

Gelenkte Evolution

DOI: 10.1002/ange.200600255

Ein Durchmusterungssystem für die gelenkte Evolution von Epoxygenasen: Bedeutung der Position 184 in P450 BM3 für die stereoselektive Epoxidierung von Styrol**

Kang Lan Tee und Ulrich Schwaneberg*

Epoxide sind vielseitige Zwischenprodukte der chemischen Synthese von Polymeren^[1] und Pharmazeutika.^[2] Styrolepoxid und substituierte Varianten treten als Schlüsselverbindungen in der Synthese von Dopamin-Agonisten und antidiabetischen Wirkstoffen für Zuckerkrankheit auf.^[3,4] Mithilfe von Metallosalen-Verbindungen^[5] und Titan-Komplexen^[6] wurden bemerkenswerte Fortschritte erzielt, es besteht aber nach wie vor Forschungsbedarf im Bereich der Synthese chiraler Epoxide. Enzymatische Umsetzungen bieten für die Synthese chiraler Epoxide wertvolle Alternativen zu chemischen Verfahren: So können Epoxide durch kinetische Racematspaltung (Epoxidhydrolasen) und/oder stereospezifische Oxygenierung (Monooxygenasen, Peroxidasen) erhalten werden. Beispiele bedeutsamer Epoxidierungsbiokatalysatoren sind Cytochrom P450,^[7] Styrol-Monooxygenase,^[8] Methan-Monooxygenase^[9] und Ganzzell-Systeme.^[10]

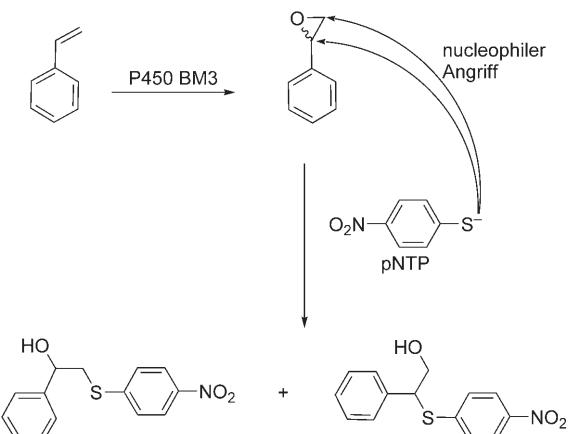
In gelenkten Evolutionsexperimenten wurden die Hydroxylierungsaktivitäten und -spezifitäten von Monooxygenasen verbessert,^[11] eine Voraussetzung für diesen Erfolg waren ausreichend durchsatzstarke und empfindliche Nachweissysteme. Für Epoxidierungen wurden zwei Nachweissysteme im 96er-Mikrotiterplatten-Format entwickelt, die beide auf der Reaktion eines Epoxids mit der Chromophorverbindung 4-(*p*-Nitrobenzyl)pyridin (NBP) beruhen; hierbei entsteht ein blaues Produkt, das spektrophotometrisch quantifiziert wird.^[12,13]

Darüber hinaus entdeckten Zocher et al. mit diesem Nachweissystem eine Epoxidhydrolase-Aktivität in *Streptomyces*-Stämmen.^[14] Alcalde et al. verwendeten es, um eine mit fehlerhafter PCR erhaltene Mutagenesbibliothek durchzumustern, sie fanden jedoch keine verbesserten Enzymvarianten.^[12] Durch diese Arbeiten wurde die wichtige

Enzymklasse der Epoxygenasen den Methoden der gelenkten Evolution erstmals zugänglich gemacht. Es gelang bisher jedoch nicht, die NBP-Nachweissysteme erfolgreich in der gelenkten Evolution einzusetzen, um die Eigenschaften einer Epoxygenase zu verbessern. Ein Grund könnte im Durchmusterungsprotokoll liegen, das ein Erhitzen der Proben auf 70 bis 80 °C vorsieht und damit den Durchsatz und die Genauigkeit des Nachweissystems verringert.^[12,13]

Hier stellen wir ein neues, validiertes und produktbasieretes Nachweissystem für die gelenkte Evolution von Epoxygenasen vor, das auf dem Farbstoff *p*-Nitrothiophenolat (pNTP) beruht. pNTP ist ein gelber Farbstoff, der Epoxidringe unter Bildung farbloser Produkte nucleophil öffnen kann.^[15] Als Modellsystem wurden das Substrat Styrol und die Monooxygenase P450 BM3 (BM3)^[11] gewählt. BM3 ist eine wasserlösliche, 118 kDa große Monooxygenase mit einer Häm- und einer Reduktase-Domäne auf einer Polypeptidkette und wurde aus *Bacillus megaterium* isoliert.^[16] BM3 kann in *Escherichia coli* hergestellt und im präparativen Maßstab in einem einzigen Chromatographieschritt effizient aufgereinigt werden.^[17] Als vielseitiger Biokatalysator setzt BM3 eine Vielzahl nichtnatürlicher Substrate um (z.B. Styrol);^[7,11] überdies steht das Enzym kurz vor industriellen Anwendungen.

