

Die Bedeutung von additiven und nicht-additiven Mutationseffekten beim Protein-Engineering**

Manfred T. Reetz*

Enzyme · Gerichtete Evolution · Mutations-Additivität ·
Mutations-Nicht-Additivität · Sättigungsmutagenese

1. Einführung

Mit der Entwicklung der ortsspezifischen Mutagenese durch Michael Smith^[1] vor mehr als drei Jahrzehnten steht eine molekularbiologische Methode zur Verfügung, mit der eine gegebene Aminosäure an einer definierten Position (Ort) im Protein durch eine der anderen 19 natürlich vorkommenden Aminosäuren ersetzt werden kann.^[2] Diese Technik hat sich beim Studium der Enzym-Mechanismen gemeinsam mit einem Arsenal von anderen experimentellen und theoretischen Methoden als unabdingbar erwiesen.^[1,3] Zugleich wurde in den letzten Dekaden ersichtlich, dass die „Geheimnisse“ der Enzyme weitaus komplexer sind als ursprünglich gedacht. Außer der Aufklärung des „groben“ Mechanismus eines gegebenen Enzyms spielen auch solch komplizierte Phänomene wie Proteindynamik und -flexibilität, elektrostatische Einflüsse, Tunneleffekte und Allosterie eine oft entscheidende Rolle.^[4] Wie in diesem Essay dargelegt ist dies der Grund, warum eine detaillierte Interpretation und Voraussage von Mutationseffekten schwierig ist, insbesondere wenn mehrere Punktmutationen eingeführt werden.

Bei dem Bestreben, die Wirkung von Enzymen als Katalysatoren in der organischen Chemie und Biotechnologie zu verbessern, ist der Austausch von Aminosäuren ebenfalls essenzieller Bestandteil des Protein-Engineerings, wobei die Erhöhung der Thermostabilität und Stereoselektivität von besonderer Bedeutung sind. Bindungsaffinitäten und Expressionsraten können mit der Methode ebenfalls beeinflusst werden. Zur praktischen Verwirklichung bieten sich zwei Optionen an: Eine Möglichkeit ist das so genannte „rationale

Design“ unter Verwendung der ortsspezifischen Mutagenese, die sich in einigen Fällen als erfolgreich erwiesen hat.^[2b,5] Leider ist dies bis zum heutigen Tag kein genereller Ansatz, auch dann nicht, wenn die zurzeit modernsten Rechenverfahren eingesetzt werden. Die zweite Option ist die so genannte gerichtete (gelenkte) Evolution, die auf randomisierter oder fokussierter Mutagenese basiert.^[2b,6] Dabei werden sich wiederholende Zyklen von Genmutagenese und -expression sowie Screening (oder Selektion) durchlaufen, ein Vorgang, der die natürliche Evolution simuliert. Die am häufigsten verwendeten Mutagenesemethoden sind die fehlerhafte Polymerasenkettenreaktion (epPCR, eine „Schrotflintenmethode“),^[2b,6] Sättigungsmutagenese (ein kombinatorischer strukturbasierter rationaler Ansatz)^[2,6,7] und DNA-Shuffling.^[2b,6]

Mithilfe der gerichteten Evolution können routinemäßig Enzym-Mutanten mit verbessertem Katalyseprofil gewonnen werden. Das Ausmaß der Verbesserung hängt davon ab, wie viel Aufwand bei den molekularbiologischen Schritten und dem Screening investiert werden soll. Um den Screening-Aufwand (den „Flaschenhals“ der gerichteten Evolution) zu minimieren, wurden nach dem Motto „mehr Qualität als Quantität“ verschiedene Methoden und Strategien entwickelt.^[2b,6,8] Gegenwärtig ist es nicht möglich vorauszusagen, wie viele Punktmutationen für ein gegebenes Ziel eingeführt werden müssen. Dies dürfte unter anderem davon abhängen, welche Mutagenesemethode eingesetzt wird. Rationales Design und gerichtete Evolution wurden auch herangezogen, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu verstehen und vorauszusagen, ein Gebiet von zunehmender Bedeutung.^[9,10] In diesen Fällen befinden sich die Mutationen meist auf der Oberfläche der Proteine.

Beim Versuch, die Einflüsse der Mutationen auf molekularer Ebene zu verstehen, ist die Deutung oder Voraussage einer einzigen Punktmutation im Wildtyp(WT)-Enzym der einfachste Fall. Werden jedoch zwei oder mehrere Punktmutationen eingeführt, wird der Sachverhalt erheblich komplexer, denn die Frage nach der Additivität oder der Nicht-Additivität einzelner Mutationen stellt sich. Ergibt sich aus der Kombination von zwei getrennten Punktmutationen ein mathematisch additiver Effekt? Oder treten sie miteinander in einer nicht-additiven Art in Wechselwirkung, mit der Erzeugung von kooperativen oder gar antagonistischen Effekten?

[*] Prof. Dr. M. T. Reetz
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
und
Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerweinstraße, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de
Homepage: <http://www.kofo.mpg.de/de/forschung/organische-synthese>

[**] Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern, die an Diskussionen über nicht-additive Effekte teilgenommen haben, insbesondere J. D. Carballera, J. Sanchis, C. Acevedo-Rocha und S. Kille sowie Prof. Yuval Nov (Haifa, Israel), für hilfreiche Kommentare. Dank gilt der Max-Planck-Gesellschaft und der Arthur C. Cope Stiftung für die großzügig gewährte finanzielle Unterstützung.

Dieser Essay enthält keine erschöpfende Behandlung von additiven oder nicht-additiven Effekten in Proteinen. Vielmehr werden typische Beispiele aus der Literatur beschrieben und in der Hoffnung analysiert, dass sich Biochemiker, Molekularbiologen und Biotechnologen verstärkt dem Thema Nicht-Additivität als komplexes, aber faszinierendes Phänomen in der Proteinwissenschaft widmen. Erste Einblicke in die Ursache(n) von nicht-additiven Effekten sowie zukünftige Aufgaben werden ebenfalls thematisiert.

2. Frühe Beispiele für Additivität

Ältere mechanistische Studien der Gruppen um Fersht,^[11] Wells,^[12] Horovitz,^[13a] Shortle^[13b,c] und andere^[13d-f] über Enzymaktivität und -stabilität oder Protein-Protein-Wechselwirkungen, bei denen zwei Punktmutationen unter Bildung der entsprechenden Doppelmutante kombiniert wurden, ließen auf Additivität als allgemeines Phänomen schließen; jedoch wurden Ausnahmen registriert. Ein typisches Beispiel für Additivität von zwei Punktmutationen wurde von Wells et al. beim Studium der Aktivität von Tyrosyl-tRNA-Synthetase beschrieben.^[12] Basierend auf einem vorangegangenen Beitrag von Fersht et al.^[11] schlug Wells 1990 eine einfache mathematische Formel zur Beschreibung der Additivität bei Doppelmutanten-Gibbs-Energiezyklen (double mutant free energy cycles) vor [Gl. (1)].^[12b] Dabei bedeutet $\Delta\Delta G_{(X,Y)}$

$$\Delta\Delta G_{(X,Y)} = \Delta\Delta G_{(X)} + \Delta\Delta G_{(Y)} + \Delta G_I \quad (1)$$

die experimentelle Änderung der Gibbs-Energie beim Übergang vom WT zur Doppelmutante (X,Y), während $\Delta\Delta G_{(X)}$ und $\Delta\Delta G_{(Y)}$ die jeweilige Änderung der Gibbs-Energie beim Übergang vom WT zu den Einzelmutanten X bzw. Y enthalten; ΔG_I spiegelt die (damals noch selten vorkommende) Wechselwirkung zwischen zwei Punktmutationen wider. Es wurde vorgeschlagen, dass Nicht-Additivität immer dann möglich ist, wenn die Seitenketten der Aminosäuren in räumlich engem Kontakt zueinander stehen oder wenn die Punktmutationen eine Änderung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt verursachen oder den Reaktionsmechanismus beeinflussen. Die Befunde aus mehreren Studien über den Einfluss von Mutationen auf die Aktivität unter Einbeziehung von fünf verschiedenen Enzymen wiesen klar auf



Manfred T. Reetz wurde 1943 in Hirschberg/Schlesien geboren und promovierte 1969 in Göttingen bei Ulrich Schölkopf. Nach einem Postdoktorat bei Reinhard W. Hoffmann und der Habilitation 1974 in Marburg zog er als C3-Professor nach Bonn, um 1980 einen Lehrstuhl für Organische Chemie in Marburg zu übernehmen (1980–1991). Nach 20 Jahren als Direktor am MPI für Kohlenforschung in Mülheim kehrte er 2011 als erster Hans-Meerwein-Forschungsprofessor nach Marburg zurück, finanziert von der Max-Planck-Gesellschaft.

