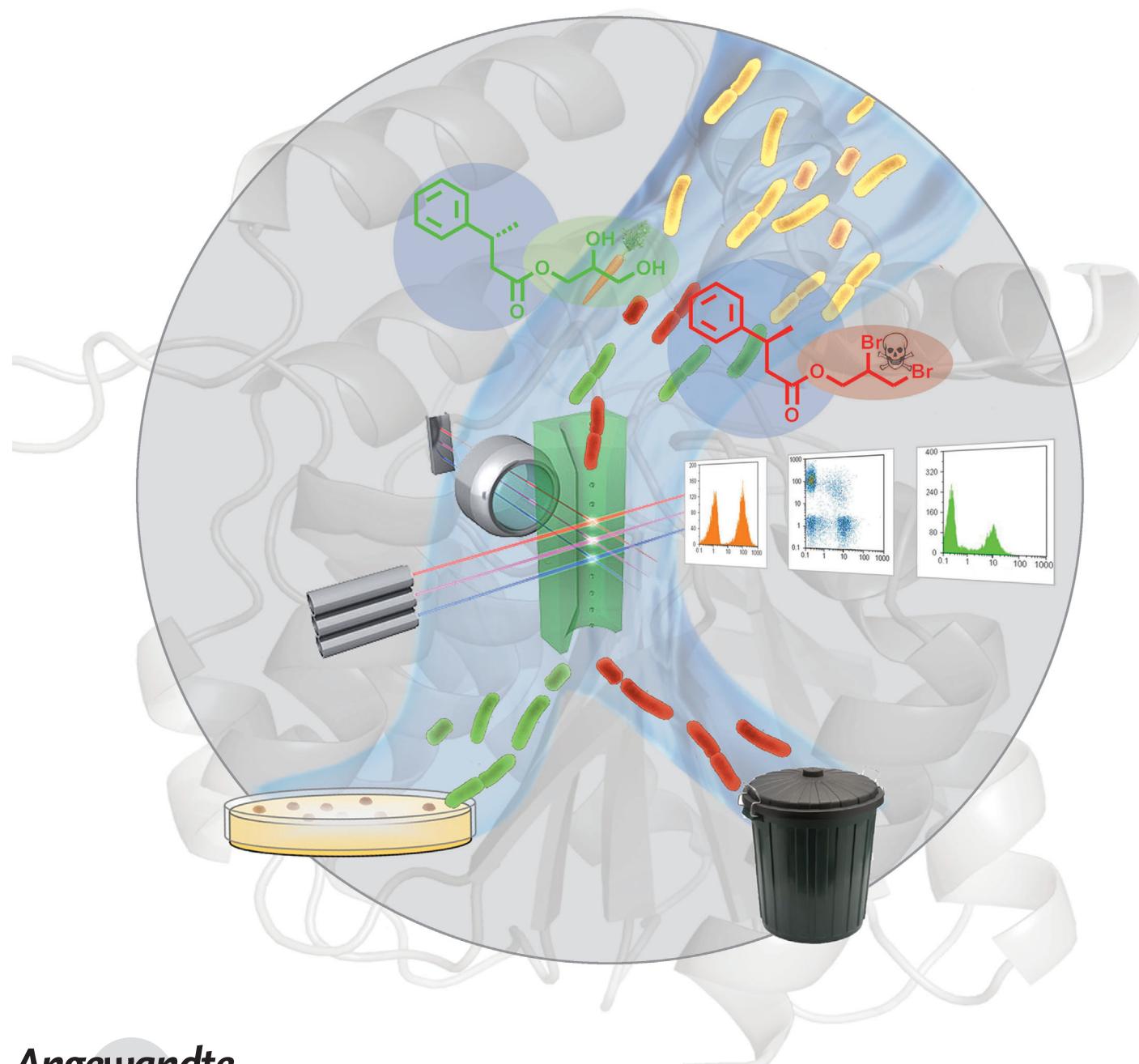


Eine Kombination aus In-vivo-Selektion und Zellsortierung zur Identifizierung enantioselektiver Biokatalysatoren**

