

Entwicklung von Enzymen für die Konstruktion von DNA-enkodierten chemischen Bibliotheken



Diplomand

Marc Erb

Korrektorinnen ZHAW

Prof. Dr. Rebecca Buller, Daniela Schaub

DNA-encodierte chemische Bibliotheken (DELS) dienen der schnellen und effizienten Identifizierung von kleinen Molekülen, die an biologisch oder pharmazeutisch relevante Zielproteine binden. Für den Aufbau von DELS müssen die beteiligten Reaktionen DNA-kompatibel sein, da die Bibliotheken ohne intakten DNA-Barcode nicht eingesetzt werden können. Für die Bildung von Amiden im DEL-Kontext sind die derzeit verwendeten chemischen Reaktionen in Teilen ineffizient, da sie unter anderem durch eine schlechte Atomökonomie und geringe DNA-Ausbeuten gekennzeichnet sein können. Enzymatische Methoden zum Aufbau von DELS sind aufgrund ihrer grossen Spezifität sowie der eingesetzten milden Reaktionsbedingungen eine vielversprechende Alternative zu den etablierten chemischen Methoden. Enzyme könnten es ermöglichen, Amid-Bindungen in Zukunft effizient und ohne Beschädigung des DNA-Barcodes herzustellen.

In dieser Arbeit wurden Amid-formende Enzyme in verschiedenen Kombinationen getestet, um ihr Substrat-Spektrum zu erkunden. Ein vielversprechendes Enzym wurde für die weitere Optimierung via Enzyme Engineering ausgewählt, um die Aktivität für ein DNA-markiertes Substratmolekül zu erhöhen.

Durch *in silico*-Analysen wurden relevante Aminosäuren identifiziert und mittels Sättigungsmutagenese modifiziert. Auf diese Weise wurden hunderte verschiedener Enzym-Varianten molekularbiologisch generiert und in *E. coli* exprimiert. Die Aktivität der Varianten wurde nach *in vitro*-Biokatalysen mittels HPLC-MS in geklärten Zell-Lysaten bestimmt. Die besten Varianten wurden anschliessend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Aktivität abschliessend bei genau definierten Enzymkonzentrationen bestimmt.

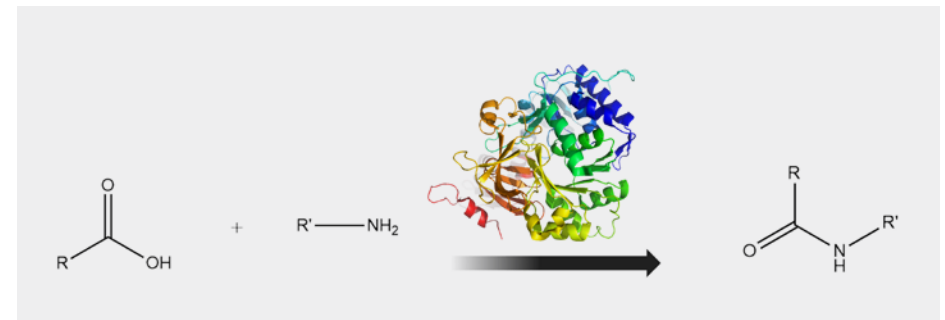


Abb. 1: Reaktionsschema zur enzymatischen Herstellung von Amiden