

**Protein Engineering von P450-
Monooxygenasen
zur selektiven Hydroxylierung von
cyclischen und acyclischen Alkanen**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Evelyne Weber
geboren in Emmendingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.2011

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2011

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Weber, E., Sirim, D., Schreiber, T., Thomas, B., Pleiss, J., Hunger, M., Gläser, R., Urlacher, V. B. (2009). „Immobilization of P450 BM-3 on mesoporous molecular sieves.“ *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **64**: 29-37.

Weber, E., Seifert, A., Antonovici, M., Geinitz, C., Pleiss, J., Urlacher, V. B. (2011). “Screening of a minimal enriched P450 BM-3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes.” *Chem Commun (Camb)*. **47**(3): 944-946.
<http://dx.doi.org/10.1039/C0CC02924F>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 18.04.2011 _____

(Evelyne Weber)

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer und Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung der besonderen Thematik und die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit an ihrem Institut anfertigen zu können.

Mein herzlichster Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Vlada B. Urlacher für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit sowie zahlreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Resch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung meiner Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 706. Für die erfolgreiche Zusammenarbeit innerhalb des SFB706 danke ich den Kooperationspartnern:

- Bioinformatik: Prof. Dr. Jürgen Pleiss, Frau Dr. Demet Sirim, Dr. Alexander Steudle und Thomas Hamm für die Unterstützung bei den Elektrostatik Berechnungen der P450 Häm F87A. Dr. Alexander Seifert und Tuan Anh Do für die Unterstützung bei der bioinformatischen Analyse der 2-Octanol-Mutante.

- Technische Chemie: Prof. Dr. Michael Hunger, Prof. Dr. Roger Gläser, Dr. Bejing Thomas, Frau Dr. Daniela Pufky und Tino Schreiber danke ich für die Synthesen meiner Silikate, sowie interessanten Diskussionen über das Thema Immobilisierung.

Frau Prof. Martie Smit danke ich für die freundliche Aufnahme an der „University of the Free State“ in Bloemfontein.

Für das gute Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit danke ich allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Biokatalyse-Gruppe sowie allen Kollegen des Instituts für Technische Biochemie.

Von besonderem Wert waren für mich die Anregungen, Hilfestellungen und die Diskussionsbereitschaft von M. eng. Sven Richter, Dr. Katja Koschorreck, Dr. Marco Girhard, Dr. Holger Beuttler, Anna Maria Romankiewicz, Sumire Honda und Luam Ghebreghiorghis, dafür vielen Dank.

Meiner wissenschaftlichen Hilfskraft Lorena Rodriguez möchte ich sehr herzlich für ihre ständige Bereitschaft danken.

Im familiären Kreis möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern bedanken die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mich tatkräftig durch das Studium begleiteten.

Ein großer Dank an meine Pateneltern Ingeborg und Rüdiger für die Finanzspritze zum 18. Lebensjahr, die ich gut in mein Studium, bis hin zur Doktorarbeit, investiert habe.

Meiner Schwester Sabine danke ich für die gut gefüllten SÜP's (Studenten-Überlebends-Pakete). Bei meinen Neffen Nico und Nevio für gemeinsame Stunden in der Badewanne und ihr Lächeln, das mir jeden Tag versüßte – Danke das es EUCH gibt!

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	19
ZUSAMMENFASSUNG.....	25
ABSTRACT.....	30
1 EINLEITUNG	34
1.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen	34
1.1.1 Nomenklatur.....	35
1.1.2 Struktur und Aufbau von P450-Systemen	37
1.1.3 Elektronentransfersysteme.....	40
1.1.4 Katalysemechanismus	43
1.1.5 Katalysierte Reaktionen	49
1.1.6 Cytochrom P450-Monooxygenasen aus der CYP102A-Familie.....	51
1.1.7 Cytochrom P450-Monooxygenasen aus <i>Candida</i> - Stämmen.....	56
1.2 Protein Engineering	59
1.2.1 Rationales Design	59

1.3 Enzymatische Oxidation linearer und cyclischer Alkane	60
1.3.1 Lineare Alkane	62
1.3.2 Cyclische Alkane	68
1.3.3 Enzyme aus Hefen für die Oxidation von Alkanen	71
1.4 Enzymimmobilisierung	74
1.5 Zielsetzung	76
2 MATERIAL UND METHODEN.....	78
2.1 Chemikalien und Enzyme	78
2.2 Geräte und Verbrauchsgegenstände	81
2.3 Stämme, Oligonukleotide, Plasmide	83
2.3.1 Bakterienstämme	83
2.3.2 Hefestämme	84
2.3.3 Oligonukleotide.....	85
2.3.4 Verwendete Plasmide	92
2.4 Medien, Lösungen und Puffer.....	93
2.4.1 Medien	93

2.4.2	Puffer und andere Lösungen.....	96
2.5 Molekularbiologische Methoden		104
2.5.1	Isolation von Plasmid-DNA.....	104
2.5.2	Gewinnung von genomischer DNA aus <i>Candida apicola</i>	104
2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA.....	105
2.5.4	Genom Walking zur Sequenzanalyse der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus <i>Candida apicola</i>	107
2.5.5	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	109
2.5.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	109
2.5.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	110
2.5.8	Enzymatische Verfahren zur Ligation von DNA-Fragmenten.....	110
2.6 Mikrobiologische Methoden.....		111
2.6.1	Stammhaltung und Kultivierung.....	111
2.6.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	112
2.6.3	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> -Zellen durch Elektroporation	113
2.6.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	114

2.6.5	Heterologe Proteinexpression	115
2.7	Präparative Methoden.....	117
2.7.1	Zellaufschluss von Expressionskulturen.....	117
2.7.2	Isolierung mikrosomaler Fraktionen von exprimierten CYP52E-Genen in <i>E. coli</i> -Zellen	119
2.7.3	Proteinaufreinigung des BM3H_F87A Proteins mit der IMAC-Methode	120
2.7.4	Immobilisierung	121
2.8	Analytische Methoden	124
2.8.1	Messung der P450-Konzentration mittels CO- Differenzspektrometrie	124
2.8.2	Test der Reduktase-Aktivität mit Hilfe des Substrats Cytochrom c	125
2.8.3	Proteinbestimmung mit dem Bradford-Reagenz.....	126
2.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	126
2.8.5	Der <i>para</i> -Nitrophenoxydodecansäure-Test (12- <i>p</i> NCA)	127
2.9	Oxidation von Substraten	127
2.9.1	Das acyclische Alkan <i>n</i> -Octan.....	127
2.9.2	Die zyklischen Alkane C8, C10, C12.....	129

2.9.3	Umsetzung von Laurinsäure mit dem CYP52E-Enzym und verschiedenen Reduktasen	130
3	ERGEBNISSE	132
3.1	Hydroxylierung von acyclischen und cyclischen Alkanen durch P450 BM-3-Mutanten.....	132
3.1.1	Acyclische Alkane	132
3.1.2	Cyclische Alkane	140
3.2	Klonierung, Expression und Charakterisierung von P450-Monooxygenasen aus <i>Candida apicola</i>.....	147
3.2.1	Identifizierung und Charakterisierung von NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus <i>C. apicola</i>	148
3.2.2	Cytochrom P450-Gene: CYP52E1 und CYP52E2	159
3.2.3	Aktivitätsanalyse des CYP52E1-Enzyms mit verschiedenen Reduktasen.....	167
3.3	Immobilisierung der P450 BM-3 Häm-Domäne F87A	168
3.3.1	Häm-Domäne von P450 BM3H_F87A	169

3.3.2	Charakterisierung der eingesetzten Silikate zur Immobilisierung	171
3.3.3	Untersuchungen zur Immobilisierung	175
3.3.4	Vergleichende Aktivitätsanalyse von freiem und immobilisiertem BM3H_F87A	181
4	DISKUSSION.....	186
4.1	Hydroxylierung von acyclischen und cyclischen Alkanen mit Hilfe von P450-Monooxygenasen	187
4.1.1	Herstellung von 2-Octanol	187
4.1.2	Umsetzung der cyclischen Alkane durch P450 BM-3-Mutanten	190
4.2	Sequenzanalyse, Expression und Charakterisierung von Cytochrom P450-Systemen aus <i>Candida apicola</i>	193
4.2.1	NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR)	193
4.2.2	Cytochrom P450-Gene: CYP52E1 und CYP52E2	194
4.2.3	Aktivitätstests mit CYP52E-Enzym und verschiedener CPRs	198

4.3 Immobilisierung der P450 BM-3 Häm-	
 Domäne F87A	199
4.3.1 Untersuchungen der Immobilisierungsbedingungen	199
4.4 Ausblick.....	202
5 LITERATURVERZEICHNIS.....	203
LEBENS LAUF.....	125

Abkürzungsverzeichnis

2S	2 Schwefelatome
3D	Dreidimensional
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Å	Ångström
Ω	Ohm (elektrischer Widerstand)
∞	Unendlich
°C	Grad Celsius
*g	Erdbeschleunigung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BM3H_F87A	P450 BM-3 Häm-Domäne F87A
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>C. apicola</i>	<i>Candida apicola</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CPR	NADPH-Cytochrom P450-Reduktase
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DEAD	Säulen-Zellulose
dH ₂ O	einfach deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
d _p	Porendurchmesser
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	Enantiomerenüberschuss
engl.	englisch
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
F	Farad (elektrische Kapazität)
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fe	Ferrum (lateinisch: Eisen)
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinadeninmononukleotid
g	Gramm
GC	Gas-Chromatographie
GC-MS	Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
<i>in silico</i>	Vorgänge, die im Computer ablaufen
<i>in situ</i>	Untersuchung eines Prozesses in einer präparierten Umgebung

<i>in vitro</i>	organische Vorgänge, die außerhalb des lebenden Organismus stattfinden (z.B. im Reagenzglas)
<i>in vivo</i>	Prozesse, die im lebenden Organismus ablaufen
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITB	Institut für Technische Biochemie
k	Kilo
Kan	Kanamycin
k_{cat}	Wechselzahl
KCl	Kaliumchlorid
K_M	Michaelis-Menten
KP_i	Kaliumphosphat
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar (1 mol l^{-1})
mA	Milliampere
MCM	Mobil's Composition of Matter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (1 mmol l^{-1})
m/V	Masse/Volumen
n	Nano (10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid

NAD(P)H	β -Nicotinamidadenin-dinukleotid- (-phosphat)
OD _{XYZ}	optische Dichte bei einer Wellenlänge XYZ
P450	Pigment bei 450 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzmischung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>pI</i>	isoelektrischer Punkt eines Proteins
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
pmol	Pikomol (1 pmol l ⁻¹)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NCA	<i>para</i> -Nitrophenoxycarbonsäure
s	Sekunde(n)
SBA	Santa Barbara
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TMS	Trimethylsilyl

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
XRD	Röntgenbeugung (X-Ray Diffraction)
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
YNB	Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren
YPD	Hefe-Pepton-Dextrose
ϵ	Extinktionskoeffizient
μ	Mikro (10^{-6})

DNA-Basen

A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin

Nukleotid-Substitutionskürzel für degenerierte Primer

B = C, G, T	H = A, C, T
K = T, G	M = A, C
N = A, C, G, T	R = A, G
S = C, G	V = A, C, G
W = A, T	Y = C, T

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Selektivoxidation nicht-aktivierter Kohlenstoffatome ist ein weitgehend ungelöstes Problem in der synthetischen Chemie. Eine Aufgabe dieser Dissertation bestand darin, Enzyme zu finden und zu optimieren, die das lineare Alkan *n*-Octan selektiv, vorzugsweise in subterminaler(n) Position(en), hydroxylieren. Das enantiomeren-reine Endprodukt 2-Octanol wird häufig als Grundstoff in der Industrie zur Herstellung von Estern, pharmazeutischen und kosmetischen Artikeln, sowie für Lebensmittelzusätze verwendet. Als Katalysator für diese Reaktion wurden Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs) ausgewählt, die die Fähigkeit besitzen molekularen Sauerstoff auf ein Substratmolekül, unter der Aufnahme von zwei Elektronen, zu übertragen. Das andere Sauerstoffatom tritt bei der Reaktion in Form von Wasser aus. Die Elektronen für die Katalyse stammen von Kofaktoren (meist NADH oder NADPH) und werden mittels Elektronentransferproteinen auf das Hämeisen von P450-Monooxygenasen übertragen. Eine weitere Thematik dieser Dissertation behandelte die enzymatische Hydroxylierung der im Erdöl vorkommenden Cycloalkane C₈, C₁₀ und C₁₂. Die dafür verwendeten P450-Monooxygenasen sind prokaryotischen (*Bacillus megaterium*) und eukaryotischen (*Candida apicola*) Ursprungs. Im Dritten und somit letzten Kapitel der vorgelegten Dissertation wurde die Stabilisierung einer P450-Monooxygenase Häm-Domäne durch Immobilisierung auf unterschiedlichen mesoporösen Silikaten untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das P450-Enzym CYP102A1 aus *B. megaterium*, kurz auch P450 BM-3 genannt, untersucht. Die wichtigsten Aspekte, warum P450 BM-3 das Enzym der Wahl wurde, ist die Löslichkeit des exprimierten Proteins, lokalisiert im Cytosol, sowie die Fusion der benötigten Reduktase (FMN/FAD) an der P450 Häm-Domäne. Dank jahrelanger Forschung ist die P450 BM-3 sehr gut untersucht und die Sequenz- und Kristallstruktur-Informationen bekannt. Viele Mutationen, und deren Bezug zur Änderung der Substratspezifität sind aus der Literatur bekannt und geben Anhaltspunkte beim Protein Engineering. Mutationen an den Aminosäuren-Positionen F87, I263 und A328 des P450 BM-3-Enzyms resultierten in der gewünschten selektiven Hydroxylierung des *n*-Octans an subterminaler (ω -1) Position mit bis zu 92 % 2-Octanol-Produkt. Aufgrund der Chiralität an subterminaler Position wurde ebenfalls die Bildung von Enantiomeren betrachtet. Die Dreifachmutante F87V I263R A328F produzierte (*R*)-2-Octanol mit 60 % ee, die I263G-Mutante bildet hauptsächlich (*S*)-2-Octanol mit 80 % ee.

Eukaryotische P450-Enzyme aus *Candida*-Stämmen besitzen gleichermaßen die Fähigkeiten der (sub-)terminalen Hydroxylierung, weshalb ebenso diese Systeme untersucht wurden. Die Membran-assoziierten CYP52E1 und CYP52E2 aus *C. apicola* wurden zum ersten Mal in *E. coli* in funktioneller Form exprimiert. Beide P450-Monooxygenasen benötigen für die Aktivität eine NADPH-Cytochrom

P450-Reduktase (CPR). Mittels der „Genom-Walking“-Strategie, ist es gelungen, ein CPR-Gen zu identifizieren, zu klonieren und in *E. coli* zu exprimieren. Beide Enzyme wurden exprimiert (CYP52E1 inaktive, CYP52E2 aktive Form), jedoch konnte kein Zusammenspiel der exprimierten Enzyme mit der exprimierten Reduktase beobachtet werden.

Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war die inerten und sperrigen Cycloalkanen (C8, C10, C12) zu hydroxylieren. Bisher sind nur zwei Enzyme mit der Fähigkeit Cyclohexan (C6) umzusetzen bekannt: P450balk aus *Alcanivorax borkumensis* und eine Mutante der P450 BM-3. Den Abbau größerer Cycloalkane, wie Cyclodecan und Cyclododecan, sind weniger gut erforscht. Aufgrund dessen, dass Cyclohexan von einer P450 BM-3-Mutante hydroxyliert werden konnte, wurde ebenfalls, für die Untersuchung der Cycloalkane im Rahmen dieser Arbeit, die P450 BM-3 gewählt. Dafür wurde in einer Zusammenarbeit mit der Bioinformatik-Gruppe am ITB eine „minimale“ Mutantenbibliothek erstellt, fokussiert auf drei Aminosäure-Positionen (F87, I263, A328), an denen ein Austausch mit fünf verschiedenen Aminosäuren durchgeführt wurde. Während der BM-3-Wildtyp die untersuchten Cycloalkane nur minimal (C8 = 8 %; C10 = 3 %) oder gar nicht (C12) umsetzt, brachten schon kleine Veränderungen in der Substratbindetasche eine starke Aktivitätssteigerung. Die Verkleinerung des großen Phenylalanin-Rests an Position 87 zu Alanin führte zu einer 65 %igen Umsetzung von Cyclooctan. Der Umsatz

konnte wiederum durch eine weitere Mutation, A328I oder A328F, auf sogar 90 % (z. B. Cyclooctan) gesteigert werden. Die Einzelmutante F87V zeigte ebenfalls einen Cyclooctan-Umsatz bis zu 90 %. Die Einführung des kleineren Alanin an Position 87 führte auch bei der Umsetzung des 2 C-Atome größeren Cycloalkan, Cyclodecan, zu 60 % Umsatz. Durch die Doppelmutation F87A A328I konnte der Cyclodecan-Umsatz auf 70 % gesteigert werden. Das größte Cycloalkan, Cyclododecan, wurde erst nach dem Austausch des Phenylalanins an Position 87 durch Alanin durch P450 BM-3 oxidiert. Den höchsten Umsatz von 46 % erzielte jedoch wieder eine Doppelmutante, F87A A328V.

Da Alkane in großer Konzentration P450-Enzyme beschädigen können, was letztendlich zu einer verringerten Produktivität führt, wurde ferner die Stabilisierung des Enzyms durch Immobilisierung auf verschiedenen mesoporösen Silikaten untersucht. Als Enzym wurde auch hier die P450 BM-3 verwendet, jedoch diesmal nur die 80 x 70 x 60 Å große Häm-Domäne (BM3H). Aufgrund der nun fehlenden Reduktase-Domäne wurde die Häm-Domäne ortsspezifisch mutiert, F87A, damit diese die Elektronen vom Kofaktor Wasserstoffperoxid akzeptiert. Die verwendeten Silikate unterschiedlicher Porengröße (25-133 Å) und Wanddicke wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Roger Gläser (Universität Leipzig) und Herrn Prof. Dr. Michael Hunger (Universität Stuttgart) synthetisiert und charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Größe der Pore

mindestens die Größe des Enzymdurchmessers besitzen muss, um eine Bindung des Enzyms in den Poren zu ermöglichen. Die Enzymkonzentration, sowie Immobilisierungsvolumen spielen ebenfalls eine Rolle bei der Immobilisierung, sowie der Art der Durchmischung und pH-Wert der Enzymlösung. Aktivitätstests mit dem Surrogatsubstrat 12-*p*NCA zeigten spezifische Aktivitäten von 1 % (MCM-41; $d_p = 25 \text{ \AA}$), 10 % (SBA-15; $d_p = 60 \text{ \AA}$) und bis zu 76 % (SBA-15; $d_p = 133 \text{ \AA}$), im Vergleich zum freien BM3H_F87A. Die Reaktion mit dem immobilisierten Enzym und dem Substrat *n*-Octan wies eine doppelte Umsatzmenge im Vergleich zum *n*-Octan-Umsatz mit freiem Enzym auf, obwohl die Anfangsgeschwindigkeiten ähnlich waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die immobilisierte BM3H_F87A eine höhere Stabilität in Anwesenheit des *n*-Octans besitzt als freies Enzym in der Lösung.

Abstract

Selective oxidation of non-activated carbon atoms still remains an unsolved issue in synthetic chemistry. The major object of this thesis was to detect and optimize enzymes, which selectively hydroxylate the linear alkane *n*-octane, preferably in the subterminal position(s). The important chiral intermediates such as (*R*)- or (*S*)-2-octanol are widely used as a raw material in industry for the production of esters, pharmaceutical, cosmetics, and food additives. Since cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) have the ability to introduce molecular oxygen into vast variety of organic molecules, they were applied as biocatalysts. The second oxygen atom is reduced to water. The electrons which are required for this reaction are derived from the cofactors (mostly NADH or NADPH) and transferred to the heme iron of CYPs via electron transfer proteins. Another theme of this thesis dealt with the enzymatic hydroxylation of the oil occurring cycloalkanes C8, C10 and C12. The incorporated P450 systems have their origin in prokaryotic (*B. megaterium*) and eukaryotic (*C. apicola*) organisms. In the final chapter of the dissertation the immobilization of a P450 monooxygenase heme domain on different mesoporous silicates was investigated.

Within this work the best characterized and widely applied P450 enzyme CYP102A1 from *B. megaterium*, also known as P450 BM-3, and its mutants were investigated for oxidation of cyclic and acyclic alkanes in detail. P450 BM-3 is a cytosolic soluble fusion

flavocytochrome consisting of heme and FMN/FAD-containing reductase domains. Several crystal structures of P450 BM-3 with and without ligand are available, building the background for protein engineering. Wild type P450 BM-3 is able to hydroxylated *n*-octane with very low activity, but produces a mixture of secondary alcohols. Replacements at positions 87, 263 and 328 of P450 BM-3 led to the mutants with desired selectivity towards ω -1 position. The best mutant (F87V A328F) produces up to 92 % 2-octanol product. Further the formation of enantiomers was considered as well. The triple mutant F87V I263R A328F produced (*R*)-2-octanol with 60 % *ee*, the I263G mutant is mainly (*S*)-2-octanol with 80 % *ee*.

It is known from literature, that eukaryotic P450 enzymes from some *Candida* strains are also able to hydroxylate fatty acids at ω -1 position. Therefore two P450s CYP52E1 and CYP52E2 from *C. apicola* were investigated as well. For the first time these membrane-associated P450s were cloned and expressed in functional form in *E. coli*. Both P450 monooxygenases require for the activation of molecular oxygen electrons from a NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR). By means of the “genome walking”, it was possible to identify a CPR gene, to clone and express it in *E. coli*. Although the CPR was expressed in functional form and demonstrate reducing activity towards cytochrome c, no interaction of the recombinant CYP52E1 and CYP52E2 enzymes with the reductase could be observed.

The further task of this study was to hydroxylate the inert and bulky cycloalkanes (C8, C10, C12). So far, only two enzymes with the ability to convert cyclohexane (C6) are known: P450balk from *Alcanivorax borkumensis* and a mutant of P450 BM-3. The degradation of larger cycloalkanes, such as cyclodecane and cyclododecane, are less well characterized. In order to study the hydroxylation of cycloalkanes, P450 BM-3 was applied, since a P450 BM-3 mutant is capable for this reaction. A minimal enriched P450 BM-3 mutant library was previously constructed by combining five hydrophobic amino acids (alanine, valine, phenylalanine, leucine and isoleucine) in two positions, 87 and 328, located directly above the heme group. For the BM-3 wild type of the cycloalkanes only a minimal (C8 = 8 %, C10 = 3 %) or no (C12) conversion could be observe, but even small changes in the substrate binding pocket resulted in a strong increase in activity. The replacement of the large phenylalanine residue at position 87 to a smaller alanine and the mutation at position A328 (A328I, A328F) led to 90 % cyclooctane conversion. The single mutant F87V also showed a cyclooctane conversion up to 90 %. The double mutante F87A A328I convert the 2 carbon atoms larger cycloalkane, cyclodecane, to 70 %. The largest cycloalkane, cyclododecane, was only oxidized by the P450 BM-3 F87A mutant. The highest turnover rate of 46 % again was achieved by a double mutant, F87A A328V.

Since alkanes in high concentrations may damage P450 enzymes, and therefore lead to reduced productivity, the immobilization of the isolated

heme domain of P450 BM-3 F87A (BM3H_F87A) on two mesoporous silicates, MCM-41 (pore diameter 25 Å) and SBA-15 (pore diameter 60 Å and 133 Å) was examined. The silicates of different pore sizes and wall thickness were synthesized and characterized by X-ray diffraction and nitrogen adsorption analyses before and after immobilization by Prof. Dr. Roger Glaeser (University of Leipzig) and Prof. Dr. Michael Hunger (Universitaet Stuttgart). The results revealed that the immobilization efficiency on MCM-41 and SBA-15 after single immersion was influenced by the pH value of the enzyme solution, initial enzyme concentration and agitation conditions. By modelling the 3D structure *in silico* and performing electrostatic potential calculations, which were carried out in the bioinformatics group of the ITB, the pH-dependence of the enzyme immobilization could be explained and a possible orientation of the protein on mesoporous materials could be predicted. The oxidizing activity of the immobilized enzyme was tested with *para*-nitrophenoxydodecanoic acid (12-*p*NCA) and *n*-octane. Hydrogen peroxide was utilized as source of electrons and oxygen to support the oxygenase activity of BM3H_F87A. The highest activity toward 12-*p*NCA of 830 nmol product/mg P450/min was observed with the enzyme immobilized on SBA-15 with pore diameter 133 Å. Enzyme activity towards *n*-octane was similar for the enzyme immobilized on SBA-15 of 60 Å and 133 Å, and was at least two-times higher compared to free enzyme, which is due to improved stability of the immobilized enzyme.

1 Einleitung

1.1 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Cytochrom P450-Monooxygenasen (E.C.1.14.14.1) gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (E.C.1.14.-.-) und stellen eine der größten Enzymfamilien mit bisher 11.292 bekannten Vertretern (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>; Stand August 2009) dar. Strukturell enthalten alle P450-Enzyme ein Häm-System im katalytischen Zentrum, das als Besonderheit zu anderen Häm-Enzymen ein Cysteinat als fünften Liganden am Porphyrinringsystem enthält. Dieser Aufbau ist verantwortlich für die charakteristischen spektralen Eigenschaften von P450-Enzymen, wie beispielsweise die Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 450 nm in Kohlenstoffmonoxid-Differenzspektren, die P450-Systemen ihren Namen gab. So steht das „P“ für Pigment und die Zahl „450“ für die ungewöhnliche Lage der Soret-Bande (450 nm), welche aufgrund der Bindung von Kohlenstoffmonoxid an das zuvor reduzierte Häm entsteht (Abbildung 1-6) [1]. P450-Monooxygenasen kommen praktisch in allen Formen des Lebens vor (Tiere, Pflanzen, Bakterien, Pilze, Protisten, Archaeen) und katalysieren eine Vielzahl verschiedener enzymatischer Reaktionen im Metabolismus. Hauptaufgabe bei Säugetieren ist der oxidative Abbau zahlreicher körpereigener und körperfremder Substanzen, wie Xenobiotika. Aber auch die Biosynthese von Steroiden, Prostaglandinen und Retinoiden wird durch P450-Monooxygenasen unterstützt. Allgemein katalysieren P450-

Monooxygenasen die Oxidation eines Substrates mit Hilfe von molekularem Sauerstoff unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten (meist in Form von NADH oder NADPH bereitgestellt). Aus der Literatur ist bekannt, dass P450-Monooxygenasen ein breites Spektrum an Substraten zur Katalyse akzeptieren. Die Oxidationsreaktionen können dabei hoch regio- und stereoselektiv (z. B. Steroidbiosynthese) oder komplett unselektiv sein.

