



## Abschlussbericht für das Max-Buchner-Forschungsstipendium 3339 zum Thema „Natürliche und künstlich fusionierte Styrol Monooxygenasen“

### Kurzfassung

Die Styrol Monooxygenase aus *Variovorax paradoxus* EPS wurde phylogenetisch eingeordnet. Hierbei wurde speziell das Fusionsprotein StyA2B untersucht. Dieses stellt eine natürliche Fusion von Monooxygenase und Reduktase dar und erlaubt unter Verbrauch von NADH, Styrol und molekularem Sauerstoff die Bildung von (S)-Styroloxid (63 mU/mg). Die Fusionsregion wurde durch Mutageneseexperimente verifiziert und erhaltenen Mutanten biochemisch charakterisiert.

### Berichte

Im Rahmen der Berichterstattung ist eine umfassendere Kurzfassung in der Zeitschrift Chemie Ingenieur Technik (DOI: 10.1002/cite.201450048) veröffentlicht und ein zugehöriger Vortrag zum Thema auf der ProcessNet-Jahrestagung und 31. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen in Aachen gehalten worden. Eine Publikation in einem peer-review Journal ist in Arbeit.

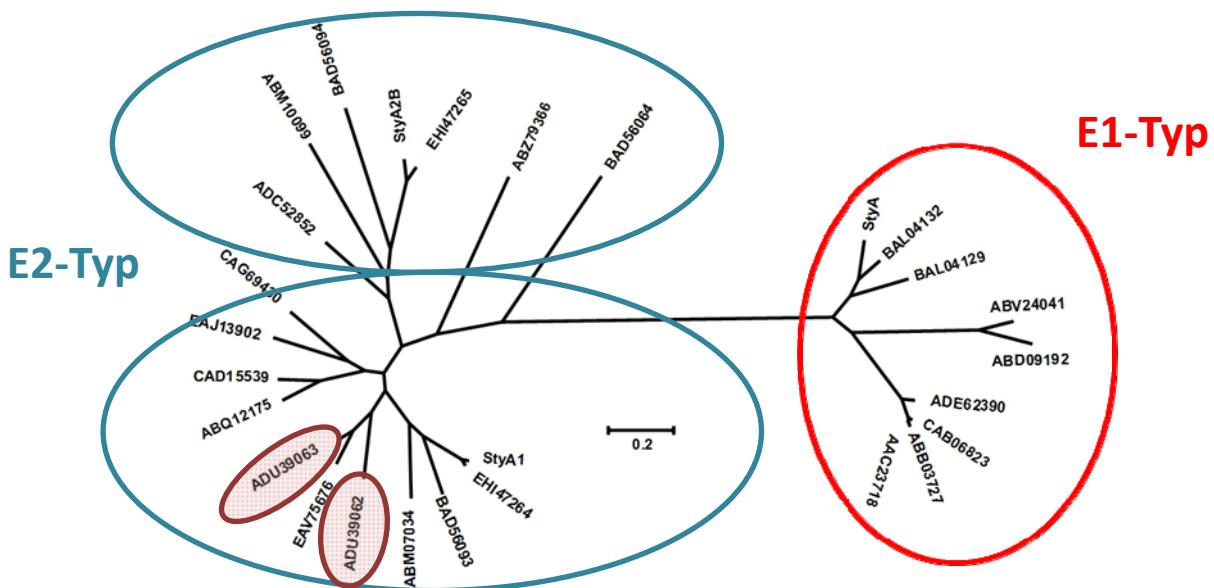
### Einleitung

Die Klasse E der Flavoprotein-Monooxygenasen ist aus biochemischer und biotechnologischer Sicht von besonderem Interesse <sup>[1,2]</sup>. Die Enzymklasse umfasst bisher zwei Typen von Styrol-Monooxygenasen (kurz SMOs; EC 1.14.14.11) <sup>[2,3]</sup>. Die SMOs zeichnen sich durch ein breites Substratspektrum aus, was für die Biokatalyse im industriellen Bereich eine wichtige Grundvoraussetzung darstellt. SMOs setzen i) Styrol und ringssubstituierte Derivate (Cl-, Br-, F-, OH-, CH<sub>3</sub>O-, CH<sub>3</sub>-), ii) am Vinylsystem substituierte Verbindungen ( $\alpha$ -/ $\beta$ - CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-; Dihydronaphthalen, Indole, Inden), iii) aromatische Sulfide (z.B. Thioanisole), iv) heterozyklische Verbindungen (Pyridin-ähnliche Styrole) und v) nicht-konjugierte Alkene (1-Hexen, 1-Allylbenzene) regioselektiv und häufig enantioselektiv um <sup>[2]</sup>.

