

Umwandlung einer Esterase in eine Epoxidhydrolase**

Helge Jochens, Konstanze Stiba, Christopher Savile, Ryota Fujii, Juin-Guo Yu,
Tatsiana Gerassenkov, Romas J. Kazlauskas* und Uwe T. Bornscheuer*

Professor Kalle Hult zum 65. Geburtstag gewidmet

Die divergente Evolution hat Superfamilien mit gleicher Proteinfaltung, aber unterschiedlichen Katalyseeigenschaften hervorgebracht. Zum Beispiel katalysieren die Enzyme der α/β -Hydrolase-Superfamilie^[1] Reaktionen, an denen ein nucleophiler Angriff beteiligt ist: Ester-,^[2] Amid-,^[3] Epoxid-^[4] und Alkylhalogenid-Hydrolyse^[5] sowie Cyanid-Addition an Aldehyde unter C-C-Bindungsbildung^[6] und einige andere. Viele dieser Enzyme, vor allem Esterasen und Lipasen, setzen eine breite Palette von Substraten mit hoher Stereoselektivität um und eignen sich daher als vielseitige Katalysatoren für die organische Synthese.^[2,7]

Die unterschiedlichen katalytischen Fähigkeiten der Enzyme machen es erforderlich, dass die einzelnen Mechanismen Schritte enthalten, die klar voneinander verschieden sind; daneben können jedoch auch ähnliche Schritte auftreten. Röntgenstrukturanalysen und biochemische Untersuchungen lassen vermuten, dass zur Einführung eines neuen mechanistischen Schrittes nur der Austausch einiger weniger Aminosäuren nötig ist – die Aminosäuresequenzen der Enzyme einer Superfamilie enthalten allerdings ausgetauschte Aminosäuren an Hunderten von Positionen und können darüber hinaus noch Insertionen und/oder Deletions aufweisen.

In früheren Arbeiten zur Veränderung von Enzymaktivitäten wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Um die Hydrolyse eines β -Lactams durch eine Thioesterase zu erreichen, mussten Schleifen inseriert, deletiert und ausgetauscht

sowie einzelne Aminosäuren ersetzt werden.^[8] Um aus einer 4-Chlorbenzoyl-CoA-Dehalogenase eine Crotonase zu machen, wurden acht Aminosäuren ausgetauscht.^[9] In einigen Fällen war es sogar möglich, einem Enzym durch nur einen Aminosäureaustausch eine neue Aktivität zu verleihen: Aus einer Racemase wurde eine Aldolase, aus einer Esterase eine Perhydrolase, aus einer Epimerase eine *o*-Succinylbenzoat-synthase und aus einer Decarboxylase eine Racemase.^[10,11] Es gelang auch die Einführung enzymatischer Aktivitäten in katalytisch nicht aktive Proteine, wofür aber sehr aufwändige Veränderungen vorgenommen werden mussten.^[12]

