

Abschlussbericht zum Max-Buchner-Forschungsstipendium

MBFSt-Kennziffer: 3654, Förderperiode 07/2018 – 06/2019

Evolution Licht-getriebener artifizieller Enzyme für Redoxbiotransformationen

- PhotoZymes -

Dr. Sandy Schmidt, Institut für Molekulare Biotechnologie, TU Graz, Petersgasse 14, 8010 Graz, Österreich

Kurzfassung

In diesem Projekt sollten Licht-getriebene und NAD(P)H-unabhängige künstliche Biokatalysatoren entwickelt werden. Hierzu wurde ein Photokatalysator in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms gebunden. Durch den Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure mit einer reaktiven Azidoseitenkette konnte dieser Photokatalysator in einer kupferfreien Cycloaddition selektiv im Enzym verankert werden. Der so entstandene künstliche Hybridkatalysator (PhotoZyme) wurde verifiziert und biochemisch charakterisiert.

Berichte

Im Rahmen der Berichterstattung ist ein Poster zum Thema auf der Himmelfahrtstagung: Intensification and digitalisation for integral bioprocessing der DECHEMA im Mai 2019 präsentiert worden.

Einleitung

Oxidoreduktasen gehören aktuell zu den Biokatalysatoren mit dem größten wirtschaftlichen Wachstumspotenzial. Während die Redoxbiokatalyse zur Synthese von hochwertigen Feinchemikalien und Pharmastoffen eine sehr erfolgreiche, umweltfreundliche Technologie darstellt,¹ gibt es derzeit nur wenige Anwendungen zur Herstellung von großvolumigen Produkten wie Spezialchemikalien und sogar Bulk-Produkten wie Polymervorstufen.² Ein intrinsischer Nachteil dieser Redoxprozesse ist der Bedarf an einer stöchiometrischen Zufuhr von Elektronen. Dabei werden die Cofaktoren NADH und NADPH bei Ganzzell-Prozessen meist über die Zugabe von Glukose zum Medium regeneriert. In zellfreien Prozessen werden oft Ameisensäure oder organische Alkohole wie Isopropanol als Elektronendonatoren eingesetzt. Problematisch ist hier, dass die aus fossilen oder landwirtschaftlichen Quellen gewonnenen Elektronendonatoren nur einen kleinen Teil der in ihnen gespeicherten chemischen Energie zur Verfügung stellen. Sie verursachen darüber hinaus die Bildung von Nebenprodukten. Die niedrige Atomeffizienz und die Abtrennung von Nebenprodukten aus der Cofaktor-Regenerierung wirken sich dementsprechend nachteilig auf die Nachhaltigkeit der Verfahren aus.

Die katalytische Nutzung von sichtbarem Licht ist eine vielversprechende Möglichkeit, Nicotinamid-Cofaktoren und potenziell auch den Einsatz von Cosubstraten zu umgehen: (i) *in vitro* über die Kopplung einer enzymatischen Reaktion mit einem Photomediator,³⁻⁷ oder (ii) *in vivo* über die Kopplung photosynthetisch aktiver Mikroorganismen mit enzymatischen Reaktionen.⁸⁻¹⁰ Diese Konzepte heben sich von den bereits bestehenden Cofaktor-Regenerierungs-Ansätzen (Ganzzell-Verfahren oder Zell-frei über die Zugabe von Regenerations-Enzymen wie Glucosedehydrogenase) vor allem dadurch ab, dass diese organische Co-Substrate wie Glucose einsparen und somit die Komplexität des Systems verringern. Nichtsdestotrotz sind die bisherigen Systeme zur Licht-getriebenen Cofaktor-Regenerierung noch nicht optimal nutzbar. Dies liegt zum einen daran, dass radikalische Zwischenstufen, die während der Reaktion erzeugt werden, zu einer verringerten Chemo- und Enantioselektivität der Reaktion führen.

