Durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* zu erhöhter Enantioselektivität: Ein neues Kapitel in der Anwendung von Schweineleberesterase**

Anna Musidlowska, Stefan Lange, Uwe T. Bornscheuer*

[*] Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, A. Musidlowska, Institut für Chemie und Biochemie, Abt. Technische Chemie und Biotechnologie, Universität Greifswald, Soldmannstr. 16, D-17487 Greifswald (Deutschland), Tel.: (+49) 3834-86-4367, Fax: (+49) 3834-86-4373, E-mail: bornsche@mail.uni-greifswald.de, web: http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech

S. Lange, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart

[**] Wir danken der Konrad-Adenauer-Stiftung (St. Augustin) für die Gewährung eines Stipendiums an A. Musidlowska, Prof. R. D. Schmid (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und A. Gollin für die Synthesen der Acetate.

Lipasen und Esterasen lassen sich als effiziente Biokatalysatoren zur Darstellung einer Vielzahl optisch aktiver Verbindungen einsetzen.[1] Während jedoch eine ganze Reihe von Lipasen - insbesondere mikrobiellen Ursprungs - kommerziell erhältlich sind, gibt es nur sehr wenige Esterasen, die für den Einsatz in einer Racematspaltung bzw. Asymmetrisierung zur Verfügung stehen. In der Mehrzahl der Publikationen wird Schweineleberesterase[2] (PLE, *pig liver esterase*) verwendet, die durch Extraktion aus Schweineleber gewonnen wird. Obwohl gezeigt werden konnte, dass mit dieser Präparation eine Vielzahl von Verbindungen mit teilweise sehr hoher Stereoselektivität umgesetzt werden können, ist dessen Verwendung doch mit einer Reihe

von Nachteilen verbunden. Neben einer Variation des Esteraseanteils zwischen verschiedenen Chargen ist insbesondere die Anwesenheit weiterer Hydrolasen als problematisch bezüglich der Selektivität anzusehen.[3] Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Schweineleberesterase in Form mehrerer Isoenzyme vorliegt,[4] die sich teilweise erheblich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. So gelang es nach elektrophoretischer Trennung durch isoelektrische Fokussierung Fraktionen zu isolieren, die u.a. bevorzugt Butyrylcholin (ähnlich der Butyrylcholin-Esterase), Prolin-β-Naphthylamid und Methylbutyrat spalten.[5a-b] Öhrner und Mitarbeiter[5c] fanden nicht nur einen Einfluß der Kettenlänge von *p*-Nitrophenylestern auf die Aktivität verschiedener PLE-Fraktionen, sondern auch eine deutliche Änderung der Enantioselektivität in der Hydrolyse prostereogener Substrate. Im Gegensatz hierzu berichteten Jones und Mitarbeiter, dass verschiedene Isoenzyme nahezu keine Unterschiede in der stereoselektiven Hydrolyse mehrerer monozyklischer und azyklischer Diester zeigten. Lediglich Unterschiede in der Aktivität wurden berichtet.[6] Die Herstellung von Enzymen in gleichbleibender und definierter Zusammensetzung läßt sich durch Überexpression der kodierenden Gene in geeigneten Wirtsorganismen wie z.B. *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* oder *Aspergillus oryzae* erreichen. Tatsächlich werden so bereits mehrere Esterasen[7] und Lipasen[8] produziert. Die Klonierung putativer Schweineleberesterase-Gene wurde bereits beschrieben: So klonierten Takahashi und Mitarbeiter[9a-b] das Gen einer Prolin-β-Naphthylamidase aus Schweineleber. Später konnte von dieser[10] und Heymanns[11] Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch um Schweineleberesterase handelt. Gleiches gilt für eine Glycerinesterhydrolase,[12] deren Sequenz sich nur durch 16 Aminosäuren von der von Takahashi beschriebenen unterscheidet. Die funktionelle Expression

