

Université de Neuchâtel

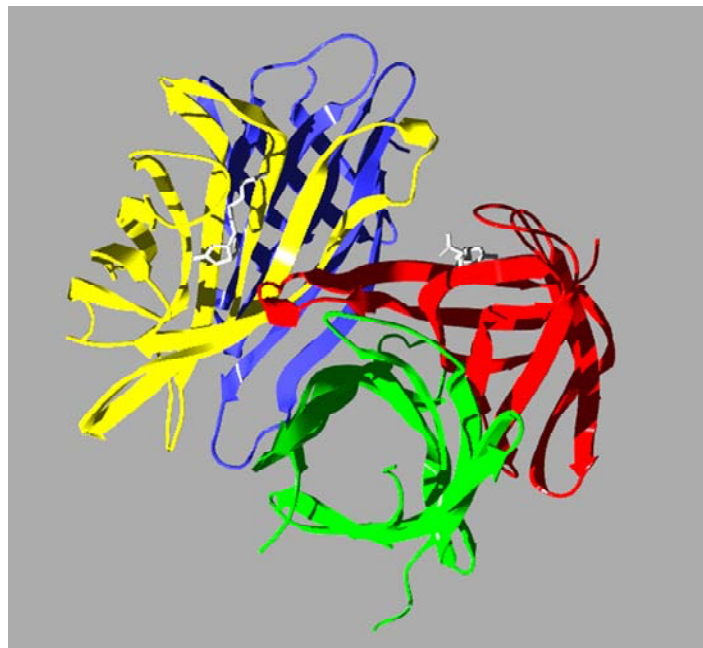
Faculté des Sciences

Instituts de Chimie et de Biochimie

Thèse de doctorat :

Approche combinatoire de la production et de la purification de mutants de la streptavidine en vue de générer des métalloenzymes artificielles

Nicolas Humbert



Année 2005

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Approche combinatoire de la production et de la
purification de mutants de la streptavidine en vue de
générer des métalloenzymes artificielles**

M. Nicolas HUMBERT

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

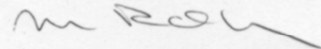
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel, sur le rapport des membres du jury

MM. T. Ward (directeur de thèse), P. Schürmann,
J.-M. Neuhaus, B. Castaing (Orléans F)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 14 avril 2005

La doyenne:



Martine Rahier

REMERCIEMENTS.....	9
ABSTRACT	10
RÉSUMÉ.....	12
ABRÉVIATIONS	14
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	17
1. GÉNÉRALITÉS SUR LA CHIRALITÉ	17
2. LA CATALYSE ÉNANTIOSÉLECTIVE.....	20
2.1. DÉFINITIONS	20
2.2. LA CATALYSE ÉNANTIOSÉLECTIVE INDUITE PAR LES MÉTAUX DE TRANSITION.....	22
2.3. CATALYSE ENZYMATIQUE	28
2.3.1 Généralités.....	28
2.3.2. Evolution dirigée des enzymes.....	32
2.4. CATALYSE PAR MÉTALLOENZYMES ARTIFICIELLES	36
2.4.1. Avantages des métalloenzymes artificielles.....	36
2.4.2. Incorporation covalente d'un catalyseur chimique à une protéine.	36
2.4.3. Incorporation non covalente d'un catalyseur dans une protéine.	38
3. LE SYSTÈME (STREPT)AVIDINE / BIOTINE.....	40
3.1. LA BIOTINE	40
3.2. GÉNÉRALITÉS SUR L' AVIDINE ET LA STREPTAVIDINE	44
3.2.1. L'avidine	44
3.2.2. La streptavidine	46
3.3. STRUCTURE DE L' AVIDINE ET DE LA STREPTAVIDINE	47

3.4. L'INTERACTION (STREPT)AVIDINE – BIOTINE.....	49
3.5. LES SYSTÈMES DE PRODUCTION DE L' AVIDINE ET DE LA STREPTAVIDINE	51
3.6. PURIFICATION DE L' AVIDINE ET DE LA STREPTAVIDINE.....	53
3.7. L'INGÉNIERIE (STREPT)AVIDINE - BIOTINE	53
4. BUTS DU TRAVAIL DE THÈSE.....	55
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	57
1. MATÉRIEL.....	57
1.1. RÉACTIFS ET COMPOSANTS DES MILIEUX	57
1.2. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	57
1.3. APPAREILS	58
2. CARACTÉRISATION DU PLASMIDE PÉT11B-SAV	59
2.1. ANALYSE DE RESTRICTION	59
2.2. PCR SAV-ECO _F - SAV-BAM _R ET T7 - T7 _{TERM}	60
2.3. SÉQUENCE DU GÈNE.....	61
3. TRANSFORMATION DES BACTÉRIES	61
3.1. OBTENTION DES BACTÉRIES « HEAT-SHOCK » COMPÉTENTES.....	61
3.2. PROTOCOLE DE TRANSFORMATION	62
4. OBTENTION DES MUTANTS	63
4.1. PCR MUTAGÈNES.....	63
4.2. ANALYSE DES CLONES ET SÉQUENÇAGE	65
5. PRODUCTION DE LA STREPTAVIDINE RECOMBINANTE ET DES MUTANTS	66
5.1. SYSTÈME INITIAL (BL21(DE3), CULTURE DE 1,5 L)	66
5.2. SYSTÈME FINAL (BL21(DE3) _P LYSS, CULTURES DE 10 L)	67
5.3. CULTURES DE 50 mL ET MINICULTURES DE 4 ML	68

5.4. PRODUCTION EN PLAQUES DE CULTURES	69
5.5. ANALYSE DES CULTURES PAR SDS-PAGE.....	69
5.5.1. Traitement des échantillons.....	69
5.5.2. SDS-PAGE.....	70
6. PURIFICATION DE LA PROTÉINE ET DES MUTANTS	71
6.1. SYSTÈME INITIAL	71
6.2. SYSTÈME FINAL	72
6.3. PURIFICATION « TYPE S112P ».....	73
6.4. QUANTIFICATION DE LA PROTÉINE DANS L'EXTRAIT CELLULAIRE	73
7. ANALYSE DES PROTÉINES PURIFIÉES.....	74
7.1. SPECTRE DE MASSE.....	74
7.2. TITRAGE DES SITES ACTIFS	75
7.2.1. Par la biotine-4-fluorescéine	75
7.2.2. Par exclusion du HABA par la biotine.....	76
8. STABILITÉ THERMIQUE DE LA STREPTAVIDINE SEULE ET DE LA STREPTAVIDINE COMPLEXÉE AVEC LA BIOTINE ET DIFFÉRENTES MOLÉCULES BIOTINYLÉES.....	77
8.1. DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DES MUTANTS	77
8.2. DÉNATURATION THERMIQUE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE	77
8.3. CINÉTIQUE DE DÉNATURATION	78
9. ANALYSES DES CATALYSES ÉNANTIOSÉLECTIVES	78
9.1. ANALYSE DE LA PROTÉINE APRÈS CATALYSE PAR SPECTRE DE MASSE.....	78
9.2. ANALYSES DES CATALYSES PAR SDS-PAGE.....	79
10. CRIBLAGE DE LA FONCTIONALITÉ DES MUTANTS EN PARTANT DE MINICULTURES DE 4 M^L	79
10.1. CRIBLAGE PAR SDS-PAGE	79

10.2. ANALYSE PAR PLAQUE ELISA	79
11. CRIBLAGE DE LA FONCTIONALITÉ DES MUTANTS PRODUITS EN PLAQUES DE CULTURES	80
12. « REDESIGN » DU GÈNE.....	81
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	82
1. CARACTÉRISATION DU PLASMIDE PET11B-SAV	83
1.1. SÉQUENCES ET CARTOGRAPHIE DE RESTRICTION.....	83
1.2. PCR T7 - T7TERM ET PCR SAV-ECO F - SAV-BAMR.....	85
2. PRODUCTION DE LA STREPTAVIDINE PAR <i>ESCHERICHIA COLI</i>.....	88
2.1. SYSTÈME INITIAL.....	88
2.2. OPTIMISATIONS DU PROTOCOLE DE PRODUCTION DE LA STREPTAVIDINE	92
2.2.1. Effet du glucose et de la température	93
2.2.2. Utilisation de la souche BL21(DE3)pLysS	93
2.2.3. Tests de milieux.....	95
2.2.4. Choc osmotique des cellules	97
2.2.5. Choix du moment de l'induction.....	98
3. PURIFICATION DE LA STREPTAVIDINE	99
3.1. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT BACTÉRIEN AVANT PURIFICATION PAR COLONNE D'IMINOBIOTINE.....	99
3.2. COLONNE D'AFFINITÉ PAR 2-IMINOBIOTINE-AGAROSE	101
3.3. FIN DE LA PURIFICATION.....	103
3.4. PROBLÈMES D'ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE	104
3.5. AUTRES AMÉLIORATIONS DU PROTOCOLE DE PURIFICATION	105
4. OBTENTION DES MUTANTS DE LA STREPTAVIDINE	106
4.1. MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE	106
4.1.1. Choix des mutants	106

4.1.2. Stratégie utilisée	109
4.1.3. Obtention des mutants	110
4.1.4. Criblage des mutants	111
4.2. MUTAGENÈSE DE SATURATION	112
4.2.1. Stratégie utilisée	112
4.2.2. Obtention des mutants Sat-112.....	113
5. CARACTÉRISATION DE LA STREPTAVIDINE WILD-TYPE ET DES MUTANTS.....	115
5.1. RENDEMENTS DE PRODUCTION.....	115
5.1.1. Streptavidine wild-type	115
5.1.2. Cas des mutants	116
5.2. SPECTRE DE MASSE.....	119
5.3. STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA PROTÉINE WILD-TYPE	120
5.4. ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE.....	122
5.4.1. Techniques utilisées	122
5.4.2. Titrage des mutants	124
5.4.3. Cas du mutant S112P	126
5.5. DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DES MUTANTS	129
5.6. STABILITÉ DE LA STREPTAVIDINE EN SDS-PAGE EN CONDITIONS DÉNATURANTES ET NON- DÉNATURANTES.....	131
5.6.1. Cas de la streptavidine sans biotine.....	131
5.6.2. Cas de la protéine complexée avec la biotine et le ligand $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$	133
5.7. CARACTÉRISATIONS EN COURS	134
6. CATALYSES ÉNANTIOSÉLECTIVES	135

6.1. HYDROGÉNATION CATALYTIQUE DE L'ACIDE ACÉTAMIDOACRYLIQUE ET DE L'ACIDE ACÉTAMIDOCINNAMIQUE	135
6.1.1. Résultats des catalyses.....	135
6.1.2. Analyse par spectre de masse de la protéine après catalyse	138
6.1.3. Etude de la structure quaternaire de la protéine dans les conditions de la catalyse.....	140
6.1.4 Dénaturation thermique du complexe streptavidine / [Rh(COD)(Biot-1)].....	141
6.2. TRANSFERT D'HYDROGÉNATION CATALYTIQUE	143
6.3. OXYDATION CATALYTIQUE	143
7. TESTS DE FONCTIONNABILITÉ DES MUTANTS PAR MINICULTURE	143
7.1. NÉCESSITÉ DE CE TYPE DE TESTS.....	143
7.2. ANALYSE PAR SDS-PAGE	144
7.3. ANALYSE PAR LECTEUR DE PLAQUES ELISA	145
7.3.1. Mise au point de la technique.....	145
7.3.2. Résultats obtenus	147
8. PRODUCTION DES MUTANTS DANS LES PLAQUES DE CULTURES	148
9. MUTANTS 24-25-26	149
10. « REDESIGN » DU GÈNE.....	152
10.1. BUT DU « REDESIGN ».....	152
10.2. STRATÉGIE UTILISÉE.....	152
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	158
BIBLIOGRAPHIE.....	161
ANNEXES.....	179

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire des métalloenzymes artificielles sous la direction du professeur Thomas R. Ward que je tiens à remercier pour son accueil, la confiance qu'il m'a accordée et l'ensemble des connaissances qu'il m'a apportées.

Je remercie également les membres de mon jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'avoir évalué mon travail. Je remercie le professeur Peter Schürmann pour les innombrables conseils qu'il m'a donnés, ainsi que pour son enthousiasme à effectuer quelques expériences avec moi. Le professeur Jean-Marc Neuhaus pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant 4 ans et pour les discussions scientifiques. Le Docteur Bertrand Castaing en souvenir des longues discussions lors de mon DEA au CNRS.

Je remercie les membres du groupe des métalloenzymes artificielles (anciens ou toujours présents) pour les moments passés ensemble que ce soit dans le cadre du travail ou dans un cadre privé. En particulier, Andrea Zocchi pour la formation qu'il m'a donnée.

Je remercie également Ophélie Rossetti, Kevin Zimmermann et Létitia Ischer qui au travers de leur apprentissage ont largement contribué à ce travail.

Je remercie l'ensemble du laboratoire de biochimie végétale pour les nombreuses interactions que nous avons pu avoir aussi bien professionnelles qu'amicales.

Je remercie aussi mes amis (collègues ou non) pour les bons moments passés ensemble et leur soutien lors des moments difficiles.

Enfin, je remercie les membres de ma famille pour leur soutien et la patience dont ils ont su faire preuve.

ABSTRACT

The production of enantiopure products is critical in many fields, notably for the life science industry. Asymmetric catalysis (= enantioselective catalysis) is a good way to obtain this kind of compounds. It can be performed either by transition metals in a chiral environment or by enzymes. Both systems have some advantages and drawbacks. The generation of artificial metalloenzymes by the insertion of a catalytic metal into a protein allows cumulating the characteristics of both systems.

The biotin – (strept)avidin system appears to be an ideal tool to generate some artificial metalloenzymes. The proteins avidin and streptavidin (= (strept)avidin) exhibit a very high affinity for the vitamin biotin ($K_a \sim 10^{13} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$). This affinity is not significantly affected by the derivatization of the biotin anchor. This system has numerous applications and is the second biological engineering system used in the world after antibody technology. In absence of protein, an achiral biotinylated catalytic organometallic complex is able to convert a prochiral substrate, but without any enantiomeric enrichment. In presence of (strept)avidin, the same reaction can become enantioselective due to the chiral environment provided by the protein.

In the present work, the optimization of the production of streptavidin by *Escherichia coli* (up to 210 mg/L of culture), its purification and characterization were studied. Twelve mutants were rationally designed to influence the metal position during catalysis with the aim of increasing the selectivity. Mutant S112G proved versatile in terms of selectivity of the resulting metalloenzyme. Thus, position 112 was selected to perform a saturation mutagenesis.

Certain variants exhibited a low solubility or a low activity. Some modifications of the purification protocol allowed to increase 4 to 18-fold the yield of the purified protein.

In addition, a high-throughput screening method using a biotinylated fluorescent probe was developed, to test the functionality of bacterial extracts coming from cells cultivated in microplates. This test allows the selection of functional variants arising from a large mutant library obtained by directed evolution of streptavidin genes.

RÉSUMÉ

L'obtention de produits énantiomériquement purs revêt une importance vitale dans bon nombre de domaines, et notamment, dans l'industrie pharmaceutique. La catalyse asymétrique (= catalyse énantiosélective) permet d'obtenir ce genre de composés. Ce type de réaction peut être catalysé par un métal de transition coordonné à un ligand chiral ou par une enzyme. Néanmoins, si chacun des deux systèmes possède des avantages, ils présentent également quelques inconvénients. L'obtention de métalloenzymes artificielles par l'insertion de métaux catalytiques au sein de protéines permet de cumuler les caractéristiques propres aux deux systèmes.

Le système biotine – (strept)avidine apparaît comme un outil de choix pour générer des métalloenzymes artificielles. L'avidine et la streptavidine (= (strept)avidine) présentent une forte affinité pour la biotine ($K_a \sim 10^{13} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Cette affinité ne baisse pas de manière significative lorsque la biotine est dérivatisée. Cette interaction a de nombreuses applications et représente le système le plus utilisé en ingénierie biologique après les anticorps. En absence de protéine, un complexe organométallique catalytique achiral biotinylé est capable de convertir un substrat prochiral en un produit racémique. En présence de (strept)avidine, la réaction devient énantiosélective grâce à l'environnement chiral apporté par la protéine.

Dans ce travail, l'optimisation de la production de streptavidine par *Escherichia coli* (jusqu'à 210 mg/L de culture), sa purification et sa caractérisation ont été étudiées. Douze mutants ont été désignés plus ou moins rationnellement pour influencer sur la position du métal lors des catalyses et ainsi modifier sa sélectivité. L'un d'eux (S112G) a apporté bon nombre d'améliorations lors des catalyses et une expérience de mutagenèse de saturation a été effectuée sur la position 112.

Les problèmes d'activité ou de solubilité de certains mutants ont amené à modifier le protocole de purification de la protéine. Cette modification a permis d'augmenter le rendement de purification de ces mutants d'un facteur allant de 4 à 18.

Par ailleurs, un criblage à haut débit de la fonctionnalité des mutants a été mis en place à l'aide d'une sonde biotinylée fluorescente, en partant d'extraits bactériens provenant de cellules cultivées en microplaques. Ce test permet d'envisager la sélection de variants fonctionnels au sein d'une large librairie de mutants obtenus par évolution dirigée de la streptavidine, mais aussi potentiellement de protéines chimériques avidine – streptavidine obtenues par DNA-shuffling.

ABRÉVIATIONS

Å : Ångström

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

APS : Persulfate d'ammonium

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNt : ARN de Transfert

BBP : Bleu de bromophénol

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Bovine sérum albumine

COD : 1,5-cyclooctadiène

Conc. : Concentration

D : Conditions dénaturantes

Da : Dalton

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Ethylènediamine acide tétracétique

ee : Excès énantiomérique

ESI-MS : Electrospray ionization mass spectrometry

g : Gramme

h : Heure

HABA : 2-(4'-hydroxyazobenzène) acide benzoïque

IL : Interleukine

IPTG : Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside

Ka : Constante d'association

Kd : Constante de dissociation

kDa : Kilo dalton

Kg : Kilo gramme

L : Litre

LB-5X : Loading-Buffer concentré 5 fois

M : Molaire

mg : Milligramme

min. : Minute

MOPS : Acide 3-(*N*-morpholino)propanesulfonique

NAD⁺/NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit

NADP⁺/NADPH : NAD phosphate oxydé/réduit

ND : Conditions non-dénaturantes

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase chain reaction

pmol : Picomole

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl

S112G : Sérine 112 remplacée par une glycine

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

sec. : Seconde

TAE : Tris-Acétate EDTA

TEMED : *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

v/v : Volume sur volume

w/v : Masse sur volume

Wt : Wild-type (type sauvage)

XC : Xylène cyanol

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Bien que notre groupe utilise la streptavidine pour de multiples projets, l'ensemble de ce travail a été réalisé dans le but d'optimiser une série de métalloenzymes artificielles capables de catalyser diverses réactions énantiosélectives. Il apparaît donc nécessaire d'introduire un certain nombre de notions sur la chiralité et la catalyse énantiosélective avant de développer l'aspect biologique du sujet.

1. GÉNÉRALITÉS SUR LA CHIRALITÉ

On définit la chiralité par l'absence de centre d'inversion ou de plan miroir d'un objet. L'objet chiral n'est pas superposable à son image miroir. L'exemple le plus fréquemment utilisé pour illustrer la chiralité est la main. La main gauche est l'image miroir de la main droite, mais ne peut en aucun cas se superposer à cette dernière. Dans la nature, les phénomènes chiraux sont observables à l'échelle morphologique (la coquille d'une grande majorité d'espèces d'escargots forme une hélice droite), anatomique (notre cœur est à gauche, l'estomac à droite), cellulaire (les cellules de l'épiderme végétal forment un sorte de puzzle dont les pièces ne sont pas superposables à leur image miroir), macromoléculaire (hélice droite de l'ADN, structures secondaires des protéines) et moléculaire.

Il existe plusieurs formes de chiralité moléculaire, la plus fréquemment rencontrée en biologie est la chiralité induite par un carbone asymétrique (Fig. 1.1). Les deux énantiomères (images miroir) sont non superposables. Leur réactivité chimique est la même sauf si un second élément de chiralité (une protéine par exemple) intervient dans la réaction. Leurs propriétés

optiques diffèrent également, les deux énantiomères dévient la lumière polarisée d'un angle opposé, l'énantiomère (L) (lévogyre) dévie la lumière à gauche, l'énantiomère (D) (dextrogyre) la dévie à droite. On définit deux configurations absolues du carbone en fonction du nombre atomique de ses substituants directs. On place le substituant le plus petit à l'arrière de la molécule, les trois autres substituants sont ordonnés du plus important au plus petit. Si l'ordre décroissant des nombres atomiques des substituants suit le sens horaire, il s'agit d'une configuration absolue (*R*), si cet ordre suit le sens anti-horaire, on parle alors de configuration (*S*)¹.

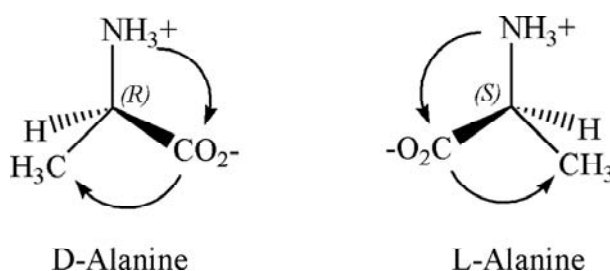


Figure 1.1 : Configurations absolues de l'alanine.

La coordination des métaux peut également induire une forme de chiralité (Fig. 1.2). Si l'on considère les agents chélatants du métal de la figure 1.2 comme étant les pales d'une hélice, l'hélice tournant dans le sens horaire est alors définie comme ayant une configuration absolue Λ . Dans le cas inverse, on parle de forme Δ .

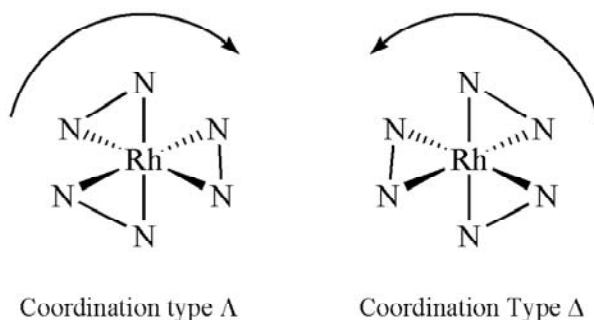


Figure 1.2 : Chiralité de la coordination des métaux.

D'autres formes de chiralité existent, quelques exemples sont montrés sur la figure 1.3².

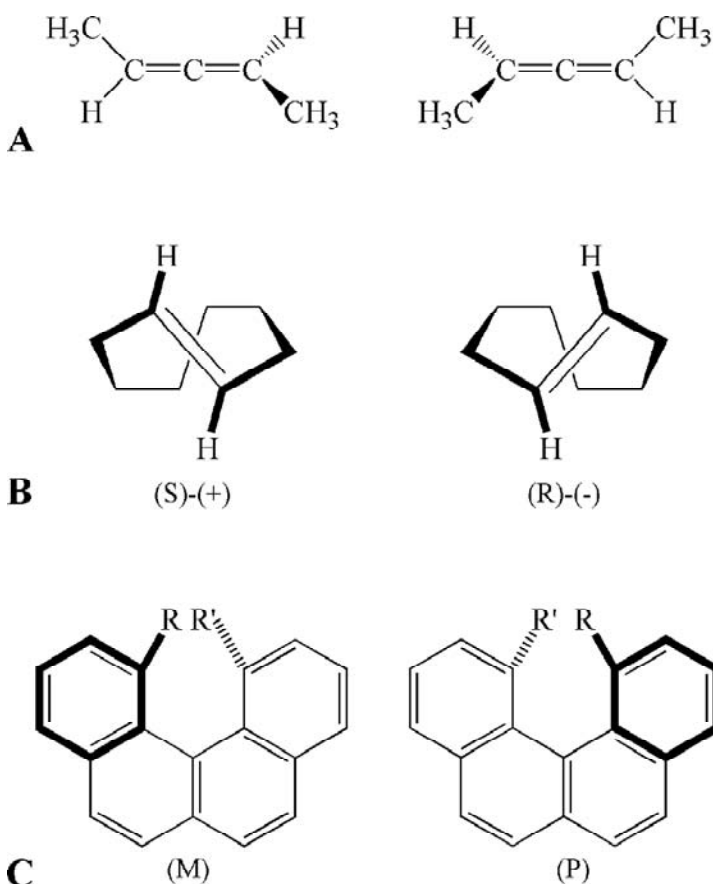


Figure 1.3 : Différentes formes de chiralité. **A.** Chiralité axiale des allènes. **B.** Chiralité planaire du *trans*-cyclooctène. **C.** Chiralité hélicoïdale des benzophénanthrènes.

La chiralité issue d'un carbone asymétrique dont la découverte a valu en 1901 le prix Nobel à van t'Hoff, revêt une importance capitale dans le monde du vivant, 19 acides aminés sur les vingt principalement utilisés pour la synthèse de protéines sont chiraux, la thréonine et l'isoleucine présentant deux centres de chiralité. Les sucres, les acides nucléiques (de par la présence de ces mêmes sucres), certains acides gras, une grande majorité de métabolites cellulaires, les alcaloïdes végétaux, les hormones, les vitamines sont chiraux. De la même manière qu'une personne utilise sa main droite différemment de sa main gauche, selon qu'elle soit droitère ou gauchère, l'organisme utilise différemment les deux énantiomères d'une même molécule. Par exemple, les acides aminés naturels (utilisés pour la synthèse de protéines) sont de

forme L, ceux de la forme D se retrouvent dans la composition d'hormones ou de venins. Dans d'autres cas, un seul des deux énantiomères est utilisé.

Lors de la fabrication d'un médicament, il est nécessaire de tenir compte du facteur chiralité. Les effets de l'un ou l'autre des énantiomères peuvent être parfois dramatiques. Ce fut le cas dans les années 60 avec la thalidomide (Fig. 1.4). Ce médicament actuellement utilisé en thérapie anti-cancer, anti-HIV et contre la lèpre, a été administré aux femmes enceintes pour ses vertus sédatives et anti-nauséuses³. Malheureusement, si la (*R*)-thalidomide induit les effets escomptés, il a été montré que la forme (*S*) est tératogène et provoque des malformations sévères sur le nouveau né (surdité, absence de membres, malformation des mains...) ⁴.

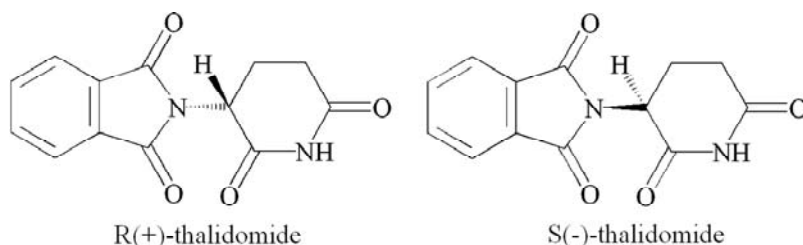


Figure 1.4 : Structure de la thalidomide.

L'obtention de molécules énantiomériquement pures devient dès lors, un véritable enjeu pour les industries pharmaceutiques, mais aussi agrochimiques, agroalimentaires ou cosmétiques.

2. LA CATALYSE ÉNANTIOSÉLECTIVE

2.1. DÉFINITIONS

Lorsqu'une réaction chimique est thermodynamiquement possible, elle peut être accélérée par un catalyseur. Ce catalyseur peut être une protéine (catalyse enzymatique) ou un métal de transition dans le cas de la catalyse homogène ou hétérogène. L'action du catalyseur est l'abaissement de la barrière d'énergie de l'état de transition de la réaction.

La catalyse énantiosélective (= catalyse asymétrique) est une forme de catalyse où le catalyseur a une réactivité différente avec les deux énantiomères d'une molécule. Il peut s'agir d'une réactivité accrue d'un énantiomère par rapport à l'autre lorsque l'on part d'un mélange racémique (Fig. 1.5).

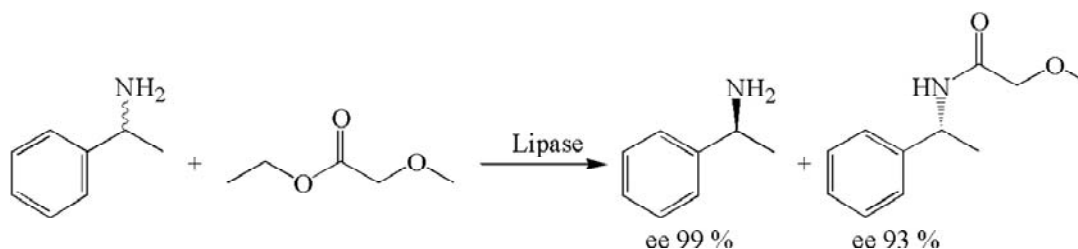


Figure 1.5 : Résolution cinétique d'une amine racémique par une lipase.

On parle dans ce cas, de résolution cinétique. Dans ce type de réaction, on définit le coefficient E comme étant le rapport de la vitesse de réaction d'un énantiomère par rapport à celle de l'autre :

$$E = \frac{V_R}{V_S} = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{Km}\right)_R}{\left(\frac{k_{cat}}{Km}\right)_S}$$

Une autre forme de catalyse est l'obtention préférentielle d'un énantiomère en partant d'une molécule prochirale (Fig. 1.6).

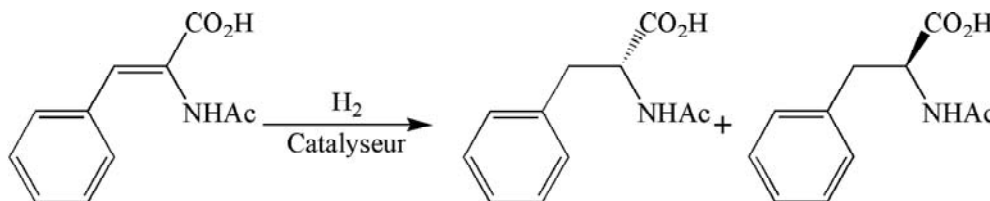


Figure 1.6 : Exemple de catalyse partant d'une molécule prochirale : l'hydrogénation de l'acide α -acétamido-cinnamique.

Dans ce type de réaction, on définit un excès énantiomérique (en pourcentage) comme étant la différence de quantité d'un produit d'une forme (*R*) ou (*S*) par rapport à la quantité de l'autre sur la somme des deux :

$$ee = \frac{|n_{(R)} - n_{(S)}|}{n_{(R)} + n_{(S)}} \times 100$$

Lorsqu'une réaction est catalysée par un métal, elle est influencée par l'environnement direct de celui-ci (l'agent chélatant = ligand). On parle alors de première sphère de coordination. Le solvant de la réaction influe également sur le rendement et l'excès énantiomérique de la catalyse. Il constitue la seconde sphère de coordination du métal. Dans le cas d'une protéine, les sphères de coordination sont plus complexes, mais bien définies. La première est constituée par le site catalytique de l'enzyme, la seconde par les acides aminés interagissant avec ceux du site catalytique. La troisième par les résidus structurant ceux de la seconde sphère et ainsi de suite.

2.2. LA CATALYSE ÉNANTIOSÉLECTIVE INDUITE PAR LES MÉTAUX DE TRANSITION

La catalyse asymétrique par les métaux de transition connaît un essor depuis le milieu des années 60. En 2001, le prix Nobel de chimie a été attribué aux professeurs William S. Knowles, Ryoji Noyori et K. Barry Sharpless pour leur contribution à l'invention et au développement de la catalyse asymétrique⁵⁻⁷. C'est Noyori et Nozaki en 1966, qui mirent au point le premier système catalytique asymétrique à partir d'un métal. Le catalyseur constitué d'un atome de cuivre II coordonné à une base de Schiff a permis d'obtenir un mélange de *cis* et *trans*-cyclopropanecarboxylates en partant du styrène et de l'éthyl diazoacétate. Les deux composés ont été obtenus avec des excès énantiomériques de respectivement 6 et 10 % (Fig. 1.7)⁶.

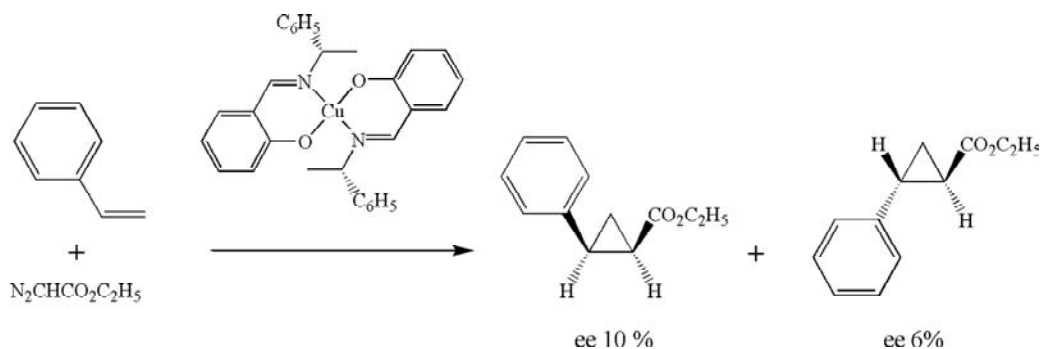


Figure 1.7 : Obtention du *cis* et du *trans*-cyclopropanecarboxylate par le complexe de cuivre de Noyori et Nozaki.

La même année Wilkinson met au point le complexe chlorotris(phénylphosphine) rhodium ($[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$) et parvient à l'aide de ce complexe, à hydrogéner la double liaison d'un alcène. Par ce procédé, il démontra que l'hydrogène moléculaire pouvait être activé par un métal⁶.

Deux ans après, Knowles et Horner mirent au point indépendamment la première hydrogénation catalytique énantiosélective en modifiant le complexe de Wilkinson. L'idée de Knowles a été de remplacer les triphénylphosphines du complexe de Wilkinson, par des phosphines portant trois substituants différents. Les atomes de phosphore deviennent alors chiraux et induisent l'énantiosélectivité de la catalyse (Fig. 1.8)⁵.

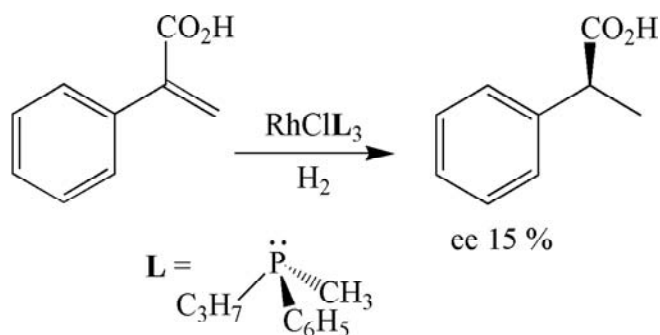


Figure 1.8 : Hydrogénation catalytique de l'acide α -phénylacrylique.

Par la suite, Knowles développa une nouvelle série de ligand chiraux utilisés pour la synthèse du L-DOPA, un médicament utilisé pour lutter contre la maladie de Parkinson (Fig. 1.9).

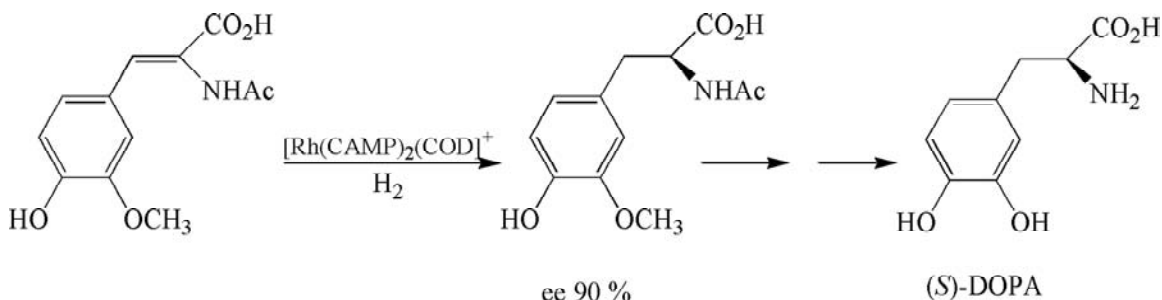


Figure 1.9 : Etapes de la synthèse du (S)-DOPA.

Ce système fut par la suite optimisé en remplaçant le complexe catalytique $[\text{RhCl}(\text{CAMP})_3]$ par le complexe $[\text{Rh}(\text{CAMP})_2(\text{COD})]$. Le CAMP fut finalement remplacé par le DIPAMP (Fig. 1.10).

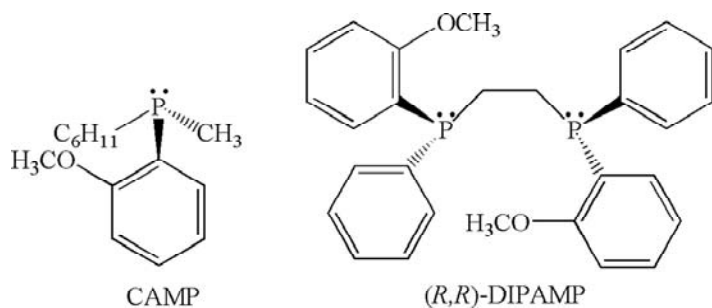


Figure 1.10 : Formules du CAMP et du DIPAMP.

En même temps que Knowles mettait au point le CAMP, H.B. Kagan créa le (R,R)-DIOP (Fig. 1.11). Ce ligand a donné naissance à une nouvelle génération de catalyseurs où la chiralité n'est pas portée par les groupements phosphine, mais par le squelette carboné du complexe. Ce type de complexe permet d'obtenir des résultats voisins de ceux du CAMP pour les mêmes catalyses que Knowles.

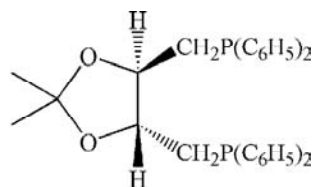


Figure 1.11 : Formule du (R,R) -DIOP de Kagan.

En 1974, Noyori et Takaya créent un ligand portant une chiralité axiale : le BINAP. Lorsqu'il est complexé au rhodium, le BINAP permet l'hydrogénation catalytique des oléfines (alcènes) (Fig. 1.12). L'application la plus remarquable du BINAP en catalyse industrielle est un pas de synthèse dans la fabrication du (-)-menthol⁶.

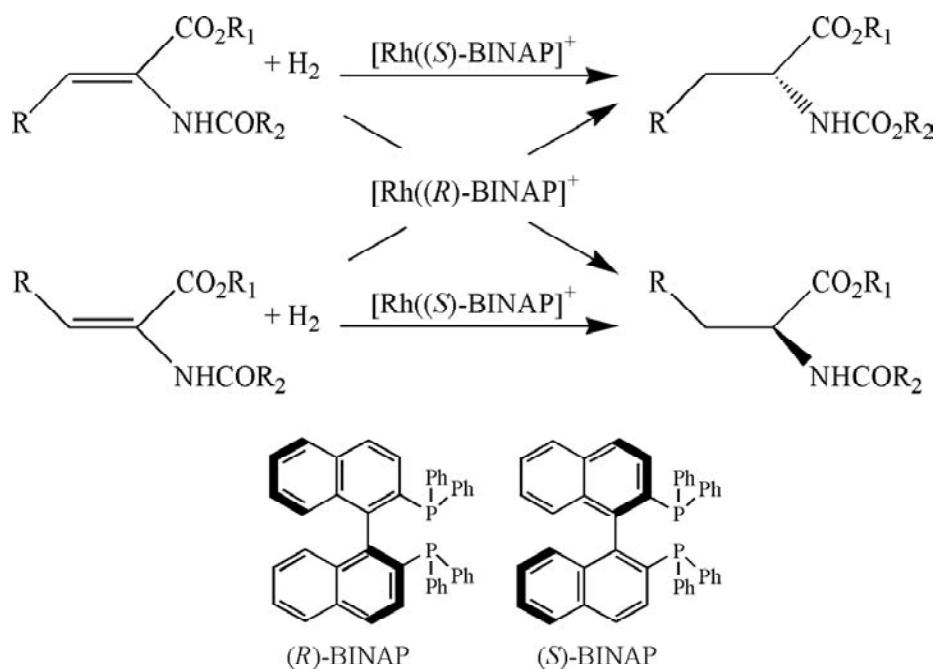


Figure 1.12 : Hydrogénation catalytique de l'acide α -(acylamino)acrylique par le BINAP complexé au ruthénium.

En 1995, Noyori met au point l'hydrogénation asymétrique et stéréosélective des groupements cétone en couplant le BINAP, le ruthénium et une diamine (Fig. 1.13)⁸.

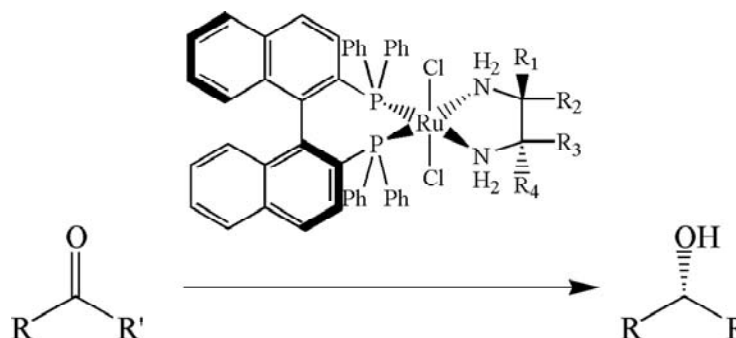


Figure 1.13 : Hydrogénation asymétrique de cétones par le complexe BINAP / diamine de Noyori.

De son côté, Sharpless s'est d'abord intéressé à l'époxydation d'alcools allyliques à partir de dérivés de l'acide tartrique en présence de tétraisopropoxyde de titane ($\text{Ti}(\text{OiPr}_4)$) et d'hydroperoxyde de tertio-butyle ($t\text{-BuOOH}$). Par cette méthode, il est parvenu à obtenir différentes formes d'époxydes du géranol ((*E*)-3,7-diméthyl-2,6-octadiène-1-ol) (Fig. 1.14)^{7,9}.

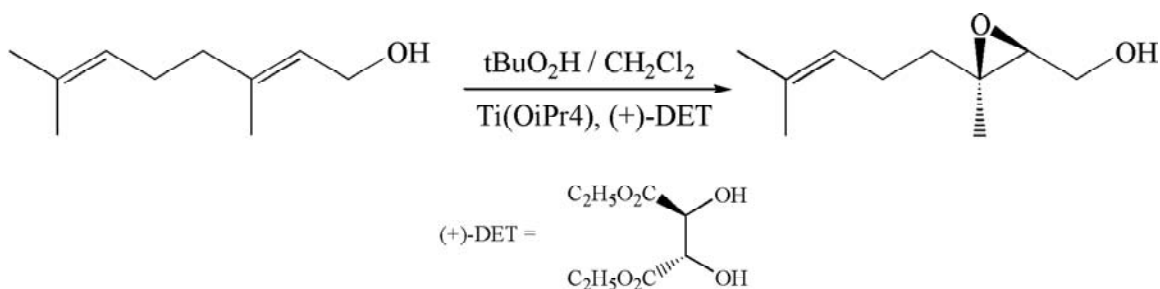


Figure 1.14 : Epoxydation asymétrique du géranol effectuée par Sharpless.

L'époxydation de Sharpless a notamment permis de mettre en œuvre la synthèse industrielle de la (+)-disparlure ((*R,S*)-7,8-époxy-2-méthyl octadécane), une phéromone du bombyx disparate utilisée comme pesticide (Fig. 1.15)¹⁰.

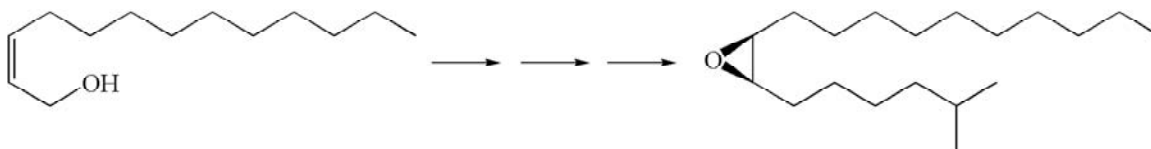


Figure 1.15 : Synthèse de la (+)-disparlure par époxydation catalytique d'un alcool allylique.

Sharpless a par ailleurs développé des réactions de dihydroxylation et d'hydroxyamination asymétriques d'oléfinés à partir de dérivés de la quinine ou de la quinidine

(Fig. 1.16)⁹. Les molécules obtenues avec les systèmes (DHQD)₂PHAL et (DHQ)₂PHAL notamment les aminoalcools ont un intérêt thérapeutique. Certains d'entre eux sont en effet, utilisés dans le traitement de maladies cardiovasculaires ou comme immunodépresseurs⁹.

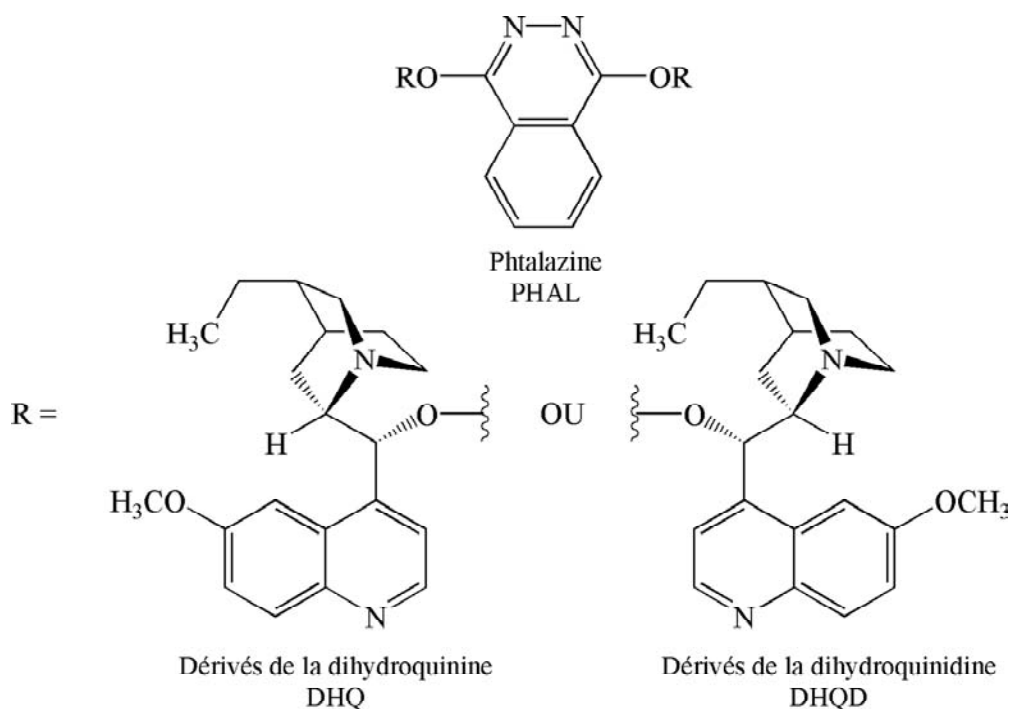


Figure 1.16 : Dérivés chiraux de la quinine et de la quinidine.

La catalyse asymétrique a plusieurs applications dans l'industrie, mais elles restent peu nombreuses à cause des contraintes qu'elle implique. L'obtention à grande échelle de catalyseurs énantiomériquement purs (99 % ee pour les composés pharmaceutiques et 80 % pour l'industrie agroalimentaire) n'est pas triviale et s'avère très coûteuse (de 5 000 à 20 000 USD / kg). Néanmoins, il s'agit d'un secteur en plein développement grâce aux progrès de la chimie combinatoire (chimie se focalisant sur le criblage des différents paramètres d'une réaction comme la nature du métal, la nature du ligand, la nature du solvant, la température, la pression

etc.)¹¹. Cette forme de chimie est devenue indispensable pour l'obtention de systèmes catalytiques efficaces.

2.3. CATALYSE ENZYMATIQUE

2.3.1 Généralités

De nombreux composés chimiques chiraux ou non peuvent être obtenus par réaction enzymatique à l'échelle industrielle (Fig. 1.17)¹².

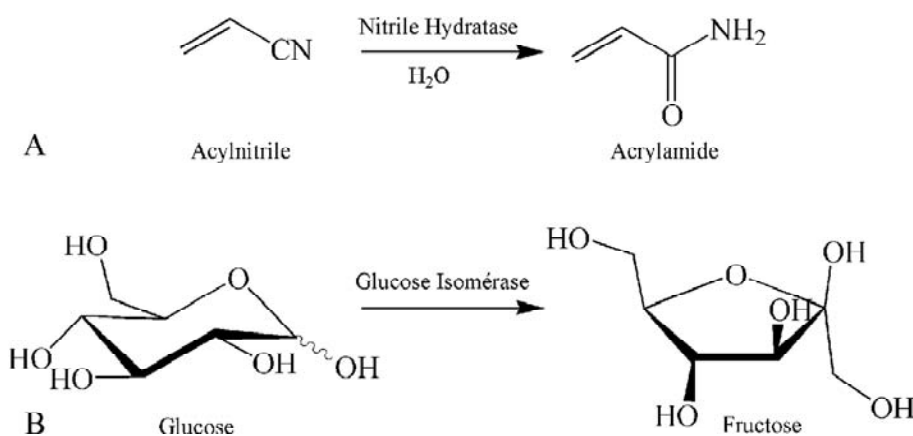


Figure 1.17 : Exemples de catalyses enzymatiques industrielles. **A.** Synthèse de l'acrylamide en partant de l'acrylonitrile. **B.** Isomérisation du glucose en fructose.

De part la haute sélectivité des enzymes, elles constituent un matériel de choix pour la catalyse asymétrique. L'application la plus fréquemment utilisée est la résolution cinétique d'un mélange racémique. La production d'amines chirales ou d'acides carboxyliques chiraux par les lipases est l'un des exemples les plus notables de ce type de catalyse (Fig. 1.5 et 1.18)¹².

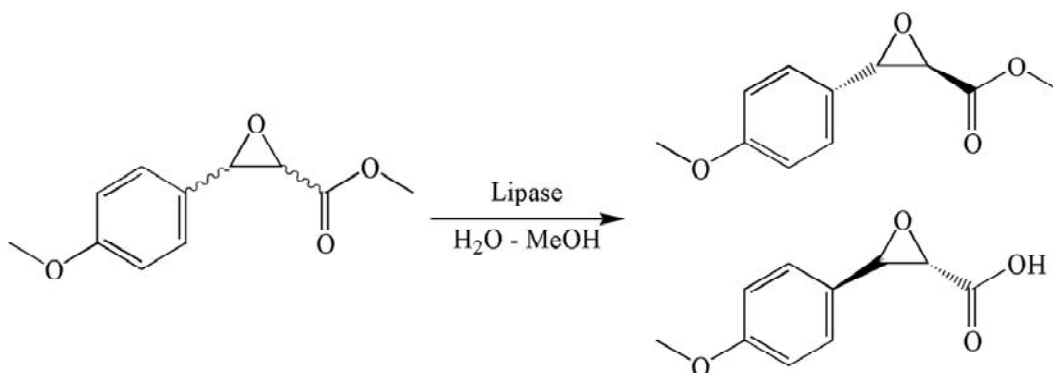


Figure 1.18 : Obtention du *trans*-(2*R*,3*S*)-*p*-méthoxyphénylgycidate par une lipase.

Toutefois, ce type de réaction ne permet d'obtenir que 50 % de rendement au maximum, aussi, a-t-il fallu développer des systèmes de racémisation *in situ* (Fig.1.19)¹³.

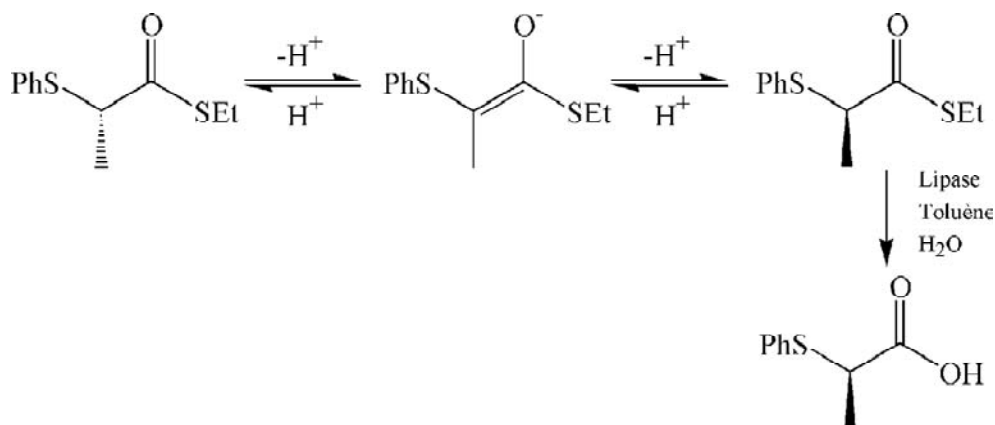


Figure 1.19 : Obtention de l' α -(phénylthio)propionate par la racémisation de ses précurseurs couplée à une catalyse par une lipase.

Dans les années 80, une nouvelle approche de la catalyse enzymatique a pris un certain essor : l'utilisation de microorganismes comme catalyseurs (Fig. 1.20)¹⁴. Un des avantages de la catalyse par les microorganismes est qu'ils ne nécessitent pas d'utilisation d'hydrogène gazeux.

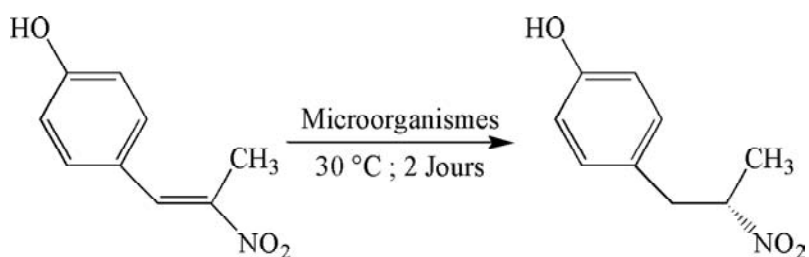


Figure 1.20 : Hydrogénation catalytique du 1-(4-hydroxyphényl)2-2-nitropropène.

Ce type de catalyses peut être couplé avec des réactions enzymatiques. C'est notamment le cas de la synthèse industrielle de la vanilline (Fig. 1.21) dont la production naturelle par l'orchidée *Vanilla planifolia* n'est pas suffisante face aux besoins mondiaux (respectivement 20 t/an contre 1 200 t/an)¹⁵.

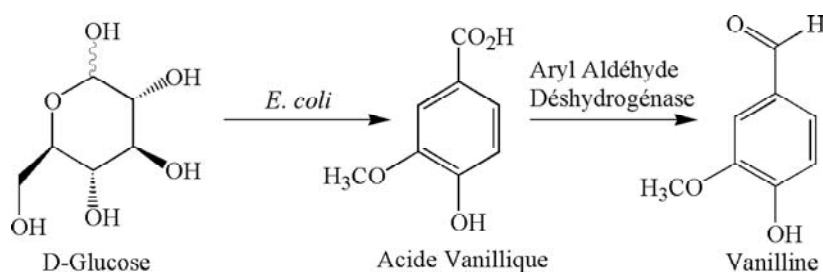


Figure 1.21 : Synthèse de la vanilline en partant du glucose en couplant une réaction catalysée par un microorganisme et une réaction enzymatique.

Les catalyses d'hydrogénation font en général intervenir des co-facteurs tels que le NADH ou le NADPH qui se retrouvent sous forme oxydée à la fin de la réaction. Il est donc nécessaire de réduire ces co-facteurs. L'enzyme elle-même peut dans certain cas, assurer ce recyclage (alcool déshydrogénase), mais il est parfois nécessaire d'utiliser une enzyme supplémentaire (Fig. 1.22)¹⁶.

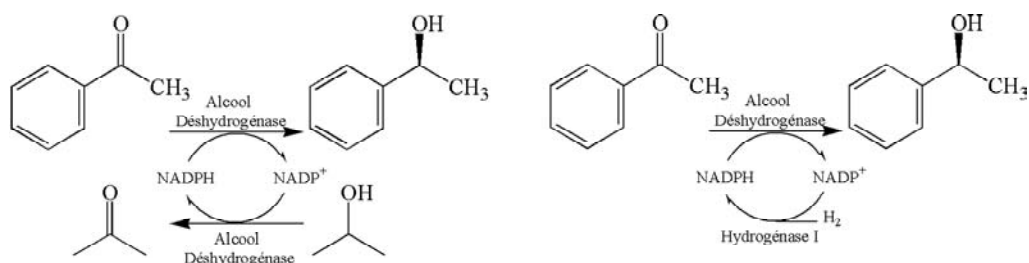


Figure 1.22 : Exemples de recyclage de cofacteurs enzymatiques. **A.** Par couplage avec un substrat. **B.** Par couplage avec une enzyme.

La faible solubilité de composés hydrophobes utilisés comme substrats en milieu aqueux peut également poser problème. Dans certains cas, l'utilisation de cyclodextrines permet solubiliser ces composés (Fig. 1.23)¹⁷.

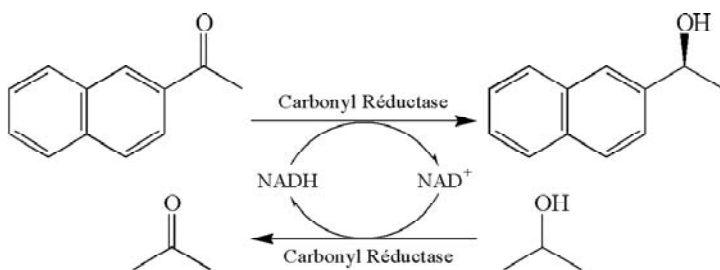


Figure 1.23 : Exemple de réaction nécessitant l'utilisation de cyclodextrine pour solubiliser le réactif et le produit de la catalyse : la synthèse du (*S*)-1-(2-naphthyl)-éthanol.

Malgré tous les systèmes mis au point, plusieurs problèmes subsistent. Bon nombre d'enzymes sont en effet, peu sélectives pour certains substrats, dans certains cas, la catalyse est stoppée par un excès de produit de la réaction. De même, l'utilisation de microorganismes est assez limitée, eu égard à la métabolisation de certains substrats ou des produits de la réaction¹⁸. L'évolution dirigée des catalyseurs protéiques apparaît comme une bonne solution à ces problèmes.

2.3.2. Evolution dirigée des enzymes

L'approche combinatoire nécessaire à l'obtention de systèmes catalytiques efficaces a naturellement amené à l'obtention de bibliothèques d'enzymes mutantes. Plusieurs techniques basées sur la PCR permettent d'obtenir cette diversité.

La première d'entre elles est la PCR aléatoire (error prone PCR). Il s'agit d'amplifier un gène en induisant des erreurs de polymérisation. Pour y parvenir, on peut varier la concentration de magnésium du milieu réactionnel, ajouter des sels de manganèse ou utiliser un excès (d'un facteur 10 à 1 000) de tel ou tel désoxyribonucléotide¹⁹ ou utiliser une polymérase peu fiable²⁰. Une variante consiste à muter un gène par des bactéries de type « mutator »²¹.

La PCR aléatoire peut être complétée par la mutagenèse de saturation (insertion de un ou plusieurs codons dégénérés, afin de remplacer l'acide aminé ciblé par les 19 autres) de résidus « chauds » (hot-spots)²¹⁻²³.

En 1994, Stemmer ajoute encore de la diversité en créant le DNA-Shuffling (brassage moléculaire), une technique dérivée de la PCR aléatoire. Son idée est de digérer une bibliothèque de gène ayant subi une mutagenèse aléatoire, par la DNaseI de manière à générer des fragments de 10 à 50 pb. Ces fragments sont ensuite soumis à une PCR sans amorce, où ils s'hybrident entre eux pour recréer le gène initial portant diverses mutations. Les gènes sont alors réamplifiés et clonés. Cette technique lui a permis d'obtenir toute une bibliothèque de β -galactosidase. Mieux encore, en appliquant sa technique sur un mélange de gènes humain et murin de l'interleukine-1 β , il parvint à obtenir des IL-1 β chimériques²⁴.

En 1998, il applique cette même technique sur le gène de la céphalosporinase de 4 espèces différentes de microorganismes (Fig. 1.24). Plusieurs clones obtenus induisent une

résistance accrue de *E. coli* au moxalactame (un antibiotique), deux d'entre eux ont acquis une résistance à plusieurs autres antibiotiques de type β -lactame²⁵.

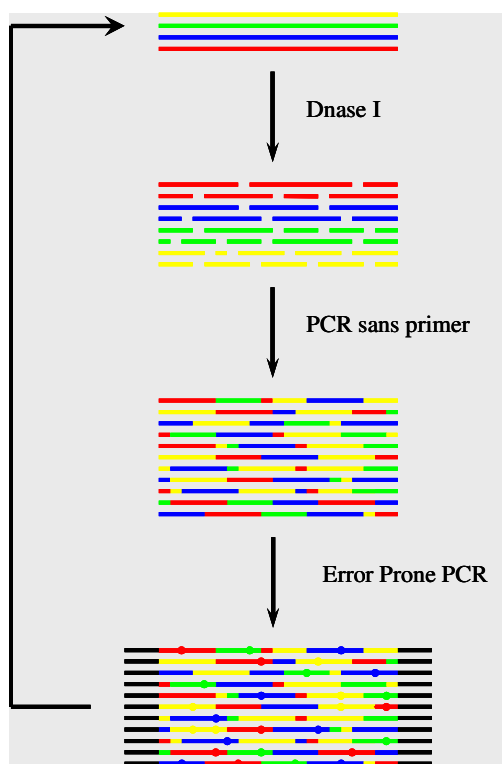


Figure 1.24 : Stratégie utilisée par Stemmer pour obtenir les chimères de céphalosporidases.

L'évolution dirigée est basée sur le hasard et nécessite un criblage soit de sélection (résistance à un antibiotique, utilisation de microorganismes auxotrophes)²⁵⁻²⁷, soit un criblage d'activité enzymatique à haut débit²⁸. Pour limiter le nombre de résultats négatifs, un certain nombre d'approches rationnelles ont été développées. La modélisation par ordinateur permet désormais de prédire quelles recombinaisons peuvent survenir durant une expérience de DNA-shuffling²⁹ ou de prédire quel résidu il est préférable de muter plutôt qu'un autre³⁰. De même, l'étude de la structure de la protéine permet de déterminer les zones impliquées dans la catalyse et d'y insérer des mutations plus ciblées³¹. L'utilisation de cassettes d'ADN artificielles portant un ou plusieurs codons dégénérés (CMCM : « Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis ») dans une expérience de DNA-shuffling permet ce genre de ciblage³².

D'autres formes d'évolutions peuvent également être envisagées comme l'incorporation d'acides aminés non naturels. Cela nécessite de modifier un ARN de transfert (ARNt) par une succession de modifications chimiques et enzymatiques et l'utilisation d'un système de traduction *in vitro*, rendant cette approche coûteuse et difficile à mettre en œuvre³³. Une seconde approche consiste à cultiver des bactéries auxotrophes dans un milieu minimal où un acide aminé est remplacé par un homologue³⁴.

La modification chimique des acides aminés apparaît comme une autre possibilité d'évolution dirigée³⁵. Un certain nombre de systèmes ont été décrits, mais des problèmes surgissent au niveau de l'homogénéité des modifications et de l'adaptabilité des techniques de chimie organique aux protéines. Seul l'accrochage de catalyseurs chimiques à une protéine semble donner des résultats intéressants. Cet aspect sera développé dans le paragraphe suivant.

Quels sont les apports de l'évolution dirigée sur la catalyse enzymatique ? Les résultats obtenus sont assez divers. En 1997, Stemmer réussit à obtenir une activité fucosidase en partant du gène *lacZ* d'*E. coli* (codant pour la β -galactosidase) après 7 cycles de DNA-shuffling ayant généré 13 mutations³⁶.

En 1998, Kagamiyama change la spécificité de l'aspartate aminotransférase. En effet, après 5 cycles de DNA-shuffling et 13 mutations apportées au gène, l'enzyme obtenue ne reconnaît plus son substrat naturel (l'aspartate), mais la valine et dans une moindre mesure, l'isoleucine^{26,27}.

En 2001, Arnolds parvient à accroître l'activité et à inverser l'énantiosélectivité de l'hydantoïnase d'*E. coli* (enzyme catalysant la synthèse de la L-méthionine). L'enzyme obtenue permet la production de D-méthionine, cette inversion de chiralité est induite par une seule mutation²².

Un autre exemple d'évolution de l'énantiosélectivité d'une enzyme, est celui de la lipase de *Pseudomonas aeruginosa* de Retz. En exploitant l'expression extracellulaire de la protéine par *P. aeruginosa* (cultivées en microplaques), il a mis en place un criblage à haut débit par analyse du milieu de culture par plaque ELISA (Fig. 1.25)^{23,28,31,32,37,38}.

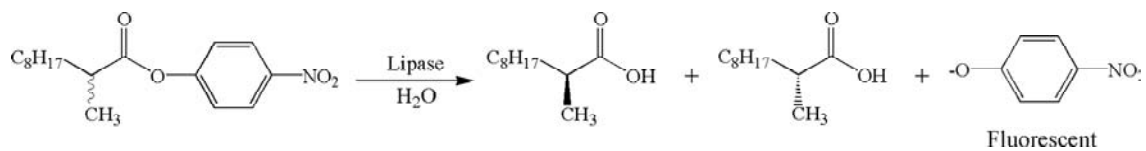


Figure 1.25 : Réaction catalysée par la lipase de Retz.

Le gène de l'enzyme a été soumis à de multiples expériences d'évolution dirigée. En partant de la protéine wild-type dont le facteur E est de 1,1 en faveur de la forme (S) (voire § 2.1), il parvient à un variant dont cette valeur E est supérieur à 51 en faveur de la forme (S) (Fig. 1.26 d'après³¹) et à un second avec $E = 30$ en faveur de la forme (R).

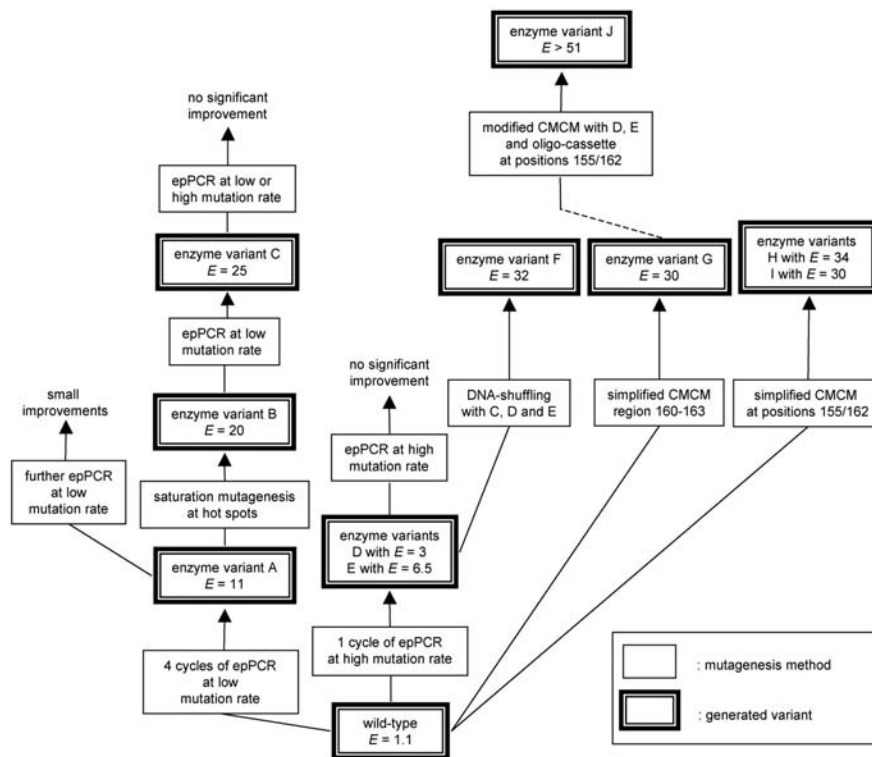


Figure 1.26 : Etapes et résultats de l'évolution dirigée de la lipase de Retz.

