

## Biochemie und Molekularbiologie 2008

Jan Marienhagen, Ulrich Schwaneberg, Mark Helm

*Um Enzyme als effiziente Katalysatoren in chemischen Synthesen einzusetzen, sind häufig ihre Eigenschaften wie Lösungsmittelstabilitäten zu verbessern. Fortschritte in der Molekularbiologie insbesondere der gelenkten Enzymevolution und dem rationalen Enzymdesign helfen, das Synthesepotenzial von Enzymen auszuschöpfen. Die RNA-Biochemie bleibt ein Treffpunkt interdisziplinärer Forschung. Mit Einzelmolekültechniken lassen sich die vielfältigen Funktionen der RNA untersuchen.*

### Enzymengineering für die Synthese

#### Rationales Design

◆ Durch Enzymengineering (rationales Proteindesign und/oder gelenkte Evolution) lassen sich Enzyme den Erfordernissen der Synthesechemie anpassen.

Lokalisierte Enzymeigenschaften wie Substratspezifität, Aktivität, Regio- und Stereoselektivität lassen sich gezielt verändern, falls für ein Enzym detaillierte Informationen zur dreidimensionalen Struktur (Proteinkristallographie, NMR, Homologiemodell) vorliegen. Diese als „rationales Enzymdesign“ bekannte Methode baut auf dem Verständnis von Struktur-Funktions-Beziehungen auf. Um lokalisierte Enzymeigenschaften zu verbessern, sind die Aminosäureseitenketten in Enzymen entscheidend, da diese an der Substratbindung, -orientierung und -umsetzung beteiligt sind. Nach Identifizierung dieser Aminosäureseitenketten im Struktur- oder Homologiemodell werden sie zunächst über eine In-vitro-Mutagenese gezielt gegen eine bestimmte (Punktmutation) oder gegen alle 19

weiteren Aminosäuren (Sättigungsmutagenese) ausgetauscht. Da meist mehrere Aminosäureseitenketten eines Enzyms identifiziert werden, ist ein aufeinander folgender oder gleichzeitiger Austausch mehrerer Positionen eine viel versprechende Optimierungsstrategie.

Rationales Proteingeneering verbesserte eine Reihe von Biokatalysatoren: So ließ sich bei einer Monooxygenase die Substratspezifität hin zu aromatischen und heterocyclischen Substraten gezielt verändern,<sup>1)</sup> die Aktivität für unnatürliche Substrate wie Indol signifikant erhöhen<sup>2)</sup> und die Enantioselektivität der Styrolepoxidierung invertieren.<sup>3)</sup>

Das rationale Proteindesign hat gegenüber dem evolutionen Proteindesign den Vorteil, dass nur wenige Proteinvarianten (20 Aminosäuren pro Position) durchzumustern sind. Dies beschränkt den Arbeitsaufwand meist auf drei bis vier Tage und erlaubt eine parallele Untersuchung von bis zu vier Positionen.

