

Auf der Spur der Evolution von einem als Gerüst in Enzymen dienenden $(\beta\alpha)_8$ -Fass

James D. Stevenson, Stefan Lutz und Stephen J. Benkovic*

Der evolutionäre Ursprung von Enzymen mit einem $(\beta\alpha)_8$ -Fass und ihre Struktur-Funktions-Beziehungen sind in den letzten Jahren ausgiebig untersucht worden.^[1] Da diese besondere Art der Faltung in der Natur sehr häufig vorkommt (man findet sie in etwa 10 % aller löslichen Proteine) und diese Enzyme offensichtlich sehr flexibel sind, was die von ihnen katalysierten chemischen Reaktionen betrifft, ist das $(\beta\alpha)_8$ -Fass auch zu einem für das Protein-Engineering interessanten Forschungsziel geworden. In zwei kürzlich erschienenen Arbeiten^[2, 3] wird das erfolgreiche Engineering der Chemie und der Bindungseigenschaften von Enzymen mit einem $(\beta\alpha)_8$ -Fass beschrieben, bei dem man sich sowohl rationaler als auch nichtrationaler Designkonzepte bedient. In Verbindung mit Strukturuntersuchungen^[4] und Rechnungen^[1a] stützen diese Ergebnisse die Theorie, dass das $(\beta\alpha)_8$ -Fass als Gerüst schon früh in der Evolution mehrstufiger metabolischer Reaktionswege auftaucht.

Die Kernstruktur des $(\beta\alpha)_8$ -Fasses selbst besteht aus dem sich achtmal wiederholenden Sekundärstrukturelement β -Strang/Schleife/ α -Helix/Schleife.^[5] In dem daraus entstehenden Fass bilden die acht β -Stränge im Innern ein zylinderförmiges paralleles β -Faltblatt und die α -Helices die äußere Oberfläche (Abbildung 1). Besonders reizvoll für das Protein-

der Katalyse beteiligten Aminosäurereste an den Schleifen, die das Substrat bindenden Reste hingegen im Innern des Fasses. Somit ist es möglich, bei der Mutagenese zur Modifizierung enzymatischer Funktionen die Bereiche für die Bindung und die für die Katalyse getrennt zu verändern.

Veränderte Chemie unter Beibehaltung der bisherigen Bindungsstellen

Altamirano et al. beschrieben die Umwandlung eines $(\beta\alpha)_8$ -Fasses in ein anderes mit gleicher Funktion mithilfe einer Kombination aus rationalem Design und zielgerichteter Evolution.^[2] Von den beiden Enzymen *N*-(5'-Phosphoribosyl)anthranilat-Isomerase (PRAI) und Indol-3-glycerinphosphat-Synthase (IGPS), die aufeinander folgende Schritte der Biosynthese von Tryptophan katalysieren (Schema 1), nimmt man an, dass sie im Laufe der Evolution durch Genverdopplung aus dem IGPS-Enzym entstanden sind.^[6] Die Autoren

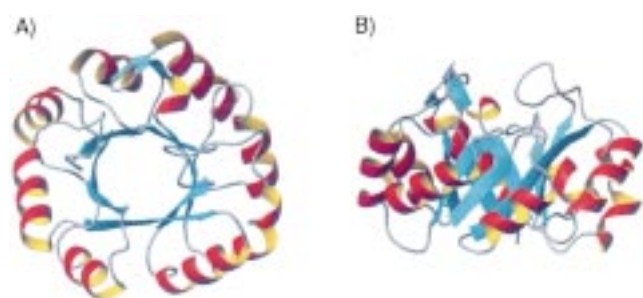
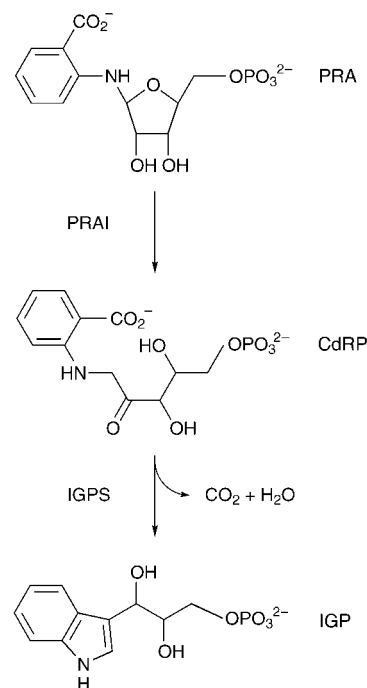


