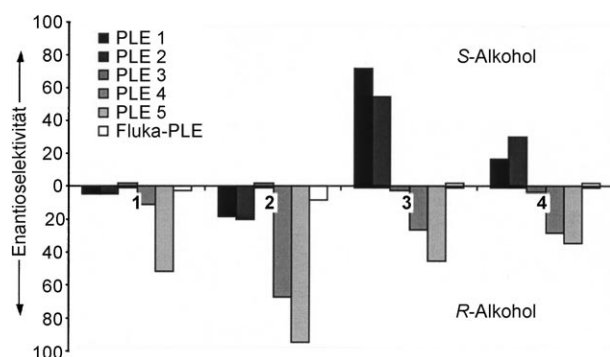
**Schema 1.** Acetate **1–4** von sekundären Alkoholen für die kinetische Racematspaltung mit den PLE-Isoenzymen.



**Schema 2.** PLE-katalysierte Desymmetrisierung der *meso*-Verbindung **5** zu **6a** oder **6b**.

In früheren Studien<sup>[6]</sup> hatten wir gezeigt, dass das rekombinante PLE 1 ( $\gamma$ -PLE) im Unterschied zur natürlichen PLE-Mischung (Enantioselectivität  $E < 5$ ) eine erhöhte Enantioselectivität für **3** ( $E > 100$ ) und **4** ( $E = 17$ ) aufweist. Der Vergleich der Enantioselectivitäten und Enantiopräferenzen der neuen PLE-Isoenzyme (PLE 2–5) mit PLE 1 und dem kommerziellen Enzym von Fluka bei der kinetischen Racematspaltung von **1–4** verdeutlicht die beachtlichen Unterschiede in ihren Eigenschaften (Abbildung 2).

PLE 1 ( $\gamma$ -PLE) und PLE 2 unterscheiden sich in nur drei Aminosäuren, und es überrascht nicht, dass ihre Selektivitäten



**Abbildung 2.** Enantioselectivität und Enantiopräferenz der rekombinanten PLE-Isoenzyme und der kommerziellen PLE-Isoenzym-Mischung bei kinetischen Racematspaltungen der Acetate **1–4**.

ten sehr ähnlich sind. Dagegen finden sich bei PLE 3–5, die in 20–21 Aminosäurepositionen<sup>[8]</sup> von der  $\gamma$ -PLE abweichen, drastische Unterschiede: Für **1** und **2** wurden mit PLE 4 und PLE 5 besonders hohe Enantioselectivitäten gefunden (Tabelle 1 und Hintergrundinformationen); dabei erhöhte sich der  $E$ -Wert für **2** von 17 (PLE 1) auf 66 (PLE 4) und 94 (PLE 5). Bei der kinetischen Racematspaltung von **1** ist PLE 5 mehr als zehnmal enantioselectiver als PLE 1.

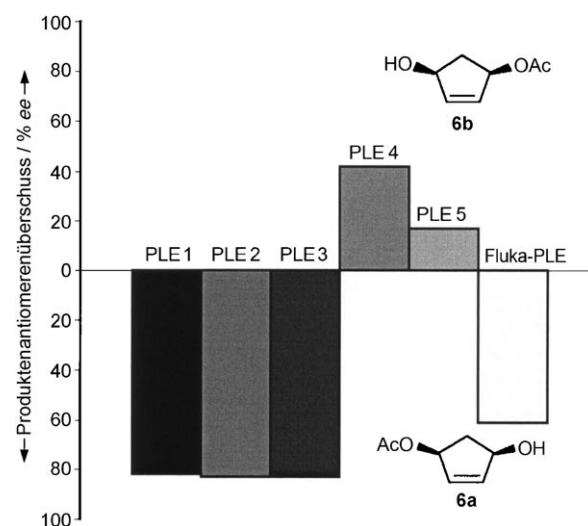
**Tabelle 1:** Enantioselectivität der rekombinanten PLE-Isoenzyme und einer kommerziellen PLE-Präparation bei der kinetischen Racematspaltung von **2**.

PLE <sup>[a]</sup>	<i>t</i> [h]	<i>ee<sub>s</sub></i> [%] <sup>[b]</sup>	<i>ee<sub>p</sub></i> [%] <sup>[b]</sup>	Umsatz [%]	<i>E</i> <sup>[c]</sup>	Präferenz
PLE 1	2	74	77	49	17	<i>R</i>
PLE 2	2	67	81	45	19	<i>R</i>
PLE 3	1.5	18	24	43	2	<i>S</i>
PLE 4	3	68	94	42	66	<i>R</i>
PLE 5	2	79	95	45	94	<i>R</i>
Fluka-PLE <sup>[d]</sup>	1.5	65	56	54	7	<i>R</i>

[a] In allen Reaktionen wurden 0.5 U Esterase (basierend auf dem pNPA-Test) verwendet. [b]  $ee_s$  = Enantiomerenüberschuss des nicht umgesetzten Substrates,  $ee_p$  = Enantiomerenüberschuss des Produktes, ermittelt über GC-Analyse an chiraler Phase. [c] Berechnet nach Chen et al.<sup>[9]</sup> [d] Kommerziell erhältliche PLE-Präparation von Fluka. Daten für die Fluka-PLE wurden aus der Literatur übernommen.<sup>[6a]</sup>

Für **3** und **4** wurde interessanterweise ein Wechsel der Enantiopräferenz beobachtet: PLE 1 und PLE 2 setzen bevorzugt das *S*-Enantiomer um, die anderen drei Isoenzyme das *R*-Enantiomer (Abbildung 2, Hintergrundinformationen). Während PLE 3 nahezu keine Präferenz zeigt, sind die Enantioselectivitäten für alle anderen Isoenzyme für alle untersuchten Acetate deutlich ausgeprägt.