#### Gelenkte Evolution

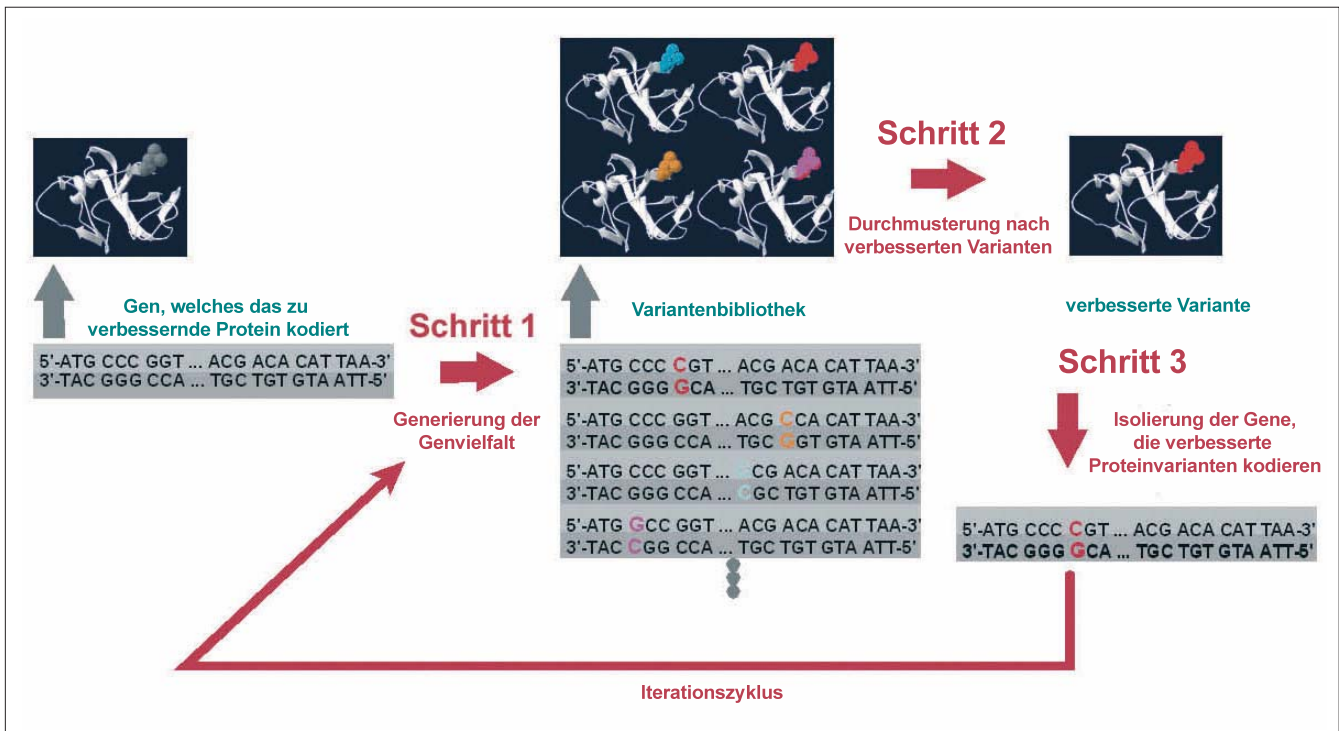
◆ Obwohl immer mehr Strukturmodelle für Enzyme verfügbar werden, bleiben viele Struktur-Funktionsbeziehungen unverstanden und

können daher nicht durch rationales Proteindesign verändert werden. Das evolutive Enzymengineering verändert im Gegensatz zum rationalen Enzymdesign universell alle Eigenschaften von Enzymen ohne Kenntnis und Verständnis der jeweiligen Enzymstruktur oder -eigenschaft. Ein typisches gelenktes Enzymevolutionsexperiment durchläuft drei iterative Schritte (Abbildung 1):

Der erste Schritt generiert eine Variantenbibliothek. Dazu wird das jeweilige Gen, das den Bauplan des Proteins vorgibt, vervielfältigt und dabei zufällig mutiert. Zufällige Mutationen der Gene führen auf Proteinebene häufig zu veränderten Aminosäureseitenketten und damit zu zufällig veränderten Enzymeigenschaften. Enzymvariantenbibliotheken spannen oft einen großen Proteinsequenzraum auf ( $20^n$ ; n: Zahl der Aminosäuren des Proteins; oft  $>20^{10} = 1,26 \cdot 10^{130}$ ).

Im zweiten Schritt werden die Bibliotheken nach verbesserten Varianten durchsucht – häufig mit einem colorimetrischen oder fluorimetrischen Durchmusterungssystem.

Im dritten Schritt werden verbesserte Proteinvarianten isoliert und charakterisiert. Sie können anschließend als Ausgangspunkt für weitere iterative Zyklen dienen.



**Limitierungen**

◆ Die Qualität der Variantenvielfalt ist für jedes Experiment zur gelenkten Evolution entscheidend. Ideal wäre eine Methode, die es erlaubt, jede Aminosäure einer Proteinsequenz gegen jede der anderen 19 weiteren Aminosäuren auszutauschen. Die durch die Natur vorgegebene Organisation des genetischen Codes und Basenpaarungseigenschaften der DNA erschweren jedoch die Entwicklung von Methoden, welche die theoretisch mögliche Vielfalt voll ausschöpfen können.

Der genetische Code ist so organisiert, dass jeweils drei aufeinander folgende Nucleotide in der Gensequenz eine Aminosäure auf Proteinebene kodieren. Berücksichtigt man, dass pro Nucleotidposition vier Nucleotide möglich sind, so ergeben sich daraus  $4^3 = 64$  Möglichkeiten. Diese 64 Möglichkeiten kodieren jedoch nur 20 Aminosäuren, so dass im Durchschnitt ungefähr drei Codons pro Aminosäure verwendet werden können. Der genetische Code ist jedoch ungleich verteilt: so kodieren gleich sechs Codons die Aminosäuren Arginin, Lysin und Serin, die Aminosäuren Methionin und Tryptophan kodiert dagegen

nur eines. Diese Ungleichverteilung verursacht bei Zufallsmutagenesen einen bevorzugten Austausch hin zu Aminosäuren die durch vier und sechs Codons kodiert werden.

