

Expression and Characterization of a Hydroxylase with Incorporated Noncanonical Amino Acids (vertraulich)



Diplomand Timo Schneider

Korrektor:in ZHAW Prof. Dr. Rebecca Buller, MSc Sandro Giger

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Halogenhaltige Verbindungen sind in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie von grosser Bedeutung. Halogene lassen sich aber mit etablierten chemischen Methoden nur schwer selektiv in Moleküle einbauen. Die enzymatische Halogenierung ist eine vielversprechende Technologie, welche die selektive Derivatisierung von nicht aktivierten Kohlenstoffatomen ermöglicht. Jedoch wurden bisher nur eine Handvoll Enzyme hauptsächlich aus der Familie der Fe(II)/ α Ketoglutarat-abhängigen (Fe/ α KG) Dioxygenasen entdeckt, die freistehende Substrate selektiv an C(sp³)-Zentren halogenieren können, wodurch die Substratbandbreite limitiert ist.

Neben der Identifizierung neuer Halogenasen ist die Optimierung und Anpassung bestehender Enzyme eine weitere Möglichkeit, den Halogenasen-Werkzeugkasten zu erweitern. In diesem Kontext ist der Einbau von nicht natürlichen Aminosäuren mit massgeschneiderten chemischen Eigenschaften in die Peptidkette eine vielversprechende Strategie, die Ziel-Enzyme mechanistisch zu untersuchen und zu optimieren. Nicht natürliche Aminosäuren können durch die Erweiterung des genetischen Codes in Proteine eingebaut werden. Hierzu wurde in dieser Bachelorarbeit die *amber stop codon suppression* Methode verwendet, wobei das *amber* (UAG) *stop codon*

umprogrammiert wird, sodass eine nicht natürliche Aminosäure an dieser Position eingebaut werden kann (Abb. 1). Die Expression von Proteinen mit nicht natürlichen Aminosäuren kann stark reduziert sein, weshalb der speziell für diese Methode entwickelte *Escherichia coli* Stamm B95.deltaA [1] verwendet wurde, um die Fe/ α -KG Dioxygenase mit nicht natürlichen Aminosäuren zu exprimieren. Weiter wurden die Expressionsbedingungen erfolgreich verbessert, um eine höhere Ausbeute von Enzymen mit eingebauten nicht natürlichen Aminosäuren zu erreichen.

Sowohl Histidin als auch Tyrosin-Analoga wurden unter den optimierten Bedingungen erfolgreich eingebaut. Anschliessend wurden *in vitro* Biokatalysen mit den exprimierten und aufgereinigten Enzymen durchgeführt und die Umsetzung der Substrate mittels *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* untersucht.

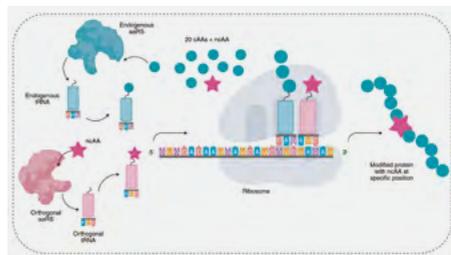


Abb. 1: Schematische Darstellung der nicht natürlichen Aminosäuren-Inkorporation mittels *amber stop codon suppression* Methode. ncAA = nicht natürliche Aminosäure, aaRS = Aminoacyl-tRNA-Synthetase.