

Enzymvarianten – am virtuellen Reißbrett entworfen

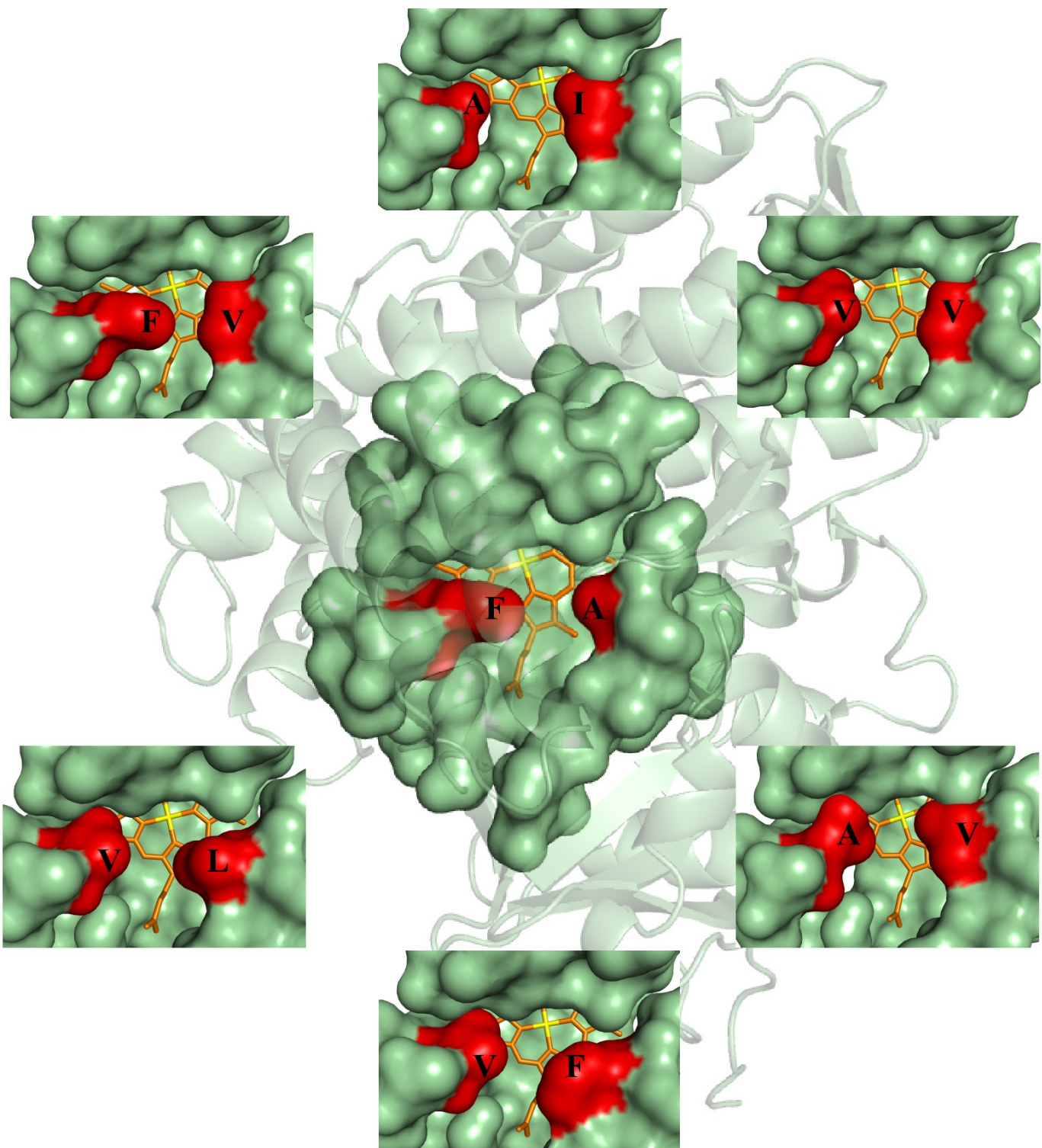
Manchmal reicht eine Mutation, um ein Enzym dazu zu bringen, ein Substrat umzusetzen, das es bisher verschmäht hat. Es ist eine hohe Kunst, die richtige Aminosäureposition für die Mutation im Enzym zu finden und in bestmöglicher Weise zu verändern. Dann ist es sogar möglich, dem Enzym beizubringen, nur eine bestimmte Substratvariante umzusetzen oder nur eine bestimmte Produkt-Variante zu erzeugen. Die weiße Biotechnologie profitiert von dieser Selektivität.

