



Entdeckung und Design promiskuitiver Acyltransferase-Aktivität in Carboxylesterasen der Familie VIII

Henrik Müller, Simon P. Godehard, Gottfried J. Palm, Leona Berndt,
Christoffel P. S. Badenhorst, Ann-Kristin Becker, Michael Lammers und Uwe T. Bornscheuer*

Professor Manfred Schneider zum 80. Geburtstag gewidmet

Abstract: Promiskuitive Acyltransferase-Aktivität ist die Eigenschaft mancher Hydrolasen, in wässriger Lösung Acyltransfer statt Hydrolyse zu katalysieren. Niedrige Enantioselektivität bzw. Effizienz, signifikante Produkthydrolyse und das begrenzte Substratspektrum bekannter Acyltransferasen stellen erhebliche Nachteile für industrielle Anwendungen dar. Durch aktivitätsbasiertes Screening von Hydrolasen konnte die Carboxylesterase EstCE1 aus der Familie VIII als beispiellos effiziente Acyltransferase identifiziert werden. EstCE1 kann die irreversible Amidierung und Carbamoylierung von Aminen in Wasser katalysieren, wie hier am Beispiel der Synthese des Wirkstoffs Moclobemid gezeigt. Detaillierte Struktur-Funktions-Analysen basierend auf der hier gelösten Kristallstruktur von EstCE1 identifizierten ein Sequenz-Motiv, das sich als bedeutsam für die promiskuitive Acyltransferase-Aktivität herausstellte. Die Übertragung dieses Motivs führte zur Umwandlung einer „Hydrolase“ in eine „Acyltransferase“.

Im Allgemeinen gelten Enzyme als hochspezifisch. In Kombination mit unnatürlichen Substraten kann in manchen Fällen allerdings trotzdem eine Reaktion erfolgen. Entspricht die chemische Umwandlung hierbei der typischen katalytischen Funktion des Enzyms, wird dies als „Substratpromiskuität“ bezeichnet. Interessanterweise können Enzyme dabei auch andere chemische Transformationen katalysieren.^[1] Dieses Phänomen wird als „katalytische Promiskuität“ bezeichnet und stellt zusammen mit der Duplikation und Divergenz von Genen den Ausgangspunkt zur Evolution neuer Enzyme dar.^[2] In Kombination mit Protein-Engineering stellen promiskuitive Enzyme eine attraktive Alternative zu herkömmlichen chemischen Katalysatoren dar.^[3] Promiskuitive Acyltransferasen zur Katalyse von Bindungsbildungsre-

aktionen in wässriger Lösung erfahren zunehmende Beliebtheit, da sie – im Gegensatz zu herkömmlichen biokatalytischen oder chemischen Synthesewegen – auf teure und wenig nachhaltige organische Lösungsmittel verzichten. Dies ermöglicht außerdem den Einsatz in Kaskadenreaktionen zusammen mit Enzymen, die in Gegenwart organischer Lösungsmittel inaktiv oder instabil sind.^[4] Seit ihrer Entdeckung im Jahr 2007 war die promiskuitive Acyltransferase MsAcT aus *Mycobacterium smegmatis* hinsichtlich der Effizienz des Acyltransfers in Wasser unangefochten.^[5–7] Kürzlich konnten wir jedoch zeigen, dass viele Esterasen aus der Familie der bakteriellen hormonsensitiven Lipasen (bHSL) ebenfalls promiskuitive Acyltransferase-Aktivität aufweisen.^[8] Manche dieser Enzyme sind hinsichtlich ihrer Effizienz vergleichbar mit MsAcT, was darauf hindeutet, dass dieses Phänomen weiter verbreitet ist, als bisher angenommen. Die enzymatische Produkthydrolyse sowie die geringe Übertragungseffizienz der Acylgruppe stellen dabei Nachteile im Hinblick auf eine Anwendung im industriellen Maßstab dar. In dieser Studie zeigen wir, dass außergewöhnlich hohe promiskuitive Acyltransferase-Aktivität bei Carboxylesterasen der Familie VIII weitverbreitet ist.