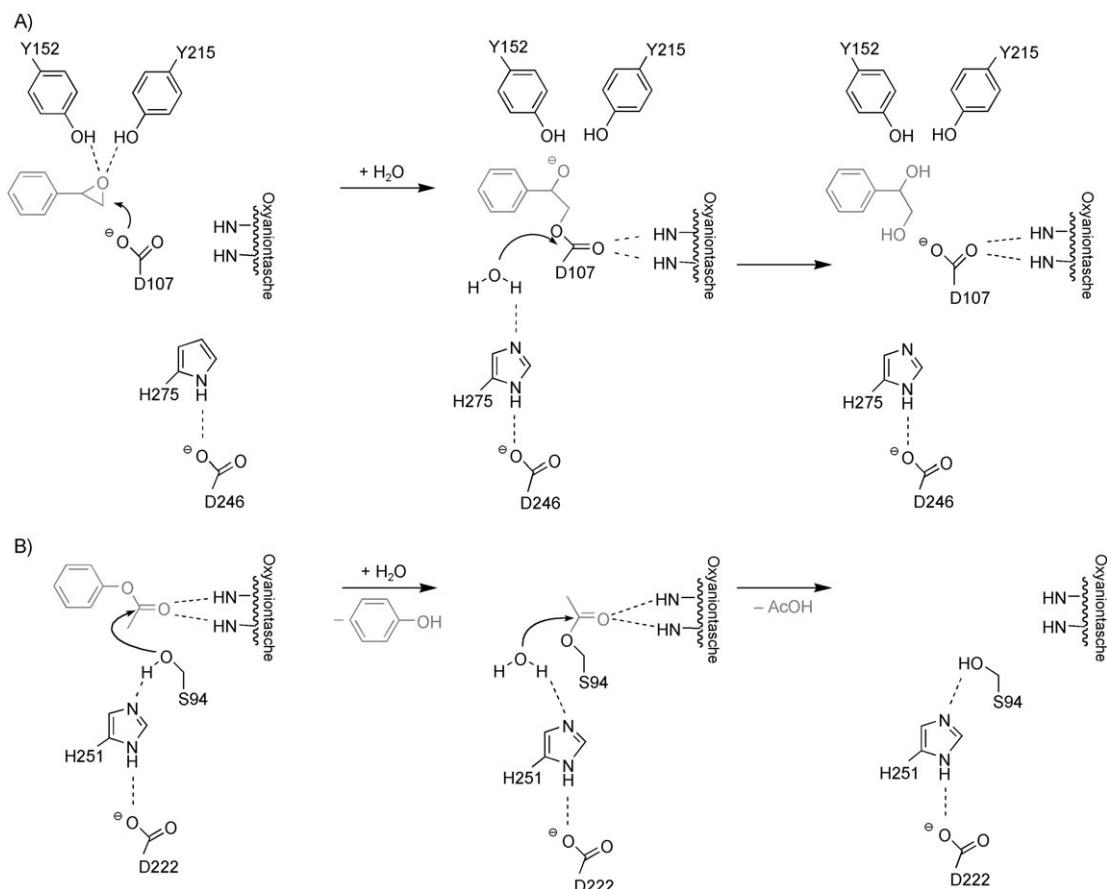
Hier untersuchen wir die Hypothese, dass bereits durch den Austausch weniger Aminosäuren die Umwandlung der katalytischen Aktivität von Enzymen der α/β -Hydrolase-Superfamilie gelingt. Unser Beispiel ist die Umwandlung einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) in eine Epoxidhydrolase. Mechanistische Überlegungen ließen uns annehmen, dass durch den Austausch zweier oder dreier Aminosäuren der Esterase- in einen Epoxidhydrolasemechanismus umgewandelt werden könnte (Schema 1). Esterasen haben eine katalytische Triade aus Ser-His-Asp,^[13] während Epoxidhydrolasen eine Asp-His-Asp-Triade nutzen;^[14] es wird also ein Austausch in der Triade benötigt. Zusätzlich brauchen Epoxidhydrolasen zwei Tyrosine zur Protonierung des Epoxidsauerstoffatoms während der Katalyse, was den Austausch zweier weiterer Aminosäuren nötig macht. Es wurde berichtet, dass nur eines dieser Tyrosine essenziell für die Katalyse sei,^[15] also wird möglicherweise nur eines benötigt.

Zur Identifizierung der Positionen dieser Aminosäuren in der PFE verglichen wir die Strukturen und Aminosäuresequenzen von sechs Epoxidhydrolasen (PDB-Einträge: 2E3J, 2CJP, 1S8O, 1CQZ, 1EHY und 1Q07) und drei Esterasen (PDB-Einträge: 1VA4, 1P0 und 1ZOI) mithilfe von clustalw.^[17] Durch diesen Vergleich (Abbildung 1) identifizierten wir die Position des katalytischen Nucleophils (D94), vier mögliche Positionen für die beiden mechanistisch wichtigen Tyrosine (Y125, Y139, Y143, Y195) sowie drei weitere Aminosäuren, die konserviert in Epoxidhydrolasen vorkommen, in der PFE jedoch fehlen (P29, H93, K188). Einem der Tyrosine ließ sich die Aminosäure 195 zuordnen, da aber die Position des zweiten Tyrosins nicht eindeutig vorhergesagt werden konnte, wurde es in allen drei alternativen Positionen eingefügt. Dementsprechend wurden folgende Mutanten mithilfe von ortsgerechteter QuikChange-Mutagenese hergestellt und rekombinant in *E. coli* exprimiert: **M1**: S94D; **M2**: S94D, F125Y, V195Y; **M3**: S94D, F143Y, V195Y; **M4**: S94D, F125Y, F143Y, V195Y; **M5**: L29P, S94D, F125Y,