Schema 1 skizziert die Entfärbungsreaktion beim pNTP-Nachweis: Nach der Epoxidierung durch BM3 wird das Styrolepoxid nucleophil durch pNTP geöffnet; die gleichzeitige



Schema 1. Der pNTP-Nachweis für die Umsetzung von Styrol zu Styrol-epoxid durch P450 BM3.

Entfärbung der Lösung wird bei 405 nm verfolgt. Bei diesem einfachen Nachweissystem sind Arbeitsschritte wie Erwärmen und Kühlen nicht erforderlich. Zusätzlich können die Durchmusterungskosten durch den Einsatz eines Cofaktor-Regenerierungssystems auf Isocitrat-Dehydrogenase-Basis verringert werden. Der pNTP-Nachweis unterscheidet jedoch nicht zwischen Enantiomeren. Falls erforderlich, kann die Nucleophilie der Thiolatgruppe durch Substituenten am Ring an die Reaktivität des Epoxids angepasst werden. Diese Flexibilität stellt sicher, dass der pNTP-Nachweis für eine Vielzahl von Epoxiden einsetzbar ist.

[*] K. L. Tee, Dr. U. Schwaneberg

School of Engineering and Science
International University Bremen
Campus Ring 8, 28759 Bremen (Deutschland)
Fax: (+49) 421-200-3229
E-Mail: u.schwaneberg@iu-bremen.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die DBU (Deutsche Bundesstiftung Umwelt) finanziell unterstützt. Prof. Frances Arnold danken wir für die Bereitstellung der P450-BM3-Mutante 139-3, Dr. Danilo Roccatano für hilfreiche Diskussionen, Prof. Andreas Schmid sowie Dr. Katja Otto für Unterstützung in der Analytik und Dr. Alexander Schenk für die Durchsicht des Manuskriptes.

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

Die Validierung des pNTP-Nachweisystems für mittleren Durchsatz in der gelenkten Evolution von Epoxidasen erfolgte durch Optimieren des Durchmusterungsprotokolls, Bestimmen der Standardabweichung und erfolgreiches Durchmustern von Sättigungsmutagenese-Bibliotheken im 96er-Mikrotiterplatten-Format. Die BM3-Variante 139-3 (V78A, H138Y, T175I, V178I, A184V, H236Q, E252G, R255S, A290V, A295T, L353V) wurde statt des Wildtyps (WT) für die Entwicklung des pNTP-Nachweisystems verwendet, da ihre Anfangsaktivität höher ist.^[7] Eine Konzentration von 10 mM Styrol wurde in allen Protokolloptimierungsschritten eingesetzt (Volumen des Zell-Lysates, Schüttelgeschwindigkeit und Dauer der pNTP-Entfärbungsreaktion). Nach Hintergrundkorrektur wurde schließlich eine niedrige Standardabweichung von 8.8 % erzielt (Abbildung 1;

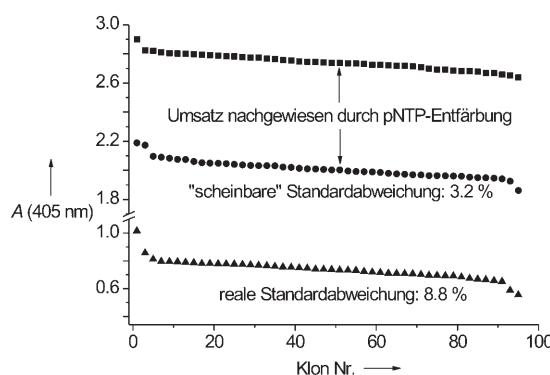


Abbildung 1: pNTP-Absorptionswerte der BM3-katalysierten Epoxidierung von Styrol in einer 96er-Mikrotiterplatte unter Verwendung des optimierten pNTP-Protokolls. ■: Hintergrundabsorption von DH5 α -Zellsatz ohne BM3; ●: Absorption nach Umsetzung von Styrol durch BM3; ▲: Absolutwerte der Absorption für die pNTP-Entfärbung nach Abzug der Absorption des DH5 α -Zellsatzes.