Die SMOs vom Typ E1 sind typisch für Pseudomonaden und bestehen aus einer Oxygenase-(StyA) und einer Reduktase-Komponente (StyB). Vertreter dieses Typs zeichnen sich durch eine hohe spezifische Aktivität aus (StyA:  $\sim 2 \text{ U mg}^{-1}$ ; StyB:  $\sim 200 \text{ U mg}^{-1}$ ). Die höchste Oxygenierungsrate wird bei Vorliegen eines stöchiometrischen Verhältnisses beider Untereinheiten beobachtet. Dabei verschwendet die Reduktase jedoch viel NADH, welches durch Regeneration (z.B. durch Metabolismus der Wirtszelle) dem Prozess wieder zugeführt werden muss. Diese Entkopplungsreaktion führt zu vermehrter Bildung von reaktivem Wasserstoffperoxid und damit zu oxidativem Stress, welcher sowohl für den Biokatalysator als auch für die Wirtszelle schädlich ist. Ein weiterer Nachteil dieses SMO-Typs liegt in der schlechten Exprimierbarkeit des *styB*-Gens als lösliches und aktives Protein.

Der SMO-Typ E2 wurde erstmals für das Actinobakterium *Rhodococcus opacus* 1CP beschrieben und besteht auch aus zwei Komponenten <sup>[4]</sup>: einer Oxygenase (StyA1) und einem natürlichen

Fusionsprotein (StyA2B). Letzteres besteht seinerseits aus einem Oxygenase- (StyA2) und einem Reduktase-Teil (StyB), welche in Form einer Polypeptidkette verknüpft vorliegen. StyA2B wurde als erste funktionsfähige Ein-Komponenten-SMO nachgewiesen, die ohne weitere Oxygenase Styrol unter NADH-Verbrauch epoxidieren kann. Jedoch ist die spezifische Aktivität mit  $0,02 \text{ U mg}^{-1}$  wesentlich schlechter als die des SMO-Typs E1. Durch Nutzung der zusätzlichen Oxygenase StyA1 wird die Aktivität zwar deutlich erhöht (StyA1/StyA2B;  $0,22 \text{ U mg}^{-1}$ ) liegt aber immer noch um ca. eine Größenordnung unter der des SMO-Typs E1. Der offensichtliche Nachteil des Systems ist daher die niedrige Produktbildungsrate. Auf der anderen Seite ist der Grad an Entkopplung beim Typ E2 geringer als beim E1-Typ, d.h. das System oxygeniert Substrate effizienter. Hinsichtlich der Regio- und Enantioselektivität ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Typen von SMOs.



**Abb. 1: Phylogenetische Unterteilung von SMOs.** Die Prototypen beider SMO-Typen (E1 und E2) sind aufgeführt. Die strikte Trennung der Typen sowie Unterteilung von StyA1 und StyA2B wird deutlich. Die hier untersuchten Proteine aus Stamm EPS sind farbig hinterlegt und es wird klar, dass diese nicht in das generelle Schema passen.

