Enzyme Engineering

Loops und Tunnel: unterschätzte Elemente in Enzymen

PETER M. HEINEMANN, LEA R. RAPP, BERNHARD HAUER
ABTEILUNG FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND TECHNISCHE BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT STUTTGART

In enzymes, the active site is the location where substrates are chemically converted. If this site is deeply buried within the protein, substrates must pass not only through the body of the protein via a tunnel, but also flexible, site-decorating loops to access the active site. These elements can act as filters that influence on both substrate specificity and activity. Identifying and understanding how they exert such control has been of growing interest over the past several years.

DOI: 10.1007/s12268-020-1394-2
© Die Autoren 2020

In der Natur dienen Enzyme als Katalysatoren für alle biochemischen Reaktionen. Besonders hervorzuheben sind dabei deren exzellente Selektivität und Spezifität sowie die Möglichkeit, diese Merkmale durch *Enzyme Engineering* gezielt anzupassen und zu verbessern. Zudem kann dadurch das Spektrum auf nicht-natürliche Substrate und Reaktionen ausgeweitet werden.

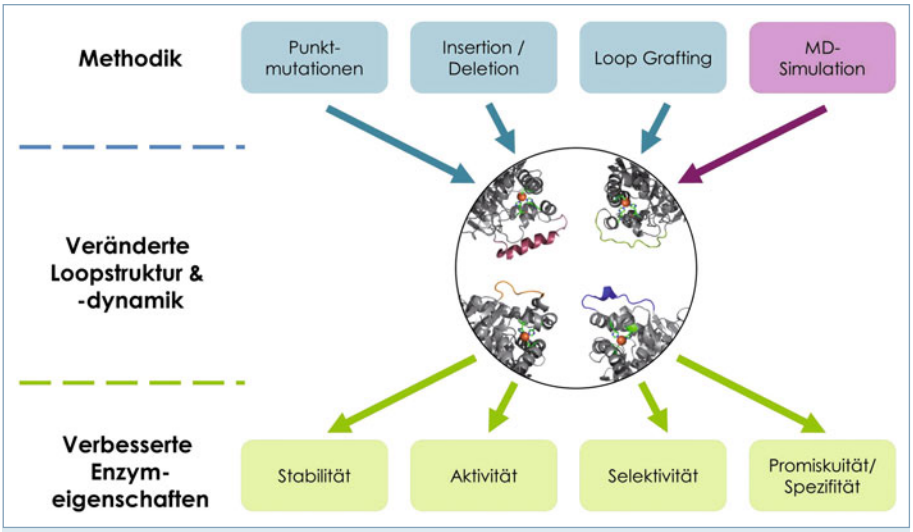
Strukturelemente und Kavitäten – ein neues Feld für das *Enzyme Engineering*

Die allermeisten Proteine sind aus Kombinationen von regelmäßigen Sekundärstrukturelementen – α-Helices und β-Faltblättern – aufgebaut, die durch Loop-Regionen variabler Länge und irregulärer Form verbunden sind. Katalytisch aktive Zentren sind Regionen auf der Oberfläche oder im Inneren des Enzyms, die von der Natur im Laufe der Evolution speziell modelliert wurden und die entweder eine Reaktion katalysieren oder für die Substratbindung verantwortlich sind. Im letztgenannten Fall ist ein weiteres Element wichtig, und zwar Tunnel. Diese Kavitäten werden durch andere Strukturelemente (Helices, Faltblätter und Loops) flankiert und bilden Zugänge von dem aktiven Zentrum zur Enzymoberfläche.

Um Enzyme für (nicht-)natürliche Reaktionen anzupassen und zu verbessern, werden standardmäßig verschiedene Methoden des *Enzyme Engineering* eingesetzt. Während bei rationalen Ansätzen weitgehend das aktive Zentrum adressiert wird, ist z. B. durch zufällige/ungerichtete Mutagenese bekannt, dass auch weit entfernte Positionen einen direkten Einfluss auf die Katalyse besitzen können. Diese Positionen sind oft an der Bildung von dynamischen Strukturelementen wie Tunnel und Loops beteiligt.