[*] Dr. C. Savile, Dr. R. Fujii, J.-G. Yu, T. Gerassenkov, Prof. Dr. R. J. Kazlauskas
University of Minnesota, Department of Biochemistry
Molecular Biology & Biophysics
1479 Gortner Avenue, 174 Gortner Lab, St. Paul, MN 55108 (USA)
Fax: (+1) 612-625-5780
E-Mail: rjk@umn.edu
Dipl.-Biochem. H. Jochens, Dr. K. Stiba, Prof. Dr. 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>

[**] Wir danken Prof. Dick Janssen für die Bereitstellung des Gens der Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* sowie Dr. Santosh Padhi für die Herstellung verschiedener Punktmutanten. U.T.B. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Projekt-Nr. Bo1862/4-1) und R.J.K. der US National Science Foundation (CHE-0616560) für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200806276> zu finden.



Schema 1. Die mechanistisch notwendigen Aminosäuren einer Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* (EchA).^[15] A) Bildung und Freisetzung des Alkyl-Enzym-Intermediates für Styroxid als Substrat und eine *Pseudomonas fluorescens*-Esterase (PFE).^[16] B) Bildung und Freisetzung des Acetyl-Enzym-Intermediats für Phenylacetat als Substrat.

1VA4: LKEVTLVGFSMGGGDVARYIARHGS . . .	LKATVDCVTAFAE ----- TDFRPDMAK . . .
1Z0I: IQGAVHVGHSTGGGEVVRYMARHPE . . .	AKAHYDGIVAFSQ ----- TDFTEDLKG . . .
1P0I: PKSVTLFGESAGAASVSLHLLSPGS . . .	LKIFFPGVSEFGKESILFHHTDWVDDQRP . . .
1EHY: IEKAYVVGHDFAAIVLHKFIR-KYS . . .	IHGGFNYYRANIRPDAALWTDDLHTMSDL . . .
1CQZ: IPQAVFIGHDWAGVMVWNMAL-FYP . . .	FRGPLNRYRN-TERNWKSCKGLGRKILV . . .
1Q07: GSGYIIQGGDIGSFVGRLGVGFDA . . .	F PRAIHYRE --- TTPTASAPNGATMLQ . . .
2E3J: AEQAFVVGHDWGAPVAWTFAW-LHP . . .	FGGPLSFLFYHN-IDNDWHDLADQQGKPLTP . . .
2CJP: EEKVFVVAHDWGALIAWHLCL-FRP . . .	FTGAVNYYRA-LPINWELTAPWTGAQVKV . . .
1S8O: LSQAVFIGHDWGGMLVWYMAL-FYP . . .	FRGPLNRYRN-MERNWKWACKSLGRKILI . . .

Abbildung 1. Teil des Vergleiches der Strukturen und Aminosäuresequenzen dreier Esterasen (PFE = 1VA4) mit sechs Epoxidhydrolasen (EH, siehe Text für die pdb-Einträge). Markierungen: unten: katalytisches Aspartat und eines der mechanistisch wichtigen Tyrosine; oben: katalytisches Serin der Esterasen.

K188M; **M6**: L29P, S94D, F125Y, V195Y; **M7**: L29P, F93H, S94D, F125Y, V139Y, V195Y. Wie erwartet zeigte keine der Mutanten eine Esteraseaktivität gegen *p*-Nitrophenylacetat, die höher als der Hintergrund war ($< 10 \text{ mU mg}^{-1}$), da das katalytische Nucleophil durch ein Aspartat ersetzt worden war. Leider wies auch keine dieser Mutanten eine detektierbare Aktivität gegen *p*-Nitrostyroxid auf (siehe Hintergrundinformationen).

Da nicht klar war, warum die Mutanten die Reaktion nicht katalysierten, wendeten wir die Methode der gerichteten Evolution an, um nach fehlenden Schlüsselaminoäuren zu suchen, die möglicherweise die fehlerhafte Geometrie

korrigieren würden. Ausgehend von den Mutanten **M4–M6** kreierten wir mithilfe von fehlerbehafteter Polymerasekettenreaktion (epPCR) eine Mutantenbibliothek und selektierten aktive Varianten unter Verwendung eines Wachstumsassays.^[18] Zwar konnten wir acht Klone in einer Bibliothek aus 25 000 Varianten identifizieren, die unter diesen Bedingungen wuchsen, allerdings war bei der folgenden HPLC-Validierung keine Aktivität gegen *p*-Nitrostyroxid detektierbar.

