

# Minimale Umgestaltung aktiver Enzymtaschen – wie man alten Enzymen neue Kunststücke beibringt

Miguel D. Toscano, Kenneth J. Woycechowsky und Donald Hilvert\*

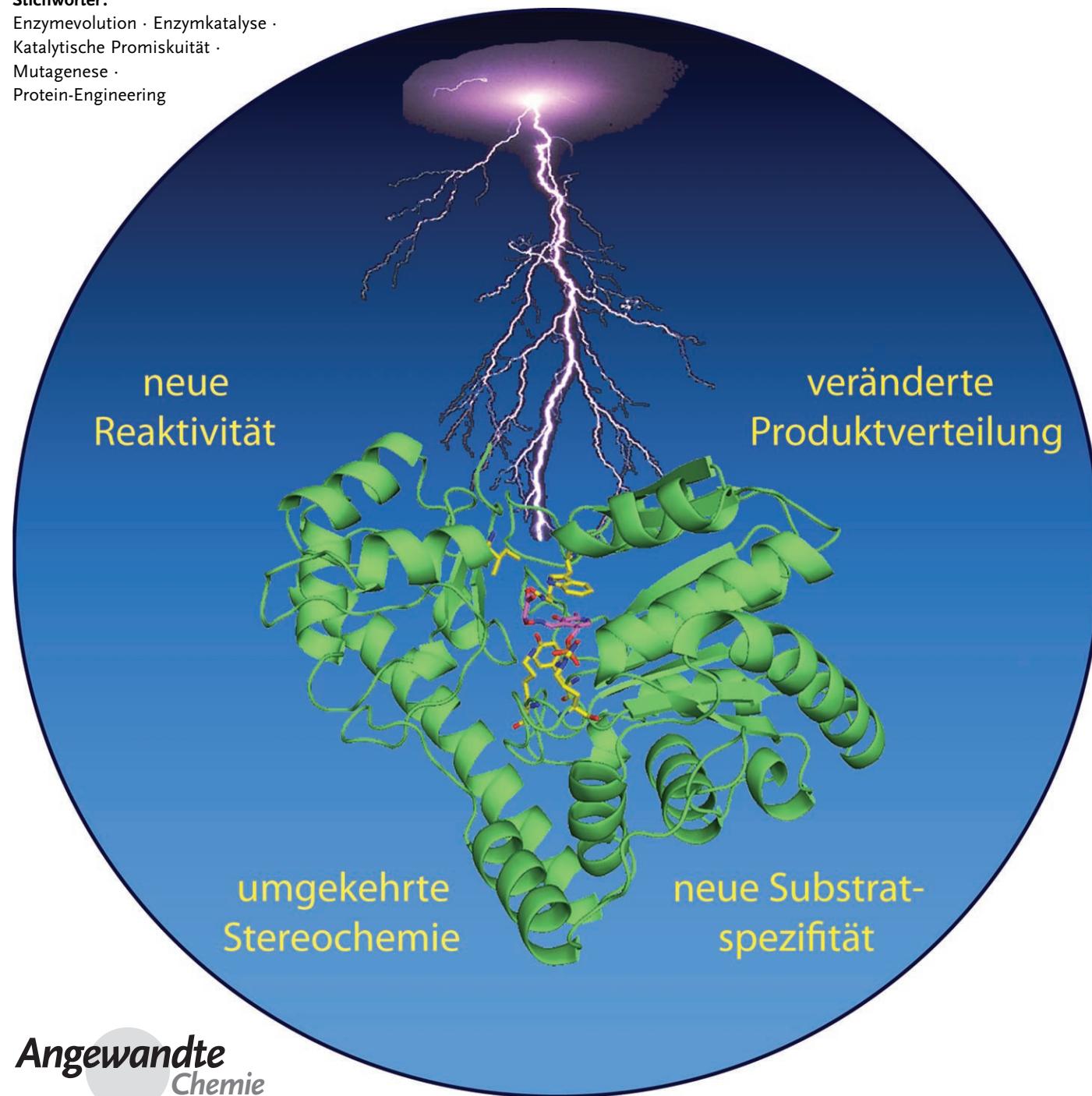
**Stichwörter:**

Enzymevolution · Enzymkatalyse ·

Katalytische Promiskuität ·

Mutagenese ·

Protein-Engineering



**W**ährend die Natur ihre Katalysatoren über Millionen von Jahren entwickelt hat, versuchen Enzymingenieure, dies ein wenig schneller zu bewerkstelligen. Die aktive Tasche eines Enzyms bildet eine stark optimierte Mikroumgebung für die Katalyse chemischer Transformationen in biologischen Systemen – folglich können Änderungen in diesen Zentren die Enzymaktivität stark beeinflussen. Daher bietet die Voraussage und Kontrolle solcher Effekte einen vielversprechenden Weg, um zu neuen Funktionen zu gelangen. Der Ansatz, bei dem minimale Modifikationen in den aktiven Taschen von Enzymen (z. B. durch gezielte Mutagenese und Hinzufügen neuer reaktiver Funktionalitäten) deren katalytisches Repertoire erweitern sollen, ist der Schwerpunkt dieses Aufsatzes. Dabei kann eine neue Aktivität oft schon durch eine einzige Mutation erreicht werden. Die vielen erfolgreichen Beispiele für die Umgestaltung von aktiven Taschen durch minimale Mutationen geben wertvolle Einblicke in die Evolution von Enzymen und bahnen neue Wege in der Erforschung der Biokatalysatoren.

## 1. Einleitung

Die natürliche Evolution hat uns zahlreiche Enzyme zur Verfügung gestellt, die eine große Vielfalt an chemischen Transformationen katalysieren.<sup>[1]</sup> Diese Katalysatoren zeichnen sich durch eine enorme Beschleunigung von Reaktionen in Wasser bei neutralem pH-Wert und milden Temperaturen aus.<sup>[2]</sup> Zunehmend profitiert die chemische und pharmazeutische Industrie von diesen Eigenschaften, indem sie Enzyme verwendet, um Syntheseprozesse kostengünstiger und umweltfreundlicher durchzuführen.<sup>[3]</sup> Die enorme katalytische Effizienz von Enzymen (oft nahe an der Diffusionskontrolle) wird normalerweise mit einer engen Substratspezifität in Verbindung gebracht, was ihre Verwendbarkeit in nichtbiologischen Anwendungen einschränkt. Protein-Engineering sollte helfen, den Spielraum von enzymkatalysierten Transformationen zu erweitern, und so ihren präparativen Nutzen vergrößern.

Die reaktiven Zentren der natürlichen Enzyme bieten einen günstigen Ausgangspunkt für den Aufbau neuer Enzyme. Die enzymatische Reaktion findet in einer aktiven Tasche statt, in der einige wenige Aminosäurereste die Substratbindungsstasche bilden. Diese präzise positionierten Reste begünstigen die Katalyse, indem sie sowohl reaktive Gruppen wie Nucleophile, Säuren oder Basen bereitstellen als auch die optimale Mikroumgebung schaffen (Hydrophobie, Ladungskomplementarität, Wasserstoffbrückendonoren und -acceptoren) und somit den Übergangszustand stabilisieren. Die Aufgabe der aktiven Tasche besteht in der Bindung des Substrats (der Substrate), der Stabilisierung des Übergangszustands und der Freigabe des Produkts (der Produkte).

Es ist seit langem bekannt, dass der chemische Raum in den aktiven Taschen der natürlichen Enzyme nicht vollständig genutzt wird. Dies wird deutlich durch die Tatsache, dass die natürlichen Enzyme eine recht begrenzte Zahl von Fal-

tungen und katalytischen Mechanismen nutzen, um eine enorme Diversität an biologischen Verbindungen herzustellen.<sup>[4]</sup> Viele Katalysatoren sind exakt auf spezifische chemische Transformationen von biologischer Relevanz abgestimmt, einige Enzyme zeigen allerdings auch promiskuitive Aktivitäten – das heißt, sie akzeptieren alternative Substrate und katalysieren sekundäre Reaktionen.<sup>[5–7]</sup> Der Begriff Promiskuität wird in der Folge in drei Kategorien gebraucht: *Substrat-Promiskuität* (das Enzym akzeptiert strukturell unterschiedliche Substrate, katalysiert jedoch dieselbe chemische Reaktion), *katalytische Promiskuität* (das Enzym akzeptiert unterschiedliche Substrate und katalysiert völlig verschiedene Reaktionen) und *Produkt-Promiskuität* (das Enzym akzeptiert ein einziges Substrat und nutzt ähnliche Mechanismen, um die Umsetzung zu unterschiedlichen Produkten zu katalysieren). Diese promiskuitiven Aktivitäten könnten in der natürlichen Evolution der Enzyme eine Rolle spielen.<sup>[7,8]</sup>

Im Einklang damit werden zunehmend Enzym-Superfamilien identifiziert, deren Mitglieder homologe Strukturen aufweisen und verwandte Katalysemechanismen für unterschiedliche Reaktionen nutzen.<sup>[9,10]</sup> In diesen Familien können kleine Änderungen in der Aminosäureabfolge der aktiven Tasche deren unterschiedliche Aktivitäten bedingen. Dies stützt die Hypothese, dass sich eine große Vielfalt an enzymatischen Aktivitäten aus einer begrenzten Zahl ursprünglicher Enzyme in divergenter Weise entwickelt hat. Solche Aktivitätswchsel demonstrieren, dass die strukturelle Formbarkeit der aktiven Taschen und die daraus folgende

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3275
2. Subtilisin – ein Spielplatz für Proteiningenieure	3276
3. Strategien für die Umgestaltung aktiver Taschen	3278
4. Wann reichen geringfügige Änderungen in der aktiven Tasche nicht aus?	3295
5. Lektionen über die Evolution	3296
6. Ausblick	3297

katalytische Vielseitigkeit zu neuen Biokatalysatoren führen kann. Die gezielte Manipulation des chemischen Raums in aktiven Taschen sollte demnach promiskutive Aktivitäten einführen oder verstärken und letztlich auch ihre Nutzung in der Synthese ermöglichen.

Tatsächlich führen Mutationen in der aktiven Tasche oftmals zu gravierenden Änderungen der Enzymeigenschaften, was meistens allerdings schlicht den völligen Verlust der Enzymaktivität bedeutet.<sup>[11]</sup> Zuweilen kann es aber passieren, dass das veränderte Enzym eine erweiterte Substratspezifität oder ein verändertes Reaktionsprofil zeigt, woraus sich neue Aktivitäten ergeben.<sup>[12]</sup> Wie kann man nun auf effiziente Weise interessante Veränderungen identifizieren? Mithilfe von Sequenz-, Struktur- und Mechanismusinformationen können Mutationen in der aktiven Tasche bestimmt werden, die vermutlich das katalytische Repertoire der Enzyme erweitern. Die Strategie beruht auf der gezielten Substitution einzelner Aminosäuren, ohne dabei die globale Proteinfaltung zu stören. Dadurch finden die unveränderten Aminosäurereste im Kontext einer „neuen“ aktiven Tasche wieder



Donald Hilvert (links) promovierte 1983 in Chemie an der Columbia University, New York. Nach einem Postdoktorat an der Rockefeller University, New York, folgte er einem Ruf an das Scripps Research Institute in La Jolla wo er sich mit biologischer Chemie befasste. 1997 trat er seine gegenwärtige Professur für Chemie an der ETH Zürich an. Seine Arbeiten konzentrieren sich auf die Funktion von Enzymen und die Nachahmung ihrer Eigenschaften im Labor. Seine Arbeiten auf diesem Gebiet wurden mit einer Reihe von Ehrungen bedacht, unter anderem mit dem Pfizer Award in Enzyme Chemistry.

Kenneth J. Woycechowsky (Mitte) erhielt 1994 seinen BSc in Chemie an der Penn State University. 2002 promovierte er in Biochemie an der University of Wisconsin-Madison, wo er bei Prof. Ronald Raines an der Entwicklung kleiner Moleküle arbeitete, die die oxidative Proteinfaltung katalysieren. Momentan ist er Postdoktorand bei Prof. Donald Hilvert an der ETH Zürich und erforscht dort die Umgestaltung von Proteinen zur Erzeugung neuer Funktionen sowie Faltung, Aufbau und Dynamik von Proteinen.

Miguel D. Toscano (rechts) wurde 1976 in Lissabon, Portugal geboren. Er erhielt 1999 seinen MSc in Chemie an der University of Durham, Großbritannien. Anschließend wechselte er an die University of Cambridge, Großbritannien, wo er 2004 bei Prof. Chris Abell über die Inhibition von Enzymen des Shikimat-Biosynthesewegs promovierte. Seit 2005 ist er Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Donald Hilvert, wo er sich mit der Umgestaltung von Enzymen, rechnergestütztem Design und gerichteter Evolution beschäftigt.

Verwendung. Dieses Recycling von funktionalen Eigenschaften reduziert die Zahl an Mutationen, die erforderlich sind, um eine neue Funktion zu erlangen. Oft ist die Substitution einer einzigen Aminosäure ausreichend, um einem Enzym eine neue Aktivität zu verleihen. Bislang hat die Umgestaltung von aktiven Taschen zu Enzymen geführt, die breitere Substratspezifität, veränderte Kontrolle der Produktbildung, verbesserte Sekundäraktivitäten, neue Reaktivitäten oder Reaktionsmechanismen aufweisen.

Wie nützlich ist die rationale Umgestaltung der aktiven Taschen von Enzymen? In diesem Aufsatz wollen wir einige beachtliche Erfolge bei der Konstruktion von aktiven Taschen erläutern, allerdings mit der Einschränkung auf Beispiele, bei denen nur eine minimale Zahl an Mutationen gebraucht wurde. Weiterhin werden wir uns mehr auf die Erzeugung von neuen Transformationen denn auf die Erzeugung von veränderten Substratspezifitäten konzentrieren (für den zweiten Fall gibt es bereits zahlreiche Übersichtsartikel<sup>[12,13]</sup>). Der Vergleich der verschiedenen Ansätze ermöglicht es, das Potenzial dieser Methoden zur Entwicklung neuer Biokatalysatoren auszuwerten. Wir werden daraus folgern, dass eine kleine Zahl bestimmter Änderungen in der atomaren Struktur eines Enzyms oft ein relativ einfacher Weg zu alternativen katalytischen Aktivitäten ist. Während die auf diesem Wege neu generierten Katalysatoren normalerweise keine optimale Effizienz aufweisen, sind sie doch ein vielversprechender Ausgangspunkt für eine Weiterentwicklung. Dank des modernen Methodenrepertoires der Proteinengineeringieure, wie der gerichteten Evolution und der rechnergestützten Modellierung, wird die Umgestaltung von aktiven Taschen immer wichtiger, um die steigende Nachfrage nach effizienten, maßgeschneiderten Enzymen zu decken.

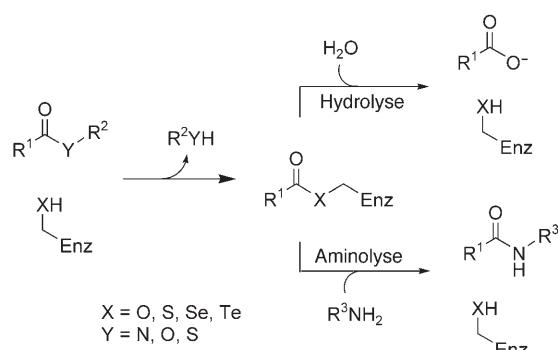
## 2. *Subtilisin – ein Spielplatz für Proteinengineeringieure*

Hydrolasen sind beliebte Forschungsobjekte für das Enzym-Engineering, nicht nur weil sie zu den ersten charakterisierten Enzymen zählen, sondern auch weil ihre katalytische Aktivität oft eine direkte industrielle Anwendung hat. Serin-Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen, indem sie ein Acyl-Enzym-Intermediat bilden, das anschließend zur freien Säure hydrolysiert wird.<sup>[14]</sup> Die katalytische Maschinerie von Serin-Proteasen enthält eine katalytische Triade (Ser-His-Asp) und eine Oxyaniontasche. Die Triade aktiviert die Serinseitenkette für einen nucleophilen Angriff, und die Oxyaniontasche stabilisiert die tetraedrischen Zwischenprodukte, die während des Enzymacylierungs- sowie während des Hydrolyseschritts gebildet werden. Die Fülle an zugänglichen Struktur- und Funktionsinformationen über Subtilisin<sup>[15]</sup> machte dieses Enzym zu einem Modellenzym für Serin-Proteasen. Subtilisin ergab folglich einen besonders geeigneten Ausgangspunkt für eine vielseitige, rationale Konstruktion aktiver Taschen.

Die Geschichte der Umgestaltung aktiver Taschen begann, als in den 1960ern die Arbeitsgruppen von Bender<sup>[16]</sup> und Koshland<sup>[17]</sup> unabhängig voneinander anhand von Subtilisin das erste Beispiel einer positionsgerichteten Mutagenese eines Proteins entwickelten. Die posttranskriptionale

Umwandlung des katalytischen Serinrests (Ser221) in einen Cysteinrest gelang durch die spezifische Reaktion von Ser221 mit Phenylmethansulfonylfluorid. Die Umsetzung dieses Addukts mit Thioacetat führte zu einem enzymgebundenen Thioester, der spontan desacyliert wurde und Cys221 freigab. Vor der Einführung der rekombinannten DNA-Technologie war die gezielte Substitution einer genetisch codierten Aminosäure durch eine andere innerhalb eines Proteins eine beachtliche Leistung. Mithilfe ähnlich trickreicher chemischer Reaktionen wurde die gezielte Umwandlung einzelner einzigartig reaktiver Aminosäuren auch in anderen Proteinen möglich.<sup>[18]</sup>

Hinter der (recht konservativen) Substitution von Serin mit Cystein in der aktiven Tasche von Subtilisin stand die Frage nach der relativen Reaktivität von Sauerstoff im Vergleich zu Schwefel in einer ansonsten identischen Proteinumgebung. Es wurde erwartet, dass die Ser221Cys-Variante von Subtilisin (Thiolsubtilisin) Amidbindungen gleich gut oder besser als der Wildtyp hydrolysiert, da Thiole nucleophiler als Alkohole sind (Schema 1). Folglich war die 10<sup>5</sup>-mal



**Schema 1.** Hydrolyse gegenüber Aminolyse: konkurrierende Reaktionen, die von Subtilisin und den Varianten Thiolsubtilisin, Selenosubtilisin und Tellurossubtilisin katalysiert werden.

schlechtere Protease-Aktivität der Mutante sehr überraschend.<sup>[19]</sup> Rückblickend ist diese drastische Abnahme der Aktivität sogar noch verblüffender, weil die aktive Tasche der Cystein-Proteasen eine ähnliche Konstellation der Reste wie diejenige der Serin-Proteasen aufweist. Angesichts der Ähnlichkeit der Größe und der chemischen Eigenschaften von Sauerstoff und Schwefel unterstreicht dieses Resultat, wie empfindlich aktive Taschen auf Substitutionen reagieren.

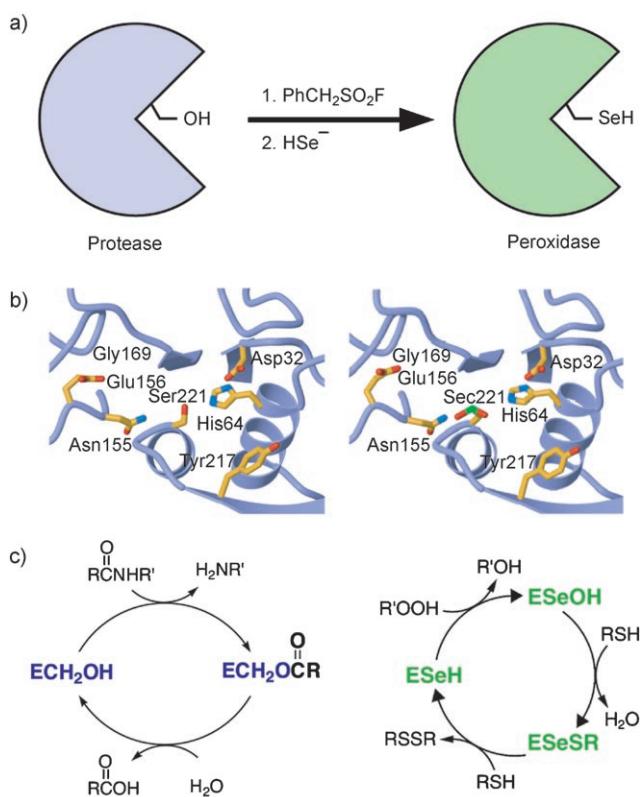
Thiolsubtilisin ist zwar eine fast inaktive Protease, zeigt aber eine gewisse Esterase-Aktivität im Fall aktivierter Ester wie *p*-Nitrophenylacetat.<sup>[19]</sup> Die Tatsache, dass Thiolsubtilisin acyliert werden konnte, aber nicht in der Lage war, Amidbindungen zu spalten, wurde von Kaiser und Mitarbeitern genutzt. Sie zeigten, dass diese mutierte Protease die chemoselektive Ligation von aktivierten Estern (*p*-Chlorphenylester) mit Aminen katalysieren konnte, wobei kleine Peptide gebildet wurden.<sup>[20]</sup> Tatsächlich beeinflusste die Mutation das Schicksal des Acylzwischenprodukts und erhöhte das Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp um mehr als das 1000fache. Diese starke Verschiebung der Lyse-Aktivität hin zur Aminolyse war wesentlich für

die beobachtete Ligase-Aktivität und verdeutlichte, dass eine einzige, konservativ erscheinende Mutation ausreichen kann, um einen neuen Katalysator herzustellen.