Phylogenetisch können beide SMO-Typen unterschieden werden <sup>[3]</sup>. Dies ist in der Abbildung 1 dargestellt. Typ E1 und E2 bilden jeweils eigne Bereiche in einem Dendrogramm, wobei beim Typ E2 nochmal zwischen StyA1 (Oxygenase) und StyA2B (Fusionsprotein) unterschieden werden kann. Hier fällt auf, dass letzteres nicht für das System aus *Variovorax paradoxus* EPS zutrifft. Es scheinen die beiden Untereinheiten evolutionär betrachtet noch nahe beieinander zu liegen und daher kann man folgern, dass die natürlich Fusion nicht lange zurück liegt <sup>[3]</sup>. Daher scheint es ein idealer Kandidat zu sein, um die Fusionsregion hinsichtlich der Entstehung und auch Einfluss auf die Aktivität des Proteins zu studieren.

## Aufgabenstellung

Ziel des hier beantragten Projektes war es, aktivere und effizientere, künstlich fusionierte SMO-Chimäre mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden zu erzeugen und so den Mechanismus der neuartigen Ein-Komponenten-SMOs besser zu verstehen und auch eine Relation zwischen Linkersequenz und Funktionalität zu erhalten. Dafür sollten künstliche Fusionsproteine (StyALxB) mit natürlichen Fusionsproteinen (StyA2B) kombiniert werden, um so eine optimale Linkersequenz für eine künstliche SMO-Chimäre zu identifizieren. Dazu sollten im Einzelnen folgende Punkte abgearbeitet werden.

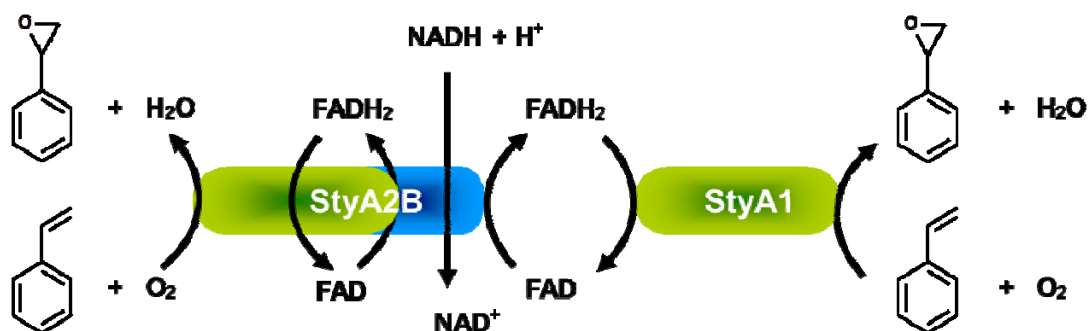
a) Bisher war nur eine natürliche Ein-Komponenten-SMO aus *Rhodococcus* charakterisiert worden<sup>[4]</sup>. Die Arbeiten wurden an unserem Institut durchgeführt und somit stehen entsprechende Plasmide/Klone zur Verfügung. Jedoch ist das StyA2B wenig aktiv und das Codon-Usage nicht ähnlich zu dem der SMOs aus Pseudomonaden. Daher sollte eine weitere Ein-Komponenten-SMO aus *Variovorax paradoxus* EPS (ADU39062; kurz StyA2B\_V) kloniert und biochemisch charakterisiert werden.

b) Die an unserem Institut erfolgreich hergestellten Chimären (*styALxB*) der parentalen Gene (*styA/styB*) aus Stamm *Pseudomonas fluorescens* ST sowie die Gene natürlicher Fusionsproteine (*styA2B*, *styA2B\_V*) sollten mittels PCR und/oder Restriktionsenzymen fragmentiert bzw. mutiert werden, so dass wieder Fusionsproteine vom Typ StyA2B generiert werden könnten. Dabei sollten sich die Mutationen auf die Linkerregion der fusionierten Gene begrenzen.

c) Die hier im Projekt generierten Enzyme sollten bezüglich Ganzzell-Biokatalyse erprobt werden. Dazu sollten stabile Expressions-Konstrukte mit geeigneten Wirten, wie z.B. pET-Vektoren mit *E. coli* BL21, kombiniert und getestet werden. Im Anschluss sollten diverse Expressionsstudien durchgeführt werden und geeignete Klone mit hohem Enzymtiter und hoher biokatalytischer Leistung sollten in der Synthese ausgewählter Verbindungen, wie z.B. (S)-4-Chlorstyroxid, (1S,2R)-Indenoxid, 1,2-Epoxyhexan, Anwendung finden.