2.4. CATALYSE PAR MÉTALLOENZYMES ARTIFICIELLES

2.4.1. Avantages des métalloenzymes artificielles

La catalyse homogène et la catalyse enzymatique présentent chacune des avantages et des inconvénients. Le tableau 1.1 présente les caractéristiques de ces deux systèmes.

Paramètres	Catalyse homogène	Catalyse enzymatique
Variété de substrats	Grande	Limitée
Enantiomères	2 énantiomères obtenus	1 seul
Tolérance pour les groupements fonctionnels	Faible	Grande
Répertoire de réactions	Grand	Faible
Nombre de cycles catalytiques	Faible	Elevé
Compatibilité avec les solvants organiques	Grande	Faible (eau)
Optimisation possible	Chimique	Génétique
Seconde sphère de coordination	Mal définie	Bien définie

Tableau 1.1 : Différences entre la catalyse homogène et la catalyse enzymatique.

Il apparaît que ces deux formes de catalyse sont complémentaires. Leurs propriétés peuvent être cumulées en générant des métalloenzymes artificielles. Le répertoire des réactions et la diversité des substrats propres à la catalyse homogène, est ainsi élargie par rapport à une catalyse enzymatique classique. De même, la partie protéique apporte une seconde sphère de coordination du métal bien définie, par contre, elle limite le solvant utilisé à l'eau.

C'est Kaiser qui le premier greffa une flavine sur la papaïne pour lui donner une activité oxydoréductase³⁹⁻⁴¹. De ses travaux découlent un grand nombre de systèmes catalytiques d'encrage de coenzymes et de catalyseurs chimiques dans des protéines de manière covalente et de manière supramoléculaire.

2.4.2. Incorporation covalente d'un catalyseur chimique à une protéine.

Un des moyens d'ancrer un catalyseur au sein d'une protéine de manière covalente est de le faire via une cystéine en formant un pont disulfure. Ce fut le cas avec la subtilisine, une

protéase. Les modifications ont permis de générer une ligase peptidique capable d'insérer des acides aminés de forme L, mais aussi de forme D sur un acide aminé estérifié (Fig. 1.27)⁴².

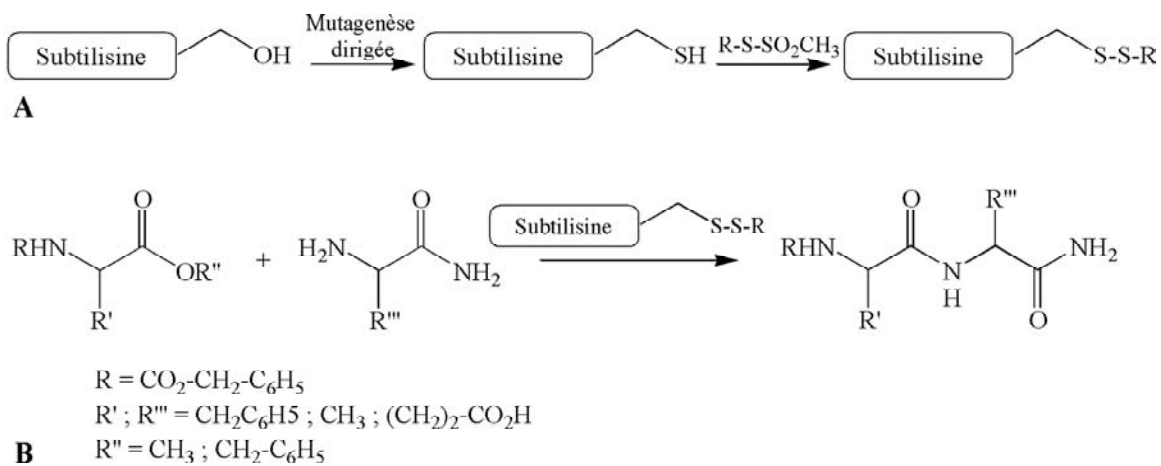


Figure 1.27 : Création d'une ligase peptidique à partir d'une protéase. **A.** Transformation de la subtilisine. **B.** Réaction catalysée.

Avec une démarche similaire, Distefano est parvenu à générer une activité transaminase en dérivatisant la IFABP (intestinal fatty acids binding protein) avec un analogue de la pyridoxamine (Fig. 1.28)⁴³.

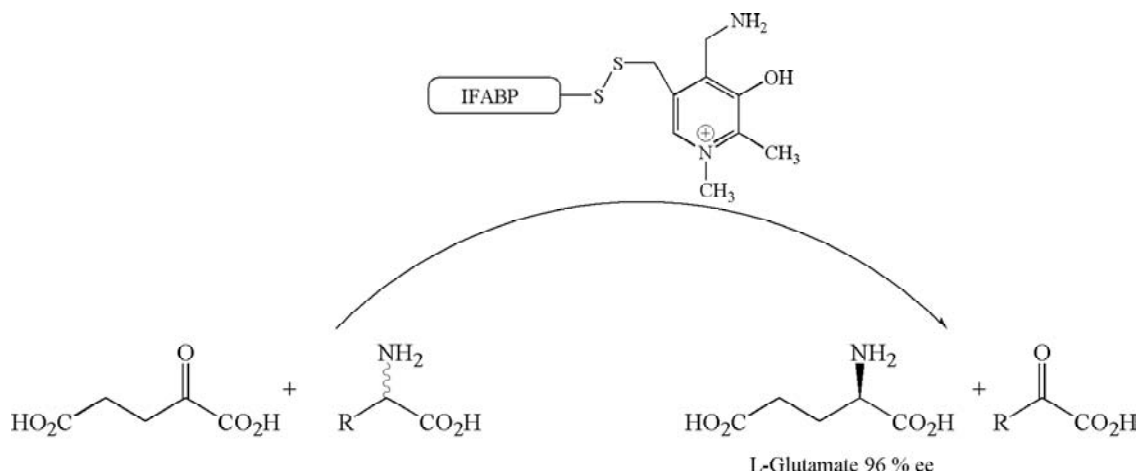


Figure 1.28 : Obtention du L-Glutamate par dérivatisation de l'IFABP par un dérivé de pyridoxamine.

Toujours dans le but d'optimiser sa lipase, Reetz a tenté d'obtenir un hybride entre la lipase et un ligand chimique³⁸.

2.4.3. Incorporation non covalente d'un catalyseur dans une protéine.

En 1978, Whitesides propose une approche supramoléculaire pour incorporer une entité catalytique dans une protéine. Il utilise pour cela le système avidine – biotine. L'idée est de dériver la biotine par un ligand diphosphine chélatant le rhodium (Fig. 1.29). En incorporant ce complexe dans l'avidine, il parvient à hydrogéner l'acide α -acétamidoacrylique avec un excès énantiomérique de 44 % pour la forme (S), alors qu'il n'obtient aucun excès énantiomérique hors de la protéine⁴⁴.

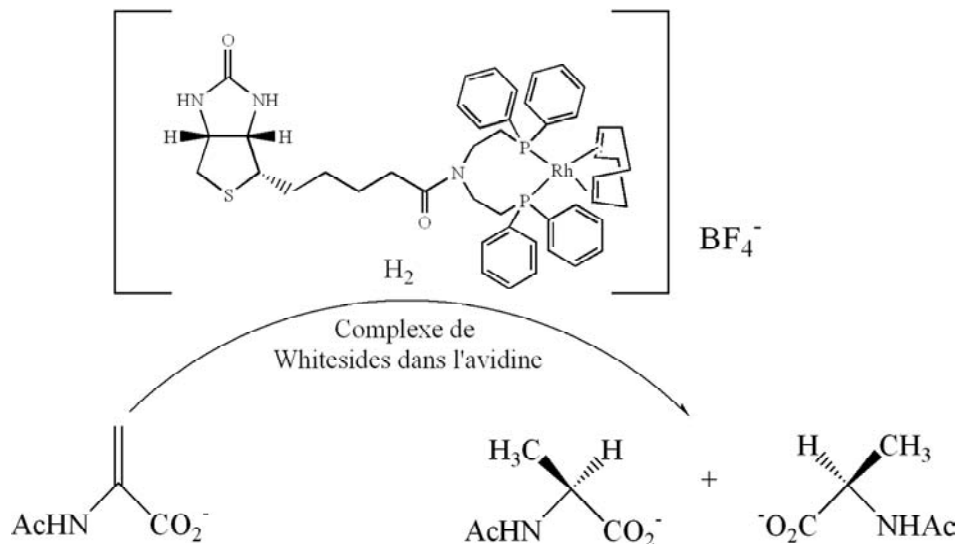


Figure 1.29 : Hydrogénation catalytique de l'acide α -acétamidoacrylique par un complexe de rhodium biotinylé inséré dans l'avidine.

Plus récemment, une étude a été menée par Chan sur l'hydrogénation de l'acide itaconique en introduisant un complexe chiral biotinylé chélatant le rhodium dans l'avidine (Fig. 1.30)⁴⁵.

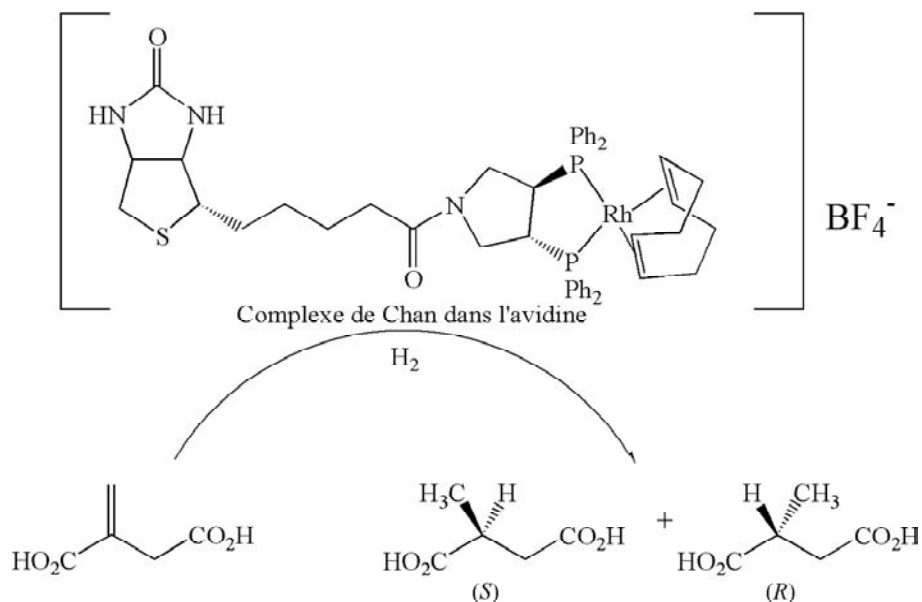


Figure 1.30 : Hydrogénation catalytique de l'acide itaconique par un complexe de rhodium biotinylé inséré dans l'avidine.

En 2003, Watanabe crée une enzyme artificielle en substituant l'hème de l'apomyoglobine par des complexes de type $[\text{Mn}(\text{salophène})]^+$ et $[\text{Cr}(\text{salophène})]^+$ (Fig. 1.31A). Le dérivé chromé permet la sulfoxydation du thioanisole avec de faibles excès énantiomériques⁴⁶. Ces travaux ont d'ailleurs été repris récemment par Yi Lu qui lui a inséré un catalyseur de type $[\text{Mn}(\text{Salène})]$ de manière covalente via des ponts disulfure au sein de l'apomyoglobine mutée (Fig. 1.31B)⁴⁷.

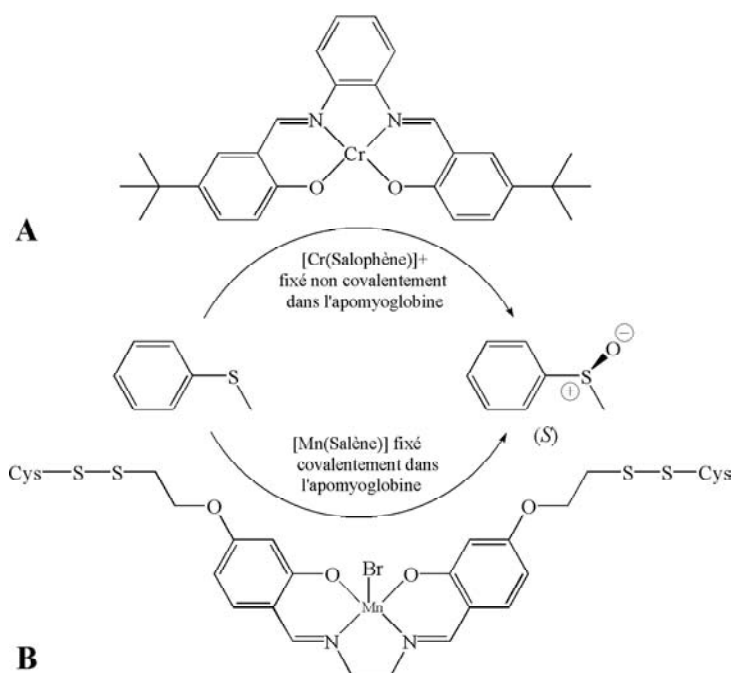
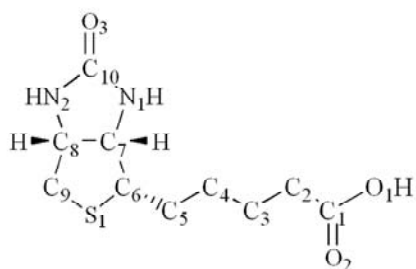


Figure 1.31 : Sulfoxydation du thioanisole à partir de complexes catalytiques insérés à l'intérieur de l'apomyoglobine. **A.** Complexe de Chrome de Watanabe. **B.** Complexe de manganèse de Yi Lu.

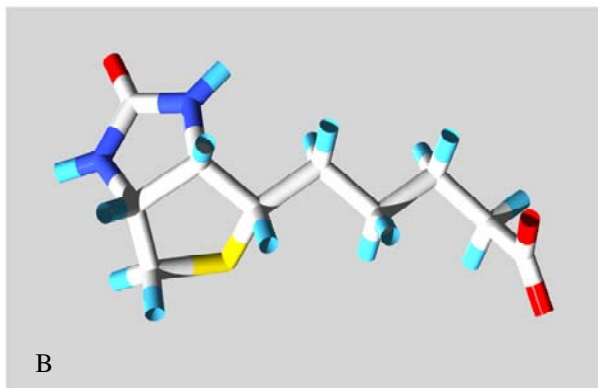
3. LE SYSTÈME (STREPT)AVIDINE / BIOTINE

3.1. LA BIOTINE

La biotine est la vitamine H ou B8, sa masse molaire est de 244 Da⁴⁸. Il s'agit d'une molécule bicyclique. Le premier cycle est un cycle tétrahydrothiophène, le second est un cycle imidazolidone (uréidique). Sur le premier cycle est greffé un acide valérique (Fig. 1.32A numérotation d'après ⁴⁹). Elle présente trois centres de chiralité qui induisent une conformation spatiale *cis* entre les deux cycles et entre le cycle uréidique et l'acide valérique (Fig. 1.32B).



A



B

Figure 1.32 : Structure de la biotine. **A.** Formule développée et numérotation des atomes. **B.** Structure tridimensionnelle.

La biotine est un coenzyme impliqué dans le métabolisme des acides gras insaturés, des acides aminés (synthèse de l'aspartate) et des sucres. Son rôle consiste à transférer un groupement carbonyle d'une molécule à une autre⁵⁰⁻⁵². Elle est notamment le cofacteur de la pyruvate carboxylase. D'une manière générale, ces enzymes sont constituées de 3 domaines : un domaine biotine-carboxylase, un domaine transcarboxylase et un domaine biotinyll où la biotine est fixée par son groupement carbonyle à une lysine⁵³. Trois types de réactions peuvent être catalysés en présence de biotine (Fig. 1.33).

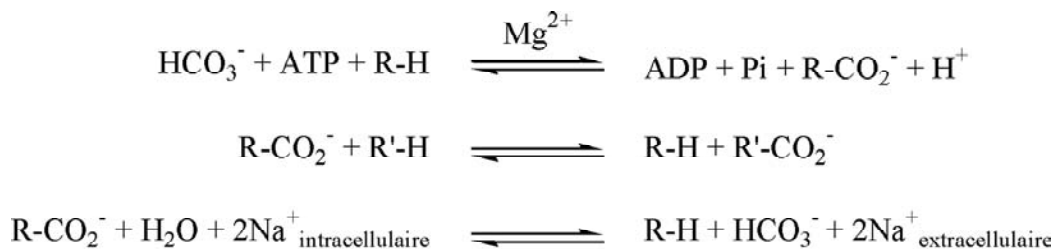


Figure 1.33 : Réactions catalysées en présence de biotine.

Les mécanismes de (trans)carboxylation sont mal connus et plusieurs systèmes sont proposés. Toutefois elles passent toutes par un intermédiaire (Biotine)-N₂-CO₂⁻ (Fig. 1.34).

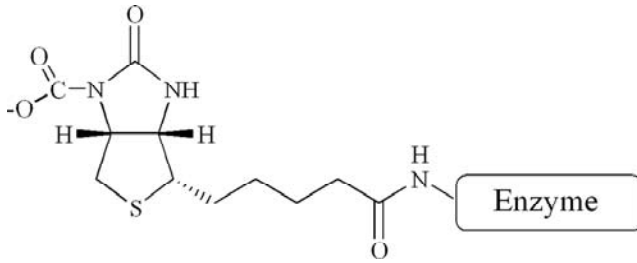


Figure 1.33 : Complexe biotine – carboxylate

Un autre rôle lui a récemment été attribué : régulateur de l'expression de gènes, notamment d'oncogènes⁵⁴.

La biosynthèse de la biotine est assurée par les microorganismes (où elle est régulée par l'opéron biotine) et les plantes en partant de l'acide pimélique (Fig.1.35)^{53,55-57}. L'apport de biotine chez les mammifères est assuré par l'alimentation. Elle est notamment présente dans les levures, les œufs, la volaille, le foie, le saumon, les champignons, bon nombre de céréales, le chou-fleur, les noisettes et le chocolat. On recense peu de cas de carences en biotine chez l'homme. Elles sont généralement dues à une trop grande consommation d'œufs. En effet, l'œuf contient de l'avidine, une protéine qui fixe la biotine avec une affinité très forte ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$)⁵⁸.

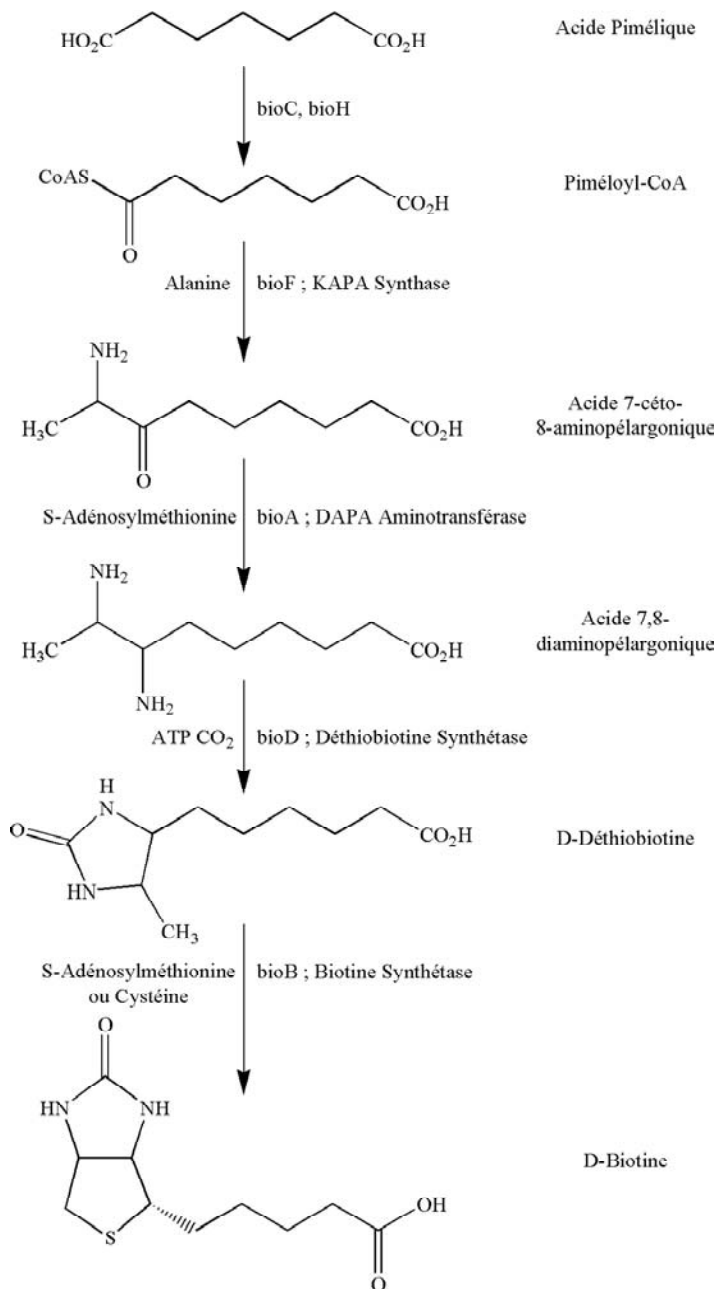


Figure 1.35 : Biosynthèse de la biotine chez les microorganismes.

Cette très forte affinité entre la biotine et l'avidine ou son homologue bactérien, la streptavidine ($K_a \sim 10^{13} \text{ M}^{-1}$) est considérée comme l'affinité protéine – ligand naturelle la plus forte (Tableau 1.2)⁵⁹. Par ailleurs, cette affinité ne baisse pas de manière significative lorsque la fonction carbonyle de la biotine est dérivatisée. De ce fait, toute une ingénierie s'est développée autour du système (strept)avidine – biotine depuis une trentaine d'années⁶⁰.

Système	Constante d'affinité (Ka ; M ⁻¹)
Avidine - Biotine	1,7 10 ¹⁵
Streptavidine - Biotine	2,5 10 ¹³
Protéase - Inhibiteur	10 ¹⁰ - 10 ¹³
Récepteur - Ligand	10 ⁹ - 10 ¹²
Anticorps - Antigène	10 ⁷ - 10 ¹¹
Lectine - Sucre	10 ³ - 10 ⁶
Enzyme - Substrat	10 ³ - 10 ⁵

Tableau 1.2 : Constantes d'affinité de complexes Protéines – Ligands présents dans la nature.

D'où vient une telle affinité ? Quelles sont les applications d'un tel système ? Pour répondre à ces questions, intéressons nous tout d'abord à l'avidine et à la streptavidine.

3.2. GÉNÉRALITÉS SUR L'AVIDINE ET LA STREPTAVIDINE

3.2.1. L'avidine

Découverte en 1927 et isolée en 1941, l'avidine est une glycoprotéine homotétramérique d'environ 62 400 Da présente dans le blanc d'œuf et l'oviducte des oiseaux, des reptiles et des amphibiens, mais totalement absente chez les mammifères. Chaque monomère peut fixer une molécule de biotine. La synthèse de l'avidine est stimulée par les oestrogènes et la progestérone. Elle appartient à la famille des « biotin-binding proteins » et à la superfamille structurale des calcines (avec les lipocaïnes et les « fatty acids binding proteins »)^{58,61}.

De nombreuses études ont été menées sur les propriétés de l'avidine de l'œuf de la poule (0,05 % de la masse totale de protéine de l'œuf)⁵⁸. Plus récemment, les isoformes présentes dans l'œuf d'autres oiseaux ont été caractérisées⁶².

Il s'agit d'une protéine sécrétée de 4 x 128 acides aminés riche en résidus lysine et arginine qui lui confèrent un point isoélectrique élevé (10,4) et la propriété de fixer non

spécifiquement l'ADN et certaines cellules^{58,61,63,64}. Par ailleurs, elle porte un pont disulfure intramonomère entre les deux seuls résidus cystéine de la séquence (C₄-C₈₃).

L'analyse du génome de la poule a montré que le gène de l'avidine est unique⁶⁵, toutefois, il est situé dans une région où se trouvent 7 gènes codants pour des protéines très proches d'elle (94 à 100 % d'homologie). Ces protéines sont appelées AVR (« Avidin-Related proteins »). Certains types d'infections bactériennes provoquent la biosynthèse de leurs ARNm, mais aucun d'entre eux n'est traduit en protéine⁶⁶. Le rôle de ces gènes n'est pas connu, mais la production des protéines pour lesquelles ils codent dans un système hétérologue a permis de mettre en évidence un variant capable de fixer la biotine avec une affinité de 10¹⁴ M⁻¹. D'autres ont des points isoélectriques plus faibles que l'avidine, des formes de glycosylation différentes ou des ponts disulfures intermonomères^{67,68}.

L'analyse de la séquence de l'ADNc de l'avidine a montré qu'elle est produite sous forme d'un précurseur constitué d'un peptide signal clivé lors de la maturation de la protéine. Ce peptide précède la séquence de la protéine à proprement parler⁶⁵.

La glycosylation de l'avidine est de type N-glycosylation portée par l'asparagine 17. La chaîne saccharidique est constituée de 4 à 5 résidus mannose et de trois résidus N-glucosamine et représente environ 10 % de la masse molaire de la protéine. Son rôle est assez mal connu, mais elle n'intervient pas dans l'interaction avidine – biotine^{58,64,69}.

L'avidine est soluble à 50 mg/mL à pH neutre. Elle reste stable à des températures élevées (85 °C en absence de biotine, 132 °C avec la biotine), à des pH allant de 2 à 13, en présence d'agents chaotropiques ou dans le chlorure de guanidium jusqu'à une concentration de 3 M. Elle est peu sensible à la protéase K et devient pratiquement insensible en présence de biotine. En cas de dénaturation, elle peut être renaturée en présence de biotine^{58,64}.

De par sa haute affinité pour la biotine ($K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$), elle est un inhibiteur irréversible des enzymes biotinyllées. Cette propriété laisse à penser que l'avidine est un antibiotique. La présence de nombreuses protéines antibactériennes dans l'œuf (lysozyme, « flavin-binding protein », conalbumine) semble conforter cette hypothèse⁵⁸.

3.2.2. La streptavidine

La streptavidine est l'équivalent bactérien de l'avidine, elle est produite naturellement par *Streptomyces avidinii*. Comme cette dernière, il s'agit d'une protéine homotétramérique, sécrétée, capable de fixer 4 molécules de biotine avec une affinité de 10^{13} M^{-1} ⁵⁹. Sa séquence protéique présente 30 % d'identité (41 % d'homologie) avec celle de l'avidine (Fig. 1.36 d'après⁶⁰). 6 zones présentent une identité de 64 % (74 % d'homologie). Ces zones correspondent la majorité du temps aux motifs structuraux conservés entre les deux protéines (voir § 3.3). Sur le reste de la séquence, on ne note que 7 % d'identité et 17 % d'homologie⁷⁰.

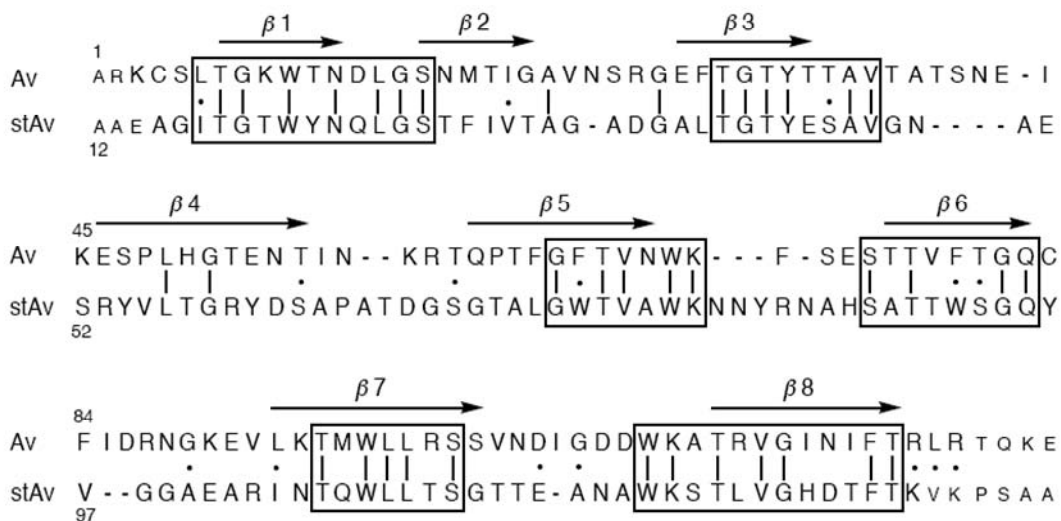


Figure 1.36 : Alignement des séquences protéiques de l'avidine (Av) et de la streptavidine (stAV). Les séquences hautement homologues sont encadrées, les résidus communs aux deux séquences sont signalés par un trait, les résidus homologues sont signalés par un point.

La masse molaire de la streptavidine est d'environ 60 000 Da et son point isoélectrique est de 6,4. Contrairement à l'avidine, elle n'est pas glycosylée et ne possède pas de pont disulfure^{59,71,72}.

Le gène de la streptavidine a été cloné et séquencé en 1986. La séquence protéique correspondante est constituée d'un peptide signal de 24 acides aminés clivé lors de sa sécrétion, suivi d'une séquence de 159 résidus appelée « mature streptavidin »⁷³. Le peptide signal porte les signaux d'adressage de sécrétion, mais il inhibe également la fixation de la biotine⁷⁴. Une fois sécrétée, la protéine est clivée en N et C terminal pour générer des « cores streptavidin » dont la longueur n'est pas homogène (de 125 à 127 acides aminés)⁷³. Le propeptide C terminal clivé dans les « cores » diminue l'accessibilité du site actif de fixation de la biotine par effet stérique et contribue à l'oligotétramérisation de la protéine^{74,75}.

Comme l'avidine, la streptavidine est relativement stable dans des conditions drastiques (hautes températures, pH extrêmes, chlorure de guanidium). La présence de biotine renforce également sa stabilité⁷⁶. De même, son rôle physiologique supposé est celui d'antibiotique⁷².

3.3. STRUCTURE DE L'AVIDINE ET DE LA STREPTAVIDINE

D'un point de vue structural, l'avidine et la streptavidine sont assez similaires. Ce sont des homotétramères organisés en dimères de dimères selon une symétrie 222 (Fig. 1.37 ; numérotation des monomères d'après ⁷⁰). Chaque sous-unité est constituée de 8 brins β antiparallèles avec une torsion hélicoïdale de type main droite, reliés entre eux par des boucles. La forme générale des monomères est celle d'un « tonneau β » (β -barrel) dont la cavité est hydrophobe^{70,77-82}.

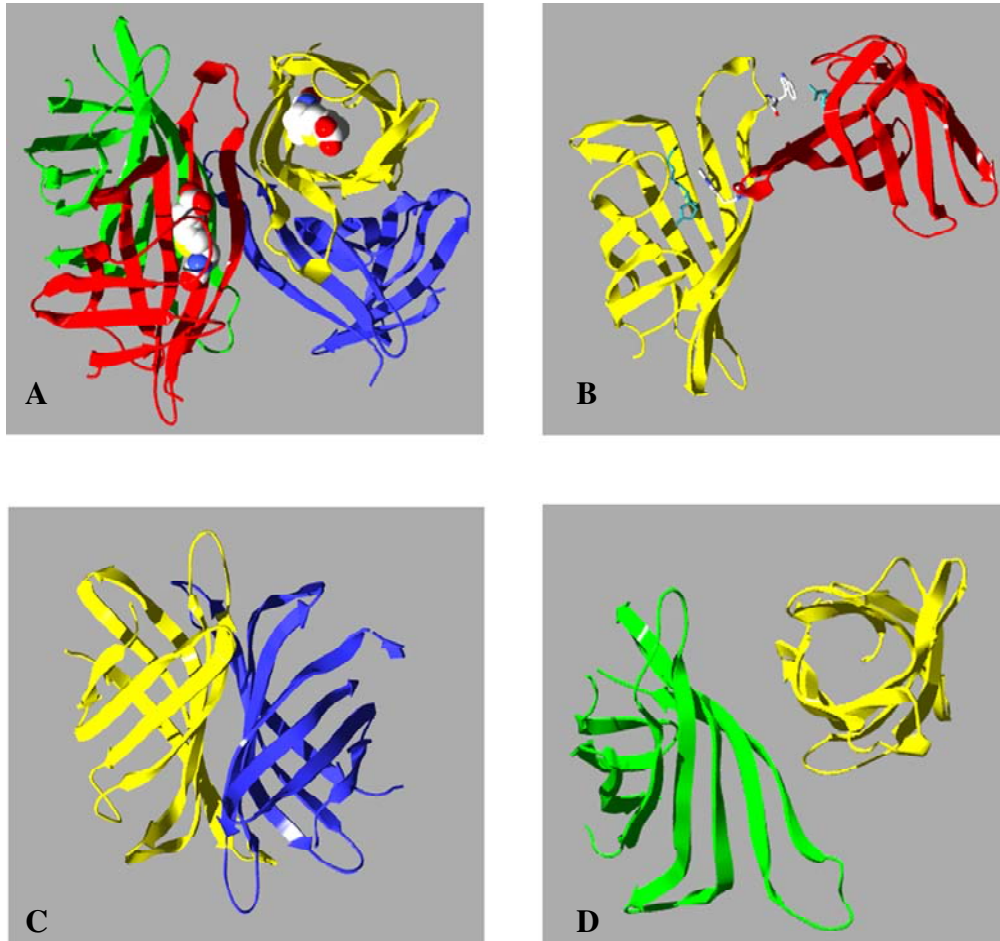


Figure 1.37 : Structure de la streptavidine. **A.** Tétramère en présence de biotine. **B.** Interaction monomère – monomère 1-2. **C.** Interaction monomère – monomère 1-4. **D.** Interaction monomère – monomère 1-3.

Il n'y a pas réellement de différences entre le monomère d'avidine et celui de la streptavidine si ce n'est l'agencement des boucles reliant les brins β (Fig.1.38). Les dimensions du tétramère de l'avidine sont $56 \times 50 \times 40 \text{ \AA}^{80}$ et celles du tétramère de la streptavidine sont de $54 \times 58 \times 48 \text{ \AA}^{82}$. Bon nombre d'interactions polaires ou de type Van der Waals stabilisent les interactions monomère – monomère^{70,83,84}. Toutefois, la mutation du résidu tryptophane 110 de l'avidine (120 pour la streptavidine) est capable d'inhiber l'interaction 1-2 (Fig. 1.37B) de manière à ne générer que des dimères de type 1-4 (Fig. 1.37C). Par ailleurs, ce résidu intervient dans l'interaction (strept)avidine – biotine⁸⁵.

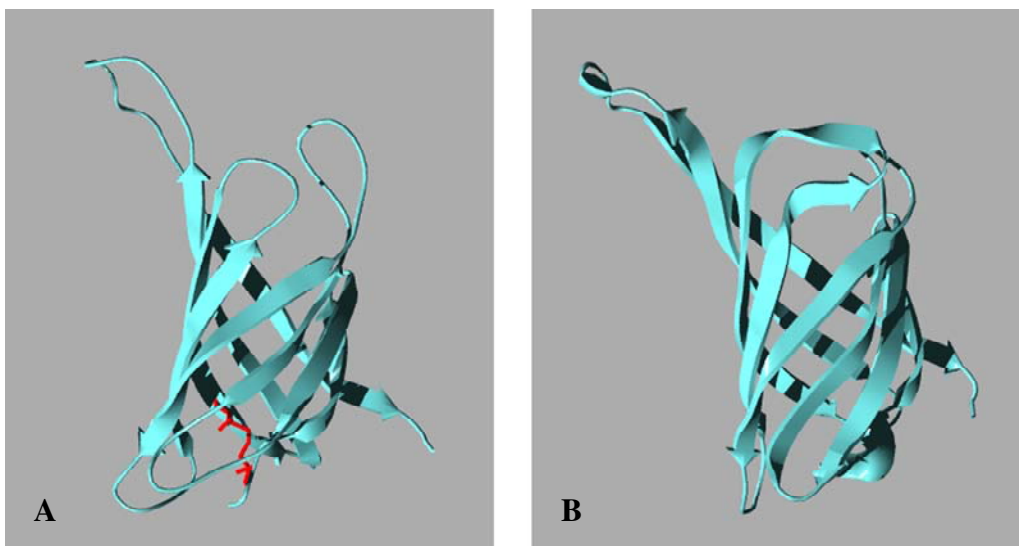


Figure 1.38 : Comparaison de la structure du monomère de l'avidine déglycosylée (**A**) et de la streptavidine (**B**). Le pont disulfure de l'avidine apparaît en rouge.

3.4. L'INTERACTION (STREPT)AVIDINE – BIOTINE

Bon nombre d'études cristallographiques en présence de biotine⁸⁰, d'analogues⁸⁶ ou de peptides^{79,87}, le plus souvent complétées par des expériences de mutagenèse dirigée^{86,88}, mais aussi de permutation circulaire^{86,89,90}, de simulation par ordinateur, d'études thermodynamiques⁹¹ ont permis de déterminer la nature de l'interaction (strept)avidine – biotine. Cette interaction est basée sur trois axes principaux :

- i) Un large réseau de liaisons polaires
- ii) Des interactions hydrophobes
- iii) Le repliement de la boucle 3,4 sur la biotine

La figure 1.39 et le tableau 1.3 résument les interactions mises en jeu^{70,78,85}.

La majorité des acides aminés en interaction avec la biotine sont conservés entre les deux protéines à l'exception de la thréonine 35, de l'alanine 39, de la phénylalanine 79 et de l'asparagine 118 de l'avidine respectivement remplacés par la sérine 45, l'asparagine 49, le

tryptophane 92 et l'aspartate 128 dans la streptavidine. De plus, les résidus thréonine 38 et 40, la phénylalanine 72 et la sérine 73 de l'avidine n'ont pas d'équivalents dans la streptavidine^{70,78}.

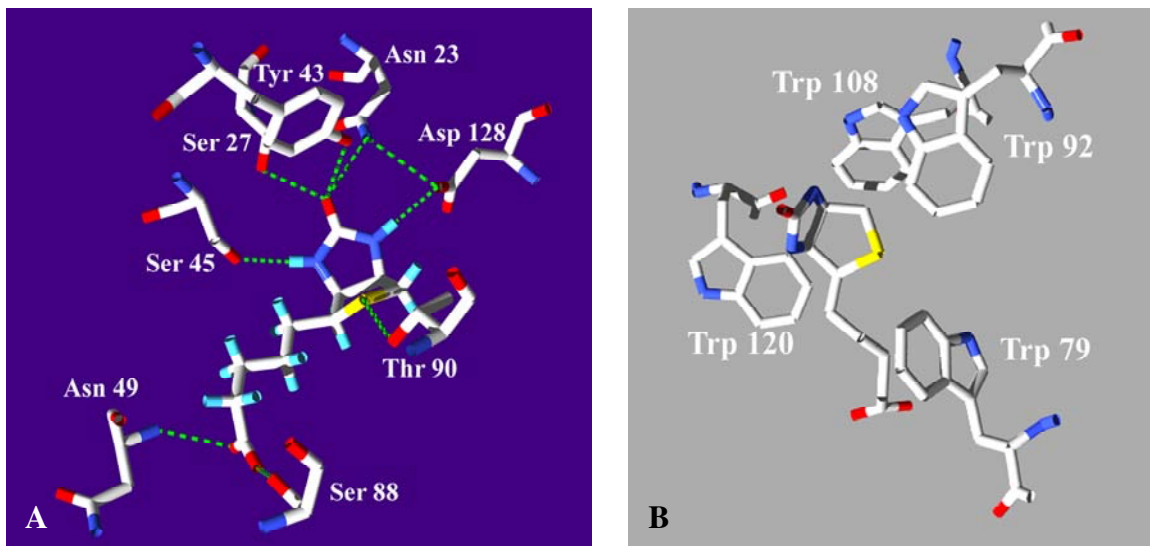


Figure 1.39 : A. Réseau de liaisons polaires mis en jeu dans le site actif de la streptavidine. B. Interactions hydrophobes faisant intervenir les résidus tryptophane.

Les interactions polaires dans la streptavidine concernent principalement le cycle uréidique de la biotine alors que dans le cas de l'avidine, un bon nombre d'interactions avec le groupement carbonyle de la biotine se surajoutent^{80,92,93}. Ces interactions font intervenir une seconde sphère de coordination assurée par les résidus tryptophane, les boucles 1,2 et 3,4 et des molécules d'eau, elles seraient de plus, stabilisées par une forme de résonance en oxyanion du groupement urée de la biotine^{77,81,92,94}.

Les interactions hydrophobes font quant à elles, principalement intervenir les résidus aromatiques des protéines avec le cycle tétrahydrothiophène et la chaîne aliphatique de la biotine. Comme nous l'avons vu, le tryptophane 110 de l'avidine ou 120 pour la streptavidine interagissant avec la biotine provient d'un monomère adjacent^{80,84,85,91,95}.

Type d'interaction	Résidu impliqué dans l'avidine	Résidu impliqué dans la streptavidine	Atome ou groupement de la biotine
Liaison Hydrogène	Asn 12	Asn 23	O ₃
Liaison Hydrogène	Ser 16	Ser 27	O ₃
Liaison Hydrogène	Tyr 33	Tyr 43	O ₃
Liaison Hydrogène	Thr 35	Ser 45	N ₁
Liaison Hydrogène	Thr 38	-	Carbonyle
Liaison Hydrogène	Ala 39	Asn 49	Carbonyle
Liaison Hydrogène	Thr 40	-	Carbonyle
Liaison Hydrophobe	Trp 70	Trp 79	Chaîne aliphatique
Liaison Hydrophobe	Phe 72	-	Chaîne aliphatique
Liaison Hydrogène	Ser 73	-	Carbonyle
Liaison Hydrogène	Ser 75	Ser 88	Carbonyle
Liaison Hydrogène	Thr 77	Thr 90	S ₁
Liaison Hydrophobe	Phe 79	Trp 92	Cycle Hydrothiophène
Liaison Hydrophobe	Trp 97	Trp 108	Cycle Hydrothiophène
Liaison Hydrophobe	Trp 110 ^a	Trp 120 ^a	Cycle Hydrothiophène
Liaison Hydrogène	Asn 118	Asp 128	N ₂

^a : Provient du monomère adjacent

Tableau 1.3 : Liste des interactions entre la biotine et la (strept)avidine.

Enfin, la boucle 3,4 (résidus 35-46 pour l'avidine et 45-52 pour la streptavidine) est plus ou moins structurée et assez flexible pour les deux protéines. En présence de biotine, il se replie sur l'acide valérique de celle-ci bloquant ainsi l'accès au site actif. Ce repliement est la seule modification structurale importante observée entre la (strept)avidine sans biotine et leur complexe avec la biotine^{49,86}. Cette modification influe probablement sur la conformation des autres monomères et suggère une coopérativité de la fixation de la biotine, bien que cette hypothèse soit très controversée^{49,78,81,96-99}.

3.5. LES SYSTÈMES DE PRODUCTION DE L'AVIDINE ET DE LA STREPTAVIDINE

L'ingénierie du système (strept)avidine – biotine a connu un grand essor ces 30 dernières années⁶⁰. Aussi est-il nécessaire de produire ces deux protéines à grande échelle. Certaines

industries spécialisées dans la purification de protéine de l'œuf exploitent la source naturelle d'avidine. De même, la production de streptavidine par *Streptomyces avidinii* donne de bons rendements de culture (110 mg/L de culture)¹⁰⁰. Dans les deux cas, un certain nombre de problèmes se posent. D'une part, l'obtention de mutants est difficile en partant d'un génome complet et pose des problèmes éthiques pour la poule. D'autre part, la glycosylation de l'avidine naturelle n'est pas homogène^{58,64}. Dans le cas de la streptavidine, les formes maturées sont de longueur variables^{73,74} et *S. avidinii* nécessite 5 à 10 jours de culture^{100,101}.

La streptavidine étant non glycosylée et n'ayant pas de pont disulfure a principalement été produite par des systèmes bactériens comme *Bacillus subtilis* dont la protéine est excrétée¹⁰² et *E. coli* où elle est cytoplasmique que ce soit sous forme de « mature streptavidin »¹⁰³ ou de « recombinant core streptavidin »^{74,104,105}.

Concernant l'avidine, la glycosylation et la présence du pont disulfure apporte des contraintes supplémentaires. L'utilisation de cellules d'insectes infectées par un baculovirus donne de bons résultats y compris avec des protéines de fusion de l'avidine¹⁰⁶. Lorsque la glycosylation n'est pas souhaitée, l'utilisation d'*E. coli* donne des résultats intéressants (10-20 mg/L de culture). Toutefois, la présence du pont disulfure nécessite d'utiliser des bactéries capables de le former ou des conditions de purification oxydantes¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

L'une et l'autre des protéines peuvent également être exprimées dans les vacuoles des feuilles du tabac ou dans les grains de maïs^{56,110} ou dans des cellules de mammifères¹¹¹.

Enfin, la production de l'avidine par la levure *Pichia pastoris* a été mise au point dans notre groupe par le Dr A. Zocchi¹¹².

3.6. PURIFICATION DE L'AVIDINE ET DE LA STREPTAVIDINE

La quasi irréversibilité de l'interaction (strept)avidine – biotine ne permet pas d'envisager une chromatographie d'affinité directement avec la biotine. Toutefois, un de ses homologues, la 2-iminobiotine possède une affinité de $3 \cdot 10^{-8}$ M pour l'avidine à pH alcalin (9,0) et de 10^{-2} M à pH acide (4,6)¹¹³. Cette baisse d'affinité est due à l'ionisation du groupement imine de la molécule (Fig. 1.40). Cette protonation de l'imine élimine les ponts hydrogènes formés avec l'asparagine 12 la sérine 16 et la tyrosine 33 de l'avidine (= Asn 23, Ser 27 et Tyr 43 de la streptavidine). Lorsqu'elle est greffée sur de l'agarose, l'iminobiotine permet d'isoler l'avidine ou la streptavidine avec une pureté supérieure à 95 %^{101,114}.

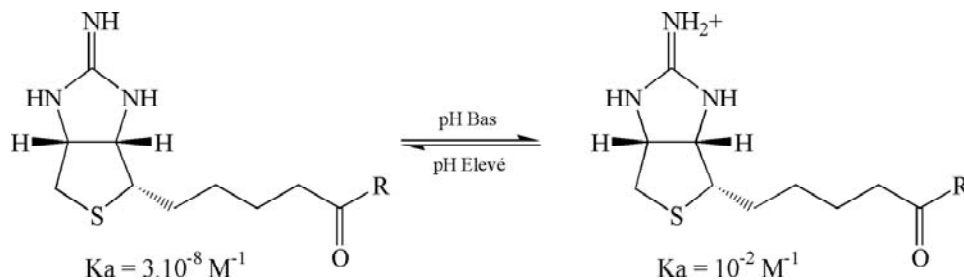


Figure 1.40 : Réaction d'ionisation de la 2-iminobiotine.

3.7. L'INGÉNIERIE (STREPT)AVIDINE - BIOTINE

Le système (strept)avidine – biotine a de nombreuses applications biomédicales^{115,116}, biochimiques^{117,118}, immunologiques¹¹⁹, nanotechnologiques¹²⁰, chimiques^{44,45} ou pour l'étude de l'adressage des protéines^{56,111}. La figure 1.41⁶⁰ montre une liste non exhaustive de ces applications (voir en revue, le numéro spécial de la revue *Biomolecular Engineering* 1999, n°16).

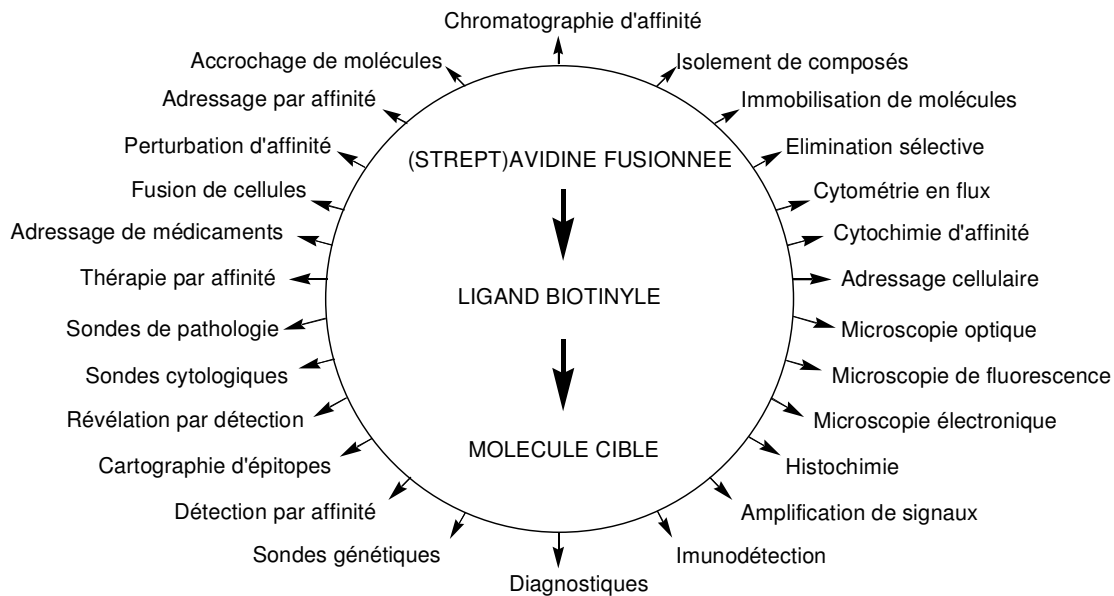


Figure 1.41 : Applications de la technologie (strept)avidine – biotine.

L'ensemble de ces applications est rendu possible grâce à un certain nombre de propriétés du système¹²¹.

i) L'immense affinité des deux protéines pour la biotine est l'atout majeur du système, notamment pour le ciblage de médicament (drug targetting)¹¹⁶, mais peut être également abaissée par mutagenèse¹²² ou modifications chimiques^{123,124} pour des applications de type chromatographie d'affinité.

ii) La dérivatisation du groupement carboxylique de la biotine ne diminue pas de manière significative son affinité pour l'une et l'autre des deux protéines⁶⁰. Certaines combinaisons biotine dérivatisée – mutants de la streptavidine donnent des affinités supérieures que le même mutant avec la biotine¹¹⁵.

iii) L'obtention des deux protéines recombinantes se fait avec de bons rendements, dans bon nombre de systèmes de production et la purification par 2-iminobiotine agarose permet d'obtenir une protéine pure à plus de 95 %^{101,114}.

iv) Le système a largement été caractérisé, ce qui permet de designer des mutants possédant telles ou telles propriétés, de manière rationnelle. Par exemple, la fixation aspécifique de l'ADN ou de certaines cellules par l'avidine provient de son point isoélectrique élevé. Cette propriété pose problème dans le cas d'applications biomédicales, mais peut être contournée en générant des mutants de charge réduite¹⁰⁸. Le « design » de ces mutants a été effectué à partir de l'étude des AVR (§ 3.2.1)^{63,64,68,109}. De même, certains mutants mono^{83,84,88,122} ou dimériques¹²⁵, des mutants par permutation circulaire^{86,90,126,127} ou des mutants chimériques¹²⁷⁻¹³⁰ ont pu être obtenus par un « design » rationnel basé sur les données cristallographiques.

v) Du fait de la fixation de 4 molécules de biotine par protéine, la fixation de 4 molécules biotinylées différentes est envisageable. De même, la fixation de l'une ou l'autre des protéines sur une surface biotinylée laisse des sites actifs libres pour fixer une sonde biotinylée^{121,131}.

vi) Les deux protéines sont très robustes et ne perdent pas trop d'affinité pour la biotine lorsqu'elles sont modifiées chimiquement^{58,76,121}.

vii) La molécule de biotine est de petite taille et sa fixation covalente sur une macromolécule (anticorps, enzyme, ADN) n'interfère pas avec l'activité de cette dernière¹²¹.

Il existe malgré tout des limites au système (strept)avidine – biotine. Dans le cas de thérapies anticancéreuses par ciblage de médicaments, les deux protéines peuvent fixer la biotine endogène du patient¹¹⁵. De plus, l'avidine et la streptavidine sont hautement immunogènes (^{62,132} ; P.S Stayton communication personnelle).

4. BUTS DU TRAVAIL DE THÈSE

Le but de cette thèse a été de produire par *E. coli*, purifier par chromatographie d'affinité et caractériser la streptavidine wild-type et un certain nombre de mutants. Ces mutants ont été

désignés rationnellement sur les bases de données cristallographiques et ont été obtenus par mutagenèse dirigée ou par mutagenèse de saturation. Les différentes protéines ont été utilisées par la suite pour générer des métalloenzymes artificielles catalysant des réactions asymétriques (hydrogénation, transfert d'hydrogénation, oxydation).

Un certain nombre de mutants ont montré des caractéristiques qui leur étaient propres. Certains se sont avérés monomériques, d'autres ont présenté une faible capacité à se fixer sur la résine de chromatographie et ont nécessité d'adapter le protocole de purification, d'autre enfin se sont révélés totalement inactifs.

La mise en place d'un système de criblage à haut débit de la fonctionnalité des mutants a été également nécessaire pour permettre à terme de tester de larges bibliothèques de mutants de la protéine obtenues par évolution dirigée du gène. Enfin, la mise au point de deux stratégies de mutagenèse aléatoire mais rationalisée a été requise en vue d'une approche combinatoire de l'optimisation des métalloenzymes artificielles.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL

1.1. RÉACTIFS ET COMPOSANTS DES MILIEUX

Les différents réactifs chimiques et les composants des milieux proviennent de Acros – Brunschwig (Bâle, Suisse), SIGMA - Fluka (Buchs, Suisse), ou Gibco – Invitrogen (Bâle, Suisse). La résine de 2-iminobiotine-agarose est fournie par Affiland (Ans-Liège, Belgique). La biotine-4-fluorescéine provient de Molecular Probes – Juro (Lucerne, Suisse). L'acrylamide – bis-acrylamide est de type Protogel 37,5 : 1 (National Diagnostics, Hessle, Royaume-Uni).

1.2. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Le plasmide pET11b-SAV a été fourni par le professeur Paolo Santambrogio (Université de Milan) et le plasmide pET3c (Novagen – Juro, Lucerne Suisse) a été fourni par le professeur Peter Schürmann (Université de Neuchâtel). Tous deux sont purifiés en utilisant le kit Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega – Catalys, Wallisellen, Suisse).

La souche de bactéries *Escherichia coli* XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]) provient de Stratagene (La Jolla CA, EU). Les souches BL21(DE3) (F- *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3)) et BL21(DE3)pLysS (F- *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)) (Novagen – Juro Lucerne Suisse), ont été respectivement fournies par le professeur Paolo Santambrogio (Université de Milan) et le professeur Peter Schürmann (Université de Neuchâtel).

Les amorces de PCR proviennent de Microsynth (Balgach, Suisse).

1.3. APPAREILS

Le matériel d'électrophorèse d'ADN et de protéine provient de Bio-Rad (Reinach, Suisse), le transilluminateur est de modèle Gel-Doc 1000 (Bio-Rad, Reinach, Suisse) et est supplémenté par le logiciel Multi-Analyst. Les thermocyclers utilisés sont de type T-Gradient (Biometra – Biolabo Scientific Instruments, Châtel-St-Denis, Suisse) et PTC-110 (MJ Research – BioConcept, Allschwill, Suisse).

L'incubateur à 37 °C pour boîtes de Pétri et digestions enzymatiques est de modèle WTB (Binder – Faust, Schaffhouse, Suisse), l'incubateur sous agitation à 37 °C est de modèle AQUATRON (Infors – Blanc Labo, Morges, Suisse). Le fermenteur de 2 litres est de type F2000 (MultiGen - New-Brunswick Scientific, EU), celui de 15 litres est de type L1523 (Bioengineering, Wald, Suisse). Le spectrophotomètre est de modèle Ultrospec 3000 (Pharmacia – Amersham Biosciences, Otelfingen, Suisse). Les centrifugeuses sont de modèle SORVAL RC 5B de Kendro (Carouge, Suisse).

Le sonicateur est de type Sonifer 450 (Branson – Skan, Bâle). Les sacs de dialyses sont de modèle Spectrapor MWCO 6-8,000 (Spectrum LABS, Breda, Pays-Bas). Le système de concentration vivaflow 200 provient de Sartorius (Dietikon, Suisse). La colonne de chromatographie C26/40 provient de Pharmacia – Amersham Biosciences (Otelfingen, Suisse), le détecteur est de type Uvicord SII (LKB Bromma - Amersham Biosciences Otelfingen, Suisse), et le grapheur de type Servogor Sb (Goerz Electro, Vienne, Autriche). Les lyophilisateurs sont de modèle Modulyo (Edwards – Zivy, Oberwil, Suisse) et Lyolab A (LSL Secfroid – Blanc Labo, Morges, Suisse). Le spectrofluorimètre est de type LS50B Luminescence Spectrometer (Perkin – Elmer, Wiesbaden, Allemagne) et est supplémenté par le logiciel Finnlab. Le lecteur de plaques

ELISA est de type FL 500 (Bio Tek Instruments, Littau, Suisse), il est supplémenté par le logiciel FL500 1D1.

2. CARACTÉRISATION DU PLASMIDE pET11b-SAV

2.1. ANALYSE DE RESTRICTION

Les plasmides pET3c vide et pET11b-SAV sont soumis aux digestions des enzymes AgeI, SphI et SspI selon le protocole défini par le fournisseur (Promega – Catalys, Wallisellen, Suisse). Les quantités de réactifs sont indiquées sur le tableau 2.1. Lors des simples digestions, le tampon fourni avec l'enzyme est utilisé, lors des doubles digestions le tampon H a été choisi pour sa compatibilité avec les trois enzymes (Protocoles Promega).

Composant	Simples digestions		Doubles digestions	
	Quantité	Conc. finale	Quantité	Conc. finale
Eau ADN	15.3 µL	-	14.8 µL	-
Tampon 10X	2 µL	1 X	2 µL	1 X
ADN (350 mg/mL)	2 µL	35 µg/mL	2 µL	35 µg/mL
BSA (10 mg/mL)	0.2 µL	0.1 µg/µL	0.2 µL	0.1 µg/µL
Enzyme 1	0.5 µL	5 U	0.5 µL	5 U
Enzyme 2	-	-	0.5 µL	5 U
Volume final	20 µL		20 µL	

Tableau 2.1 : Quantités de réactifs utilisés lors des digestions du plasmide pET11b-SAV et pET11b vide. Les tampons utilisés sont le tampon K (1X : 10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 10 mM MgCl₂ ; 150 mM KCl) pour les simples digestions par SphI, le tampon E (1X : 6 mM Tris-HCl pH7,5 ; 6 mM MgCl₂ ; 100 mM NaCl ; 1 mM DTT) pour les simples digestions par SspI et le tampon H (1X : 90 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM MgCl₂ ; 150 mM KCl) pour les doubles digestions. L'eau ADN est l'eau MilliQ autoclavée et filtrée à 0,22 µm.

Les digestions sont incubées 2 h à 37 °C. A la fin de la réaction, le tampon de charge 6X (4 µL ; 24,4 % v/v Glycérol ; 0,032 % w/v Bleu de Bromophénol = BBP ; 0,02 % w/v Xylène Cyanol = XC) est ajouté à l'échantillon qui est chargé sur gel 0,7 % w/v agarose, 1X TAE (40

mM Tris-HCl ; 40 mM Acide Acétique ; 1 mM EDTA) en présence de bromure d'éthidium (= BET ; 4 µL/100 mL de gel de solution 1 % w/v).

2.2. PCR SAV-EcoF - SAV-BamR ET T7 - T7term

Les PCR d'analyse du gène par SAV-EcoF et SAV-BamR (Tableau 2.2) sont effectuées en utilisant les réactifs (Taq polymérase et dNTP) fournis par Promega – Catalys (Wallisellen, Suisse). Les conditions réactionnelles et le programme utilisés sont définis sur le tableau 2.3.

Nom	Longueur (bases)	Séquence	Tm °C
T7	17	AAT ACG ACT CAC TAT AG	46
T7term	19	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	55.3
SAV-EcoF	24	CAA GAA TTC GCT AGC ATG ACT GGT	51.3
SAV-BamR	27	CAT GGA TCC CTA CTG CTG AAC GGC GTC	63

Tableau 2.2 : Séquence des amorces T7 ; T7term ; SAV-EcoF et SAV-BamR.

Composant	Quantité	Conc. Finale	Température (°C)	Temps
Eau ADN	13.2 µL		95	5 min.
Tampon 10 X	2 µL	1 X	95	40 sec.
SAV-EcoF 12,5 µM	0,8 µL	500 nM	56	45 sec.
SAV-BamR 12,5 µM	0,8 µL	500 nM	72	30 sec.
ADN 15 µg/mL	1 µL	0,75 µg/mL	72	10 min.
dNTP 2 mM	2 µL	200 µM de chaque	10	∞
Taq Polymérase 5 U/µL	0,2 µL	0,05 U/µL		
Volume final	20 µL			

Tableau 2.3 : Conditions de la PCR SAV-EcoF – SAV-BamR. La composition du tampon 1X est 10 mM Tris-HCl pH 9,0 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,1 % Triton X-100.

L'optimisation des PCR T7-T7term (Tableau 2.2) est effectuée dans les mêmes conditions en faisant varier la concentration en DMSO et la température d'hybridation des amorces (Tableau 2.4).

Composant	Quantité	Conc. Finale	Température (°C)	Temps
Eau ADN	13,2 ; 13 ; 12,2 ; 11,2 µL		95	5 min.
Tampon 10 X	2 µL	1X	95	40 sec.
T7 12,5 µM	0,8 µL	500 nM	45,3 ; 49,6 ; 54,1 ; 60,7 *	45 sec.
T7term 12,5 µM	0,8 µL	500 nM	72	30 sec.
DMSO 100 %	0 ; 0,2 ; 1 ; 2 µL	0 ; 1 ; 5 ; 10 %	72	10 min.
ADN 15 µg/mL	1 µL	0,75 µg/mL	10	∞
dNTP 2 mM	2 µL	200 µL de chaque	* Gradient 53/19 Puits 3 ; 5 ; 7 ; 10	
Taq Polymérase 5 U/µL	0,2 µL	0,05 U/µL		
Volume final	20 µL			

Figure 2.4 : Conditions de la PCR T7 – T7term.

Une fois la réaction terminée, les échantillons sont supplémentés de tampon de charge (4 µL, Cf. § 2.1) puis chargés sur gel (1 % w/v Agarose ; 1X TAE ; 0,000 04 % w/v BET).

2.3. SÉQUENCE DU GÈNE

La majorité des séquençages du gène de la streptavidine et des mutants a été effectuée par Synergene (Schlieren, Suisse). Les séquences des mutants P64G-S112G et P64G-S112G-N118T sont déterminées sur un séquenceur de type 4000L (Li-cor – Biosciences, Bad Homburg, Allemagne) à l'aide du kit Cy5 Autorad Sequencing Kit (Pharmacia – Amersham Biosciences Otelfingen, Suisse) en utilisant les amorces T7 et T7term marquées (fmol DNA Sequencing System, Promega – Catalys, Wallisellen, Suisse) en présence de DMSO (concentration finale 5 % v/v ; concentration d'ADN utilisée 350 µg/mL).

3. TRANSFORMATION DES BACTÉRIES

3.1. OBTENTION DES BACTÉRIES « HEAT-SHOCK » COMPÉTENTES

Les bactéries non transformées d'un glycérol-stock ou d'un aliquote de cellules compétentes sont étalées sur boîte de Petri LB (10 g/L Bactotryptone ; 5 g/L Bactoyeast-extract ;

5 g/L NaCl ; 15 g/L Bactoagar) contenant les antibiotiques appropriés (50 µg/mL Tétracycline pour XL1-Blue ; 34 µg/mL Chloramphénicol pour BL21(DE3)pLysS et sans antibiotiques pour BL21(DE3)), puis sont incubées une nuit à 37 °C. Une colonie isolée de taille moyenne est sélectionnée pour inoculer une préculture de milieu LB (3 mL ; 10 g/L Bactotryptone ; 5 g/L Bactoyeast-extract ; 5 g/L NaCl) contenant les antibiotiques précités à la même concentration. Cette préculture est incubée une nuit à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm).

La préculture est versée dans le milieu LB (250 mL) contenant les antibiotiques adéquats (mêmes concentrations). Les bactéries sont incubées à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm) jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne 0,400-0,600 (~ 2h30), puis sont centrifugées (4 500 g ; 5 min. ; 4 °C). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans la solution TFB1 (100 mL ; 30 mM Acétate de Potassium pH 5,8 ; 100 mM CaCl₂ ; 50 mM MnCl₂ ; 100 mM RbCl et 15 % v/v Glycérol). Les cellules sont incubées dans la glace (5 min.), puis sont centrifugées à nouveau (4 500 g ; 5 min. ; 4 °C). Le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans la solution TFB2 (10 mM MOPS pH 6,5 ; 75 mM CaCl₂ ; 10 mM RbCl et 15 % Glycérol). Les bactéries sont alors incubées 15-60 minutes dans la glace puis sont aliquotées (50 µL), congelées à l'azote liquide et stockées à – 80 °C.

3.2. PROTOCOLE DE TRANSFORMATION

Un aliquote de bactéries compétentes (*Escherichia coli* XL1-blue, BL21(DE3) et BL21(DE3)pLysS) est transformé avec 2 µL de plasmide (concentrations allant de 5 à 70 ng/µL) ou de produit PCR dans le cas de la mutagenèse. Les bactéries sont incubées dans la glace (30 min.), puis à 37 °C (1 min. 30) et enfin dans la glace (5 min.). La totalité de la transformation est ensuite étalée sur boîte de Petri contenant du milieu LB et les antibiotiques appropriés (c-à-d 60

µg/mL Ampicilline pour les souches XL1-blue et BL21(DE3) et 60 µg/mL Ampicilline ; 34 µg/mL Chloramphénicol ; 1 % w/v Glucose pour la souche BL21(DE3)pLysS) puis est incubée une nuit à 37 °C.

4. OBTENTION DES MUTANTS

4.1. PCR MUTAGÈNES

La mutagenèse dirigée et la mutagenèse de saturation sont effectuées en utilisant le QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla CA, EU) selon les conditions décrites dans le tableau 2.5 (ces conditions ont été optimisées en utilisant le gradient de température d'hybridation des amorces et de concentration en DMSO décrit dans le § 2.2). Les différentes amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 2.6.

Une fois la PCR terminée, un aliquote (2 µL) est prélevé, supplémenté avec de l'eau MilliQ stérile et du tampon de charge (respectivement 8 et 2 µL), puis est chargé sur gel (0,7 % w/v Agarose ; 1X TAE ; 0,000 04 % w/v BET) pour s'assurer de la taille de la bande amplifiée.

Composant	Quantité	Conc. Finale	Température	Temps	
Eau ADN	36,8 µL		95	5 min.	X 30
Tampon 10 X	5 µL	1X	95	1 min.	
Amorce 1 12,5 µM	1 µL	250 nM	65	1 min.	
Amorce 2 12,5 µM	1 µL	250 nM	68	15 min.	
DMSO 100 %	2,5 µL	5%	68	60 min.	
ADN 15 µg/mL	1,7 µL	0,51 µg/mL	10	∞	
dNTP 50 X	1 µL	1 X			
Turbo Pfu 2,5 U/µL	1 µL	0,05 U/µL			
Volume final	50 µL				

Tableau 2.5 : Conditions des PCR de mutagenèse dirigée et de saturation.

L'enzyme DpnI (1 μ L, incluse dans le kit de mutagenèse) est ajoutée au milieu réactionnel. L'échantillon est incubé 1 heure à 37 °C. 2 μ L de cette digestion sont utilisés pour transformer *E. coli* XL1-blue comme décrit dans le § 3.