Vor kurzem wurde von uns beschrieben, dass eine klare, wässrige Lösung aus Dimethylcarbonat und 1,6-Hexandiol durch die Acyltransferase-katalysierte Bildung von Oligocarbonaten getrübt wird.^[9] Es kann jedoch nicht von allen promiskuitiven Acyltransferasen erwartet werden, dass diese aus diesen Substraten Oligocarbonate bilden. Deshalb wurde zur Durchmusterung in unserem Labor verfügbarer Hydrolasen auf Acyltransferase-Aktivität stattdessen ein auf Emulgierung basierender Assay verwendet, der auf der Reaktion von 2-Phenylethanol mit Vinylacetat als Substrat ba-

[*] M. Sc. H. Müller, M. Sc. S. P. Godehard, Dr. C. P. S. Badenhorst, Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Abt. Biotechnologie und Enzymkatalyse
Institut für Biochemie, Universität Greifswald
17487 Greifswald (Deutschland)
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de
Dr. G. J. Palm, L. Berndt, Prof. Dr. M. Lammers
Abt. Synthetische und strukturelle Biochemie
Institut für Biochemie, Universität Greifswald
17487 Greifswald (Deutschland)
M. Sc. A.-K. Becker
Institut für Bioinformatik
Universitätsmedizin Greifswald
17487 Greifswald (Deutschland)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter: <https://doi.org/10.1002/ange.202014169> zu finden.

© 2020 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

siert. Acyltransferase-Aktivität wird dabei durch Trübung der Reaktionslösung angezeigt, welche auf die geringe Wasserlöslichkeit des Reaktionsprodukts 2-Phenylethylacetat zurückzuführen ist.^[10] Dies führte zur Entdeckung einer Carboxylesterase der Familie VIII (EstCE1) als promiskuitive Acyltransferase mit einer Präferenz für aromatische Acylakzeptor-Substrate (Abbildung S1).

EstCE1 kann nicht nur die Bildung von Estern, sondern auch die Bildung von Amidinen, Carbonaten und Carbamaten in wässriger Lösung katalysieren (Abbildung 1). Die Esterbildung aus der Reaktion von Benzylalkohol mit einem vierfachen Überschuss an Vinylacetat ist sehr schnell und erreicht innerhalb von Sekunden über 90% Umsatz. Gebildetes Benzylacetat wird jedoch innerhalb von zwei Stunden vollständig hydrolysiert. Die Bildung von Benzylmethylcarbonat ist selbst bei höherem Donorüberschuss langsamer. Der Umsatz liegt dadurch nach drei Stunden allerdings noch bei etwa 50%. Darüber hinaus kann EstCE1 die Bildung von *N*-Benzylacetamid und *N*-Methylbenzylcarbammat katalysieren. Beide Reaktionen erreichen in kurzer Zeit nahezu Vollumsatz, ohne dass dabei das Produkt hydrolysiert wird. Selbst nach 24 Stunden war keine Produkthydrolyse zu beobachten. Carbamate stellen zentrale Zwischenprodukte bei der Synthese von Arzneimitteln dar und werden häufig als Schutzgruppe verwendet.^[12] Die hier gezeigte, Phosgen-unabhängige Carbamoylierung von Aminen stellt eine wesentlich umweltfreundlichere und selektivere Alternative zu konventionellen Synthesewegen dar.

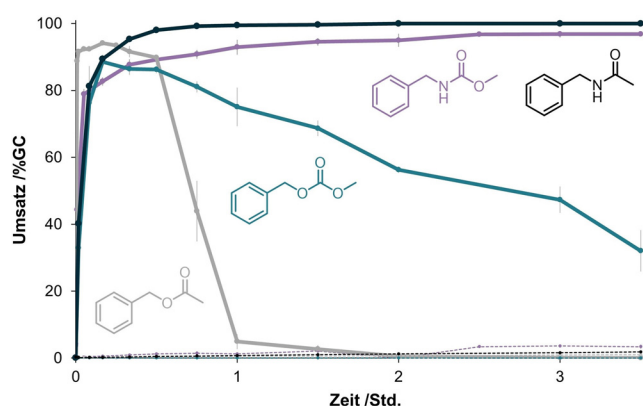


Abbildung 1. EstCE1-katalysierte Synthese von Benzylacetat (grau), Benzylmethylcarbonat (cyanblau), *N*-Benzylcarbammatmethyl ester (violett) und *N*-Benzylacetamid (schwarz) in wässrigem Puffer. Die Akzeptorkonzentration betrug bei allen Reaktionen 50 mM. Für die Esterbildung wurde ein vierfacher Überschuss an Vinylacetat verwendet. Für die Amidsynthese wurde ein zehnfacher Überschuss an Ethylacetat verwendet. Für die Carbonat- und Carbamatbildung wurde ein zehnfacher Überschuss an Dimethylcarbonat verwendet. Gestrichelte Linien zeigen die Bildung der Produkte in Abwesenheit von EstCE1.