## Methoden

Die Gene *styA1\_V* und *styA2B\_V* aus Stamm EPS waren zuvor schon bekannt und wurden in dem Vorhaben per Gensynthese hergestellt und anschließend kloniert. Dazu wurden ausschließlich konventionelle Klonierungs- und Expressionsmethoden sowie Protokolle zur Charakterisierung der Enzyme bzw. Produktanalyse benutzt die bei uns im Labor etabliert und schon publiziert waren<sup>[3,4]</sup>. Im Fall der gezielten Mutagenese der Linkerregion der *styA2B*-Gene wurde auf eine zweistufige Methode zurückgegriffen (analog dem GeneMorph II Random Mutagenesis Kit von Agilent). In einer ersten PCR mit dem Elterngen als Template wurden ein degenerierter Primer mit der neu einzubringenden Sequenz für die Linkerregion und ein zweiter Primer passend für die C-terminale Seite des Gens benutzt. Das Produkt dieser PCR war ca. 500-Bp groß und konnte anschließend über ein Agarosegel gereinigt werden. Dieses gereinigte Produkt mit der neuen Linkersequenz wurde als Megaprimer in eine zweite PCR eingesetzt, in der das parentale Expressionsplasmid mit dem ursprünglichen Wildtyp-Gen als Template diente. So konnten zügig große Bereich der Linkersequenz mutiert und schnell neue Expressionsplasmide für die Mutanten generiert werden. Die erhaltenen Gene mit Mutationen in der Linkersequenz, welche auf zuvor erzeugten künstlichen Fusionsproteinen beruht, wurden exprimiert und entsprechend biochemisch charakterisiert.



**Abb. 2: Prinzipieller Mechanismus der E2-Typ SMO.** Die Reduktase (StyA2B) verwendet NADH um FAD zu reduzieren. Und dies kann dann von beiden Monooxygenasen (StyA1 und StyA2B) genutzt werden, um den molekularen Sauerstoff zu aktivieren und damit Styrol zu epoxidieren.

## Ergebnisse

Gensynthese und Klonierung zu den Wildtyp-Genen *styA1\_V* und *styA2B\_V* waren erfolgreich. Die Proteine StyA1\_V und StyA2B\_V wurden anschließend in rekombinanter Form (N-terminaler His-Tag: Ni-Chelatchromatographie und Gelfiltration) gewonnen. Gemäß bekannter Prozeduren und allgemeiner Funktion der Aktivität dieser Enzyme (Abb. 2) wurden dies dann charakterisiert <sup>[4]</sup>.

Die Reduktase des Fusionsproteins StyA2B\_V zeigte eine höhere Aktivität als die des Prototyps StyA2B aus *Rhodococcus opacus* 1CP (Tabelle 1). Das Protein ist spezifisch für NADH als Elektronendonator und akzeptiert neben FAD noch FMN und Riboflavin als Elektronenakzeptor. Es gibt zudem erste Hinweise auf einen Ping-Pong-Mechanismus, was jedoch in weiteren Experimenten zu bestätigen ist. Dies unterscheidet das Enzym von E1-Typ SMO-Reduktasen <sup>[1,2]</sup>.

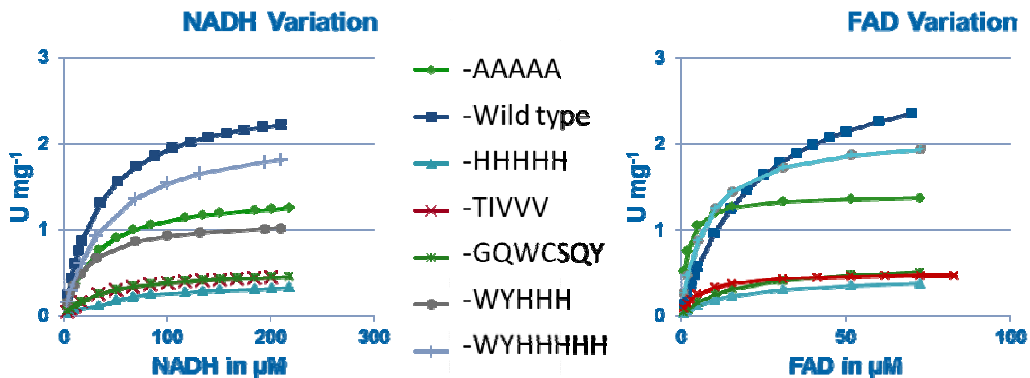
**Tabelle 1: Kennzahlen der Reduktasekomponente von StyA2B\_V aus Stamm EPS.**