In gelenkten Evolutionsexperimenten werden Mutagenesefrequenzen durch Beschränkungen der Durchmusterungstechniken so eingestellt, dass pro Enzym etwa ein bis vier Aminosäuren ausgetauscht werden. Bei einer angenommenen Gesamtlänge von 200 Aminosäuren (600 Nucleotiden) ist die Wahrscheinlichkeit zweier aufeinanderfolgender Nucleotidaustausche gering. In einem kürzlich publizierten Übersichtsartikel zu gelenkten Evolutionsexperimenten von Monooxygenasen gab es keinen einzigen Bericht über aufeinanderfolgende Nucleotidaustausche in einem Codon, die durch eine Zufallsmutagenese des jeweiligen Gens generiert wurden.<sup>4)</sup> Ohne solche Mutationen ist ein großer Teil der möglichen genetischen Diversität nicht zugänglich, da durch den Austausch eines Nucleotids pro Codon von 380 Möglichkeiten (alle 20 Aminosäuren jeweils durch die 19 anderen Aminosäuren ausgetauscht) nur 150 Möglichkeiten realisierbar sind (Abbildung 2).<sup>5)</sup>

Mutieren hingegen zwei aufeinander folgende Nucleotide in einem Codon, so sind 316 Aminosäuresubstitutionen möglich.

Eine weitere Limitierung betrifft die DNA-Synthese, da meist Methoden der fehlerhaften Polymerasekettenreaktion (error-prone-PCR) eingesetzt werden, um die genetische Vielfalt zu generieren. Dabei werden die Gene durch Erhöhen der Fehlerrate der DNA-Polymerase mutiert, die zum Vervielfältigen der DNA eingesetzt wird. Aufgrund der Doppelhelixstruktur der DNA und den Bindungseigenschaften der Nucleotide

Abb. 1. Typischer Ablauf eines Experiments zur gelenkten Enzymevolution.

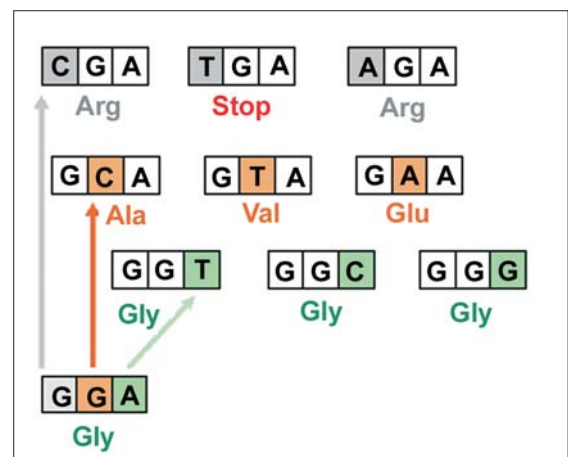


Abb. 2. Tauscht man im Codon GGA nur ein Nucleotid gegen die jeweils drei anderen Nucleotide aus, sind nur vier Aminosäuresubstitutionen möglich.

