

Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei Enzymen durch Protein-Engineering**

Von Alan R. Fersht*, Jian-Ping Shi, Anthony J. Wilkinson, David M. Blow,
Paul Carter, Mary M. Y. Waye und Greg P. Winter

Die Beziehung zwischen Struktur und Aktivität von Enzymen kann heute erstmals durch systematische Veränderung der Proteinstruktur analysiert werden. Die rapide Entwicklung der DNA-Rekombinations-Techniken einerseits und die Erarbeitung leistungsfähiger Methoden zur chemischen Synthese von DNA-Fragmenten andererseits ermöglichen es, auf einfache Weise Proteine durch spezifische Mutation der entsprechenden Gene gezielt zu verändern. Die kinetische Analyse von Mutanten-Enzymen und die durch hochauflösende Röntgen-Kristallographie erhaltenen Befunde lassen direkt Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen Struktur und Funktion zu. Insbesondere können jetzt Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und deren Bedeutung für Katalyse und Spezifität detailliert untersucht werden. Den gezielten Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren eines Proteins – eine „ortsspezifische Mutagenese“ („site-directed mutagenesis“) führten wir exemplarisch zur Analyse der Struktur-Funktions-Beziehung an der Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus stearothermophilus* durch; dabei konzentrierten wir uns auf das Studium der Rolle der Wasserstoffbrückenbindungen für Substratspezifität und Katalyse. Die Bindung von Tyrosin und ATP kann nur unter Berücksichtigung der Austauschreaktion mit den Wassermolekülen der Hydrathülle verstanden werden. Diese Tatsache und die Kenntnis der detaillierten Struktur ermöglichten es uns, ein Enzym mit erhöhter Substrataffinität maßzuschneidern. Durch ein solches „Protein-Engineering“ können Enzyme mit neuen Spezifitäten, Aktivitäten und Struktureigenschaften gewonnen und direkte Einblicke in die Art und Weise der Enzymkatalyse erhalten werden. Wir fanden beispielsweise, daß die Katalyse der Bildung von Tyr-AMP aus Tyr und ATP hauptsächlich auf elektrostatischen Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen beruht, die im Übergangszustand stärker als im Grundzustand sind – ein „strain“-Mechanismus also und weniger eine Säure-Base-Katalyse oder eine kovalente Katalyse.

[*] Prof. A. R. Fersht, J.-P. Shi, A. J. Wilkinson
Department of Chemistry, Imperial College of Science and Technology,
London SW7 2AY (Großbritannien)

Prof. D. M. Blow
Department of Physics, Imperial College of Science and Technology,
London SW7 2AZ (Großbritannien)

P. Carter, Dr. M. M. Y. Waye, Dr. G. P. Winter
Laboratory of Molecular Biology, MRC Centre,
Hills Road, Cambridge CB2 2QH (Großbritannien)

[**] Nach einem Vortrag beim Dritten Europäischen Symposium über Organische Chemie (ESOC III, 5.–9. September 1983). Diese Arbeit wurde vom Medical Research Council (Großbritannien) unterstützt.

1. Einleitung

Die Enzymforschung wurde durch zwei wichtige Entwicklungen revolutioniert: die Röntgen-Kristallographie, mit der die dreidimensionale Struktur von Proteinen bestimmt werden kann, und die Gentechnologie, die die Produktion großer Mengen von sonst schwer zugänglichen Enzymen ermöglicht. Beide trugen dazu bei, daß heute Enzyme mit neuen Eigenschaften durch „Protein-Engineering“ gezielt hergestellt werden können.

Zwar kann schon seit ca. zwanzig Jahren durch Protein-Kristallographie die zur Enzymmodifizierung notwendige Strukturinformation gewonnen werden, doch gab es lange keine Möglichkeit, Strukturen gezielt zu verändern und so zu neuen Enzymen zu gelangen. Obwohl es vereinzelt Beispiele für eine de-novo-Synthese von Enzymen durch klassische Peptidsynthese gibt, ist diese Methode zu aufwendig, um von allgemeinem Wert für die Produktion neuer Enzyme zu sein. Außerdem falten sich synthetische Proteine oft nicht zu ihrer nativen Struktur. Die Natur zu kopieren und mit DNA zu arbeiten schien der einzig logische Weg zur Lösung dieses Problems. DNA ist das natürliche genetische Material und kann zur Proteinsynthese unbegrenzt eingesetzt werden; die einfache robuste Struktur von DNA verursacht keine Faltungsprobleme; DNA-Mutationen können ebenso wie die Rekombination von DNA-Fragmenten in vitro durchgeführt werden; wie in der Evolution entstehen neue Gene, die neue Strukturen codieren. Dieser Weg wird heute beschritten. Da die Proteinfaltung noch nicht vollständig verstanden wird^[32], ist es nicht möglich, neue Enzyme de novo zu konstruieren, aber es können Varianten schon existierender Strukturen durch kontrollierte Mutagenese der zugehörigen Gene hergestellt werden. In diesem Beitrag berichten wir über Ergebnisse, die durch derartige Experimente mit einem speziellen Enzym erhalten wurden; die Fülle an Informationen, die so über Enzyme und Enzymkatalyse gewonnen wurden, demonstrieren die Leistungsfähigkeit des Protein-Engineering.

2. Oligodesoxynucleotid-gesteuerte Mutagenese

Zur Erzeugung spezifischer Mutationen in DNA benutzt man heute gewöhnlich ein chemisch synthetisiertes DNA-Fragment, durch das die Mutation in ein Gen eingeschleust wird – eine Oligodesoxynucleotid-gesteuerte Mutagenese. Das DNA-Fragment enthält das Codon (oder das komplementäre Codon) für die Aminosäure, die im nativen Protein eine bestimmte Aminosäure ersetzen soll. Das Prinzip der Methode wurde bereits 1973 eingeführt^[11]; eine praktische Anwendung ermöglichte dann die Bestimmung der DNA-Sequenz eines Bakteriophagen (ΦX174) in Sangers Laboratorium in den Jahren 1976–1978^[12]. Schon 1978 wurde durch Oligodesoxynucleotid-gesteuerte Mutagenese eine Punktmutation in den Bakteriophagen ΦX174 eingeführt^[13,4]; seitdem wurde die Methode sehr verfeinert^[5]. Ende 1982 wurde in drei Publikationen über die ortsspezifische Mutagenese von Strukturgenen von Enzymen mit bekanntem Mechanismus berichtet^[6–8]. Von einem dieser Enzyme – der Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus stearothermophilus* – war die dreidimensionale Struktur bekannt^[6]; dies ermöglichte eine detaillierte Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehung.