Das synthetische Potenzial von EstCE1 geht über die in Abbildung 1 gezeigten, strukturell eher einfachen Modellverbindungen hinaus. In einer Machbarkeitsstudie wurde EstCE1 eingesetzt, um aus Methyl-4-chlorbenzoat (200 mM) als Acyldonor und 4-(2-Aminoethyl)morpholin (50 mM) als

Acylakzeptor das Antidepressivum Moclobemid zu synthetisieren (Abbildung S4, ca. 20% Umsatz).

Darüber hinaus wurde EstCE1 zur kinetischen Racematspaltung über Acetylierung von „schwer zu trennenden“ sekundären Alkoholen eingesetzt (Tabelle S2).^[13] EstCE1 stellte sich dabei als enantioselektiv heraus, ganz besonders in Bezug auf die Acetylierung von (+)-Menthol. Dies steht in Einklang mit der hohen Selektivität von EstCE1 bei der Hydrolyse von (+)-Menthylacetat.^[11]

Interessanterweise scheint die Hydrolyse von *p*NP-Estern bei vielen Carboxylesterasen der Familie VIII durch Methanol stimuliert zu werden.^[14] Vieles spricht dafür, dass diese Enzyme unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen in Wirklichkeit die Acylierung von Methanol katalysieren. Das Acylenzym-Intermediat einer promiskuitiven Acyltransferase würde in Gegenwart eines organischen Nucleophils wie Methanol schneller überföhrt werden, was zu einer beschleunigten Freisetzung von *p*-Nitrophenol und damit erhöhter scheinbarer Hydrolyseaktivität führt. Dies ist das zugrundeliegende Prinzip des kürzlich veröffentlichten *p*NP-AcT-Assays.^[8] Im Falle von EstCE1 konnten wir einen achtfachen Anstieg der scheinbaren *p*NPA-Hydrolyserate bei nur 6,3% (v/v) Methanol beobachten (Abbildung S1). Um zu zeigen, dass die beschleunigte Freisetzung von *p*NP ein Resultat der Umesterung zu Methanol ist, wurde die EstCE1-katalysierte Bildung von Methylbutyrat aus *p*NP-Butyrat und Methanol durch Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS, Abbildung S5) verifiziert. Dies bedeutet, dass es sich bei vielen der in der Literatur beschriebenen, Methanol-stimulierten Hydrolasen um promiskuitive Acyltransferasen handeln könnte, was wiederum richtungsweisend für die zukünftige Forschung wäre.

Um zu untersuchen, ob promiskuitive Acyltransferase-Aktivität in Carboxylesterasen der Familie VIII die Regel ist, wurden mehrere EstCE1-Homologe in *Escherichia coli* exprimiert, säulenchromatographisch gereinigt und untersucht. Wie zuvor vermutet, stellte sich dabei heraus, dass promiskuitive Acyltransferase-Aktivität in dieser Enzymfamilie tatsächlich weit verbreitet ist (Abbildung 2). Abgesehen von zwei Ausnahmen zeigten alle untersuchten Carboxylesterasen in Gegenwart von Benzylalkohol signifikant höhere relative Aktivitäten als MsAcT und die zuvor charakterisierten bHSLs.^[6,8] EstCE1 katalysiert den Acetyltransfer zu Benzylalkohol 66-mal schneller als die Hydrolyse des Acyldonors und übertrifft damit sogar eine der effizientesten MsAcT-Varianten (K97A; 50-mal schneller), über die unsere Gruppe kürzlich berichtete.^[6] Bemerkenswert ist, dass EstM2^[15] die Acetylierung von Benzylalkohol sogar 149-mal schneller katalysiert als die Donor-Hydrolyse und damit etwa 20-mal effizienter als MsAcT ist. Lediglich EstA (PDB 3ZYT)^[16] zeigte keine erhöhte relative Aktivität in Gegenwart von Benzylalkohol, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym nicht in der Lage ist, Benzylalkohol zu acetylieren. Mit Ausnahme von 3ZYT zeigte – selbst bei einer Konzentration von Benzylalkohol von 150 mM – keines der untersuchten Enzyme signifikante Substratinhibierung oder Stabilitätsprobleme.

