

- [1] a) G. Schmid, *Clusters and Colloids. From Theory to Applications*, Wiley-VCH, New York, **1994**; b) *Nanomaterials: synthesis, properties and applications* (Hrsg.: A. S. Edelstein, R. C. Cammarata), IOP, Bristol, **1996**.
- [2] a) K. Simkiss, K. M. Wilbur, *Biomineralization*, Academic Press, New York, **1989**; b) *Biomimetic Materials Chemistry* (Hrsg.: S. Mann), VCH, New York, **1996**.
- [3] a) H. Spring, K. H. Schleifer, *System. Appl. Microbiol.* **1995**, *18*, 147; b) D. P. E. Dickson, *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *203*, 46.
- [4] a) S. Mann, *Nature* **1993**, *365*, 499; b) S. Oliver, A. Kupermann, N. Coombs, A. Lough, G. A. Ozin, *Nature* **1995**, *378*, 47.
- [5] a) D. Pum, U. B. Sleytr, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 8; b) U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sara, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1034.
- [6] a) J. R. Duncan, D. Brady, B. Wilhelmi, *Methods Biotechnol.* **1997**, *2*, 91; b) J. R. Stephen, S. J. Macnaughton, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 230.
- [7] a) T. J. Beveridge, R. J. Doyle, *Metal Ions and Bacteria*, Wiley, New York, **1989**; b) T. J. Beveridge, R. G. E. Murray, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 876; c) G. Southam, T. J. Beveridge, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1996**, *60*, 4369; d) D. Fortin, T. J. Beveridge in *Biomineralization. From Biology to Biotechnology and Medical Applications* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 7.
- [8] a) T. Klaus, R. Joerger, E. Olsson, C.-G. Granqvist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13611; b) T. Klaus-Joerger, R. Joerger, E. Olsson, C.-G. Granqvist, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 15.
- [9] R. Joerger, T. Klaus, C.-G. Granqvist, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 407.
- [10] S. Underwood, P. Mulvaney, *Langmuir* **1994**, *10*, 3427.
- [11] a) V. Patil, R. B. Malvankar, M. Sastry, *Langmuir* **1999**, *15*, 8197; b) K. S. Mayya, V. Patil, M. Sastry, *Langmuir* **1997**, *13*, 2575; c) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1849; d) M. D. Musick, C. D. Keating, L. A. Lyon, S. L. Botsko, D. J. Pena, W. D. Hollaway, T. M. MeEvoy, J. N. Richardson, M. J. Natan, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2869.
- [12] D. V. Leff, L. Brandt, J. R. Heath, *Langmuir* **1996**, *12*, 4723.
- [13] J. W. Jeffrey, *Methods in Crystallography*, Academic Press, New York, **1971**.
- [14] K. Esumi, T. Hosoya, A. Suzuki, K. Torigoe, *Langmuir* **2000**, *16*, 2978.
- [15] P. Mukherjee, C. R. Patra, R. Kumar, M. Sastry, *PhysChemComm* **2001**, *5* (online journal), <http://www.rsc.org/physcc>.

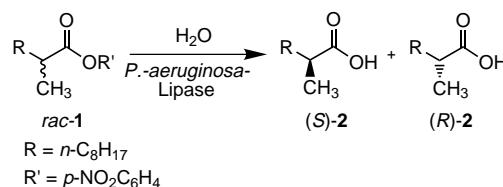
## Gerichtete Evolution eines enantioselektiven Enzyms durch kombinatorische multiple Kassetten-Mutagenese

Manfred T. Reetz,\* Stephanie Wilensek, Dongxing Zha und Karl-Erich Jaeger

Erstmalig 1997 gelang uns der Nachweis, dass die Methoden der gerichteten Evolution funktionaler Proteine<sup>[1-4]</sup> auch zur Erzeugung von enantioselektiven Enzymen angewandt werden können.<sup>[5]</sup> Die Kombination geeigneter Mutagenese- und

[\*] Prof. Dr. M. T. Reetz, S. Wilensek, Dr. D. Zha  
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung  
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)  
Fax: (+49) 208-306-2985  
E-mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de  
Priv.-Doz. Dr. K.-E. Jaeger  
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen  
Ruhr-Universität Bochum  
44780 Bochum (Deutschland)