von aktivem Enzym wurde jedoch von keiner der Arbeitsgruppen berichtet.
Uns ist es nun erstmals gelungen, PLE aktiv durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* herzustellen.[13] Somit können wir nun rekombinante PLE (rPLE) in gleichbleibender Produktqualität ohne störende Einflüsse weiterer Isoenzyme und anderer Hydrolasen herstellen. Die rPLE zeigt nahezu identische pH- und Temperaturprofile[13] und ein ähnliches Substratspektrum in der Hydrolyse einfacher (achiraler) Ester und Triacylglyceride wie nicht-rekombinante PLE (Abbildung 1). Hervorzuheben ist aber, dass nur rPLE kein Triolein spaltet, welches ein typisches Lipasesubstrat ist. Dies belegt die Verunreinigung kommerzieller Präparate durch andere Hydrolasen. Neben der biochemischen Charakterisierung des rekombinanten Proteins,[13] war für uns jedoch vor allem die Enantioselektivität der rPLE in der Umsetzung chiraler Substrate im Vergleich zu kommerziellen Präparaten[14] von Interesse, da dies das mit Abstand wichtigste Einsatzgebiet der PLE darstellt.
Während in PLE-katalysierten Racematspaltungen von (*R*,*S*)-1-Phenyl-1-ethylacetat **1** in allen Fällen ähnliche Enantioselektivitäten[15] zwischen E=5.7 und 7.9 ermittelt wurden (Tabelle 1), beobachteten wir jedoch in der Hydrolyse von (*R*,*S*)-1-Phenyl-2-propylacetat **2** (Tabelle 2) bzw. (*R*,*S*)-1-Phenyl-2-butylacetat **3** (Tabelle 3) deutlich höhere Enantioselektivitäten im Vergleich zu den Reaktionen mit PLE-Präparaten von Fluka, Sigma oder Roche (Chirazyme E-1 bzw. E-2). In der Hydrolyse von **3** zeigten diese Präparate nur sehr geringe Enantioselektivitäten (E=1.4-4.0), während mit rekombinanter PLE E-Werte >> 100 bestimmt wurden (Tabelle 3). Für **2** fiel diese Steigerung der Enantioselektivität geringer aus, jedoch beobachteten wir hier eine Umkehrung in der Enantiopräferenz (Tabelle 2). Während mit den kommerziellen Esterasen bevorzugt der (*R*)-Alkohol gebildet wurde, endstand mit rPLE der (*S*)-Alkohol. Diese Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass wir

die γ-Untereinheit der PLE kloniert haben,[13] während kommerzielle Präparate ein Gemisch von Untereinheiten enthalten, die sich bezüglich Sequenz und Molekulargewicht deutlich unterscheiden,[5] was sich natürlich auch auf die Substrat- und Enantioselektivität auswirken kann.
Folglich ermöglicht die Verwendung der rekombinanten PLE nun auch die Darstellung von Verbindungen in hoher optischer Reinheit, die bisher nicht durch PLE-katalysierte Reaktionen zugänglich waren.
Zusätzlich können durch die gelungene funktionelle Expression nun die Enzymeigenschaften durch positionsgerichtete Mutagenese oder gerichtete Evolution[16] manipuliert werden.

Experimentelles

Herstellung der rekombinanten Schweineleberesterase (rPLE)

Zur Expression der rPLE wurde die Hefe *Pichia pastoris* - die das für die Esterase kodierende Gen unter Kontrolle des Methanol-induzierbaren Alkoholoxidase 1 Promotors (AOX1) genomisch integriert trägt – entsprechend der Anleitung des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zunächst in Glycerin-haltigem (1 % (v/v)) BMGY-Medium und anschließend in BMMY-Medium, das 0.5 % (v/v) Methanol als C-Quelle und Induktor enthält, kultiviert. Die Induktion der rPLE-Expression wurde durch tägliche Zugabe von 0.5 % (v/v) Methanol aufrechterhalten. Nach 96 Std. wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit 20 ml Centricons (NMWL 30 000, Ultracel-PL Membran, Millipore) für 15 min bei 4000 g aufkonzentriert. Die so erhaltene Aktivität betrug 10 U/ml (pNPA-Test) bzw. ~500 U/mg Protein.

Bestimmung der Esteraseaktivität

Die photometrische Bestimmung der Esteraseaktivität erfolgte durch Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat (pNPA).[7d] Ein Unit (U) Esterase entspricht der Menge Enzym, die 1 µmol *p*-Nitrophenol pro Minute freisetzt.