Seine Forschungen befassen sich mit der gerichteten Evolution stereoselektiver Enzyme und der kombinatorischen Übergangsmetall-Katalyse.

Additivität hin (Abbildung 1).^[12b] Die bei der Konstruktion dieser Korrelation verwendeten Daten beziehen sich auf Punktmutationen, bei denen der Abstand zwischen den entsprechenden Aminosäure-Seitenketten größer ist als der Van-der-Waals-Kontakt ($> 4 \text{ \AA}$).

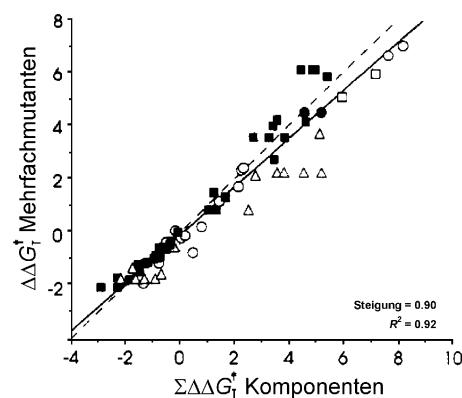


Abbildung 1. Änderungen der Stabilisierungsenthalpie des Übergangszustandes im Falle von Mehrfachmutanten gegen die Summe der Energie der Einzelmutanten.^[12b] Die Daten stammen von Mutanten folgender Enzyme: Subtilisin (■), Tyrosyl-tRNA-Synthetase (○), Trypsin (□), DHFR (●) und Glutathion-Reduktase (△). Die gestrichelte Linie hat eine Steigung von 1, während die durchgezogene Linie der besten Anpassung entspricht.

Zwei Jahre später „zergliederten“ Mildvan et al. die Fersht-Wells-Gleichung, indem folgender Satz von Terminen vorgeschlagen wurde: Additive Effekte, nicht-additive Effekte, antagonistische Effekte oder keine Effekte.^[14a] Beispiele für all diese Fälle wurden aus der Literatur zusammengestellt, mit der Schlussfolgerung, dass additive Effekte häufig vorkommen, wenn die Aminosäuren nicht in molekularem Kontakt stehen, und dann auch am leichtesten zu deuten sind („additive effects are the easiest to interpret and are commonly found, usually when the mutated residues are not in molecular contact“). Später führte Mildvan das Konzept des „inversen Denkens“ (inverse thinking) über Doppelmutantenzyklen von Enzymen ein, bei dem die Parameter der Doppelmutanten und nicht die des WT-Enzyms als Referenzpunkt herangezogen wurden.^[14b]

Im Anschluss an diese ersten Berichte erschienen weitere Beispiele für die Additivität von Proteinmutationen. Ein Beispiel für eindeutige Additivität wurde von Terwilliger und Skinner in einer 1996 erschienenen Arbeit mit dem Titel „Potential use of additivity of mutational effects in simplifying protein engineering“ beschrieben.^[15] Der Einfluss von Mutationen auf die Stabilität und DNA-Bindungsaffinität des Gen-V-Proteins (GVP) wurde systematisch untersucht, wobei alle Mutanten sowie WT GVP durch Röntgenstrukturanalysen charakterisiert wurden. Additivität als Folge getrennter lokalisierter Einflüsse wurde für die beiden voneinander unabhängigen Parameter (Stabilität und DNA-Bindungsaffinität) gefunden. Im Jahr 2000 publizierten Uchiyama et al. eine Analyse bestimmter Fitness-Landschaften auf Grundlage eines so genannten zerklüfteten Mt.-Fuji-Modells, wobei Prolyl-Endopeptidase und Thermolysin als Enzyme fungieren.

ten.^[16] Diese Studie führte zur Schlussfolgerung, dass derzeitige Biopolymere statistische Additivitäten aufweisen („*current biopolymers have statistical additivities*“). Die Autoren beziehen sich auf vorangegangene Untersuchungen zur Additivität und betonen, dass im Falle von Experimenten, bei denen die Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins nach außen gerichtet sind, die gegenseitige Beeinflussung als Folge von Mutationen gering sein muss („*If experiments are performed focusing on residues located at the surface of a protein and oriented outwardly, the mutual interference between residues changed as a result of multiple mutations must be small.*“)^[16] Die Frage, ob diese Schlussfolgerung heute noch gilt, muss gestellt werden.

Wissenschaftler der Firma Novozyme berichteten 2002 über additive Effekte bei der Anwendung des so genannten Mutations-Konsensus-Konzepts zur Erhöhung der Protein-Thermostabilität,^[17a] ebenso Magliery et al. in einer kürzlich erschienenen Arbeit zum gleichen Thema.^[17b] Additive Effekte wurden auch in weiteren Publikationen nachgewiesen oder angenommen.^[17c-e] Das Kombinieren von positiven Punktmutationen in dem erfolgreichen Versuch, die Thermostabilität von *Bacillus licheniformis* zu erhöhen, ist ein Beispiel.^[17c] In einer Studie zur gerichteten Evolution haben wir ebenfalls festgestellt, dass beim Kombinieren von zwei positiven Mutationen verbesserte Mutanten generiert werden können, jedoch nicht in allen Fällen (weniger als Additivität).^[18] Letztere (negative) Beobachtung ist dennoch ein wichtiger Befund. Möglicherweise wird diese Art der Nicht-Additivität in Studien zur gerichteten Evolution nicht routinemäßig gemeldet, weil solche Befunde kein unmittelbarer praktischer Fortschritt sind.

3. Beispiele für nicht-additive Mutationseffekte in mechanistischen und theoretischen Studien

Mit dem Ziel, die Mechanismen von Enzymen in größtem Detail zu verstehen, erschienen in den 1990er Jahren zunehmend Studien über additive versus nicht-additive Effekte.^[13c] Ein frühes Beispiel stammt von Fersht et al., die Doppelmutantenzyklen nutzten, um elektrostatische Wechselwirkungen auf der Oberfläche der Ribonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase) abschätzen zu können.^[19] Zwei Aminosäuren in einer α -Helix auf der Enzymoberfläche, Asp12 (geladen) und Thr16 (polar), wurden zunächst mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese jeweils in Asp12Ala bzw. Thr16Arg überführt, während die dritte Variante als Doppelmutante Asp12Ala hergestellt wurde. Sodann wurde die Änderung der Gibbs-Energie der reversiblen Harnstoff-induzierten Entfaltung relativ zu WT-Barnase bei verschiedenen Salzkonzentrationen gemessen. Dabei wurde Nicht-Additivität beobachtet, z.B. Einzelmutante Asp12Ala (Wechselwirkungsenergie = +0.43 kcal mol⁻¹), Einzelmutante Thr16Arg (-0.48 kcal mol⁻¹) und Doppelmutante Asp12Ala/Thr16Arg (+0.28 kcal mol⁻¹).^[19] Zur Erklärung wurden direkte elektrostatische Wechselwirkungen postuliert. Später befasste sich die gleiche Gruppe auf Protein-Protein-Wechselwirkungen im Falle der Barnase und ihres intrazellulären Inhibitors Barstar (ein kleines Protein).^[10] Die

entsprechenden Doppelmutantenzyklen zeigten, dass mit steigender Entfernung die Wechselwirkungsenergie zwischen den jeweiligen zwei Aminosäuren abnimmt, wobei maximale Kooperativität bei einer Distanz von weniger als 7 Å stattfindet.

