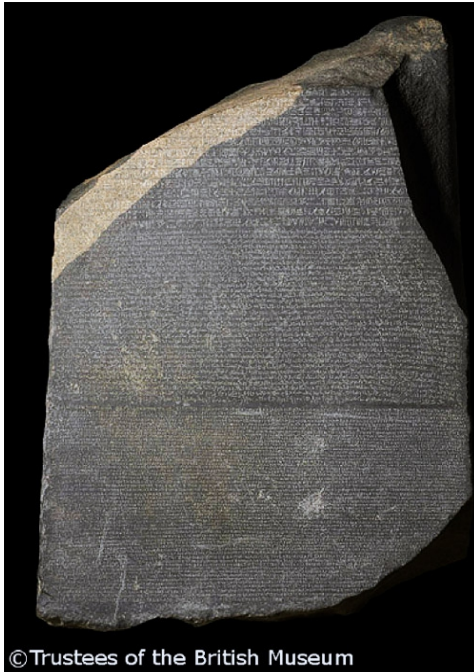


„Hieroglyphen in der Neuzeit – aktives Enzymdesign am Beispiel der Diels-Alder-Reaktion“

Anna Bruns



© Trustees of the British Museum

Abbildung 1: Stein von Rosetta

Das vielleicht wertvollste Objekt, das Napoleon Bonaparte von seiner Ägyptenexpedition im Jahre 1799 mitbrachte, war ein auf den ersten Blick unscheinbarer Stein (Abb. 1). Auf diesem aus dem zweiten vorchristlichen Jahrhundert stammenden *Stein von Rosetta* ist in drei Sprachen (Hieroglyphen, Demotisch und Altgriechisch) ein Gesetzestext eingemeißelt. Damit konnte erstmals die ägyptische Hieroglyphenschrift entschlüsselt werden.

Genauso rätselhaft wie bis dahin die Schriftzeichen der Altägypter war für Biochemiker bis vor wenigen Jahren der Faltungs- und Funktionscode von Proteinen. Wie kann die Abfolge der Aminosäurebausteine in einem Protein seine komplexe dreidimensionale Struktur festlegen? Kann man Proteine im Computer in 3D entwerfen und dann die Abfolge der Aminosäuren vorhersagen, die zu dieser gewünschten räumlichen Anordnung führen? Kann man Bakterien genetisch so programmieren, dass sie ein neu designtes Protein herstellen? Hat ein solches Protein dann die gewünschten vorgegebenen Eigenschaften? Diese zentralen Fragen der Theoretischen Biochemie und Synthetischen

Biologie lassen sich heute mit einem „Im Prinzip ja“ beantworten.

Maßgeblich zur Entschlüsselung des Proteinfaltungscodes beigetragen hat die Arbeitsgruppe um David Baker von der Universität von Washington. Ihr ist es gelungen, durch Kombination mathematischer Algorithmen, quantenmechanischer Theorien und experimenteller biochemischer Daten, erfolgreich aktives Proteindesign zu betreiben. So war es möglich, durch Anwendung des von David Baker erfundenen Rosetta-Algorithmus [1] maßgeschneiderte Biokatalysatoren zu entwerfen. Mit Hilfe von Bakterien wurden dann die Proteine hergestellt, um wichtige Syntheseschritte in der Organischen Chemie effektiver zu gestalten.

Am Beispiel der stereoselektiven Diels-Alder-Reaktion sollen hier nun kurz die einzelnen Etappen des *de novo* Designs von Enzymen beschrieben werden [2].