Das Substratspektrum der PLE wurde mittels pH-Stat (Schott, Mainz) durch Hydrolyse verschiedener Ester (Caprylsäureethylester, Essigsäureethylester, Tributyrin oder Triolein) bei 37°C und pH 7.5 ermittelt.[7d] Ein Unit (U) Esterase entspricht der Menge Enzym, die 1 µmol Säure pro Minute freisetzt. Die höchste so ermittelte Aktivität wurde als 100%-Wert angenommen.

Esterase-katalysierte Racematspaltung der Acetate
Hierzu wurden 10 mM der Acetate **1**-**3** gelöst in Natriumphosphatpuffer (pH 7.5, 50 mM) in 1 ml Reaktionsgefäße gegeben und die Racematspaltung durch Zugabe von 0.5 U (bezogen auf den pNPA-Test) Esterase gestartet. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Gemisch mit Methylenchlorid extrahiert und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit und des Umsatzes erfolgte gaschromatographisch (Säule: Heptakis(2,6-*O*-methyl-3-*O*-pentyl)-β-cyclodextrin, Trägergas: H_2, Flammenionisationsdetektor).
Retentionszeiten: **1** (100°C isotherm): (*S*)-**1** 3.7 min; (*R*)-**1**, 5.8 min; (*R*)-**1a** 6.7 min; (*S*)-**1a**, 7.6 min; **2** (75°C isotherm): (*S*)-**2** 26.5 min; (*R*)-**2**, 42.3 min; (*S*)-**2a** 32.6 min; (*R*)-**2a**, 34.2 min. **3** (90°C isotherm): (*S*)-**3** 17.6 min; (*R*)-**3**, 20.2 min; (*S*)-**3a** 24.8 min; (*R*)-**3a**, 27.4 min. Die absolute Konfiguration basierte für **1** auf einem Vergleich mit käuflichem (*R*)-**1a**. Bei **2** und **3** diente die literaturbekannte[17] (*R*)-Präferenz der Lipase Amano PS als Bezug.

Literatur

[1] a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**; b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694-1720; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1608-1633; c) K.

