

Einzelzellbasierte Hochdurchsatz-Durchmusterung zur Identifizierung enantioselektiver hydrolytischer Enzyme**

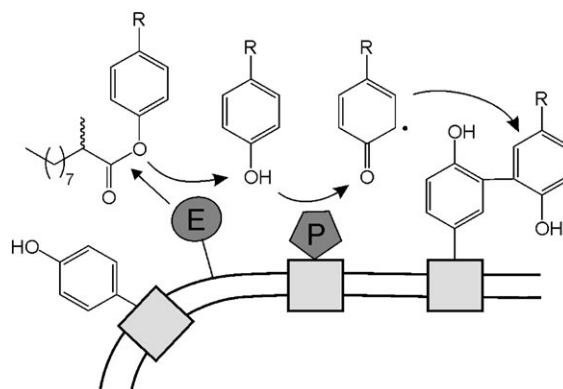
Stefan Becker, Horst Höbenreich, Andreas Vogel, Janina Knorr, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau, Karl-Erich Jaeger, Manfred T. Reetz und Harald Kolmar*

Die gerichtete Evolution hat sich als eine wertvolle Methode zur Optimierung von Stabilität, Substratspezifität und Enantioselektivität von Enzymen erwiesen, die in der Biotechnologie und der organischen Chemie als Katalysatoren zum Einsatz kommen.^[1] Entscheidend hierbei ist die Verfügbarkeit effizienter Durchmusterungs- oder Selektionsverfahren. Während Selektionsverfahren die Überprüfung von typischerweise 10^6 – 10^8 Klonen ermöglichen, können Durchmusterungsverfahren lediglich kleinere Bibliotheken handhaben, die normalerweise eine Anzahl von 1000 bis 10000 Varianten nicht überschreiten.^[2] Durchmusterungsverfahren, jedoch keine Selektionssysteme, wurden bisher in der gerichteten Evolution von enantioselektiven Enzymen eingesetzt, um Biokatalysatoren z.B. für die Produktion von chiralen Pharmazeutika oder von Pflanzenschutzmitteln zu erzeugen.^[3] Dies hat zur Konsequenz, dass nur ein kleiner Teil des Proteinsequenzraumes experimentell erfasst wird und damit zahlreiche funktionell verbesserte Varianten möglicherweise unentdeckt bleiben.

Wir präsentieren hier ein Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahren zur Identifizierung und Isolierung von enantioselektiven Enzymen, das auf Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) basiert. Konzeptionelle Grundlage ist die Markierung beider Substratanalogue mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (grün/rot). 10^8 Zellen können innerhalb weniger Stunden durchgemustert werden, also alle Klone, die mittels gerichteter Evolution erzeugt wurden. Zur Illustration des Konzepts wählten wir als asymmetrische Reaktion die kinetische Racematspaltung eines racemischen Esters, katalysiert durch eine Esterase aus *Pseudomonas*

aeruginosa (EstA). Lipolytische Enzyme wie Esterasen und Lipasen sind wertvolle Katalysatoren in der (industriellen) Produktion von chiralen Intermediaten.^[4] Substratbereiche und Enantioselektivitäten wurden durch gerichtete Evolution optimiert. Häufig ist dabei die Zahl der in Hinblick auf eine neue gewünschte Eigenschaft untersuchten Kandidaten der über den Erfolg entscheidende Parameter.

Wir haben unlängst eine Durchmusterungsstrategie im Hochdurchsatz vorgestellt, welche die Identifizierung von *E. coli*-Zellen ermöglicht, die Esterasen und Lipasen auf der Oberfläche präsentieren. Dabei werden Tyramidester als Substrate eingesetzt, deren Hydrolyseprodukte durch eine Peroxidase-katalysierte Radikalbildung auf der Oberfläche einer Esterase-profizienten bakteriellen Zelle kovalent fixiert werden (Schema 1).^[5] Nach Fluoreszenzmarkierung des oberflächengebundenen Produkts können anschließend enzymatisch aktive Zellen durch FACS isoliert werden.



Schema 1. Gekoppelte Reaktionen, die zur kovalenten Anbindung von Tyramidspezies auf der Oberfläche von *E. coli*-Zellen führen. E: Esterase, P: Peroxidase, R: detektierbare Gruppe.