In Abbildung 1 ist die Methode zur Einführung von Mutationen in die Tyrosyl-tRNA-Synthetase exemplarisch beschrieben^[6,9]. Als Vektor für das Gen, welches das Enzym codiert, wurde der Bakteriophage M13 verwendet (das ist ein Bakteriophage mit Einzelstrang-DNA und deshalb ideal für die im folgenden beschriebenen Manipulationen

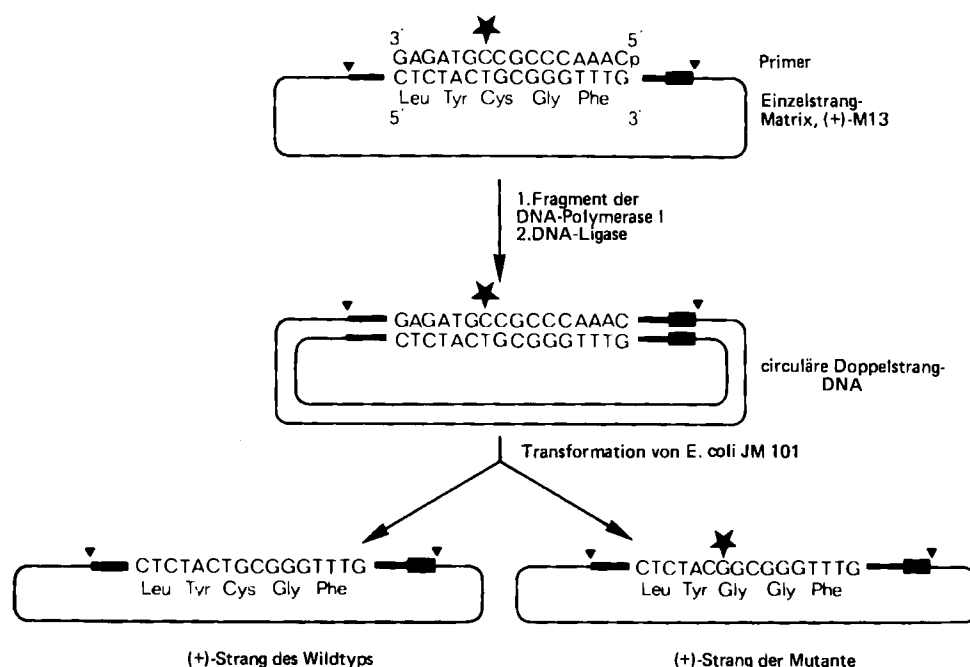


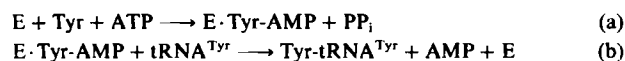
Abb. 1. Prinzip der Oligodesoxynucleotid-gesteuerten Mutagenese. Der „mismatch“-Primer ist so konstruiert, daß am Ende des Prozesses ein Codon für Cystein (TGC) gegen eines für Glycin (GGC) eingetauscht ist. Das zu mutierende Gen muß als Einzelstrang-DNA vorliegen, bevor es mit dem Primer hybridisiert werden kann. Um dies für das Gen der Tyrosyl-tRNA-Synthetase zu erreichen, haben wir es vom Plasmid pBR322 in den Bakteriophagen M13 „subkloniert“. Das Genom dieses fadenförmigen Bakteriophagen, der seinen Wirt nicht zerstört, besteht aus einer circulären, einsträngigen DNA. ▼ markieren die Enden des inserierten DNA-Fragments, die fette Linie steht für die *B. stearothermophilus*-DNA und ■ steht für ein DNA-Stück aus pBR322. Während der Replikation in *E. coli* durchläuft der Phage ein doppelsträngiges Stadium (RF-Stadium). Die Subklonierung wird im doppelsträngigen, die Mutation im einsträngigen Stadium vorgenommen. Ein mutiertes Gen erhält man durch Kopieren der DNA des Bakteriophagen mit dem klonierten Tyrosyl-tRNA-Synthetase-Gen unter Verwendung von DNA-Polymerase, wobei am 3'-Ende des mismatch-Primers begonnen wird; mit DNA-Ligase wird der neue DNA-Strang mit dem 5'-Ende des Primers verknüpft. Der resultierende Heteroduplex wird in *E. coli* (Stamm JM101) eingeschleust und liefert Zellklone; einige enthalten den Bakteriophagen mit dem Gen für das Wildtyp-Enzym, andere den mit dem Gen für die Mutante. Die Klone lassen sich wie im Text beschrieben sortieren. Sie produzieren große Mengen Tyrosyl-tRNA-Synthetase. Weitere Details siehe [6, 9].

geeignet). Es wurde ein kurzes Oligonucleotid (12–20 Reste) synthetisiert, das der DNA, in die die Mutation eingeführt werden soll, bis auf einen Rest (in Abb. 1 mit Stern markiert) komplementär ist; dieser Rest wurde so gewählt, daß aus dem Codon der „Zielamino-säure“ das der gewünschten Aminosäure wurde. Nach Hybridisierung des Oligodesoxynucleotids mit der Einzelstrang-DNA des Bakteriophagen diente es als Primer zur Replikation durch eine DNA-Polymerase; die DNA-Ligase schloß dann den neuen Strang, so daß eine Heteroduplex aus Wildtyp- und Mutanten-DNA entstand. Als Wirtszellen dienten *Escherichia coli*-Bakterien, die durch diese Heteroduplexe transformiert wurden; sie lieferten Klone, die entweder den mutierten oder den Wildtyp-Vektor enthielten. Mutanten-Klone konnten durch einen Hybridisierungsassay selektiert werden; dabei wurde der ^{32}P -markierte mutagene Primer eingesetzt, der bevorzugt an die Mutanten-DNA bindet^[10]. Der Anteil der Mutanten-Klone schwankte zwischen 1% und 50%. Die Mutanten-Klone produzierten die Mutanten-Enzyme mit hoher Ausbeute.

Die Oligodesoxynucleotid-gesteuerte Mutagenese ermöglicht inzwischen auch die Herstellung von Deletions- und Insertions-Mutanten. Beispielsweise bildet eine „Mutator-DNA“ mit einem zusätzlichen Codon in ihrer Mitte eine Schleife aus den drei überzähligen Basen beim Hybridisieren mit der Ziel-DNA. Nach der Replikation enthält der synthetische Strang ein Extracodon. Umgekehrt kann ein längerer Primer, z. B. ein 24-mer, synthetisiert werden, bei dem die beiden Hälften zweier nicht direkt hintereinanderliegender Genregionen komplementär sind; beim Hybridisieren des Primers mit dem Gen bildet das Zwischenstück des Gens eine Schleife, die nach der Replikation dem synthetischen Strang fehlt. Noch weiter verfeinerte Methoden zur Deletionserzeugung wurden inzwischen entwickelt^[11].

