

# Kombination von opto-elektrochemischen Messmethoden in modifizierten Mikrotiterplatten und gelenkter Evolution zur Optimierung des mediatorvermittelten Elektronentransfers zwischen Redoxenzymen und Elektroden

15454 N

In diesem Projekt sind molekularbiologische, bioelektrochemische und verfahrenstechnische Methoden und Vorgehensweisen kombiniert worden, um eine effektive Bioelektrokatalyse mit Redoxenzymen am Beispiel der Monooxygenase P450cin und der Cineol-Hydroxylierung zu erreichen. Diese Umsetzung bietet Zugang zu Produkten, die sowohl für die chemische als auch für die pharmazeutische Industrie von Interesse sind.

Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene Systeme entwickelt, mit denen es möglich ist, parallele elektrochemische Messungen in Mikrotiterplatten (MTP) durchzuführen. Das Basissystem besteht aus drei Platin-Elektroden, die als Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode eingesetzt werden. Alternativ können auch Gold- oder Glaskohlenstoffelektroden eingesetzt werden.

Die elektrochemische Charakterisierung mittels Cyclovoltammetrie des Messsystems zeigte, dass die Elektroden reproduzierbare und stabile Signale liefern. Es wurden außerdem auch Reinigungsprotokolle für die Elektroden entwickelt. MTP mit Elektroden konnten in einem nachfolgenden Schritt erfolgreich in eine optische Leseinheit (kommerzieller MTP-Reader) integriert werden. Parallel dazu wurden optische und elektrochemische Messungen durchgeführt. Protokolle zur Produktion und Charakterisierung der notwendigen Proteine (CinA, CinB und CinC) wurden etabliert und optimiert sowie eine GC/MS Analytik für die Substrate und Produkte entwickelt. Im Rahmen eines Screenings wurden verschiedene Mediatoren für den Elektronentransfer zwischen einer Elektrode und dem P450cin-System getestet. Es konnte gezeigt werden, dass der mediatorvermittelte Elektronentransfer über CinC zu CinA mit den Mediatoren Phenosafranin, Safranin und Cobalt(III)sepulchrat sowie den Coenzymen Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) möglich ist. Weiterhin ist auch ein mediatorvermittelter Elektronentransfer von einer Elektrode zu CinA ohne Einsatz von CinC möglich. Als Mediatoren sind dabei Phenosafranin und Safranin eingesetzt worden.

Zur Erhöhung der Aktivität von P450cin gegenüber dem natürlichen Substrat 1,8-Cineol wurde ein Durchmusterungsprotokoll auf Basis eines E. coli in vivo Reaktionssystems entwickelt, bei dem anschließend die Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie analysiert werden können. Das Protokoll wurde verwendet, um 12 Sättigungsmutagenese-Bibliotheken, die mit Hilfe des verfügbaren Strukturmodells generiert wurden, zu durchmustern. Dabei konnten fünf Aminosäurepositionen identifiziert werden, an denen Substitutionen zu einer Erhöhung der Aktivität des Enzyms führen. Die aktivsten P450cin Varianten wurden gereinigt sowie deren kinetische Eigenschaften charakterisiert. Zwei Varianten (Val386Ser und Ala387His) zeigten deutlich erhöhte  $k_{cat}$ -Werte und Umsatzraten.

Die ortsspezifische Mutagenese zur elektrostatischen Verbesserung des mediatorvermittelten Elektronentransfers zum katalytischen Zentrum von P450cin sowie die Deletion einer Proteinschleife aus drei Aminosäuren im Substratzugangskanal zur sterischen Erleichterung des Elektronentransfers führten zum Großteil zu inaktiven Monooxygenase-Varianten. Dies lässt sich Faltungsprobleme zurückführen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der mediatorvermittelte Elektronentransfer zur Produktion von Wertstoffen mit P450cin und die technische Umsetzung des Prozesses möglich ist. Die entwickelten Bioelektrolysemethoden und -verfahren sollen daher im Rahmen eines Fortsetzungsprojektes (16649 N) in einen technischen Prozess umgesetzt werden.

Bearbeitet wurde das Forschungsthema von 02/08 bis 07/10 bei der **DECHEMA e.V., Karl-Winnacker-Institut** (Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt, Tel.: 069/7564-422) unter der Leitung von Dr. J. Schrader (Leiter der Forschungsstelle Dr. K. Wagemann) und der **Jacobs University gGmbH** (Campus Ring 1, 28759 Bremen, Tel. 0421/200-40) unter der Leitung von Prof. Dr. U. Schwaneberg (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. J. Treusch).

[-> TIB](#)

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

Das IGF-Vorhaben Nr. 15454 N der Forschungsvereinigung DECHEMA, Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages