

Untersuchung von Schlüsselmutationen in Kemp-Eliminase-Varianten



Diplomand Jonah Eyer

Korrektor/-in ZHAW Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Thomas Schwander

In der chemischen Industrie werden häufig Edelmetalle als Katalysatoren genutzt, um chemische Reaktionen zu beschleunigen oder zu ermöglichen. Doch Gewinnung, Verwendung und Entsorgung dieser Edelmetalle können umweltschädlich sein. Enzyme, natürliche Katalysatoren, bieten eine nachhaltige Alternative für die Produktion von Chemikalien. Biokatalysatoren übertreffen chemische Katalysatoren oft in Spezifität und Effizienz. Allerdings sind direkt aus der Natur isolierte Enzyme oft nicht robust genug für industrielle Anwendungen oder sie akzeptieren das relevante Startmaterial nur unzureichend. Daher wird häufig Enzym-Engineering eingesetzt, um Enzyme für industrielle Anwendungen zu optimieren.

Zur Durchführung der Kemp-Eliminierung, einer Modellreaktion für enzymkatalysierte Protonentransfer-Reaktionen, wurde 2012 ein Enzym (HG3) mittels *In-silico-Methoden* generiert und in zwei Evolutionskampagnen zu Varianten mit erhöhter Aktivität (HG3.17 und HG3.R5) weiterentwickelt. Diese Varianten zeigen eine vergleichbare Aktivität, unterscheiden sich aber in 29 Aminosäuresubstitutionen (Abb. 1). [1, 2]

Diese Arbeit untersuchte die mechanistischen Grundlagen der gesteigerten Aktivität der beiden Kemp-Eliminase-Varianten, die durch verschiedene Methoden der Enzymentwicklung entstanden sind. Schlüsselmutationen der hochaktiven

Varianten wurden strategisch entfernt oder in die jeweils andere eingeführt, um ihre Auswirkungen auf die Enzymaktivität zu untersuchen. Die Bestimmung von Michaelis-Menten-Parametern der positionellen Enzymvarianten zeigte, dass ein rationaler Austausch von Substitutionen zwischen den evolvierten Varianten ohne Aktivitätsverlust möglich war.

Eine biochemische Charakterisierung von Kemp-Eliminase-Varianten, die durch einen maschinellen Lernansatz entwickelt wurden, identifizierte vier weitere Varianten mit vergleichbarer katalytischer Effizienz wie HG3.17 und HG3.R5.

- [1] R. Blomberg *et al.*, Nature 503, 418–421, 2013.
- [2] D. Patsch *et al.*, Nat. Chem. Biol., 2024.

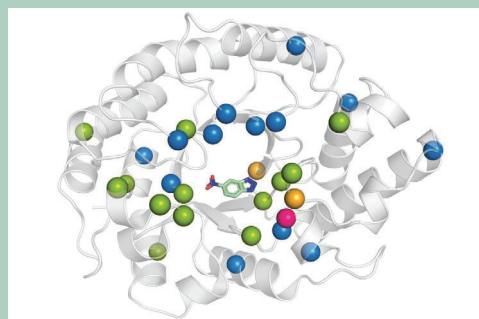


Abb. 1: Struktur der Kemp-Eliminase HG3 (PDB: 5RGA), mittels der die Mutationen der Varianten HG3.R5 (blaue Kugeln) und HG3.17 (grüne Kugeln) dargestellt sind. Die Substitution K50Q, die in beiden Varianten vorkommt, ist mittels einer rosa Kugel hervorgehoben, positionell identische Substitutionen mit unterschiedlichen Aminosäureresten sind hellbraun dargestellt. Abbildung angepasst von der ZHAW Biokatalyse-Gruppe [2].