3. Die Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *B. stearothermophilus*

Das durch Oligodesoxynucleotid-gesteuerte Mutagenese am besten untersuchte Enzym ist die Tyrosyl-tRNA-Synthetase (TyrTS)^[7] aus *B. stearothermophilus*. Bis heute haben wir etwa zwanzig Mutanten mit Punktmutationen, Doppelmutationen und Deletionen hergestellt und analysiert. Dieses Enzym katalysiert die Aminoacylierung der tRNA^{Tyr} in einer Zweischnitt-Reaktion [Gl. (a) und (b)]^[12] (Tyr-AMP wird im folgenden kurz als Tyrosyladenylat bezeichnet).



Das Enzym ist ein symmetrisches Dimer ($M_r = 2 \cdot 47\,500$)^[13, 14]; seine Nucleotidsequenz wurde durch Klonierung mit dem Vektor pBR322 ermittelt^[15]. Die Struktur des Enzyms wurde Röntgen-kristallographisch mit einer Auflösung von 0.3 nm bestimmt (Abb. 2)^[16a]; die

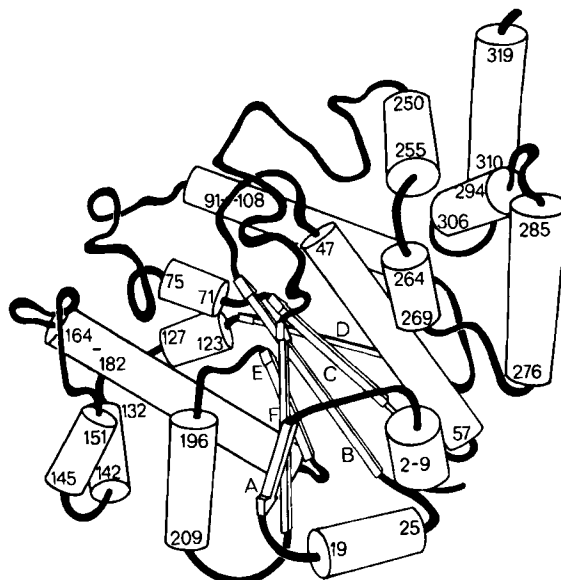


Abb. 2. Struktur einer der beiden symmetrischen Untereinheiten der Tyrosyl-tRNA-Synthetase im Kristall (schematisch). Tyrosyladenylat (siehe Abb. 3 und 4) bildet Wasserstoffbrücken mit Seitenketten der helical angeordneten Reste 47–57 und 164–182 sowie mit der β -Faltblattstruktur B.

Auflösung konnte inzwischen bis auf 0.21 nm verbessert werden^[16b]. Besonders wichtig ist, daß auch die Kristallstruktur des Tyrosyladenylat-Enzym-Komplexes bestimmt wurde^[17]; damit liegt der seltene Fall vor, daß die Wechselwirkungen eines Enzyms mit einem Substrat direkt bekannt sind (Abb. 3).

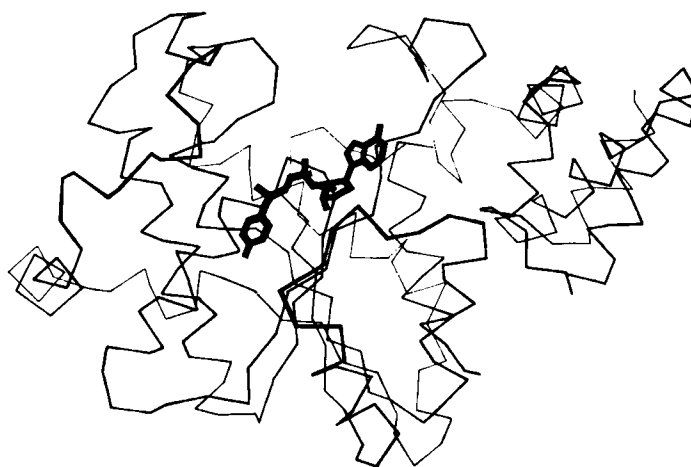


Abb. 3. Tyrosyl-tRNA-Synthetase bildet einen stabilen Komplex mit Tyr-AMP. Gibt man Tyrosin und ATP zu Kristallen des Enzyms, so springen sie erst und heilen dann wieder; es entsteht ein Intermediat, das in Abwesenheit von tRNA oder hoher Pyrophosphatkonzentration stabil ist. Das Bild zeigt das Enzymgerüst zusammen mit dem gebundenen Substrat; die Struktur wurde durch Röntgenbeugung direkt bestimmt.

Die Tyrosyl-tRNA-Synthetase ist ferner aufgrund ihrer kinetischen Eigenschaften ein ideales Enzym für Mutagenese-Untersuchungen, da reproduzierbare und genaue Messungen der Reaktionskinetiken durch Titration des aktiven Zentrums möglich sind^[18]. Die erste Teilreaktion (Aktivierung) [Gl. (a)] und die Gesamtreaktion können durch relativ einfache Verfahren verfolgt werden: die Kinetik der Aktivierungsreaktion vor Einstellung des Fließgleichgewichtes kann durch stopped-flow-Fluoreszenzmessungen

[*] Abkürzungen: TyrTS = Tyrosyl-tRNA-Synthetase; Mutanten werden folgendermaßen bezeichnet: TyrTS(Cys35-Ser35) = TyrTS, in der Cys-35 gegen Ser-35 ausgetauscht ist; k_{cat} und K_M sind die Geschwindigkeitskonstante bzw. die Michaelis-Menten-Konstante einer Enzymreaktion.

sungen erfaßt werden^[19], und der Transferschritt [Gl. (b)] wird mit Hilfe schneller Abfangreaktionen studiert. Als Dimer hat das Enzym zusätzlich interessante Eigenschaften; die beiden aktiven Zentren wechselwirken so miteinander, daß sie in Lösung nur ein Tyrosin^[20], eine tRNA-Tyr^[21,22] und ein Tyrosyladenylat^[23] fest binden.

Die Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *B. stearothermophilus* – einem thermophilen Organismus – besitzt eine weitere sehr wichtige Eigenschaft: das Enzym ist thermostabil, es verliert auch bei längerer Inkubation bei 56°C keine Aktivität; das entsprechende Enzym aus *E. coli* denaturiert hingegen unter diesen Bedingungen sehr schnell. Da die mutierte Tyrosyl-tRNA-Synthetase von Klonen in *E. coli* produziert wird, kann das native Enzym aus *E. coli* durch Erhitzen entfernt werden – vorausgesetzt, auch die Mutantenenzyme sind thermostabil. So ist es möglich, auch schwach aktive Mutanten ohne Beeinträchtigung durch das native *E. coli*-Enzym zu untersuchen.