Loops – nur flexible Verbindungsstücke?

Die Flexibilität von Loops und die Dynamik des Enzyms ist bei der Bindung des Substrats, bei Transportvorgängen oder der Bildung verschiedener Enzymkonformationen essenziell. Das legt zwar nahe, dass durch Loop-Variationen die Eigenschaften des gesamten Enzyms als Biokatalysator optimiert werden können, allerdings ist gerade diese Flexibilität eine Herausforderung für ein *Enzyme Engineering*. Aufgrund dieser Dynamik ist die Vorhersage vom Einfluss einzelner Aminosäuren auf die katalytischen Eigenschaften des gesamten Enzyms bisher nur schwer möglich. Eingebrachte Mutationen können zu erhöhter Aktivität, Stabilität und auch zu neuen Selektivitäten führen [1]. Dies hängt oftmals mit einer Änderung der Flexibilität zusammen. Rigidere Oberflächenloops können beispielsweise zu erhöhter Thermostabilität führen, während ein flexiblerer Loop in der aktiven Tasche die Orientierung des Substrats entscheidend beeinflussen kann [1]. Zwar lassen sich Loops meist in Kristallstrukturen darstellen, allerdings bilden diese lediglich eine Momentaufnahme



▲ **Abb. 1:** Durch verschiedene Methoden können Loops in ihrer Dynamik und ihren Eigenschaften so verändert werden, dass das gesamte Enzym bezüglich seiner Funktion als Biokatalysator optimiert wird. MD: Molekulardynamik.

der gesamten Dynamik des Enzyms ab und genauere Ableitungen sind nur schwer möglich.

Die natürliche Evolution von Loop-Regionen beinhaltet meist Insertionen und Deletionen. Dieser Ansatz für das Proteindesign birgt zwar das Risiko, dass es durch einen *Frameshift* zur fehlerhaften Ablesung der DNA und dadurch zu einem inaktiven Enzym kommt. Allerdings lassen sich durch entsprechende Methoden, wie die Verwendung von Transposons, diese Verschiebungen des Leserasters verhindern und Enzymvarianten mit verbesserten katalytischen Eigenschaften generieren [2].

Während der Austausch, die Insertion oder Deletion einzelner Aminosäuren die Morphologie des Loops beeinflussen kann, werden beim *loop grafting* komplette Loop-Regionen zwischen ähnlichen Mitgliedern der selben Enzymfamilie ausgetauscht (**Abb. 1**, [3]). So können durch den Übertrag eines Loops in das Proteingerüst eines anderen Enzyms dessen Eigenschaften weitergegeben werden. Das kann beispielsweise zur Bildung neuer Produkte führen, welche mit dem Wildtyp des ursprünglichen Enzyms nicht zugänglich waren.

Werden Loops variiert, so lässt sich auf Basis der eingeführten Mutationen grob der Einfluss auf die Flexibilität abschätzen. Soll jedoch die Änderung der Dynamik genauer untersucht und visualisiert werden, so sind Simulationen in der Regel unumgänglich. Moderne Molekulardynamik(MD)-Simulationen können die Bewegungen von Enzymen darstellen und veränderte Eigenschaften aufgrund von abweichender Loop-Dynamik erklären [4, 5]. Solche Berechnungen sind noch sehr zeit- und rechenleistungsintensiv, weshalb sie bisher meist zur Analyse von verbesserten/optimierten Enzymvarianten herangezogen werden. Allerdings können solche Simulationen durch sich stetig verbessernde Methoden mittlerweile auch zur Vorhersage des Einflusses neuer Mutationen verwendet werden und Loop-Varianten in silico generiert und überprüft werden, noch bevor sie im Labor getestet werden [6].

Molekulare Tunnel – nur hohle Räume?

