

# Optimierung einer Halogenase mittels gerichteter Evolution (vertraulich)



Diplomand	Samuel Schneider
Korrektorin ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller
Korrektorin extern	Dr. Kirsten Schroer, Novartis

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde zusammen mit der Firma Novartis durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Viele der heutzutage verfügbaren Medikamente und Agrochemikalien enthalten Halogenatome in ihrer Struktur. Diese Heteroatome haben einen starken Einfluss auf die Bindungsfähigkeit und können die Verstoffwechslung der Substanzen beeinflussen. Chemische Halogenierungen sind jedoch sterisch schwierig zu kontrollieren, benötigen oft harsche Reaktionsbedingungen und können giftige Abfälle produzieren. Biokatalysatoren ermöglichen es, die Halogenierungen regio- und enantiospezifisch sowie nachhaltiger durchzuführen und bieten so eine attraktive Alternative zu den klassischen chemischen Methoden. Darüber hinaus können Enzymeigenschaften durch gerichtete Evolution verbessert werden, so können etwa die katalytische Aktivität und die Regio- oder Stereoselektivität von Enzymen für industrielle Bedürfnisse optimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Halogenase untersucht und optimiert. Dieses Enzym ist in der Lage, kleine Moleküle zu halogenieren und ist somit von grossem synthetischem Interesse. Ziel dieser Arbeit war es, bei der gerichteten Evolution zur Verbesserung der katalytischen Aktivität der Halogenase mitzuwirken, indem bereits identifizierte, vorteilhafte Mutationen durch die Technik des DNA-Shufflings kombiniert wer-

den sollten. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine kombinatorische Enzym-Bibliothek entwickelt, in der das Halogenase-Gen mittels PCR aus mehreren Fragmenten zusammengesetzt wurde, welche entweder Wildtyp oder mutierte Codons enthielten. Die resultierende Enzym-Bibliothek wurde dann auf ihre katalytische Aktivität hin überprüft und es konnte eine Enzymvariante identifiziert werden, die eine zweifach höhere Chlorierungsaktivität als die vorhergehend beste Variante besass.

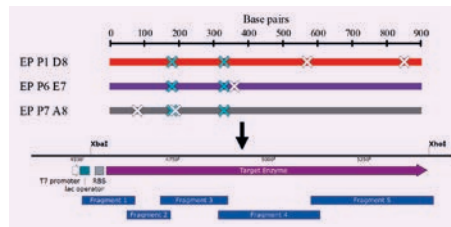


Abb. 1: Entwicklung einer kombinatorischen Enzym-Bibliothek durch die PCR-basierte Konstruktion des Halogenase-Gens aus mehreren designten DNA-Fragmenten.

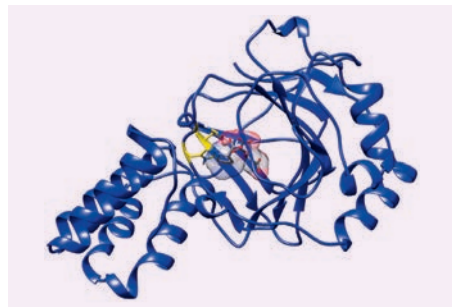


Abb. 2: Homologie-Modell des entwickelten Enzyms. Das Metallbindungsnetzwerk der aktiven Tasche ist gelb eingefärbt.