

Diss. ETH Nr. 13642

**A strategy for the isolation of catalytic activities
from repertoires of enzymes displayed on phage**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

Presented by

Salvatore Demartis
Dottore in Chimica - University of Sassari
born May 15, 1969
from Sassari, Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Dario Neri, examiner
Prof. Dr. Pier Luigi Luisi, co-examiner
Prof. Dr. Ugo Azzena, co-examiner

Zürich, April 2000

1. SUMMARY

We have aimed at developing a general methodology for the isolation of enzymatic activities from large repertoires of protein displayed on the surface of filamentous phage. When selecting for protein binders by phage display, phage particles with suitable specificities are physically isolated by affinity capture and amplified by bacterial infection. Selection for catalysis mediated by enzymes displayed on filamentous phage is more difficult, as reaction products (which represent the biochemical memory of the reaction catalysed by the phage particle) diffuse away after the reaction is complete. We reasoned that if we were able to anchor the reaction products on the phage surface, the catalytically active phages could then be physically isolated using specific anti-product affinity reagents.

We achieve the conditional anchoring of reaction substrates and products on phage by displaying enzyme-calmodulin chimeric proteins on filamentous phage as gene III fusions. Such phage particles can be targeted in a stable fashion ($k_{\text{off}} < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) by chemical derivatives of a calmodulin-binding peptide. The peptide-phage complexes are stable in purification procedures such as capture with magnetic beads and polyethylene glycol precipitation, and can be conditionally dissociated by addition of calcium chelators as EDTA.

Glutathione-S-transferase, biotin ligase and two endopeptidases belonging to the serine protease family, submut (mutant of subtilisin) and trypsin mutant H57A, were used in model selection experiments to demonstrate that it is possible to isolate catalytic activities from calmodulin-tagged enzymes displayed on filamentous phage. After one round of selection, enrichment factors ranging between 30-800 (biotin ligase) and 1000 (trypsin mutant H57A) were obtained. Furthermore, a library of trypsin mutants created randomizing four position in the H57A gene allowed us to isolate, after three rounds of selection, several clones that presented a consensus sequence in the randomized positions. This consensus sequence was not observed in a same number of clones screened from the unselected library.

1. RIASSUNTO

Con questo lavoro abbiamo cercato di sviluppare una metodologia generale per l'isolamento di enzimi con nuove attività catalitiche da librerie di enzimi mutati legati alla superficie dei batteriofagi filamentosi. Questa tecnica (phage display) viene sfruttata, ad esempio, per l'isolamento di anticorpi; questi ultimi si legano stabilmente ad un antigene ancorato ad una matrice, ed il fago così isolato può essere amplificato tramite infezione batterica.

La selezione di enzimi con la tecnica del "phage display" presenta delle difficoltà in quanto il prodotto di reazione, che rappresenta la memoria biochimica del catalizzatore, si allontana dopo che la reazione è conclusa impedendo l'isolamento del fago recante l'enzima attivo.

Abbiamo così ipotizzato che se avessimo avuto la possibilità di ancorare il prodotto di reazione alla superficie del fago, i fagi cataliticamente attivi sarebbero stati isolati usando un reagente di affinità anti-prodotto. La specificità di questo anti-prodotto eviterebbe la cattura di substrati non reagiti.

Abbiamo ottenuto la formazione di un legame non covalente tra il reagente (e quindi con l'eventuale prodotto) ed il fago esprimendo la calmodulina tra l'enzima e la superficie del batteriofago. La calmodulina, attiva solo in presenza di calcio, può legare in modo stabile un particolare peptide ($k_{\text{off}} < 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). L'estremità di questo peptide può essere modificata chimicamente in modo da legare covalentemente il substrato di reazione. I complessi fago-peptide, stabili durante le procedure di purificazione, durante la cattura su supporti magnetici così come durante la precipitazione in glicole polietilenico possono essere dissociati tramite aggiunta di un chelante del calcio come l'EDTA.

Enzimi come la glutatione S-transferasi, la biotina ligasi, e due endopeptidasi [submut, (mutante della subtilisina) e il mutante della tripsina H57A] sono stati usati in selezioni modello per dimostrare la validità della metodologia.

Dopo un solo ciclo di selezione si sono ottenuti arricchimenti che vanno da un fattore 30-800 (biotina ligasi) ad un fattore 1000 (mutante della tripsina H57A).

E' stata quindi costruita una libreria di mutanti della tripsina modificando in maniera casuale 4 posizioni. Dopo 3 cicli di selezione sono stati isolati diversi cloni che presentano una sequenza omologa nelle posizioni mutate. La stessa omologia non è stata riscontrata in uno stesso numero di cloni isolati dalla libreria prima dei cicli di selezione.