

# Optimierung der Expression einer rSAM abhängigen Epimerase



Diplomandin	Selina Hodel
Korrektor/-in ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Lukas Neutsch

Die Resistenzbildung von Mikroorganismen gegen Antibiotika stellt ein immer grösser werdendes Problem dar (WHO Bericht 2014). Als Konsequenz sind neue Klassen von Antibiotika gefragt, die eine schnelle Resistenzbildung verhindern können. Ein vielversprechender Ansatz sind dabei antimikrobielle Peptide (AMPs). Ein Problem der AMPs und allgemein aller Peptide, die als Wirkstoff eingesetzt werden sollen, ist ihre Anfälligkeit gegenüber Proteasen bei *in vivo* Anwendungen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Austausch einiger L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren in der Peptidsequenz von Indolicidin (ein AMP) eine höhere Stabilität bei Versuchen mit Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin bewirken kann (Abb. 1, Chang *et al.*, 2013).

Radikale S-Adenosylmethionin (rSAM) Epimerasen sind eine Klasse von Enzymen, die in der Lage sind einzelne Aminosäuren eines Peptides in die D-Konfiguration umzuwandeln (Freeman *et al.* 2012). Eine rSAM Epimerase ist YydG, das ursprünglich aus *Bacillus subtilis* isoliert wurde (Benjdia *et al.* 2017).

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression des Fusionsproteins Strep-YydG in *E. coli* BL21 (DE3) zu optimieren. Dazu wurden verschiedene Parameter wie zum Beispiel der Einfluss der Temperatur, die Expressionszeit und der Zellaufschluss sowie der Zusatz von Chaperonen untersucht. Dabei stellte sich die Expression bei 16 °C in TB-Medium als die beste Option heraus. Es wurden Biokatalysen mit dem Enzym Strep-YydG durchgeführt. Der Nachweis der Epimerisierung an einer gekürzten Variante des natürlichen Substrates (YydF-Core) konnte nicht erbracht werden. Nach dem tryptischen Verdau des Reaktionsgemisches waren zwar neue Peaks neben den zu erwartenden Fragmenten des Substrates vorhanden, jedoch muss noch bestimmt werden, ob diese neuen Peaks von Epimerisierungen stammen oder Verunreinigungen aus dem Reaktionsgemisch sind. Die Katalyse mit Strep-YydG und OspAcore (natürliches Substrat der Epimerase OspD) zeigte einen neuen Peak, der auf eine einfache Epimerisierung hindeuten könnte. Die Aktivität von Strep-YydG konnte durch den Nachweis der Bildung von 5-Desoxyadenosin (Nebenprodukt des katalytischen Zyklus) aus SAM während der Biokatalyse gezeigt werden.

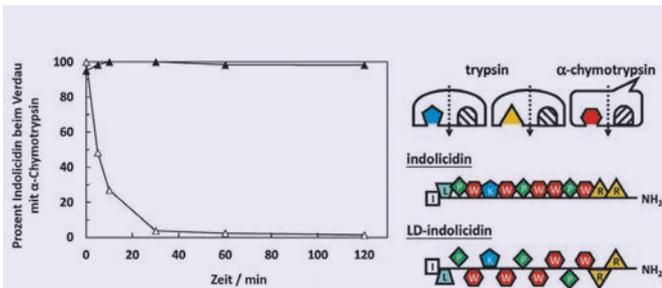


Abb. 1: Verdau von Indolicidin ( $\Delta$ ) und LD-Indolicidin ( $\blacktriangle$ ) mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (Chang *et al.* 2013).