Enzyme spielen eine wirtschaftlich bedeutende Rolle in der weißen Biotechnologie. Sie werden als Katalysatoren eingesetzt, um schnell und bei niedrigen Temperaturen Ausgangsstoffe für die Produktion von Feinchemikalien, Zusatzstoffen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, Medikamenten und viele andere Substanzen herzustellen. Je selektiver ein Substrat umgesetzt wird, umso effektiver ist die Produktion. Besonders praktisch und kostensparend ist es, wenn das Substrat nicht hochrein vorliegen muss, sondern vom Enzym auch aus Mischungen gut herausgefischt wird. Produktseitig sind Moleküle gefragt, die nicht nur möglichst rein, sondern häufig auch in einer bestimmten sterischen Form vorliegen sollen.

Um ein Enzym zu finden oder zu designen, das ein gewünschtes Substrat regio- oder stereoselektiv umsetzt, bedarf es viel Erfahrung und Spezialwissen. Beides bringen die Mitarbeiter des Instituts für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart mit. Sie modellieren Enzymmoleküle gezielt für bestimmte Anwendungen ihrer Industrie- und Forschungspartner, aber auch im Rahmen der Grundlagenforschung. Damit erweitern sie ihr Methoden-Repertoire für das Moleküldesign und ihr Wissen darüber, wie die Biochemie von Enzymreaktionen en detail funktioniert. Die Gruppe um Prof. Dr. Jürgen Pleiss und Dr. Alexander Seifert konzentriert sich dabei auf die Enzymgruppen der Lipasen und der Monooxygenasen.

Enzymselektivitäten sind die Spezialität der ITB-Forscher

„Wir führen zum Beispiel regioselektive Enzymreaktionen durch, um Riechstoffe als Lebensmittelzusätze oder als Inhaltsstoffe für die kosmetische Industrie zu erhalten oder Bausteine, die zu pharmazeutischen Substanzen weitersynthetisiert werden“, erklärt Pleiss. Regioselektive Reaktionen durchzuführen heißt, die Reaktion nur an einer von mehreren ähnlichen Molekülregionen ablaufen zu lassen, die theoretisch für diese Reaktion infrage kämen. „Durch eine hohe Selektivität bei der Synthese lassen sich Kosten bei der späteren Aufreinigung der Produkte einsparen“, sagt Pleiss. Immer effizientere enzymkatalysierte Reaktionen sind der Schlüssel zu finanziell konkurrenzfähigen Syntheseverfahren, und dies kann durch Enzymdesign erreicht werden.



Änderung des Zugangs zum katalytisch aktiven Häm (gelb) in einer bakteriellen Monooxygenase durch Mutation von zwei "Hotspots" (rot). Die Form der Bindungsstelle in sechs hochselektiven Mutanten unterscheidet sich von der Bindungsstelle des natürlich vorkommenden Enzyms (Mitte). Abb.: Seifert A, Vomund S, Grohmann K, Kriening S, Urlacher VB, Laschat S, Pleiss J: Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *ChemBioChem*. 2009. 10: 853-861. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Abgebildet mit Genehmigung.

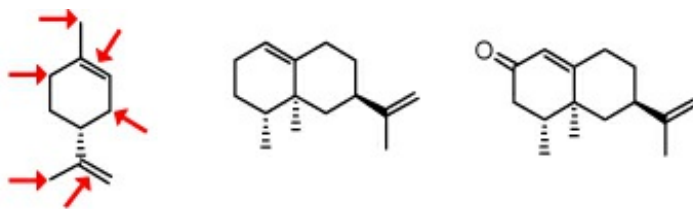
© Wiley-VCH Verlag

Wie viele Enzymvarianten schon die Natur bietet, macht Pleiss am Beispiel der Cytochrom-P450-Monooxygenasen deutlich, die in allen Lebewesen vorkommen und zum Beispiel in der Leber an Abbaureaktionen mitwirken: „Wir haben rund 10.000 verschiedene Aminosäure-Sequenzen dieser Enzymfamilie in unserer Datenbank und kennen inzwischen von rund 40 Proteinen die Röntgenstruktur.“ Das ITB-Team baut Monooxygenasen zunächst virtuell am Computer auf und

lässt sie später auch real im Labor von Bakterien produzieren, damit das Enzym dort bestimmte Substrate zu den gewünschten Produkten umsetzt. „Die Monooxygenasen verwenden molekularen Sauerstoff für die oxidative Gewinnung von Produkten. Wenn wir eine Monooxygenase-Variante generieren, achten wir darauf, dass die grundsätzliche Funktion und die Struktur des Enzyms erhalten bleiben. Es gibt jedoch Abweichungen im Detail, zum Beispiel an den Substrat-Bindungstaschen des Enzyms“, sagt Pleiss.