Zum anderen ist die Bildung von reaktiven Nebenprodukten wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) problematisch. Betrachtet man in diesem Zusammenhang Flavin-abhängige Monooxygenasen genauer, so ist der Grund hierfür vor allem, dass eine oxidative Entkopplung der Flavin-Regenerationsreaktion von der enzymatischen O_2 -Aktivierung stattfindet und damit ca. 95% der reduzierenden Äquivalente, die vom EDTA stammen, verloren gehen. Außerdem zeigt sich hier eine gehinderte Interaktion zwischen dem Enzym-gebundenen FAD und dem reduzierenden Katalysator, was eine sehr langsame Elektronentransferkinetik zur Folge hat.¹¹

Aufgabenstellung

Ziel des hier beantragten Projektes war es, über eine Verbesserung der Wechselwirkung zwischen dem reduzierten natürlichen Mediator und der Monooxygenase-Untereinheit eine Erhöhung der Kopplungseffizienz der Elektronen Transporte in diesen Reaktionen zu erzielen. Demzufolge sollte ein Engineering der Monooxygenase-Mediator-Interaktion auf Basis von rationalem Design die Effizienz des Elektronentransfers erhöhen.¹²⁻¹³ Dafür sollte ein Photosensitizer/Mediator über eine kovalente Bindung direkt an eine Monooxygenase angebunden werden, um somit die Reaktionsraten bisher beschriebener Licht-getriebener Monooxygenase-Reaktionen zu beschleunigen. Hierbei sollten vor allem organische Photokatalysatoren (PKs), wie beispielsweise Flavine eingesetzt werden, während die Enzyme die Reaktion hochselektiv machen.

Um dieses Ziel zu erreichen, sollte der genetische Code genutzt werden, um einen PK mit Hilfe von nicht-kanonischen Aminosäuren (ncAS) über ein AMBER Stopcodon in das Enzym zu inkorporieren. Nicht-kanonische Aminosäuren sind hierbei nur eine von mehreren Möglichkeiten zur Kopplung, allerdings bieten diese eine große Flexibilität und präzise Kontrolle der Position der Anknüpfung am Protein. Durch die Verbindung der Konzepte der Photokatalyse mit der Biokatalyse soll *PhotoZymes* ein System darstellen, mit dem sich die katalytischen Möglichkeiten von Enzymen erheblich erweitern lassen. Dies soll den Weg ebnen, um Licht direkt als Energiequelle zum Antreiben biokatalytischer Reaktionen zu nutzen und dabei die beschriebenen Limitationen zu überwinden.

Methoden

Das Gen für das Modellenzym Cyclohexanon Monooxygenase (CHMO) aus *Acinetobacter calcoaceticus* war zuvor schon Gegenstand der Forschung und lag bereits kloniert in einem Expressionsvektor vor.¹⁰ Für die Inkorporation einer nicht-kanonischen Aminosäure in ein Protein in *E. coli* musste das Zielgen zunächst in einen geeigneten anderen Vektor kloniert werden, welcher ein orthogonales Paar aus Aminoacyl-tRNA-Synthetase und ihre korrespondierende tRNA kodiert (pSCS-MmOP).¹⁴ Hierfür wurden verschiedene Konstrukte erstellt, die entweder einen N-oder C-terminalen His-tag an dem Zielgen oder verschiedene Promotoren (T5 und T7) beinhalteten. Ein C-terminaler His-tag bietet den Vorteil, dass mögliche entstehende Proteinfragmente durch die Inkorporation des AMBER Stopcodons während der Proteinreinigung entfernt werden können.