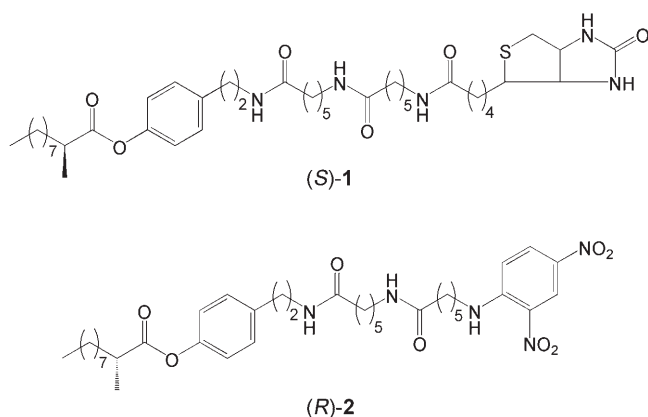
Hier beschreiben wir eine verfeinerte Strategie, die auf dem Einsatz von zwei unterschiedlichen enantiomeren Substraten beruht, die infolge einer Hydrolyse zu grüner oder roter zellulärer Fluoreszenz führen und damit die Isolierung von Esterasen mit erhöhter Enantioselektivität ermöglichen (Schema 2). Als Modellenzym diente die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dieses Enzym wurde gewählt, weil die bakterielle Zelloberflächenpräsentation von EstA ausführlich beschrieben ist^[6] und außerdem die Wildtyp-Esterase nur marginale Enantioselektivität für das (*S*)-Enantiomer des Substrats 2-Methyldecansäure(2-MDS)-*p*-nitrophenylester ($E_{app} = 1.2$) aufweist. Die Esterasesubstrate wurden als Tyramidester der (*R*)- und (*S*)-2-MDS synthetisiert, die entweder

[*] Dr. S. Becker, Prof. Dr. H. Kolmar
Institut für Biochemie und Organische Chemie
Technische Universität Darmstadt
Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)
Fax: (+49) 6151-16-5399
E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de
Homepage: <http://www.biochemie-tud.de>

H. Höbenreich, Dr. A. Vogel, Prof. Dr. M. T. Reetz
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim/Ruhr (Deutschland)
J. Knorr, Dr. S. Wilhelm, Dr. F. Rosenau, Prof. Dr. K.-E. Jaeger
Institut für Molekulare Enzymtechnologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Forschungszentrum Jülich, 52426 Jülich (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung durch das SPP1170.

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



Schema 2. Unterschiedlich konjugierte Enantiomere der als Substrate verwendeten 2-Methyldecanoäuretyramidester.

mit einem 2,4-Dinitrophenyl- oder einem Biotinrest als Indikatorgruppe konjugiert sind (Schema 2; Synthese siehe Hintergrundinformationen). Die Hydrolyse des Substrats resultiert in der kovalenten Anbindung des Tyramidderivats an der Zelloberfläche durch eine Peroxidase-katalysierte Radikalreaktion. Durch Konjugation von Meerrettich-Peroxidase auf der Zelloberfläche wurden Zellmarkierungen mit beiden Substraten individuell durchgeführt. Die Anbindung von 2,4-Dinitrophenyltyramid (DNP-Tyramid) wurde mit einem mit Alexa Fluor 488 konjugierten anti-DNP-Antikörper detektiert, der eine grüne Fluoreszenz vermittelt, während die Anbindung von Biotintyramid mit Streptavidin-(R-Phycoerythrin)-Konjugat (rote Fluoreszenz) nachgewiesen wurde. Die individuell markierten Zellpopulationen konnten mittels Durchflusszytometrie voneinander unterschieden werden (Abbildung 1 a).

Bibliotheken von EstA-Varianten wurden durch fehlerbehaftete Polymerasekettenreaktion (error prone PCR; epPCR) auf Basis eines DNA-Fragments erzeugt, das für die N-terminale katalytische Domäne von EstA codiert und die Aminosäuren 1 bis 351 umfasst. Die resultierenden Bibliotheken enthielten 6.8×10^7 und 4.0×10^7 unterschiedliche Klone und wiesen durchschnittliche Fehlerraten von zwei bzw. vier Aminosäureaustauschen pro Molekül auf. In einer ersten Durchmusterungsrunde wurden Zellen der Bibliothek mit der höheren Fehlerrate mit einem anti-EstA-Antikörper markiert und anschließend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und Streptavidin-(R-Phycoerythrin)-Konjugat inkubiert. Durch anschließende durchflusszytometrische Sortierung wurden solche Klone abgereichert und aus der Zellpopulation entfernt, die Leserastermutationen oder Stopp-Codons enthielten oder denen ein EstA-Fragment fehlte. Das Sortierfenster wurde dazu so festgelegt, dass nur solche Zellen isoliert wurden, die eine dem Wildtyp entsprechende Menge an EstA-Molekülen präsentieren (30000 Kopien pro Zelle). Anschließend wurden 1.0×10^8 Zellen zwei aufeinander folgenden Runden von FACS unterzogen (siehe Hintergrundinformationen). 44 % der Zellen befanden sich im Bereich des Sortierfensters, und 1.5×10^7 EstA-präsentierende Klone wurden insgesamt isoliert. Die Anwesenheit von esterolytischer Aktivität in der Population wurde

