

# Nutzung von $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen zur Funktionalisierung von Peptiden



Diplomand	Jan Taubitz
Korrektorinnen ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Christin Peters

Die Modifikation von Biomolekülen durch konventionelle organisch-chemische Methoden gestaltet sich oft schwierig, da die erforderlichen Reaktionsbedingungen für Proteine oder Peptide häufig nicht geeignet sind [1]. Ein eleganterer Weg ist die Verwendung von Enzymen, die ihre Substrate unter milden Bedingungen spezifisch derivatisieren können. Eine vielversprechende Enzymklasse für die Modifikation von Biomolekülen sind  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Oxygenasen ( $\alpha$ KGDs). Die natürliche Funktion vieler  $\alpha$ KGDs ist die Hydroxylierung von Peptiden und Proteinen [2].

In dieser Arbeit wurden sechs  $\alpha$ KGDs mit dem Ziel untersucht, diese für Modifikationen von Peptidsubstraten zu adaptieren. Alle Hydroxylasen konnten in *E. coli* rekombinant exprimiert und löslich aufgereinigt werden. Bei drei der ausgewählten Enzyme konnte Hydroxylase-Aktivität auf semi-native Substrate nachgewiesen werden. Der Austausch des Fe(II)-koordinierenden Aspartats durch die nicht-koordinierenden Aminosäuren Alanin oder Glycin im Reaktionszentrum der aktiven Enzyme sollte die aktive Tasche einer  $\alpha$ -Keto-glutarat abhängigen Halogenase nachbilden und so die Modifikation von Peptidsubstraten mit Halogenid- und Pseudohalogenid-Ionen ermöglichen [3]. Alle generierten Enzymvarianten wurden auf ihre Halogenase-Aktivität überprüft, doch konnten die entsprechenden Produkte nicht nachgewiesen werden. In Anwesenheit von Azid-Ionen bewahrten einige  $\alpha$ KGD-Varianten jedoch interessanterweise

die Fähigkeit zur Hydroxylierung. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass das Eisen-Ion weiterhin in der aktiven Tasche gebunden ist und das Azid koordiniert. Das wäre der erste Schritt im Design einer Proteinazidase, welche die Modifikation von Proteinen durch Click-Chemie erlauben würde.

[1] C. Spicer *et al.*, **2014**, vol. 5, no. 1, p. 4740.

[2] M. Islam *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, **2018**, vol. 87, no. 1, pp. 585–620.

[3] A. Mitchell *et al.*, *Biochemistry*, **2017**, vol. 56, pp. 441–444.

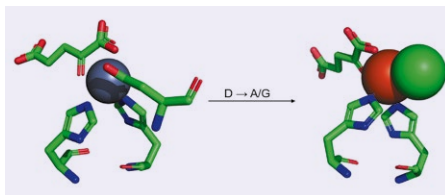


Abb. 1: Durch die Substitution von Aspartat in der katalytischen Triade einer Hydroxylase (links, PDB: 5C5T) mit den nicht-koordinierenden Aminosäuren Alanin oder Glycin wird eine Koordinationsstelle am zentralen Eisen-Ion (grau bzw. braun) frei. Die neue Konstellation ist ähnlich wie sie in natürlich vorkommenden Halogenasen beobachtet wird (rechts, PDB: 2FCT).

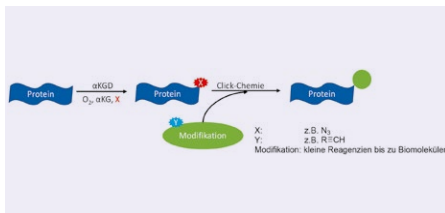


Abb.2: Durch die selektive Modifikation von Proteinen oder Peptiden mittels einer designten Proteinazidase könnten diese für Click-Chemie vorbereitet werden.