Dennoch gab es immer noch Raum für eine Erhöhung der Peptidligase-Aktivität von Thiolsubtilisin. Zwar unterscheiden sich die Atomradien von Schwefel und Sauerstoff nur um 0.45 Å, allerdings wird die nucleophile Reaktivität der Thiolgruppe durch ihren Einbau in eine Bindungstasche behindert, die durch die Evolution auf den sterischen Anspruch einer Alkoholgruppe hin optimiert wurde. Wells und Mitarbeiter führten eine zweite Mutation in der aktiven Tasche ein,<sup>[21]</sup> um diese sterische Hinderung durch die Ser221Cys-Substitution zu verringern. Diese Doppelmutante (Ser221Cys/Pro225Ala) – Subtiligase genannt – verlor nochmals um den Faktor 100 an Amidase-Aktivität, hatte aber eine 10-mal stärkere Peptidligase-Aktivität ( $k_{cat}/K_m$ ) als die Einzelmutante. Glycolatester (Glc) wie H-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-Glc-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> ergeben z.B. gute Katalysegeschwindigkeiten für die Ligation mit dem nucleophilen Di-peptid H-Ala-Phe-NH<sub>2</sub>. Eine andere bemerkenswerte Eigenschaft dieses Katalysators ist, dass in dem Peptid, das das Thioacylenzym-Intermediate angreift, weder für die Seitenketten noch für den C-Terminus Schutzgruppen erforderlich sind. Die Substratspezifität von Subtiligase ist praktisch identisch zur Spezifität von Wildtyp-Subtilisin in der Amidhydrolyse.<sup>[21]</sup> Dies belegt, dass die Bindungswechselwirkungen mit dem Substrat gleich geblieben sind, obwohl die katalytische Aktivität der aktiven Tasche verändert wurde. Eine zusätzliche Mutagenese in der Bindungstasche für das Substrat zeigte, dass Reaktivitäts- und Substratspezifitätsdeterminanten entkoppelt sind und unabhängig voneinander manipuliert werden können.<sup>[22]</sup>

Die Entwicklung von Subtiligase war nicht nur ein spannendes akademisches Experiment, sondern fand auch praktische Anwendung in der Semisynthese von Peptiden und Proteinen. Beispielsweise gelang die Ligation eines biotinylierten Hexapeptidesters an ein gefaltetes Protein (menschliches Wachstumshormon) in einer Ausbeute von über 95%.<sup>[22]</sup> Ein noch beeindruckenderes Beispiel ist die Totalsynthese von Ribonuclease A, einem 124 Aminosäuren langen Protein, das mithilfe der Ligase-Aktivität des Subtilins aus sechs Peptidfragmenten zusammengesetzt wurde.<sup>[23]</sup> Drei nichtnatürliche Varianten der Ribonuclease A, die die nichtnatürliche Aminosäure 4-Fluorhistidin (mit niedrigerem pK<sub>S</sub>-Wert als Histidin) anstelle der katalytisch unabdingbaren Histidinreste enthielten, wurden so hergestellt. Dies ermöglichte die Untersuchung der Relevanz der Protonenübertragungsschritte im Hinblick auf die Geschwindigkeit von RNA-Spaltung und Hydrolyse.

Die Vielseitigkeit der aktiven Tasche von Subtilisin wurde später durch die chemische Umwandlung des katalytischen Serinrests Ser221 zu Selenocystein (Sec) erweitert, die zu Selenosubtilisin führte (Abbildung 1).<sup>[24]</sup> Die neue aktive Tasche ist ein schlechterer Katalysator für die Amidhydrolyse, begünstigt aber Acyltransferreaktionen. Wie Thiolsubtilisin weist auch Selenosubtilisin eine hohe Selektivität für Aminolyse gegenüber Hydrolyse des Acylenzym-Intermediats auf (eine 14 000-mal höhere Selektivität als der Wildtyp und 20-mal höhere als Thiolsubtilisin). Noch eindrücklicher war die



**Abbildung 1.** Selenosubtilisin: a) chemische Umwandlung des katalytischen Serinrests in einen Selenocysteinrest in Subtilisin. b) Vergleichende Ansicht der aktiven Tasche von Subtilisin (links) und von Selenosubtilisin (rechts); Sec221 von Selenosubtilisin ist zu Selinsäure ( $\text{ESeO}_2\text{H}$ ) oxidiert. Gelb C, rot O, blau N, grün Se. c) Katalytischer Kreislauf der Amidhydrolyse-Aktivität von Subtilisin (links) und der Thiol-abhängigen Peroxidase-Aktivität von Selenosubtilisin (rechts; E = Enzym). Die reaktive Spezies ESeOH wurde durch direkte Reduktion des oxidierten Enzyms mit Thiolen erhalten.

Beobachtung, dass der Einbau von Selenocystein die Protease in eine Peroxidase überführt hatte.<sup>[25]</sup>

Die Fähigkeit von Selenosubtilisin, die Reduktion von Hydroperoxiden durch Thiole zu katalysieren, war beispiellos für das Subtilisingerüst, konnte aber durch die Analogie zu dem natürlich vorkommenden Selenoenzym Glutathionperoxidase (GPx) verstanden werden.<sup>[26]</sup> Durch Charakterisierung von Selenosubtilisin mittels Röntgenkristallographie,<sup>[27]</sup> NMR-Spektroskopie,<sup>[28]</sup> kinetischer Analysen<sup>[29,30]</sup> und Mutagenesestudien<sup>[31]</sup> wurde ein detailliertes Bild vom katalytischen Kreislauf der beobachteten Peroxidase-Aktivität (Abbildung 1) erhalten. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt scheint demnach die Bildung der Selenolgruppe (ESeH) zu sein.<sup>[29]</sup> Der  $pK_s$ -Wert des enzymgebundenen Selenolrests ist ungewöhnlich niedrig. Dies kann mit einem Netz von Wechselwirkungen erklärt werden, vornehmlich mit der Bildung eines Ionenpaares mit dem Histidinrest der katalytischen Triade (der selbst einen höheren  $pK_s$ -Wert als Wildtyp-Subtilisin hat) und mit einer Wasserstoffbrücke zu einem Asparaginrest in der Oxyaniontasche.<sup>[27]</sup> Abgesehen davon bleibt die Topologie der aktiven Tasche durch die Mutation weitgehend unverändert. Im Unterschied zu GPx ist Gluta-

thion ein schlechtes Substrat für Selenosubtilisin, das eine markante Präferenz für aromatische Thiolsubstrate (das beste ist 3-Carboxy-4-nitrothiophenol) aufweist, was die Spezifität von Wildtyp-Subtilisin widerspiegelt.

Für Selenosubtilisin wurde nachgewiesen, dass es eine Vielzahl an sekundären und tertiären Hydroperoxidsubstraten akzeptieren und stereospezifisch zu den entsprechenden Alkoholen umsetzen kann. Die Substratselektivität von Selenosubtilisin ist ähnlich der von Wildtyp-Subtilisin, sodass das Hydroperoxid vermutlich in einer ähnlichen Orientierung gebunden wird wie die Peptidsubstrate und Inhibitoren in der aktiven Tasche des Wildtypenzymes.<sup>[32]</sup> Die umfangreiche Bindungsinformation für Subtilisin konnte später verwendet werden, um die Substratspezifität der Selenovariante vorherzusagen. Für einige Substrate fand man, dass Selenosubtilisin die Peroxidreduktion mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % katalysierte.<sup>[33]</sup> Diese Charakteristik wurde für die Racematspaltung von Hydroperoxiden genutzt. Die Tatsache, dass Selenosubtilisin eine ähnliche katalytische Effizienz, aber eine entgegengesetzte Stereoselektivität zur natürlichen Chlorperoxidase und Meerrettichperoxidase hat, macht dieses künstliche Enzym zu einem nützlichen Hilfsmittel für die Synthese enantiomerenreiner Hydroperoxide.

Als weiteres Element der Gruppe 16 im Periodensystem wurde auch Tellur an Position 221 von Subtilisin eingeführt.<sup>[34]</sup> Das resultierende Enzym, Telluros subtilisin, weist eine ähnliche Redoxaktivität (und Effizienz) wie Selenosubtilisin auf und katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid in Gegenwart von aromatischen Thiolen.

Die Reihe der Chalkogenhomologen von Subtilisin demonstriert die Formbarkeit der aktiven Tasche von Proteasen, wobei bereits Unterschiede in einem einzigen Atom zu drastischen Änderungen führen. Diese Mutationen zerstören die ursprüngliche katalytische Aktivität, obwohl die neu eingeführten Reste intrinsisch ähnliche funktionelle Eigenschaften aufweisen. Die veränderten aktiven Taschen sind allerdings keinesfalls unreaktiv, sondern katalysieren einfach andere chemische Transformationen als der Wildtyp. Diese neuen Enzyme weisen vorhersagbare Substratspezifitäten auf, weil der geringfügige Eingriff durch Substitution einer einzelnen Aminosäure insgesamt kaum strukturelle Veränderungen bewirkt. Zusätzlich lässt die erfolgreiche Anwendung von künstlichen Enzymen in der Synthese erwarten, dass auch die Umgestaltung weiterer Proteine lohnenswert sein dürfte. Die vielen natürlich vorkommenden aktiven Taschen stellen einen bislang kaum angetasteten Fundus von großem katalytischem Potenzial dar.

### 3. Strategien für die Umgestaltung aktiver Taschen

Subtilisin zeigt bei weitem nicht als einziges Enzym solch eine katalytische Vielfalt. Das Ersetzen einer genetisch codierten Aminosäure durch eine andere ist dank der Fortschritte in der rekombinanten DNA-Technologie zu einer Routinemethode geworden. Aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Modifizierung des genetischen Codes ermöglichen sogar den Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren in Enzyme,<sup>[35]</sup> was das katalytische Repertoire wohl

erheblich vergrößern wird. Zusätzlich können Proteine mittels moderner semisynthetischer Methoden chemisch verändert werden. Ortsspezifische Mutationen in Seitenketten oder die Einführung prosthetischer Gruppen können genutzt werden, um die Reaktivität oder Substraterkennung gezielt zu beeinflussen.

Dieser Abschnitt beschreibt einige Beispiele für die Umgestaltung aktiver Taschen, unterteilt nach den erzielten Effekten und eingesetzten Strategien. Zuerst betrachten wir die Erzeugung von neuen Aktivitäten in aktiven Taschen durch Hinzufügen oder Entfernen katalytischer Seitenketten, basierend auf strukturellen und mechanistischen Vorkenntnissen (Abschnitt 3.1). Viele Enzyme katalysieren die Bildung von reaktiven Intermediaten, die entlang eines bestimmten Reaktionspfads gelenkt werden. In Abschnitt 3.2 diskutieren wir Modifikationen aktiver Taschen, die neue Reaktionswege ermöglichen und somit zu alternativen Produkten führen. In einigen Fällen zeigen auch natürliche Enzyme promiskuitive Reaktivität. Eine schwache Promiskuität kann durch wenige Modifikationen der aktiven Tasche verstärkt werden und dabei sogar zur primären Funktion werden (Abschnitt 3.3). Zudem kann die Fähigkeit einiger Enzymgerüste, die Promiskuität von Cofaktoren zu unterdrücken, genutzt werden, um neue Aktivitäten durch Umgestaltung der aktiven Tasche zu generieren (Abschnitt 3.4). Die entsprechenden Beispiele sind interessante Variationen zur Umgestaltung des Subtilisins (Abschnitt 2).

### 3.1. Einführen neuer Reaktivität

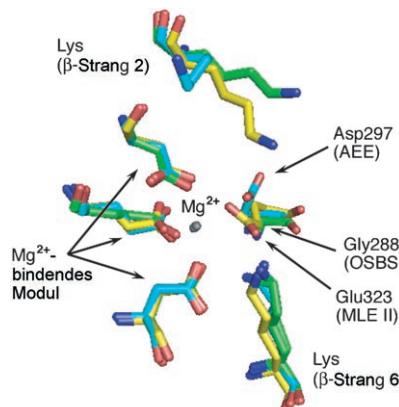
Völlig neuartige Aktivitäten können oft auf ein Proteingerüst übertragen werden, indem ein wesentlicher Teil der katalytischen Maschinerie entfernt oder eingefügt wird. Wie bei der Umwandlung der Protease Subtilisin in eine Peroxidase ist die Basis für die Erzeugung einer neuen Aktivität das strukturelle und mechanistische Wissen um das ursprüngliche Enzym sowie um die angestrebte Reaktion. Nach Möglichkeit werden wichtige Merkmale der originalen aktiven Tasche, wie die Bindungstasche des Substrats oder ein Netz von Wechselwirkungen, beibehalten. Durch diesen Rückgriff auf bereits vorhandene Merkmale einer aktiven Tasche können die notwendigen Eingriffe auf ein Minimum reduziert werden, und oft genügt eine einzelne Punktmutation in der aktiven Tasche für die gewünschte Änderung der enzymatischen Funktion.

#### 3.1.1. Gegenseitige Umwandlung homologer Enzyme

Auch wenn sie unterschiedliche Reaktionen katalysieren, nutzen homologe Enzyme doch dasselbe Gerüst und denselben Mechanismus zur Ausführung des gleichen elementaren chemischen Schrittes.<sup>[9,10]</sup> Diese Ähnlichkeiten werden divergenter Evolution zugeschrieben, also der Abstammung von einem gemeinsamen Ursprung. Die steigende Zahl an Enzymstrukturen führte dazu, dass solche homologen Enzyme zu Superfamilien gruppiert wurden. Der Wechsel von Aktivitäten zwischen Mitgliedern einer Superfamilie stellt einen günstigen Ausgangspunkt für die Suche nach op-

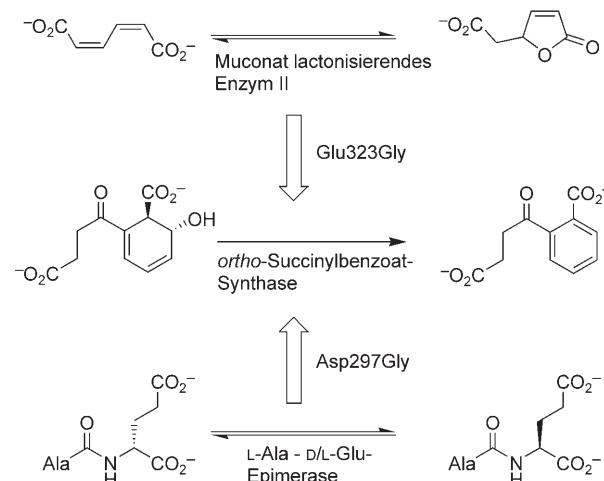
timalen Strategien zur Umgestaltung aktiver Taschen dar, weil diese Enzyme bereits prinzipiell gemeinsame strukturelle und mechanistische Eigenschaften teilen.

Die Enolase-Superfamilie ist eine der am besten charakterisierten Superfamilien. Diese Enzyme nutzen eine übliche Triosephosphat-Isomerase(TIM)-Barrel-Faltung, um Reaktionen zu katalysieren, bei denen ein Proton aus der  $\alpha$ -Position eines Carboxylat-Substrats abgespalten wird. Das entstehende Endiolat wird durch Koordinierung an ein essenzielles  $Mg^{2+}$ -Atom stabilisiert.<sup>[36]</sup> L-Ala-d/L-Glu-Epimerase (AEE), Muconat lactonisierendes Enzym II (MLE II) und *ortho*-Succinylbenzoat-Synthase (OSBS) sind Mitglieder der Enolase-Superfamilie und weisen daher strukturell ähnliche aktive Taschen mit den genannten Merkmalen auf (Abbildung 2). Um die divergente evolutionäre Beziehung inner-



**Abbildung 2.** Überlagerung der aktiven Taschen von Mitgliedern der Enolase-Superfamilie (AEE hellblau, MLE II gelb, OSBS grün); rot O, blau N, grau Mg. Gezeigt sind das Metall bindende Motiv, die für die Protonenabstraktion verantwortlichen Lysinbasen und die für die Mutagenese gewählten Reste (Asp297-AEE, Glu323-MLE II).

halb dieser Superfamilie aufzuzeigen, wurden die aktiven Taschen von AEE und MLE II so umkonstruiert, dass sie die OSBS-Reaktion katalysieren, die für beide Wildtypenzymen nicht detektierbar ist (Schema 2).<sup>[37]</sup> Zwei verschiedene Me-



**Schema 2.** Erzeugung von OSBS-Aktivität in MLE II und AEE durch Mutation eines einzigen Rests in der aktiven Tasche.

thoden wurden dazu verwendet: die positionsgerichtete Mutagenese in AEE und die zufällige Mutagenese in MLE II.

Der Strukturvergleich zwischen AEE und Wildtyp-OSBS ergab, dass zwar die katalytischen Reste sowie der  $Mg^{2+}$ -Cofaktor in beiden aktiven Taschen dieselbe Position einnehmen, dass aber die Seitenkette von Asp297 mit dem Succinylteil des OSB-Produkts in der aktiven Tasche von OSBS überlappt. Um die sterische Hinderung mit dem Substrat zu vermindern, wurde, basierend auf der Homologie mit OSBS, die Variante Asp297Gly von AEE hergestellt; tatsächlich wurde OSBS-Aktivität nachgewiesen ( $k_{cat} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 13 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[37]</sup> Parallel dazu konnte auch bei der zufälligen Mutagenese von MLE II eine Punktmutation identifiziert werden (Glu323Gly), die eine  $> 10^6$ fache Steigerung der OSBS-Aktivität mit sich brachte ( $k_{cat} = 1.5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 1.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[37]</sup> Die gefundene Mutation ist analog zur Asp297Gly-Mutation in AEE und demonstriert die Konvergenz der gefundenen Lösungen für die beiden Strategien rationales Design und zufällige Mutagenese.

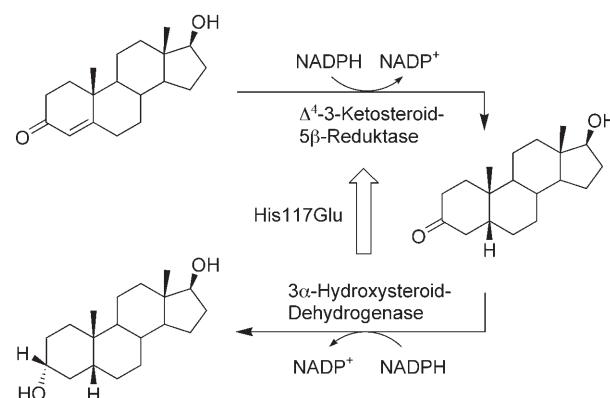
Mutation der Lysin-Reste der aktiven Taschen in Glu323Gly-MLE II und Asp297Gly-AEE zerstörte die neu gewonnenen OSBS-Aktivitäten. Da die homologen Reste in OSBS für die Aktivität wesentlich sind, stützt dieser Befund die Annahme, dass die konstruierten und die natürlichen Enzyme einen ähnlichen Mechanismus nutzen. Interessanterweise behielten Glu323Gly-MLE II und Asp297Gly-AEE ihre ursprünglichen Aktivitäten, allerdings mit reduzierter katalytischer Effizienz.

Die Effizienz der OSBS-Aktivität von Asp297Gly-AEE liegt noch immer fünf Größenordnungen unter derjenigen des OSBS-Wildtyps, eine Folgestudie zeigte jedoch, dass nach einer weiteren zufälligen Mutagenese und Selektion eine neue Doppelmutante (Ile19Phe/Asp297Gly) mit einer nochmals verbesserten Effizienz (größer als 10fach) erhalten wurde.<sup>[38]</sup> Sättigungsmutagenese von Position 19 ergab eine andere Mutation (Ile19Trp) mit einer 27fach erhöhten katalytischen Effizienz, hauptsächlich durch einen erhöhten  $k_{cat}$ -Wert relativ zur ursprünglichen Asp297Gly-Mutante. Diese Befunde zeigen, wie eine neu eingeführte Aktivität durch Optimierung der Umgebung der aktiven Tasche weiter verbessert werden kann.

Die gegenseitige Umwandlung von  $\Delta^4$ -3-Ketosteroid-5 $\beta$ -Reduktase (5 $\beta$ -Reduktase) und 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD) zeigt, dass der Wechsel von Aktivitäten über Punktmutationen auch in anderen Superfamilien erreicht werden kann. 5 $\beta$ -Reduktase und 3 $\alpha$ -HSD sind Mitglieder einer NADPH-abhängigen Aldo-Keto-Reduktase-(AKR)-Superfamilie.<sup>[39]</sup> Sie katalysieren aufeinander folgende Schritte im Metabolismus von Steroidhormonen und der Gallensäuresynthese. Das Produkt von 5 $\beta$ -Reduktase ist das Substrat von 3 $\alpha$ -HSD. Mitglieder dieser Superfamilie nutzen eine katalytische Tetrade (Tyr-Lys-Asp-Xaa) mit einem „push-pull“-Mechanismus für den Protonentransfer. Die katalytischen Tetraden beider Enzyme unterscheiden sich in der „Xaa“-Position, die einen Histidinrest in 3 $\alpha$ -HSD und einen Glutamatrest in der 5 $\beta$ -Reduktase aufweist.

Die His117Glu-Mutante von 3 $\alpha$ -HSD wurde produziert, und es konnte 5 $\beta$ -Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden ( $k_{cat} = 4.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{cat}/K_m = 220 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für Testosteron;

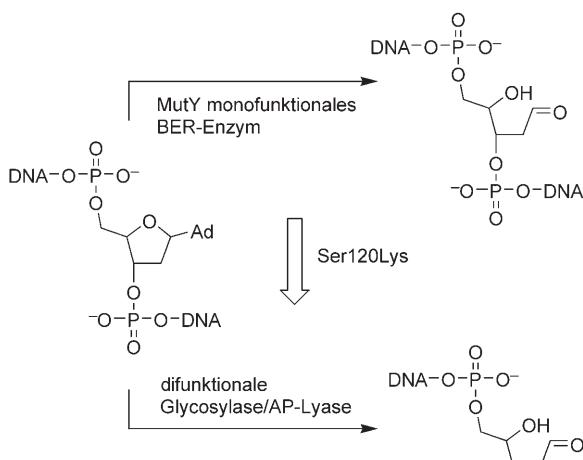
Schema 3).<sup>[40]</sup> Wie bei den oben gezeigten Beispielen zur gegenseitigen Umwandlung innerhalb der Enolase-Superfamilie wies auch die künstliche Variante von 3 $\alpha$ -HSD noch



**Schema 3.** Umwandlung von 3 $\alpha$ -HSD in 5 $\beta$ -Reduktase (zwei homologe Enzyme, die aufeinander folgende Schritte im Steroidstoffwechsel katalysieren).

immer die ursprüngliche, wenngleich um den Faktor 600 abgeschwächte Aktivität auf ( $k_{cat} = 0.95 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{cat}/K_m = 160 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für 5 $\beta$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3-on). Die Einfachheit der Umwandlung dieser Enzyme stützt die Hypothese, dass die Evolution einiger Stoffwechselwege einem ähnlichen Mutationsverlauf gefolgt ist, wobei eine Rückwärtsentwicklung stattgefunden hat.<sup>[41]</sup>

Aktivitätsumwandlungen zwischen Mitgliedern von Superfamilien können auch in die andere Richtung erfolgen, also ein Enzym generieren, welches das Produkt seiner ursprünglichen Aktivität als Substrat für einen darauf folgenden Schritt des Stoffwechselwegs verwenden kann. Basenexzisionsreparatur(BER)-Enzyme sind an der Reparatur oxidativer DNA-Schäden beteiligt.<sup>[42]</sup> Zu den Mitgliedern dieser Superfamilie zählen die monofunktionalen Glycosylasen mit Basenexzisionsaktivität und difunktionale Enzyme, die ebenfalls Strangspaltungen katalysieren (difunktionale Glycosylase/apurinisch-apyrimidinische (AP)-Lyasen). Difunktionale BER-Enzyme enthalten einen konservierten Lysinrest in der aktiven Tasche, der für die Katalyse der Strangspaltung wichtig ist. Sequenzabgleiche weisen darauf hin, dass monofunktionalen Glycosylasen der BER-Superfamilie dieser Lysinrest fehlt. So wurde MutY, ein monofunktionaler BER-Enzym, das fehlgepaarte Adeninbasen entfernt, durch das Einsetzen eines passend platzierten Lysinrests mittels positionsgerichteter Mutagenese in eine difunktionale Glycosylase/AP-Lyase umgewandelt (Schema 4).<sup>[43]</sup> In dieser Mutante, Ser120Lys-MutY, waren beide Reaktionsgeschwindigkeiten ähnlich, allerdings war die Glycosylase-Aktivität 20-mal geringer als die des Wildtyps. Diese MutY-Variante katalysierte also zwei aufeinander folgende Schritte in der DNA-Reparatur (die Glycosylase sowie die AP-Lyase), ein Befund, der an das Resultat der Umwandlung der Aktivitäten in der AKR-Superfamilie erinnert (His117Glu-3 $\alpha$ -HSD katalysiert die ursprüngliche Reaktion sowie den vorangehenden Schritt im gleichen Stoffwechselweg). Solche difunktio-



**Schema 4.** Umwandlung eines monofunktionalen BER-Enzyms in ein difunktionales Enzym durch Homologie-basierte Mutation der aktiven Tasche.