1.1.1 Nomenklatur

Die Bezeichnung Cytochrom (griech. *chroma* = Farbe) wird für viele Enzyme und Redoxproteine verwendet. Die Eigenschaft, ein Häm als prosthetische Gruppe zu besitzen und Reduktionsäquivalente zu übertragen (indem das Eisenion im Häm die Oxidationszahl wechselt), ist die einzige Gemeinsamkeit dieser Proteine. Cytochrome werden nach der Variante des Häms, das sie enthalten, und nach ihrem Licht-Absorptionsspektrum unterschieden. Ebenso weisen die unterschiedlichen Cytochrome verschiedene Gensequenzen und daraus resultierende abweichende Sekundär- und Tertiärstrukturen auf. Zur eindeutigen Charakterisierung der P450-Monooxygenasen wird der Begriff Häm-Thiolat-Enzyme bevorzugt [2]. Im Unterschied zu den meisten anderen Cytochromen, die über ein Histidin mit dem Häm verbunden sind, ist der Ligand bei P450-Monooxygenasen das Schwefelatom eines Cysteinats.

Das Nomenklatorsystem für P450-Monooxygenasen nutzt den Begriff CYP als Abkürzung für Cytochrom P450. Wird der Ausdruck kursiv dargestellt, bezieht man sich auf das entsprechende Gen [3].

Die weitere Klassifizierung der über 11.000 Cytochrome erfolgt anhand ihrer Aminosäuresequenzidentität, wobei Proteine mit mehr als 40 % Aminosäuresequenzidentität in die gleiche Familie eingeordnet werden (gekennzeichnet durch eine Nummer, z. B. CYP102). Durch den folgenden Buchstaben (z. B. CYP102A) werden Proteine mit einer Aminosäuresequenzidentität von 55 % und mehr in Unterfamilien eingeteilt. Die abschließende Nummer steht letztendlich für das konkrete Gen (z. B. CYP102A1).

Anhand von Stammbäumen können die strukturellen Ähnlichkeiten, die phylogenetischen Beziehungen und eine partielle funktionelle Ähnlichkeit der P450-Formen untereinander dargestellt werden, wie z. B. in Abbildung 1-1.

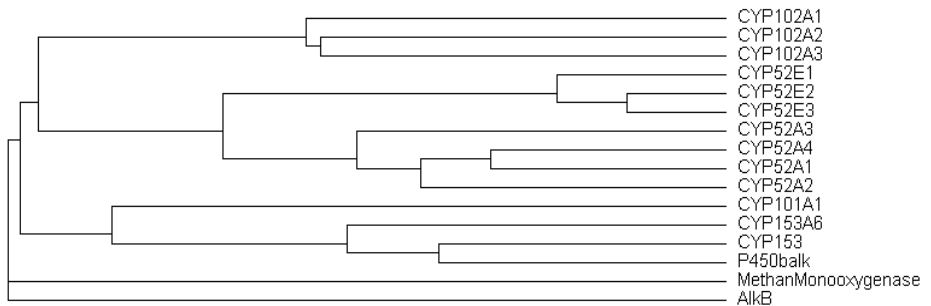


Abbildung 1-1: Phylogenetischer Baum verschiedener Cytochrom P450s aus Bakterien und Hefen

CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*; CYP102A2 und A3 aus *Bacillus subtilis*; CYP52E1 und CYP52E2 aus *Candida apicola*; CYP52E3 aus *Candida bombicola*; CYP52A3 und A4 aus *Candida maltosa*; CYP52A1 und A2 aus *Candida tropicalis*; CYP101A1 aus *Pseudomonas putida*; CYP153A6 aus *Mycobakterium sp.* HXN-1500; CYP153 aus *Acinetobacter* OC4; P450balk aus *Alcanivorax borkumensis* SK2; Methan Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath); AlkB aus *Pseudomonas putida*.

1.1.2 Struktur und Aufbau von P450-Systemen

Zur Untersuchung struktureller Merkmale, insbesondere im Bereich des aktiven Zentrums, werden so genannte Kristallstrukturen herangezogen. Die Kristallisation des ersten P450-Systems erfolgte 1987 mit der P450cam (CYP101) aus *Pseudomonas putida*. Seitdem ist die Bezeichnung der α -Helices (A-L) und der β -Faltblattstrukturen (1-4), sowie eine Unterteilung in zwei Domänen, einer α - und einer β -Domäne, eingeführt worden [4]. 1993 wurde die Kristallstruktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 (CYP102A1) veröffentlicht [5]. Mittlerweile sind über 150 Strukturen gelöst, die von über 20 verschiedenen P450-Monooxygenasen stammen. Die Sequenzen der Bindungstaschen der P450-Systeme müssen sich grundlegend voneinander unterscheiden, um solch eine Vielzahl von Substraten unterschiedlicher

Größe, Form und elektrostatischen Eigenschaften mit hoher Regio- und Stereoselektivität gezielt umsetzen zu können. Jedoch sind gerade in dem Bereich des aktiven Zentrums strukturell hoch konservierte Regionen zu finden. Die bisher aufgelösten fast 40 P450-Strukturen bestätigen, dass bei allen P450s der Häm-Porphyrinring im katalytischen Zentrum von einem Vier-Helix-Bündel (bestehend aus den aneinander liegenden α -Helices D, E, I und L), den Helices J und K, zwei β -Faltblattstrukturen und der Häm-stabilisierenden Meander-Schleife umgeben ist (

Abbildung **1-2**). Vor der L-Helix befindet sich eine charakteristische Aminosäuresequenz (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly), die das für die Häm-Bindung verantwortliche Cystein beinhaltet. Außerdem konserviert sind das Glu-X-X-Arg-Motiv in der K-Helix, welches wahrscheinlich der Stabilisierung der Häm-Bindetasche dient, und der mittlere Teil der I-Helix, welcher für den Protonentransport zum aktiven Zentrum verantwortlich ist (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser). Mutationen in diesen Bereichen haben folglich einen hohen Einfluss auf das Substratspektrum bzw. auf dessen Umsetzung.

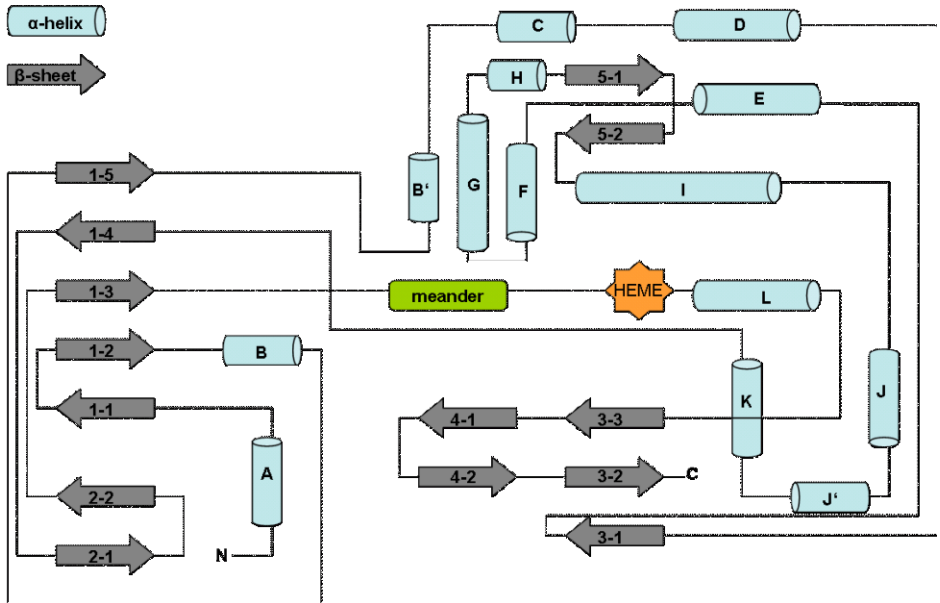


Abbildung 1-2: Schematische Übersicht über die Sekundärstruktur der Cytochrom P450-Monooxygenase

α-Helices sind als blaue Zylinder, β-Faltblätter als graue Pfeile dargestellt. Der Bereich der Meander-Schleife ist grün, der der Häm-Gruppe (HEME) orange hinterlegt. Die Länge der Elemente in der Abbildung entspricht nicht ihrer Länge in der Primärstruktur (übernommen aus [6]).

Für die Katalyse benötigen P450-Monooxygenasen Elektronen, die meist über Reduktasen und kleinen Elektronentransferproteinen (zusammen als Redoxpartner bezeichnet) übertragen werden. Enorme Unterschiede gibt es dafür in dem Sequenzbereich der P450-Monooxygenasen, die mit unterschiedlichen Redoxpartnern wechselwirken [7]. Ein weiterer Strukturunterschied befindet sich im N-

terminalen Bereich, wo bei eukaryotischen P450s meist ein Membrananker liegt.

Die über die Enzyme verfügbaren Daten, wie Kristallstrukturen, Homologiemodelle und Sequenzvergleiche, werden gezielt zur Veränderung der Aminosäuresequenz genutzt. Somit können Verwandtschaftsgrade, konservierte Bereiche, aber auch einzelne Aminosäuren und deren Wechselwirkung mit Substraten untersucht werden.

1.1.3 Elektronentransfersysteme

Um den Luftsauerstoff in ein Substrat einbauen zu können, müssen dem Enzym zwei Elektronen zugeführt werden, die meist von den Kofaktoren NADH oder NADPH stammen. Die Elektronen werden mit Hilfe eines Transportsystems über ein oder mehrere Proteine in die Nähe des aktiven Zentrums geschleust. Bis heute sind eine Reihe verschiedener Elektronentransfersysteme bekannt [7]. Die vier wichtigsten Elektronentransfersysteme sind hier aufgelistet und beschrieben:

Klasse I :

Mitochondriale P450s aus Eukaryoten und die meisten bakteriellen P450s, wie z. B. P450cam aus *P. putida*, sind Drei-Komponenten-Systeme und werden in die Klasse I eingeteilt. Die Weiterleitung der Elektronen erfolgt zuerst auf eine NADPH- oder NADH-abhängige

FAD-enhaltende Reduktase, gefolgt von einem Enzym mit dem Namen 2Fe-2S-Ferredoxin und endet bei der P450-Monooxygenase. Bei dem eukaryotischen Transfersystem sind die Reduktase und das Häm an der inneren mitochondrialen Membran gebunden, während bei dem bakteriellen System alle drei Komponenten löslich im Cytosol vorliegen (Abbildung 1-3) [8].

Klasse II :

Die P450s der Klasse II vereinigt mikrosomale P450-Monooxygenasen, die mit einer Membran-gebundenen NADPH-abhängigen Diflavin-Reduktase (CPR) interagieren. Manchmal benötigt der Elektronenfluss weitere Zwischenproteine zur Elektronenübertragung vom CPR auf das P450, wie z. B. cytb5 oder cytb5Red und cytb5 [9]. Die zwei Komponenten eines eukaryotischen Systems, wie z. B. bei *Candida*-Stämmen, sind an Membranen verankert (Abbildung 1-3) [10].

Klasse III :

Diese Elektronentransfersysteme kommen meist in Bakterien und Pilzen vor und bestehen ebenfalls aus zwei Domänen, P450-Häm-Domäne und CPR, mit den gleichen Kofaktoren FAD/FMN [11], wie in den Klasse II-Systemen. Jedoch sind sie löslich und fusioniert und haben ihren Ursprung in einer gemeinsamen Polypeptidkette. Ein Beispiel dafür ist das am häufigsten in der Biokatalyse angewandte Enzym, P450 BM-3 aus *B. megaterium* (Abbildung 1-3) [12, 13]. Aus

Pilzen ist eine Membran-gebundene P450 bekannt aus *Fusarium oxysporum* [14].

Klasse IV :

Die Klasse IV-P450s sind lösliche Ein-Komponenten-Enzyme, die aus einer NADPH-abhängigen FMN-enthaltenden Reduktase, einer Ferredoxin-Domäne und einer Häm-Domäne zusammengesetzt sind. Ein Beispiel für Klasse IV-Systeme sind die P450s aus *Rhodococcus sp.* (Abbildung 1-3) [15].

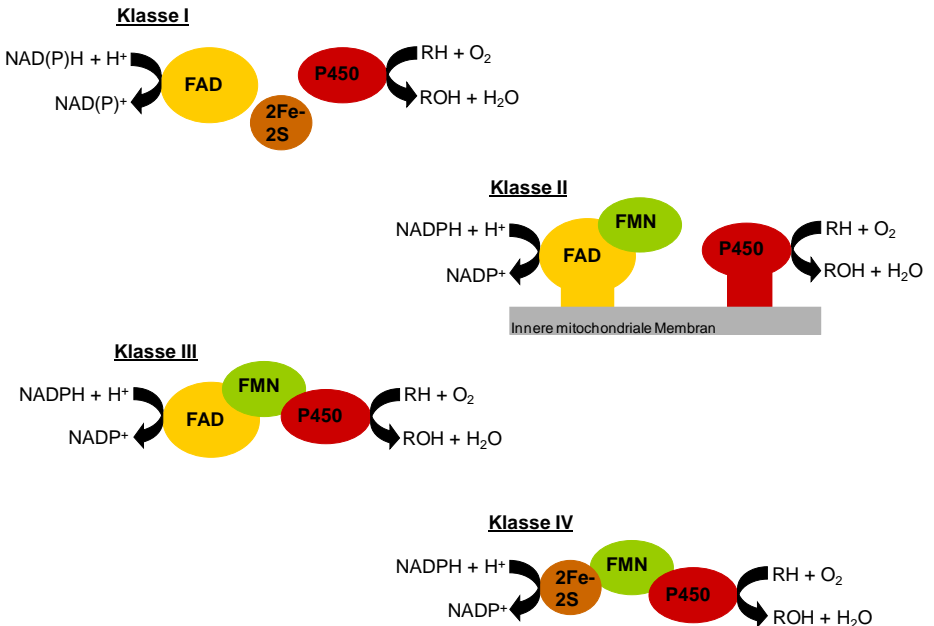


Abbildung 1-3: Übersicht über die vier wichtigsten P450-Elektronentransfersysteme

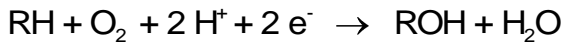
Bei allen Systemen werden Elektronen von dem Kofaktor NAD(P)H auf eine oder mehrere Redoxproteine und anschließend auf die P450-Häm-Domäne übertragen. Das führt letztlich zu einer Hydroxylierung des Substrates „R“.

Klasse I, bakterielles System. Klasse II, mikrosomales eukaryotisches System. Klasse III, bakterielles System. Klasse IV, bakterielles System.

1.1.4 Katalysemechanismus

Alle Cytochrom P450-Monooxygenasen sind in der Lage molekularen Sauerstoff bei Zufuhr von zwei Elektronen katalytisch zu spalten. Eines der gebildeten Sauerstoffatome wird in das nun hydroxylierte Produkt

eingebaut, während das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reagiert. Aliphatische und aromatische Hydroxylierungsreaktionen, sowie N-, O- und S-Dealkylierungen (Abbildung 1-7) sind typische P450-Reaktionen, die verschiedenste Substrate nach der gängigen Formel 1-1 chemisch umsetzen.



Formel 1-1: Reaktionsgleichung der P450-Monooxygenase mit einem beliebigen Substrat „R“

In Abbildung 1-4 ist der katalytische Zyklus der Substrathydroxylierung und Elektronenübertragung aufgezeichnet. Im ersten Schritt dissoziiert ein Wassermolekül aus dem aktiven Zentrum (Verbindung 1), was eine Gleichgewichtsverschiebung (engl. *equilibrium shift*) des Häm-Eisen-Spins von low-spin ($S = 1/2$) zu high-spin ($S = 5/2$) verursacht (Verbindung 2). Im nächsten Schritt nimmt Verbindung 2 ein Elektron auf und reduziert sich vom Fe^{III} zu Fe^{II} (Verbindung 3). Die Veränderung des Redoxpotentials durch die Substratbindung verhindert die unkontrollierte Übertragung von Elektronen und somit den unkontrollierten Verbrauch des Kofaktors. Die Elektronen für die Katalyse kommen üblicherweise von dem Kofaktor NAD(P)H und werden von einem oder mehreren Redoxpartnern geliefert (s. Kap. 1.1.3). Durch die Bindung von molekularem Sauerstoff im nächsten Schritt entsteht ein Oxy- Fe^{III} -Komplex (Verbindung 4). Nach einer

weiteren Reduktion ein Peroxy-Fe^{III}-Komplex (Verbindung 5), dessen Protonierung zu einem Hydroperoxo-Fe^{III}-Komplex führt (Verbindung 6). Eine weitere Protonierung und die Abgabe von einem Wassermolekül resultiert in einem Oxo-Fe^{IV}-Komplex (Verbindung 7), welches die P450-Reaktion katalysiert und ein Sauerstoffatom in ein Substratmolekül einbaut. Da die letzten Zwischenstufen des Katalysezyklus aufgrund ihrer hohen Reaktivität nur schwer zu charakterisieren sind, ist der genaue Mechanismus der Substratoxidation noch immer Gegenstand von Spekulationen. Sowohl kationische als auch radikalische Übergangszustände kommen in Betracht, wobei experimentelle Belege für verschiedene Reaktionsmechanismen, abhängig vom untersuchten Substrat und der Monooxygenase gefunden wurden. Ausgehend von Verbindung 7 wird ein radikalischer „Rebound“-Mechanismus, durch welchen der Sauerstoff letztlich auf das Substrat übertragen wird, vermutet (Abbildung 1-5). Diese Hypothese konnte durch Oxidationsversuche mit P450cam und P450 BM-3 und den Substraten α - und β -Thujon bestätigt werden [16].

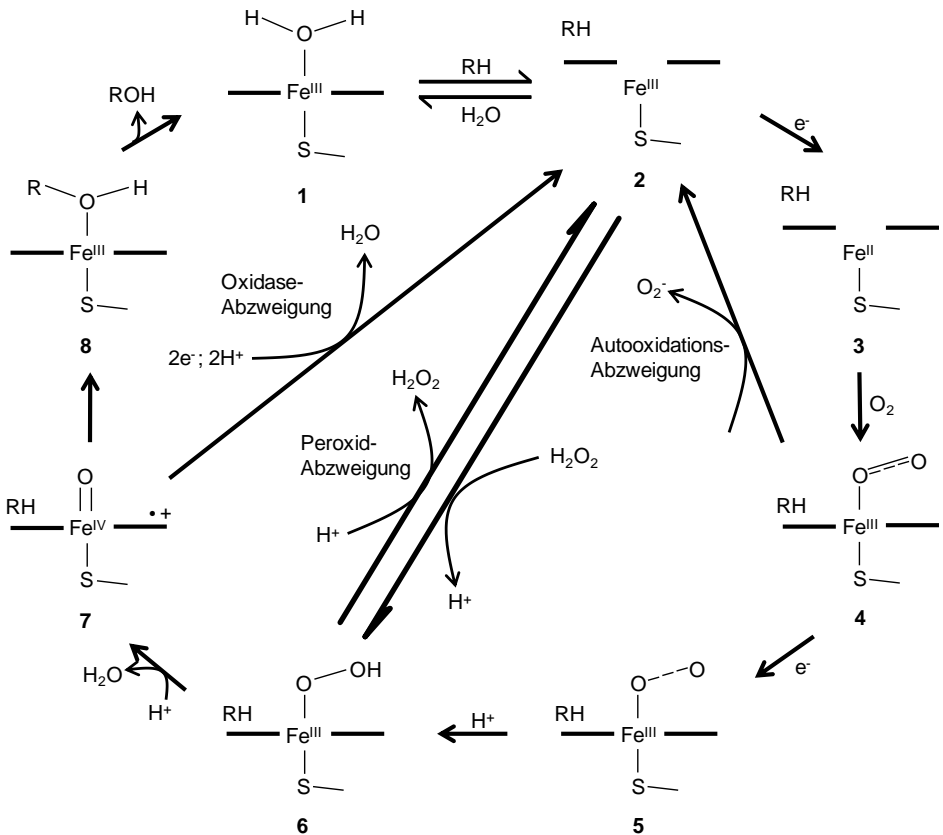


Abbildung 1-4: Der Katalysemechanismus von Cytochrom P450-Monooxygenasen und weitere Entkopplungsreaktionen

Dargestellt ist der Katalysezyklus einer P450-Häm-Domäne. Der Porphyrinring ist durch zwei fette Balken gekennzeichnet. Die benötigten Elektronen werden durch die Zugabe des Kofaktors NAD(P)H zugeführt. Der molekulare Sauerstoff wird aus der Umgebungsluft erworben. Die verschiedenen Nebenreaktionen des Zyklus sind ebenfalls im Schema wieder zu finden: Autooxidations-, Peroxid- und Oxidase-Abzweigung (übernommen aus [17]).

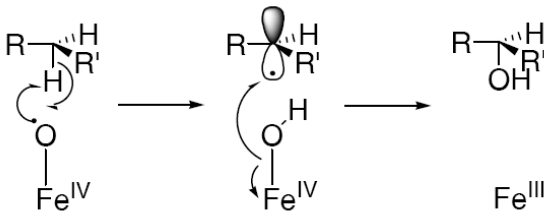


Abbildung 1-5: „Rebound“-Mechanismus (übernommen aus [18])

Zusätzlich zur „optimalen P450-Reaktion“ sind weitere Nebenreaktionen, in denen Kofaktoren nicht produktiv verbraucht werden, im P450-Katalysezyklus möglich. Der Prozess der Entkopplung, das heißt der Verbrauch von Kofaktoren ohne Produktbildung, kann durch drei verschiedene Reaktionswege hervorgerufen werden (Beschreibung siehe unten). Diese Entkopplungsreaktionen sind biokatalytisch ungünstig, denn sie verbrauchen wertvollen Kofaktor und fördern die Entstehung von reaktiven Spezies, wie Wasserstoffperoxid, die das Enzym schädigen und sogar inaktivieren können.

Autooxidations-Abzweigung :

Eine Autooxidation spaltet ein Superoxidanion von Verbindung 4 ab und es entsteht wiederum die Verbindung 2 des Katalysezyklus. Für diese Nebenreaktion werden ein Elektron und der molekulare Sauerstoff verbraucht, ohne jegliche Produktbildung (Abbildung 1-4).

Peroxid-Abzweigung :

Unter Dissoziation von Wasserstoffperoxid geht Verbindung 6 wieder in Verbindung 2 über (Abbildung 1-4). Um die Zerstörung des P450-Enzyms aufgrund zu hoher Wasserstoffperoxidkonzentrationen zu verhindern, sollte mit Hilfe eines weiteren Enzyms, der Katalase, das Wasserstoffperoxid neutralisiert werden.

Oxidase-Abzweigung :

Bei dieser Nebenreaktion endet der Zyklus kurz vor der Produktbildung bei Verbindung 7. Unter Entstehung von Wasser und einer Abspaltung von zwei Elektronen und zwei Protonen von Verbindung 7 beginnt der Zyklus wieder bei Verbindung 2 ohne Produktbildung (Abbildung 1-4).

Der spektroskopische Nachweis eines P450-Enzyms erfolgt dank der starken Affinität der Verbindung 3 zu Kohlenstoffmonoxid (CO). Bei der Reaktion wird die Verbindung 9 gebildet (Abbildung 1-6). Das benötigte Elektron für die Eisenreduktion der Verbindung 2 (Fe^{III}) zu Verbindung 3 (Fe^{II}) wird durch die Zugabe von Natriumdithionit oder NADPH geliefert. Die Messung erfolgt photometrisch gegen eine Referenz, die Natriumdithionit beinhaltet aber nicht mit CO begast wurde, bei der die Wellenlängen 400–500 nm gescannt werden. Nun kann der für das Enzym namensgebende P450-Peak beobachtet (Abbildung 1-6) und die P450-Konzentration berechnet werden (Formel 2-2) [1].

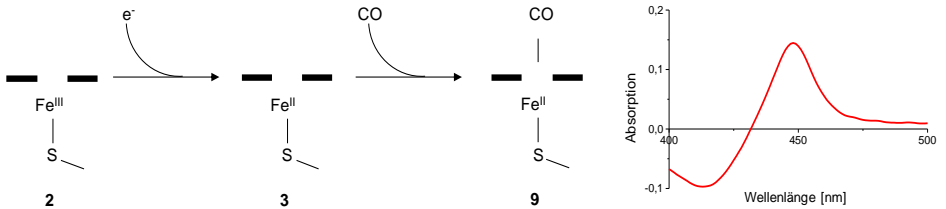


Abbildung 1-6: Kohlenstoffmonooxid-Bindung am Eisenzentrum

Verbindung 2 (Fe^{III}) wird durch die Zugabe von Natriumdithionit oder NADPH zu Verbindung 3 (Fe^{II}) reduziert. Das zugegebene Kohlenstoffmonooxid bindet sich an das Fe^{II}-Zentrum der Verbindung 3. Die P450-Konzentration der resultierenden Verbindung 9 kann spektrophotometrisch nachgewiesen werden (s. Kap. 2.8.1).

1.1.5 Katalysierte Reaktionen

Die enorme Variationsbreite der Cytochrom P450-Enzymfamilie ist der Grund für die große Vielfalt der katalysierten Reaktionen und für die breite Palette an umsetzbaren Substraten. Mittlerweile ist eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionstypen bekannt. Eine Auswahl ist in Abbildung 1-7 dargestellt.

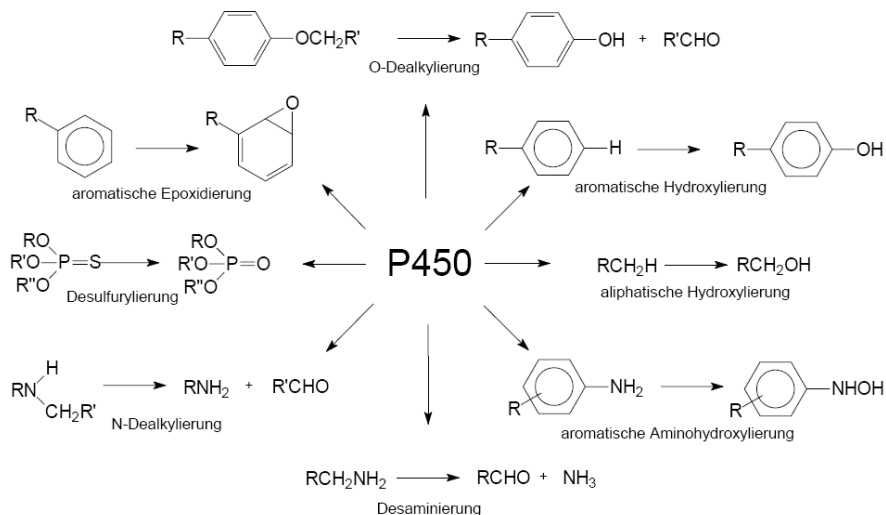


Abbildung 1-7: Übersicht von P450-Monooxygenasen katalysierten Reaktionen

Aufgeführt sind einige der wichtigsten katalysierten P450-Monooxygenase-Reaktionen. Die Bezeichnungen R, R' und R'' stehen für Substratreste von aromatischen oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Es können aber auch Heteroatome oder Halogene sein [19].

Die von bakteriellen P450-Monooxygenasen am häufigsten katalysierte Reaktion ist die Hydroxylierung nicht-aktivierter Kohlenstoffatome. Ein Beispiel hierfür ist die Hydroxylierung von Campher zu 5-exo-Hydroxycampher durch P450cam (CYP101A1) aus *P. putida* [20]. Die aliphatische [21] und aromatische Epoxidierung [22] von C-C-Bindungen sind ebenfalls häufige P450-Reaktionen. Neben diesen typischen Reaktionen können P450-Monooxygenasen auch außergewöhnliche Oxidationen durchführen. Dazu zählen die

Sulfoxidation, Dealkylierung und Deaminierung [23], bei denen ein Sauerstoffeinbau zu instabilen Zwischenprodukten führt, die im Folgenden dann zerfallen.