Nom	Séquence	Longueur (bases)	Tm (°C)	Site de restriction inséré
Uv47g	GGAACCTACGAGT CaG CtGgCGGCAACGCCGAGAGCC	37	74,3	
Lv47g	GGCTCTCGGCGTTGCCG CaG CtGACTCGTAGGTTCC	37	74,3	AluI
Up64g	GCGCC ggc GCCACCGACGGCAGCGGCACCGCC	32	80,2	
Lp64g	GGT GGC gccGGCGCTGTCTGTAACGACCGG	29	73,8	NarI
Uk80g	CGGTTGGACGGT AG CtGGggGAATAACTACCGC	34	69,4	
Lk80g	GCGGTAGTTATTC cc CC AaG CtACCGTCCAACCG	34	69,4	AluI
Un81p	CCTCGGTTGGACGGT AG CtGGAAAG cc TAACTACCGCAACGCC	43	73,1	
Ln81p	GGCGTTGCGGTAGTT Agg CTTCCA AaG CtACCGTCCAACCGAGG	43	73,1	AluI
Un85p	GCCTGGAAGAATAACTACCG Ccc CGCCCACTCCGCGACC	39	74,6	
Ln85p	GGTCGCGGAGTGGGCG gg GCGGTAGTTATTC T TCCAGGC	39	74,6	Aucun
Us112g	GCTGACC ggc G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	75,5	
Ls112g	GGT GGT ACC gccGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	72,9	
U112-118 ^a	GCTGACC ggc G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	76,5	KpnI
Ut123g	GCCTGGAAGT CC ggaCTGGTCGGCCACG	28	71,2	
Lt123g	CGTGCCCGACCA Gtcc GGACTTCCAGGC	28	71,2	AccIII
Usat112	GCTGACC nns G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	74,1	
Lsat112	GGT GGT ACC snnGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	71,7	KpnI
Us112h	GCTGACC cat G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	72,9	
Ls112h	GGT GGT ACC catGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	70,5	KpnI
Us112i	GCTGACC att G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	71,9	
Ls112i	GGT GGT ACC aatGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	69,4	KpnI
Us112m	GCTGACC atg G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	72,9	
Ls112m	GGT GGT ACC catGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	70,5	KpnI
Us112n	GCTGACC aac G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	73,1	
Ls112n	GGT GGT ACC gttGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	70,6	KpnI
Us112q	GCTGACC cag G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	74,1	
Ls112q	GGT GGT ACC ctgGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	71,9	KpnI
Us112t	GCTGACC acc G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	74,3	
Ls112t	GGT GGT ACC ggtGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	71,7	KpnI
Us112w	GCTGACC tgg G Gt ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	74,3	
Ls112w	GGT GGT ACC ccaGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	71,9	KpnI
Us112y	GCTG a C ct at G G t ACCACCGAGGCCAACGCCTGG	34	71,9	
Ls112y	GGT GGT ACC ataGGTCAGCAGCCACTGGGTGTTG	34	69,4	KpnI
U242526	CCGGCACCTGGTACAAC nnsnnsnns TCGACCTCATCGTGACCGCGGGC	50	77,0	
L242526	CGATGAAGGT CG As nnsnnsnns GTTGTACCAGGTGCCGGTGATGCCGGC	49	75,6	Aucun

^a : Primer commandé par erreur, code pour le double mutant S112G-N118T

Tableau 2.6 : Listes des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée ou la mutagenèse de saturation. Les nucléotides mutés sont en minuscule, les sites de restriction insérés sont en gras et la température de fusion (Tm) est calculée directement par Microsynth. Uv47g est le « upper primer » apportant la mutation valine 47 → glycine.

4.2. ANALYSE DES CLONES ET SÉQUENÇAGE

4 à 8 clones par mutant sont sélectionnés et analysés par PCR sur colonie. Une colonie isolée de taille moyenne est piquée stérilement, repiquée sur une boîte de milieu sélectif (LB + 60 µg/mL Ampicilline qui est incubée une nuit à 37 °C) puis est déposée dans un tube PCR contenant de l'eau MilliQ stérile (14 µL). Le reste de la réaction (6 µL, Tableau 2.7) est préparé sous forme de « master-mix » et est ajouté à la suspension de bactéries. La PCR (même programme que précédemment avec ces amorces) est démarrée en hot-start.

Une fois la PCR terminée, un aliquote (2 µL) est prélevé, dilué dans l'eau MilliQ stérile et du tampon de charge (respectivement 8 et 2 µL), puis est chargé sur gel (1 % w/v Agarose ; 1X TAE ; 0,000 04 % w/v BET) pour s'assurer de la présence d'une bande amplifiée. Le produit PCR est purifié par le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega – Catalys, Wallisellen, Suisse) et élué avec 30 µL d'eau MilliQ stérile à 65 °C.

Composant	Quantité	Conc. finale dans le tube PCR
Eau ADN	0,2 µL	
Tampon 10 X	2 µL	1 X
SAV-EcoF 12,5 µM	0,8 µL	500 nM
SAV-BamR 12,5 µM	0,8 µL	500 nM
dNTP 2 mM	2 µL	200 µM de chaque
Taq Polymérase 5 U/µL	0,2 µL	0,05 U/µL
Volume final	6 µL	

Tableau 2.7 : Composition du « master-mix » des PCR sur colonies.

5 µL de fragment purifié sont digérés par l'enzyme de restriction dont le site est apporté par la mutagenèse (Tableau 2.8) selon le protocole du fournisseur (Promega – Catalys, Wallisellen, Suisse). La digestion est analysée sur gel (2 % w/v agarose ; 1X TAE ; 0,000 04 % w/v BET).

Enzyme	Tampon	Composition du tampon 1 X
AccIII	F	10 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl ; 1 mM DTT
AluI	B	6 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 6 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl ; 1 mM DTT
BamHI	E	6 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 6 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl ; 1 mM DTT
KpnI	J	10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 7 mM Mg Cl ₂ ; 50 mM KCl ; 1 mM DTT
NarI	G	50 mM Tris-HCl pH 8,2 ; 5 mM MgCl ₂

Tableau 2.8 : Composition des tampons des enzymes de restriction utilisées pour cribler les clones positifs de la mutagenèse.

Les positifs sont envoyés à séquencer (15 µL de fragment PCR + 1 µL d’amorce SAV-EcoF 10 µM) à Syngene (Schlieren, Suisse). Les plasmides sont purifiés par le kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega – Catalys, Wallisellen, Suisse), visualisés sur gel (0,7 % w/v Agarose ; 1X TAE ; 0,000 04 % w/v BET) et quantifiés par spectrophotométrie UV ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$).

5. PRODUCTION DE LA STREPTAVIDINE RECOMBINANTE ET DES MUTANTS

5.1. SYSTÈME INITIAL (BL21(DE3), CULTURE DE 1,5 L)

Le protocole initial a suivi celui élaboré dans ¹⁰³. Les cellules BL21(DE3) heat-shock compétentes sont transformées par le plasmide pET11b-SAV et étalées sur milieu LA (milieu LB ; 60 µg/mL Ampicilline) comme décrit dans le § 3. Après une nuit d’incubation (37 °C), une colonie isolée de taille moyenne est utilisée pour inoculer 20 mL (soit 1/75 du volume final de la culture) de milieu TP (20 g/L Bactotryptone ; 2 g/L Na₂HPO₄, 1 g/L KH₂PO₄ ; 8 g/L NaCl ; 15 g/L Bacto yeast extract) contenant de l’ampicilline (60 µg/mL). Cette préculture est alors incubée une nuit sous agitation (37 °C ; 230 rpm) puis est transférée dans 1,5 L de milieu TP (+ Ampicilline 60 µg/mL).

La culture est effectuée à 25 °C sous agitation (600 rpm) et aération (1 bar d'air) constante en présence d'antimousse A (SIGMA - Fluka, Buchs, Suisse). La croissance des cellules est suivie par densité optique à $\lambda = 600$ nm, lorsque l'absorbance atteint $\sim 0,800$, les cellules sont induites avec l'IPTG (concentration finale 0,4 mM).

Un aliquote de culture (1 mL) est prélevé à ce moment, puis toutes les 60 minutes. Cet échantillon est centrifugé (16 000 g ; 5 min. ; température ambiante), le milieu est éliminé et le culot est conservé à -20 °C jusqu'à son analyse par SDS-PAGE.

Trois heures après induction, la culture est arrêtée et centrifugée (3 600 g ; 10 min. ; 4 °C). Les culots sont lavés dans la solution de resuspension 1 (100 mL ; 20 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,02 % w/v NaN_3 ; 1 mM PMSF) et recentrifugées (3 600 g ; 20 min. ; 4 °C). Le surnageant est alors éliminé et le culot de bactéries est stocké à -20 °C, jusqu'à purification.

Ce protocole a évolué petit à petit vers le système dit « final ». Les différentes évolutions sont décrites dans la partie résultats.

5.2. SYSTÈME FINAL (BL21(DE3)pLysS, CULTURES DE 10 L)

Les cellules BL21(DE3)pLysS heat-shock compétentes sont transformées par le plasmide pET11b-SAV et étalées sur milieu LACG (milieu LB ; 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicilline ; 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chloramphénicol et 1 % w/v Glucose) comme décrit dans § 3. Après une nuit d'incubation (37 °C), une colonie isolée de taille moyenne est utilisée pour inoculer 150 mL (soit 1/75 du volume final de la culture) de milieu MTP (20 g/L Bactotryptone ; 1,3 g/L Na_2HPO_4 , 1 g/L KH_2PO_4 ; 8 g/L NaCl ; 15 g/L Bacto yeast extract) en présence des antibiotiques appropriés (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicilline ; 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chloramphénicol) et de glucose (1 % w/v). Cette préculture est alors incubée une nuit sous agitation (37 °C ; 230 rpm) puis est mélangée à 200 mL de glucose (20 %

w/v) puis est déversée dans 10 L de milieu MTP (+ Ampicilline 60 µg/mL ; Chloramphénicol 34 µg/mL ; Concentration finale de glucose : 0,4 % w/v)

La culture est effectuée à 37 °C sous agitation (600 rpm) et aération (1 bar d'air) constante en présence d'antimousse A (SIGMA - Fluka, Buchs, Suisse). Lorsque l'absorbance atteint ~ 2,500, les cellules sont induites avec l'IPTG (concentration finale 0,4 mM).

Un aliquote de culture (1 mL) est prélevé à ce moment, puis toutes les heures. Cet échantillon est centrifugé (16 000 g ; 5 min. ; température ambiante), le milieu est éliminé et le culot est conservé à -20 °C jusqu'à son analyse par SDS-PAGE.

Trois heures après induction, la culture est arrêtée et centrifugée (3 600 g ; 10 min. ; 4 °C). Les culots sont lavés dans la solution de resuspension 2 (100 mL ; 20 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 0,02 % w/v NaN₃ ; 10 mM MgCl₂) et recentrifugées (3 600 g ; 20 min. ; 4 °C). Le surnageant est alors éliminé et le culot de bactéries est stocké à - 20 °C, jusqu'à utilisation.

5.3. CULTURES DE 50 mL ET MINICULTURES DE 4 mL

Les criblages de conditions de culture ont été effectués en Erlenmeyer (250 mL pour 50 mL de culture) en respectant les proportions d'antibiotiques et de glucose indiquées dans § 5.1. et 5.2. sous agitation et en absence d'aération. Les conditions exactes utilisées sont décrites dans le chapitre des résultats.

Les minicultures (4 mL dans des tubes Falcon de 50 mL) ont été traitées de manière identique, au détail près que la croissance n'a pas été suivie. L'induction a été effectuée arbitrairement au bout de 3 heures après l'inoculation du milieu et la culture est stoppée 2 heures après induction.

5.4. PRODUCTION EN PLAQUES DE CULTURES

Les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que précédemment. Les volumes de production sont adaptés au matériel utilisé. Pour les précultures, une colonie isolée est repiquée sur boîte de Petri contenant le milieu LACG puis est utilisée pour inoculer le milieu (180 µL pour les plaques ELISA 96 puits ; 850 µL pour les plaques de culture de 48 puits et 2 mL pour les plaques de 24 puits). Les plaques sont incubées une nuit à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm). Un dixième du volume est utilisé pour inoculer le milieu de culture (mêmes volumes que pour les précultures) dans une nouvelle plaque. Les plaques sont incubées 3 heures à 37 °C sous agitation orbitale (250 rpm), puis les cellules sont induites et sont remises en culture deux heures. A la fin de la culture les plaques sont centrifugées, le milieu est éliminé et les cellules sont placées à – 20 °C jusqu'à analyse.

5.5. ANALYSE DES CULTURES PAR SDS-PAGE

5.5.1. Traitement des échantillons

Les échantillons prélevés durant la culture sont décongelés, resuspendus dans un volume (en µL) d'eau MilliQ équivalent à 40 fois l'absorbance à 600 nm de la culture au moment du prélèvement. La DNaseI est ajoutée (1 µL ; 1 mg/mL solubilisée dans 5 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 75 mM NaCl ; 0,5 mM MgCl₂ ; 50 % v/v Glycérol)¹³³ et chaque échantillon est incubé à température ambiante jusqu'à digestion totale des acides nucléiques (30-60 min.). Les extraits bactériens sont alors vortexés (5 min. ; vitesse maximale) et centrifugés (16 000 ; 5 min. ; température ambiante). La fraction soluble est transférée dans un nouveau tube et la fraction insoluble est resuspendue dans l'eau milliQ (même volume que précédemment).

12 µL de chaque fraction soluble et de chaque fraction insoluble sont prélevés, supplémentés de 5X-LB (« 5X loading buffer ») dénaturant (50 mM Tris-HCl pH = 6.8 ; 1 % w/v SDS ; 2 % v/v β-Mercaptoéthanol ; 10 % w/v Saccharose ; 0.006 % w/v BBP) et dénaturés à haute température (90 °C ; 20 min.).

Un témoin positif (12 µL de protéine pure diluée à 1 mg/mL dans l'eau MilliQ), un témoin négatif (12 µL d'un extrait cellulaire de bactéries transformées avec le pET11b vide traité de la même manière que les échantillons) et un marqueur de taille (10 µL ; Broad-range Protein Marker, New-England Biolabs – Bioconcept, Allschwill, Suisse) subissent le même traitement. A la fin de la dénaturation, les échantillons sont brièvement refroidis dans la glace et centrifugés avant d'être chargé sur gel SDS-PAGE.

5.5.2. SDS-PAGE

La majorité des gels de protéines utilisés dans ce travail sont de type SDS-PAGE (0.375 M Tris-HCl pH 8,8 ; 16 % Acrylamide – Bis-acrylamide 37,5 : 1 ; 0,1 % w/v SDS ; 0,034 % w/v APS ; 0,05 % v/v TEMED) supplémenté d'un gel de concentration (0,125 M Tris-HCl pH 6,8 ; 5 % Acrylamide – Bis-acrylamide 37,5 : 1 ; 0,1 % w/v SDS ; 0,1 % w/v APS ; 0,15 % v/v TEMED) selon le protocole décrit par Laemmli¹³⁴. Le gel est immergé dans le tampon de migration (25 mM Tris-HCl ; 0,192 M Glycine ; 0,1 % w/v SDS) et les échantillons sont chargés.

Le gel migre à 200 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol présent dans le 5X-LB sorte du gel. Le gel est ensuite incubé dans la solution de fixation (50-100 mL ; 25 % v/v Isopropanol ; 10 % v/v Acide Acétique) durant 5 minutes dans un four à micro-ondes (position médium), coloré au bleu de Coomassie (100 mL ; 0,25 % w/v Coomassie Brilliant Blue ; 45 % v/v Méthanol ; 10 % v/v Acide Acétique) pendant 5 minutes dans un four à micro-ondes (position

médium) et décoloré (deux fois 20 minutes dans 50-100 mL de 5 % v/v Méthanol ; 7 % v/v Acide Acétique dans le four à micro-ondes position médium). Le gel est ensuite laissé une nuit dans la solution de décoloration (100 mL ; température ambiante), puis photographié dans un transilluminateur de type Gel-Doc 1000 (Bio-Rad, Reinach, Suisse) supplémenté d'un écran de type Conversion Screen (Bio-Rad, Reinach, Suisse).

6. PURIFICATION DE LA PROTÉINE ET DES MUTANTS

6.1. SYSTÈME INITIAL

Tout comme pour la production de la protéine, le protocole de ¹⁰³ a été suivi. Le culot de bactéries est décongelé puis repris dans la solution de resuspension 1 (50 mL, voir § 5.1.). L'échantillon est soniqué (3 fois 1 min.) dans un bain de glace, puis est centrifugé (10 000 g ; 10 min. ; 4 °C). La fraction soluble est ensuite chauffée (75 °C ; 10 min.), refroidie dans la glace puis recentrifugée (10 000 g ; 20 min. ; 4 °C). Le surnageant est alors dialysé contre le tampon d'équilibration de la colonne de 2-iminobiotine agarose (= tampon pH 9,8 : 50 mM Na₂CO₃ pH 9,8 ; 0,5 M NaCl) puis filtré (filtres GF53 et GF52, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) et chargé sur la colonne de 2-iminobiotine-agarose équilibrée dans le même tampon. Après lavage dans le même tampon jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm de l'effluent atteigne la valeur de 0, la protéine est éluée par le tampon pH 2,9 (0,1 M Acide Acétique pH 2,9) et récolté dans un tube contenant du tampon Tris-HCl (2 mL ; 2 M ; pH7,4), immédiatement dialysée contre Tris-HCl (10 mM pH 7,4 ; 8 L ; 24 h ; 4 °C), contre l'eau déionisée (8 L ; 24 h ; 4°C) puis contre l'eau milliQ (5 L ; 24 h ; 4 °C). La protéine pure est alors filtrée (Filtres Millex 0,22 µm, Millipore, Volketswil, Suisse), congelée à - 80 °C, lyophilisée et stockée à 4 °C jusqu'à utilisation.

Ce protocole a été appliqué jusqu'à son terme avec la souche BL21(DE3)pLysS et seulement jusqu'à l'étape de dialyse dans le tampon pH 9,8 pour les extraits bactériens de la souche BL21(DE3), la quantification n'ayant jamais donné de résultats suffisants pour passer l'échantillon sur la colonne.

6.2. SYSTÈME FINAL

Le culot de bactéries est décongelé puis resuspendu dans la solution de resuspension 2 (100 mL ; voir § 5.2.). Quelques milligrammes de DNaseI (Roche, Rotkreuz, Suisse) sont alors ajoutés et l'échantillon est incubé sous légère agitation à température ambiante (3-4 h). Le volume est complété à 400 mL avec le chlorure de guanidium (6 M ; pH 1,5) puis est dialysé contre la même solution pour dénaturer la protéine (15 L ; 24 h ; température ambiante). Il s'en suit une dialyse de renaturation contre le Tris-HCl (20 mM ; pH 7,4 ; 10 L ; 24 h ; température ambiante), une centrifugation (20 000 g ; 30 min. ; 4°C), une concentration (jusqu'à ~ 100 mL ; 4 °C) et une diafiltration contre le tampon pH 9,8 en utilisant le système vivaflow 200.

L'échantillon est alors centrifugé (47 000 g ; 30 min. ; 4 °C), filtré (filtres GF53 et GF52, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) puis chargé sur la colonne de 2-iminobiotine équilibrée dans le même tampon. Après lavage jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit égale à 0, la protéine est éluée avec le tampon pH 2,9. L'éluât est ensuite dialysé une fois contre le Tris-HCl (10 mM ; pH 7,4 ; 8 L ; 24 h ; 4°C), puis contre l'eau distillée (8 L ; 24 h ; 4°C) et enfin contre l'eau milliQ (5 L ; 24 h ; 4°C). La protéine purifiée est alors congelée à – 80 °C, lyophilisée puis stockée à 4 °C jusqu'à utilisation.

6.3. PURIFICATION « TYPE S112P »

Les mutants S112P, S112G, K80G, T123G, S112G-T123G, P64G-S112G et S112G-N118T ont été purifiés par une méthode alternative. Le culot de bactéries est décongelé puis repris dans la solution de resuspension 2 (100 mL ; voir § 5.2.). Quelques milligrammes de DNaseI sont alors ajoutés et l'échantillon est incubé sous légère agitation à température ambiante (3-4 h). L'échantillon est dilué 10 fois dans le tampon pH 9,8 ($V_{\text{final}} \sim 2$ L). Après centrifugation (20 000 g ; 30 min. ; 4 °C) et filtration (filtres GF53 et GF52, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne), l'extrait protéique est chargé sur la colonne et traité comme décrit précédemment jusqu'à l'élution. Le volume d'élution est ensuite ramené à 400 mL avec le chlorure de guanidium (6 M ; pH 1,5), puis dialysé contre le même tampon (15 L ; 24 h ; température ambiante). S'en suivent 4 dialyses : deux contre Tris-HCl (20 mM pH 7,4 ; 8 L ; 24 h ; température ambiante et 10 mM pH 7,4 ; 10 L ; 24 h ; 4 °C), une contre l'eau distillée (8 L ; 24 h ; 4 °C) et une contre l'eau milliQ (5 L ; 24 h ; 4 °C). L'échantillon est ensuite filtré, lyophilisé et conservé à 4 °C.

6.4. QUANTIFICATION DE LA PROTÉINE DANS L'EXTRAIT CELLULAIRE

La quantification de la protéine durant les étapes de purification a été effectuée par spectrofluorimétrie selon la méthode décrite dans ¹³⁵. Elle a lieu juste avant l'étape de la chromatographie pour les productions en masse (soit dans un volume de ~ 400 mL, voir § 6.2) et après digestion des acides nucléiques dans le cas des cribalges de conditions de cultures de 50 mL (reprise dans 700 µL de tampon de resuspension 2 ; §5.3 + DNaseI 1 µL d'une solution à 1 mg/mL ; § 5.4.1).

1,5 μL de l'extrait d'une culture de 50 mL ou 4 μL d'extrait d'une culture de 10 L (volume optimal pour titrer une production comprise entre 10 et 200 mg de protéine active par litre culture) sont additionnés à 2,5 mL de solution A (100 mM NaCl ; 50 mM NaH_2PO_4 ; 1 mM EDTA ; pH 7,5 ajusté avec 1 M NaOH) dans une cuvette de spectrofluorimétrie. Les paramètres de mesure sont : $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ (fente de 5 nm) ; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ (fente de 5 nm) ; agitation douce.

L'extrait protéique est titré par des incréments de biotine-4-fluorescéine (5 μL d'une solution 15 μM ; solution mère de 0,6 mM diluée dans le DMSO, la concentration de travail est obtenue par dilution dans la solution A). La valeur de l'intensité de fluorescence est relevée 1 minute après l'addition de la biotine-4-fluorescéine. Les données sont retranscrites sous forme de courbe où l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction du nombre de moles de biotine-4-fluorescéine ajoutés. La concentration de streptavidine au point d'équivalence est donnée par la formule :

$$[\text{SAV}] = \frac{n_{\text{B4F}}}{4V_{\text{SAV}}}$$

Avec [SAV] la concentration de streptavidine (M), n_{B4F} le nombre de moles de biotine-4-fluorescéine ajoutés, et V_{SAV} le volume de l'extrait protéique utilisé lors de la mesure.

7. ANALYSE DES PROTÉINES PURIFIÉES

7.1. SPECTRE DE MASSE

La détermination des masses moléculaires de la streptavidine wild-type et des différents mutants par ESI-MS a été effectuée au sein du groupe du professeur Johann Schaller (Université de Berne). L'appareil utilisé est type « VG Platform Mass Spectrometer » (Micromass instruments, Manchester, UK).

7.2. TITRAGE DES SITES ACTIFS

7.2.1. Par la biotine-4-fluorescéine

Le titrage des sites actifs de la protéine pure a été effectué à l'aide de la biotine-4-fluorescéine par spectrofluorimétrie comme décrit dans ¹³⁵. Une solution mère de protéine dissoute dans l'eau milliQ (10 mg/mL ~ 152 µM) est diluée 75 fois (133 µg/mL ~ 2 µM). La concentration exacte de l'échantillon est déterminée par spectrophotométrie à $\lambda = 280$ nm (avec $\epsilon = 167\,280\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour la majorité des protéines, $\epsilon = 190\,040\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour S112W et pour S112Y, $\epsilon = 172\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Afin de quantifier la quantité de sels (= activité par Abs / activité par pesée), cette même concentration est calculée à partir de la masse et du volume de resuspension selon la formule :

$$C = \frac{m}{MV}$$

Avec C, la concentration ; m, la masse pesée ; M la masse molaire ; et V le volume de resuspension.

50 µL de la solution diluée de protéine (~ 100 pmol) est transférée dans la cuvette de mesure contenant de la solution A (2,45 mL, voir § 6.4.). Les paramètres utilisés pour la mesure sont les mêmes que décrit précédemment (§ 6.4). La biotine-4-fluorescéine (15 µM) est ajoutée par incréments de 2,5 µL. La mesure est effectuée 1 minute après l'ajout de biotine-4-fluorescéine. Les données sont transcrites sous forme de courbe où l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction de la quantité de biotine-4-fluorescéine ajoutée. Lorsque le point d'équivalence est déterminé, le nombre de sites actifs est calculé par la formule :

$$n_{Sites} = \frac{4[SAV_{mes}]}{[SAV_{th}]} = \frac{4n_{B4F}/4V_{SAV}}{[SAV_{th}]} = \frac{n_{B4F}}{[SAV_{th}]V_{SAV}}$$

Où $[SAV_{mes}]$ est la concentration de streptavidine mesurée, $[SAV_{th}]$, la concentration de streptavidine calculée par masse et par absorbance, n_{B4F} , le nombre de moles de biotine-4-fluorescéine ajouté et V_{SAV} , le volume de streptavidine titré (50 μ L).

7.2.2. Par exclusion du HABA par la biotine

Le titrage des sites actifs est effectué par spectrométrie visible (506 nm)¹³⁶. La protéine est diluée dans le tampon de titrage (2,4 mL ; 26 mM KH_2PO_4 ; 41 mM Na_2PO_4 pH 7,0 ; Merck, Dietikon, Suisse ; [protéine] = 8 μ M). Une solution de HABA (2-(4'-hydroxy-azobenzène) acide benzoïque) ; 9,6 mM ; 300 μ L dilué dans le tampon de titrage) est ajoutée et une première mesure est effectuée. La biotine (0,96 μ M diluée dans le tampon de titrage) est ajoutée par incréments de 5 μ L. A chacun des ajouts, l'absorbance à 506 nm est relevée et traitée sous forme de graphique où l'absorbance mesurée est exprimée en fonction du nombre de moles de biotine ajoutées.

Le nombre de sites actifs de la protéine au point d'équivalence est donné comme précédemment par la formule :

$$n_{sites} = \frac{n_{biot}}{[SAV_{th}]V_{SAV}}$$

Avec n_{biot} le nombre de moles de biotine ajouté ; $[SAV_{th}]$ la concentration de streptavidine et V_{SAV} le volume de streptavidine.

8. STABILITÉ THERMIQUE DE LA STREPTAVIDINE SEULE ET DE LA STREPTAVIDINE COMPLEXÉE AVEC LA BIOTINE ET DIFFÉRENTES MOLÉCULES BIOTINYLÉES

8.1. DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DES MUTANTS

Un aliquote de chaque mutant purifié (12 μL ; 1 mg/mL dilué dans l'eau milliQ stérile) auquel est ajouté le 5X-LB non dénaturant (3 μL ; 50 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10 % w/v Saccharose ; 0,006 % BBP) est chargé sur SDS-PAGE. Le gel est alors traité comme décrit dans le paragraphe 5.5.2. Le même type de traitement est effectué avec les mutants monomériques en présence de biotine (1 μL ; 0,6 M).

8.2. DÉNATURATION THERMIQUE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE

Une solution de protéine pure (1 mg/mL dans l'eau MilliQ) est divisée en 9 fractions (11 μL chacune) auxquelles on ajoute 1 μL de biotine (0,6 mM), de biotine-4-fluorescéine (0,6 mM dans DMSO), de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$ (0,6 mM dilué dans l'eau) ou d'eau. L'ensemble est équilibré sous agitation douce (5 min. ; température ambiante) puis le 5X-LB dénaturant ou non dénaturant (§ 5.1 et 8.1) est ajouté (3 μL).

Les échantillons sont placés 15 minutes à différentes températures : 25 °C (température ambiante), 37 °C dans un incubateur de type WTB Binder (Faust, Schaffhouse, Suisse) ; 45 °C dans un bloc chauffant de type PHC19 (Grant Boekel - Biolabo Scientific Instruments, Châtel-St-Denis, Suisse) ; 54, 63, 72, 82, et 90 dans un thermocycler type T-Gradient (Biometra - Biolabo Scientific Instruments, Châtel-St-Denis, Suisse) en utilisant un gradient 70/40 et en plaçant les échantillons respectivement dans les colonnes 3, 5, 7, 9 et 12 ; et 100 °C dans un bloc

chauffant de type Multi-Block Heater (Lab-Line – Unident, Genève, Suisse). Ils sont ensuite refroidis dans la glace et centrifugés brièvement avant d'être analysés par SDS-PAGE comme décrit § 5.5.2.

8.3. CINÉTIQUE DE DÉNATURATION

A 13 aliquotes de protéine (12 μ L ; 1 mg/mL dans l'eau MilliQ), on ajoute selon le cas le 5X-LB non-dénaturant (3 μ L). Les échantillons sont chauffés à 90 °C durant différents temps (temps précisés en fonction de l'expérience dans le chapitre des résultats), placés dans la glace, rapidement centrifugés et traités par SDS-PAGE comme décrit § 5.5.2.

9. ANALYSES DES CATALYSES ÉNANTIOSÉLECTIVES

9.1. ANALYSE DE LA PROTÉINE APRÈS CATALYSE PAR SPECTRE DE MASSE

Lors d'une réaction d'hydrogénation de l'acide acétamidoacrylique et de l'acide acétamidocinnamique, le milieu de catalyse est extrait à l'acétate d'éthyle de manière à isoler les produits de départ et d'arrivée de la réaction. La phase aqueuse de cette extraction est récupérée et dialysée contre le chlorure de guanidium (6 M ; pH 1,5 ; dialyse 15 L ; 24 h ; température ambiante). S'en suivent 4 dialyses : 2 contre le Tris-HCl (20 mM pH 7,4 ; 8 L ; 24 h ; température ambiante et 10 mM pH 7,4 ; 10 L ; 24 h ; 4 °C), une contre l'eau distillée (8 L ; 24 h ; 4 °C) et une contre l'eau milliQ (5 L ; 24 h ; 4 °C). L'échantillon est ensuite filtré, lyophilisé et conservé à 4 °C. 1 à 2 mg sont envoyés au service de spectrométrie de masse du professeur Schaller (Université de Berne).

9.2. ANALYSES DES CATALYSES PAR SDS-PAGE

Un ou plusieurs aliquote(s) de milieu réactionnel de catalyse contenant 10 µg de protéine sont complétés à 12 µL avec de l'eau milliQ stérile. Les échantillons sont chargés sur SDS-PAGE et sont traités comme décrit dans le paragraphe 8.1 ou 8.2 selon le cas.

10. CRIBLAGE DE LA FONCTIONALITÉ DES MUTANTS EN PARTANT DE MINICULTURES DE 4 mL

Les culots des minicultures de 4 mL (§ 5.3) sont décongelés et resuspendus dans la solution de resuspension 2 (§ 5.2 ; 600 µL). La DNaseI est ajoutée (1 µL ; 1 mg/mL ; § 5.4.1) et les échantillons sont incubés 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Les extraits bactériens sont alors vortexés (5 min.) puis centrifugés (16 000 g ; 5 min. ; température ambiante). La fraction soluble est transférée dans un nouveau tube.

10.1. CRIBLAGE PAR SDS-PAGE

Un aliquote de fraction soluble (11 µL) est mélangé à la biotine-4-fluorescéine (1 µL ; 0,6 mM) et incubé (15 min. ; température ambiante). Le tampon de charge non-dénaturant (3 µL, § 9.2) est ajouté et le tout est chargé sur gel SDS-PAGE et traité comme décrit § 8.2.

10.2. ANALYSE PAR PLAQUE ELISA

L'analyse est effectuée sur plaque ELISA 96 puits. Chaque fraction soluble (50 µL) est diluée dans la solution A (120 µL ; § 6.4). Une première mesure est effectuée dans le lecteur de

plaque ELISA (paramètres : filtre d'excitation : 485/20 ; filtre d'émission : 530/25 ; sensibilité 20 ; 2 scans de 27 secondes). La biotine-4-fluorescéine est ajoutée (5 μ L par puits d'une solution à 8 μ M). La plaque est ensuite mise sous agitation douce (5 min. ; température ambiante), centrifugée (1 500 g ; 2 min. ; température ambiante) sur centrifugeuse de modèle Labofuge 400R (Heraeus – Faust, Schaffhouse, Suisse) et une nouvelle mesure est effectuée après 5 minutes d'incubation dans l'appareil (dans le noir).

Trois ajouts de biotine-4-fluorescéine sont effectués successivement. Les résultats sont analysés sous forme de courbe où l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction du nombre d'ajouts (~ nombre de moles de biotine-4-fluorescéine).

11. CRIBLAGE DE LA FONCTIONALITÉ DES MUTANTS PRODUITS EN PLAQUES DE CULTURES

Les plaques de cultures sont décongelées à température ambiante puis les cellules sont reprises dans la solution de resuspension 2 contenant la DNaseI (50 μ L pour les plaques ELISA 96 puits ; 100 μ L pour les plaques de 48 puits et 200 μ L pour les plaques de 24 puits) et incubées jusqu'à digestion totale des acides nucléiques sous agitation douce. Les plaques sont alors centrifugées et un aliquote (50 μ L) d'extrait cellulaire est transféré dans une plaque ELISA 96 puits. Ces échantillons sont alors traités comme décrit dans le § 10.2.

12. « REDESIGN » DU GÈNE

Le « redesign » du gène a été effectué sur ordinateur en utilisant les logiciels Edit-Seq (DNA-star) et le site Webcutter 2,0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>). Les différentes étapes pour arriver au gène optimisé seront décrites dans la partie résultats.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

La catalyse énantiosélective effectuée par des métalloenzymes artificielles nécessite une approche combinatoire. L'optimisation des catalyseurs requiert une grande quantité de matériel (protéine, complexes biotinylés etc) et d'essais. Dès que les conditions sont définies, une grande diversité des composants du système (plusieurs complexes catalytiques, plusieurs substrats, plusieurs mutants) est indispensable. Ce travail s'inscrit dans cette démarche combinatoire.

Nous étudierons dans un premier temps, la caractérisation du plasmide utilisé pour la production de la protéine, puis l'optimisation de la production et de la purification de la streptavidine wild-type. Nous nous intéresserons par la suite au « design » et à l'obtention de 30 mutants générés par mutagenèse dirigée et par mutagenèse de saturation. Nous développerons ensuite la caractérisation de ces mutants et la mise en place d'une méthode alternative de purification pour certains d'entre eux. Les résultats de catalyse seront montrés au travers d'articles et d'expériences complémentaires. Nous verrons ensuite la mise au point de méthodes de criblage de la fonctionnalité des mutants ainsi qu'une application de ces criblages sur une librairie de 8 000 mutants obtenus par mutagenèse de saturation sur trois codons successifs. Enfin, nous nous intéresserons au « redesign » du gène dans le but de diviser le gène en plusieurs cassettes afin d'y d'insérer des séquences aléatoires plus longues.

Un article a été publié dans la revue *Chimia* pour résumer l'ensemble des projets biologiques de notre groupe (Voir annexe 1 : Zocchi *et al* 2003).

1. CARACTÉRISATION DU PLASMIDE pET11b-SAV

1.1. SÉQUENCES ET CARTOGRAPHIE DE RESTRICTION

Le plasmide pET11b-SAV a été fourni par le Professeur Santambrogio (Université de Milan). Le gène de la streptavidine mature (480 pb ; soit les acides aminés 15 à 159) suivi d'une séquence d'environ 40 pb (issues du plasmide de clonage) est inséré dans le plasmide pET11b (Novagen) de 5 677 pb en aval de la séquence du T7-tag, un peptide capable de solubiliser la protéine et de servir de marqueur immunologique¹⁰³. L'insertion du gène est effectuée au niveau du site BamHI du plasmide, préalablement soumis à une opération de « fill-in ». Le plasmide ainsi obtenu comporte 6 197 pb (Fig. 3.1).

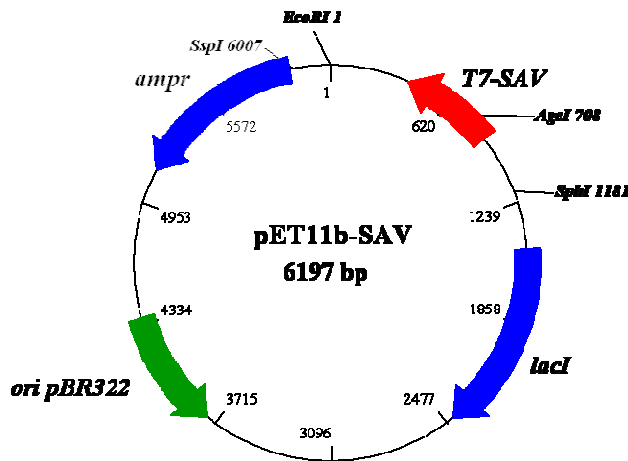


Figure 3.1 : Carte du plasmide pET11b-SAV. En bleu, le gène de la β -lactamase et le gène lac I codant pour le répresseur de l'opéron lactose, en vert, l'origine de réplication du plasmide pBR322, en rouge, le gène de la streptavidine.

La séquence codante et la séquence protéique de la « T7-mature-Streptavidine » sont montrées figure 3.2.

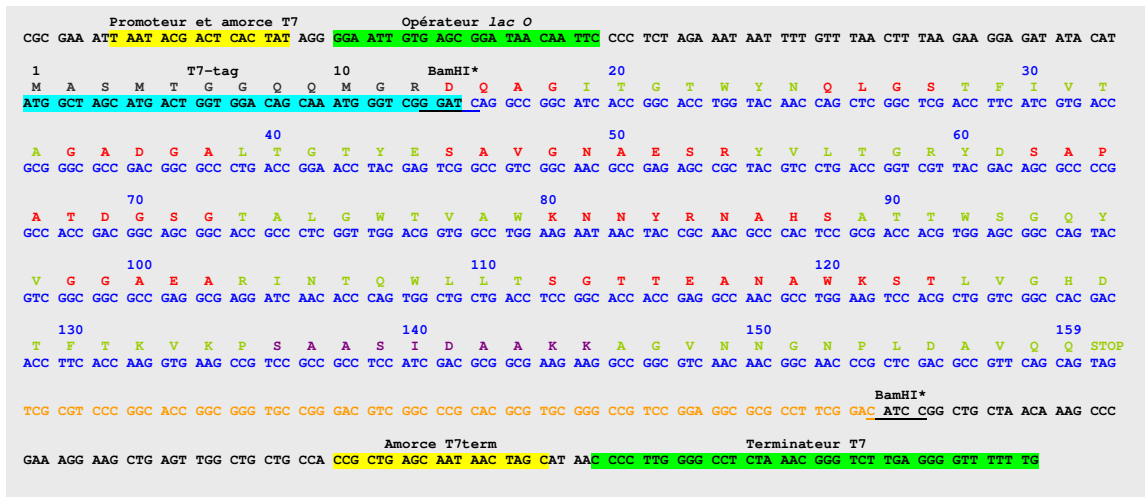


Figure 3.2 : Séquence du plasmide pET11b-SAV comprise entre le promoteur du phage T7 et le terminateur T7. Les parties appartenant au plasmide pET11b sont en noir, le gène de la mature streptavidine est en bleu, la séquence issue du plasmide de clonage est en orange. Les séquences du promoteur, de l’opérateur *lac O*, du T7-tag, de l’amorce T7term et du terminateur sont surlignées. Les sites BamHI disparus lors du clonage sont indiqués. Sur la séquence de la protéine, le T7-tag est en noir, les boucles sont en rouge, les brins β sont en vert et l’hélice α en C terminal est en violet (voir § 5.3).

La taille du plasmide est vérifiée par analyse de restriction. Les enzymes choisies pour cette analyse sont SphI et SspI. Ces deux enzymes possèdent un site unique de coupure sur le plasmide. La double digestion doit générer un fragment de 1750 pb et un second de 4447 pb. Notre laboratoire ne possède pas le plasmide pET11b vide, les témoins négatifs sont effectués avec le plasmide pET3c (4640 pb), les tailles théoriques des fragments générés par une double digestion SphI – SspI sur ce plasmide sont de 1034 pb et 3606 pb.

L’analyse des digestions sur gel d’agarose est montrée sur la figure 3.3.

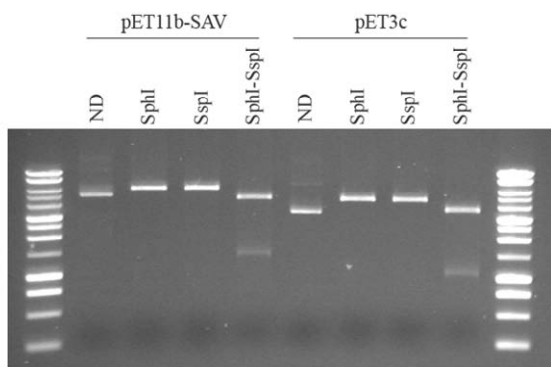


Figure 3.3 : Analyse de restriction des plasmides pET11b-SAV et pET3c sur gel d'agarose. Le marqueur de taille est de type Bench-Top 1kb Ladder (Promega – Catalyst). Les tailles des bandes sont de 10 ; 8 ; 6 ; 5 ; 4 ; 3 ; 2,5 ; 2 ; 1,5 ; 1 ; 0,75 ; 0,5 et 0,25 kb.

Lorsqu'ils ne sont pas digérés, les deux plasmides se trouvent majoritairement sous forme surenroulée (migration à environ 5 kb pour pET11b-SAV et environ 4 kb pour le plasmide vide), quelques traces de plasmide circulaire ouvert apparaissent également à près de 10 kb pour le premier et vers 8 kb pour le second. Lorsqu'ils sont linéarisés par une simple digestion, les deux plasmides se trouvent à la taille attendue. De même, les bandes générées par les deux doubles digestions apparaissent à la bonne taille.

1.2. PCR T7 - T7term ET PCR SAV-EcoF - SAV-BamR

Dans le plasmide pET11b-SAV, le gène de la streptavidine est inséré entre les amorces universelles T7 et T7term¹³⁷. Deux autres amorces (SAV-EcoF et SAV-BamR) ont été dessinées par le Dr Andrea Zocchi au début et à la fin du gène pour le cloner dans un vecteur de levure (Fig. 3.4).



Figure 3.4 : Positions des amorces utilisées pour amplifier le gène.

La figure 3.5 montre les résultats des PCR effectuées avec différentes combinaisons de paires d'amorces sur les plasmides pET11b-SAV et pET3c. Lorsqu'il est soumis à une PCR T7 - T7term, le plasmide pET11b-SAV (piste n°1) ne donne aucune amplification (malgré un certain nombre d'essais notamment en faisant varier la température d'hybridation des amorces). Les mêmes amorces appliquées sur le pET3c (piste n°5) donnent une bande à la bonne taille (191 pb).

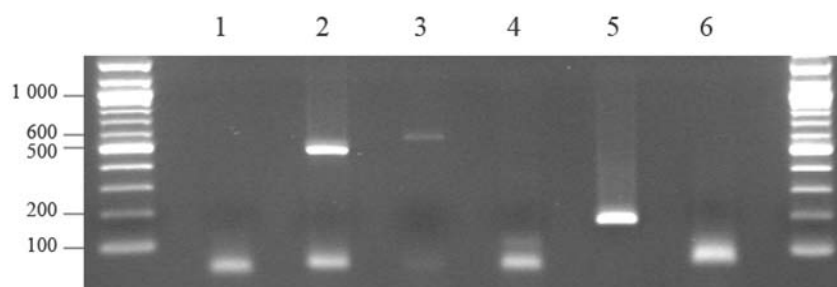


Figure 3.5 : Gel d'analyse des PCR. Les combinaisons des amorces sur le plasmide pET11b-SAV sont T7 - T7term (piste 1) ; SAV-EcoF - SAV-BamR (piste 2) ; T7 - SAV-BamR (piste 3) ; SAV-EcoF - T7term (piste 4). Les combinaisons sur le plasmide pET3c sont T7 - T7term (piste 5) et SAV-EcoF - SAV-BamR (piste 6).

Les amorces SAV-EcoF et SAV-BamR génèrent une bande à 480 pb (soit la taille attendue) lorsqu'elles sont utilisées avec le plasmide pET11b-SAV (piste n°2). Aucune bande n'est observable avec ces deux amorces appliquées sur le plasmide pET3c (piste n°6).

La combinaison T7 - SAV-BamR sur le plasmide pET11b-SAV (piste n°3) permet d'obtenir un fragment à environ 630 pb, soit la taille attendue. Enfin l'amplification par SAV-EcoF et T7term génère un fragment de faible intensité à environ 100 pb au lieu des 495 pb souhaitées (piste n°4).

Lors d'un séquençage effectué sur un séquenceur type Licor sur le plasmide pET11b-SAV, l'amorce T7 donne une séquence totalement aberrante et l'amorce T7term permet d'obtenir

la séquence du T7-tag suivie de celle des 10-15 derniers codons de la séquence de la streptavidine.

Selon toute vraisemblance, le gène forme une structure secondaire stable à 72 °C au niveau de la zone d'hybridation de l'amorce SAV-EcoF. Lors d'une amplification T7-T7term, les polymérase de PCR (Taq Polymerase et Pfu Polymerase de Promega – Catalyst ; Turbo Pfu de Stratagene ou HF Polymerase de Roche) ou la séquenase ne détectent pas cette structure secondaire et amplifient un fragment tronqué. La séquence du gène est soumise au site <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold> spécialisé dans la prédiction de structures secondaires des acides nucléiques¹³⁸. Les structures calculées à 72 °C sont montrées sur la figure 3.6. Les structures proposées semblent plausibles, mais le résultat obtenu ne se borne qu'à des structures entre séquences voisines et non sur la totalité du gène.

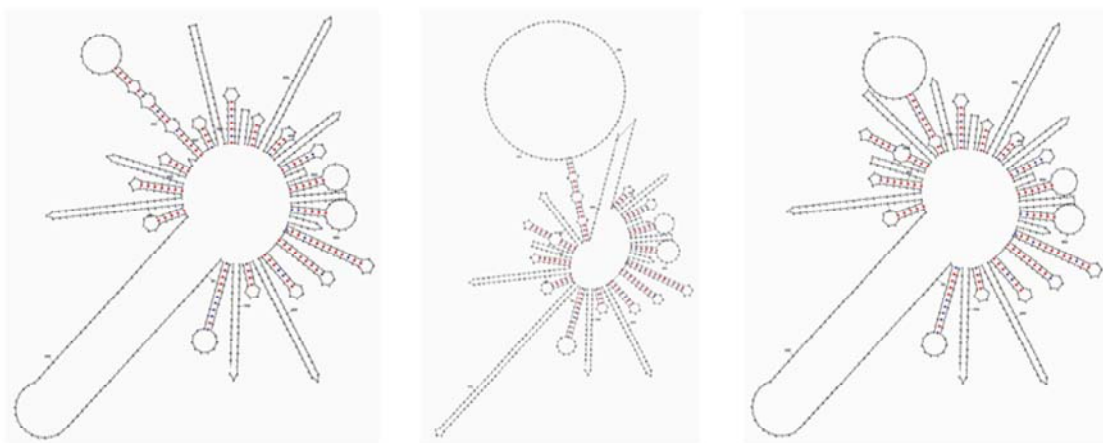


Figure 3.6 : Structures secondaires du gène de la T7-tag-Mature- Streptavidine calculées à 72 °C par le site <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>.

Deux molécules sont connues pour empêcher la formation de structures secondaires durant une PCR : le DMSO et le glycérol¹³⁹⁻¹⁴¹. Un test de PCR en variant la température d'hybridation et la concentration en DMSO permet de déterminer que les conditions optimales d'amplification du gène par T7 et T7term sont : 45 °C d'hybridation et 5 % v/v de DMSO (Fig.

3.7). Malgré tout, cette amplification ne donne pas un résultat très satisfaisant, puisqu'une bande aspécifique apparaît aux alentours de 550-600 pb.

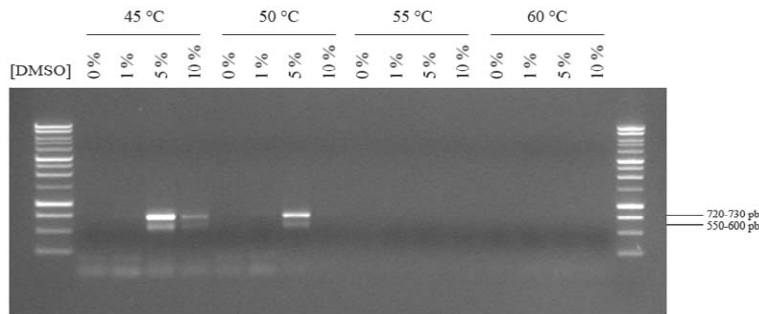


Figure 3.7 : Criblage des conditions de PCR en utilisant les amorces T7 et T7term sur le plasmide pET11b-SAV.

L'ajout de 5 % de DMSO dans la réaction de séquençage de type Licor, permet d'obtenir une séquence complète du gène. L'amorce T7term donne de meilleurs résultats que T7, mais ce type de séquençage donne un trop grand nombre d'incertitudes pour être exploité. L'amplification aspécifique observée sur la figure 3.7 est probablement à l'origine de ces incertitudes.

2. PRODUCTION DE LA STREPTAVIDINE PAR *Escherichia coli*

2.1. SYSTÈME INITIAL

La multiplicité des projets utilisant l'avidine et la streptavidine dans notre groupe, nécessite une production de l'une et l'autre des protéines en grande quantité. Inspirés par les travaux de l'équipe du Professeur Santanbrogio (Université de Milan), nous avons tenté de produire la streptavidine dans la souche d'*Escherichia coli* BL21(DE3) dans le milieu TP à 25 °C¹⁰³.

En théorie, les cellules doivent croître en moins de 4 heures pour obtenir une densité optique de 0,800 et être inductibles. Malgré un certain nombre d'essais, les cellules ne poussent pas d'une manière satisfaisante et notre production ne dépasse pas les 8 mg de protéine par litre

de culture (soit un rendement d'environ 13 % en comparaison des 60-70 mg/L de culture obtenus par Santambrogio).

La figure 3.8 montre un exemple de croissance des cellules d'une culture de 1,5 L effectuée dans un fermenteur en utilisant les conditions de Santambrogio. La phase exponentielle n'est atteinte qu'au bout de 5 heures à une absorbance à 600 nm de 0,285 ; une heure après l'induction. A la fin de la culture, l'absorbance à 600 nm n'est que de 0,720.

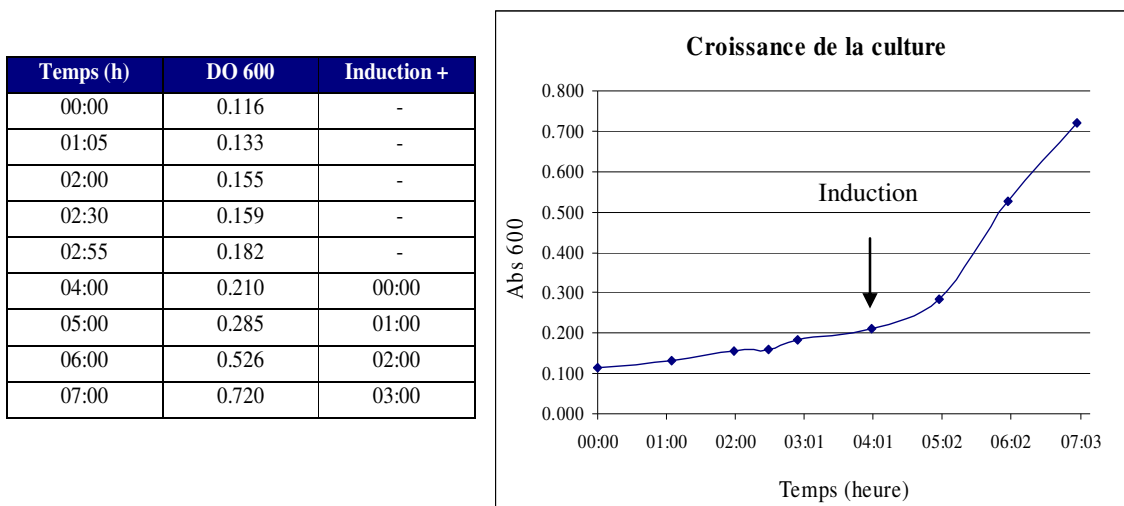


Figure 3.8 : Exemple de courbe de croissance lors d'une culture effectuées selon les paramètres définis par Santambrogio.

Le gel d'analyse par SDS-PAGE de cette culture (Fig. 3.9) montre que la protéine (dont l'expression est cytoplasmique)^{103,137}, se trouve sous forme de corps d'inclusion et que sa production est importante avant l'induction des cellules (contrairement à ce qui a été décrit¹⁰³). De plus, la quantité de protéine par bactérie décroît à partir de deux heures après l'induction. Ceci suggère que les bactéries ayant perdu le plasmide commencent à se multiplier dès qu'il n'y a plus d'ampicilline dans le milieu. Les profils des autres bandes du gel étant à peu près les mêmes, on peut exclure une quelconque contamination.

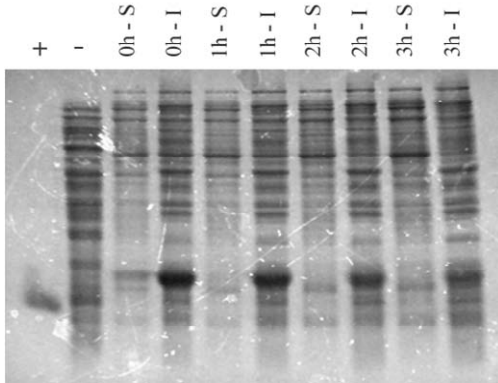


Figure 3.9 : SDS-PAGE d'une culture de 1,5 L effectuée dans les conditions définies par Santambrogio. + = « Recombinant core streptavidin » commercial ; - = extrait d'une culture effectuée avec des bactéries transformées par le plasmide pET3c vide. 1h - S = fraction soluble d'un échantillon prélevé au bout d'une heure après l'induction. 1h - I = fraction insoluble d'un échantillon prélevé une heure après l'induction.

Les corps d'inclusions sont connus pour être un moyen d'inhiber les protéines toxiques pour la bactérie¹³⁷. La protéine toxique est agglomérée et inactivée. De part sa capacité à fixer la biotine et les protéines biotinyllées d'une manière irréversible, la streptavidine s'avère être un véritable poison pour la bactérie par inhibition de la synthèse des acides gras et donc de la formation de la membrane plasmique de la bactérie⁵². Malgré tout, une faible partie de la protéine se trouve sous forme soluble avant induction et l'on peut penser qu'elle est active, ralentissant, voire inhibant la croissance des cellules déjà rendue difficile par la faible température de culture (25 °C au lieu de 37 °C pour une croissance optimale).

Cette expression basale provient probablement d'une dérégulation du système de production de la protéine. Ce système est basé sur l'induction indirecte du gène de la streptavidine¹³⁷. La Figure 3.10 montre les différents niveaux de régulation de l'expression de la protéine dans le système pET11b / *E. coli* BL21(DE3). Le gène de la streptavidine est sous la dépendance du promoteur de l'ARN-polymérase du phage T7 couplé à l'opérateur de l'opéron lactose (*lac o*). Ce promoteur n'est reconnu par aucune polymérase endogène de la bactérie, seule l'ARN-polymérase du phage T7 peut le reconnaître.

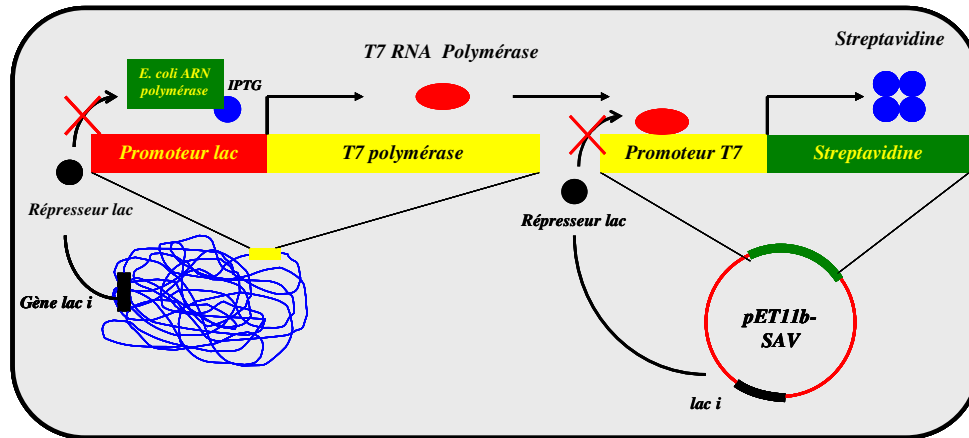


Figure 3.10 : Régulation de la production de la streptavidine par *E. coli* BL21(DE3) au moment de l'induction.

Le gène ARN-polymérase du phage T7 est sous la dépendance du promoteur *lacUV5*, un promoteur dérivé de l'opéron *lac* insensible à l'AMP cyclique (= AMPc) capable d'activer le promoteur^{137,142,143}. Le promoteur *lacUV5* est régulé négativement par l'inhibiteur Lac I dont le gène est présent dans le génome de la bactérie et dans le plasmide. Cet inhibiteur se fixe sur l'opérateur *lac O* présent dans *lacUV5* et en amont du gène de la streptavidine. Sa fixation est renforcée par la présence de glucose et est levée par la présence de galactose ou de galactosides tels que l'IPTG.

La forte production de la streptavidine avant l'induction des cellules indique une levée de la régulation de *lacUV5* et du promoteur de la streptavidine par le répresseur Lac I. D'où vient cette levée de la répression ? Il est connu qu'en biologie cellulaire, le rendement de production d'une protéine par une cellule de mammifère varie considérablement selon l'origine des composants du milieu de culture (notamment le sérum de veau fœtal)¹⁴⁴. On peut supposer qu'il en va de même chez la bactérie et que la balance galactoside/glucose soit différente dans les composants du milieu de Santambrogio par rapport au notre (d'où les différences de rendement),

bien que ses conditions et les conseils qu'il nous a donnés oralement lors d'une visite dans son laboratoire, aient été scrupuleusement suivies¹⁰³.

Plusieurs améliorations peuvent être apportées pour obtenir une meilleure croissance des cellules et une production plus élevée de streptavidine soluble^{74,137} :

- i) Augmenter la température de culture pour accélérer la croissance des cellules.
- ii) Ajouter du glucose dans le milieu pour inhiber le promoteur de l'opéron lactose jusqu'à l'induction.
- iii) Utiliser une souche de bactérie adaptée à la production de protéines toxiques.
- iv) Cultiver les cellules dans un milieu plus riche que le TP.

2.2. OPTIMISATIONS DU PROTOCOLE DE PRODUCTION DE LA STREPTAVIDINE

Différentes conditions de cultures sont mises au point et caractérisées par SDS-PAGE, par quantification d'extraits cellulaires (via la biotine-4-fluorescéine) ou par pesée de protéine pure lyophilisée (Tableau 3.1). En utilisant les conditions standards de Santambrogio (entrée 1), l'absorbance d'induction de 0,800 est obtenue dans le meilleur des cas au bout de 5h25 (ce temps pouvant aller jusqu'à 8 heures, non montré). L'absorbance finale n'est que de 1,800.

D'autres essais où le moment de l'induction est fixé à maximum 4 heures après le début de la culture (temps au bout duquel l'ampicilline est dégradée) ne sont pas plus concluants. Les bactéries ne poussent pas ou très peu que ce soit en présence ou non de glucose dans la préculture (entrées 2 et 3, $Abs_{600\text{ nm}} = 0,720$ et $0,321$ respectivement). De plus, la protéine se trouve sous forme de corps d'inclusions.

2.2.1. Effet du glucose et de la température

L'ajout de glucose dans la culture et surtout l'augmentation de la température de culture influent considérablement sur la croissance des cellules (entrées 4 et 5). A 25 °C en présence de glucose, les bactéries deviennent inductibles après 2 heures 30. La streptavidine dont la production est inhibée, n'empêche plus la croissance des cellules.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Souche de bactéries	DE3 ^a	DE3	DE3	DE3	DE3	pLysS	pLysS	pLysS	pLysS
Température (°C)	25	25	25	25	37	30	37	37	37
Présence de glucose (1 %) dans la boîte de Petri	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Présence de glucose (1 %) dans la préculture	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui
% de glucose dans la culture	0	0	0	0,2	0	0	0,4	0	0,4
Volume de culture	1.5 l	1 l	1 l	1.5 l	1 l	1 l	1 l	10 l	10 l
Abs _{600 nm} à l'induction	0.8	0.21	0.172	0.62	2.26	0.66	1.048	0.724	1.04
Moment de l'induction après le début de la culture	5h25	4h00	4h00	2h30	03:10	03:35	02:35	01:30	03:30
Abs _{600 nm} finale	1.8	0.72	0.321	1.6	8.3	2.38	4.66	2.76	5.1
Durée de la culture	9h25	7h00	7h00	5h35	06:30	06:35	05:35	04:30	06:30
SDS-PAGE ^b	Pas de gel	100 % CI	90 % CI	90 % CI	90 % CI	80 % S	80 % S	80 % S	80 % S
Rendement (mg / L de culture)	8.06	ND	ND	ND	ND	20.1	59.13	19.6	54.82
Technique utilisée	B4F ^c					B4F	B4F	pesée	pesée

^a : DE3 = Souche B121(DE3) ; pLysS = Souche BL21(DE3)pLysS.
^b : CI = Présence de la protéine dans les corps d'inclusion ; S = Protéine présente dans la fraction soluble de l'extrait bactérien
^c : B4F = Quantification de l'extrait bactérien par la Biotine-4-Fluorescéine.

Tableau 3.1 : Rendements et conditions de culture de cellules exprimant la streptavidine.

Concernant la température, à 37 °C la croissance est optimale (Abs_{600 nm} = 8,300), mais le rapport protéine soluble / protéine insoluble diminue. Ce résultat n'est pas surprenant, car un abaissement de la température de culture induit généralement une augmentation de la solubilité d'une protéine au sein du cytoplasme de la bactérie¹³⁷.

2.2.2. Utilisation de la souche BL21(DE3)pLysS

Bien que les problèmes de croissance de la souche BL21(DE3) puissent être résolus par l'addition de glucose dans la culture et/ou une augmentation de la température, la protéine se trouve très majoritairement dans les corps d'inclusion. Un changement de souche de bactérie

apparaît comme une possibilité pour obtenir une protéine solubilisée. Notre choix s’est porté sur la souche BL21(DE3)pLysS adaptée à la production de protéines toxiques¹³⁷. Cette souche porte le plasmide pLysS codant pour le lysozyme, l’inhibiteur naturel de l’ARN-polymérase du phage T7 (Figure 3.11). En inhibant l’activité de la polymérase, le lysozyme inhibe ainsi la production de streptavidine¹⁴⁵.

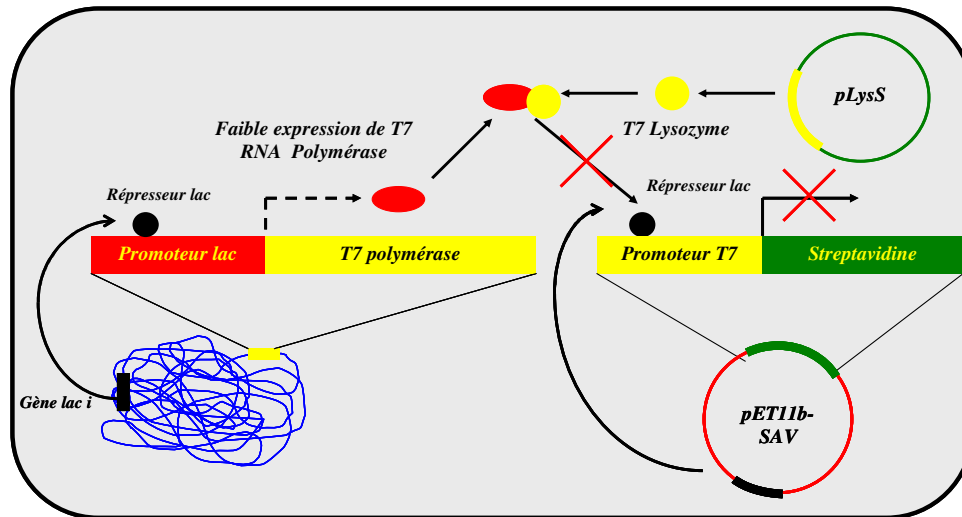


Figure 3.11 : Régulation de la production de streptavidine par le système BL21(DE3)pLysS.

Le lysozyme présente un autre avantage, il catalyse la digestion du peptidoglycane de la paroi bactérienne, permettant ainsi la lyse des cellules par simple congélation / décongélation¹⁴⁶. Le plasmide pLysS apporte de plus, une résistance au chloramphénicol à la bactérie qui supplée l’action de la β -lactamase (résistance à l’ampicilline apportée par le plasmide pET11b) dont l’action est limitée dans le temps. En outre, il porte les séquences codant pour les ARNt des codons peu utilisés par la bactérie. Ces ARNt permettent la production de protéines en grande quantité quels que soient les codons que porte leur gène (y compris les protéines eucaryotes)¹³⁷.

En l’absence de glucose, les cellules BL21(DE3)pLysS permettent d’obtenir une bonne solubilisation de la protéine et un rendement de 20 mg/L de culture quelle que soit la température

(30 °C et 37 °C), la croissance est logiquement plus rapide à 37 °C (Tableau 3.1, entrées 6 ; 7 et 8). Malheureusement, une expression basale de la protéine est toujours observable. En présence de glucose (0,4 % w/v), la solubilisation de la protéine semble être la même, mais le rendement passe à 55-60 mg/L de culture (Fig. 3.12). Ce rendement est le même que l'on se trouve dans un fermenteur de 2 L (1 L de culture) ou de 15 L (culture de 10 L ; Tableau 3.1, entrées 7 et 9)

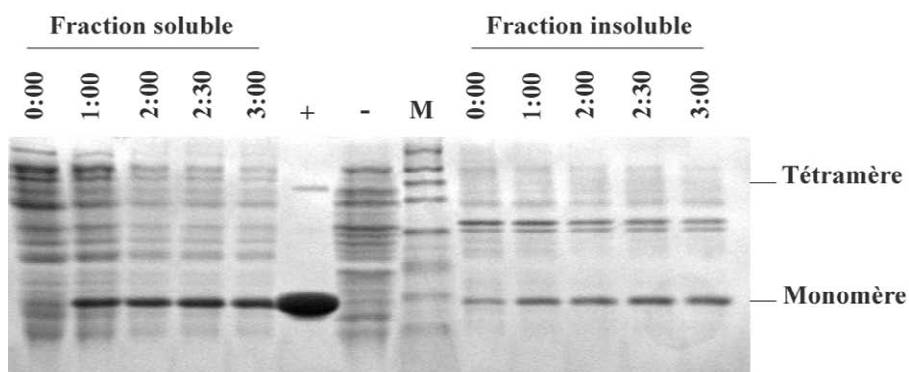


Figure 3.12 : SDS-PAGE d'une culture effectuée avec la souche BL21(DE3)pLysS en présence de 0,4 % de glucose. Le temps est comptabilisé à partir du moment de l'induction.

La double régulation glucose / système pLysS apparaît comme étant la bonne combinaison pour éliminer l'expression basale de la streptavidine. Les cellules croissent alors sans la moindre gêne avant l'induction et produisent une grande quantité de protéine soluble. Toutefois, au delà de 3 heures après induction, les bactéries entrent en phase de saturation, leur croissance est dans un premier temps ralentie, puis dans un deuxième, elle chute rapidement (voir paragraphe suivant), suite à l'empoisonnement des cellules.