Seit längerem ist bekannt, dass die Konformation der Acylgruppe im Acylenzym-Intermediat einen hohen Einfluss auf die Effizienz des Deacylierungsschrittes haben kann.^[17,18]

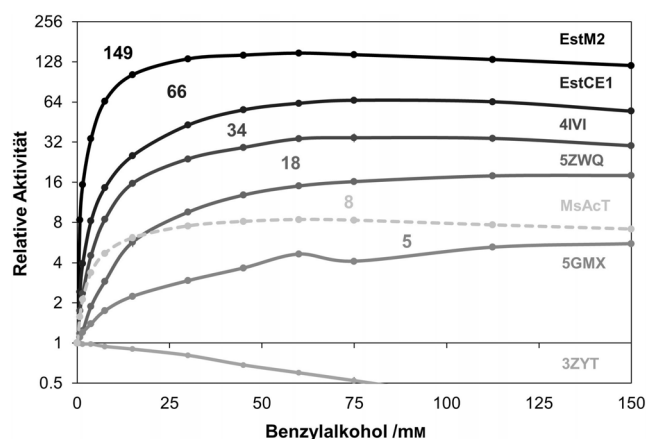


Abbildung 2. Relative Acyltransferase-Aktivitäten der EstCE1-Homologen als Funktion der Benzylalkoholkonzentration (logarithmische Skala). Die relativen Aktivitäten wurden in Triplikaten über das *p*NP-AcT-Assay bestimmt. Für jedes Enzym ist der höchste Wert angegeben. Bei diesen Reaktionen ist *p*NPA der Acyldonor und Benzylalkohol der Acylakzeptor.

Daher wurde das Acyldonorspektrum von EstCE1 und seiner Homologen mittels *p*NP-AcT-Assay untersucht, indem *p*NP-Ester verschiedener Kettenlängen als Acyldonoren eingesetzt wurden (Tabelle 1 und Tabelle S3).

Tabelle 1: Das Acyldonorspektrum von EstCE1 und EstM2 wurde mittels *p*NP-AcT-Assays mit Benzylalkohol als Acylakzeptor bestimmt. AT_{max} stellt die maximal gemessene Acyltransferase-Aktivität im Konzentrationsbereich von Benzylalkohol von 0 bis 150 mM dar.

Enzym	Donor	AT_{max} [U mg ⁻¹]	Hydrolyse [U mg ⁻¹]	AT/H
EstCE1	C2	2605 ± 86	40,1 ± 2,2	65
	C4	1081 ± 28	38,7 ± 3,3	28
	C6	26,1 ± 0,9	0,22 ± 0,03	119
	C8	0,29 ± 0,05	0,13 ± 0,01	2,2
EstM2	C2	5583 ± 221	37,7 ± 1,2	148
	C4	361 ± 33	54,2 ± 5,5	6,7
	C6	181,2 ± 17,3	23,7 ± 2,3	7,6
	C8	0,013 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,7

Fast alle untersuchten Enzyme zeigten gute Aktivität bezüglich der Acylierung von Benzylalkohol mit Kettenlängen von C2 bis C8. Im Allgemeinen wurden die höchsten Aktivitäten und Aktivitätsverhältnisse aus Acyltransfer zu Hydrolyse (AT/H) bei Kettenlängen im Bereich von C2 bis C6 gemessen. Hierbei zeigten EstCE1 und EstM2 eine bemerkenswert hohe Acyltransferase-Aktivität im kU/(mg-Enzym)-Bereich (Tabelle 1). EstSRT1 (PDB 5GMX)^[19] und EstU1 (PDB 4IVI)^[17,18] erwiesen sich bezüglich des Transfers von C8-Ketten als wertvoll, wobei die AT/H-Verhältnisse (4,6 und 5,6) im Bereich des Aktivitätsverhältnisses von MsAcT für die Acetylierung liegen (Tabelle S3). Umfangreiches Protein-Engineering war im Falle von MsAcT notwendig, um das Substratspektrum für C8-Ketten zu erweitern, wobei

selbst die beste Variante (F154A/I194V) ein AT/H-Verhältnis von unter 3 aufweist.^[6] 3ZYT zeigt zwar keine Transacetylase-Aktivität, dafür aber moderate Acyltransferase-Aktivität in Reaktionen mit Acyldonoren zunehmender Kettenlängen (Tabelle S3). Dies kann durch die hydrophoben aliphatischen Ketten erklärt werden, die Wasser aus der Bindungstasche ausschließen und dadurch die Hydrolyse erschweren sowie die Bindung organischer Akzeptoren begünstigen.^[20] Die Kristallstruktur von EstCE1 (PDB 7ATL), der zuerst entdeckten und bisher vielseitigsten Acyltransferase aus dieser Enzymfamilie, wurde aufgeklärt, um Strukturmerkmale identifizieren zu können, die zu hoher Acyltransferase-Aktivität beitragen. EstCE1 zeigt eine für Carboxylesterasen der Familie VIII typische β -Lactamasefaltung (Abbildung 3A), wobei die katalytische Triade (S65, K68 und Y171) am Übergang einer α/β -Subdomäne zu einer strukturell flexibleren helikalen Subdomäne lokalisiert ist. Wie auch für andere Carboxylesterasen der Familie VIII beschrieben, wird die Tasche rund um die katalytische Triade bei EstCE1 durch eine sogenannte Ω -Schleife verdeckt. Die Substratbindestelle (Abbildung 3A, grau-transparentes Volumen) kann in zwei Subdomänen, R1 und R2, unterteilt werden.^[18]