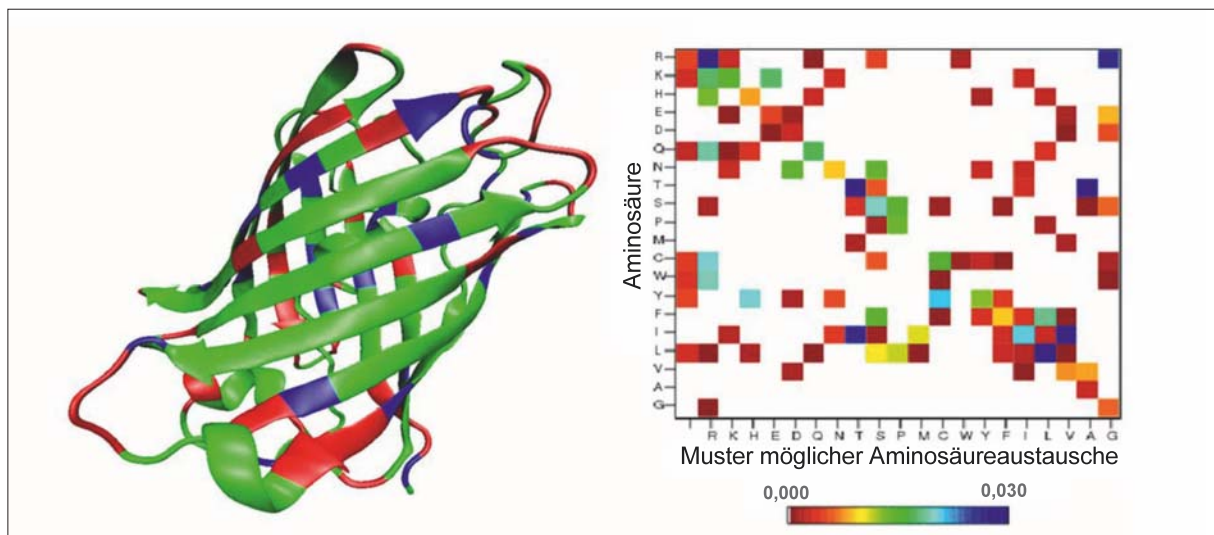


Abb. 3. MAP-Analyse der Aminosäureaustausche, generiert durch fehlerhafte PCR für das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* (PDB-Eintrag: 1GFL). Blaue Regionen haben eine hohe, rote Regionen eine niedrige Wahrscheinlichkeit für einen Aminosäureaustausch.

bevorzugen DNA-Polymerasen aber den Austausch von Nukleotiden durch chemisch ähnliche Nukleotide: Purine (A und G) durch Purine und Pyrimidine (T und C) durch Pyrimidine. Diese als Transitionen bezeichneten Mutationen bewirken auf Proteinebene überwiegend die Substitution von Aminosäuren durch chemisch ähnliche Aminosäuren.<sup>6)</sup> Ein Vergleich von 19 zur Verfügung stehenden Mutagenesemethoden mit dem statistischen MAP-Programm (Mutagenesis Assistant Program) zeigte, dass alle diese Mutagenesetechniken nur einen Bruchteil der na-

türlichen Vielfalt generieren.<sup>7)</sup> Statistisch werden lediglich 3,15 bis 7,4 Aminosäureaustausche pro Protein generiert und bestimmte Regionen (mutagene hotspots) werden stark bevorzugt oder so gut wie nicht mutiert (Abbildung 3).

Die Sequence-Saturation-Mutagenesis-Methode (Sesam) ist eine einfache Methode (mittlerweile auch kommerzialisiert: [www.sesambiotech.com](http://www.sesambiotech.com)), die jedes Nukleotid vollkommen zufällig mutiert und auch partiell aufeinanderfolgende Mutationen einführt.<sup>8)</sup>

Ein Sesam-Experiment umfasst vier Arbeitsschritte: Zuerst wird eine Bibliothek aus DNA-Fragmenten des Gens von Interesse mit zufälliger Längenverteilung generiert. An diese Fragmente werden Nukleotidanaloga mit degenerierten Nukleotidpaarungseigenschaften angehängt und die so modifizierten Fragmente zum vollständigen Gen verlängert. Nach Reinigung vervielfältigt eine PCR die Vollhängene, wobei im Gegenstrang der Nukleotidanaloga natürliche Nukleotide eingebaut werden. Bei der Sesam-Methode lässt sich das Spektrum der Nukleotidaustausche durch Auswahl und Kombination von universellen Nukleotiden (nukleotidanalogue Basen mit degenerierten Basenpaarungseigenschaften) steuern. Dadurch ist es möglich, statt Transitionen bevorzugt Transversionen (Nukleotidaustausch gegen chemisch

weniger verwandte Nucleotide) zu generieren, und dies führt in den Mutantenbibliotheken zu einer signifikant höheren chemischen Vielfalt in den Aminosäuresubstitutionen.<sup>9)</sup>

### Durchmusterungssysteme

◆ Neben der Generierung der Vielfalt entscheidet die Entwicklung von Durchmusterungssysteme über den Erfolg gelenkter Evolutionsexperimente. Dabei muss ein solches Durchmusterungssystem nicht nur verbesserte Enzymvarianten zuverlässig identifizieren, sondern vor allem sehr viele Proteinvarianten testen können. Letzteres sollte unter solchen Bedingungen geschehen, die denjenigen der angestrebten Anwendung ähneln. In den letzten Jahren wurden mit der Entwicklung von In-vitro-Kompartimentierungstechniken<sup>10,11)</sup> und durch Displaytechniken<sup>12)</sup> methodische Durchbrüche erzielt, die es erlauben, bis zu  $10^9$  Varianten durchzumustern. Bei der In-vitro-Kompartimentierung werden zunächst Wasser-in-Öl-Emulsionen hergestellt, in die einzelne Zellen oder zellfreie Transkriptions- und Translationsysteme eingeschlossen werden. Jedes dieser Kompartimente ist ein unabhängiger Reaktionsraum, in dem einzelne Enzymvarianten unabhängig voneinander durch Durchflusszytometrie untersucht werden können.

