

Charakterisierung einer enzymatischen Dehydratisierung in der Anthocyanin Biosynthese



Diplomand	Jan Kreuzer
Korrektor/-in ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Michael Eichenberger

Anthocyane gehören zu den wichtigsten Pflanzenfarbstoffen, welche für die intensiven Blau-, Rot- oder Violettfärbungen in vielen Früchten und Gemüsen verantwortlich sind. Ihnen wird eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Effekten wie entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften zugeschrieben. Als natürliche Farbstoffe für die Lebensmittelindustrie gewinnen sie industriell an Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden relevante Enzyme, die im Biosyntheseweg der Anthocyane impliziert sind, mittels Mutagenese-Studien genauer charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Aminosäuren in den aktiven Taschen der Enzyme mutiert und die resultierende Aktivität der Enzymvarianten überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die gewählten Aminosäuren in allen Fällen eine ähnliche Aufgabe in der Substraterkennung übernehmen, obwohl die Wildtyp-Enzyme aus unterschiedlichen pflanzlichen Spezies stammten.

Des Weiteren wurde ein Oligo Pool für die Klonierung von 50 Enzymvarianten verwendet. Die Varianten wurden anhand computergestützter Stabilitätsberechnungen, welche mit dem Protokoll von «Cartesian ddg» von RosettaCommons durchgeführt wurden, ausgewählt. Im Labor konnte gezeigt werden, dass destabilisierend-vorausgesagte Varianten keine biokatalytische Aktivität mehr hatten und das Substrat nicht umsetzten. Dies könnte auf eine schlechte Expression der Enzyme oder aber auch auf eine zu geringe Stabilität

der Enzymstruktur zurückgeführt werden. Stabilisierende Varianten verloren zum Teil ihre biokatalytische Aktivität, was möglicherweise durch eine Rigidisierung der Enzymstruktur erklärt werden kann. Der hier vorgestellte Filter basierend auf Stabilitätsberechnungen kann in Zukunft bei der Planung von Enzymbibliotheken eingesetzt werden. Der Filter wird es so möglicherweise erlauben, den Aufwand für Enzym Engineering im Labor zu senken, was Kosten, Zeit und Ressourcen spart.

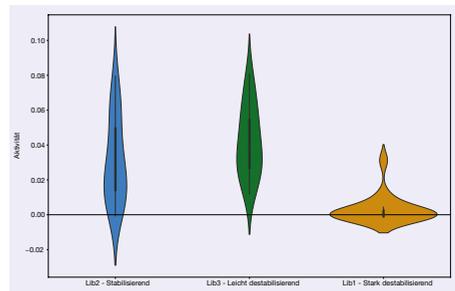


Abb. 1: Violin-Plot der drei klonierten Enzymbibliotheken. Blau: Stabilisierend-vorausgesagte Varianten, Grün: Leicht destabilisierend-vorausgesagte Varianten und Orange: Stark destabilisierend-vorausgesagte Varianten.