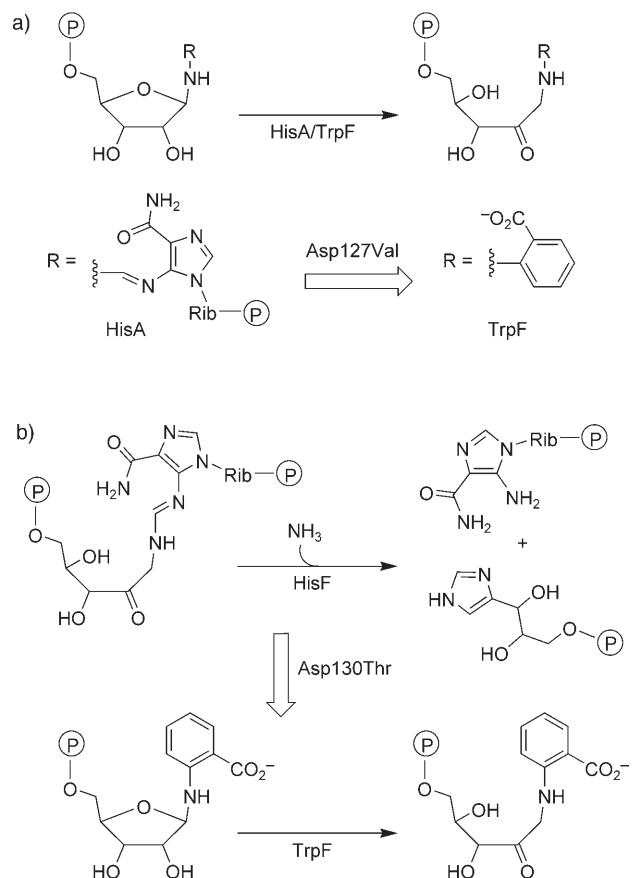
nalen Enzyme sind plausible Intermediate bei der Entwicklung der Stoffwechselwege.

Die Umwandlung von katalytischen Aktivitäten zwischen homologen Enzymen kann auch zu „cross-talk“ zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen führen. Die Enzyme HisA und HisF katalysieren aufeinander folgende Schritte in der Biosynthese von Histidin, und beide Enzyme sind homolog zu TrpF, einem Enzym der Tryptophan-Biosynthese (Schema 5). Mutation einer einzigen, analogen Aminosäure führt bei HisA und HisF zu TrpF-Aktivität.<sup>[44]</sup> Die Übertragung von TrpF-Aktivität auf diese Proteine erfordert den Austausch eines negativ geladenen Aspartatrests gegen einen anderen Rest, z. B. Valin, Threonin oder Prolin.

HisA und TrpF katalysieren beide Amadori-Umlagerungen, allerdings mit unterschiedlichen Substraten. Daher entspricht die Umwandlung formal nur einer Änderung der Substratspezifität. HisF hingegen katalysiert einen anderen Reaktionstyp (eine Aminolyse/Cyclisierung), allerdings mit schwach promiskuitiver HisA-Aktivität. Während die HisA-Varianten 10- bis 20fach höhere Aktivität als die HisF-Varianten aufweisen, erforderte das Umschalten der Spezifität der untergeordneten promiskuitiven Aktivität in HisF dieselben Anpassungen der Struktur der aktiven Tasche wie in HisA, das schon für die Ausführung der Zielumwandlung optimiert war. Daher könnten HisA, HisF und TrpF aus einem urzeitlichen Vorfahren hervorgegangen sein, der unterschiedliche Funktionen in unabhängigen Stoffwechselwegen ausgeübt hatte.

### 3.1.2. Einbau von katalytischer Maschinerie

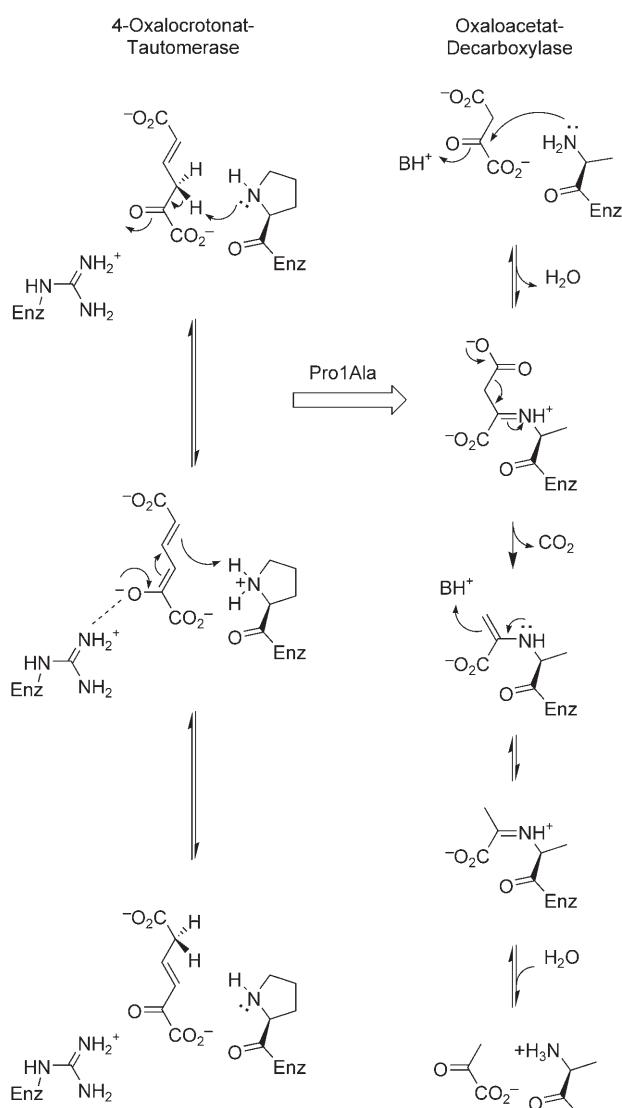
Bei der Umgestaltung aktiver Taschen für die Durchführung neuartiger Transformationen hilft es, die bereits bestehende katalytische Maschinerie wiederzuverwerten, um so die Zahl benötigter Mutationen zu minimieren, wie dies im vorigen Abschnitt für die Umwandlung von Aktivitäten innerhalb von Superfamilien beschrieben wurde. Manchmal ist es allerdings auch möglich, neue mechanistische Bestandteile durch eine oder mehrere Punktmutationen gezielt einzubauen.



**Schema 5.** Übertragung von TrpF-Aktivität auf HisA und HisF. a) Die Umwandlung von HisA in TrpF umfasst eine Änderung der Substratspezifität. b) Die Umwandlung von HisF in TrpF erfordert Änderungen sowohl in der Substrat- als auch in der Reaktionsspezifität.

en. In diesem Fall ist die ursprüngliche aktive Tasche bereits für die Substratbindung prädisponiert, und die zusätzlich eingeführten Reste erzielen die gewünschte Reaktivität im sonst unverändert belassenen Enzym-Substrat-Komplex.

Ein Beispiel für die Einführung einer katalytischen Maschinerie mit dem Ziel, eine neue Reaktion zu ermöglichen, ist die Erzeugung einer Oxaloacetat-Decarboxylase-Aktivität in 4-Oxalocrotonat-Tautomerase (4-OT). In kleinen Molekülen<sup>[45]</sup> oder Peptidmodellen<sup>[46]</sup> erfordert die Katalyse der Decarboxylierung von Oxaloacetat nur die Bildung einer Schiff-Base zwischen dem Substrat und einem primären Amin (Schema 6). Das Enzym 4-OT bildet normalerweise kein kovalentes Intermediat mit seinem Substrat, sondern nutzt das sekundäre Amin von Pro1 als Säure/Base.<sup>[47]</sup> Um die Katalyse von Oxaloacetat-Decarboxylierung mittels intermediärer Iminbildung zu ermöglichen, wurde eine einzige Punktmutation in der aktiven Tasche von 4-OT (Pro1Ala) eingeführt. Diese Mutation sollte ein primäres Amin einführen, ohne die Fähigkeit zu beeinträchtigen,  $\alpha$ -Ketocarboxylate zu binden.<sup>[48]</sup> Diese Mutante zeigte im Unterschied zum Wildtyp in der Tat Oxaloacetat-Decarboxylase-Aktivität ( $k_{cat} = 0.08 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m = 114 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Die Aktivität von Pro1Ala-4-OT ist 4700-mal niedriger als diejenige natürlicher Oxaloacetat-Decarboxylasen. Die 4-OT-Variante ist jedoch mehr als 30-mal aktiver als Modellpeptidkatalysatoren dieser



**Schema 6.** Mechanismen der Wildtyp-4-Oxalocrotonat-Tautomerase und der Pro1Ala-Oxaloacetat-Decarboxylase.

Reaktion,<sup>[46]</sup> was bedeutet, dass ein signifikanter Beitrag vom Proteingerüst beigesteuert wird.

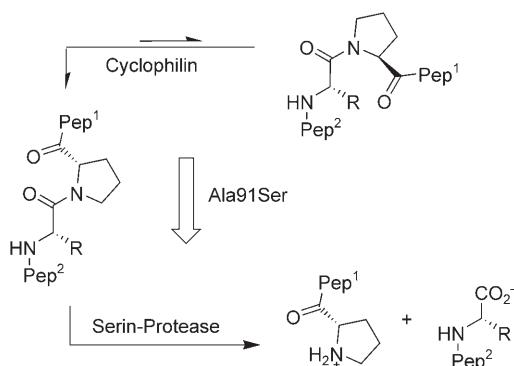
Da bei dieser Strategie die katalytische Maschinerie (oder zumindest ein Teil davon) erst eingefügt wird, ist keine vorangehende Enzymaktivität des Gerüsts erforderlich. Die Einführung eines einzigen reaktiven Rests in das katalytisch inerte Phospho(serin/threonin/tyrosin)-bindende Protein (STYX) zum Beispiel brachte Phosphatase-Aktivität mit sich.<sup>[49]</sup> Die Reste, die an der Bindung des Liganden an STYX beteiligt sind, sind in der Enzymklasse der Doppelspezifitäts-Phosphatasen (dsPTPAsen), die phosphorylierte Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste hydrolysieren, meistens konservert. Ein Unterschied zwischen dsPTPAsen und STYX besteht in dem Austausch eines Cysteinrests in der aktiven Tasche der dsPTPase gegen einen Glycinrest in STYX. Es wurde vermutet, dass diese Stelle im betreffenden Gerüst als Aktivitätsschalter wirkt. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass die Gly120Cys-Mutante von STYX die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat ( $k_{\text{cat}} = 4.6 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 490 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )

sowie die Dephosphorylierung von Phosphotyrosin und Phosphothreonin in einem diphosphorylierten MAP-Kina-sepeptid katalysiert (MAP = Mitogen-aktiviertes Protein).

Wie im Zusammenhang mit Selenosubtilisin erwähnt, kann der Austausch eines Rests in der aktiven Tasche zu einem Enzym mit neuen Redoxeigenschaften führen. Diese Methode zur Erzeugung von Peroxidasen ist nicht auf das Subtilisingerüst beschränkt, sondern wurde auch eingesetzt, um Thiol-abhängige Peroxidase-Aktivität auf phosphorylierende Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)<sup>[50]</sup> und Glutathion-S-Transferase (GST) von *Lucilia cuprina*<sup>[51]</sup> zu übertragen. Durch den Einbau eines Selenocysteinrests in die aktive Tasche von GST konnte die Stabilisierung des neuen kovalenten Zwischenprodukts von der spezifischen Bindungstasche für das Substrat profitieren, das auch schon Substrat der ursprünglichen Reaktion war. Wie bei den vorangegangenen Beispielen von künstlichen Selenoproteinen wurde auch für die Seleno-GST-Variante eine effiziente  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktion nachgewiesen ( $k_{\text{cat}} = 39.2 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , bei  $[\text{GSH}] = 2.00 \text{ mM}$ ). Tatsächlich ist die katalytische Effizienz von Seleno-GST nur um zwei Größenordnungen geringer als die von natürlicher Glutathion-Peroxidase ( $k_{\text{cat}}/K_m = 1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[52]</sup> Dies ist erstaunlich, weil Glutathion-Peroxidase als fast perfekt evolviert für die Reduktion von Hydroperoxiden angesehen wird.

Die Flexibilität des GST-Gerüsts wurde zusätzlich durch die Umwandlung von GST A1-1 in eine Thioesterase demonstriert.<sup>[53]</sup> In diesem Fall führt die Zugabe von *S*-Glutathionylbenzoat zum Wildtyp zum nucleophilen Angriff eines Tyrosinrests der aktiven Tasche an das Substrat unter Bildung eines inerten Enzym-Substrat-Konjugats. Mithilfe von Strukturinformationen wurde eine Variante entworfen, in der ein strategisch positionierter Histidinrest die Hydrolyse des zuvor inerten Addukts fördern sollte. Die katalytischen Möglichkeiten von Histidin wurden zusätzlich durch den Einbau dieses Rests in die aktive Tasche einer Glycosid-Hydrolase genutzt.<sup>[54]</sup> Der Histidinrest greift dort das Substrat nucleophil an, wobei eine neue Transglycosidase-Aktivität gefördert und die ursprüngliche Aktivität unterbunden wird.

Die Hydroxygruppe von Serin ist unter physiologischen Bedingungen normalerweise kein gutes Nucleophil. Natürliche Enzyme, die Serin als Nucleophil einsetzen, haben präzise Netzwerke elektrostatischer Wechselwirkungen entwickelt, um diesen Rest zu aktivieren. Trotzdem reichte der Einbau eines Serinrests in die aktive Tasche von Cyclophilin (ECyp) mithilfe von rationalem Design aus, um Protease-Aktivität auf dieses Gerüst zu übertragen (Schema 7).<sup>[55]</sup> Cyclophilin katalysiert die *cis-trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen in Peptiden (wobei Xaa jede Aminosäure außer Prolin sein kann), und daher ist die aktive Tasche bereits zur Erkennung dieser Substrate geeignet. Die Analyse der Struktur des Komplexes mit Prolyl enthaltenden Peptiden führte zum Entwurf der Ala91Ser-Mutante, die Amidbindungen hydrolysierte ( $k_{\text{cat}} = 0.044 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 73 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Um die gefundene Aktivität weiter zu erhöhen, wurden Histidin- und Aspartatreste in zum eingebauten Ser91 benachbarten Positionen eingefügt. Dies sollte die für natürlich evolvierte Proteasen typische katalytische Triade Ser-His-Asp imitieren. Die Dreifachmutante Ala91Ser/



**Schema 7.** Umwandlung der Peptid-Isomerase Cyclophilin in eine Serin-Protease.

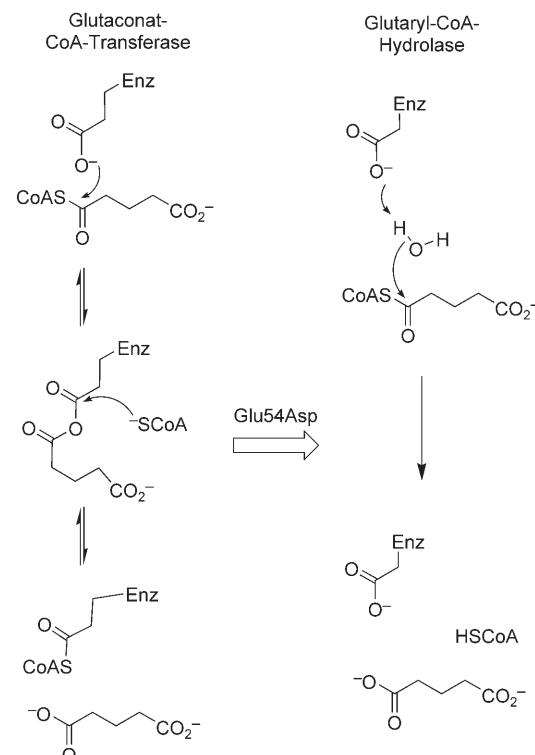
Phe104His/Asn106Asp-ECyP (Cyproase) wies tatsächlich eine verbesserte Aktivität für ein chromogenes Substrat mit Ala-Pro-Peptidbindung auf ( $k_{\text{cat}} = 4.0 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 1.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Cyproase war spezifisch für Xaa-Pro-Peptidbindungen, was zeigte, dass die Substratspezifität der aktiven Tasche intakt geblieben war. Der Erfolg dieser Strategie basierte auf der Tatsache, dass die Mutanten die ursprüngliche Fähigkeit beibehielten, die Carbonylbindung der Xaa-Pro-Peptidbindung zu polarisieren.

Anhand der oben aufgeführten Beispiele von Cyproase und den anderen konstruierten Enzymen konnte gezeigt werden, dass die Enzymreaktivität – unter Nutzung von Substratbindungseigenschaften vorhandener aktiver Taschen – mithilfe einer einzigen Mutation auf eine definierte Weise derart verändert werden kann, dass eine neue Reaktion nach einem völlig anderen Mechanismus katalysiert wird. Der Einbau einer katalytischen Triade in Cyclophilin demonstriert weiterhin, dass wenige zusätzliche Mutationen die Mikroumgebung um den eingeführten Rest (die zweite Schale der aktiven Tasche) vorhersehbar beeinflussen können, um dessen chemische Eigenschaften gezielt zu optimieren.

### 3.1.3. Entfernen nucleophiler Reste: Addition durch Subtraktion

Alternativ zum Hinzufügen von reaktiven Gruppen kann auch ihr Entfernen aus einer aktiven Tasche zu neuen katalytischen Aktivitäten führen. Effiziente Enzymkatalyse ergibt sich normalerweise aus dem Zusammenspiel mehrerer reaktiver Gruppen, die in der aktiven Tasche gruppiert sind. Häufig hat die Mutation eines nucleophilen Rests katastrophale Konsequenzen für die Aktivität, weil ein wesentlicher Schritt des katalytischen Mechanismus (wie die Erzeugung eines kovalenten Zwischenprodukts) fehlt. Meistens können die bleibenden Reste der aktiven Tasche trotzdem mit dem Substrat wechselwirken (und reagieren). Daher könnte eine Enzymvariante, die ein notwendiges Nucleophil für ihre ursprüngliche Aktivität fehlt, nun eine andere chemische Umwandlung katalysieren, und zwar mit einem Mechanismus, der zuvor durch den nucleophilen Angriff am Substrat verhindert wurde.

Ein Beispiel hierfür ist die Glu54Asp-Mutation in Glutacanat-CoA-Transferase aus *Acidaminococcus fermentans*.<sup>[56]</sup> Der Wildtyp katalysiert die reversible Übertragung von Coenzym A (CoA) von Glutaryl-CoA auf Acetat, indem vorübergehend ein Thioester zwischen Glu54 und CoA gebildet wird. Die Mutation dieses Rests zu Aspartat resultierte in einer inaktiven Transferase, aber gleichzeitig hydrolysierte die neue Variante Glutaryl-CoA mit beeindruckender Effizienz ( $k_{\text{cat}} = 16 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Schema 8). Das

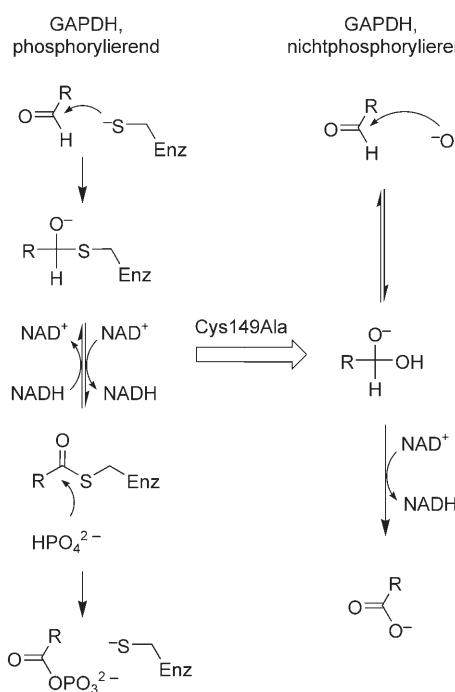


**Schema 8.** Mechanismen der Wildtyp-Glutaconat-CoA-Transferase und der Glu54Asp-Variante mit Glutaryl-CoA-Hydrolase-Aktivität.

Entfernen einer Methylengruppe aus der Seitenkette des Rests 54 unterdrückt offensichtlich den ursprünglichen nucleophilen Mechanismus, da das Carboxylat den Thioester von Glutaryl-CoA nicht mehr erreichen kann. Stattdessen wird wahrscheinlich ein Wassermolekül vom eingebrachten Aspartatrest zur Addition an das Substrat aktiviert. Diese Mutante imitiert die Wirkungsweise von Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae*, einem verwandten Enzym, in dem ein Aspartatrest ähnlich zu Glu54 in Gluconat-CoA-Transferase positioniert ist.