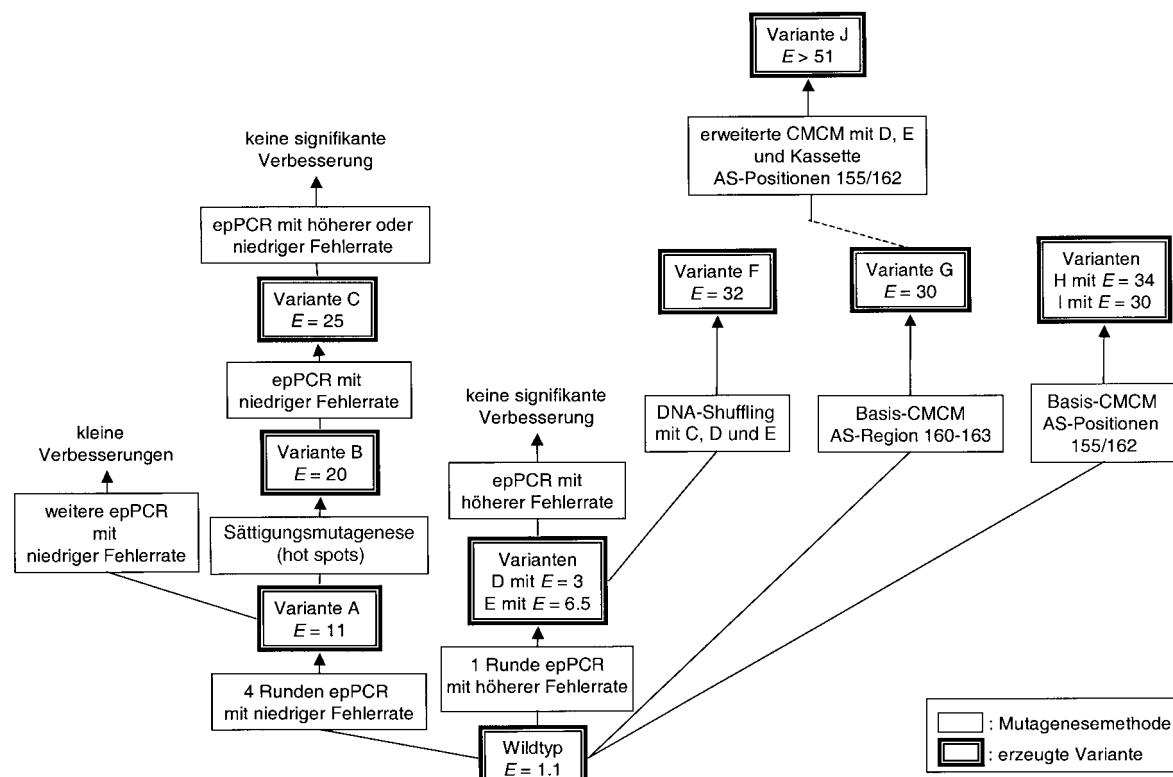
Genexpressionsmethoden sowie Hochdurchsatzassays zur Bestimmung der Enantioselektivität tausender Enzymmutanten bildet die Basis eines grundsätzlich neuen Konzepts auf dem Gebiet der asymmetrischen Katalyse. In nur vier Zyklen von Zufallsmutagenese auf der Basis der fehlerhaften Polymerasekettenreaktion (epPCR) und Screening von etwa 8000 Enzymvarianten konnte der Selektivitätsfaktor  $E^{[6]}$  der lipasekatalysierten hydrolytischen kinetischen Racematspaltung des Esters **1** zugunsten der (*S*)-Säure **2** von 1.1 auf 11