Analog fanden wir einen Wechsel der Enantiopräferenz bei der Desymmetrisierung von **5** (Abbildung 3, Hintergrundinformationen). Die resultierenden Cyclopentenmonoester sind wichtige chirale Bausteine für die Syn-



**Abbildung 3.** Enantiopräferenz der rekombinanten PLE-Isoenzyme und einer kommerziellen PLE-Isoenzym-Mischung in der Desymmetrisierung von **5**.

these von Prostaglandinen und ihren Derivaten.<sup>[10]</sup> Die kommerzielle PLE (Mischung der Isoenzyme) weist laut Literatur eine *pro-R*-Selektivität mit einem Enantiomerenüberschuss von 80 % *ee* auf.<sup>[11]</sup> Abbildung 3 zeigt, dass Fluka-PLE tatsächlich die gleiche Selektivität hat, aber mit nur 60 % *ee* für **6a**. Die wichtigste Beobachtung ist aber, dass PLE 1–3 die gleiche Enantiopräferenz zeigen und bis zu 80 % *ee* erreichen, während die Isoenzyme PLE 4 bzw. PLE 5 die *pro-S*-Acetoxygruppe bevorzugen und das Monoacetat **6b** mit 42 bzw. 17 % *ee* bilden.

PLE 4 und PLE 5 zeigen nicht nur veränderte Enantioselektivitäten, sondern weisen außerdem bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat höhere kinetische Konstanten auf (Tabelle 2). Wegen des höheren  $v_{\max}$ - und des geringeren  $K_m$ -Wertes ist die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) von PLE 5 dreimal höher als die von PLE 1.

**Tabelle 2:** Kinetische Daten der Isoenzyme für pNPA.<sup>[a]</sup>

Isoenzym <sup>[b]</sup>	$v_{\max}$ [U mg <sup>-1</sup> ]	$K_m$ [mM]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] <sup>[c]</sup>
PLE 1	149	1.57	$3.0 \times 10^5$
PLE 3	110	0.96	$3.6 \times 10^5$
PLE 4	133	0.81	$5.2 \times 10^5$
PLE 5	217	0.76	$9.1 \times 10^5$

[a] pNPA = *p*-Nitrophenylacetat; die Aktivitätsmessung erfolgte bei pH 7.5 und Raumtemperatur. [b] Die kinetischen Daten von PLE 2 wurden nicht bestimmt, da die Eigenschaften mit denen von PLE 1 vergleichbar sind. [c] Zur Berechnung des  $k_{\text{cat}}$ -Wertes wurde das PLE-Trimer als eine katalytisch aktive Untereinheit betrachtet.

Unsere Ergebnisse machen deutlich, dass die Unterschiede in den Proteinsequenzen zwischen den natürlichen Isoenzymen einen starken Einfluss auf die Enantioselektivität und -präferenz der Schweineleberesterase haben. Die Tatsache, dass nun auch einzelne PLE-Isoenzyme zugänglich

sind, ist ein wichtiger Fortschritt für die Anwendung dieser für die Synthese sehr wichtigen Esterase. Jetzt können definierte Biokatalysatoren mit spezifischen Eigenschaften für ein bestehendes Syntheseproblem ausgewählt werden.

Eingegangen am 20. Juli 2007

Online veröffentlicht am 27. September 2007

**Stichwörter:** Desymmetrisierung · Enantioselektivität · Enzymkatalyse · Hydrolasen · Schweineleberesterase

- [1] a) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4. Aufl., Springer, Berlin, **2004**; b) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [2] a) C. Tamm, *Pure Appl. Chem.* **1992**, 64, 1187; b) L.-M. Zhu, M. C. Tedford, *Tetrahedron* **1990**, 46, 6587.
- [3] a) E. Heymann, W. Junge, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 95, 509; b) W. Junge, E. Heymann, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 95, 519.
- [4] S. Lange, A. Musidlowaska, C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2001**, 2, 576.
- [5] D. Böttcher, E. Brüsehaber, K. Doderer, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 73, 1282.
- [6] a) A. Musidlowaska, S. Lange, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2851; b) A. Musidlowaska-Persson, U. T. Bornscheuer, *J. Mol. Catal. B* **2002**, 19–20, 129.
- [7] E. Brüsehaber, D. Böttcher, A. Musidlowaska-Persson, D. Albrecht, M. Hecker, K. Doderer, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 76, 853.
- [8] siehe Hintergrundinformationen.
- [9] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294.
- [10] M. Harre, P. Raddatz, R. Walenta, E. Winterfeldt, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 496; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 480.
- [11] Y. Wang, C. S. Chen, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3695.