

Künstliche Enzyme maßgeschneidert: Kombination von Computerdesign und gerichteter Evolution**

Thomas R. Ward*

Eliminierungen · Enzymdesign · Gerichtete Evolution ·
Künstliche Enzyme · Protonentransfer

Gemäß der von Haldane und Pauling formulierten klassischen Theorie der Enzymkatalyse ist die Stabilisierung eines Übergangszustandes durch schwache Wechselwirkungen verantwortlich für die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Enzyme.^[1] Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines künstlichen Enzyms enorm anspruchsvoll, denn sie erfordert eine präzise Kenntnis der Geometrie des Übergangszustandes, Methoden zur korrekten Positionierung entscheidender Aminosäuren für die Stabilisierung dieser Geometrie innerhalb eines Proteingerüsts sowie einen für Hochdurchsatz-Screenings geeigneten Assay zur Feinabstimmung der Aktivität über die Leistungsgrenze des rationalen Designs hinweg.

Kürzlich wurde diese schwierige Aufgabe nun mithilfe von Computerdesign^[2,3] und gerichteter Evolution angegangen.^[4,5] Die jüngste Untersuchung von Röthlisberger et al. zur Gewinnung eines künstlichen Enzyms für die basenkatalysierte Kemp-Eliminierung basiert sowohl auf Computerdesign als auch auf gerichteter Evolution (Abbildung 1).^[6] Diese Arbeit fußt auf den bemerkenswerten Fortschritten, die auf dem Gebiet des computergestützten Proteindesigns erzielt worden sind.^[7,8]

Die Betrachtung des für diese Reaktion berechneten Übergangszustandes lässt vermuten, dass eine Stabilisierung durch die geeignete Positionierung eines basischen Restes zur Abspaltung des aciden Protons, eines aromatischen Restes zur Bildung von π -Stapelwechselwirkungen und eines Wasserstoffbrückendonors zur Stabilisierung der entstehenden negativen Ladung am Phenolsauerstoffatom erreicht werden kann.

Für die Maßanfertigung eines idealisierten aktiven Zentrums aus einer breiten Palette von Faltungsmotiven wurde der RosettaMatch-Computeralgorithmus verwendet. Aus anfänglich 100 000 Kandidaten konnten so 59 Strukturen identifiziert werden, die in Bakterien exprimiert, gereinigt und getestet wurden; acht von diesen wiesen eine messbare katalytische Aktivität auf.

Bei Experimenten zur ortsgerichteten Mutagenese zeigte sich zwar, wie wichtig bestimmte katalytische Seitenketten sind, allerdings gelang mit dieser Methode keine signifikante Verbesserung der Effizienz. Die Autoren unterzogen nun ein mäßig aktives künstliches Enzym, dessen Struktur röntgenkristallographisch aufgeklärt worden war, einer gerichteten Evolution und erzielten dabei eine 200-fache Verbesserung des $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wertes gegenüber dem des ursprünglichen Enzyms.

Bei der computergestützten Modifizierung des aktiven Zentrums wurden zunächst 13 Mutationen in das Ausgangsgerüst eingeführt (Pdb-Code: 1thf). Die Kristallstruktur des künstlichen Enzyms ohne koordiniertes Substrat wies gegenüber der berechneten Enzymstruktur nur geringe Positionsveränderungen ihrer Seitenketten auf, was die Vorhersagequalität des RosettaMatch-Algorithmus demonstriert. Während der sieben Durchläufe der nachfolgenden gerichteten Evolution wurden bis zu acht zusätzliche Mutationen eingeführt, ohne dabei die Positionen des Computerdesigns anzutasten. Einige Mutationen befanden sich allerdings an benachbarten Positionen, was darauf schließen lässt, dass ein semirationaler Ansatz zur Feinabstimmung der Wechselwirkungen in der zweiten Koordinationssphäre eine weitere Optimierung ermöglichen könnte.^[9,10]

Der Protonentransfer ist die einfachste Reaktion in der Chemie – aber so einfach diese Reaktion auch scheinen mag, ist sie doch entscheidend für die hohe katalytische Effizienz zahlreicher enzymatischer Umwandlungen. In diesem Zusammenhang bietet die Kemp-Eliminierung eine ausgezeichnete Möglichkeit, unser Verständnis der für eine effiziente Katalyse benötigten Schlüsselemente zu prüfen; diese Reaktion wird durch katalytische Antikörper,^[11,12] Serumalbumine,^[13] Peptide, molekular geprägte Polymere sowie natürliche Kohlenstoffverbindungen katalysiert.