**GDCh-Kurs**

Ausgewählte Kapitel aus dem gewerblichen Rechtsschutz (990/09)

I. IP-IT-Mediation: Definition, Abgrenzung und Fallbeispiele  
II. Effektive Rechtsdurchsetzung im Patentrecht: Umsetzung der Enforcement-Richtlinie; Auswirkung auf die Praxis

25. März 2009, Frankfurt am Main  
Leitung: Dr. Nicolai von Fünér

**Highlights:**  
IP-IT-Mediation  
Patentverletzungsprozess  
Beweiserleichterung/Beweissicherung  
Durchsetzung des Besichtigungsanspruchs

**Anmeldung/Information:**  
Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.  
Fortbildung  
Tel.: 069 7917-291, Fax: 069 7917-475  
fb@gdch.de, [www.gdch.de/fortbildung2009](http://www.gdch.de/fortbildung2009)

Displaytechniken präsentieren Proteinbibliotheken auf Oberflächen von Bakteriophagen oder Bakterien und selektieren verbesserte Varianten über deren Bindung an immobilisierte Zielmoleküle. Die Zielmoleküle ähneln häufig den Übergangszuständen von Substraten, oder sie sind Selbstmordsubstrate, die nach Umsetzung durch das Enzym irreversible, kovalente Bindungen mit Aminosäuren des aktiven Zentrums eingehen.

Trotz der enorm großen Zahl testbarer Enzymvarianten wird die Kapazität solcher Hochdurchsatzdurchmusterungssysteme niemals ausreichen, um den Sequenzraum von Enzymen komplett zu durchmusteren: Allein von einem kleinen, nur zehn Aminosäuren langen Oligopeptid gibt es  $20^{10}$  ( $1,024 \cdot 10^{13}$ ) mögliche Sequenzvarianten. Repräsentierte die Höhe des Mount Everest diesen Sequenzraum und würden eine Milliarde Varianten durchgemustert, stiege man nur 86 Zentimeter auf.

Deshalb sind Methoden zur Herstellung intelligent generierter Mutantenbibliotheken gefragt, welche die generierte funktionelle Vielfalt auf ein durchsuchbares Maß reduzieren. Für die Generierung solcher fokussierter und hochfunktionaler Mutantenbibliotheken ist das iterative Zusammenspiel bioinformatischer und molekularbiologischer Methoden unverzichtbar. Obwohl es noch großer Anstrengungen bedarf, sind mit den

zur Verfügung stehenden Methoden und Verfahren bereits viele Enzyme für Anwendungen in der Synthesechemie verbessert worden. Ein Beispiel ist die Modifizierung der Cytochrom-P450-Monooxygenase BM-3, um ihre Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln zu erhöhen. Diese fehlende Toleranz war der Grund für die geringe katalytische Aktivität der Monooxygenase. Nach proteinkristallographische Untersuchungen reduziert z.B. DMSO die Enzymaktivität indem ein DMSO-Molekül im aktiven Zentrum überraschenderweise über das S-Atom an das Eisenatom des Häm-Cofaktors koordiniert (Abbildung 4).<sup>13)</sup> Durch gelenkte Enzymevolution wurden Monooxygenasevarianten identifiziert, deren Resistenz gegenüber dem Ausgangsenzym in Lösungsmitteln wie DMSO, THF und Ethanol erhöht ist.<sup>14)</sup> Die beste Enzymvariante zeigt noch bei einer 2,1-molaren Ethanolkonzentration eine unverändert hohe Aktivität.

Das Zusammenspiel von rationalem Enzymdesign und gelenkter Evolution haben das Verständnis von Struktur-Funktions-Zusammenhängen in Enzymen in den letzten Jahren stark vorangebracht. Diese Fortschritte werden in der kommenden Dekade die Entwicklungszeiten maßgeschneiderter Enzyme für die Industrie stark verkürzen. Dadurch werden langfristig biologische und chemische Katalyse zusammenwachsen.