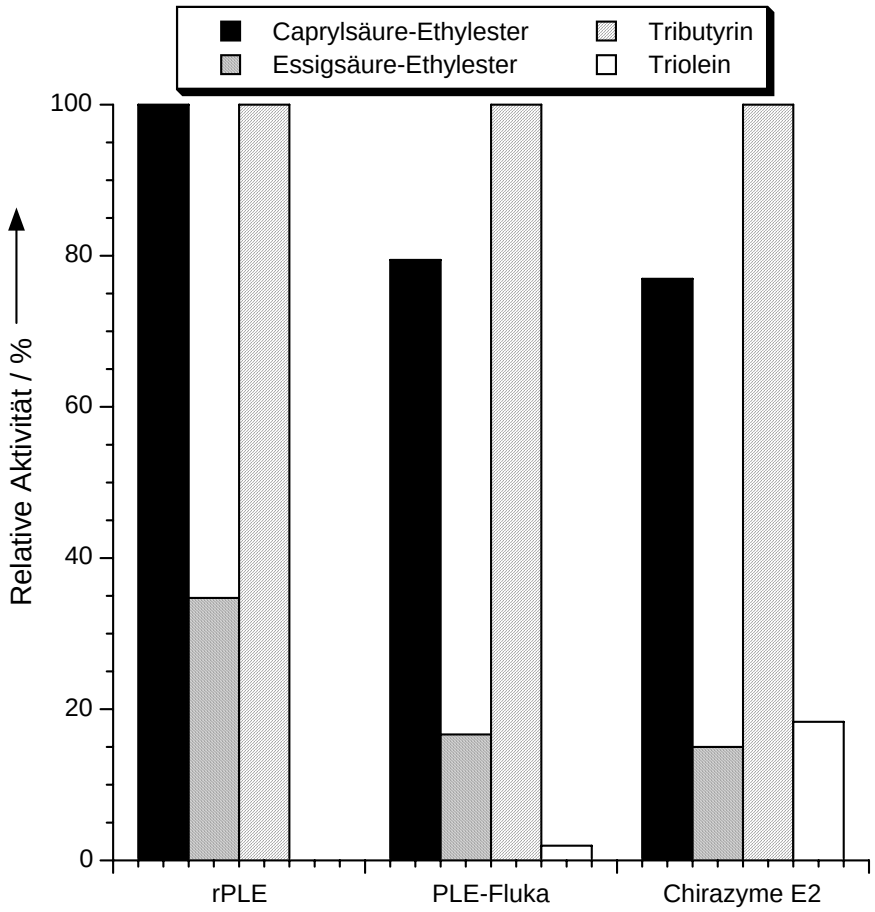
Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **2000**.
[2] a) L.-M. Zhu, M. C. Tedford, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6587-6611; b) J. B. Jones, *Pure & Appl. Chem.* **1990**, *62*, 1445-1448; c) C. Tamm, *Indian J. Chem.* **1993**, *32B*, 190-194; d) S. J. Phytian, in *Biotechnology-Series, Vol. 8a* (Hrsg: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. J. W. Stadler, D. R. Kelly), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 193-241.
[3] D. Seebach, M. Eberle, *Chimia* **1986**, *40*, 315-318.
[4] D. Farb, W. D. Jencks, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *203*, 214-226.
[5] a) E. Heymann, W. Junge, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 509-518; b) W. Junge, E. Heymann, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 519-52; c) N. Öhrner, A. Mattson, T. Norin, K. Hult, *Biocatalysis* **1990**, *4,* 81-88.
[6] L. K. P. Lam, C. M. Brown, B. deJeso, L. Lym, E. J. Toone, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4409-4411.
[7] a) V. Khalameyzer, U. T. Bornscheuer, *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 101-104; b) N. Krebsfänger, F. Zocher, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *21*, 641-646; c) M. Nishizawa, M. Shimizu, H. Ohkawa, M. Kanaoka, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3208-3215; d) V. Khalameyzer, I. Fischer, U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, *Appl. Environm. Microbiol.* **1999**, *65*, 477-482.
[8] a) D. T. Quyen, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid, *Appl. Environm. Microbiol.* **1999**, *65*, 787-794; b) E. Catoni, C. Schmidt-Dannert, S. Brocca, R. D. Schmid, *Biotechnol. Techn.* **1997**, *11*, 689-695; c) B. Huge-Jensen, F. Andreasen, T. Christensen, M. Christensen, L. Thim, E. Boel, *Lipids* **1989**, *24*, 781-785.
[9] a) T. Takahashi, A. Ikai, K. Takahashi, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11565-11571; b) T. Takahashi, M. Nishigai, A. Ikai, K. Takahashi, *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 297-300.
[10] M. Matsushima, H. Inoue, M. Ichinose, S. Tsukada, K. Miki, K. Kurokawa, T. Takahashi, K. Takahashi, *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 37-41.

[11] E. Heymann, K. Peter, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1993**, *374*, 1033-1036.
[12] L. David, X. J. Guo, C. Villard, A. Moulin, A. Puigserver, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *257*, 142-148.
[13] S. Lange, A. Musidlowska, C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, U. T. Bornscheuer, *Chem. Bio*. Chem., *eingereicht.* Zur Klonierung und Expression der rPLE wurde (in Kürze) wie folgt vorgegangen: Wir isolierten die mRNA aus frischer Schweineleber und überführten diese durch RT-PCR in die entsprechende cDNA. Eine Aufreinigung kommerziell erhältlicher PLE-Präparationen erlaubte die Bestimmung der *N*-terminalen Proteinsequenz. Diese Daten waren mit der in der Datenbank SWISS-PROT vorhandenen und von Takahashi et al.[9] veröffentlichten Sequenz identisch. Das gesamte Gen wurde nun basierend auf dieser Sequenz unter Verwendung der mRNA kloniert. Nur nach Entfernung einer Leadersequenz und eines Retentionssignals konnte rPLE aktiv in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert werden.
[14] zum Vergleich wurden PLE-Präparationen der Firmen Fluka, Sigma und Roche Diagnostics (Chirazyme E-1, E-2) verwendet.
[15] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
[16] a) U. T. Bornscheuer, *Biocatal. Biotransform.* **2001**, im Druck; b) U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3285-3288; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 3105-3108; c) F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125-131.
[17] A. L. Gutman, D. Brenner, A. Boltanski, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 839-844.