Anstatt eine essenzielle nucleophile Gruppe eines Enzyms nur zu verkürzen, kann man sie auch entfernen, um eine neue katalytische Aktivität zu erzielen. Eine Cystein-zu-Alanin-Mutation (Cys149Ala) in GAPDH ergab eine nicht-phosphorylierende Dehydrogenase-Aktivität.<sup>[57]</sup> Der Mechanismus der oxidativen Phosphorylierung durch GAPDH beginnt mit der Erzeugung eines Thiohemiacetal-Intermediats. Oxidation dieses Intermediats durch  $\text{NAD}^+$  erzeugt einen Thioester. Acyltransfer auf anorganisches Phosphat schließt

die Reaktion ab und regeneriert das Enzym für einen weiteren Katalysezyklus (Schema 9). Das Entfernen der Thiolgruppe an Position 149 verhindert den nucleophilen Angriff



**Schema 9.** Phosphorylierender und nichtphosphorylierender Mechanismus von Wildtyp-GAPDH und Cys149Ala-GAPDH.

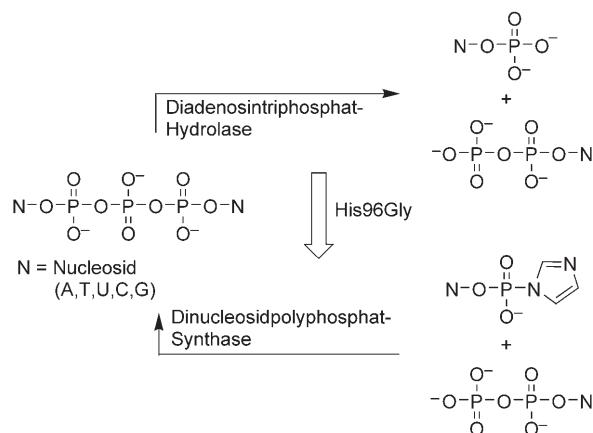
am Substrat und somit die Katalyse der oxidativen Phosphorylierung. Allerdings verhindert das Entfernen der Thiolgruppe nicht die Bindung des Ausgangsmaterials und führt zur Entstehung eines Hydrats in der aktiven Tasche durch Addition von Wasser an das Substrat. Oxidation dieses Hydrats durch NAD<sup>+</sup> bildet als neues Produkt ein Carboxylat.

Während diese Mutante die Fähigkeit verlor, ein kovalentes Intermediat mit dem Substrat zu formen, behielt sie doch die Fähigkeit, als Oxidase, allerdings mithilfe eines veränderten Mechanismus, effizient eine andere chemische Gesamtreaktion zu katalysieren ( $k_{\text{cat}} = 5.2 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Auf ähnliche Weise wurde das Entfernen einer reaktiven Gruppe genutzt, um die Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen mithilfe einer Lipase durchzuführen; der Mechanismus ist bislang jedoch unklar.<sup>[58]</sup>

Die Entstehung neuer katalytischer Aktivität durch Entfernen von Nucleophilen der aktiven Tasche scheint nichts Ungewöhnliches zu sein. Ein weiteres Beispiel ist die Cys161Gln-Mutation in der  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase-Domäne der Fettsäure-Synthase von Ratten.<sup>[59]</sup> Der Wildtyp katalysiert den decarboxylierenden Transfer einer Malonylgruppe (oder Methylmalonylgruppe) von Acylcarrier-Protein (ACP) zur enzymgebundenen Acylkette, einer Fettsäurevorstufe. In Abwesenheit eines Acceptors findet die Decarboxylierung der Malonylgruppe nur langsam statt, weil sie nicht mehr mit dem Acyltransfer gekoppelt ist. Die Cys161Gln-Variante, die

nicht mit dem Acceptor beladen werden kann, verstärkt die Decarboxylierung um mehr als zwei Größenordnungen. Wichtig ist, dass die Mutation von Cys161 zu Serin oder Asparagin (oder anderen Aminosäuren) die Malonatdecarboxylierung relativ zum Wildtyp nicht erhöhte. In diesem Fall hing die erfolgreiche Umgestaltung nicht nur vom Entfernen des Nucleophils ab, sondern erforderte auch besondere Rücksicht auf die strukturellen oder funktionellen Aspekte beim Ersatz des ausgetauschten Rests.

Im Fall der Diadenosintriphosphat-Hydrolase führte die Mutation des Nucleophils His96 zu Glycin zur Katalyse der Bildung von Polyphosphatbindungen über den Transfer eines Nucleosidphosphats von Imidazol auf ein Nucleosiddi- oder Nucleosidtriphosphat (Schema 10).<sup>[60]</sup> Die Wahl von Glycin



**Schema 10.** Umwandlung einer Triphosphat-Hydrolase in eine Polyphosphat-Synthase durch eine einzelne Mutation.

als Histidinersatz war wohl entscheidend für die Bildung einer Bindungstasche für den Imidazolteil des Nucleosid-5'-phosphoimidazolid-Substrats. Dieses Beispiel erinnert an die Umwandlung der Protease Subtilisin in eine Peptidbindungs-Ligase<sup>[20]</sup> und an die „chemical rescue“-Experimente,<sup>[61]</sup> in denen eine essenzielle Gruppe einer aktiven Tasche durch Mutagenese entfernt und das Enzym durch ein kleines Molekül, das die fehlende funktionelle Gruppe enthält, (teilweise) reaktiviert wird.

Das Entfernen eines Nucleophils ermöglichte auch die Umwandlung von Glycosidasen in Ligasen (Glycosynthetasen), die mögliche Anwendungen in der Oligosaccharidsynthese haben. Konfigurationserhaltende Glycosidasen nutzen eine difunktionale aktive Tasche, die eine nucleophile Gruppe und einen Säure/Base-Katalysator enthält. Das kovalente Zwischenprodukt muss sich zwischen dem Glycosyltransfer und der Hydrolyse entscheiden, was für präparative Anwendungen problematisch sein kann. Ersetzen des Glutamat-Nucleophils in  $\beta$ -Glucosidase/Galactosidase oder  $\beta$ -Mannosidase durch einen Alanin- oder Serinrest verhinderte die Bildung des kovalenten Glycosyl-Enzym-Intermediats und somit auch dessen Hydrolyse.<sup>[62]</sup> Die konstruierte Variante katalysierte jedoch die Transglycosylierung von aktivierten  $\alpha$ -Glucosylfluoriden mit unterschiedlichen Zuckern durch direkte S<sub>N</sub>2-

Substitution.<sup>[63]</sup> Auch das Ersetzen der Säure/Base-Funktionalität durch Alanin zerstörte die Glycosidase-Aktivität in ähnlicher Weise, ermöglichte aber die Bildung des kovalenten Intermediats, das unter Zugabe von recht nucleophilen Thiozuckern abgefangen werden und somit zur Synthese von Thioglycosiden eingesetzt werden konnte.<sup>[64]</sup> Eine Variante, die beide Mutationen vereint, katalysierte die Bildung von Thioglycosiden aus  $\alpha$ -Fluor- und Thiozuckern. Es scheint, als würde der Bindungsapparat der umgestalteten aktiven Tasche intakt bleiben und als sei der katalytische Effekt dieser Mutanten auf das bloße Zusammenbringen der Substrate zurückzuführen (Substratapproximation).

### 3.2. Reaktionskontrolle reaktiver Zwischenprodukte

Viele Reaktionen verlaufen über die Bildung reaktiver Zwischenprodukte, die sich ohne Kontrolle in komplexe Produktgemische aufteilen können. Enzyme bilden in der aktiven Tasche jedoch eine Umgebung, die die Intermediate entlang bestimmter Reaktionspfade leitet. Die Kontrolle der Produktverteilung durch kinetische Partitionierung kann sowohl durch Begünstigung eines Reaktionspfades als auch durch Verhindern alternativer Reaktionspfade geschehen. Auf diese Weise erreichen Enzyme Reaktionsspezifität. Zusätzlich können intrinsisch ungünstige Reaktionen durch die Kanalisierung instabiler Zwischenprodukte in entsprechende Reaktionspfade gefördert werden. Dies ist besonders wichtig für préparative Anwendungen von Biokatalysatoren.<sup>[65]</sup>

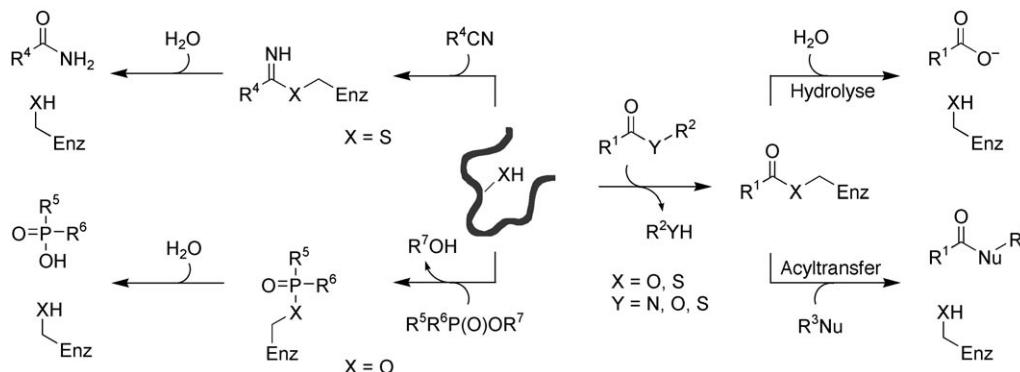
Eingriffe in aktive Taschen zur Unterbrechung von Reaktionswegen enzymgebundener Zwischenprodukte sind eine gängige Taktik der mechanistischen Enzymologie, um die Weiterreaktion der Zwischenprodukte zu blockieren und somit ihre Auftrennung und strukturelle Beschreibung zu erleichtern. Es gibt zahlreiche Beispiele solcher Modifikationen.<sup>[11]</sup> Normalerweise enthalten sie den Austausch eines katalytisch notwendigen Rests durch einen inerten Rest wie Alanin. Manchmal kann die Umgestaltung der aktiven Tasche jedoch weiter gehen und nicht nur einen der Schritte des ursprünglichen Mechanismus blockieren, sondern einen neuen Reaktionspfad für das Zwischenprodukt eröffnen und somit zur Bildung eines neuen Produkts führen.

#### 3.2.1. Kanalisierung kovalenter Enzym-Substrat-Zwischenprodukte in neue Richtungen

Die Reaktivitäten von acylierten Enzymen standen im Zentrum zahlreicher Experimente zur Umgestaltung aktiver Taschen. Viele Hydrolasen, Amid- und Ester-Ligasen gehen Acyltransferreaktionen mit ihren Substraten ein (Schema 11). Diese Umwandlungen beinhalten oft die Bildung von Acyl-Enzym-Zwischenprodukten. Einfache Mutationen in der aktiven Tasche können, wie wir im Fall von Thiolsubtilisin gesehen haben, einen starken Einfluss auf solche Spezies ausüben.

Die Umwandlung einer Hydrolase in eine Ligase läuft auf die Konkurrenz zwischen Acyltransfer vom Enzym auf den vorgesehenen Acceptor (Ligation) oder auf Wasser (Hydrolyse) hinaus. Ein einschlägiges Beispiel ist mit der Ser101Cys/His237Arg-Mutante von Thioesterase II aus der Brustdrüse von Ratten gegeben, die eine Acyl-Transferase-Aktivität zeigt.<sup>[66]</sup> In diesem Fall führte die Acylierung des eingeführten Cysteinrests durch ein aktiviertes Estersubstrat, *p*-Nitrophenyldecanoat, zur Bildung eines langsam hydrolysierenden Thioester-Intermediats. In Gegenwart von Thiolen wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder CoA katalysiert die acyierte Enzymvariante jedoch eine effiziente Transthioveresterung und bildet das Thioesterprodukt. Der  $k_{cat}$ -Wert von  $0.91\text{ s}^{-1}$  (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol als Nucleophil) für die Thioester-Ligase-Aktivität der Doppelmutante lässt sich gut mit der Thioesterase-Aktivität des Wildtyps vergleichen ( $k_{cat} = 0.11\text{ s}^{-1}$ ). Die Mutation Ser101Cys allein genügt zur Erzeugung von Acyl-Transferase-Aktivität, während die His237Arg-Mutation die Aktivität weiter erhöht, indem sie hilft, die Hydrolyse des Zwischenprodukts zu unterdrücken.

Einige Hydrolasehemmer bilden kovalente, schwer spaltbare Addukte mit den nucleophilen Resten der aktiven Tasche. Durch minimale Umgestaltung der aktiven Tasche können solche Inhibitoren häufig zu Substraten mit neuen Reaktivitäten werden, indem der unreaktiven Spezies erneut ein Reaktionspfad eröffnet wird. Beispielsweise sind Nitrile als reversible Hemmstoffe von Cystein-Proteasen wie Papain bekannt, da sie mit dem katalytisch essenziellen Cysteinrest unter Bildung recht stabiler Thioimidate reagieren (Schema 11). In der aktiven Tasche ist die Rückreaktion des unprotonierten Thioimidats zum Nitril schneller als die Hydrolyse des Thioimidats. Dies wird verständlich, wenn man



**Schema 11.** Verschiedene Beispiele für die Reaktionskontrolle von Acylenzym-Intermediaten.

bedenkt, dass aus der Reaktivität in Lösung bekannt ist, dass die Hydrolyse von Thioimidaten säurekatalysiert verläuft, während die Thioesterhydrolyse in der aktiven Tasche basisenkatalysiert ist.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte die Thioimidathydrolyse-Aktivität von Papain erhöht werden, indem ein neuer Rest eingeführt wurde, der in der Lage ist, ein Proton auf das Stickstoffatom des Thioimidats zu übertragen.<sup>[67]</sup> Anhand von Strukturinformationen wurde Gln19, das ein Teil der Oxyaniontasche ist, ausgewählt und zu Glutaminsäure mutiert, was sowohl  $k_{\text{cat}}$  ( $4 \times 10^5$  fach) wie auch  $k_{\text{cat}}/K_m$  ( $4 \times 10^4$  fach) der Nitril-Hydratase-Aktivität relativ zum Wildtyp verbesserte. Das Amidprodukt wiederum kann als neues Substrat wirken, allerdings ist die Amidase-Aktivität dieser Papainvariante geschwindigkeitsbestimmend, sodass das Amid akkumuliert. Gln19Glu-Papain hat Anwendung in der Synthese von Amidrazon gefunden.<sup>[68]</sup>

Die Allgemeingültigkeit dieses Konzepts wird durch ein weiteres Beispiel belegt, bei dem eine Nitril-Hydratase-Aktivität auf die Asparagin-Synthetase B übertragen wurde.<sup>[69]</sup> Asparagin-Synthetase B ist eine Amido-Transferase, die zwar einen nucleophilen Cysteinrest enthält, darüber hinaus jedoch bezüglich Gesamtstruktur und Sequenz keine signifikante Verwandtschaft zu den Cystein-Proteasen aufweist. Eine einzige Mutation (Asparagin zu Asparaginsäure) erhöhte die Nitril-Hydratase-Aktivität um mehr als den Faktor 2500, während die ursprüngliche Glutaminase-Aktivität um mehr als den Faktor 5000 abnahm. Dieser Befund deutet auf einen analogen Nitril-Hydratase-Mechanismus wie bei der Gln19Glu-Variante von Papain hin.

Auch durch das Eröffnen neuer Reaktionspfade für inerte Enzymkonjugate können neue katalytische Aktivitäten generiert werden. Zum Beispiel stattet eine einzelne Mutation (Gly117His) die menschliche Butyrylcholin-Esterase mit der Fähigkeit aus, Organophosphatverbindungen zu hydrolysieren.<sup>[70]</sup> Die Gegenwart solcher Verbindungen führt zur irreversiblen Hemmung natürlicher Cholin-Esterasen durch die Bildung eines hydrolyseresistenten Phosphoesters mit dem nucleophilen Serinrest der aktiven Tasche (Schema 11). Folglich wurde diese Klasse von Inhibitoren als Pestizide, Arzneimittel und Nervengase (Sarin und VX) eingesetzt. Die Esterase-Aktivität der Gly117His-Variante weist eine zeitabhängige Reaktivierung nach Behandlung mit Sarin oder VX auf, was auf die Fähigkeit der Mutante hindeutet, die kovalente Phosphoesterbindung zum Inhibitor zu hydrolysieren. Tatsächlich wurde gezeigt, dass diese Mutante die Hydrolyse zahlreicher Organophosphorverbindungen (wie den Phosphotriester Paraoxon,  $k_{\text{cat}} = 0.013 \text{ s}^{-1}$ ) bis zu  $10^6$  fach gegenüber den unkatalysierten Reaktionen beschleunigen kann. Die natürlichen Phosphotriesterasen sind etwa  $10^3$ – $10^5$  mal aktiver als diese Variante, allerdings nutzen sie auch einen grundlegend anderen, metallabhängigen Katalysemechanismus.<sup>[71]</sup> Es ist nicht völlig klar, nach welchem Mechanismus Gly117His-Butyrylcholin-Esterase die Hydrolyse der Organophosphatester katalysiert, doch im ersten Schritt reagiert das Serin der aktiven Tasche sicherlich analog zur Inaktivierung des Wildtyps mit dem Organophosphorsubstrat. Das nahe der Oxyaniontasche neu eingeführte His117 fördert wohl die Hydrolyse des Phosphoester-Intermediats;

zu erreichen wäre dies entweder durch das korrekte Positionieren eines Wassermoleküls für einen nucleophilen Angriff am Phosphoratom oder durch eine Verzerrung des Phosphoester-Intermediats, sodass dieses für einen nucleophilen Angriff besser zugänglich ist.

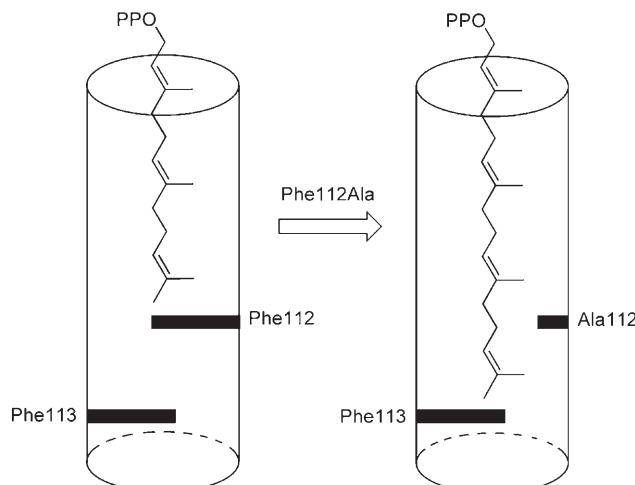
Völlig unterschiedliche Enzyme, die nur ein einziges gemeinsames mechanistisches Merkmal aufweisen, nämlich die Bildung eines kovalenten Zwischenprodukts, können also neue Aktivitäten gewinnen, indem sie die Verteilung auf die Reaktionspfade, entlang derer die Zwischenprodukte umgesetzt werden, beeinflussen. Alternative Reaktivitäten können dabei aus der Beschleunigung ungünstiger und/oder aus dem Unterdrücken günstiger Reaktionskanäle entspringen. Erfolg versprechende Angriffspunkte für Mutationen sind die Nucleophile aktiver Taschen oder Reste in der direkten Nachbarschaft zum Zwischenprodukt; chemische Intuition ist hier ein wichtiges Hilfsmittel.

### 3.2.2. Kontrolle der Produktbildung

Viele Enzyme sind darauf ausgelegt, ihre Substrate durch eine komplexe Vielfalt möglicher Reaktionen zu navigieren. Folglich können neue katalytische Aktivitäten nicht nur wie oben beschrieben durch Änderungen der Reaktivität eines Enzyms mit seinem Substrat oder Intermediat erzielt werden – Enzyme können auch so umgestaltet werden, dass sie die Bildung von neuen Produkten unter Beibehaltung ihren natürlichen Substrate und Mechanismen katalysieren. Veränderte Produktspezifitäten wurden durch Modifizieren von Größe und Form der aktiven Tasche oder Stellung der katalytischen Reste relativ zum Substrat erzielt.

#### 3.2.2.1. Veränderung des Polymerisationsgrads

Die Produktgröße einiger Enzym-katalysierter Polymerisationen ist durch die Ausmaße der Reaktionstasche definiert. In diesen Fällen könnte die Polymerlänge auf (qualitativ) vorhersagbare Weise durch Variieren der Taschengröße verändert werden. Eine größere Tasche sollte ein Produkt mit höherer, eine kleinere Tasche ein Produkt mit niedrigerer Kettenlänge ergeben. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Isoprenyldiphosphat-Synthasen ausgewählt, weil sie die mehrfache Addition von Isopentenyldiphosphat(IPP)-Einheiten an Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) mit enger Produktverteilung katalysieren. Um Änderungen in den Produktverteilungen zu erreichen, wurde die Struktur und Sequenz von Farnesylidiphosphat-Synthase ( $C_{15}$ ; Geranyl-Transferase) mit Isoprenyldiphosphat-Synthasen verglichen, die an der Synthese von Isoprenoiden verschiedener Kettenlängen beteiligt sind.<sup>[72]</sup> Diese Analyse deutete darauf hin, dass die Reste Phe112 und Phe113 in der Geranyl-Transferase die Größe der Bindungstaschen für die wachsende Isoprenoidkette festlegen (Abbildung 3). Mutationen, die die Größe dieser Reste verringerten, führten zu Produkten mit höherer Kettenlänge, wie Geranylgeranyldiphosphat ( $C_{20}$ ; Phe112Ala), Geranylgeranylgeranyldiphosphat ( $C_{25}$ ; Phe113Ser) und sogar noch längeren Isoprenoiddiphosphaten (Phe112Ala/Phe113Ser). Umgekehrt wurden zwei andere Varianten (Ala116Trp und Asn144Trp) entworfen, um den



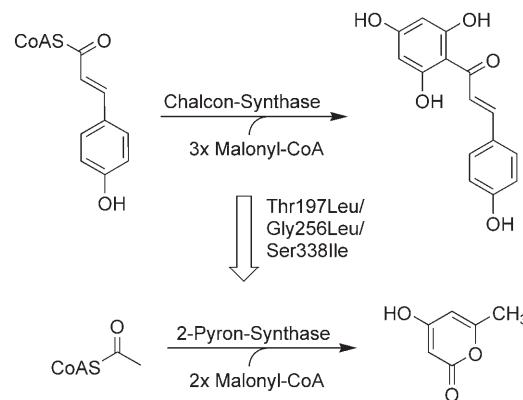
**Abbildung 3.** Farnesyldiphosphat-Polymerase; Faktoren, die die Produktlänge bestimmen. PP = Diphosphat.

verfügbarer Platz in der Produktbindungstasche zu verringern, was zum kleineren Geranyldiphosphat ( $C_{10}$ ) führte.<sup>[73]</sup> Substitutionen einzelner Aminosäuren haben auch die Produktverteilung anderer mittelkettiger Isoprenyldiphosphat-Synthasen verändert,<sup>[74]</sup> was darauf schließen lässt, dass sich dieser Ansatz generell zur Manipulation der Produktgröße zumindest bei dieser Enzymklasse eignet.

