



## RFT-Projekt: Know How Cluster für Molekulares Engineering von Enzymen

### *Know-how Cluster for Molecular Engineering of Enzymes*

#### Enzyme im Einsatz für Biokatalyse, Diagnostik und medizinische Therapie

Enzyme sind Proteine (Eiweißkörper), die in lebenden Systemen die biochemischen Abläufe steuern, indem sie Reaktionen auf sehr präzise und selektive Art katalysieren. Weiters können Enzyme chemische Reaktionen bei niedrigen Temperaturen und bei milden Milieubedingungen durchführen. Aufgrund dieser Eigenschaften werden Enzyme zu vielfältigen Anwendungen herangezogen. Klassische Beispiele für technische Anwendungen sind der breite Einsatz von Zucker-, Fett- und Protein-spaltenden Enzymen in der Lebensmittelproduktion und bei Waschmitteln. Eine wichtige neue Entwicklung ist der Einsatz von Enzymen in der Chemieproduktion (Biokatalyse). Dadurch können chemische Produkte unter Einhaltung von hohen ökologischen Standards hergestellt werden. Weiters erlauben Enzyme die einfache und kostengünstige Herstellung von chiralen Feinchemikalien, die eine wichtige Basis für die Herstellung von hochwirksamen Medikamenten und Agrochemikalien darstellen. Durch Einsatz von Enzymen in der medizinischen Diagnostik können Substanzen in sehr komplexen Umgebungen wie Blut oder anderen biologischen Proben selektiv analysiert werden. Von großem, derzeit noch wenig genutztem, aber äußerst zukunftssträchtigem Potential ist der Einsatz von Enzymen für therapeutische Zwecke.

#### Enzyme müssen für Anwendungen maßgeschneidert werden (Enzym-Engineering)

Die Natur hat eine nahezu unbegrenzte Vielfalt von Enzymen generiert, die in jedem Organismus tausende biochemische Reaktionen katalysieren. Diese Enzyme sind auf die spezifischen Anforderungen des jeweiligen Lebewesens abgestimmt, deshalb ist es erforderlich Enzyme für Anwendungen spezifisch anzupassen und zu optimieren.

Der Zugang, Eigenschaften von Enzymen zu verändern, liegt in der Erbsubstanz, der DNA. In den Genen ist der Bauplan für Enzyme in Form der spezifischen Nukleinsäuresequenz, und der damit definierten Aminosäuresequenz der Proteine, festgelegt. Mit den Methoden der Gentechnik können die DNA-Abschnitte (Gene), die für ein bestimmtes Enzym kodieren, isoliert werden. Durch Einbau dieser Gene in einfache Produktionsorganismen wie Bakterien oder Pilze wird die effiziente gentechnische Herstellung von Enzymen realisiert.

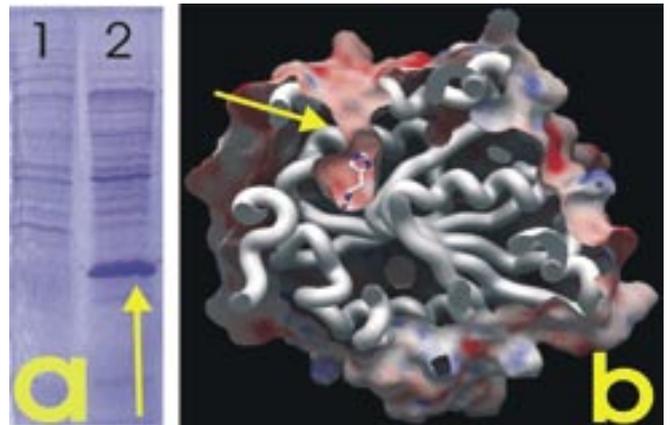
Der Schlüssel zur Beeinflussung der Eigenschaften von Enzymen liegt in der Möglichkeit, die Sequenzen der entsprechenden Gene zu verändern. Die Schwierigkeit dabei ist, in den langen Aminosäuresequenzen die richtigen Ansatzpunkte zu finden. Dazu stehen zwei prinzipielle Wege zur Verfügung:

##### 1) *Molekulare Evolution (directed evolution)*

Bei der ersten Methode wird im Prinzip die Evolution der Natur im Reagenzglas nachvollzogen. Mit Hilfe der modernen DNA-Technologien können evolutionäre Entwicklungen im Labor in extrem kurzen Zeiträumen ablaufen. Wir sind heute in der Lage, in einem Schritt Milliarden von veränderten Enzym-codierenden Genen zu generieren, die dann in effizienten, Roboter-unterstützten Screening- und Selektionsverfahren auf interessante Enzymvarianten durchsucht werden können. Somit können in wenigen Wochen verbesserte neue Enzymvarianten gewonnen werden, die den Anforderungen von (technischen) Anwendungen entsprechen.