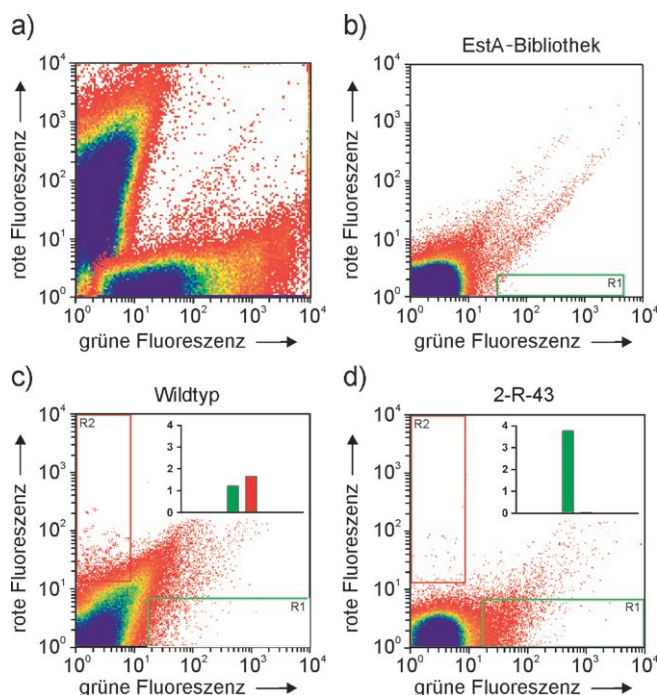


Abbildung 1. a) Überlagerung von durchflusszytometrischen Analysen esterasepräsentierender Zellen, die 60 min entweder mit dem (S)- oder (R)-Enantiomer des Tyramidesters inkubiert wurden. b) Sortierung der EstA-Bibliothek; die grüne Region kennzeichnet das Sortierfenster. c,d) FACS-Histogramme des EstA-Wildtyps (c) und des Klon 2-R-43 (d) nach 5 min Inkubation mit einem 1:1-Gemisch aus beiden enantiomeren Substraten und nach Fluoreszenzmarkierung. Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Anteil von Zellen innerhalb des entsprechenden grünen oder roten Fensters.

durch die Messung der Hydrolyse von Octansäure-*p*-nitrophenylester bestätigt (siehe Hintergrundinformationen).

Auf die Oberfläche der Enzymvarianten tragenden Zellen wurde Peroxidase aufgebracht. Diese wurden dann mit einem 1:1-Gemisch von (S)-1 und (R)-2 inkubiert. Anschließend folgte eine simultane Markierung mit Streptavidin-(R-Phycoerythrin)-Konjugat (zur Detektion der Produktbildung der (S)-2-MDS-Esterhydrolyse) und mit einem mit Alexa Fluor 488 konjugierten anti-DNP-Antikörper (zur Detektion der Produktbildung der (R)-2-MDS-Esterhydrolyse). Die Reaktionszeit betrug lediglich 5 Minuten, um Varianten mit niedriger Aktivität auszuschließen und Produktbildung durch spontane Esterhydrolyse zu vermeiden. Zur Anreicherung von Zellen, die Enzymvarianten mit invertierter Enantioselektivität präsentieren und somit den (R)-2-MDS-Ester bevorzugt hydrolysierten, wurde ein sehr stringentes Sortierfenster festgelegt (Abbildung 1 b). Von 6.8×10^7 Zellen der FACS-Sortierung wurden schließlich nur 86 Kolonien erhalten. Für 35 individuelle Klone wurde die Hydrolysegeschwindigkeit des (R)-2-MDS- und (S)-2-MDS-*p*-nitrophenylesters bestimmt und die apparente Enantioselektivität E_{app} berechnet. Von den 35 untersuchten Klonen zeigten vier eine Inversion der Enantioselektivität mit einer Präferenz für die Hydrolyse des (R)-Enantiomers. Diese Varianten wiesen nach Nucleotidsequenzanalyse im Vergleich zu Wildtyp-EstA einen bis vier Aminosäureaustausche auf (Tabelle 1).

