

Protein-Engineering aus dem „Nichts“ wird praktikabel

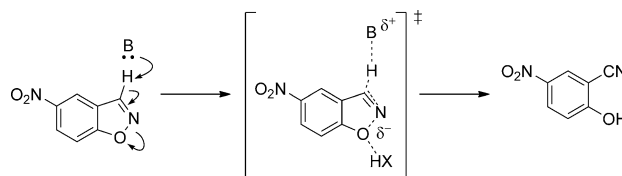
Matthias Höhne und Uwe T. Bornscheuer*

Computerdesign · Enzymkatalyse · Gerichtete
Evolution · Kemp-Eliminase · Protein-Engineering

In der Biokatalyse werden natürliche Enzyme verwendet, um eine gewünschte Reaktion durchzuführen, und zahlreiche Beispiele, die nahezu alle Enzymklassen abdecken, wurden beschrieben. Falls ein natürliches Enzym nicht die gewünschten Eigenschaften aufweist, können Methoden des Protein-Engineering^[1] genutzt werden, um es einer Zielvorgabe anzupassen, z. B. Stereoselektivität, gewünschtes Substratspektrum oder Temperatur und Lösungsmittelstabilität. Vor allem in den letzten beiden Jahrzehnten wurden sehr viele Erfolgsgeschichten unter Einsatz verschiedenster Methoden des Protein-Engineerings geschrieben – von der Zufallsmutagenese in Kombination mit Hochdurchsatz-Screening bis zu rationalen Methoden des Proteindesigns. Dazu zählen auch verschiedene industrielle Verfahren auf Basis maßgeschneiderter Biokatalysatoren.^[2]

Ein kürzlich entwickeltes Konzept ist das Computer-gestützte Design von Enzymen.^[3] Bei diesem Designansatz werden quantenmechanische Modelle des Übergangszustands genutzt, um „Theozyme“ zu entwerfen, die anschließend mithilfe eines effizienten Algorithmus in die enorme Zahl von möglichen Proteinstrukturen gedockt werden. Das Computerdesign nutzt dabei die schnell wachsende Zahl an Proteinstrukturkoordinaten, die in der RCSB-Proteindatenbank (<http://www.pdb.org>) hinterlegt sind. Diese ist in der letzten Dekade etwa um den Faktor 6 gewachsen und enthält derzeit fast 100 000 Einträge von Proteinstrukturen.

Das erste erfolgreiche Design einer nichtnatürlichen Reaktion war die Kemp-Eliminierung von 5-Nitrobenzisoxazol (Schema 1).^[4] Die Autoren postulierten, dass eine His-Asp-Dyade in der Lage sein sollte, eine Deprotonierung des Kohlenstoffatoms in Nachbarschaft zur N-O-Bindung durch eine Base zu vermitteln, wobei der Aspartatrest den pK_a-Wert des Histidins reguliert. Die ersten auf der Basis von Vorhersagen hergestellten Proteine wiesen eine messbare katalytische Aktivität auf ($k_{\text{cat}} = 0.0009\text{--}0.29\text{ s}^{-1}$) und ermöglichten einige katalytische Zyklen. In einem weiteren Schritt konnten die Autoren die Aktivität durch nachfolgende ge-



Schema 1. Die Kemp-Eliminierung.

richtete Evolution auf einen k_{cat} -Wert von 9.5 s^{-1} und einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $60430\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ (Variante KE 59.13)^[5] steigern. Positiv ist zu bewerten, dass es Baker et al. gelungen war, ein katalytisch aktives Protein aus dem Nichts zu entwerfen. Bedauerlicherweise war die Effizienz nicht im Bereich präparativ nützlicher Katalysatoren.

In einer kürzlich veröffentlichten, herausragenden Arbeit gelang es der Arbeitsgruppe Hilvert nun, eine effiziente Kemp-Eliminase (KE) zu kreieren.^[6] Das Ausgangsgerüst (HG3, basierend auf einer Xylanasestruktur) stammte aus einer früheren Studie und hatte einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $1300\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$. Zunächst führte eine Kombination aus globalen Methoden zu einer vierfachen Steigerung (HG3.3b; Abbildung 1). Dafür wurden fehlerbehaftete Polymerasekettenre-

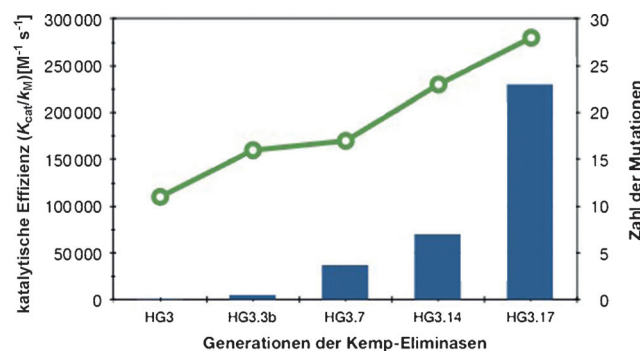


Abbildung 1. Verbesserung der katalytischen Effizienz $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (blaue Säulen) und Zahl der Mutationen (grüne Linie), die in den Generationen der Kemp-Eliminase eingefügt wurden.

aktion (epPCR) und DNA-Shuffling, gepaart mit lokalen Analysen, die auf rational und experimentell ermittelten Hotspots basierten, eingesetzt.