Abbildung 1. Struktur des PRAI-Enzyms mit einem $(\beta\alpha)_8$ -Fass. A) Blick von oben vom C-Terminus des Fasses aus; man erkennt das aktive Zentrum. B) Seitenansicht der Fassstruktur.

Engineering ist die offenkundige räumliche Trennung der Abschnitte, die für die Bindung verantwortlich sind, von denen für die Katalyse. Typischerweise befinden sich die an



Schema 1. Die von den beiden Enzymen PRAI und IGPS katalysierten aufeinander folgenden Reaktionen in der Biosynthese von Tryptophan. PRAI katalysiert die Amadori-Umlagerung von *N*-(5'-Phosphoribosyl)anthranilat (PRA) zu 1'-(2'-Carboxyphenylamino)-1'-desoxyribulose-5'-phosphat (CdRP), IGPS katalysiert den Ringschluss von CdRP zu Indol-3-glycerinphosphat (IGP) unter Freisetzung von CO_2 und H_2O .

[*] Prof. S. J. Benkovic, J. D. Stevenson, S. Lutz
Department of Chemistry, The Pennsylvania State University
414 Wartik Laboratory
University Park, PA, 16802 (USA)
Fax: (+1) 814-865-2973
E-mail: sjb1@psu.edu

versuchten nun, diese evolutive Divergenz durch Umwandlung von IGPS aus *E. coli* in eine funktionelle PRAI zu wiederholen. Hiermit könnten sie nicht nur die These der evolutiven Verbindung zwischen diesen beiden Enzymen stützen, sondern würden auch die Umwandlung einer Aktivität eines Enzyms in die eines anderen Enzyms zeigen.

Die experimentelle Vorgehensweise hierbei ist eine eindrückliche Kombination von rationalem und nichtrationalem Design (zielgerichtete Evolution), dabei kommt die Leistungsfähigkeit von In-vivo-Selektions-Methoden zum Tragen (Abbildung 2). Zu Beginn suchten die Autoren die Bereiche