Kontrolle über die Produktkettenlänge ist auch entscheidend in der Biosynthese verschiedener Polyketide, einer Naturstoffklasse mit breiter Vielfalt an biologischen Aktivitäten. In Typ-III-Polyketid-Synthasen bestimmen die Struktur und das Volumen der aktiven Tasche sowohl die Länge des gebildeten Polyketids als auch die Wahl des Startmoleküls. Zum Beispiel katalysieren 2-Pyron-Synthase (2-PS) und Chalcon-Synthase (CHS) die Addition von Malonyl-CoA-Einheiten an Acetyl-CoA (2-PS) und *p*-Cumaroyl-CoA (CHS) zur Bildung von 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron bzw. Chalcon. Die Kombination von drei Mutationen in der aktiven Tasche in CHS (Thr197Leu/Gly256Leu/Ser228Ile) veränderte die Struktur der Initiations-/Elongationskavität so, dass die Variante funktionell identisch zu 2-PS wurde (Schema 12).<sup>[75]</sup> Der Wechsel in der Aktivität der CHS-Variante ging nicht nur mit einer Änderung des Startmoleküls einher (Acetyl-CoA anstatt *p*-Cumaroyl-CoA), sondern auch mit einer Änderung der Produktspezifität (von drei katalysierten Malonyl-CoA-Additionen zu zweien).

### 3.2.2.2. Kontrolle von Stereo- und Regiochemie

Enzymkatalysierte Prozesse zeigen oft ausgezeichnete Stereo- und Regiospezifitäten, was ein Motiv für den Einsatz von Biokatalysatoren in asymmetrischen Synthesen ist. Manchmal jedoch gibt es für die gewünschte Anwendung keine Enzyme mit ausreichender Selektivität. Daher war die Kontrolle über die Stereo- und Regioselektivität von Enzymreaktionen Ziel intensiver Untersuchungen. Mithilfe gerichteter Evolution wurden gewisse Verbesserungen erreicht, wobei die resultierenden Enzyme jedoch meist eine Häufung mehrerer Mutationen außerhalb der aktiven Tasche aufwei-



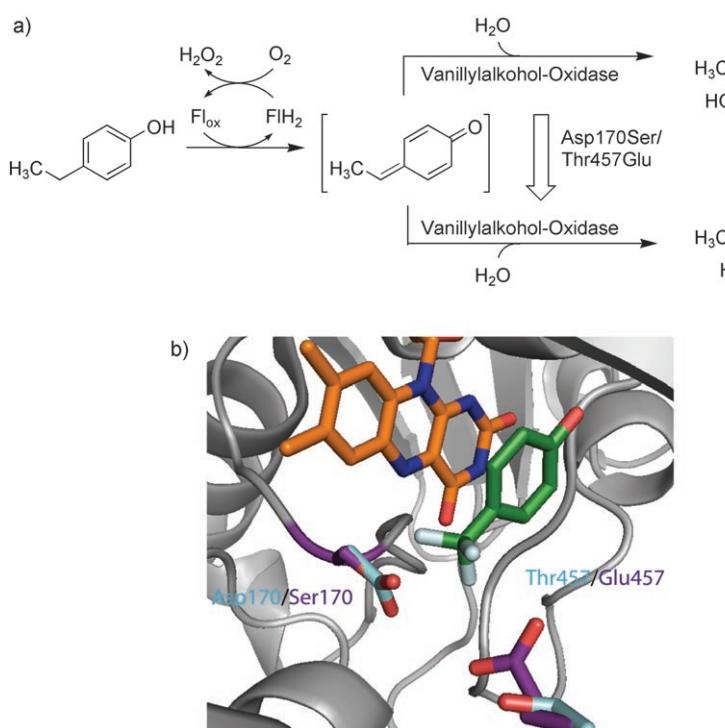
**Schema 12.** Umwandlung einer Chalcon-Synthase in eine 2-Pyron-Synthase durch Mutationen, die die Größe der aktiven Tasche verändern.

sen.<sup>[76]</sup> Wenn Reste der aktiven Tasche verändert werden, können größere Effekte erzielt werden.<sup>[77]</sup> Tatsächlich konnte auch durch zielgerichtetes rationales Design an diesen Resten eine Umkehr der Stereo- und Regioselektivität erreicht werden.

Ein Ansatz für das Design eines Enzyms mit umgekehrter Spezifität ist das Versetzen eines wesentlichen katalytischen Rests auf die gegenüberliegende Seite des Substrats. Diese Strategie wurde bei Vanillylalkohol-Oxidase, einer Flavin-abhängigen Oxidoreduktase, angewendet.<sup>[78]</sup> Dieses Enzym ist stark promiskuitiv, denn es katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen mit Phenolsubstraten, darunter die stereospezifische Hydroxylierung von 4-Ethylphenol zu (*R*)-1-(4'-Hydroxyphenyl)ethanol (Abbildung 4a). Man nimmt an, dass die Hydroxygruppe von einem Wassermolekül stammt, das von der Carboxygruppe von Asp170 aktiviert wird. Die Doppelmutation Asp170Ser/Thr457Glu wurde entworfen, um das essenzielle Carboxylat auf die gegenüberliegende Seite des gebundenen Substrats zu versetzen (Abbildung 4b), und man fand, dass tatsächlich das *S*-Enantiomer mit 80 % ee gebildet wurde. Auf ähnliche Weise wurde die Enantioselektivität von Arylmalonat-Decarboxylase umgekehrt, indem der Protonendonator (Cystein) durch Doppelmutation umplatziert wurde.<sup>[79]</sup>

Eine alternative Lösung zur Umkehr der Stereospezifität wurde mit Adenylylat-Kinase gefunden. Anstatt die reaktiven Teile dieses Enzyms zu reorganisieren, konnte mit einer einzigen Punktmutation (Arg44Met) die Ausrichtung des Substrats AMP $\alpha$ S (Adenosin-5'-phosphorothioat) innerhalb der aktiven Tasche umgekehrt werden.<sup>[80]</sup> Während der Wildtyp spezifisch das *pro-R*-Sauerstoffatom der Phosphatgruppe zu (*S<sub>P</sub>*)-ADP $\alpha$ S phosphoryliert, weist die konstruierte Variante die umgekehrte Stereospezifität auf und bildet folglich hauptsächlich (*R<sub>P</sub>*)-ADP $\alpha$ S.

Die Architektur einer aktiven Tasche kann auch die Regioselektivität drastisch beeinflussen. Die an der Steroid- und Terpenbiosynthese beteiligten Cyclasen sind dafür beispielhaft. Die Vielfalt dieser Enzyme, die mithilfe von Carbokationenchemie ganz unterschiedliche Produkte aus einer kleinen Auswahl von Isoprenoid-Bausteinen synthetisieren, resultiert aus ihrer Fähigkeit, die Reaktivität von identischen (oder sehr



**Abbildung 4.** Inversion der Stereospezifität von Vanillylalkohol-Oxidase: a) Wildtyp-Vanillylalkohol-Oxidase katalysiert die Bildung von (*R*)-1-(4'-Hydroxyphenyl)ethanol, während die konstruierte Asp170Ser/Thr457Glu-Variante hauptsächlich die Synthese des *S*-Isomers katalysiert (80% ee). b) Überlagerte Strukturen der aktiven Taschen von Wildtyp-Vanillylalkohol-Oxidase (hellblau) und der Asp170Ser/Thr457Glu-Variante (violett). Der Flavin-Cofaktor ist orange dargestellt und 4-Trifluormethylphenol, ein Substratanalogon, grün.

ähnlichen) Zwischenprodukten präzise auf unterschiedliche Reaktionspfade zu lenken.

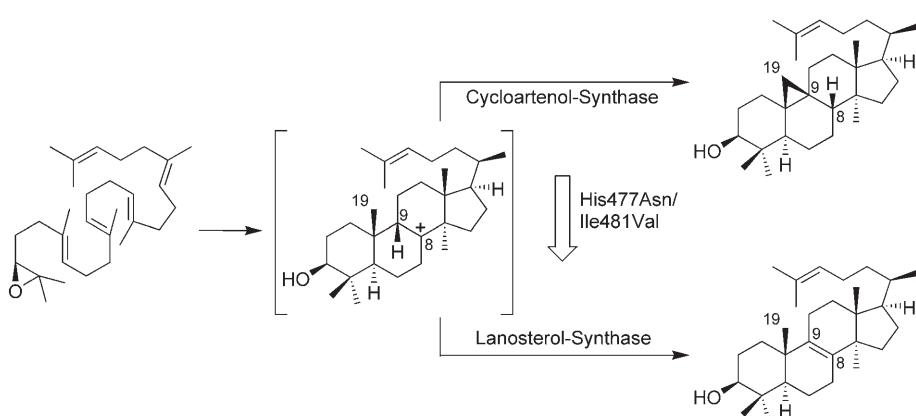
Untersuchungen zur Produktspezifität an Cycloartenol-Synthase (CAS) ergaben eine Mutante mit hochspezifischer Lanosterol-Synthase-Aktivität (Schema 13).<sup>[81]</sup> Drei stark konservierte Reste (Tyr410, His477 und Ile481), die wohl zur korrekten Produktbildung in CAS beitragen, wurden mithilfe von Sequenzvergleich und Homologiemodellierung mit der Struktur von Squalen-Hopen-Cyclase (eng verwandt zur

CAS) identifiziert. Individuelle Mutationen dieser Reste führen zur Bildung mehrerer Produkte, was auf eine reduzierte Regiokontrolle hindeutet. Eine Doppelmutante (His477Asn/Ile481Val) zeigte jedoch hohe (99%) Selektivität für die Bildung von Lanosterol und komplementierte Lanosterol-Synthase-defizierte Hefestämme. Die CAS und Lanosterol-Synthase teilen beide das gleiche Substrat, Oxidosqualen, aber katalysieren seine Cyclisierung zu unterschiedlichen Produkten.

Der Mechanismus ist komplex, wobei die anfängliche Protonierung des Epoxids zur Bildung eines Carbokations führt, gefolgt von Cyclisierung, Hydrid- und Methylverschiebungen und schließlich Deprotonierung. Die Doppelmutante und der Wildtyp deprotonieren das Carbokation an unterschiedlichen Positionen, wodurch die Produktidentität diktiert wird. Während CAS-Aktivität eine Hydridwanderung von C-9 zum C-8-Kation und nachfolgende Deprotonierung an C-19 umfasst, erfordert die Synthese von Lanosterol die direkte Deprotonierung an C-9. Mit Rückgriff auf das Homologiemodell vermutete man, dass der Wechsel in der Produktspezifität durch beide Mutationen gleichermaßen bedingt ist: Die Ile481Val-

Mutation führt zu einer Vergrößerung des Raums und ermöglicht damit die Rotation des Intermediats zur Exponierung der C-9-Position, und die His477Asn-Mutation positioniert eine Base günstig für die Deprotonierung von C-9.

Die Produktverteilung in Enzymen der Sesquiterpen-Biosynthese kann ebenfalls mit Mutationen beeinflusst werden, die die Regiospezifität verändern.  $\delta$ -Selinen-Synthase und  $\gamma$ -Humulen-Synthase sind Produkt-promiskutive Enzyme, die die Cyclisierung von Farnesyldiphosphat zu



**Schema 13.** Umgestaltung der Produktspezifität in Cycloartenol-Synthase durch zwei Mutationen in der aktiven Tasche.

einer Vielzahl an Naturstoffen katalysieren. Bei Steroid-Synthasen wie CAS hängt die Produktverteilung stark von der Architektur der aktiven Tasche ab, die sowohl die Deprotonierungsstelle als auch die Orientierung von Ausgangsstoff und Zwischenprodukt(en) beeinflusst. Diese Abhängigkeit wurde in einer Studie untersucht, derzufolge Punktmutationen verschiedener Reste der aktiven Tasche in jedem Enzym signifikante (und in einigen Fällen drastische) Änderungen in der Produktspezifität mit sich brachten.<sup>[82]</sup>

Der Austausch von Resten zwischen zwei Sesquiterpen-Syn-

thasen, 5-Epiaristolochen-Synthase (TEAS) und Premnaspironien-Synthase (HPS), auf der Basis von Homologieüberlegungen bewirkte eine beinahe vollständige wechselseitige Umwandlung der beiden Produktverteilungen.<sup>[83]</sup> Da jene Reste, die mit dem Substrat wechselwirken, in beiden Enzymen identisch waren, wurden neun Reste der zweiten Schale für die Mutagenese ausgewählt. Die Resultate weisen darauf hin, dass die Aktivitätsdeterminanten fast vollständig in der zweiten Schale liegen. Sequenzielles Hinzufügen von Mutationen in TEAS bis hin zur Variante mit sechs Mutationen bewirkte eine Steigerung der Produktpromiskuität. Die letzten drei Mutationen führten jedoch zu einer stark erhöhten Präferenz für das HPS-Produkt. Dieses Beispiel stützt die Auffassung, dass die Evolution von neuen Enzymaktivitäten über weniger spezifische Zwischenvarianten verlaufen könnte.<sup>[7,8,84]</sup>

In einer Parallelstudie untersuchten Keasling und Mitarbeiter ausführlich die Kontrolle der Produktverteilung in  $\gamma$ -Humulen-Synthase.<sup>[85]</sup> Dabei wurden 19 Aminosäuren der aktiven Tasche einer Sättigungsmutagenese unterzogen und so verschiedene Positionen ermittelt, die die Hauptbeiträge zur Produktspezifität leisten. Eine Analyse der relativen Menge jedes von jeder Einzelmutante gebildeten Produkts führte schließlich zu einem mathematischen Algorithmus (unter der Annahme, dass jede Einzelmutation unabhängig wirkt) für die Vorhersage derjenigen Kombination von Mutationen, die eine beliebige vorgegebene Terpensynthase-Aktivität maximiert. Sieben neuartige Enzyme wurden mit dieser Methode entworfen, und alle zeigten gute Selektivitäten für das gewünschte Terpenprodukt mit katalytischen

Wirksamkeiten, die der des Wildtyps ähnlich waren (30-mal geringer bis 3-mal höher; Tabelle 1). Das in umfangreichen Mutagenesestudien gewonnene Wissen kann also genutzt werden, um katalytische Aktivität vorauszusagen und zu kontrollieren.

### 3.3. Verbesserung von promiskuitiven Enzymaktivitäten

Früher wurde angenommen, dass Enzyme spezialisierte „Sackgassen“ darstellen, da sie durch die Evolution auf ihre katalytische Aktivität hin hoch optimiert sind (ein Gen, eine Funktion). Dies gilt allerdings als widerlegt, seitdem man Enzyme mit nichtnatürlichen Substraten in der organischen Synthese einsetzt.<sup>[86]</sup> Auch werden immer mehr natürliche Enzyme gefunden, die eine Substrat-, Katalyse- oder Produktpromiskuität aufweisen. Die Häufigkeit, mit der promiskuitive Enzyme gefunden werden, und die einfache Möglichkeit der Optimierung dieser Sekundäraktivitäten im Labor führen zu dem Schluss, dass eine Gruppe natürlicher, promiskuitiver Aktivitäten ein genereller Ausgangspunkt für die Entwicklung von effizienten und spezialisierten Enzymen in der Natur sein kann (für aktuelle Übersichtsartikel siehe Lit. [6, 7]). Zusätzlich zeigen die oben diskutierten Beispiele, dass umgestaltete Enzyme oftmals eine gewisse katalytische Promiskuität aufweisen, da sie beispielsweise einen Teil ihrer ursprünglichen Aktivität beibehalten. Die Umgestaltung der aktiven Tasche führte bereits zu Erfolgen bei der Verbesserung von geringen Aktivitäten.

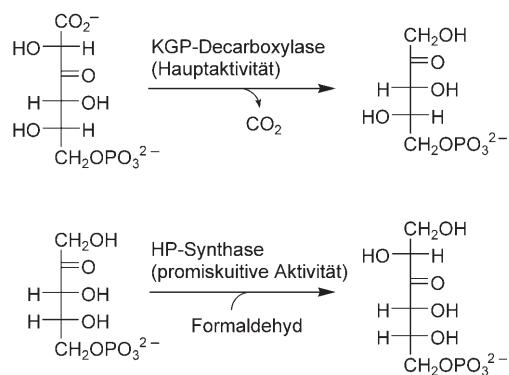
**Tabelle 1:** Produktverteilung [%] für  $\gamma$ -Humulen-Synthase (Wildtyp) und Varianten.<sup>[85]</sup>

Produkte	Wildtyp	W315P	F312Q/M339A/ M447F	M339N/S484C/ M565I	A317N/A336S/ S484C/I562V	A336C/T445C/S484C/ I562L/M565L	S484A/ Y566F	A336V/M447H/ I562T
<b>1</b>	3.0	<b>54.1<sup>[a]</sup></b>	6.4	2.7	1.7	7.7	2.6	6.4
<b>2</b>	23.1	2.9	<b>78.1</b>	0.4	1.4	n.d. <sup>[b]</sup>	0.4	0.4
<b>3</b>	45.1	2.2	11.4	<b>85.7</b>	12.6	11.7	54.6	3.8
<b>4</b>	13.4	n.d.	2.6	3.4	<b>63.0</b>	13.3	3.5	4.7
<b>5</b>	4.7	n.d.	0.1	3.5	12.6	<b>61.5</b>	15.8	1.1
<b>6</b>	3.8	n.d.	1.0	4.3	3.2	2.2	<b>14.7</b>	0.1
<b>7</b>	6.9	6.7	0.4	n.d.	5.5	3.6	8.4	<b>83.6</b>
<b>8</b>	n.d.	<b>34.0</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[a] Fettgedruckte Werte weisen auf die größte Ausbeute für ein gegebenes Produkt hin. [b] Nicht detektierbar.

In einem Fall wurden die Determinanten einer Kreuzaktivität untersucht für 3-Keto-L-gulonat-6-phosphat-Decarboxylase (KGPDC) und D-arabino-Hex-3-ulose-6-phosphat-Synthase (HPS), homologe ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-Enzyme der Orotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase-Suprafamilie.<sup>[87]</sup> Beide Enzyme sind promiskuitiv; KGPDC zeigt eine schwache HPS-Aktivität und HPS eine entsprechende KGPDC-Aktivität (Schema 14). Es wird angenommen, dass beide Aktivitäten über ein  $Mg^{2+}$ -stabilisiertes cis-Endiolat ablaufen. Dieses Intermediat wird allerdings über einen unterschiedlichen Mechanismus gebildet (Decarboxylierung in KGPDC, Deprotonierung in HPS) und umgesetzt (Protonierung in KGPDC, Aldolkondensation mit Formaldehyd in HPS). Im Zuge der Aufklärung der Grundlagen der unterschiedlichen katalytischen Präferenzen von HPS und KGPDC wurden drei Reste in der aktiven Tasche identifiziert, die in KGPDC, nicht aber in HPS konserviert sind. Diese Positionen wurden in der *E. coli*-KGPDC zu den entsprechenden HPS-Resten mutiert.<sup>[88]</sup> Die resultierende Variante, Glu112Asp/Arg139Val/Thr169Ala-KGPDC, zeigte eine 260fach höhere katalytische Effizienz für die HPS-Aktivität ( $k_{cat}/K_m = 21 M^{-1} s^{-1}$ ) als der Wildtyp.

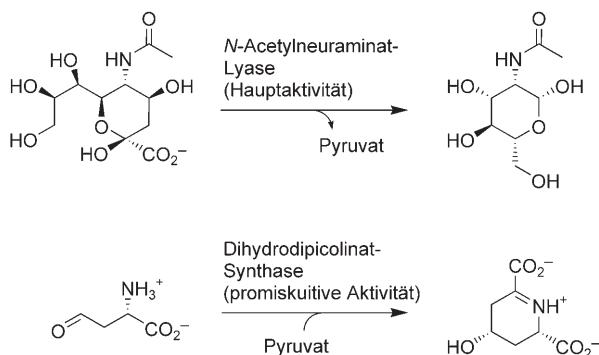
Auf ähnliche Weise wurde die Struktur von Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS) herangezogen, um Mutationen auszuwählen, die die promiskutive DHDPS-Aktivität von N-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) erhöhen sollten (Schema 15).<sup>[89]</sup> Der Vergleich der homologen ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-Struktur führte zu der Identifizierung einer einzigen Mutation



**Schema 14.** KGPDC-katalysierte Reaktion.

täten über ein  $Mg^{2+}$ -stabilisiertes cis-Endiolat ablaufen. Dieses Intermediat wird allerdings über einen unterschiedlichen Mechanismus gebildet (Decarboxylierung in KGPDC, Deprotonierung in HPS) und umgesetzt (Protonierung in KGPDC, Aldolkondensation mit Formaldehyd in HPS). Im Zuge der Aufklärung der Grundlagen der unterschiedlichen katalytischen Präferenzen von HPS und KGPDC wurden drei Reste in der aktiven Tasche identifiziert, die in KGPDC, nicht aber in HPS konserviert sind. Diese Positionen wurden in der *E. coli*-KGPDC zu den entsprechenden HPS-Resten mutiert.<sup>[88]</sup> Die resultierende Variante, Glu112Asp/Arg139Val/Thr169Ala-KGPDC, zeigte eine 260fach höhere katalytische Effizienz für die HPS-Aktivität ( $k_{cat}/K_m = 21 M^{-1} s^{-1}$ ) als der Wildtyp.

Auf ähnliche Weise wurde die Struktur von Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS) herangezogen, um Mutationen auszuwählen, die die promiskutive DHDPS-Aktivität von N-Acetylneuraminat-Lyase (NAL) erhöhen sollten (Schema 15).<sup>[89]</sup> Der Vergleich der homologen ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-Struktur führte zu der Identifizierung einer einzigen Mutation



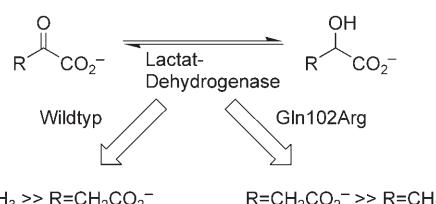
**Schema 15.** NAL-katalysierte Reaktion.

in der aktiven Tasche (Leu142Arg), die die DHDPS-Aktivität um den Faktor 19 erhöhte. Interessanterweise blieben sowohl NAL als auch KGPDC katalytisch promiskuitiv und verloren nur ein Dreifaches bzw. Dreißigfaches ihrer ursprünglichen Aktivität.