Ein weiteres Paradebeispiel für Nicht-Additivität findet sich in einer von Benkovic et al. 1995 veröffentlichten Studie über Mutationseffekte in Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) aus *Escherichia coli*, mit dem Ziel, den Reaktionsmechanismus des Enzyms besser zu verstehen.^[20] DHFR katalysiert die Reduktion von 7,8-Dihydrofolat zu 5,6,7-Tetrahydrofolat unter Einwirkung von NADPH als Kofaktor. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass die Folat-Bindungstasche durch eine 15 Å tiefe Höhle charakterisiert ist. Diese ist unter anderem von Leu28, Phe31, Ile50 und Leu54 umgeben, die bekanntlich mit *p*-Aminobenzoyl-L-glutamat des Folats in Wechselwirkung treten. Um etwas über die Beziehung zwischen der Natur der Bindungstasche und der katalytischen Funktion in Erfahrung zu bringen, wurden mehrere Mutanten mithilfe der ortsspezifischen Mutagenese hergestellt, einschließlich der Einzelmutanten L28Y und L54F sowie aller theoretisch denkbaren Doppelmutanten, so auch L28Y/L54F. Es wurde darauf hingewiesen, dass sich die Aminosäuren L28 und L54 in unterschiedlichen Unterstrukturen am aktiven Zentrum befinden, sodass sie nicht miteinander wechselwirken können.^[20] Drei Mutationszyklen wurden analysiert, die Aufschluss über spezifische Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der jeweiligen Aminosäuren in jedem einzelnen katalytischen Schritt gaben. Aufgrund der relativ großen räumlichen Entfernung zwischen den Seitenketten der entsprechenden Aminosäuren 28 und 54 (ca. 8 Å) wurden additive Effekte für alle Parameter erwartet [$\Delta G_f = 0$ in Gl. (1)]. Tatsächlich wurde im gesamten Schema Additivität oder partielle Additivität beobachtet. Jedoch ließ sich im Falle der Thermodynamik der Ligandenaffinität und der Geschwindigkeit des Hydridtransfers sowie der Produktfreisetzung signifikante Nicht-Additivität in Form von Kooperativität oder Antagonismus nachweisen.^[20] Zur Erklärung wurden Konformationsänderungen postuliert. Auch wenn keine synergistischen Doppelmutationen gefunden wurden, schlussfolgern die Autoren, dass vertiefte Erkenntnisse zum Ursprung von nicht-additiven Effekten auf molekulärer Ebene dazu führen können, verbesserte Ansätze zur Erhöhung der Enzym-Effizienz durch Herbeiführung molekular gekoppelter Mutationen zu entwickeln („*with an enhanced knowledge of the origin of nonadditive effects, it may be possible to optimize an approach to improve enzyme's efficiency by coupling mutations*“).^[20] Leider wurde dieses Ziel bis heute nicht erreicht. Die Aussage zeigt jedoch, wie es zu erreichen ist: nämlich durch erweiterte Kenntnisse zum Ursprung kooperativer nicht-additiver Effekte. Eines Tages könnten dann optimale Entscheidungen hinsichtlich des Aminosäure-Austausches vorausgesagt werden.

4. Beispiele für nicht-additive Mutationseffekte in der gerichteten Evolution

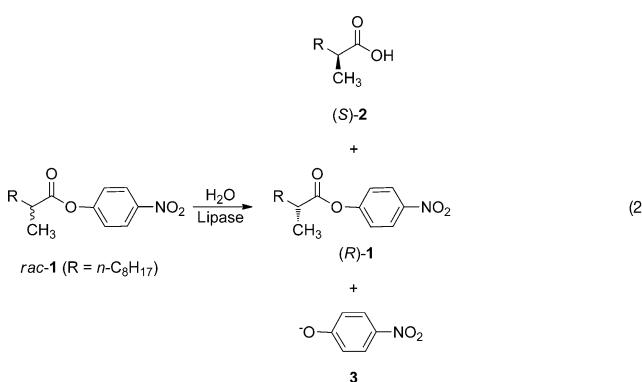
Die Frage zur strengen Additivität als Gegensatz zur kooperativen oder antagonistischen Nicht-Additivität wurde auf dem Gebiet der gerichteten Evolution nur selten gestellt. Die meisten Wissenschaftler auf diesem Forschungsgebiet interessieren sich mehr für praktische Anwendungen und weniger für zeitaufwendige Dekonvolutionsexperimente, die notwendig sind, um Aufschluss über Additivität oder Nicht-Additivität zu geben.^[2b,6] Unsere Gruppe hat jedoch diesen zusätzlichen Aufwand als lohnend empfunden, denn dadurch werden unter anderem Erkenntnisse zur Effizienz einer gegebenen Mutagenesestrategie gewonnen.^[21] Der „Flaschenhals“ (d.h. langsame Schritt) der gerichteten Evolution – das Screening – ist der Grund für das verstärkte Interesse an der Entwicklung besserer Verfahren zur Generierung qualitativ hochwertiger Mutantenbibliotheken. Je höher die Qualität, desto geringer der Screening-Aufwand.^[2b,6,8,21] Unser Beitrag in diesem Bereich ist die Entwicklung der iterativen Sättigungsmutagenese (ISM),^[21,22] die unter anderem zur Entdeckung zahlreicher kooperativer nicht-additiver Effekte bei der gerichteten Evolution stereoselektiver Enzyme vom Typ Lipase, Epoxid-Hydrolase, Enoat-Reduktase, Baeyer-Villiger-Monoxygenase (BVMO) und P450-Monoxygenase geführt hat.^[6q,21] Lediglich einige repräsentative Beispiele für Nicht-Additivität aus unseren und anderen Publikationen seien hier beschrieben. Sie alle decken Phänomene auf, die zunächst rätselhaft schienen.

In einer Machbarkeitsstudie zur gerichteten Evolution stereoselektiver Enzyme wurde die durch die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) katalysierte hydrolytische kinetische Racematspaltung des Esters **rac-1** untersucht [Gl. (2)].^[23a] Das Enzym ist durch die für Lipasen typische katalytische Triade Asp229, His251 und Ser82 charakterisiert, wobei im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Ser82 nukleophil an die Carbonylgruppe unter Bildung des kurzlebigen tetraedrischen Oxyanions addiert. WT-PAL zeigt eine sehr geringe Enantioselektivität zugunsten von (*S*)-**2** mit einem Selektivitätsfaktor von lediglich $E = 1.2$. Vier aufeinander folgende epPCR-Zyklen ergaben eine Mutante mit vier Punktmutationen, die eine erhöhte *S*-Selektivität aufwies ($E = 11$). Nachdem verschiedene alternative Strategien zur Mutagenese getestet worden waren, gelang es mit der Kombination aus epPCR, Sättigungsmutagenese und DNA-

Shuffling, eine deutlich verbesserte Mutante D20N/S53P/S155M/L162G/T180I/T234S ($E = 51$) mit sechs Punktmutationen zu evolvieren.^[23b] Überraschend war der Befund, dass sich lediglich Leu162Gly in der Nähe der Bindungstasche befindet, während die anderen fünf Punktmutationen auf der PAL-Oberfläche gefunden wurden.

Im Anschluss an diese Arbeiten wurde das Konzept der gerichteten Evolution von stereoselektiven Enzymen als Katalysatoren für asymmetrische Reaktionen von uns und anderen Arbeitsgruppen verallgemeinert.^[2b,6,21] Allerdings zeigte eine quanten- und molekulmechanische (QM/MM-)Studie, dass lediglich zwei der sechs Punktmutationen erforderlich sind, um hohe Stereoselektivität zu erreichen, nämlich S53P auf der Oberfläche des Enzyms und L162G direkt an der PAL-Bindungstasche.^[24] Tatsächlich erwies sich die entsprechende Doppelmutante S53P/L162G mit $E = 64$ (*S*) als hoch selektiv. Dieses Ergebnis kann als Triumph der Theorie gewertet werden, es zeigt jedoch, dass die von uns verwendete Mutagenesestrategie basierend hauptsächlich auf epPCR und DNA-Shuffling keineswegs optimal ist, denn vier der sechs Punktmutationen sind überflüssig.

Als Konsequenz dieser Studie wandten wir uns der Methodenentwicklung in der gerichteten Evolution zu. Damals ahnten wir nicht, dass ISM eine nahezu ideale Methode des Protein-Engineerings ist, die ausgeprägte Nicht-Additivität in Form von kooperativen Effekten zwischen einzelnen Punktmutationen und zwischen Sätzen von Punktmutationen hervorruft. Im Zuge von ISM werden zunächst geeignete Orte im Enzym (sites) bestehend aus einer oder mehreren Aminosäure-Positionen unter Bildung von Mutanten-Bibliotheken randomisiert. Das Gen einer verbesserten Mutante (hit) wird anschließend als Templat für Randomisierung an den anderen Enzymorten verwendet, und das Verfahren wird fortgesetzt, bis die gewünschte Verbesserung des Enzyms erreicht wird. Im Falle von Stereo- oder Regioselektivität, Aktivität und/oder Substratazeptanz werden Orte direkt an oder in der Nähe der Bindungstasche für Sättigungsmutagenese als Teil eines Prozesses ausgesucht, der ursprünglich in einer unsystematischen Art praktiziert worden war.^[23b] Erst später wurde diese Strategie als „combinatorial active-site saturation test“ (CAST)^[22a] verallgemeinert, ein nützliches Akronym für eine effektive Strategie zur Verbesserung oder Umkehrung der Stereoselektivität, Erhöhung der Aktivität sowie Kontrolle der Regioselektivität.^[23b] Soll die Thermostabilität erhöht werden, müssen geeignete Enzymorte mit hohen B-Faktoren (ein Maß für die thermische Bewegung) in einem Prozess gewählt werden, der als B-FIT (B-Faktor-iterativer Test) bezeichnet wurde.^[22b] In beiden ISM-Formen sind weitere Verbesserungen der Methode möglich, z.B. durch Einschränkung der Zahl der verwendeten Aminosäuren (reduced amino acid alphabets) als Bausteine bei der Sättigungsmutagenese, die das Ausmaß des Screenings stark reduziert.^[6q,21] Methoden zur Reduzierung oder Eliminierung der Bevorzugung oder Benachteiligung von bestimmten Aminosäuren (amino acid bias), die durch die Entartung des genetischen Codes hervorgerufen werden,^[25] tragen ebenfalls zur Reduzierung des Screenings bei, ebenso wie Pooling-Strategien.^[6e,25d] Diese Techniken, wie auch geeignete statistische Analysen zur Abschätzung des erforderlichen Oversampling beim Scree-



ning,^[8b,f] steigern die Effizienz von ISM, so auch und insbesondere der von Nov beschriebene statistische Ansatz.^[8e]

