

Optimierung der Kemp-Eliminase HG3 durch Protein Engineering



Diplomandin

Lisa Schelbert

Korrektorinnen ZHAW

Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Christin Peters

Biologische Katalysatoren, sogenannte Enzyme, finden immer mehr Verwendung zur Herstellung von kleinen Molekülen in der Industrie. Enzyme bieten den Vorteil, gewünschte Reaktionen unter milden Bedingungen sehr effizient, selektiv und spezifisch durchzuführen. Natürlich vorkommende Enzyme sind jedoch oft nicht aktiv oder robust genug für industrielle Anwendungen und müssen mithilfe des Protein Engineerings verbessert werden.

In dieser Arbeit wurde mit der Kemp-Eliminase gearbeitet, die als Modellsystem zur Weiterentwicklung von Protein-Engineering-Techniken dient. Das Enzym katalysiert die gut untersuchte Kemp-Eliminierung, eine Protonabstraktion von 5-Nitrobenzisoxazol. Diese Reaktion bietet den Vorteil, dass die Produktbildung einfach durch optische Messung verfolgt werden kann.

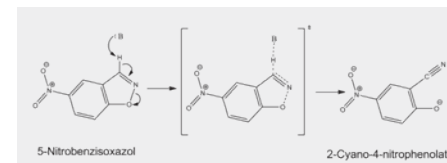


Abb. 1: Kemp-Eliminierung: Reaktionsschema des Substrats 5-Nitrobenzisoxazol.

Das Ziel der Arbeit war es, mithilfe der Modellreaktion der Kemp-Eliminierung grundlegende Aspekte der Struktur-Funktionsbeziehung bei Enzymen zu untersuchen. Dafür wurde mit den zwei Kemp-Eliminase-Varianten HG3.17 mit 17 Mutationen und HG3.R5 mit 16 Mutationen gearbeitet. Sie weisen beide eine ähn-

liche *in vivo*-Aktivität gegenüber dem Substrat 5-Nitrobenzisoxazol auf, besitzen jedoch kaum identische Mutationen. Durch das Mischen dieser Mutationen mit der Methode des Gen Shuffling wurden vier verschiedene Bibliotheken erzeugt, von denen über 1100 Varianten gemessen wurden. Aus allen Bibliotheken wurden insgesamt 230 einzigartige Varianten sequenziert. Diese Daten können nun verwendet werden, um eine Fitnesslandschaft der Kemp-Eliminase zu generieren und so einen Einblick in die Struktur-Funktionsbeziehungen des Enzyms zu erhalten.

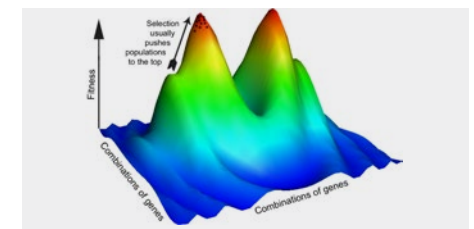


Abbildung 2: Beispiel einer Fitnesslandschaft eines Enzyms. Bildquelle: Loewe, L., Systems in Evolutionary Systems Biology, in: Encycl. Evol. Biol., Elsevier, **2016**: pp. 297–318. DOI: 10.1016/B978-0-12-800049-6.00184-0

Ausserdem wurden in dieser Arbeit Varianten identifiziert, die Kombinationen von Mutationen aus HG3.17 und HG3.R5 aufwiesen und eine ähnliche *in vivo*-Aktivität wie die beiden Referenzen zeigten. Nach chromatographischer Aufreinigung dieser ausgewählten Kemp-Eliminasen konnte zudem gezeigt werden, dass sie ähnliche oder verbesserte Michaelis-Menten-Parameter besaßen.