1. Etappe: Auswahl einer Modellreaktion für die Biokatalyse

Die 1950 mit einem Nobelpreis für Diels und Alder gekrönte Reaktion stellt einen Eckpfeiler in der organischen Synthese dar. Sie kommt zum Beispiel bei der Synthese von Naturstoffen (Aufbau des weiblichen Sexualhormons Östradiol) zum Einsatz. Dabei reagieren zwei konjugierte Doppelbindungen eines Diens mit einer Doppelbindung eines Alkens (Dienophil) zu Cyclohexanderivaten. Aufgrund der miteinander reagierenden π -Systeme und dem anschließenden Ringschluss wird diese Reaktion auch 4+2 Cycloaddition genannt. Die Diels-Alder-Reaktion vom Dien 4-Carboxybenzyl-trans-1,3-butadien-1-Carbamat und dem Dienophil N,N-

Dimethylacrylamid gilt dabei als sehr gut untersuchtes Modell und bildet die Grundlage der zu katalysierenden Reaktion im Falle des Enzymdesigns (Abb. 2A). Denn Ziel eines Enzymdesignprojektes ist es, maßgeschneiderte Biokatalysatoren zu entwerfen, die diese Reaktion beschleunigen.

2. Etappe: Wahl des aktiven Zentrums im Enzym

Als Nächstes wird der Frage nachgegangen, welche Aminosäuren benötigt werden und wie diese räumlich angeordnet sein müssen, um die Diels-Alder-Reaktion zu beschleunigen. Es ist bekannt, dass die Reaktivität der Diels-Alder-Reaktion bei einem elektronenarmen Alken mit einem elektronenreichen Dien erhöht ist. Für eine durch die Aminosäuren in einem Enzym katalysierte Diels-Alder-Reaktion wurden die Aminosäuren Glutamin mit Carbonylsauerstoff als elektronenliefernder Rest am Dien sowie Tyrosin mit seiner aromatischen Hydroxylgruppe als elektronenziehender Rest am Alken als katalytische Seitenketten ausgewählt (Abb. 2A). Über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, welche zum Herabsetzen des LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) am Dienophil bzw. zur Erhöhung des HOMO (*Highest Occupied MO*) am Dien führt, wird die Beschleunigung der Reaktion realisiert. Quantenmechanische Simulationen basierend auf der Dichtefunktionaltheorie ergaben, dass die funktionellen Gruppen der katalytischen Reste den Übergangszustand der Modellreaktion stabilisieren.

3. Etappe: Berechnung der Geometrie im Übergangszustand

Für eine theoretische Annäherung beim Design von Enzymen ist die optimale Geometrie der Substrate und des katalytischen Zentrums im Übergangszustand sehr wichtig. Um diese *in silico*, also im Computermodell, vorhersagen zu können, wurde für die Substrate ein diskretes Ensemble von Konformationen generiert. Durch Einsatz interner *clash filter* wurden dann die möglichen Geometrien im Übergangszustand reduziert, sodass für das Dien 15 mögliche Strukturen verblieben. Mittels quantenmechanischer Berechnungen wurden dann geometrische Positionen für Aminosäurereste des aktiven Zentrums vorausgesagt, sogenannte Theozyme [3], die einen speziellen Übergangszustand stabilisieren können (Abb. 2B). Dabei kommt man sehr rasch zu astronomisch großen Anordnungsmöglichkeiten katalytischer Aminosäurereste. So ergab die Berücksichtigung von 15 Übergangszuständen des Substrats 10^{19} mögliche Konformationen für das aktive Zentrum (Abb. 2C).

4. Etappe: RosettaMatch

Nachdem nun ein Modell für den Übergangszustand geschaffen war und feststand, in welcher räumlichen Anordnung die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren positioniert werden sollen, ist der nächste Schritt, Proteinstrukturen zu finden, die als Gerüste für die Platzierung der katalytischen Reste in Frage kommen. Mit RosettaMatch [4] werden mehr als 200 verschiedene Strukturgerüste automatisch untersucht und dabei solche identifiziert, die für eine optimale Positionierung der katalytischen Reste für die Diels-Alder-Reaktion geeignet sein können (Abb. 2D). Von RosettaMatch wurde unter anderem ein Protein mit sechsblättriger B-Propellerstruktur als Gerüst für eine Funktionalisierung vorgeschlagen (Abb. 2E).