4. Strategie zur Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Zwischen dem Ausdruck k_{kat}/K_M aus der Michaelis-Menten-Gleichung und der Bildungsenthalpie des Enzym-Substrat-Komplexes (ΔG_s) besteht eine einfache Beziehung^[24,25] [Gl. (c)]. ΔG^* ist die Aktivierungsenergie, k und h sind die Boltzmann- bzw. die Planck-Konstante.

$$RT \ln(k_{\text{kat}}/K_M) = RT \ln(kT/h) - \Delta G^* - \Delta G_s \quad (c)$$

Durch ortsspezifische Mutagenese kann ΔG_s durch Änderung von Seitenketten der Aminosäurereste, die mit dem Substrat wechselwirken, beeinflusst werden. Die Änderung von ΔG_s kann aus k_{kat}/K_M nach Gl. (c) berechnet werden; die Bedeutung der strukturellen Änderung für die Enzym-Substrat-Wechselwirkung läßt sich so abschätzen. Theoretische Betrachtungen^[24,25] zeigen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit dann am größten ist, wenn die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Übergangszustand und nicht die zwischen Enzym und Grundzustand des Substrats optimal ist – das Konzept der Übergangszustands-Stabilisierung. Wasserstoffbrückenbindungen sind besonders wichtig für die unterschiedlichen Effekte bei der Substratbindung, da deren Ausmaß sehr von den interatomaren Abständen abhängt und deswegen empfindlich auf Atombewegungen während der Umsetzung reagiert. Deshalb veränderten wir zuerst die Aminosäuren des Enzyms, die Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat bilden.

5. Die Natur der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Substrat

Die erste durch Protein-Engineering herbeigeführte Mutation eines Enzyms bekannter dreidimensionaler Struktur war der Austausch von Cys-35 gegen Ser-35 an der Tyrosin-tRNA-Synthetase; es entstand ein Enzym mit veränderter Aktivität^[6]. Cys-35 bildet möglicherweise eine Wasserstoffbrücke zur 3'-Hydroxygruppe der Ribose im Tyr-AMP (Abb. 4). Durch die Mutation wird die –SH-Gruppe gegen eine –OH-Gruppe in der Aminosäureseitenkette ersetzt. Obwohl bei einfachen intermolekularen Assoziatio-

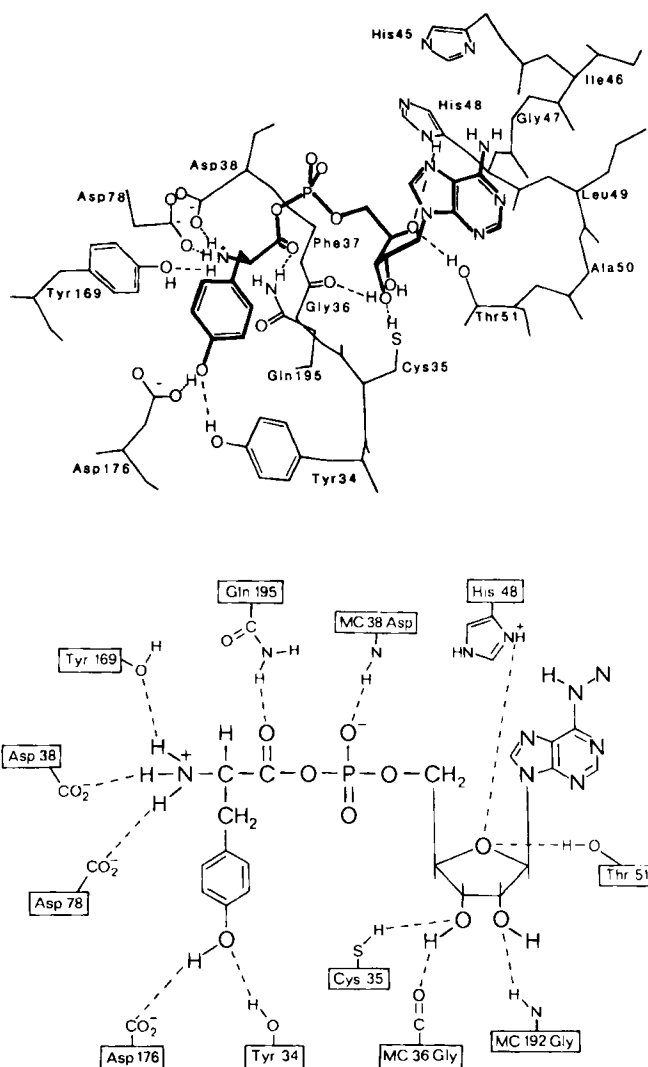


Abb. 4. Aktives Zentrum der Tyrosyl-tRNA-Synthetase mit gebundenem Tyr-AMP. Oben: Detaillierter Ausschnitt aus Abbildung 3. Unten: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr-AMP und Aminosäureresten im aktiven Zentrum. MC steht für „main chain“.

nen die absolute Stärke einer OH...O-Wasserstoffbrücke größer ist als die einer SH...S-Wasserstoffbrücke, findet man beim Vergleich von Wildtyp-TyrTS mit Mutanten-TyrTS(Cys35-Ser35) (Tabelle 1), daß das Enzym des Wildtyps eine um 1.2 kcal mol⁻¹ höhere Affinität zum Substrat ATP hat (errechnet nach Gl. (c)).

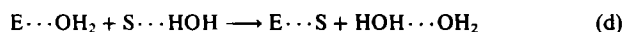
Tabelle 1. Aktivierung von Tyrosin durch TyrTS-Wildtyp und -Mutanten bei 25°C (Details siehe [9]).

Enzym	k_{kat} [s ⁻¹]	K_M (ATP) [mM]	K_M (Tyr) [μM]	k_{kat}/K_M (ATP) [s ⁻¹ M ⁻¹]
TyrTS	7.6	0.9	2.4	8400
TyrTS(Cys35-Gly35)	2.8	2.6	2.7	1120
TyrTS(Cys35-Ser35)	2.4	2.4	2.6	1000

Dieser Befund hat zwei Ursachen:

1. Nicht die absolute Stärke der Wasserstoffbrücken in einem Enzym-Substrat-Komplex bestimmt dessen Dissoziationskonstante, sondern der Energieunterschied zwischen den Wasserstoffbrücken zweier Donor/Acceptor-

Komplexe, denn sowohl das „freie“ Enzym als auch das „freie“ Substrat enthalten über Wasserstoffbrücken gebundenes Wasser [Gl. (d)]:



2. Die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen im Enzym-Substrat-Komplex ist strukturabhängig, d. h., die Donor- und die Acceptorgruppen müssen eine definierte Distanz zueinander einhalten. So ist z. B. der S-O-Abstand in $SH \cdots O$ um 0.5 nm größer als der O-O-Abstand in $OH \cdots O$. Der Austausch der SH-Gruppe des Cysteins gegen die OH-Gruppe des Serins ist energetisch ungünstig, da der O-O-Abstand im starren aktiven Zentrum für eine $OH \cdots O$ -Wechselwirkung zu groß ist^[9]. Der Vergleich von TyrTS(Cys35-Ser35) mit TyrTS(Cys35-Gly35), eine Mutante, die in dieser Position überhaupt keine Seitenkette mehr enthält, zeigt, daß die Serin-Seitenkette keinen nennenswerten Beitrag zur Substratbindung leistet, sondern die Bindung sogar schwächt.