2.2.3. Tests de milieux

De nombreux milieux de culture existent et il semble intéressant de comparer certains d'entre eux. De même, la concentration en glucose de 0,4 % w/v peut potentiellement être

optimisée^{74,137}. Le milieu LB (Luria Bertani¹³³) fréquemment utilisé en biologie moléculaire et pour la production de protéines, le milieu TP¹⁰³ et le milieu TB (terrific broth) un milieu particulièrement riche lui aussi utilisé en production de protéine sont comparés¹³³. Une augmentation de la concentration de glucose dans le TP est également testée. Enfin une culture dans le milieu TP en présence de 0,4 % de glucose mais dont la préculture est incubée en absence d'antibiotique est effectuée. Les courbes de croissance obtenues sont montrées figure 3.13.

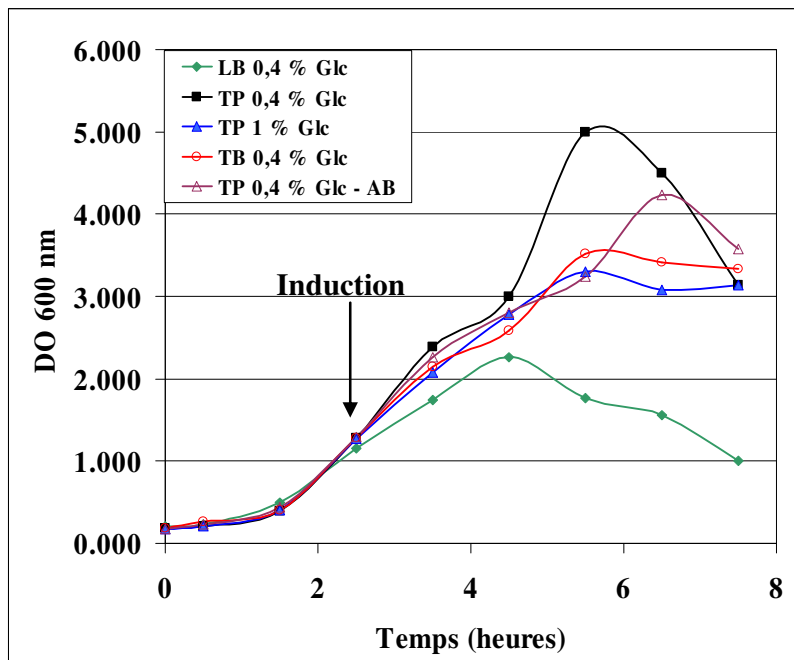


Figure 3.13 : Croissance des cellules lors des tests de milieux.

Au regard des courbes de croissance, il apparaît que c'est dans le TP 0,4 % w/v glucose que les bactéries poussent le mieux, le maximum de cette croissance étant atteint au bout de 3 heures après induction avant une chute significative. Le LB moins riche que les deux autres milieux donne un pic de croissance de faible amplitude à induction + 2 heures. Le TB (plus riche que le TP), le TP 1 % w/v glucose et le TP 0,4 % w/v glucose sans antibiotique dans la préculture donnent des résultats similaires, un maximum de croissance 3 heures après induction suivi d'une décroissance lente.

Le gel d'analyse (Fig. 3.14) montre que dans toutes les conditions, la production de protéine par bactérie (le volume de reprise de l'échantillon étant basé sur son absorbance à 600 nm, le gel traduit la quantité de protéine par bactérie) est la même et ce, dès 2 heures après induction y compris quand la quantité de cellules décroît. Il apparaît donc que les conditions de culture optimales sont celles qui permettent une croissance maximale des bactéries, c'est à dire, milieu TP, 0,4 % w/v de glucose, 37 °C dans BL21(DE3)pLysS.

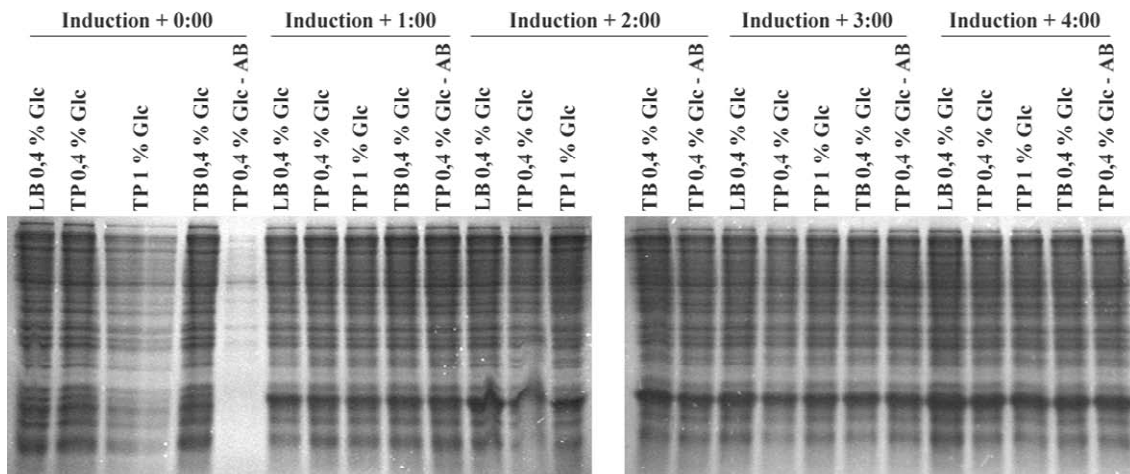


Figure 3.14 : Gels d'analyse des cultures de tests de milieux.

Lors d'une culture, la concentration de phosphate du milieu a été accidentellement changée. La décroissance des cellules observée après 3 heures est retardée avec ce nouveau milieu et la quantité de bactéries finale est plus importante. Nous avons appelé ce milieu MTP (modified TP), sa formulation est : 20 g/L Bactotryptone ; 1,3 g/L Na_2HPO_4 , 1 g/L KH_2PO_4 ; 8 g/L NaCl ; 15 g/L Bacto yeast extract.

2.2.4. Choc osmotique des cellules

Le fermenteur utilisé permet son propre autoclavage avec le milieu de culture. Le temps d'autoclavage étant supérieur au temps d'autoclavage « classique » (respectivement 30 et 20

minutes), le glucose est stérilisé séparément puis ajouté stérilement au milieu autoclavé, pour éviter qu'il ne caramélise dans le fermenteur. Lorsque la préculture est mélangée au 20 % glucose avant d'inoculer le milieu de culture, le rendement passe alors de 50-60 mg/L de culture à 120-160 mg/L.

Il semble qu'un stress osmotique des bactéries avant la mise en culture, ait un effet positif sur la production de la protéine. De plus, les courbes de croissance sont beaucoup plus reproductibles qu'en absence de ce stress (non montré). La forte concentration de glucose (~ 11,4 % w/v) à laquelle sont soumises les bactéries doit entraîner une inhibition totale du promoteur *lacUV5*, mais ce n'ai vraisemblablement pas la seule explication à ce doublement du rendement de production. Quels sont les phénomènes physiologiques ou métaboliques mis en jeu ? Nous n'avons à ce jour aucune explication.

2.2.5. Choix du moment de l'induction

Comme nous l'avons vu, quelles que soient les conditions de culture, le rapport quantité de protéine / nombre de bactéries, est constant. Selon toute logique, plus les bactéries croissent, plus la production de protéine est élevée. En retardant l'induction, les bactéries sont plus nombreuses à la fin de la culture. La Figure 3.15 montre la corrélation entre la densité optique des bactéries au moment de l'induction et la quantité de protéine récupérée en fin de purification de différentes cultures de streptavidine wild-type.

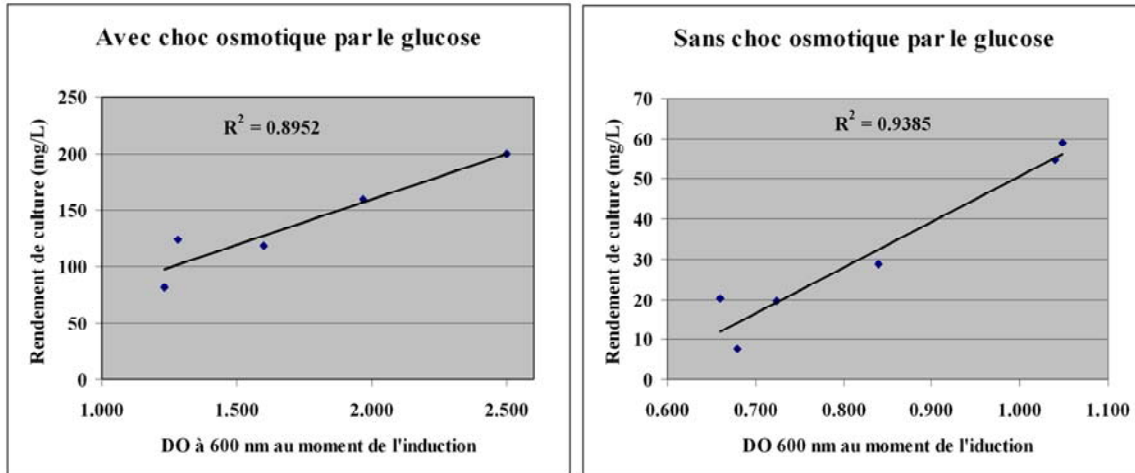


Figure 3.15 : Corrélation entre le rendement des cultures et le moment de l'induction.

Il apparaît qu'avec ou sans choc osmotique en début de culture, il y ait bien un lien entre la densité optique des bactéries au moment de l'induction et la quantité de protéine récupérée. Toutefois, lorsque l'induction est effectuée à une absorbance de 4,000, le rendement est identique à celui d'une culture induite à 2,500 (200-210 mg/L de culture). Il est probable que la culture induite à 4,000 ait eu un rendement supérieur et qu'il y ait eu des pertes lors de la purification (cette dernière n'étant vraisemblablement pas adaptée à de trop hautes concentrations en protéine). Mais ce rendement est loin des 300 mg/L espérés et tout laisse à penser que la corrélation moment de l'induction / rendement de culture n'est linéaire que jusqu'à un maximum qui reste à déterminer.

3. PURIFICATION DE LA STREPTAVIDINE

3.1. TRAITEMENT DE L'EXTRAIT BACTÉRIEN AVANT PURIFICATION PAR COLONNE D'IMINOBIOTINE

Les différentes étapes de purification de la protéine ont dans un premier temps, suivi le protocole défini par Santambrogio¹⁰³, auxquelles sont ajoutées deux dialyses contre l'eau et la

lyophilisation de la protéine. Une zone d'ombre apparaît dans ce protocole : les cellules sont reprises dans le tampon de resuspension 1 (20 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 1 mM PMSF ; 0,02 % w/v NaN₃) mais la colonne d'iminobiotine nécessite que l'échantillon se trouve dans son tampon d'équilibration (50 mM NaHCO₃ pH 9,8 ; 0,5 M NaCl) et aucune information n'apparaît sur la manière de passer de l'un à l'autre. Plusieurs conditions sont appliquées (Tableau 3.2) sur l'extrait protéique d'une culture de 1,5 L divisée en plusieurs parts égales, passées sur la colonne de 2-iminobiotine-agarose et quantifiées après élution. Le meilleur rendement est obtenu par dialyse de l'échantillon contre le tampon de la colonne. Les autres techniques utilisées occasionnent des pertes plus moins importantes.

Condition testée	Rendement
Extrait brut sans traitement	< 1%
Lysat à pH7,4 + 0,5 M NaCl	15%
Basification du lysat à la soude + 0,5 M NaCl	67%
Dilution 7 fois dans le tampon de la colonne	94%
Dialyse contre le tampon de la colonne	100%

Tableau 3.2 : Conditions de basification de l'extrait protéique avant l'étape de chromatographie.

Le passage de l'extrait brut sans aucun traitement donne un rendement nul. Un simple ajout de sel augmente ce rendement par le renforcement des liaisons hydrophobes streptavidine - biotine. La basification de l'extrait par la soude supplémentée de sel (0,5 M NaCl) conseillée par Santambrogio lui-même, semble être une manière rapide d'amener l'échantillon au bon pH et dans les bonnes conditions ioniques. Malheureusement, cette technique occasionne 33 % de pertes par rapport à la dialyse.

Une autre manière d'amener rapidement l'échantillon dans les conditions de fixation de la colonne est la dilution de celui-ci dans le tampon pH 9,8. C'est efficace, puisque les pertes sont très faibles (6 % pour une dilution d'un facteur 7), mais cela implique des volumes importants qui allongent la purification (augmentation du nombre de centrifugation, plus de temps pour

charger l'échantillon sur la colonne etc) et la rendent peu pratique. Néanmoins, la dilution de l'extrait s'avèrera très utile pour la purification de certains mutants (§ 5.4.3).

La dialyse, puis finalement la diafiltration (pour des raisons d'économies de tampon) contre le tampon pH 9,8 sont choisies de part leur rendement et de part les volumes « raisonnables » qu'elles mettent en oeuvre, bien qu'elles occasionnent 24 heures de purification supplémentaires.

3.2. COLONNE D'AFFINITÉ PAR 2-IMINOBIOTINE-AGAROSE

La purification de la (strept)avidine par affinité est basée sur la baisse spectaculaire de l'affinité des deux protéines pour l'iminobiotine que provoque la protonation du groupement imine de cette molécule (Fig. 1.41). La fixation de la protéine se fait à haut pH et haute force ionique (voir paragraphe précédent et introduction). Ces conditions assez éloignées des conditions physiologiques limitent probablement toutes interactions aspécifiques entre les différents composants de l'extrait bactérien et la matrice de la colonne. L'élution est quant à elle effectuée à bas pH et avec une force ionique plus faible (0,1 M Acide Acétique pH 2,9).

Le profil d'une purification par la colonne suivie par spectrophotométrie à 280 nm est montré figure 3.16. L'absorbance à 280 nm augmente au fur et à mesure du chargement, puis diminue lors du lavage jusqu'à obtenir une valeur égale à zéro. Une fois cette valeur atteinte, un temps de latence est laissé pour s'assurer que le zéro soit bien constant. Il s'en suit l'étape d'élution où la protéine apparaît à la fin du volume mort. La protéine est récoltée dans un tube contenant ~ 1/20 de volume de Tris-HCl à pH 7,4 afin de neutraliser l'éluât.

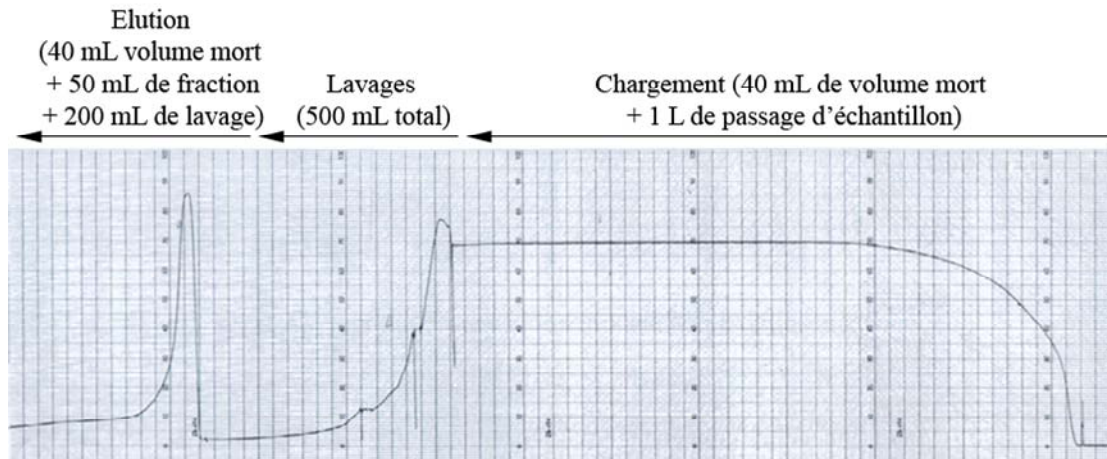


Figure 3.16 : Profil d'une colonne d'iminobiotine de 36 mL.

Pour une raison inexplicée, un pigment vert provenant d'une purification d'un milieu de levure (pour la purification de l'avidine) est fixé à la colonne. Malgré les variations de pH dues aux purifications à répétition, ainsi que quelques tentatives de nettoyage à l'éthanol (conseillés par le fournisseur de la résine), ce pigment ne semble pas éluable. Apparemment, il n'interfère pas avec la fixation de la protéine sur l'iminobiotine, mais présente un avantage : il permet de suivre la trace de la protéine durant son élution. En effet, lorsqu'elle est concentrée en front d'élution, la (strept)avidine forme une sorte de halo blanc visible à l'oeil nu (Fig. 3.17).



Figure 3.17 : Colonne de 2-iminobiotine-agarose au moment de l'élution.

Bien qu'un peu anecdotique, ce halo permet de récolter la protéine au moment où elle commence à sortir de la colonne et donc de réduire au maximum le volume récupéré et de diminuer le temps de lyophilisation (72 à 96 heures).

3.3. FIN DE LA PURIFICATION

L'éluât de la colonne est dialysé dans Tris-HCl (10 mM pH 7,4) afin de neutraliser la protéine, puis deux fois contre l'eau pour éliminer le plus de sels possibles. Pour finir l'échantillon est congelé et lyophilisé. Au final, la protéine apparaît sous forme d'une poudre blanche cotonneuse très légère (Fig. 3.18) présentant une certaine affinité pour le plastique et le verre.



Figure 3.18 : La streptavidine une fois lyophilisée.

3.4. PROBLÈMES D'ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE

L'activité de la protéine après lyophilisation est très variable d'une culture à l'autre (de 1,12 à 3 sites actifs sur 4). Cette basse activité peut avoir plusieurs causes. Soit la protéine est endommagée, soit elle a fixé de la biotine ou des protéines biotinylées durant la culture.

L'analyse de la protéine par ESI-MS (Fig. 3.19) montre que la protéine a la bonne masse (masse mesurée = $16\,424,96 \pm 0,87$ Da ; masse théorique 16 423,92 Da pour le monomère) et qu'apparemment elle ne subit aucune modification chimique durant la purification. De même, cette analyse montre que la protéine est seule dans l'échantillon. Tout porte donc à croire que c'est de la biotine fixée dans la protéine qui occasionne la baisse d'activité de la protéine.

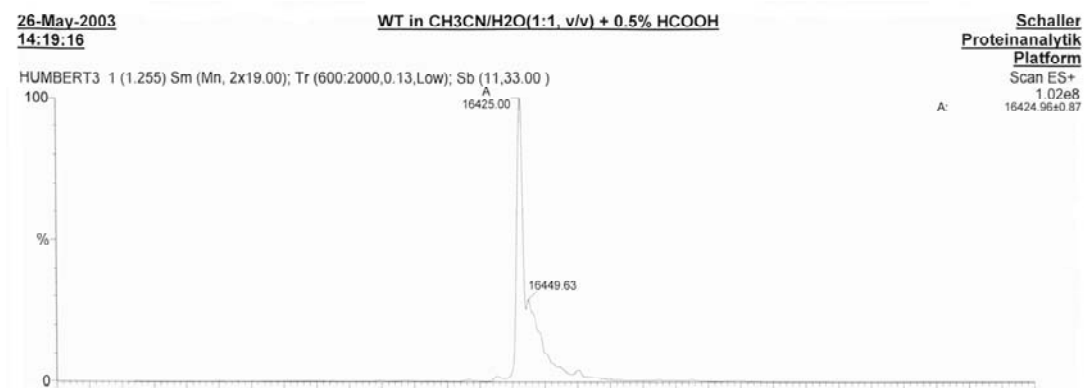


Figure 3.19 : Spectre de masse de la protéine purifiée.

L'élimination de cette biotine est possible par dialyse dénaturante de la protéine suivie d'une étape de renaturation. Comme le chlorure de guanidium (6 M ; pH 1,5) est fréquemment utilisé pour solubiliser les corps d'inclusion et dénaturer la streptavidine^{74,104,105}, nous l'avons préféré à l'urée. Plusieurs dénaturations / renaturations contre le Tris-HCl (20 mM ; pH 7,4) effectuées sur la protéine pure à différentes dilutions montrent que la protéine est active à plus de 3,5 sites sur 4 à condition d'être dénaturée à une concentration inférieure à 5 mg/mL, ce qui corrèle les résultats obtenus par Chilkoti et Stayton¹⁰⁵.

Pour la production, cette concentration est ramenée à l'échelle de la culture. Dans le meilleur des cas la masse totale de protéine (soluble et corps d'inclusion) produite est de 2 g donc la dénaturation doit se faire dans un volume minimal de 400 ml. Afin de récupérer la protéine occupée par 4 molécules de biotine et celle présente dans les corps d'inclusion, l'étape de la dénaturation / renaturation est placée avant l'étape de chromatographie par iminobiotine.

3.5. AUTRES AMÉLIORATIONS DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Bon nombre d'étapes du protocole de Santambrogio sont modifiées, remplacées ou éliminées¹⁰³. Les cellules BL21(DE3)pLysS sont lysables par une simple congélation - décongélation, la sonication des bactéries devient donc inutile^{137,146}. La dégradation des acides nucléiques (initialement provoquée par la sonication) est assurée par l'addition de DNase I dans l'extrait bactérien. De même, la dialyse de renaturation et celle contre le tampon de la colonne, provoque la précipitation de beaucoup de matériel dans l'échantillon. L'étape de dénaturation thermique à 75 °C est donc supprimée. Le tableau 3.3 résume l'ensemble des modifications apportées au protocole de Santambrogio.

	Système Santambrogio	Système mis en place
Souche de bactéries	BL21(DE3)	BL21(DE3)pLysS
Température de culture	25 °C	37 °C
Glucose	Non	Oui, inoculé avec la préculture
Milieu	TP	MTP
Abs ₆₀₀ d'induction	0,800	2.500
Moment de la fin de la culture	3 h après induction	3 h après induction
Lyse des cellules et élimination des acides nucléiques	Sonication	Congélation / décongélation + DNaseI
Purification avant colonne	Dénaturation thermique	Dénaturation / renaturation
Chromatographie	2-iminobiotine	2-iminobiotine
Traitement après colonne	Mise en solution	Lyophilisation
Rendement de culture	60-70 mg/L de culture	160-210 mg/L de culture

Tableau 3.3 : Comparaison du système de production et de purification de la streptavidine mis au point par Santambrogio et celui mis en place.

4. OBTENTION DES MUTANTS DE LA STREPTAVIDINE

4.1. MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE

4.1.1. Choix des mutants

En l'absence de structure cristallographique de la streptavidine complexée avec un ligand catalytique biotinylé, le « design » rationnel des mutants a été effectué par tâtonnement en suivant plusieurs lignes directrices. La première est de ne pas muter les acides aminés impliqués directement dans l'interaction biotine / streptavidine. En effet, la dérivatisation de la biotine par un catalyseur chimique entraîne une baisse significative de son affinité pour la protéine ($K_d = 10^{-7.2} \text{ M}$)⁹⁹ ; voir en annexe Skander *et al* 2004). Il est donc préférable de ne pas diminuer plus encore cette affinité.

La seconde tient au choix de l'acide aminé de substitution. Nous avons choisi la glycine qui induit une grande flexibilité¹⁴⁷ et la proline qui à l'inverse, rigidifie les structure protéiques et déstabilise les hélices α et les feuilletts β ¹⁴⁸. 7 simples mutants, 4 doubles mutants et un triple mutant ont été désignés (Fig. 3.20).

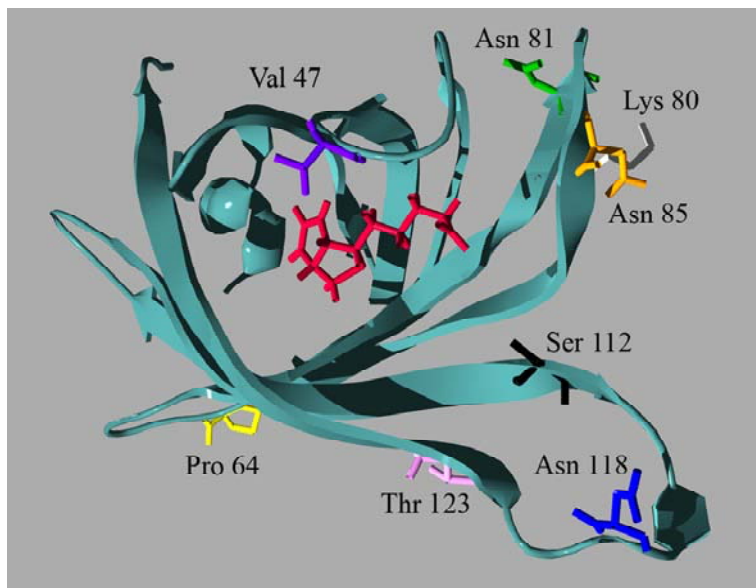


Figure 3.20 : Position des résidus soumis à la mutagenèse dirigée.

Ces 12 mutants peuvent être classés en 6 familles :

i) Les mutants proches du site actif : S112G et V47G. La valine 47 est située dans la boucle 3,4 qui se replie sur le site actif (à 3,34 Å de l'azote 1 de la biotine). Elle interagit directement par son squelette peptidique avec la sérine 45 qui elle, entre directement en interaction avec l'azote n°1 de la biotine⁹². La sérine 112 se trouve à l'extrémité de la boucle 7,8 (celle portant le tryptophane 120 impliqué dans la tétramérisation de la protéine et l'interaction avec la biotine du monomère adjacent)^{95,105} sa chaîne latérale est proche du site actif (le groupement hydroxyle de ce résidu est à 5,15 Å du groupement carbonyle de la biotine). La substitution de ces deux résidus a pour but de modifier la cavité hydrophobe de la protéine et ainsi de modifier l'emplacement du complexe catalytique par rapport à la protéine wild-type.

ii) Les mutations visant à perturber l'interaction entre deux monomères (interaction 1-4) : K80G ; N85P et T123G. La lysine 80 est située dans la boucle 5,6 à côté du tryptophane 79 impliqué dans l'interaction de la protéine avec la biotine (Fig. 3.21A)^{95,105}. Elle est de plus, très proche de la sérine 62 du monomère adjacent (4,05 Å). L'asparagine 85 semble interagir avec l'aspartate 61 du second monomère (1,84 Å). La thréonine 123 quant à elle est positionnée dans la même boucle que la sérine 112 (à l'autre extrémité), mais elle se trouve de plus, à proximité de la sérine 93 et de la glutamine 107 du second monomère (respectivement 4,95 et 6,19 Å ; Fig. 3.21B). Ces trois mutants ont été désignés pour obtenir des protéines monomériques.

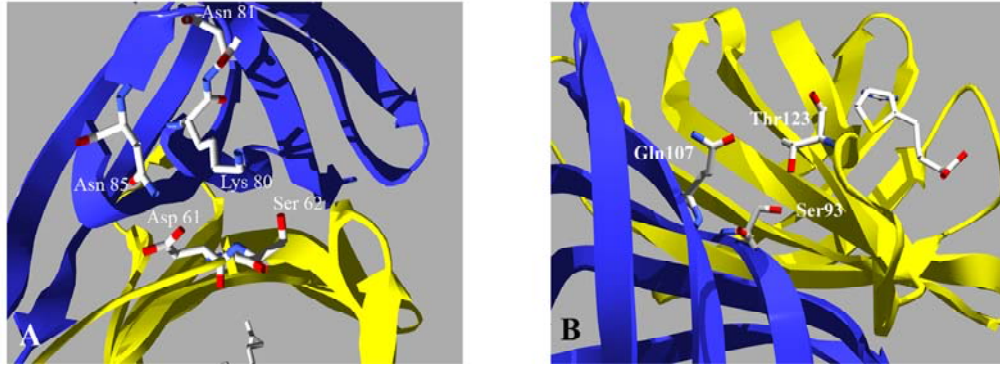


Figure 3.21 : A. Interactions intermonomères possibles de la lysine 80 et de l'asparagine 85. B. Interactions intermonomères possibles de la thréonine 123.

iii) Les mutations visant à déstabiliser la boucle 5,6 : N81P. Comme la lysine 80 et l'asparagine 85, l'asparagine 81 se trouve dans la boucle 5,6 sans toutefois entrer dans l'interaction monomère-monomère. Le but du mutant N81P est de déstabiliser la haute organisation de la boucle 5,6.

iv) Une mutation visant à influencer le positionnement du ligand catalytique d'un autre monomère : P64G. La proline 64 est située dans la boucle 4,5 à l'opposé du site actif, mais est assez proche du site actif du monomère adjacent (interaction 1-4) Le carbonyle de ce résidu est à 15 Å du groupement carbonyle de la biotine du monomère voisin (Fig. 3.22).

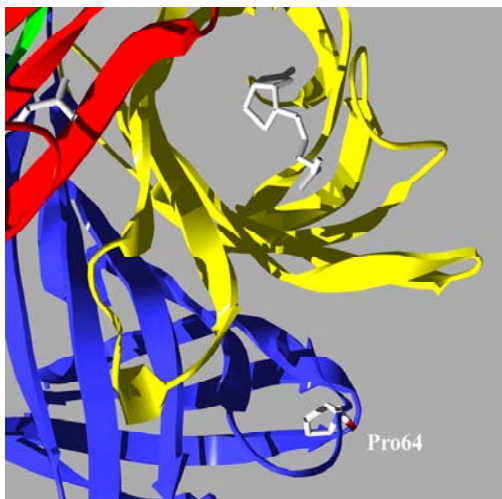


Figure 3.22 : Position de la proline 64 par rapport à la biotine du monomère adjacent.

v) Une double mutation accidentelle : S112G-N118T. Il s'agit d'un accident de commande d'amorce de PCR, mais il apparaît intéressant de par l'emplacement des deux mutations dans la

boucle 7,8. L'asparagine 118 est assez proche du tryptophane 120 mais ne semble pas entrer dans une interaction monomère – monomère.

vi) Les doubles mutations et la triple mutation : V47G-S112G, P64G-S112G, S112G-T123G, P64G-S112G-N118T. Ces mutants ont été désignés pour déterminer si les mutations sont additives, indépendantes ou antagonistes les unes des autres en catalyse¹⁴⁹.

4.1.2. Stratégie utilisée

La plupart des mutants ont été obtenus par une technique dérivée du QuickChange-Mutagenesis Kit développé au laboratoire du professeur Jean-Louis Reymond (Université de Berne) par le Dr. Zheng Lei¹⁵⁰. Il s'agit d'amplifier la totalité du plasmide en utilisant des amorces divergeantes et partiellement chevauchantes (Fig. 3.23). La mutation désirée et une mutation silencieuse générant un site de restriction sont portées sur la zone chevauchante des amorces. L'insertion du site de restriction permet de cribler les positifs. Le plasmide muté porte le site de restriction, le wild-type non (Tableau 2.6).

```

I104 N105 T106 Q107 W108 L109 L110 T111 S112 G113 T114 T115 E116 A117 T118 A119 W120
                                     KpnI
          G CTG ACC GGC GGT ACC ACC GAG GCC AAC GCC TGG
ATC AAC ACC CAG TGG CTG CTG ACC TCC GGC ACC ACC GAG GCC AAC GCC TGG
TAG TTG TGG GTC ACC GAC GAC TGG AGG CCG TGG TGG CTC CGG TTG CGG ACC
  G TTG TGG GTC ACC GAC GAC TGG CCG CCA TGG TGG
  
```

Figure 3.23 : Amorces apportant la mutation S112G. Les bases mutées sont surlignées, le site KpnI généré est en gris.

Les mutants V47G, K80G, N81P, N85P et T123G sont générés à l'aide d'amorces 100 % chevauchantes, mais portant dans la mesure du possible un site de restriction pour le criblage des positifs¹⁵¹.

Le choix du codon de substitution a été effectué en cherchant à modifier le moins possible le codon initial. Le plasmide pLysS, apportant les ARNt peu fréquents chez *E. coli*, il n'a pas été tenu compte des codons préférentiels de la bactérie¹³⁷.

4.1.3. Obtention des mutants

Comme il a été vu précédemment, l'amplification du gène de la streptavidine est problématique eu égard à la structure secondaire résistante aux hautes températures qui se forme au sein du gène (§ 1.2). Des tests d'amplification du plasmide avec les amorces Us112g et Ls112g (amorces apportant la mutation S112G) sans DMSO à différentes températures n'ont pas permis d'obtenir la moindre amplification (figure 3.24). En revanche, en présence de 5 % de DMSO, un signal apparaît pour des températures d'hybridation supérieures à 50 °C, les meilleures amplifications étant obtenues pour des températures de 60-65 °C.

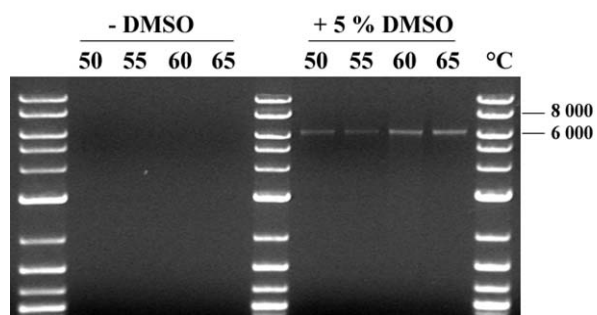


Figure 3.24 : Test de conditions de PCR mutagène à différentes températures en présence ou non de 5 % DMSO.

L'effet cumulé du DMSO et d'une haute température d'hybridation est nécessaire pour déstabiliser la structure secondaire formée au sein du gène et permettre l'hybridation des amorces mutagènes. De par leur taille (35 bases en moyenne), ces amorces ont une température de fusion très élevée (> 69 °C, Cf. Tableau 2.6) et n'ont aucun mal à s'hybrider à leur séquence complémentaire à haute température.

Les PCR mutagènes sont effectuées en présence de 5 % de DMSO et en appliquant une température d'hybridation des amorces de 65 °C afin d'éliminer le plus possible les hybridations aspécifiques. Ces conditions drastiques permettent d'obtenir une amplification satisfaisante du plasmide pour l'ensemble des mutants.

4.1.4. Criblage des mutants

Le premier mutant obtenu est S112G-N118T. Pour tester la bonne insertion de la mutation, le plasmide est soumis à une digestion par KpnI. Mais, l'effet star de cette enzyme rend le résultat inexploitable (2 coupures à la place d'une seule, non montré)¹⁵². A contrario, une digestion sur un produit de PCR sur colonie effectuée avec les amorces SAV-EcoF et SAV-BamR donne le résultat escompté (Fig. 3.25). Lorsque la mutation est insérée (80 % des fragments testés), les fragments issus de la digestion sont à la taille désirée (150 pb et 330 pb). L'insertion de la mutation est confirmée par séquençage du produit PCR des positifs.

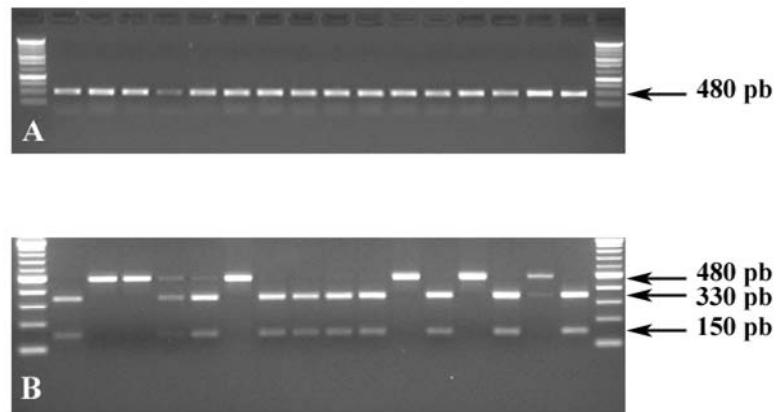


Figure 3.25 : Criblage des clones obtenus par mutagenèse. **A.** PCR sur colonie. **B.** Digestion par l'enzyme KpnI des fragments PCR. Les marqueurs de tailles sont respectivement le DNA Bench top ladder (Promega – Catalyst) et le 2-log ladder (New-England Biolabs).

L'ensemble des mutations désirées est obtenu sans aucun problème et aucune erreur d'amplification n'est à déplorer.

4.2. MUTAGENÈSE DE SATURATION

4.2.1. Stratégie utilisée

Le mutant S112G permet d'obtenir une augmentation d'excès énantiomérique de l'hydrogénation catalytique de l'acide acétamidoacrylique ainsi qu'une augmentation du taux de conversion du transfert d'hydrogénation de l'acétophénone (voir Skander *et al* et Letondor *et al* en annexe), nous avons donc décidé d'effectuer une expérience de mutagenèse de saturation en position 112.

Plusieurs stratégies de saturation sont envisageables. On peut remplacer le codon désiré par la séquence NNN (N = A, C, G ou T), mais il est préférable d'utiliser une séquence type NNS (S = C ou G) ou NNK (K = G ou T). En effet, la stratégie « NNN » est parfaitement efficace, mais la probabilité d'obtenir une méthionine ou un tryptophane est de 1/64, quant au codon stop, il apparaît avec une fréquence de 3/64 (Tableau 3.4). En utilisant les codons NNS ou NNK, la méthionine et le tryptophane apparaissent avec une fréquence de 1/32 et il ne subsiste qu'une possibilité sur 32 d'obtenir un stop.

	NNN	NNS	NNK		NNN	NNS	NNK		NNN	NNS	NNK
A	4/64	2/32	2/32	I	3/64	1/32	1/32	R	6/64	3/32	3/32
C	2/64	1/32	1/32	K	2/64	1/32	1/32	S	6/64	3/32	3/32
D	2/64	1/32	1/32	L	6/64	3/32	3/32	T	4/64	2/32	2/32
E	2/64	1/32	1/32	M	1/64	1/32	1/32	V	4/64	2/32	2/32
F	2/64	1/32	1/32	N	2/64	1/32	1/32	W	1/64	1/32	1/32
G	4/64	2/32	2/32	P	4/64	2/32	2/32	Y	2/64	1/32	1/32
H	2/64	1/32	1/32	Q	2/64	1/32	1/32	STOP	3/64	1/32	1/32

Tableau 3.4 : Probabilités d'obtention des différents acides aminés par les différentes stratégies de mutagenèse de saturation.

Une autre technique a récemment été développée en utilisant un mélange de 19 paires d'amorces (une paire par acide aminé de substitution). Ce protocole possède plusieurs avantages. Les codons utilisés pour la mutation peuvent être ceux que l'organisme utilise le plus fréquemment, aucun codon stop ne peut être généré et chaque acide aminé à une fréquence d'apparition de 1/19. En contre partie, cette technique est assez onéreuse puisque qu'elle requiert l'achat de 38 amorces (pour nous seulement 36 puisque S112G est déjà obtenu) de 34 bases chacun¹⁵³.

Nous avons choisi la technique « NNS » en tablant sur le fait que la présence d'un G ou d'un C en 3^{ème} position permet une hybridation plus forte des deux amorces.

4.2.2. Obtention des mutants Sat-112

La PCR mutagène est menée dans les conditions habituelles de mutagenèse (5 % DMSO et 65 °C de température d'hybridation) et le résultat est conforme à nos attentes. Les échantillons sont traités de la même manière que les autres mutants.

Un crible par l'enzyme KpnI est effectué sur 63 clones (Tableau 3.5). 34 clones portent le plasmide wild-type sans site KpnI. Bien que le fournisseur du kit de mutagenèse précise que le rendement d'insertion des mutations n'est que de 80 %¹⁵¹, cela n'explique pas une telle proportion de négatifs. La fragilité des plasmides type pET est probablement à l'origine de ce résultat. Même conservé à -20 °C dans le tampon TE, le plasmide a tendance à se trouver sous forme circulaire-ouvert s'il est stocké plusieurs mois. Il est fort probable que lors de la PCR, les brins coupés se réhybrident sur la matrice permettant l'amplification d'une séquence ne portant pas la mutation. Ce phénomène n'est jamais apparu aussi flagrant lors de la mutagenèse dirigée. En effet, à chaque fois, seulement 2 à 4 clones sont séquencés et les négatifs sont rares. Dans le

cas de la mutagenèse de saturation, le nombre de séquençages est plus élevé et ce problème peut être mis en évidence.

Mutant	Positifs	Mutant	Positifs	Mutant	Positifs	Mutant	Positifs	Mutant	Positifs
S112A	1	S112G	1	S112M ^a	1	wt+KpnI	4	Autres ^b	2
S112C	2	S112H	0	S112N	0	S112T	0	Stop	0
S112D	1	S112I	0	S112P	4	S112V	1	wt sans KpnI ^c	34
S112E	1	S112K	1	S112Q	0	S112W	0	Total :	63
S112F	4	S112L	3	S112R	3	S112Y	0		

^a : Contient un décalage du cadre de lecture
^b : Séquence dégénérée en position 112
^c : Non séquencés

Tableau 3.5 : Résultats de la mutagenèse de saturation.

Les séquences obtenues avec les 29 clones restants sont montrées sur le tableau 3.5. La séquence de 11 nouveaux mutants est mise en évidence. Les séquences les plus fréquemment obtenues sont celles de S112P, du wild-type avec le site KpnI (à chaque fois un codon différent du codon naturel) et S112F. Deux séquences sont dégénérées en position 112, il s'agit probablement d'un problème survenu lors de la PCR sur colonie. Les bactéries XL1-blue sont relativement petites lorsqu'elles sont nombreuses sur boîte de Petri et il n'est pas toujours facile de différencier à l'œil nu une colonie isolée et deux colonies fusionnées.

Aucun codon stop n'est généré, ni de mutation S112H, S112I, S112N, S112Q, S112T, S112W et S112Y. Par soucis d'économie (proportion de wild-type non muté trop importante) et pour éviter de perdre trop de temps, ces 7 mutants et S112M (dont la PCR a généré un décalage du cadre de lecture) sont finalement générés par mutagenèse dirigée. Une fois obtenus, ils sont traités de la même manière que les autres mutants.

5. CARACTÉRISATION DE LA STREPTAVIDINE WILD-TYPE ET DES MUTANTS

5.1. RENDEMENTS DE PRODUCTION

5.1.1. Streptavidine wild-type

La streptavidine wild-type a été produite 13 fois en culture de 10 litres et une fois en culture de 7 litres. Les rendements et quantifications de sites actifs sont montrés dans le tableau 3.6. Comme observé précédemment, les rendements sont corrélés avec la concentration des cellules au moment de l'induction et ont plus que doublé à partir du moment où le glucose a été co-inoculé avec la préculture.

N° de culture	Durée de la culture	Abs _{600 nm} à l'induction	Rendement (mg/L de culture)	Nombre de sites actifs par masse	Nombre de site par Abs _{280 nm}	Evolutions	
1	04:30	0.724	19.6	2,88	ND ^a	Utilisation du chlorure de guanidium	Inoculation du glucose avec la préculture
2	04:30	0.84	28.6	2,38	ND		
3	04:50	0.68	7.77	1,28	ND		
4 ^b	05:50	1.49	20.9	2,00	ND		
5	06:30	1.04	54.8	2,81	ND		
6	05:50	1.45	52.3	3,77	3,93		
7	05:25	2.25	50.5	3	3,37		
8 ^c	05:25	1.25	37	3,49	3,56		
9	05:25	1.28	124	3,61	ND		
10	05:20	1.97	160	3,75	3,96		
11	04:50	1.6	118.9	3,00	3,51		
12	06:15	2.5	200	3,38	4,04		
13 ^d	05:00	1.386	81.2	3,22	3,93		
14	06:25	4					

^a : ND = Non déterminé
^b : Perte d'une partie de la protéine durant la purification.
^c : Culture de 7 L.
^d : Purifiée par purification alternative (voir § 5.4.3).

Tableau 3.6 : Rendements et activités des différentes cultures de protéine wild-type.

5.1.2. Cas des mutants

Tous les mutants sont cultivés et purifiés selon le protocole établi pour la protéine wild-type. Les courbes de croissance des cultures sont très similaires à celles du wild-type. Les rendements et l'activité des protéines purifiées sont résumés tableau 3.7.

Nom	Rendement de culture (mg/L de culture)	Sites actifs /4 (mesurés par masse)
K80G	8 ; 15	3,41 ; 2,98
N81P	0	-
N85P	0	-
P64G	120 ^a ; 64 ; 66 ; 81	3,75 ; 3,62 ; 3,89 ; 3,10
P64G-S112G	6	3,00
P64G-S112G-N118T	5 ^a	ND
S112A	83	3,49
S112C	83	3,00
S112D	130	2,64
S112E	120	3,38
S112F	77	3,76
S112G	0	-
S112G-N118T	15 ^a 6,8	3,00 ; 2,80
S112G-T123G	0	-
S112H	100	3,03
S112I	65	3,32
S112K	95	3,39
S112L	62	3,00
S112M	115	3,69
S112N	42	2,70
S112P	3,8	1,31
S112Q	45	3,32
S112R	101	3,00
S112T	88	3,30
S112V	82	3,57
S112W	24	3,07
S112Y	46	3,03
T123G	0,7	ND
V47G	63 ^a ; 113	ND ; 3,00
V47G-S112G	31	3,68
W120A	0.2	-
wt	160-200	

^a : Cultures de 1,5 L

Tableau 3.7 : Rendements et activités des cultures des différents mutants.

Les rendements sont très variables d'un mutant à l'autre. Ils sont nuls pour N81P, N85P, S112G et S112G-T123G, et très faibles pour K80G, P64G-S112G, P64G-S112T-N118T, S112G-

N118T, T123G et S112P. L'analyse par SDS-PAGE des cultures des mutants N81P, N85P, K80G, T123G, S112G-T123G et S112P montre qu'ils sont présents très majoritairement dans les corps d'inclusion (Fig. 3.26) alors que les quatre autres apparaissent comme étant majoritairement solubles.

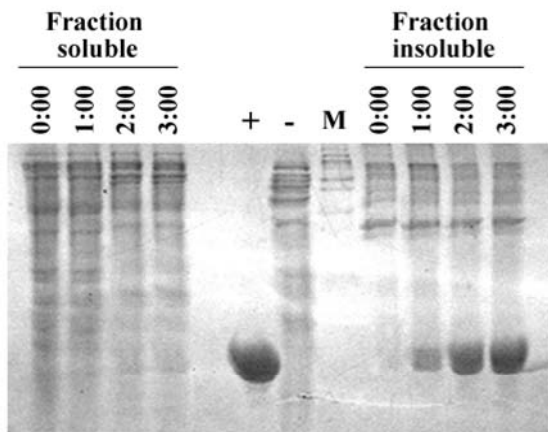


Figure 3.26 : Gel d'analyse d'une culture du mutants T123G. Le temps est comptabilisé à partir de l'induction. + = 12 µg de protéine wild-type ; - = extrait d'une protéine transformée avec le plasmide vide ; M = marqueur de taille Broad Range Ladder (New-England Biolabs).

Les mutants K80G, N81P, N85P, T123G et S112G-T123G ont été désignés pour perturber la tétramérisation de la protéine (§ 4.1.1). Apparemment, les mutants N81P, N85P, S112G et S112G-T123G sont totalement non fonctionnels, aucun pic d'éluion n'est observé lorsqu'ils sont chromatographiés sur 2-iminobiotine. Aucun signal n'apparaît lors de la quantification par la biotine-4-fluorescéine des extraits bactériens des mutants N81P, N85P et S112G-T123G, par contre, S112G donne une courbe de titrage exploitable (non montré). Compte tenu des mutations apportées, le repliement des trois premiers mutants semble très difficile voire impossible. Pour S112G, on peut penser à une baisse importante de l'affinité de ce mutant pour la 2-iminobiotine. Les faibles rendements observés pour les mutants P64G-S112G, P64G-S112G-N118T, S112G-N118T semblent dépendre de la mutation S112G. A contrario, le mutant V47G-S112G est obtenu avec un rendement de 31 mg/L de culture ; la mutation V47G semble contrecarrer l'effet de la mutation S112G. Il est fort probable que les mutants portant la mutation

S112G soient purifiables avec des rendements supérieurs en utilisant une colonne plus large et moins haute qui permettrait de limiter le temps de fixation de la protéine sur la matrice.

K80G, S112P et T123G sont peu fonctionnels et seule une faible quantité de protéine se fixe à l'iminobiotine (ou ne se décroche pas pendant le chargement ou le lavage de la colonne). Compte tenu de la position de la lysine 80 et de la thréonine 123, on peut supposer que les mutants générés ne sont pas tétramériques ou que leur affinité pour l'iminobiotine est très faible (Fig. 3.22 ; § 4.1.1). Toutefois, dans le cas de K80G, la perte de 4 charges peut également être à l'origine de la faible solubilité de ce mutant.

Concernant S112P, « l'effet proline » provoque vraisemblablement un mauvais repliement de la protéine^{147,148}.

Des rendements de purification peu élevés mais suffisants pour être exploités à grande échelle sont obtenus avec, S112N, S112Q, S112W et S112Y. De part l'encombrement stérique apporté par un tryptophane ou une tyrosine, de tels rendement pour S112W et S112Y constituent une bonne surprise. Concernant S112N et S112Q, l'apport d'un groupement amide en position 112 semble défavorable soit pour le repliement de la protéine soit pour l'affinité pour l'iminobiotine. Ces mutants apparaissent 50 % solubles, 50 % dans les corps d'inclusion sur gel d'analyse de culture (Fig. 3.27).

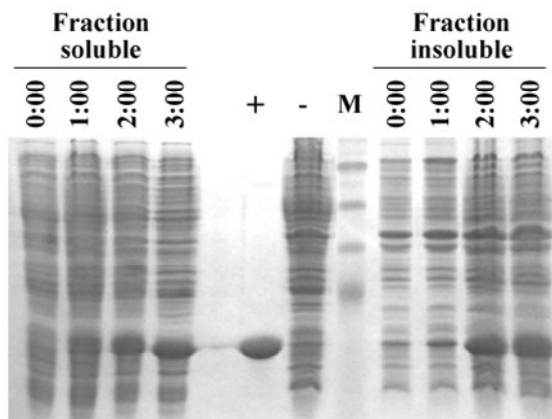


Figure 3.27 : Analyse d'une culture du mutant S112Y.

Pour l'ensemble des autres mutants, les rendements sont comparables avec ceux de la protéine wild-type (ils apparaissent plus faibles car nous n'avons observé la corrélation moment de l'induction - rendement qu'après la purification de ces mutants). Les gels d'analyse des cultures sont tout à fait corrélés avec ces rendements (Fig. 3.28).

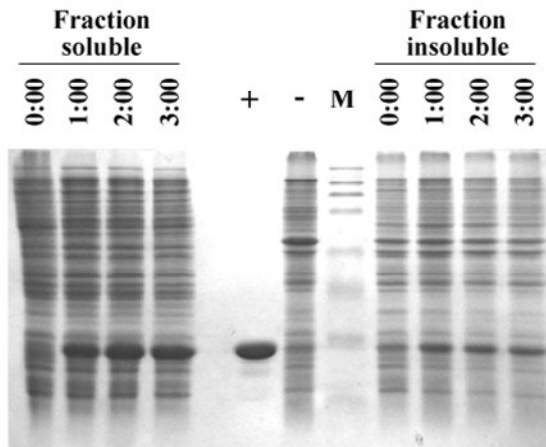


Figure 3.28 : Analyse d'une culture du mutant S112T.

5.2. SPECTRE DE MASSE

Une fois la protéine lyophilisée, elle est envoyée au service de spectrométrie de masse du professeur Schaller à Berne. La Figure 3.19 (§ 3.4) montre le spectre de masse d'une protéine wild-type. La masse obtenue correspond à la masse théorique moins la méthionine n°1 (respectivement $16\,424,96 \pm 0,87$ Da et $16\,423,92$ Da pour le monomère). Le clivage de la méthionine n°1 fait partie du processus normal de maturation de certaines protéines chez *E. coil*¹⁵⁴. L'absence de pic à 16 555 Da (soit la masse du monomère plus celle de la méthionine) montre que cette coupure est totale.

Cette analyse est effectuée de manière systématique à la fin de chaque production et à chaque fois, la masse mesurée correspond à celle du monomère. Le mutant V47G-S112G

présente toutefois une singularité notable : un pic à 16 348, 38 Da (soit la taille du monomère) et un à 65 432,13 Da soit la taille du tétramère (65 392 Da) plus 40 Da (Fig.3.29).

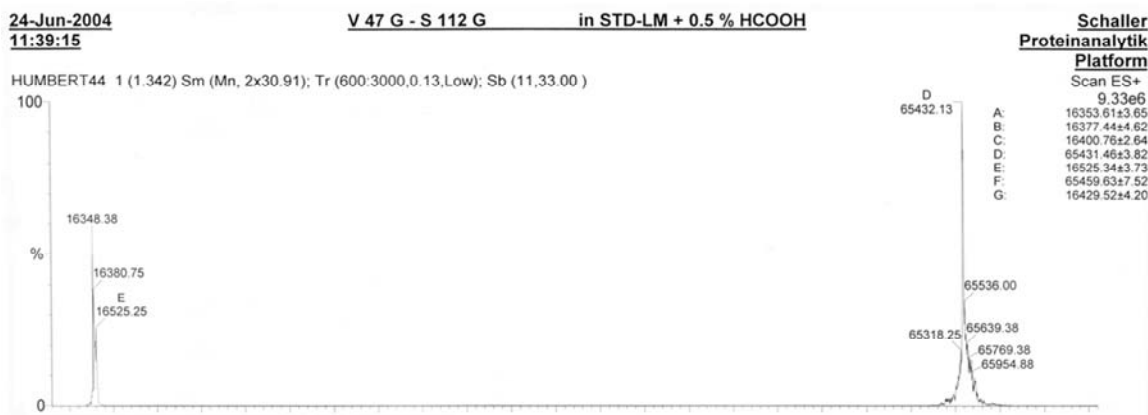


Figure 3.29 : Spectre de masse du mutant V47G-S112G.

C'est le seul mutant pour lequel le tétramère est observable. A ce jour, nous n'avons aucune explication à ce phénomène. Concernant l'excès de masse de 40 Da par rapport à la masse du tétramère, on peut penser à un ion potassium. En effet, cet ion entre en jeu dans les conditions expérimentales de la spectrométrie de masse et il est très fréquent d'observer un pic à M+40 Da lors de cette mesure.

5.3. STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DE LA PROTÉINE WILD-TYPE

La structure de « T7tag-mature-streptavidine » a été résolue à 2,0 Å par le professeur Ronald Stenkamp (Université de Washington – Seattle, EU). Cette structure et celle du « recombinant-core-streptavidin » sont montrées figure 3.30. La forme globale des deux protéine est la même (β -barrel à 8 brins β), mais la T7tag-mature-streptavidine possède en plus une hélice α (résidus 136 à 145) dans la partie C-terminale exposée au solvant et située hors des zones d'interactions monomère - monomère. Cette hélice est suivie d'une boucle (résidus 146 à 159) venant s'enchasser dans le site actif.

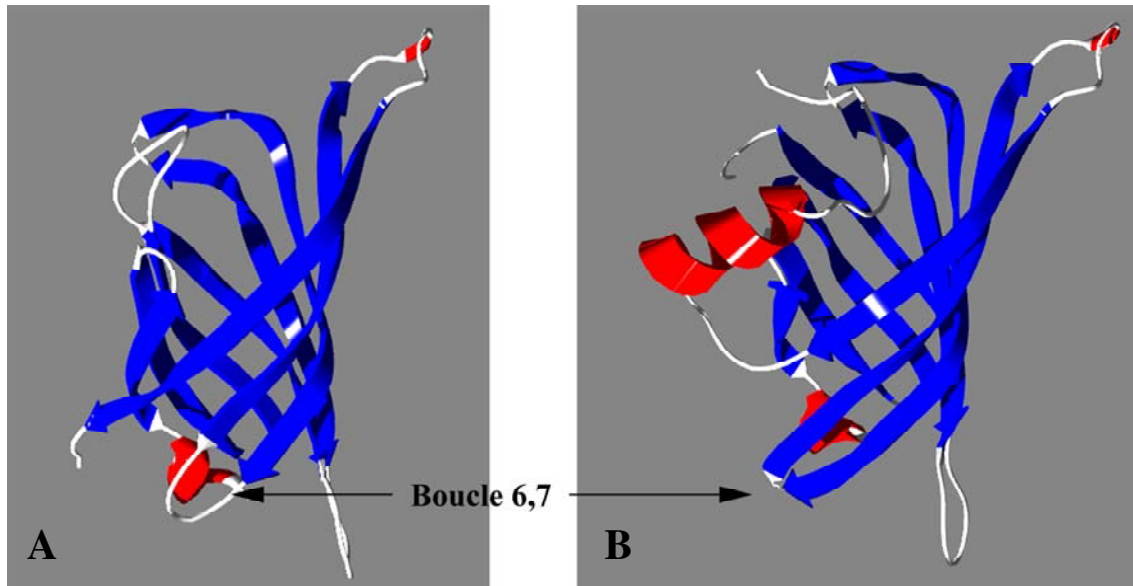


Figure 3.30 : Comparaison de la structure du « recombinant core streptavidin » (A) et de la T7-Mature-Streptavidine (B). Les brins β apparaissent en bleu, les boucles en blanc et les hélices α en rouge.

Cette partie C terminale est comme nous l'avons vu, naturellement clivée lorsqu'elle est sécrétée par *Streptomyces avidinii* suggérant une sensibilité aux protéases⁷³. De plus, il a été établi que cette partie C terminale provoque l'aggrégation de la protéine⁷⁴ et gêne l'accessibilité du site actif^{75,104}. Selon toute vraisemblance cette perte d'accessibilité provient de l'encombrement stérique provoqué par la présence de la boucle.

D'autres légères différences peuvent être également observées, par exemple, la boucle 6,7 apparaît un peu plus structurée sur la T7-mature-streptavidine que sur le « recombinant core ».

La boucle 3,4 n'est pas résolue sur la structure de Stenkamp (les résidus alanine 46 et valine 47 manquent), comme cela est observable en absence de biotine aussi bien sur la streptavidine que sur l'avidine^{49,78,81,82,155}. Ceci suggère que la partie C terminale de la protéine n'a aucune influence sur son repliement.

5.4. ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE

5.4.1. Techniques utilisées

L'activité de la protéine est mesurée par la biotine-4-fluorescéine selon le protocole de Grüber^{135,156} ou par exclusion du HABA ((2-(4'-hydroxyazobenzène) Acide Benzoïque) développée par Green (Fig. 3.31)¹³⁶. La première est un titrage direct par un fluorophore biotinylé dont la fluorescence est quenchée dans la poche hydrophobe de la (strept)avidine. La seconde est un titrage indirect par spectrophotométrie visible (506 nm), le HABA se fixe dans la cavité de la protéine avec une affinité de 10 M^{-1} , la mesure est effectuée par ajout d'incrément de biotine qui déplacent le HABA de la cavité. L'absorbance à 506 nm diminue et la HABA absorbe alors à 346 nm.

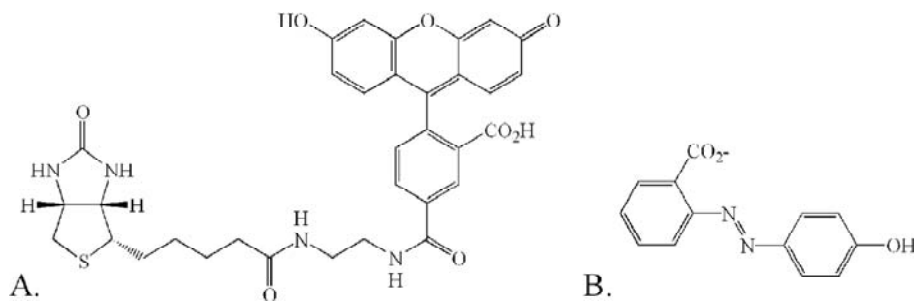


Figure 3.31 : A. Formule de la biotine-4-fluorescéine. B. Formule du HABA.

La Figure 3.32 montre le titrage d'un même lot de streptavidine wild-type pure en utilisant les 2 techniques. Les activités déduites de ces deux mesures sont 3,52 et 3,48 sites /4 par masse et 3,92 et 3,95 sites par absorbance à 280 nm. Les résultats sont exprimés à partir de la masse pesée pour effectuer la mesure et en fonction de la densité optique à 280 nm de la solution à titrer. La comparaison de la concentration déterminée par masse et par l'absorbance permet de déterminer la teneur en sels (contre-ions des charges) de la protéine. Les activités obtenues sont très similaires et les deux techniques peuvent se substituer l'une à l'autre. Ce même lot a été soumis à une expérience d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) à l'université de Zürich.

L'activité déterminée lors de cette mesure est de 3,75 sites sur 4 (Julia Ahlskog, ETHZ, communication personnelle).

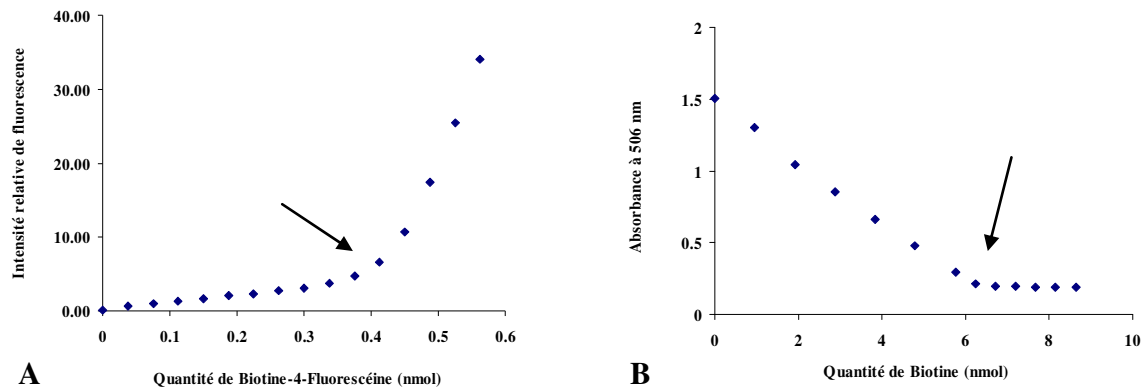


Figure 3.32 : Titrage de la Streptavidine **A.** Par la Biotine-4-Fluorescéine ; **B.** Par exclusion du HABA. Le point d'équivalence des deux mesures est indiqué par une flèche.

Bien qu'il nécessite plus de protéine que lors d'un titrage avec la biotine-4-fluorescéine (8 μM vs 2 μM), le titrage par HABA présente deux avantages notables : il est rapide et la courbe de mesure est plus simple à exploiter. Le point d'équivalence se trouve en effet au croisement de deux droites et sa détermination ne présente aucune ambiguïté, alors que le point d'équivalence du titrage par la biotine-4-fluorescéine est plus subtil à déterminer (la courbe suit une équation d'ordre 3).

A contrario le titrage par la biotine-4-fluorescéine étant basé sur le quenching de sa fluorescence, il renseigne sur la profondeur ou la largeur de la cavité hydrophobe. En effet, la cavité de la streptavidine est plus profonde que celle de l'avidine et la courbe de titrage s'en ressent (Fig. 3.33)^{80,82}. Le quenching par l'avidine est moins efficace et le point d'équivalence est plus flou à déterminer que celui de la streptavidine.

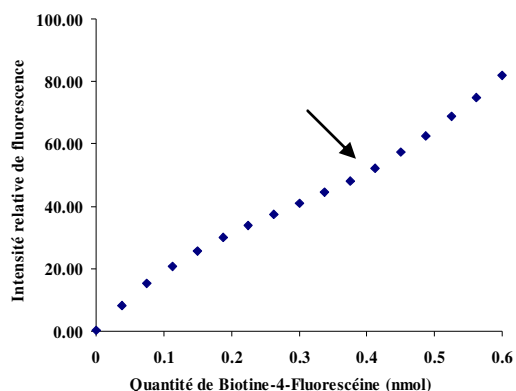


Figure 3.33 : Titrage de l'avidine par la Biotine-4-Fluorescéine. La flèche indique le point d'équivalence.

La streptavidine wild-type a été produite 9 fois en dénaturant l'extrait cellulaire avec le chlorure de guanidium (Tableau 3.6), l'activité de la protéine est de $85 \% \pm 12$ soit 3,40 sites sur 4 par pesée et $94 \% \pm 10$ par $Abs_{280 \text{ nm}}$, soit 3,76 sites sur 4.

5.4.2. Titrage des mutants

Concernant les mutants, le nombre de sites actifs est bien souvent compris entre 3,0 et 3,8 sites/4 comme le montre le tableau 3.7. Toutefois, un certain nombre d'entre-eux sont peu actifs malgré la dénaturation de la protéine à l'image de S112P dont le cas sera traité au paragraphe suivant.

Chaque mutant ayant des propriétés qui lui sont propres, il n'est pas surprenant d'observer des variations dans la forme des courbes de titrage par la biotine-4-fluorescéine. La figure 3.34 montre les différences les plus notables. La mutation la plus dramatique pour le titrage est P64G-S112G puisque la courbe obtenue équivaut à un titrage sans protéine. Apparemment, il n'y a aucun quenching de la fluorescence et il semble que ce ne soit pas un effet cumulatif des mutations P64G et S112G dont les courbes de titrage ressemblent à celle de la protéine wild-type. En revanche, P64G-S112G est parfaitement titrable par la technique du HABA.

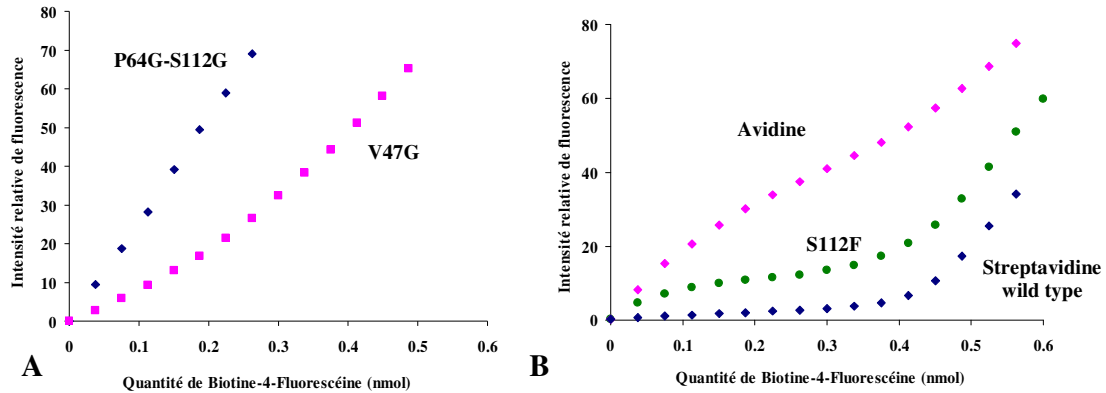


Figure 3.34 : Titrage de certains mutants par la biotine-4-fluorescéine. **A.** Titrage de P64G-S112G et V47G ; **B.** Comparaison des courbes obtenues avec l'avidine, la streptavidine et le mutant S112F.

V47G donne également un quenching très limité qui rend la courbe de croissance quasiment inexploitable. Là encore, le titrage par la technique du HABA permet une détermination claire du nombre de sites actifs. Assez curieusement, ce phénomène ne se répercute pas sur V47G-S112G.

S112F donne une courbe particulière qui semble être un hybride de la courbe obtenue avec l'avidine et de celle de la streptavidine. Au regard de la séquence primaire des deux protéines (Fig. 1.36), cet aspect hybride de S112F peut s'expliquer par le nombre de résidus phénylalanine présent dans l'une et l'autre des protéines. L'avidine en a sept alors que la streptavidine n'en possède que 2. On peut penser qu'un double mutant phénylalanine permettrait d'observer une courbe encore intermédiaire et qu'en cumulant les mutations phénylalanine on obtienne une courbe similaire à celle de l'avidine. Toutefois, il peut s'agir également d'un simple hasard et il est envisageable que la mutation S112F provoque une modification structurale de la cavité hydrophobe vers une forme proche de celle de l'avidine (bien qu'aucune phénylalanine ne se trouve dans cette zone dans l'avidine).

5.4.3. Cas du mutant S112P

Le rendement de production du mutant S112P est très faible (3,8 mg/L de culture) et son activité n'est que de 1,31 sites actifs / 4, soit une quasi-saturation de la protéine en biotine (Tableau 3.7). Une expérience de dénaturation thermique telle qu'elle a été décrite par Bayer et Wilchek⁷⁶ montre qu'à toutes les températures appliquées sur l'échantillon, la protéine se trouve à environ 50 % sous forme tétramérique et 50 % sous forme monomérique (Fig. 3.35). Le même genre d'expérience menée avec la protéine wild-type montre l'apparition du monomère à 72 °C et non 25 °C (§ 5.6.1).