siehe *Experimentelles*). Durchmusterungssysteme mit Standardabweichungen um 10 % waren bereits in der gelenkten Evolution von BM3 erfolgreich.^[18] Eine Kalibriergerade wurde zusätzlich mit Styrolepoxid (0–1 mM) anstelle von Styrol aufgenommen (Abbildung 2). Das Zell-Lysat erhöhte die Absorption um 0.3, was die lineare Abhängigkeit der Entfärbungsreaktion von der Produktkonzentration jedoch

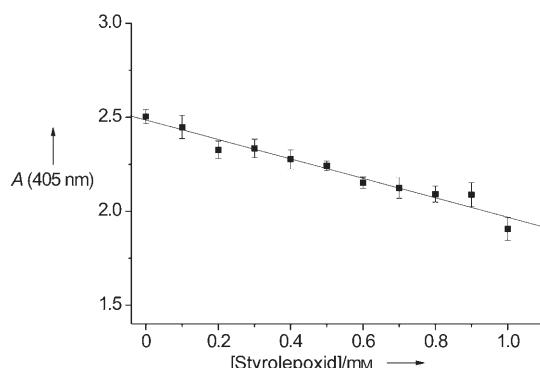


Abbildung 2: pNTP-Entfärbung für unterschiedliche Styrolepoxid-Konzentrationen bei 405 nm.

nicht beeinträchtigte. Die Detektionsgrenze des NTP-Nachweises für Styrolepoxid liegt bei ca. 400 μ M. Da sich pNTP bei der Lagerung langsam entfärbt, sollte die pNTP-Lösung vor Gebrauch immer frisch angesetzt werden.

Für die Sättigungsmutagenese-Bibliotheken wurde nicht die BM3-Variante 139-3 eingesetzt, da diese große Mengen an Wasserstoffperoxid bildet und daher für industrielle Anwendungen ungeeignet ist, sondern die BM3-Mutante 5F5 (F87A, T235A, R471A, E494K, S1024E), die sich durch eine erhöhte Lösungsmittelresistenz auszeichnet.^[19] Für 5F5 ergab sich im pNTP-Nachweis eine Standardabweichung von 14 % mit dem Durchmusterungsprotokoll, das für 139-3 ausgearbeitet wurde. Sättigungsmutagenese-Bibliotheken für zwei Positionen wurden erzeugt (V78 und A184), die bereits in der Variante 139-3 mutiert wurden. Je zwei 96er-Mikrotiterplatten wurden pro Position durchgemustert; dabei enthielt die A184-Mutagenesbibliothek aktiver BM3-Varianten als die V78-Bibliothek. Durch Sequenzieren der fünf aktivsten Klone wurden folgende Nucleotidaustausche ermittelt: A184K (zweimal), A184R (zweimal) und A184H (einmal); in allen Fällen wurde die hydrophobe Aminosäure Alanin durch eine positiv geladene Aminosäure ersetzt. Die Absorptionsunterschiede betrugen (nach Hintergrundkorrektur) für die Ausgangsvariante (5F5) 0.24 und für die Mutanten 0.53 (A184K), 0.48 (A184R) bzw. 0.67 (A184H). Diese drei Mutanten wurden gemeinsam mit den Ausgangsvarianten 5F5, WT und der Variante 139-3 gereinigt,^[17] mithilfe von CO-Messungen normalisiert und durch Messen des Sauerstoffverbrauchs (Fibox 3-Sauerstoffelektrode; Presens) und der Styrolepoxidbildung (GC an chiraler Phase; Dodecan als interner Standard) charakterisiert.^[7]

Tabelle 1 enthält Daten zu den Anfangskinetiken, die aus dem Sauerstoffverbrauch bei der Umsetzung von 2 mM Styrol berechnet wurden. Die Mutanten A184K (2.2fach) und A184R (1.7fach) sind auch nach CO-Normalisierung aktiver als die Ausgangsvariante 5F5, während A184H eine Expressionsmutante ist. A184K- und A184R-Varianten zeigten eine um 143–257 min⁻¹ höhere Aktivität und validieren damit den pNTP-Nachweis als Durchmusterungssystem im 96er-Mikrotiterplatten-Format. Die entkoppelte Wasserstoffperoxidbildung betrug einem ABTS-Nachweis^[12] zufolge weniger als 2 % bei der Ausgangsvariante 5F5 und allen 5F5-Mutanten (A184R, A184K, A184H; siehe Hintergrundinformationen). Tabelle 1 fasst ferner Umsätze und enantioselek-

Tabelle 1: Styrolepoxidierung durch BM3 und Mutanten.