| Donor<br>[μM] | Akzeptor<br>[μM]  | $K_m$<br>[μM] | $V_{max}$<br>[U mg <sup>-1</sup> ] | $k_{cat}$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $k_{cat} K_m^{-1}$<br>[s <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> ] |
|---------------|-------------------|---------------|------------------------------------|---------------------------------|---|
| NADH (9-150)  | FAD (70)          | 24.0 ± 4.0    | 16.2 ± 0.8                         | 17.9 ± 0.9                      | 0.72  |
| NADPH (200)   | FAD (56)          | n.d.          | n.d.                               | /                               | /   |
| NADH (160)    | FAD (60-79)       | 33.6 ± 4.0    | 20.2 ± 1.0                         | 22.3 ± 1.1                      | 0.64  |
| NADH (160)    | FMN (4-80)        | 45.9 ± 6.8    | 26.0 ± 1.8                         | 28.7 ± 1.9                      | 0.57  |
| NADH (160)    | Riboflavin (6-88) | 37.7 ± 7.2    | 31.3 ± 2.7                         | 34.6 ± 2.9                      | 0.88  |

Die Oxygenasen StyA1\_V und StyA2B\_V konnten auch erfolgreich charakterisiert werden. Wie erwartet setzten beide Enzyme Styrol zum Styroloxid um (StyA1\_V: 121 mU mg<sup>-1</sup>; und StyA2B\_V: 27 mU mg<sup>-1</sup>). Dazu reicht beiden die Reduktaseaktivität und damit Menge an reduziertem FAD, welches über StyA2B\_V generiert wird. Setzt man zusätzliches StyB ein und erhöht damit den Pool an reduziertem FAD erhöht sich die Aktivität der Oxygenase von StyA2B\_V (63 mU mg<sup>-1</sup>). Letzteres wurde damit erstmals für die E2-Typ SMOs gezeigt. Neben Styrol werden auch andere Substrate, wie Thioanisole und Indole, umgesetzt. Hier ist bemerkenswert das bis zu 35-fach höhere Sulfoxidationsraten im Vergleich zur normalen Styrolepoxidierung ermittelt wurden. Sulfide sind allerdings unnatürliche Substrate und geben daher keine Hinweise auf die natürliche Funktion von StyA2B-ähnlichen Enzymen <sup>[2,3]</sup>.

Die Identifikation der Linkersequenz wurde zunächst durch Alignments mit Sequenzen von E1- und E2-Typ SMOs auf Basis früher publizierter Arbeiten vorangetrieben <sup>[3,4]</sup> (nicht gezeigt). Es konnte recht schnell eine Region identifiziert werden, wo die eigentliche Oxygenaseeinheit aufhört und die Reduktaseeinheit beginnt. Der Bereich dazwischen (Aminosäurepositionen von 408 bis 412) wird daher als Linkersequenz (AREAV) bezeichnet. Diese Region wurde dann einer gerichteten Mutagenese (siehe Methoden) unterzogen und es wurden die folgenden Varianten erzeugt. Anstelle von AREAV wurden die Aminosäuresequenzen TIVVV, AAAAA, HHHHH, WYHHH, WYHHHHH und GQWCSQY eingefügt. Diese wurden auf Basis von Erfahrungen mit der Erzeugung künstlicher Fusionsproteine aus StyA und StyB ausgesucht. Die Erzeugung der Mutanten (hier 6 künstliche Varianten der Linkersequenz) wurde gemäß den zuvor genannten Methoden erfolgreich durchgeführt. Die erhaltenen Plasmide für die Expression der Mutanten wurden via Sequenzierung überprüft und dann zu Expressionsstudien eingesetzt. Alle Proteine wurden erfolgreich gebildet, was an der Indigobildung bei der Expression zu erkennen war <sup>[4]</sup>.