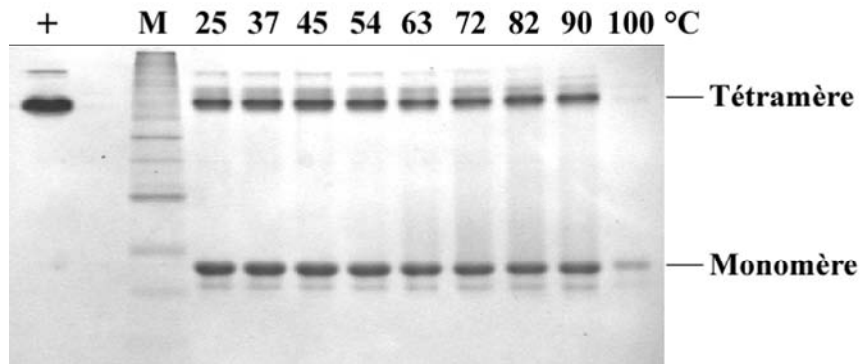


Figure 3.35 : Dénaturation thermique du mutant S112P.

Ce résultat laisse à penser que le mutant S112P est monomérique et qu'il ne se tétramérise qu'en présence de biotine. La courbe de titrage de ce mutant dénaturé puis renaturé est pour le moins surprenante (Fig. 3.36). Pas moins de 4 points d'inflexion apparaissent sur la courbe, comme si le titrage se faisait par étape. Cela peut suggérer deux choses, soit une coopérativité de fixation de la biotine-4-fluorescéine par ce mutant, soit une tétramérisation induite par la présence de la sonde biotinylée.

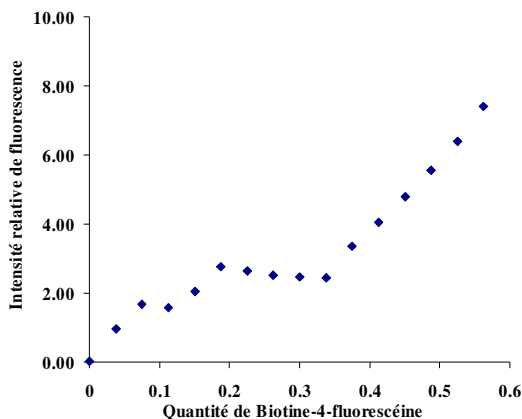


Figure 3.36 : Titrage à la biotine-4-fluorescéine du mutant S112P dénaturé et renaturé.

Si l'on admet que la masse totale de streptavidine produite par les bactéries est la même dans le cas de la protéine wild-type et du mutant S112P (soit ~ 160 mg/L de culture selon les paramètres de la culture S112P n°1) ; les 38 mg récupérés lors d'une culture de 10 L représentent 2,37 % de la masse totale produite. La dialyse de dénaturation est effectuée dans un sac de 400 mL placé dans un bain de 15 litres. Si l'on considère la dialyse comme une dilution d'un échantillon, la quantité de biotine restant dans le sac à la fin de cette dialyse représente 2,7 % de la quantité initiale (soit $\sim 2,37$ %).

La biotine stabiliserait donc S112P sous forme tétramérique et permettrait sa fixation à l'iminobiotine lors de la chromatographie. La présence de monomère sur la figure 3.36 suggère que malgré tout, un faible pourcentage de protéine est capable de se retétramériser autour de l'iminobiotine durant son chargement sur la colonne. Mais il est plus probable qu'une partie de la biotine fixée dans les tétramères se soit décrochée lors des trois dernières dialyses de la purification, suggérant une faible constante d'affinité du mutant S112P pour la biotine.

Une tentative de la purification de S112P en ne dénaturant la protéine qu'après l'étape de chromatographie, permet d'obtenir 160 mg de S112P pur (pour 10 L de culture) soit 4,2 fois plus que lors de la première tentative de purification de ce mutant.

Le même protocole appliqué à l'extrait bactérien des mutants les plus difficilement purifiables (K80G, S112G, T123G, S112G-T123G, P64G-S112G ; S112G-N118T ; P64G-S112G-N118T rendement < 15 mg/L de culture), multiplie les rendements de purification de certains d'entre eux d'un facteur pouvant aller de 4 à 18 (Tableau 3.8).

Mutant	Rendement par purification type wild-type (mg/L de culture)	Rendement par purification type "S122P" (mg/L de culture)	Augmentation du rendement (%)
S112P	3,8	16	421
K80G	8 - 15	39	487 - 260
T123G	0,7	2,8	400
S112G-T123G	0	0	0
S112G	0	128	-
P64G-S112G	6	78	1 300
S112G-N118T	7 - 15	128	1 830 - 853

Tableau 3.8 : Rendement de production des mutants les plus difficiles à purifier en ne dénaturant qu'après chromatographie sur 2-iminobiotine-agarose.

Cette nouvelle forme de purification n'apporte aucune amélioration avec le mutant S112G-T123G bien qu'il soit capable de fixer la biotine-4-fluorescéine (§ 7.2). Une augmentation de rendement est observable avec T123G, toutefois, les quantités récupérées sont trop faible pour que l'on puisse parler de réelle amélioration. L'affinité de ces deux mutants pour les analogues de la biotine est apparemment très faible et leur purification par la 2-iminobiotine est inefficace. Une résine de biotine-agarose a été décrite dans la littérature⁸⁵ et de meilleurs rendements de purification pourraient être observés avec ces deux mutants en utilisant ce type de résine.

Pour les autres mutants, le nouveau mode de purification donne des résultats encourageants. Les mutants de « type S112G » qui se décrochent habituellement de la résine lors de l'étape de fixation ou de lavage, restent fixés en présence de la biotine endogène de l'extrait bactérien. De même, l'affinité de K80G pour la résine semble être augmentée par la présence de biotine (soit par une augmentation de la fonctionnalité qui suggérerait un phénomène de

coopérativité de la fixation de molécules biotinyllées par ce mutant, soit par une meilleure solubilisation ou soit par une tétramérisation).

Cette méthode alternative de purification de la streptavidine sera prochainement appliquée sur le triple mutant P64G-S112G-N118T et probablement sur les mutants dont les rendements de purification sont moyens par rapport à ceux obtenus avec la protéine wild-type (V47G-S112G ; S112N ; S112Q ; S112W et S112Y ; Tableau 3.7).

5.5. DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE DES MUTANTS

La totalité des mutants purifiés est chargée sur SDS-PAGE en conditions non dénaturantes (pas de chauffage des échantillons avant chargement, pas de SDS ni de β -mercaptoéthanol dans le tampon de charge). La figure 3.37 montre le résultat obtenu.

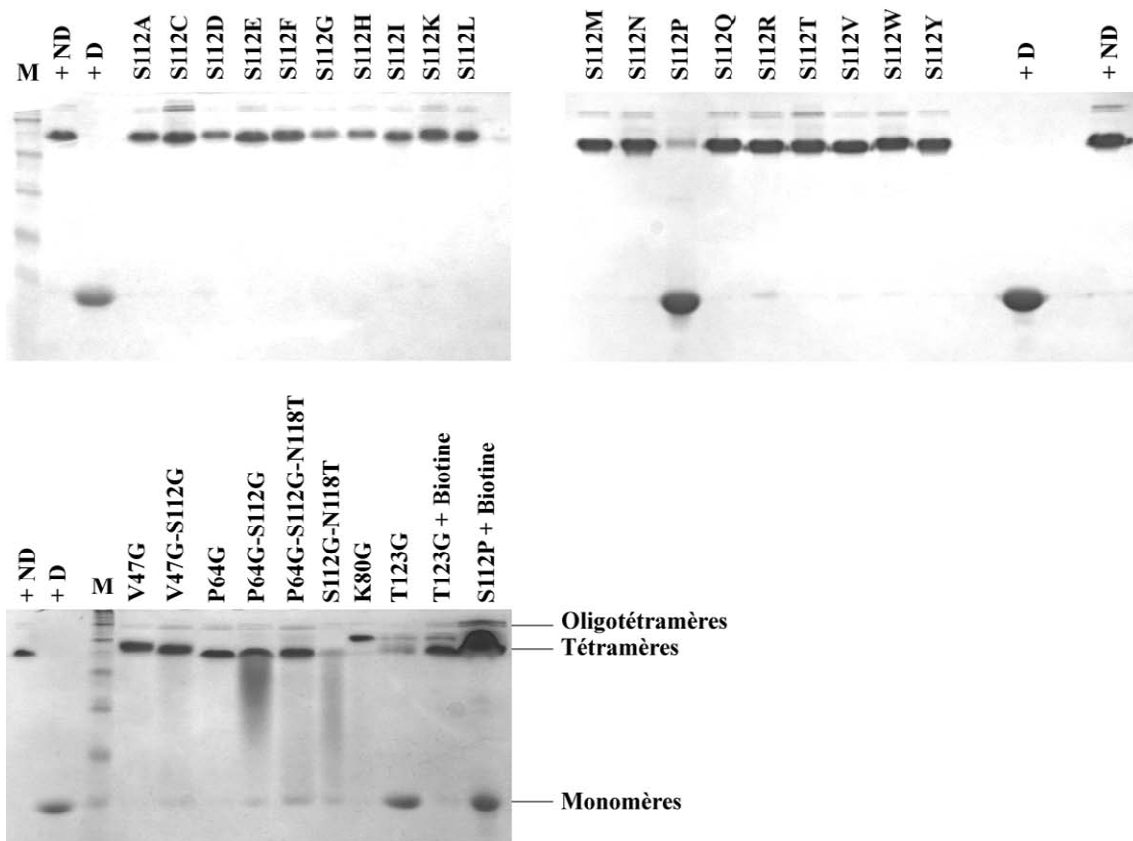


Figure 3.37 : SDS-PAGE de l'ensemble des mutants purifiés en conditions non-dénaturantes et des mutants monomériques en présence de biotine. + ND : Protéine wild-type non dénaturée ; + D : Protéine wild-type dénaturée ; M : Marqueur de taille.

La totalité des isoformes de la streptavidine sont tétramériques dans ces conditions exceptées S112P et T123G. De légères différences de migrations sont observables entre les mutants tétramériques.

Le mutant K80G a toutefois un comportement électrophorétique particulier, non seulement il est tétramérique, mais sa migration est retardée par rapport aux autres, contrairement à ce que sa charge globale pourrait laisser penser (voir aussi § 7.2). Une modification structurale importante comme un élargissement de l'entrée du site actif pourrait être envisagée.

Concernant T123G et S112P, ils apparaissent sous forme de tétramère en présence de biotine soit totalement (T123G), soit partiellement (S112P). La présence de SDS dans le gel et le

tampon de migration pourrait être mise en cause pour la monomérisation de ces deux mutants. Lors de tests préliminaires de tamisage moléculaire effectués sur ces deux mutants (tests effectués avec le Prof. Schürmann), un pic de 16 kDa apparaît majoritairement (non montré). Le profil de tamisage moléculaire est proche de celui observé en SDS-PAGE, ce qui est en corrélations avec les données de la littérature^{76,88}.

5.6. STABILITÉ DE LA STREPTAVIDINE EN SDS-PAGE EN CONDITIONS DÉNATURANTES ET NON-DÉNATURANTES

5.6.1. Cas de la streptavidine sans biotine

L'équilibre protéine native \leftrightarrow protéine dénaturée peut-être étudié de différentes façons. Pour la streptavidine, nous nous sommes inspirés des travaux de Bayer et Wilchek sur la stabilité thermique en SDS-PAGE⁷⁶. La protéine wild-type est soumise 15 minutes à différentes températures en conditions dénaturantes (loading buffer contenant 1 % de SDS et 2 % de β -Mercaptoéthanol) et non dénaturantes (loading buffer sans SDS, ni β -Mercaptoéthanol) puis est chargée sur SDS-PAGE.

La Figure 3.38 montre les résultats obtenus. La forme monomérique apparaît à 63 °C en conditions dénaturantes contre 72 °C en conditions non dénaturantes. Dans les deux cas, le tétramère disparaît à plus de 100 °C. La présence d'une bande à la taille du dimère suggère que la transition tétramère – monomère passe par le stade dimérique⁷⁶.

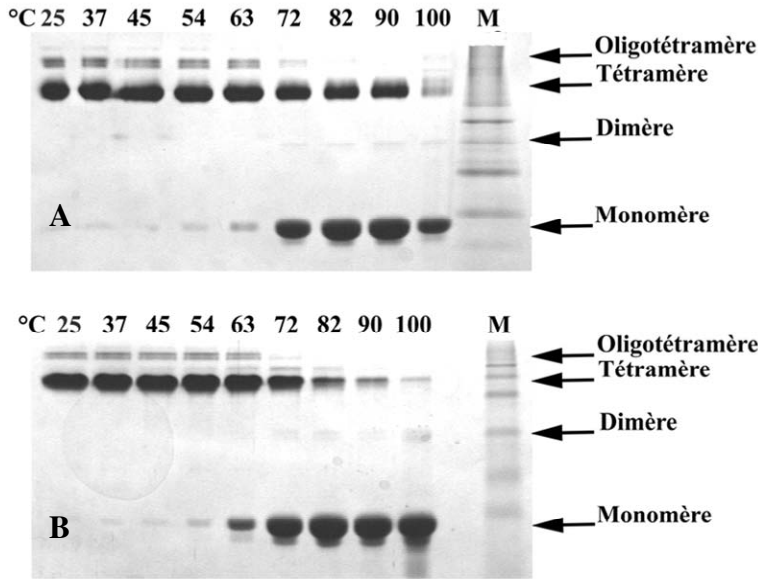


Figure 3.38 : Dénaturation thermique de la streptavidine. **A.** En conditions non dénaturantes. **B.** En conditions dénaturantes.

Pour étudier la cinétique de la dénaturation du tétramère, la protéine est soumise à une température de 90 °C à différents temps en conditions non dénaturantes puis est chargée sur SDS-PAGE. La Figure 3.39 montre les résultats obtenus. Une minute est nécessaire pour voir apparaître le dimère et le monomère et voir disparaître les formes oligotétramériques. A partir de 20 minutes, le profil observé est le même, c'est à dire une trace de tétramère et de dimère (suggérant la présence de biotine n'ayant pas été éliminée durant l'étape de dénaturation). La transition tétramère – dimère est totale en 20 minutes.

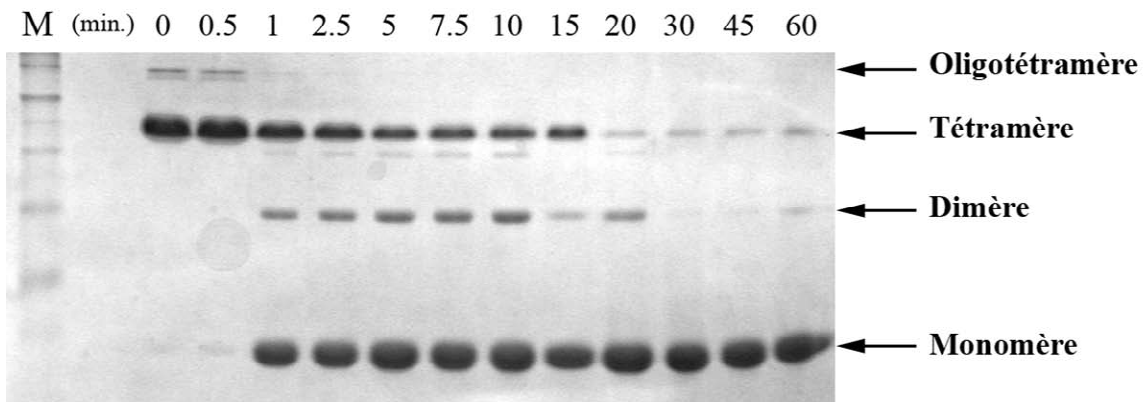


Figure 3.39 : Cinétique de dénaturation de la streptavidine.

5.6.2. Cas de la protéine complexée avec la biotine et le ligand $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$

La biotine est connue pour stabiliser la streptavidine (et l'avidine) sous forme tétramérique lorsque la protéine est soumise à de hautes températures^{59,76}. Nous avons voulu savoir ce qu'il en est avec le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$ (Figure 3.40).

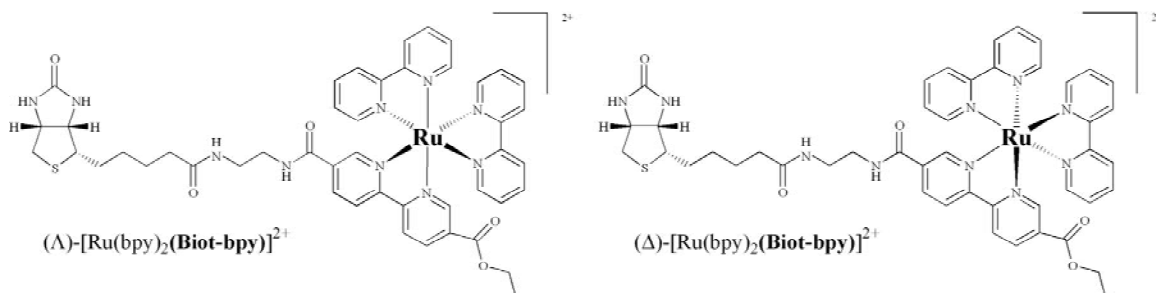


Figure 3.40 : Structure des deux énantiomères du complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$.

Tout comme précédemment, le complexe streptavidine / biotine ou $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$ est chauffé 15 minutes à différentes températures, puis est chargée sur SDS-PAGE (Fig. 3.41). Dans les deux cas, la température d'apparition du monomère est de 100 °C aussi bien en conditions dénaturantes que non dénaturantes. Aucune différence n'est observable entre les deux énantiomères du $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$ bien qu'ils possèdent une constante d'affinité différente pour la streptavidine ($K_{a\Delta} = 10^{7,22} \text{ M}^{-1}$ et $K_{a\Lambda} = 10^{7,50} \text{ M}^{-1}$)⁹⁹.

En présence de biotine, la protéine se trouve principalement sous forme tétramérique. A l'inverse, en présence de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$, la protéine se trouve très majoritairement sous forme d'oligomères. Ceci suggère que les résidus bipyridine du $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Biot-bpy})]^{2+}$ interagissent entre eux d'une protéine à l'autre par empilement (stacking) ou que le complexe provoque une modification structurale de la partie C terminale qui augmenterait sa capacité à agréger la protéine⁷⁵.

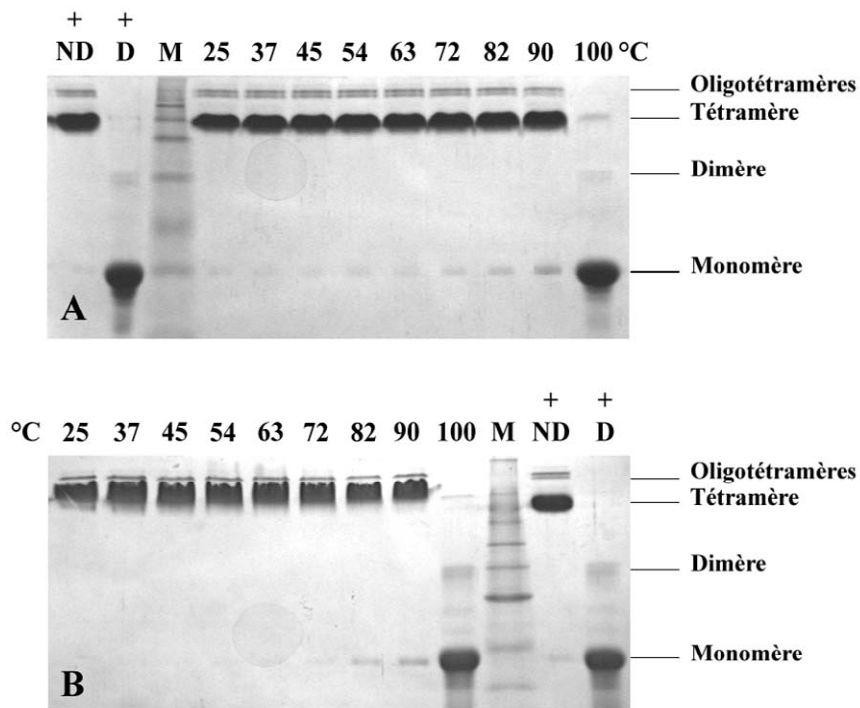


Figure 3.41 : Dénaturation thermique de la streptavidine en présence de biotine (A.) et de Δ -[Ru(bpy)₂(Biot-bpy)]²⁺ (B.).

5.7. CARACTÉRISATIONS EN COURS

Les constantes d'affinité des mutants pour la biotine sont actuellement en cours de détermination au laboratoire par M. Edy Rusbandi. Cette détermination est envisagée par une étude par dichroïsme circulaire de l'exclusion du HABA par la biotine. Par ailleurs, une collaboration avec l'équipe du professeur Dario Neri (ETZ, Zurich) est mise en place pour déterminer la constante d'affinité et la constante cinétique (k_{off}) des différents mutants pour la biotine tritiée par dialyse à l'équilibre. De même, quelques essais de band-shift assay sur les protéines complexées à la biotine-4-fluorescéine donnent des résultats prometteurs.

Par ailleurs, quelques essais d'isoélectrofocalisation montrent des résultats cohérents en fonction des charges, mais aucun point isoélectrique n'a été déterminé à ce jour. Ces expériences ont été effectuées avec l'aide du professeur Schürmann.

6. CATALYSES ÉNANTIOSÉLECTIVES

6.1. HYDROGÉNATION CATALYTIQUE DE L'ACIDE ACÉTAMIDOACRYLIQUE ET DE L'ACIDE ACÉTAMIDOCINNAMIQUE

6.1.1. Résultats des catalyses

Ces catalyses ont été mises au point et optimisées au laboratoire par le Dr. Jérôme Collot, le Dr. Gérard Klein et Melle Myriem Skander. Les différents catalyseurs ont été synthétisés par le Dr. Jérôme Collot et le Dr. Julietta Gradinaru. Les diverses protéines ont été produites par le Dr. Andrea Zocchi, Anita Ivanova et moi-même. A titre personnel, j'ai effectué quelques catalyses sur le wild-type, S112P (dénaturé durant la purification et non dénaturé) et V47G-S112G en utilisant les ligands **Biot-1**, **Biot-4^{meta}-1**, **Biot-3¹-2**, **Biot-3²-2** et **Biot-4^{ortho}-2**. Les résultats obtenus sont montrés tableau 3.9 et figure 3.42.

N°	Ligand	Protéine	ee A. Acr	conv A. Acr	ee A. Cin	conv A. Cin
1	Biot-1	WT	93	100	93	95
2	Biot-1	V47G-S112G	16	100	29	83
3	Biot-1	S112P-ND	31	100	87	96
4	Biot-1	S112P-D	25	100	85	83
5	Biot-4 ^{meta} -1	WT	-46	100	-51	97
6	Biot-4 ^{meta} -1	V47G-S112G	-25	100	-37	67
7	Biot-4 ^{meta} -1	S112P-ND	-36	100	-78	99
8	Biot-4 ^{meta} -1	S112P-D	-40	100	-75	90
9	Biot-3 ¹ -2	WT	11	100	-18	27
10	Biot-3 ¹ -2	V47G-S112G	-30	100	-38	100
11	Biot-3 ¹ -2	S112P-ND	-16	100	-44	67
12	Biot-3 ¹ -2	S112P-D	-16	100	-43	48
13	Biot-3 ² -2	WT	-37	100	-42	51
14	Biot-3 ² -2	V47G-S112G	-10	41	0	5
15	Biot-3 ² -2	S112P-ND	-10	100	-12	43
16	Biot-3 ² -2	S112P-D	-10	100	-22	22
17	Biot-4 ^{ortho} -2	WT	-49	100	0	27
18	Biot-4 ^{ortho} -2	V47G-S112G	20	100	-21	61
19	Biot-4 ^{ortho} -2	S112P-ND	14	100	0	17
20	Biot-4 ^{ortho} -2	S112P-D	19	96	0	7

Tableau 3.9 : Excès énantiomériques obtenus lors de l'hydrogénation catalytique de l'acide α -acétamidoacrylique et de l'acide α -acétamidocinnamique. Les protéines testées sont la protéine wild type, V47G-S112G, S112P dénaturée et renaturée (S112P-D) et S112P non dénaturée durant la culture (S112P-ND). NB : - = forme (S) ; + = forme (R) des produits de la réaction.

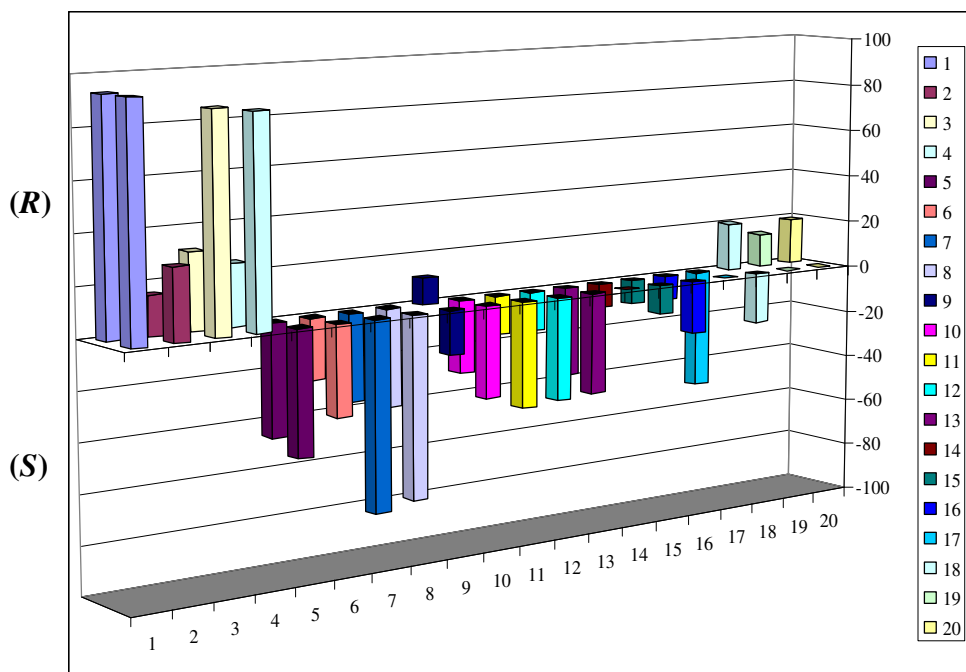


Figure 3.42 : Schématisation des résultats de catalyse. L'hydrogénation de l'acide α -acétamidocinnamique est au premier plan et celle de l'acide α -acétamidoacrylique au second. Les numéros correspondent aux conditions décrites tableau 3.9.

Trois articles ont été publiés à ce jour sur les résultats du groupe sur l'hydrogénation catalytique. Ils sont présentés en annexes (Annexes 2, 3 et 4 : Collot *et al* 2003, Skander *et al* 2004 et Collot *et al* 2004, voir aussi ¹⁵⁷).

Concernant les catalyses présentées ici, les valeurs de l'excès énantiomérique de l'hydrogénation de l'acide α -acétamidoacrylique en acétamidoalanine obtenues avec V47G-S112G, peuvent être comparées avec celles obtenues avec les deux simples mutants V47G et S112G (les valeurs de l'hydrogénation de l'acide α -acétamidocinnamique avec S112G sont en cours de détermination et ne peuvent donc pas être discutées ici). Avec le complexe **Biot-1** dans le double mutant ee = +16 % (en faveur de la forme *R*) contre 96 % pour S112G et 26 % pour V47G suggérant une modification structurale suffisamment importante pour diminuer de manière dramatique la sélectivité du mutant S112G (- 80 %) (Tableau 3.10).

Complexe	ee V47G-S112G	ee S112G	ee V47G
Biot-1	16	96	26
Biot-4^{méta}-1	-25	0	-50
Biot-3¹-2	-30	-31	7
Biot-3²-2	-10	-8	-19
Biot-4^{ortho}-2	20	-57	44

Tableau 3.10 : Comparaison des excès énantiomériques obtenus lors de l'hydrogénation de l'acide α -acétamidoacrylique effectuée avec le double mutants V47G-S112G et les simples mutants S112G et V47G.

En présence de **Biot-4^{méta}-1** et de **Biot-4^{ortho}-2**, les valeurs obtenues avec le double mutant sont des valeurs intermédiaires par rapport à celles obtenues avec les deux simples mutants. Ceci laisse à penser que les deux simples mutations contrecarrent leurs effets respectifs.

Enfin en présence de **Biot-3¹-2** et **Biot-3²-2**, les valeurs obtenues avec le double mutant sont très proches de celles obtenues avec S112G. Il semble que la mutation S112G ait une influence prédominante sur le positionnement du métal par rapport à la mutation V47G. D'un

point de vue structural, cela pourrait vouloir dire que l'entité catalytique des complexes **Biot-3¹-2** et **Biot-3²-2** soit plus proche de la boucle 7,8 (portant S112G) que de la boucle 3,4 (portant V47G), mais il ne s'agit que de spéculations et cela reste à confirmer.

Les doubles mutants semblent être un outil intéressant pour analyser les résultats de catalyse. Les travaux en cours sur l'acide α -acétamidocinnamique devraient permettre d'aller plus en profondeur dans la compréhension de la catalyse d'hydrogénation. Néanmoins, si deux mutations permettent d'émettre des hypothèses, elles ne suffisent pas à expliquer ce qui se passe réellement durant la catalyse. Seule la résolution de la structure des différents complexes insérés dans la protéine est susceptible d'apporter des éléments de réponse tangibles sur l'influence des mutations sur la catalyse.

Concernant les catalyses effectuées avec le mutant S112P, peu de différences sont observables selon que la protéine ait été dénaturée ou non, excepté le taux de conversion de l'hydrogénation de l'acide α -acétamidocinnamique. Toutefois, en termes de diversité, les excès énantiomériques observés diffèrent assez nettement de ceux obtenus avec la protéine wild-type, ce qui est peu surprenant compte tenu de la mutation apportée.

Une question peut se poser, comment évolue la protéine durant la catalyse ? Est-elle modifiée ? Reste-t-elle tétramérique malgré les conditions auxquelles elle est soumise ? Un certain nombre d'expériences apporte quelques éléments de réponse.

6.1.2. Analyse par spectre de masse de la protéine après catalyse

La propriété qu'a la streptavidine d'être dénaturable et renaturable permet d'envisager son recyclage après la catalyse. Le mutant S112F ayant subi la catalyse (processus comportant 24 h d'hydrogénation et une extraction à l'acétate d'éthyle) est dénaturé et renaturé, lyophilisé et

analysé par ESI-MS. La figure 3.43 montre le spectre de masse du mutant tel qu'il a été obtenu lors de sa purification et le spectre de masse après la catalyse. Le spectre de la protéine tout juste purifiée montre un pic à $16\,481 \pm 3.21$ Da (masse théorique $16\,484.01$ Da) avec un léger bruit de fond sur des tailles supérieures. Ce même pic est présent majoritairement après la catalyse, auquel se surajoutent un grand pic à $16\,504,25$ Da et quelques pics mal définis aux alentours de $17\,800$ - $17\,900$ Da et entre $15\,000$ et $16\,000$ Da.

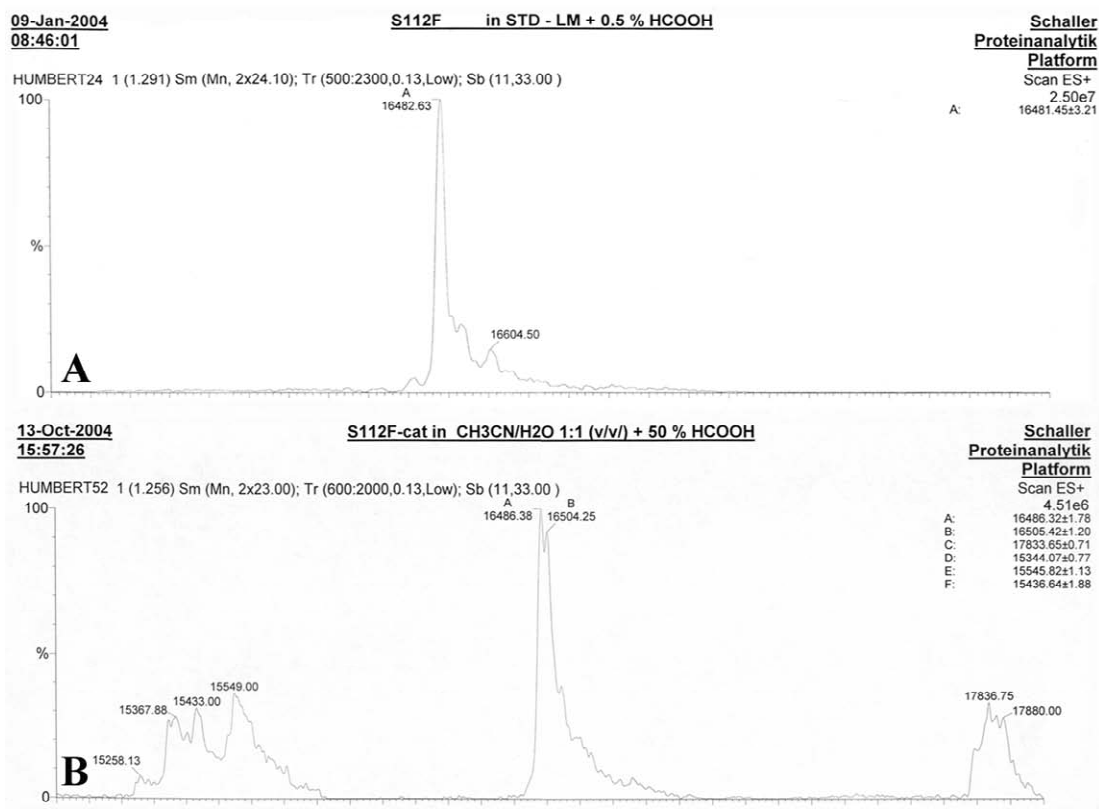


Figure 3.43 : Comparaison des spectres de masse du mutant S112F fraîchement purifiée (**A.**) et après hydrogénation catalytique (**B.**).

L'origine des pics à $17\,800$ - $17\,900$ Da n'est pas expliquée. Apparemment, quelque chose est additionné à la protéine lors de la catalyse ou de l'extraction. Il semble peu probable qu'il s'agisse de la protéine portant encore le catalyseur biotinylé du fait de la dénaturation dans le

chlorure de guanidium et des conditions dénaturantes de la mesure (c-à-d $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 50\% \text{HCO}_2\text{H}$).

Concernant les pics entre 15 000 et 16 000 Da, on peut supposer que la protéine soit clivée en plusieurs endroits. Toutefois, les pics sont très diffus et mal définis, ils ne permettent pas de déterminer la nature du ou des clivage(s) que subit la protéine. Que se passe-t-il exactement ? A quel moment (durant la catalyse et/ou l'extraction) ? Il semble difficile de le déterminer. Toutefois compte tenu de la fragilité de la partie C-terminale de la protéine dans les conditions naturelles, il est probable que le clivage se produise dans cette zone.

6.1.3. Etude de la structure quaternaire de la protéine dans les conditions de la catalyse

La streptavidine et plus encore l'avidine résistent à des conditions assez drastiques en particulier en présence de biotine^{58,59,76}. Qu'en est-il dans les conditions de la catalyse (10 % DMSO, pH 4) ? Pour le déterminer, la protéine est chargée sur SDS-PAGE en conditions dénaturantes et non dénaturantes à différents moments de la catalyse (Fig. 3.44) :

- i) Lors de sa complexation avec le catalyseur $[\text{Rh}(\text{COD})(\mathbf{Biot-1})]$ dans l'eau (+ 10 % DMSO qui permet la solubilisation du complexe biotinylé).
- ii) Dans le milieu réactionnel (en présence du tampon, du substrat et du complexe $[\text{Rh}(\text{COD})(\mathbf{Biot-1})]$) avant hydrogénation.
- iii) Dans le même milieu après 15 heures de catalyse.
- iv) Après extraction à l'acétate d'éthyle.

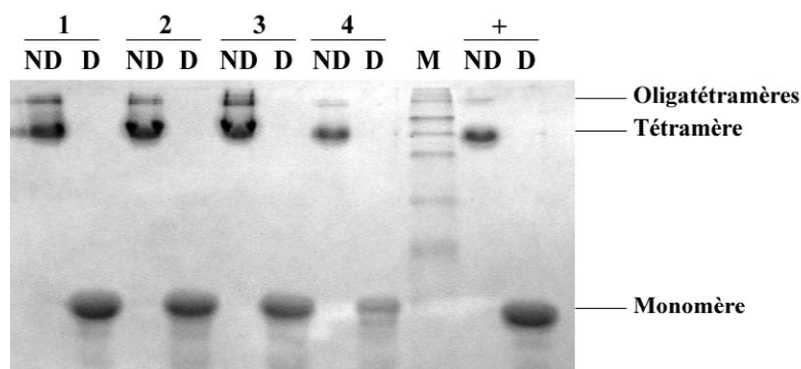


Figure 3.44 : Analyse de la protéine à différentes étapes de l'hydrogénation catalytique de l'acide α -acétamidoacrylique. 1 = Complexe [Rh(COD)(Biot-1)] / streptavidine dans l'eau + 10 % DMSO ; 2 = Milieu réactionnel de la catalyse avant hydrogénation ; 3 = Milieu réactionnel après 15 h de catalyse ; 4 = phase aqueuse de l'extraction à l'acétate d'éthyle ; + = protéine seule. D = Conditions dénaturantes ; ND = Conditions non dénaturantes.

Il apparaît que la protéine est tétramérique à toutes les étapes de la catalyse et l'on peut penser qu'elle est fonctionnelle malgré les modifications chimiques qu'elle subit (voir paragraphe précédant).

6.1.4 Dénaturation thermique du complexe streptavidine / [Rh(COD)(Biot-1)]

Dans l'article Skander *et al* (2004), une étude de l'évolution de la catalyse en fonction de la température est présentée. Le taux de conversion est de 100 % pour des températures supérieures à 20 °C. En revanche, l'excès énantiomérique décrit une gaussienne avec un maximum pour 20-30 °C (ee = 94 %). Deux hypothèses peuvent être formulées, soit le complexe biotinylé se dissocie de la protéine à haute température, soit la protéine subit une modification structurale provoquant un changement de position du rhodium et une plus grande accessibilité de celui-ci.

Une étude de la cinétique de l'hydrogénation de l'acide α -acétamidoacrylique montre que la réaction est totale au bout de 20-25 minutes avec le complexe [Rh(COD)(**Biot-1**)] (Myriem Skander, communication personnelle). Une analyse de la dénaturation thermique de la streptavidine wild-type en présence du complexe [Rh(COD)(**Biot-1**)] dans le milieu de catalyse avant hydrogénation, montre qu'au bout de 20 minutes, la protéine est tétramérique jusqu'à 90 °C (Fig. 3.45). Dans les mêmes conditions, la streptavidine seule apparaît sous forme monomérique à 72 °C (voir paragraphe 5.6.1). Ceci suggère une protection thermique de la streptavidine par [Rh(COD)(**Biot-1**)]. Autrement dit, le large groupement diphénylphosphine / rhodium / COD, n'empêche pas la fixation de la partie biotinylée du complexe et cette fixation reste effective le temps nécessaire pour que la catalyse soit totale quelque soit la température de la réaction.

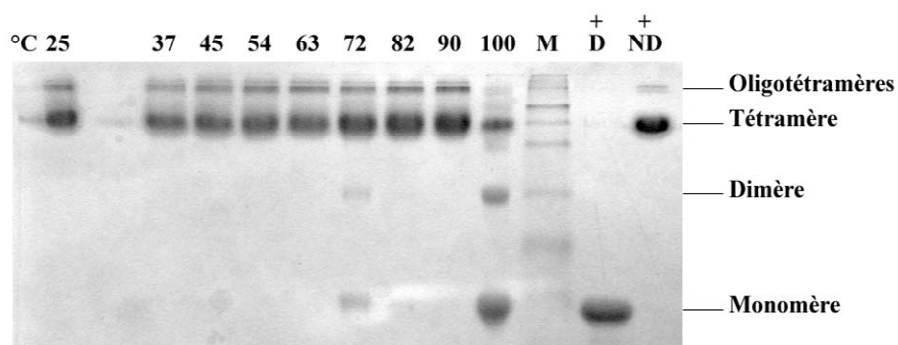


Figure 3.45 : Dénaturation thermique du complexe Streptavidine / [Rh(COD)(**Biot-1**)].

L'évolution de l'excès énantiomérique ne s'explique donc pas par une dissociation complexe catalytique / protéine. L'effet de la température sur la catalyse est probablement dû à une modification de la structure de la protéine induite par une agitation thermique. La seconde sphère de coordination du métal est donc changée.

6.2. TRANSFERT D'HYDROGÉNATION CATALYTIQUE

Ces travaux ont fait l'objet d'un article (Annexe 5 : Letondor *et al*, 2005), la synthèse des complexes et les catalyses ont été effectuées par M. Christophe Letondor. Tout comme pour l'hydrogénation catalytique, des analyses sur SDS-PAGE montrent que la protéine est sous forme de tétramère en fin de catalyse. De même, des expériences de dénaturation thermique en conditions non-dénaturantes ont montré que le monomère apparaît à 82 °C et que le tétramère ne disparaît qu'au dessus de 100 °C (non montré).

6.3. OXYDATION CATALYTIQUE

Un article a été publié sur ces travaux (Annexe 6 : Thomas *et al* 2005). La catalyse a été effectuée au laboratoire par le Dr. Christophe Thomas à l'aide de complexes catalytiques préparés par M. Christophe Letondor. Le gel d'analyse a été réalisé par moi-même.

7. TESTS DE FONCTIONNABILITÉ DES MUTANTS PAR MINICULTURE

7.1. NÉCESSITÉ DE CE TYPE DE TESTS

Comme il a été vu précédemment, les différents mutants de la streptavidine apportent une grande diversité dans les résultats de catalyse qui se traduit parfois par une augmentation du taux de conversion ou de l'excès énantiomérique. Malgré tout, lors du « design » d'un mutant, ses propriétés et notamment sa fonctionnalité sont difficilement prévisibles. En désignant certains mutants comme N81P, N85P ou S112G-T123G, nous ne nous attendions pas à obtenir une protéine dont les propriétés soient proches du wild-type, mais nous ne nous attendions pas non plus à obtenir deux mutants totalement non fonctionnels. De même, comment prédire qu'un mutant comme P64G soit aussi fonctionnel malgré la nature de la mutation qu'il porte ?

A long terme, il est prévu dans le groupe de générer des bibliothèques de mutants aléatoires obtenus soit par « error prone PCR », par DNA shuffling des séquences de l'avidine et de la streptavidine ou par insertion de cassettes de séquences dégénérées au sein du gène (voir § 9 et 10). Il apparaît donc crucial d'obtenir un moyen de tester la fonctionnalité des mutants générés. De tels tests doivent pouvoir se faire sur un extrait cellulaire ou mieux à l'échelle de la colonie, dans la mesure du possible, ils doivent être rapide, simple et sans ambiguïté.

Dans un premier temps, nous avons développé un test sur l'extrait cellulaire de minicultures de 4 mL en utilisant la biotine-4-fluorescéine. L'avantage de cette molécule en plus de se fixer à la (strept)avidine, est d'être fluorescente et donc détectable directement sans nécessiter de systèmes de révélation « multi-étapes », long et parfois coûteux. Deux méthodes d'analyses sont envisagées : le SDS-PAGE révélé par un transilluminateur de biologie moléculaire et le lecteur de plaque ELISA.

7.2. ANALYSE PAR SDS-PAGE

Ces travaux ont occasionné la publication d'un article dans le journal *Electrophoresis* (voir Humbert *et al* 2005 en annexe). Une analyse de protection thermique de la protéine par la biotine-4-fluorescéine, un comparatif de la limite de détection par UV ou par coloration au bleu de Coomassie de la protéine et l'analyse de minicultures y sont présentés.

Comme il a été précisé dans le texte de cet article, la nouvelle technique a été appliquée sur l'ensemble des mutants que nous possédons. La figure 3.46 montre un gel effectué sur un certain nombre de mutants impurifiables ou nécessitant la purification alternative (§ 5.4.3). Seuls N81P et N85P ne donnent aucun signal, confirmant ainsi qu'ils sont totalement inactifs. En revanche, S112G-T123G donne un résultat positif suggérant une faible activité de ce mutant (voir

§ 5.4.3). Les protéines ne sont pas dénaturées dans cette expérience, elles sont stabilisées par la biotine endogène de l'extrait bactérien et probablement par la biotine-4-fluorescéine.

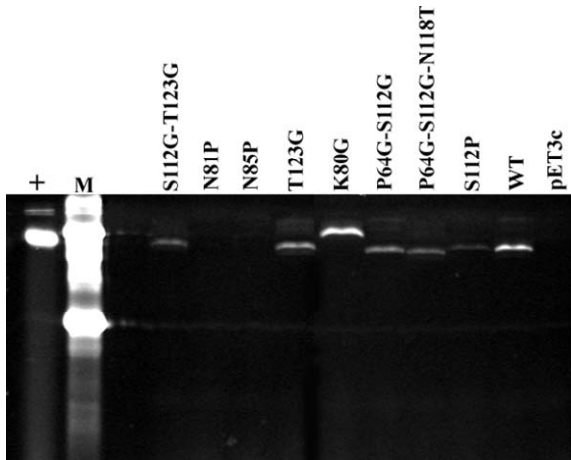


Figure 1.46 : Migration de minicultures de différents mutants en présence de biotine-4-fluorescéine révélés par transilluminateur UV. + : protéine wild-type non dénaturé ; M : protein marker Broad-Range (New-England Biolabs).

La technique développée ici est efficace et relativement peu contraignante, malgré tout, elle ne permet pas d'analyser beaucoup d'échantillons à la fois. Aussi, avons nous tenté le même type d'analyses par plaque ELISA.

7.3. ANALYSE PAR LECTEUR DE PLAQUES ELISA

7.3.1. Mise au point de la technique

Le principe de cette technique est basé sur la quantification d'extraits cellulaires mise au point par Gruber¹³⁵. On ne peut donc pas travailler avec un excès de biotine-4-fluorescéine comme en SDS-PAGE. Il est donc nécessaire de déterminer la concentration optimale de biotine-4-fluorescéine pour titrer les échantillons, car si l'on obtient d'une manière à peu près reproductible 160 à 200 mg de protéine par litre de culture en utilisant un fermenteur, il est peu probable que ce soit le cas de bactéries cultivées dans 4 mL de milieu, dans un tube Falcon de 50 mL et sans aération.

Les extraits bactériens de 4 minicultures sont titrés avec des solutions de biotine-4-fluorescéine de différentes concentrations. Les mutants choisis sont la protéine wild-type et S112G comme positifs, V47G dont le titrage par la biotine-4-fluorescéine est difficile (§ 5.3.2) et le plasmide pET3c comme négatif. La biotine-4-fluorescéine à différentes concentrations (1,6 μM ; 3,2 μM , 8 μM et 16 μM) est ajoutée deux fois. Les courbes de titrage obtenues sont montrées figure 3.47.

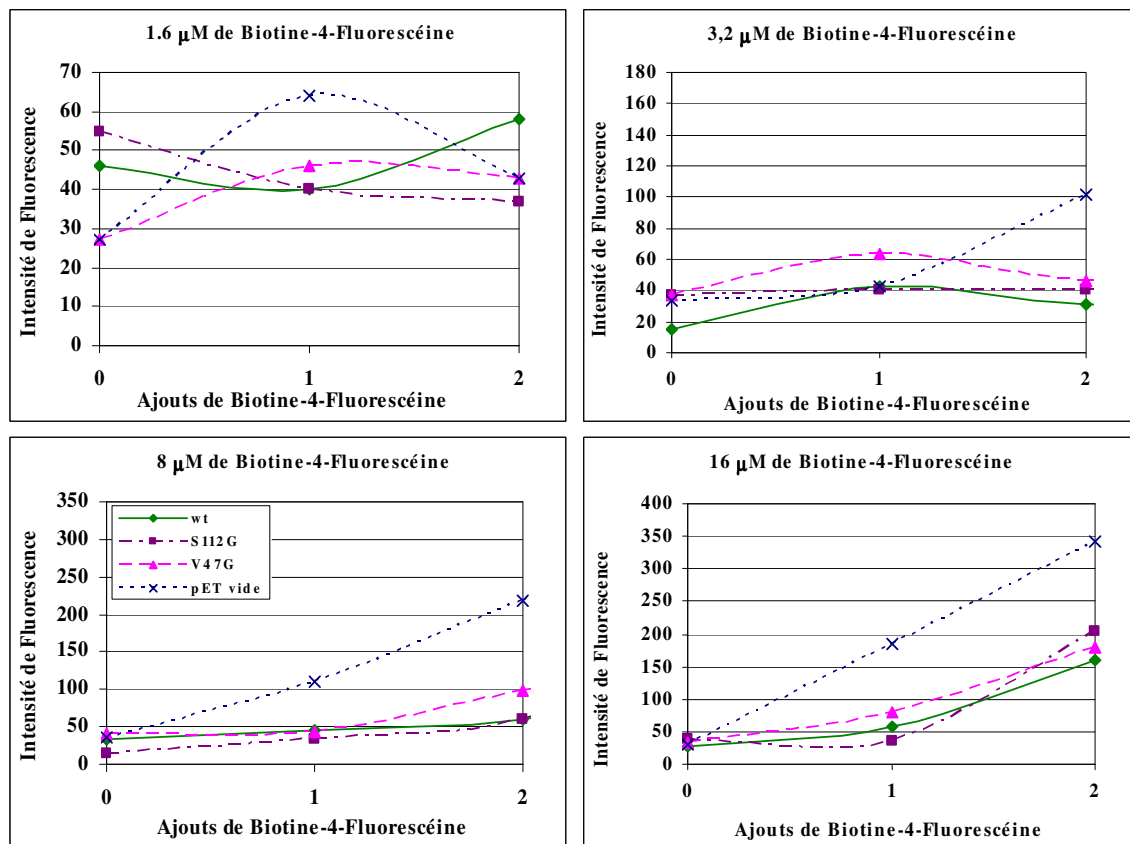


Figure 3.47 : Détermination de la concentration de biotine-4-fluorescéine à appliquer sur l'extrait bactérien des minicultures lors des mesures par lecteur de plaques ELISA.

A faible concentration de biotine-4-fluorescéine (1,6 et 3,2 μM), les courbes de titrages sont peu ou pas distinctes et aucune réelle différence n'est observable d'un mutant à l'autre. A des concentrations plus élevées, (8 et 16 μM), le quenching de la fluorescence de la biotine-4-

fluorescéine est parfaitement décelable y compris avec V47G. Par soucis d'économie, la mesure est effectuée avec une concentration de 8 μ M de biotine-4-fluorescéine.

7.3.2. Résultats obtenus

Le titrage par la biotine-4-fluorescéine en lecteur de plaque ELISA est effectué sur la fraction soluble de l'extrait cellulaire de l'ensemble des mutants. La figure 3.48 montre les courbes obtenues avec certains d'entre-eux (NB : dans tous les cas un contrôle positif est effectué avec de la protéine purifiée en large excès, de même, un puits ne contenant que du tampon de titrage fait office de contrôle négatif). Ces résultats sont conformes à ce que l'on pouvait attendre (y compris pour les mutants non montrés). Globalement plus un mutant est fonctionnel, plus la courbe obtenue est proche de celle obtenue avec la protéine wild-type.

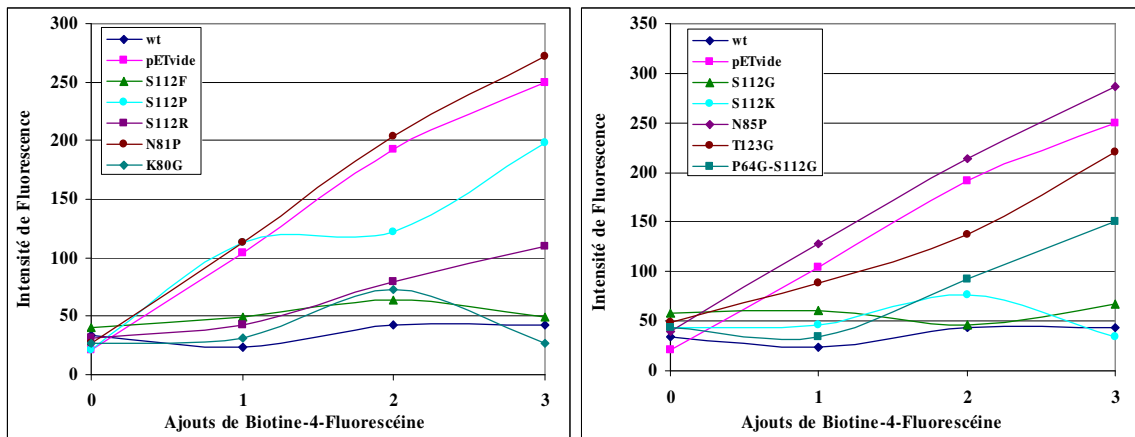


Figure 3.48 : Analyse par plaque ELISA de minicultures de différents mutants par la biotine-4-fluorescéine.

Cette technique est plus sensible que l'analyse par SDS-PAGE, les courbes obtenues semblent corrélées avec les rendements de production. T123G et S112P donnent des bas rendements de purification, leur courbe est proche de celle du plasmide vide. De même les mutants donnant un rendement de purification élevé ont une courbe proche de celle obtenue avec

la protéine wild-type. Une réserve peut toutefois être émise pour le mutant K80G, sa courbe est voisine de celle du wild-type, alors qu'il n'est purifiable qu'avec des rendements modestes en utilisant la technique alternative de purification.

Les deux techniques développées ici (SDS-PAGE et plaques ELISA) sont efficaces et permettent d'obtenir des renseignements sur la fonctionnalité des mutants de la streptavidine, elles sont faciles à mettre en oeuvre, mais nécessitent de cultiver les cellules en tube de 50 mL (et probablement dans des tubes de plus faible volume en réduisant le volume de culture à 1 mL) ce qui limite le nombre de clones testés. Il est donc indispensable de développer un crible à plus grande échelle.

8. PRODUCTION DES MUTANTS DANS LES PLAQUES DE CULTURES

De nombreux protocoles de cultures cellulaires réfèrent aux plaques de culture, y compris avec les bactéries³¹. Dans le laboratoire quelques tentatives de cultures de levures dans ce type de plaque ont été effectuées¹²⁷. Il paraît donc intéressant de tenter de cultiver les bactéries exprimant la streptavidine dans ce type de boîte.

Les 20 mutants de saturation (y compris la protéine wild-type), N81P, N85P et T123G ainsi qu'un clone transformé avec un plasmide vide sont cultivés dans une plaque de 24 puits. Les conditions de culture sont identiques à celles utilisées en fermenteur en adaptant les volumes. L'induction a lieu arbitrairement au bout de 3 heures de croissance et la culture est stoppée après 2 heures d'induction. Les cellules sont alors centrifugées, puis congelées jusqu'à l'analyse.

Une purification grossière est effectuée (reprise des cellules dans le tampon de resuspension 2 contenant de la DNase I), puis les corps d'inclusions sont éliminés par centrifugation. Un aliquote de la fraction soluble est transféré dans une plaque ELISA 96 puits et

les différents échantillons sont titrés par la biotine-4-fluorescéine diluée à une concentration de 8 μM . Les résultats obtenus sont très similaires à ceux obtenus par la même mesure effectuée sur l'extrait bactérien des minicultures de 4 mL.

Ce crible présente plusieurs avantages :

- i) Il est à haut débit.
- ii) Il s'agit comme précédemment d'un test à révélation directe.
- iii) L'exploitation des données sous forme de courbes permet d'effectuer une quantification grossière de l'extrait cellulaire.
- iv) Seulement un quart de l'extrait est utilisé pour la mesure et l'on peut parfaitement envisager d'utiliser les trois quarts restants pour effectuer une catalyse « *in vivo* ».

La même expérience tentée en cultivant les cellules dans une plaque ELISA de 96 puits, ne donne pas de résultat satisfaisant. Les volumes mis en jeu (180 μL) sont trop faibles pour obtenir une agitation convenable des cellules. En effet, ces dernières ont tendance à rester au fond du puits plutôt que d'être en suspension homogène. De plus, ce type de plaque ne dispose pas d'un système d'aération ad-hoc comme c'est le cas dans les plaques de culture. Seul un mutant sur deux donne le résultat attendu.

En utilisant une plaque de 48 puits (850 μL de culture), les résultats sont meilleurs, mais pas aussi nets qu'avec une plaque de 24 puits.

9. MUTANTS 24-25-26

Lors du « design » des différents mutants, nous nous sommes principalement concentrés sur les boucles adjacentes au site de fixation de la biotine. La mutagenèse de saturation en position 112 apporte des résultats intéressants en termes de catalyses et en termes de propriétés

biologiques. Malgré tout, aucune métalloenzyme ne permet d'obtenir une conversion et excès énantiomérique de > 99,9 %. Il paraît d'ailleurs peu probable qu'elle soit obtenue par une simple mutation, surtout en l'absence de structure cristallographique de la protéine complexée avec un catalyseur biotinylé. Il est donc nécessaire d'obtenir une librairie de mutants plus large.

L'« error-prone-PCR » le plus souvent complétée par la mutagenèse de saturation, a de nombreuses fois fait ses preuves en termes d'enrichissement énantiosélectif^{28,31}. Cette approche présente toutefois quelques désavantages. Des insertions ou des délétions de bases peuvent se produire et générer des protéines totalement inactives par décalage du cadre de lecture, de même, les acides aminés importants dans l'activité de la protéine ou son repliement peuvent être substitués. Ces contraintes nécessitent un criblage à haut débit avec une faible proportion de positifs^{28,31}.

Le remplacement des zones codantes pour les boucles adjacentes au site de fixation de la biotine (boucles 1,2 ; 3,4 ; 5,6 ; 7,8) par une séquence dégénérée, apparaît comme une solution alternative. Une telle substitution évite les problèmes de décalage du cadre de lecture et ne touche pas les acides aminés impliqués dans la formation du β -barrel. Toutefois, rien n'indique que cette stratégie puisse donner une bonne proportion de mutants fonctionnels.

La boucle 1,2 est constituée de l'asparagine 23, de la glutamine 24, de la leucine 25, de la glycine 26 et de la sérine 27. Ces 5 acides aminés interagissent soit directement avec la biotine (Asn 23 et Ser 27) soit indirectement via leur squelette peptidique (Glu 24, Leu 25 et Gly 26) (Figure 3.49).

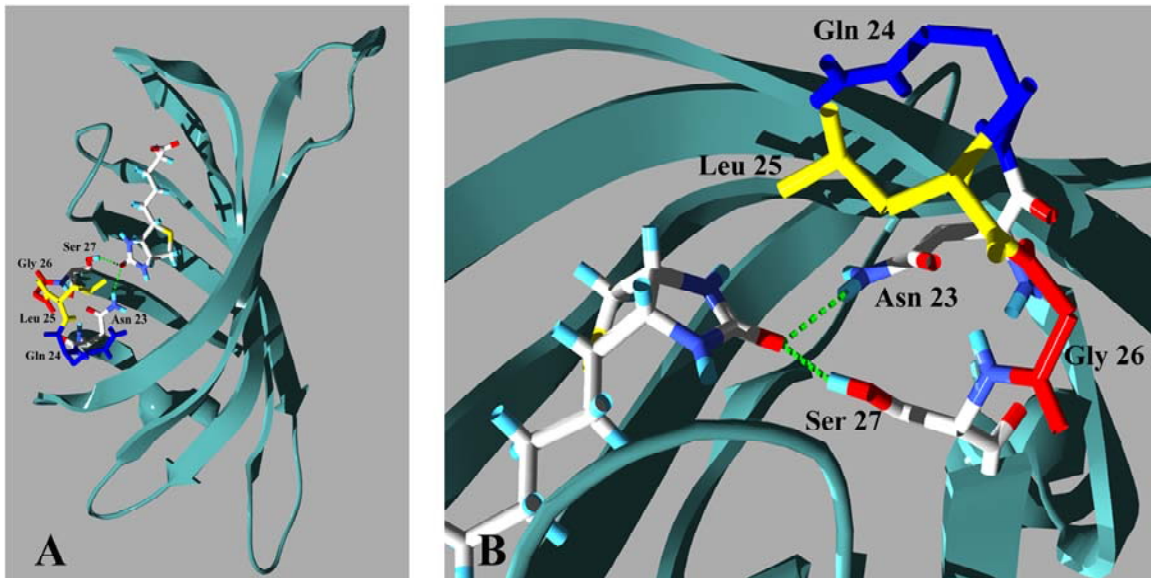


Figure 3.49 : Interactions entre la boucle 1,2 et la biotine. **A.** A l'échelle du monomère. **B.** Détail de cette interaction.

La mutation de l'asparagine 23 et de la sérine 27 entraînent une très forte baisse de l'affinité de la protéine pour la biotine⁹². Ne voulant pas trop perturber cette interaction, nous nous sommes focalisés sur les résidus Glu24, Leu25 et Gly26. L'obtention d'une séquence dégénérée sur ces trois positions est effectuée par mutagenèse de saturation en appliquant les amorces U₂₄₂₅₂₆ et L₂₄₂₅₂₆ (Fig. 3.50) sur le plasmide pET11b-SAV.

U₂₄₂₅₂₆ :
 5' CCGGCACCTGGTACAACnnsnnsnnsTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGC 3'

L₂₄₂₅₂₆ :
 5' CGATGAAGGTCGAsnnsnnsnnGTTGTACCAGGTGCCGGTGATGCCGGC 3'

Figure 3.50 : Amorces utilisées pour générer 8 000 mutants par saturation des positions 24, 25 et 26.

Les bactéries de production sont transformées par le produit PCR. Les clones obtenus sont repiqués sur milieu sélectif (en vue d'effectuer un glycérol stock des positifs) et mis en culture dans les plaques 24 puits. L'analyse est effectuée par lecteur de plaque ELISA et chaque clone positif est séquencé.

A l'heure actuelle, seules la PCR mutagène et la transformation des bactéries BL21(DE3)pLysS ont été effectuées. Le produit de PCR apparaît à la bonne taille sur gel d'agarose et les plasmides générés sont transformants.

10. « REDESIGN » DU GÈNE

10.1. BUT DU « REDESIGN »

La substitution de la boucle 1,2 par une séquence dégénérée est rendue possible par une mutagenèse de saturation de trois résidus successifs, mais il semble plus difficile d'appliquer cette technique sur des séquences plus longues (en comptant large : 8 résidus pour les boucles 3,4 et 5,6 en éliminant les sérines 45 et 88 ; 12 pour la boucle 7,8). De plus, nous désirons préserver l'asparagine 49 et le tryptophane 120 afin d'assurer un minimum d'affinité pour la biotine aux mutants générés. Il semble donc préférable de définir des cassettes délimitées par de sites de restriction au sein des séquences du gène codant pour les brins β plutôt que de tenter la mutagenèse de saturation. Ces sites doivent être uniques sur la totalité du plasmide pET11b-SAV.

10.2. STRATÉGIE UTILISÉE

Dans un premier temps, la séquence du gène est soumise au site « web cutter » (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>) spécialisé dans l'analyse de restriction des séquences d'ADN, en sélectionnant les enzymes ne coupant pas le plasmide pET11b vide (en l'occurrence AflII, AgeI, AscI, AvrII, BaeI, BseRI, BsrGI, Bsu36I, DraIII, FseI, KpnI, MunI, NcoI, NotI, NsiI, NspV, PacI, PmeI, PmlI, RleAI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SexAI, SfiI, SgfI, SmaI, SnaBI, SpeI, SrfI, Sse837II, StuI, SunI, SwaI et XhoI)¹³⁷, à l'exception de SnaBI

fortement déconseillée pour les clonages (Dr Gabor Jakab, communication personnelle), et de BseRI dont la coupure est mal définie.

Par chance, 5 sites uniques sur les 8 requis pour encadrer les 7 boucles parmi les enzymes testées sont « naturellement » présents dans les séquences codantes pour les brins β (Fig. 3.51). SexAI est présent dans le brin β 1, SacII dans le deuxième, AgeI dans le n°4, PmlI dans le n°6 et DraIII dans le n°7. Il ne reste qu'à trouver un site à insérer dans les brins β 3, 5 et 8 (ou dans la partie N-terminale).

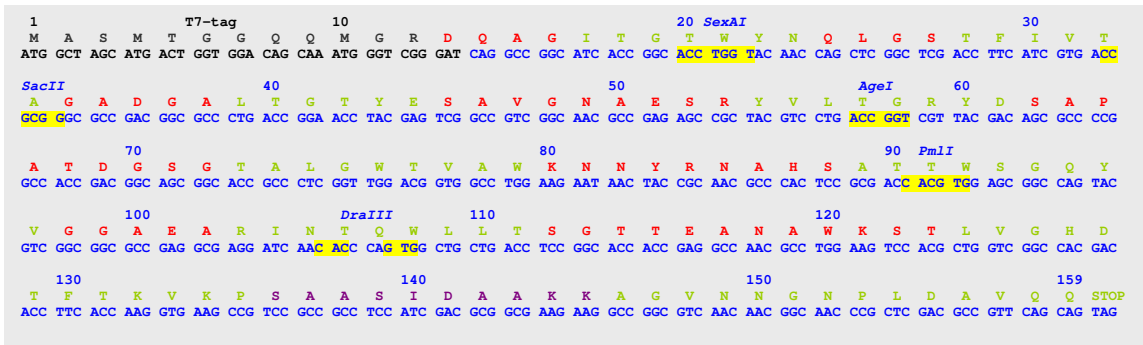


Figure 3.51 : Sites de restriction naturellement présents dans le gène. La séquence du T7-tag apparaît en noir, les sites de restrictions sont surlignés en jaune et leur nom apparaît en italique, les acides aminés impliqués dans les boucles apparaissent en rouge, ceux dans les brins β en vert et l'hélice α apparaît en violet.

Dans un deuxième temps, une traduction inverse (back-translation) de la séquence de la protéine est effectuée (Fig. 3.52). La séquence d'ADN obtenue est de nouveau soumise au web cutter. Les enzymes dont les sites déjà présents dans le gène sont exclues de la sélection. De plus, la présence de PmlI dont la coupure se fait en bouts francs, oblige d'exclure également PmeI, StuI et SwaI qui elles aussi, coupent en bout francs.

NsiI *SexAI* *MunI*
atggcnwsnatgacngngngncarcacaratggngmgngaycargcnggnathacnggnacntggtaayaaycarytn base pairs
taccgnwsntactgncncncngtygtytaccnkcncnctrgtycgnccntadtgncocntgnaccatrttrgtyran 1 to 75
KpnI

Sall *KpnI* *SfiI* *SacI* *KpnI*
ggwnsnacnttyathgtnacngngngcngayggngcnytnacngnacntaygarwsngcngtngnaaygcn base pairs
ccnwsntgnaartadcantgncgncncngnctrcncngnranrntgnccntgnatrcctywsngcncancnttrcgn 76 to 150
BsrGI *SunI*

SexAI *AflIII* *AflIII* *SacI* *KpnI* *KpnI* *Bsu36I*
garwsnmgntaygtntnacngngmgtaygaywsngcncngcncnacngayggwnsnggnacngcnytgngtgg base pairs
ctywsnkcnatrcanrantgncnkcncnctrcrwsngcngngcngntgnctrcnwsncntgncgnranccnacc 151 to 225
SpeI *BseRI* *AvrII*

SexAI *BseRI*
acngtngcngtggaaaraayaaytaymnaaygncaywsngcncnacntggwsnggncartaygtngngngngcn base pairs
tgncancngnaccttytrtrtrtrtrkcntrrcngtrwsncngntgntgnaccwsncngtyatrcancncncngn 226 to 300

SpeI *BseRI* *KpnI* *AflIII* *Sall* *SpeI*
gargcnmgnaaayaacncartggtyntnacnwsnggnacnacngargcnaaygcntggaarwsnacnytnngtn base pairs
ctycgkcnatdtrtrngtyaccranrantgnwsncncntgntgntcygnttrcgnaccttywsntgnranca 301 to 375
AflIII *NsiI* *BsrGI*
Bsu36I

AflIII *NcoI* *MunI* *SfiI*
ggncaygayacnttyacnaargtnaarccnwsngcncnwsnathgaycngcnaaraargcngngtnaayaay base pairs
cngtrcrtgnaartgnttycanytggnwsngcngnwsntadctrcngcngnttytctygcncncanttrtr 376 to 450
AvrII *NsiI*

BsrGI
ggnaayccnytngaycngtncarcarr base pairs
cncntrgggnrncntrcngcangtygyay 451 to 480

Figure 3.52 : Analyse de restriction du gène après traduction inverse. b = c,g,t ; d = a,g,t ;
h = a,c,t ; k = g,t ; m = a,c ; n = a,c,g,t ; r = a,g ; s = c,g ; v = a,c,g ; w = a,t ; y = c,t.