Die Tücke steckt im Detail

Diese winzigen Veränderungen sind es, die eine bestimmte Selektivität verschlechtern, verbessern oder überhaupt erst möglich machen. Die gleiche Reaktion an jeweils benachbarten C-Atomen kann zu unterschiedlichen Produkten führen. Beispiel (R)-Limonen: Dieser Aromastoff kann durch Extraktion etwa aus Orangen günstig gewonnen werden. Die selektive Oxidation von (R)-Limonen führt zu wertvollen Produkten. Die herkömmliche chemische Oxidation dieses Terpens resultiert allerdings in einem Gemisch verschiedener Produkte. „Um ein reines Produkt zu erhalten, sind Aufarbeitungsschritte nötig, die den Kostenfaktor natürlich in die Höhe treiben. Außerdem entsteht ein Materialverlust und es ist eine Entsorgung von Nebenprodukten nötig. Häufig ist daher der Preis des Produkts ein Vielfaches höher als der des Ausgangssubstrats“, so Pleiss.



Aromastoffe (von links nach rechts): (R)-(+)-Limonen, (+)-Valencen und (+)-Nootkaton. Die Pfeile kennzeichnen mögliche Oxidationsstellen und damit Angriffsstellen für die enzymatische Katalyse.

© ITB Uni Stuttgart

Für die enzymatische Produktion kann das ITB-Team in vielen Fällen eine effiziente regio- oder stereoselektive Enzym-Variante entwickeln. Mitunter ist es auch das Label "Bioproduktion", was zählt: So kann aus Valencen mit Metallkatalysatoren der Aromastoff Nootkaton hergestellt werden, der eine Grapefruit-Note in Lebensmitteln beisteuert. „In der Lebensmittelbranche möchte man jedoch keine Schwermetalle als Katalysatoren einsetzen, hier ist die Biokatalyse eine gute Alternative“, sagt Pleiss.

Von der Natur lernen

Selbst wenn die „richtige“ Aminosäure für eine potenziell selektivitätsoptimierende Mutation gefunden wurde, heißt das noch nicht, dass diese sich auch in der Praxis bewährt, wie Dr. Alexander Seifert erklärt: „Ein wichtiger Punkt ist die Variabilität der Aminosäure. Hoch konservierte Aminosäuren, die für die Gesamtstruktur des Enzymmoleküls entscheidend sind, wollen wir nicht verändern. Ansonsten ist es unser Ziel, möglichst wenige für den Austausch relevante Aminosäuren zu finden.“ Pleiss ergänzt: „Wir agieren sozusagen minimalinvasiv.“ Dabei nimmt sich das Team auch die Natur zum Vorbild. „Bestimmte Austausche findet man auch in der Natur. Das ist für uns oft ein Signal, dass wir es damit versuchen können“, sagt Seifert.

Weltweit und auch in Deutschland gibt es noch weitere Arbeitsgruppen, die sich designmäßig mit

den gleichen Enzymgruppen befassen. Die ITB-Gruppe hat nach eigenem Bekunden den Vorteil, dass ihr systematischer Ansatz noch nicht so weit verbreitet ist. „Wir modellieren nicht nur, sondern zeigen auch direkt im Labor, das es funktioniert. Dazu stellen wir das Enzym direkt in unserem Institut im Milligrammmaßstab her“, so Pleiss. Außerdem wird bei vielen Ansätzen ergebnisoffen geforscht. Dabei wird nicht ein ideales Enzym für eine bestimmte Produktion gesucht, sondern es werden vielversprechende Enzym-Mutationen durchgeführt. Anschließend wird analysiert, welche Substrate davon zu welchen Produkten umgesetzt werden. Sind interessante Ergebnisse dabei, kann systematisch an weiteren Optimierungen des Enzymdesigns gearbeitet werden.

Fachbeitrag

09.08.2010

leh

BioRegio STERN

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

Universität Stuttgart

Institut für Technische Biochemie (ITB)

Prof. Dr. Jürgen Pleiss

Dr. Alexander Seifert

Allmandring 31

70569 Stuttgart

Tel.: 0711 685-63191

E-Mail: juergen.pleiss@itb.uni-stuttgart.de

alexander.seifert@itb.uni-stuttgart.de

Der Fachbeitrag ist Teil folgender Dossiers



Moleküldesign nach Maß und Bedarf