Wir erkannten die Notwendigkeit, ISM auf die mit Methoden der gerichteten Evolution am häufigsten untersuchte Lipase PAL anzuwenden,^[26] denn nur so war ein rigoroser Vergleich mit den früher verwendeten Mutagenesemethoden möglich.^[23c] Unter Verwendung von drei CAST-Orten, A (Met16/Leu17), B (Leu159/Leu162) und C (Leu231/Val232), sowie einem optimal gewählten Aminosäurealphabet wurden einige der sechs möglichen ISM-Pfade beschritten, wobei nur kleine Mutantenbibliotheken mit einem Screening-Verfahren durchsucht wurden. Dabei wurde eine ungewöhnlich aktive und hoch selektive Mutante Met16Ala/Leu17Phe/Leu162Asn entlang des Pfades B → A mit einem Selektivitätsfaktor von $E = 594$ entdeckt (Abbildung 2).^[26] Angesichts dieses deutlichen Erfolgs wurde ein weiterer Schritt zum Ort C nicht mehr in Erwägung gezogen. Diese Mutante ist der früheren besten Variante, die hauptsächlich mit epPCR und DNA-Shuffling erzeugt worden war,^[23b] klar überlegen und erfordert deutlich weniger Screening (10000 gegenüber 50000 Transformanten).

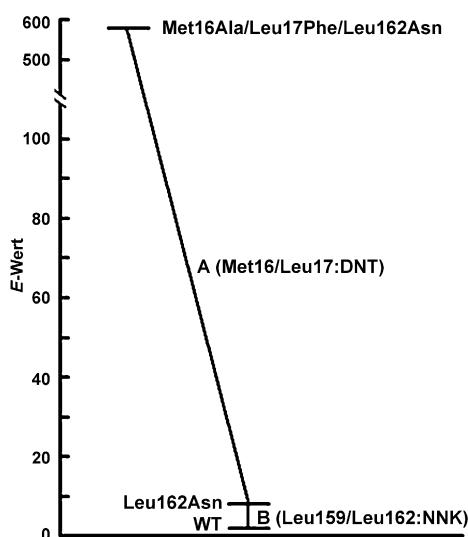


Abbildung 2. ISM-Schema des optimalen Pfades WT-PAL → B → A.^[26]

Die Leistungsstärke der ISM-Strategie wurde mithilfe eines Dekonvolutionsverfahrens auf starke kooperative epistatische Effekte zurückgeführt.^[26] Die in der ersten Runde erzeugte Einzelmutante Leu162Asn zeigt eine sehr geringe Stereoselektivität ($E = 8$), während die durch Dekonvolution hergestellte Doppelmutante Met16Ala/Leu17Phe mit $E = 2.6$ ein noch schlechteres Ergebnis liefert. Da die Kombination beider Mutanten zu $E = 594$ führt, wechselwirken die beiden Mutantensätze kooperativ.^[26] Diese positive Nicht-Additivität beläuft sich auf etwa 8 kJ mol⁻¹. Kooperativität wird auch in der Kinetik der bevorzugten Reaktion von (S)-1 erkennbar: Leu162Asn ($K_M = 5.6 \times 10^{-4}$ M; $k_{cat} = 42.1 \times 10^{-3}$ s⁻¹; $k_{cat}/K_M = 75.2$ s⁻¹ M⁻¹); Met16Ala/Leu17Phe ($K_M = 22.0 \times 10^{-4}$ M; $k_{cat} = 16.1 \times 10^{-3}$ s⁻¹; $k_{cat}/K_M = 7.3$ s⁻¹ M⁻¹); Met16Ala/Leu17Phe/Leu162Asn ($K_M = 3.4 \times 10^{-4}$ M; $k_{cat} = 1374 \times 10^{-3}$ s⁻¹; $k_{cat}/K_M = 4041$ s⁻¹ M⁻¹). Ferner belegen die Ergebnisse, dass über-

flüssige Mutationen nicht auftreten,^[26] ganz im Gegensatz zur besten vorangegangenen Mutante mit sechs Punktmutationen.^[23b] Bäckvall et al. haben in einer Studie zur gerichteten Evolution der Lipase CALA, bei der stark kondensierte Sättigungsbibliotheken verwendet wurden, ebenfalls nicht-additive Effekte beobachtet.^[27]

Aufschluss über den Ursprung der Nicht-Additivität in der PAL-Studie wurde mithilfe von Moleküldynamik(MD)-Simulationen und Docking-Experimenten erhalten.^[26] Die Mutation Leu162Asn macht deshalb mehr Platz für das Substrat in der Bindungstasche, weil die Seitenkette von Asparagin (bedingt durch eine neue H-Brücke mit Ser158 und His83) in eine andere Richtung „weggezogen“ wird. Dies bedeutet im Endeffekt, dass Asn162 in der besten Mutante deutlich kleiner erscheint als Leu162, die mit der hydrophoben und raumfüllenden Isobutyl-Seitengruppe in die Bindungstasche von PAL hineinragt. Jedoch bewirkt das Schaffen von mehr Platz für das Substrat nicht unbedingt eine höhere Aktivität und Stereoselektivität. Hier kommt nun der Mutationssatz Met16Ala/Leu17Phe kooperativ ins Spiel. Im Falle von (S)-1 wird das entsprechende Oxyanion zusätzlich durch neue H-Brücken mit His83 und Ala16 stabilisiert, während Phe17 eine π,π-Wechselwirkung eingeht (Abbildung 3). Diese Einflüsse sind im Falle des benachteiligten Enantiomers (R)-1 wegen sterischer Effekte nicht möglich.^[26] Analysen dieser Art sind notwendig, um den Ursprung der Nicht-Additivität auf molekularer Ebene zu verstehen.

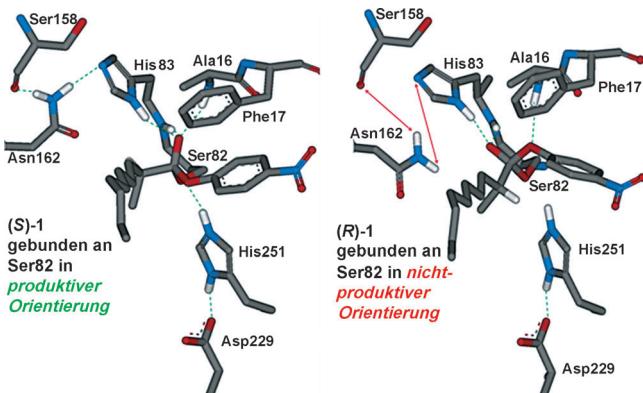
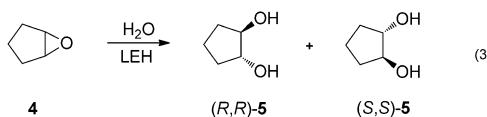


Abbildung 3. Vergleich der Oxyanion-stabilisierenden H-Brücken (grüne gestrichelte Linien) in der PAL-Mutante Met16Ala/Leu17Phe/Leu162Asn.^[26] Links: gebundenes (S)-1 in einem produktiven Modus; rechts: gebundenes (R)-1 in einem nicht-produktiven Modus.

Auch bei der Anwendung von ISM auf andere Typen von Enzymen fanden wir stets kooperative nicht-additive Effekte.^[6g,21] Auch Bornscheuer et al. haben bei einer CAST-Studie mit einer Esterase als Katalysator bei der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung von tertiären Acetaten Nicht-Additivität beobachtet.^[28] Während die Doppelmutante Glu188Trp/Met193Cys zu einer verbesserten S-Selektivität ($E = 64$) führte, wurde bei der anschließenden Dekonvolution eine überraschende Beobachtung gemacht: Die Einzelmutante Glu188Trp zeigte zwar die erwartete moderate S-Selektivität ($E = 26$), die andere Einzelmutante Met193Cys er-

wies sich jedoch als *R*-selektiv ($E = 16$).^[28] Wären in einem umgekehrten Mutagenesevorgang zwei Einzelmutanten entstanden, die jeweils *R*- oder *S*-selektiv sind, wäre man keineswegs auf die Idee gekommen, beide zu kombinieren, um verstärkte *S*-Selektivität zu bewirken!