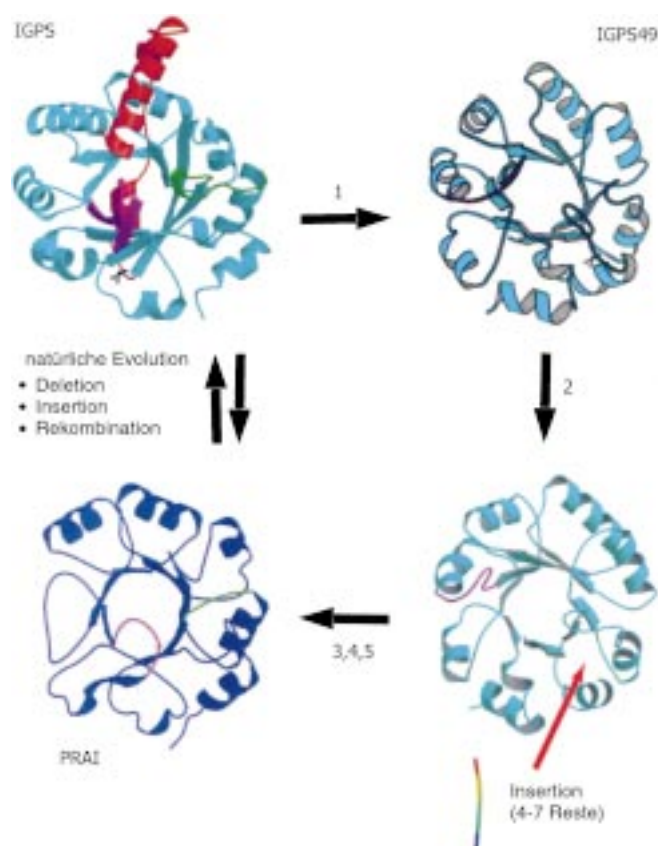


Abbildung 2. Die verschiedenen Schritte der zielgerichteten Evolution zur Umwandlung von IGPS in eine aktive PRAI. 1) Deletion des 48 Aminosäurereste umfassenden Teils vom N-Terminus her (rot). 2) Substitution der IGPS-Schleife $\beta 1a1$ (15 Aminosäurereste) mit der Schleifensequenz GK(X)₂₋₅ aus einer kombinatorischen Bibliothek, mit einer Länge von 4–7 Aminosäureresten. 3) Austausch der $\beta 6a6$ -Schleife im IGPS gegen die Sequenz DGXGGQG, die mit PRAI übereinstimmt. 4) In-vivo-Selektion. 5) Zwei Zyklen mit DNA-Shuffling und StEP-Mutagenese durch Rekombination über Polymerasekettenreaktionen, an die sich eine In-vivo-Selektion anschließt, sodass man schließlich eine über In-vitro-Evolution erzeugte PRAI (ivePRAI) erhält. Wiedergabe mit freundlicher Erlaubnis aus Lit. [2]. Copyright (2000) Macmillan Magazines Ltd.

in der Tertiärstruktur von IGPS, die sich von denen in der PRAI beträchtlich unterscheiden; sie folgerten, dass diese Bereiche in erster Linie dafür verantwortlich sind, dass die beiden Enzyme unterschiedliche chemische Reaktionen katalysieren. In einer Reihe struktureller Modifizierungen entfernten die Autoren die Helix am N-Terminus von IGPS (die in der PRAI nicht vorhanden ist) und führten mithilfe einer Peptidbibliothek Schleifensequenzen an den Stellen ein,

an denen sich in der PRAI solche befinden ($\alpha 1\beta 1$ - und $\alpha 6\beta 6$ -Schleifen). Auf diese Weise kann man tatsächlich vom aktiven Zentrum des einen Enzyms zu dem des anderen umschalten.

Um aus dieser kombinatorischen Bibliothek mit verschiedenen Schleifen die Glieder mit aktivem Enzym zu selektieren, bediente man sich eines auxotrophen *E.-coli*-Stammes (JA300) mit defizienter PRAI-Aktivität. Dabei wachsen in Abwesenheit exogenen Tryptophans nur Zellen, die ein aktives PRAI-Enzym exprimieren. Obwohl ohne Tryptophan keine der Zellen mit dem Peptidteil aus der Bibliothek wuchs, beobachtete man bei sehr niedrigen Konzentrationen (0–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Tryptophan) ein Wachstum eines kleinen Anteils (1.7%) der Bibliothek. Dies deutete man als Hinweis auf das Vorliegen einer schwachen PRAI-Aktivität in einigen der Bibliothekskomponenten. Zur weiteren Erhöhung dieser Aktivität bedienten sich die Autoren eines zielgerichteten Evolutionsansatzes und erzeugten dabei eine Zufallsdiversität in den ausgewählten Bibliothekskomponenten. Mit zwei Zyklen aus DNA-Shuffling^[7] und stufenweiser DNA-Erweiterung (oder „Staggered-Extension“-Verfahren; StEP)^[8] erhielt man eine große Bibliothek von Zufallsmutanten. Bei der In-vivo-Selektion dieser Bibliothek fand man 360 Kolonien, die vollkommen ohne Tryptophan wachsen konnten. Das aktivste Protein aus diesen Mutanten, das ivePRAI (in vitro evolved PRAI), zeigte, hauptsächlich aufgrund einer besseren Substratbindung in vitro, eine gegenüber dem Wildtyp-Enzym sechsfach erhöhte PRAI-Aktivität, aber überhaupt keine IGPS-Aktivität mehr.