Da aus früheren Arbeiten bereits bekannt war, dass ein C-terminaler His-tag die Expression der CHMO negativ beeinflussen kann, wurden zunächst optimierte Expressions- und Aufreinigungsprotokolle erstellt, um die Ausbeute an CHMO zu erhöhen. Nachdem die C-terminal getaggte CHMO mittels NADPH-Aktivitätsassay charakterisiert wurde, erfolgten erste Licht-getriebene Biotransformationen in einem extra hierfür konstruierten Lichtreaktor. Die hierfür genutzte Produktanalyse war bei uns im Labor bereits etabliert und publiziert.¹⁰ Anschließend wurden drei CHMO Varianten erstellt, die an

unterschiedlichen Positionen auf der Oberfläche des Enzyms nahe am aktiven Zentrum das AMBER Stopcodon enthalten. Hierfür wurde die QuikChange™ Methode verwendet. Die erhaltenen Proteinvarianten wurden hergestellt, gereinigt und die Aktivitäten mittels NADPH-Aktivitätsassay bestimmt. Für einige Varianten wurde untersucht, inwieweit der Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure Azidolysin die Expression und Aktivität beeinflusst. Nach erfolgreicher Inkorporation konnten erste kupferfreie Klickreaktionen durchgeführt werden, um einen Photokatalysator der eine reaktive Octin-Einheit enthält, kovalent im Enzym zu verankern.

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Projekt wurde ein Enzym-Photokatalysator-Komplex generiert, der die Regeneration des Enzym-eigenen Flavins von Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen vereinfachen sollte. Das Projekt wurde unterteilt in a) molekulare Klonierung und Expression vom Wildtyp-Modellenzym (CHMO) im Vektor pSCS_MmOp; b) die Modifikation dieses Modellenzym unter Verwendung der AMBER-Stopcodon-Suppressionstechnologie und die Expression von CHMO-Varianten mit eingebauter nicht-kanonischer Aminosäure; c) Etablierung einer *in vitro*-Photobiokatalyse mit gereinigter CHMO sowie d) Etablierung einer Kupferfreien Klickreaktion des Photokatalysators mit den generierten CHMO Varianten mit inkorporierter nicht-kanonischer Aminosäure.

Die Klonierungen zur Generierung verschiedener Vektorkonstrukte, welche entweder einen C- oder N-terminalen His-tag am Gen der CHMO enthielten, sowie Konstrukte mit verschiedenen Promotern (T5 und T7) konnten erfolgreich mithilfe von Standard-Klonierungsmethoden abgeschlossen werden. Die C- oder N-terminal getaggten CHMOs wurden anschließend in rekombinanter Form (Ni-Chelatchromatographie und Gelfiltration) gewonnen. Gemäß bekannter Prozeduren und allgemeiner Funktion der Aktivität dieses Enzyms wurden diese dann charakterisiert (Tabelle 1).¹⁵

Tabelle 1: Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten für den CHMO Wildtyp mit C-oder N-terminalem His-tag. Die Aktivitäten wurden mithilfe des NADPH Assays spektrophotometrisch bestimmt.

Enzym	His-tag	Vektor	Promoter	Spezifische Aktivität [U/mg]	Literaturverweis	Proteinkonzentration [mg/mL]
CHMO	N-term.	pET28a(+)	T7	4.5 ± 0.5	[15]	[15]
CHMO	N-term.	pSCS_MmOp	T7	7.44 ± 0.0132	this thesis	1.8
CHMO	C-term.	pSCS_MmOp	T7	1.27 ± 0.0109	this thesis	11.9

Wie erwartet, zeigte die CHMO mit C-terminalem His-tag eine deutlich geringere spezifische Aktivität im Vergleich zu dem N-terminal getaggten Enzym (Tabelle 1). Trotzdem resultierte die Expression der CHMO kodiert in pSCS_MmOp in einer hohen Proteinkonzentration nach der Reinigung mittels Ni-Chelatchromatographie und Gelfiltration. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die lösliche Expression des CHMO Wildtyps mit T7 Promoter in pSCS_MmOp deutlich höher war im Vergleich zum Konstrukt mit T5 Promoter. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten das pSCS_MmOp Konstrukt mit T7 Promoter und einem C-terminalem His-tag verwendet.