Noch extremer ist eine rätselhafte Beobachtung, die wir in einer Studie zur gerichteten Evolution der Limonen-Epoxid-Hydrolase (LEH) als Katalysator bei der hydrolytischen Desymmetrisierung des Cyclopentanoxids **4** → **5** gemacht haben [Gl. (3)].^[29] Eine der generierten *S,S*-selektiven Doppelmutanten der ersten Generation, Met32Leu/Leu35Phe, zeigte eine Enantioselektivität von 24 % *ee*, die entsprechenden Einzelmutanten, Met32Leu und Leu35Phe, erwiesen sich jedoch beide als *R,R*-selektiv (14 bzw. 2 % *ee*!). Die kooperative Wechselwirkung zwischen den beiden Punktmutationen beläuft sich auf 2 kJ mol⁻¹. Im Falle einer noch besseren *S,S*-selektiven Doppelmutante der ersten Generation stellte sich bei der Dekonvolution dagegen „erwartungsgemäß“ heraus, dass beide Einzelmutanten *S,S*-selektiv sind; jedoch kommunizieren sie miteinander in einer synergistischen Art, die ebenfalls 2 kJ mol⁻¹ ausmacht. Bei darauf folgenden ISM-Schritten wurden Enantioselektivitäten von bis zu 93 % *ee* und mit anderen prochiralen Epoxiden bis zu 99 % *ee* erreicht.^[29] In der gleichen Studie gelang es, auf molekularer Ebene die Nicht-Additivität zu erklären.^[29] Allerdings dürfte es schwierig sein, solche Effekte vorauszusagen.



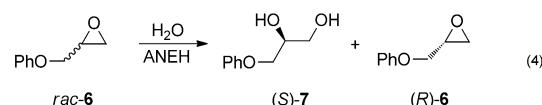
Livesay et al. haben bei der Verwendung von Gibbs-Energiezyklen von Doppelmutanten neue Erkenntnisse gewonnen, insbesondere im Falle von Systemen, in denen die beiden Mutationssorte weit voneinander entfernt sind.^[30] Die Autoren ziehen die Schlussfolgerung, dass Nicht-Additivität bei den beiden Punktmutationen immer dann auftritt, wenn sie im gleichen rigidem Cluster des Proteins vorkommen und deshalb irgendwie miteinander in Wechselwirkung treten können, obgleich sie nicht in direktem Kontakt zueinander stehen. Dagegen soll Additivität stets dann auftreten, wenn die beiden Aminosäuren in unterschiedlichen Clustern vorkommen.^[30]

5. Nicht-additive Mutationseffekte in Fitness-Landschaften

Im Allgemeinen erfordert gerichtete Evolution n Zyklen von Mutagenese/Expression/Screening mit der schrittweisen Akkumulation von n Sätzen von Mutationen, jeder bestehend aus einer oder mehreren Punktmutationen.^[2b,6,21] Mit Ausnahme des ersten Satzes ist die einzelne oder getrennte katalytische Leistung der darauf folgenden Mutationssätze nicht bekannt, es sei denn, systematische Dekonvolution wird betrieben. Geht man systematisch vor, indem man alle theoretisch denkbaren Kombinationen von Mutationssätzen herstellt und in der Katalyse testet, kann man aufschlussreiche

Informationen über additive und nicht-additive Effekte auf jeder evolutionären Stufe erhalten. Werden z.B. fünf sukzessive Mutageneszyklen durchlaufen, dann gilt $n = 5$, sodass auf der Fitness-Landschaft $5! = 120$ evolutionäre Pfade (pathways) existieren, die den Zugang vom WT zur letzten (d.h. besten) Mutante definieren. Additive oder nicht-additive Effekte können so auf allen 120 Wegen aufgedeckt werden, also auch für den ursprünglichen im Zuge des Protein-Engineerings definierten Pfad. Wir haben diese Art der Fitness-Landschaft als begrenzt (constrained) beschrieben, denn auf jeder evolutionären Stufe treten zwar neue Mutanten auf, aber nicht neue Punktmutationen. Ein frühes Beispiel wurde von Weinreich et al. beschrieben, die eine über fünf DNA-Shuffling-Schritte erhaltene β -Lactamase-Mutante verwendeten, um 120 Wege vom WT zur letzten (besten) Mutante zu konstruieren.^[31] Gemessen an der jeweils unterschiedlichen Aktivität der β -Lactamase in einem Selektionssystem wurden additive und nicht-additive Effekte entdeckt. Von den 120 Wegen erwiesen sich 102 als nicht „zugänglich“,^[31] denn in diesen Fällen traten lokale Minima auf. Daraus schlossen die Autoren, dass in der natürlichen Evolution nur wenige Wege zu verbesserten Proteinen führen („few pathways in Darwinian evolution lead to fitter proteins“).^[31]

Wir haben einen anderen Ansatz zur Konstruktion von „begrenzten“ Fitness-Landschaften entwickelt, die ebenfalls dazu geeignet sind, additive sowie nicht-additive Effekte aufzudecken. In der ersten ISM-Studie zur Erhöhung der Stereoselektivität von Enzymen wirkte die Epoxid-Hydrolase aus *Aspergillus niger* (ANEH) als Katalysator bei der hydrolytischen kinetischen Racematspaltung des Epoxids **rac-6** [Gl. (4)].^[22a] Dabei wurden fünf CAST-Orte für Sättigungs-mutagenese gewählt. Während WT-ANEH einen Selektivitätsfaktor von nur $E = 4.6$ zugunsten von *(S)-7* aufweist, zeigt die beste Mutante LW202 in der fünften (letzten) Mutanten-Bibliothek eine deutlich erhöhte Stereoselektivität ($E = 115$). Mutante LW202 ist charakterisiert durch fünf Sätze von Punktmutationen, die im Zuge des fünfstufigen ISM-Verfahrens akkumulierten.^[22a]



In einer darauf folgenden Studie wurde eine vollständige Dekonvolution unter Berücksichtigung der fünf Mutations-sätze an den jeweiligen CAST-Orten B, C, D, E und F durchgeführt (Ort A wurde nicht berücksichtigt), um so die entsprechenden 120 Pfade vom WT-ANEH zur besten Mutante LW202 zu konstruieren (Abbildung 4).^[32] Es stellte sich heraus, dass keiner der fünf Mutationssätze überflüssig ist. Ferner erwies sich die Mehrzahl der evolutionären Pfade (55) als energetisch günstig, hatte also keine lokalen Minima.

Die experimentellen Befunde ermöglichen es, die Gibbs-Energie der Wechselwirkung zwischen zwei Mutationssätzen *i* und *j* auf allen Stufen der 120 Pfade zu erfassen^[32] [Gl. (5)],

$$\Delta G^\#(i,j) = \Delta\Delta G^\#(\exp) - [\Delta\Delta G^\#(i) + \Delta\Delta G^\#(j)] \quad (5)$$

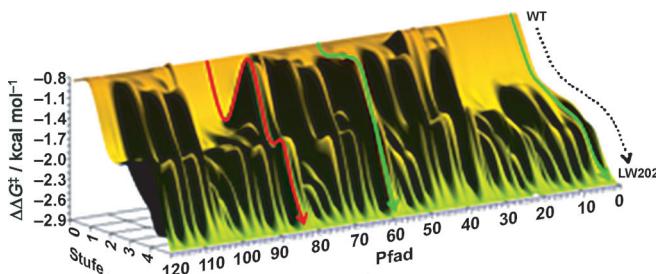


Abbildung 4. Energieprofile von zwei Typen von Pfaden in einer Fitness-Landschaft, die vom WT-ANEH zur besten Mutante LW202 führen (kinetische Racematspaltung des Epoxids *rac-6* als Modellreaktion): energetisch bevorzugt (grüne Pfade), wie im Falle des ursprünglichen $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ (Pfad 2) oder $D \rightarrow C \rightarrow F \rightarrow E \rightarrow B$ (Pfad 60), oder energetisch benachteiligt (rote Pfade), wie $E \rightarrow C \rightarrow F \rightarrow D \rightarrow B$ (Pfad 84).^[32]

wobei $\Delta\Delta G^\#(\text{exp})$ die Differenz der experimentellen Aktivierungsenergien der beiden Enantiomere in der binären Kombination darstellt und $\Delta\Delta G^\#(i)$ sowie $\Delta\Delta G^\#(j)$ die erhaltenen Energien für jeden getrennten Mutantensatz bedeuten. $\Delta G^\#(i,j)$ ist entweder ein Maß für kooperative Effekte [$\Delta G^\#(i,j) < 0$], für additive Effekte [$\Delta G^\#(i,j) = 0$ oder keine Wechselwirkung], für partielle additive Effekte [$\Delta G^\#(i,j) > 0$ und $|\Delta\Delta G^\#(i)|$ und $|\Delta\Delta G^\#(j)| < |\Delta\Delta G^\#(\text{exp})|$] oder für antagonistische Effekte [$\Delta G^\#(i,j) > 0$ und $|\Delta\Delta G^\#(i)|$ oder $|\Delta\Delta G^\#(j)| > |\Delta\Delta G^\#(\text{exp})|$].