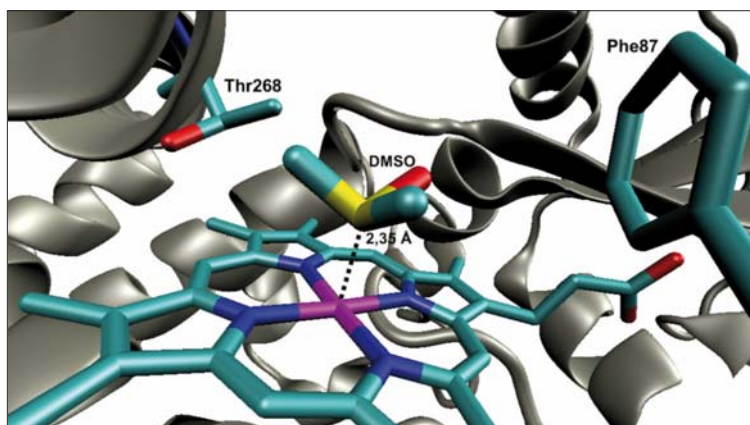


Abb. 4. Koordinierung von DMSO über das S-Atom an das Eisenatom des Häms, welches das aktive Zentrum der Cytochrom-P450-Monooxygenase BM3 bildet (PDB-Eintrag: 2J1M). DMSO koordiniert über das S-Atom aufgrund von Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten Thr268 und Phe87.

**Jan Marienhagen**, Jahrgang 1978, leitet seit dem Jahr 2008 den Bereich „Gelenkte Evolution“ in der Arbeitsgruppe von Ulrich Schwaneberg in Bremen und Aachen. Er promovierte Ende 2007 in Biologie bei Hermann



Sahm zur Struktur und Funktion von Transaminasen. Er forscht an der Entwicklung neuer Mutagenesemethoden zur Generierung von Diversität auf Genebene und der gelenkten Evolution von industriell relevanten Biokatalysatoren. j.marienhagen@jacobs-university.de

**Ulrich Schwaneberg**, Jahrgang 1969, ist seit Januar 2009 Institutsleiter und Inhaber des Lehrstuhls Biotechnologie an der RWTH Aachen. Er studierte Chemie



in Stuttgart und promovierte 1999 am Institut für Technische Biochemie. Nach einem zweijährigen Forschungsaufenthalt am Caltech, Pasadena, CA/USA) wurde er 2002 als Professor an die Jacobs University Bremen berufen. Sein Forschungsinteresse gilt dem Verständnis und Design von Biokatalysatoren und funktionalen Biomaterialien mit Methoden der gelenkten Evolution und des rationalen Designs. u.schwaneberg@biotec.rwth-aachen.de

#### Literatur

- 1) T. S. Wong, N. Wu, D. Roccatano, M. Zacharias, U. Schwaneberg, *J. Biomol. Screen.* 2005, 10, 246.
- 2) Q. S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, R. D. Schmid, *Chemistry* 2000, 6, 1531.
- 3) K. L. Tee, U. Schwaneberg, *Angew. Chem.* 2006, 118, 5507.
- 4) K. L. Tee, U. Schwaneberg, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2007, 10, 197.
- 5) T. S. Wong, D. Roccatano, U. Schwaneberg, *Biocatal. Biotrans.* 2007, 25, 229.
- 6) T. S. Wong, D. Roccatano, U. Schwaneberg, *Biotechnol. J.* 2007, 2, 133.
- 7) T. S. Wong, D. Roccatano, M. Zacharias, U. Schwaneberg, *J. Mol. Biol.* 2006, 355, 858.
- 8) T. S. Wong, K. L. Tee, B. Hauer, U. Schwaneberg, *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 26.
- 9) T. S. Wong, D. Roccatano, D. Loakes, K. L. Tee, A. Schenk, B. Hauer, U. Schwaneberg, *Biotechnol. J.* 2008, 3, 74.
- 10) A. Aharoni, G. Amitai, K. Bernath, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Chem. Biol.* 2005, 12, 1281.
- 11) E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B. T. Kelly, A. D. Griffiths, *Chem. Biol.* 2005, 12, 1291.
- 12) M. J. Droge, Y. L. Boersma, G. van Pouderoyen, T. E. Vrenken, C. J. Rugeberg, M. T. Reetz, B. W. Dijkstra, W. J. Quax, *ChemBioChem* 2006, 7, 149.
- 13) J. Kuper, T. S. Wong, D. Roccatano, M. Wilmanns, U. Schwaneberg, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5786.
- 14) T. S. Wong, F. H. Arnold, U. Schwaneberg, *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 85, 351.

