

Ansätze zur Produktion von universellem Blut durch strukturgerichtete Evolution von Glykosidhydrolasen

Zhoutong Sun, Adriana Ilie und Manfred T. Reetz*

Blutgruppen · Gerichtete Evolution · Glykosid-
hydrolasen · Iterative Sättigungsmutagenese ·
Universelles Blut

Das ABO-Blutgruppensystem, das vor über hundert Jahren von Landsteiner entdeckt wurde, ist ein maßgebliches Hilfsmittel bei Bluttransfusionen.^[1] Die Blutgruppen im ABO-System unterscheiden sich durch spezifische, antigen wirkende Zuckermoleküle auf der Oberfläche roter Blutzellen (RBCs; Erythrozyten). Die Spezifität einer Blutgruppe ist durch die Art und Verknüpfung der Monosaccharide an den Enden der Kohlenhydratketten definiert. Der antigene Bestandteil sind eine oder mehrere Kohlenhydratketten, die an ein in der Zellmembran eingebettetes Ceramid- oder Peptid-Rückgrat gebunden sind. Wird die falsche Blutgruppe verabreicht, löst dies eine Immunantwort mit manchmal fatalen Konsequenzen aus.^[1b]

Wissenschaftler haben lange versucht, ein „universelles Blut“ durch enzymkatalysierte Abspaltung der antigenen Komponenten herzustellen. In einer frühen Studie wurden Erythrozyten vom B-Typ durch eine katalytische Exoglykosidase in universelles Blut Typ O umgewandelt.^[2] α GalNAc- und α Gal-Reste der A- und B-Trisaccharid-Antigene konnten selektiv gespalten werden, und die Zellen blieben nach anschließender Transfusion intakt. Leider war die Enzymaktivität viel zu niedrig für die praktische klinische Anwendung. Andere Versuche wurden seither unternommen, z.B. die Verwendung von bakteriellen Glykosidasen,^[3c] das Problem der geringen Aktivität erwies sich jedoch als hartnäckig.^[3a,b]

Einer Forschungsgruppe unter der Leitung von Steve Withers in Zusammenarbeit mit anderen kanadischen Forschern und einer französischen Gruppe gelang nun ein wichtiger Schritt hin zur Produktion von universellem Blut.^[4] Mit dem Ziel, die Aktivität einer selektiven Glykosidasehydrolase zu steigern, unternahmen die Forscher eine Machbarkeitsstudie unter Einsatz einer strukturgerichteten Evolution. Diese Technik des Protein-Engineerings umfasst die Anwendung rekursiver Zyklen von Genmutagenese, Genexpression und Gensecreening (oder Genselektion), entsprechend einer „Darwinistischen“ Prozedur, welche die

Evolution praktisch jeder gewünschten Proteineigenschaft ermöglicht, einschließlich Enzymstabilität, Aktivität und Stereoselektivität.^[5,6] Mehrere Genmutagenesemethoden und Strategien zu deren Anwendung wurden entwickelt; eine der verlässlichsten Techniken für die Evolution von Aktivität und Stereoselektivität ist die iterative Sättigungsmutagenese (ISM) von Aminosäuren am Eingang zur Bindungstasche des Enzyms, die auf dem CAST-Verfahren (combinatorial active-site saturation test) basiert.^[6] Bei dem Verfahren wird der beste Treffer aus einer randomisierten Bibliothek als Vorlage für die Sättigungsmutagenese einer anderen Aminosäureposition verwendet, und der Prozess wird solange fortgeführt, bis die katalytischen Eigenschaften des Enzyms bis zum gewünschten Grad verbessert sind.

In Wesentlichen unterzogen Withers und Mitarbeiter eine Glykosidhydrolase aus *Streptococcus pneumonia* SP3-BS71 (Sp3GH98) mehreren gerichteten Evolutionszyklen basierend auf ISM.^[4] Sp3GH98 spaltet die gesamten terminalen Trisaccharid-Antigendeterminanten sowohl der A- als auch B-Antigene von Oberflächenglykanen roter Blutzellen ab, dies allerdings so langsam, dass eine praktische Anwendung nicht möglich ist. Klinisch sind dies die wichtigsten Antigene, auf die bei Bluttransfusionen und Gewebe- oder Organtransplantationen geachtet werden muss.^[1] Das Ziel war es, die Enzymaktivität für die Spaltung der Gal β -1,3-GlcNAc-Verknüpfung in Typ1A-Antigenen zu steigern (Abbildung 1 a–d). Zuerst wurde ein Mikrotiterplattentest zum Hochdurchsatz-Screening entwickelt. Hierfür wurde ein fluorogenes Substrat erzeugt, bestehend aus dem Typ1A-Pentasaccharid, das über eine β -glykosidische Bindung an eine Methylumbelliferyl-Einheit gekuppelt wurde. In Gegenwart zweier „kuppelnder“ Enzyme erzeugt die gewünschte hydrolytische Spaltung fluoreszierendes Methylumbelliferon; die Technik wird auch in anderen fluoreszenzbasierten Screeningsystemen eingesetzt.^[7]