Das aktive Zentrum des künstlichen Enzyms zur Kemp-Eliminierung aktivierter Benzisoxazole weist eine besteckende Ähnlichkeit zu dem der katalytischen Antikörper auf ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 2590 bzw. 5500 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$),^[14] allerdings bietet der Ansatz von Röthlisberger et al. einige Vorteile:

- 1) Für eine Immunantwort werden ein bis zwei spezifisch positionierte Reste benötigt, um eine für Antigen-Antikörper-Bindung typische Affinität im nanomolaren Bereich zu erzielen. Dagegen kann beim Ansatz von Röthlisberger et al. eine beliebige Zahl von Resten zur Stabilisierung des Übergangszustandes eingebaut werden,

[*] Prof. T. R. Ward
Département Chemie, Universität Basel
Spitalstrasse 51, 4056 Basel (Schweiz)
E-Mail: thomas.ward@unibas.ch
Homepage: <http://www.unibas.ch/~ward/>

[**] Besonderer Dank gilt Prof. D. Hilvert und Dr. F. Seebeck für aufschlussreiche Diskussionen.

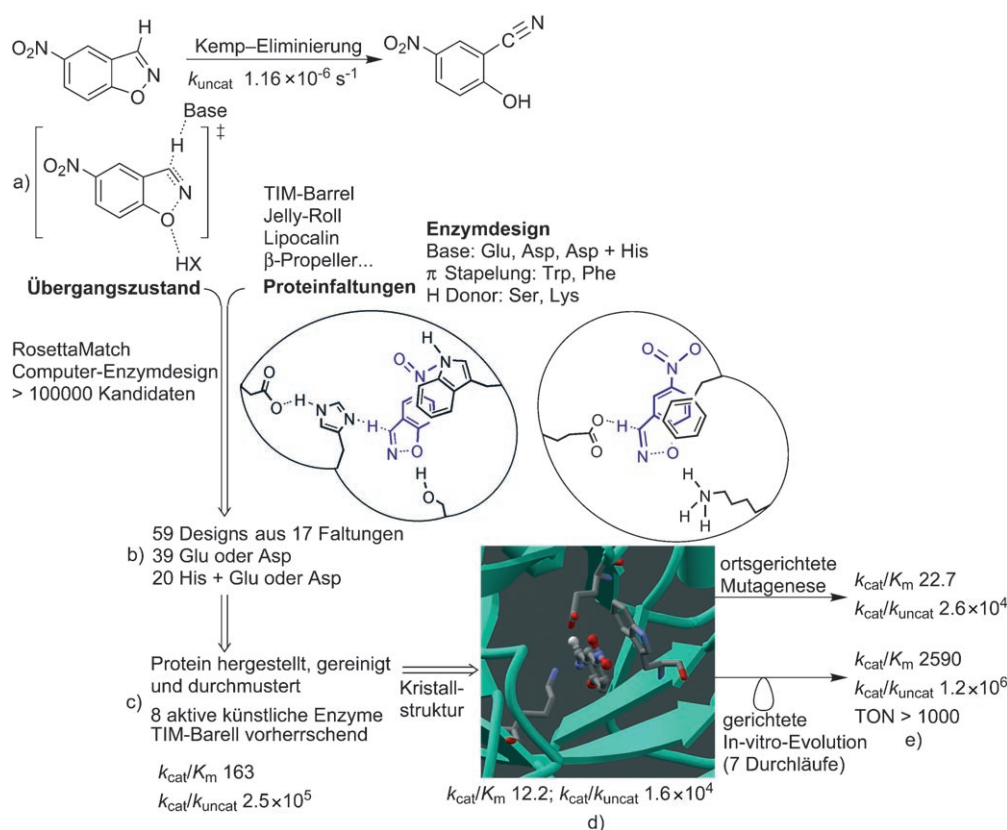


Abbildung 1. Computerdesign und gerichtete Evolution eines künstlichen Enzyms für die Kemp-Eliminierung. Der Übergangszustand der Kemp-Eliminierung (a) wurde für das Computerdesign eines aktiven Zentrums aus einer Vielzahl von Proteinfaltungsmotiven verwendet (b). Die in diesem virtuellen Screening gewonnenen Kandidaten wurden hergestellt und getestet, wobei acht aktive künstliche Enzyme identifiziert werden konnten (c). Die strukturelle Charakterisierung eines aktiven Enzyms wies eine nahezu perfekte Übereinstimmung mit dem Computerentwurf auf. Im gezeigten Computerentwurf ist das TIM-Barrel-Motiv hervorgehoben; der Übergangszustand ist als Kugel-Stab-Modell, die entscheidenden Seitenketten Trp50, Glu101 und Lys222 sind als Stabmodelle gezeigt (d). Weitere Optimierungen erfolgten durch ortsgerechte Mutagenese oder gerichtete Evolution (e). k_{cat}/K_m Werte sind in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ angegeben.

wenn auch zum Preis deutlich steigender Rechenzeiten. So könnte auch eine Katalyse anspruchsvollerer Reaktionen ermöglicht werden.