Im Gegensatz zu vielen anderen Strukturhomologen ist die Ω -Schleife in EstCE1 deutlich länger und blockiert dadurch einen Großteil der Bindetasche rund um die R1-Subdomäne. Die Ligandenbindestelle weist im Allgemeinen einen hydrophoben Charakter auf (Abbildung 3B). Ein Induced-Fit-Docking von Benzylalkohol in die Substratbindestelle des modellierten Acetylenzym-Intermediats deutet auf eine besondere Rolle von F243 als Teil der Ω -Schleife hin (Abbildung 3B). Über π - π -Wechselwirkungen trägt F243 zur Positionierung von Benzylalkohol in einer produktiven Pose nahe der Carbonylgruppe des Acetylenzym-Intermediats bei.

Ein Strukturvergleich mehrerer Carboxylesterasen zeigt, dass keine äquivalente Aminosäure zu F243 in EstY-29 (PDB 5ZWQ),^[21] 4IVI, 5GMX und 3ZYT existiert. Eine Homologiemodellierung legt jedoch nahe, dass F244 in EstM2, F243 in EstCE1 entspricht (Abbildung S9). Dies könnte erklären, warum EstCE1 und EstM2 im Vergleich zu ihren Homologen eine signifikant höhere Aktivität bei der Acetylierung von Benzylalkohol zeigen. Darüber hinaus wurde kovalentes Docking angewendet, um die Donorkettenlängenspezifität von EstCE1 erklären zu können. In Einklang mit den experimentellen Daten in Tabelle 1 deuten die Modellierungen darauf hin, dass lineare aliphatische Ketten mit mehr als vier Kohlenstoffatomen Teile der Benzylalkohol-Bindestelle blockieren (Abbildung 3B).

Auf Grundlage von Sequenzvergleichen wurde kürzlich die Aufteilung von Carboxylesterasen der Familie VIII in drei Unterklassen vorgeschlagen.^[15] Demnach gehören EstCE1, EstM2, 5ZWQ, 5GMX und 4IVI entweder zur Unterklasse VIII.1 oder VIII.2, welche beide ein konserviertes WGG-Motiv (WSG für 5ZWQ) in der Region aufweisen, in der die so genannte KTG-Box in β -Lactamasen der Klasse C zu finden ist (Abbildung S6).^[22] Aufgrund der Nähe zur katalytischen Triade scheint dieses Motiv die physikalischen Eigenschaften der Ligandenbindestelle tiefgreifend zu beeinflussen. Interessanterweise spielt Tryptophan in der ersten Position dieses Motivs (W339 in EstCE1) eine wichtige Rolle