Ein weiterer Strukturvergleich von sechs Epoxidhydrolasen zeigte eine 20 Aminosäuren lange Schleife am mutmaßlichen Eingang zum aktiven Zentrum,^[16] die sich von jener der PFE unterscheidet (Abbildung 2). In den Epoxidhydrolasen liegt diese Schleife an einer Seite des aktiven Zentrums, während sie in der PFE den Eingang blockiert. Möglicherweise positioniert diese Schleife auch das mechanistisch wichtige Y152 (Position 139 in PFE), da dieses die letzte Position in der Schleife einnimmt.

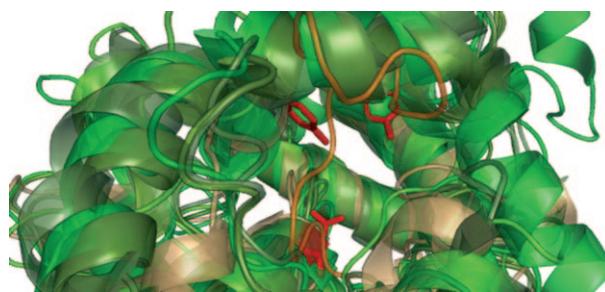


Abbildung 2. Strukturvergleich von sechs Epoxidhydrolasen (grün) mit der PFE (hellorange). Eine Schleife (A120–V139) der PFE (dunkelorange) blockiert möglicherweise den Eingang zum aktiven Zentrum (rote Stäbe).

Um die Rolle der Schleife zu untersuchen, wurde sie mithilfe einer PCR-Methode komplett durch das entsprechende Element der EchA in der PFE-Mutante **M7** (enthält

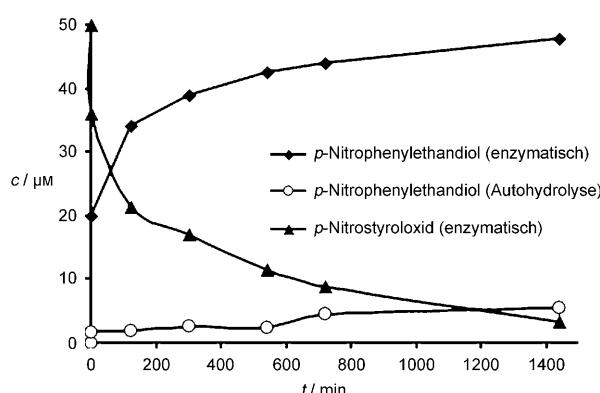


Abbildung 3. Hydrolyse von *p*-Nitrostyroloxid, katalysiert durch die Schleifenmutante **M8**. Die Proteinkonzentration betrug 0.5 mg mL^{-1} ($16.7 \mu\text{M}$). Demnach entspricht ein kompletter Substratumsatz der Hydrolyse von drei Substratmolekülen pro Enzymmolekül.

die Mutationen L29P, F93H, S94D, F125Y, V139Y, V195Y) ersetzt (EchA-Nummerierung: P132–Y152). Die resultierende Chimäre (**M8**) konnte durch die Coexpression mit Chaperonen als lösliches Enzym hergestellt werden (siehe Hintergrundinformationen). Etwa 10 mg Protein wurden nach His-tag-Aufreinigung und Entsalzung isoliert. Diese Chimäre katalysiert die langsame Hydrolyse von *p*-Nitrostyroloxid (Abbildung 3) mit einer Anfangsaktivität von 9 mU mg^{-1} und einer Wechselzahl von 0.01 s^{-1} bei einer Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$. Die Katalyseaktivität war von Ansatz zu Ansatz unterschiedlich, und einige Präparationen zeigten überhaupt keine Aktivität. Trotz intensiver Untersuchungen (siehe Hintergrundinformationen) konnten wir bislang keine zufriedenstellende Erklärung für diese Beobachtung finden. Wir nehmen an, dass die Mutationen die Proteinfaltung behindern und dass kleinere Abweichungen der experimentellen Bedingungen die Menge an richtig gefaltetem Protein beeinflussen. Aufgrund der Substratinhibition (siehe Hintergrundinformationen) ließen sich keine K_m - und V_{max} -Werte bestimmen. Diese Inhibition war bereits bei einer Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$ signifikant,