Die Sequenzanalyse ergab für ivePRAI 90% Übereinstimmung mit der Sequenz des Wildtyp-IGPS und nur 28% mit PRAI, was die zentrale Rolle der Schleifenregionen für die Aktivität dieses (βa)₈-Fasses im Enzym verdeutlicht. Dass man mit einer gezielten Mutagenese dieser Bereiche die Funktion so leicht ändern kann, weist klar darauf hin, dass das (βa)₈-Fassgerüst, was seine Funktion betrifft, formbar ist. Das mag erklären, warum diese Struktur in der Natur so weit verbreitet ist.

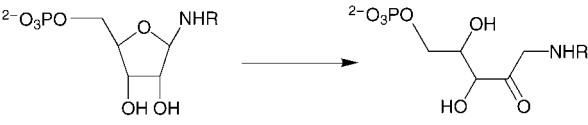
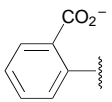
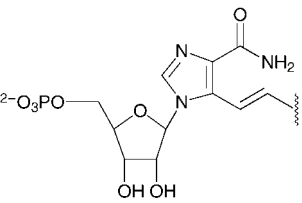
Im Hinblick auf das Protein-Engineering kann man aus dieser Untersuchung eine Reihe von Lektionen lernen: Man kann sich des rationalen und nichtrationalen Designs im Tandemverfahren bedienen. Der erste, rationale Schritt zum Aufpfropfen von Schleifen führte nicht zu einem aktiven Enzym. Dies gelang erst, als man die In-vitro-Rekombination zur Erzeugung von Diversität einsetzte. Wenn man sagt, dieser Schritt sei lediglich eine Feinabstimmung der Mutagenese, die bereits stattgefunden habe, so unterschätzt man möglicherweise die Bedeutung dieser Technik. Alles in allem – mit einer DNA-Umstellung allein ist man wahrscheinlich nicht in der Lage, im IGPS-Gerüst eine PRAI-Aktivität zu erzeugen.

Veränderung in der Substratbindung bei gleich bleibender Chemie

Neben dem Einsatz bereits existierender Enzyme als Strukturgerüste findet man in der Natur die Strategie, dass die spezifische Bindungsfähigkeit bereits existierender Enzyme so „zurechtgeschneidert“ wird, dass diese Enzyme verschiedene Substrate erkennen können. Dies ist wiederum am

PRAI-Enzym zu sehen, denn ein Homologes hierzu ist an der Biosynthese von Histidin beteiligt. Das Enzym *N*'-[(5'-Phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamidribonucleotid isomerase (ProFARI) katalysiert die Amadori-Umlagerung von ProFAR zu *N*'-[(5'-Phosphoribulosyl)formimino]-5-aminoimidazol-4-carboxamidribonucleotid (PRFAR; Tabelle 1). Dies ist die gleiche chemische Umwandlung wie die, die von PRAI katalysiert wird, nur mit einem anderen

Tabelle 1. Die Substratspezifität von ProFARI und PRAI.

			
R	Substrat	Produkt	Enzym
	ProFAR	PRFAR	ProFARI
	PRA	CdRP	PRAI

Substrat. Auch ProFARI ist wie PRAI ein Enzym mit einem $(\beta\alpha)_8$ -Fass. Die beiden Enzyme sind in ihrer Sequenz zwar nur zu 10 % identisch, doch diese Ähnlichkeit in der Struktur und Chemie legt eine Verbindung im Laufe der Evolution nahe.

Jürgens et al. gingen daran, die Verzweigung in der Entwicklung eines Enzyms zu PRAI und ProFARI aufzuspüren, indem sie von einem Enzym mit einer breiteren Substratspezifität ausgingen und dazu Varianten von ProFARI erzeugten, die sowohl die PRAI- als auch ProFARI-Reaktion zu katalysieren vermochten.^[3] Solch eine Mutante würde die These von der Verbindung zwischen PRAI und ProFARI im Verlauf der Evolution unterstützen. Die Autoren kombinierten eine Zufallsmutagenese mit einer In-vivo-Selektion, um damit ProFARI-Mutanten mit PRAI-Aktivität zu erhalten. Im Unterschied zum arbeitsaufwändigen Mutageneseverfahren von Altamirano et al.^[2] benötigten Jürgens et al. nur ein einziges DNA-Shuffling, um ihre Ziele zu erreichen. Sie fanden aus einer durch Zufallsmutation erzeugten ProFAR-Bibliothek durch In-vivo-Selektion in einem auxotrophen *E.-coli*-Stamm mit defizienter PRAI-Aktivität zwei Varianten des ProFAR-Enzyms, die PRA zu CdRP isomerisieren konnten. Kinetische Untersuchungen ergaben für beide Mutanten beträchtliche PRAI-Aktivität, wenngleich die Aktivität, gemessen an der der Geschwindigkeitskonstante ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}^{\text{PRA}}$), $3-11 \times 10^4$ -mal kleiner war als die