Das pSCS_MmOp_CHMO Konstrukt mit C-terminalem His-tag wurde genutzt, um an drei Positionen (E127, N156 and R389) mittels QuikChange™ Mutagenese die entsprechenden Mutationen die für ein AMBER Stopcodon kodieren, zu generieren. An allen drei ausgewählten Positionen konnten die AMBER Stopcodons erfolgreich generiert werden. Für alle nachfolgenden Studien wurde sich zunächst auf die CHMO Varianten mit AMBER Stopcodon an den Positionen N156 und R389 konzentriert. Der CHMO Wildtyp sowie die Varianten wurden rekombinant hergestellt, gereinigt und die spezifischen Aktivitäten bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die CHMO Variante mit AMBER Stopcodon an Position N156 in einer guten löslichen Expression resultiert. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Inkorporation der nicht-kanonischen Aminosäure Azidolysin ((S)-2-amino-6-((2-azidoethoxy) carbonylamino) hexanoic acid hydrochloride) zu einer reduzierten löslichen Expression und Aktivität führt. Abbildung 1 zeigt eine SDS-PAGE Analyse der Expression und Reinigung der CHMO Variante mit inkorporierter nicht-kanonischer Aminosäure Azidolysin an Position N156.

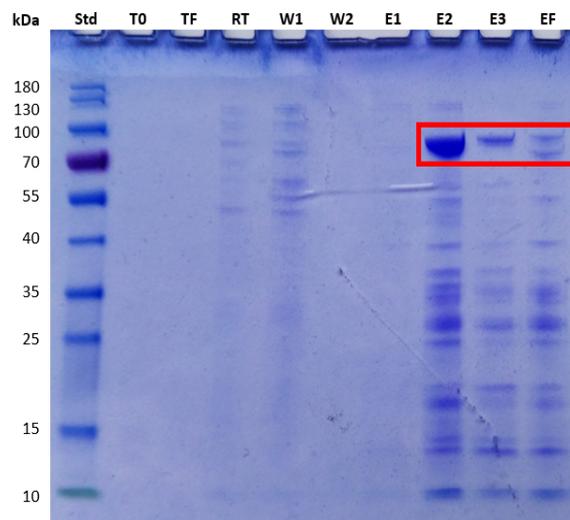


Abbildung 1: SDS-PAGE Analyse der Expression der CHMO Variante mit einem an Position N156 inkorporierten Azidolysin, durchgeführt in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, die das Konstrukt pSCS_MmOp_CHMO-C tragen. Diese SDS-PAGE zeigt die zu Beginn der Induktion (T0) und zum Zeitpunkt der Ernte (TF) entnommenen Proben sowie den Durchfluss (RT) nach dem Laden der CHMO_N156-Variante auf die Ni-Sepharose™ Beads. Die Proben wurden aus den ersten beiden Waschfraktionen (W1 und W2) der Proteinreinigung entnommen, und die Proben aus den ersten drei Millilitern Elution mit 300 mM Imidazol Elutionspuffer (E1-3) wurden auf die SDS-PAGE-Säulen aufgetragen. Die entsalzte Elutionsfraktion (EF) wurde zur weiteren Verwendung genutzt. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) wurde als Proteinstandard (STD) verwendet.