Les enzymes AflIII, AscI, FseI, NotI, NspV, PacI, RsrII, SgfI, SmaI, SrfI, Sse8387I, et XhoI ne coupent pas le gène quelque soit la combinaison des codons utilisés. Le tableau 3.11 montre la position et la séquence reconnue par les enzymes restantes. Un certain nombre de sites est éliminé pour ne pas modifier la séquence du T7-tag de manière à pouvoir hybrider l'amorce SAV-EcoF sur le gène (Tableau 3.11, positions en gras et italique).

Enzyme	Positions	Séquence reconnue
AvrII	216 403	c/ctagg
BsrGI	79-364 468	t/gtaca
Bsu36I	216 333	cc/tnagg
KpnI	6 59 80 125 206 212 341	ggtac/c
MunI	70 416	c/aattg
NcoI	403	c/catgg
NsiI	10 357 418	atgca/t
SacI	114 189	gagct/c
Sall	78 363	g/tcgac
SfiI	109 433	ggccnnnn/nggcc
SpeI	154 331 369	a/ctagt
SunI	125	c/gtacg

Tableau 3.11 : Positions possibles des sites de restriction. Les sites situés dans le T7-tag sont en italique et en gras, les sites occasionnant un changement d'acide aminé sont barrés.

De plus, le web cutter tient compte de la séquence dégénérée sans tenir compte de l'acide aminé codé. Ainsi, certains sites déterminés ne sont pas valables. La sérine est par exemple, codée par le codon dégénéré WSN (W = A ou T ; S = C ou G ; N = A, C, G ou T) et non pas par AGK (K = G ou T) + TCN. La séquence WSN inclue également les codons AGR (R = A ou G); ACN ou TGN qui coderont pour un autre acide aminé ou un codon stop (l'arginine pour AGR ; la thréonine pour ACN ; le tryptophane pour TGG ; STOP pour TGA ou une cystéine pour TGY ; Y = C ou T). La Figure 3.53 montre deux possibilités de générer un site KpnI, l'une respecte la séquence protéique, l'autre substitue la sérine 69 par une thréonine. Un certain nombre de positions est ainsi éliminé (Tableau 3.10, sites rayés), dont les sites NcoI.

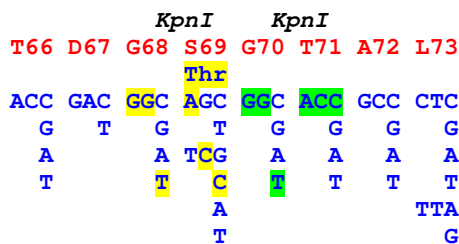


Figure 3.53 : Exemple de site générant un changement d'acide aminé dans la séquence. Le site KpnI générant une mutation est surligné en jaune, celui n'en générant pas est en vert.

La carte résultante du gène est montrée sur la figure 3.54. La séquence définitive porte les sites naturels. KpnI est éliminée à cause des coupures aspécifiques qu'elle peut générer¹⁵². SunI (= BsiWI) reste donc la seule possibilité en β 3. L'enzyme AvrII étant déjà présente au laboratoire, est préférée à Bsu36I en β 5. En β 8-Cterminal, le choix de MunI (= MfeI) imposé par sa position (SpeI est trop proche de la boucle 7,8 ; SfiI et BsrGI en sont trop éloignées).

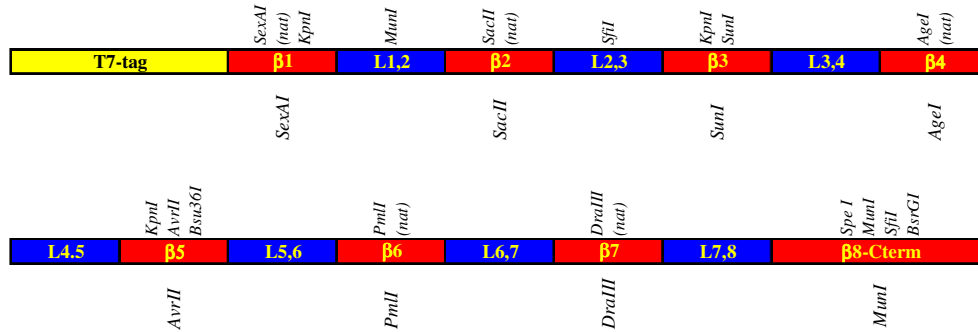


Figure 3.54 : Carte de restriction du gène après élimination des sites inintéressants. Les enzymes finalement sélectionnées apparaissent dans la partie du bas.

La Figure 3.55 montre l’alignement de la séquence initiale et de la séquence finale d’ADN. Il apparaît que seulement 4 mutations sont nécessaires pour générer les 3 nouveaux sites de restriction : une pour SunI, une pour AvrII et deux pour MunI. L’alignement des deux séquences de protéine est parfait, aucun changement d’acide aminé n’a été généré (non montré). Quant à analyse de restriction du nouveau gène, elle montre que les 8 enzymes choisies ne le coupent qu’une seule fois.

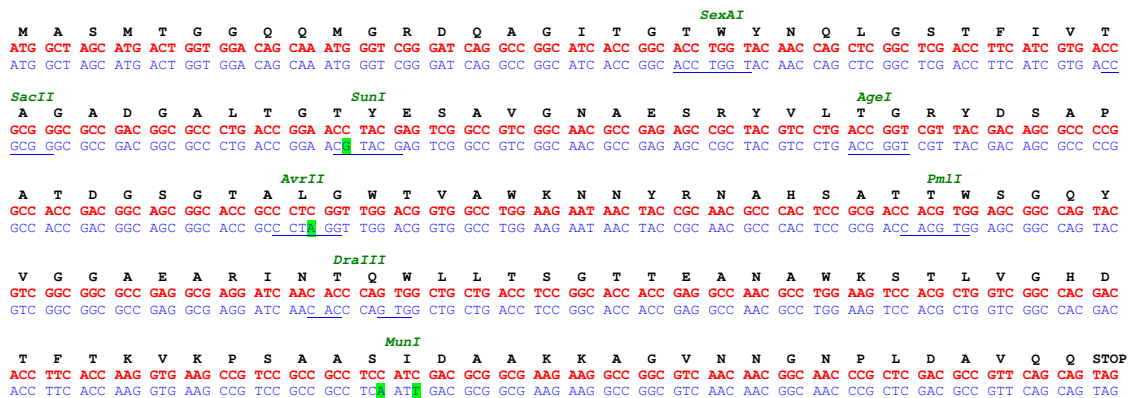


Figure 3.55 : Alignement de la séquence initiale (en rouge) et de la séquence finale (en bleu). Les sites de restriction sont soulignés, les mutations à générer sont surlignées en vert.

Les 6 amorces dessinées pour insérer les 3 sites sont montrés sur la figure 3.56.

USunI :
5' CC GGA ACg TAC GAG TCG GCC GTC GGC AAC GCC 3'
LSunI :
5' GGC CGA CTC GTA cGT TCC GGT CAG GGC GCC GTC GGC 3'

UAvrII :
5' GGC ACC GCC CTa GGT TGG ACG GTG GCC TGG 3'
LAvrII :
5' CGT CCA ACC tAG GGC GGT GCC GCT GCC GTC GG 3'

UMunI :
5' GCC GCC TCa ATt GAC GCG GCG AAG AAG GCC GGC 3'
LMunI :
5' CGC CGC GTC aAT aGA GGC GGC GGA CGG CTT CAC C 3'

Figure 3.56 : Amorces permettant l'insertion des 3 sites de restriction, les bases mutées sont en minuscules.

Les PCR mutagènes ont été effectuées avec succès au laboratoire par Melle Anita Ivanova et l'insertion des séquences dégénérées est actuellement en cours.

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La catalyse asymétrique par une métalloenzyme artificielle nécessite une approche combinatoire et un grand nombre d'optimisations. La mise au point de ce type de système requiert une grande quantité de protéine et lorsqu'il est optimisé, il nécessite une grande variété de mutants. Le système biotine – (strept)avidine s'avère être un matériel de choix de part la haute affinité des deux protéines pour la biotine⁵⁹ pour générer des métalloenzymes capables de catalyser des réactions énantiosélectives^{44,45,158}.

Dans ce travail, la production et la purification de la streptavidine par *E. coli* ont été optimisées jusqu'à obtenir une protéine pure à plus de 95 %, active à quasiment 100 % et ce, à l'échelle du gramme. De telles quantités ont permis tous les criblages nécessaires à la mise au point et à la reproductibilité des catalyses.

30 mutants en plus de la protéine wild-type ont été générés, 2 sont complètement inactifs, 8 sont peu actifs et ont nécessité de modifier le protocole de purification, 5 sont purifiables avec des rendements de purification modestes, mais suffisants pour être exploités à grande échelle en catalyse et les 20 autres ont des rendements de purification comparables à ceux de la protéine wild-type. La purification des mutants peu ou pas actifs peut être envisagée par des techniques alternatives (chromatographie d'affinité d'anticorps dirigés contre le T7-tag¹³⁷ ou colonne de biotine-agarose⁸⁵).

La caractérisation des mutants a mis en évidence certaines modifications structurales importantes (mutants monomériques) ou une baisse significative de l'affinité de certains d'entre eux pour la 2-iminibiotine.

La diversité des mutants apporte également une grande variabilité des résultats de catalyse et permet d'entrevoir un début de compréhension des mécanismes mis en jeu. En termes biochimiques, cette diversité a permis le développement d'un certain nombre de criblages de fonctionnalité à haut débit des « biotin-binding proteins » en partant de culture de faible volume. Ce système est facile à mettre en œuvre, il est rapide et reproductible. Tout est prêt pour commencer des expériences d'évolution dirigée du gène de la streptavidine et de DNA-shuffling entre les gènes de l'avidine et de la streptavidine.

Par ailleurs, des études structurales de la protéine complexée avec un ligand de catalyse sont en cours. A terme, elles devraient permettre de mettre en évidence les acides aminés clés dans le positionnement du métal et d'envisager un « design » rationnel des mutations à apporter à la protéine pour améliorer les systèmes mis en place. Une première évolution a d'ailleurs été effectuée au travers de l'obtention d'un « recombinant core streptavidin » (en insérant un codon stop dans notre séquence par mutagenèse dirigée) afin de mettre en évidence un éventuel rôle de la partie C terminale de la protéine sur la catalyse. Si cette partie s'avérait importante, le clivage de cette zone sur plusieurs sites choisis est envisageable. De même, l'obtention d'une avidine fusionnée à la partie C terminale de la streptavidine devrait apporter des données intéressantes.

En outre, l'ingénierie du système biotine – (strept)avidine se tourne vers l'obtention de protéines chimériques. Il peut s'agir de chimères avidine – streptavidine par insertion d'une boucle précise de l'une des protéines, à la place correspondante de l'autre protéine. Ce type de projet a occasionné un travail de diplôme (master) dans notre laboratoire¹²⁷, mais des études équivalentes ont également été menées dans d'autres laboratoires¹²⁹. Récemment Kulomaa et Stayton se sont intéressés à l'obtention de chimères avidine – rAVD résistantes à de hautes températures et insensibles aux protéases¹⁵⁹. Ce type de chimères ainsi que des mutants obtenus

par permutation circulaire^{86,89,90} permettent de mieux comprendre la nature de l'interaction biotine – (strept)avidine. Mais tout laisse à penser que ces « biotin-binding proteins » artificielles puissent offrir une grande diversité de résultats de catalyse.

Beaucoup de travail reste à faire en termes de caractérisation de la protéine et plusieurs études sont actuellement en cours, notamment la détermination du point isoélectrique des différents mutants, la détermination de leur constante d'affinité pour la biotine ou la biotine-4-fluorescéine et leur profil de tamisage moléculaire.

En termes de catalyse, une réduction des quantités mises en jeu est à l'étude ainsi que l'exploitation du criblage à haut débit des mutants. De plus, la mise en place de métalloenzymes capables de catalyser de nouvelles réactions comme l'époxydation ou l'oxydation est en cours de développement.

Enfin, la rédaction de deux nouveaux articles est en projet, l'un portera sur la production de la protéine et la purification alternative ; l'autre sur la technique de criblage des mutants par microplaques de culture.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cahn, R. S., Ingold, C. K. & Prelog, V. (1956) Specification of asymmetric configuration in organic chemistry, *Experientia*. 12, 81-94.
2. Testa, B. (1979) *Principles of Organic Stereochemistry*.
3. Franks, M. E., Macpherson, G. R. & Figg, W. D. (2004) Thalidomide, *Lancet*. 363, 1802-11.
4. Blaschke, G., Kraft, H. P., Fickentscher, K. & Koehler, F. (1979) Chromatographic racemic separation of thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers, *Arzneimittel-Forschung*. 29, 1640-2.
5. Knowles, W. S. (2002) Asymmetric hydrogenations (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1998-2007.
6. Noyori, R. (2002) Asymmetric catalysis: science and opportunities (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2008-2022.
7. Sharpless, K. B. (2002) Searching for new reactivity (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2024-2032.
8. Ohkuma, T., Ooka, H., Ikariya, T. & Noyori, R. (1995) Preferential hydrogenation of aldehydes and ketones, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10417-18.
9. Kolb, H. C., VanNieuwenhze, M. S. & Sharpless, K. B. (1994) Catalytic Asymmetric Dihydroxylation, *Chem. Rev.* 94, 2483-547.
10. Rossiter, B. E., Katsuki, T. & Sharpless, K. B. (1981) Asymmetric epoxidation provides shortest routes to four chiral epoxy alcohols which are key intermediates in syntheses of methymycin, erythromycin, leukotriene C-1, and disparlure, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 464-5.

11. Vogl, E. M., Groger, H. & Shibasaki, M. (1999) Towards perfect asymmetric catalysis: additives and cocatalysts, *Angew. Chem. Int. Ed.* *38*, 1570-1577.
12. Liese, A. & Filho, M. V. (1999) Production of fine chemicals using biocatalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* *10*, 595-603.
13. Tan, D. S., Guenter, M. M. & Drueckhammer, D. G. (1995) Enzymatic Resolution Coupled with Substrate Racemization Using a Thioester Substrate, *J. Am. Chem. Soc.* *117*, 9093-4.
14. Sakai, K., Nakazawa, A., Kondo, K. & Ohta, H. (1985) Microbial hydrogenation of nitroolefins, *Agric. Biol. Chem.* *49*, 2331-5.
15. Li, K. & Frost, J. W. (1998) Synthesis of Vanillin from Glucose, *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 10545-10546.
16. Mertens, R., Greiner, L., van den Ban, E. C. D., Haaker, H. B. C. M. & Liese, A. (2003) Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration, *J. Mol. Catal. B: Enzyme.* *24-25*, 39-52.
17. Zelinski, T., Liese, A., Wandrey, C. & Kula, M.-R. (1999) Asymmetric reductions in aqueous media: enzymic synthesis in cyclodextrin-containing buffers, *Tetrahedron Asym.* *10*, 1681-1687.
18. Arnold, F. H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design, *Nature.* *409*, 253-7.
19. Vartanian, J. P., Henry, M. & Wain-Hobson, S. (1996) Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions, *Nucleic Acids Res.* *24*, 2627-31.
20. Camps, M., Naukkarinen, J., Johnson, B. P. & Loeb, L. A. (2003) Targeted gene evolution in *Escherichia coli* using a highly error-prone DNA polymerase I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *100*, 9727-32.

21. Horsman, G. P., Liu, A. M., Henke, E., Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. (2003) Mutations in Distant Residues Moderately Increase the Enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* Esterase towards Methyl 3-Bromo-2-methylpropanoate and Ethyl 3-Phenylbutyrate, *Chem. Eur. J.* *9*, 1933-9.
22. May, O., Nguyen, P. T. & Arnold, F. H. (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine, *Nat. Biotechnol.* *18*, 317-20.
23. Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. & Jaeger, K. E. (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase, *Chem. Biol.* *7*, 709-18.
24. Stemmer, W. P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *91*, 10747-51.
25. Cramer, A., Raillard, S. A., Bermudez, E. & Stemmer, W. P. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution, *Nature.* *391*, 288-91.
26. Yano, T., Oue, S. & Kagamiyama, H. (1998) Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *95*, 5511-5.
27. Oue, S., Okamoto, A., Yano, T. & Kagamiyama, H. (1999) Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non-active site residues, *J. Biol. Chem.* *274*, 2344-9.
28. Reetz, M. T. (2001) Combinatorial and Evolution-Based Methods in the Creation of Enantioselective Catalysts, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *40*, 284-310.
29. Maheshri, N. & Schaffer, D. V. (2003) Computational and experimental analysis of DNA shuffling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *100*, 3071-6.
30. Voigt, C. A., Mayo, S. L., Arnold, F. H. & Wang, Z. G. (2001) Computational method to reduce the search space for directed protein evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *98*, 3778-83.

31. Reetz, M. T. (2004) Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *101*, 5716-22.
32. Reetz, M. T., Wilensek, S., Zha, D. & Jaeger, K. E. (2001) Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *40*, 3589-3591.
33. England, P. M. (2004) Unnatural amino acid mutagenesis: A precise tool for probing protein structure and function, *Biochemistry*. *43*, 11623-11629.
34. Soumillion, P. & Fastrez, J. (1998) Incorporation of 1,2,4-triazole-3-alanine into a mutant of phage lambda lysozyme containing a single histidine, *Protein Eng.* *11*, 213-217.
35. Davis, B. G. (2003) Chemical modification of biocatalysts, *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 379-86.
36. Zhang, J. H., Dawes, G. & Stemmer, W. P. (1997) Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *94*, 4504-9.
37. Reetz, M. T. (2002) Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts, *Tetrahedron*. *58*, 6595-6602.
38. Reetz, M. T., Rentsch, M., Pletsch, A. & Maywald, M. (2002) Towards the directed evolution of hybrid catalysts, *Chimia*. *56*, 721-723.
39. Kaiser, E. T. & Lawrence, D. S. (1984) Chemical mutation of enzyme active sites, *Science*. *226*, 505-11.
40. Levine, H. L., Nakagawa, Y. & Kaiser, E. T. (1977) Flavopapain: synthesis and properties of semi-synthetic enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *76*, 64-70.
41. Levine, H. L. & Kaiser, E. T. (1978) Oxidation of dihydronicotinamides by flavopapain, *J. Am. Chem. Soc.* *100*, 7670-7.

42. Matsumoto, K., Davis, B. G. & Jones, J. B. (2002) Chemically modified "polar patch" mutants of subtilisin in peptide synthesis with remarkably broad substrate acceptance: designing combinatorial biocatalysts, *Chem. Eur. J.* 8, 4129-37.
43. Haering, D., Lees, M. R., Banaszak, L. J. & Distefano, M. D. (2002) Exploring routes to stabilize a cationic pyridoxamine in an artificial transaminase: site-directed mutagenesis versus synthetic cofactors, *Protein Eng.* 15, 603-610.
44. Wilson, M. E. & Whitesides, G. M. (1978) Conversion of a protein to a homogeneous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with a diphosphinerhodium(I) moiety, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 306-7.
45. Lin, C.-C., Lin, C.-W. & Chan, A. S. C. (1999) Catalytic hydrogenation of itaconic acid in a biotinylated Pyrrhos-rhodium(I) system in a protein cavity, *Tetrahedron Asym.* 10, 1887-1893.
46. Ohashi, M., Koshiyama, T., Ueno, T., Yanase, M., Fujii, H. & Watanabe, Y. (2003) Preparation of artificial metalloenzymes by insertion of chromium(III) Schiff base complexes into apomyoglobin mutants, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 1005-8.
47. Carey, J. R., Ma, S. K., Pfister, T. D., Garner, D. K., Kim, H. K., Abramite, J. A., Wang, Z., Guo, Z. & Lu, Y. (2004) A site-selective dual anchoring strategy for artificial metalloprotein design, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 10812-3.
48. Gyorgy, P., Rose, C. S., Hofmann, K., Melville, D. B. & du Vigneaud, V. (1940) Identity of vitamin H with biotin, *Science (Washington, DC, United States)*. 92, 609.
49. Freitag, S., Le Trong, I., Klumb, L., Stayton, P. S. & Stenkamp, R. E. (1997) Structural studies of the streptavidin binding loop, *Protein Sci.* 6, 1157-66.
50. Attwood, P. V. & Wallace, J. C. (2002) Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes, *Acc. Chem. Res.* 35, 113-20.

51. Wallace, J. C., Jitrapakdee, S. & Chapman-Smith, A. (1998) Pyruvate carboxylase, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30, 1-5.
52. Nikolau, B. J., Ohlrogge, J. B. & Wurtele, E. S. (2003) Plant biotin-containing carboxylases, *Arch. Biochem. Biophys.* 414, 211-22.
53. Lindqvist, Y. & Schneider, G. (1996) Protein-biotin interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 798-803.
54. Rodriguez-Melendez, R. & Zemleni, J. (2003) Regulation of gene expression by biotin (review), *J. Nutr. Biochem.* 14, 680-90.
55. Streit, W. R. & Entcheva, P. (2003) Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 21-31.
56. Murray, C., Sutherland, P. W., Phung, M. M., Lester, M. T., Marshall, R. K. & Christeller, J. T. (2002) Expression of biotin-binding proteins, avidin and streptavidin, in plant tissues using plant vacuolar targeting sequences, *Transgenic Res.* 11, 199-214.
57. Birnbaum, J., Pai, C. H. & Lichstein, H. C. (1967) Biosynthesis of biotin in microorganisms. V. Control of vitamer production, *J. Bacteriol.* 94, 1846-53.
58. Green, N. M. (1975) Avidin, *Adv. Protein Chem.* 29, 85-133.
59. Green, N. M. (1990) Avidin and streptavidin, *Methods Enzymol.* 184, 51-67.
60. Wilchek, M. & Bayer, E. A. (1999) Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system, *Biomol. Eng.* 16, 1-4.
61. DeLange, R. J. & Huang, T. S. (1971) Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit, *J. Biol. Chem.* 246, 698-709.

62. Hytonen, V. P., Laitinen, O. H., Grapputo, A., Kettunen, A., Savolainen, J., Kalkkinen, N., Marttila, A. T., Nordlund, H. R., Nyholm, T. K., Paganelli, G. & Kulomaa, M. S. (2003) Characterization of poultry egg-white avidins and their potential as a tool in pretargeting cancer treatment, *Biochem. J.* 372, 219-25.
63. Marttila, A. T., Airene, K. J., Laitinen, O. H., Kulik, T., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Kulomaa, M. S. (1998) Engineering of chicken avidin: a progressive series of reduced charge mutants, *FEBS Lett.* 441, 313-7.
64. Marttila, A. T., Laitinen, O. H., Airene, K. J., Kulik, T., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Kulomaa, M. S. (2000) Recombinant NeutraLite avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties, *FEBS Lett.* 467, 31-6.
65. Gope, M. L., Keinanen, R. A., Kristo, P. A., Conneely, O. M., Beattie, W. G., Zarucki-Schulz, T., O'Malley, B. W. & Kulomaa, M. S. (1987) Molecular cloning of the chicken avidin cDNA, *Nucleic Acids Res.* 15, 3595-606.
66. Ahlroth, M. K., Ahlroth, P. & Kulomaa, M. S. (2001) Copy-number fluctuation by unequal crossing-over in the chicken avidin gene family, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 400-6.
67. Hytonen, V. P., Nyholm, T. K., Pentikainen, O. T., Vaarno, J., Porkka, E. J., Nordlund, H. R., Johnson, M. S., Slotte, J. P., Laitinen, O. H. & Kulomaa, M. S. (2004) Chicken avidin-related protein 4/5 shows superior thermal stability when compared with avidin while retaining high affinity to biotin, *J. Biol. Chem.* 279, 9337-43.
68. Laitinen, O. H., Hytonen, V. P., Ahlroth, M. K., Pentikainen, O. T., Gallagher, C., Nordlund, H. R., Ovod, V., Marttila, A. T., Porkka, E., Heino, S., Johnson, M. S., Airene, K. J. &

- Kulomaa, M. S. (2002) Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin, *Biochem. J.* 363, 609-17.
69. Airene, K. J., Marjomaki, V. S. & Kulomaa, M. S. (1999) Recombinant avidin and avidin-fusion proteins, *Biomol. Eng.* 16, 87-92.
70. Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Sussman, J. L. (1993) Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 5076-80.
71. Chalet, L. & Wolf, F. J. (1964) Properties of Streptavidin Biotin-Binding Protein Produced by Streptomycetes, *Arch. Biochem. Biophys.* 106, 1-5.
72. Tausig, F. & Wolf, F. J. (1964) Streptavidin--a substance with avidin-like properties produced by microorganisms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 205-9.
73. Argarana, C. E., Kuntz, I. D., Birken, S., Axel, R. & Cantor, C. R. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene, *Nucleic Acids Res.* 14, 1871-82.
74. Sano, T. & Cantor, C. R. (1990) Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87, 142-6.
75. Bayer, E. A., Ben-Hur, H., Hiller, Y. & Wilchek, M. (1989) Postsecretory modifications of streptavidin, *Biochem. J.* 259, 369-76.
76. Bayer, E. A., Ehrlich-Rogozinski, S. & Wilchek, M. (1996) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin, *Electrophoresis.* 17, 1319-24.
77. Weber, P. C., Wendoloski, J. J., Pantoliano, M. W. & Salemme, F. R. (1992) Crystallographic and thermodynamic comparison of natural and synthetic ligands bound to streptavidin, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3197-200.

78. Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J. & Salemme, F. R. (1989) Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin, *Science*. 243, 85-8.
79. Weber, P. C., Pantoliano, M. W. & Thompson, L. D. (1992) Crystal structure and ligand binding studies of a screened peptide complexed with streptavidin, *Biochemistry*. 31, 9350-4.
80. Pugliese, L., Coda, A., Malcovati, M. & Bolognesi, M. (1993) Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 231, 698-710.
81. Pugliese, L., Malcovati, M., Coda, A. & Bolognesi, M. (1994) Crystal structure of apo-avidin from hen egg-white, *J. Mol. Biol.* 235, 42-6.
82. Hendrickson, W. A., Pahler, A., Smith, J. L., Satow, Y., Merritt, E. A. & Phizackerley, R. P. (1989) Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 2190-4.
83. Laitinen, O. H., Marttila, A. T., Airene, K. J., Kulik, T., Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Kulomaa, M. S. (2001) Biotin induces tetramerization of a recombinant monomeric avidin. A model for protein-protein interactions, *J. Biol. Chem.* 276, 8219-24.
84. Laitinen, O. H., Nordlund, H. R., Hytonen, V. P., Uotila, S. T., Marttila, A. T., Savolainen, J., Airene, K. J., Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Kulomaa, M. S. (2003) Rational design of an active avidin monomer, *J. Biol. Chem.* 278, 4010-4.
85. Laitinen, O. H., Airene, K. J., Marttila, A. T., Kulik, T., Porkka, E., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Kulomaa, M. S. (1999) Mutation of a critical tryptophan to lysine in avidin or streptavidin may explain why sea urchin fibropellin adopts an avidin-like domain, *FEBS Lett.* 461, 52-8.

86. Freitag, S., Le Trong, I., Klumb, L. A., Chu, V., Chilkoti, A., Stayton, P. S. & Stenkamp, R. E. (1999) X-ray crystallographic studies of streptavidin mutants binding to biotin, *Biomol. Eng.* *16*, 13-9.
87. Ostergaard, S., Hansen, P. H., Olsen, M. & Holm, A. (1995) Novel avidin and streptavidin binding sequences found in synthetic peptide libraries, *FEBS Lett.* *362*, 306-8.
88. Qureshi, M. H., Yeung, J. C., Wu, S. C. & Wong, S. L. (2001) Development and characterization of a series of soluble tetrameric and monomeric streptavidin muteins with differential biotin binding affinities, *J. Biol. Chem.* *276*, 46422-8.
89. Nordlund, H. R., Laitinen, O. H., Hytonen, V. P., Uotila, S. T., Porkka, E. & Kulomaa, M. S. (2004) Construction of a dual chain pseudotetrameric chicken avidin by combining two circularly permuted avidins, *J. Biol. Chem.* *279*, 36715-9.
90. Chu, V., Freitag, S., Le Trong, I., Stenkamp, R. E. & Stayton, P. S. (1998) Thermodynamic and structural consequences of flexible loop deletion by circular permutation in the streptavidin-biotin system, *Protein Sci.* *7*, 848-59.
91. Chilkoti, A. & Stayton, P. S. (1995) Molecular Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics, *J. Am. Chem. Soc.* *117*, 10622-8.
92. Klumb, L. A., Chu, V. & Stayton, P. S. (1998) Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin-biotin complex, *Biochemistry.* *37*, 7657-63.
93. Hyre, D. E., Le Trong, I., Freitag, S., Stenkamp, R. E. & Stayton, P. S. (2000) Ser45 plays an important role in managing both the equilibrium and transition state energetics of the streptavidin-biotin system, *Protein Sci.* *9*, 878-85.

94. Livnah, O., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Sussman, J. L. (1993) The structure of the complex between avidin and the dye, 2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid (HABA), *FEBS Lett.* 328, 165-8.
95. Freitag, S., Le Trong, I., Chilkoti, A., Klumb, L. A., Stayton, P. S. & Stenkamp, R. E. (1998) Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidin-biotin complex, *J. Mol. Biol.* 279, 211-21.
96. Jones, M. L. & Kurzban, G. P. (1995) Noncooperativity of biotin binding to tetrameric streptavidin, *Biochemistry.* 34, 11750-6.
97. Sano, T. & Cantor, C. R. (1990) Cooperative biotin binding by streptavidin. Electrophoretic behavior and subunit association of streptavidin in the presence of 6 M urea, *J. Biol. Chem.* 265, 3369-73.
98. Kurzban, G. P., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Horowitz, P. M. (1991) The quaternary structure of streptavidin in urea, *J. Biol. Chem.* 266, 14470-7.
99. Loosli, A. (2005, Université de Neuchâtel) Investigation of Second Coordination Sphere Interactions Between Biotinylated Coordination Complexes and (Strept)avidin: CD Spectroscopy as a Powerful Tool for Stability Constant Determinations, *Thèse*.
100. Suter, M., Cazin, J., Jr., Butler, J. E. & Mock, D. M. (1988) Isolation and characterization of highly purified streptavidin obtained in a two-step purification procedure from *Streptomyces avidinii* grown in a synthetic medium, *J. Immunol. Methods.* 113, 83-91.
101. Bayer, E. A., Ben-Hur, H., Gitlin, G. & Wilchek, M. (1986) An improved method for the single-step purification of streptavidin, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 13, 103-12.
102. Nagarajan, V., Ramaley, R., Albertson, H. & Chen, M. (1993) Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3894-8.

103. Gallizia, A., de Lalla, C., Nardone, E., Santambrogio, P., Brandazza, A., Sidoli, A. & Arosio, P. (1998) Production of a soluble and functional recombinant streptavidin in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 14, 192-6.
104. Sano, T., Pandori, M. W., Chen, X., Smith, C. L. & Cantor, C. R. (1995) Recombinant core streptavidins. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules, *J. Biol. Chem.* 270, 28204-9.
105. Chilkoti, A., Tan, P. H. & Stayton, P. S. (1995) Site-directed mutagenesis studies of the high-affinity streptavidin-biotin complex: contributions of tryptophan residues 79, 108, and 120, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 1754-8.
106. Airene, K. J., Laitinen, O. H., Alenius, H., Mikkola, J., Kalkkinen, N., Arif, S. A., Yeang, H. Y., Palosuo, T. & Kulomaa, M. S. (1999) Avidin is a promising tag for fusion proteins produced in baculovirus-infected insect cells, *Protein Expr. Purif.* 17, 139-45.
107. Hytonen, V. P., Laitinen, O. H., Airene, T. T., Kidron, H., Meltola, N. J., Porkka, E. J., Horha, J., Paldanius, T., Maatta, J. A., Nordlund, H. R., Johnson, M. S., Salminen, T. A., Airene, K. J., Yla-Herttuala, S. & Kulomaa, M. S. (2004) Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*, *Biochem. J.* 384, 385-90.
108. Nardone, E., Rosano, C., Santambrogio, P., Curnis, F., Corti, A., Magni, F., Siccardi, A. G., Paganelli, G., Losso, R., Aprea, B., Bolognesi, M., Sidoli, A. & Arosio, P. (1998) Biochemical characterization and crystal structure of a recombinant hen avidin and its acidic mutant expressed in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 256, 453-60.
109. Airene, K. J., Sarkkinen, P., Punnonen, E. L. & Kulomaa, M. S. (1994) Production of recombinant avidin in *Escherichia coli*, *Gene.* 144, 75-80.

110. Hood, E. E., Witcher, D. R., Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M., Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R. J., Hernan, R., Kappel, W. K., Ritland, D., Li, C. P. & Howard, J. A. (1997) Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification, *Mol. Breeding*. 3, 291-306.
111. Juuti-Uusitalo, K., Airenne, K. J., Laukkanen, A., Punnonen, E. L., Olkkonen, V. M., Gruenberg, J., Kulomaa, M. & Marjomaki, V. (2000) Selective targeting of avidin/mannose 6-phosphate receptor chimeras to early or late endosomes, *Eur. J. Cell. Biol.* 79, 458-68.
112. Zocchi, A., Jobe, A. M., Neuhaus, J. M. & Ward, T. R. (2003) Expression and purification of a recombinant avidin with a lowered isoelectric point in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.* 32, 167-74.
113. Green, N. M. (1966) Thermodynamics of Binding of Biotin and Some Analogues by Avidin, *Biochem. J.* 101, 774-&.
114. Hofmann, K., Wood, S. W., Brinton, C. C., Montibeller, J. A. & Finn, F. M. (1980) Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 4666-8.
115. Hamblett, K. J., Kegley, B. B., Hamlin, D. K., Chyan, M. K., Hyre, D. E., Press, O. W., Wilbur, D. S. & Stayton, P. S. (2002) A streptavidin-biotin binding system that minimizes blocking by endogenous biotin, *Bioconjug. Chem.* 13, 588-98.
116. Wilbur, D. S., Pathare, P. M., Hamlin, D. K., Stayton, P. S., To, R., Klumb, L. A., Buhler, K. R. & Vessella, R. L. (1999) Development of new biotin/streptavidin reagents for pretargeting, *Biomol. Eng.* 16, 113-8.

117. Lee, B. S., Gupta, S., Krishnanchettiar, S. & Lateef, S. S. (2005) Capturing SDS-treated biotinylated protein and peptide by avidin functional affinity electrophoresis with or without SDS in the gel running buffer, *Anal. Biochem.* 336, 312-5.
118. Nakamura, M., Tsumoto, K., Ishimura, K. & Kumagai, I. (2002) Detection of biotinylated proteins in polyacrylamide gels using an avidin-fluorescein conjugate, *Anal. Biochem.* 304, 231-5.
119. van Osdol, W. W., Sung, C., Dedrick, R. L. & Weinstein, J. N. (1993) A distributed pharmacokinetic model of two-step imaging and treatment protocols: application to streptavidin-conjugated monoclonal antibodies and radiolabeled biotin, *J. Nucl. Med.* 34, 1552-64.
120. Fukushima, H., Morgan, H. & Taylor, D. M. (1994) Self-assembly of avidin and streptavidin with multifunctional biotin molecules, *Thin Solid Films.* 244, 789-93.
121. Diamandis, E. P. & Christopoulos, T. K. (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology, *Clin. Chem.* 37, 625-36.
122. Qureshi, M. H. & Wong, S. L. (2002) Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins, *Protein Expr. Purif.* 25, 409-15.
123. Morag, E., Bayer, E. A. & Wilchek, M. (1996) Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin, *Biochem. J.* 316 (Pt 1), 193-9.
124. Morag, E., Bayer, E. A. & Wilchek, M. (1996) Immobilized nitro-avidin and nitro-streptavidin as reusable affinity matrices for application in avidin-biotin technology, *Anal. Biochem.* 243, 257-63.
125. Sano, T., Vajda, S., Smith, C. L. & Cantor, C. R. (1997) Engineering subunit association of multisubunit proteins: a dimeric streptavidin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6153-8.

126. Nordlund, H. R., Laitinen, O. H., Hytonen, V. P., Uotila, S. T., Porkka, E. & Kulomaa, M. S. (2004) Construction of a dual-chain pseudo-tetrameric chicken avidin by combining two circularly permuted avidins, *J. Biol. Chem.*
127. Berta, T. (2002, Université de Neuchâtel) xGAviLoop5,6. Design, expression and characterization of a chimeric avidin with streptavidin homologous loop 5,6 for asymmetric catalysis purposes, *Travail de Diplome.*
128. Stayton, P. S., Freitag, S., Klumb, L. A., Chilkoti, A., Chu, V., Penzotti, J. E., To, R., Hyre, D., Le Trong, I., Lybrand, T. P. & Stenkamp, R. E. (1999) Streptavidin-biotin binding energetics, *Biomol. Eng. 16*, 39-44.
129. Pazy, Y., Raboy, B., Matto, M., Bayer, E. A., Wilchek, M. & Livnah, O. (2003) Structure-based rational design of streptavidin mutants with pseudo-catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 278, 7131-4.
130. Sano, T., Glazer, A. N. & Cantor, C. R. (1992) A streptavidin-metallothionein chimera that allows specific labeling of biological materials with many different heavy metal ions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 1534-8.
131. Graf, R. & Friedl, P. (1999) Detection of immobilized proteins on nitrocellulose membranes using a biotinylation-dependent system, *Anal. Biochem.* 273, 291-7.
132. Meyer, D. L., Schultz, J., Lin, Y., Henry, A., Sanderson, J., Jackson, J. M., Goshorn, S., Rees, A. R. & Graves, S. S. (2001) Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis, *Protein Sci.* 10, 491-503.
133. Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY 2001.

134. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227, 680-5.
135. Kada, G., Falk, H. & Gruber, H. J. (1999) Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate, *Biochim. Biophys. Acta*. 1427, 33-43.
136. Green, N. M. (1970) Vitamins and Coenzymes, *Methods in Enzymol.* 18A, 418-424.
137. Novagene. (2003) *pET system manuel*, 10th edn.
138. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-15.
139. Hung, T., Mak, K. & Fong, K. (1990) A specificity enhancer for polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res.* 18, 4953.
140. Ling, M. M. & Robinson, B. H. (1997) Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal. Biochem.* 254, 157-78.
141. Bookstein, R., Lai, C. C., To, H. & Lee, W. H. (1990) PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene, *Nucleic Acids Res.* 18, 1666.
142. Eron, L. & Block, R. (1971) Mechanism of initiation and repression of in vitro transcription of the lac operon of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 1828-32.
143. Grossman, T. H., Kawasaki, E. S., Punreddy, S. R. & Osburne, M. S. (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, *Gene.* 209, 95-103.
144. Wurm, F. M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nat. Biotechnol.* 22, 1393-8.

145. Huang, J., Villemain, J., Padilla, R. & Sousa, R. (1999) Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription, *J. Mol. Biol.* 293, 457-75.
146. Inouye, M., Arnheim, N. & Sternglanz, R. (1973) Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, *J. Biol. Chem.* 248, 7247-52.
147. Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins, *Adv. Protein Chem.* 23, 283-438.
148. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1974) Prediction of protein conformation, *Biochemistry.* 13, 222-45.
149. Mildvan, A. S. (2004) Inverse thinking about double mutants of enzymes, *Biochemistry.* 43, 14517-20.
150. Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol, *Nucleic Acids Res.* 32, e115.
151. Protocoles Stratagene.
152. Protocoles Promega - Catalys.
153. Hughes, M. D., Nagel, D. A., Santos, A. F., Sutherland, A. J. & Hine, A. V. (2003) Removing the redundancy from randomised gene libraries, *J. Mol. Biol.* 331, 973-9.
154. Hirel, P. H., Schmitter, M. J., Dessen, P., Fayat, G. & Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 8247-51.
155. Livnah, O. & Sussman, J. L. (1990) Crystal forms of avidin, *Methods Enzymol.* 184, 90-3.

156. Kada, G., Kaiser, K., Falk, H. & Gruber, H. J. (1999) Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization, *Biochim. Biophys. Acta.* 1427, 44-8.
157. Collot, J. (2004, Université de Neuchâtel) Métalloenzymes artificielles pour l'hydrogénation énantiosélective basées sur la technologie biotine-avidine., *Thèse*.
158. Ward, T. R., Collot, J., Gradinaru, J., Loosli, A., Skander, M., Letondor, C., Joseph, E., Klein, G. (2003) Exploiting the second coordination sphere: Proteins as host for enantioselective catalysis, *Chimia.* 57, 586-588.
159. Hytonen, V. P., Maatta, J. A., Nyholm, T. K., Livnah, O., Eisenberg-Domovich, Y., Hyre, D., Nordlund, H. R., Horha, J., Niskanen, E. A., Paldanius, T., Kulomaa, T., Porkka, E. J., Stayton, P. S., Laitinen, O. H. & Kulomaa, M. S. (2005) Design and construction of highly stable, protease-resistant chimeric avidins, *J. Biol. Chem.* accepted.

ANNEXES

Ce travail a contribué à la rédaction de sept articles. Cinq sont publiés, 2 ont été acceptés pour publication :

1. Zocchi, A., Humbert, N., Berta, T. & Ward, T. R. (2003) Efficient expression and mutation of avidin and streptavidin as host proteins for enantioselective catalysis, *Chimia*. 57, 589-592.
2. Collot, J., Gradinaru, J., Humbert, N., Skander, M., Zocchi, A. & Ward, T. R. (2003) Artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis based on biotin-avidin, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9030-1.
3. Skander, M., Humbert, N., Collot, J., Gradinaru, J., Klein, G., Loosli, A., Sauser, J., Zocchi, A., Gilardoni, F. & Ward, T. R. (2004) Artificial metalloenzymes: (strept)avidin as host for enantioselective hydrogenation by achiral biotinylated rhodium-diphosphine complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14411-8.
4. Collot, J., Humbert, N., Skander, M., Klein, G. & Ward, T. R. (2004) Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis: The Phenomenon of Protein Accelerated Catalysis, *J. Organomet. Chem.* 689, 4868-4871.
5. Letondor, C., Humbert, N. & Ward, T. R. (2005) Artificial Metalloenzymes Based on the Biotin-Avidin Technology for the Enantioselective Reduction of Ketones via Transfer-Hydrogenation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 4683-7.
6. Thomas, C. M., Letondor, C., Humbert, N. & Ward, T. R. (2005) Aqueous Oxidation of Alcohols Catalyzed by Artificial Metalloenzymes based on the Biotin-Avidin Technology, *J. Organomet. Chem.* Accepted for publication.

7. Humbert, N., Zocchi, A. & Ward, T. R. (2005) Electrophoretic behavior of streptavidin complexed to a biotinylated probe: A functional screening assay for biotin-binding proteins, *Electrophoresis*. 26, 47-52.

Efficient Expression and Mutation of Avidin and Streptavidin as Host Proteins for Enantioselective Catalysis

Andrea Zocchi^{a*}, Nicolas Humbert, Temugin Berta, and Thomas R. Ward^{b*}

Abstract: Avidin and structurally related streptavidin are attractive host proteins for the creation of artificial metalloenzymes displaying features reminiscent both of homogeneous catalysts and enzymes. The main advantages are that both proteins have been cloned and expressed in several organisms and possess a deep hydrophobic binding pocket capable of hosting biotinylated catalyst precursors. An optimized artificial avidin gene in *Pichia pastoris* is expressed. The high level of active protein produced in the extracellular medium is suitable for the performance of high-throughput screening in 96-well plate format. Biologically active recombinant streptavidin is expressed in *E. coli*. Mutations have been introduced both in avidin and streptavidin genes and both wild type and mutated proteins have been utilized to explore the role of the second coordination sphere in enantioselective catalysis.

Keywords: Avidin · *Escherichia coli* · *Pichia pastoris* · Site-directed and random mutagenesis · Streptavidin

As outlined in the preceding article [1], the research in the Ward group is centered on the incorporation of active catalyst precursors in a well-defined protein environment to afford selective catalysts. Rather than covalent anchoring, the biotin-avidin technology is a straightforward method that ensures precise localization of a biotinylated moiety without the need for a chemical coupling step between the host protein and the organometallic moiety. For synthetic organometallic chemists, avidin and structurally related streptavidin are attractive host proteins for several reasons:

- i) Derivatization of the valeric acid side chain of biotin does not significantly affect the stability constant of the biotin-(strept) avidin couple ($K_a = \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) [2].
- ii) The proteins have been cloned and expressed in several organisms.

- iii) The proteins are easy to purify by affinity chromatography on an iminobiotin resin [3].
- iv) The proteins are very robust (temperature, pH, organic solvents, etc.) [2].
- v) The proteins possess a deep hydrophobic binding pocket capable of hosting biotinylated catalyst precursors [4][5].
- vi) The proteins are easily quantifiable by titration with fluorescent biotinylated probes [6].
- vii) The protein can be immobilized and/or recycled.

Because of the prohibitive cost of purchasing either avidin or streptavidin, we set out to express these host proteins. Two major issues were addressed in this context: the development of efficient expression systems and the generation of protein diversity (*i.e.* mutagenesis).

Expression Systems

The modern techniques of molecular biology, the availability of genes and the increasing knowledge of cellular mechanisms allow the routine utilization of several living systems for the expression of exogenous proteins.

Avidin is a glycoprotein found in avian, reptilian and amphibian egg white, which

most likely plays a role as a host defense factor [7][8]. The active form of hen-avidin is a homotetramer composed of four singly glycosylated subunits, containing one single intramonomeric disulfide bridge. Each monomer can bind a (+)-biotin (vitamin H) molecule with an extraordinary affinity ($K_a = \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) [7]. Each subunit consists of 128 amino acids and its primary sequence was determined in 1971 [9]. The cDNA of the chicken oviduct avidin gene was documented by Gope *et al.* [10] and a genomic clone was isolated by Keinanen *et al.* [11]. The primary source for the commercial production of avidin has been extraction and purification from chicken egg white, but biologically active recombinant isoforms have been produced in several expression systems, including *E. coli* [12] [13], baculovirus-infected cells [14] and maize [15]. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* offers an attractive alternative to the above expression systems. This expression system combines the advantages of microbial and eukaryotic organisms, namely the formation of disulfide bridges, the glycosylation and the high-density cell fermentation [16].

We expressed an optimized artificial avidin gene in *Pichia pastoris*. The expression vector is integrated into the yeast genome. The plasmid we chose drives the

*Correspondence: Dr. A. Zocchi^a, Prof. T.R. Ward^b
Institute of Chemistry
University of Neuchâtel
Av. Bellevaux 51
Case Postale 2
CH-2007 Neuchâtel
^aTel.: +41 32 718 2734
Fax: +41 32 718 2511
E-Mail: andrea.zocchi@unine.ch
^bE-Mail: thomas.ward@unine.ch

extracellular secretion of the recombinant protein. After transformation, high-level expressing clones are roughly selected growing transformants on nitrocellulose filters. The filters are utilized for the dot blot procedure [17] and colonies that stain most are utilized for further expression.

The recombinant avidin is efficiently produced both in flasks at a concentration of ~40 mg/l and in a high-cell density fermentation at a concentration of ~350 mg/l [18]. In this system, the purification of recombinant avidin only requires the concentration of the culture medium and its purification via an affinity chromatography on an iminobiotin column.

Streptavidin is the prokaryotic counterpart of avidin, with the same tridimensional eight-stranded β -barrel structure, but only 32% protein sequence homology [8]. It is produced by *Streptomyces avidinii* in its extracellular medium and has antimicrobial activity [19]. As for avidin, the active form of streptavidin is a homotetramer. Each of subunit can bind a (+)-biotin molecule with almost the same affinity as avidin [8][19]. Each monomer consists of 159 amino acids and the gene of streptavidin was isolated by Argaraña *et al.* [20]. The primary source for the commercial production of streptavidin has been the isolation from cultures of *Streptomyces avidinii* [21] or the expression in recombinant *E. coli* [22]. Biologically active recombinant streptavidin has been also secreted in the extracellular medium in the *Bacillus subtilis* expression system [22].

The streptavidin gene is expressed in *E. coli* both in shaking flasks and in a 15 l

fermentor. The episomal vectors target the protein into the cytoplasm. This expression system was optimized in our group. The multi-step purification involves a lysis of the cells by heat shock, an enzymatic digestion of nucleic acids and a denaturing-renaturing step prior to affinity purification of the active protein. Under optimized conditions, we routinely obtain a concentration of active streptavidin of up to 120 mg/l of fermenting culture.

The expression of avidin in this prokaryotic system (*i.e. E. coli*) is more problematic, essentially because it is produced in inclusion bodies [13]. The purification from inclusion bodies requires an obligatory denaturing-renaturing step and avidin is not prone to renaturing [13].

Mutagenesis

In order to introduce variability in either avidin or streptavidin, four different approaches were investigated: i) site-directed mutagenesis, ii) cassette mutagenesis, iii) DNA shuffling and iv) artificial gene synthesis (Table).

(i) The **site-directed mutagenesis** is utilized for direct deletion, insertion or modification of sequences. The procedure, based on PCR, involves two normal primers located at the beginning and the end of the target sequence, and one other longer primer, complementary to the sequence portions flanking the zone to modify and bearing the mutation (mutagenic primer) (Scheme). All the PCRs required in this technique are performed with a proof-reading DNA polymerase. Two PCRs are required. For the

first PCR, an external normal primer and a mutagenic internal primer are used. After purification of the product, a second PCR is performed. This PCR contains as template the unmodified target sequence, the product of the previous PCR acting as megaprimer, and one of the external normal primers. The result is a complete functional sequence containing the desired mutation [24]. A variant of this technique is performed on the whole expression vector containing the protein gene. Starting from the site in which the mutation is introduced, two opposite primers direct a PCR that resynthesizes the whole plasmid. This variant usually is carried out with the 'Quickchange Mutagenesis Kit' (Stratagene) and is considerably less time-consuming.

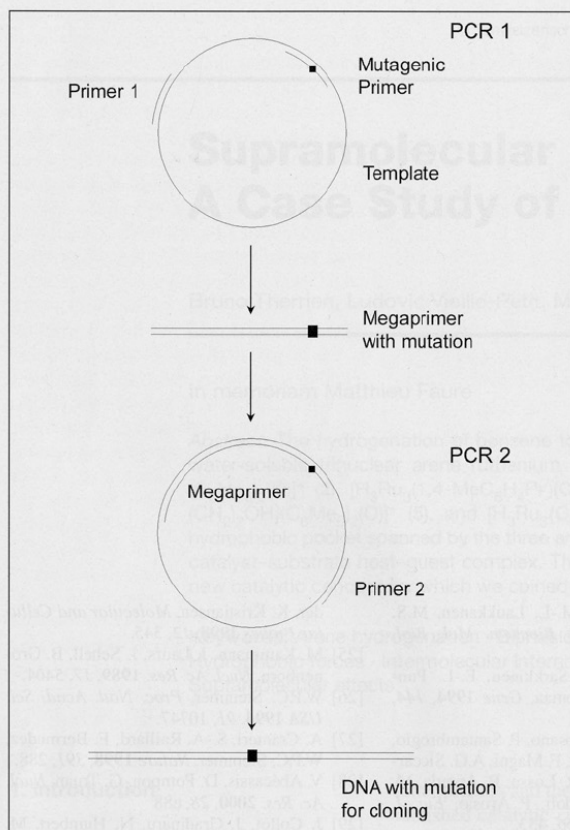
Site-directed mutagenesis is essentially utilized in the *E. coli*-streptavidin system. The mutations (single or multiple) are located mainly in loop connecting β -sheets around the biotin-binding pocket. In most cases, the original amino acid was exchanged with a glycine, to confer more flexibility to the loop.

ii) The **cassette mutagenesis** is utilized to completely change one specific region of a gene. The gene is roughly subdivided according the position of functional or structural domains.

Random or site-directed mutations can be introduced in one or more of these partial sequences (cassettes). Their extremities maintain a high homology with the original gene. One or more cassettes are introduced into the gene by homologous recombination or by cloning utilizing restriction sites present in the original sequence. This method requires a stringent selection of

Table. Summary of the mutagenesis methods utilized for the generation of (strept)avidin diversity.

Mutagenesis method	Template	DNA treatment	Remarks
Site Directed Mutagenesis	Plasmid	Quick change procedure (Stratagene protocol)	Sequencing required
Cassette Mutagenesis	Linear DNA or plasmid	Excision of sequences corresponding to functional protein regions + Site-directed mutagenesis or erratic PCR + Cloning of PCR product	High throughput screen or sequencing required
DNA shuffling	Linear DNA or plasmid	Random cut of sequences (DNase I) + Mutagenic and recombinogenic PCR + Cloning of PCR products	High throughput screen required
Gene synthesis	Synthesis of coding fragments, based on back-translation of amino acid sequence	Ligation of coding fragments + Amplification (PCR) + Cloning of PCR product	Sequencing required



Scheme. General scheme of the site-directed mutagenesis procedure for streptavidin

functional mutated protein [25]. For both avidin and streptavidin, the purification step on an iminobiotin column fulfills this selection step as only those proteins that bind to iminobiotin are purified, isolated and subsequently screened for catalytic activity in the presence of a biotinylated catalyst precursor.

iii) The *DNA shuffling* technique [26] [27] is utilized to introduce random mutations throughout the avidin or streptavidin gene. The method implies a random fragmentation of the gene or of the genes to be modified through digestion with an unspecific endonuclease. Re-assembly PCR is performed combining the fragment isolated above. In the case of mixing streptavidin with avidin, the genes of which display only 30% homology, the first 10–15 cycles of the PCR are performed manually, alternating a fast freezing of the denatured DNA with annealing, elongation and denaturation. After this *in vitro* recombination, an aliquot of this PCR is utilized to perform another normal PCR with primer designed to insert appropriate restriction sites allowing the creation of a mutant library.

An important step of this procedure is the screening of the mutant library. In this phase, functional proteins with new or improved characteristics are selected for the following cycle of shuffling, starting again with the random cut. It is clear that in the case of this technique the screening step must be a high throughput step. For this purpose, a 96 well-plate fluorescence quenching titration with biotin-4-fluorescein allows the binding properties and the activity towards biotin of the mutant proteins to be assessed. It is also possible to perform the shuffling protocol *in vivo*, exploiting the promptness of *Pichia* to recombination [28]. In this case random fragments are introduced into yeast cell already containing a gene homologous with the fragments.

iv) The *synthesis of an artificial gene* is utilized to optimize the expression of streptavidin or avidin in a given expression system. For this purpose, the amino acid sequence of the gene of interest is back-translated and the degenerate codons are selected according to the frequency of the triplet per amino acid, found in the chosen

expressing organism (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). The resulting coding strand is subdivided into several fragments. The length of these fragments along the gene is chosen to minimize the formation of secondary structures. Shorter oligomers, on the antisense strand, are synthesized across couples of adjacent coding fragments. These oligomers have the function to align the coding fragments in the right order. The coding fragments are subsequently covalently ligated to give a full-length coding strand. A high-fidelity PCR is performed to synthesize the antisense strand and obtain enough material for sequencing and cloning. This method was utilized to test a hypothesis concerning the factors responsible for enantioselection. Indeed, streptavidin proved to be far a better chiral inducer than avidin in the vast majority of experiments. By way of example, the best enantiomeric excess (ee) for the reduction of acetamidoacrylic acid with mutant streptavidin as host protein affords acetamidoalanine with 96% ee (*R*) [28]. The best ee with mutant avidin for the same substrate was only 69% (*S*) [29]. Analysis of the quaternary structure of both proteins reveals that the main structural difference arises from loop 5-6 which is in close proximity to the catalytic event (Fig.). We thus set out to synthesize a chimeric gene, by incorporating the 5-6 loop of streptavidin in the avidin gene. The resulting chimeric avidin was expressed in baffled flasks, yielding after purification, 10 mg/l of functional chimeric avidin.

Outlook

By optimizing both the expression levels and the mutagenesis methods, we have been able to generate diversity in host proteins for enantioselective catalysis. By combining the chemical diversity of the biotinylated catalysts with the genetic diversity of the protein, it is possible to produce artificial metalloenzymes which are amenable to optimization by high throughput screening methods.

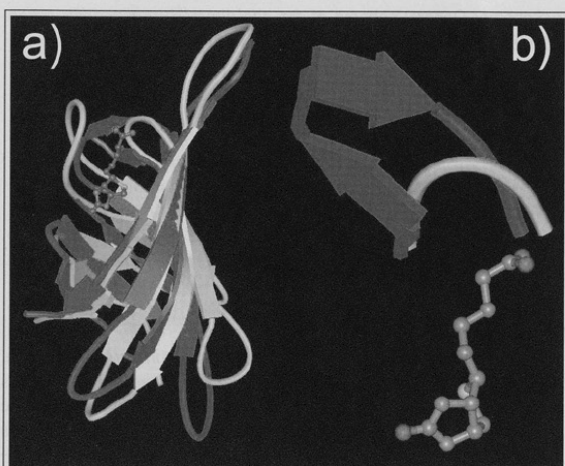


Fig. a) Superposition of avidin (light) and streptavidin (dark) monomers emphasizing their structural similarity; b) Zoom on the 5-6 loop (Biotin: ball and stick).

Acknowledgements

This work was supported by the Swiss National Science Foundation (Grants 620-57866.99 and 4047-057532) as well as the Canton of Neuchâtel. We thank Prof. J.-M. Neuhaus and P. Schürmann for their support for this work. We thank Belovo Egg Science and Technology for a generous gift of egg white avidin.

We thank Prof. C.R. Cantor for the gift of the streptavidin cDNA and Prof. P. Arosio and Dr. P. Santambrogio (San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy), for their valuable advice in streptavidin expression. We acknowledge Dr. Z. Lei and Prof. J.-L. Reymond (Chemistry Department, University of Bern) for their advice in site-directed mutagenesis.

Received: July 14, 2003

[1] T.R. Ward, J. Collot, J. Gradinaru, A. Loosli, M. Skander, C. Letondor, E. Joseph, G. Klein, *Chimia* **2003**, *57*, 586.
 [2] N.M. Green, 'Avidin and Streptavidin', in 'Avidin-Biotin Technology', Eds. M. Wilchek, E.A. Bayer, Academic Press, San Diego, **1990**, p. 51.
 [3] B. Fudem-Goldin, G.A. Orr, *Methods in Enzymology* **1990**, *184*, 167.
 [4] M.E. Wilson, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
 [5] C.C. Lin, C.W. Lin, A.S.C. Chan, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1887.
 [6] H.J. Gruber, G. Kada, M. Marek, K. Kaiser, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1381*, 203.
 [7] J. Korpela, *Med. Biol.* **1984**, *62*, 5.
 [8] N.M. Green, *Adv. Prot. Chem.* **1975**, *29*, 85.
 [9] R.J. De Lange, T.S. Huang, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 698.
 [10] M.L. Gope, R.A. Keinanen, P.A. Kristo, O.M. Conneely, W.G. Beattie, T. Zarucki-Schulz, B.W. O'Malley, M.S. Kulomaa, *Nucl. Ac. Res.* **1987**, *15*, 3595.

[11] R.A. Keinanen, M.-L. Laukkanen, M.S. Kulomaa, *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **1988**, *30*, 17.
 [12] K.J. Airene, P. Sarkkinen, E.-L. Punnonen, M.S. Kulomaa, *Gene* **1994**, *144*, 75.
 [13] E. Nardone, C. Rosano, P. Santambrogio, F. Curmis, A. Corti, F. Magni, A.G. Siccardi, G. Paganelli, R. Losso, B. Apreda, M. Bolognesi, A. Sidoli, P. Arosio, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 453.
 [14] K.J. Airene, C. Oker-Blom, V.S. Marjomäki, E.A. Bayer, M. Wilchek, M.S. Kulomaa, *Protein Express. Purif.* **1997**, *9*, 100.
 [15] E.E. Hood, D.R. Witcher, S. Maddock, T. Meyer, C. Baszczynski, M. Bailei, P. Flynn, J. Register, L. Marshall, D. Bond, E. Kulisek, A. Kusunadi, R. Evangelista, Z. Nikolov, C. Wooge, R.J. Mehigh, R. Hernan, W.K. Kappel, D. Ritland, C.P. Li, J.A. Howard, *Mol. Breeding* **1997**, *3*, 291.
 [16] C.A. Scorer, J.J. Clare, W.R. McCombie, M.A. Romanos, K. Sreekrishna, *Biotechnology* **1994**, *12*, 181.
 [17] J. Sambrook, D.W. Russel, 'Molecular Cloning. A laboratory manual', Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA **2001**.
 [18] A. Zocchi, A.M. Jobé, J.-M. Neuhaus, T. Ward, *Protein Express. Purif.* **2003**, in press.
 [19] L. Chaiet, F.J. Wolf, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1964**, *106*, 1.
 [20] C.E. Argaraña, I.D. Kuntz, S. Birken, R. Axel, C.R. Cantor, *Nucl. Ac. Res.* **1986**, *14*, 1871.
 [21] M. Suter, J. Cazin, Jr, J.E. Butler, D.M. Mock, *J. of Immunol. Meth.* **1988**, *113*, 83.
 [22] T. Sano, C.R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 142.
 [23] V. Nagarajan, R. Ramaley, H. Albertson, M. Chen, *Applied and Environmental Microbiology* **1993**, *59*, 3894.
 [24] J. Brøns-Poulsen, N.E. Petersen, M. Hørd, K. Kristiansen, *Molecular and Cellular Probes* **1998**, *12*, 345.
 [25] M. Kammann, J. Laufs, J. Schell, B. Groenborn, *Nucl. Ac. Res.* **1989**, *17*, 5404.
 [26] W.P.C. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10747.
 [27] A. Cramer, S.-A. Raillard, E. Bermudez, W.P.C. Stemmer, *Nature* **1998**, *391*, 288.
 [28] V. Abécassis, D. Pompon, G. Truan, *Nucl. Ac. Res.* **2000**, *28*, e88.
 [29] J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.

Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Catalysis Based on Biotin–Avidin

Jérôme Collot, Julieta Gradinaru, Nicolas Humbert, Myriem Skander, Andrea Zocchi, and Thomas R. Ward*

Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Av. Bellevaux 51, CP 2, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

Received April 9, 2003; E-mail: thomas.ward@unine.ch

Enantioselective catalysis is one of the most efficient ways to synthesize high-added-value enantiomerically pure organic compounds.¹ As the subtle details which govern enantioselection cannot be reliably predicted or computed, catalysis relies more and more on a combinatorial approach.² Biocatalysis offers an attractive and often complementary alternative for the synthesis of enantiopure products.³ From a combinatorial perspective, the potential of directed evolution techniques in optimizing an enzyme's selectivity is unrivaled.⁴ The present Communication outlines our efforts to create artificial metalloenzymes by incorporating an achiral rhodium–diphosphine moiety into a protein environment to yield efficient enantioselective hydrogenation catalysts.

Inspired by the seminal work of E. T. Kaiser,⁵ several groups have recently developed methods to covalently modify proteins by incorporating transition-metal catalysts to yield hybrid catalytic systems with promising properties.^{4d,6,7}

The approach delineated herein relies on noncovalent interactions between the metal catalyst and the protein. As no chemical coupling step is required upon addition of the catalyst precursor to the protein, the integrity of organometallic species is warranted.⁸ As proposed by Whitesides, the biotin–avidin system⁹ offers an attractive scaffold to perform such experiments.¹⁰

Initial enantioselective hydrogenation of acetamidoacrylic acid was performed with biotinylated amino-diphosphine ligands **Biot-1** and **Biot-2** using avidin as the host protein (Scheme 1).¹¹ The modest levels of enantioselection obtained with both ligand scaffolds (Table 1, entries 1^{10a} and 2) led us to question the affinity of the catalyst precursors [Rh(COD)(**Biot-1**)]⁺ and [Rh(COD)(**Biot-2**)]⁺ for avidin. Indeed, the Coulomb repulsion caused by the cationic character of avidin at neutral pH (pI = 10.4) may dramatically decrease the affinity of the biotinylated cationic catalysts for avidin. We thus tested neutravidin (pI = 6.3) with catalysts [Rh(COD)(**Biot-1**)]⁺ and [Rh(COD)(**Biot-2**)]⁺ (7% ee (S) and 10% ee (S), respectively, entries 3 and 4).

As compared to avidin, streptavidin (pI = 6.2) possesses a similar affinity for biotin (K_a ca. 10^{14} M⁻¹) but is endowed with a deeper binding pocket.¹² In the spirit of E. Fischer's lock-and-key principle, streptavidin may thus offer a more propitious environment for an enantiodiscrimination event. To our delight, catalyst precursor [Rh(COD)(**Biot-1**)]⁺ displayed good enantioselectivity, in favor of the (R)-enantiomer (92% ee, entry 5). The catalyst derived from [Rh(COD)(**Biot-2**)]⁺ performed sluggishly to afford acetamidoalanine in 20% ee (S) with only 55% conversion after 15 h (entry 6).

To optimize the enantioselectivity of the reduction, two complementary strategies can be pursued: chemical modification of the first coordination sphere of the biotinylated catalyst or genetic modification of the gene coding the protein. So far, our efforts have focused primarily on the introduction of an amino acid spacer between biotin and the aminodiphosphine. This allows one to probe the topography of the host protein's binding pocket in search of a

Scheme 1

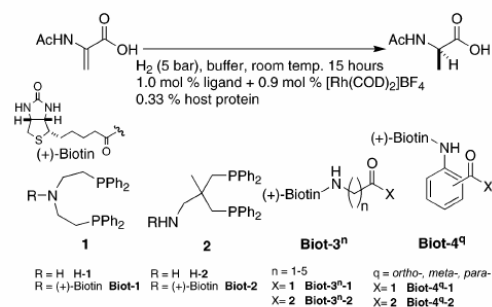


Table 1. Enantioselective Hydrogenation of the Acetamidoacrylic Acid Using Biotinylated Complexes in (Strept)avidin^a

entry	ligand	host protein	buffer	ee (%)
1	Biot-1	avidin	phosphate	37 (S) ^b
2	Biot-2	avidin	MOPS	0 ^c
3	Biot-1	neutravidin	phosphate	7 (S) ^d
4	Biot-2	neutravidin	MOPS	10 (S) ^d
5	Biot-1	streptavidin	acetate	92 (R)
6	Biot-2	streptavidin	acetate	20 (S) ^e
7	Biot-3¹⁻¹	avidin	MOPS	60 (S)
8	Biot-3¹⁻²	avidin	MOPS	66 (S)
9	Biot-3¹⁻¹	streptavidin	acetate	24 (S)
10	Biot-3¹⁻²	streptavidin	acetate	42 (R)
11	Biot-3²⁻¹	avidin	MOPS	69 (S)
12	Biot-4^{ortho-1}	streptavidin	acetate	92 (R)
13	Biot-1	strept. S122G	acetate	96 (R)
14	Biot-4^{ortho-1}	strept. S122G	acetate	94 (R)

^a Unless otherwise stated, conversions (conv.) were quantitative after 15 h. ^b 90% conv. ^c 94% conv. ^d 87% conv. ^e 55% conv. The ee and conversion were determined by GC (after 15 h at room temperature, 5 atm H₂, buffer).¹¹ Hydrogenation with all biotinylated catalysts in the absence of a host protein produced essentially racemic material (ee < 8%, quantitative).

favorable chiral environment. Achiral alkylamino acid spacers **3ⁿ** (n = 1–5) and arylamino acid spacers **4^q** (q = ortho-, meta-, para-) were inserted between the biotin anchor and the amino-diphosphine moieties **1** and **2** to afford ligands **Biot-3ⁿ⁻¹** and **Biot-3ⁿ⁻²** as well as **Biot-4^{q-1}** and **Biot-4^{q-2}** (Scheme 1).¹¹

Using avidin as the host protein, introduction of a glycine spacer has a beneficial effect both on the activity and on the selectivity of catalysts [Rh(COD)(**Biot-3¹⁻¹**)]⁺ and [Rh(COD)(**Biot-3¹⁻²**)]⁺ (60% ee (S) and 66% ee (S), respectively, entries 7 and 8). In streptavidin, the sense of enantioselection for catalysts [Rh(COD)(**Biot-3¹⁻¹**)]⁺ and [Rh(COD)(**Biot-3¹⁻²**)]⁺ is inverted as compared to the catalysts devoid of spacer (24% ee (S) and 42% ee (R), respectively, entries 9 and 10). The best result for avidin as the host protein is obtained with [Rh(COD)(**Biot-3²⁻¹**)]⁺ (69% ee (S),

entry 11). For streptavidin, $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-4}^{\text{ortho}}\text{-1})]^+$ catalyzes the reduction of acetamidoacrylic acid to (*R*)-acetamidoalanine in 92% ee (entry 12). All other ligand–spacer–protein combinations yielded acetamidoalanine with an ee < 40%.¹¹

The catalytic experiments reported herein reveal several noteworthy features:

(i) As the host protein, streptavidin is generally a better chiral inducer than avidin. Good levels of enantioselection, that match or exceed those obtained with catalysts devoid of spacers, can be achieved with either a glycine **3**¹ or a β -alanine **3**² spacer for avidin and an anthranilic acid **4**^{ortho} spacer in streptavidin. Although both enantiomers can be obtained with both proteins, streptavidin produces preferentially the (*R*)-enantiomer, and avidin produces preferentially the (*S*)-enantiomer.