PRAI-Aktivität im Wildtyp. In einer der Mutanten blieb auch beträchtliche ProFARI-Aktivität (ein 26tel der vom Wildtyp) beibehalten, die andere Mutante hingegen zeigte sehr viel geringere Aktivität. Man sollte erwarten, dass man mit zusätzlichen Mutagenesen und In-vivo-Selektionen die PRAI-Aktivität auf Kosten der ProFARI-Aktivität weiter erhöhen kann, denn die Selektion ist ausschließlich auf die PRAI-Aktivität ausgerichtet.

Reproduziert man die in den beiden ProFARI-Varianten gefundenen Punktmutationen als einzelne Mutationen durch ortsspezifische Mutagenese, so zeigt nur eine von den sieben, nämlich die D127V-Punktmutation, PRAI-Aktivität. Allerdings zeigt diese Mutante mit der einzelnen Mutation für beide Reaktionen bedeutend weniger Aktivität als die beiden selektierten Mutanten. Dies weist darauf hin, dass mehrere Mutationen kooperativ miteinander die Aktivität von ProFARI verändern. Umgekehrt stützt die Tatsache, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure die Spezifität von ProFARI zu ändern vermag, die Hypothese, dass die beiden Enzymaktivitäten evolutiv miteinander in Beziehung stehen.

Hieraus folgt: Die De-novo-Herstellung effizienter, maßgeschneiderter Proteine als Katalysatoren mithilfe des Protein-Engineerings ist zwar zurzeit noch ein unerreichbares Ziel, doch bietet das Konzept, bei dem ein bereits existierendes Enzymgerüst gezielt umgebaut wird, einen gangbaren Weg zu neuen Enzymaktivitäten.^[9] Wie hier an den beiden diskutierten Enzymen mit einem $(\beta\alpha)_8$ -Fass gezeigt werden konnte, kann man entweder die Chemie oder die Bindungseigenschaften ändern und erhält so Enzymvarianten mit der erwünschten neuen Enzymaktivität. Die Struktureinheit des $(\beta\alpha)_8$ -Fasses lässt sich auf diese Weise als ein allgemeines Gerüst einsetzen, in das sich neue Aktivitäten einbauen lassen. Damit kann man tatsächlich Vorgänge in der Natur nachahmen, bei denen im Verlaufe der Evolution durch einen Rückgriff auf bereits vorhandene strukturelle und funktionelle Proteinfaltungen neue enzymatische Funktionen erzeugt wurden.

- [1] a) R. R. Copley, P. Bork, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 627–640; b) N. Nagano, E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2072–2084, zit. Lit.
- [2] M. M. Altamirano, J. M. Blackburn, C. Aguayo, A. R. Fersht, *Nature* **2000**, *403*, 617–622.
- [3] C. Jürgens, A. Strom, D. Wegener, S. Hettwer, M. Wilmanns, R. Sterner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9925–9931.
- [4] D. Lang, R. Thoma, M. Henn-Sax, R. Sterner, M. Wilmanns, *Science* **2000**, *289*, 1546–1550.
- [5] D. Reardon, G. K. Farber, *FASEB J.* **1995**, *9*, 497–503.
- [6] K. Kirschner, H. Szadkowski, T. S. Jardetzky, V. Hager, *Methods Enzymol.* **1987**, *142*, 386–397.
- [7] W. P. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389–391.
- [8] H. Zhao, L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 258–261.
- [9] I. P. Petrounia, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 325–330.