1.1.6 Cytochrom P450-Monooxygenasen aus der CYP102A-Familie

Die Cytochrom P450-Familie CYP102A besteht derzeit aus mindestens fünf charakterisierten und neun nicht-charakterisierten Vertretern: 1986 wurde das CYP102A1 aus *B. megaterium* erstmalig funktionell in *E. coli* exprimiert, charakterisiert [24] und schlussendlich 1993 zur Aufklärung der Proteinstruktur kristallisiert [5]. Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *B. subtilis* konnten anhand eines Sequenzalignments mit der CYP102A1 zwei weitere Monooxygenasen, CYP102A2 und CYP102A3, mit einer Aminosäuresequenzidentität von 59 % bzw. 60 %, gefunden werden [25-28]. Der bekannteste und der am besten untersuchte Vertreter ist bis heute die CYP102A1-Monooxygenase, auch bekannt als P450 BM-3. Diese Abkürzung wird verwendet, weil es sich um die dritte identifizierte P450-Monooxygenase aus *B. megaterium* handelt. Die Gene der Häm- und Reduktase-Domäne befinden sich auf einer Polypeptidkette und bilden somit ein natürliches Fusionsprotein. Fusionsproteine, deren Flavin- und Häm-Domäne auf einer Polypeptidkette liegen, kommen in der Natur sehr selten vor [29, 30]. Noch seltener kommen Fusionsproteine vor, bei denen sich die Reduktase- und Häm-Domäne auf einer Polypeptidkette befinden, so wie bei dem ältesten bekannten

Flavocytochrom P450 BM-3 [24]. Das Fusionsprotein weist eine Molekularmasse von 119 kDa auf. Die Messung der Aktivität von P450-Monooxygenasen geschieht durch photometrische Messung der Oxidation des zugegebenen Kofaktors. Auf diese Weise ist es möglich eine P450-katalysierte Reaktion photometrisch *in situ* zu verfolgen, was eine Bestimmung von Anfangsaktivitäten und die Messung kinetischer Konstanten, wie dem K_M - und k_{cat} -Wert entsprechend des Enzymkinetik-Modells von Michaelis und Menten, erlaubt. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass es sich um eine indirekte Methode zur Aktivitätsbestimmung handelt, da nicht die Aktivität der Monooxygenase, sondern die der Reduktase-Domäne gemessen wird. Da die durch die Monooxygenase katalysierte Produktbildung auf diese Weise also nicht direkt bestimmt werden kann, muss nach Beendigung der Reaktion die Menge an umgesetztem Substrat bestimmt und mit der Menge an eingesetztem Kofaktor korreliert werden, um den Anteil des unproduktiv verbrauchten Kofaktors (Entkopplung) bestimmen zu können.

Die Hydroxylierungsaktivität der P450 BM-3 gegenüber Fettsäuren wurde erstmalig im Jahre 1974 beschrieben [31]. Das Enzym besitzt bis heute noch die höchste Fettsäuren-Umsatzrate von $>1.500 \text{ min}^{-1}$ bei subterminalen Hydroxylierungen von mittel- und langkettigen Fettsäuren von allen untersuchten P450-Reaktionen. Erst zwölf Jahre später gelang es, das Enzym heterolog in *E. coli* zu exprimieren und zu charakterisieren [32, 33]. Durch die Möglichkeit der effektiven rekombinanten Expression und Aufreinigung gelang es schließlich

Kristallstrukturen der P450-Häm-Domäne in substratfreier und substratgebundener Form zu erhalten, was die Grundlage für ein rationales Protein Design mit P450 BM-3 schuf [5, 34]. Aufgrund dieses Fortschritts können die Substratinteraktionen mit einzelnen Aminosäuren gezielt untersucht werden, z. B. bei der P450-Hydroxylierung von Fettsäuren. So konnte festgestellt werden, dass die Aminosäuren Arginin 47 und Tyrosin 51 sich am Substrateingangskanal befinden und dort mit der Carboxylgruppe der Fettsäure interagieren. Diese auf strukturelle Erkenntnisse basierende Information konnte auch in der Praxis bestätigt werden. Aufgrund von Mutationen an den Aminosäurepositionen 47 und 51 wurde ein schlechterer Fettsäureumsatz, im Vergleich zum P450 BM-3-Wildtyp (WT), beobachtet [35].

Ebenso gut untersucht ist der Einfluss von Mutationen auf die Position 87, mit der Aminosäure Phenylalanin (F87), dessen Lokalisation sich direkt oberhalb des Porphyrinrings befindet. Zahlreiche Mutationen von F87 mit Einfluss auf Regio- und Stereoselektivität bei verschiedenen Substraten wurden bei P450 BM-3 bereits durchgeführt [36-38]. Speziell der Austausch des Phenylalanins an der Position 87 zu der sehr viel kleineren Aminosäure Alanin (F87A), führt zu einer Veränderung der Akzeptanz von Kofaktor-Elektronen. So erhält man auch mit Hilfe von Peroxiden eine Hydroxylierungsreaktion mit einem Substrat [39]. Allein durch die Mutation F87A könnte auf den teuren Kofaktor NADPH und sogar auf die Reduktase, die zur Elektronenweiterleitung benötigt wird, verzichtet werden. Zu hohe

Konzentrationen von Peroxiden als Oxidationsmittel können jedoch das Enzym schädigen und sogar zu seiner Inaktivierung führen. Das Isoleucin an Position 263 (I263) liegt in der I-Helix direkt über dem Häm und ist von großer Bedeutung für die Stabilisierung des Sauerstoffs und der Übertragung von Elektronen in der Katalyse, wie Mutationsstudien belegen. Ebenso verursacht ein Austausch von I263 eine Verringerung der Aktivität [40]. Der starke Einfluss der Aminosäure Alanin an Position 328 (A328) auf die Regio- und Stereoselektivität der Oxidation von Alkanen und Alkenen konnte ebenfalls experimentell nachgewiesen werden [41, 42].

P450 BM-3 ist eines der am besten erforschten Enzyme überhaupt und wurde im Rahmen dieser Arbeit herangezogen, um die Produktion von 2-Octanol ausgehend vom *n*-Octan zu optimieren. Aufgrund Strukturanalysen ist die Aminosäureanordnung und somit die Umgebung des aktiven Zentrums bestens bekannt. Dank dieser Informationen und vieler Forschungsjahre können gezielte Mutationen in P450 BM-3 zur Hydroxylierung von *n*-Alkanen und zur Synthese von enantiomeren-reinem 2-Octanol eingesetzt werden. Das Endprodukt 2-Octanol wird häufig als Grundstoff in der Industrie verwendet und kann chemisch nur schwer hergestellt werden (s. Kap. 1.3).

Die ersten Untersuchungen zur Aktivität von P450 BM-3 gegenüber *n*-Alkanen und Methylester wurde von Miura und Fulco 1975 durchgeführt. Sie beschrieben, dass das P450 BM-3 diese Substrate

wegen ihrer mangelnden polaren Funktionalität nicht umsetzen kann. Die physiologischen Substrate der P450 BM-3-Monooxygenase sind Fettsäuren C12–C18, die an subterminalen Positionen, abhängig von der Kettenlänge, hydroxyliert werden [31, 43]. Ebenso, hydroxyliert P450 BM-3 die dazugehörigen Fettsäureamide und –alkohole und bildet Epoxide aus ungesättigten Fettsäuren. Die Aktivität und Selektivität der P450 BM-3 aus *B. megaterium* konnte in den letzten Jahren durch spezifische Mutationen in der P450-Häm-Domäne weitgehend verändert werden, so dass nicht nur die üblichen Fettsäuren, sondern auch strukturfremde Substanzen, wie z. B. alicyclische, aromatische und heterocyclische Verbindungen, wie z. B. Indol und Alkane, hydroxyliert werden können [44].

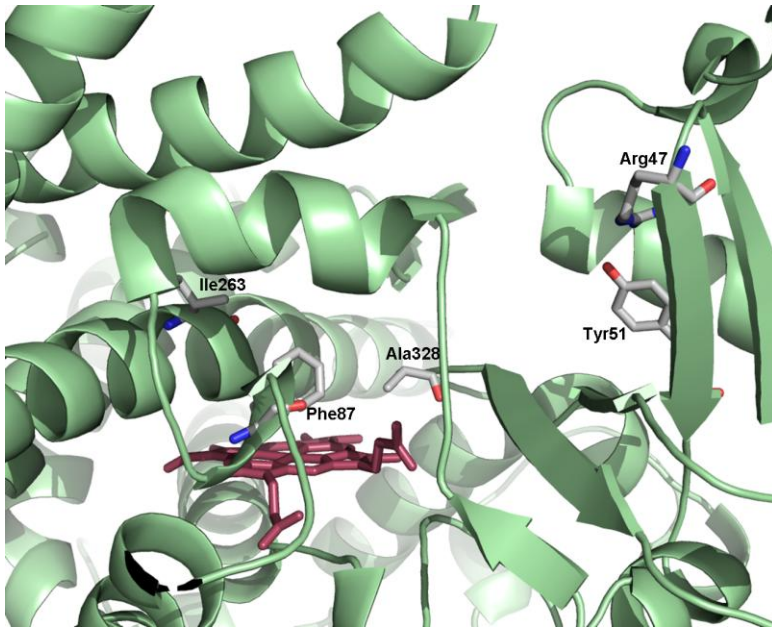


Abbildung 1-8: Kristallstruktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 (PDB-Eintrag: 1BU7)

In der Abbildung sind die Häm-Gruppe (rot) und die Aminosäuren R47, Y51, F87, I263 und A328 hervorgehoben.

1.1.7 Cytochrom P450-Monooxygenasen aus *Candida*-Stämmen

Louis Pasteur (1822–1895) beschrieb Mitte des 19. Jahrhunderts, dass die Hefe aus Mikroorganismen besteht und die Anwesenheit dieser Organismen von essentieller Bedeutung für den Gärungsprozess ist. Ebenso bewies Pasteur, dass ohne die kleinsten eukaryotischen Organismen keine Fermentation stattfinden kann. Schon seit einigen tausend Jahren waren Hefen für die Produktion von Wein, Bier und

Brot zuständig, jedoch ohne dass die Menschen wussten, dass die verwendeten Hefen Organismen sind.

Die meisten Hefen sind nicht auf Sauerstoff angewiesen, sie sind fakultativ anaerob. Wird ihnen Sauerstoff angeboten, so können sie ihn jedoch für einen oxidativen Energiestoffwechsel nutzen. Sie können verschiedene Zucker zu den energiearmen Produkten Kohlenstoffdioxid und Wasser oxidieren. Im Gegensatz dazu können Hefen in Abwesenheit von Sauerstoff die Zucker nur zu dem Produkt Ethanol, welches noch viel Energie in sich trägt, und zu Kohlenstoffdioxid abbauen (Gärung) [45]. Hefen nutzen ein breites Spektrum an Kohlenhydraten, jedoch wurde bisher keine Spezies beschrieben, die alle in der Natur vorkommenden Zucker nutzen kann. Die bekannte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann z. B. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Saccharose, Maltose, Maltotriose und Raffinose nutzen.

Hefen werden für eine Vielzahl biotechnischer Verfahren verwendet, wie z. B. bei der Herstellung alkoholischer Getränke und in der Bäckerei für Brot- und Hefeteig. Ebenso sind sie ideale Systeme für die Produktion von Fremdproteinen. Bekannte Hefen für die Proteinproduktion bei biotechnischen Verfahren sind *Pichia pastoris* und *S. cerevisiae*. Von Letzterer wurde 1996 das komplette Genom, als erstes eukaryotisches Genom überhaupt, sequenziert [46].

Candida ist eine Hefegattung, bei der harmlose und potentiell gefährliche Stämme existieren. Zu den bekanntesten harmlosen

Stämmen zählt der Kefirpilz *C. kefir*, zu den fakultativen pathogenen Erregern (besonders für Warmblüter) *C. albicans*.

Candida, sowie *Pichia*-Arten gehören zu den Alkanhefen. Sie können Alkane, aber auch Fettsäuren, als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen und diese an terminalen Positionen hydroxylieren (s. Kap. 1.3.3). Es gibt mehrere bekannte P450-Enzyme aus *Candida*-Stämmen, oft existieren sogar mehrere P450s in einem Organismus. In *C. maltosa* wurden bisher acht P450s gefunden [47], in *C. tropicalis* sieben P450s [48] und in *C. apicola* zwei P450s [49]. Die vorgelegte Dissertation fokussiert auf P450-Enzyme aus *C. apicola*, die den Namen CYP52E1 und CYP52E2 besitzen.

Die P450-Monooxygenase aus der CYP52-Familie und die dazugehörige NADPH-Reduktase (CPR) sind N-terminal an der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert, jedoch nicht in die Membran integriert [50]. Eukaryotische Reduktasen sind nicht mit dem P450-Enzym fusioniert und weisen somit eine langsamere Elektronenübertragungsrate im Vergleich zum fusionierten P450 BM-3 auf und daher auch geringere katalytische Umsatzraten. Der kontinuierliche Elektronenfluss vom Kofaktor über die CPR auf das P450-Enzym ermöglicht überhaupt erst die Monooxygenase-Reaktion am P450-Enzym [51, 52].

1.2 Protein Engineering

1.2.1 Rationales Design

Beim rationalen Proteindesign wird eine gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz durch eine ortsspezifische gezielte Mutagenese (engl.: *site-directed mutagenesis*) eingesetzt. Die hierfür notwendigen Informationen stammen aus Kristallstrukturen, Homologiemodellen, Sequenzvergleichen und bereits veröffentlichten bekannten Struktur-Funktions-Beziehungen aus der Literatur. Die Methode des rationalen Proteindesigns wird mit der Zielsetzung durchgeführt, die Enzymeigenschaften in eine gewünschte Richtung, wie z. B. Erhöhung der Stabilität oder Variation der Substratspezifität, zu verändern. Die Komplexität dieser Methode zeigt sich daran, dass Proteine meist am Rand der Instabilität stehen. Der räumliche Aufbau des aktiven Enzyms ist das Ergebnis der intramolekularen Wechselwirkungen der Aminosäuren, wobei bereits die Änderung einer einzelnen Wasserstoffbrücke zum Konformationswechsel und damit zum Aktivitätsverlust führen kann. Der gezielte Austausch von einzelnen Aminosäuren, der zu verbesserten oder neuen Eigenschaften des Enzyms unter Erhalt der Aktivität führt, erfordert eine Fülle von Informationen, die nur für wenige Enzyme zur Verfügung steht. Jedoch muss nicht jede Veränderung gleich eine Verbesserung sein. So kann durch den Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren zwar eine erhöhte Aktivität gegenüber einem Substrat erreicht werden, aber eine gleichzeitig auftretende negative Auswirkung, z. B. eine geringere Stabilität des Enzyms, kann nicht immer ausgeschlossen werden.

Die Methode der gezielten Mutagenese konnte schon erfolgreich an Enzymen eingesetzt werden, wobei Substratspezifität [53], Kofaktorabhängigkeit [54] und Enantioselektivität [55] modifiziert werden konnten.

1.3 Enzymatische Oxidation linearer und cyclischer Alkane

Die wichtigste und natürlichste Quelle von Alkanen ist Erdgas und Erdöl. Viele der flüssigen und festen Alkane lassen sich einfach und billig durch Destillation und Cracken aus dem Erdöl gewinnen. Die Entwicklung der Erdölfraction fand über viele Millionen Jahre durch das Herabsinken toter Meerestiere auf den Meeresboden und anschließender Überlagerung der Kadaver mit Sediment statt. Unter hohen Temperaturen und hohem Druck sowie jahrelangem Sauerstoffabschluss entstand schlussendlich das Rohöl. Rohöl ist ein Gemisch aus mehreren hundert verschiedenen Kohlenwasserstoffen, hauptsächlich geradkettigen Alkanen, einigen verzweigten Alkanen und einem schwankendem Anteil von aromatischen Kohlenwasserstoffen. Erdgas enthält in erster Linie Methan, Ethan, Propan und auch Butan. Anders als Methan, das ständig im großen Maße neu gebildet wird, entstehen höhere Alkane in der Natur nicht im nennenswerten Umfang neu und sind deshalb in einigen Jahrzehnten erschöpft. Für die chemische Industrie sind Alkane wichtige Grundstoffe für die Kunststoffherstellung, für die Weltwirtschaft bilden sie die wichtigsten

Brennstoffquellen. Durch Erdöl werden etwa 60 % des Energiebedarfs der Bundesrepublik Deutschland gedeckt.

Alkane gehören zu den gesättigten Kohlenwasserstoffen. Sie stellen eine besonders einheitliche Stoffgruppe dar, die das Gerüst für viele weitere organische Stoffgruppen bildet. Lineare Alkane (*n*-Alkane) sind aufgrund ihrer starken inerten C-H-Bindungen (410 kJ/mol) schwer zu hydroxylieren. Die Selektivoxidation nicht-aktivierter C-H Bindungen ist ein in der synthetischen organischen Chemie weitgehend ungelöstes Problem [56]. Dadurch kommt der Erforschung der Hydroxylierung der Alkane durch Enzyme ein noch höherer Stellenwert zu. Die Oxidation von Alkanen durch (mutierte) Enzyme führt mit hoher Wahrscheinlichkeit einfach und schnell zu regio- und enantiomerenreinen Produkten, während eine chemische Synthese durch viele Reaktionsschritte [57] und durch das Entstehen racematischer Produkte verkompliziert wird.

Somit ist die Untersuchung von P450-Enzymen, die in der Lage sind nicht-aktivierte C-H-Bindungen zu hydroxylieren, ein aktuelles Thema. Ein weiterer wichtiger Aspekt, warum die regioselektive Octan-Oxidationen in dieser Arbeit untersucht wurde, ist der enorme industrielle Nutzen des Produktes 2-Octanol (>8.000 Tonnen Verbrauch im Jahr). So ist das enantiomeren-reine 2-Octanol der Grundstoff für viele Ester. In der organischen Chemie wird es z. B. als Lösungs-, Entwässerungs- und Antischaummittel verwendet. Das 2-Octanol wird als wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von Fasern und in der Parfümindustrie zur Herstellung von Duftstoffen

benutzt. Auch zur Herstellung von pharmazeutischen und kosmetischen Produkten sowie als Lebensmittelzusatzstoff wird 2-Octanol als Zwischenprodukt benötigt.

Aus der Literatur sind bis heute etliche P450-Systeme aus verschiedenen Mikroorganismen, mit der Fähigkeit gasförmige sowie auch langkettigere *n*-Alkane, C₂-C₃₂, als Kohlenstoffquelle zu nutzen, bekannt. Diese P450-Systeme produzieren jedoch keine reinen regiospezifischen Alkoholprodukte die z. B. die Industrie zur Weiterverarbeitung nutzen könnte. Erst mit Hilfe einzelner oder mehrfacher Mutationen der P450-Enzyme kann die Stereospezifität verändert und so die Ausbeute der entstehenden Alkohole beeinflusst werden.

1.3.1 Lineare Alkane

Es gibt zwei Arten von Proteinen, die die Fähigkeit der Alkan-Oxidation aufweisen: Häm- und Nicht-Häm-Eisenenzyme. Eines der ersten Häm-Eisenenzyme wurde 1968 aus *Corynebacterium* sp. 7E1C beschrieben. Es beinhaltet ein mutmaßliches P450-System, welches die Oxidation des *n*-Octan zu 1-Octanol und Octansäure katalysiert, wenn *n*-Octan beim Wachstum der Zelle als Kohlenstoffquelle angeboten wird [58].

Zwei weitere P450-Enzyme aus der CYP153-Familie sind ebenfalls für ihre terminalen Hydroxylierungen von Alkanen bekannt. Die erste lösliche Alkan-Hydroxylase, die vorzugsweise inerte *n*-Alkane mit

hoher Regioselektivität an terminaler Position hydroxyliert, ist die CYP153A6 aus *Mycobacterium* sp. HXN-1500. Dieses Enzym hydroxyliert lineare Alkane, C6-C11, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % an terminaler Position. Das am effektivsten umgesetzte Alkan ist *n*-Octan. Die restlichen 5 % bei der Produktbildung sind sekundäre Alkohole [59, 60].

Eine weitere Alkan-Hydroxylase der CYP153-Familie stammt ursprünglich aus *Acinetobacter* OC4, wurde in *E. coli* exprimiert und auf ihre Fähigkeit zur Umsetzung von *n*-Octan untersucht. Die terminale Hydroxylierung zum 1-Octanol konnte nach 24 h Inkubation des Zellextrakts mit *n*-Octan beobachtet werden. Nach weiteren 24 h folgte eine zweite Hydroxylierung am entgegengesetzten Ende, was in einem 1,8-Octandiol resultierte [61].

Ein weiteres *n*-Alkan-abbauendes Bakterium ist das *Alcanivorax borkumensis* SK2. Das aus diesem Bakterium isolierte Enzym mit der unabhängigen Reduktase der P450-Monooxygenase (P450RhF) am C-Terminus fusionierte und in BL21-A1-*E. coli*-Zellen exprimierte Enzym P450balk setzte *n*-Octan zum terminalen 1-Octanol um [62, 63].

Darüber hinaus sind weitere Vertreter der P450-Monooxygenasen, z. B. die Mutanten des Enzyms P450cam, die liquide langkettige bis gasförmig kurzkettige Alkanen abbauen können, bekannt. Das physiologische Substrat von P450cam (CYP101A1) aus *P. putida* ist der (+)-Campher, welcher regio- und enantioselektiv zu 5-exo-Hydroxycampher hydroxyliert wird [64, 65]. Mit Hilfe der Kristallstruktur konnten über Protein Engineering spezifische Mutationen im aktiven

Zentrum eingeführt werden, die das Substratspektrum des Enzyms zu kürzeren *n*-Alkanen veränderte. So konnte die P450cam Häm-Monooxygenase zu einer Alkan-Hydroxylase modifiziert werden. 1996 konnte durch den Ersatz des Tyrosins an der Position 96 (Y96) durch Phenylalanin (Y96F) eine bis zu 19-fach höhere Aktivität (275-fach höhere Produktrate) mit C5–C7-Alkanen gegenüber dem P450cam-WT beobachtet werden [66]. Ausgehend von der Mutation Y96F konnten an weiteren Positionen mutierte P450-Enzyme auf ihre Oxidationsprodukte der *n*-Alkane Butan und Propan hin untersucht werden. Die Mutante F87W Y96F T101L V247L wies eine fast 80-fach höhere Aktivität (1.875-fach höhere Produktrate), im Vergleich zum P450cam-WT, bei der Umsetzung von Butan und Propan auf [67]. Schlussendlich wurde die Hydroxylierung vom Ethan zum Ethanol mit P450cam untersucht. Dafür wurden weitere neun Mutationen in die P450-Domäne eingeführt (F87W Y96F T101L V247L L1244M L294M T185M L1358P G248A). Durch diese Mutationen konnte nicht nur erstmals Ethan mit einer 78 %igen Produktrate umgesetzt werden, sondern auch die Produktrate bei der Propanumsetzung im Vergleich zur 4-fach-Mutante F87W Y96F T101L V247L auf das 6.000-fache gesteigert werden. Die Aktivitäten sind vergleichbar zum P450cam-WT, der mit dem natürlichen Substrat (+)-Campher, gleiche Ergebnisse erzielte [68].

Die erste *n*-Octan-Umsetzung durch einen P450 BM-3-WT wurde 2001 von Schmid und Mitarbeitern beschrieben [69]. Die Hydroxylierung erfolgte nur an den subterminalen Positionen, ω -1, ω -2 und ω -3 im

Verhältnis 1:9:8, jedoch nicht am terminalen Ende (ω) des Alkans. Ebenso konnten die Ketone 3- und 4-Octanon als Folgeprodukte detektiert werden [70]. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Ketonen bei einer Enzymreaktion mit einer Monooxygenase, ist die weitere Hydroxylierung des zuvor entstandenen Alkohols zu dem instabilen Zwischenprodukt eines geminalen Diols, welches nach Abspaltung von Wasser zum Keton umgeformt wird („Erlenmeyer-Regel“) (Abbildung 1-9) [71].

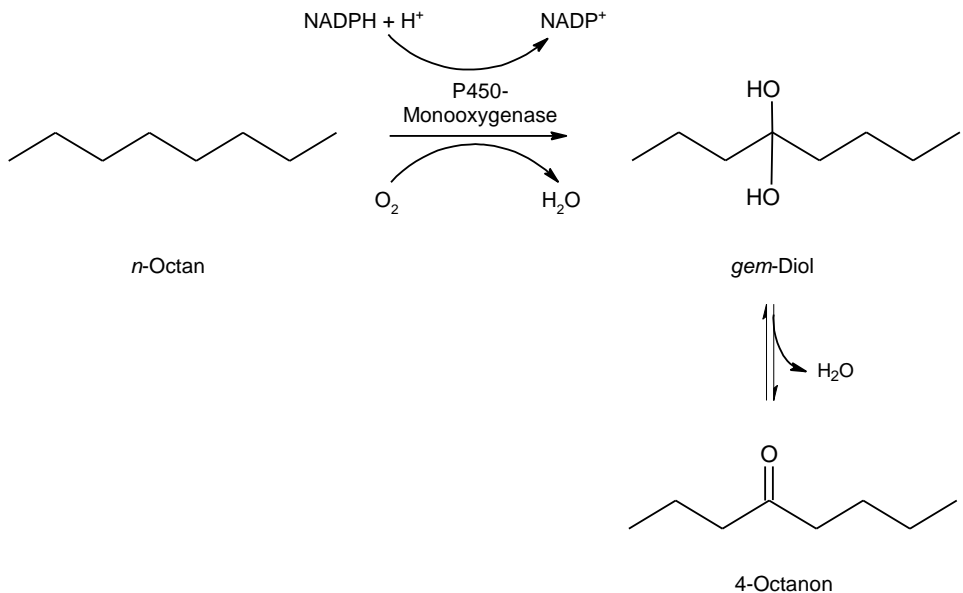


Abbildung 1-9: Entstehung eines Ketons über ein geminales Diol

Die doppelte Hydroxylierung eines Alkans an einem Kohlenstoffatom formt ein instabiles geminales Diol (*gem*-Diol). Durch die Instabilität dieser Verbindung wird eine Wasserabspaltung erzwungen und die Bildung eines Ketons unterstützt.