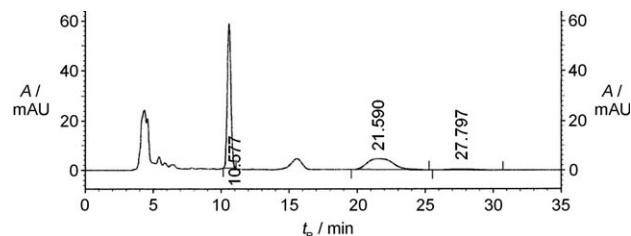


Abbildung 4. HPLC-Chromatogramm für die Umsetzung von *p*-Nitrostyroloxid durch die Schleifenmutante **M8**. $50 \mu\text{L}$ einer vorbereiteten Probe ($c = 50 \mu\text{M}$) wurden mithilfe von HPLC unter Verwendung einer Chiracel-OD-H-Säule gemessen (Probenvorbereitung: siehe Hintergrundinformationen). (*R,S*)-*p*-Nitrostyroloxid ($t_R = 10.577 \text{ min}$), (*R*)-*p*-Nitrophenylethandiol ($t_R = 21.590 \text{ min}$), (*S*)-*p*-Nitrophenylethandiol ($t_R = 27.797 \text{ min}$).

und geringere Konzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Schleifenmutante zeigte eine hohe Enantioselektivität ($E > 100$) für das (*R*)-Enantiomer von *p*-Nitrostyroloxid (Abbildung 4). Die Templat-Epoxidhydrolase – EchA – begünstigt ebenfalls das (*R*)-Enantiomer. Wir detektierten auch eine Hintergrundaktivität im *E. coli*-Zellextrakt (0.06 mU mg^{-1}), aber diese Reaktion begünstigte das (*S*)-Enantiomer. Durch die His-tag-Aufreinigung wurde diese kontaminierte Aktivität beseitigt.

Die obigen Befunde lassen darauf schließen, dass die Epoxidhydrolase-Schleife essenziell für diese neu geschaffene Aktivität ist; die Gründe auf molekularer Ebene dafür sind jedoch noch unklar. Eine Möglichkeit ist, dass die Esterase-Schleife eine unproduktive Substratorientierung bedingt. Das Esterasesubstrat – *p*-Nitrophenylacetat – und das Epoxidhydrolasesubstrat – *p*-Nitrostyroloxid – könnten sich leicht unterschiedlich im aktiven Zentrum orientieren. Eine korrekte Orientierung der *p*-Nitrophenyl-Gruppe für das Esterase-Substrat könnte unproduktiv für das Epoxidhydrolase-Substrat sein. Die beobachtete Substratinhibition durch *p*-Nitrostyroloxid stützt die Annahme, dass unproduktive Substratorientierungen im aktiven Zentrum möglich sind. Eine zweite mögliche Aufgabe der Epoxidhydrolase-Schleife liegt möglicherweise darin, eine gewisse Bewegungsfreiheit zu ermöglichen. Die Röntgenkristallstruktur von EchA zeigt eine nicht interpretierbare Elektronendichte für die Aminosäuren G138–H148, was auf eine erhöhte Flexibilität dieser Region hindeutet.^[19] Die dritte Möglichkeit ist, dass die Schleife die korrekte Orientierung von Y139 bewirkt. Die Mutante **M7** enthielt bereits die Mutation Y139, zeigte jedoch keine Epoxidhydrolaseaktivität. Die neue Schleife ändert möglicherweise die Orientierung dieser Aminosäure.

Der simple Austausch der offensichtlichen Aminosäuren (Serin zu Aspartat, Einfügen zweier Tyrosine) war nicht ausreichend, aber durch die zusätzliche Substitution einer Schleife konnte ein Esterasegerüst mit einer Epoxidhydrolaseaktivität versehen werden. Die spezifische Aktivität wurde bei einer Substratkonzentration in der Nähe der Nachweisgrenze gemessen und war nur 800fach niedriger als die der Vorlage, einer natürlichen Epoxidhydrolase. Die Katalyseaktivität ist zu niedrig für praktische Anwendungen, demonstriert aber, dass es möglich ist, Enzymaktivitäten innerhalb

der α/β -Hydrolase-Familie umzuwandeln, und eröffnet damit neue Möglichkeiten zur Katalyse nichtnatürlicher Reaktionen.