Klon	$v_{\text{Anf. max.}} [\text{min}^{-1}]^{\text{[a]}}$	ee [%]	Umsatz [%] ^[b]	WF [%] ^[c]
WT	62 ± 2	19.7 ± 0.1 (R)	11.7 ± 0.6	79 ± 3
WT ^[d]	–	19.7 ± 0.1 (R)	14.1 ± 0.2	78 ± 3
WT ^[e]	–	20.0 ± 1.1 (R)	11.0 ± 0.8	79 ± 4
139-3	955 ± 88	6.4 ± 0.3 (R)	40.2 ± 0.9	69 ± 2
5F5	217 ± 11	26.6 ± 1.5 (R)	36.1 ± 0.4	78 ± 3
5F5A184R	360 ± 27	26.5 ± 0.3 (S)	41.6 ± 1.4	75 ± 1
5F5A184K	474 ± 20	27.3 ± 0.5 (S)	41.4 ± 0.5	83 ± 2
5F5A184H	199 ± 4	26.0 ± 1.3 (S)	32.9 ± 2.0	78 ± 4

[a] Maximale Anfangsgeschwindigkeit. [b] Umsatz = $\{c(\text{Styrolepoxid}) / [c(\text{Styrol}) + c(\text{Styrolepoxid})]\} \times 100$. [c] Wiederfindungsrate von Styrol + Styrolepoxid nach Extraktion. [d] 2 h Reaktionsdauer. [e] Enzymkonzentration 3.2 μ M.

tive Styrolepoxidbildung von WT, den Varianten 139-3, 5F5 und den 5F5-Mutanten (A184R, A184K, A184H) zusammen. Alle Epoxidierungen wurden bei einem Umsatz von 33–42% gestoppt. Eine Ausnahme bildete der WT, der unter vergleichbaren Bedingungen (gleiche Menge an BM3 und Substrat) nur einen Umsatz von 12% erzielte. Zwei weitere Experimente sollten den Umsatz erhöhen (Tabelle 1): Zum einen wurde die Reaktionsdauer verlängert, und zum anderen wurde die BM3-Konzentration erhöht. Der Umsatz blieb trotzdem bei nur 11–14% mit einem Enantiomerenüberschuss von 20% ee für das R-Enantiomer. Gaschromatographie an chiraler Phase zeigte für alle drei 5F5-Mutanten (A184R, A184K, A184H) eine unerwartete Inversion der Enantioselektivität (26–27% ee für das S-Enantiomer). Die Ausgangsvarianten 5F5, WT und die Variante 139-3 bilden hingegen bevorzugt das R-Enantiomer (Tabelle 1). Aus diesen Experimenten lernen wir, dass eine positiv geladene Aminosäure an Position 184 in der F-Helix, die ca. 18 Å weit vom katalytischen Zentrum entfernt ist, die Enantioselektivität der Styrolepoxidierung in BM3 moduliert. Es ist schwierig vorherzusagen, ob diese Inversion durch elektrostatische Effekte oder weitreichende Konformationsänderungen zustandekommt.

Zusammenfassend wurde ein neues Durchmusterungssystem mit mittlerem Durchsatz für Epoxide entwickelt und validiert, um das Potenzial von Epoxygenasen für die Synthese durch gelenkte Evolution nutzbar zu machen. Wir haben ferner nachgewiesen, dass der pNTP-Nachweis aktivierte Styrol-Epoxidases in einer Mutantenbibliothek identifizieren kann. Die Produktcharakterisierung mit GC zeigte für die aktiveren Varianten der Styrolepoxidierung eine unerwartete Inversion der Enantioselektivität, die durch den Austausch eines hydrophoben Alaninrestes an Position 184 gegen positiv geladene Aminosäuren (R, K oder H) verursacht wird.