(ii) The flexible ligand skeleton **1** generally catalyzes the reduction with a higher enantioselectivity than the more rigid ligand skeleton **2**.¹³ Along the lines of the quadrant rule,^{1b} we suggest that the conformation of the biotinylated chelating ligand (which exists as a racemic mixture in solution, but may be biased in favor of one enantiomer, λ or δ , upon incorporation in the host protein) plays a determinant role in the enantioselection event.

(iii) Buffer-screening experiments reveal that the fastest reduction rates and slightly higher enantioselectivities are obtained at neutral pH for avidin (0.1 M MOPS, pH 7.0 or 0.07 M phosphate buffer, pH 7.1) and acidic pH for streptavidin (0.1 M acetate buffer, pH 4.0 or 0.1 M MES, pH 6.0). This suggests that the Coulomb repulsion between the biotinylated catalyst and the cationic protein is not responsible for the modest performance with avidin as a host protein.

(iv) To test the substrate specificity of these hybrid catalysts, the reduction of acetamidocinnamic acid was carried out using $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ streptavidin and $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-4}^{\text{ortho}}\text{-1})]^+$ streptavidin to yield (*R*)-acetamidophenylalanine with 86% ee (pH 6.0, MES buffer) and 83% ee (pH 6.0, MES buffer), respectively (as compared to 92% for (*R*)-acetamidoalanine, Table 1, entries 5 and 12). The substrate tolerance displayed by these hybrid catalysts is thus more typical of homogeneous than of enzymatic catalysis.¹⁶ Because the host protein was by no means designed to stabilize the transition state of a hydrogenation reaction, it is more tolerant toward substrates of varying steric requirements.

(v) These artificial metalloenzymes are amenable to a chemogenetic optimization procedure. Having identified by chemical modification the most promising organometallic fragments (entries 5 and 12), we subjected the streptavidin to site-directed mutagenesis. Preliminary experiments were performed by substituting single amino acids by a glycine³⁴ in the flexible regions of streptavidin close to the biotin-binding site. Substitution of serine 112 by a glycine residue in the L7,8 loop of streptavidin (S112G) yields an improved host protein for the reduction of acetamidoacrylic acid both with $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ streptavidin S112G and with $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-4}^{\text{ortho}}\text{-1})]^+$ streptavidin S112G (96% ee (*R*) and 94% ee (*R*), entries 13 and 14, respectively).

In the field of homogeneous catalysis, the steric and the electronic control of a catalytic moiety is mostly limited to the first coordination sphere of the metal. This contrasts with enzymes which take advantage both of the first and of the second coordination

sphere to produce catalysts with exquisite activity and selectivity. The artificial metalloenzymes presented herein offer an attractive way to exploit the second coordination sphere provided by a host protein to produce versatile enantioselective catalysts with features reminiscent both of enzymatic and of organometallic catalysts. We have demonstrated that the enantioselectivity may be optimized either chemically or genetically (i.e., chemogenetic), thus offering an ideal scaffold for high-throughput optimization of enantioselective catalysts.

Finally, these hybrid enantioselective catalysts offer interesting perspectives toward “greener” organometallic catalysis as they operate in water and should prove easy to recycle either by immobilization or by size-selective filtration.

Acknowledgment. This work was funded by the Swiss National Science Foundation. We acknowledge the preliminary experiments performed by E. Joseph and D. Berdat. We thank Belovo Egg Science and Technology for a generous gift of egg white avidin. We thank C. R. Cantor for the streptavidin gene, J.-M. Neuhaus, P. Schürmann (University Neuchâtel), and P. Arosio (University Milano) for their help in setting up the streptavidin production, as well as Z. Lei (University Berne) for help with the mutagenesis experiments.

Supporting Information Available: Materials and methods, complementary data tables and figures (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) (a) Jacobsen, E. N.; Pfaltz, A.; Yamamoto, H., Eds. *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Springer: Berlin, 1999; Vols. I–III. (b) Knowles, W. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998. (c) Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2024. (d) Noyori, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008. (e) Blaser, H.-U.; Malan, C.; Pugin, P.; Spindler, F.; Steiner, H.; Studer, M. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 103.
- (2) (a) Jandeleit, B.; Schaefer, D. J.; Powers, T. S.; Turner, H. W.; Weinberg, W. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2494. (b) Josephson, N. S.; Kuntz, K. W.; Snapper, M. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11594. (c) Wenzel, A. G.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12964.
- (3) (a) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3rd ed.; Springer: Berlin, 1997. (b) Drauz, K.; Waldmann, H., Eds. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, VCH: Weinheim, 1995; Vols. I–II.
- (4) (a) Fong, S.; Machajewski, T. D.; Mak, C. C.; Wong, C. H. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 873. (b) Bornscheuer, U. T.; Altenbuchner, J.; Meyer, H. H. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 554. (c) May, O.; Nguyen, P. T.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317. (d) Reetz, M. T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6595 and references therein.
- (5) Kaiser, E. T.; Lawrence, D. S. *Science* **1984**, *226*, 505.
- (6) Qi, D.; Tann, C.-M.; Haring, D.; Distefano, M. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081.
- (7) Reetz, M. T.; Rentsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M. *Chimia* **2002**, *56*, 721.
- (8) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005.
- (9) Wilchek, M.; Bayer, E. A., Eds. *Methods in Enzymology: Avidin–Biotin Technology*; Academic Press: San Diego, 1990; Vol. 184.
- (10) (a) Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306. (b) Lin, C.-C.; Lin, C.-W.; Chan, A. S. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1887.
- (11) Materials and Methods are available free of charge as Supporting Information.
- (12) (a) Pazy, Y.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Livnah, O. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30892. (b) Stayton, P. S.; Freitag, S.; Klumb, L. A.; Chilkoti, A.; Chu, V.; Penzotti, J. E.; To, R.; Hyre, D.; Le Trong, I.; Lybrand, T. P.; Stenkamp, R. E. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 39.
- (13) Yue, T.-Y.; Nugent, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13692.

JA035545I

Artificial Metalloenzymes: (Strept)avidin as Host for
Enantioselective Hydrogenation by Achiral Biotinylated
Rhodium–Diphosphine Complexes

Myriem Skander, Nicolas Humbert, Jérôme Collot, Julieta Gradinaru, Gérard Klein,
Andreas Loosli, Jérôme Sauser,[†] Andrea Zocchi, François Gilardoni,[‡] and
Thomas R. Ward*

Contribution from the Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Avenue Bellevaux 51,
CP2, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

Received April 22, 2004; E-mail: thomas.ward@unine.ch

Abstract: We report on the generation of artificial metalloenzymes based on the noncovalent incorporation of biotinylated rhodium–diphosphine complexes in (strept)avidin as host proteins. A chemogenetic optimization procedure allows one to optimize the enantioselectivity for the reduction of acetamidoacrylic acid (up to 96% ee (*R*) in streptavidin S112G and up to 80% ee (*S*) in WT avidin). The association constant between a prototypical cationic biotinylated rhodium–diphosphine catalyst precursor and the host proteins was determined at neutral pH: $\log K_a = 7.7$ for avidin ($pI = 10.4$) and $\log K_a = 7.1$ for streptavidin ($pI = 6.4$). It is shown that the optimal operating conditions for the enantioselective reduction are 5 bar at 30 °C with a 1% catalyst loading.

Introduction

Today, the preparation of enantiomerically pure compounds is one of the most actively pursued fields in synthetic chemistry. In the past 35 years, metal-catalyzed enantioselective transformations have enjoyed significant growth as it was recognized that these are among the most efficient ways to produce enantiomerically pure compounds.¹ This effort was rewarded by the 2001 Nobel Prize in Chemistry, which was shared by Knowles, Noyori, and Sharpless.^{2–4}

Despite significant advances, it remains very difficult to predict the outcome of a metal-catalyzed enantioselective reaction. Indeed, the differences in energy involved in the transition state leading to both enantiomers of a desired product are too small to be reliably predicted or computed. As a consequence, the number of efficient enantioselective metal catalysts used for industrial applications remains limited.^{5,6}

To get around the difficulty of predicting the enantioselectivity, combinatorial methodologies have successfully been applied to the discovery and to the development of new enantioselective catalysts.^{7,8} These studies have highlighted the

fact that many subtle experimental parameters (solvent, counterion, added salts, and so forth) often have a significant and unpredictable influence on the enantioselectivity of a reaction.⁹ These weak contacts between a catalyst and its “nonbonded” environment are commonly referred to as the second coordination sphere.¹⁰

In recent years, enzymatic catalysis has emerged as an important alternative tool for the synthesis of enantiopure compounds.¹¹ Again, despite widespread academic and industrial research efforts, the number of industrial biocatalyst applications remains limited.¹²

Table 1 outlines a comparison of some of the most noteworthy features of homogeneous and of enzymatic catalysis. For example, homogeneous catalysts are more tolerant than enzymes toward variation in the size of a substrate; despite their difference in size, acetamidoacrylic and acetamidocinnamic acids are often both good substrates for homogeneous hydrogenation catalysts. Biocatalysts have evolved to target a single functionality even in the presence of other, perhaps more reactive, functionalities; enzymes do not require protective groups.

Recently, some of the inherent limitations of biocatalysts, including small substrate scope, operational stability, and availability of only one enantiomer of the product, have been overcome, thus expanding the scope of applications of bioca-

[†] Current address: Department of Chemistry, Oxford University, Mansfield Road, Oxford OX1 3TA, U.K.

[‡] Current address: Inforsense Ltd., 48 Princes Gardens, SW7 2PE London, U.K.

(1) *Comprehensive Asymmetric Catalysis*; Jacobsen, E. N., Pfaltz, A., Yamamoto, H., Eds.; Springer: Berlin, 1999.
(2) Knowles, W. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998–2007.
(3) Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2024–2032.
(4) Noyori, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008–2022.
(5) Blaser, H.-U.; Malan, C.; Pugin, B.; Spindler, F.; Steiner, H.; Studer, M. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 103–151.
(6) Blaser, H. U.; Spindler, F.; Studer, M. *Appl. Catal., A* **2001**, *221*, 119–143.
(7) Jandeleit, B.; Schaefer, D. J.; Powers, T. S.; Turner, H. W.; Weinberg, W. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2494–2532.

(8) Gennari, C.; Piarulli, U. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3071–3100.
(9) Vogl, E. M.; Gröger, H.; Shibusaki, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1570–1577.
(10) Loeb, S. J. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Lehn, J.-M., Atwood, J. L., Davies, J. E. D., McNichol, D. D., Vögtle, F., Gokel, G. W., Eds.; Pergamon: Oxford, 1996; pp 733–753.
(11) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th ed.; Springer: Berlin, 2004.
(12) Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548–556.

Table 1. Comparing Homogeneous to Enzymatic Catalysis: Pros and Cons

	homogeneous catalysis	enzymatic catalysis
substrate scope	large	limited
enantiomers	both enantiomers accessible	single enantiomer
functional group tolerance	small	large
reaction repertoire	large	small
turnover numbers	small	large
solvent compatibility	large	small (aqueous)
optimization	chemical	genetic
second coordination sphere	poorly-defined	well-defined

talysis. In particular, directed evolution (i.e., genetic optimization) combined with high-throughput screening has significantly facilitated the optimization of customized enantioselective enzymes.^{13–18}

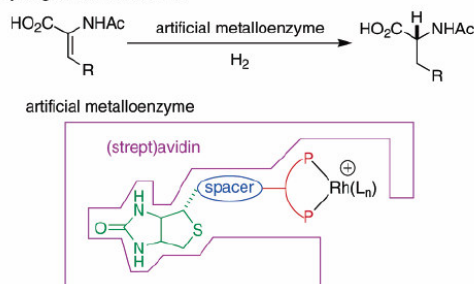
Perhaps most relevant to this study, and in contrast to organometallic catalysts, is that enzymes exquisitely tailor both the first and the second coordination sphere of their active site to afford efficient and selective catalytic systems (Table 1).

From these considerations, it appears that homogeneous and enzymatic catalyses are in many respects complementary. By anchoring an organometallic catalyst precursor into a host protein, we hoped to create artificial metalloenzymes with properties reminiscent of both kingdoms.

To be able to readily deconvolute the influence of the organometallic fragment from the influence of the protein, we focus on enantioselective catalysis. Incorporation of an achiral catalyst precursor in the host protein ensures that any level of enantioselection is induced by the second coordination sphere provided by the protein. Such an approach offers several appealing features: (i) the possibility of dissociating the activity (primarily dictated by the organometallic catalyst precursor) from the selectivity (governed by the host protein); (ii) the use of orthogonal diversity-generating procedures (molecular biology for the protein optimization as well as parallel synthesis for the organometallic fragment); and (iii) a novel approach to exploit weak interactions in enantioselective homogeneous catalysis.

Inspired by the seminal work of E. T. Kaiser,¹⁹ several groups have recently developed methods to covalently modify proteins by incorporating transition-metal catalysts to yield hybrid catalytic systems with promising properties.^{15,20–23}

The approach we focus on relies on a noncovalent incorporation (i.e., supramolecular) of the organometallic catalyst precursor in the protein. Since no chemical coupling step is required

Scheme 1. Artificial Metalloenzymes for Enantioselective Hydrogenation Reactions^a

^a The host protein (violet) displays high affinity for the anchor, biotin (green); introduction of a spacer (blue) and variation of the ligand scaffold (red) allow one to chemically optimize the enantioselectivity. Site-directed mutagenesis allows a genetic optimization of the host protein.

upon addition of the catalyst precursor to the protein, we reasoned that the integrity of the organometallic species would be warranted. To ensure the localization of the organometallic catalyst precursor within the protein, however, a very strong noncovalent host–guest (i.e., a protein inhibitor) system should be selected. The biotin–avidin system naturally comes to mind.²⁴ The principle of the biotin–avidin technology (often referred to as molecular velcro) relies on the extraordinary affinity of biotin for either avidin or streptavidin ($K_a \sim 1 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$).²⁵ Most importantly, it is generally accepted that derivatization of the valeric acid side chain of biotin does not affect significantly the strength of the biotin–avidin interaction as most stabilizing contacts are located on the bicyclic framework of (+)-biotin.²⁵ In the past 20 years, the biotin–avidin technology has found numerous applications in various fields of biotechnology, including ELISA, immunolabeling, affinity targeting, drug delivery, and so forth.²⁶ Whitesides was the first to suggest the use of the avidin as a host for enantioselective catalysis.^{27,28} In the same spirit, Watanabe recently reported on the apomyoglobin as a host for Cr(III) Schiff base complexes in the oxidation of sulfides.²⁹

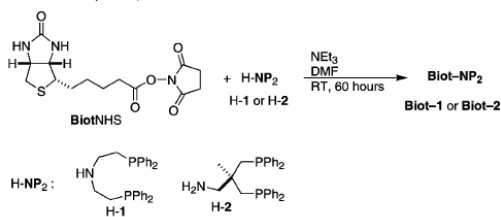
Herein, we report on the use of avidin and streptavidin (abbreviated hereafter (strept)avidin) as a host protein for biotinylated rhodium–diphosphine complexes. The resulting artificial metalloenzymes are tested in the enantioselective hydrogenation of acetamidoacrylic acid. Both chemical and genetic methodologies (i.e., chemogenetic optimization)²⁰ are used to optimize the enantioselectivity of the hybrid catalyst (Scheme 1).³⁰

Results and Discussion

Ligand Synthesis. The approach used in this study relies on amide bond coupling reactions for the synthesis of the biotinylated ligands. Two different amino–diphosphine skeletons

- Powell, K. A.; Ramer, S. W.; del Cardayrè, S. B.; Stenmer, W. P. C.; Tobin, M. B.; Longchamp, P. F.; Huisman, G. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948–3959.
- Reetz, M. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1335–1338.
- Reetz, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *101*, 5716–5722.
- Fong, S.; Machajewski, T. D.; Mak, C. C.; Wong, C.-H. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 873–883.
- May, O.; Nguyen, P. T.; Arnold, F. H. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317–320.
- DeSantis, G.; Wong, K.; Farwell, B.; Chatman, K.; Zhu, Z.; Tomlinson, G.; Huang, H.; Tan, X.; Bibbs, L.; Chen, P.; Kretz, K.; Burk, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11476–11477.
- Kaiser, E. T.; Lawrence, D. S. *Science* **1984**, *226*, 505–511.
- Qi, D.; Tann, C.-M.; Haring, D.; Distefano, M. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081–3111.
- Reetz, M. T.; Rentsch, M.; Pletsch, A.; Maywald, M. *Chimia* **2002**, *56*, 721–723.
- Nicholas, K. M.; Wentworth, P., Jr.; Harwig, C. W.; Wentworth, A. D.; Shafton, A.; Janda, K. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 2648–2653.
- Davis, B. G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 379–386.

- Kuntz, I. D.; Chen, K.; Sharp, K. A.; Kollman, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9997–10002.
- Methods in Enzymology: Avidin–Biotin Technology*; Wilchek, M., Bayer, E. A., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 1990; Vol. 184.
- Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 1–4.
- Wilson, M. E.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306–307.
- Lin, C.-C.; Lin, C.-W.; Chan, A. S. C. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1887–1893.
- Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005–1008.
- Collot, J.; Gradinaru, J.; Humbert, N.; Skander, M.; Zocchi, A.; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030–9031.

Scheme 2. Synthesis of Biotinylated Amidodiphosphine Ligands Devoid of Spacer, **Biot-1** and **Biot-2**

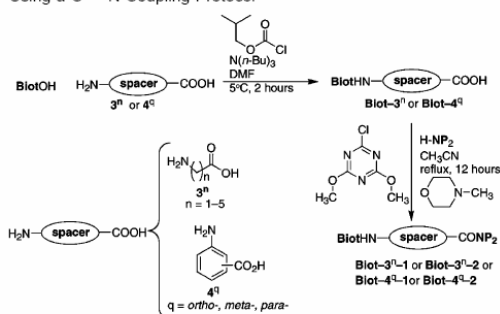
(NP₂) were tested in this study: the flexible ligand scaffold 1, forming an eight-membered chelate ring, and the more-rigid ligand scaffold 2, forming a six-membered chelate ring (Scheme 2). These contain an endocyclic secondary amine and an exocyclic primary amine, respectively. The biotinylated ligands, **Biot-1** and **Biot-2**, were synthesized using biotin *N*-hydroxy-succinimide (**BiotNHS**) in 67 and 69% yield, respectively (Scheme 2).

To probe the topography of the host protein, two different achiral amino acid spacer motifs were introduced between the biotin anchor and the diphosphine moieties: *n*-alkylamino acids, **3ⁿ** ($n = 1-5$), as well as arylamino acids, **4^q** ($q = \textit{ortho}, \textit{meta}, \textit{para}$). We reasoned that the synthesis and isolation of biotinylated amino acids **Biot-3ⁿ** and **Biot-4^q** would be most economical (since no racemization is possible even in the event of an intramolecular cyclization, typical of C → N peptide synthesis). Coupling of biotin to the unprotected amino acid was achieved using isobutylchloroformate as the activating agent.³¹ The crude biotinylated amino acids were crystallized from EtOH/H₂O (1:1) upon acidification (53–81% yield). Coupling of **Biot-3ⁿ** and **Biot-4^q** to the amidodiphosphine ligands, **H-1** and **H-2**, was best achieved using 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) as the activating agent in anhydrous acetonitrile.³² Flash chromatography (SiO₂) under an inert atmosphere using CHCl₃/EtOH (7:1) allowed the isolation, in all but one case, of analytically pure biotinylated ligands **Biot-3ⁿ⁻¹** ($n = 1-5$, 29–64% yield), **Biot-4^{q-1}** ($q = \textit{meta}$ and \textit{para} , 29 and 61% yield, respectively), **Biot-3ⁿ⁻²** ($n = 1-5$, 20–50% yield), and **Biot-4^{q-2}** ($q = \textit{ortho}, \textit{meta}, \textit{para}$, 21–24% yield) (Scheme 3).

In the case of analytically pure biotinylated anthranilic acid, **Biot-4^{ortho}**, all attempts to couple amidodiphosphine **H-1** yielded **Biot-4^{ortho-1}**, but it was contaminated with **Biot-1**! This contamination escaped our scrutiny until recently.³⁰ Despite numerous attempts, we were unable to separate both phosphines, either by chromatography or by recrystallization. To circumvent this problem, a N → C coupling protocol, typical of peptide coupling methodologies, was followed. CDMT-assisted coupling of diphosphine **H-1** with anthranilic acid, **4^{ortho}**, affords **4^{ortho-1}**, which can be isolated in analytically pure form (49% yield) after flash chromatography (SiO₂, 7:1 CHCl₃/EtOH). Coupling with biotin is again achieved with CDMT to afford analytically pure **Biot-4^{ortho-1}** after flash chromatography (SiO₂, 7:1 CHCl₃/EtOH, 43% yield) (Scheme 4).

(31) Redeuilh, G.; Secco, C.; Baulieu, E.-E. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3996–4002.

(32) Garrett, C. E.; Jiang, X.; Prasad, K.; Repic, O. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4161–4165.

Scheme 3. Synthesis of Biotinylated Amidodiphosphine Ligands Incorporating Alkylamino Acid (**3ⁿ**) or Arylamino Acid (**4^q**) Spacers Using a C → N Coupling Protocol

Protein Expression. For screening purposes, both avidin (Avi) and streptavidin (Sav) host proteins were tested. Because of the need for gram quantities of proteins and the prohibitive market price of these proteins, we set out to produce avidin and streptavidin by recombinant means.

With directed-evolution experiments in mind, the expression of the host protein in the culture medium would considerably simplify the experimental procedure as the culture supernatant could be screened directly in catalysis. For this purpose, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, strain GS115, in combination with the expression vector pPIC9K (Invitrogen), was selected for the extracellular production of avidin. Because we suspected that the isoelectric point of avidin may decrease the affinity of biotinylated cationic catalyst precursors, we expressed a recombinant glycosylated avidin (r-GAvi) with a lowered isoelectric point, pI = 5.4.³³ Compared to the wild-type avidin (WT Avi), r-GAvi contains the K3E, K9D, R122A, and R124A mutations,³⁴ as well as additional E-A-E at its N-terminus. Under biotin-depleted expression conditions using a minimal growth medium, 340 mg/L fully functional tetrameric avidin can be isolated and purified via affinity chromatography on an iminobiotin column.

Although reports for the extracellular expression of streptavidin (Sav) in *Bacillus subtilis* exist, high expression levels (up to 50 mg/L) are obtained only with biotin present in the growth medium,³⁵ thus requiring a denaturation–dialysis step before catalytic experiments are carried out with biotinylated catalyst precursors. Streptavidin can be conveniently expressed in the cytoplasm of *Escherichia coli*.^{36–38} To favor the expression of soluble protein, we used the T7-tag, containing mature streptavidin plasmid, provided by Cantor and co-workers.³⁶ Under optimized conditions, the production of soluble streptavidin (WT Sav) reaches up to 210 mg/L.

Site-Directed Mutagenesis. Site-directed mutagenesis was performed using the Quick-Change mutagenesis kit (Stratagene)

(33) Zocchi, A.; Jobé, A. M.; Neuhaus, J.-M.; Ward, T. R. *Protein Expression Purif.* **2003**, *32*, 167–174.

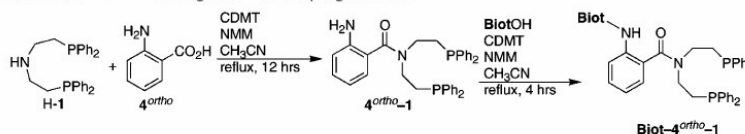
(34) Marttila, A. T.; Aurenne, K. J.; Laitinen, O. H.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S. *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 313–317.

(35) Nagarajan, V.; Ramaley, R.; Albertson, H.; Chen, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3894–3898.

(36) Sano, T.; Cantor, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 142–146.

(37) Gallizia, A.; de Lalla, C.; Nardone, E.; Santambrogio, P.; Brandazza, A.; Sidoli, A.; Arosio, P. *Protein Expression Purif.* **1998**, *14*, 192–196.

(38) Chilkoti, A.; Tan, P. H.; Stayton, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 1754–1758.

Scheme 4. Synthesis of **Biot-4^{ortho}-1** Using a N–C Coupling Protocol

on the pET11b-Sav plasmid.³⁶ Preliminary experiments suggested the presence of secondary structures within the gene in its single-stranded state, persistent even at a high temperature. Computational analysis confirmed secondary structures at 72 °C. DMSO (dimethyl sulfoxide) and glycerol are known to destabilize DNA secondary structures.³⁹ After screening different PCR conditions, we determined that site-directed mutagenesis was most efficient in the presence of 5% DMSO using an annealing temperature of 65 °C. These rather drastic conditions are made possible by the length of mutagenic primers (40 bp) and afford the full-length PCR product (i.e., 7000 bp).

Protein Activity. Following the protein expression and purification, we determined the activity of the protein using Gruber's protocol based on the fluorescence quenching of biotin-4-fluorescein upon binding.⁴⁷

If, on the basis of this titration, the number of binding sites is $< 3.8 \pm 0.2$, dialysis against Tris HCl (20 mM, pH 7.4) was repeated until this threshold was reached.

In the following discussion, the number of equivalents of biotinylated catalyst precursor was scaled to the actual number of binding sites. For example, for a protein with 3.7 binding sites, 3.0 equiv of biotinylated catalyst precursor corresponds, in reality, to $3.0/4.0 \times 3.7 = 2.78$ equiv.

Screening (Chemogenetic Optimization). The screening experiments were performed using the 18 ligands **Biot-1**, **Biot-2**, **Biot-3ⁿ-1**, **Biot-3ⁿ-2**, **Biot-4ⁿ-1**, and **Biot-4ⁿ-2** ($n = 1-5$; $q = \textit{ortho}, \textit{meta}, \textit{para}$), in combination with both wild-type proteins as well as five mutants proteins: WT Avi, r-GAvi, WT Sav, S112G, V47G, K80G, and P64G. (These latter four mutants are derived from WT Sav.)

By replacing an amino acid belonging to a loop of streptavidin by a glycine residue, we expected to perturb the loop structure and thus influence the enantioselectivity. Four mutations (Figure 1) were performed with the following goals. (i) The first goal is to alter the proximity of the metal site (S112 is located at one hinge of L7,8). This loop, which contains the hydrophobic lid (W120), is expected to be in close contact with the metal during catalysis. (ii) The next goal is to perturb the amino acids that are either participating in or neighboring the second coordination sphere of biotin⁴⁰ (V47 interacts with S45, which

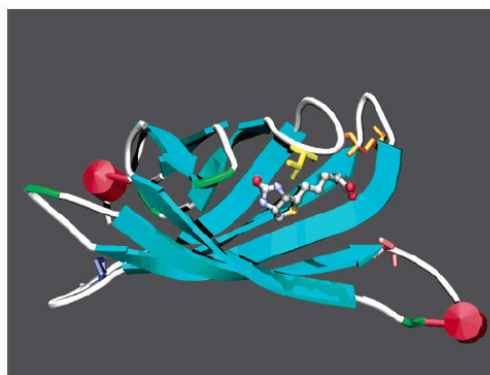


Figure 1. Schematic representation of a monomeric wild-type streptavidin with bound biotin (ball-and-stick), emphasizing the residues (stick) selected for site-directed mutagenesis: P64 (blue), V47 (yellow), K80 (orange), and S112 (pink).

in turn forms a hydrogen bond with H–N of biotin, and K80 is adjacent to W79, which forms a hydrogen bond with T90 and in turn interacts with the thioether of biotin. (iii) The last goal is to perturb a loop very remote from the biotin binding site (replacing a proline residue (P64) may significantly affect the geometry of the distant loop).

For solubility reasons, acetamidoacrylic acid was preferred over acetamidocinnamic acid as a substrate for screening (5.65 mM substrate concentration). The experiments were performed with a 1 mol % $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-ligand})]^+$ metal catalyst loading at room temperature and at 5 bar hydrogen pressure in a custom-designed glass autoclave holding up to 21 3-mL glass tubes (1.1 mL final volume, containing 0.1 mL of DMSO, used to solubilize the catalyst precursor).

Previous buffer screening experiments suggested that streptavidin performs best at pH 4.0, while avidin performs best at pH 7.0.³⁰ Screening was performed in acetate buffer (0.1 M, pH 4.0) for Sav and its mutants. For Avi and r-GAvi, experiments were carried out in MOPS buffer (0.1 M, pH 7.0), except with **Biot-1** in WT Avi and r-GAvi, where catalysis experiments were performed in phosphate buffer (0.07 M, pH 7.1).⁴¹

Table 2 and Figure 2 list the conversions and the enantiomeric excesses obtained for all ligand–protein combinations.⁴²

To gain an unbiased view of the performance of the protein–ligand combinations, the matrix (and the corresponding transposed matrix) displayed in Table 2 was subjected to principal component analysis (PCA).⁴³ This statistical procedure transforms the set of correlated variables (proteins and ligands) into another set of uncorrelated (orthogonalized) variables (the principal components, PCs) that are ordered by decreasing variability (i.e., the first PC contains the most variability). These uncorrelated variables are linear combinations of the original

- (39) Hung, T.; Mak, K.; Fong, K. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 4953.
 (40) Klumb, L. A.; Chu, V.; Stayton, P. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7657–7663.
 (41) All attempts to obtain reproducible and high activities and selectivities (ee > 20%) using **Biot-1** in Avi and r-GAvi in different buffers failed, suggesting that these particular ligand–protein combinations are very sensitive to pH and buffer composition.²⁷
 (42) The slight variations in enantiomeric excesses, compared to those of ref 30, are due to the systematic use of a glovebox to prepare catalytic runs. The enantiomeric excess reported for **Biot-4^{ortho}-1** in ref 30 was heavily biased by the previously unnoticed contamination of **Biot-1** in the system.
 (43) Kachigan, S. K. *Multivariate Statistical Analysis: A Conceptual Introduction*, 2nd ed.; Radius Press: New York, 1991.
 (44) Horsman, G. P.; Liu, A. M. F.; Henke, E.; Bomscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Chem.—Eur. J.* **2003**, *9*, 1933–1939.
 (45) Hofmann, K.; Titus, G.; Montibeller, J. A.; Finn, F. M. *Biochemistry* **1982**, *21*, 978–984.
 (46) Green, N. M. *Methods Enzymol.* **1970**, *18*, 418–424.
 (47) Kada, G.; Falk, H.; Gruber, H. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1427*, 33–43.

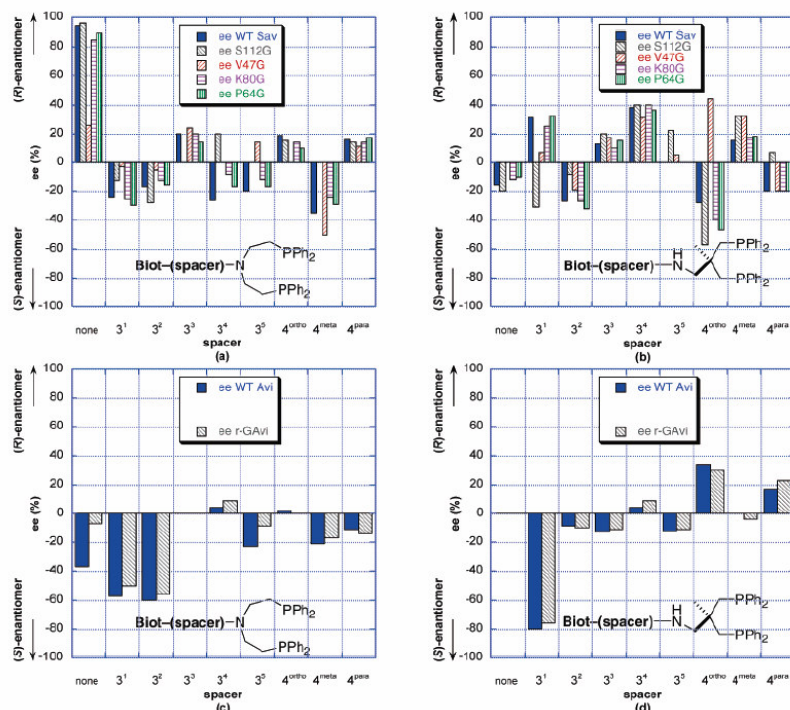


Figure 2. Graphic summary of the enantiomeric excess obtained for the enantioselective reduction of acetamidoacrylic acid with ligand scaffold 1 in the streptavidin family (a), with ligand scaffold 2 in the streptavidin family (b), with ligand scaffold 1 in the avidin family (c), and with ligand scaffold 2 in the avidin family (d).

Table 2. Enantiomeric Excesses (% ee) Obtained with the 18 Ligands in Combination with the 7 Proteins for the Reduction of Acetamidoacrylic Acid^a

	WT Sav	S112G	V47G	K80G	P64G	WT Avi	r-GAvi
Biot-1	94	96	26	85	90	-39	-7
Biot-3 ¹ -1	-24	-13	-3	-25	-30	-57	-50 ^b
Biot-3 ² -1	-17	-28	-5	-13	-16	-60	-56 ^c
Biot-3 ³ -1	20	0	24	20	14	0	0 ^b
Biot-3 ⁴ -1	-26	20	0	-8	-17	4	9 ^b
Biot-3 ⁵ -1	-20	0	14	-12	-17	-23	-9 ^d
Biot-4 ^{ortho} -1	19	15	0	14	10	2	0 ^e
Biot-4 ^{meta} -1	-35	0	-50	-24	-29	-21	-17 ^c
Biot-4 ^{para} -1	16	14	11	14	17	-11	-14 ^b
Biot-2	-16 ^b	-20	0	-12 ^f	-10 ^d	0 ^d	0 ^e
Biot-3 ¹ -2	31	-31	7	25	32	-80	-76 ^b
Biot-3 ² -2	-27	-8	-19	-27	-32	-9	-10 ^d
Biot-3 ³ -2	13	20	17	10	15	-13	-11
Biot-3 ⁴ -2	38	40	31	40	36	4	9
Biot-3 ⁵ -2	0	22	5	0	0	-12	-11 ^c
Biot-4 ^{ortho} -2	-28	-57	44	-40	-47	34	30 ^e
Biot-4 ^{meta} -2	15	32	32	17	18	0	-4 ^c
Biot-4 ^{para} -2	-20 ^f	7 ^d	-20 ^d	-20	-20 ^f	17	23 ^c

^a Positive enantiomeric excess values are in favor of the (*R*) enantiomer, while negative enantiomeric excess values are in favor of the (*S*) enantiomer. Unless otherwise stated, all conversions were quantitative after 12 h at room temperature. ^b Conversion > 80%. ^c Conversion > 90%. ^d Conversion > 70%. ^e Conversion > 40%. ^f Conversion > 50%. ^g Conversion > 30%. ^h Conversion > 60%.

variables. The latter variables may be removed with minimal loss of information; in the present case, three PCs suffice to account for 96% of the variability in the data.

Hierarchical clustering was then applied on the scores of both the proteins and the ligands (using the matrix and the transposed matrix, respectively) in order to group similar entities. Hierarchical clustering may be represented by a two-dimensional diagram known as a dendrogram, which illustrates the fusions or divisions made at each successive stage of analysis (Figure 3). To assess the consistency of the statistical analysis performed on the original data sets, the experimental data set was split into 20 contiguous blocks that were randomly perturbed by the absolute experimental error estimated at 2%. The PCA performed on the modified data set, accounting for experimental uncertainties, clearly demonstrates that the experimental error does not affect the original underlying structures of the data sets.

The first dendrogram clearly shows that the avidin and the streptavidin families are dissimilar. Among the streptavidins, WT Sav, K80G, and P64G form a cluster, which merges with V47G. Mutant S112G clearly stands out as a singular entity (Figure 3a). Hierarchical ordering of the ligands suggests that **Biot-1** forms a cluster with itself. The next four ligands, namely, **Biot-4^{ortho}-2**, **Biot-3¹-2**, **Biot-3¹-1**, and **Biot-3²-1** (Figure 3b), form three subclusters laying in proximity.

In the avidin family, the best enantiomeric excesses are obtained with the glycine and the β -alanine spacers. In particular, **Biot-3¹-2** gives the highest enantiomeric excess in favor of the (*S*) enantiomer (80%). No significant variation with respect

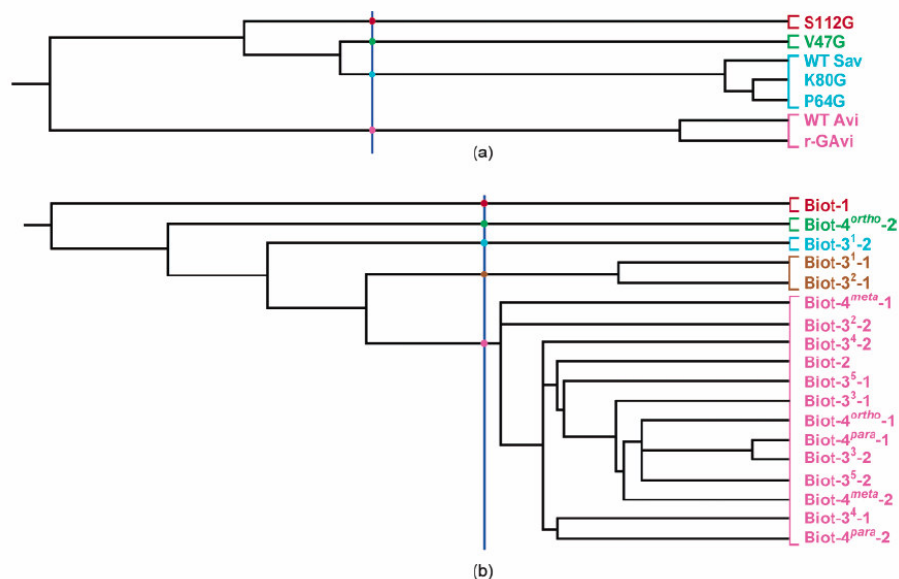


Figure 3. Dendrogram illustrating the fusions or divisions made at each successive stage of PCA. The analysis was performed on the score space obtained by a PCA. Hierarchical ordering of the proteins (a) and of the ligands (b). (IDs are listed along the y-axis; the x-axis measures intercluster distance.)

to WT Avi is observed with the r-GAvi (largest increase +6% for **Biot-4^{para}-2**, largest decrease -32% for **Biot-1**). Overall, both Avi and r-GAvi display a bias in favor of the (*S*) enantiomer (Figure 2c,d).

In the streptavidin family, neither K80G nor P64G provides much variability to the enantiomeric excess with respect to WT Sav (largest increase +19% for **Biot-4^{ortho}-2**, largest decrease -18% for **Biot-3⁴-1**). In contrast, S112G and V47G show broad variability with respect to WT Sav. In particular, **Biot-4^{ortho}-2** exhibits the largest increase in enantiomeric excess (+29% in S112G, which corresponds to the highest enantiomeric excess (57%) in favor of the (*S*) enantiomer in the Sav family) and the largest decrease in enantiomeric excess (-72% in V47G) for all of the mutants tested. Along similar lines, **Biot-1** affords the highest enantiomeric excess in favor of the (*R*) enantiomer (96% in S112G) and the second largest decrease (-68% in V47G). These data suggest that **Biot-4^{ortho}-2** and **Biot-1** are particularly sensitive to the protein environment and may be good candidates for the genetic optimization of the selectivity. All of these observations are in full agreement with the dendrograms displayed in Figure 3.

Although most conversions are quantitative within 12 h at room temperature, it appears that r-GAvi performs more poorly than all of the other proteins tested. In the streptavidin family, **Biot-2** and **Biot-4^{para}-2** tend to give conversions lower than those of all other spacer-ligand combinations (Table 2).

The data presented herein confirms (the common wisdom) that mutations close to the active site affect the selectivity more dramatically than do distant mutations.⁴⁴ Indeed, statistical analysis of the data clearly shows that mutations that either affect the biotin binding site via second coordination sphere interactions (V47G) or lie in proximity to the metal active site (S112G)

provide more variability than either remote loop residues (P64 in Sav as well as K3, K9, R122, and R124 in Avi) or residues which are close but not directly involved in second coordination sphere interactions (K80G) with biotin. This latter mutation further suggests that removal of a positive charge in the vicinity of the catalytic moiety does not affect significantly the selectivity of the catalyst.

Stability Constant Determination. As suggested by Hofmann, the affinity of *N*-iminobiotinyllysineamide for avidin is significantly lower than that of neutral iminobiotinylated amino acids. This unusual behavior was traced to the repulsion between the positively charged avidin host at neutral pH and the positively charged iminobiotinylated guest.⁴⁵ Considering the difference of the isoelectric points of avidin (pI = 10.4) and streptavidin (pI = 6.4), we speculated that the superior performance of streptavidin as the host protein may be caused by its higher affinity for the cationic biotinylated catalyst precursors. Since the first coordination sphere of the catalyst is achiral (with the exception of the chirality of the (+)-biotin bicyclic framework), any catalyst not incorporated within the host protein produces (nearly) racemic hydrogenation products.³⁰ We thus set out to determine the strength of the guest-host interaction of $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Biot-1}]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}$. In the field of study of biotin-avidin, it is widely accepted that the four biotin-binding events are noncooperative.^{25,48} For the stability constant determination, we thus fit the data with a single binding constant.

The host protein was initially loaded with a large excess of 2-(4'-hydroxyazobenzene)benzoic acid (HABA), ensuring nearly complete saturation of the biotin binding sites (eq 1). Addition of $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ aliquots caused a decrease of both

(48) Jones, M. L.; Kurzban, G. P. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11750-11756.

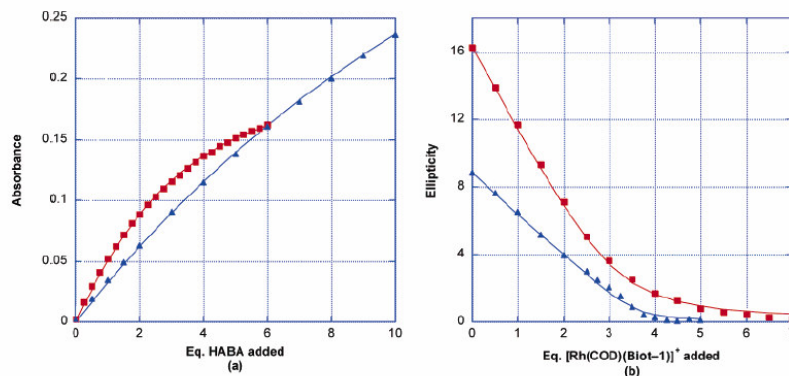
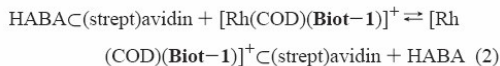
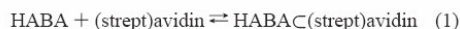


Figure 4. Two-step procedure for the determination of the overall stability constant for $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}$. The appearance of an absorption band ($\lambda_{\text{max}} = 506 \text{ nm}$) upon addition of HABA aliquots to $(\text{strept})\text{avidin}$ allows the determination of the K_{HABA} for $\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}$ (a). Decrease of the CD signal ($\lambda_{\text{max}} = 506 \text{ nm}$) of $\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}$ for the displacement equilibrium K_{exch} between HABA and $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+$ (b). Blue triangles are the measured points for WT Sav; the blue line is the fitted curve for WT Sav. Red squares are the measured points for WT Avi; the red line is the fitted curve for WT Avi.

visible and CD signals ($\lambda_{\text{max}} = 506 \text{ nm}$) of $\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}$, allowing the determination of the stability constant for the displacement equilibrium in eq 2.



The stability constant, K_{HABA} (eq 3), for WT Avi ($\log K_{\text{HABA}} = 5.5$ ($R^2 = 0.996$))⁴⁶ and for WT Sav ($\log K_{\text{HABA}} = 3.5$ ($R^2 = 0.997$))⁴⁶ was determined by following the appearance of a visible band centered at 506 nm that was caused by the $\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}$ interaction. With these values at hand, and assuming a single binding constant (i.e., noncooperative binding events), we determined the stability constant, $K_{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}}$, according to eq 5.

$$K_{\text{HABA}} = \frac{[\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}]}{[\text{HABA}] \times [(\text{strept})\text{avidin}]} \quad (3)$$

$$K_{\text{exch}} = \frac{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin} \times [\text{HABA}]}{[\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}] \times [\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+} \quad (4)$$

$$K_{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}} = \frac{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}}{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+ \times [(\text{strept})\text{avidin}]} = K_{\text{HABA}} \times K_{\text{exch}} \quad (5)$$

Since the biotinylated catalyst is not soluble in water, methanol was used to solubilize the stock solution of $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+$. Using the known total concentrations, $[\text{HABA}]_{\text{total}}$, $[(\text{strept})\text{avidin}]_{\text{total}}$, and $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+_{\text{total}}$, and rearranging eq 4, one can derive a single quadratic equation to estimate the concentration of the absorbing species, $[\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}]$ (eq 6):

$$(1 - K_{\text{exch}}) \times [\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}]^2 + (K_{\text{exch}} \times \{[(\text{strept})\text{avidin}]_{\text{total}} - [\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\} - [\text{HABA}]_{\text{total}} - [(\text{strept})\text{avidin}]_{\text{total}}) \times [\text{HABAC}(\text{strept})\text{avidin}] + [\text{HABA}]_{\text{total}} \times [(\text{strept})\text{avidin}]_{\text{total}} = 0 \quad (6)$$

For a given value of the fitting parameter, K_{exch} , the corresponding theoretical titration curve is calculated, and a least-squares minimization is performed until the sum of all data points $(\text{signal}_{\text{calculated}} - \text{signal}_{\text{measured}})^2$ reaches a minimum. The calculated and the measured curves are depicted in Figure 4.

From these stability constant determinations (pH 7.0, phosphate buffer, $I = 0.3 \text{ M}$), we conclude that the affinity of $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+$ for the considered host protein is independent of the isoelectric point of the protein and is essentially constant: $\log K_{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}} = 7.7$ and $\log K_{\text{exch}} = 2.2$ ($R^2 = 0.998$), and $\log K_{[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}} = 7.2$ and $\log K_{\text{exch}} = 3.7$ ($R^2 = 0.997$). The quality of the fits using single binding constants suggests that there is no significant cooperativity upon binding.

From these data, we conclude that at a given pH, the affinity of a cationic catalyst precursor for a protein does not depend on the isoelectric point of the host protein. Thus, both avidin and streptavidin should be suitable host proteins. The difference in performance is not caused by a difference in affinity, but most likely, it is caused by a difference in their respective binding pocket topography.

Pressure and Temperature. The performance of $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot}-1)]^+\text{C}(\text{strept})\text{avidin}$ was evaluated as a function of pressure and temperature (Figure 5a,b, respectively). The temperature study reveals that the artificial metalloenzyme performs sluggishly up to 20 °C. Hydrogenation of acetamidoacrylic acid at 5 bar during 12 h at 0 and 10 °C affords acetamidoalanine with a 33% conversion (80% ee (*R*)) and a 73% conversion (85% ee (*R*)), respectively. The optimal temperature for hydrogenation is 30 °C, affording a quantitative conversion after 12 h and 94% ee (*R*). Above this temperature, the enantioselectivity decreases (Figure 5b). Hydrogenation at 1 and 5 bar both gives the same enantioselectivity (94% ee (*R*),

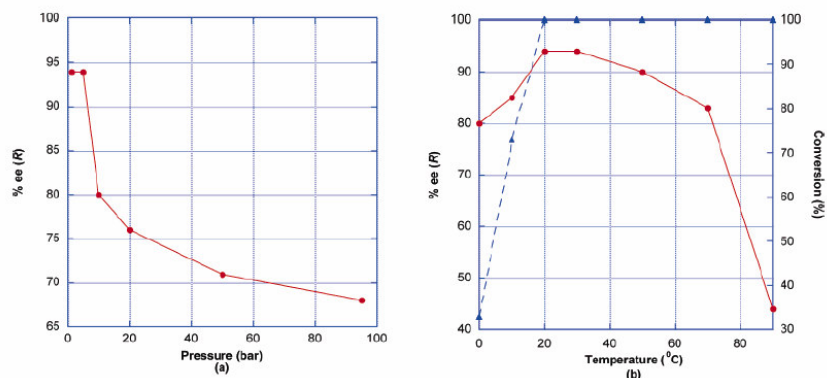


Figure 5. Activity and selectivity of $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+\text{CWT Sav}$ as a function of pressure (a) and temperature (b). The red circles represent the enantioselectivity, and the triangles represent the conversion. All pressure experiments were performed at 30 °C and were quantitative after 12 h.

quantitative conversion at 30 °C after 12 h). Thereafter, the enantiomeric excess rapidly decreases as a function of pressure (Figure 5a). It appears that the magnitude of the variations of both the activity and the selectivity is more pronounced than that for most enantioselective hydrogenation catalysts (although exceptions exist),⁴⁹ suggesting that the protein conformation is affected both by temperature and by pressure.

The ideal operating conditions are 5 bar hydrogen pressure and 30 °C, thus ensuring high enantioselectivities and rapid conversions.

Outlook

The work presented herein demonstrates the versatility of a combined chemogenetic optimization procedure for the creation of artificial metalloenzymes based on the biotin–avidin technology.

Screening of seven host proteins (two wild-type and five mutant proteins), with 18 biotin–spacer–ligand scaffolds, reveals the best protein–ligand combinations produce (*R*)-acetamidoalanine (96% ee in S112G with **Biot-1**) or (*S*)-acetamidoalanine (80% ee in WT Avi with **Biot-3¹⁻²**; 57% ee in S112G with **Biot-4^{ortho-2}**).

Statistical analysis of the data suggests future optimization avenues. (i) Streptavidin and its mutants display more variability than avidin and its mutants. (ii) Position S112 (and to a lesser extent V47) in streptavidin appears to be particularly sensitive to mutation. (iii) Biotinylated ligands, **Biot-1**, **Biot-3¹⁻²**, **Biot-3¹⁻¹**, **Biot-3²⁻¹**, and **Biot-4^{ortho-2}**, display the most variability. All of the other ligands tested behave similarly and display less variability.

More detailed studies with $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ in both WT Avi and WT Sav uncover the following features. (i) The affinity of the cationic catalyst precursor for both host proteins is essentially identical, despite their marked difference in pI. Since the repulsion energy is inversely proportional to the distance between the two point charges, remote positive charges on the

host protein's side chains do not influence the affinity of the cationic catalyst precursor. (ii) The marked pressure and temperature dependence of the activity and the selectivity of the artificial metalloenzymes were revealed.

From the considerations outlined in Table 1, we conclude that such artificial metalloenzymes display features which are reminiscent both of homogeneous catalysts and of enzymes. In particular, we have shown that the second coordination sphere can be exploited either by mutagenesis or by chemical means (by the introduction of a spacer between the biotin anchor and the metal) to produce more active and selective hydrogenation catalysts.

Targeted mutations (e.g., introduction of a metal-coordinating amino acid) within the second coordination sphere should make these systems more enzyme-like as the active site will be tailored for the needs of a particular catalytic cycle. For this purpose, we favor an optimization procedure inspired by statistical analysis and molecular modeling over a high-throughput screening using directed evolution. Current efforts in this direction are in progress within our group.

Acknowledgment. This work was funded by the Swiss National Science Foundation, CERC3, and the Canton of Neuchâtel. We thank Belovo Egg Science and Technology for a generous gift of egg white avidin. We thank C. R. Cantor for the streptavidin gene, J.-M. Neuhaus, P. Schürmann (University of Neuchâtel), and P. Arosio (University of Milano) for their help in setting up the streptavidin and avidin productions, and Z. Lei (University of Berne) for the help with the mutagenesis experiments.

Supporting Information Available: Complete experimental procedures, stability constant determination, characterization of all intermediates and ligands, and hydrogenation protocol. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

(49) Landis, C. R.; Halpern, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1746–1754.



Note

Artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis: the phenomenon of protein accelerated catalysis

Jérôme Collot, Nicolas Humbert, Myriem Skander, Gérard Klein, Thomas R. Ward *

Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Av. Bellevaux 51, CP 2, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

Received 18 August 2004; accepted 14 September 2004

Available online 14 October 2004

Abstract

We report on the phenomenon of protein-accelerated catalysis in the field of artificial metalloenzymes based on the non-covalent incorporation of biotinylated rhodium–diphosphine complexes in (strept)avidin as host proteins. By incrementally varying the $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ vs. (strept)avidin ratio, we show that the enantiomeric excess of the produced acetamidoalanine decreases slowly. This suggests that the catalyst inside (strept)avidin is more active than the catalyst outside the host protein. Both avidin and streptavidin display protein-accelerated catalysis as the protein embedded catalyst display 12.0- and 3.0-fold acceleration over the background reaction with a catalyst devoid of protein. Thus, these artificial metalloenzymes display an increase both in activity and in selectivity for the reduction of acetamidoacrylic acid.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Biotin–avidin; Streptavidin; Enantioselective catalysis; Second coordination sphere; Hydrogenation; Artificial metalloenzyme; Bioinorganic chemistry; Protein-accelerated catalysis

1. Introduction

Enantioselective catalysis is one of the most efficient ways to synthesize high-added value enantiomerically pure organic compounds [1]. In recognition for their pioneering accomplishments in transition metal mediated enantioselective catalysis, the 2001 Nobel Prize in chemistry was awarded to Knowles [2], Noyori [3] and Sharpless [4].

As the subtle details which govern enantioselection cannot be reliably predicted or computed, catalysis relies more and more on a combinatorial approach. In the past couple of years, several groups have made important contributions in this field [5].

Biocatalysis offers an attractive alternative for the synthesis of enantiopure products [6]. In many aspects,

enzymatic catalysis is complementary to transition metal-based systems, although the scope of reactions is limited to enzymatic processes. From a combinatorial perspective however, the potential of directed evolution techniques in optimizing an enzyme's selectivity is unrivalled [7].

We have recently demonstrated that incorporation of an achiral rhodium–diphosphine moiety into a protein environment can yield highly enantioselective hydrogenation catalysts [8].

Inspired by the seminal work of Kaiser [9,10], several groups have developed methods to covalently modify proteins by incorporating transition-metal catalysts to yield hybrid catalytic systems with promising properties [7,10].

The approach we follow relies on non-covalent (i.e., supramolecular) interactions between the metal catalyst and the protein. As no chemical coupling step is required upon addition of the catalyst precursor to the protein, the integrity of organometallic species is

* Corresponding author. Tel.: +41 32 718 2516; fax: +41 32 718 2511.

E-mail address: thomas.ward@unine.ch (T.R. Ward).

warranted [11]. As suggested by Whitesides, the biotin–avidin system [12] offers an attractive scaffold to perform such experiments [13,14].

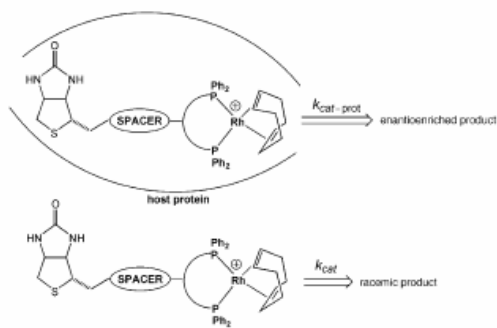
The principle of the biotin–avidin technology (often referred to as molecular velcro) relies on the extraordinary affinity of biotin for either avidin or streptavidin ($K_a \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) [12]. Most importantly, it is generally accepted that derivatization of the valeric acid side chain of biotin does not affect significantly the strength of the biotin–avidin interaction as most stabilizing contacts are located on the bicyclic framework of (+)-biotin [12]. In the past twenty years, the biotin–avidin technology has found numerous applications in various fields of biotechnology including ELISA, immunolabeling, affinity targeting, drug delivery etc. [12]. In the context of this work, it should be emphasized that both avidin and streptavidin are tetrameric proteins constituted by four identical subunits which can bind up to four biotin molecules with no binding cooperativity.

Performing the reduction of acetamidoacrylic acid in avidin as host protein, the rhodium coenzyme $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ affords (*S*)-acetamidoalanine in quantitative yield with 39% ee.

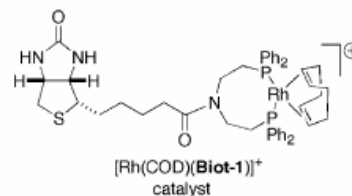
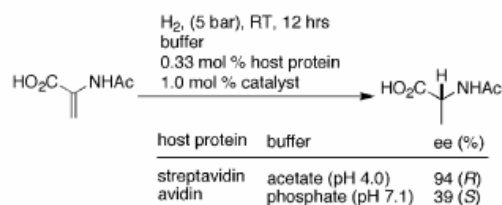
As the catalyst devoid of its protein environment yields essentially racemic product under identical conditions, we reasoned that it is imperative to ensure that catalysis proceeds exclusively within the protein (Scheme 1). As avidin possesses an isoelectric point $pI = 10.4$, we speculated that at pH 7.0, the cationic catalyst may display a significantly reduced affinity for the positively charged avidin. The modest ee may thus be a reflection of two competing catalytic cycles:

- (i) inside the protein which affords an highly enantio-enriched product;
- (ii) outside the protein which affords racemic product.

Streptavidin, which displays only 30% sequence homology with avidin possesses a much lower isoelectric point ($pI = 6.4$) [12]. Using streptavidin may thus solve



Scheme 1.



Scheme 2.

the problem of Coulomb repulsion between the host protein and the cationic catalyst precursor. The reaction performed under identical conditions afforded (*R*)-acetamidoalanine in nearly quantitative yield with 94% ee [8]. Upon lowering the pH to 4.0, the reaction proceeded quantitatively (Scheme 2).

2. Results and discussion

Both in the fields of homogeneous [15] and heterogeneous [16] catalysis, the concept of ligand acceleration has proven very valuable. In ligand-accelerated catalysis, the addition of a ligand increases the reaction rate of a catalytic transformation which proceeds even in the absence of added ligand.

In the area of artificial metalloenzymes, the same concept may apply as the “coenzyme” $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ was shown to be active (and unselective) in the absence of host protein (Scheme 1). As the interaction between the biotinylated moiety and the host protein is non-covalent, it is inherently reversible. The amount bound and free catalyst (abbreviated μ_{bound} and μ_{free} , respectively) is determined by the stability constant of the supramolecular edifice $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ –(strept)avidin and the individual concentrations (We use Lehn’s notation for host–guest interactions [17]; (strept)avidin denotes both avidin and streptavidin) [18]. Because of the very low solubility of acetamidoacrylate, we could not perform a thorough kinetic analysis to determine the individual rate constants $k_{\text{cat-prot}}$ and k_{cat} for the reaction within the protein and outside the protein, respectively. Assuming that both competing catalytic cycles (within and outside (strept)avidin) proceed according to the same mechanism, we reasoned that we could determine the relative rates $k_{\text{cat-prot}}:k_{\text{cat}}$ by

incrementally varying the $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ to (strept)avidin ratio. By plotting the enantiomeric excess of the product as a function of this ratio, it should be possible to estimate the extent of protein-acceleration (Fig. 1).

Hydrogenation experiments were performed using both avidin and streptavidin loaded with varying amounts of $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$. The $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -to-protein ratio was varied incrementally from 1:1 to 10:1 and the enantiomeric excess is plotted against this ratio, Fig. 1. The reactions were performed as described in [8]. Two noteworthy features emerge:

- (i) protein acceleration and
- (ii) cooperativity between the four catalytic sites.

(i) Both avidin and streptavidin display protein accelerated catalysis. The extent of protein acceleration in streptavidin (where the (*R*)-product is produced preferentially) can be estimated by

$$\%(\text{R})_{\text{calculated}} = \frac{k_{\text{cat-prot}} \cdot \mu_{\text{bound}} \cdot a + k_{\text{cat}} \cdot \mu_{\text{free}} \cdot b}{k_{\text{cat-prot}} \cdot \mu_{\text{bound}} + k_{\text{cat}} \cdot \mu_{\text{free}}}, \quad (1)$$

where $k_{\text{cat-prot}}$ and k_{cat} are the rate constants for the reaction within the protein and outside the protein, respectively, μ_{bound} and μ_{free} are the number of protein-bound complexes ($[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -(strept)avidin) and protein-free $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ moieties; *a* and *b* are the % (*R*) produced by $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -(strept)avidin and by $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$, respectively.

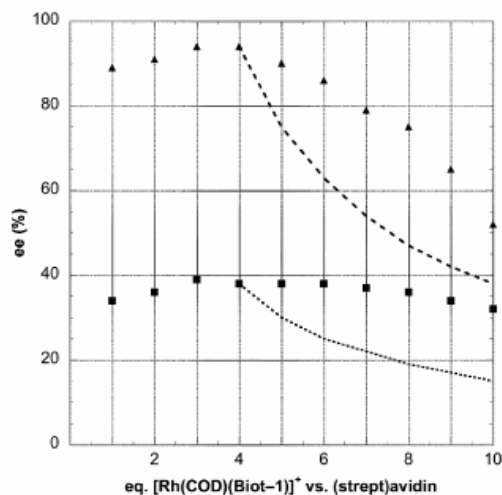


Fig. 1. Enantioselectivity as a function of the $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -to-(strept)avidin ratio. The triangles correspond to the ee (*R* enantiomer) obtained with streptavidin as host protein; the squares correspond to the ee (*S* enantiomer) obtained with avidin as host protein. The broken lines represent the theoretical ee with no protein acceleration, emphasizing the effect of the protein on the rate of the reduction.

As this procedure produces a single equation with two unknowns $k_{\text{cat-prot}}$ and k_{cat} , we can only extract the ratio rather than the individual rate constants.

If no protein acceleration is operative, $k_{\text{cat-prot}} = k_{\text{cat}}$. At eight equivalents $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ vs. protein, $\mu_{\text{bound}} = \mu_{\text{free}} = 4$ as (strept)avidin possesses four binding sites. Since $a = 0.97$ (i.e., 94% ee (*R*) for $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -streptavidin) and $b = 0.50$ (racemic material produced by $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$), the % (*R*) predicted at eight equivalents and with no protein acceleration is % (*R*) = 73.5 (i.e., 47% ee (*R*)). The broken lines in Fig. 1 correspond to the ee calculated with no protein acceleration, assuming that both reactions proceed according to the same mechanism.

By performing a least square minimization on the calculated and measured % ee for a given $k_{\text{cat-prot}}:k_{\text{cat}}$ ratio, we estimate the relative rates. For streptavidin and avidin, we compute a $k_{\text{cat-prot}}:k_{\text{cat}}$ ratio of 2.95 and 11.96, respectively.

(ii) Increasing the $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -to-protein ratio from 1:1 to 4:1 (i.e., all four biotin binding sites occupied) leads to a slight increase in enantioselectivity (from 89% to 94% ee (*R*) for streptavidin and from 34% to 39% (*S*) for avidin). This suggests that there is a slight cooperativity on the enantioselectivity between the four biotin binding sites.

3. Conclusion

By incrementally varying the $[\text{Rh}(\text{COD})(\text{Biot-1})]^+$ -to-(strept)avidin ratio, we have unraveled the phenomenon of protein-accelerated catalysis, similar to ligand accelerated catalysis. We have shown that the hydrogenation of acetamidoacrylic acid within artificial metalloenzyme proceeds at a faster rate than the corresponding hydrogenation outside of the protein.

We believe that this phenomenon is caused by the affinity of the hydrophobic substrate for the hydrophobic catalytic pocket within the host protein. Although the "active site" was by no means optimized to accommodate an enantioselective hydrogenation event, it is pleasing to witness an increase both in activity and in selectivity for this reaction, prototypical of the homogeneous catalysis kingdom. Current efforts in the group are directed towards the determination of individual rate constants using a more soluble substrate.

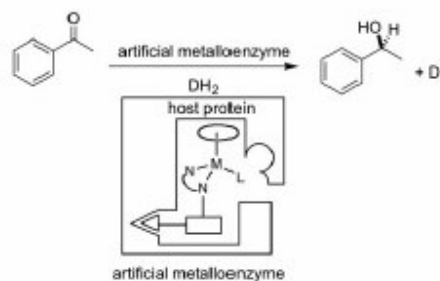
Acknowledgements

This work was funded by the Swiss National Science Foundation, CERC3 and the Canton of Neuchâtel. We thank Belovo Egg Science and Technology for a generous gift of egg white avidin. We thank C.R. Cantor for the streptavidin gene, J.-M. Neuhaus, P. Schürmann

(Univ. Neuchâtel) and P. Arosio (Univ. Milano) for their help in setting up the streptavidin production.

References

- [1] E.N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto (Eds.), *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer, Berlin, 1999.
- [2] R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2008.
- [3] K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2024.
- [4] W.S. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 1998.
- [5] C. Gennari, U. Piarulli, *Chem. Rev.* 103 (2003) 3071.
- [6] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, fifth ed., Springer, Berlin, 2004.
- [7] M.T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 5716.
- [8] J. Collot, J. Gradinaru, M. Skander, N. Humbert, A. Zocchi, T.R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9030; M. Skander, N. Humbert, J. Collot, J. Gradinaru, G. Klein, A. Loosli, J. Sauser, A. Zocchi, F. Gilardoni, T.R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) in press.
- [9] E.T. Kaiser, D.S. Lawrence, *Science* 226 (1984) 505.
- [10] D. Qi, C.-M. Tann, D. Haring, M.D. Distefano, *Chem. Rev.* 101 (2001) 3081.
- [11] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 1005.
- [12] M. Wilchek, E.A. Bayer (Eds.), *Methods in Enzymology: Avidin-Biotin Technology*, Academic Press, San Diego, 1990.
- [13] M.E. Wilson, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 306.
- [14] C.-C. Lin, C.-W. Lin, A.S.C. Chan, *Tetrahedron Asym.* 10 (1999) 1887.
- [15] D.J. Berrisford, C. Bolm, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1059.
- [16] M. Garland, H.-U. Blaser, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 7048.
- [17] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, 1995.
- [18] Although the biotin-(strept)avidin is among the strongest non-covalent interactions known, we have shown that the introduction of a bulky and charged rhodium moiety dramatically diminishes the affinity association constant (unpublished results).



Scheme 1. Artificial metalloenzymes for enantioselective transfer hydrogenation reactions. The host protein displays high affinity for the anchor (triangle); introduction of a spacer (rectangle) and variation of the d^6 piano-stool moiety allows us to chemically optimize the enantioselectivity. Site-directed mutagenesis allows for a genetic optimization of the host protein.

vidin (26–30). Herein, we present our efforts to extend this methodology to the transfer hydrogenation of ketones by using biotinylated d^6 piano-stool complexes in conjunction with (strept)avidin.