Man kann daraus schließen, daß die Dissoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes durch eine schwache (zu lange) Wasserstoffbrückenbindung vergrößert und der k_{kat}/K_M -Wert erniedrigt wird. Hiernach stellt sich die Frage, ob die Affinität eines Enzyms für sein Substrat durch ortsspezifische Mutagenese erhöht werden kann, wenn man eine Aminosäure austauscht, die eine schwache Wasserstoffbrückenbindung ermöglicht.

6. Affinitätserhöhung des Enzyms für ATP

Vorläufige kristallographische Untersuchungen deuten auf eine lange Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr-51 und dem Tyrosyladenylat hin (Abb. 4). Obwohl alle anderen in Abbildung 4 gezeigten Seitenketten im Enzym aus *E. coli* konserviert sind, hat es in dieser Position einen Prolinrest, der keine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Substrat eingehen kann und außerdem die Sekundärstruktur in dieser Region stört. Angesichts des am Ende des vorigen Abschnitts gezogenen Schlusses tauschten wir zuerst Thr-51 gegen Ala-51 aus, um den Effekt, den die Entfernung der Wasserstoffbrückenbindung bewirkt, zu untersuchen; dann ersetzten wir Thr-51 durch Pro-51 und studierten die Wirkung dieser größeren strukturellen Änderung^[26].

Tabelle 2. Affinitätserhöhung für ATP bei der Tyrosinaktivierung durch Thr-51-Austausch bei TyrTS. Reaktion bei 25°C (Details siehe [26]).

Enzym	k_{kat} [s ⁻¹]	K_M (ATP) [mM]	K_M (Tyr) [μM]	k_{kat}/K_M (ATP) [s ⁻¹ M ⁻¹]
TyrTS	7.6	0.9	2.4	8 400
TyrTS(Thr51-Ala51)	8.6	0.54	2.0	15 900
TyrTS(Thr51-Pro51)	12.0	0.058	—	208 000

Die kinetischen Daten der Tyrosinaktivierung durch diese Mutanten zeigt Tabelle 2. K_M von TyrTS(Thr51-Ala51) ist für ATP nur etwa halb so groß wie beim Wildtyp. Die Wechselwirkung von Threonin mit dem Substrat

scheint also ausgesprochen gering zu sein. Die ortsspezifische Mutagenese erwies sich somit als gute Methode zur Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffbrückenbindungen.

Mit der Mutation vom Wildtyp zu TyrTS(Thr51-Pro51) geht ein extrem starker Anstieg des k_{kat}/K_M -Wertes einher, der seine Ursache sowohl in einer Erhöhung von k_{kat} als auch in einer Senkung von K_M (für ATP) hat. Eine einzige Punktmutation erhöht also die Enzymaktivität signifikant. Für die Biotechnologie eröffnet sich die Möglichkeit, die Aktivität von Enzymen in vitro gezielt zu beeinflussen.

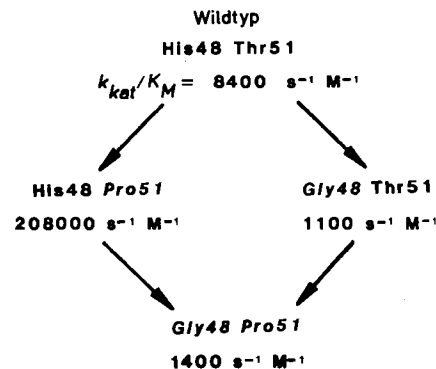


Abb. 5. Verwendung einer Doppelmutante zur Untersuchung des Einflusses struktureller Änderungen (mutierte Reste sind kursiv geschrieben). Der hohe k_{kat}/K_M -Wert der Mutante TyrTS(Thr51-Pro51) tritt nur auf, wenn His48 und Pro51 vorhanden sind. Wird erst His48 gegen Gly48 ausgetauscht (rechts) und dann Thr51 gegen Pro51, wobei die Doppelmutante TyrTS(His48-Gly48, Thr51-Pro51) entsteht (unten), so nimmt im letzten Schritt die Geschwindigkeitskonstante kaum zu.

Welche Ursache hat diese drastische Erhöhung der Affinität des Enzyms für ATP? Thr-51 ist Teil der von den Aminosäuren 47–57 gebildeten α -Helix (Abb. 2); die Einführung eines Prolins sollte die Helixstruktur zwischen Rest 47 und 50 stören. Die erhöhte Affinität könnte auf eine neu entstandene Kontaktstelle für das Substrat, auf eine verbesserte Wechselwirkung des Substrats mit einer schon existierenden Kontaktstelle oder auf eine direkte Wechselwirkung des Substrats mit dem Pyrrolidinring des Prolins zurückzuführen sein. Frühere Mutagenese-Untersuchungen hatten gezeigt, daß His-48 mit ATP eine Wasserstoffbrücke bildet, die nur einen Energiegewinn von 1.2 kcal mol⁻¹ erbringt. Wir nahmen an, daß durch Prolin das Polypeptidgerüst verformt und dadurch die Wechselwirkung von His-48 mit dem Substrat verstärkt wird. Um diese Hypothese zu beweisen, konstruierten wir die Doppelmutante TyrTS(His48, Thr51-Gly48, Pro51); sie wies annähernd dieselbe Aktivität auf wie die TyrTS(His48-Gly48)-Mutante. Der Effekt von Thr-51 muß folglich durch die Imidazolgruppe von His-48 vermittelt werden (Abb. 4). Mit Gleichung (c) läßt sich aus dem in Abbildung 5 angegebenen Zyklus berechnen, daß die Imidazolgruppe von His-48 beim Wildtyp 1.2 kcal mol⁻¹ und bei der Mutante TyrTS(Thr51-Pro51) 3 kcal/mol⁻¹ zur Enzym-Substrat-Bindung beiträgt. Dieses Ergebnis zeigt, daß eine zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms die Strukturänderungen aufdecken kann, die durch die erste Mutation verursacht wurden.

7. Beweise für die Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Aktivierungsreaktion

Wie wird die Reaktion der Carboxygruppe des Tyrosins mit ATP [Gl. (a)] katalysiert? Im Verlauf dieser Reaktion wird eine Pyrophosphatgruppe aus ATP verdrängt [Gl. (e)]^[27].