Experimentelles

pNTP-Nachweis im 96er-Mikrotiterplatten-Format: Klare Zell-Lysate für den Aktivitätsnachweis wurden hergestellt durch Suspensionsieren von Zellpellets (400 µL Kultur) in 200 µL Lysozym (14 000 U, 100 mM Tris, pH 8.0), anschließendes Inkubieren (37°C, 1 h) und Zentrifugieren. Je 50 µL des klaren Zell-Lysates wurden in eine 96er-Mikrotiterplatte aus Polypropylen transferiert, die 20 µL Tris-Puffer (100 mM, pH 8.0) und 10 µL Styrol (100 mM, gelöst in Ethanol) enthielt. Die Mischung wurde 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 µL NADPH (5 mM) gestartet wurde. Nach 10 min Inkubation (600 Umdrehungen min⁻¹, RT) wurde jeweils eine Lösung von 2.5 µL Katalase (19.5 U) und einem Cofaktor-Regenerierungssystem aus 7.5 µL Isocitrat-Dehydrogenase (0.09 U) und 5 µL dl-Isocitrat-Natriumsalz (50 mM) zugegeben und weitere 50 min inkubiert (600 Umdrehungen min⁻¹, RT). Für den pNTP-Entfärbungsnachweis wurden 95 µL p-Nitrothiophenolat (1 mM, 100 mM Tris, pH 8.0) pro Mikrotiterplattenkammer zugegeben und 1 h inkubiert (800 Umdrehungen min⁻¹, RT). Luftblasen wurden mithilfe eines Bunsenbrenners entfernt, bevor die Absorptionswerte bei 405 nm bestimmt wurden.

Standardabweichungen wurden mit dem beschriebenen Protokoll und Zell-Lysaten von *E. coli* DH5α ohne BM3-Protein bestimmt. Die „scheinbare“ Standardabweichung wurde ausgehend von den absoluten Absorptionswerten für die BM3-Variante 139-3 berechnet.

Die „reale“ Standardabweichung wurde durch Hintergrundkorrektur in *E. coli*-DH5α-Zell-Lysaten ohne BM3-Protein erhalten.

Eingegangen am 20. Januar 2006,
veränderte Fassung am 17. April 2006
Online veröffentlicht am 17. Juli 2006

Stichwörter: Epoxidierungen · Gelenkte Evolution · Hochdurchsatz-Screening · Monoxygenasen · P 450

- [1] A. A. Roche, J. Bouchet, S. Bentadjine, *Int. J. Adhes. Adhes.* **2002**, 22, 431.
- [2] O. Takahashi, J. Umezawa, K. Furuhashi, M. Takagi, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1583.
- [3] J. D. Bloom, M. D. Dutia, B. D. Johnson, A. Wissner, M. G. Burns, E. E. Largis, J. A. Dolan, T. H. Claus, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3081.
- [4] F. R. Pfeiffer, J. W. Wilson, J. Weinstock, G. Y. Kuo, P. A. Chambers, K. G. Holden, R. A. Hahn, J. R. Wardell, A. J. Tobia, P. E. Setler, H. M. Sarau, *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 352.
- [5] T. Katsuki, *Curr. Org. Chem.* **2001**, 5, 663.
- [6] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5974.
- [7] E. T. Farinas, M. Alcalde, F. H. Arnold, *Tetrahedron* **2004**, 60, 525.
- [8] K. Otto, K. Hofstetter, M. Rothlisberger, B. Witholt, A. Schmid, *J. Bacteriol.* **2004**, 186, 5292.
- [9] S. J. Elliott, M. Zhu, L. Tso, H. H. T. Nguyen, J. H. K. Yip, S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9949.
- [10] A. M. Warhurst, C. A. Fewson, *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, 77, 597.
- [11] A. Glieder, E. T. Farinas, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1135.
- [12] M. Alcalde, E. T. Farinas, F. H. Arnold, *J. Biomol. Screening* **2004**, 9, 141.
- [13] F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, R. D. Schmid, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 391, 345.
- [14] F. Zocher, M. M. Enzelberger, U. T. Bornscheuer, B. Hauer, W. Wohlleben, R. D. Schmid, *J. Biotechnol.* **2000**, 77, 287.
- [15] S. C. Agarwal, B. L. Vanduren, J. J. Solomon, S. A. Kline, *Environ. Sci. Technol.* **1980**, 14, 1249.
- [16] R. T. Ruettiger, L. P. Wen, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 10987.
- [17] U. Schwaneberg, A. Sprauer, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *J. Chromatogr. A* **1999**, 848, 149.
- [18] T. S. Wong, N. Wu, D. Roccatano, M. Zacharias, U. Schwaneberg, *J. Biomol. Screening* **2005**, 10, 246.
- [19] T. S. Wong, F. H. Arnold, U. Schwaneberg, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 85, 351.