Neben Loops besitzen auch Tunnel eine große Bedeutung in Enzymen und damit verbunden im Proteindesign. Mehr als 64 Prozent aller Enzyme besitzen lange Tunnel (≥ 15 Å), die die Bindung des Liganden und damit auch die katalytischen Eigenschaften beeinflussen. [7]. Viele Enzyme schirmen das aktive Zentrum ab, indem es tief im Enzyminneren verborgen wird. Ein wichtiger Grund für den Schutz des aktiven Zentrums können unter anderem katalytisch aktive Metallionen sein, die im hydrophoben Kern des Enzyms von umgebenden Wassermolekülen abgeschirmt werden müssen. Zusätzlich kann der Ligand innerhalb der Tunnel optimal orientiert und stabilisiert werden sowie der Eintritt, wie ein Filter, für ausgewählte Moleküle ermöglicht werden. Diese können spezifisch für Substrate, Produkte und Kofaktoren, aber auch Gase, Wassermoleküle und Lösemittel sein und deren Migration zum bzw. vom aktiven Zentrum hin oder weg erlauben.

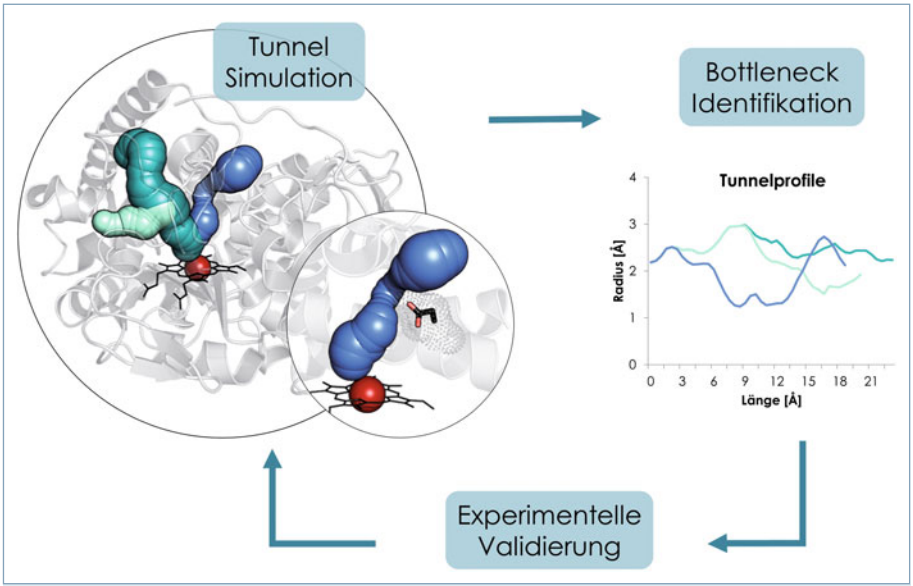
Für die Detektion der Tunnel ist eine Struktur des Enzyms notwendig, die mittels ausgewählter Programme detektiert und ggf. visualisiert und untersucht werden kann. Einige Tunnel sind durch alleinige visuelle Inspektion der Proteinoberfläche nicht zu erkennen. Mithilfe von MD-Simulationen kann z. B. beobachtet werden, dass Tunnel oft durch Liganden induziert geöffnet sowie geschlossen werden können [5]. Meist ist dabei die Dynamik von Oberflächenloops sowie auch von Loops nahe dem aktiven Zentrum ausschlaggebend, was die Voraussage hinsichtlich eines rationalen *Engineering* meist schwierig gestaltet. Daher ist es empfehlenswert, nicht nur die starre Kristallstruktur, sondern auch die Dynamik des Enzyms zu untersuchen [8].

Während der Einfluss von Loops in den letzten Jahren hauptsächlich experimentell (gezielt sowie zufällig) erfasst wurde, lag der Fokus der meisten aktuellen Arbeiten über Enzymtunnel auf Simulationen der Strukturen hinsichtlich potenzieller *hot spot*-Aminosäuren für die Verbesserung der Aktivität, Selektivität und Spezifität sowie eines neuartigen *drug designs*. Der experimentelle Teil war meist auf wenige Substitutionen an identifizierten Aminosäuren, wie *bottleneck*-Positionen, die die engste Stelle des Tunnels bilden, begrenzt.