Im gleichen Jahr fanden Schmid und Mitarbeiter eine P450 BM-3-Mutante (A74G F87V L188Q) mit einer, bei der Umsetzung von *n*-Octan, 700-fach erhöhten Produktrate im Vergleich zum BM-3-WT [69]. Ebenso hatten die eingeführten Mutationen in der Häm-Domäne zur Folge, dass eine höhere 2-Octanol-Produktion beobachtet werden konnte (ω -1: ω -2: ω -3 (1:2,6:2,2)). Ein Jahr später konnte eine Mutante (139-3) mit einer 12-fach höheren Regioselektivität zum 2-Octanol erzeugt werden [72]. Im Folgenden fokussierte die Forschung zur Octan-Oxidation nicht nur auf die Hauptproduktion des 2-Octanols, sondern auch auf die Reinheit der gebildeten Enantiomere an selbiger Position. Peters und Kollegen konnten zwei P450 BM-3-Mutanten mit mäßiger Stereoselektivität zum (*R*)- bzw. zum (*S*)-2-Octanol-Enantiomer finden. Diese Mutanten weisen bis zu 13 Mutationen in der Häm-Domäne auf: Mutante 9-10A-A328V zeigte einen (*S*)-Enantiomeren-Überschuss von 40 %, während die Mutante 1-12G einen Überschuss des (*R*)-Enantiomers von 40-55 % aufwies [73]. Durch weitere Forschung konnte eine Erhöhung des Enantiomeren-Überschusses von 65 % (*S*)-2-Octanol bei einer ebenfalls hohen 2-Octanol-Produktion von 89 % mit einer weiteren P450 BM-3-Mutante (35-E11) erzielt werden [74].

Die P450-Monooxygenase (CYP102A3) aus *Bacillus subtilis*, mit einer 76 %igen Sequenzgleichheit zum bekannten P450 BM-3 (CYP102A1) aus *B. megaterium*, wurde ebenfalls auf seine Fähigkeit zur terminalen Hydroxylierung von *n*-Octan hin untersucht. Es wies eine niedrige Hydroxylierungs-Aktivität gegenüber *n*-Octan auf, weshalb auch hier

eine Verbesserung des Enzyms durch Protein Engineering angestrebt wurde. Die beste P450-Mutante aus *B. subtilis*, CYP102A3 S189Q A330V, zeigte eine Produktion von 48 % 1-Octanol und 36 % 2-Octanol [28].

Durch die durch Mutationen hervorgerufene räumliche Änderung des aktiven Zentrums besteht auch die Möglichkeit, kleinere *n*-Alkane $\leq C4$ umzusetzen. Mit Hilfe des Protein Engineering der P450 BM-3 wurden mehrfache (etwa 23) Mutationen im gesamten Gen eingeführt. Anschließend wurden mit einem Durchmusterungsverfahren, die Mutanten auf ihre Fähigkeit, das gasförmige *n*-Alkane Propan umzusetzen, untersucht. Mit einer 98 %igen Propanumsetzung zu 1-Propanol und 2-Propanol (1:9) konnte die Mutante P450_{PMO}R2 identifiziert werden [75]. Das ebenfalls gasförmige Ethan konnte durch die P450 BM-3-Mutante 35-11, die insgesamt 17 Mutationen vorweist, in dessen Alkohol umgesetzt werden [74].

Enzyme, die Eisen über andere Liganden als ein Porphyrin-Molekül binden, werden als Nicht-Häm-Eisenenzyme bezeichnet. In die Klasse der Nicht-Häm-Eisenenzyme gehören die integrierten Membranproteine, wie z. B. die Membran-gebundene Methan Monooxygenase (pMMO) aus *M. capsulatus*. Sie ist in der Lage lineare Alkane, wie Butan und Pentan, überwiegend zu *R*-2-Alkohole zu hydroxylieren, akzeptiert jedoch keine längerkettigen Alkane. Die lösliche Methan Monooxygenase (sMMO) aus *M. capsulatus* (Bath)

katalysiert die NADH-abhängige Oxidation von Methan zu Methanol, sowie die Reaktion mit den Substraten C2 bis C8 [76]. Dieses Enzym oxidiert die Substrate (speziell Propan und Butan) nur zu primären und sekundären Alkoholen und weist somit nicht die selektive Oxidation einer terminalen Hydroxylase auf.

Eine weitere Membran-integrierte Nicht-Häm-Eisen Alkan-Monooxygenase wurde in *Pseudomonas oleovorans* entdeckt und mit dem Kürzel AlkB bezeichnet. Dieser Organismus ist fähig auf linearen Alkanen (C6-C16) zu wachsen und diese terminal zu hydroxylieren [77].

Einige Mikroorganismen/Bakterien besitzen sogar die Fähigkeit langkettige Alkane, (>C16) als C-Quelle nutzen zu können, wie z. B. *Rhodococcus*, (>C32) [78] oder *Pseudomonas fluorescens* (C18–C28) [79]. Keines der beiden Enzyme wurde bis heute isoliert, um deren oxidative Alkan-Aktivität *in vitro* bestätigen zu können.

1.3.2 Cyclische Alkane

Die Cycloalkane sind gesättigte Kohlenwasserstoffe mit der allgemeinen Summenformel C_nH_{2n} , wobei $n \geq 3$ ist. Somit ist das kleinste vorkommende Cycloalkan das Cyclopropan. Das Einteilungskriterium für Cycloalkane ist die Größe des Kohlenstoffrings. Cycloalkane, deren cyclische Kohlenstoffkette drei oder vier Kohlenstoffatome enthält, werden als kleine, von fünf bis sieben als normale, von acht bis elf als mittlere und mehr als elf als größere Cycloalkane bezeichnet. Unter Normalbedingungen sind die kleinen

Cycloalkane gasförmig, ab fünf Kohlenstoffatome sind sie flüssig. Im Wasser sind die unpolaren Cycloalkane nur schlecht löslich oder sogar unlöslich. Die ringförmige Struktur der Cycloalkane wirkt sich auf ihre Reaktivität und auf die Schmelz- und Siedepunkte aus. Die Reaktivität der Cycloalkane sinkt mit zunehmender Ringzahl, $C_3 \leq C_5$, was im Zusammenhang mit ihrer Konformation steht. Um Molekülspannungen zu umgehen, lagern sich die C-Atome der Cycloalkane nicht planar, sondern in einer Sesselkonformation, mit einem Winkel von $109,45^\circ$, zueinander. Bei den kleineren Ringen, C_3 bis C_5 , kann dieser Winkel nicht ganz erreicht werden, wodurch eine sogenannte Baeyer-Spannung entsteht. Wegen dieser Spannung sind die Moleküle $C_3 \leq C_5$ reaktiver als höhere Cycloalkane. Das monocyclische Alkan besitzt immer einen höheren Siede- und Schmelzpunkt als das entsprechende *n*-Alkan. Cycloalkane sind leicht entflammbar, jedoch sehr reaktionsträge und gehen im Wesentlichen die gleichen Reaktionen wie die Alkane ein. Sie sind typische schwer aktivierbare Kohlenwasserstoffe, die nur sehr ineffizient, wenn überhaupt mit Hilfe von heterogenen und homogenen Katalysatoren oxidiert werden. In einer unserer früheren Arbeiten wurde eine P450 BM-3-Mutante (R47L Y51F) beschrieben, die mit Hilfe eines Zweiphasensystems in der Lage ist Cyclohexan zu Cyclohexanol zu hydroxylieren [80]. Besonders schwierig ist die Oxidation von Cycloalkanen ab C_{10} .

Verzweigte und lineare Alkane sind neben Cycloalkanen die Hauptbestandteile von Erdöl. Eine mögliche Reaktion zum Abbau

dieser Substanzen wäre eine selektiv gerichtete Oxidation der Alkane in deren Alkohole, wobei die Cycloalkane schwieriger abzubauen sind als *n*-Alkane. Einige derzeit bekannte Alkan-abbauende Bakterien für Cyclohexan und dessen Derivate sind *Nocardia* [81], *Acinetobacter* [82, 83], *Xanthobacter* [84] und Mycobakterium [85]. Der Reaktionsweg zum Cyclohexan-Abbau beginnt mit einer Hydroxylierung zum Alkohol am Ausgangsring durch eine Monooxygenase, gefolgt von einer Oxidation des Cyclohexanols zu dessen Keton, Cyclohexanon, mit Hilfe einer Dehydrogenase. Durch das Einfügen eines Sauerstoffatoms an zweiter Kohlenstoffposition in das Cyclohexanon, katalysiert durch eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase, entsteht ein Lacton. Aufgrund dieser Vermutung wurden Baeyer-Villiger-Monooxygenasen einiger Mikroorganismen isoliert und charakterisiert, nahezu nichts ist über eine entsprechende Cyclohexan-Oxygenase bekannt. Ein weiteres Alkan-abbauendes P450-Enzym, P450balk aus *Alcanivorax borkumensis* SK2, besitzt die Fähigkeit Cyclohexan zu dessen Alkohol Cyclohexanol umzusetzen [62, 72].

Den Abbau größerer Cycloalkane, wie Cyclodecan und Cyclododecan, sind weniger gut erforscht. Erst kürzlich wurde der Stamm *Rhodococcus ruber* D4 beschrieben, der die Möglichkeit besitzt Cyclododecan und dessen entsprechende Monoketone mit anschließender Ringteilung zu oxidieren [86].

1.3.3 Enzyme aus Hefen für die Oxidation von Alkanen

P450-Enzyme von *n*-Alkan-verarbeitenden Hefen besitzen die Fähigkeit langkettige Alkane (C10–C16) und meist auch Fettsäuren terminal oder subterminal zu metabolisieren [87]. Anhand dieses Merkmals werden die P450-Enzyme aus Hefen in die Klasse der CYP52-Enzyme eingeteilt. Wobei die Hefe-P450s gerne auch als P450alk, aufgrund ihrer Eigenschaft Alkane umsetzen zu können, bezeichnet werden. P450s, mit eben dieser Besonderheit, sind in *Candida*- und *Yarrowia*-Gattungen zu finden und werden im deutschen Sprachgebrauch „Alkanhefen“ genannt.

Die ersten Aufzeichnungen über 36 *Candida*-Gattungen die *n*-Alkane (C9–C18) oder 1-Alkene (C10, C12, C14, C16, C18) als C-Quellen nützen können sind 1967 veröffentlicht [88]. Bei näherer Untersuchung zur Fähigkeit von *C. lipolytica* langkettigen *n*-Alkane und Fettsäuren *in vivo* zu hydroxylieren konnten bei der Alkanumsetzung die Alkoholprodukte ω oder $\omega-1$ beobachtet werden. Im Falle von Fettsäuren als C-Quelle konnten nur ω -Produkte detektiert werden [89].

Erste *in vitro*-Untersuchungen wurden 1973 mit *C. tropicalis* durchgeführt und konnten die Anwesenheit eines P450-Systems bei der Hydroxylierung von Alkanen bestätigen [90]. Seither konnten sieben P450-Enzyme (CYP52A1 [91], CYP52A2 [92], CYP52A6 bis A8, CYP52B1, CYP52C1 [48]), sowie die NADPH-Cytochrom P450-Oxidoreduktase, aus *C. tropicalis* identifiziert und auch charakterisiert

werden [93]. Die Hefe *C. albicans* beinhaltet zehn mutmaßliche P450s. Charakterisiert werden konnte jedoch nur CYP52A21, welche eine überwiegende terminale und nur zu einem geringen Anteil subterminale Hydroxylierung von Fettsäuren (C12, C14, C16) katalysiert [94]. Erst kürzlich entdeckt wurde die NADPH-P450-Reduktase des P450-Systems aus *C. albicans* [95]. Weitere acht P450-Enzyme (CYP52A3 bis A5, CYP52A9 bis A11, CYP52C2, CYP52D) konnten aus der Hefe *C. maltosa* identifiziert und charakterisiert werden [47]. Zeitgleich erfolgte die Expression und Charakterisierung der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aus *C. maltosa* [96, 97]. Aus *Yarrowia lipolytica* sind insgesamt acht P450-Gene bekannt: *YIALK1* [98], *YIALK2* bis *YIALK8* [99], die ebenfalls eine *n*-Alkan-abbauende Funktion aufweisen.

Einige *Candida*-Stämme sind Sophorolipid-Bildner. Sophorolipide sind mikrobielle Glykolipide und werden unter Verwendung von *Candida*-Stämmen (*C. bombicola*, *C. apicola*) produziert, indem man diese auf Zuckern, Kohlenwasserstoffen, Pflanzenölen oder Mischungen davon wachsen lässt. Sie bestehen aus einem Disaccharid (Sophorose), das sich mit einer zuvor hydroxylierten Fettsäure oder einem zuvor hydroxylierten Alkan verbindet (Abbildung 1-10). Sophorolipide unterscheiden sich durch ihre Fettsäuren/Alkane, die wiederum von den Inhaltsstoffen (Ölen) des Ausgangsmediums abhängig sind [100]. Wird der Hefe nur Glucose als Kohlenstoffquelle angeboten, so sinkt die Sophorolipid-Produktion im Vergleich zur Produktion in

Fettsäuren/Alkanen als C-Quelle enorm ab und es werden nur ω -hydroxylierte Fettsäuren/Alkane synthetisiert. Die Hydroxylierung an ω -1-Position ist nur zu geringen Anteilen, wenn die Hefe auf *n*-Alkanen wächst, zu beobachten [89]. Die Beteiligung der P450-Enzyme aus Hefen an der Hydroxylierung der Fettsäuren zur Sophorolipid-Bildung konnte bestätigt werden [101]. Die Sophorolipide werden extrazellulär gebildet und besitzen oberflächenaktive Eigenschaften (Tensideigenschaften), jedoch ist ihre biologische Funktion im Hefeorganismus noch nicht aufgeklärt [100]. Sophorolipide sind, im Gegensatz zu chemisch synthetisierten Tensiden, weniger toxisch, biologisch abbaubar und umweltverträglich. Darüber hinaus konnte man den Sophorolipiden und deren Derivaten antiseptische, anticancerogene, spermizide, antimikrobielle und antivirale Wirkungen nachweisen. Die Industrie macht sich die natürlichen Sophorolipide der Hefen zu Nutze und verwendet diese als natürliche Tenside z. B. in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie [102-105].

Ein Vorteil der Sophorose-bildenden Hefen ist deren Einsatz bei Öl-kontaminierten Gewässern und Böden. Die Ölverschmutzung durch Alkane kann durch den Abbau mit Hilfe eingesetzter Hefen eliminiert werden [103].

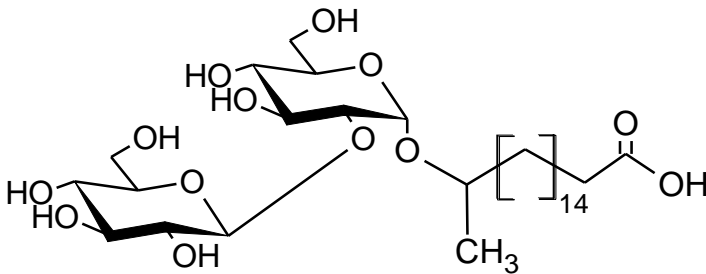


Abbildung 1-10: Aufbau eines Sophorolipids

Die Grundbausteine eines Sophorolipids sind zwei miteinander verbundene Zuckermoleküle (Sophorose) und eine ω oder $\omega-1$ hydroxylierte, ungesättigte oder gesättigte Fettsäure.

Im obigen gezeigten Bild sind zwei Moleküle D-Glucopyranose (1→2) zu Sophorose verbunden (2-O-Glucopyranosyl-D-Glucopyranose) und mit einer $\omega-1$ -Stearinsäure acetyliert.

Identifizierte und charakterisierte P450-Systeme von Sophorolipid-bildenden Hefen sind drei P450-Enzyme (CYP52E3, CYP52M1, CYP52N1 [106]) sowie die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus *C. bombicola* [10]. Mit Letzterer konnten bisher die höchsten Sophorolipid-Konzentrationen von 700 g/L Kulturmedium erzielt werden [107]. Eine weitere Hefe, mit der Eigenschaft Sophorolipide herzustellen, ist *C. apicola*, aus der zwei identifizierte P450-Enzyme (CYP52E1 und CYP52E2) bekannt sind [49].

1.4 Enzymimmobilisierung

Die räumliche Fixierung von Bakterien oder Enzymen an einer Matrix wird als Immobilisierung bezeichnet. Die einfachste und billigste Form der Immobilisierung ist die physikalische Bindung einer

Biokatalysatoroberfläche an einen Träger. Die Adsorption ist zwar sehr schonend für den Biokatalysator, jedoch ist diese Form der Immobilisierung nicht für alle Katalysatoren geeignet und die Bindung oft nur recht schwach. Trotzdem, hat das Verfahren der Immobilisierung von Katalysatoren auch Vorteile, wie kontinuierliche Prozessführung, wiederholte Nutzbarkeit, einfache Handhabbarkeit und Langzeitstabilität. Das Letztgenannte ist das wohl wichtigste bzw. interessanteste Kriterium für eine Immobilisierung speziell für die Industrie. Denn der Verlust der Stabilität eines Katalysators/Enzyms, aufgrund extremer Prozessbedingungen (Temperatur, Lösemittel) kann durch eine Immobilisierung minimiert werden. Für das Verfahren der Immobilisierung werden Molekularsiebe genutzt, die geeignete Eigenschaften für die Immobilisierung aufweisen, wie z. B. eine große Oberfläche, hydrophobes sowie hydrophiles Verhalten, elektrostatische Wechselbeziehungen, sowie mechanische und chemische Widerstandsfähigkeit. Seit 1993 werden immer häufiger mesoporöse Silikate, wie z. B. MCM-41 und SBA-15 mit einem einheitlichen Porendurchmesser von 1,5–30 Å zur Immobilisierung eingesetzt. Diese anorganischen Materialien, die günstige Porengrößen und Oberflächen für die Immobilisierung von Enzymen besitzen, sind sehr gefragt. Die ersten Immobilisierungen auf den mesoporösen Materialien MCM-41 und SBA-15 wurden mit kommerziellen Enzymen, wie Cytochrom c [108], Lysozym [109], Lipase [110, 111] und Albumin [109, 112] erforscht. Durch den Einsatz verschieden großer Templates wurden anorganische Materialien mit Porendurchmesser synthetisiert, die dem

Molekulardurchmesser des zu immobilisierenden Enzyms entsprechen oder geringfügig größer sind. Der grundlegende Mechanismus der Enzymadsorption oder –inkorporation in mesoporöse Silikate wurde bisher noch nicht genau definiert.

1.5 Zielsetzung

Die vorrangige Aufgabe war es, natürliche Enzyme zu finden oder durch Protein Engineering zu modifizieren, die Alkane in subterminaler Position selektiv oxidieren können. Der Fokus lag hierbei besonders bei der enzymatischen Umsetzung von *n*-Octan zu 2-Octanol, da eine chemische Hydroxylierung von linearen Alkanen nur schwer zu erreichen ist. Ein enantiomeren-reines 2-Octanol-Produkt kann auf chemischem Wege kaum entstehen, jedoch sind enzymatische Reaktionen mit der ausschließlichen Bildung eines Enantiomers oder mit einem enormen Überschuss eines Enantiomeren-Produkts aus der Literatur bekannt. Jährlich werden mehr als 8.000 Tonnen enantiomeren-reines 2-Octanol als Grundstoff für zahlreiche Ester in der Industrie verwendet, somit ist die erfolgreiche Etablierung einer schnellen und kostengünstigen 2-Octanol-Produktion, mit hoher Ausbeute, enorm wichtig. Hierfür wurden zwei P450-Systeme genutzt: P450 BM-3 aus *B. megaterium* und zwei P450-Monooxygenasen aus *C. apicola*. Des Weiteren wurden P450 BM-3-Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, cyclische Alkane verschiedener Größen (C8, C10, C12) zu hydroxylieren. Die letzte Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit war die Immobilisierung der P450 BM-3 Häm-Domäne auf

mesoporösen Materialien mit unterschiedlichen Porengrößen, wie MCM-41 (Porendurchmesser $d_p = 25 \text{ \AA}$) und SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$ und $d_p = 133 \text{ \AA}$). Daraus ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Protein Engineering der bakteriellen Cytochrom P450-Monooxygenase BM-3 zur Produktion von 2-Octanol (in hoher Regio- und Enantiomerenreinheit) ausgehend vom linearen Alkan *n*-Octan
- Verwendung einer P450 BM-3-Mutanten-Minimalbibliothek und die Analyse der Produkte bei Reaktionen mit cyclischen Alkanen (C8, C10, C12)
- Immobilisierung der Häm-Domäne von P450 BM-3 F87A auf mesoporösen Materialien, wie MCM-41 und SBA-15 zur Enzymstabilisierung, sowie Aktivitätsbestimmungen mit dem Surrogat-Substrat 12-*p*NCA und *n*-Octan
- Klonierung, Expression der CYP52E-Gene und deren Untersuchung auf subterminale Hydroxylierung von *n*-Octan

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits

Hersteller	Chemikalien, Enzyme, Kits
Bio-Rad, München, Deutschland	Bradford-Reagenz
Codexis, Jülich, Deutschland	NADPH + H ⁺
Difco, Heidelberg, Deutschland	YNB (Yeast Nitrogen Base)
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)
Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	PageRuler Prestained Protein Ladder, <i>Pfu</i> -Polymerase, Restriktionsenzyme + Puffer, T4-DNA-Ligase
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	α-Naphthol, 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), Aminosäuren, Agar-Agar, Bromphenolblau, Chloramphenicol, Coomasie-Brilliant-Blau R-250, Cyclooctan, 1-Decanol, Diethylether, Essigsäureanhydrid, Ethidiumbromid, EDTA, Glycin, Imidazol, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumphosphat, Kanamycin,

	Lithiumacetat, Lysozym aus Hühnereiweiß, Magnesiumacetat, Magnesiumsulfat, Mercaptoethanol, Methanol, Natriumchlorid, Natriumdithionit, Natriumphosphat, 1-, 2-, 3-, 4-Octanol, Orange G, PMSF, Salzsäure (HCl), Sodiumdodecylsulfat (SDS), Sorbitol, Sucrose, Toluol, Triton X-100, Wasserstoffperoxid
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	Zeocin
Kremer Pigmente, Aichstetten, Deutschland	Cyclododecan
Lancaster Synthesis, Morecamb, England	<i>n</i> -Octan
Metabion international, Planegg-Martinsried, Deutschland	Oligonukleotide
Merck, Darmstadt, Deutschland	Isopropanol, Methanol
New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	2-Log DNA Ladder

Qiagen, Hilden, Deutschland	Gelextraktion Kit, Nickel-NTA
Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	DMSO, Essigsäure, Ethanol (abs.), Glycerin
Roche, Mannheim, Deutschland	magnetische Streptavidin Kugeln
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Acrylamid, Ampicillin, Chloroform/Isoamylalkohol, Hefeextrakt, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Trypton, TEMED
Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	Aceton, Agarose, Ammoniumpersulfat, BSA, Cyclodecan, Cytochrom c, D-Glucose, GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, PEG-3350, Protease Inhibitor Cocktail Tablette (EDTA frei), Proteinase K, RNase, Thiamin hydrochlorid, Tris
Stratagene, La Jolla, USA	dNTPs
VWR, Darmstadt, Deutschland	Herings-Sperma DNA

2.2 Geräte und Verbrauchsgegenstände

Tabelle 2-2: Verwendete Geräte und Materialien

Hersteller	Geräte	Typbezeichnung
Beckman Coulter, Deutschland	Ultrazentrifuge	Optima™ LE-80K
Bio-Rad, München, Deutschland	DNA- Gelelektrophorese SDS-Gel-Trockner Elektroporationsgerät Elektroporationsküvetten	DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT Model 583 Gel-Dryer Pulse Controller, Gene Pulser Küvetten
Branson, Ultraschall, Dietzenbach, Deutschland	Sonifier	Sonifier 250
Karl Breseman, Deutschland	Agarosegel- Dokumentations- System	UV-Lampe 254 nm
Chromatographie Service GmbH, Deutschland	GC-Säule GC/MS-Säule	FS-Cyclodex β -I/P FS-Supreme-5

FUJIFILM, Japan	Agarosegel- Dokumentations- System	Image Reader LAS- 1000 Intelligent Dark Box
Getinge AB, Getinge, Schweden	Autoklav	Pacs 2000
Grace Company	Amicon	
Heidolph	Rotamix	
Herenz Medizinalbedarf, Hamburg, Deutschland	Haemocytometer	Superior
Hitachi, Japan	Agarosegel- Dokumentations- System	Video Copy Processor
Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland	Äkta Photometer	Explorer Ultrospec 3000
Retsch, Haan, Deutschland	Schwingmühle	Retsch MM2000
Science Services	Polyallomer Ultrazentrifugenröh- rchen	S5030
Shimadzu Europe, Duisburg, Deutschland	GC GC-MS	GC2010 GCMS-QP-2010
Sorvall, Langenselbold, Deutschland	Zentrifugen Rotoren	RC-5C Plus SS-34, SLA-3000

Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Deutschland	Photometer	Nicolet Evolution 100
WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland	Inkubatoren	Brutschränke und Schüttler WTC Binder
WTW, Weilheim, Deutschland	pH Meter	
Zeiss, Esslingen, Deutschland	Mikroskop	

2.3 Stämme, Oligonukleotide, Plasmide

2.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	relevanter Genotyp	Anbieter
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen, Madison, USA
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cm ^R)	Novagen, Madison, USA

<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA- argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Clontech, Heidelberg, Deutschland
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS- mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.3.2 Hefestämme

Tabelle 2-4: Verwendete Hefestämme

Spezies	Stamm	relevanter Genotyp	Anbieter
<i>Candida apicola</i>	-	Wildtyp	ATCC, Wesel, Deutschland (ATCC Nummer: 96134)
<i>Pichia pastoris</i>	X-33	Wildtyp	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland (Katalognummer: C180- 00)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	INVSc1	MAT <i>his3D1 leu2</i> <i>trp1-289</i> <i>ura3-52</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland (Katalognummer: C810-00)
---------------------------------	--------	--	---

2.3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried/Deutschland) bezogen. Sie sind namentlich und mit ihrer Nukleotidsequenz in Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6 aufgeführt. Restriktionsschnittstellen und veränderte Codons sind in Kleinschreibweise dargestellt.