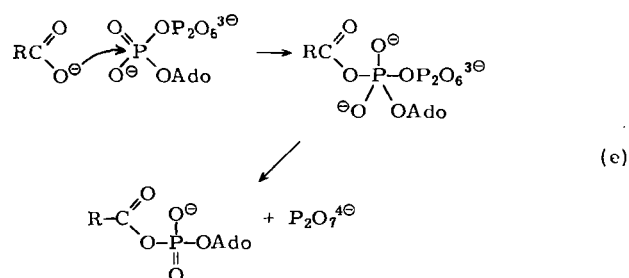
Eine allgemeine Basekatalyse des nucleophilen Angriffs ist nicht möglich, da die Carboxygruppe vollständig ionisiert vorliegt. Nucleophile Katalyse durch eine Gruppe des Enzyms, d. h. intermediäre Bildung von „aktiviertem“ AMP, ist unwahrscheinlich, da ATP selbst schon eine aktivierte Verbindung ist und über eine gute Abgangsgruppe verfügt (Pyrophosphat). Es bleiben die „elektrostatische“ Katalyse und die Katalyse durch Stabilisierung des Substrat-Übergangszustandes. Bei einer Übergangszustands-Stabilisierung sollte, wenn durch ortsspezifische Mutagenese eine Seitenkette am Enzym entfernt wird, die Affinität des Enzyms für sein Substrat ein wenig sinken; viel stärker sollte aber die Affinität für das Substrat im Übergangszustand abnehmen, vorausgesetzt, dieser wurde stabilisiert. Der K_M -Wert sollte dann mehr oder weniger steigen, k_{kat} jedoch sinken. Wie Tabelle 3 zeigt, ist dies tatsächlich der Fall.

Tabelle 3. Einfluß verschiedener Mutationen auf die Tyrosinaktivierung.

Mutante	k_{kat} [s ⁻¹]	K_M (ATP) [mM]	k_{kat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]
TyrTS [a]	7.6	0.9	8400
TyrTS(Cys35-Gly35) [a]	2.8	2.6	1120
TyrTS(Cys35-Ser35) [a]	2.4	2.4	1000
TyrTS(His48-Gly48) [b]	1.6	1.4	1140
TyrTS(His45-Asn45) [b]	0.003	1.0	3
TyrTS(Gln195-Gly195) [b]	0.16	2.5	64

[a] Lit. [9]. [b] Unveröffentlichte Ergebnisse.

Besonders drastisch wirkt sich der Austausch von His-45 durch Asp-45 aus: k_{kat} ist auf etwa 1/2000 des Wildtyp-Wertes gesunken, während K_M fast unverändert geblieben ist (J.-P. Shi, unveröffentlicht). Auch die Geschwindigkeit, mit der Pyrophosphat das Tyrosyladenylat angreift, ist für TyrTS(His45-Asn45) auf 1/2000 des Wildtyp-Wertes gesunken (unveröffentlichte Befunde). His-45 scheint im Kristall (Abb. 4) keine Wechselwirkung mit dem Tyrosyladenylat einzugehen. Von Dr. R. J. Leatherbarrow gebaute Modelle (unveröffentlicht) zeigen, daß die γ -Phosphorylgruppe der fünfbindigen Zwischenstufe in Gl. (e) eine Wasserstoffbrückenbindung mit His-45 bilden kann^[1].



Auf Strukturänderungen des Enzyms während der Aktivierungsreaktion kann aus Versuchen mit Mutanten geschlossen werden, in denen Wasserstoffbrücken-bildende Gruppen verändert worden sind. Bildet ein Aminosäurerest des Enzyms Wasserstoffbrücken gleichermaßen gut mit dem Übergangszustand wie mit dem Grundzustand des Substrats, dann verändert sich nach Entfernung dieses Restes nur K_M , nicht aber k_{kat} (siehe ^[25], S. 244–247). Wird ein Rest entfernt, der im Enzym-Übergangszustand-Komplex stärkere Wasserstoffbrücken bildet, so sinkt k_{kat} . Wir fanden, daß k_{kat} der Aktivierungsreaktion auf alle Veränderungen an Resten, die mit ATP Wasserstoffbrücken bilden, reagiert. Umgekehrt beeinflusst die Änderung von Resten, die mit der Hydroxygruppe des Tyrosins Wasserstoffbrücken bilden, k_{kat} nicht, z. B. der Austausch von Tyr-34 durch Phe-34 in Abb. 4 (unveröffentlicht). Nach diesen Befunden ist anzunehmen, daß die Tyrosinseitenkette während der Aktivierungsreaktion relativ starr ist und das gebundene ATP sich auf die Carboxygruppe des Tyrosins zubewegt, damit ein nucleophiler Angriff auf die α -Phosphorylgruppe möglich ist. Da die Stärke der Wasserstoffbrücken zunimmt, sobald der Übergangszustand erreicht ist, bringt das Enzym wahrscheinlich ATP und Tyrosin in enge Nachbarschaft.

8. Optimierung der Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen während der Evolution

Es gibt viele Vorstellungen darüber, wie sich der evolutionäre Selektionsdruck auf die Geschwindigkeitskonstanten enzymatischer Reaktionen auswirkt, so daß die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion maximiert wird; die Gültigkeit der Modelle^[20, 21, 28] kann durch ortsspezifische Mutagenese geprüft werden. Obwohl die von uns hergestellten Mutanten nicht unbedingt die natürlichen Vorläufer des heutigen nativen Enzyms sein müssen, könnten es doch Enzymformen sein, die während der Evolution ausselektiert wurden; die Häufigkeit spontaner Mutationen ist hoch genug, um diese Annahme zu rechtfertigen. Eine einfache Theorie über die Effekte des evolutionären Selektionsdruckes auf die maximale Geschwindigkeit einer Gesamtreaktion^[20, 21] sagt voraus, daß 1. der Wert k_{kat}/K_M zu einem Maximum tendiert (als Konsequenz der Komplementarität von Enzym und Substratstruktur im Übergangszustand) und daß 2. die Werte von k_{kat} und K_M gleichzeitig steigen, so daß K_M immer größer ist als die normale Konzentration des Substrates in vivo. Als Resultat wird der Ausdruck $[S]_p k_{\text{kat}} / (K_M + [S]_p)$ in Gl. (f) maximiert; diese

[*] Auch Mechanismen wie „induced fit“ oder „non productive binding“ können Änderungen von k_{kat} oder K_M bewirken, wie sie in Tabelle 3 beschrieben sind. Deshalb lieferten frühere Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, bei denen die Struktur des Substrates verändert wurde, keinen eindeutigen Beweis für den „strain“-Mechanismus (Übergangszustands-Stabilisierung)^[21]. Die durch ortsspezifische Mutagenese eingeführten Änderungen bei der TyrTS sollten aus folgenden Gründen eindeutige Resultate ergeben: 1. Die Struktur des nativen Enzyms und des Enzym-Substrat-Komplexes der Mutanten kann durch Röntgen-Kristallographie aufgeklärt werden. 2. Die Strukturänderungen sind vielfach so gering, daß man die damit einhergehende Änderung der Bindungsenergien berechnen kann. Sogar ohne genaue Strukturdaten läßt sich durch Kombination von chemischer Intuition und Analyse der Enzymstruktur mit Computergraphik-Methoden eine Übergangszustands-Stabilisierung durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen vorhersagen.