Basierend auf der Kristallstruktur von Sp3GH98, das ein Lewis^x-Pentasaccharid Typ 2A enthält (PDB ID 2WMK),^[8] wurden sieben CAST-Aminosäuren in der ersten und zweiten Struktursphäre für eine Sättigungsmutagenese ausgewählt: Tyr530, Asn559, Tyr560, Trp561, Ile562, Asn592 und Lys624 (Abbildung 1 E). Diese Aminosäurepositionen sind nicht die einzigen, die in Betracht gezogen werden können, und tatsächlich wurden in einer späteren Phase zwei weitere zugefügt. Die sieben ursprünglichen Bibliotheken wurden per Fluoreszenzassay durchsucht, und es wurden drei Einzelmu-

[*] Dr. Z. Sun, Dr. A. Ilie, Prof. Dr. M. T. Reetz
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
und
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße 4, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de

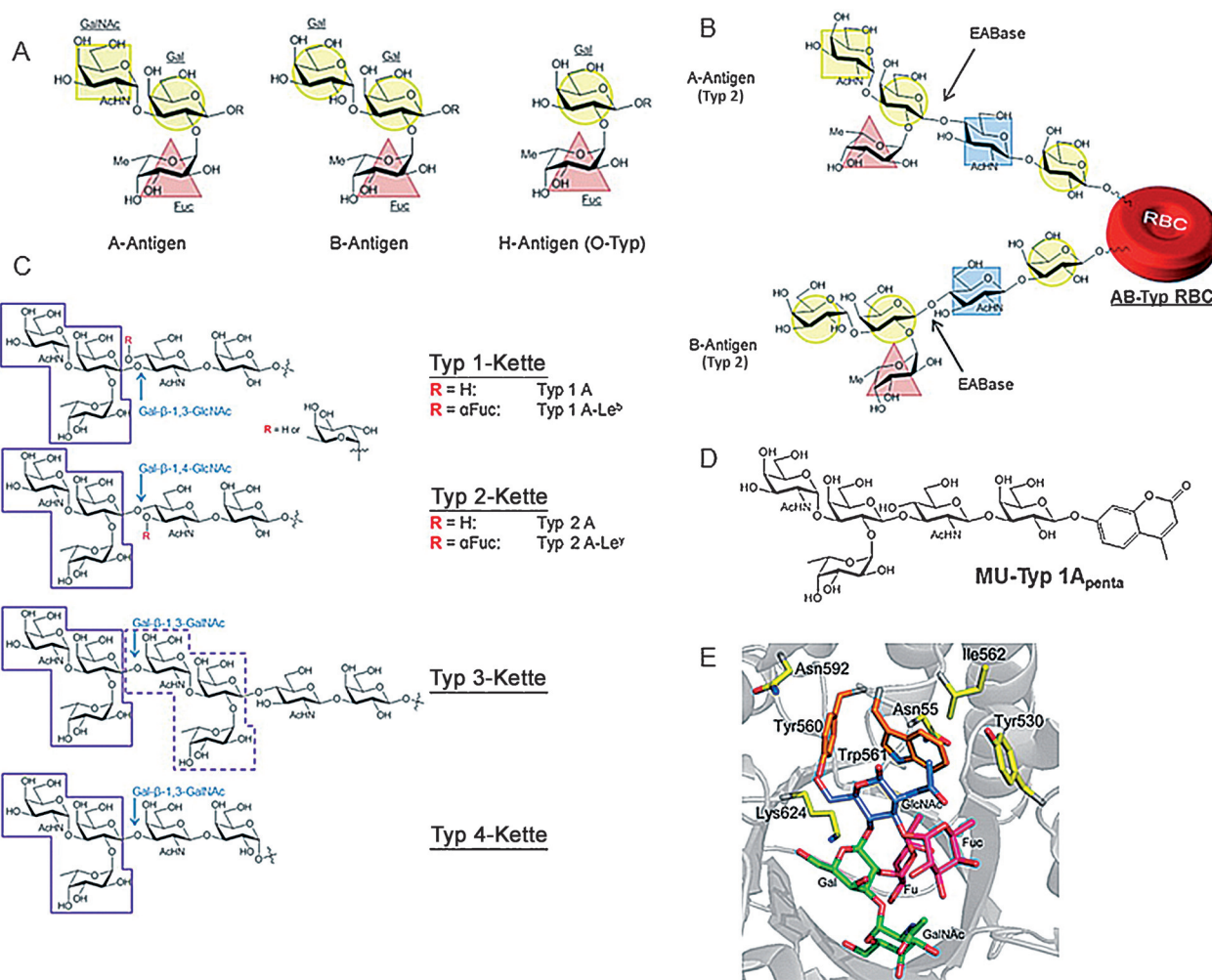


Abbildung 1. A) Antigene Kohlenhydratdeterminanten von A-, B- und H-Antigenen.^[4] Das H-Antigen kommt auf Glykanen der Blutgruppe O vor und ist typischerweise nichtantigen, außer in seltenen Fällen. B) Spaltungsstellen in Typ2-Ketten für die Abspaltung der A- und B-Antigene von Erythrozyten durch GH98-EABase-Enzyme. C) Verschiedene Kettentypen mit A-Antigenkomponenten auf der Oberfläche von Erythrozyten und anderen Zelltypen. D) Struktur des fluorogenen Substrats MU-Typ1A_{penta}. E) Randomisierungsstellen in der ersten und zweiten Struktursphäre, die basierend auf der Röntgenkristallstruktur von Sp3GH98^[8] für die iterative Sättigungsmutagenese (ISM) ausgewählt wurden.^[4] Erste Sphäre: Tyr560 und Trp561; zweite Sphäre: Tyr530, Asn559, Ile562, Asn592 und Lys624. Abdruck mit Genehmigung der American Chemical Society.