ABBILDUNGSLEGENDE

Abbildung 1: Vergleich der hydrolytischen Aktivität von rekombinanter (rPLE) mit kommerziellen Präparaten von Fluka (PLE Fluka) bzw. Roche Diagnostics (Chirazyme E-2) gegenüber verschiedenen achiralen Estern.

Abb. 1, Musidlowska et al.



TABELLEN

Tabelle 1: Enantioselektivität verschiedener Schweineleberesterasen in der kinetischen Racematspaltung von (*R*,*S*)-1-Phenyl-1-ethylacetat **1**.

PLE[a]	**Zeit** [Std.]	**Enantiomerenüberschuß** [%ee_S][c]	[%ee_P][c]	**Umsatz** [%]	**E**[b]
Rekombinant	1	58	53	53	5.7
Fluka	1.5	65	56	54	6.8
Sigma	1	72	58	55	7.8
Chirazyme E-1	5	73	58	56	7.9

[a]in allen Reaktionen wurden 0.5 Units (bezogen auf den pNPA-Test) eingesetzt.

[b]die Enantioselektivität E wurde gemäß Chen et al. (1982)[15] berechnet.

[c]in allen Fällen hatte der Produktalkohol **1a** (*R*)-Konfiguration und das nicht-umgesetzte Acetat **1** (*S*)-Konfiguration.

Tabelle 2: Enantioselektivität verschiedener Schweineleberesterasen in der kinetischen Racematspaltung von (*R*,*S*)-1-Phenyl-2-propylacetat **2**.

PLE[a]	**Zeit** [Std.]	**Enantiomerenüberschuß** [%ee_s]	[%ee_p]	**Umsatz** [%]	**E**[b]
Rekombinant	2	75 (*R*)	70 (*S*)	52	12.6
Fluka	1.5	35 (*S*)	44 (*R*)	44	3.6
Sigma	1.5	24 (*S*)	32 (*R*)	43	2.4
Chirazyme E-1	1.5	22 (*S*)	43 (*R*)	34	3.1
Chirazyme E-2	1	9 (*S*)	9 (*R*)	50	1.3

[a], [b]s. Tabelle 1.

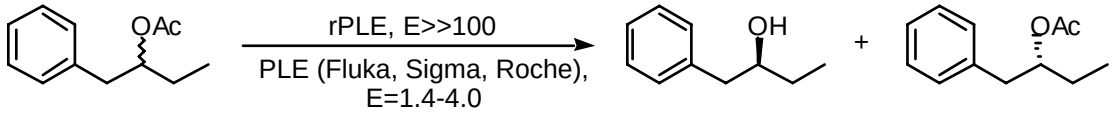
Tabelle 3: Enantioselektivität verschiedener Schweineleberesterasen in der kinetischen Racematspaltung von (*R*,*S*)-1-Phenyl-2-butylacetat **3**.

PLE[a]	**Zeit** [Std.]	**Enantiomerenüberschuß** [%ee_s][c]	[%ee_p][c]	**Umsatz** [%]	**E**[b]
Rekombinant	2	57	>99	36	>>100
Fluka	2	12	12	49	1.4
Sigma	1	17	11	59	1.5
Chirazyme E-1	2	19	18	52	1.7
Chirazyme E-2	1	58	40	59	4.0

[a], [b]s. Tabelle 1.

[c]in allen Fällen hatte der Produktalkohol **3a** (*S*)-Konfiguration und das nicht-umgesetzte Acetat **3** (*R*)-Konfiguration.

Stichwörter: Chiralität, Genexpression, Enzymkatalyse, Hydrolasen, Schweineleberesterase

Graphischer Abstract

Die Verwendung rekombinanter Schweineleberesterase (rPLE) – deren funktionelle Expression nun erstmals gelungen ist - führt in der Hydrolyse von 1-Phenyl-2-butylacetat zu wesentlich höheren Enantioselektivitäten im Vergleich zu kommerziellen PLE-Präparaten.