Tabelle 2-5: Oligonukleotide für Punktmutationen von P450 BM-3

Restriktionsschnittstellen und veränderte Codons sind in Kleinschreibweise dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Punktmutation
Ewe_F87ABM-3F	GCAGGAGACGGGTTAgctACAAGCT GGACGC	F87A
Ewe_F87ABM-3R	GCGTCCAGCTTGTtagcTAACCCGTC TCCTGC	F87A
Ewe_P1G5_fw_F	CGCTTATGGCCAACTtttCCTGCGTT TTCCC	I263F
Ewe_P1G5_rev_F	GGGAAAACGCAGGaaaAGTTGGCC ATAAGCG	I263F

Ewe_P1G5_fw_L	CGCTTATGGCCAACtctCCTGCGTT TTCCC	I263L
Ewe_P1G5_rv_L	GGGAAAACGCAGGaagAGTTGGCC ATAAGCG	I263L
Ewe_A328V_fw	CGCTTATGGCCAACgttCCTGCGTT TTCCC	A328V
Ewe_A328V_rev	GGGAAAACGCAGGaacAGTTGGCC ATAAGCG	A328V
Mdil263Af	CGCTATCAAATTATTACATTCTTAgc tGCGGGACACGAAACAAC	I263A
Mdil263Ar	GTTGTTTCGTGTCCCGCagcTAAGA ATGTAATAATTTGATAGC	I263A
Mdil263Gf	CGCTATCAAATTATTACATTCTTAagg tGCGGGACACGAAACAAC	I263G
Mdil263Gr	GTTGTTTCGTGTCCCGCaccTAAGA ATGTAATAATTTGATA	I263G
Mdil263Rf	CGCTATCAAATTATTACATTCTTAagg gGCGGGACACGAAACAAC	I263R
Mdil263Rr	GTTGTTTCGTGTCCCGCcttTAAGAA TGTAATAATTTGATAGCG	I263R
I263Vf (Mdi)	GCTATCAAATTATTACATTCTTAgttG CGGGACACGAAACAACAAGTGG	I263V
I263Vr (Mdi)	CCACTTGTTGTTTCGTGTCCCGCaa cTAAGAATGTAATAATTTGATAGC	I263V

Tabelle 2-6: Oligonukleotide zur Identifizierung und Klonierung der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus *Candida apicola*

Restriktionsschnittstellen und veränderte Codons sind in Kleinschreibweise dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
Ewe_P1red_for	GGSTCBCARACYGGWACK GCHGARGAYYW	Degenerierter Primer
Ewe_P2red_for	CCHCGHTAYTACTCMATYT CKTCHTCBTC	Degenerierter Primer
Ewe_P2red_rev	GAVGADGAMGARATKGAG TARTADCGDGG	Degenerierter Primer
Ewe_P3red_rev	DBCTACCAMACRTCYTCYT GGTAB	Degenerierter Primer
Ewe_P4red_rev	AGTGACGGATGTGGACCG GAACAC	Degenerierter Primer
KDO_WP1	CTAATACGACTCACTATAG GGnnnnATGC	Statistischer Primer für Genom Walking
KDO_WP2	CTAATACGACTCACTATAG GGnnnnGATC	Statistischer Primer für Genom Walking
KDO_WP3	CTAATACGACTCACTATAG GGnnnnTAGC	Statistischer Primer für Genom Walking
KDO_WP4	Ctaatacgactcactatagggnnnnc tag	Statistischer Primer für Genom Walking

KDO_NWP	Ctaatacgactcactataggg	Statistischer Primer für Genom Walking
EweKotCapiCPR revBiotin	BiotinGTAGATGCTTGAGAT TGGGTTCTCCAAG	Biotinilierte Primer für Genom Walking
EweKotCapiCPR revSpez	GCTTTACGCTGATCGCAG GCTC	Nested primer
EWE_CapiCPR EndeForBiotin	BiotinCCTATCATCATGGTC GGGCCGG	Biotinilierte Primer für Genom Walking
EWE_CapiCPR EndeSpez	CTGCAGGCAAAGAGGTAG G	Nested primer
Ewe_CPRkurz_ NcoI_For	CTTAGccatggTCGATACGA ATCTTCTTGCG	Primer zur Klonierung vom CPR-Gen in pET28a+
EWE_CPRNotI_ rev	TAAAgcggccgcCCAAACATC CTCTTGGTA	Primer zur Klonierung vom CPR-Gen in pET28a+

Tabelle 2-7: Oligonukleotide zur Klonierung der CYP52E1- und CYP52E2-Gene aus *Candida apicola*

Unterstrichene Sequenzen sind zusätzlich angehängte Nukleotide der 17 α -Hydroxylase-Sequenz. Restriktionsschnittstellen und veränderte Codons sind in Kleinschreibweise dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
CYP52E1_for_ NotI	GGAATTCg <u>cgggccgc</u> ATGATT ATTGGACTTTCAG	Klonierung CYP52E1 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pYES2
CYP52E1_rev_ XbaI	CATtctagaCTAACGAATGAA CCTCG	
CYP52E2_for_ HindIII	GGAGGTCaagcttATGAACA TTAACTTCTCTG	Klonierung CYP52E2 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pYES2
CYP52E2_rev_ XbaI	CATtctagaCTAGCGAATGAA CCTC	
Ewe_CYP52E1 _forC_KpnI	GGAATTCggtacctATGATTA TTGGACTTTCAG	Klonierung CYP52E1 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pPICZ C
Ewe_CYP52E1 _rev_NotI	CATg <u>cgggccgc</u> CTAACGAATG AACC	

Ewe_CYP52E1_forAlphaA_KpnI	GGAATTCggtacctATTATT GGACTTTCAGACG	Klonierung CYP52E1 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pPICZα A
Ewe_CYP52E2_forAlphaA_KpnI	GGAGGTCggtacctAACAT TAACTTCTCTGATG	Klonierung CYP52E2 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pPICZα A
CYP52E1_for	GGAATTCcatatgATTATT GGACTTTCAG	Klonierung CYP52E1 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pCold III
CYP52E1_rev	CATggatccCTAACGAATG AACCTCG	
CYP52E2_for	GGAGGTCcatatgAACATT AACTTCTCTG	Klonierung CYP52E1 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pCold III
CYP52E2_rev	CATggatccCTAGCGAAT GAACCTC	
EWE_E1_Bam-pTrc-for	CGCggatcctATGATTATT GGACTTTCAG	Klonierung CYP52E1 aus <i>C. apicola</i> in den Vektor pTrcHisTOPO

EWE_E1_Eco- pTrc-rev	CTAgaattcCTAACGAATG AACCTCGTTATCAC	
EWE_E2_NCO- pTrc-for	CATGccatggcaATGAACA TTAACTTCTCTGATGCA CTCATGC	Klonierung CYP52E2 aus <i>C.</i> <i>apicola</i> in den Vektor pTrcHisTOPO
EWE_E2_Hind- pCWO-pTrc-rev	CaccaagctTCAGCGAATG AACCTCGTTATCACGCC ACCGCTAGAAG	Klonierung CYP52E2 aus <i>C.</i> <i>apicola</i> in die Vektoren pTrcHisTOPO und pCWOri
EWE_E1_NDE- pCWO-for	GTAATTCcatatg <u>GCTCTG</u> <u>TTATTAGCAGTTTTTCTG</u> GTCGCCTACCAATTCAT CTACTTTTAC	Klonierung CYP52E1 aus <i>C.</i> <i>apicola</i> in den Vektor pCWOri
EWE_E1_Bgl- pCWO-rev	GGATagatctAACGAATGA ACCTCGTTATCACGCCA CC	
EWE_E2_NDE- pCWO-for	GTAATTCcatatg <u>GCTCTG</u> <u>TTATTAGCAGTTTTTCTG</u> <u>CTCGCCTCCCAGGCGA</u> TTTAC	Klonierung CYP52E2 aus <i>C.</i> <i>apicola</i> in den Vektor pCWOri

2.3.4 Verwendete Plasmide

In Tabelle 2-8 sind verwendete Plasmide sowie deren relevante Promotoren und Resistenzen aufgelistet.

Tabelle 2-8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Expressions-Stamm	Resistenz / Besonderheit	Anbieter
pCold III	<i>E. coli</i>	Ampicillin	Takara Bio, Madison, USA
pCWOri	<i>E. coli</i>	Ampicillin	
pET22b+	<i>E. coli</i>	Ampicillin	Novagen, San Diego, USA
pET28a+	<i>E. coli</i>	Kanamycin	Novagen, San Diego, USA
pLysS	<i>E. coli</i>	Chloramphenicol	Novagen, San Diego, USA
pPICZ C, pPICZ α A	<i>Pichia pastoris</i>	Zeocin	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
pTrcHisTOPO	<i>E. coli</i>	Ampicillin	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland

pYES2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uracil	Invitrogene, Karlsruhe, Deutschland
-------	---------------------------------	--------	-------------------------------------

2.4 Medien, Lösungen und Puffer

2.4.1 Medien

Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Flüssigkulturen wurden erst kurz vor dem Inokulieren mit Antibiotika versetzt. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 12 g/L Agar zugeführt. Das Plasmid-entsprechende Antibiotikum wurde erst nach Abkühlen des Agarmediums auf 50 °C zugemengt.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) :

Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

Die Einstellung des pH-Wertes von pH 7 erfolgte über die Zugabe von NaOH.

TB-Medium (Terrific Broth-Medium) :

Glycerin	4 ml
Hefeextrakt	24 g
Trypton	12 g
dH ₂ O	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml eines sterilen 10x TB-Phosphat-Puffers zugegeben.

YPD-Medium (Hefe-Pepton-Dextrose-Medium) :

Hefeextrakt	10 g
Trypton	20 g
dH ₂ O	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurden 100 ml einer 20 %igen D-Glucose-Lösung zugegeben.

YPDS-Medium :

Hefeextrakt	10 g
Trypton	20 g
Sorbitol	1 M
dH ₂ O	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurden 100 ml einer 20 %igen D-Glucose-Lösung zugegeben.

10x Uracil⁻-Medium :

Adenin	0,1 % (m/V)
Arginin	0,1 % (m/V)
Cystein	0,1 % (m/V)
Leucin	0,1 % (m/V)
Lysin	0,1 % (m/V)
Threonin	0,1 % (m/V)
Tryptophan	0,1 % (m/V)
Aspartat	0,05 % (m/V)
Histidin	0,05 % (m/V)
Isoleucin	0,05 % (m/V)
Methionin	0,05 % (m/V)
Phenylalanin	0,05 % (m/V)
Prolin	0,05 % (m/V)
Serin	0,05 % (m/V)
Tyrosin	0,05 % (m/V)
Valin	0,05 % (m/V)

Selektivagar-Uracil⁻-Medium :

YNB	0,67 (m/V)
10x Uracil ⁻ -Medium	1 % (V/V)
dH ₂ O	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurden 100 ml einer 20 %igen D-Glucose-Lösung zugegeben.

2.4.2 Puffer und andere Lösungen

2.4.2.1 Standard-Puffer für TB-Medium

10x TB-Phosphat-Puffer :

KH_2PO_4	2,31 g
K_2HPO_4	12,54 g
dH_2O	ad 100 ml

2.4.2.2 Lösung für die Expression der Hefegene in *E. coli*-Zellen

4000x Spurenelemente :

MgCl_2	5 mM
$\text{FeCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	120 mM
$\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4,5 mM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,8 mM
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	4,5 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3,4 mM
CuCl_2	7,5 mM
H_3BO_3	3,2 mM

Die Bestandteile der Spurenelementelösung wurden in 10 % HCl gelöst.

2.4.2.3 Lösungen für die Proteinaufreinigung mit einer Ni-NTA-Säule durch einen 6x His-Tag

Puffer A :

Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5	50 mM
NaCl	500 mM

Puffer B :

Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM

2.4.2.4 Lösungen für die Arbeitsschritte mit Hefezellen

1x LiAc/0,5x TE :

Lithiumacetat pH 7,5	100 mM
Tris/HCl pH 7,5	5 mM
EDTA	0,5 mM

1x LiAc/40 %PEG-3350/1x TE :

Lithiumacetat pH 7,5	100 mM
PEG-3350	40 % (V/V)
Tris/HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

1x TE-Puffer :

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

Aufschluss-Puffer :

Triton X-100	2 % (V/V)
SDS	1 % (m/V)
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Tris/HCl pH 8,0	10 mM

Lithiumacetat-Puffer 100 mM :

Lithiumacetat	6,6 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte über Titrierung mit NaOH.

PBS-Puffer :

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

2.4.2.5 Verwendete Antibiotika

Zur Selektion der Plasmide wurden die in Tabelle 2-9 genannten Antibiotikakonzentrationen benötigt.

Tabelle 2-9: Antibiotikakonzentrationen

Antibiotika	Konzentration der Stammlösung	Plasmid	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	pET22b+	100 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	pTrcHisTOPO	50 µg/ml
Chloramphenicol	350 mg/ml in Ethanol (abs.)	pLysS	35 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml in ddH ₂ O	pET28a+	30 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml in ddH ₂ O	pPICZ C, pPICZα A	25 µg/ml (<i>E. coli</i>) 100 µg/ml (<i>P. pastoris</i>)

2.4.2.6 Lösungen für die Gelelektrophorese zur DNA-Trennung

50x TAE-Puffer :

EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
Essigsäure	57,1 ml
Tris	242 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

10 x Orange G-Probenpuffer :

Sucrose	20 g
dH ₂ O	40 ml

Die Zugabe von 100 mg Orange G erfolgte nach vollständiger Auflösung obiger Komponenten. Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit dH₂O aufgefüllt.

2.4.2.7 Lösungen für die Transformation von *E. coli*-Zellen

Tfbl (Transformationspuffer I) :

CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 % (V/V)
KAc	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl ₂	100 mM

Die Einstellung des pH-Wertes von pH 5,8 erfolgte über die Zugabe von Essigsäure.

TfblI (Transformationspuffer II) :

CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 % (V/V)
MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM

Die Einstellung des pH-Wertes von pH 6,5 erfolgt über die Zugabe von NaOH.

2.4.2.8 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Probenpuffer :

Tris/HCl pH 6,8	500 mM
Glycerin	10 % (V/V)
SDS	20 % (V/V)
Mercaptoethanol	2 % (w/V)
Bromphenolblau	0,05 % (m/V)

Mercaptoethanol wurde vor jedem Elektrophoresenlauf, aus einer 1 M Stammlösung, frisch zugegeben.

Trenngel (12,5 %) :

4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl-Puffer; pH 8,8; 0,4 % SDS (m/V))	2 ml
Acrylamidlösung 30 % (m/V)	3,33 ml
APS 10 % (m/V)	40 µl
H ₂ O	2,67 ml
TEMED	4 µl

Sammelgel (4 %) :

4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl-Puffer; pH 6,8; 0,4 % SDS (m/V))	1 ml
Acrylamidlösung 30 % (m/V)	0,52 ml
APS 10 % (m/V)	40 µl
H ₂ O	2,47 ml
TEMED	4 µl

Elektrophoresepuffer :

Tris	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

Coomassie-Färbelösung :

Coomassie-Brillant-Blau R-250	1 g
Methanol	30 % (V/V)
Essigsäure (99,8 %)	10 % (V/V)
dH ₂ O	ad 1000 ml

Coomassie-Entfärbelösung :

Methanol	30 % (V/V)
Essigsäure (99,8 %)	10 % (V/V)
dH ₂ O	60 % (V/V)

2.4.2.9 Verwendete Lösungen für das Verfahren des Genom Walkings

TEN100-Puffer :

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM

TEN1000-Puffer :

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	1 M

2.4.2.10 Lösungen für die Aufreinigung der mikrosomalen Fraktion

2x TSE-Puffer :

Trisacetat pH 7,6	100 mM
Sucrose	500 mM
EDTA	0,5 mM

100 mM K_pi pH 7,6 Ultra :

Kaliumphosphat-Puffer pH 7,6	100 mM
Magnesiumacetat	6 mM
Glycerin	20 % (V/V)
DTT	0,1 mM

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von reiner Plasmid-DNA wurde das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, nach Herstellerangaben verwendet.

2.5.2 Gewinnung von genomischer DNA aus *Candida apicola*

Zwei mal 10 ml YPD-Medium wurden mit einer Glycerin-Dauerkultur von *C. apicola* angeimpft und über Nacht bei 25 °C und 180 Upm inkubiert. Durch Zentrifugation (2.000 *g, 20 min, 4 °C) wurden die Zellen geerntet, das gewonnene Zellpellet mit 5 ml PBS-Puffer und 1 mg/ml Proteinase K resuspendiert und bei 65 °C für 20 min inkubiert. Nach der Zugabe von 2 ml 10 %iger SDS-Lösung erfolgte eine erneute Inkubation, diesmal bei 37 °C für 60 min. Der Zellaufschluss wurde durch die Zugabe des gleichen Volumens Glasperlen (Ø 0,75 mm) gestartet. Das Verfahren benötigte eine dauerhafte Durchmischung (15 min) auf dem Vortexer bei 8 °C. Die Zentrifugation, bei 2.000 *g für 10 min bei 4 °C, führte zur Trennung der Zelltrümmer vom Zelllysat, wobei das Zelllysat überführt und erneut einem Zentrifugationsschritt (2.000 *g, 10 min, 4 °C) unterzogen wurde. Der daraus resultierende Überstand wurde 3x mit je 10 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 V/V/V) versetzt, vorsichtig gemischt und jeweils bei 2.000 *g für 30 min bei 4 °C zur Phasentrennung gezwungen. Das gleiche Extraktionsverfahren erfolgte 2x mit gleichem Volumen

Chloroform/Isoamylalkohol. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, überführt und mit 0,6 Volumenanteilen Isopropanol versetzt. Dieses Gemisch wurde für mindestens 10 min bei -20 °C gelagert und anschließend einer Zentrifugation, bei 2.000 *g für 20 min bei 4 °C, unterzogen. Das gewonnene Pellet wurde 2-3x mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend über Nacht getrocknet. Nach Aufnahme des getrockneten Pellets in 100 µl dH₂O erfolgte die Zugabe von 2 µl RNase mit einer abschließenden Inkubation für 1 h bei 37 °C.

2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA

2.5.3.1 Standard-PCR

Der erste Schritt einer Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) ist die thermische Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA bei 95 °C, was ein Aufschmelzen der Doppelstränge bewirkt. Es entsteht einzelsträngige DNA. Im zweiten Schritt lagern sich die Oligonukleotide an die Matrizen-DNA an. Die „Annealing“-Temperatur gibt hierbei die Temperatur an, bei der Oligonukleotid und DNA-Matrize spezifisch hybridisieren. Das Pipettierschema sowie das Temperaturprogramm einer Standard-PCR sind in Tabelle 2-10 und Tabelle 2-11 beschrieben.

Die Synthese der neuen DNA-Moleküle erfolgte durch eine thermostabile DNA-Polymerase (z. B. *Taq* aus *Thermus aquaticus*, *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus*).

Tabelle 2-10: Pipettierschema für die Standard-PCR

* enthält Mg²⁺ (15 mM)

** dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 2,5 mM, also insgesamt 10 mM

*** Plasmid-DNA oder genomische DNA

Komponente	Volumen	Arbeitskonzentration/Menge
10x Polymerase Puffer*	5 µl	1x
dNTP-Mix**	1 µl	0,2 mM
Primer forward	1 µl	0,2 pmol/µl
Primer reverse	1 µl	0,2 pmol/µl
Ausgangs-DNA***	10–100 ng	0,1–100 ng
ddH ₂ O	ad 49 µl	
Polymerase (5 U/µl)	1 µl	5 U

Tabelle 2-11: Temperaturprogramm für die Standard-PCR

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	1	30
Anlagerung	55–65	1	
Synthese	72	2-7	
Synthese	72	2-7	1
Ruhephase	8	∞	1

2.5.3.2 Ortsspezifische Mutagenese (QuikChange®-Methode)

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Handbuch von Stratagene durchgeführt. Hierzu wurden genspezifische Primer mit einer Länge von 25-45 bp verwendet, die sich im Zentrum nur durch den Austausch von ein, zwei oder drei Basenpaaren gegenüber der Ausgangs-DNA, unterschieden. Das komplette Plasmid mit gewünschter Mutation wurde mit Hilfe der Primer unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (500 bp min⁻¹) vollständig amplifiziert. Vor der Transformation in *E. coli* erfolgte die Verdauungsreaktion der parentalen, methylierten DNA durch *DpnI*.

2.5.4 Genom Walking zur Sequenzanalyse der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus *Candida apicola*

Das Verfahren des Genom Walkings dient zur Genomsequenzanalyse flankierender Bereiche eines bekannten DNA-Abschnittes, mit Hilfe einer PCR-Methode [113].

Die Zusammensetzung der ersten PCR ist in Tabelle 2-10 aufgelistet: Im Ansatz enthalten sind ein sequenzspezifischer Primer mit Biotin-Anhang, und vier verschiedene unspezifische Primer (KDO_WP1-4, Tabelle 2-6) und als Enzym die *Taq*-Polymerase. Das PCR-Programm ist in Tabelle 2-11 beschrieben. Nach der PCR und einer dreimaligen Waschung mit 100 µl TEN100-Puffer wurden 50 µl magnetische Streptavidin-Kugeln mit den vier PCR-Ansätzen vereint, vorsichtig

gemixt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 100 µl TEN1000-Puffer, nach dem am Ende die Kugeln in 25 µl PCR-Puffer aufgenommen wurden. 2 µl dieser Mischung wurden für die zweite PCR eingesetzt, bei der die vier verschiedenen unspezifischen Primer (KDO_WP1-4, Tabelle 2-6) und zwei spezifische Primer, die an die zuvor eingesetzten Biotin-Primer binden, verwendet wurden. Nach abgeschlossener PCR wurden kleine Mengen der PCR-Produkte auf einem Agarosegel analysiert, mit einem linearisiertem pTrcHisTOPO-Vektor ligiert und in *E. coli*-Zellen transformiert.

Nach Erhalt der kompletten Reduktase-Sequenz, durch die Genom Walking-Methode, wurden spezifische Primer (Tabelle 2-6) mit angehängten Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* zur Amplifizierung des Gens in einer folgenden PCR verwendet. Anschließend wurde das Amplifikat und der gewählte Vektor pET28a+ mit den Restriktionsenzymen verdaut (s. Kap. 2.5.7), aufgereinigt (s. Kap. 2.5.6), ligiert (s. Kap. 2.5.8.1) und transformiert (s. Kap. 2.6.2). Zur Gewinnung des entstandenen Plasmids pET28a+ CPR *C. apicola* wurden 5 ml Übernacht-Kulturen, mit Kolonien von der zuvor inkubierten Agarplatte, über Nacht angeimpft und mit einer anschließenden Plasmidisolierung (s. Kap. 2.5.1) gereinigt. Durch einen Verdau mit den gleichen Restriktionsenzymen *NcoI/NotI*, wurde die Aufnahme des PCR-Amplifikats auf einem Agarosegel überprüft.

2.5.5 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA-Proben in einem elektrischen Feld (negativ geladene DNA wandert zur Anode). Dafür wurden 40 ml einer 1 %igen Agaroselösung mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in den Genschlitten gegossen. Nach Polymerisation wurde der Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben sowie ein DNA-Längenstandard wurden mit einem Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach Auftrennung der DNA, bei 120 V für 30 min konnten die DNA-Fragmente mittels UV-Licht detektiert werden.

2.5.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 2.5.5) konnten die DNA-Fragmente (Restriktionsverdau oder PCR) aufgetrennt werden und durch das Ethidiumbromid auf dem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht werden. Die gewünschte DNA-Bande konnte mit Hilfe eines Skalpell's ausgeschnitten werden. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte, nach Herstellerangaben, mit dem Gelextraktion Kit.

2.5.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme katalysieren die Spaltung von DNA-Molekülen an einer spezifischen Schnittstelle. Dieser Schnitt kann versetzt (sticky-ends) oder gerade (blunt-ends) sein.

Pipettierschema :

Plasmid-DNA (Miniprep) oder Insert	10 µl
10x Puffer (enzymspezifisch)	3 µl
Restriktionsendonuklease A (10 U/µl)	0,5 µl
Restriktionsendonuklease B (10 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Der Ansatz wurde 2 h (je nach Enzym auch über Nacht) bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.5.8 Enzymatische Verfahren zur Ligation von DNA-Fragmenten

2.5.8.1 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C durchgeführt.

Ein übliches molekulares Verhältnis, Vektor zu Insert, beträgt für sticky-ends 1:3.

Pipettierschema :

Vektor	x μ l
Insert	y μ l
10x T4-Ligase-Puffer	2 μ l
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	0,5 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

2.5.8.2 Ligation von DNA mit TA-Überhängen

Das PCR-Fragment wurde mit Hilfe einer *Taq*-Polymerase amplifiziert und zur direkten Ligation mit einem linearisierten Vektor verwendet.

Das Ansatzvolumen betrug 5 μ l und wurde, nach vorsichtigem Mischen, nur kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine sofortige Transformation von 2 μ l Ligationsansatz mit 50 μ l kompetenten *E. coli*-Zellen.

Pipettierschema :

Linearisierter Vektor	1 μ l
Frisches PCR-Produkt	0,5–4 μ l
ddH ₂ O	ad 5 μ l

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Stammhaltung und Kultivierung

Für die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Stämmen und –Klonen wurde 15 % (V/V) steriles Glycerin (87 %) mit 85 % (V/V) ÜN-Kultur vermischt

und bei -80 °C gelagert. Für die Lagerung von verschiedenen Hefestämmen wurde ein Mischverhältnis von 50:50 % (V/V) steriles Glycerin zu ÜN-Kultur verwendet.

2.6.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation von Plasmiden wurden 100 µl bzw. 200 µl kompetenter *E. coli*-Zellen mit 70 ng Plasmid-DNA gemischt und für 45 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und einer anschließenden Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. 50-100 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarnährböden mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Das 24stündige Wachstum der Bakterien erfolgte im 37 °C-Brutschrank.

Wenn DNA ursprünglich aus einer Ligation oder QuikChange-PCR stammend transformiert werden sollte, so wurden 10 µl DNA eingesetzt. Das weitere Protokoll wurde jedoch beibehalten.

2.6.2.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen, wie DH5α, BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS, erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode. Hierfür wurden 50 ml LB-Medium aus einer 5 ml ÜN-Kultur im Volumenverhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C, unter Schütteln, bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C und 3.200 *g für 10 min zentrifugiert, das Pellet in 20 ml

vorgekühltem TfbI-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine zehninütige Zentrifugation bei 4 °C und 3.200 *g, mit anschließender Resuspendierung des Pellets mit 2 ml TfbII-Puffer. Aufgeteilt in je 200 µl Aliquots wurden diese sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.6.3 Transformation von *Pichia pastoris*-Zellen durch Elektroporation

P. pastoris-Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Für die Transformation wurden 80 µl kompetente Zellen mit 10 µg linearisierter DNA in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß gemischt und in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt. Nachdem der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert wurde, wurde mit dem Gene-Pulser (Bio-Rad, München, Deutschland) 1.500 V, 25 µF und 400 Ω elektroporiert. Anschließend wurde sofort 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zugegeben und der Ansatz in einem Reaktionsgefäß für 1-2 h ohne Schütteln bei 30 °C inkubiert. 300 µl wurden auf YPDS-Agarplatten mit dem Antibiotikum Zeocin ausplattiert und etwa 3 Tage, bis zum Erscheinen von Kolonien, bei 30 °C inkubiert.

2.6.3.1 Linearisierung der Plasmid-DNA für Rekombination in die chromosomale DNA von *P. pastoris*-Zellen

Vor der Transformation von *P. pastoris*-Zellen wurden die zu transformierenden *Pichia*-Vektoren, pPICZ C und pPICZα A mit

CYP52E-Gen, zur Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *PmeI* geschnitten. 20 µg DNA wurden mit 10 U Restriktionsenzym für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

2.6.3.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

10 µl einer Glycerinkultur von Hefe (*S. cerevisiae*-Stamm INVSc1 oder *P. pastoris*-Stamm X-33), wurden auf einer YPD-Platte ausgestrichen und 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Überimpfen einzelner Kolonien in 10 ml YPD-Medium führte über Nacht bei 30 °C und 200 Upm zum Wachstum der Hefezellen. Am darauf folgenden Tag wurde die Kultur in 50 ml YPD zu einer OD_{600 nm} von 0,4 verdünnt und weitere 2-4 h bei 30 °C und 200 Upm inkubiert. Durch Zentrifugation mit 1.500 *g bei 4 °C für 5 min wurden die Zellen pelletiert.

Im Falle der elektrokompetenten *P. pastoris*-Zellen wurde das Zellpellet mit 500 ml und 250 ml eiskaltem Wasser gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift mit eiskaltem 20 ml 1 M Sorbitol. Das durch Zentrifugation entstandene Pellet wurde erneut in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und direkt zur Transformation eingesetzt.