Die erzeugten Mutanten wurden wie der Wildtyp angereichert (nur Ni-Chelatchromatographie) und biochemisch untersucht. Die Reduktaseaktivitäten waren etwas geringer als bei der aufwendigeren Reinigung (oben), jedoch untereinander gut vergleichbar (Abb. 3). Alle Mutanten zeigten eine niedrigere Aktivität jedoch auch geänderte Affinitäten zu den Substraten. Im Fall von NADH war die Bindung immer schwächer im Vergleich zum Wildtyp-Protein, welches im Allgemeinen die schlechteren Raten erklären kann. Der Cofaktor FAD wurde jedoch von allen Mutanten deutlich affiner gebunden als vom Wildtyp. Damit wird klar, dass Linkersequenz und somit die Fusion einen drastischen Effekt auf die Reduktaseeigenschaften hat. Die AAAAA-Mutante ist hervorzuheben mit einem besonders niedrigen  $K_m$ -Wert für FAD von kleiner 2  $\mu\text{M}$  (Vergleich mit Tabelle 1 und 2).



**Abb. 3: Reduktaseaktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.** Es wurden die Aktivitäten in Abhängigkeit der NADH bzw. FAD Konzentration bestimmt wobei der zweite Cofaktor dann jeweils im Überschuss vorhanden war. Die Messreihen der Enzyme wurden nach Michaelis-Menten ausgewertet (siehe Tabelle 2).

**Tab. 2: Aktivitäten der einfach angereicherten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.**

| Enzym   | Epoxidaserate<br>[ mU mg <sup>-1</sup> ] | Reduktaserate<br>[ U mg <sup>-1</sup> ] | $K_m$ (NADH)<br>[ $\mu\text{M}$ ] | $K_m$ (FAD)<br>[ $\mu\text{M}$ ] | Indigobildung |
|---------|--|---|-----------------------------------|----------------------------------|---------------|
| Wildtyp | 159                                      | 2,582                                   | 34                                | 22                               | ++            |
| TIVVV   | 135                                      | 0,527                                   | 38                                | 5                                | +             |
| AAAAA   | 260                                      | 1,41                                    | 28                                | 2                                | +++           |
| HHHHH   | > 1                                      | 0,408                                   | 44                                | 15                               | +             |
| WYHHH   | 2  | 1,114                                   | 20                                | 3                                | +             |
| WYHHHHH | > 1                                      | 2,166                                   | 40                                | 2                                | +             |
| GQWCSQY | > 1                                      | 0,019                                   | 47                                | 15                               | +             |

Die Epoxidaseaktivitäten der Mutanten wurden auch im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Tabelle 2). Es wurden für alle Mutanten Aktivitäten ermittelt (Styrol- und Indol-Umsätze). Jedoch ist auffällig, dass nur Enzyme mit kurzen hydrophoben Resten in der Linkerregion relativ hohe Werte erzielten. Größere und geladene Reste scheinen die korrekte Faltung und damit Aktivität zu beeinträchtigen, und dies im speziellen bei der Epoxidaseeinheit von StyA2B\_V. Daher ist klar, dass die Linkerregion auch einen deutlichen Effekt auf die Monooxygenase hat. Auch hier ist die

AAAAA-Mutante hervorzuheben, welche mit  $260 \text{ mU mg}^{-1}$  eine deutlich höhere spezifische Aktivität als der Wildtyp aufweist.

Die biotechnologische Nutzung der hier untersuchten Enzyme aus Stamm EPS wurde hinsichtlich selektiver Epoxidierung, Sulfoxidierung und Indigobildung untersucht. Die Enzyme eignen sich hervorragend als Biokatalysatoren. Detaillierte Angaben zu untersuchten Substraten und damit generierten Produkten können nicht gemacht werden, da es diesbezüglich einen Interessenkonflikt gibt. Es kann jedoch festgehalten werden, dass nahezu alle Substrate, welche in der Einleitung genannt wurden, umsetzbar sind.