5. Etappe: RosettaDesign

Nach Identifizierung von Proteingerüsten, in die das neu designte katalytische Zentrum eingepasst werden soll, findet mit RosettaDesign deren optimale Einbettung in die ausgewählte Struktur statt. In der Regel ist es notwendig, zur

Platzierung der katalytischen Reste im Zielprotein eine Reihe weiterer Aminosäuren in deren unmittelbarer oder mittelbarer Nachbarschaft gegen andere auszutauschen, um eine bessere Passung und eine höhere Stabilität des Proteins zu ermöglichen. Nach geometrischen und energetischen Betrachtungen und anschließender Optimierung wurden von RosettaDesign insgesamt 84 Proteinsequenzen vorgeschlagen, die eine Diels-Alder-Reaktion katalysieren könnten.

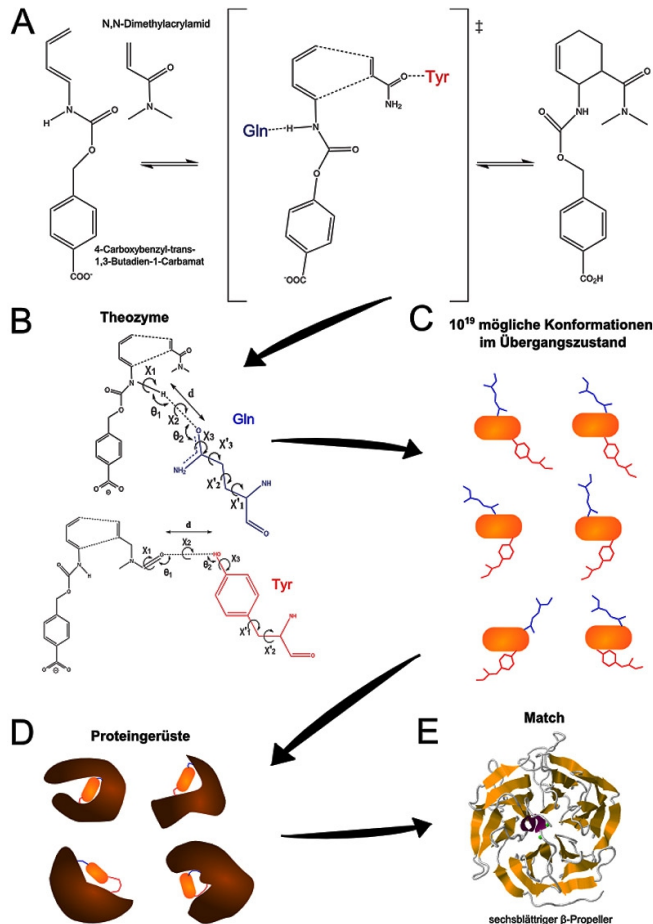


Abbildung 2: Etappen des Rosetta-Enzymdesigns. **A:** Diels-Alder Reaktion als Modellreaktion für den Entwurf von reaktionsbeschleunigenden Biokatalysatoren. 4-Carboxybenzyl-trans-1,3-Butadien-1-Carbamat ist das Dien, N,N-Dimethylacrylamid das Dienophil und Glutamin und Tyrosin sind die katalytischen Reste. **B+C:** Theozyme (theoretische Enzyme) werden über quantenmechanische Berechnungen der Orientierung (Diederwinkel: χ , θ) des aktiven Zentrums entworfen. **D:** Diese werden in eine Bibliothek von Proteingerüsten eingepasst und optimale Gerüste werden identifiziert. **E:** Sechsbliättriger β -Propeller als ein Proteingerüst zur Etablierung einer Diels-Alderase-Aktivität. Modifiziert nach Nanda [5] und Siegel et al. [2].