Experimentelles

Alle experimentellen Details befinden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 23. Dezember 2008

Online veröffentlicht am 6. April 2009

Stichwörter: Enantioselektivität · Enzymkatalyse · Epoxidhydrolasen · Esterasen · Gerichtete Evolution

- [1] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, *Protein Eng.* **1992**, 5, 197.
- [2] a) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer in *Biotechnology*, Vol. 8a, 2. Aufl. (Hrsg.: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. J. W. Stadler, D. R. Kelly), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 37; b) M. Cygler, J. D. Schrag, J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M. K. Gentry, B. P. Doctor, *Protein Sci.* **1993**, 2, 366.
- [3] P. Carter, J. A. Wells, *Nature* **1988**, 332, 564.
- [4] a) M. Arand, A. Cronin, M. Adamska, F. Oesch, *Methods Enzymol.* **2005**, 400, 569; b) A. Archelas, R. Furstoss, *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 108; c) K. Faber, M. Mischitz, W. Kroutil, *Acta Chem. Scand.* **1996**, 50, 249.
- [5] a) S. Barth, M. Fischer, R. D. Schmid, J. Pleiss, *Bioinformatics* **2004**, 20, 2845; b) D. B. Janssen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 150; c) S. Fetzner, F. Lingens, *Microbiol. Rev.* **1994**, 58, 641; d) P. E. Swanson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 365.
- [6] a) D. V. Johnson, A. A. Zabelinskaja-Mackova, H. Griengl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 103; b) F. Effenberger, S. Förster, H. Wajant, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 532; c) M. Schmidt, H. Griengl in *Biocatalysis—from discovery to application*, Vol. 200 (Hrsg.: W.-D. Fessner), Springer, Berlin, **1999**, S. 193.
- [7] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1694; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608.
- [8] H. S. Park, S. H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, H. S. Kim, *Science* **2006**, 311, 535.
- [9] H. Xiang, L. Luo, K. L. Taylor, D. Dunaway-Mariano, *Biochemistry* **1999**, 38, 7638.
- [10] a) F. P. Seebeck, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10158; b) D. M. Z. Schmidt, E. C. Mundorff, M. Dojka, E. Bermudez, J. E. Ness, S. Govindarajan, P. C. Babbitt, J. Minshull, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2003**, 42, 8387.
- [11] a) P. Bernhardt, K. Hult, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2742; b) Y. Terao, K. Miyamoto, H. Ohta, *Chem. Commun.* **2006**, 3600.
- [12] a) D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, 453, 190; b) B. Seelig, J. W. Szostak, *Nature* **2007**, 448, 828; c) L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas III, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2008**, 319, 1387.
- [13] V. K. Ward, B. C. Bonning, T. Huang, T. Shiotsuki, V. N. Griffith, B. D. Hammock, *Int. J. Biochem.* **1992**, 12, 1933.
- [14] R. Rink, M. Fennema, M. Smids, U. Dehmel, D. B. Janssen, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 14650.
- [15] a) B. van Loo, J. H. L. Spelberg, J. Kingma, T. Sonke, M. G. Wubbolts, D. B. Janssen, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 981; b) R. Rink, J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra, D. B. Janssen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7417.
- [16] a) J. D. Cheeseman, A. Tocilj, S. Park, J. D. Schrag, R. J. Kazlauskas, *Acta Cryst. Sect D* **2004**, 60, 1237; b) R. Rink, J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, 60, 1237; c) N. Krebsfänger, F. Zocher, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 22, 641; d) G. P. Horsman, A. M. F. Liu, E. Henke, U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1933.
- [17] npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html
- [18] Mutantenbibliotheken wurden auf Agarplatten mit Glycidolbutyrat übertragen. Aktive Klone sollten dann Glycerinmono-butyrat generieren, das als Kohlenstoffquelle für *E. coli* auf dem Minimalmedium fungierte. Auf diese Weise sollten aktive Epoxidhydrolase-Varianten selektiert werden.
- [19] M. Nardini, I. S. Ridder, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, R. Rink, D. B. Janssen, B. Dijkstra, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 14579.