##### 2) *Rationales Design*

Die zweite Methode beruht auf umfassenden Kenntnissen über



Aus der Praxis des Enzym-Engineerings:  
a) Analyse der Produktion eines Enzyms durch Gelelektrophorese. Die dicke Bande (Spur 2, Pfeil) stellt ein gentechnisch produziertes pflanzliches Enzym dar, das von rekombinanten Hefezellen in großer Menge hergestellt wird. In Spur 1 sind die Proteine eines nicht-rekombinanten Wildtyp-Hefestamms zu sehen  
b) 3-D Modell eines Enzyms (Schnitt). Der Pfeil zeigt auf eine Engstelle im Zugang zum aktiven Zentrum. Durch gezielten Austausch einer einzigen Aminosäure gegen eine sterisch kleinere Aminosäure konnte ein mutiertes Enzym erhalten werden, das mit einem technisch interessanten Substrat im Vergleich zum natürlichen Enzym eine etwa 5-fach höhere Umsatzrate zeigt. (3-D Modell: Prof. Kratky, KFU Graz)

die Funktionsweise und die Struktur von Enzymen. Durch molekulares Design und Modellierung, gefolgt von punktgenauer Manipulation der entsprechenden Gene können spezifische Enzymvarianten mit vorhergesagten Eigenschaften generiert werden.

#### Derzeitiger Status des Enzym Know-How Cluster der TU Graz

Mit Hilfe der vom RFT bereitgestellten Mittel konnte eine moderne Ausstattung an wissenschaftlichen Geräten beschafft werden. Hervorzuheben sind dabei der Ausbau einer roboterunterstützten Screeningeinheit einschließlich computergesteuerter Bildverarbeitung, einer modernen leistungsfähigen Enzymreinigungsstation, speziellen Analyseneinheiten wie Surface Plasmon Resonanz, sowie moderne Ausstattung für die Züchtung von rekombinanten Mikroorganismen und für gentechnische Arbeiten inklusive einer modernen Sequenzierstation, die als zentrale Serviceeinheit dient.

Es sind bereits mehrere Projekte für molekulares Engineering von Enzymen etabliert, in denen mehrere Institute der TU Graz und externe Partner zusammenarbeiten. Hervorzuheben ist vor allem die Verknüpfung mit dem Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse. Im strategischen Grundlagenprogramm werden neue Methoden für „directed evolution“ etabliert und in mehreren bilateralen Industriekooperationsprojekten konkrete Ansätze zur Verbesserung von Enzymen für die Produktion von Feinchemikalien, Pharmazeutika und Waschmitteln bearbeitet. Ein kürzlich gestartetes internationales Kooperationsprojekt der European Science Foundation (CERC3, FWF) zeigt die internationale Vernetzung.

In den neu geschaffenen Instituten für Molekulare Biotechnologie und für Bioinformatik – Computational Biotechnology wird molekulares Engineering von Enzymen einen wesentlichen Schwerpunkt der zukünftigen Forschung darstellen. Die TU Graz hat nicht zuletzt dem Ausbau dieses Schwerpunkts durch einen Neubau, der Ende März dieses Jahres fertig gestellt wird, Rechnung getragen. Damit sind beste Voraussetzungen für den Aufbau eines international konkurrenzfähigen Know-How Clusters gegeben.

## Know-how Cluster for Molecular Engineering of Enzymes

Apart from classic areas of application for enzymes, like e.g. in food production or cleansing agents, novel developments include the biocatalytic synthesis of chiral (fine) chemicals and the use of enzymes in medical diagnosis and therapy.

Technical and medical applications require the generation of well-adapted and optimized enzyme variants. The key to customized enzyme functions can be found in the genes of their own DNA. The introduction of these genes into bacterial or fungal hosts allows us to establish an efficient recombinant enzyme production, and to alter the gene sequences enables us to alter the enzyme's features. Basically, two methods for the molecular engineering of enzymes are currently available: directed evolution and rational design. Both require highly advanced lab technology and extended interdisciplinary cooperation.

The funding of the project by the Austrian Council for Research and Technology Development (RFT) has enabled us to set up a well equipped lab infrastructure, including robotic equipment and special facilities for analyses, like e.g. surface plasmon resonance. Several projects are well under way, especially our close co-operation with the Competence Center for Applied Biocatalysis and an international project within a European Science Foundation Program. All this, combined with the establishment of the new Institutes of Molecular Biotechnology as well as Bioinformatics - Computational Biotechnology, and new lab facilities about to become available, provides an excellent basis for the establishment of an internationally competitive research unit in this field.