6. Etappe: Experimentelle Validierung


Vor der eigentlichen experimentellen Validierung wurde die zur Auswahl stehende Anzahl der Enzymdesigns weiter reduziert. Die von Rosetta entworfenen Designs wurden kritisch inspiziert und unter Berücksichtigung weiterer Randbedingungen, wie zum Beispiel erwartete Löslichkeit der Protein Kandidaten, verworfen. Von den besten Kandidaten wurde dann die Aminosäuresequenz in DNA-Sequenz rückübersetzt und ein synthetisches Gen hergestellt, welches für das im Computer entworfene Protein kodiert. Dieses wird in Bakterien eingeschleust, die dann den potenziellen Biokatalysator produzierten. Das Protein wurde isoliert und auf seine reaktionsbeschleunigende Wirkung getestet.

Wenn man einen interessanten neuen Biokatalysator identifiziert hat, will man natürlich auch wissen, ob die dreidimensionale Anordnung der Aminosäurereste der vorhergesagten Anordnung des *in silico* Designs entspricht. Beides war für die beste Designvariante der Fall. Diese zeigte gegenüber der unkatalysierten Reaktion eine Reaktionsbeschleunigung um das Vierfache (25 °C, pH=7,4) und wies dabei eine Struktur auf, die mit einer mittleren quadratischen Abweichung von 0,5 Å (1 Å = 1×10^{-10} m \cong ungefähre Größe eines Atoms) der vorhergesagten Struktur recht nahe kommt [2].

Natürliche Biokatalysatoren beschleunigen Reaktionen häufig um das Vieltausendfache, wie zum Beispiel Nukleasen, die die Hydrolyse von

RNA um den Faktor 10^{17} (25 °C, pH=7) beschleunigen [6]. Das *in silico* generierte Enzym war weit weniger aktiv. Es wird daher noch ein langer Weg in der Optimierung des *de novo* Designs zu gehen sein, bis dieses allgemein einsetzbar ist. Doch im Gegensatz zu dem Stein von Rosetta, bei dem zwei Drittel des Hieroglyphen-Textes für immer verloren sind, hat man beim Rosetta-Algorithmus immer noch die Möglichkeit, diesen schrittweise zu verbessern.

Zum Schluss noch ein Hinweis an alle „*in silico*“-Freunde. Wer Spaß an Videospiele und der Biochemie von Proteinen hat, findet in „Foldit“ (<http://fold.it/portal/>) eine neue Herausforderung. Ziel des Online-Spiels ist es, ein „gut gefaltetes“ Protein zu erhalten. Dabei stehen aber nicht nur die Gesetze der Biochemie im Vordergrund, sondern auch die der eigenen Kreativität.

Kontakt:	Schlauer Fuchs
 <p>Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. Woche 2). Die Autorin, Anna Bruns, ist Studierende des Fachs Biomolecular Engineering (Master) an der TU Darmstadt (E-Mail: anna.bruns@stud.tu-darmstadt.de).</p> <p>Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Harald Kolmar (E-Mail: kolmar@biochemie-tud.de).</p>	<p>Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:</p> <p>Wer erfand den Rosetta-Algorithmus?</p>
Literatur:	
<p>[1] Rohl, C. A., Strauss, C. E. M., Misura, K. M. S. & Baker, D. Protein structure prediction using Rosetta. <i>Methods Enzymol</i> 383, 66-93 (2004).</p>	
<p>[2] Siegel, J. B. et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. <i>Science</i> 329, 309-313 (2010).</p>	
<p>[3] Zhang, X. et al. Quantum Mechanical Design of Enzyme Active Sites. <i>J Org Chem</i> (2008).</p>	
<p>[4] Zanghellini, A. et al. New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design. <i>Protein Sci</i> 15, 2785-2794 (2006).</p>	
<p>[5] Nanda, V. Do-it-yourself enzymes. <i>Nat Chem Biol</i> 4, 273-275 (2008).</p>	
<p>[6] Dupureur, C. M. One is enough: insights into the two-metal ion nuclease mechanism from global analysis and computational studies. <i>Metallomics</i> 2, 609-620 (2010).</p>	