Das bereits in Abschnitt 3.1.2 erwähnte Glutathion-S-Transferase(GST)-Gerüst ist von Natur aus promiskuitiv, sowohl in Bezug auf Substrate wie auch in Bezug auf die katalytische Aktivität.<sup>[90]</sup> Diese Vielseitigkeit wurde in GST A2-2, einer Glutathion-Peroxidase mit schwacher Steroid-Isomerase-Aktivität, genutzt. Basierend auf der Homologie mit GST A3-3, einer effizienten Steroid-Isomerase, wurde die aktive Tasche von GST A2-2 durch Mutieren von Resten in einem Satz von fünf Positionen umgestaltet.<sup>[91]</sup> Die Einfach- und die Dreifachmutante zeigten beide eine signifikante Verbesserung ihrer Steroid-Isomerase-Funktion, doch der größte Zuwachs wurde bei der Fünffachmutante beobachtet, die 5000-mal aktiver als die Wildtyp-GST A2-2 war. Tatsächlich erreichte die Fünffachmutante eine katalytische Effizienz für die Steroidisomerisierung, die ähnlich zu der von GST A3-3 ist, während die ursprüngliche Peroxidase-Aktivität nur um den Faktor drei abnahm.

Wie die letzten drei Beispiele zeigen, verursacht die Optimierung der katalytischen Effizienz einer schon vorhandenen promiskuitiven Aktivität geringere Einbußen der natürlichen Aktivität als die Einführung einer völlig neuen Aktivität. Dieses Phänomen wurde auch bei anderen künstlichen Enzymvarianten beobachtet, deren promiskutive Aktivität verbessert wurde.<sup>[92]</sup> Die Eingriffe, die für die Einführung einer völlig neuen katalytischen Aktivität benötigt werden, können starke Störungen in der bestehenden katalytischen Maschinerie verursachen, wohingegen eine promiskutive aktive Tasche per Definition mit den verschiedenen promiskutiven Sekundäraktivitäten kompatibel ist. Daher kann die „native“ Aktivität recht unempfindlich auf Mutationen reagieren, die eine Sekundäraktivität verbessern.

Dies ist allerdings nicht immer der Fall, wie die Optimierung der Perhydrolase-Aktivität einer Serin-Hydrolase<sup>[93]</sup> und die Optimierung der Oxygenase-Aktivität einer Aldolase gezeigt haben.<sup>[94]</sup> Beide Enzyme verloren mehr als zwei Größenordnungen in ihrer ursprünglichen Hydrolase- bzw. Aldolase-Aktivität. Ein noch drastischeres Beispiel lieferte die Umgestaltung einer Lactat-Dehydrogenase (LDH) mit dem Ziel, eine Malat-Dehydrogenase-Sekundäraktivität (MDH) zu optimieren (Schema 16).<sup>[95]</sup> Die Umgestaltungsstrategie stützte sich auf Strukturinformationen und hatte zum Ziel, die Bindung des nichtnatürlichen Substrats zu



**Schema 16.** Austausch der Substratpräferenz in Lactat-Dehydrogenase mithilfe einer einzigen Mutation in der aktiven Tasche.

verbessern, ohne dabei die für den Umsatz wesentlichen Reste zu beeinträchtigen. Eine Modellierung legte die Einführung einer einzelnen Mutation (Gln102Arg) nahe, die eine bevorzugte Wechselwirkung mit dem neuen Oxaloacetat-substrat eingehen sollte, während gleichzeitig der Enzym-Substrat-Komplex mit Pyruvat destabilisiert würde. Tatsächlich zeigte die Variante eine  $10^3$ fach erhöhte katalytische Effizienz für Oxaloacetatreduktion mit  $k_{\text{cat}}$ - und  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Werten ( $250 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), die identisch mit denen der Wildtyp-LDH mit Pyruvat als Substrat waren. Bemerkenswerterweise reduzierte diese Mutation aber auch die LDH-Aktivität um vier Größenordnungen. Die Substratselektivität der Variante war also vollständig umgekehrt zu der des Wildtyps. Zusätzlich demonstriert dieses frühe Beispiel der Umgestaltung einer aktiven Tasche das Potenzial einer einzelnen Punktmutation, die in diesem Fall eine Änderung in der Substratspezifität um einen Faktor von mehr als einer Million verursachte.

### 3.4. Cofaktor Promiskuität

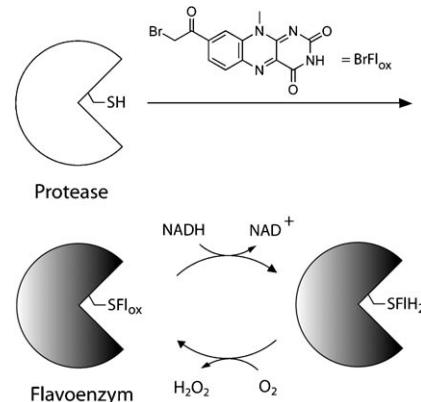
Aus den 20 genetisch codierten Standardaminoäuren ist eine enorme Vielfalt an Proteingerüsten aufgebaut, die ein sehr breites Spektrum an chemischen Transformationen vermitteln – aber sie können nicht alles. Um das Reaktionsspektrum zu vergrößern, greifen viele Enzyme auf unübliche Aminoäuren zurück, die entweder durch ribosomalen Einbau (wie Selenocystein<sup>[96]</sup> oder Pyrrolysin<sup>[97]</sup>) oder durch post-transkriptionale Modifikation (Bildung von Pyrrolochinolinon, Oxidation von Thiolen zu Disulfiden usw.) eingeführt werden.<sup>[98]</sup> Als Alternative können reaktive Liganden wie Flavine, Nicotinamide, Metallionen und Pyridoxalphosphat als Cofaktoren dienen. Diese Spezies sind in Lösung an sich promiskuitiv, denn sie katalysieren viele unterschiedliche Reaktionen mit verschiedenen Substraten. Das Proteingerüst von Cofaktor-abhängigen Enzymen bildet eine Bindungstasche, die direkt von reaktiven Resten umgeben ist, und richtet so das Substrat in einer definierten Orientierung relativ zum Cofaktor aus. Diese Merkmale fördern die Reaktion entlang eines definierten Reaktionspfads und minimieren damit Nebenreaktionen. Daher sollte eine aktive Tasche, die einen bestimmten Reaktionsverlauf begünstigt, in einfacher Weise so verändert werden können, dass es zu einer neuen Produktbildung kommt, vergleichbar zur Manipulation der Reaktionskontrolle reaktiver Intermediate (Abschnitt 3.2).

#### 3.4.1. Flavin-abhängige Enzyme

Flavin-abhängige Enzyme sind in der Natur weit verbreitet als Katalysatoren für Oxidationen und Reduktionen sowie als Elektronenüberträger.<sup>[99]</sup> Wegen ihrer drei möglichen Oxidationszustände sind die Cofaktoren Flavinmononucleotid (FMN) und Flavinadenindinucleotid (FAD) besonders vielseitig, denn sie können sowohl Ein- als auch Zweielektronen-Übertragungen ausführen. Dank dieser Eigenschaften können Flavine Reaktionen verschiedener Substrate mit molekularem Sauerstoff, dem stärksten biologischen Oxidationsmittel, vermitteln.

Änderungen der Proteinumgebung rund um den Flavin-Cofaktor können sich stark auf die Reaktivität auswirken. Eine einzelne Mutation eines nichtkatalytischen Cysteinrests (Cys106Val) in der aktiven Tasche der bakteriellen Luciferase war z.B. ausreichend, um diese Monooxygenase in eine Oxidase umzuwandeln.<sup>[100]</sup> Luciferase katalysiert die FMN-abhängige Oxidation von Aldehyden zu Carbonsäuren, eine Aktivität, die der Cys106Val-Variante verloren gegangen ist. Stattdessen katalysiert diese Variante die direkte  $O_2$ -abhängige Oxidation des Cofaktors  $\text{FMNH}_2$  zu FMN unter gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffperoxid. Vergleichbar dazu verwandelt eine einzige Mutation (Gly99Ala) in der aktiven Tasche von L-Lactat-Monooxygenase diese in eine Oxidase.<sup>[101]</sup> Anscheinend führt die Enge in der aktiven Tasche der Mutante zur Freisetzung von Pyruvat, anstatt dieses enzymatisch weiter zu Essigsäure und Wasser umzusetzen.

Eine spezialisierte Bindungstasche für Flavin ist nicht einmal nötig, um die Aktivität des Cofaktors zu steuern. In den späten 1970ern banden Kaiser und Mitarbeiter Flavin-analoga durch kovalente Bindung an die Sulphydrylgruppe des reaktiven Cysteinrests (Cys29) der Cystein-Protease Papain (Abbildung 5).<sup>[102]</sup> Die Verknüpfung mit der prosthe-



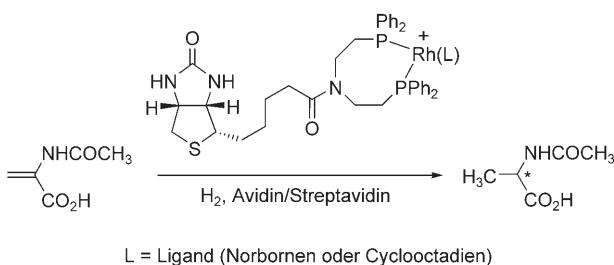
**Abbildung 5.** Semisynthetische Flavoenzyme: kovalente Bindung des Cofaktors Flavin an den katalytischen Cysteinrest von Papain. Das resultierende semisynthetische Enzym katalysiert die Oxidation von Nicotinamid, wobei der Cofaktor durch molekularen Sauerstoff reoxidiert wird.

tischen Gruppe wandelte diese Protease in eine Oxidase um. Mit Substraten wie Dithiolen, z.B. Dithiothreitol (DTT), und Dihydronicotinamiden, z.B. NADH, steigerte sich die Umsatzgeschwindigkeit gegenüber der von proteinfreien Modellreaktionen um einen Faktor 17 bzw. 600. Flavopapaine waren selektiv gegenüber verschiedenen *N*-substituierten Dihydronicotinamiden und außerdem stereoselektiv unter Bevorzugung von *pro-R*-Hydridübertragungen. Diese Resultate sind sogar noch beeindruckender, wenn man bedenkt, dass die aktive Tasche von Papain auf die Erkennung von Polypeptidsubstraten optimiert ist, die überhaupt keine Ähnlichkeiten mit den Substraten der Oxidase-Aktivität dieser semisynthetischen Enzyme haben. Die chirale Umgebung im Protein kann die Spezifität der Reaktion beeinflussen, sogar ohne Optimierung der aktiven Tasche.

### 3.4.2. Metalloenzyme

Metalle zählen zu den häufigsten Cofaktoren. Tatsächlich sind 30% aller natürlichen Enzyme Metalloenzyme.<sup>[103]</sup> Übergangsmetalle weisen vielfältige Eigenschaften und Reaktivitäten auf, die bei metallorganischen Katalysatoren Anwendung finden. Die große Regio- und Stereoselektivität von metallorganisch und Metalloenzym-katalysierten Reaktionen führte zu ihrer breiten Anwendung in der organischen Synthese. Sowohl die organischen Liganden der metallorganischen Katalysatoren als auch das Polypeptidgerüst der Metalloenzyme machen die vorteilhaften Eigenschaften der Metalle nutzbar und liefern dabei die gewünschte Substratspezifität, Stereokontrolle oder eine geeignete geladene Umgebung.<sup>[104]</sup> Um neue Metall-abhängige Enzyme zu erhalten, können Enzymingenieure ein neues Metallzentrum einführen oder die Topographie der aktiven Tasche ändern.

Ein früher Erfolg war die Überführung eines Proteins in einen metallorganischen Katalysator durch Wilson und Whitesides. Ganz ähnlich zu Kaisers Flavopapain (Abschnitt 3.4.1) führten sie Rhodium(I) als katalytisches Zentrum in Avidin ein.<sup>[105]</sup> Avidin ist ein gut charakterisiertes Protein, das Biotin mit einer Affinität bindet ( $K_d = 10^{-15}$  M), aus der eine der stärksten bekannten nichtkovalenten Wechselwirkungen resultiert. Um Rhodium(I) in die Bindungstasche des Proteins einzuführen, wurde ein Biotinanalogen mit Diphosphinfunktion verwendet. Dieses künstliche Metalloenzym hydrierte  $\alpha$ -Acetamidoacrylsäure enantioselektiv zu (*S*)-*N*-Acetylalanin (ca. 40% ee) mit vollem Umsatz, während für den freien Liganden keine detektierbare Enantioselektivität nachgewiesen werden konnte (Schema 17).

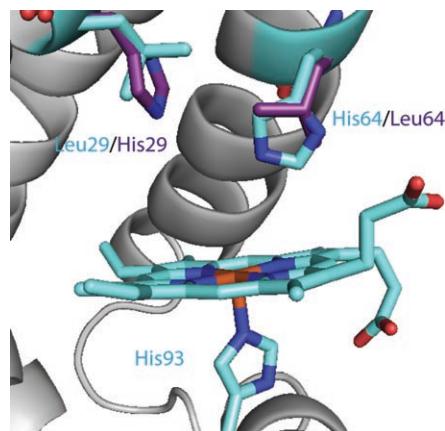


**Schema 17.** Nichtkovalente Bindung eines Biotin-Rh<sup>I</sup>-Komplexes mit Biotin-bindenden Proteinen (Avidin und Streptavidin) führt zu einer neuen stereoselektiven Hydrierungsaktivität.

Dieses System wurde kürzlich durch Veränderungen des Biotinliganden, des Metalls und des Enzymgerüsts optimiert.<sup>[106]</sup> Modifikationen des Liganden führten zu einer besseren Enantioselektivität und konnten sogar die Umkehr der Enantioselektivität induzieren. Vermutlich wegen der tieferen Bindungstasche wurden mit Streptavidin, einem dem Avidin verwandten Protein mit ähnlicher Affinität für Biotin, höhere ee-Werte erzielt (92% für die Hydrierung von  $\alpha$ -Acetamidoacrylsäure). Im Unterschied zu Avidin begünstigt Streptavidin die Bildung des *R*-Produkts. Der Beitrag des Proteins wurde nochmals dadurch verdeutlicht, dass sich der ee-Wert durch Substitution einer einzelnen Aminosäure (Ser112Gly) in Streptavidin auf 96% erhöhte. Diese Strategie

fand auch Verwendung bei der Hydrierung von Ketonen durch Ru<sup>II</sup>-Komplexe. Basierend auf Strukturinformationen und Docking-Studien wurde der dem Metallkomplex benachbarte Rest Ser112 für Sättigungsmutagenese ausgewählt.<sup>[107]</sup> Die daraus resultierenden Varianten zeigten erstaunlich unterschiedliche Stereoselektivitäten: Während aromatische Reste die Selektivität für das *R*-Alkoholprodukt erhöhten (bis zu 97% ee für Ser112Tyr), verschoben positiv geladene Reste die Selektivität in Richtung der *S*-Alkoholbildung (bis zu 70% ee für Ser112Arg).

Wie wichtig die Topographie der aktiven Tasche für Aktivität und Stereoselektivität von Metalloenzymen ist, wurde ferner an Myoglobin veranschaulicht. Die Hauptfunktion dieses Hämproteins ist der Transport von molekularem Sauerstoff, aber darüber hinaus hat es auch eine geringe Peroxidase-Aktivität. Strukturvergleiche mit dem natürlichen Hämprotein Cytochrom-*c*-Peroxidase führten zu dem Schluss, dass die Position des Histidinrests in der unmittelbaren Nachbarschaft des Eisenkations für die Aktivität wichtig sein könnte. Eine Myoglobinvariante mit versetztem Histidinrest (Leu29His/His64Leu) wurde produziert<sup>[108]</sup> (Abbildung 6), und für die Wasserstoffperoxid-abhängige

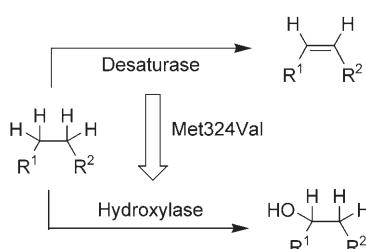


**Abbildung 6.** Vergleich der aktiven Tasche von Wildtyp-Myoglobin (hellblau) und der Leu29His/His64Leu-Variante (violett). Die Änderung der Histidinposition relativ zum Häm steigert die Umsatzgeschwindigkeit und die Stereoselektivität der sekundären Peroxidase-Aktivität stark. Orange Fe, blau N, rot O.

Oxidation von Methylphenylsulfid zeigte diese Variante tatsächlich eine 200fach höhere Aktivität ( $k_{cat} = 0.092\text{ s}^{-1}$ ) sowie eine verbesserte Enantioselektivität (97 gegenüber 25% ee für den Wildtyp). Ein ähnlicher Effekt wurde für die Epoxidierung von Styrol beobachtet. Zwei andere Ansätze, in denen das Häm durch Cr<sup>III</sup><sup>[109]</sup> und Mn<sup>II</sup>-Komplexe<sup>[110]</sup> ausgetauscht wurde, führten zu Myoglobinvarianten mit Peroxidase-Aktivität. Andere Beispiele für die Konstruktion neuer Peroxidasen sind der Metallaustausch zu Mn<sup>II</sup> in Kohlensäure-Anhydrase<sup>[111]</sup> und die Einführung von Vanadat in Phytase.<sup>[112]</sup>

Änderungen in der Redoxaktivität wurden auch durch Umgestaltung von natürlichen Metalloenzymen erreicht. Oleat-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* (FAD2) und

Oleat-Hydroxylase aus *Lesquerella fendleri* (LFAH) sind zwei strukturell und mechanistisch verwandte membran gebundene Enzyme, die an der Modifizierung von Fettsäuren beteiligt sind (Schema 18). Ihre aktiven Taschen enthalten einen Nicht-Häm-Dieisencluster, und ihr Mechanismus verläuft über ein energiereiches Radikalzwischenprodukt, das durch die Abspaltung eines Wasserstoffradikals durch eine Eisenoxyospezies entsteht.<sup>[113]</sup>



**Schema 18.** Desaturase- (FAD2) gegenüber Hydroxylase(LFAH)-Aktivität in Eisen-abhängigen, Fettsäure modifizierenden Enzymen.

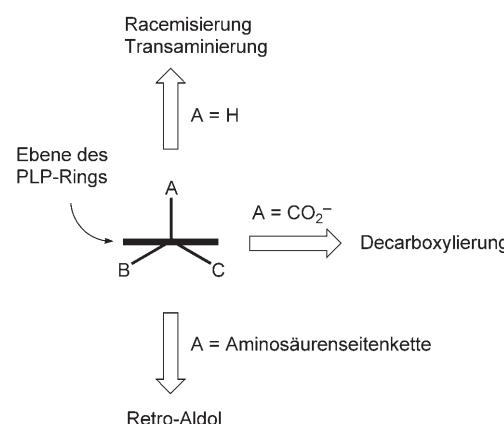
Der Austausch von sieben nichtkonservierten Resten in der aktiven Tasche führte zu einer gesteigerten Hydroxylase-Aktivität von FAD2 und einer gesteigerten Desaturase-Aktivität in LFAH.<sup>[114]</sup> Weitere Studien an einer Einzelmutante (Met324Ile) von FAD2 zeigten eine 54fache Verringerung des Verhältnisses von Hydroxylierung zu Desaturierung relativ zum Wildtyp.<sup>[115]</sup> Eine ähnliche Strategie wurde für die Umwandlung von der *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, einem Fe<sup>II</sup>-abhängigen Enzym, in eine *p*-Hydroxymandelat-Synthase verwendet, bei der eine oder zwei Mutationen ins aktive Zentrum eingeführt wurden.<sup>[116]</sup> Da jeweils ein gemeinsames Intermediat in divergente Reaktionspfade gelenkt wird, können diese beiden Beispiele ebenfalls als Beispiele für eine Manipulation der Reaktionskontrolle angesehen werden (Abschnitt 3.2.2).

Die Konstruktion neuer Metalloenzyme ist nicht auf ihre Redoxchemie beschränkt. So ergab die Einführung eines Cu<sup>II</sup>-Komplexes in Albumine einen hoch enantioselektiven Katalysator für eine Diels-Alder-Reaktion (bis zu 98% ee).<sup>[117]</sup> Tatsächlich scheint die Bandbreite möglicher Reaktivitäten hauptsächlich durch die Wahl des Metalls limitiert zu sein, während das Proteingerüst die Stereoselektivität sicherstellt. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass das Vorhandensein eines Proteingerüsts allein nicht automatisch zu einer erhöhten Umsatzgeschwindigkeit oder Stereoselektivität führt.<sup>[118]</sup> Eine bessere Kontrolle der Metalleigenschaften könnte erreicht werden, indem Metallbindungstaschen direkt im Proteingerüst aufgebaut werden.<sup>[119]</sup> Wie bei der Entwicklung der metallorganischen Katalysatoren wird der Fortschritt durch die Optimierung der Umgebung von Metall wie Substrat erreicht werden.

### 3.4.3. PLP-abhängige Enzyme

Pyridoxalphosphat(PLP)-abhängige Enzyme katalysieren ein breites Spektrum an Transformationen mit Aminosäuresubstraten (Racemisierungen, Decarboxylierungen, Aldol-

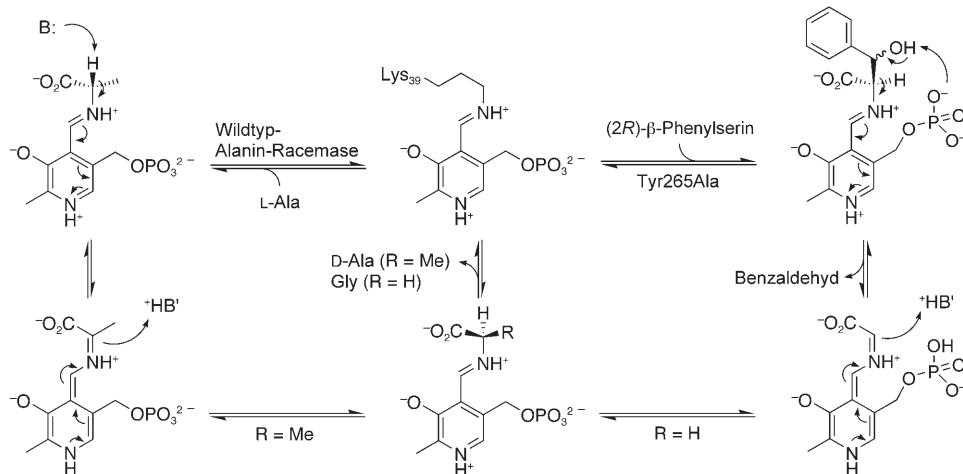
kondensationen, Transaminierungen und andere).<sup>[120,121]</sup> Die Reaktivität dieses Cofaktors in Lösung wurde detailliert untersucht und zeigt kaum Substrat- oder Reaktionsspezifität. Allerdings wurde ein gewisses Maß an Kontrolle in Gegenwart von Metallionen<sup>[122]</sup> oder für Cofaktoranalogika<sup>[123]</sup> nachgewiesen. PLP-katalysierte Reaktionen teilen eine gemeinsame Eigenschaft, nämlich die Bildung einer Schiff-Base zwischen Substrat und Cofaktor, was eine Stabilisierung von Carbanionen an der Cα-Position der Aminosäure bewirkt. Die Struktur der aktiven Tasche ist für die Erkennung des Substrats verantwortlich und dirigiert den Reaktionsweg in Richtung des gewünschten Produkts. Gemäß Dunathans Hypothese aus dem Jahr 1966<sup>[124]</sup> wird jeweils die Bindung, die in einer Ebene senkrecht zur Ebene des Pyridinrings des Cofaktors steht, und dadurch mit dem konjugierten π-System des Cofaktors ausgerichtet ist, gebrochen, wodurch das Cα-Carbanion erzeugt wird (Abbildung 7). Aktive Taschen von



**Abbildung 7.** Dunathans Hypothese über die Reaktionsspezifität von PLP-katalysierten Reaktionen. Die Art der chemischen Transformation wird dadurch bestimmt, welche Bindung senkrecht zur Ebene des Pyridinrings von PLP steht.