2.6.4 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Zur Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen wurden 100 µl kompetente Zellen pro Transformationsansatz benötigt. Zu diesem Ansatz wurden nun 1 µg zu transformierende Plasmid-DNA und 100 µg denaturierte Heringssperma-DNA gemischt. Nach Zugabe von 700 µl 1x LiAc/40 %PEG-3350/1x TE und guter Durchmischung wurde der Ansatz 30 min

bei 30 °C inkubiert, gefolgt von einer Zugabe von 88 µl DMSO. Nach guter Durchmischung wurde die Probe für 7 min lang Temperaturen von 42 °C ausgesetzt (Hitzeschock). Anschließende Zentrifugation des Ansatzes für 10 s resultierte in die Trennung von Überstand und Pellet, wobei Letzteres in 1 ml TE-Puffer resuspendiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde das entstandene Pellet in 50–100 µl TE-Puffer aufgenommen und auf einer Selektivagar-Uracil-Platte ausplattiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 30 °C, bis zum Erscheinen von Kolonien (etwa 3-4 Tage).

2.6.4.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Im Falle der *S. cerevisiae*-Zellen wurde das gewonnene Zellpellet in 40 ml TE-Puffer aufgenommen, gewaschen und zur Phasentrennung zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml 1x LiAc/0,5x TE resuspendiert, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und in je 100 µl Aliquots aufgeteilt.

2.6.5 Heterologe Proteinexpression

2.6.5.1 Expression von P450 BM-3 (CYP102A1) und seine Mutanten in *E. coli*-Zellen

Die entsprechenden Plasmide wurden in *E. coli*-Zellen transformiert (s. Kap. 2.6.2), auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Das Animpfen eines 5 ml-LB-Mediums mit einer einzelnen Kolonie von der Petrischale führte

unter konstantem Schütteln bei 180 UpM und 37 °C über Nacht zum Wachstum der Zellen. Ein Erlenmeyer-Kolben mit TB-Medium wurde 1:100 aus der 5 ml-Kultur inokuliert und unter Schütteln bei 180 UpM und 37 °C angezogen. Bei Erreichen einer OD_{600 nm} von 0,6 wurde mit 1 mM IPTG die Proteinexpression gestartet und die Kultur über Nacht bei 25 °C und 140 UpM inkubiert.

2.6.5.2 Expression der CYP52E-Gene aus *Candida apicola* in *E. coli*-Zellen

Die gewünschten Plasmide wurden in entsprechende Expressionsstämme transformiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellanzucht erfolgte wie in Kap. 2.6.5.1 beschrieben, mit den Zugaben von 1 mM IPTG, 0,5 mM 5-ALA, 0,5 mM Thiamin und 1:4000 Spurenelemente-Lösung bei einer OD_{600 nm} von 0,6 mit anschließender Inkubation der Kultur über Nacht bei 25 °C und 140 UpM.

2.6.5.3 Expression von CYP52E1 aus *Candida apicola* in Hefezellen (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*)

Von einer Agarplatte, auf die zuvor ein Transformationsansatz der gewünschten Plasmide/Hefezellen statt gefunden hat, ausgestrichen und inkubiert wurde, wurde eine Kolonie gepickt und in 10 ml YPD-Flüssigmedium über Nacht bei 30 °C und 180 UpM angezogen. Die Inokulation von 50 ml YPD-Medium, in einem Schüttelkolben, erfolgte 1:100 mit der Vorkultur, wobei der Schüttelkolben generell nur 1:10 mit

Flüssigmedium gefüllt sein darf. Die Inkubation erfolgte wiederum bei 30 °C und 180 UpM für 2-4 Tage. Die erstmalige Zugabe von Methanol erfolgte nach 24 h Wachstum der Hefezellen im Schüttelkolben und wurde alle 24 h wiederholt.

2.6.5.4 Expression der CPR aus *C. apicola* und *C. bombicola* in *E. coli*-Zellen

Die Protein-Anzucht *in E. coli* erfolgt wie in Kapitel 2.6.5.1 beschrieben, mit den Besonderheiten, dass ein Erlenmeyer-Kolben mit LB-Medium zur Expression verwendet wurde. Die Expressionszeit der Kultur betrug 4 h bei 25 °C und 140 UpM.

2.7 Präparative Methoden

2.7.1 Zellaufschluss von Expressionskulturen

2.7.1.1 *E. coli*-Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 10.000 *g für 20 min bei 4 °C. Das daraus resultierende Zellpellet wurde in 5 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 mit 0,1 mM PMSF resuspendiert. Gefolgt von einer Ultraschall-Behandlung, je 1 min für 5 Zyklen, vollzogen im Eisbad. Zwischen den Zyklen wurden die Zellen 1 min auf Eis gekühlt. Anschließende Zentrifugation, für 20 min bei 4 °C und 3.200 *g, trennt das Zellhomogenat in Lysat (Überstand) und Pelletfraktion.

Im Falle der Hefe-Proteine CYP52E (s. Kap. 2.6.5.2) und die dazugehörige Reduktase CPR (s. Kap. 2.6.5.4), die in *E. coli*-Zellen angezogen wurden, wurde nach der Zellernte das Zellpellet in 5 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 mit 1 mM PMSF, 20 % Glycerol und 0,25 mM EDTA resuspendiert. Zusätzlich wurde bei diesem Zellaufschlussverfahren einzelne Detergenzien, wie CHAPS, Emulgen 120 und Triton X-100, in einer Konzentration von 1,5 % (V/V) beigemischt. Die Auswirkungen der Detergenzien auf die Enzyme wurden mit Ultraschall-behandelten und unbehandelten *E. coli*-Zellen untersucht. Die Einwirkdauer der Detergenzien betrug bei beiden Zellen je 1 h auf Eis. Abschließend folgte ein Zentrifugationsschritt, mit 18.000 *g für 20 min bei 4 °C, der das Gemisch in Überstand und Pelletfraktion trennte. Beide Fraktionen wurden Aktivitätstests unterzogen.

2.7.1.2 Zellaufschluss von Hefen durch Glasperlen

Der Zellaufschluss von Hefen (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*) erfolgte durch den mechanischen Zellaufschluss durch Glasperlen. Vorausgehend ist eine Zellernte bei 2.000 *g für 20 min bei 4 °C und anschließendes zweimaliges Waschen des Zellpellets mit PBS-Puffer. Durch die Zugabe des gleichen Volumens Glasperlen (\emptyset 0,75 mm) wurde der Zellaufschluss gestartet und bei einer dauerhaften Durchmischung (30 min) durch eine Schwingmühle bei 8 °C durchgeführt. Durch Zentrifugation bei 2.000 *g für 10 min bei 4 °C wurden die Zelltrümmer (Pelletfraktion) vom Lysat getrennt.

2.7.2 Isolierung mikrosomaler Fraktionen von exprimierten CYP52E-Genen in *E. coli*-Zellen

Nach der Zellernte bei 4 °C für 20 min bei 10.000 *g erfolgte eine Zugabe von 15 ml 2x TSE-Puffer per 1 g Nasszellgewicht zur Resuspendierung des Zellpellets, sowie die Zugabe von 300 µg Lysozym per 1 g Nasszellgewicht. Nach Zugabe gleicher Menge kaltem H₂O, wie 2x TSE-Puffer, wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende Zentrifugationsschritt bei 10.000 *g für 10 min bei 4 °C ergab die Fraktionen: Überstand A und Pelletfraktion A, wobei die Pelletfraktion mit 10 ml „100 mM KP_i pH 7,6 Ultra“ weiter behandelt wurde. Der folgende Frier-Tau-Zyklus, durchgeführt bei -80 °C und Raumtemperatur für 45 min, mit anschließender Gabe einer Protease-Inhibitor-Tablette bereitete die Probe auf die Ultraschall-Behandlung (5x 30 s auf Eis) vor. Durch eine Zentrifugation des Gemisches bei 4 °C, 10.000 *g für 20 min erfolgte die Trennung in Überstand B und Membranfraktion B des Gemisches. Letzteres wird einer weiteren Zentrifugation, der Ultrazentrifugation bei 6 °C, 100.000 *g für 60 min, unterzogen. Die daraus resultierende Membranfraktion C beinhaltet die mikrosomale Fraktion, die wiederum in 2 ml 1x TSE-Puffer, zum Zwecke der Weiterbehandlung, resuspendiert wurde. Die schon bekannte CO-Differenzspektrometrie zur Bestimmung der P450-Konzentration erfolgt wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben.

2.7.3 Proteinaufreinigung des BM3H_F87A Proteins mit der IMAC-Methode

Nach Proteinexpression (s. Kap. 2.6.5.1), Zellernte und -aufschluss (s. Kap. 2.7.1), sowie Filtern des Zelllysats durch einen 0,45 µM Filter, wurde das Protein auf eine Ni-NTA (engl.: *Nickel-nitrilotriacetic acid*) Säule geladen. Dabei gehen jeweils zwei Histidin-Reste des 6x His-Tags des Zielproteins, mit der Ni-NTA-Matrix eine Bindung ein (Abbildung 2-1).

Die Ni-NTA-Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Puffer A, anschließend mit zwei Säulenvolumen Puffer B (10 %) äquilibriert. Gefolgt von der Säulenbeladung durch das Lysat mit anschließenden zwei Waschschritten mit Säulenvolumen Puffer B (10 %). Durch die Verwendung verschieden konzentrierter Imidazol-Lösungen kann das Zielprotein optimal eluiert und bis zur Homogenität aufgereinigt werden. So konnte das His-Tag gebundene Zielproteine mit Puffer B (40 %) von der Ni-NTA-Säule eluiert werden. Die Ni-NTA-Säule wurde nach Gebrauch mit 20 % Ethanol gespült und bei 4 °C aufbewahrt. Um das gebundene Imidazol wieder aus dem aktiven Zentrum des Enzyms zu lösen, wurde gegen ein großes Volumen (1-2 Liter) Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 über Nacht dialysiert.

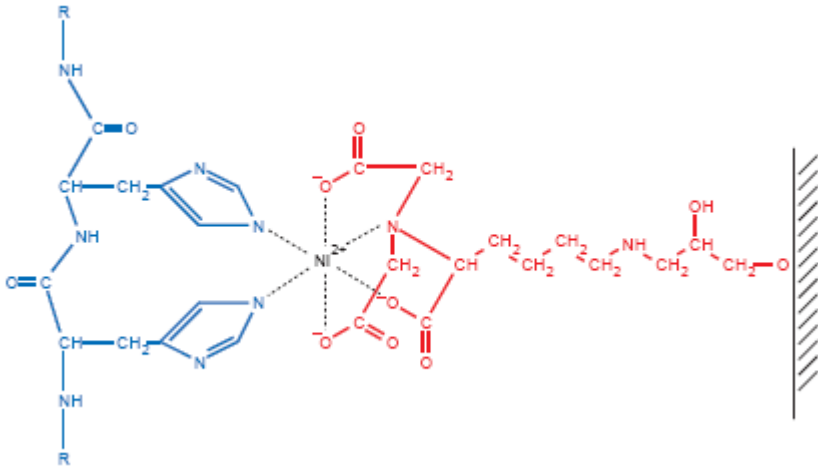


Abbildung 2-1: Ni^{2+} von der Ni-NTA-Matrix (rot) wird durch 2 Histidine (blau) des Zielproteins komplexiert.

2.7.4 Immobilisierung

2.7.4.1 Mesoporöse Materialien

Die chemischen Synthesen von MCM-41 ($d_p = 25 \text{ \AA}$) und SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$ und 133 \AA) wurden im Rahmen des Projekts A4 des Sonderforschungsbereichs 706 am Institut für technische Chemie durchgeführt [114]. Am gleichen Institut wurden die Strukturuntersuchungen, wie N_2 -Adsorptions-Desorptions-Isotherme und Röntgenbeugung (X-Ray Diffraction, XRD), des mesoporösen Materials vorgenommen.

2.7.4.2 Immobilisierung von BM3H_F87A auf mesoporösen Materialien

Das verwendete Enzym der Immobilisierung war die P450 BM-3 (CYP102A1) Häm-Domäne, mit der Punktmutation F87A. Für den Immobilisierungsprozess wurde 1,5 ml einer aufgereinigten BM3H_F87A-Lösung (15-150 μM) mit 20 g des jeweiligen mesoporösem Silikats gemischt und inkubiert. Diese Enzym-Silikat-Lösung wurde unterschiedlichen Mischbedingungen, zwei separaten Temperaturen, 10 °C und Raumtemperatur, sowie Inkubationszeiten bis zu 24 h ausgesetzt. Weiterhin wurden unterschiedliche Volumen der eingesetzten Enzymkonzentration mit der gleichen Menge an Matrix, 20 g, untersucht. Anschließende Aktivitätsmessungen mit Hilfe der CO-Differenzspektrometrie zeigten, ob das Enzym nach Misch- und Temperatur-Behandlung noch Aktivität aufwies (s. Kap. 2.7.4.3). Das beladene Silikat wurde dann einer viermaligen Waschung mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 unterzogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Überstände der Waschschritte wurden ebenfalls einer CO-Differenzspektrometrie unterzogen.

Bei einer so genannten Mehrfachbeladung eines Silikates werden mehrere Immobilisierungsprozesse hintereinander, unter gleichen Bedingungen und mit gleicher Ausgangskonzentration der Enzymlösung, durchgeführt, wobei zwischen den einzelnen Prozessen wiederum ein viermaliger Waschschritt erfolgte.

2.7.4.3 Messung der Enzymbeladung auf dem Silikat

Die Messung der P450-Konzentration der Ausgangslösung erfolgte mit Hilfe der CO-Differenzspektrometrie (s. Kap. 2.8.1). Das Enzym-Silikat-Gemisch wurde nach der Immobilisierungsprozedur durch Zentrifugation in Silikat und Überstand (Enzymlösung) getrennt. Die Enzymlösung wurde wiederholt einer CO-Differenzspektrometrie unterzogen. Anhand einer einfachen Subtraktion der gemessenen P450-Konzentrationen vor und nach der Immobilisierung konnte die Enzymmenge, gebunden auf dem Silikat-Material, berechnet werden (Formel 2-1).

$$c(\text{P450}_{\text{immobilisiert}}) = c(\text{P450}_{\text{Ausgangslösung}}) - c(\text{P450}_{\text{nach Immobilisierung}})$$

Formel 2-1: Berechnung der immobilisierten P450-Konzentration

2.7.4.4 Messung der Aktivität von freiem und immobilisiertem Enzym gegenüber *p*-Nitrophenoxydodecansäure (12-*p*NCA)

Für die Aktivitätsmessungen des BM3H_F87A-Enzyms wurde der *p*NCA-Test eingesetzt (s. Kap. 2.8.5) [115]. Die Reaktion wurde in diesem Falle nicht mit NADPH, sondern mit dem Kofaktor H₂O₂ (10 mM) gestartet.

Aktivitätsmessungen mit immobilisiertem BM3H_F87A-Enzym wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt, jedoch wurde anstatt freier aufgereinigter Enzymlösung 20 g Silikat aus der

Immobilisierungsprozedur, welches mit BM3H_F87A-Enzym beladen war, eingesetzt. Zur photometrischen Messung bei 410 nm des immobilisierten Enzyms wurde eine Durchflussküvette zur Hilfe genommen.

Alle Aktivitätsmessungen werden in mindestens dreifacher Bestimmung durchgeführt und der Durchschnittswert ermittelt.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Messung der P450-Konzentration mittels CO-Differenzspektrometrie

Im Falle der P450 BM-3-Mutanten wurde 100 µl Überstand in 1.900 µl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5) pipettiert und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit wurde die Lösung in zwei Plastikküvetten à 1 ml aufgeteilt. Eine Küvette davon wurde 1 min mit Kohlenstoffmonoxid begast, die zweite diente als Referenz und wurde nicht begast. Die Spektrumanalyse der Lösung erfolgte mittels Photometer zwischen den Wellenlängen 400-500 nm. Dafür wurde zuerst die Referenz, dann die begaste Küvette gemessen. Die Absorptionen des namensgebenden 450 nm-Peaks und der Basislinie bei 490 nm, wurden in Formel 2-2 eingesetzt um somit die P450-Konzentration bestimmen zu können.

Untersuchungen der mikrosomalen Enzymfraktionen (s. Kap. 2.7.2) erfolgte mit je 1 ml Enzymlösung pro Küvette. Gefolgt von der Begasung einer Küvette, mit anschließender Zugabe von Natriumdithionit. Entsteht ein Peak bei 450 nm so sind die Werte in die

Formel 2-2 einzusetzen. Ist aber ein Peak bei 420 nm zu beobachten, so muss der Wert bei 420 nm, mit einem Extinktionskoeffizient von $111 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, zur Berechnung der Cytochrom-Konzentration herangezogen werden.

$$c(\text{P450}) = \frac{(\Delta A_{450 \text{ nm} - 490 \text{ nm}}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1000}{\epsilon \cdot d}$$

Formel 2-2: Berechnung der P450-Konzentration

- c (P450): Konzentration von P450 (μM)
- $\Delta A_{450 \text{ nm} - 490 \text{ nm}}$: Absorptionsdifferenz der Signale bei 450 nm und 490 nm
- ϵ : Extinktionskoeffizient von P450 ($91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bzw. P420 ($111 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [1]
- d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

2.8.2 Test der Reduktase-Aktivität mit Hilfe des Substrats Cytochrom c

Für den Cytochrom c-Test wurden gleiche Mengen Gesamtprotein (100 μg) der unterschiedlichen Fraktionen (s. Kap. 2.6.5.4) in 1 ml-Küvetten eingesetzt. Zum Start der Reaktion wurde 1 mM NADPH zugegeben und photometrisch bei 550 nm beobachtet. Zusätzlich befanden sich 100 μM Cytochrom c ($\epsilon_{\text{Cytochrom c}} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [116] und Kaliumphosphat-Puffer 50 mM pH 7,5 in der Versuchslösung. Die Inkubationszeit der Reaktion lag bei bis zu vier Minuten, wobei jedoch nur die Anfangssteigung der Geraden zur Berechnung der

Volumenaktivität der Reduktase berücksichtigt wurde. Als Negativkontrolle diente hier die jeweilige Fraktion einer Expression mit dem Plasmid pET28a+. Zur so genannten Positivkontrolle diente das Plasmid pTrcHisTOPO, welches die bekannte Reduktase (CPR) aus *C. bombicola* [10] beinhaltet.

2.8.3 Proteinbestimmung mit dem Bradford-Reagenz

Die Proteinproben wurden gegebenenfalls zuvor verdünnt und 4:1 mit Bradford-Reagenz vermischt. Nach 5minütiger Inkubation wurden die Lösungen gegen eine Referenzprobe, die nur den gleichen Puffer der Ausgangslösung enthielt, bei 595 nm gemessen. Anhand zuvor gemessenen Proteinproben mit bekannten Proteinkonzentrationen einer BSA-Lösung konnte die unbekannte Probe auf deren Proteinkonzentration berechnet werden.

2.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinexpression sowie der Erfolg der Aufreinigung wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft [117]. Die in einer Lösung enthaltenen Proteine wurden dabei auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde zunächst ein 12,5 %iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen, welches anschließend mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet wurde (s. Kap. 2.4.2.8). Die Proteinproben wurden mit 50 % SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Aufgetragen wurden 15 mg Gesamtproteinmenge (s. Kap.

2.8.3) pro Spur und für 70 min bei einem konstanten Strom von 25 mA elektrophoretisch getrennt.

2.8.5 Der *para*-Nitrophenoxydodecansäure-Test (12-*p*NCA)

Der *p*NCA-Test wurde bei Raumtemperatur in einem Maßstab von 1 ml in Plastikkuvetten durchgeführt [115]. Die benötigten Komponenten für diesen Test sind: 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,1, 200 μ M 12-*p*NCA (gelöst in DMSO; Endkonzentration 1 %) und entsprechende Mengen des zu testenden Enzyms. Gestartet wurde die Reaktion mit einem Kofaktor, meist NADPH. Die Produktbildung des gelben *p*-Nitrophenolats konnte visuell, sowie photometrisch bei 410 nm, beobachtet werden.

2.9 Oxidation von Substraten

2.9.1 Das acyclische Alkan *n*-Octan

2.9.1.1 Reaktion mit P450 BM-3-Mutanten

Für die Untersuchung der Umsatzrate von P450 BM-3-Mutanten mit *n*-Octan wurde 1 μ M Lysat in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 aufgenommen, mit 200 μ M einer *n*-Octan-Lösung (gelöst in Ethanol abs.) und 100 μ M NADPH versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktionslösung zweimal mit 300 μ l Dichlormethan extrahiert, vereinigt und mit dem internen Standard 1-Decanol versetzt. Anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet, auf ein Volumen von 100 μ l eingeeengt und per GC/MS analysiert (Tabelle 2-12).

Um die Verhältnisse der gebildeten Enantiomeren zu bestimmen, wurde die Reaktionslösung nach vollständigem NADPH-Verbrauch mit 500 μl Toluol extrahiert, gefolgt von der Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid (200 μl) für 2 h bei 90 °C. Nach Abkühlen der Probe erfolgte eine zweimalige Zugabe von 500 μl dH₂O und anschließende Zentrifugation. Die gewonnene organische Phase konnte nun auf einem Gaschromatographen, mit FID und eingebauter chiralen Säule, analysiert werden (Tabelle 2-12).

Tests zur Untersuchung der Substratkonversion wurden mit einem 3-fachen Überschuss an NADPH, im Vergleich zum beigemengten Substrat, und einer Inkubationsdauer von einer Stunde durchgeführt. Die Extraktionen erfolgten wie zuvor beschrieben.

2.9.1.2 Umsetzung von *n*-Octan mit immobilisiertem BM3H_F87A-Enzym

Die zur Immobilisierung eingesetzten 20 g Silikat, beladen mit BM3H_F87A, wurden in 1 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 aufgenommen und mit 20 μl einer 10 mM *n*-Octan-Lösung, gelöst in Ethanol abs., und 10 mM H₂O₂ versetzt. Nach zwei Stunden Inkubation wurde die Reaktionslösung zentrifugiert und in Silikat und wässrige Fraktion getrennt. Letzteres wurde wie in Kapitel 2.9.1.1 beschrieben extrahiert und zur Analyse der Produkte auf ein GC/MS, mit dem Ofenprogramm aus Tabelle 2-12, gegeben.

Tabelle 2-12: Verwendete Ofenprogramme für die Probenanalyse des Substrats *n*-Octan sowie dessen Produkte, mit GC und GC/MS

Ofenprogramm	GC-2010	GC/MS-QP2010
	Chirale Analytik	Achirale Analytik
Anfangstemperatur	70 °C	40 °C für 1 min
Temperaturgradient	10 °C/min	2 °C/min
Erreichte Temperatur	90 °C für 15 min	67 °C
Temperaturgradient	10 °C/min	1 °C/min
Erreichte Temperatur	175 °C für 1 min	75 °C
Temperaturgradient		30 °C/min
Erreichte Temperatur		200 °C

2.9.2 Die zyklischen Alkane C8, C10, C12

Die Reaktionsdurchführung mit den Cycloalkanen entsprach der Enzymreaktion mit *n*-Octan (s. Kap. 2.9.1.1). Die Cycloalkane wurden, mit entsprechenden Lösungsmitteln, in Lösung gebracht, um sie in 200 µM-Konzentration für die Reaktion einsetzen zu können: Cyclooctan und Cyclodecan in DMSO, Cyclododecan in Ethanol abs.. Nach Inkubationszeiten von 15 min (Umsatzrate) oder einer Stunde (Konversion) wurde die Probe mit 900 µl Diethylether, mit zuvor beigemengtem internem Standard α -Naphthol, extrahiert. Die Analyse erfolgte über ein GC/MS durch verschiedene Temperaturprogramme, je nach Ausgangssubstrat (Tabelle 2-13).

Tabelle 2-13: Ofenprogramme zur Analyse der Cycloalkane nach Umsetzung der P450 BM-3-Mutanten-Minimalbibliothek

Ofenprogramm	GC/MS-QP2010		
	Cyclooctan	Cyclodecan	Cyclododecan
Anfangstemperatur	70 °C für 3 min	90 °C für 3 min	130 °C für 3 min
Temperaturgradient	2 °C/min	2 °C/min	5 °C/min
Erreichte Temperatur	76 °C	100 °C	150 °C
Temperaturgradient	6 °C/min	20 °C/min	3 °C/min
Erreichte Temperatur	106 °C	200 °C	175 °C
Temperaturgradient	30 °C/min	30 °C/min	30 °C/min
Erreichte Temperatur	330 °C	330 °C	330 °C

2.9.3 Umsetzung von Laurinsäure mit dem CYP52E-Enzym und verschiedenen Reduktasen

Die Fraktionen der CYP52E-Anzuchten (Tabelle 3-7, Tabelle 3-8) wurden auf Umsetzung von Laurinsäure mit drei verschiedenen Reduktasen getestet. Die Komponenten des Reaktionsansatzes sind: 200 nM Enzym, 1,5 Units Reduktase, 45 µM Lecithin und 150 µM Laurinsäure (in DMSO gelöst). Das Glucose-6-Phosphat (G-6-P, 5 mM) bzw. die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH, 1 Unit) wurde zum Regenerieren der eingesetzten 200 µM NADPH verwendet. Das jeweilige Lysat der exprimierten CPR aus *C. apicola* und *C. bombicola* und das einer kommerziellen humanen Reduktase wurden als Reduktase-Komponente den drei verschiedenen

Reaktionsansätzen beigemischt. Ein vierter Versuchsansatz wurde mit CYP52E-Enzym, CPR-Pellefraktion aus *C. apicola*, G-6-P-Regenerations-System, NADPH, Laurinsäure und CHAPS, anstatt Lecithin, durchgeführt. Alle Ansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C geschüttelt und anschließend zweimalig mit je 500 µl Diethylether extrahiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels über Nacht wurde 35 µl TMS (Trimethylsilyl) als Derivatisierungsreagenz zugegeben und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte über ein GC/MS mit dem Ofenprogramm aus Tabelle 2-14.