Elena Fernández-Álvaro, Radka Snajdrova, Helge Jochens, Timo Davids,
Dominique Böttcher* und Uwe T. Bornscheuer*



Protein-Engineering ist eine wichtige Methode, um allgemeine Funktionen von Enzymen zu untersuchen und zu verstehen sowie um die Enzymeigenschaften zu verändern, da diese häufig in Biokatalysen genutzt werden.^[1] Rationales Proteindesign (bei dem bestimmte Aminosäuresubstitutionen auf Basis der dreidimensionalen Struktur von Proteinen durch Computermodellierung eingeführt werden) und gerichtete Evolution (das Erstellen einer Zufallsmutagenesbibliothek und das anschließende Identifizieren gewünschter Varianten durch Screening oder Selektion) sind die beiden wichtigsten Hilfsmittel des Protein-Engineerings. Rationales Design ist durch die vorhandenen Informationen (Struktur, Art des Mechanismus und der Substratbindung usw.) limitiert, während Ansätze der gerichteten Evolution oft durch den großen Arbeitsaufwand behindert werden, der Hochdurchsatzscreening oder Selektionsmethoden notwendig macht.^[2] Das Screening erfolgt meist in 96-Loch-Mikrotiterplatten, weshalb Wissenschaftler in der Regel nur wenige tausend Klone pro Durchgang analysieren können. Selektionsmethoden ermöglichen einen sehr viel höheren Durchsatz (10^5 – 10^8 Klone), sind aber meist auf Fälle beschränkt, in denen im entscheidenden Schritt eine Komplementierung des Stoffwechsels erfolgen muss. Eine Ausnahme bildet die In-vitro- (IVC) oder Einzelzell-Kompartimentierung in Kombination mit Durchflusszytometrie (FACS),^[3] die aber eine In-vitro-Proteinbiosynthese des zu untersuchenden Enzyms (im Falle der IVC), stabile Substrate während des gesamten Prozesses und die Generierung eines fluoreszierenden Produktes voraussetzt. Darüber hinaus können nur Enzyme mit einer neuen Aktivität identifiziert werden, während die Identifizierung von Varianten mit einer verbesserten Eigenschaft mit diesem System nur schwierig durchzuführen ist. Eine weitere vor Kurzem veröffentlichte Alternative ist der Einsatz von Zelloberflächen-Display in Kombination mit Durchflusszytometrie. Zwar konnte diese Methode erfolgreich für das Auffinden von Esterase- oder Lipasevarianten mit verbesserter Enantioselektivität genutzt werden, jedoch sind die biotinylierten Tyramide nur mühsam herzustellen. Zudem muss das Protein in aktiver Form auf der Zelloberfläche produziert und präsentiert werden.^[4]

Eine weitere Einschränkung der gerichteten Evolution ist, dass alle Varianten, die in einer Bibliothek generiert wurden, untersucht werden müssen. In einigen Fällen wurden nur die aktiven Mutanten untersucht, trotzdem wies der Großteil davon nicht die gewünschte Eigenschaft auf, was viel Zeit und Material kostete. Ein genetisches Selektionssystem würde es ermöglichen, diese Einschränkung zu überwinden und eine

größere Zahl an Varianten zu durchmustern. In einer früheren Arbeit haben wir eine Agarplatten-basierte Selektionsmethode entwickelt, um Varianten einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) zu finden, die dazu in der Lage waren, einen sterisch gehinderten 3-Hydroxyester zu hydrolysieren. Aktive Mutanten ließen sich dadurch identifizieren, dass sich ihr Wachstum verbesserte, da sie die Kohlenstoffquelle Glycerin freisetzen konnten, wobei sich auch der pH-Wert veränderte.^[5]