Tabelle 1: Enantioselektivitäten des EstA-Wildtyps und der isolierten Varianten.

Klon ^[a]	Selektivität	E_{app}	Aminosäureaustausche
WT	S	1.2	–
1-R-1	R	6.7	G59S, W185R, D239S, L305P
1-R-2	R	3.3	L15P, A163G, P188Q
1-R-3	R	1.1	L150P
1-R-4	R	1.8	A1V, G122S, N147S
2-R-7	R	4.4	V184I, W185R
2-R-12	R	4.5	A71T, W185R, P233L
2-R-23	R	10.0	D169A, W185R, L249P
2-R-38	R	1.3	T143A, F149S, W185T
2-R-43	R	16.3	W185R, G224D, G263S
2-R-44	R	5.3	Y141H, W185R
2-R-55	R	5.0	W185R, E238G, A250G, F284L

[a] Nach 1-R benannte Klone resultieren aus der Durchmusterung der durch fehlerbehaftete PCR erzeugten Bibliothek. Nach 2-R benannte Klone stammen aus der Bibliothek der Sättigungsmutagenese an Position 185.

Klon 1-R-1, der die höchste Enantioselektivität zeigte, enthielt den Austausch W185R, der auch in einer unabhängigen Durchmusterung der zweiten Bibliothek mit der niedrigeren epPCR-Fehlerrate identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass die Position W185 ein Reaktionszentrum (hot-spot) für die Enantioselektivität von EstA sein könnte. An dieser Position wurde durch zweistufige SOE-PCR (splicing by overlapping extension) mithilfe entarteter Oligonucleotidprimer eine Sättigungsmutagenese vorgenommen (siehe Hintergrundinformationen). Insgesamt wurden 60 Klone analysiert, von denen sieben eine R-Selektivität aufwiesen. Von diesen enthielten sechs den Austausch W185R neben zusätzlichen Mutationen (Tabelle 1). Die siebte Variante, mit einem W185T-Austausch, zeigte die niedrigste Enantioselektivität mit $E_{R,app} = 1.3$. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Austausch von Tryptophan185 durch Arginin eine wichtige Rolle bei der Verschiebung der Enantioselektivität von EstA hin zum R-Substrat spielt. Alle Klone, die aus der Mikrobibliothek der Sättigungsmutagenese an Position 185 isoliert wurden, enthielten weitere Mutationen, die vermutlich während der PCR-Assemblierung auftraten. Variante 2-R-43 zeigte die höchste Enantioselektivität mit $E_{R,true} = 15.5$ (gemessen mittels GC-Analyse) und 81 % ee bei 38 % Umsatz (siehe Hintergrundinformationen). Eine FACS-Analyse belegt die Zuverlässigkeit unseres Verfahrens (Abbildung 1c,d): Bezüglich der Zelloberflächenakkumulation roter und grüner Fluoreszenz zeigte die EstA-Variante 2-R-43 bei identischen Markierungsbedingungen ein deutlich anderes Markierungsprofil als der EstA-Wildtyp.

Um der Frage nachzugehen, ob Mutation W185R maßgeblich zur erhöhten Enantioselektivität von EstA beiträgt und ob die Expression auf der Zelloberfläche einen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften hat, wurde eine EstA-Variante W185R durch gezielte Mutagenese konstruiert, die keine weiteren Aminosäuresubstitutionen enthält. EstA-Wildtyp und die W185R-Variante wurden in *E.-coli*-Bakterien in Form unlöslicher Einschlusskörper produziert, aufgereinigt und zurückgefaltet (siehe Hintergrundinformationen).