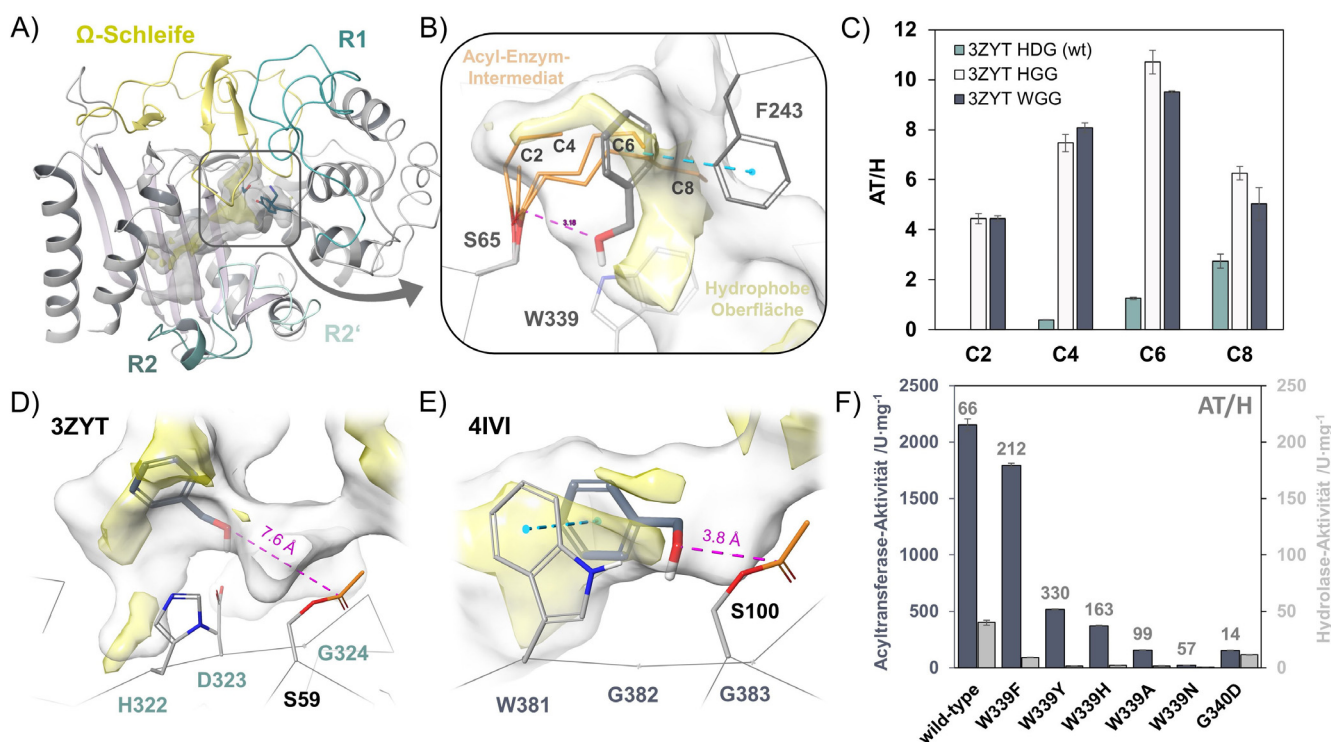


Abbildung 3. A) Kristallstruktur von EstCE1. Die Ω -Schleife sowie die R1-, R2- und R2'-Segmente sind farblich hervorgehoben. Die hydrophobe Tasche innerhalb der Ligandenbindungsstelle ist als gelbes Volumen dargestellt. B) Aktives Zentrum von EstCE1. Die Acylenzym-Intermediate, die bei den in Tabelle 1 gezeigten Reaktionen gebildet werden, wurden über kovalentes Docking modelliert. Benzylalkohol als Acylakzeptor wurde über Induced-Fit-Docking in die Struktur gedockt. Über π - π -Wechselwirkungen hilft F243 als Teil der Ω -Schleife dabei, Benzylalkohol in einer hydrophoben Tasche nahe dem nukleophilen Zentrum zu platzieren. Hierbei wird deutlich, dass die Acylenzym-Intermediate mit Ketten der Länge C6 und C8 mit der mutmaßlichen Benzylalkohol-Bindungsstelle überlagern. C) Die Mutation D323G verringert die Polarität innerhalb der Substratbindetasche erheblich (Abbildung S11) und befähigt 3ZYT zur Transacetylierung. D) und E) Die Acylenzym-Intermediate von 3ZYT und 4IVI wurden über kovalentes Docking modelliert, und Benzylalkohol wurde über Docking (starrer Rezeptor) in der Akzeptor-Bindungsstelle platziert. Hydrophobe Bereiche sind durch gelbe, transparente Volumina dargestellt. In der Esterase 4IVI der Familie VIII.1/2 trägt W381 des WGG-Motivs signifikant zur korrekten Positionierung des Acylakzeptors in einem Abstand von 3,8 Å zum Acylenzym-Intermediat bei. Im Gegensatz dazu führt D323 im HDG-Motiv von 3ZYT zur Abstoßung des Acylakzeptors, der nun mehr als 7 Å vom Acylenzym-Intermediat entfernt ist. F) Die Acyltransferase-Aktivität mehrerer EstCE1-Varianten wurde mittels pNPA-AcT-Assay bestimmt (Benzylalkohol als Acylakzeptor). Die spezifische Acyltransferase-Aktivität bezieht sich auf die maximale, in einem Bereich 0 bis 150 mM Benzylalkohol gemessene Aktivität. Die maximalen AT/H-Verhältnisse sind für jede Variante angegeben.