Das Ergebnis eines solchen Verfahrens sei hier am Beispiel des ursprünglichen Pfades $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$ illustriert (Abbildung 5). Nicht-additives Verhalten ist auf allen evolutionären Stufen ersichtlich. So bewirkt z.B. der getrennt hergestellte Mutationssatz D einen antagonistischen Effekt (d.h., allein führt er zu geringerer Enantioselektivität), in Kombination mit den anderen Mutationssätzen auf der BCDF- oder BCDFE-Stufe resultiert jedoch mehr als Addi-

tivität infolge einer deutlichen Kooperativität. Auf allen anderen 119 Pfaden treten ähnliche kooperative Effekte auf. Dies bedeutet, dass die Mutationssätze miteinander in Wechselwirkung treten, obwohl sie räumlich nicht immer direkte Nachbarn sind. Exakte Additivität ist lediglich ein Punkt auf einer Skala von vielen Möglichkeiten.

Anwendung des Milvan-Konzepts des „*inversen Denkens*“^[14] auf die ANEH-Daten führt ebenfalls zur Aufdeckung nicht-additiver Effekte.^[32] Kooperative Nicht-Additivität scheint eine entscheidende Rolle bei allen ISM-Vorgängen zu spielen und erklärt die ausgeprägte Effizienz dieser Methode.^[21] Die faszinierende Frage, wie solche nicht-additiven Effekte auf molekularer Ebene funktionieren, muss von Fall zu Fall mithilfe von biophysikalischen Methoden unter Einbeziehung von QM/MM-Rechnungen beantwortet werden.

Die Zahl der energetisch günstigen Pfade in der ANEH-Studie^[32] ohne lokale Minima ist ganz anders als im Falle des Weinreich-Berichts.^[31] Der prozentuale Anteil von günstigen Pfaden dürfte von der Mutagenesemethode in einem gegebenen experimentellen System und von dem jeweils verwendeten Enzym abhängen. Wir schlagen daher vor, dass der Experimentator von der natürlichen Evolution lernen kann, dass aber der umgekehrte Weg, nämlich von Befunden der Laborevolution auf die in der Natur vorkommenden Evolution zu schließen, problematisch ist – obgleich nicht unmöglich, wenn korrekt und sorgfältig vorgegangen wird.

Noch größere kooperative Effekte wurden bei einer B-FIT/ISM-Studie zur Stabilität der Lipase aus *Bacillus subtilis* beobachtet.^[22b,33] Die biophysikalische Charakterisierung der besten Mutante unter Einbeziehung von Protein-NMR-Spektroskopie ergab, dass die Mutation zur Inhibition der vorher nicht erkannten Protein-Protein-Wechselwirkung führt. Bei höheren Temperaturen treten deutlich weniger Aggregation und unerwünschte Fällung des Enzyms ein als im Falle des WT.^[33a] Kooperative Wechselwirkungen zwis-

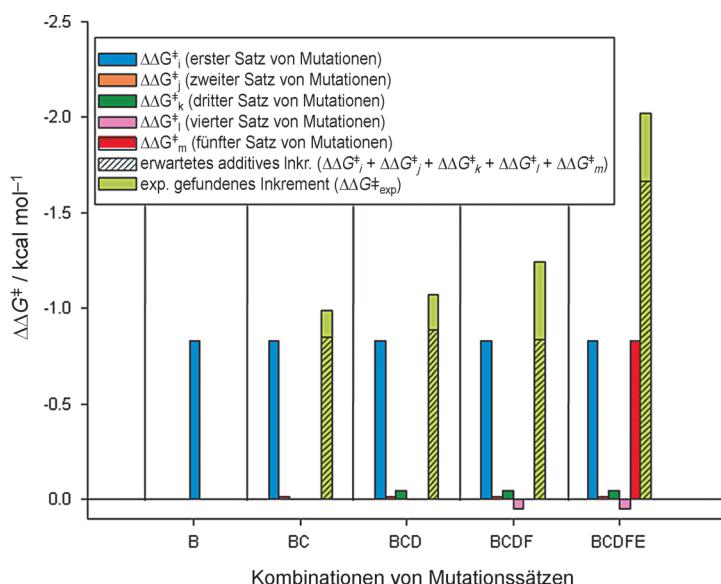


Abbildung 5. Thermodynamischer Zyklus [Gl. (5)], bezogen auf die Wechselwirkung von Mutationssätzen auf jeder Stufe des energetisch günstigen Pfades $B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow F \rightarrow E$.^[32]

schen den auf der Oberfläche der Lipase befindlichen Mutationen sind über große Entfernungen wirksam und erklären somit die ausgeprägte Nicht-Additivität.^[33b]

Kürzlich berichteten wir über ein ISM-System mit vier Randomisierungsorten A, B, C und D unter Verwendung von ANEH und der gleichen Modellreaktion.^[34] Dabei wurden sämtliche $4! = 24$ Pfade beschriften, wobei auf jeder Stufe die entsprechende Sättigungsmutagenese neue Punktmutationen herbeiführte. Daher ist ein solches System als „unbegrenzt“ zu bezeichnen, im Unterschied zu den obigen Fällen.^[31,32] Wir fanden, dass die Mehrzahl der Pfade (16 von 24) keine lokalen Minima aufweisen und somit energetisch günstig sind. Im Falle der acht energetisch weniger günstigen Pfade gelang es, aus dem jeweiligen lokalen Minimum herauszukommen, indem eine minderwertige (schlechtere) Mutante für den nächsten ISM-Schritt gewählt wurde.^[34] Wird bei der gerichteten Evolution keine verbesserte Mutante in einer gegebenen Bibliothek gefunden, so bedeutet dies traditionsgemäß, dass der Experimentator entweder die Mutantenbibliothek vergrößert, eine andere Mutagenesemethode testet oder aufgibt.^[2b,6] Unsere Studie zeigt nun, dass in solchen Fällen minderwertige, d. h. für die gegebene Aufgabe „schädliche“ Mutationen als „molekulare Sprungbretter“ verwendet werden können, die wahrscheinlich zu kooperativen Effekten beim darauf folgenden ISM-Schritt führen.^[34] In diesem Zusammenhang seien das Konzept der neutralen Drift^[35] und die Quasispeziestheorie von Eigen et al.^[36] erwähnt, die Manervik et al. in ihren Studien zur gerichteten Evolution herangezogen haben.^[37] Möglicherweise kommen dort nicht-additive Effekte vor.^[34]

6. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Dieser Essay bietet keine erschöpfende Behandlung von Additivität und Nicht-Additivität in Studien zum Protein-Engineering. Vielmehr soll auf die entscheidende Rolle der Nicht-Additivität generell hingewiesen werden, illustriert durch ausgewählte Beispiele und neuere Analysen. Es ist zu hoffen, dass daraus ein vertieftes Bewusstsein hinsichtlich der Bedeutung von nicht-additiven Effekten auf dem gesamten Gebiet der Proteinforschung resultieren wird. Wenn Additivität wirklich universell wäre, dann wäre im Rahmen eines linearen Systems die Entwicklung einer generellen Theorie funktionaler Proteine einfacher, wenngleich nicht trivial. Die zunehmende Zahl von nicht-additiven Fällen zeigt jedoch, dass Proteine und so auch Enzyme komplizierter sind, als man sich vielleicht wünschen würde. Es dürfte schwierig sein, in einem solchen nicht-linearen System zuverlässige Voraussagen zu treffen. Es ist auch nicht ganz klar, ob die Darwinische Evolution in der Natur von nicht-additiven Effekten Gebrauch macht, auch wenn es wahrscheinlich ist. Evolutionsbiologen haben kürzlich gezeigt, dass Epistase, und nicht nur Anpassung (Adaption), eine wichtige Rolle bei der molekularen Evolution spielt.^[38]

Gerichtete Evolution ist ein ideales Hilfsmittel für die Untersuchung nicht-additiver Effekte. Zu wünschen wäre es, wenn in Zukunft Wissenschaftler beim Protein-Tuning verstärkt Zeit und Mittel investieren würden, um mögliche ad-

ditive und nicht-additive Effekte aufzudecken und zu analysieren. Wie in diesem Essay dargelegt sind dazu Dekonvolutionsstudien erforderlich.^[21,26–29,32–34] Mit zunehmender Datenmenge, gekoppelt mit detaillierten biophysikalischen Untersuchungen und QM/MM-Analysen aller Mutanten auf einem im Labor konzipierten und durchlaufenen evolutiönen Pfad, wird es möglich sein, ein tieferes Verständnis von nicht-additiven Effekten auf molekularer Ebene zu entwickeln. Dadurch wird auch unser Wissen über funktionale Proteinen wachsen, was letztlich zu einem treffsicheren rationalen Design führen könnte. Das Erkennen von kooperativen und antagonistischen Effekten als Funktion der Mutagenesemethode dient auch dazu, die relative Nützlichkeit und Effizienz der verschiedenen Ansätze in der gerichteten Evolution zu bewerten.^[2b,6,21] Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) hat sich zu einem besonders nützlichen Hilfsmittel entwickelt, bei dem kooperative Nicht-Additivität eine zentrale Rolle spielt.^[21] Bei Anwendung dieser Methode ist die Wahrscheinlichkeit, nicht-additive kooperative Effekte zu induzieren, besonders groß. Ob das De-novo-Design von Enzymen^[2b,39] erweitert werden kann, indem kooperative Mutationseffekte bewirkt werden, bleibt abzuwarten. Eine Möglichkeit wäre es, die im Zuge des De-novo-Designs erhaltenen Enzyme einem ISM-Verfahren zu unterziehen. Die volle Nutzung von potenziellen nicht-additiven kooperativen Mutationseffekten auf dem Gebiet des Protein-Engineerings^[40] bleibt ein reizvolles Ziel in mechanistischer, theoretischer und praktischer Hinsicht.