Die besten Varianten aus beiden Strategien wurden kombiniert und weiteren Runden von Shuffling und epPCR unterzogen; so wurde die ca. 29-mal bessere Variante HG3.7 erzeugt. Weitere Verbesserungen gelangen durch fokussierte

[*] Jun. Prof. M. Höhne
Abt. Proteinbiochemie
Institut für Biochemie, Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
Prof. U. T. Bornscheuer
Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse
Institut für Biochemie, Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de
Homepage: <http://biotech.uni-greifswald.de>

Mutagenese im Tunnel zum aktiven Zentrum, gefolgt von erneutem Shuffling. Diese Vorgehensweise führte zur besten Variante mit $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 230\,000\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$, einer erstaunlich hohen Wechselzahl k_{cat} von 700 s^{-1} (die somit über der vieler natürlicher Enzyme liegt) und vernachlässigbarer Produktinhibition. Diese Kemp-Eliminase enthielt 28 Mutationen (11 hiervon waren bereits beim Computerdesign in das Ausgangsgerüst eingefügt worden). Somit wurde im Schnitt eine Aminosäuremutation pro Runde gerichteter Evolution eingebaut.

Die Notwendigkeit einer hohen Zahl an Mutationen, um eine langsame Kemp-Eliminase in eine effiziente zu überführen, passt zu anderen Beispielen, bei denen extensives Protein-Engineering zum Erfolg führte: Die gerichtete Evolution einer Halohydrin-Dehalogenase zur Herstellung der Atorvastatin(Lipitor)-Seitenkette bedingte die Änderung von mindestens 14 % der Aminosäuren (35 von insgesamt 254 Aminosäuren).^[7] Das Protein-Engineering einer Aminotransaminase zur Herstellung des Diabeteswirkstoffs Sitagliptin veränderte 8,2 % aller Reste.^[8] In einer Retro-Aldolase, die auch über Computerdesign erzeugt wurde, mussten 4–6 % des Ausgangsenzyms (einer Xylanase) ausgetauscht werden.^[9]

Wie kann die außergewöhnliche Verbesserung der Kemp-Eliminase erklärt werden? Drei entscheidende Faktoren wurden hierfür identifiziert:

- 1) Eine außergewöhnlich hohe Passgenauigkeit: Während in HG3 zwei Orientierungen für die Bindung des Substrats gefunden wurden, gab es in HG3.17 nur einen Bindungsmodus, der eine effizientere Katalyse ermöglichte. Diese perfekte Bindung führte allerdings zu einem engen Substratspektrum.
- 2) Die Ausrichtung des Liganden an Asp127, das als katalytische Base wirkte, wurde durch mehrere Runden gerichteter Evolution optimiert und ergab eine ungewöhnlich kurze Wasserstoffbrücke.
- 3) Gln50 wurde als sehr gut positioniert erkannt und fungierte als neuer katalytischer Rest, der die negative Ladung des Übergangszustands stabilisiert.

Aus technischer Sicht erforderte der Erfolg von Hilvert et al. allerdings die sehr arbeitsintensive Erstellung von 17 Bibliotheken und umfangreiches Hochdurchsatzscreening. Diese Situation ähnelt derjenigen der frühen 1990er Jahre, als die gerichtete Evolution als Methode für das Protein-Engineering entdeckt wurde. Unser unzureichendes Wissen bedeutet für die verfügbaren Programme des Computer-basierten Designs, dass Proteindynamik vernachlässigt und ein starres Proteingrundgerüst angenommen werden muss. Diese Tatsache verhindert jedoch die Analyse verschiedener Zustände des Proteinrückgrats, die aber für eine genaue Ausrichtung des katalytischen Zentrums notwendig ist. Nur mit dieser Kenntnis können umfangreiche Runden des Protein-Engineerings zur Generierung effizienter Katalysatoren vermieden oder zumindest auf ein praktikableres Maß reduziert werden.

Ein Problem kann auch die Wahl des richtigen Ausgangsgerüsts sein. Das erste Design von Baker et al. (KE) basierte auf einer Indol-3-glycerinphosphat-Synthase (einer