bei der Bildung der hydrophoben Tasche in Carboxylesterasen der Familie VIII.1 und VIII.2, wodurch die Bindung und Positionierung organischer Nucleophile erleichtert wird, wie für EstCE1 und 4IVI gezeigt (Abbildung 3B,E). Bei 3ZYT, einem Mitglied der Unterklasse VIII.3 (H-x-x-Motiv), findet sich HDG anstelle von WGG, was eine dramatische Reduktion der Hydrophobie rund um das aktive Zentrum zur Folge hat (Abbildung 3D). Dies könnte erklären, warum für 3ZYT als einziges Enzym in dieser Studie keine Transacetylase-Aktivität gemessen werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Rolle dieses Motivs für promiskuitive Acyltransferase-Aktivität genauer untersucht. Durch Mutation von HDG in 3ZYT zu HGG oder WGG (Abbildung 3C) konnte eine „Hydrolase“ rational in eine „Acyltransferase“ überführt werden, die mit MsAcT, dem aktuellen Maßstab für promiskuitive Acyltransferase-Aktivität, vergleichbar ist.^[5,6]

Um die Rolle dieses Motivs sowohl für die Hydrolase als auch für die Acyltransferase-Aktivitäten besser verstehen zu können, wurden darüber hinaus mehrere EstCE1-Varianten konstruiert und mittels pNPA-AcT-Assay charakterisiert

(Abbildung 3F). Bemerkenswerterweise zeigt die W339F-Variante dabei eine deutlich reduzierte Hydrolase-Aktivität, wobei die Acyltransferase-Aktivität mit der des EstCE1-Wildtyps vergleichbar bleibt. Das AT/H-Verhältnis übersteigt den Wert von 200 und übertrifft damit selbst EstM2. Die höchste Transfereffizienz wurde jedoch für die Variante W339Y gemessen. Ihr bemerkenswert hohes AT/H-Verhältnis von 330 macht diese Variante zu einer etwa 50-fach effizienteren Acyltransferase als MsAcT und führt dazu, dass Acyldonor-Hydrolyse fast als vernachlässigbare Nebenreaktion angesehen werden kann. Analog zum HDG-Motiv in EstCE1 platziert (ergibt WDG), was, den Erwartungen entsprechend, in einem drastisch verringertem AT/H-Verhältnis resultierte. Die Ergebnisse dieser Mutagenesestudien unterstreichen die Bedeutung dieses Motivs für die promiskuitive Acyltransferase-Aktivität und die Acylakzeptor-Spezifität in Carboxylesterasen der Familie VIII.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Biokatalysatoren zur Überwindung der synthetischen Grenzen verfügbarer Acyl-

transferasen zu identifizieren und das allgemeine Verständnis von promiskuitiver Acyltransferase-Aktivität zu vertiefen. Wir konnten zeigen, dass viele Carboxylesterasen der Familie VIII die Grenzen dessen, was bisher für möglich gehalten wurde, überschreiten, indem sie die Bildung von Estern, Carbonaten, Carbamaten und Amidinen, wie dem Antidepressivum Moclobemid, mit beispielloser Effizienz katalysieren. Das identifizierte Aminosäuremotiv in unmittelbarer Umgebung zur katalytischen Triade könnte in dieser Enzymfamilie als Aktivitäts- und Spezifitätsschalter betrachtet werden. Bemerkenswert ist, dass es nur einer einzigen, rationalen Mutation bedurfte, um 3ZYT, eine Esterase ohne promiskuitive Acetyltransferase-Aktivität, in eine Acetyltransferase umzuwandeln. Nach unserem Wissen ist dies in der Literatur bisher beispiellos.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (231396381/GRK1947) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderungsnummer 031B0354B) gefördert. Wir danken der B.R.A.I.N. AG (Zwingenberg, Deutschland) für die Bereitstellung des Expressionsplasmids für EstCE1. Wir danken auch Prof. Wolfgang Streit (Univ. Hamburg) und Dr. Klaus Liebeton (B.R.A.I.N. AG) für hilfreiche Diskussionen. Wir danken Schrödinger Maestro für die Bereitstellung einer Testlizenz für ihre Software. Wir danken für den Zugang zur Beamline BL14.2 des BESSY II (Berlin, Deutschland) Speicherring über das Gemeinsame Berliner MX-Laboratorium, das vom Helmholtz Zentrum Berlin für Materialien und Energie der Freien Universität Berlin, der Humboldt-Universität zu Berlin, dem Max-Planck-Gesellschaft und dem Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie gefördert wird. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Acyltransferase · Acyltransferase · Biokatalyse · Familie-VIII-Carboxylesterase · Veresterung

- [1] a) S. D. Copley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *47*, 167–175; b) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032–6040; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156–6165; c) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231–238.
[2] U. Bergthorsson, D. I. Andersson, J. R. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17004–17009.
[3] a) S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, <https://doi.org/10.1002/ange.202006648>; *Angew. Chem.* **2020**, <https://doi.org/10.1002/ange.202006648>; b) B. Hauer, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 8418–8427.

- [4] H. Land, P. Hendil-Forsell, M. Martinelle, P. Berglund, *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 2897–2900.
[5] I. Mathews, M. Soltis, M. Saldajeno, G. Ganshaw, R. Sala, W. Weyler, M. A. Cervin, G. Whited, R. Bott, *Biochemistry* **2007**, *46*, 8969–8979.
[6] S. P. Godehard, C. P. S. Badenhorst, H. Müller, U. T. Bornscheuer, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 7552–7562.
[7] E. Jost, M. Kazemi, V. Mrkonjić, F. Himo, C. K. Winkler, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 10500–10507.
[8] H. Müller, A.-K. Becker, G. J. Palm, L. Berndt, C. P. S. Badenhorst, S. P. Godehard, L. Reisky, M. Lammers, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 11607–11612; *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 11704–11709.
[9] L. Reisky, V. S. T. Srinivasamurthy, C. P. S. Badenhorst, S. P. Godehard, U. T. Bornscheuer, *Catalysts* **2019**, *9*, 64.
[10] L. Mestrom, J. G. R. Claessen, U. Hanefeld, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 2004–2010.
[11] C. Elend, C. Schmeisser, C. Leggewie, P. Babiak, J. D. Carbalreira, H. L. Steele, J.-L. Reymond, K.-E. Jaeger, W. R. Streit, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3637–3645.
[12] M. Litwinowicz, J. Kijeński, *Sustainable Chem. Processes* **2015**, *3*, 1.
[13] M. Baumann, B. H. Hauer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4781–4790.
[14] a) J. Selvin, J. Kennedy, D. P. H. Lejon, G. S. Kiran, A. D. W. Dobson, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 72; b) L.-M. Ouyang, J.-Y. Liu, M. Qiao, J.-H. Xu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *169*, 15–28; c) H. W. Lee, W. K. Jung, Y. H. Kim, B. H. Ryu, T. D. Kim, J. Kim, H. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 315–325; d) K. Rashamuse, V. Magomani, T. Ronneburg, D. Brady, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 491–500.
[15] J. Sarkar, A. Dutta, P. Pal Chowdhury, J. Chakraborty, T. K. Dutta, *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 77.
[16] a) M. Schütte, S. Fetzner, *Curr. Microbiol.* **2007**, *54*, 230–236; b) U. G. Wagner, F. DiMaio, S. Kolkenbrock, S. Fetzner, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 1154–1160.
[17] J. H. Jeon, S.-J. Kim, H. S. Lee, S.-S. Cha, J. H. Lee, S.-H. Yoon, B.-S. Koo, C.-M. Lee, S. H. Choi, S. H. Lee, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7830–7836.
[18] S.-S. Cha, Y. J. An, C.-S. Jeong, M.-K. Kim, J. H. Jeon, C.-M. Lee, H. S. Lee, S. G. Kang, J.-H. Lee, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2013**, *81*, 2045–2051.
[19] a) S.-S. Cha, Y. J. An, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 818–824; b) J. H. Jeon, H. S. Lee, J. H. Lee, B.-S. Koo, C.-M. Lee, S. H. Lee, S. G. Kang, J.-H. Lee, *SpringerPlus* **2016**, *5*, 525.
[20] a) M. Golczak, A. E. Sears, P. D. Kiser, K. Palczewski, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 26–32; b) M. Kazemi, X. Sheng, W. Kroutil, F. Himo, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10698–10706.
[21] a) T. D. Ngo, C. Oh, P. Mizar, M. Baek, K.-s. Park, L. Nguyen, H. Byeon, S. Yoon, Y. Ryu, B. H. Ryu, et al., *ACS Catal.* **2019**, *9*, 755–767; b) S. Yoon, S. Kim, Y. Ryu, T. D. Kim, *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 1–7.
[22] U. G. Wagner, E. I. Petersen, H. Schwab, C. Kratky, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 467–478.

Manuskript erhalten: 22. Oktober 2020

Akzeptierte Fassung online: 3. November 2020

Endgültige Fassung online: 23. November 2020