beschreibt die Umsatzgeschwindigkeit in vivo ($[S]_p$ ist die Substratkonzentration in vivo).

$$v(\text{in vivo}) = [E]_0 [S]_p k_{\text{kat}} / (K_M + [S]_p) \quad (f)$$

Die Maximierung wird durch verminderte Komplementarität zum Substrat im Grundzustand bei gleichbleibender Komplementarität zum Substrat im Übergangszustand erreicht. Der experimentelle K_M -Wert des nativen Enzyms für ATP in der Aminoacylierungsreaktion liegt bei 2.5 mM, ein Wert, der in vielen Organismen der in-vivo-Konzentration von ATP sehr nahe kommt (2–3 mM). Die zwischen ATP und einem Protein maximal mögliche Bindungsenergie wird nicht genutzt – K_M für ATP und Myosin beträgt beispielsweise $10^{-13} \text{ M}^{[29]}$. Im allgemeinen sind die k_{kat}/K_M -Werte der Mutanten kleiner als die des Wildtyps. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist die Mutante TyrTS(Thr51-Pro51) (Tabelle 4). Das liegt hauptsächlich am niedrigen

Tabelle 4. Kinetik der Aminoacylierung von tRNA [a].

Enzym	Unterschiedliche ATP-Konz.			[ATP] [mM]		
	k_{kat} [s ⁻¹]	K_M [mM]	k_{kat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	2.5 [b]	0.25 v [s ⁻¹]	0.025
TyrTS [c]	4.7	2.5	1860	2.35	0.43	0.05
TyrTS(Thr51-Pro51)[c]	1.8	0.019	95800	1.79	1.67	1.02
TyrTS(Thr51-Ala51)[c]	4.0	1.251	3200	2.7	0.67	0.078
TyrTS(Cys35-Gly35)[d]	1.9	6.1	320	0.55	0.075	0.008
TyrTS(Cys35-Ser35)[d]	1.3	6.4	200	0.36	0.049	0.005
TyrTS(His48-Gly48)[e]	2.4	8.7	278	0.54	0.067	0.047
TyrTS(Gln195-Gly195)[e]	0.15	6.2	24	0.043	0.006	0.0007

[a] Geschwindigkeit der Aminoacylierung von tRNA bei 25°C [mol Tyr-tRNA · mol⁻¹ Enzym · s⁻¹]. k_{kat} und K_M sind aufgerundet, k_{kat}/K_M wurde aus den exakten Werten berechnet. [b] In-vivo-Konzentration. [c] Lit. [26]. [d] Lit. [9]. [e] Unveröffentlichte Befunde.

k_{kat} -Wert, der den ausgesprochen kleinen K_M -Wert für ATP überkompensiert. Unter physiologischen ATP-Konzentrationen (2–3 mM) ist das native Enzym aktiver als die Mutante (nach Gl. (f) anhand der experimentellen Werte für k_{kat} , K_M und [ATP]). Bei niedrigeren ATP-Konzentrationen ist jedoch die Mutante TyrTS(Thr51-Pro51) aktiver. Dieser Befund illustriert die Bedeutung, die das Einstellen der K_M -Werte von Enzymen auf die Substratkonzentration in vivo hat, um maximale Umsatzgeschwindigkeiten zu erreichen. Die Mutante TyrTS(Thr51-Ala51) ist bei 25°C in vitro ähnlich aktiv wie das native Enzym.

9. Strukturelle Organisation der Tyrosyl-tRNA-Synthetase

Im Kristall hat das Enzym eine hoch geordnete N-terminale Domäne, die die Reste 1–319 umfaßt und Tyrosyladenylylat bindet; die verbleibenden 100 Reste des C-Terminus sind ungeordnet^[16]. Das Genfragment, das die N-terminale Domäne codiert, wurde durch Gen-Deletion hergestellt und das verstümmelte Protein exprimiert und isoliert^[11]. Dieses Torso-Protein ist zwar in der Aktivierungsreaktion [Gl. (a)] voll aktiv, es katalysiert aber nicht den Transfer von Tyrosin auf die tRNA und bindet auch keine Tyr-tRNA. Der strukturellen Unterteilung der Tyrosyl-tRNA-

Synthetase entspricht also auch eine funktionelle, wobei die N-terminale Domäne für die Aminosäure-Aktivierung verantwortlich ist und die C-terminale Domäne für die Bindung der tRNA. Durch eine Reihe von Mutationsexperimenten mit der Alanyl-tRNA-Synthetase – einem Enzym unbekannter dreidimensionaler Struktur – konnte gezeigt werden, daß auch dieses Protein besondere Regionen für Aktivierungs- und Transfer-Reaktion enthält^[30].

10. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl wir aus persönlichen Mitteilungen wissen, daß gegenwärtig viele andere Proteine mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese untersucht werden, gibt es doch erst wenige Publikationen, in denen über Untersuchungen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mit dieser Methode berichtet wird. Die Arbeit an der β -Lactamase^[7,8] kann vorläufig nicht fortgesetzt werden, da die dreidimensionale Struktur des Enzyms noch nicht bekannt ist; die Kristallstruktur wird jedoch gegenwärtig bestimmt. Drei Mutanten der Dihydrofolat-Reduktase wurden hergestellt^[31]; mit diesem Enzym arbeiten auch noch andere Gruppen. Wir sind sicher, daß in den nächsten beiden Jahren viele interessante Ergebnisse veröffentlicht werden.

Protein-Engineering ist ein wunderbares Werkzeug für den Enzymologen; die Anwendungsgebiete scheinen unbegrenzt zu sein. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen können mit dieser Methode direkt analysiert werden; schon mit einfachen Experimenten können die Gruppen identifiziert werden, die an der Katalyse beteiligt sind; kompliziertere Versuche ermöglichen das Studium der Rolle von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen für die Katalyse und die Spezifität. Zukünftige Experimente werden die Fernwirkungen von Strukturveränderungen auf Aktivitäten und die Weiterleitung der Effekte von Substrat- und Effektorbindung durch einzelne Proteinuntereinheiten zum Gegenstand haben. Einige Laboratorien werden die Thermostabilität von Enzymen und die strukturellen Grundlagen der Enzymstabilität generell analysieren. Zweifellos wird auch die Proteinfaltung^[32] mit dem Protein-Engineering untersucht werden. Für industrielle Anwendungen wird das Protein-Engineering sehr schnell Bedeutung erlangen, da physikalische Eigenschaften wie Thermostabilität, Löslichkeit, Reaktivität in Abhängigkeit vom pH etc. veränderbar sind. Biotechnologisch verwendete Enzyme können in vitro optimiert werden. Durch Protein-Engineering werden auch kinetische Eigenschaften einstellbar, z. B. k_{kat} - und K_M -Werte für Substrate, und nicht zuletzt wird man auch die Enzymspezifitäten verändern. Das Fernziel wird sein, Enzyme für jede Reaktion maßzuschneidern.