α/β -Fassstruktur), während das HG3-Protein auf einer Xylanase beruhte, einem Triosephosphatisomerase(TIM)-Fassgerüst. In einem anderen Beispiel generierten Baker et al. ein Enzym zur Katalyse der Morita-Baylis-Hillman-Reaktion von 2-Cyclohexenon mit *p*-Nitrobenzaldehyd.^[10] Sie schlussfolgerten, dass ein Cystein oder ein Histidin als katalytische Reste fungieren könnten, und dies führte zur Identifizierung von zwei Designs aus 48 Proteinen, die sehr niedrige, aber messbare Aktivität über dem Hintergrund zeigten. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe Reetz schon vor einigen Jahren demonstrieren,^[11] dass verschiedene Esterasen und Lipasen – die alle eine katalytische Ser-His-Asp-Triade enthalten – sehr gute Aktivität (bis zu 10 % Umsatz bei 200 mM Substratkonzentration) für die promiskuitive Reaktion aufweisen. Dies zeigt, dass es mehr als eine Lösung geben kann, um ein bestimmtes Problem in der Enzymkatalyse zu bewältigen. Diese Erkenntnis führt zur Frage, ob hier der Hydrolasemechanismus nicht ein besserer Ausgangspunkt für das Computerdesign eines Morita-Baylis-Hillman-Enzyms gewesen wäre. Auch die Natur nutzt verschiedene Designs, um ein vorgegebenes Syntheseproblem zu lösen, selbst wenn die gleiche Art von Reaktion katalysiert wird. Beispielsweise haben Typ-I-Aldolasen, die in Pflanzen und Tieren vorkommen, ein katalytisches Lys, während Typ-II-Aldolasen aus Bakterien und Pilzen Zn-abhängige Enzyme sind.

Die Kemp-Eliminierung ist eine eher einfache, einstufige Reaktion, in welcher der Protontransfer mit einer irreversiblen Spaltung der N-O-Bindung einhergeht. Aus der strukturellen Charakterisierung der verbesserten Variante der Protein-Engineering-Studie konnten Hilvert et al. Faktoren ableiten, die essenziell sind, um das am Computer entworfene Enzym zu verbessern. In Kombination mit leistungsfähigeren Computern könnte dies zur Entwicklung optimierter Design-Algorithmen führen. Solche Algorithmen würden wiederum von Beginn an ein effizienteres Engineering aus dem „Nichts“ ermöglichen (und somit eine „Reifung“ des Computerdesigns darstellen). Leider sind viele wichtige Faktoren zum Erreichen hoher katalytischer Effizienz für andere Fragestellungen der Katalyse noch unbekannt. Folglich ist das umfangreiche Protein-Engineering eine anspruchsvolle, aber auch faszinierende Möglichkeit nicht nur zur Schaffung verbesserter Enzyme, sondern auch, um weitere Kenntnisse für zukünftige Designs zu erlangen. Offen bleibt, ob eine Kombination aus Computerdesign und Protein-Engineering es auch ermöglichen kann, effiziente Enzyme zu generieren, die (stereoselektive) Mehrsubstratreaktionen katalysieren und möglichst ein breites Substratspektrum aufweisen (z.B. die Optimierung der von Baker et al. generierten Diels-Alderase^[12]). Nur dann ist dieses Konzept wirklich konkurrenzfähig zu Enzymen aus der Natur.

Eingegangen am 4. November 2013

Online veröffentlicht am 11. Dezember 2013

- [1] a) *Protein Engineering Handbook*, Bd. 1–3 (Hrsg.: S. Lutz, U. T. Bornscheuer), Wiley-VCH, Weinheim, **2009/2013**; b) R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 526–529; c) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144–182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138–174.

- [2] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185–194.
- [3] a) G. Kiss, N. Celebi-Olcum, R. Moretti, D. Baker, K. N. Houk, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5810–5836; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5700–5725; b) H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 221–228; c) D. N. Bolon, S. L. Mayo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14274–14279; d) B. I. Dahiyat, S. L. Mayo, *Science* **1997**, 278, 82–87.
- [4] a) D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. De Chancie, 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, 190–195; b) ein alternatives Design einer allosterisch kontrollierten Kemp-Eliminase: I. V. Korendovych, D. W. Kulp, Y. Wu, H. Cheng, H. Roder, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 6823–6827.
- [5] O. Khersonsky, G. Kiss, D. Röthlisberger, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. Baker, D. S. Tawfik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 10358–10363.
- [6] R. Blomberg, H. Kries, D. M. Pinkas, P. R. Mittl, M. G. Grutter, H. K. Privett, S. L. Mayo, D. Hilvert, *Nature* **2013**, 503, 418–421.
- [7] R. J. Fox, S. C. Davis, E. C. Mundorff, L. M. Newman, V. Gavrilovic, S. K. Ma, L. M. Chung, C. Ching, S. Tam, S. Muley, J. Grate, J. Gruber, J. C. Whitman, R. A. Sheldon, G. W. Huisman, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 338–344.
- [8] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, 329, 305–309.
- [9] 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.
- [10] S. Bjelic, L. G. Nivon, N. Celebi-Olcum, G. Kiss, C. F. Rosewall, H. M. Lovick, E. L. Ingalls, J. L. Gallaher, J. Seetharaman, S. Lew, G. T. Montelione, J. F. Hunt, F. E. Michael, K. N. Houk, D. Baker, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 749–757.
- [11] T. Reetz, R. Mondière, J. D. Carballeira, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 1679–1681.
- [12] J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael, D. Baker, *Science* **2010**, 329, 309–313.