

# Charakterisierung einer reprogrammierten Halogenase



Diplomand	Samuel Sonderegger
Korrektorinnen ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Athina Papadopoulou

Im Rahmen dieser BSc-Arbeit wurde an der Optimierung einer aliphatischen Halogenase gearbeitet. Aliphatische Halogenasen sind Enzyme, welche ihr Substrat asymmetrisch an einem  $sp^3$ -Zentrum halogenieren können. Die Biokatalysatoren gelten als umweltfreundliche Alternativen zu traditionellen organisch-chemischen Katalysatoren. Bisher sind jedoch nur wenige natürliche, aliphatische Halogenasen in der Literatur bekannt.

Um die Palette an aktiven Halogenasen zu erweitern, wurde in der Fachgruppe Biokatalyse eine Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylase zu einer Halogenase umprogrammiert. Im aktiven Zentrum von Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylasen wird das essenzielle Fe(II) von zwei Histidinen,  $\alpha$ -Ketoglutarat und dem Carboxylrest von entweder einer Asparaginsäure oder einer Glutaminsäure koordiniert. Tauscht man die Carboxylsäure gegen ein Alanin oder Glycin aus, kann Platz geschaffen werden, um ein Halogen zu koordinieren, welches im Rahmen des Reaktionszyklus auf das Substrat übertragen wird. Die Fachgruppe Biokatalyse hat die Hydroxylase SmP4H auf diese Weise umprogrammiert und eine Prolin-Halogenase erhalten. Die «Designer»-Halogenase besass jedoch immer noch die Fähigkeit zu hydroxylieren sowie eine nur tiefe Halogenierungsaktivität.

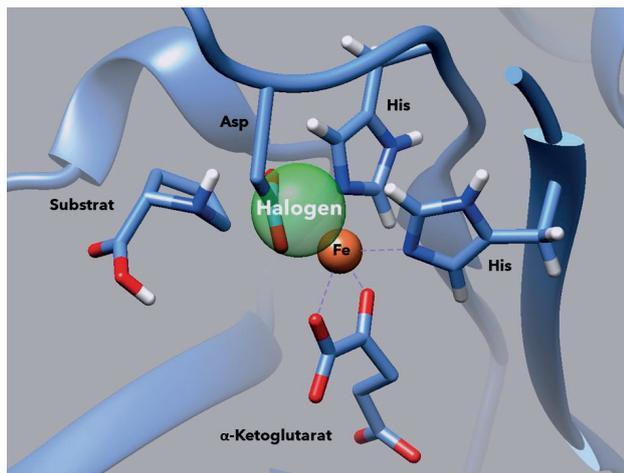


Abb. 1: Aktives Zentrum der Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Halogenase. Im Zentrum wird Fe koordiniert. Das Halogen nimmt in der Koordinationssphäre jenen Platz ein, den Aspartat in der Hydroxylase einnahm.

Um die reprogrammierte Halogenase weiter zu optimieren, wurden zusätzliche Aminosäuren in der aktiven Tasche des Enzyms ausgewählt, die mit molekularbiologischen Methoden durch alle anderen Aminosäuren ersetzt wurden. Die neugenerierten Halogenase-Varianten wurden in *E. coli* exprimiert und in biokatalytischen Reaktionen auf ihre Aktivität überprüft. Zu diesem Zweck wurde das halogenierte Produkt mittels LC-MS quantifiziert. Die Enzym-Engineering-Studie ergab, dass, während einige Aminosäuren nicht ausgetauscht werden konnten, ohne dass das Enzym an Aktivität verlor, andere Positionen eine Modulation zwischen Hydroxylierung und Halogenierung erlaubten.