## Zusammenfassung

Die Wildtyp-Enzyme StyA1\_V und StyA2B\_V wurden erfolgreich gewonnen in Form rekombinanter Proteine und über Nickel-Chelatchromatographie angereichert. Diese hatten eine mit  $0,121 \text{ U mg}^{-1}$  bzw.  $0,063 \text{ U mg}^{-1}$  vergleichbare Epoxidaseaktivitäten wie die Prototypen aus *Rhodococcus opacus* 1CP. Damit wurde erstmals eine E2-Typ SMO aus Proteobakterien charakterisiert.

Die Linkerregion im Fusionsprotein StyA2B wurde auf bioinformatischem Weg identifiziert (Position 408 bis 412) und es wurden 6 verschiedene künstliche Linkersequenzen via Mutagenese erzeugt. Alle Mutanten waren aktiv. Diese Region beeinflusst sowohl Reduktase- als auch Oxygenase Aktivität des Fusionsproteins. Die Reduktaseaktivität war im Allgemeinen etwas geringer als die des Wildtyp-Enzyms aber noch ausreichend um die fusionierte Oxygenase zu versorgen. Bei allen Mutanten wurde eine höhere Affinität zu FAD detektiert, was förderlich für die Effizienz sein kann. Andererseits waren nur geringe Effekte auf das Binden von NADH ermittelt worden. Auf der Seite der Oxygenase waren nur die Mutanten mit kleinen hydrophoben Resten ähnlich aktiv wie der Wildtyp. Bemerkenswert war hier das die AAAAA-Mutante eine höhere Epoxidierungsrate bei geringerer Reduktaseaktivität wie der Wildtyp aufwies. So ist das Ziel eine aktiviere und effizientere Chimäre zu generieren gelungen. Mutanten mit größeren oder geladenen Resten in der Linkerregion waren kaum oxygenaseaktiv. Dies legt den Schluss nahe, dass die Linkerregion für die Ausrichtung und die effiziente Faltung der StyA2B-Proteine und damit deren Aktivität entscheidend ist. Das Fehlen von strukturellen Daten ist hier ein großes Hindernis, um diese Erkenntnisse weiter aufzubereiten und bessere Biokatalysatoren zu erzeugen.

## Ausblick

Die Linkersequenz in StyA2B\_V aus Stamm EPS wurde erfolgreich detektiert und es konnte durch einbringen von Aminosäuren mit kleinen hydrophoben Seitenketten eine höhere Aktivität und auch Effizienz des Systems gezeigt werden. Die Länge des Linkers sollte noch optimiert werden, um noch aktiviere Mutanten zu generieren. Auch ein Austausch der Oxygenaseuntereinheit gegen die eines Typ-E1 SMO-Systems wäre denkbar. Informationen zum Mechanismus des Enzyms wurden gefunden und können durch weitere biochemische bzw. strukturelle Studien untermauert werden.

## Literaturverzeichnis

1. van Berkel, W.J.H., N.M. Kamerbeek, M.W. Fraaije. 2006. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124:670-689.
2. Montersino, S., D. Tischler, G.T. Gassner, W.J.H. van Berkel. 2011. Catalytic and structural features of flavoprotein hydroxylases and epoxidases. *Adv. Synth. Catal.* 353:2301-2319.
3. Tischler, D., J.A.D. Gröning, S.R. Kaschabek, M. Schlömann. 2012. One-component styrene monooxygenases: an evolutionary view on a rare class of flavoproteins. *Appl. Biochem Biotechnol.* 167:931-944.
4. Tischler, D., D. Eulberg, S. Lakner, S.R. Kaschabek, W.J.H. van Berkel, M. Schlömann. 2009. Identification of a novel self-sufficient styrene monooxygenase from *Rhodococcus opacus* 1CP. *J. Bacteriol.* 191:4996-5009.