Die wohl nützlichste Eigenschaft von Enzymen in der Biokatalyse ist ihre Enantioselektivität (*E*-Wert). Allerdings haben Enzyme oft nicht die gewünschte Enantioselektivität für industriell wichtige chirale Bausteine. Folglich wurde die Verbesserung der Enantioselektivität^[6] oder gar Umkehrung der Enantiopräferenz^[7] umfangreich durch gerichtete Evolution untersucht, wobei das Screening ausschließlich in Mikrotiterplatten durchgeführt wurde. Als alternative Methode wurde die Inhibition von Enzymen durch Sulfoxide in einem enantioselektiven Assay vorgeschlagen, da ein Enantiomer ein besserer Inhibitor war als das andere.^[8] Die selektive Bindung von Antikörpern wurde ebenfalls als Prinzip zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses beschrieben.^[9]

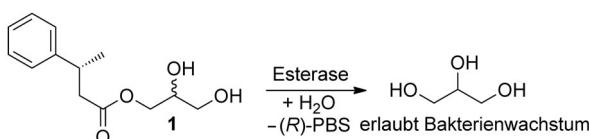
Ein Konzept für In-vivo-Selektionssysteme, um Mutanten mit veränderter Enantioselektivität zu finden, basiert auf der Kopplung des Überlebens der Wirtzelle an ein Enantiomer und des Zelltodes an das andere Enantiomer. Demnach werden durch „Zuckerbrot und Peitsche“ gewünschte Varianten als einzige Überlebende leicht zugänglich und können weiter analysiert werden. Reetz und Rüggeberg konnten zeigen, dass die Gegenwart von einerseits einem Essigsäureester (unterstütztes Wachstum) oder andererseits einem Fluorescinsäureester (verursacht Zelltod) von Pantolactonen unterschiedliches Wachstum bei Hefestämmen verursacht; von einer verbesserten Enantioselektivität wurde nicht berichtet.^[10] In einer nachfolgenden Studie konnten Reetz et al. das Prinzip übertragen: Sie identifizierten Varianten der CAL-B-Lipase mit leicht invertierter, aber nicht hoher Enantioselektivität für 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol (IPG, Wildtyp: *E*=1.9, bevorzugt das *R*-Enantiomer, im Unterschied zu Mutanten mit *E*=3–8, die das *S*-Enantiomer bevorzugen).^[11] In ähnlicher Weise untersuchten Quax et al.^[12] eine Lipase aus *Bacillus subtilis* mithilfe von IPG, das entweder an Aspartat oder an ein Phosphonat gekuppelt ist. Die Freisetzung der Aminosäure unterstützt das Zellwachstum eines Aspartat-auxotrophen *E. coli*-Stammes, während das Phosphonat zu einer Inhibition der Lipase führt. Die Autoren fanden zudem eine Mutante mit invertierter Enantioselektivität (bis zu 73 % ee); von einem verbesserten *E*-Wert wurde nicht berichtet. In beiden Fällen war der Durchsatz sehr niedrig (80 bzw. 2500 Kolonien), da die Selektion noch mit Agarplatten-Screening durchgeführt wurde. Zudem war der Erfolg nur gering, da die identifizierten Mutanten kaum Enantioselektivität (*E*<10) aufwiesen.

Hier beschreiben wir eine In-vivo-Selektionsmethode unter Anwendung der Durchflusszytometrie,^[13] um im Ultrahochdurchsatzverfahren Esterasevarianten mit veränderter Enantioselektivität für 3-Phenylbuttersäureester zu finden, indem ein Enantiomer an Glycerin – das als Kohlen-

[*] Dr. E. Fernández-Álvaro, Dr. R. Snajdrova, Dr. H. Jochens, Dipl.-Biol. T. Davids, Dr. D. Böttcher, Prof. Dr. U. T. Bornscheuer Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse Universität Greifswald Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland) E-Mail: dominique.boettcher@uni-greifswald.de uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

[**] Wir danken der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (Projekt AZ 13198) und der DFG (Projekt Bo1862/4-1) für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201102360> zu finden.