- Das Proteingerüst kann im Rahmen des Computerdesigns variiert werden, während katalytische Antikörper auf Immunglobuline beschränkt sind. Das in der Natur weit verbreitete TIM-Barrel-Gerüst (acht parallele β -Faltblätter, flankiert von acht α -Helices) scheint besonders geeignet, da zahlreiche Reste ins innere der katalytischen Tasche (in einem idealen Abstand für die Stabilisierung eines Übergangszustands) gerichtet sind.
- Die Expression des Antigen bindenden Fragments der Immunglobuline gestaltet sich in Bakterien schwierig, wodurch eine gerichtete Evolution katalytischer Antikörper erschwert wird.^[15] Entscheidend war die In-vitro-Evolution des am Computer entworfenen Enzyms, durch die eine mehr als 200-fache Verbesserung des k_{cat}/K_m -Wertes gegenüber dem des ursprünglichen Entwurfs erzielt wurde.
- Anstatt das aktive Zentrum eines katalytischen Antikörpers durch Stabilisierung eines Übergangszustandsanalogons zu erzeugen, werden die katalytischen Reste ideal positioniert, um den tatsächlichen Übergangszustand zu stabilisieren.

Der Ansatz von Røthlisberger et al. verbindet Computerdesign mit der kombinatorischen Diversität der gerichteten Evolution. Bisher können die künstlichen Enzyme im Vergleich zu den natürlichen allerdings nur als prototypische Enzyme mit mäßiger Aktivität angesehen werden. Da die prinzipielle Eignung dieses Ansatzes nunmehr erwiesen ist, können weitere Ziele definiert werden: eine Verbesserung der katalytischen Effizienz, wofür die Substratbindung und Produktfreisetzung optimiert werden müssen (womöglich hilft es hier, das Computerdesign mit einem flexiblen Rückgrat durchzuführen), sowie die Vermittlung von anspruchsvolleren Reaktionen. Jiang et al. verwendeten ausschließlich den RosettaMatch-Algorithmus zur Entwicklung und Charakterisierung künstlicher Retroaldolasen für ein nicht-natürliches Substrat.^[2] Möglicherweise könnten die mäßigen Aktivitäten in dieser Studie (k_{cat}/K_m $0.74 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}} > 2 \times 10^4$) mithilfe der gerichteten Evolution deutlich erhöht werden. Um den Anwendungsbereich künstlicher Enzyme zu erweitern, ist auch die Einführung prosthetischer Gruppen denkbar. Insgesamt können die hier vorgestellten Arbeiten^[2,4-6] als Meilensteine auf dem Weg künstlicher Enzyme hin zu nützlichen Synthesewerkzeugen angesehen werden.

Online veröffentlicht am 5. September 2008

- [1] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, 24, 1375.
- [2] L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas III, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2008**, 319, 1387.
- [3] J. Kaplan, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 11566.
- [4] H. S. Park, S. H. Nam, J. K. Lee, C. N. Yoon, B. Mannervik, S. J. Benkovic, H. S. Kim, *Science* **2006**, 311, 535.
- [5] B. Seelig, J. W. Szostak, *Nature* **2007**, 448, 828.
- [6] D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, 453, 190.
- [7] B. I. Dahiyat, S. L. Mayo, *Science* **1997**, 278, 82.
- [8] B. Kuhlman, G. Dantas, G. C. Ireton, G. Varani, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2003**, 302, 1364.
- [9] R. A. Chica, N. Doucet, J. N. Pelletier, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 378.
- [10] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4192.
- [11] S. N. Thorn, R. G. Daniels, M. T. Auditor, D. Hilvert, *Nature* **1995**, 373, 228.
- [12] R. Müller, E. W. Debler, M. Steinmann, F. P. Seebeck, I. A. Wilson, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 460.
- [13] F. Hollfelder, A. J. Kirby, D. S. Tawfik, *Nature* **1996**, 383, 60.
- [14] E. W. Debler, S. Ito, F. P. Seebeck, A. Heine, D. Hilvert, I. A. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 4984.
- [15] S. A. Lesley, P. A. Patten, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1160.



With its efficient and thorough peer-review system, ChemMedChem has quickly established itself as an attractive venue for reporting high-quality work in medicinal chemistry.

Steven Ley (University of Cambridge, UK)



www.ChemMedChem.org



EUChemSoc



WILEY-VCH