

Charakterisierung und Strukturanalyse einer optimierten Halogenase (vertraulich)



Diplomand	Nils Furrutter
Korrektor/-in ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Lukas Neutsch

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.

Enzyme, die Katalysatoren der Natur, ermöglichen es, chemische Reaktionen regio- und enantiospezifisch sowie nachhaltig durchzuführen und bieten so eine attraktive Alternative zu klassischen chemischen Methoden. Die in dieser Arbeit untersuchte Enzymfamilie der Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen katalysiert die Aktivierung von C-H-Bindungen und ist so in der Lage, kleine Moleküle zu halogenieren. Halogenierungen spielen vor allem in der pharmazeutischen Industrie und in der Agrochemie eine bedeutende Rolle.

In einer vorhergehenden Forschungsarbeit wurde die Halogenase WelO5* mittels gezielter Mutagenese auf erhöhte Aktivität und Spezifität gegenüber einem nicht natürlichen Substrat optimiert. Dabei wurden Varianten entwickelt, die das gewählte Substrat an unterschiedlichen Positionen enantiospezifisch halogenieren können.

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, eine Strukturanalyse des Wildtyps-Enzyms WelO5* sowie von evolvierten Varianten durchzuführen und auf diese Weise strukturelle Merkmale, die für die erhöhte Aktivität und Selektivität verantwortlich sind, zu untersuchen. Das native WelO5* sowie eine evolvierte Variante wurden im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) exprimiert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschliessend erfolgreich durch die «hanging drop vapour diffusion»-Methode kristallisiert. Während der Laufzeit dieser Bachelorarbeit konnte die Struktur des nativen Enzyms gelöst werden. Es zeigte sich, dass sich WelO5* von seinem literaturbekannten Homolog WelO5 (PDB ID: 5IQS) in der Anordnung einer α -Helix unterscheidet (Abb. 1). Diese alternative Anordnung ist wahrscheinlich die Basis der unterschiedlichen Substratazeptanz: Während WelO5* das nicht-native Substrat akzeptiert, konnte beim Enzym WelO5 keine Aktivität beobachtet werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass das nicht-native Substrat sehr genau in die aktive Tasche des Enzyms dockt (Abb. 2).

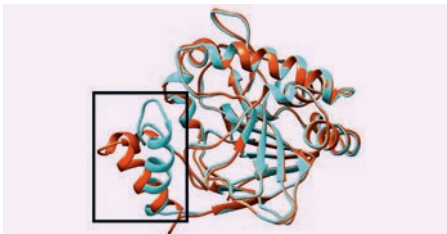


Abb. 1: Strukturvergleich zwischen WelO5 (orange) und WelO5* (Cyan).

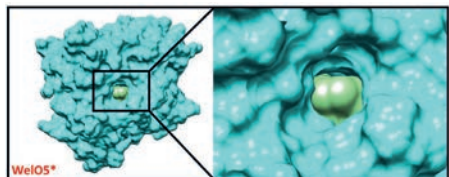


Abb. 2: Darstellung der Proteinoberfläche von WelO5* (Cyan) mit dem gedockten nicht-nativen Substrat (grün).