Schema 1. In-vivo-Selektionskonzept. Die Hydrolyse von **1** generiert die Kohlenstoffquelle Glycerin, die das Bakterienwachstum unterstützt, während die Hydrolyse von **2** 2,3-Dibrompropanol freisetzt, was zum Zelltod führt. PBS: 3-Phenylbuttersäure.

stoffquelle fungiert – oder an 2,3-Dibrompropanol^[14] – das als toxische Komponente wirkt – gekuppelt wurde (Schema 1). Diese Kombination hat den Vorteil, dass beide Alkohole eine hohe sterische Ähnlichkeit aufweisen und dass damit ebenfalls die wichtige Bedingung „you get what you screen for“ für eine erfolgreiche gerichtete Evolution erfüllt wird. Weitere Vorteile unseres Selektionssystems sind, dass kein auxotropher *E. coli*-Stamm benötigt wird und dass die Substrate von intrazellulär exprimierten Enzymen gespalten werden, was eine Zelloberflächen-Display-Technik unnötig macht.

Die Inkubation dieses pseudoracemischen Gemisches mit flüssigen *E. coli*-Kulturen, welche die Mutantenbibliothek der Esterase enthalten, sollte das Wachstum derjenigen *E. coli*-Klone fördern, die eine stark selektive Esterase exprimieren, wohingegen Klone mit einer nichtselektiven Esterase sterben oder ein vermindertes Wachstum aufweisen. In Kombination mit der Messung der Wachstumsfähigkeit sollten nur die gewünschten Klone von der FACS aussortiert werden. Auf diese Weise kann ein evolutionärer Druck gemäß Darwins Leitsatz „survival of the fittest“ in einer flüssigen In-vivo-Kultur aufgebaut werden.

Zur Validierung des Konzeptes wurde eine Vielzahl von Esterasen verwendet, um verschiedene Enantioselektivitäten für das Modellsubstrat 3-Phenylbuttersäure (siehe Hintergrundinformationen) zu simulieren. Die Esterase BS2^[15] fungierte als nichtselektive Kontrolle ($E \approx 1-3$), während die Esterasen PestE^[16] und CL1^[17] eine hohe Enantioselektivität aufweisen ($E > 100$, R-Präferenz, siehe Hintergrundinformationen) und als Positivkontrolle wirkten. Anschließend wurden Experimente durchgeführt, um das Wachstumsverhalten von Esterase exprimierenden *E. coli*-Bakterien in einem Medium zu untersuchen, das mit (R)-**1**/(S)-**2** (Selektionsmedium) oder (S)-**1**/(R)-**2** (Antiselektionsmedium) als Substraten (siehe Hintergrundinformationen) versetzt wurde. Das Selektionsmedium enthielt 5 mm **1** und 20 mm **2**. Die Komponente **1** konnte nicht in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, da ansonsten eine Wachstumshemmung von *E. coli* eintrat. Die Konzentration von **2** wurde dagegen optimiert, um eine vollständige Wachstumshemmung im Falle nichtenantioselektiver Enzyme zu erreichen.

Wie aufgrund ihrer R-Präferenz erwartet, war Bakterienwachstum nur in den Kulturen, die mit den Substraten (R)-**1**/(S)-**2** versetzt wurden und PestE oder CL1 exprimierten,

möglich (Abbildung 1c und Hintergrundinformationen). Der Kontrollstamm, der die nichtselektive Esterase BS2 exprimierte, war nicht in der Lage zu wachsen (Abbildung 1d und Hintergrundinformationen).