Die CHMO Variante mit AMBER Stopcodon an Position R389 konnte ebenfalls erfolgreich hergestellt und gereinigt werden, auch wenn die lösliche Expression dieser Variante generell geringer war. Im Folgenden wurde die CHMO Variante mit inkorporiertem Azidolysin an der Position N156 auf ihre Aktivität gegenüber Cyclohexanon untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Inkorporation von Azidolysin zu einer starken Reduktion der Aktivität führt. Obwohl diese Variante kaum noch messbare Aktivität aufwies, wurde diese genutzt, um die kupferfreie Klickreaktion (SPAAC) zwischen Azidolysin und der reaktiven Gruppe des modifizierten Photokatalysator (dibenzylcyclooctyne-PEG4-5/6-FMA, DBCO-PEG4-5/6-FMA) zu etablieren. Beide Komponenten wurden in einer äquimolaren Konzentration von 75 µM zu der Reaktion gegeben. Die Cycloadditionsreaktion wurde über Nacht inkubiert. Nach zweimaliger Entsalzung mit einer PD MiniTrap™ G-10 (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) wurde

ein fluorimetrischer Nachweis des Enzym-Photosensibilisator-Komplexes durchgeführt. Diese Messung zeigte, dass der Photokatalysator erfolgreich über eine SPAAC an die reaktive Azido-Gruppe der nicht-kanonischen Aminosäure im Enzym gebunden werden konnte.

Außerdem konnte im Rahmen dieses Projektes ein neuer Lichtreaktor konstruiert werden, welcher speziell für Sauerstoff-abhängige Enzymreaktionen geeignet ist (Abbildung 2). Dieser Lichtreaktor, welcher mit Leuchtstofflampen ausgestattet ist, war für Biotransformationen in 20 ml-Glasfläschchen vorgesehen. Dieser Reaktor wurde in einen Inkubationsschüttler bei 30°C unter leichtem schütteln mit 130 U/min gegeben und konnte alternativ auch mit LED Stripes ausgestattet werden.

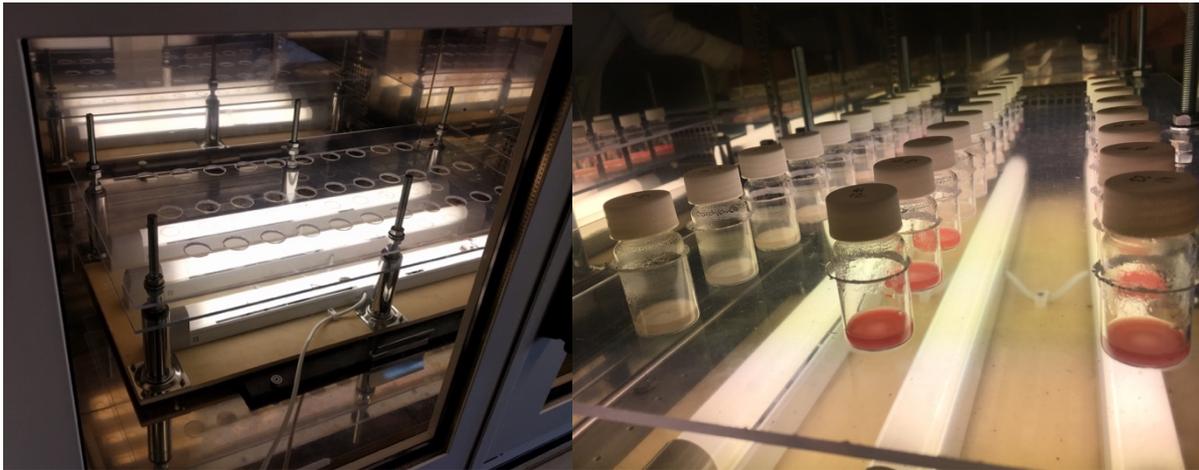


Abbildung 2: Lichtreaktor ausgestattet mit Leuchtstofflampen, der in einen Schüttelinkubator platziert wird.

Dieser Lichtreaktor konnte erfolgreich für die Etablierung von Licht-getriebenen Biotransformationen eingesetzt werden. Hierfür wurde der Lichtreaktor mit LED Stripes ausgestattet, um bei den jeweils geeigneten Wellenlängen für die entsprechenden Photokatalysatoren (Flavine oder Fluoreszenzfarbstoffe) arbeiten zu können. So konnte zum ersten Mal erfolgreich gezeigt werden, dass die CHMO in einer photobiokatalytischen Reaktion bestehend aus Elektronendonator/Photokatalysator die Umsetzung von Cyclohexanon zu ϵ -Caprolacton katalysieren kann.