Methods

(Strept)avidin was produced, purified, and quantified according to ref. 28. All experiments were carried out by using standard Schlenk techniques, with thoroughly degassed solutions (nitrogen-flushed).

Preparation of $[\eta^6\text{-(arene)Ru}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$. The ruthenium dimer $[\eta^6\text{-(arene)RuCl}_2]_2$ (arene = benzene, *p*-cymene; *q* = *ortho*, *meta*, *para*) (38.8 μmol , 1.00 eq.), the biotinylated ligand Biot-*q*-LH (37.8 mg, 85.5 μmol , 2.20 eq.), and NEt_3 (12.5 μl , 90 μmol , 2.25 eq.) were dissolved in isopropanol (1.5 ml) and heated at 80°C for 2 h. The solvent was removed *in vacuo* to afford a red-brown powder that was stored under nitrogen until use. For catalysis purposes, the crude catalyst precursor $[\eta^6\text{-(arene)Ru}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$ was dissolved in degassed dimethylformamide to a final stock solution concentration of $[\text{Ru}] = 0.0395 \text{ M}$. This

stock solution can be stored for several days without any noticeable loss in activity or selectivity.

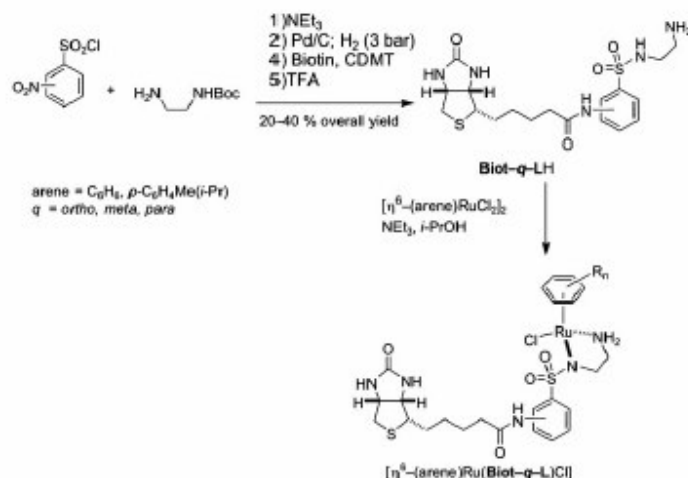
Boric Acid-Formate Mixed Buffer. Boric acid (1.05 g, 17 mmol) and sodium formate (1.36 g, 20 mmol) were dissolved in water (20 ml). The pH was adjusted to 6.25 with NaOH pellets. The final stock-solution concentration was $\text{B}(\text{OH})_3 = 0.85 \text{ M}$, $\text{HCO}_2\text{Na} = 1 \text{ M}$.

Catalysis Experiments. (Strept)avidin was dissolved in water [100 μM tetrameric concentration (31)] and thoroughly degassed. The host protein (450 μl , 0.045 μmol , 1.4 eq. active sites vs. ruthenium) was mixed in a test tube (7 ml capacity) with the precursor complex $[\eta^6\text{-(arene)Ru}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$ (3.3 μl of the dimethylformamide stock solution, 0.13 μmol ruthenium) and stirred at room temperature for 10 min. The boric acid-formate mixed buffer (550 μl of the stock solution, 42 eq. formate vs. substrate 2 a-c), and, if required, the Mops buffer (200 μl of 1 M stock solution in water, pH 6.25, as well as an additional 50 μl of the boric acid-formate stock solution) were added and stirred for 5 min. Finally, substrate 2 a-c (13 μl of a 1 M stock solution in dimethylformamide, 13 μmol , 100 eq. vs. ruthenium) was added. The test tube was placed in a magnetically stirred 24 multireactor (Greenhouse Parallel Synthesizer from Radleys, Brinkmann), purged four times with nitrogen, and heated at 45–55°C for 40–64 h. After completion, the reaction mixture was extracted four times with Et_2O (4 \times 1 ml) and dried over Na_2SO_4 . Subsequent continuous extraction of the resulting aqueous phase reveals no trace of substrate 2 a-c or product 3 a-c. The organic solution was filtered through a short silica plug that was thoroughly washed with Et_2O , concentrated, and subjected to HPLC analysis using a Chiralcel OB-H column (Daicel Chemical Industries, Tokyo) with hexane/isopropanol at 97:3 at 0.7 ml/min. Identical results were obtained for the best ees with samples that were not subjected to filtration through a silica plug.

For 1-phenylethanol 3a, $t_S = 18.18 \text{ min}$ and $t_R = 26.45 \text{ min}$ (UV detection at 215 nm, absolute configuration determined with a commercial enantiopure sample).

For 1-(*p*-bromophenyl)ethanol 3b, $t_S = 17.33 \text{ min}$ and $t_R = 19.44 \text{ min}$ [UV detection at 225 nm, absolute configuration (32)].

For 1-(*p*-methylphenyl)ethanol 3c, $t_S = 19.14 \text{ min}$ and $t_R = 22.16 \text{ min}$ [UV detection at 215 nm, absolute configuration (33)].



Scheme 2. Biotinylated ligand synthesis and *in situ* catalyst precursor generation. CDMT, 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine; TFA, trifluoroacetic acid.

Results and Discussion

The most successful ligands for enantioselective transfer hydrogenation with d^6 piano-stool complexes in organic solvents are often amino alcohols, amino-sulfonamides, and diimine ligands (2, 9, 10, 34). In aqueous solvents, the most promising systems are based on water-soluble or polymer-supported amino-sulfonamide scaffolds derived from Noyori's system (35–40). In the same spirit, we synthesized a series of achiral aminosulfonamide ligands Biot-*q*-LH (Scheme 2) and set out to test their potential in combination with two $[\eta^6\text{-(arene)Ru}]^{2+}$ moieties by using (strept)avidin as host proteins.

The catalyst precursors $[\eta^6\text{-(arene)Ru(Biot-}q\text{-L)Cl}]$ were prepared *in situ* with isopropanol and triethylamine. Such complexes are chiral at ruthenium. The absence of a CD signal in their absorption band strongly suggests that these complexes are formed as a 1:1 mixture of epimers at ruthenium. As a consequence, in the absence of (strept)avidin, all catalysts (1 mol% vs. acetophenone 2a) produce quantitatively (*rac*)-phenylethanol 3a at 45°C within 40 h of using either isopropanol, the triethylamine-formic acid azeotropic mixture, or 1.5 M sodium formate as the hydrogen source. These experiments demonstrate that the catalyst precursors are indeed active, but unselective, transfer hydrogenation catalysts.

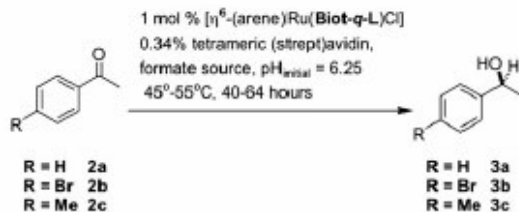
Under similar reaction conditions but in the presence of (strept)avidin {1 mol% $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$, 0.34 mol% tetrameric streptavidin, Scheme 3}, we observed the slow appearance of a white precipitate. Nondenaturing gel electrophoresis (41, 42) of the turbid mixture reveals the presence of monomeric (strept)avidin, suggesting that these reducing agents denature (strept)avidin. Decreasing the formate concentration to 0.5 M (42 eq. vs. acetophenone) allows us to totally suppress the denaturation of the host protein, thus ensuring that the chiral environment provided by the host protein remains unaltered throughout catalysis [conversion 51%, ee 28% (*R*), Table 1, entry 1].

With the aim of stabilizing the pH during catalysis (43), various acids were screened in combination with 0.5 M sodium formate. These experiments revealed that the mixed buffer $\text{HCO}_2\text{Na-B(OH)}_3$ ($\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$, $\text{pH}_{\text{final}} < 7.5$ with boric acid, $\text{pH}_{\text{final}} > 8.5$ without boric acid) has a beneficial effect on the ee [conversion 55%, ee 57% (*R*), Table 1, entry 2].

Having identified a reducing source compatible with the artificial metalloenzyme, we tested various biotinylated catalyst precursors $[\eta^6\text{-(arene)Ru(Biot-}q\text{-L)Cl}]$ in conjunction with WT (strept)avidin (WT-Avi and WT-Sav respectively; Table 1). These experiments reveal the following trends:

(i) The *para*-anchored ligand Biot-*p*-L outperforms both the *ortho*- and the *meta*-diastereomers Biot-*o*-L and Biot-*m*-L in terms of activity and selectivity (Table 1, compare entries 2, 4, and 5).

(ii) Streptavidin is a better host protein than avidin (Table 1, compare entries 2 and 3 and 6 and 7).



Scheme 3. Transfer hydrogenation of acetophenone derivatives 2 a-c catalyzed by artificial metalloenzymes.

Letondor et al.

Table 1. Selected results for the chemical optimization of the performance of $[\eta^6\text{-(arene)Ru(Biot-}q\text{-L)Cl}]$ [(strept)avidin] as an artificial metalloenzyme for the transfer hydrogenation of acetophenone 2a

Entry	Ligand	$\eta^6\text{-arene}$	Protein	Conversion, %	ee, %
1*	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	WT-Sav	51	28 (<i>R</i>)
2*	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	WT-Sav	55	57 (<i>R</i>)
3*	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	WT-Avi	24	22 (<i>R</i>)
4*	Biot- <i>m</i> -L	<i>p</i> -cymene	WT-Sav	20	6 (<i>S</i>)
5*	Biot- <i>o</i> -L	<i>p</i> -cymene	WT-Sav	18	3 (<i>S</i>)
6*	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	WT-Sav	29	56 (<i>S</i>)
7*	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	WT-Avi	17	17 (<i>R</i>)

All catalytic runs were carried out at 45°C for 40 h at $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$, using a Ru/acetophenone 2a/formate ratio of 1:100:4,200. Conversions and enantioselectivities were determined by HPLC on Chiralcel OB-H.

*Nonbuffered 0.5 M formate solution.

*Mixed buffer HCO_2Na (0.5 M) + B(OH)_3 (0.47 M).

(iii) With streptavidin as host protein, substitution of the $\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)}$ - by an $\eta^6\text{-benzene}$ cap on the biotinylated piano-stool complex produces the opposite enantiomer of phenylethanol {57% (*R*), 55% conversion for $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ [(strept)avidin] and 56% ee (*S*), 29% conversion for $[\eta^6\text{-(benzene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ [(strept)avidin], respectively; Table 1, entries 2 and 6}.

Having identified the best biotinylated ligand- $\eta^6\text{-arene}$ combinations, we proceeded to genetically optimize the performance of the artificial metalloenzyme by introducing point mutations within the host protein. For this purpose, a recombinant avidin with a lowered isoelectric point (r-GAvi, $\text{pI} = 5.4$) (44) and five streptavidin mutants (S112G Sav, K80G Sav, V47G Sav, P64G Sav, and the double mutant P64G S112G Sav) (28) were screened. For the reduction of acetophenone using the boric acid-formate mixed buffer, some additional general trends emerge (Table 2):

(i) The host protein with the mutation closest to the catalytic site (S112G Sav) affords the highest conversions but the lowest selectivity {28% ee (*R*), 90% conversion using $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ [(S112G Sav); 8% ee (*S*), 42% conversion using $[\eta^6\text{-(benzene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ [(S112G Sav); Table 2, entries 2 and 7}.

(ii) The host protein with the most remote site of mutation (P64G Sav) has the greatest influence on the enantioselectivity

Table 2. Selected results for the genetic optimization of the performance of $[\eta^6\text{-(arene)Ru(Biot-}p\text{-L)Cl}]$ [(strept)avidin] as an artificial metalloenzyme for the transfer hydrogenation of acetophenone 2a by using formate-boric acid as a reducing agent

Entry	Ligand	$\eta^6\text{-arene}$	Protein	Conversion, %	ee, %
1	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	r-GAvi	40	22 (<i>R</i>)
2	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	S112G Sav	90	28 (<i>R</i>)
3	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	V47G Sav	42	68 (<i>R</i>)
4	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	K80G Sav	54	65 (<i>R</i>)
5	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G Sav	54	72 (<i>R</i>)
6	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G S112G Sav	95	58 (<i>R</i>)
7	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	S112G Sav	42	8 (<i>S</i>)
8	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	V47G Sav	8	56 (<i>S</i>)
9	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	K80G Sav	31	51 (<i>S</i>)
10	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	P64G Sav	30	58 (<i>S</i>)

All catalytic runs were carried out at 45°C for 40 h at $\text{pH}_{\text{initial}} = 6.25$, using a Ru/acetophenone 2a/formate ratio of 1:100:4,200, by using the mixed buffer HCO_2Na (0.5 M) + B(OH)_3 (0.47 M) as a formate source. Conversions and enantioselectivities were determined by HPLC on Chiralcel OB-H.

PNAS | March 29, 2005 | vol. 102 | no. 13 | 4685

Table 3. Selected results for the optimization of the performance of $[\eta^6\text{-(arene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{strept})\text{avidin}$ as an artificial metalloenzyme for the transfer hydrogenation of acetophenone derivatives 2a-c by using formate-boric acid as a reducing agent in 0.15 M Mops buffer

Entry	Ligand	$\eta^6\text{-arene}$	Protein	Substrate	Temperature, °C	Time, h	Conversion, %	ee, %
1	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	Sav	2a	45	40	40	66 (<i>R</i>)
2	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	Sav	2a	45	40	30	63 (<i>S</i>)
3	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	Sav	2a	55	64	82	68 (<i>R</i>)
4	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G Sav	2a	55	64	90	85 (<i>R</i>)
5	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G Sav	2b	55	64	97	89 (<i>R</i>)
6	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G Sav	2c	55	64	92	94 (<i>R</i>)
7	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G S112 G Sav	2a	55	40	Quantitative	67 (<i>R</i>)
8	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G S112 G Sav	2b	55	40	Quantitative	88 (<i>R</i>)
9	Biot- <i>p</i> -L	<i>p</i> -cymene	P64G S112 G Sav	2c	55	40	Quantitative	90 (<i>R</i>)
10	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	P64G Sav	2c	45	64	34	57 (<i>S</i>)
11	Biot- <i>p</i> -L	Benzene	P64G Sav	2c	55	64	44	44 (<i>S</i>)

All catalytic runs were carried out at $\text{pH}_{\text{final}} = 6.25$ by using the mixed buffer HCO_2Na (0.5 M) + $\text{B}(\text{OH})_3$ (0.47 M) combined with Mops (0.15 M) with a Ru/substrate 2 a-c/formate ratio of 1:100:4,500. Conversions and enantioselectivity were determined by HPLC on Chiralcel OB-H.

{72% ee (*R*), 54% conversion for $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$; 58% ee (*S*), 30% conversion with $[\eta^6\text{-(benzene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$; Table 2, entries 5 and 10).

(iii) The double mutant P64G S112G Sav (Table 2, entry 6) combines the features of both single mutants P64G (increased selectivity vs. WT Sav) and increased activity S112G (increased activity vs. WT Sav).

With the aim of further stabilizing the $\text{pH} \approx 6.25$, various buffers were screened. Addition of 0.15 M Mops [3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid sodium salt, $\text{pH}_{\text{final}} < 7.0$] to the formate-boric acid mixture has a beneficial effect on the enantioselectivity, at the cost of a slightly lower conversion, however (compare Table 3, entries 1 and 2 with Table 1, entries 2 and 6). To overcome this drawback, the temperature was raised from 45°C to 55°C, and the reaction time was extended to 64 h (Table 3, entry 3). In the presence of Mops at 55°C, $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$ affords (*R*)-phenylethanol in 85% ee (*R*) in 90% conversion (Table 3, entry 4, compare with Table 2, entry 5).

Next, *p*-bromoacetophenone 2b and *p*-methylacetophenone 2c were tested in conjunction with $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$ and $[\eta^6\text{-(benzene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$. Again with these substrates, the *p*-cymene-capped and the benzene-capped catalysts afford the opposite enantiomers within the same host protein (Table 3, entries 4–6 and 10–11). For example, the reduction of *p*-methylacetophenone 2c affords *p*-toylethanol in 94% ee (*R*) with 92% conversion and in 44% (*S*) with 44% conversion by using $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$ and $[\eta^6\text{-(benzene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G Sav})$, respectively (Table 3, entries 6 and 11).

It is interesting to note that increasing the temperature has a beneficial effect on both the conversion and enantioselectivity for the *p*-cymene-capped catalyst; in contrast, it has a detrimental effect on enantioselectivity for the benzene-capped catalyst (Table 3, compare entries 10 and 11).

At 55°C, the double mutant $[\eta^6\text{-(}p\text{-cymene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]\text{C}(\text{P64G S112G Sav})$ produces quantitatively all three phenylethanol derivatives (2 a-c) within 40 h with selectivities intermediate between the WT Sav and P64G Sav (Table 3, entries 7–9).

Outlook

The study of artificial transfer hydrogenases based on biotin-avidin technology reveals several noteworthy features:

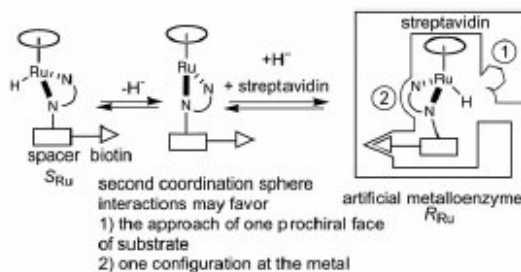
(i) Having identified a source of hydrogen compatible with streptavidin, biotinylated three-legged piano-stool complexes are versatile enantioselective transfer hydrogenation catalysts.

(ii) As the first coordination sphere around ruthenium is achiral, enantioselection is determined by second coordination sphere interactions. In this context, the choice of capping arene (either $\eta^6\text{-}p\text{-cymene}$ or $\eta^6\text{-benzene}$) plays a critical role in determining which enantiomer of the product is produced preferentially. To rationalize this observation, two complementary enantioselection mechanisms can be envisaged. On one hand, protein-substrate interactions may favor the preferential approach of one prochiral face of the substrate. On the other hand, streptavidin- $[\eta^6\text{-(arene)Ru}(\text{Biot-}q\text{-L})\text{Cl}]$ contacts may enforce one configuration at ruthenium [(R_{Ru}) or (S_{Ru})] (45). This configuration, in turn, could determine which prochiral face of the substrate undergoes reduction. These two possibilities are summarized in Scheme 4.

(iii) Both chemical and genetic methodologies [i.e., chemogenetic (46)] can be efficiently combined to optimize the activity and selectivity of the artificial metalloenzymes [up to 94% ee (*R*) with 92% conversion with 1 mol% catalyst loading]. This approach thus adds another dimension to catalyst discovery and optimization.

In the spirit of enzymatic catalysis, providing a well defined second coordination sphere for a transition state that does not involve coordination of the substrate to the metal (see 1, Fig. 1) is a promising approach. Additional efforts in this area should be centered on the microscopic reverse reaction: the kinetic resolution of secondary alcohols by Oppenauer oxidation.

We thank Belovo Egg Science and Technology (Bastogne, Belgium) for a generous gift of avidin and C. R. Cantor (Boston University, Boston)



Scheme 4. Postulated second coordination sphere interactions between streptavidin and either $[\eta^6\text{-(arene)Ru}(\text{Biot-}p\text{-L})\text{Cl}]$ or the substrate. Depending on the $\eta^6\text{-arene}$ cap, S_{Ru} -streptavidin or R_{Ru} -streptavidin may be favored.

for the streptavidin gene. This work was generously funded by Swiss National Science Foundation Grants FN 620-57866.99 and FN 200021-105192, National Research Programme 47 Supramolecular Functional

Materials Grant FN 4047-057532, Chairmen of the European Research Councils' Chemistry Committees (CERC3) Grant FN 20C321-101071, and the Canton of Neuchâtel.

- Jacobsen, E. N., Pfaltz, A. & Yamamoto, H., eds. (1999) *Comprehensive Asymmetric Catalysis* (Springer, Berlin), Vols. 1-3.
- Noyori, R. & Hashiduchi, S. (1997) *Acc. Chem. Res.* **30**, 97-102.
- Noyori, R. & Ohkuma, T. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 40-73.
- Drauz, K. & Waldmann, H. (1995) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook* (VCH, Weinheim, Germany), Vols. 1-2.
- Faber, K. (2004) *Bioasformations in Organic Chemistry* (Springer, Berlin), 5th Ed.
- Stampfer, W., Kosjek, B., Moitzi, C., Krcutik, W. & Faber, K. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1014-1017.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T. & Harada, T. (2003) *Tetrahedron Asymmetry* **14**, 2659-2681.
- Krcutik, W., Mang, H., Edegger, K. & Faber, K. (2004) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 120-126.
- Bhaser, H.-U., Malan, C., Pugin, B., Spindler, F., Steiner, H. & Studer, M. (2003) *Adv. Synth. Catal.* **345**, 103-151.
- Palmer, M. J. & Wills, M. (1999) *Tetrahedron Asymmetry* **10**, 2045-2061.
- Yamakawa, M., Yamada, I. & Noyori, R. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2818-2821.
- Brandt, P., Roth, P. & Andersson, P. G. (2004) *J. Org. Chem.* **69**, 4885-4890.
- Yamakawa, M., Ito, H. & Noyori, R. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1466-1478.
- Clapham, S. E., Hadzovic, A. & Morris, R. H. (2004) *Coord. Chem. Rev.* **248**, 2201-2237.
- Pàmies, O. & Bückvall, J.-E. (2003) *Chem. Rev.* **103**, 3247-3261.
- Lo, H. C., Burrier, O., Kerr, J. B. & Fish, R. H. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1429-1432.
- Ruppert, R., Herrmann, S. & Steckhan, E. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 6583-6586.
- Westerhausen, D., Herrmann, S., Hummel, W. & Steckhan, E. (1992) *Angew. Chem. Int. Ed.* **31**, 1529-1531.
- Hollmann, F., Lin, P.-C., Witholt, B. & Schmid, A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8209-8217.
- Ghani, M. T. E. & Williams, J. M. J. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 11-15.
- Tann, C.-M., Qi, D. & Ditefano, M. D. (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 696-704.
- Carey, J. R., Ma, S. K., Pfister, T. D., Garner, D. K., Kim, H. K., Abramite, J. A., Whang, Z., Guo, Z. & Lu, Y. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10812-10813.
- Reetz, M. T., Rentsch, M., Pletsch, A. & Maywald, M. (2002) *Chimia* **56**, 721-723.
- Ohashi, M., Koshiyama, T., Ueno, T., Yanase, M., Fujii, H. & Watanabe, Y. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1005-1008.
- Reetz, M. T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 5716-5722.
- Wilson, M. E. & Whitesides, G. M. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 306-307.
- Lin, C.-C., Lin, C.-W. & Chan, A. S. C. (1999) *Tetrahedron Asymmetry* **10**, 1887-1893.
- Skander, M., Humbert, N., Collot, J., Gradinaru, J., Klein, G., Locdi, A., Sauser, J., Zocchi, A., Gilardoni, F. & Ward, T. R. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14411-14418.
- Collot, J., Humbert, N., Skander, M., Klein, G. & Ward, T. R. (2004) *J. Organomet. Chem.* **689**, 4868-4871.
- Collot, J., Gradinaru, J., Skander, M., Humbert, N., Zocchi, A. & Ward, T. R. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9030-9031.
- Kada, K., Kaiser, K., Falk, H. & Grober, H. J. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1427**, 44-48.
- Akakabe, Y., Takahashi, M., Kamezawa, M., Kikuchi, K., Tachibana, H., Ohtani, T. & Nacshima, Y. (1995) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1295-1298.
- Kitamura, M., Oka, H. & Noyori, R. (1999) *Tetrahedron* **55**, 3605-3614.
- Ueno, T., Ohashi, M., Kono, M., Kondo, K., Suzuki, A., Yamane, T. & Watanabe, Y. (2004) *Inorg. Chem.* **43**, 2852-2858.
- Bubert, C., Blacker, J., Brown, S. M., Crosby, J., Fitzjohn, S., Muxworthy, J. P., Thorpe, T. & Williams, J. M. J. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 4037-4039.
- Thorpe, T., Blacker, J., Brown, S. M., Bebert, C., Crosby, J., Fitzjohn, S., Muxworthy, J. P. & Williams, J. M. J. (2001) *Tetrahedron Lett.* **42**, 4041-4043.
- Hayes, A., Clarkson, G. & Wills, M. (2004) *Tetrahedron Asymmetry* **15**, 2079-2084.
- Ma, Y., Liu, H., Chen, L., Cui, X., Zhu, J. & Deng, J. (2003) *Org. Lett.* **5**, 2103-2106.
- Rhyoo, H. Y., Park, H.-J. & Chung, Y. K. (2001) *Chem. Commun.* 2064-2065.
- Wu, X., Li, X., Hems, W., King, F. & Xiao, J. (2004) *Org. Biomol. Chem.* **2**, 1818-1821.
- Bayer, E. A., Ehrlich-Rogozinski, S. & Wikhek, M. (1996) *Electrophoresis* **17**, 1319-1324.
- Humbert, N., Zocchi, A. & Ward, T. R. (2005) *Electrophoresis* **26**, 47-52.
- Abura, T., Ogo, S., Watanabe, Y. & Fukuzumi, S. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4149-4154.
- Zocchi, A., Jobé, A. M., Neuhäuser, J.-M. & Ward, T. R. (2003) *Protein Expression Purif.* **32**, 167-174.
- Therrien, B. & Ward, T. R. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 405-408.
- Qi, D., Tann, C.-M., Haring, D. & Ditefano, M. D. (2001) *Chem. Rev.* **101**, 3081-3111.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Organometallic Chemistry xxx (2005) xxx–xxx

Journal
of Organometallic
Chemistry

www.elsevier.com/locate/jorganchem

Aqueous oxidation of alcohols catalyzed by artificial metalloenzymes based on the biotin–avidin technology

Christophe M. Thomas, Christophe Letondor, Nicolas Humbert, Thomas R. Ward *

Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, Rue Emile-Argand 11, Case Postale 2, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

Abstract

Based on the incorporation of biotinylated organometallic catalyst precursors within (strept)avidin, we have developed artificial metalloenzymes for the oxidation of secondary alcohols using *tert*-butylhydroperoxide as oxidizing agent. In the presence of avidin as host protein, the biotinylated aminosulfonamide ruthenium piano stool complex **1** (0.4 mol%) catalyzes the oxidation of *sec*-phenethyl alcohol at room temperature within 90 h in over 90% yield. Gel electrophoretic analysis of the reaction mixture suggests that the host protein is not oxidatively degraded during catalysis.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Artificial metalloenzymes; Ruthenium; Oxidation; Piano stool complex; Biotin–avidin technology

Homogeneous and enzymatic catalysis are in many respects complementary [1–4]. By incorporating an organometallic complex into a host protein, we aim at creating artificial metalloenzymes with properties reminiscent both of enzymes and of homogeneous catalysts. With this goal in mind, we have recently described the incorporation of achiral biotinylated rhodium–diphosphine complexes into (strept)avidin ((strept)avidin refers to either avidin or streptavidin, used as a host protein) [5]. These artificial metalloenzymes were used as catalysts for the enantioselective hydrogenation of *N*-protected dehydroaminoacids (ee up to 96%). The perspective of improving the performance of such artificial metalloenzymes using combined chemical- and genetic optimization strategies (i.e., chemogenetic) provides the opportunity to focus on more challenging reactions. For example, it may be interesting to test the power of such methodology for the oxidation of alcohols. Along similar lines, several groups have recently reported the creation of artificial metalloenzymes

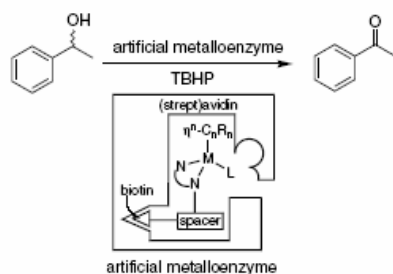
for the enantioselective oxidation of sulfides to sulfoxides [6–8].

The oxidation of alcohols to the corresponding aldehydes and ketones is one of the most important functional group transformations in organic synthesis. While alcohol dehydrogenases often perform this task very efficiently [3,4], mild homogeneous catalysts are scarce. Traditionally, these reactions have been performed with stoichiometric chromium reagents. However, today's environmental restrictions render most of the stoichiometric metal oxidants obsolete. For this purpose, the use of *tert*-butylhydroperoxide (TBHP) as an oxidizing agent has been investigated in conjunction with several homogeneous transition-metal catalysts, including chromium, ruthenium, rhodium, and copper [9–13].

The present Communication outlines our efforts to create active artificial metalloenzymes for the oxidation of alcohols using biotinylated transition metal complexes in the presence of (strept)avidin as host protein.

In contrast to transition-metal catalyzed hydrogenation reactions (where nearly any rhodium–diphosphine moiety is an active catalyst), the number of versatile

* Corresponding author. Tel.: +41 32 718 2516; fax: +41 32 718 2511.
E-mail address: thomas.ward@unine.ch (T.R. Ward).



Scheme 1. Artificial metalloenzymes for the oxidation of *sec*-phenethyl alcohol based on biotinylated d^6 piano stool complexes.

60 organometallic catalysts for the mild oxidation of sec-
61 ondary alcohols in water is limited [14–16]. With no
62 homogeneous system to build upon, we decided to focus
63 d^6 piano stool complexes as catalyst precursors as illus-
64 trated in Scheme 1. Biotinylation of the metal was intro-
65 duced by means of a chelating ligand, thus ensuring
66 stability of the coenzyme as well as its quantitative
67 incorporation within (strept)avidin [5].

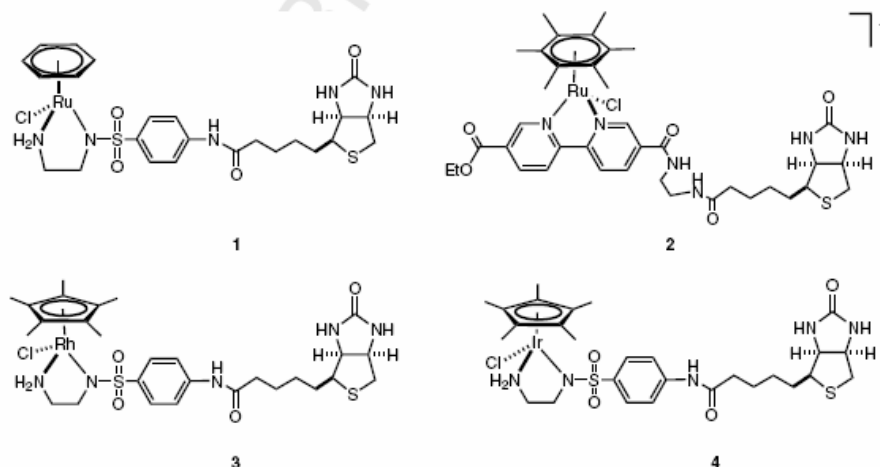
68 Initial oxidation experiments using *sec*-phenethyl
69 alcohol as substrate were performed with biotinylated
70 amino-sulfonamide Ru(II) catalyst 1 (Scheme 2). A de-
71 tailed experimental procedure is provided in the Sup-
72 porting Information. Using streptavidin as a host
73 protein, we found that, in the presence of 1, the oxida-
74 tion proceeded efficiently using *tert*-butylhydroperoxide
75 (TBHP) as terminal oxidant. When *sec*-phenethyl al-
76 col (250.0 equiv., 62.5 μmol) was treated with aqueous
77 TBHP (300.0 equiv., 75.0 μmol) in the presence of the
78 ruthenium coenzyme 1 (1.0 equiv., 0.25 μmol) dissolved

79 in DMF (31 μl), streptavidin (0.08 μmol of the tetra-
80 meric protein) in a mixture of water (500 μl) and acetone
81 (150 μl), acetophenone was obtained with 81% conver-
82 sion after 90 h at room temperature (Table 1, entry 1).

83 Extraction of the reaction mixture with pentane al-
84 lows to isolate the product devoid of any traces of the
85 hybrid catalyst which remains exclusively in the aqueous
86 phase. Following this treatment, the aqueous orange-red
87 solution was subjected to non-denaturing gel-electro-
88 phoresis. Inspection of the gel suggests that, despite
89 the presence of a strong oxidizing agent, the host protein
90 remains tetrameric (Fig. 1). There is no evidence for pro-
91 tein degradation by oxidative cleavage or denaturation
92 (to afford monomeric streptavidin). Performing the reac-
93 tion in the absence of host protein under the same con-
94 ditions, the reaction is nearly quantitative, but affords a
95 black residue, suggesting the formation of RuO_2 , which
96 is supposed to result from the degradation of an arene-
97 ruthenium complex by *tert*-butylhydroperoxide [17].

98 As control experiments, the catalytic reaction was
99 carried out in the absence of either the ruthenium cata-
100 lyst or TBHP. The presence of both compounds was
101 found to be essential. No oxidized product was detected
102 in the absence of TBHP (thus excluding an Oppenauer-
103 type oxidation with acetone acting as a hydrogen accep-
104 tor [15]), and very low conversions were obtained in the
105 absence of the ruthenium complex (<1% based on *sec*-
106 phenethyl alcohol). Carrying out the reaction in the
107 presence of air revealed no difference, while substitution
108 of TBHP with H_2O_2 afforded no trace of oxidized
109 product.

110 While *sec*-phenethyl alcohol was oxidized to afford
111 exclusively acetophenone, oxidation of benzyl alcohol
112 (entry 2) afforded a mixture of benzaldehyde and



Scheme 2. Biotinylated organometallic coenzymes tested for the oxidation of alcohols.

Table 1
Oxidation of alcohols catalyzed by different artificial metalloenzymes^a

Entry	Coenzyme	Substrate	Host protein	Conversion (%) ^b
1	1	Phenethyl alcohol	Streptavidin	81
2	1	Benzyl alcohol	Streptavidin	68
3 ^c	1	Cyclohexanol	Streptavidin	80
4 ^d	1	Phenethyl alcohol	Streptavidin	43
5	2	Phenethyl alcohol	Streptavidin	69
6 ^c	3	Phenethyl alcohol	Streptavidin	3
7 ^c	4	Phenethyl alcohol	Streptavidin	12
8	1	Phenethyl alcohol	Ser112Gly	75
9	1	Phenethyl alcohol	Pro64Gly	70
10	1	Phenethyl alcohol	Avidin	92

^a Unless otherwise stated, the reaction was carried out under nitrogen at room temperature for 90 h with alcohol (62.5 μmol), aqueous TBHP (75.0 μmol), coenzyme (0.25 μmol) dissolved in DMF (31 μl), protein (0.08 μmol) dissolved in a mixture of water (500 μl) and acetone (100 μl).

^b Determined by GC integration.

^c The reaction was performed for 140 h.

^d The coenzyme was dissolved in DMSO (31 μl).

113 benzoic acid in a ratio of 4:1 (68% total conversion (Ta-
114 ble 1, Entry 2)).

115 With cyclic alcohols such as cyclohexanol (Table 1,
116 Entry 3), the corresponding ketone was obtained with-
117 out the formation of ring-opened or lactone products
118 (80% conversion).

119 Using DMSO instead of DMF to solubilize the cata-
120 lyst precursor, led to a decrease in conversion (Table 1,
121 Entry 4). Dimethyl sulfoxide can act as a reductant in
122 certain aerobic oxidation reactions catalyzed by late
123 transition metals and dimethyl sulfone is produced dur-
124 ing the reaction [18]. In contrast, DMSO is also a stoi-
125 chiometric oxidant in a variety of chemical [19,20] and
126 biological [21] oxidation reactions, yielding dimethyl
127 sulfide as a byproduct. However, in our case there is
128 no evidence for presence of either dimethyl sulfone or di-
129 methyl sulphide (GC analysis). Presumably DMSO low-
130 ers the oxidation rate by coordinating to the Ru(II)
131 center.

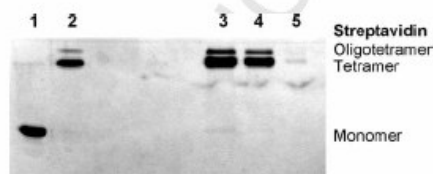


Fig. 1. Non-denaturing gel-electrophoresis demonstrating the integrity of the host protein following a catalytic run. (Lane 1: denatured pure streptavidin, revealing monomeric protein; Lane 2: non-denatured pure streptavidin, revealing tetrameric and oligotetrameric protein; Lane 3: aqueous reaction mixture resulting from a catalytic run, identical to Lane 2; Lanes 4 and 5: supernatant and precipitate, respectively, resulting from centrifugation at 16000g of a catalytic run).

To optimize the catalytic activity of such metalloen-
zymes, two complementary approaches can be pursued:
chemical modification of the first coordination sphere of
the biotinylated catalyst or genetic modification of the
protein.

Our first attempts focused on the use of a biotinyl-
ated bipyridine Ru(II) catalyst 2 (Table 1, Entry 5).
With this coenzyme, a slight decrease in catalytic
activity was observed (69% conversion, compared to
80% conversion for the sulfonamide Ru(II) complex
1).

We also examined the oxidation of *sec*-phenethyl
alcohol in the presence of [Rh(η^5 -C₅Me₅)(Biot-Ligand)]
3 and [Ir(η^5 -C₅Me₅)(Biot-Ligand)] 4. The results dis-
played in Table 1 suggest that the iridium catalyst 4
was more active than its rhodium analog 3. However,
both systems are much less active than the correspond-
ing ruthenium-based catalysts 1 and 2: acetophenone
was obtained in 3% yield and 12% yield after 140 h with
catalyst precursors 3 and 4, respectively (Table 1, En-
tries 6–7).

Having identified the most promising organometallic
fragment (Table 1, Entry 1), we subjected the host pro-
tein to site-directed mutagenesis. Two streptavidin
mutants were tested with the most promising organome-
tallic catalyst precursor 1. Neither Ser112Gly nor
Pro64Gly streptavidin mutants displayed enhanced
activity (Table 1, Entries 8–9). Using avidin as the host
protein, we found that, in the presence of 1, the oxida-
tion of *sec*-phenethyl alcohol proceeds nearly to comple-
tion (Table 1, Entry 10).

In summary, we have developed *active* artificial met-
alloenzymes for the oxidation of alcohols in water based
on the non-covalent incorporation of biotinylated *d*⁶
piano stool complexes in (strept)avidin. Having estab-
lished that the protein does not suffer from oxidative
damage despite the harsh reaction conditions, our next
goal is to develop *selective* artificial metallo-alcohol
dehydrogenases for the kinetic resolution of secondary
alcohols.

Acknowledgements

This work was supported by the Swiss National Sci-
ence Foundation and CERC3. We thank Belovo Egg
Science and Technology for a generous gift of egg white
avidin.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can
be found, in the online version, at doi:10.1016/
j.jorganchem.2005.02.001.

181 References

- 182 [1] E.N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto (Eds.), *Comprehensive*
183 *Asymmetric Catalysis*, vols. I-III, Springer, Berlin, 1999.
- 184 [2] H.-U. Blaser, C. Malan, P. Pugin, F. Spindler, H. Steiner, M.
185 Studer, *Adv. Synth. Catal.* 345 (2003) 103.
- 186 [3] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, fifth ed.,
187 Springer, Berlin, 2004.
- 188 [4] K. Drauz, H. Waldmann (Eds.), *Enzyme Catalysis in Organic*
189 *Synthesis: A Comprehensive Handbook*, vols. I-II, VCH, Wein-
190 heim, 1995.
- 191 [5] (a) J. Collot, J. Gradinaru, M. Skander, N. Humbert, A. Zocchi,
192 T.R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9030;
193 (b) M.T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 5716;
194 (c) M.E. Wilson, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978)
195 306.
- 196 [6] F. van de Veldre, I.W.C.E. Arends, R.A. Sheldon, *J. Inorg.*
197 *Biochem.* 80 (2000) 81.
- 198 [7] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y.
199 Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 1005.
- 200 [8] J.R. Carey, S.K. Ma, T.D. Pfister, D.K. Garner, H.K. Kim, J.A.
201 Abramite, Z. Whang, Z. Guo, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* 126
202 (2004) 10812.
- [9] K.B. Sharpless, T.R. Verhoeven, *Aldrichim. Acta* 12 (1979) 63. 203
- [10] J. Muzart, A. Nait-Ajjou, *J. Mol. Catal.* 66 (1991) 155. 204
- [11] J. Muzart, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 3139. 205
- [12] S. Uemura, S.R. Patil, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 4353. 206
- [13] C.-M. Che, K.-W. Cheng, M.C.W. Chan, T.-C. Lau, C.-K. Mak,
207 *J. Org. Chem.* 65 (2000) 7996. 208
- [14] G.J. ten Brink, I.W.C.E. Arends, R.A. Sheldon, *Science* 287
209 (2000) 1636. 210
- [15] A. Nait Ajjou, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 13. 211
- [16] K. Sato, M. Aoki, J. Takagi, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* 119
212 (1997) 12386. 213
- [17] G. Süß-Fink, B. Therrien, L. Vieille-Petit, M. Tschan, V.B.
214 Romakh, T.R. Ward, M. Dadras, G. Laurency, *J. Organomet.*
215 *Chem.* 689 (2004) 1362, and references therein. 216
- [18] (a) J. Trocha-Grimshaw, H.B. Henbest, *Chem. Commun.* (1968)
217 1035; 218
(b) H. Gampp, D. Haspra, W. Spieler, A.D. Zuberbühler, *Helv.*
219 *Chim. Acta* 67 (1984) 1019. 220
- [19] T.V. Lee, in: B.M. Trost, I. Fleming (Eds.), *Comprehensive*
221 *Organic Synthesis*, vol. 7, Pergamon, New York, 1991, p. 291. 222
- [20] J.P. Caradonna, P.R. Reddy, R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* 110
223 (1988) 2139, and references therein. 224
- [21] R. Hille, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2757. 225
226

Nicolas Humbert
Andrea Zocchi
Thomas R. Ward

Institute of Chemistry,
University of Neuchâtel,
Neuchâtel, Switzerland

Electrophoretic behavior of streptavidin complexed to a biotinylated probe: A functional screening assay for biotin-binding proteins

The biotin-binding protein streptavidin exhibits a high stability against thermal denaturation, especially when complexed to biotin. Herein we show that, in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), streptavidin is stabilized at high temperature in the presence of biotinylated fluorescent probes, such as biotin-4-fluorescein, which is incorporated within the binding pocket. In nondenaturing SDS-PAGE, streptavidin is detectable when complexed with biotin-4-fluorescein using a UV-transilluminator. Using biotin-4-fluorescein, the detection limit of streptavidin lies in the same range as with Coomassie blue staining. The functionality of streptavidin mutants can readily be assessed from crude bacterial extracts using biotin-4-fluorescein as a probe in nondenaturing SDS-PAGE.

Keywords: Biotin-4-fluorescein / Functional screening / Nondenaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / Streptavidin
DOI 10.1002/elps.200406148

1 Introduction

The biotin-(strept)avidin technology ((strept)avidin refers to either avidin or streptavidin), commonly referred to as molecular velcro, relies on the extraordinary affinity of biotin for either avidin or streptavidin ($K_a \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$) [1]. This remarkable affinity has been exploited for more than 20 years in analytical biology, immunolabelling, affinity targeting, and biomolecular purification [2–5]. More recently, this technology has been applied in bioengineering and biomedicine, notably in drug targeting [4].

Inspired by Whitesides' work, our group has produced artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis by anchoring an organometallic biotinylated catalyst inside (strept)avidin [6–9]. The biotin-(strept)avidin technology relies on the fact that derivatization of the valeric acid side chain of biotin does not interfere too significantly with the biotin-(strept)avidin affinity [1]. With the aim of performing random mutations of the (strept)avidin gene to produce selective artificial metalloenzymes, we require a convenient method to rapidly identify the functional (strept)avidin mutants from the crude cell extracts. Neither antibodies nor Coomassie blue staining fulfill these requirements.

Bayer and Wilchek [10, 11] reported that biotin stabilizes the tetrameric structure of (strept)avidin. This stabilization effect is observed at elevated temperatures and in SDS-

PAGE [11]. This thermal stabilization is currently exploited as a tool for (strept)avidin characterization [12]. In the present study, we show that this stabilization effect can be extended to a biotinylated molecule which can be readily detected by optical methods.

Biotin-4-fluorescein is a convenient, commercially available probe used to quantify the number of active sites of purified biotin-binding proteins or to estimate their concentration in complex biofluids [13]. The quantification principle of this assay is based on the (partial) fluorescence quenching of biotin-4-fluorescein upon incorporation in (strept)avidin. In this work, we determine the thermal stabilization extent of the tetrameric structure of streptavidin, complexed with biotin-4-fluorescein. The biotin-4-fluorescein streptavidin adduct is detectable using a UV transilluminator and a comparison with Coomassie blue staining is made to determine the detection limits of both techniques. We apply the biotin-4-fluorescein on bacterial extracts of *Escherichia coli* expressing different streptavidin mutants and analyze these extracts in nondenaturing SDS-PAGE. We show that the presence of a fluorescent band in the gel, exposed to UV light, is correlated with the functionality of the mutants.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Chemicals and media were purchased from Acros-Brunswick (Basel, Switzerland), Sigma, Fluka (Buchs, Switzerland), or Gibco-Invitrogen (Basel, Switzerland). The 2-iminobiotin-agarose was provided by Affiland (Ans-Liège, Belgium). SDS-PAGE analysis was carried out with

Correspondence: Professor Thomas R. Ward, Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Rue Emile Argand 11, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland
E-mail: thomas.ward@unine.ch
Fax: +41-32-718-2511

Abbreviations: IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; LB, Luria broth; RT, room temperature

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Bio-Rad equipment (Bio-Rad, Reinach, Switzerland) [14]. The molecular mass of the expressed streptavidin mutants was determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) (VG platform mass spectrometer, Micromass instruments, Manchester, UK). The functionality of the recombinant proteins was assessed by fluorimetric titration using biotin-4-fluorescein (Molecular Probes – Juro, Luzern, Switzerland) [13].

2.2 Production of recombinant streptavidin

Heat-shock competent BL21(DE3)pLysS *E. coli* strain (Novagen-Juro, Luzern, Switzerland) were transformed by pET11b-SAV plasmid containing a gene encoding for recombinant streptavidin fused with the T7-tag [15–18]. Transformed bacteria were plated on Luria broth (LB) dishes [19] containing ampicilline (60 µg/mL), chloramphenicol (34 µg/mL) and glucose (1% w/v), and further incubated overnight at 37°C. The culture medium (150 mL total, 20 g/L bactotryptone, 2 g/L Na₂HPO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 8 g/L NaCl, 15 g/L bacto yeast extract) containing ampicilline (60 µg/mL), chloramphenicol (34 µg/mL), and glucose (1% w/v) were inoculated with a single colony. This preculture was incubated overnight on an orbital shaker (37°C, 230 rpm). High-cell-density fermentation was performed in a 15 L fermentor. The culture medium (10 L) containing ampicilline (60 µg/mL), chloramphenicol (34 µg/mL), and glucose (0.4% w/v), was inoculated with the whole preculture. The cells were grown at 37°C until an OD₆₀₀ ~ 1.4–1.6 was reached. Then, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added (final concentration, 0.4 mM). After 3 h induction, the cells were harvested (centrifugation at 3600 × g, 10 min, 4°C). The pellet was washed with Tris-suspension buffer (50 mL, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.02% w/v sodium azide, 10 mM MgCl₂) and recentrifuged (3600 × g, 10 min, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was frozen at –80°C until purification.

2.3 Protein purification

The pellet was thawed and resuspended in Tris-suspension buffer (50 mL). Lyophilized DNase I (5 mg; Roche, Rotkreuz, Switzerland) was added and incubated at 25°C until total degradation of nucleic acids. The volume of resuspension was completed with 6 M guanidium hydrochloride pH 1.5 (final volume, 400 mL) and the sample was dialyzed against the same solution to fully denature the protein (24 h, room temperature (RT)). Two consecutive dialyses were performed (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, followed by 50 mM Na₂CO₃, pH 9.8, 0.5 M NaCl) to renature the streptavidin and to prepare the proteic extract for affinity chromatography. The proteic extract was then centrifuged

(20 000 × g, 30 min, 4°C), the pellet was washed with the above carbonate buffer (100 mL) and recentrifuged in the same conditions. The supernatant was filtered (0.45 µm filter) and applied on a 2-aminobiotin agarose column equilibrated at pH 9.8 (50 mM Na₂CO₃, 0.5 M NaCl). Pure streptavidin was eluted with acetic acid (0.1 M pH 2.9), immediately dialyzed against the Tris-buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 24 h, 4°C), against distilled water and finally against bidistilled water. Following a final filtration (0.22 µm filter), the purified protein was frozen at –80°C, lyophilized, and stored at 4°C until use. The molecular weight of the purified protein was assessed by ESI-MS.

2.4 Site-directed mutagenesis

The streptavidin mutants' genes were obtained using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The PCR reaction was performed in the presence of DMSO (5%). The cycle conditions were: initial denaturation (94°C, 5 min), followed by 16 cycles of 1 min at 94°C; 1 min at 65°C; 15 min at 68°C. The final extension was performed at 68°C for 1 h.

After analysis, the template (nonmutated plasmid) was digested by *DpnI* (1 h at 37°C). An aliquot was used to transform the XL1-blue *E. coli* strain. Plasmids were extracted from bacteria using Wizard[®]Plus Miniprep System (Promega-Catalys, Wallisellen, Switzerland) and were sequenced by Synergene (Schlieren, Switzerland).

2.5 Minicultures of streptavidin mutants

Heat-shock competent BL21(DE3)pLysS *E. coli* strain (Novagen – Juro) was transformed by wild-type, empty or mutant plasmids and plated on LB dishes containing ampicilline (60 µg/mL), chloramphenicol (34 µg/mL), and glucose (1% w/v), and further incubated overnight (37°C). The culture medium (1 mL) containing the antibiotics and glucose in the same proportions was inoculated with a single colony and incubated overnight at 37°C. This preculture (80 µL) was used to inoculate the culture medium (4 mL) containing antibiotics in same proportions and glucose (0.4% w/v) in 50 mL falcon tubes. After 3 h of incubation at 37°C under orbital shaking, IPTG was added (final concentration, 0.4 mM). The bacteria were grown for 2 h and centrifuged (5 min, 5000 × g). The culture medium was removed and the pellet was stored at –20°C until use.

2.6 Nondenaturing and denaturing SDS-PAGE

Each experiment was performed in 16% acrylamide-bisacrylamide separating gels. The stacking gels contained 5% of acrylamide-bisacrylamide. The denatur-

ing conditions refer to heating the samples in the presence of a denaturing loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% w/v SDS, 2% v/v β -mercaptoethanol, 10% w/v sucrose, 0.006% w/v bromophenol blue). The nondenaturing conditions refer to heating the samples without the loading buffer. Following this treatment, the nondenaturing loading buffer (same formulation as above except for SDS and β -mercaptoethanol) was added prior to loading the samples in the gels.

2.7 Heat stability experiments

The purified streptavidin (12 μ g) was combined with biotin-4-fluorescein (1 μ L of a 0.6 mM stock solution) and incubated under gentle stirring (15 min, RT) to ensure complete binding of the biotinylated compound. The samples were then incubated at the selected temperature for 15 min and were then loaded in SDS-PAGE. Following the migration, the gel was stained by Coomassie Brilliant Blue [19].

2.8 Determination of the detection limit of streptavidin with biotin-4-fluorescein

A solution of purified wild-type streptavidin (10 mg/mL) was combined with biotin-4-fluorescein (1 μ L of a 0.6 mM stock solution), incubated 15 min at RT under gentle stirring, and successively diluted to obtain a concentration ranging from 10 μ g to 20 ng (in 15 μ L). The nondenaturing loading buffer was added and the protein was loaded on SDS-PAGE. After migration, the gel was immediately analyzed by UV exposition in a transilluminator. For comparison, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

2.9 Analysis of the minicultures

The cell pellets were thawed and resuspended in the Tris-suspension buffer (600 μ L) containing DNase I (1 μ L of a stock solution at 1 mg/mL), and incubated until the nucleic acids were thoroughly digested. The samples were centrifuged (5 min, 16 000 \times g, RT) and the supernatants were transferred in to a new tube. The supernatants (12 μ L) were combined with biotin-4-fluorescein (1 μ L of 0.6 mM) and equilibrated under gentle stirring (15 min, RT). The nondenaturing loading buffer was then added and the samples were loaded in SDS-PAGE. Revealing was first performed by UV exposition and then by Coomassie Brilliant Blue staining.

3 Results and discussion

3.1 Production and mutation of recombinant streptavidin

Using the protocol described above, we routinely produce wild-type and mutant streptavidin at high concentration levels (up to 200 mg of protein per liter cell culture) in *Escherichia coli*. The DNA sequencing and mass spectral analysis of the protein unambiguously confirm the gene sequence and the molecular weight of the corresponding purified protein [16].

3.2 Stabilization of streptavidin by biotin-4-fluorescein in denaturing and nondenaturing SDS-PAGE

As biotin is not readily detectable under UV-visible illumination, we sought for biotinylated molecules which can be revealed by this simple procedure [11]. For this purpose, we tested the biotinylated chromophore biotin-4-fluorescein (Fig. 1). Figure 2A depicts the behavior of wild-type streptavidin in nondenaturing SDS-PAGE. The protein appears as a tetramer with a small quantity of oligotetramers at low temperatures. At 72°C, the oligotetramers start to disappear with the concomitant appearance of monomers (and dimers to a small extent). The presence of SDS during the heat-denaturation contributes to decrease the denaturation temperature to 63°C (Fig. 2B).

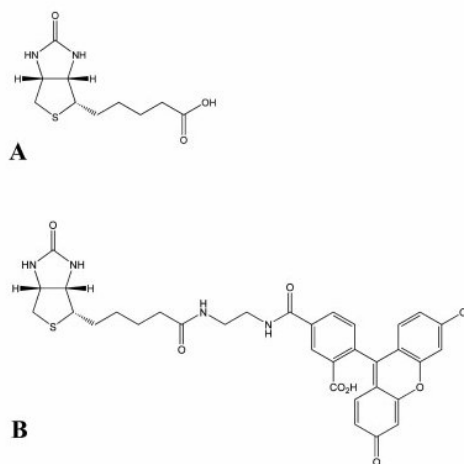


Figure 1. Structure of (A) (+)-biotin and (B) biotin-4-fluorescein.

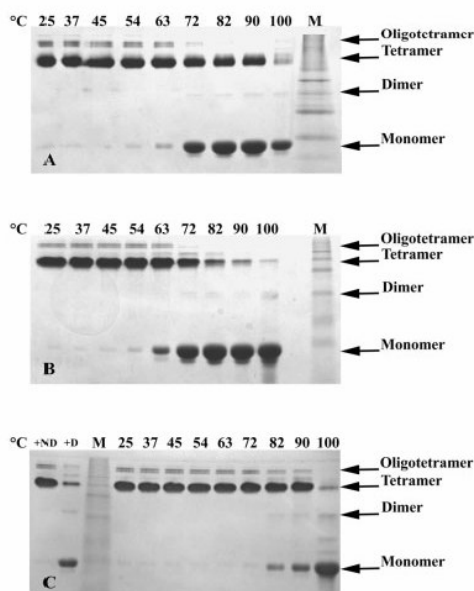


Figure 2. SDS-PAGE of (A) apo-streptavidin under non-denaturing conditions, (B) apo-streptavidin under denaturing conditions, and (C) streptavidin complexed with biotin-4-fluorescein under non-denaturing conditions exposed to increasing temperatures. The proteins were incubated 15 min at RT with or without biotin-4-fluorescein and heated at the indicated temperature for 15 min. M, BioRad Prestained Protein Marker Broad Range; +ND, nondenatured apostreptavidin; +D, denatured apostreptavidin. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

As shown by Wilchek and co-workers, the presence of biotin stabilizes the tetrameric form of streptavidin [11]: the tetramer denaturation occurs above 100 °C. The same trend is observed with biotin-4-fluorescein (Fig. 2C), but the tetramer to monomer transition appears at lower temperatures (*i.e.*, 72 °C in the presence of SDS and 82 °C under non-denaturing conditions).

3.3 Comparison of the detection limit of the protein by Coomassie blue staining and by biotin-4-fluorescein under non-denaturing conditions

In order to detect streptavidin in SDS-PAGE using an UV transilluminator, we exploit the biotin-4-fluorescein fluorescent properties ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). Figure 3 presents a comparison between the fluorescence detect-

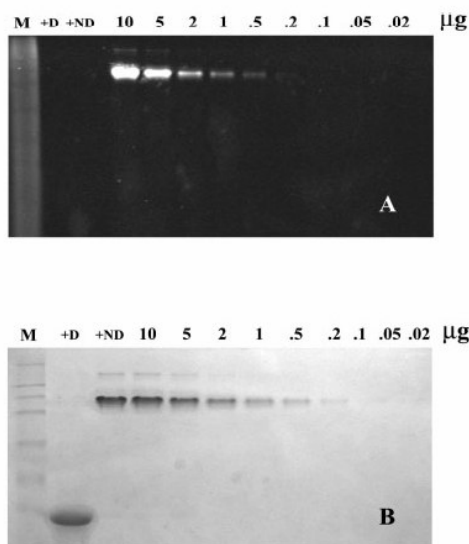


Figure 3. Comparison of the detection limit of streptavidin complexed with biotin-4-fluorescein in non-denaturing SDS-PAGE, by fluorescence and Coomassie blue staining. Decreasing amounts of the biotin-4-fluorescein streptavidin adduct were incubated 15 min at RT and loaded in the SDS-PAGE. The same gel was analyzed in UV transilluminator (A) and then stained with Coomassie Blue (B).

ed upon UV transillumination (Fig. 3A) and Coomassie blue staining (Fig. 3B) of samples with decreasing quantities of purified streptavidin containing biotin-4-fluorescein, loaded in an SDS-PAGE. In both cases, the streptavidin appears as a tetramer with small amounts of oligotetramer. The presence of a fluorescence signal under the UV transilluminator clearly shows that biotin-4-fluorescein remains bound to streptavidin during migration on the gel. As can be judged from Fig. 3, the detection limit for both methods is comparable.

Upon incorporation in (strept)avidin, the fluorescence of biotin-4-fluorescein is partially quenched [13]. However, sufficient fluorescence is maintained to allow the detection of the biotin-4-fluorescein streptavidin adduct in the gel without any further time-consuming manipulation after electrophoresis. In contrast with Coomassie blue staining or Western blotting, this detection provides a functional screen for the biotin-binding activity. These results suggest that the incorporation of biotin-4-fluorescein does not induce any significant shift in the position of the bands corresponding to the tetramer (Fig. 3B, lanes +ND and 10 µg). As molecular weight markers cannot be detected using UV-transillumination, we rely on the use of

purified functional wild-type streptavidin, complexed with biotin-4-fluorescein as positive size marker (Fig. 3B, lanes + ND and 10 μ g).

3.4 Detection of functional streptavidin mutants in bacterial extract

The biotin-binding activity of streptavidin present in complex biofluids is detectable exploiting the fluorescence of biotin-4-fluorescein [13]. We adapted this protocol to SDS-PAGE conditions as it can readily be fitted to high-throughput screening of DNA-shuffled mutants. For this purpose, biotin-4-fluorescein was added to bacterial extracts expressing four different streptavidin isoforms: wild-type, V47G, K80G, and N81P. Each mutant displays different characteristics compared to the wild-type protein. The V47G mutant is a functional protein which proved difficult to quantify in a cuvette using the biotin-4-fluorescein protocol (Fig. 4) [13]. However, it is readily purified by affinity chromatography on iminobiotin, suggesting that this mutant indeed has a strong affinity for (imino)biotin. The residue V47 is located in loop 3,4 close to the biotin-binding site. Its backbone amide has an H-bonding interaction with S45 which is in contact with biotin [20]. The production of N81P proved problematic as it was expressed exclusively in the form of inclusion bodies. Residue N81 is located in loop 5,6 close to the biotin binding site. Substitution of an amino acid by a proline is known to have a profound effect on loop conformation [21]. The mutant K80G was expressed mainly as inclusion bodies but, in contrast to N81P, it can be purified by affinity chromatography and quantified using the biotin-4-fluorescein titration protocol. The K80G mutation was designed to suppress a positive charge in loop 5,6 and to introduce flexibility, thus possibly influencing the adjacent W79 which is involved in biotin-streptavidin interaction [22].

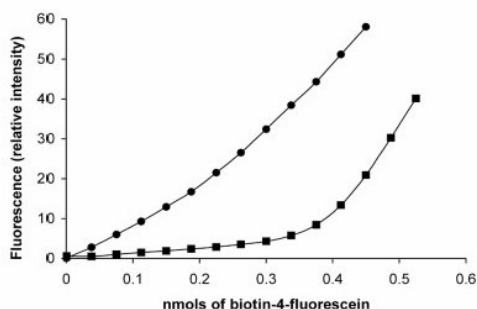


Figure 4. Biotin-binding activity assay for (■) purified recombinant wild-type streptavidin and (●) V47G mutant. The titration was performed with 50 μ L of a 2 μ M protein solution.

Figure 5 displays the SDS-PAGE as revealed by UV transilluminator, containing different mutants treated with biotin-4-fluorescein prior to loading. In lane 4, the wild-type streptavidin appears as a fluorescent band in the top of the gel, suggesting the presence of a tetrameric protein. As a blank, lane 5 displays the bacterial extract (treated with biotin-4-fluorescein) from a clone devoid of the streptavidin gene. No fluorescence is observed, thus demonstrating that biotin-4-fluorescein does not interact with other proteins or bacterial fragments. The streptavidin mutant V47G displays the same pattern as wild-type streptavidin (lane 6), suggesting that indeed the mutant is functional. This observation, combined with the fact that the titration protocol is not applicable to this mutant, suggests that biotin-4-fluorescein is indeed incorporated within V47G but its fluorescence is not quenched (Fig. 4). The inability of N81P to bind biotin derivatives is confirmed as no band appears in lane 7. This observation suggests that the inactivity of the mutant is due to misfolding. Although not functional, this mutant is revealed by Western blot. In lane 8, the mutant K80G exhibits a retarded migration compared to the other proteins with similar molecular weight. This migration pattern was further confirmed using purified K80G (lane 9), thus excluding an effect due to bacterial fragments. Biotin-4-fluorescein applied to a protein extract from *E. coli* expressing streptavidin mutants confirms that this fluorophore is a useful tool that allows to quickly assess the biotin-binding properties of streptavidin mutants prior to large-scale production. Moreover, no interference with other proteins or other cellular fragments is observed.

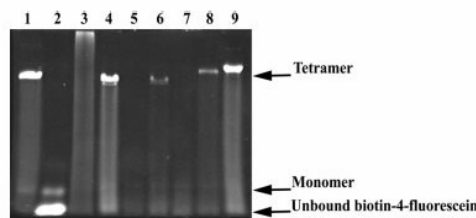


Figure 5. UV revealing of biotin-4-fluorescein streptavidin-mutants addsucts present in bacterial extracts. Biotin-4-fluorescein (1 μ L of a 0.6 mM solution) was applied to the *E. coli* soluble extract. Samples were equilibrated with gentle stirring during 15 min and loaded in SDS-PAGE (nondenaturing conditions). Lanes 1 and 2, non-denatured and denatured purified wild-type streptavidin; lane 3, BioRad Prestained Protein Marker Broad Range; lanes 4–8, bacterial extracts of *E. coli* transformed with wild-type plasmid (4), empty plasmid (5), V47G mutant (6), N81P (7), and K80G (8); lane 9, purified K80G mutant.

4 Concluding remarks

Biotin has long been known to favor the folding of (strept)avidin under various denaturing conditions provided by (i) extreme pH values, (ii) high concentrations of urea or of guanidium hydrochloride, (iii) detergents, and (iv) high temperatures [23, 24]. The results presented herein shed light on the stabilizing effect of a biotinylated chromophore towards thermal- and detergent-assisted denaturation of streptavidin as reflected by the electrophoretic behavior of the streptavidin in SDS-PAGE. Most importantly, the biotin-4-fluorescein assay presented here allows to assess the biotin-binding properties and to roughly estimate the amount of functional streptavidin in a bacterial extract without any interference caused by the presence of cellular fragments. The behavior of four representative streptavidin isoforms is presented, but this technique was applied to over 20 mutants. The semiquantitative results, concerning the state of aggregation and the activity, are complementary to those obtained with other time-consuming detection protocols, such as Western blot and titration of biotin-binding sites using a spectrofluorimeter. We are currently using this protocol towards the development of DNA-shuffled streptavidin genes.

This work was funded by the Swiss National Science Foundation FN 620–57866.99 and FN 4047–05532, CERC3 FN 20C321–1010 711/1 and the Canton of Neuchâtel. We thank C. R. Cantor for the streptavidin gene, P. Schürmann, J.-M. Neuhaus (University of Neuchâtel), and P. Arosio (University of Milano) for their help in setting up the streptavidin.

Received June 8, 2004

5 References

- [1] Wilchek, M., Bayer, E. A., *Methods Enzymol.* 1990, 184, 5–13.
- [2] Graf, R., Friedl, P., *Anal. Biochem.* 1999, 273, 291–297.
- [3] Nakamura, M., Tsumoto, K., Ishimura, K., Kumagai, I., *Anal. Biochem.* 2002, 304, 231–235.
- [4] Wilchek, M., Bayer, E. A., *Biomol. Eng.* 1999, 16, 1–4.
- [5] Wilchek, M., Bayer, E. A., *Anal. Biochem.* 1988, 171, 1–32.
- [6] Wilson, M. E., Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100, 306–307.
- [7] Lin, C. C., Lin, C. W., Chan, A. C. S., *Tetrahedron Asym.* 1999, 10, 1887–1893.
- [8] Collot, J., Gradinaru, J., Humbert, N., Skander, M., Zocchi, A., Ward, T. R., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9030–9031.
- [9] Skander, M., Humbert, N., Collot, J., Gradinaru, J., Klein, G., Loosli, A., Sauser, J., Zocchi, A., Gilardoni, F., Ward, T. W., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14411–14418.
- [10] Williams, G. J., Domann, S., Nelson, A., Berry, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 3143–3148.
- [11] Bayer, E. A., Ehrlich-Rogozinski, S., Wilchek, M., *Electrophoresis* 1996, 17, 1319–1324.
- [12] Hytonen, V. P., Laitinen, O. H., Grapputo, A., Kettunen, A., Savolainen, J., Kalkkinen, N., Marttila, A. T., Nordlund, H. R., Nyholm, T. K., Paganelli, G., Kulomaa, M. S., *Biochem. J.* 2003, 372, 219–225.
- [13] Kada, G., Falk, H., Gruber, H. J., *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1427, 33–43.
- [14] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [15] Zocchi, A., Humbert, N., Berta, T., Ward, T. R., *Chimia* 2003, 57, 589–592.
- [16] Gallizia, A., de Lalla, C., Nardone, E., Santambrogio, P., Brandazza, A., Sidoli, A., Arosio, P., *Prot. Expr. Purif.* 1998, 14, 192–196.
- [17] Sano, T., Cantor, C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 142–146.
- [18] Zocchi, A., Jobe, A. M., Neuhaus, J. M., Ward, T. R., *Prot. Expr. Purif.* 2003, 32, 167–174.
- [19] Sambrook, J., Russel, D. W., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY 2001.
- [20] Klumb, L. A., Chu, V., Stayton, P. S., *Biochemistry* 1998, 37, 7657–7663.
- [21] Chou, P. Y., Fasman, G. D., *Biochemistry* 1974, 13, 222–245.
- [22] Freitag, S., Le Trong, I., Chilkoti, A., Klumb, L. A., Stayton, P. S., Stenkamp, R. E., *J. Mol. Biol.* 1998, 279, 211–221.
- [23] Gonzalez, M., Argarana, C. E., Fidelio, G. D., *Biomol. Eng.* 1999, 16, 67–72.
- [24] Green, N. M., *Adv. Prot. Chem.* 1975, 29, 85–133.