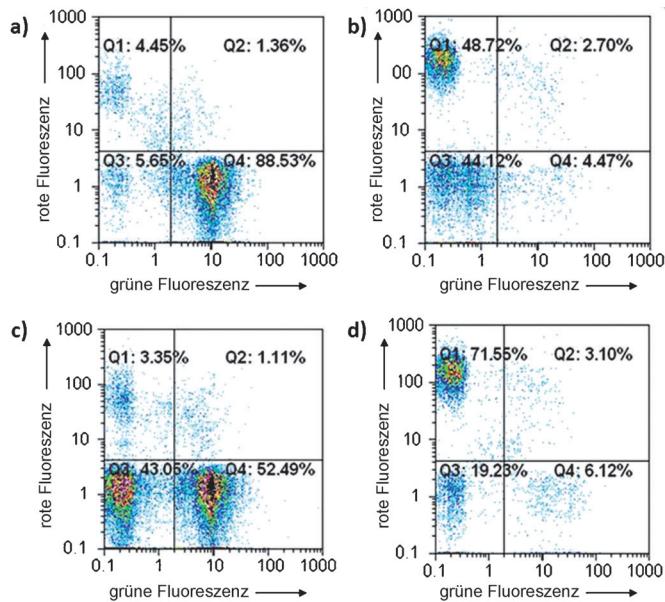


Abbildung 1. Syto9/PI-Färbung der Kulturen, um zwischen lebenden und toten *E. coli*-Zellen zu unterscheiden. Q1: tote Zellen, Q2: Zellen in der intermediären Phase, Q3: Hintergrund, Q4: wachstumsfähige Zellen. a) Zellen aus der exponentiellen Phase (wachstumsfähige Zellen). b) Zellen nach 15 min Behandlung bei 95 °C (tote Zellen). c) PestE-Kultur, in Selektionsmedium kultiviert. d) BS2-Kultur, in Selektionsmedium kultiviert.

Die Durchflusszytometrie wurde in Kombination mit Farbstoffen (Propidiumiodid und Syto9) angewendet, um die Wachstumsfähigkeit der Zellen zu evaluieren. Abbildung 1 zeigt das Prinzip mit Doppelfärbung von Kulturen nach 24 h Inkubation, welche die Esterasen PestE (Abbildung 1c) und BS2 (Abbildung 1d) in einem Medium, das mit (R)-**1**/(S)-**2** versetzt wurde, exprimieren. Kontrollen wurden entwickelt, um zwischen Zellen mit intakter Membran (Abbildung 1a), wachstumsfähigen *E. coli*-Zellen ohne Esterase-Expression) und nichtintakter Membran (Abbildung 1b, tote *E. coli*-Zellen) zu differenzieren. Eine Mischung aus den Kontrollesterasen (BS2 zusammen mit PestE oder CL1) wurde im Selektionsmedium inkubiert, und nach Aussortierung der wachstumsfähigen Population konnte eine deutliche Anreicherung der Zellen, welche die enantioselektive Esterase exprimierten, beobachtet werden (siehe Hintergrundinformationen).

PFE wurde als Modellkatalysator zur Validierung einer Mutantenbibliothek gewählt, da sie einen geringen *E*-Wert für die Zielsubstrate ($E = 3.5$ für den Ethylester, das R-Enantiomer bevorzugend)^[18] aufweist und wichtige Aminosäuresubstitutionen zur Steigerung der Enantioselektivität dieses Enzyms für chirale Carbonsäuren bereits beschrieben wurden.^[19] Aus diesem Grund wurde eine Esterasemutantbibliothek^[20] mithilfe positionsgerichteter Mutagenese

erstellt, indem degenerierte Primer verwendet wurden. Die Bibliothek wurde anschließend in *E. coli* JM109(DE3) transformiert. Die gesamte PFE-Bibliothek wurde in einer Flüssigkultur exprimiert, anschließend wurden 10^8 Klone gewaschen und 24 h in Selektionsmedium und Antiselektionsmedium inkubiert. Die wachstumsfähigen Zellen, welche die mutierten und voraussichtlich selektiven PFE-Varianten exprimierten, wurden mit einem Durchflusszytometer aussortiert und auf Agarplatten ausplattiert, woraufhin 28 Klone wachstumsfähig waren, die mit den Substraten (*R*)-**1**/*(S)*-**2** kultiviert wurden. Einige falschpositive Klone, mit verkürzten oder inaktiven Esterasevarianten, wurden gefunden, die aber durch vorausgehende Anreicherung unter Verwendung von (*R,S*)-**1** und anschließende Sortierung mit dem Durchflusszytometer entfernt werden konnten.