Obwohl derzeit noch nicht bestätigt werden kann, dass die kovalente Anbindung eines Photokatalysators an eine Oxidoreduktase wie beispielsweise die CHMO zu einer Erhöhung der Kopplungseffizienz der Elektronentransporte führt, bilden die im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente eine vielversprechende Grundlage, um die bereits generierten Hybridkatalysatoren weiter zu optimieren (z.B. durch Anbindung an anderen Positionen im Enzym).

Zusammenfassung

Über 25% aller bekannten Biokatalysatoren sind Oxidoreduktasen. Diese Klasse von Enzymen wird in der Industrie intensiv genutzt, weil diese ein sehr großes Spektrum an Substraten und Produkten abdecken und dabei hoch selektiv sind. Ein intrinsischer Nachteil dieser Redoxprozesse ist jedoch der Bedarf an einer stöchiometrischen Zufuhr von Elektronen. Dabei werden die Cofaktoren NADH und NADPH bei Ganzzell-Prozessen meist über die Zugabe von Glukose zum Medium regeneriert. Ziel dieses Projektes war es deswegen, ein Licht-getriebenes künstliches Enzym für Reduktions-Oxidations-

Biotransformationen zu generieren, dass eine Erhöhung der Kopplungseffizienz der Elektronentransporte in diesen Reaktionen erzielt. Nachdem unterschiedlichste Plasmidkonstrukte mit einem C- oder N-terminalen His-tag am CHMO Gen und verschiedenen Promotoren erstellt werden konnten, wurden Expressions- und Aufreinigungsprotokolle erstellt und optimiert. Die AMBER Stopcodon Suppression wurde genutzt, um eine nicht-kanonische Aminosäure in die Primärstruktur der Modellenzyme einzubauen, damit eine strain-promoted azide-alkyne Cycloaddition mit einem modifizierten Photosensitizer durchgeführt werden konnte. Nach der Generierung der Mutanten, welche ein AMBER Stopcodon im jeweiligen Gen aufwies, wurde die Expression und Reinigung der Enzymvarianten durchgeführt. Die initiale spezifische Enzymaktivität wurde sowohl von den Wildtyp-Proteinen als auch einer Variante der CHMO mittels des gut etablierten NADPH Aktivitätstests ermittelt. Weiterhin wurde eine Licht-getriebene Biotransformation von Cyclohexanon zu ϵ -Caprolacton, katalysiert durch die CHMO (C-terminaler His-tag) durchgeführt. Für diese Licht-getriebene Biotransformation wurde ein neuer Lichtreaktor entwickelt und konstruiert (Abbildung 2). Abschließend wurde eine strain-promoted azide-alkyne Cycloaddition durchgeführt, um das Modellenzym mit einem Photosensitizer zu koppeln. Dieses Projekt legt damit den Grundstein zur weiteren Entwicklung und Optimierung eines Licht-getriebenen Enzym-Photosensitizer-Komplexes für Redox-Biotransformationen. Es ist zu erwarten, dass ein solcher Enzym-Photosensitizer-Komplex die Atomeffizienz erhöhen und die gesamte Reaktion beschleunigen kann.