Tabelle 2-14: Ofenprogramm zur Analyse von Laurinsäure nach Umsetzung mit den CYP52E-Enzymen und verschiedenen Reduktasen

Ofenprogramm	GC/MS-QP2010
Anfangstemperatur	100 °C für 1 min
Temperaturgradient	10 °C/min
Erreichte Temperatur	190 °C
Temperaturgradient	2 °C/min
Erreichte Temperatur	197 °C
Temperaturgradient	30 °C/min
Erreichte Temperatur	300 °C

3 Ergebnisse

3.1 Hydroxylierung von acyclischen und cyclischen Alkanen durch P450 BM-3-Mutanten

3.1.1 Acyclische Alkane

3.1.1.1 Suche nach einer regioselektiven P450 BM-3-Mutante gegenüber *n*-Octan

Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung einer P450-Monooxygenase, die in der Lage ist, *n*-Octan zu 2-Octanol regio- und enantioselektiv zu hydroxylieren (Abbildung 3-1). Um dieses Ziel zu erreichen, wurden im ersten Teil des Projektes etwa 60 am Institut vorhandene Mutanten von P450 BM-3 aus *B. megaterium* untersucht. P450 BM-3 ist eine Fettsäure-Hydroxylase, die auch *n*-Octan als Substrat akzeptiert und oxidiert, obwohl mit niedriger Aktivität. Das WT-Enzym produziert bekanntlich eine Mischung von 2-, 3- und 4-Octanol im Verhältnis 15:42:43. Eine terminale Hydroxylierung zu 1-Octanol wird nicht beobachtet [72]. In früheren Arbeiten aus unserer Gruppe und in der Fachliteratur wurde gezeigt, dass die Position 87 (Phenylalanin) über der Häm-Gruppe einen sterischen Effekt auf die Regioselektivität des Enzyms hat. Vor diesem Hintergrund wurden alle Mutanten an der Position 87 in das Screening einbezogen. Andere mutierte Positionen befanden sich entweder am Eingang (Y51) oder entlang des Substratbindungskanals des Enzyms (A74, L188, I263,

A328). Außerdem wurde die Umsetzung von *n*-Octan mit der kürzlich am Institut hergestellten P450 BM-3-Mutanten-Minimalbibliothek getestet [118]. Bei dieser Bibliothek wurden 23 Mutanten, ausgehend vom BM-3-WT, mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese hergestellt. Die gewählten Mutationen betrafen die Positionen F87 und A328, bei denen die jeweiligen Aminosäuren gegen hydrophobe Reste mit anderer Größe, wie Alanin, Valin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin ausgetauscht wurden. Beide Positionen sind oberhalb des Porphyrinrings lokalisiert. Durch den Austausch dieser Aminosäuren wird die Größe des aktiven Zentrums verändert und somit möglicherweise die Substratspezifität beeinflusst.

Die Produktanalyse der durch die P450 BM-3-Mutanten produzierten Alkohole aus dem Substrat *n*-Octan erfolgte mittels GC/MS. Die Konzentration von Produkt und Substrat wurde durch Kalibrierung der Signalfächen unter Verwendung vom Standard 1-Decanol bekannter Konzentration ermittelt. Zur Bestimmung der produktspezifischen Retentionszeiten sowie zur Optimierung des GC-Heizprogrammes standen Referenzproben, wie *n*-Octan, 1-, 2-, 3- und 4-Octanol, zur Verfügung. Die Produktverhältnisse (Tabelle 3-1), die Kopplungseffizienz (Tabelle 3-2) und der k_{cat} -Wert (Tabelle 3-5) der jeweiligen Mutante konnten über den NADPH-Verbrauch sowie durch GC/MS-Analyse ermittelt werden. Zur Bestimmung der gebildeten Enantiomere, sowie des Enantiomerenüberschusses (*ee*) wurde eine Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid durchgeführt und die Produkte

anschließend auf einer chiralen GC-Säule analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2 aufgelistet.

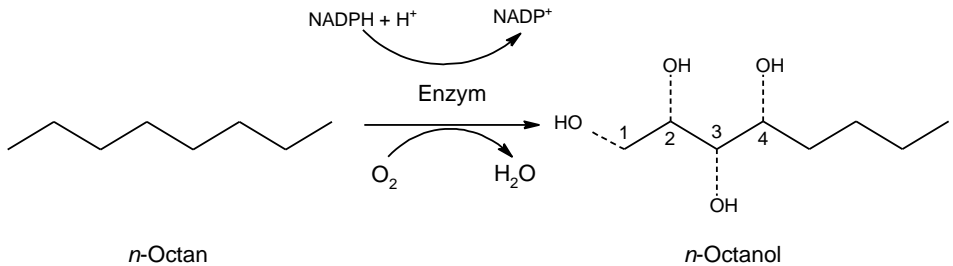


Abbildung 3-1: Enzymreaktionsschema mit dem Substrat *n*-Octan

Im Reaktionsansatz befinden sich *n*-Octan, P450-Monooxygenase und NADPH, das als Kofaktor fungiert. Der Luftsauerstoff nimmt ein Elektron vom NADPH an und wird zu Wasser reduziert. Das Substrat *n*-Octan wird alternativ zu vier einfach hydroxylierten Regioisomeren oxidiert. Bei den Regioisomeren 2-, 3- und 4-Octanol sind jeweils die enantiomeren Formen (*R*) und (*S*) zu erwarten.

Im Vergleich zum BM-3-WT, der nur 15 % 2-Octanol produzierte, wiesen fast alle untersuchten Mutanten höhere 2-Octanol-Produktanteile (28–92 %) auf (Tabelle 3-1). Jede der untersuchten Positionen (87, 263 und 328) hatte einen Effekt auf die Selektivität und Aktivität der Reaktion. Die Einzelmutante F87V produzierte bis zu 20 % 2-Octanol (Produktanteil), wobei in der Kombination mit der Mutation A328F eine Erhöhung des 2-Octanolanteils auf 92 % erzielt werden konnte. Bei der Untersuchung der Einzelmutation A328F konnten keinerlei Alkoholprodukte detektiert werden. Die Mutante A328L produzierte zu 83 % 2-Octanol. Der Austausch des Isoleucins 263

durch Arginin erhöhte den 2-Octanolanteil auf 28 %, ein Ersatz durch Alanin, Glycin oder Valin ergab 73-87 % 2-Octanol. Die Einführung einer weiteren Mutation an der Position 263 (Alanin, Glycin, Arginin oder Valin) bei der schon zuvor erwähnten Doppelmutante F87V A328F (92 % 2-Octanol) erbrachte keine wesentliche Steigerung der 2-Octanolbildung. Jedoch konnte, bei der Untersuchung der Enantioselektivität festgestellt werden, dass die Mutante F87V I263R A328F 86 % (*R*)-2-Octanol mit einem ee von 60 % produzierte, im Vergleich zum BM-3-WT mit nur 15 % (*R*)-2-Octanol und einem ee von 20 %. Die Einzelmutante I263G zeigte unerwartet eine invertierte Enantioselektivität im Vergleich zum WT und der Dreifachmutante F87V I263R A328F. Sie produzierte 87 % (*S*)-2-Octanol mit 80 % ee. Beim Betrachten der Tabelle 3-1 fällt auf, dass nur die Mutante I263G die Fähigkeit besitzt, ein (*S*)-Enantiomer zu bilden. Alle weiteren untersuchten Mutanten zeigten eine Präferenz für das (*R*)-2-Octanol-Enantiomer. Somit beeinflusst die Aminosäureposition 263 die Enantioselektivität des Produkts.

Tabelle 3-1: Umsetzung von *n*-Octan durch P450 BM-3-Mutanten und Wildtyp

Die Verhältnisse der Regioisomere 4-, 3-, 2- und 1-Octanol wurden mit Hilfe einer achiralen GC-Säule und einem gekoppelten Massenspektrometer ermittelt. Der Enantiomerenüberschuss wurde nach Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid auf einer einfachen GC-Säule nachgewiesen.

n.g.: nicht gemessen

	Produkt-Verhältnisse [%]						
	4-Octanol:3-Octanol: 2-Octanol :1-Octanol						
	ω -3	:	ω -2	:	ω -1	:	ω
P450 BM-3							
WT	43	:	42	:	15	:	0
F87V	36	:	44	:	20	:	0
I263A	0	:	1	:	87	:	12
I263G	2	:	11	:	73	:	14
I263R	23	:	36	:	28	:	13
I263V	3	:	20	:	74	:	3
A328F	0	:	0	:	0	:	0
A328L	0	:	11	:	83	:	6
F87V A328F	4	:	4	:	92	:	0
F87V I263A A328F	1	:	4	:	90	:	5
F87V I263G A328F	1	:	1	:	86	:	13
F87V I263R A328F	0	:	2	:	86	:	12
F87V I263V A328F	0	:	4	:	93	:	4

	ee [%]	ee [%]
P450 BM-3	(<i>S</i>)-2-Octanol	(<i>R</i>)-2-Octanol
WT		20
F87V	n.g.	n.g.
I263A	n.g.	n.g.
I263G	80	
I263R		34
I263V	n.g.	n.g.
A328F	-	-
A328L	n.g.	n.g.
F87V A328F		46
F87V I263A A328F		52
F87V I263G A328F		42
F87V I263R A328F		60
F87V I263V A328F		48

Neben der Verteilung der Produkte wurden auch die Umsatzrate und die Kopplung der P450 BM-3-Enzyme untersucht. Die Messungen der Umsatzraten des NADPHs erfolgten über den NADPH-Verbrauch, was photometrisch bei 340 nm beobachtet werden kann. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode besteht darin, dass es sich um eine indirekte Methode zur Aktivitätsbestimmung handelt, da nicht die Aktivität der Monooxygenase, sondern die der Reduktase-Domäne gemessen wird. Da die durch die Monooxygenase katalysierte Reaktion auf diese

Weise direkt bestimmt werden kann, muss nach Beendigung der Reaktion die Menge an umgesetztem Substrat gemessen und mit der Menge an eingesetztem Kofaktor korreliert werden, um den Anteil des unproduktiv verbrauchten Kofaktors (Entkopplung) bestimmen zu können. Wie in Kapitel 2.9.1.1 beschrieben, wurde die zweifache Substratkonzentration als NADPH-Konzentration eingesetzt. Demnach entspricht ein 1:1-Verhältnis von Produkt zu Substrat im GC-Chromatogramm einer Kopplungseffizienz von 100 %. Die Kopplungseffizienz und Umsatzraten der getesteten Enzyme sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tabelle 3-2: Kopplungseffizienz und Umsatz von *n*-Octan durch P450 BM-3-Wildtyp und Mutanten

P450 BM-3	NADPH Oxidationsrate [nmol NADPH/nmol P450/min]	Kopplung [%]
WT	34	52
F87V	57	32
I263A	6	25
I263G	23	80
I263R	140	95
I263V	6	10
A328F	47	0
A328L	68	10
F87V A328F	150	80

F87V I263A A328F	100	35
F87V I263G A328F	250	72
F87V I263R A328F	340	58
F87V I263V A328F	50	60

Sehr niedrige Umsatzraten- und Kopplungsverhältnisse weisen die Mutanten I263A und I263V auf. Beide Mutanten besitzen eine Umsatzrate von 6 NADPH/nmol P450/min und eine Kopplung von 25 % bzw. 10 %. Wird an der gleichen Position eine andere Aminosäure eingefügt (z. B. I263G oder I263R) steigern sich die Substratkopplung (80 % bzw. 95 %) und die Umsatzrate (23 bzw. 140 nmol NADPH/nmol P450/min) beträchtlich. Der BM-3-WT weist eine Umsatzrate von 34 nmol NADPH/nmol P450/min und eine Kopplung von 52 % auf. Bei der Einzelmutante A328F ist ein NADPH-Verbrauch von 47 nmol NADPH/nmol P450/min zu beobachten, obwohl kein Produkt gebildet wurde. Das bedeutet, dass die verbrauchten Elektronen des NADPHs nicht wie gewünscht in die Produktbildung eingehen, sondern ausschließlich Sauerstoff zu Wasser oder H₂O₂ reduzieren. Bei der Dreifachmutante F87V I263V A328F sowie bei der Einzelmutante F87V konnte ein NADPH-Verbrauch von 50 bzw. 57 nmol NADPH/nmol P450/min und eine Kopplung von 60 % bzw. 32 % beobachtet werden. Geringfügig bessere Kopplungsverhältnisse zeigt die Mutante A328L mit 10 % bei einer Umsatzrate von 68 nmol NADPH/nmol P450/min. Höhere Umsatzraten von ≥ 100 nmol NADPH/nmol P450/min konnten die Mutanten F87V I263A A328F (100 nmol NADPH/nmol P450/min),

I263R (140 nmol NADPH/nmol P450/min) und F87V A328F mit 150 nmol NADPH/nmol P450/min erzielen. Wobei die erstgenannte Mutante (F87V I263A A328F) mit einer Kopplung von 35 %, die beiden anderen Mutanten mit einer hohen bis fast vollständigen Kopplung (80-95 %) arbeiteten. Eine der höchsten Umsatzraten (250 nmol NADPH/nmol P450/min) zeigte die Mutante F87V I263G A328F mit einer Kopplung von 72 %. Dieses Ergebnis konnte nur von der Mutante F87V I263R A328F mit 340 nmol NADPH/nmol P450/min und einer Kopplung von 58 % übertroffen werden.

3.1.2 Cyclische Alkane

Cycloalkane sind typische schwer aktivierbare Kohlenwasserstoffe, die nur sehr ineffizient, wenn überhaupt mit Hilfe, von heterogenen [119-121] und homogenen [122] Katalysatoren oxidiert werden. Wie schon in einer früheren Arbeit beschrieben sind P450 BM-3-Mutanten in der Lage Cyclohexan zu Cyclohexanol zu hydroxylieren [123]. Besonders schwierig aber ist die Oxidation von Cycloalkanen ab C₁₀, was in dieser Arbeit untersucht wurde (Abbildung 3-2).

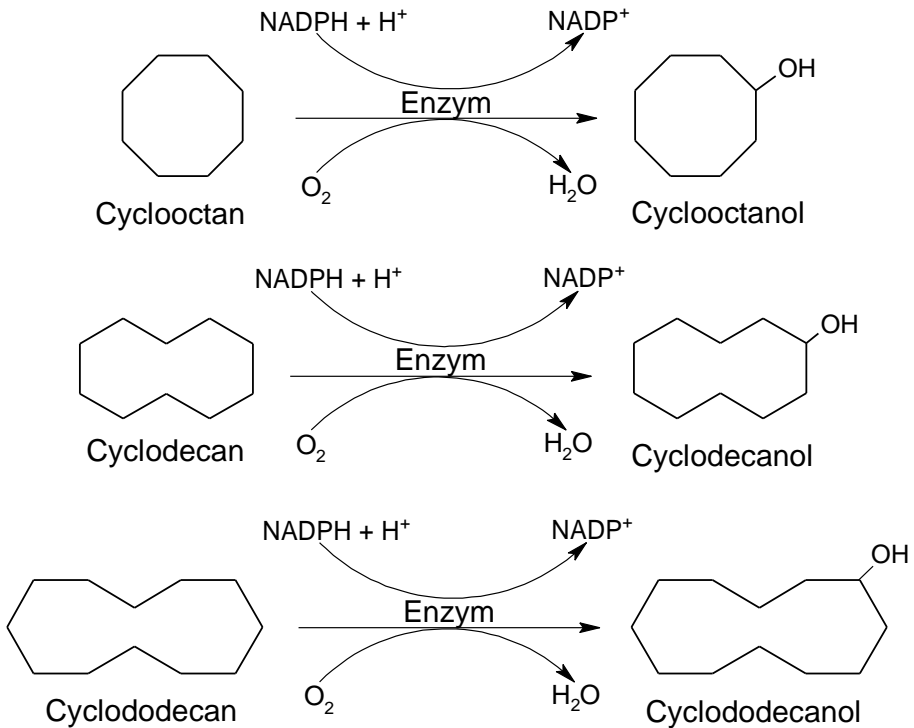












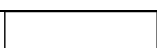







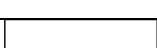



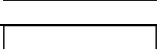

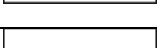
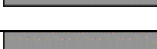
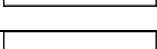
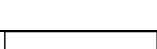
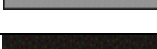

Abbildung 3-2: Hydroxylierungsschema der Cycloalkane Cyclooctan, Cyclodecan und Cyclododecan

Für die Untersuchung der Substratumsetzung dreier ausgewählter Cycloalkane (Cyclooctan, Cyclodecan und Cyclododecan) wurde die P450 BM-3-Mutanten-Minimalbibliothek herangezogen [124]. Mutanten zuzüglich des BM-3-WT, die eine Konversion der cyclischen Substrate aufweisen, wurden mit Hilfe eines Farbcodes in der Tabelle 3-3 aufgelistet. Für die ausgewählten Mutanten wurden darüber hinaus kinetische Konstanten (K_M - und k_{cat} -Wert) ermittelt (3.1.2.1).

Tabelle 3-3: Auflistung der aktivsten P450 BM-3-Mutanten der Minimalbibliothek

Die Höhe der Konversion der Substrate Cyclooctan, Cyclodecan und Cyclododecan, werden durch einen Farbcode dargestellt.

- keine Konversion, □ 1–33 %, ■ 34–66 %, ■ 67–100 %

P450 BM-3	Konversion von Cyclooctan [%]	Konversion von Cyclodecan [%]	Konversion von Cyclododecan [%]
WT	 8	 3	-
F87A	 65	 60	 20
F87A A328F	 90	 60	 6
F87A A328I	 90	 70	 14
F87A A328L	 77	 50	-
F87A A328V	 80	 60	 46
F87V	 90	 60	 6
F87V A328F	 70	 14	-
F87V A328I	 89	 23	-
F87V A328L	 52	 19	-
F87V A328V	 58	 23	 3
A328V	 87	 53	-

Die nicht aufgelisteten Doppelmutanten mit der Kombination F87I A328F/I/L/V zeigten keinerlei Konversion der drei cyclischen Substrate. Die Doppelmutanten mit F87L A328F/I/L/V wiesen nur eine minimale Konversion des kleinsten Cycloalkans, Cyclooctan, auf und wurden deshalb in Tabelle 3-3 nicht aufgeführt.

Die Effizienz der Konversion des kleinsten Cyloalkans, Cyclooctan, war bei dem BM-3-WT mit einer Konversion von 8 % gering, wohingegen 20 Mutanten der untersuchten Bibliothek eine zum Teil deutlich höhere Konversion zeigten. Eine ≥ 70 % Umsetzung von Cyclooctan zu korrespondierendem Cyclooctanol konnte von acht Mutanten realisiert werden. Diese sind die vier Doppelmutanten F87A A328 F/I/L/V, sowie F87V A328F, F87V A328I, gefolgt von den Einzelmutanten F87V und A328V. Von diesen acht Mutanten wiesen drei Mutanten (F87A A328F, F87V A328I, F87V) eine fast vollständige Konversion (90 %) des Cyclooctans auf (Tabelle 3-3).

Mit dem Substrat Cyclodecan konnte nur eine 3 %ige Konversion mit dem BM-3-WT beobachtet werden. Bei der Durchmusterung der Minimalbibliothek fanden sich 17 Mutanten mit einer höheren Konversion als der WT. Sieben der getesteten 24 Mutanten zeigten eine Cyclodecanol-Herstellung ≥ 50 % (Tabelle 3-3). Die beste Konversion erzielte die Mutante F87A A328I mit 70 % Alkoholproduktion.

Cyclododecan wurde vom BM-3-WT als Substrat nicht akzeptiert, jedoch konnten bei acht Mutanten der Minimalbibliothek eine

Konversion nachgewiesen werden. Die höchste Konversion von 46 % wurde mit der Doppelmutante F87A A328V erreicht. Die Einzelmutation F87A setzte nur 20 % Cyclododecan um, während die Einzelmutante A328V das Substrat gar nicht akzeptierte (Tabelle 3-3).

Die Umsatzraten der P450 BM-3-Enzyme mit den drei verschiedenen Substraten Cyclooctan, Cyclodecan und Cyclododecan wurden ebenfalls, wie schon zuvor für das azyklische Alkan *n*-Octan (Tabelle 3-2), im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Bedingungen der Versuchsdurchführung sind in Kapitel 2.9.2 beschrieben und die Ergebnisse in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Tabelle 3-4: Oxidationsrate der Substrate Cyclooctan, Cyclodecan und Cyclododecan durch P450 BM-3-Mutanten der Minimalbibliothek

P450 BM-3	NADPH Oxidationsrate [nmol NADPH/nmol P450/min]		
	Cyclooctan	Cyclodecan	Cyclododecan
WT	2	<1	-
F87A	20	13	4
F87A A328F	130	23	1,5
F87A A328I	102	28	3,6
F87A A328L	141	78	-
F87A A328V	87	20	18
F87V	46	67	2,4
F87V A328F	230	35	-

F87V A328I	73	16	-
F87V A328L	64	20	-
F87V A328V	34	13	1
A328V	200	106	-

Die Oxidationsraten der P450 BM-3-Mutanten Minimalbibliothek mit dem Substrat Cyclooctan reichen von 2 (BM-3-WT) bis 230 nmol NADPH/nmol P450/min (F87V A328F). Ersetzt man die Aminosäure Phenylalanin durch Alanin an Position 87 so erhält man eine 10-fach höhere Oxidationsrate (20 nmol NADPH/nmol P450/min) im Vergleich zum BM-3-WT. Führt man eine weitere Mutation an Position 328 ein so steigen die Werte von 87 (F87A A328V) auf bis zu 130 nmol NADPH/nmol P450/min (F87A A328F) an. Bei der Einzelmutation A328V konnte eine Oxidationsrate von 200 nmol NADPH/nmol P450/min gemessen werden. Während die höchste Oxidationsrate wiederum bei einer Doppelmutante (F87V A328F) mit 230 nmol NADPH/nmol P450/min beobachtet werden konnte.

Betrachtet man die Ergebnisse der P450 BM-3-Mutanten Minimalbibliothek mit dem Substrat Cyclodecan so sind Umsatzraten <78 nmol NADPH/nmol P450/min erzielt worden. Die Mutante A328V zeigte immerhin eine Rate von bis zu 106 nmol NADPH/nmol P450/min.

Die geringsten Oxidationsraten (<18 nmol NADPH/nmol P450/min (F87A A328V)) wies die P450 BM-3-Mutanten Minimalbibliothek bei der Untersuchung mit Cyclododecan auf.

3.1.2.1 Kinetische Messungen von Cycloalkanen mit P450 BM-3-Mutanten

Für kinetische Messungen und Ermittlungen der K_M - und k_{cat} -Werte wurden drei ausgewählte Mutanten herangezogen (Tabelle 3-5). Bei den Untersuchungen mit Cyclooctan wurde für die Einfachmutante F87A (65 % Cyclooctanol) der niedrigste K_M -Wert (215 μM) und somit die höchste Affinität gegenüber dem Substrat ermittelt. Für die Doppelmutante (F87V A328I, 89 % Cyclooctanol) wurde ein K_M -Wert von 317 μM gemessen. Für das größte Cycloalkan (Cyclododecan) wurden vergleichende Messungen mit den Mutanten F87A (20 % Cyclododecanol) und F87A A328V (46 % Cyclododecanol) durchgeführt. Auch mit diesem Substrat wies die Einfachmutante mit 18 μM den niedrigsten K_M -Wert auf (K_M der Doppelmutante = 35 μM).

Tabelle 3-5: Kinetische Parameter (K_M - und k_{cat} -Wert) einiger ausgesuchten P450 BM-3-Mutanten mit den Substraten Cyclooctan, Cyclodecan und Cyclododecan

n.g.: nicht gemessen

		Cyclooctan	Cyclodecan	Cyclododecan
F87A;	K_M [μM]	215	23	18
	k_{cat} [min^{-1}]	19	11	7
F87A A328V;	K_M [μM]	n.g.	n.g.	35
	k_{cat} [min^{-1}]	n.g.	n.g.	5
F87V A328I;	K_M [μM]	317	n.g.	n.g.
	k_{cat} [min^{-1}]	51	n.g.	n.g.

3.2 Klonierung, Expression und Charakterisierung von P450-Monooxygenasen aus *Candida apicola*

Die Fähigkeit Alkane terminal oder subterminal zu metabolisieren ist auch bei einigen eukaryotischen P450-Systemen bestätigt (s. Kap. 1.3.3). Aufgrund dessen wurden auch die P450-Monooxygenasen aus *Candida*-Stämmen auf deren Fähigkeit regioselektive Alkanoxidationen durchzuführen, hin untersucht. Zwei P450s aus *C. apicola* [49], CYP52E1 und CYP52E2, wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert, exprimiert und auf *n*-Octan-Umsetzung getestet.

Eukaryotische P450-Monooxygenasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie an der Membran gebunden vorliegen und eine ebenfalls

Membran-assoziierte NADPH-Diflavin-Reduktase, NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR), zur Substratumsetzung benötigen. Die Sequenz der Diflavin-Reduktase aus *C. apicola* war noch nicht bekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst identifiziert, das Gen exprimiert und das Protein anschließend charakterisiert.

3.2.1 Identifizierung und Charakterisierung von NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus *C. apicola*

3.2.1.1 Sequenzanalyse und Klonierung der CPR aus *C. apicola*

Die bisherigen identifizierten und charakterisierten CPR stammen aus den gut erforschten Stämmen *C. tropicalis* [93], *C. maltosa* [96, 97] und *C. bombicola* [10]. Zur Sequenzanalyse der unbekanntes CPR aus *C. apicola* wurde zwischen den drei bekannten CPR-Sequenzen ein Sequenzvergleich durchgeführt, um konservierte DNA-Abschnitte zu lokalisieren. Bekannt ist, dass homologe DNA-Sequenzen von nahverwandten Organismen meist eine Übereinstimmung von ~40 % besitzen. Bei dem Vergleich konnten Bereiche mit bis zu 30 hochkonservierten Nukleotiden ausfindig gemacht werden, die in allen drei CPR-Sequenzen nur vereinzelt Unterschiede aufwiesen (Abbildung 3-3).

<i>Candida maltosa</i> Reduktase	CCA CGT TAT TAC TCC ATT TCT TCA TCT TC
<i>Candida tropicalis</i> Reduktase	CCA CGT TAC TAC TCC ATT TCT TCT TCG TC
<i>Candida bombicola</i> Reduktase	CCT CGC TAC TAC TCA ATC TCG TCA TCC TC
Degenerierter Primer EWE_P2red_for	CCH CGH TAY TAC TCM ATY TCK TCH TCB TC
	* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Abbildung 3-3: Ausschnitt aus dem DNA-Sequenzalignment zwischen CPR aus *C. maltosa*, *C. tropicalis* und *C. bombicola*. Erstellt mit ClustalW.

Sequenzalignment dreier bekannter CPR-Sequenzen und dem daraus abgeleiteten degenerierten Primer, der anschließend in einer PCR eingesetzt wurde und somit zur Amplifikation eines DNA-Fragmentes der unbekanntes *C. apicola* CPR-Sequenz verwendet wurde.

- * Position mit Sequenzübereinstimmung zwischen allen drei Sequenzen
- . Position mit Sequenzübereinstimmung nur zwischen zwei Sequenzen oder mit fehlender Übereinstimmung

H, Y, M, K, B: Sind Nukleotid-Substitutionskürzel für die Herstellung von degenerierten Primern

Zur Identifikation der entsprechenden homologen Bereiche wurden degenerierte Primer konstruiert und in einer PCR mit genomischer DNA aus *C. apicola* eingesetzt. Obwohl *Candida*-Stämme Eukaryoten sind, enthalten ihre genomische DNA bekanntlich keine Introne. Bei degenerierten Primern handelt es sich um ein Gemisch von Oligonukleotiden, die weitgehend die gleiche Sequenz, an einigen (degenerierten) Positionen jedoch verschiedene Basen haben. Sie binden am gleichen Abschnitt des Genoms, auch wenn dieser Unterschiede an einzelnen Basenpositionen aufweist.

Mit Hilfe der degenerierten Primer konnte aus *C. apicola* ein 1.694 Nucleotide langes DNA-Fragment amplifiziert werden. Die zur Vervollständigung der Gensequenz fehlenden Abschnitte außerhalb des konservierten Bereichs wurden mit dem Verfahren des Genom Walkings identifiziert (Abbildung 3-4).