Die 28 selektierten Klone wurden in 96-Loch-Mikrotitratterplatten kultiviert und vorab auf Aktivität durchgemustert, indem ein racemischer 3-Phenylbuttersäure-*p*-nitrophenylester verwendet wurde.^[21] Vier unterschiedliche Klone wurden in kinetischen Racematspaltungen der racemischen Ethyl- und Glycerinester der 3-Phenylbuttersäure charakterisiert, indem Rohextrakt oder aufgereinigtes Enzym verwendet wurde und die *E*-Werte mithilfe von HPLC (oder GC) an chiraler Phase ermittelt wurden (Tabelle 1). Wie aufgrund des Selektionsprinzips erwartet, hatten alle vier Mutanten eine *R*-Enantiopräferenz. Die Varianten E8 und F5 zeigten eine hohe Enantioselektivität für den Glycerinester, der in der Selektion verwendet wurde, und exzellente *E*-Werte für den Ethylester, der in der kinetischen Racematspaltung der Biokatalyse verwendet wurde. Die Klone C4 und E7 ergaben nur eine geringe Enantioselektivität und liegen somit im gleichen Bereich wie das Wildtypenzym.

Tabelle 1: Ergebnisse der Biokatalyse mit den selektierten PFE-Mutanten für den Glycerin- (**1**) oder Ethylester (**3**) von 3-Phenylbuttersäure.

Mutante	<i>E</i> ^[a]	<i>E</i> ^[b]	<i>E</i> ^[c]	<i>E</i> ^[d]	Mutationen
C4	4	4	3	1	V121I, F198G, V225 A
E7	2	n.b.	3	n.b.	V121S
E8	25	16	50	>100	V121S, F198G, V225 A
F5	13	16	18	80	V121I, F198C

[a] Für **1** mit Rohextrakt oder [b] aufgereinigtem Enzym. [c] Für **3** mit Rohextrakt oder [d] aufgereinigtem Enzym. *ee_S*- und *ee_P*-Werte wurden durch HPLC bestimmt; S = Substrat, P = Produkt. n.b.: wegen Enzyminstabilität nach der Aufreinigung nicht bestimmt.

Wir haben ein Konzept für ein In-vivo-Selektionssystem in Kombination mit Durchflusszytometrie entwickelt, das für die Entdeckung enantioselektiver Enzyme nützlich ist. Durch die Anwendung eines Gemischs von Pseudoenantiomeren – wobei ein Enantiomer als potenzielle Energiequelle für den Wirtsorganismus und das andere als möglicher Wachstumsinhibitor fungiert – konnten *E. coli*-Klone, die die gewünschten enantioselektiven Esterasen enthalten, durch Wachstum und Zellsortierung identifiziert werden. Dies konnte durch eine anschließende kinetische Racematspaltung, beispielhaft anhand der 3-Phenylbuttersäure demonstriert, bestätigt werden. Mit entsprechenden Selektionssub-

straten sollte diese Methode auch für andere Verbindungen oder Enzymklassen geeignet sein.

Eingegangen am 5. April 2011
Online veröffentlicht am 3. August 2011

Stichwörter: Biokatalyse · Durchflusszytometrie · Enantioselektivität · Gerichtete Evolution · In-vivo-Selektion