Literaturverzeichnis

1. Kourist, R.; Domínguez de María, P.; Miyamoto, K., Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of profens – recent trends and developments. *Green Chem.* **2011**, 2607-2618.
2. Schmidt, S.; Scherkus, C.; Muschiol, J.; Menyés, U.; Winkler, T.; Hummel, W.; Groger, H.; Liese, A.; Herz, H. G.; Bornscheuer, U. T., An Enzyme Cascade Synthesis of epsilon-Caprolactone and its Oligomers. *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54* (9), 2784-2787.
3. Rauch, M.; Schmidt, S.; Arends, I. W. C. E.; Oppelt, K.; Kara, S.; Hollmann, F., Photobiocatalytic alcohol oxidation using LED light sources. *Green Chem* **2017**, *19* (2), 376-379.
4. Choi, D. S.; Ni, Y.; Fernandez-Fueyo, E.; Lee, M.; Hollmann, F.; Park, C. B., Photoelectroenzymatic Oxyfunctionalization on Flavin-Hybridized Carbon Nanotube Electrode Platform. *ACS Catal* **2017**, *7* (3), 1563-1567.
5. Okamoto, Y.; Kohler, V.; Paul, C. E.; Hollmann, F.; Ward, T. R., Efficient In Situ Regeneration of NADH Mimics by an Artificial Metalloenzyme. *ACS Catal* **2016**, *6* (6), 3553-3557.
6. Holtmann, D.; Hollmann, F., The Oxygen Dilemma: A Severe Challenge for the Application of Monooxygenases? *ChemBioChem* **2016**, *17* (15), 1391-1398.
7. Kochius, S.; Ni, Y.; Kara, S.; Gargiulo, S.; Schrader, J.; Holtmann, D.; Hollmann, F., Light-Accelerated Biocatalytic Oxidation Reactions. *ChemPlusChem* **2014**, *79* (11), 1554-1557.
8. Koninger, K.; Grote, M.; Zachos, I.; Hollmann, F.; Kourist, R., Light-driven Enzymatic Decarboxylation. *Jove J Vis Exp* **2016**, (111).
9. Koninger, K.; Baraibar, A. G.; Mugge, C.; Paul, C. E.; Hollmann, F.; Nowaczyk, M. M.; Kourist, R., Recombinant Cyanobacteria for the Asymmetric Reduction of C=C Bonds Fueled by the Biocatalytic Oxidation of Water. *Angew Chem Int Ed* **2016**, *55* (18), 5582-5585.
10. Böhmer, S.; Köninger, K.; Gómez-Baraibar, Á.; Bojarra, S.; Mügge, C.; Schmidt, S.; Nowaczyk, M. M.; Kourist, R., Enzymatic Oxyfunctionalization Driven by Photosynthetic Water-Splitting in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Catalysts* **2017**, *7* (8).
11. Taglieber, A.; Schulz, F.; Hollmann, F.; Rusek, M.; Reetz, M. T., Light-driven biocatalytic oxidation and reduction reactions: Scope and limitations. *ChemBioChem* **2008**, *9* (4), 565-572.
12. Strohle, F. W.; Cekic, S. Z.; Magnusson, A. O.; Schwaneberg, U.; Roccatano, D.; Schrader, J.; Holtmann, D., A computational protocol to predict suitable redox mediators for substitution of NAD(P)H in P450 monooxygenases. *J Mol Catal B Enzym* **2013**, *88*, 47-51.
13. Verma, R.; Schwaneberg, U.; Holtmann, D.; Roccatano, D., Unraveling Binding Effects of Cobalt(II) Sepulchrate with the Monooxygenase P450 BM-3 Heme Domain Using Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput* **2016**, *12* (1), 353-363.
14. Fladischer, P.; Weingartner, A.; Blamauer, J.; Darnhofer, B.; Birner-Gruenberger, R.; Kardashliev, T.; Ruff, A.J.; Schwaneberg, U.; Wiltschi, B., A Semi-Rationally Engineered Bacterial Pyrrolysyl-tRNA Synthetase Genetically Encodes Phenyl Azide Chemistry. *Biotechnol J* **2019**, *14*, 1800125.
15. Schmidt, S.; Genz, M.; Balke, K.; Bornscheuer, U. T., The effect of disulfide bond introduction and related Cys/Ser mutations on the stability of a cyclohexanone monooxygenase. *J Biotechnol.* **2015** *214*, 199-211.