gesteigert werden (Schema 1, links). Die epPCR-Versuche wurden mit dem Gen der bakteriellen Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* bei niedriger Mutationsrate entsprechend einer durchschnittlichen Zahl von einer Aminosäuresubstitution pro Enzymmolekül durchgeführt. Diese Lipase besteht aus 285 Aminosäuren, einer Anzahl, die bei der Berücksichtigung des theoretischen Proteinsequenzraumes von Bedeutung ist.<sup>[7]</sup> Da weitere epPCR-Zyklen nur kleine Steigerungen der Enantioselektivität zur Folge hatte, wurde eine Sättigungsmutagenese an den durch Aminosäuresequenzierung identifizierten empfindlichen Stellen („hot spots“) der verbesserten Enzymvarianten durchgeführt, was zur Bildung der Variante B mit deutlich erhöhter Enantioselektivität ( $E = 20$ ) führte (Schema 1, links).<sup>[8]</sup> Im Zuge eines weiteren epPCR-Zyklus wurde Variante C ( $E = 25$ ) mit fünf Mutationen (V47G, V55G, S149G, S155F und S164G) erhalten (Schema 1, links). Jedoch hat die Strategie der alternierenden epPCR und Sättigungsmutagenese Grenzen, denn weitere Versuche dieser Art führten zu keinen merklichen Verbesserungen. Wir zeigen nun erstmals, dass die Anwendung rekombinanter Methoden ein ausgezeichnetes Instrumentarium zur Erhöhung der Enantioselektivität von Enzymen ist.

Da die bislang beste Enzymvariante C durch sequentielle Anreihung kleiner struktureller Änderungen (jeweils nur ein Aminosäureaustausch) entwickelt wurde, könnte eine Rückzüchtung („back-crossing“) unter Verwendung von DNA-Shuffling<sup>[3]</sup> die funktionellen Eigenschaften des Enzyms verbessern, weil dadurch die Möglichkeit der Eliminierung negativer Mutationen besteht. Wurde jedoch das Wildtyp-Gen und das Gen, welches die Enzymvariante C kodiert, im DNA-Shuffling verwendet, so ließen sich keine signifikanten Verbesserungen nachweisen. Mit dem Ziel, einen neuen Ausgangspool an Mutationen zu erstellen und zu nutzen, die nicht ausschließlich aufeinander aufbauen, wurde zunächst das Wildtyp-Gen einer epPCR mit höherer Fehlerrate entsprechend drei Aminosäuresubstitutionen pro Enzymmolekül unterworfen.<sup>[7]</sup>

Im Screening wurden 15 000 Varianten untersucht, von denen mehrere eine erhöhte (*S*)-Selektivität relativ zum Wildtyp aufwiesen, z.B. Variante D (mit den Mutationen S53P, C180T und G272A;  $E = 3$ ) und Variante E (D20N,



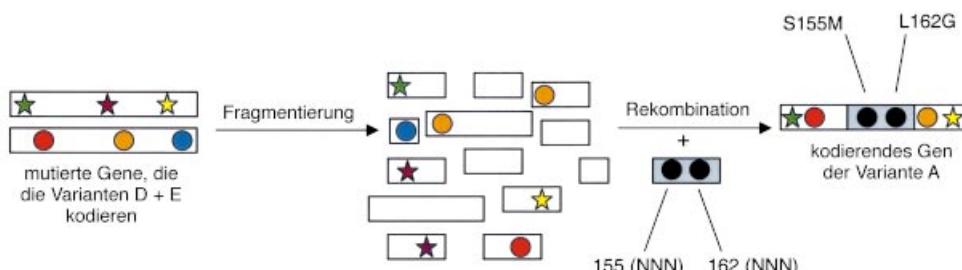
Schema 1. Überblick über die gerichtete Evolution von enantioselektiven Enzymen (Lipasevarianten), die die hydrolytische kinetische Racematspaltung des Esters **1** katalysieren.

S161P und T234S;  $E = 7$ ). Die entsprechenden beiden Gene sowie das Gen, welches Variante C kodiert, wurden dann im DNA-Shuffling eingesetzt (Fragmentgröße 30–50 Basenpaare (bp)). Dieser Versuch erwies sich als erfolgreicher als das vorangegangene DNA-Shuffling, denn es wurde ein kleiner Pool von sehr enantioselektiven Enzymen erhalten. Die beste Variante (F) mit fünf Mutationen (V47G, S149G, S155F, S199G und T234S) führt zu einem  $E$ -Wert von 32 (Schema 1, rechts).

Obwohl ein weiteres Durchsuchen des Proteinsequenzraumes<sup>[7]</sup> auf der Basis von epPCR, Sättigungsmutagenese und/oder DNA-Shuffling durchaus möglich wäre, erwogen wir zur methodischen Weiterentwicklung erstmals die Anwendung der Kassetten-Mutagenese<sup>[4]</sup> in Form einer vereinfachten Version der kombinatorischen multiplen Kassetten-Mutagenese (CMCM).<sup>[9]</sup> Die ursprüngliche von Stemmer beschriebene Form der CMCM ist eine spezielle Art des DNA-Shufflings, die auf dem Gebiet der funktionalen Antikörper angewandt wurde und mit der Bibliotheken von Genmutanten hergestellt werden können, bei denen das Wildtyp-Gen und Kassetten aus definierten Sequenzen randomisiert sind.<sup>[9a]</sup> Aufgrund vorangegangener Untersuchungen bezüglich der „hot spots“ ließen sich die Positionen um die Aminosäure 160 als für die Enantioselektivität empfindliche Region („hot region“) identifizieren.<sup>[5, 8]</sup> Da die Kassetten-Mutagenese in einem nicht zu großen Bereich durchgeführt werden sollte,<sup>[4]</sup> wählten wir die Region 160–163. Die Mutagenese wurde mit dem Wildtyp-Gen und einer einzigen Oligo-Kassette, hergestellt aus äquimolaren Mengen von Nucleotidmischungen, im Zuge einer vereinfachten

CMCM durchgeführt. Dadurch wurde die Sättigung an allen vier Positionen sichergestellt. Durch das Screening wurde in einer Bibliothek aus 5000 Varianten unter anderem eine enantioselektive Variante (G,  $E = 30$ ) mit vier Mutationen (E160A, S161D, L162G und N163F) entdeckt. Da schon frühere Arbeiten die Einführung von Glycin an bestimmten Stellen im Enzym zur Erhöhung der Enantioselektivität geführt hatte,<sup>[8]</sup> richtete sich unser Augenmerk auf die Mutation L162G. Neben dieser Position hatten wir schon früher die Position 155 als „hot spot“ im Enzym identifiziert.<sup>[5b]</sup> Deshalb inserierten wir eine Kassette (Größe 69 bp) mit doppelter Sättigung an den Positionen 155 und 162 in das Wildtyp-Gen. Somit wurden diese beiden Positionen mit äquimolaren Nucleotidmischungen im Zuge eines vereinfachten CMCM-Verfahrens gesättigt. Nach Expression und Screening wurden zwei sehr enantioselektive Enzymvarianten identifiziert: H (S155S, L162G) und I (S155V, L162G) mit  $E$ -Werten von 34 bzw. 30 (Schema 1, rechts). In beiden Fällen bleibt die Mutation L162G erhalten – ein interessanter Befund, der frühere Vermutungen hinsichtlich der Bedeutung dieser Aminosäuresubstitution bestätigt.<sup>[8]</sup>

Suchprogramme obiger Art sind zwar erfolgreich, schränken aber den zugänglichen Proteinsequenzraum stark ein. Deshalb entschlossen wir uns, ihn durch Modifizierung des CMCM-Verfahrens zu erweitern. Dies wurde erreicht mit DNA-Shuffling<sup>[3, 9a]</sup> unter Verwendung von Genmutanten, die die Enzymvarianten D und E kodieren, und einer Oligo-Kassette mit gleichzeitiger Sättigung an den Positionen 155 und 162 (Schema 2). Dadurch wurde eine maximale Rekombination sichergestellt. Tatsächlich fanden wir nach Express-



Schema 2. Erweiterte CMCM bei der Evolution einer (S)-selektiven Lipasevariante J; siehe Schema 1, rechts (grüner Stern: Position 20; lilafarbener Stern: Position 161; gelber Stern: Position 234; roter Kreis: Position 53; orangefarbener Kreis: Position 180; blauer Kreis: Position 272).

sion und Screening mehrere enantioselektive Enzyme, darunter Variante J mit sechs ausgetauschten Aminosäuren (D20N, S53P, S155M, L162G, T180I und T234S) und einer fast verdoppelten Enantioselektivität von  $E > 51$  ( $ee \geq 95\%$ ; Schema 1, rechts).