Eingegangen am 28. September 2012,
veränderte Fassung am 19. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 4. Februar 2013

- [1] a) C. A. Hutchison III, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6551–6560; b) Nobelpreisvortrag: M. Smith, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1277–1284; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1214–1221.
- [2] a) Häufig wird die QuikChange-Vorschrift von Strategene für ortsspezifische Mutagenese verwendet: H. H. Hogrefe, J. Cline, G. L. Youngblood, R. M. Allen, *BioTechniques* **2002**, *33*, 1158–1165; b) andere Methoden zur Sättigungsmutagenese wie Megaprimer und Overlap-Extension-PCR (PCR = Polymerasekettenreaktion) sowie verschiedene Assembly-Strategien können ebenfalls eingesetzt werden:^[7] S. Lutz, U. T. Bornscheuer, *Protein Engineering Handbook*, Vol. 1–2, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [3] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, W. H. Freeman, New York, **1999**.
- [4] Siehe z. B.: a) G. G. Hammes, S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer, *Biochemistry* **2011**, *50*, 10422–10430; b) A. J. Adamczyk, J. Cao, S. C. L. Kamerlin, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14115–14120; c) J. Liu, R. Nussinov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 901–906; d) M. Garcia-Viloca, J. Gao, M. Karplus, D. G. Truhlar, *Science* **2004**, *303*, 186–195; e) S. D. Schwartz, V. L. Schramm, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 551–558; f) Z. D. Nagel, J. P. Klinman, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 543–550; g) N. Boekelheide, R. Salomón-Ferrer, T. F. Miller III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16159–16163; h) S. Hay, N. S. Scrutton, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 161–168.
- [5] Übersichten über rationales Design von Enzymen unter Verwendung der ortsspezifischen Mutagenese:^[2b] a) J. Pleiss in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3. Aufl. (Hrsg.: K. Drauz, **2013**)

- H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, S. 89–117; b) T. Ema, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1009–1025; c) K. Hult, P. Berglund, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 395–400; d) L. G. Otten, F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 46–54.
- [6] Neuere Übersichten über gerichtete Evolution:^[2b,8] a) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, 1, 1017–1021; b) E. M. Brustad, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 201–210; c) N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 567–573; d) C. Jäckel, P. Kast, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2008**, 37, 153–173; e) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 194–200; f) S. Bershtain, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 151–158; g) P. A. Dalby, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, 21, 473–480; h) L. G. Otten, F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, *Trends Biotechnol.* **2009**, 28, 46–54; i) A. V. Shivange, J. Marienhagen, H. Mundhada, A. Schenk, U. Schwaneberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 19–25; j) A. Kumar, S. Singh, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, DOI: 10.3109/07388551.2012.716810; k) A. Bolt, A. Berry, A. Nelson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 474, 318–330; l) N. E. Labrou, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2010**, 11, 91–100; m) D. P. Nannemann, W. R. Birmingham, R. A. Scism, B. O. Bachmann, *Future Med. Chem.* **2011**, 3, 809–819; n) N. U. Nair, C. A. Denard, H. Zhao, *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 1870–1882; o) S.-C. Lee, J.-H. Kim, H.-S. Kim, *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14, 1894–1901; p) R. M. P. Siloto, R. J. Weselake, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2012**, 1, 181–189; q) M. T. Reetz in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, S. 119–190.
- [7] Ältere und neuere Versionen und Anwendungen von Sättigungsmutagenese:^[2b,6] a) J. A. Wells, M. Vasser, D. P. Powers, *Gene* **1985**, 34, 315–323; b) K. M. Derbyshire, J. J. Salvo, N. D. F. Grindley, *Gene* **1986**, 46, 145–152; c) A. Wissmann, I. Meier, W. Hillen, *J. Mol. Biol.* **1988**, 202, 397–406; d) R. Higuchi, B. Krummel, R. K. Saiki, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 7351–7367; e) M. A. Vandeyar, M. P. Weiner, C. J. Hutton, C. A. Batt, *Gene* **1988**, 65, 129–133; f) D. K. Dube, L. A. Loeb, *Biochemistry* **1989**, 28, 5703–5707; g) G. Sarkar, S. S. Sommer, *BioTechniques* **1990**, 8, 404–407; h) S. Climie, L. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Panowska, P. Prapunwattana, S.-W. Cho, R. Stroud, D. V. Santi, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18776–18779; i) A. V. Teplyakov, J. M. van der Laan, A. A. Lammers, H. Kelders, K. H. Kalk, O. Misset, L. J. S. M. Mulleners, B. W. Dijkstra, *Protein Eng.* **1992**, 5, 413–420; j) L. D. Graham, K. D. Haggett, P. A. Jennings, D. S. Le Brocq, R. G. Whittaker, P. A. Schober, *Biochemistry* **1993**, 32, 6250–6258; k) M. S. Warren, S. J. Benkovic, *Protein Eng.* **1997**, 10, 63–68; l) R. D. Kirsch, E. Joly, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1848–1850; m) K. Miyazaki, F. H. Arnold, *J. Mol. Evol.* **1999**, 49, 716–720; n) S. V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3408–3436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3310–3335; o) N. M. Antikainen, P. J. Hergenrother, M. M. Harris, W. Corbett, S. F. Martin, *Biochemistry* **2003**, 42, 1603–1610; p) C. N. Dominy, D. W. Andrews, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 235 (Hrsg.: N. Casali, A. Preston), Humana, Totowa, **2003**, S. 209–223; q) R. Georgescu, G. Bandara, L. Sun, *Directed Evolution Library Creation*, Vol. 231 (Hrsg.: F. H. Arnold, G. Georgiou), Humana, Totowa, **2003**, S. 75–83; r) E. M. Gabor, D. B. Janssen, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, 17, 571–579; s) A. R. Schmitzer, F. Lépine, J. N. Pelletier, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, 17, 809–819; t) T. S. Wong, K. L. Tee, B. Hauer, U. Schwaneberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e26; u) L. Zheng, U. Baumann, J.-L. Reymond, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e115; v) A. Herman, D. S. Tawfik, *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, 20, 219–226; w) W.-C. Tseng, J.-W. Lin, T.-Y. Wei, T.-Y. Fang, *Anal. Biochem.* **2008**, 375, 376–378; x) A. Hidalgo, A. Schließmann, R. Molina, J. Hermoso, U. T. Bornscheuer, *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, 21, 567–576; y) J. Sanchis, L. Fernández, J. D. Carballeira, J. Drone, Y. Gumulya, H. Höbenreich, D. Kahakeaw, S. Kille, R. Lohmer, J. J.-P. Peyralans, J. Podtetenieff, S. Prasad, P. Soni, A. Taglieber, M. T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 81, 387–397.
- [8] a) Übersicht über gerichtete Evolution mit Betonung auf Qualität statt Quantität bei der Generierung von Mutantenbibliotheken, die zu weniger Screening führen:^[21] S. Lutz, W. M. Patrick, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 291–297; statistische Ansätze zur Abschätzung des Oversampling beim Screening:^[21,25a] b) A. E. Firth, W. M. Patrick, *Bioinformatics* **2005**, 21, 3314–3315; c) A. E. Firth, W. M. Patrick, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, W281–W285; d) M. Denault, J. N. Pelletier, *Protein Engineering Protocols*, Vol. 352 (Hrsg.: K. M. Arndt, K. M. Müller), Humana, Totowa, **2007**, S. 127–154; e) Y. Nov, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 258–262; f) J. F. Chaparro-Riggers, K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, *Biotechnol. J.* **2007**, 2, 180–191.
- [9] a) W. Cai, H. Hong, *Protein-Protein Interactions – Computational and Experimental Tools*, InTech, Rijeka, **2012**; b) D. A. Bonsor, E. J. Sundberg, *Biochemistry* **2011**, 50, 2394–2402; c) „Protein-Protein Interactions“: M. Werther, H. Seitz, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer, Berlin, **2010**; d) O. Keskin, B. Ma, K. Rogale, K. Gunasekaran, R. Nussinov, *Phys. Biol.* **2005**, 2, S24–S35; e) G. Pál, J.-L. K. Kouadio, D. R. Artis, A. A. Kossiakoff, S. S. Sidhu, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 22378–22385; f) S. Byrum, S. K. Smart, S. Larson, A. J. Tackett, *Methods Mol. Biol.* **2012**, 833, 143–152; g) Z. Qiu, X. Wang, *J. Theor. Biol.* **2012**, 293, 143–150; h) Q. C. Zhang, D. Petrey, L. Deng, L. Qiang, Y. Shi, C. A. Aye, B. Bisikirska, C. Lefebvre, D. Accili, T. Hunter, T. Maniatis, A. Califano, B. Honig, *Nature* **2012**, 490, 556–560.
- [10] G. Schreiber, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **1995**, 248, 478–486.
- [11] D. C. Carter, G. Winter, A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, *Cell* **1984**, 38, 835–840.
- [12] a) J. A. Wells, D. B. Powers, R. R. Bott, T. P. Graycar, D. A. Estell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 1219–1223; b) J. A. Wells, *Biochemistry* **1990**, 29, 8509–8517.
- [13] a) A. Horovitz, *Curr. Biol.* **1996**, 6, R121–R126; b) D. Shortle, A. K. Meeker, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1986**, 1, 81–89; c) D. Shortle, *Quart. Rev. Biophys.* **1992**, 25, 205–250; d) G. K. Ackers, F. R. Smith, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 597–629; e) J. Laskowski, M. I. Kato, W. Ardelet, J. Cook, A. Denton, M. W. Empie, W. J. Kohr, S. J. Park, K. Parks, B. L. Schatzley, O. L. Schoenberger, M. Tashiro, G. Vichot, H. E. Whatley, A. Wieczorek, M. Wieczorek, *Biochemistry* **1987**, 26, 202–221; f) H. C. M. Nelson, R. T. Sauer, *Cell* **1985**, 42, 549–558.
- [14] a) A. S. Mildvan, D. J. Weber, A. Kulipulos, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 294, 327–340; b) A. S. Mildvan, *Biochemistry* **2004**, 43, 14517–14520.
- [15] M. M. Skinner, T. C. Terwilliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 10753–10757.
- [16] T. Aita, H. Uchiyama, T. Inaoka, M. Nakajima, T. Kokubo, Y. Husimi, *Biopolymers* **2000**, 54, 64–79.
- [17] a) M. Lehmann, C. Loch, A. Middendorf, D. Studer, S. F. Lassen, L. Pasamontes, A. P. G. M. van Loon, M. Wyss, *Protein Eng.* **2002**, 15, 403–411; b) B. J. Sullivan, T. Nguyen, V. Durani, D. Mathur, S. Rojas, M. Thomas, T. Syu, T. J. Magliery, *J. Mol. Biol.* **2012**, 420, 384–399; c) N. Declerck, M. Machius, P. Joyet, G. Wiegand, R. Huber, C. Gaillardin, *Biologia Bratislava* **2002**, 57, 203–211; d) Y. Qvarnström, G. Swedberg, *Microbiology* **2000**, 146, 1151–1156; e) J. D. Bloom, J. J. Silberg, C. O. Wilke, D. A. Drummond, C. Adami, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 606–611.
- [18] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, J. J.-P. Peyralans, H. Höbenreich, A. Maichele, A. Vogel, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6031–6038.
- [19] L. Serrano, A. Horovitz, B. Avron, M. Bycroft, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1990**, 29, 9343–9352.