tationen mit dreifach erhöhter Hydrolyseaktivität entdeckt (Asn559Ser, Asn592Val und Asn592Ser). Die Mutationen wurden zu Doppelmутanten Asn559Ser/Asn592Val und Asn559Ser/Asn592Ser kombiniert, die eine etwa sechsfach erhöhte Aktivität aufwiesen. Auf die Doppelmутanten wurde anschließend ISM angewendet,^[6] mit individueller Randomisierung an den Aminosäurepositionen Tyr530, Tyr560, Trp561, Ile562 und Lys624. Danach wurden verschiedene Doppelpositionen bestehend aus den obigen Einzelpositionen und den in der Nähe befindlichen Resten Glu630, Glu663 und Lys677 weiteren ISM-Prozeduren unterzogen. Den Studien lag die Annahme zugrunde, dass kooperative Effekte zwischen einzelnen Punktmutationen innerhalb eines aus mehreren Aminosäuren bestehenden Zentrums und zwischen Sätzen von Mutationen auftreten, wie es in anderen Arbeiten bereits gezeigt wurde.^[6] Die beste Variante, die mit diesem Ansatz auf dieser Stufe der evolutionären Optimierung erhalten wurde, war Tyr530His/Asn559Ser/Asn592Val/Glu630Leu/Lys677Leu mit einer 120-fachen Verstärkung von

k_{cat}/K_M . Eine fehleranfällige Polymerasekettenreaktion erhöhte die Aktivität nur in geringem Ausmaß durch eine sechste Mutation, Leu692Ile.^[4] Die Strategie erwies sich als erfolgreich. Ein vielleicht sogar besserer ISM-Ansatz wäre gewesen, die einzelnen Aminosäurepositionen von Anfang an in größere Abschnitte zu gruppieren und dann ISM mit reduzierten Aminosäurealphabeten durchzuführen.^[6]

Die thermische Stabilität der Mutante ($T_m = 44^\circ\text{C}$) reicht für praktische Anwendungen aus.^[4] Die für das Typ1A-Oligosaccharid evolvierten Aktivitätssteigerungen verursachen keinen signifikanten Aktivitätsverlust gegen Typ2A-Oligosaccharide. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass die Aktivitäten des Enzyms gegen die beiden Verknüpfungen ausbalanciert sind, was die vollständige Entfernung von Antigenen ermöglicht. Schließlich wurden antikörperbasierte Immunfluoreszenzexperimente mit den realen Substraten durchgeführt, die eine deutlich erhöhte Abspaltung der Typ1A-Antigene von der Oberfläche roter Blutzellen demonstrierten.