Eingegangen am 5. April 1984 [A 497]
Übersetzt von Christiane Koszka, Wien

- [1] H. Schott, H. Kossel, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 3778.
- [2] F. Sanger, A. R. Coulson, T. Friedmann, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, J. C. Fiddes, C. A. Hutchinson, P. M. Slocombe, M. Smith, *J. Mol. Biol.* 125 (1978) 225.

- [3] C. A. Hutchinson III, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6551.
- [4] A. Razin, T. Hirose, K. Itakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4268.
- [5] M. J. Zoller, M. Smith, *Methods Enzymol.* 100 (1983) 468.
- [6] G. Winter, A. R. Fersht, A. J. Wilkinson, M. Zoller, M. Smith, *Nature (London)* 299 (1982) 756.
- [7] G. Dalbadie-McFarland, L. W. Cohen, A. D. Riggs, D. Morin, K. Itakura, J. H. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6409.
- [8] I. S. Sigal, B. G. Harwood, R. Arentzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7175.
- [9] A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, D. M. Blow, G. Winter, *Biochemistry* 22 (1983) 3581.
- [10] R. Wallace, M. Schold, M. J. Johnson, P. Dembek, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 3647.
- [11] M. M. Waye, G. Winter, A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, *EMBO J.* 2 (1983) 1827.
- [12] A. R. Fersht, R. Jakes, *Biochemistry* 14 (1975) 3350.
- [13] G. L. E. Koch, *Biochemistry* 13 (1974) 2307.
- [14] M. J. Irwin, J. Nyborg, B. R. Reid, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 105 (1976) 577.
- [15] G. Winter, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, D. G. Barker, *Eur. J. Biochem.* 132 (1983) 383.
- [16] a) T. N. Bhat, D. M. Blow, P. Brick, J. Nyborg, *J. Mol. Biol.* 122 (1982) 407; b) T. N. Bhat, P. Brick, D. N. Blow, unveröffentlicht.
- [17] J. Rubin, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 489.
- [18] A. R. Fersht, J. S. Ashford, C. J. Bruton, R. Jakes, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, *Biochemistry* 14 (1975) 1.
- [19] A. R. Fersht, R. S. M. Mulvey, G. L. E. Koch, *Biochemistry* 14 (1975) 13.
- [20] A. R. Fersht, *Biochemistry* 14 (1975) 5.
- [21] R. Jakes, A. R. Fersht, *Biochemistry* 14 (1975) 3344.
- [22] P. Dessen, G. Zaccari, S. Blanquet, *J. Mol. Biol.* 159 (1982) 651.
- [23] R. S. Mulvey, A. R. Fersht, *Biochemistry* 16 (1977) 4005.
- [24] A. R. Fersht, *Proc. R. Soc. London Ser. B* 187 (1974) 397.
- [25] A. R. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York 1977.
- [26] A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, D. M. Blow, P. Carter, G. Winter, *Nature (London)* 307 (1984) 187.
- [27] G. Lowe, G. Tansley, *Tetrahedron* 40 (1984) 113.
- [28] W. J. Albery, J. R. Knowles, *Angew. Chem.* 89 (1977) 295; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 285.
- [29] H. G. Mannherz, H. Schenk, R. S. Goody, *Eur. J. Biochem.* 48 (1974) 287.
- [30] M. Jasin, L. Regan, P. Schimmel, *Nature (London)* 306 (1983) 441.
- [31] J. E. Villafranca, H. E. Howell, D. H. Voet, M. S. Strobel, R. C. Ogden, J. N. Abelson, J. Kraut, *Science* 222 (1983) 782.
- [32] R. Jaenicke, *Angew. Chem.* 96 (1984) 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 395.

Mycotoxine aus Schimmelpilzen – Waffen ungebetener Tischgenossen von Mensch und Tier: Strukturen, Wirkungen, Biosynthese und Schutzmöglichkeiten**

Von Burchard Franck*

Neben den Antibiotica sind die Mycotoxine die zweite große Gruppe von Wirkstoffen aus Mikroorganismen. Man kennt schon über 300 Mycotoxine, die sich 25 Strukturtypen zuordnen lassen. Sie werden von etwa 350 Schimmelpilzen mit annähernd 10000 Stämmen produziert. Durch die Neigung der Mycotoxin-bildenden Schimmelpilze, sich aggressiv auf Nahrungsmitteln auszubreiten, können sie epidemieartig auftretende Mycotoxikosen verursachen. – Nach Isolierung, Strukturbestimmung und Feststellung der biologischen Wirkungen gelang es, die Biosynthese der Mycotoxine weitgehend aufzuklären. Danach lassen sich die Mycotoxine auf nur drei Gruppen von biogenetischen Schlüsselbausteinen zurückführen: Polyketide, Isopentenylpyrophosphat und Aminosäuren. Mycotoxine sind zumeist unpolar, chemisch recht beständig, werden in hohen Konzentrationen gebildet und enthalten – im Gegensatz zu den Antibiotica – keine Zucker. Mycotoxine rufen eine enorme Vielfalt toxisch-pharmakologischer Wirkungen hervor, z. B. Leberdegeneration, Hämorrhagie, Carcinomentstehung. Kumulationsneigung im Säugetierorganismus und lange Inkubationszeiten erschweren die Erkennung der Mycotoxikosen und machen schon geringste Konzentrationen in der Nahrung zum Risiko. So darf das besonders gefährliche Aflatoxin B₁ den schwierig zu kontrollierenden Grenzwert von 5 ppb (5 µg/kg) in der Nahrung nicht überschreiten.

1. Einleitung

Jeder weiß, was passiert, wenn man Fruchtsaft einige Tage offen stehen läßt (Abb. 1): Durch die immer in der Luft vorhandenen Keime bilden sich Kolonien von Schimmelpilzen. Zumeist handelt es sich dabei um *Aspergillus*-

und *Penicillium*-Arten. Wir sind dann nicht mehr geneigt, diesen Saft zu trinken. Ein Instinkt mahnt uns zur Vorsicht, und das ist wichtig, denn viele der genannten Pilze bilden Stoffwechselprodukte, die für Menschen und Säugetiere gefährlich sind. Man nennt diese Giftstoffe Mycotoxine.

Die Mycotoxine unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität von den gegen Bakterien gerichteten Antibiotica. Mit den Mycotoxinen und Antibiotica verfügen die Mikroorganismen über wirksame Mittel zur Verdrängung anderer Lebewesen von ihren Nahrungsquellen. In Abbildung 1

[*] Prof. Dr. B. Franck
Organisch-chemisches Institut der Universität
Orléansring 23, D-4400 Münster

[**] Erweiterte und ergänzte Fassung einer Adolf-Windaus-Gedächtnis-Vorlesung an der Universität Göttingen.