Enzymen können nichtkovalente Wechselwirkungen nutzen, um das Substrat gezielt auszurichten und um somit zu bestimmen, welche Bindung senkrecht zum Pyridinring des Cofaktors steht, was letztlich einen wichtigen Beitrag zur Steuerung der spezifischen Reaktivität leistet. Strukturuntersuchungen haben ergeben, dass ein Großteil der Cofaktorbindenden Bereiche ebenso wie die katalytische Maschinerie in verschiedenen Enzymen konserviert ist, auch wenn diese eine völlig andere Faltung einnehmen.<sup>[120]</sup>

Dieser Idee folgend genügte eine einzige Mutation in der aktiven Tasche, um die Alanin-Racemase (AR) aus *Geobacillus stearothermophilus* in eine D-Aminosäure-Aldolase umzuwandeln, die die Retroaldolreaktion von D-β-Phenylserin katalysiert (Schema 19).<sup>[125]</sup> Natürliche D-Aminosäure-Aldolasen wurden gereinigt und charakterisiert,<sup>[126]</sup> aber bisher ist noch keine Struktur bekannt. Zwar wurden sowohl die D-Aminosäure-Aldolasen als auch AR als Mitglieder des Faltungstyps III der PLP-abhängigen Enzyme klassifiziert, die Sequenzähnlichkeit in diesen Enzymen ist jedoch nicht groß genug, um einen Vergleich der aktiven Tasche zuzulassen. Daher wurde die Struktur von L-Threonin-Aldolase



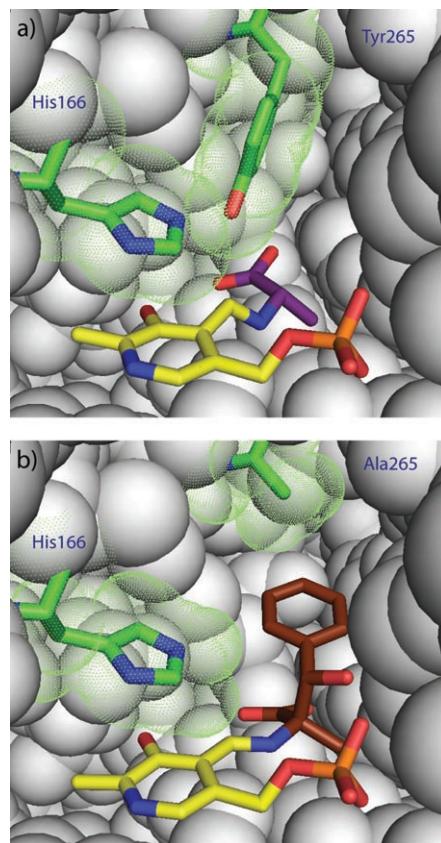
**Schema 19.** Reaktionsmechanismus von Wildtyp-Alanin-Racemase und der Aldolase-Aktivität der Tyr265Ala-Variante (B = Tyr265, B' = Lys39).

(TA) aus *Thermotoga maritima* als Vorbild für die Umgestaltung von AR verwendet. TA und AR sind evolutionär nicht verwandte Enzyme, die eine unterschiedliche tertiäre Faltung (Typ I bzw. Typ III) und Quartärstruktur aufweisen. Ihre Mechanismen involvieren jedoch ein gemeinsames Aldimin-Intermediat. Die Analyse der beiden aktiven Taschen und Überlagerung der jeweiligen PLP-Liganden haben gezeigt, dass die essenziellen, in beiden Enzymen vorkommenden katalytischen Reste sich relativ zum Cofaktor beinahe spiegelbildlich zueinander verhalten. Dieses Beispiel zeigt, wie die Natur, ausgehend von zwei unterschiedlichen Gerüsten, unabhängig zu zwei sehr ähnlichen Lösungen konvergierte.

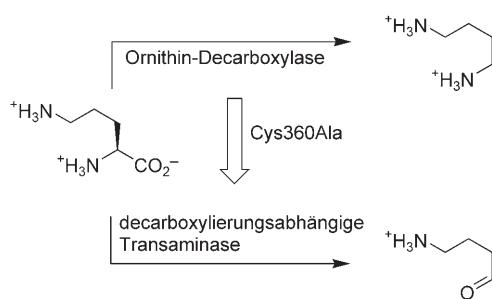
D-β-Phenylserin-Aldolase-Aktivität wurde durch die Mutation der katalytischen Base Tyr265 zu Alanin erzeugt, was zu einer > 3000fachen Reaktionsbeschleunigung führte ( $k_{\text{cat}} = 0.095 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 11 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>[125]</sup> Diese Mutation erzeugt einen Hohlraum, der den Phenylring von D-β-Phenylserin beherbergen kann (Abbildung 8). Die D-Aminosäure ist erwartungsgemäß das bevorzugte Substrat der Tyr265Ala-Mutante, und die gefundene Stereospezifität geht mit der gewollten Orientierung der C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Bindung von D-β-Phenylserin orthogonal zum Pyridinring des Cofaktors einher. Die methylbindende Tasche wurde beibehalten und bewahrte dabei ihre Funktion, wie die erhöhte (nichtnatürliche) Aldolase-Aktivität mit α-methylierten β-Phenylserinen belegt.<sup>[127]</sup> Diese Mutante war nicht stereospezifisch an der β-Position der Substrate, eine Eigenschaft, die auch bei natürlichen PLP-abhängigen β-Hydroxyaminosäure-Aldolasen beobachtet wird. Eine zweite Mutation (Arg219Glu) bewirkte eine Erhöhung der promiskuitiven Transaminase-Aktivität von AR, die Aldolase-Aktivität dieser Doppelmutante wurde jedoch nicht untersucht.<sup>[128]</sup>

Zwei weitere Beispiele illustrieren, wie die Reaktivität von PLP durch Umgestaltung der aktiven Tasche in eine neue Richtung gelenkt werden konnte. Ornithin-Decarboxylase (ODC) ist ein Typ-III-PLP-abhängiges Enzym, das die Synthese von Putrescin katalysiert. Zwei Mutanten von ODC – Cys360Ala und Cys360Ser – wurden hergestellt, und es wurde

gezeigt, dass beide eine decarboxylierungsabhängige Transaminierung zur Bildung von Pyridoxamin-5-phosphat (PMP) und γ-Aminobutyraldehyd katalysieren. Diese Aktivität kann im Wildtyp nicht nachgewiesen werden (Schema 20).<sup>[129]</sup> In



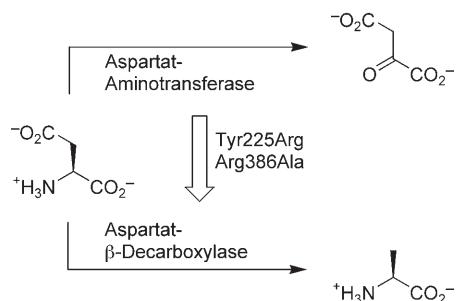
**Abbildung 8.** Einführung von Aldolase-Aktivität in eine PLP-abhängige Alanin-Racemase: a) Aktive Tasche von Alanin-Racemase aus *G. stearothermophilus* als Komplex mit PLP (gelb) und L-Ala (violettblau); b) Modell der Tyr265Ala-Variante als Komplex mit dem Aldimin zwischen PLP (gelb) und (2R,3S)-2-Methyl-β-phenylserin (braun). Die Reste in Position 265 und His166 sind grün gezeichnet.



**Schema 20.** Einbau von Transaminase-Aktivität in eine PLP-abhängige Ornithin-Decarboxylase.

der aktiven Tasche des Wildtyps scheint ein Cysteinrest nach dem Decarboxylierungsschritt die Protonierung des  $\text{Ca}$ -Atoms zu lenken und unterdrückt dadurch die Transaminierung. In der Mutante erfolgt die Protonierung am C4'-Atom des Cofaktors, woraus eine neue Aktivität resultiert.

Im zweiten Beispiel wurde eine Dreifachmutante von Aspartat-Aminotransferase (AAT), Tyr225Arg/Arg292Lys/Arg386Ala, rational anhand ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Asparaginsäure-Decarboxylase entworfen, um die  $\beta$ -Decarboxylierung von L-Asparaginsäure zu katalysieren (Schema 21).<sup>[130]</sup> Die konstruierte Variante wies eine



**Schema 21.** Umwandlung von Aspartat-Aminotransferase in eine  $\beta$ -Decarboxylase.

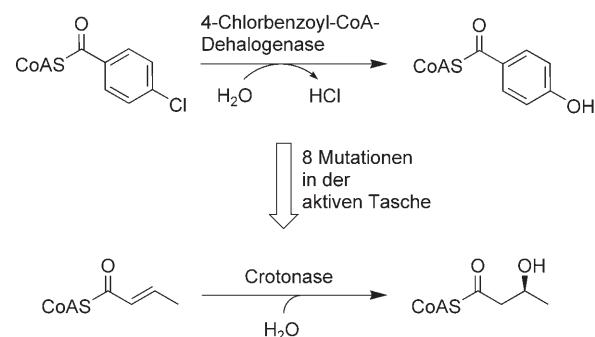
1300fach gesteigerte Decarboxylierungsaktivität ( $k_{\text{cat}}$ ) auf, während die Transaminase-Aktivität um den Faktor 18000 sank. Es wurde nachgewiesen, dass die Tyr225Arg/Arg386Ala-Mutation die  $\beta$ -Decarboxylase-Aktivität auslöst, während die Arg292Lys-Mutation die Transaminase-Aktivität unterdrückt.

#### 4. Wann reichen geringfügige Änderungen in der aktiven Tasche nicht aus?

Die vielen erfolgreichen Beispiele in den vorangegangenen Abschnitten machen deutlich, dass neue Aktivitäten ausgehend von natürlich vorkommenden Enzymen einfach zugänglich sind, oft durch eine einzige Mutation. Trotzdem führt das simple Austauschen oder Hinzufügen von Resten nicht immer zu der erwünschten enzymatischen Aktivität.

Manchmal mag dies an der Wahl des falschen Proteingerüsts liegen, doch auch von einem gut gewählten Ausgangspunkt aus kann es in einigen Fällen notwendig sein, die aktive Tasche umfassend umzustrukturieren, um die neue katalytische Maschinerie einzupassen oder um die optimale Umgebung für die gewünschte Reaktion zu schaffen. Beispielsweise kann das neue Substrat oder die neue Reaktion größere sterische Ansprüche an die aktive Tasche stellen, als mit den Mitteln der zuvor beschriebenen Strategien zur Verfügung gestellt werden können, oder ein neu eingeführter Rest hat (ungewollte) drastische Auswirkungen auf die Struktur. Einzelmutationen sind also nicht die Antwort auf jede Fragestellung!

Ein typisches Beispiel für die Erfordernis wesentlich umfassenderer Eingriffe in die aktive Tasche ist der Versuch, 4-Chlorbenzoyl(CBA)-CoA-Dehalogenase in eine Crotonase umzuwandeln, beides Mitglieder der 2-Enoyl-CoA-Hydrolase/Isomerase-Superfamilie.<sup>[131]</sup> Als man aufgrund einfacher Homologiestudien die beiden katalytisch essenziellen Glutamatreste von Crotonase in das 4-CBA-CoA-Dehalogenase-Gerüst einbaute, erhielt man ein instabiles Protein, was man auf die sterische Abstoßung mehrerer Reste in der aktiven Tasche zurückführte. Diese Instabilität verhinderte die experimentelle Bestätigung der erwarteten Aktivität. Daher wurden sechs weitere Mutationen eingeführt, hauptsächlich in einem einzigen Segment der instabilen Gly117Glu/Trp137Glu-Variante von 4-CBA-CoA-Dehalogenase. Diese zusätzlichen Eingriffe sollten den Glutamatresten mehr Platz einräumen und ihnen zu einer optimalen Ausrichtung verhelfen – tatsächlich zeigte diese Variante Crotonase-Aktivität ( $k_{\text{cat}} = 0.06 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{\text{cat}}/K_m = 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Schema 22), die



**Schema 22.** Auf Strukturhomologie basierende Einführung von Crotonase-Aktivität in ein 4-CBA-CoA-Dehalogenase-Gerüst.

mehr als 64000fach über der Hintergrundreaktion lag. Beispiele für noch größere Eingriffe sind die Einführung von Scytalon-Dehydratase-Aktivität in ein homologes, aber katalytisch inaktives Gerüst<sup>[132]</sup> sowie die Umwandlung von Glyoxalase II, einer Metallhydrolase, in eine Metall- $\beta$ -Lactamase.<sup>[133]</sup> Zusätzlich zu Punktmutationen erforderte die Umgestaltung dieser beiden Proteine die Substitution/Addition ganzer Kettensegmente.

Prinzipiell ist es von Vorteil, möglichst geringfügige Eingriffe in einer aktiven Tasche vorzunehmen, denn dadurch ist

der Rückgriff auf die Funktion der konservierten Aminosäurereste am sichersten gewährleistet. Eine geringe Zahl an Mutationen vereinfacht zwar die Konstruktionsstrategie, schränkt aber die für ein gegebenes Gerüst erreichbaren Aktivitäten auch ein. Natürlich entwickelte Enzyme erkennen bevorzugt Substrate und Übergangszustände bestimmter Größe, Form und elektrostatischer Eigenschaften. Für die im vorigen Absatz beschriebenen Anwendungen ist die simple Substitution einzelner katalytischer Reste offensichtlich nicht ausreichend, um diese Hürde zu überwinden. Solche schwierigen Fälle erfordern große Hartnäckigkeit und ein tiefes Verständnis, um die notwendigen Anpassungen in der aktiven Tasche zu identifizieren und vorzunehmen, ohne dabei das empfindliche Gleichgewicht zwischen Funktion und Stabilität zu stören.

Tatsächlich dürfte es bei schwierigeren Enzymumgestaltungen notwendig sein, nicht mehr nur jene Reste zu berücksichtigen, die direkt mit dem Substrat wechselwirken (erste Schale), sondern auch solche, die die Ausrichtung der Reste in der aktiven Tasche beeinflussen (zweite Schale). Für die Steuerung der Aktivität ist die erste Schale sicher wichtiger – Eingriffe in der zweiten Schale können aber einen signifikanten Einfluss auf Größe und Struktur der aktiven Tasche sowie auf die Orientierung und damit auch auf die Reaktivität der katalytischen Reste haben.

Nur ein Beispiel sei hier erwähnt: Glu117 ist in menschlicher Kohlensäure-Anhydrase essenziell für die Einstellung der Polarität von His119 (welches das reaktive Zn<sup>2+</sup>-Metallzentrum koordiniert), und eine strukturell konservative Substitution von Glu117 durch Gln führt zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust (wegen des starken Anstiegs des pK<sub>S</sub>-Werts des metallgebundenen Wassers, was wiederum aus der Stabilisierung des Histidinianions resultiert).<sup>[134]</sup>

Eine größere Zahl an Mutationen vergrößert folglich den Spielraum für das Engineering der aktiven Taschen, und weit entfernte Mutationen, wie sie oft bei gerichteter Evolution gefunden wurden, können Aktivitäten und Selektivitäten feinabstimmen.<sup>[135]</sup> Aus diesen Beispielen lässt sich als generelle Strategie für die Umgestaltung von Enzymen ableiten, dass man zunächst mit der Mutagenese der aktiven Tasche beginnen sollte, da diese Eingriffe den größten Einfluss auf die Reaktivität haben;<sup>[77]</sup> anschließend gestaltet man, ausgehend von der zweiten Schale, das Protein Schritt für Schritt nach außen um. Ein umfassendes Verständnis der Enzymsstruktur und -funktion wird dabei entscheidend für den Erfolg sein.

## 5. Lektionen über die Evolution

Informationen über natürliche Enzyme bilden die Basis für rationale Umgestaltungen. Eine Analyse der Resultate der Umgestaltungsexperimente könnte daher Einblicke in natürliche Evolutionsprozesse liefern. Die Beobachtung, dass zwei verschiedene Enzyme sich nur durch eine (oder wenige) Punktmutation(en) im Sequenzraum unterscheiden, legt einen ähnlichen Verlauf für die natürliche, divergente Evolution durch Genduplikation und zufällige Punktmutation nahe. Die Vorstellung, dass viele der heutigen Enzyme von

einer gemeinsamen Vorstufe divergierten, ist wegen ihrer strukturellen und mechanistischen Ähnlichkeit weitgehend akzeptiert.<sup>[9,10]</sup> Verwandte Enzyme mit unterschiedlichen Aktivitäten haben jedoch normalerweise nur eine geringe Sequenzähnlichkeit (weniger als 50%). Es ist daher schwierig herauszufinden, welche Mutationen wirklich entscheidend für die unterschiedlichen Aktivitäten dieser Enzyme sind. Die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Beispiele liefern dazu eindeutige Antworten, denn die umgebauten Varianten enthalten nur solche Mutationen, die absolut notwendig sind, um die Aktivität zu ändern und zeigen, dass bereits kleine Änderungen in der Sequenz dazu führen können, dass völlig unterschiedliche chemische Reaktionen katalysiert werden.

Beispiele aus der natürlichen Evolution stützen diese These. Die Untersuchung der Resistenz von Schmeißfliegen gegen Organophosphatpestizide (OP; z. B. Diazinon) ergab, dass Mutationen in einem Gen, das eigentlich für eine Carboxy-Esterase codiert, für die neue OP-Hydrolase-Aktivität verantwortlich sein könnte.<sup>[136]</sup> Es wurde beobachtet, dass eine einzige Mutation von Glycin zu Aspartat nahe der Oxyaniontasche in allen resistenten Stämmen vorhanden war, obwohl auch weitere zufällige Mutationen gefunden wurden.<sup>[137]</sup> Die Gly137Asp-Mutante von der (elterlichen) Carboxy-Esterase E3 eines OP-empfindlichen Stamms zeigte tatsächlich OP-Hydrolase-Aktivität, allerdings unter Verlust der Carboxy-Esterase-Aktivität. Diese E3-Mutante scheint einen ähnlichen OP-Hydrolase-Mechanismus wie die konstruierte Butyrylcholin-Esterase (Abschnitt 3.2.1) zu haben. Dies ist kein Einzelfall, andere Beispiele betreffen die Atrazin-Chlorhydrolase<sup>[138]</sup> und Melamin-Desaminase,<sup>[139]</sup> die am Abbau synthetischer Substanzen beteiligt sind, die seit dem letzten Jahrhundert in die Umwelt gelangt sind. Diese Enzyme divergierten erst in der letzten Zeit von einer gemeinsamen Vorstufe, und obwohl sie für ihre jeweiligen Reaktionen spezifisch sind, unterscheiden sich ihre Sequenzen in nur neun Aminosäuren, wobei die meisten für die neue Aktivität nicht wesentlich sind.<sup>[140]</sup> Die Bedeutung dieser nicht essenziellen Mutationen ist unklar; möglicherweise tragen sie zur Optimierung der Aktivität oder zur Stabilisierung bei, oder sie resultieren nur aus neutraler genetischer Drift.

Es wurde vorgeschlagen, dass die Evolution neuer Funktionen über nichtspezifische Intermediate verläuft.<sup>[7,8,84]</sup> Die Beobachtung katalytischer Promiskuität in natürlich evolvierten wie in umgestalteten Enzymen bestätigt diese Sichtweise. Allerdings führen nicht alle Aktivitätswechsel zu Promiskuität (Beispiele: Subtilisin zu Peroxidase, Glutacan-CoA-Transferase zu Glutaryl-CoA-Hydrolase). Einzelne Mutationen können manchmal die Umgebung innerhalb der aktiven Tasche radikal verändern und die ursprüngliche Aktivität auslöschen, während sie eine neue Funktion einführen. Kleine Änderungen in der Sequenz können zu promiskutiven Enzymen führen, einige Modifikation ergeben aber auch neue, spezialisierte Katalysatoren.

Die minimale Umgestaltung aktiver Taschen hat vielerlei Strategien zur Entwicklung neuer Enzyme aufgezeigt. Weiterhin ist sie relevant für das Verständnis der Entwicklung metabolischer Wege.<sup>[141]</sup> Dazu zählen auch die retrograde Evolution, bei der Enzyme sequenziell rückwärts entlang der

Stoffwechselwege entwickelt werden<sup>[41]</sup> (z.B. Umsetzung der 3 $\alpha$ -HSD zur 5 $\beta$ -Reduktase, Abschnitt 3.1.1), die Spezialisierung von promiskuitiven Enzymen<sup>[7,8]</sup> (z.B. NAL zu DHDPS, Abschnitt 3.3) und die Rekrutierung von Enzymen aus anderen Stoffwechselwegen<sup>[8]</sup> (z.B. HisA zu TrpF, Abschnitt 3.1.1). Aus der Perspektive des Proteiningenieurs sind alle Ansätze ähnlich plausibel. Die Wahl des Stammgerüsts könnte von der evolutionären Konkurrenz zwischen Substratbindung und Reaktivität bestimmt sein.

Die wenigen Mutationen, die notwendig sind, um eine neue (oder optimierte) katalytische Aktivität zu erhalten, können schon allein durch die Fehlerrate bei der DNA-Replikation hervorgebracht werden. Daher ist es denkbar, dass sich eine neue Enzymaktivität in einer gegebenen Faltung spontan entwickeln kann. Diese neue Aktivität kann entweder in einem Stoffwechselweg Anwendung finden oder wieder verloren gehen. Die Kombination aus Selektionsdruck und der Dynamik der Genomverdopplung könnte so die Enzymevolution recht einfach beschleunigen.

