

Zell-freie Proteinsynthese von Oxidoreduktasen



Diplomandin	Jasmin Meierhofer
Korrektorin ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller
Korrektor extern	Dr. Dennis Wetzl

Zu den bekanntesten Oxidoreduktasen gehören die Cytochrom P450 Monooxygenasen. Ihre Aufgabe ist es, elementaren Sauerstoff auf ihr Substrat zu übertragen und dadurch inaktivierte CH-Bindungen zu funktionalisieren. In Lebewesen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Synthese von Biomolekülen, im Metabolismus und bei der Entgiftung von Xenobiotika. Oxidoreduktasen sind industriell von grossem Interesse, da die Funktionalisierung von inaktiven CH-Bindungen chemisch sehr schwierig durchzuführen ist. Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen jedoch für industrielle Anwendungen den Nachteil, dass sie Häm-Proteine sind, den Co-Faktor NAD(P)H benötigen und die Elektronentransportkette nicht ohne Nebenreaktionen funktioniert, welche für die Enzyme toxisch sein können und es so nur zu geringen Ausbeuten kommt. Eine andere Möglichkeit, Substrate an inaktiven CH-Bindungen zu hydroxylieren, bieten die α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (α -KGDs), welche ebenfalls zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen gehören. Der Vorteil der α -KGDs ist, dass sie zur Aktivierung des elementaren Sauerstoffs lediglich nicht-Häm-

gebundenes Eisen(II) und α -Ketoglutarat benötigen. Ziel der Bachelorarbeit war die Herstellung von α -KGDs mittels Zell-freier Proteinsynthese (CFPS). Anstelle von lebenden Organismen werden hierfür Extrakte verwendet, welche alle Bestandteile enthalten, die zur Proteinsynthese nötig sind. Grosser Vorteil dieser Methode ist der geringe Zeitaufwand. Da das gewünschte Protein direkt von PCR-Produkten oder Plasmiden hergestellt werden kann, fallen gegenüber der rekombinanten Expression in *E. coli* aufwändige und langwierige Klonierungs- und Kultivierungsschritte weg. Aus diesem Grund besitzt die CFPS grosses Anwendungspotential für die immer mehr gefragten High-Throughput-Systeme für das Protein-Engineering.

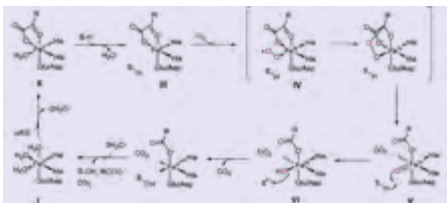


Abb. 1: Vermuteter Reaktionsmechanismus der durch α -KGDs katalysierten Hydroxylierung.



Abb. 2: Schematische Darstellung der Zell-freien Proteinsynthese im Vergleich zur *in vivo* Proteinexpression.

[1] L. F. Wu, S. Meng & G. L. Tang, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1864 (2016) 453.