Während sich das isolierte Wildtyp-Enzym erneut als unselektiv erwies ($E_{true} \approx 1$), zeigte die Variante W185R einen $E_{R,true}$ -Wert von 10 mit einer nur geringfügig reduzierten spezifischen Aktivität (5.2 U mg^{-1} vs. 4.1 U mg^{-1} für Octansäure-*p*-nitrophenylester und 50 mU mg^{-1} vs. 18 mU mg^{-1} für (*R*)-2-MDS-*p*-nitrophenylester). Dieser Befund verdeutlicht, dass die evolutive Optimierung von Enantioselektivität nicht notwendigerweise mit einer massiven Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität einhergehen muss.

EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* war bisher nicht Gegenstand evolutiver Optimierungsversuche, wogegen die Anpassung der Enantioselektivität der Lipase A aus dem gleichen bakteriellen Stamm durch gerichtete Evolution mittels epPCR, Sättigungsmutagenese und DNA-Shuffling intensiv erforscht wurde. In diesem Fall führten iterative Runden von Mutagenese und Durchmusterung einiger hundert bis einiger tausend Klone pro Runde zu verbesserter Enantioselektivität für die kinetische Racematspaltung von 2-MDS-*p*-nitrophenylester ($E = 1.1$ für den Wildtyp und $E = 51$ für die beste Mutante).^[1j,2a,b] Die hier vorgestellte Strategie hat gegenüber diesen iterativen Durchmusterungen zwei große Vorteile: Zum einen werden nur solche Klone durch FACS isoliert, die eine ähnlich hohe katalytische Effizienz wie das Wildtyp-Enzym aufweisen (siehe Hintergrundinformationen), zum anderen können auch sehr große Sammlungen von Kandidaten zügig nach enantioselektiven Enzymen durchmustert werden. Die Anzahl experimentell zugänglicher Durchmusterungsereignisse liegt im Vergleich zu bisherigen ee-Durchmusterungen um mehrere Zehnerpotenzen höher. Damit wird die Durchmusterung kompletter großer Bibliotheken möglich, denen in ihrer Vielfalt nur durch die bakterielle Transformation Grenzen gesetzt sind.

Wir haben die Entwicklung eines Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahrens zur Isolierung enantioselektiver Esterasen aus großen kombinatorischen Bibliotheken beschrieben. Die Übertragung der Methode auf andere Enzymklassen wie Lipasen sollte prinzipiell möglich sein, zumal ihre Anwendung in der bakteriellen Zelloberflächenpräsentation von biotechnologisch relevanten Lipasen bereits beschrieben wurde.^[6b] Bislang beschränkt sich dieses Verfahren auf die Durchmusterung von Enzymlbibliotheken nach Esterase-Varianten mit erhöhter Enantioselektivität bezüglich der Hydrolyse von Tyramidestern chiraler Carbonsäuren oder nach Peroxidase-Varianten mit verbesserter Oxidation chiraler Phenolderivate.^[7] Ein Vergleich dieses Hochdurchsatzverfahrens hinsichtlich Effizienz und Qualität der erhaltenen Enzymvarianten mit kürzlich beschriebenen In-vitro-Strategien steht noch aus.^[8] In naher Zukunft wird auch die Frage zu beantworten sein, ob das hier vorgestellte Verfahren mittels direkter oder indirekter Kopplung von Enzymaktivität/Enantioselektivität mit der Bildung von Wasserstoffperoxid oder Tyramid auf andere Enzyme als Esterasen und Peroxidasen übertragen werden kann.

Die Durchmusterung großer kombinatorischer Bibliotheken im Hochdurchsatz ist auch von Bedeutung in Hinblick auf die kürzlich vorgeschlagene Strategie, Genbibliotheken zu erzeugen, in denen jede Variante eine Vielzahl von Mutationen (mehr als 20 pro Gen) enthält. Eine solche massive Mutagenese erzeugt hohe funktionale Diversität, bringt al-

lerdings nur sehr wenige Kandidaten hervor, die überhaupt noch enzymatische Aktivität aufweisen.^[9] Um diese identifizieren zu können, ist die Durchmusterung einer großen Zahl von Klonen notwendig, wie es mit dem hier vorgestellten Verfahren erstmals ermöglicht wurde. Dies gilt im übrigen auch für iterative Sättigungsmutagenesen, bei denen nun eine größere Vielfalt von Varianten erzeugt und funktionell analysiert werden kann, die über die bisher handhabbaren ca. vier Aminosäureaustausche pro Enzymvariante deutlich hinausgeht.^[10]

Eingegangen am 14. November 2007,
veränderte Fassung am 7. Februar 2008
Online veröffentlicht am 30. Mai 2008