Mittlerweile gibt es diverse bioinformatische Tools, die einfach und schnell in der Anwendung sind und somit von jedem Computer aus genutzt werden können. Ein Beispiel für die Untersuchung von Tunnel ist das Software-Tool CAVER, das die Analyse von Tunnel und Kanälen sowie des Transports eines Liganden innerhalb kürzester Zeit ermöglicht. Es kann für neue Ansätze im *Enzyme Engineering* genutzt werden, um Enzyme zu verbessern (**Abb 2**, [9]).

Perspektiven

Obwohl Loops und Tunnel einen deutlichen Einfluss auf wichtige Eigenschaften des Enzyms besitzen, wurden sie bisher nur selten für das *Enzyme Engineering* herangezogen. Zufällig eingeführte Mutationen können die Dynamik der flexiblen Loops oder Tunnel zum aktiven Zentrum verändern.



▲ **Abb. 2:** Workflow zum Engineering von Enzymen. Tunnel werden detektiert und visualisiert (Darstellung mit PyMOL). Im nächsten Schritt können bottlenecks, also die Engpässe der Tunnel, anhand der Tunnelprofile z. B. mit CaverWeb identifiziert werden. Gewünschte Aminosäurereste an entsprechenden Positionen können mutiert sowie experimentell validiert und anschließend die Veränderungen am Tunnel simuliert werden.

Mittels semirationaler Mutagenesemethoden lassen sich gezielt Mutationen in diese Bereiche einführen und die vormals kaum gezielt adressierten Strukturelemente durch Kombination aus experimentellen Daten und computergestützten Simulationen für ein *Enzyme Engineering* heranziehen.

Danksagung

Wir danken dem BMBF (PowerCART 031B0369A) für die finanzielle Unterstützung.

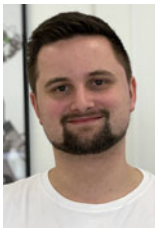
Literatur

[1] Nestl BM, Hauer B (2014) Engineering of flexible loops in enzymes. ACS Catal 4:3201–3211
[2] Emond S, Petek M, Kay E et al. (2019) Access to unexplored regions of sequence space in directed enzyme evolution via insertion/deletion mutagenesis. bioRxiv, doi: 10.1101/790014
[3] Park HS, Nam SH, Lee JK et al. (2006) A loop engineering strategy improves laccase lcc2 activity in ionic liquid and aqueous solution. Science 311:535–538
[4] Dodani SC, Kiss G, Arnold FH et al. (2016) Discovery of a regioselectivity switch in nitrating P450s guided by molecular dynamics simulations and Markov models. Nat Chem 8:419–425
[5] Kreß N, Halder JM, Rapp LR et al. (2018) Unlocked potential of dynamic elements in protein structures: channels and loops. Curr Opin Chem Biol 47:109–116
[6] Liu B, Ou G, Li JK et al. (2019) Conformational dynamics-guided loop engineering of an alcohol dehydrogenase: capture, turnover and enantioselective transformation of difficult-to-reduce ketones. Adv Synth Catal 361:3182–3190
[7] Pravda L, Berka K, Svobodová Vařeková R et al. (2014) Anatomy of enzyme channels. BMC Bioinformatics 15:379
[8] Kingsley LJ, Lill MA (2014) Including ligand-induced protein flexibility into protein tunnel prediction. J Comput Chem 35:1748–1756
[9] Stourac J, Vavra O, Kokkonen P et al. (2019) Caver Web 1.0: identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. Nucleic Acids Res 47:W414–W422

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de.

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Bernhard Hauer
Institut für Biochemie und Technische Biochemie
Abteilung Technische Biochemie
Universität Stuttgart
Allmandring 31
D-70569 Stuttgart
Tel.: 0711-685-63193
bernhard.hauer@itb.uni-stuttgart.de
www.ibtb.uni-stuttgart.de/tb



Peter M. Heinemann, Lea R. Rapp und Bernhard Hauer (von oben nach unten).