- [20] a) Z. Huang, C. R. Wagner, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1994**, 33, 11576–11585; b) C. R. Wagner, Z. Huang, S. F. Singleton, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1995**, 34, 15671–15680.
- [21] Übersicht über gerichtete Evolution mit Betonung auf ISM:^[6a] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 144–182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 138–174.
- [22] Erste ISM-Studie zur Steuerung der Stereoselektivität von Enzymen: a) M. T. Reetz, L.-W. Wang, M. Bocola, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 1258–1263; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1236–1241; Erratum: M. T. Reetz, L.-W. Wang, M. Bocola, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2494; b) ISM zur Erhöhung der Stabilität von Enzymen: M. T. Reetz, J. D. Carballera, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 891–903; c) ISM zur Kontrolle der Regioselektivität bei P450-katalysierten oxidativen Hydroxylierungen: S. Kille, F. E. Zilly, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 738–743.
- [23] a) M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2830–2832; b) M. T. Reetz, S. Wilensek, D. Zha, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3701–3703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3589–3591; c) M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 5716–5722.
- [24] a) M. Bocola, N. Otte, K.-E. Jaeger, M. T. Reetz, W. Thiel, *ChemBioChem* **2004**, 5, 214–223; b) M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballera, A. Vogel, K.-E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Bocola, N. Otte, *ChemBioChem* **2007**, 8, 106–112.
- [25] a) S. Kille, C. G. Acevedo-Rocha, L. P. Parra, Z.-G. Zhang, D. J. Opperman, M. T. Reetz, J. P. Acevedo, *ACS Synth. Biol.* **2012**, DOI: 10.1021/sb300037w; b) L. Tang, H. Gao, X. Zhu, X. Wang, M. Zhou, R. Jiang, *BioTechniques* **2012**, 52, 149–158; c) Y. Gumulya, *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2010**; d) D. J. Bougioukou, S. Kille, A. Taglieber, M. T. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 3287–3305.
- [26] M. T. Reetz, S. Prasad, J. D. Carballera, Y. Gumulya, M. Bocola, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9144–9152.
- [27] A. G. Sandström, Y. Wikmark, K. Engström, J. Nyhlén, J.-E. Bäckvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 78–83.
- [28] S. Bartsch, R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1531–1534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1508–1511.
- [29] H. Zheng, M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15744–15751.
- [30] A. Y. Istomin, M. M. Gromiha, O. K. Vorov, D. J. Jacobs, D. R. Livesay, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, 70, 915–924.
- [31] D. M. Weinreich, N. F. Delaney, M. A. DePristo, D. L. Hartl, *Science* **2006**, 312, 111–114.
- [32] a) M. T. Reetz, J. Sanchis, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2260–2267; b) M. T. Reetz, D. Kahakeaw, J. Sanchis, *Mol. BioSyst.* **2009**, 5, 115–122.
- [33] a) W. Augustyniak, A. A. Brzezinska, T. Pijning, H. Wienk, R. Boelens, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Protein Sci.* **2012**, 21, 487–497; b) M. T. Reetz, P. Soni, J. P. Acevedo, J. Sanchis, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8418–8422; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8268–8272.
- [34] Y. Gumulya, J. Sanchis, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2012**, 13, 1060–1066.
- [35] a) S. G. Peisajovich, D. S. Tawfik, *Nat. Methods* **2007**, 4, 991–994; b) M. A. DePristo, *HFSP J.* **2007**, 1, 94–98.
- [36] M. Eigen, J. McCaskill, P. Schuster, *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 6881–6891.
- [37] a) S. Kurtovic, B. Mannervik, *Biochemistry* **2009**, 48, 9330–9339; b) S. Kurtovic, A. Shokeer, B. Mannervik, *J. Mol. Biol.* **2008**, 382, 136–153.
- [38] a) M. S. Breen, C. Kemena, P. K. Vlasov, C. Notredame, F. A. Kondrashov, *Nature* **2012**, 490, 535–538; b) G. P. Wagner, *Nature* **2012**, 490, 493–494.
- [39] De-novo-Design von Enzymen unter Verwendung des Rosetto-Algorithmus: a) 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, 1387–1391; b) N. Koga, R. Tatsumi-Koga, G. Liu, R. Xiao, T. B. Acton, G. T. Montelione, D. Baker, *Nature* **2012**, 491, 222–227.
- [40] Ich möchte hinzufügen, dass die Bezeichnung „Protein-Engineering“ unglücklich gewählt worden ist. Nach Webster’s Dictionary bezieht sich der Begriff „Engineering“ auf Anwendung der Wissenschaft („the application of science and mathematics by which the properties of matter and the sources of energy in nature are made useful to people“). Der allergrößte Teil der Tätigkeit auf dem Gebiet des Protein-Engineerings hat heute wie in der Vergangenheit mit Grundlagenforschung zu tun. Nicht nur in diesem Essay, sondern auch in Tausenden von anderen Artikeln ist klar geworden, dass wir immer noch weit entfernt von einem tiefen Verständnis der Mechanismen von Enzymen sind. Ferner sind wir längst nicht in der Lage, auf breiter Basis zuverlässige Voraussagen über den Einfluss von Mutationen auf die katalytischen Eigenschaften von Enzymen zu machen.