Stichwörter: Asymmetrische Katalyse · Enzymatische Katalyse · Gerichtete Evolution · Hydrolasen · Kinetische Racematspaltung

- [1] Übersichtsartikel zur gerichteten Evolution von funktionellen Enzymen: a) *Directed Enzyme Evolution: Screening and Selection Methods*, Vol. 230 (Hrsg.: F. H. Arnold, G. Georgiou), Humana, Totowa, **2003**; b) *Directed Molecular Evolution of Proteins* (Hrsg.: S. Brakmann, K. Johnsson), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**; c) *Evolutionary Methods in Biotechnology* (Hrsg.: S. Brakmann, A. Schwienhorst), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; d) S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3408–3436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3310–3335; e) K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4068–4080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948–3959; f) S. B. Rubin-Pitel, H. Zhao, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 247–257; g) J. Kaur, R. Sharma, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2006**, *26*, 165–199; h) E. G. Hibbert, F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley, P. A. Dalby, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 11–19; i) *Protein Engineering Protocols*, Vol. 352 (Hrsg.: K. M. Arndt, K. M. Müller), Humana, Totowa, **2007**; j) Übersicht zur gerichteten Evolution von enantioselektiven Enzymen: M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5716–5722.
- [2] a) M. T. Reetz, K. Zonta, N. Schimossek, K. Liebeton, K. E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832; b) M. T. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K. E. Jaeger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3701–3703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3589–3591; c) Y. Koga, K. Kato, H. Nakano, T. Yamane, *J. Mol. Biol.* **2003**, *331*, 585–592; d) M. Ivancic, G. Valinger, K. Gruber, H. Schwab, *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 109–122; e) *Enzyme Assays—High-throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting* (Hrsg.: J.-L. Reymond), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [3] Typische Beispiele zur gerichteten Evolution von enantioselektiven Enzymen:^[1],2a,b] a) M. Wada, C. C. Hsu, D. Franke, M. Mitchell, A. Heine, I. Wilson, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2091–2098; b) G. J. Williams, S. Domann, A. Nelson, A. Berry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3143–3148; c) R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4955–4958; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807–4810; d) M. T. Reetz, F. Daligault, B. Brunner, H. Hinrichs, A. Deege, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4170–4173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4078–4081; e) M. T. Reetz, C. Torre, A. Eipper, R. Lohmer, M. Hermes, B. Brunner, A. Maichele, M. Bocola, M. Arand, A. Cronin, Y. Genzel, A. Archelas, R. Furstoss, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 177–180; f) B. van Loo, J. H. Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts, D. B. Janssen, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 981–990; g) O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317–320; h) G. DeSantis, K. Wong, B. Farwell, K. Chatman, Z. Zhu, G. Tomlinson, H. Huang, X. Tan, L. Bibbs, P. Chen, K. Kretz, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476–11477.
- [4] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**; b) K. E. Jaeger, M. T. Reetz, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 396–403; c) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694–1720; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633; d) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer in *Biotransformations I*, 2nd ed. (Hrsg.: D. R. Kelly), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 37–191.
- [5] a) S. Becker, H. U. Schmoldt, T. M. Adams, S. Wilhelm, H. Kolmar, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 323–329; b) S. Becker, A. Michalczyk, S. Wilhelm, K. E. Jaeger, H. Kolmar, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 943–949.
- [6] a) S. Wilhelm, J. Tommassen, K. E. Jaeger, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6977–6986; b) S. Becker, S. Theile, N. Heppeler, A. Michalczyk, A. Wentzel, S. Wilhelm, K. E. Jaeger, H. Kolmar, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1177–1182; c) S. Wilhelm, F. Rosenau, S. Becker, S. Buest, S. Hausmann, H. Kolmar, K. E. Jaeger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 55–60.
- [7] D. Lipovsek, E. Antipov, K. A. Armstrong, M. J. Olsen, A. M. Klivanov, B. Tidor, K. D. Wittrup, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1176–1185.
- [8] a) K. Bernath, M. Hai, E. Mastrobattista, A. D. Griffiths, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Anal. Biochem.* **2004**, *325*, 151–157; b) E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B. T. Kelly, A. D. Griffiths, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1255–1257; c) A. Aharoni, G. Amitai, K. Bernath, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1281–1289.
- [9] D. A. Drummond, B. L. Iverson, G. Georgiou, F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 806–816.
- [10] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891–903.