Die hier besprochene Studie hat zum ersten Mal gezeigt, dass gerichtete Evolution genutzt werden kann, um die Substratspezifität von Sp3GH98 für die Spaltung der Gal β -1,3-GlcNAc-Verknüpfung von Typ1-Ketten ohne größeren Aktivitätsverlust gegen die Gal β -1,4-GlcNAc-Verknüpfung von Typ2-Ketten zu steigern. Die Ergebnisse dienen als Basis für zukünftige gerichtete Evolutionsexperimente zur Verbreiterung der Substratspezifität gegen Gal β -1,3-GalNAc-Verknüpfungen von Typ3- und Typ4-Ketten. Diese beinhalten A-Antigene (aber keine B-Antigene), die in manchen zum A₁-Phänotyp gehörenden Individuen (80% der Blutgruppe A) vorkommen. Mehr Forschungen sind nötig, bevor die Produktion von universellem Blut möglich sein wird, aber die hier vorgestellte Studie hat einen neuen Zugang zu diesem spannenden Projekt geöffnet.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9158–9160
Angew. Chem. **2015**, *127*, 9288–9290

-
- [1] a) M. E. Reid, C. Lomas-Francis, M. L. Olsson, *The Blood Group Antigen Facts Book*, 3. Aufl., Elsevier, New York, **2012**; b) J. L. Carson, B. J. Grossman, S. Kleinman, A. T. Tinmouth, M. B. Marques, M. K. Fung, J. B. Holcomb, O. Illoh, L. J. Kaplan, L. M. Katz, S. V. Rao, J. D. Roback, A. Shander, A. A. R. Tobian, R. Weinstein, L. G. S. McLaughlin, B. Djulbegovic, *Ann. Intern. Med.* **2012**, *157*, 49–58.
[2] J. Goldstein, G. Siviglia, R. Hurst, L. Lenny, L. Reich, *Science* **1982**, *215*, 168–170.
[3] a) K. M. Anderson, H. Ashida, K. Maskos, A. Dell, S. C. Li, Y. T. Li, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7720–7728; b) Q. P. Liu, H. Yuan,

- E. P. Bennett, S. B. Levery, E. Nudelman, J. Spence, G. Pietz, K. Saunders, T. White, M. L. Olsson, B. Henrissat, G. Sulzenbacher, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8545–8554; c) Q. P. Liu, G. Sulzenbacher, H. Yuan, E. P. Bennett, G. Pietz, K. Saunders, J. Spence, E. Nudelman, S. B. Levery, T. White, J. M. Neveu, W. S. Lane, Y. Bourne, M. L. Olsson, B. Henrissat, H. Clausen, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 454–464.
[4] D. H. Kwan, I. Constantinescu, R. Chapanian, M. A. Higgins, M. Koetzler, E. Samain, A. B. Boraston, J. N. Kizhakkedathu, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5695–5705.
[5] *Directed Evolution Library Creation: Methods in Molecular Biology* (Hrsg.: E. M. J. Gillam, J. N. Copp, D. F. Ackerley), Humana Press, Totowa, **2014**.
[6] Übersicht zur gerichteten Evolution mit Fokus auf der iterativen Sättigungsmutagenese: a) M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138–174; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144–182; b) „Iterative Saturation Mutagenesis: A Powerful Approach to Engineer Proteins by Simulating Darwinian Evolution“: C. G. Acevedo-Rocha, S. Kille, M. T. Reetz in *Methods in Molecular Biology, Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, 2. Aufl. (Hrsg.: D. Ackerley, J. Copp, E. Gillam), Humana Press, Totowa, **2014**, S. 103–128.
[7] *Enzyme Assays: High-throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting* (Hrsg.: J.-L. Reymond), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
[8] M. A. Higgins, G. E. Whitworth, N. El Warry, M. Randrianisoa, E. Samain, R. D. Burke, D. J. Voadlo, A. B. Boraston, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 26161–26173.

Eingegangen am 12. Mai 2015
Online veröffentlicht am 19. Juni 2015