## 6. Ausblick

Natürliche Enzyme sind offensichtlich keine evolutionären Sackgassen. Sie liegen vielmehr auf oder nahe an Scheidewegen, sodass eine gut gewählte Einzelmutation enorme Auswirkungen haben kann. Oft werden dabei alte Aktivitäten unterdrückt, und neue Aktivitäten treten hervor. Zwar wird die jeweilige Methode für die Umgestaltung der aktiven Tasche von Fall zu Fall neu gewählt, die Fülle an neuen, durch rationale Mutagenese erhaltenen Enzymen demonstriert allerdings die Allgemeingültigkeit dieser Strategie im Hinblick auf Ausgangsgerüst und Zielaktivität. Das Erschaffen neuer Aktivität kann im Allgemeinen auf eine Änderung in der Spezifität zurückgeführt werden, und zwar entweder der Bindung (Affinität für ein neues Substrat), der Funktion (die gleiche katalytische Maschinerie wird auf neue Art genutzt) oder des Mechanismus (neue reaktive Zentren werden hinzugefügt).<sup>[10]</sup>

Besonders interessant ist die Entwicklung von Biokatalysatoren für Reaktionen, die in der Natur nicht vorkommen. Viele der hier diskutierten neuen Aktivitäten basieren auf natürlicher Homologie, es wurden aber bereits erste Schritte zur Erzeugung völlig nichtnatürlicher Aktivitäten unternommen. Neben minimaler Umgestaltung natürlicher Enzyme gibt es zwei weitere Ansätze: katalytische Antikörper sowie rechnergestütztes Design (In-silico-Screening).

Katalytische Antikörper haben sich als besonders allgemein anwendbare und zuverlässige Möglichkeit zur Erzeugung neuer Proteinkatalysatoren erwiesen<sup>[142]</sup> – allerdings bleiben ihre katalytischen Effizienzen immer noch weit hinter denjenigen von natürlichen Enzymen zurück. Die Reifung der Antikörper, die auf die Affinität zum Hapten ausgerichtet ist, kann Reste entstehen lassen, die zwar für die feste Bindung des Haptens im Grundzustand nützlich sind, aber keinen Nutzen für die katalysierte Umsetzung des Substrates haben. Zudem hat es sich als äußerst schwierig erwiesen, die normalerweise sehr geringen Aktivitäten dieser Gerüste zu optimieren.

Im Unterschied zu katalytischen Antikörpern ist die rationale Umgestaltung nicht auf das Immunoglobulingerüst beschränkt, sondern umfasst alle bekannten Proteinfaltungen, von denen viele besser zur Optimierung der Aktivität geeignet sein sollten. Zudem vereinfacht die bestehende Vielfalt an katalytischen Aktivitäten natürlicher Enzyme den Umgestaltungsprozess, da viele zur Katalyse optimierte Merkmale der aktiven Tasche einfach übernommen werden können.

Rechnergestütztes Design teilt viele Vorteile der minimalen Umgestaltung, hat zusätzlich jedoch eine potenziell höhere Allgemeingültigkeit, da es nicht durch die Homologie zu natürlichen Enzymen beschränkt ist. Ein erster bemerkenswerter Erfolg war in diesem Zusammenhang die Einführung einer Triosephosphat-Isomerase-Aktivität in ein Ribose-bindendes Protein.<sup>[143]</sup> Rechnergestützte Methoden befinden sich allerdings immer noch im Anfangsstadium, und um ihr enormes Potenzial auszuschöpfen, muss man zunächst die Enzymenergetik wesentlich besser verstehen. Der aktuellen Software zur Enzymkonstruktion fehlen einige fundamentale Aspekte des minimalistischen Ansatzes, z.B. die chemische Intuition und die Fähigkeit, Chemie passend mit Gerüst zu verknüpfen. In naher Zukunft werden genauere und benutzerfreundlichere Programmversionen den Enzymingenieuren wertvolle Hilfestellung leisten, indem sie die Analyse einer größeren Zahl an Mutationen ermöglichen. Die Kombination von chemischen und rechnergestützten Methoden wird zweifellos die Entwicklung von Katalysatoren für nichtbiologische Reaktionen beschleunigen. Es gab bereits einige erste Arbeiten in dieser Richtung.<sup>[144]</sup> Daher sollte das rechnergestützte Design mehr als eine Ergänzung zur minimalen Umgestaltung gelten denn als Alternative.

Rechnergestützte Designmethoden könnten prinzipiell auch auf die Optimierung von Aktivität angewendet werden. Unser Verständnis der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion ist jedoch noch nicht gut genug, als dass dieser Ansatz zuverlässig zum Erfolg führen könnte. Gerichtete Evolution bietet einen generellen Weg zur Verbesserung von Katalysatoren, ohne dass dazu Vorkenntnisse über Struktur oder Mechanismus vorhanden sein müssen. Laufend werden neue, gut durchdachte Bibliothekformen, Screening- und Selektionsmethoden entwickelt.<sup>[76,145]</sup> Diese Fortschritte erweitern die Anwendbarkeit der gerichteten Evolution zur Schaffung neuer Aktivitäten und verbessern die Chance zur Identifizierung interessanter Moleküle, indem die Zahl an untersuchten Sequenzen erweitert wird. Die Anwendung von gerichteter Evolution zur Entdeckung neuer Aktivitäten ist noch stark durch die ungenügende Empfindlichkeit aktueller Detektionstechniken für geringe Aktivitäten in einer großen Mutantenbibliothek eingeschränkt, auch wenn aktive Mutanten sehr wahrscheinlich in der Bibliothek vorhanden sind. Daher sind Methoden unerlässlich, mit deren Hilfe sich Ausgangsaktivitäten erzeugen lassen, die über dem Hintergrundniveau liegen.

Auf der Basis der hier diskutierten Beispiele könnte man die Strukturen der aktiven Taschen zu einem lokalen Code abstrahieren, der dann eine allgemeine Lösung für eine spezifische Funktion enthält.<sup>[146]</sup> Dieser Code ist wohl modular, und Substitutionen der Reste können entweder den Sinn

zerstören (z.B. Inaktivierung des Enzyms) oder seine Ausgabe verändern (z.B. Wechsel der katalytischen Aktivität des Enzyms). Wie wir gesehen haben, sind die Reste, die die aktive Tasche bilden, am wichtigsten, doch die zweite Schale der aktiven Tasche (ebenso wie weiter entfernte Teile der Proteinstruktur) kann ebenfalls eine signifikante Rolle spielen, die aber im Allgemeinen schwieriger zu interpretieren und mit vorhersehbarem Ergebnis zu manipulieren ist. Eine Kombination von rationalem Design, Rechnungen und gerichteter Evolution sollte ein Weg sein, den Code der aktiven Taschen zu entziffern und ihn für Manipulationen nutzbar zu machen, was den Zugang zu maßgeschneiderten, optimierten Enzymen eröffnen würde.

*Für finanzielle Unterstützung danken wir dem Schweizerischen Nationalfonds, der Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA) und den National Institutes of Health (postdoctoral fellowship für K.J.W.). Des Weiteren sei Maren Butz, Manuel Müller und Thorsten Stafforst für die Übersetzung ins Deutsche gedankt.*

Eingegangen am 13. Oktober 2006

- [1] C. Walsh, *Nature* **2001**, *409*, 226.
- [2] R. Wolfenden, M. J. Snider, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 938.
- [3] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258; K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232; H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694.
- [4] C. A. Orengo, D. T. Jones, J. M. Thornton, *Nature* **1994**, *372*, 631; Y. I. Wolf, N. V. Grishin, E. V. Koonin, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 897; A. Grant, D. Lee, C. Orengo, *Genome Biol.* **2004**, *5*, 107.
- [5] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91; S. D. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265.
- [6] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032.
- [7] O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498.
- [8] R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409.
- [9] P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30591; J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 209.
- [10] M. E. Glasner, J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 492.
- [11] A. Peracchi, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 497.
- [12] T. M. Penning, J. M. Jez, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3027.
- [13] H. M. Wilks, J. J. Holbrook, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 561; N. M. Antikainen, S. F. Martin, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2701; R. A. Chica, N. Doucet, J. N. Pelletier, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 378.
- [14] L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501.
- [15] J. A. Wells, D. A. Estell, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 291; P. N. Bryan, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1543*, 203.
- [16] L. Polgar, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3153.
- [17] K. E. Neet, D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *56*, 1606.
- [18] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, S. E. Rokita, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 565.
- [19] L. Polgar, M. L. Bender, *Biochemistry* **1967**, *6*, 610; K. E. Neet, A. Nanci, D. E. Koshland, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 6392.
- [20] T. Nakatsuka, T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3808.
- [21] L. Abrahmsen, J. Tom, J. Burnier, K. A. Butcher, A. Kossiakoff, J. A. Wells, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4151.
- [22] T. K. Chang, D. Y. Jackson, J. P. Burnier, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12544.
- [23] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, *266*, 243.
- [24] Z.-P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4513.
- [25] Z.-P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5647.
- [26] L. Flohe, *Basic Life Sci.* **1988**, *49*, 663.
- [27] R. Syed, Z.-P. Wu, J. M. Hogle, D. Hilvert, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6157.
- [28] K. L. House, R. B. Dunlap, J. D. Odom, Z.-P. Wu, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8573; K. L. House, A. R. Garber, R. B. Dunlap, J. D. Odom, D. Hilvert, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3468.
- [29] I. M. Bell, M. L. Fisher, Z.-P. Wu, D. Hilvert, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3754.
- [30] I. M. Bell, D. Hilvert, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13969.
- [31] E. B. Peterson, D. Hilvert, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6616; E. B. Peterson, D. Hilvert, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12311.
- [32] D. Häring, B. Hubert, E. Schüler, P. Schreier, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *354*, 263.
- [33] D. Häring, M. Herderich, E. Schüler, B. Withopf, P. Schreier, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 853; D. Häring, E. Schüler, W. Adam, C. R. Saha-Möller, P. Schreier, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 832.
- [34] S. Mao, Z. Dong, J. Lui, X. Li, X. Liu, G. Luo, J. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11588.
- [35] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34.
- [36] J. A. Gerlt, F. M. Raushel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 252; J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, I. Rayment, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 59.
- [37] D. M. Z. Schmidt, E. C. Mundorff, M. Dojka, E. Bermudez, J. E. Ness, S. Govindarajan, P. C. Babbitt, J. Minshull, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8387.
- [38] J. E. Vick, D. M. Z. Schmidt, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11722.
- [39] J. M. Jez, M. J. Bennett, B. P. Schlegel, M. Lewis, T. M. Penning, *Biochem. J.* **1997**, *326*, 625.
- [40] J. M. Jez, T. M. Penning, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9695.
- [41] N. H. Horowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1945**, *31*, 153.
- [42] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1221.
- [43] S. D. Williams, S. S. David, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10098.
- [44] C. Jürgens, A. Strom, D. Wegener, S. Hettwer, M. Wilmanns, R. Sterner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9925; S. Leopoldsdeder, J. Claren, C. Jürgens, R. Sterner, *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 871.
- [45] D. L. Leussing, N. V. Raghavan, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5635.
- [46] K. Johnsson, R. K. Allemand, H. Widmer, S. A. Benner, *Nature* **1993**, *365*, 530; S. E. Taylor, T. J. Rutherford, R. K. Allemand, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 **2002**, *751*; C. J. Weston, C. H. Cureton, M. J. Calvert, O. S. Smart, R. K. Allemand, *Chem-BioChem* **2004**, *5*, 1075.
- [47] T. K. Harris, R. M. Czerwinski, W. H. Johnson, Jr., P. M. Legler, C. Abeygunawardana, M. A. Massiah, J. T. Stivers, C. P. Whitman, A. S. Mildvan, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12343.
- [48] A. Brik, L. J. D'Souza, E. Keinan, F. Grynszpan, P. E. Dawson, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 845.
- [49] M. J. Wishart, J. M. Denu, J. A. Williams, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26782.
- [50] S. Boschi-Muller, S. Muller, A. Van Dorsselaer, A. Böck, G. Brälnant, *FEBS Lett.* **1998**, *439*, 241.
- [51] H. Yu, J. Liu, A. Böck, J. Li, G. Luo, J. Shen, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11930.
- [52] K. R. Maddipati, L. J. Marnett, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17398.

- [53] S. Hederos, K. S. Broo, E. Jakobsson, G. J. Kleywegt, B. Mannervik, L. Baltzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13163.
- [54] R. Kuroki, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 1007; R. Kuroki, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8949.
- [55] E. Quéméneur, M. Moutiez, J.-B. Charbonnier, A. Ménez, *Nature* **1998**, *391*, 301.
- [56] M. Mack, W. Buckel, *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 209.
- [57] C. Corbier, F. D. Setta, G. Branst, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12532.
- [58] P. Carlqvist, M. Svedendahl, C. Branneby, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 331; M. Svedendahl, K. Hult, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988.
- [59] A. Witkowski, A. K. Joshi, Y. Lindqvist, S. Smith, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11643.
- [60] K. Huang, P. A. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9548.
- [61] M. D. Toney, J. F. Kirsch, *Science* **1989**, *243*, 1485.
- [62] L. F. Mackenzie, Q. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5583; C. Mayer, D. L. Zechel, S. P. Reid, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *FEBS Lett.* **2000**, *466*, 40; O. Nashiru, D. L. Zechel, D. Stoll, T. Mohammadzadeh, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 431; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 417.
- [63] M. Jahn, J. Marles, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 366; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 352.
- [64] M. Jahn, H. Chen, J. Mülliger, J. Marles, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *Chem. Commun.* **2004**, 274.
- [65] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 391.
- [66] A. Witkowski, H. E. Witkowska, S. Smith, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 379.
- [67] E. Dufour, A. C. Storer, R. Ménard, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16382.
- [68] E. Dufour, W. Tam, D. K. Nägele, A. C. Storer, R. Ménard, *FEBS Lett.* **1998**, *433*, 78.
- [69] S. K. Boehlein, J. G. Rosa-Rodriguez, S. M. Schuster, N. G. J. Richards, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5785.
- [70] C. B. Millard, O. Lockridge, C. A. Broomfield, *Biochemistry* **1995**, *34*, 15925; O. Lockridge, R. M. Blong, P. Masson, M.-T. Froment, C. B. Millard, C. A. Broomfield, *Biochemistry* **1997**, *36*, 786.
- [71] V. E. Lewis, W. J. Donarski, J. R. Wild, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1988**, *27*, 1591.
- [72] L. C. Tarshis, P. J. Proteau, B. A. Kellogg, J. C. Sacchettini, C. D. Poulter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 15018.
- [73] S. M. S. Fernandez, B. A. Kellogg, C. D. Poulter, *Biochemistry* **2000**, *39*, 15316.
- [74] K. Hirooka, S.-I. Ohnuma, A. Koike-Takeshita, T. Koyama, T. Nishino, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 4520.
- [75] J. M. Jez, M. B. Austin, J.-L. Ferrer, M. E. Bowman, J. Schröder, J. P. Noel, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 919.
- [76] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3701; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284.
- [77] K. L. Morley, R. J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 231.
- [78] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, M. Ferrer, A. Matthevi, W. J. H. van Berk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9455.
- [79] Y. Iijima, K. Motoishi, Y. Terao, N. Doi, H. Yanagawa, H. Ohta, *Chem. Commun.* **2005**, 877.
- [80] R.-T. Jiang, T. Dahnke, M.-D. Tsai, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5485.
- [81] S. Lodeiro, T. Schulz-Gasch, S. P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14132.
- [82] D. B. Little, R. B. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 120.
- [83] B. T. Greenhagen, P. E. O'Maille, J. P. Noel, J. Chappell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9826.
- [84] I. Matsumura, A. D. Ellington, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 331.
- [85] Y. Yoshikuni, T. E. Ferrin, J. D. Keasling, *Nature* **2006**, *440*, 1078.
- [86] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in synthetic organic chemistry*, Pergamon, Oxford, **1994**.
- [87] E. Wise, W. S. Yew, P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, I. Rayment, *Biochemistry* **2002**, *41*, 3861.
- [88] W. S. Yew, J. Akana, E. L. Wise, I. Rayment, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1807; E. L. Wise, W. S. Yew, J. Akana, J. A. Gerlt, I. Rayment, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1816.
- [89] A. C. Joerger, S. Mayer, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5694.
- [90] B. Mannervik, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1985**, *57*, 357.
- [91] P. L. Pettersson, A.-S. Johansson, B. Mannervik, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30019.
- [92] A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, S. McQ. Gould, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat. Genet.* **2004**, *37*, 73; S. McQ. Gould, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5444; C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12728.
- [93] P. Bernhardt, K. Hult, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2742.
- [94] Y. Wang, G. Scherperel, K. D. Roberts, A. D. Jones, G. E. Reid, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13216.
- [95] H. M. Wilks, K. W. Hart, R. Feeney, C. R. Dunn, H. Muirhead, W. N. Chia, D. A. Barstow, T. Atkinson, A. R. Clarke, J. J. Holbrook, *Science* **1988**, *242*, 1541.
- [96] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, C. Baron, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 463; T. C. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 83.
- [97] J. A. Krzycki, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 706.
- [98] R. G. Krishna, F. Wold, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1993**, *67*, 265.
- [99] R. Miura, *Chem. Rec.* **2001**, *1*, 183.
- [100] L. Xi, K.-W. Cho, M. E. Herndon, S.-C. Tu, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4200.
- [101] W. Sun, C. H. Williams, Jr., V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17226.
- [102] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science* **1984**, *226*, 505.
- [103] S. W. Ragsdale, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3317.
- [104] C. M. Thomas, T. R. Ward, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337; Y. Lu, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5714; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5588.
- [105] M. E. Wilson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306.
- [106] J. Collot, J. Gradišar, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030.
- [107] C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320.
- [108] S.-I. Ozaki, T. Matsui, Y. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9784; T. Matsui, S.-I. Ozaki, E. Liang, G. N. Phillips, Jr., Y. Watanabe, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2838.
- [109] M. Ohashi, T. Koshiyama, T. Ueno, M. Yanase, H. Fujii, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1035; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1005.
- [110] J. R. Carey, S. K. Ma, T. D. Pfister, D. K. Garner, H. K. Kim, J. A. Abramite, Z. Wang, Z. Guo, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812.
- [111] K. Okrasa, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1587; A. Fernandez-Gacio, A. Codina, J. Fastrez, O. Riant, P. Soumillion, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1013.
- [112] F. van de Velde, L. Könemann, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 87.
- [113] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 871.
- [114] P. Broun, J. Shanklin, E. Whittle, C. Somerville, *Science* **1998**, *282*, 1315.
- [115] J. A. Broadwater, E. Whittle, J. Shanklin, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15613.

- [116] M. Gunsior, J. Ravel, G. L. Challis, C. A. Townsend, *Biochemistry* **2004**, *43*, 663; H. M. O'Hare, F. Huang, A. Holding, O. W. Choroba, J. B. Spencer, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 3445.
- [117] M. T. Reetz, N. Jiao, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2416.
- [118] L. Panella, J. Broos, J. Jin, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, M. Jeronimus-Stratingh, B. L. Feringa, A. J. Minnaard, J. G. de Vries, *Chem. Commun.* **2005**, 5656.
- [119] Y. Lu, S. M. Berry, T. D. Pfister, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3047; A. L. Pinto, H. W. Hellinga, J. P. Caradonna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 5562.
- [120] A. C. Eliot, J. F. Kirsch, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 383.
- [121] M. D. Toney, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 279.
- [122] A. E. Martell, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 115.
- [123] L. Liu, R. Breslow in *Artificial Enzymes* (Hrsg.: R. Breslow), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 37.
- [124] H. C. Dunathan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *55*, 712.
- [125] F. P. Seebeck, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10158.
- [126] T. Kimura, V. P. Vassilev, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11734; J.-Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16678.
- [127] F. P. Seebeck, A. Guainazzi, C. Amoreira, K. K. Baldridge, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6824.
- [128] G. Y. Yow, A. Watanabe, T. Yoshimura, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B* **2003**, *23*, 311.
- [129] L. K. Jackson, H. B. Brooks, A. L. Osterman, E. J. Goldsmith, M. A. Phillips, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11247.
- [130] R. Gruber, P. Kasper, V. N. Malashkevich, E. Sandmeier, P. Berger, H. Gehring, J. N. Jansonius, P. Christen, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 686; R. Gruber, P. Kasper, V. N. Malashkevich, P. Strop, H. Gehring, J. N. Jansonius, P. Christen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31203.
- [131] H. Xiang, L. Luo, K. L. Taylor, D. Dunaway-Mariano, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7638.
- [132] A. E. Nixon, S. M. Firestone, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3568.
- [133] H.-S. Park, S.-H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, H.-S. Kim, *Science* **2006**, *311*, 535.
- [134] C.-C. Huang, C. A. Lesburg, L. L. Kiefer, C. A. Fierke, D. W. Christianson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3439.
- [135] P. E. Tomatis, R. M. Rasia, L. Segovia, A. J. Vila, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13761.
- [136] P. M. Campbell, J. F. Trott, C. Claudianos, K.-A. Smyth, R. J. Russell, J. G. Oakeshott, *Biochem. Genet.* **1997**, *35*, 17.
- [137] R. D. Newcomb, P. M. Campbell, D. L. Ollis, E. Cheah, R. J. Russell, J. G. Oakeshott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7464.
- [138] M. J. Sadowsky, Z. Tong, M. de Souza, L. P. Wackett, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 152; J. L. Seffernick, L. P. Wackett, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12747.
- [139] J. L. Seffernick, M. L. de Souza, M. J. Sadowsky, L. P. Wackett, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2405.
- [140] S. Raillard, A. Krebber, Y. Chen, J. E. Ness, E. Bermudez, R. Trinidad, R. Fullem, C. Davis, M. Welch, J. Seffernick, L. P. Wackett, W. P. C. Stemmer, J. Minshull, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 891.
- [141] S. Schmidt, S. Sunyaev, P. Bork, T. Dandekar, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 336.
- [142] D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 751; P. G. Schultz, J. Yin, R. A. Lerner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4607; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4427; E. Keinan, *Catalytic Antibodies*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [143] M. A. Dwyer, L. L. Looger, H. W. Hellinga, *Science* **2004**, *304*, 1967.
- [144] T. Kortemme, L. A. Joachimiak, A. N. Bullock, A. D. Schuler, B. L. Stoddard, D. Baker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 371; A. Korkegian, M. E. Black, D. Baker, B. L. Stoddard, *Science* **2005**, *308*, 857; P. Oelschlaeger, S. L. Mayo, *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 395; J. Ashworth, J. J. Havranek, C. M. Duarte, D. Sussman, R. J. Monnat, Jr., B. L. Stoddard, D. Baker, *Nature* **2006**, *441*, 656.
- [145] S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3310; J.-P. Goddard, J.-L. Reymond, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 314; J. D. Bloom, M. M. Meyer, P. Meinholt, C. R. Otey, D. MacMillan, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 447; A. Aharoni, A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 210.
- [146] M. Allert, M. A. Dwyer, H. W. Hellinga, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 945.