- [1] a) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 526–529; b) *Protein Engineering Handbook* (Hrsg.: S. Lutz, U. T. Bornscheuer), Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; c) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2144–2182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138–174.
- [2] a) *Evolutionary Methods in Biotechnology* (Hrsg.: S. Brakmann, A. Schwienhorst), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; b) in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 230 (Hrsg.: F. H. Arnold, G. Georgiou), Humana Press, Totawa, **2003**, S. 387–390; c) J. P. Goddard, J.-L. Reymond, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 363–370; d) *Enzyme assays* (Hrsg.: J. L. Reymond), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [3] a) A. Aharoni, A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 210–216; b) A. Aharoni, G. Amitai, K. Bernath, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1281–1289; c) A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 338–353; d) O. J. Miller, K. Bernath, J. J. Agresti, G. Amitai, B. T. Kelly, E. Mastrobattista, V. Taly, S. Magdassi, D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 561–570.
- [4] S. Becker, H. Hobenreich, A. Vogel, J. Knorr, S. Wilhelm, F. Rosenau, K. E. Jaeger, M. T. Reetz, H. Kolmar, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5163–5166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5085–5088.
- [5] F. Zocher, N. Krebsfänger, O. J. Yoo, U. T. Bornscheuer, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *5*, 199–202.
- [6] a) M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2830–2832; b) M. Schmidt, D. Hasenpusch, M. Kähler, U. Kirchner, K. Wiggenhorn, W. Langel, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 805–809.
- [7] S. Bartsch, R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1531–1534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1508–1511.
- [8] C. M. Sprout, C. T. Seto, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5099–5102.
- [9] a) F. Taran, C. Gauchet, B. Mohar, S. Meunier, A. Valleix, P. Y. Renard, C. Creminon, J. Grassi, A. Wagner, C. Mioskowski, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 132–135; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 124–127; b) M. Matsushita, K. Yoshida, N. Yamamoto, P. Wirsching, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 6166–6169; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5984–5987.
- [10] M. T. Reetz, C. J. Rüggeberg, *Chem. Commun.* **2002**, 1428–1429.
- [11] M. T. Reetz, H. Hobenreich, P. Soni, L. Fernandez, *Chem. Commun.* **2008**, 5502–5504.
- [12] Y. L. Boersma, M. J. Droke, A. M. van der Sloot, T. Pijning, R. H. Cool, B. W. Dijkstra, W. J. Quax, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1110–1115.
- [13] G. Yang, S. G. Withers, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2704–2715.
- [14] 2,3-Dibromopropanol wurde nach Untersuchung verschiedener halogenierter Alkohole, unter Berücksichtigung von Kriterien wie hohe Toxizität des Halogenalkohols gegenüber niedriger Toxizität des Esters auf das Wachstum von *E. coli* sowie Stabilität und Löslichkeit im wässrigen System, als beste Verbindung ausgewählt.
- [15] M. Schmidt, E. Henke, B. Heinze, R. Kourist, A. Hidalgo, U. T. Bornscheuer, *Biotechnol. J.* **2006**, *2*, 249–253.

- [16] Y. Hotta, S. Ezaki, H. Atomi, T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3925–3931.
- [17] C. Schmeisser, C. Stockigt, C. Raasch, J. Wingender, K. N. Timmis, D. F. Wenderoth, H. C. Flemming, H. Liesegang, R. A. Schmitz, K. E. Jaeger, W. R. Streit, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 7298–7309.
- [18] a) E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1029–1033; b) F. Zocher, N. Krebsfänger, O. J. Yoo, U. T. Bornscheuer, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *5*, 199–202.
- [19] S. Park, K. L. Morley, G. P. Horsman, M. Holmquist, K. Hult, R. J. Kazlauskas, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 45–54.
- [20] H. Jochens, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1861–1866.
-
- [21] E_{app} -Werte, die mit enantiomerenreinen *R*- und *S*-Estern von pNP bestimmt wurden, unterschieden sich deutlich von den E_{true} -Werten, die in der kinetischen Racematspaltung der Glycerin- oder Ethylester ermittelt wurden (E_{app} =scheinbare Enantioselektivität, E_{true} =wahre Enantioselektivität, pNP=*para*-Nitrophenol). Zurückgeführt werden kann dies auf die bekannten Diskrepanzen zwischen E_{app} -und E_{true} -Werten (L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4560–4561) sowie auf die Tatsache, dass wir mit den Substraten **1** und **2** selektiert hatten, die strukturell dem Ethylester **3** ähnlich sind, sich aber deutlich von den pNP-Estern unterscheiden, was die Regel „you get what you screen for“ bestätigt.