Unsere Arbeiten zeigen erstmals, dass rekombinante Verfahren bei der gerichteten Evolution von enantioselektiven Enzymen erfolgreich angewandt werden können. Wir haben gelernt, dass der Proteinsequenzraum bezüglich der Enantioselektivität am besten durch die Abfolge von drei Arbeitsstufen durchsucht werden kann: 1) Herstellung von Mutanten mittels epPCR bei hoher Mutationsrate; 2) Identifizierung von „hot regions“ im Enzym und Einkreisen auf „hot spots“ durch epPCR und vereinfachte CMCM; und 3) Erweiterung des CMCM-Verfahrens<sup>[9]</sup> um eine definierte Region im Proteinsequenzraum abzudecken. Insgesamt wurden weniger als 40 000 Enzymvarianten im  $ee$ -Screening untersucht.<sup>[10]</sup> Derzeit versuchen wir, die hier beschriebenen methodischen Entwicklungen bei der gerichteten Evolution anderer enantioselektiver Enzyme<sup>[11]</sup> zu nutzen. Sie dürften aber auch bei der evolutionären Verbesserung anderer Enzymeigenschaften nützlich sein.

Eingegangen am 5. April 2001 [Z16907]

- [1] a) D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, *Technique* (Philadelphia) **1989**, *1*, 11–15; b) R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1994**, *3*, S136–S140; c) „Combinatorial Chemistry in Biology“: B. Steipe, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 55–86.
- [2] a) F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125–131; b) F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253–257.

- [3] a) W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389–391; b) A. Crameri, S.-A. Raillard, E. Bermudez, W. P. C. Stemmer, *Nature* **1998**, *391*, 288–291.
- [4] M. Kammann, J. Laufs, J. Schell, B. Gronenborn, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 5405.
- [5] a) 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; b) M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 407–412; c) M. T. Reetz, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1615–1622.
- [6] Der Selektivitätsfaktor  $E$  spiegelt die relative Reaktionsgeschwindigkeit der beiden Enantiomere wider.
- [7] Die Zahl  $N$  der theoretisch möglichen Lipasevarianten ist gegeben durch  $N = 19^M \cdot 285! / [(285 - M)! M!]$ , wobei  $M$  die Zahl der ausgetauschten Aminosäuren pro Enzymmolekül ist.<sup>[5]</sup> Daraus ergibt sich für  $M = 1$ :  $N = 5415$ , für  $M = 2$ :  $N \cong 15 \times 10^6$ ; und für  $M = 3$ :  $N \cong 52 \times 10^9$ . Man darf annehmen, dass die meisten dieser Varianten die Modellreaktion nicht katalysieren.
- [8] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 709–718.
- [9] a) A. Crameri, W. P. C. Stemmer, *BioTechniques* **1995**, *18*, 194–196; frühere Arbeiten über die kombinatorische Kassetten-Mutagenese; b) J. F. Reidhaar-Olson, R. T. Sauer, *Science* **1988**, *241*, 53–57; c) J. D. Hermes, S. C. Blacklow, J. R. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 696–700; d) A. P. Arkin, D. C. Youvan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7811–7815.
- [10] a) Das ursprüngliche UV/Vis- $ee$ -Screeningsystem<sup>[5a]</sup> wurde verwendet, um „hits“ zu identifizieren. In allen Fällen wurden dann diese Enzymmutanten in einzelnen Versuchen unter Verwendung des racemischen Substrats **rac-1** untersucht; der  $ee$ -Wert wurde durch konventionelle chirale GC bestimmt. Der *p*-Nitrophenolester **1** wurde in allen Fällen eingesetzt, weil das Hydrolyseprodukt (*p*-Nitrophenol) leicht UV/Vis-spektroskopisch erfasst werden kann. Der Nachteil besteht darin, dass der Ester aktiviert ist und daher in einem gewissen Maß eine nichtkatalysierte Hintergrundreaktion eingeht. Dies wurde bei der Angabe von  $E$ -Werten größer 30 berücksichtigt. Kontrollversuche mit dem Ethylester ergaben eine niedrigere Aktivität und Selektivität, was nicht überrascht. Andere Substrate wurden noch nicht untersucht. b) Übersichtsartikel über Hochdurchsatz- $ee$ -Screeningsysteme: M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284–310.
- [11] Andere Publikationen über die gerichtete Evolution von enantioselektiven Enzymen: a) U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 554–559; b) O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317–320; c) S. Fong, T. D. Machajewski, C. C. Mak, C. H. Wong, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 873–883.