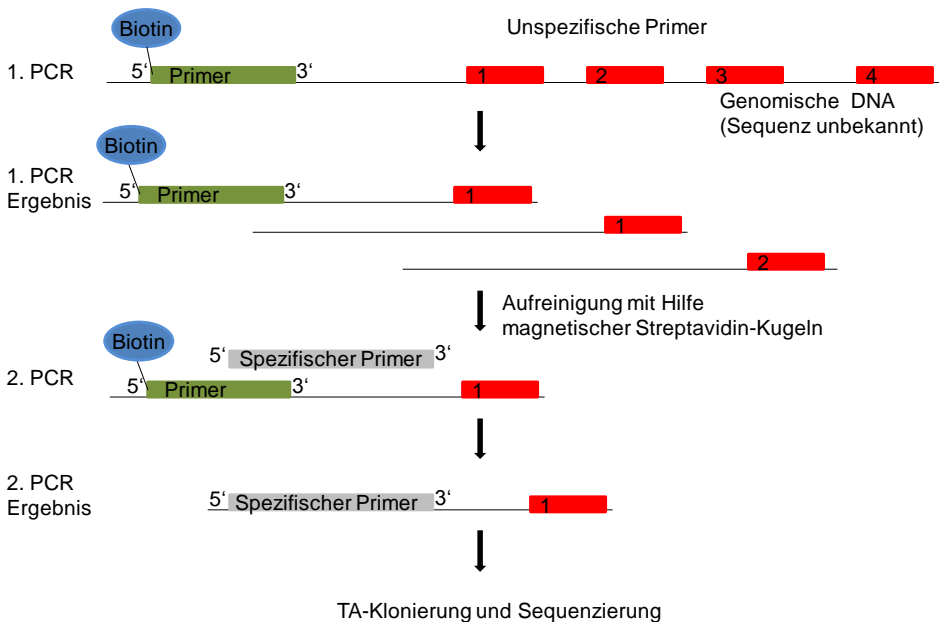


Abbildung 3-4: Schema des Verfahrens des Genom Walkings

Ein biotinmarkierter Primer (grün) bindet an die durch degenerierte Primer ermittelte CPR-Sequenz der genomischen DNA aus *C. apicola*. Vier unspezifische Primer (rot) binden an der DNA und synthetisieren unterschiedlich lange Amplifikate. Diese PCR-Produkte werden mit Hilfe von magnetischen Streptavidin-Kugeln, von den PCR-Produkten ohne Biotin-Anhang, gereinigt und in der zweiten PCR als Ausgangs-DNA eingesetzt. Der wiederholte Einsatz der vier unspezifischen (rot) und eines Sequenz-spezifischen Primers (grau) führen erneut zu PCR-Amplifikate. Diese werden, aufgrund der Nutzung der *Taq*-Polymerase, mit einem 3'-Überhang von

Alanin-Resten synthetisiert. Anhand dieser Besonderheit kann der amplifizierte DNA-Abschnitt in einen Vektor mit 5'-Überhang von Thymin-Resten kloniert werden.

Abschließend wurden die Größen der amplifizierten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel bestimmt. Bei der Amplifikation mit der *Taq*-Polymerase entsteht ein Produkt mit einfachem 3'-Adenin-Überhang, das sich mit einem linearisierten Vektor mit einfachem 3'-Thymin-Überhang ligieren lässt. Über eine Sequenzierung mit einem für den Plasmid-Promotor spezifischen Primer kann die amplifizierte Sequenz analysiert werden. Das Verfahren des Genom Walkings kann beliebig oft wiederholt werden, so dass stufenweise die komplette Sequenz des gewünschten Gens amplifiziert wird.

Mit Hilfe des Genom Walkings konnte die codierte Region der CPR-Sequenz identifiziert werden (Abbildung 3-5). Danach wurde das CPR-Gen mit Sequenzspezifischen Primern, die die Restriktionsschnittstellen für Endonukleasen *NcoI* und *NotI* enthalten, amplifiziert und anschließend für die Expression in den pET28a+-Vektor kloniert.

1 atggtcgata cgaatcttct tgcgtcggtc gctggtgcgc ttggtgtgtg tttgtggca tacaagtact
 M V D T N L L A S V A V A L V V V F V A Y K Y

71 tcaatggggg cctcggagtc cagagcagca atgcaggcag cagcagcccc tttggcaacg cgaagaccga
 F N G G L E V Q S S N A G S S T P F G N A K A

141 cgaggatggc gattctcgta actttgttgc gctcatggag aagaataaca agaacgtcat cgtgttttac
 D E D G D S R N F V A L M E K N N K N V I V F Y

211 EWE_P1red_for
 ggggtctcaga ctgggtaccgc cgaggacttg gcctcgaagc tggccaaaga gctcagctcc aaatacggcc
 G S Q T G T A E D L A S K L A K E L S S K Y G

281 tacgcactat gactgctgac ccgaaaaact tcgatttcga caaattcgac acgttccccg agtcccacct
 L R T M T A D P E N F D F D K F D T F P E S H

351 cgctgttttc atcacggcat cttatgggta tggtgagccg actgacaacg ctcaggacct ttacagcttc
 L A V F I T A S Y G D G E P T D N A Q D L Y S F

421 ttagggaaca gtcctgcatt cagtcaggat ggcgagacac tcgagaactt gaacttcgcc gtatttggtc
 L G N S P S F S Q D G E T L E N L N F A V F G

491 tgggcaacgt tctctatgag ttctacaata aagccggcag ggatattgac aagtctctca ccgatcttgg
 L G N V L Y E F Y N K A G R D M H K F L T D L

561 tggacactcg attggccctt acggagaagg cgatgactcc aagggtatgc tagaggagga ttacatggcc
 G G H S I G P Y G E G D D S K G M L E E D Y M A

631 tgggaaggagc aattccttgc tgcacttgtg accaaatggg gcctcaagga gcgcgaggct gtgtatgagc
 W K D E F L A A L V T K W G L K E R E A V Y E

701 EWEKotCapiCPRrevSpez EWEKotCapiCPRrevBiotin
 ctgcgatcag cgtaaaggat attgaagagg atgcgcagag ccacgatgtc tatcttggag aaccctctct
 P A I S V K D I E E D A Q S H D V Y L G E P N

771 Biotin
 caagcatcta caggcaagta aggcgcgaga ggtgcccaag ggtccctaca acgcgtccaa cccaatgctt
 L K H L Q A S K A R E V P K G P Y N A S N P M L

841 gccaaagtta ccgctgctca agagcttttc accaacaccg acaggcactg catccatag gagtttgaca
 A K V T A A Q E L F T N T D R H C I H M E F D

911 ccactgggtgc gcgttacaca acgggggacc atctcgcttt ttggtgccag aataatgaag aggaagtcca
 T T G A R Y T T G D H L A F W C Q N N E E E V

981 gcggtttgcc aaagcgcttg gtatcaccaa tccgcagcag cccattgcc a tagcgtgct cgataagacc
 Q R F A K A L G I T N P Q Q P I A I S V L D K T

1051 tcgaccgtgc gtataccttc accgagcact tacgaaaaga taattcgcca ctttttggag atcaacggac
 S T V R I P S P T T Y E T I I R H F L E I N G

1121 ccgtctcccg tcaggttctt tcatcgattg ccccttcgc gccttccgag gaggtgaaaa aggccacgca
 P V S R Q V L S S I A P F A P S E E V K K A T


```

1191 gcagcttggc agcaacaagg agttgttccg aagccatgtg gccgcgaaga aattcaacat cgcaaggctg
    Q Q L G S N K E L F A S H V A A K K F N I A R L
1261 cttctgcctc tcagtggggg tcagccctgg aagaacgtgc ctttcagttt cattattgag accattcccc
    L L H L S G G Q P W K N V P F S F I I E T I P
1331 atcttcaacc gcgctactac tcgatctcgt catcctcagt gcagtctccg aacctatatt ccataccccg
    H L Q P R Y Y S I S S S S V Q S P N T I S I T
1401 tgttgtcgag cgccaaaaac tggctggagt cgaccacgag cttcgcggcg tcgcgaccaa tcaaattctg
    A V V E R Q K L A G V D H E L R G V A T N Q I L
1471 gctctcagcg aggccctcat cggaagcccg agctcgactt ataggcttca gcagccgcac gactttactg
    A L S E A L I G R P S S T Y R L Q Q P H D F T
1541 gctctttgaa ctctcaggat atccgtgttc cggttcacat ccgtcactca ttggttaagc ttccggctaa
    G S L N S Q D I R V P V H I R H S L F K L P A
1611 gccacagtc cctatcatca tggctggggc gggcactggc gttgctccgt tccgtggggt tgttcacgaa
    K P T V P I I M V G P G T G V A P F R G F V H E
    Biotin EWE_CapiCPREndeForBiotin
1681 cgcgcccgcg aaaaggctgc aggcaaaag gtaggcaaag ccttgctttt caccggctct cgtcacgcga
    R A A Q K A A G K E V G K A L L F T G S R H A
    EWE_CapiCPREndeSpez
1751 atgaggactt cctctaccgc gacgaatgga agcagttctc agacttcttg gacttggaaa ccgcattcag
    N E D F L Y R D E W K Q F S D F L D L E T A F
1821 ccgcgattcg aacacaaaag tctatgtcca gcacaagctg aaggagcgtg ctaaggatgt cttcgccttc
    S R D S N T K V Y V Q H K L K E R A K D V F A L
1891 ctcaatgagg gcgctgtatt ctatgtgtgt ggtgacgctg gtggcatgtc gcacgatgty cacagcgct
    L N E G A V F Y V C G D A G G M S H D V H S A
1961 tgttgagat tgtggcccag gagggcaact tgtccagcga ggatgcagac aagtttggtc gtaaaatgcg
    L L E I V A Q E G N L S S E D A D K F V R K M
    EWE_P3red_rev
2031 tagccgcaac aagtaccaag aggatgtttg gtag
    R S R N K Y Q E D V W -

```

Abbildung 3-5: Codierte Region der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) aus *C. apicola*

Die Sequenz umfasst 2.064 Nukleotide bzw. 688 Aminosäuren. Eingefügt sind die verwendeten degenerierten Primer, sowie die Primer des Genom Walkings-Verfahren.

3.2.1.2 Proteinexpression der CPR aus *Candida apicola* und *C. bombicola*

Mit der in dieser Arbeit klonierten CPR (s. Kap. 3.2.1.1) wurden nach Expression in *E. coli* Aktivitätstests mit Cytochrom c durchgeführt. Eine bereits bekannte und gut charakterisierte CPR aus *C. bombicola* [10] diente bei diesen Experimenten als Kontrolle.

Für die Proteinexpression der beiden Membran-assoziierten CPR-Gene wurde das *C. apicola*-Gen in den Stamm BL21 (DE3) pLysS- und das *C. bombicola*-Gen in BL21 (DE3)-Zellen transformiert (s. Kap. 2.6.2). Die Kulturbedingungen der transformierten *E. coli*-Stämme sind in Kapitel 2.6.5.4 beschrieben. 4 h nach Induktion der Expression mit IPTG konnte unter optimalen Expressionsbedingungen (25 °C bei einer Durchmischung von 140 UpM) das deutlich überexprimierte Protein pET28a+ CPR in *C. apicola* nachgewiesen werden (Abbildung 3-6, Bild A). Das Protein befand sich nach Zellaufschluss in der Pelletfraktion (s. Kap.2.7.1.1). Das als Positivkontrolle dienende Protein pTrcHisTOPO CPR aus *C. bombicola* konnte unter optimalen Kultivierungsbedingungen ebenfalls in *E. coli* exprimiert werden. Nach der SDS-PAGE konnte sowohl in der Pelletfraktion eine deutliche und im Lysat eine schwache Bande detektiert werden (Abbildung 3-6, Bild B).

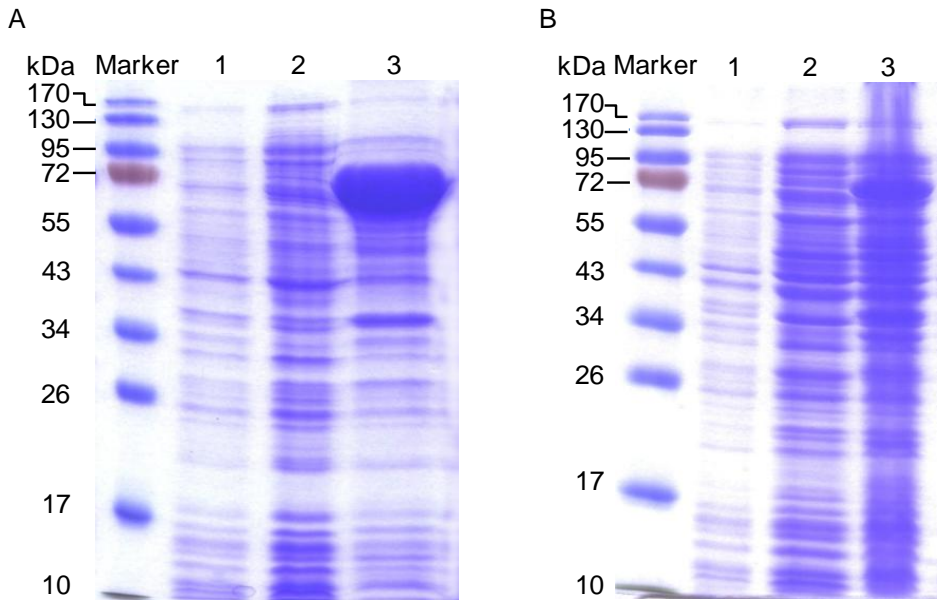


Abbildung 3-6: 12,5 %ige SDS-PAGE: Proteinexpression von CPR aus *C. apicola* (A) und aus *C. bombicola* (B).

Proteinbanden der 76 kDa großen CPR nach der Anzucht von (A) *C. apicola* in BL21 (DE3) pLysS-Zellen und (B) *C. bombicola* in BL21 (DE3)-Zellen

Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder)

- 1) Zellen vor Induktion mit IPTG
- 2) Lysat, erhalten nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation, mit zuvoriger Induktion durch IPTG
- 3) Pellet, erhalten nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation, mit zuvoriger Induktion durch IPTG

3.2.1.3 Charakterisierung von CPR aus *Candida apicola*

Eine NADPH-abhängige Cytochrom P450-Reduktase (CPR) besitzt die Fähigkeit Elektronen von NADPH auf einen physiologischen

(Cytochrom P450) oder nicht physiologischen Akzeptor (Cytochrom c) zu übertragen. Die Elektronenübertragung von NADPH über FAD und FMN auf Cytochrom c kann photometrisch bei einer $OD_{550\text{ nm}}$ nachgewiesen werden. Diese Absorptionsänderung wird durch die Reduktion des Häm-Zentrums Fe^{III} zu Fe^{II} des Cytochrom c hervorgerufen.

Bei den nachfolgenden beschriebenen Cytochrom c-Tests wurde bei Anwesenheit einer Reduktase, dem Elektronendonator NADPH sowie dem Substrat Cytochrom c in der Versuchslösung der Anstieg der Adsorption bei 550 nm gemessen.

Die Cytochrom c-Tests wurden mit Lysat und Pelletfraktion durchgeführt. Für den Aktivitätstest wurde die Pelletfraktion mit Puffer wieder in Lösung gebracht. Als Negativkontrollen dienten Lysat und Pelletfraktion von *E. coli*-Zellen, die das *lacZ*-Gen exprimierten.

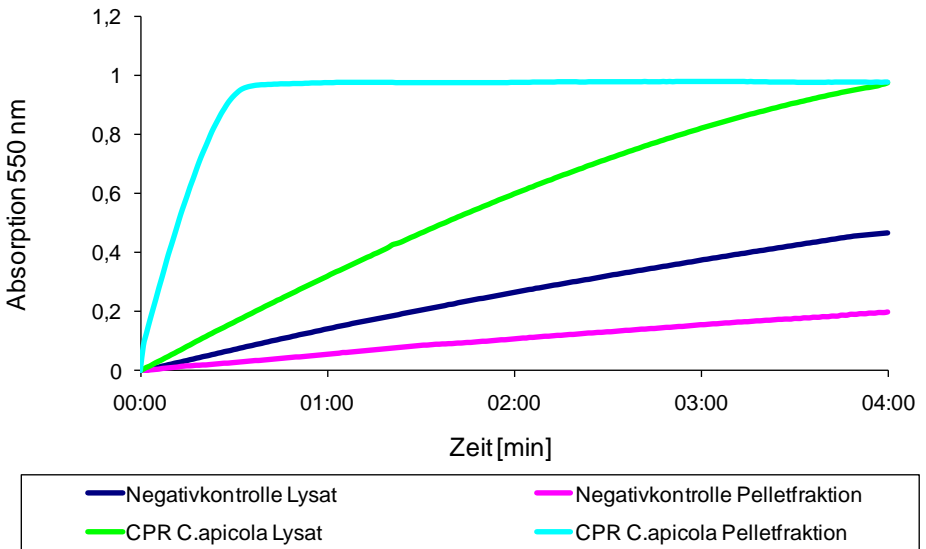


Abbildung 3-7: Cytochrom c-Test mit der CPR aus *C. apicola*

Eingesetzt in den Cytochrom c-Test wurden jeweils 100 μg Gesamtprotein. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer NADPH-Lösung gestartet. Die Absorptionsänderung wurde im zeitlichen Verlauf bei 550 nm bis zu vier Minuten photometrisch beobachtet, aufgezeichnet und ausgewertet.

Die Ergebnisse des Cytochrom c-Tests sind in Abbildung 3-7 dargestellt. Das Lysat der Reduktase-exprimierenden Zellen zeigte eine absolute Volumenaktivität von 198 mU/ml (Tabelle 3-6). Interessanterweise erreichte die volumetrische Aktivität der im Puffer aufgenommenem *E. coli*-Pelletfraktion mit der exprimierten *C. apicola*-Reduktase den deutlich höheren Wert von 1.237 mU/ml. Anhand

dieser Ergebnisse zeigt sich, dass die Membran-assoziierte Reduktase der *C. apicola* unter den optimierten Expressionsbedingungen (s. Kap. 2.6.5.4), die höchste Cytochrom c-Aktivität in der Pelletfraktion aufwies. Auch der Einsatz von Detergenzien (s. Kap. 2.7.1.1) konnten das Membran-assoziierte Protein nicht in die lösliche Fraktion überführen.

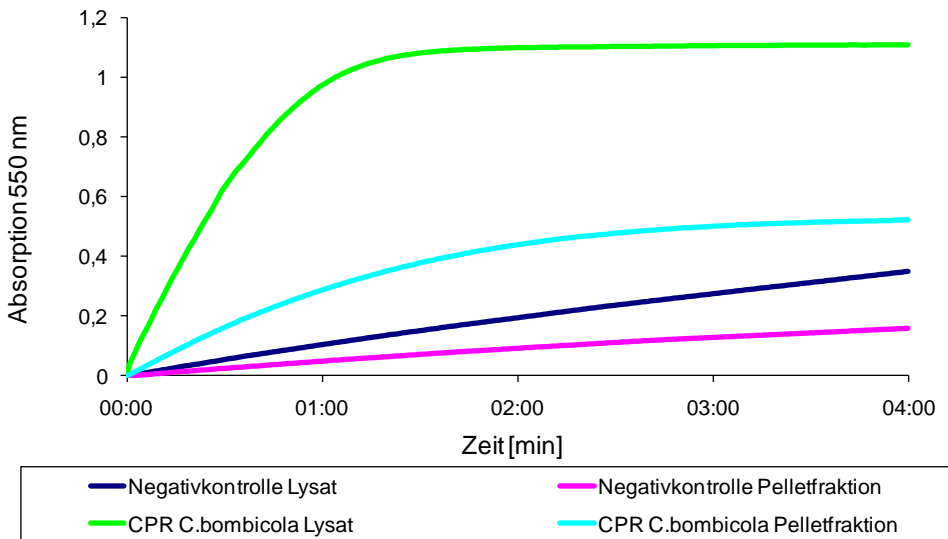


Abbildung 3-8: Cytochrom c-Test mit der CPR aus *C. bombicola*

Die exprimierte CPR der *C. bombicola* (Abbildung 3-8) wurde ebenfalls dem Cytochrom c-Test unterzogen. Die absolute Volumenaktivität des Lysates mit der exprimierten *C. bombicola*-Reduktase, zeigte ein Wert von 744 mU/ml. Untersuchungen der Pelletfraktion wiesen einen Wert von 93 mU/ml absoluter Volumenaktivität auf.

Tabelle 3-6: Volumenaktivitäten der exprimierten Reduktasen von *C. apicola* und *C. bombicola* in Lysat und Pelletfraktion im Vergleich

	Negativkontrolle BL21 (DE3) pLysS pET28a+	CPR aus <i>C.</i> <i>apicola</i>	Absolute Volumenaktivität [mU/ml]
Volumenaktivität [mU/ml] Lysat	154	352	198
Volumenaktivität [mU/ml] Pelletfraktion	37	1.274	1.237
	Negativkontrolle BL21 (DE3) pTrcHisTOPO <i>lacZ</i>	CPR aus <i>C.</i> <i>bombicola</i>	Absolute Volumenaktivität [mU/ml]
Volumenaktivität [mU/ml] Lysat	110	854	744
Volumenaktivität [mU/ml] Pelletfraktion	72	165	93

3.2.2 Cytochrom P450-Gene: CYP52E1 und CYP52E2

Die bekannten P450-Sequenzen [49], CYP52E1 und CYP52E2, aus *C. apicola* konnten mit spezifischen Primern amplifiziert werden (s. Kap.

2.3.3, Tabelle 2-7). Wegen der unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen an den 5'- und 3'-Enden der DNA-Sequenz konnten die zwei Gene in unterschiedliche Vektoren inkloniert werden um die Expression von Membran-gebundenen P450s in verschiedenen Expressionssystemen zu testen.

3.2.2.1 Expression von CYP52E1 und CYP52E2 in eukaryotischen Expressionssystemen

3.2.2.1.1 Amplifikation und Klonierung der CYP52E-Gene in Hefevektoren

Für die Expression der CYP52E-Gene in *S. cerevisiae* wurde der Vektor pYES2 genutzt. Die Klonierung der PCR-Amplifikate erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NotI/XbaI* (CYP52E1) oder über *HindIII/XbaI* (CYP52E2-Gen). Bei der anschließenden Sequenzierung der Plasmide wurde eine Mutation im CYP52E2-Gen, an der Position 140, (N140H) detektiert.

Weiterhin wurden die CYP52E-Gene in die Vektoren pPICZ C und pPICZ α A, die zur Expression in *P. pastoris* verwendet wurden kloniert (Tabelle 3-7). Bei pPICZ C konnte nur das CYP52E1-Gen erfolgreich eingefügt werden (*KpnI/NotI*). Dabei kam es zu einer zusätzlichen Mutation an der Position 14 (A14V). In den zweiten Vektor, pPICZ α A, konnte über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XbaI* beide CYP52E-Gene erfolgreich kloniert werden, wobei auch hier eine Mutation im CYP52E1-Gen (F130L) auftrat.

3.2.2.1.2 Expression der CYP52E-Gene in Hefezellen

Der Versuch der Expression der CYP52E-Gene in *S. cerevisiae* wurde unter den in Kapitel 2.6.5.3 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Mit Hilfe der CO-Differenzspektrometrie (s. Kap. 2.8.1) konnte keine P450-Produktion (Tabelle 3-7) nachgewiesen werden.

Die Expression des Plasmids pPICZ C CYP52E1 + A14V in *P. pastoris* erzielte eine minimale P450-Produktion von 0,4 μM (420 nm-Peak) (Abbildung 3-9). Bei der Expression des Vektors pPICZ α A in *P. pastoris* konnte kein P450-Enzym nachgewiesen werden (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Nachweis der P450-Konzentration von CYP52E1 und CYP52E2 mit Hilfe der CO-Differenzspektrometrie

Stamm	Plasmid	CO-Differenzspektrum
INVSc1 (<i>S. cerevisiae</i>)	pYES2 CYP52E1	-
INVSc1 (<i>S. cerevisiae</i>)	pYES2 CYP52E2 + N140H	-
X-33 (<i>P. pastoris</i>)	pPICZ C CYP52E1 + A14V	0,4 μM (Peak bei 420 nm)
X-33 (<i>P. pastoris</i>)	pPICZ α A CYP52E1 + F130L	-
X-33 (<i>P. pastoris</i>)	pPICZ α A CYP52E2	-

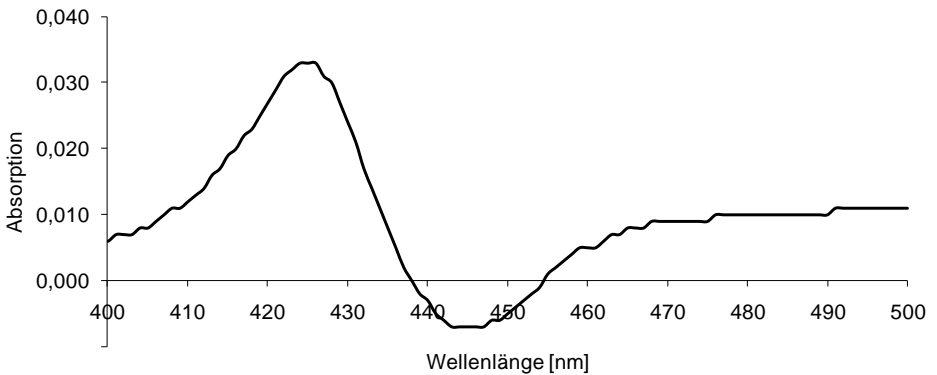


Abbildung 3-9: CO-Differenzspektrum von CYP52E1 exprimiert in *P. pastoris*

Lysat von *P. pastoris*-Zellen, die mit pPICZ C CYP52E1 + A14V transformiert wurden.

3.2.2.2 Expression in *E. coli*

3.2.2.2.1 Amplifikation und Klonierung der CYP52E-Gene in *E. coli*-Vektoren

Zur Expression der Hefegene, CYP52E1 und CYP52E2, in *E. coli* mussten diese zuvor in entsprechende *E. coli*-Vektoren kloniert werden. Aus der großen zur Verfügung stehenden Auswahl an unterschiedlichen *E. coli*-Vektoren wurden für diese Arbeit pCold III, pCWori und pTrcHisTOPO ausgewählt.

Für die Klonierung der CYP52E-Gene in den pCold III-Vektor wurden beide Gene über eine PCR mit spezifischen Primern (s. Kap. 2.3.3, Tabelle 2-7), die die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI enthielten, amplifiziert. Die über diese Methode erfolgreich klonierten

Plasmide wurden mit pCold III CYP52E1 und pCold III CYP52E2 + N140H bezeichnet. Parallel dazu wurden auch Zellen mit dem pCold III-Vektor und einem zusätzlichen Plasmid, das das Gen für ein Chaperon enthielt, kotransformiert.

Als weiterer Vektor für die Proteinexpression der Hefegene wurde ein pCWOri-Vektor mit integrierter boviner 17 α -Hydroxylase [125] verwendet. Zuvor wurden die CYP52E-Gene mit genspezifischen Primern (s. Kap. 2.3.3, Tabelle 2-7) amplifiziert. Bei der Klonierung des CYP52E1-Gens wurden die ersten sechs Aminosäuren der bovinen 17 α -Hydroxylase beibehalten, während von der P450-Sequenz die ersten 16 Aminosäuren deletiert wurden. Die Ligation der beiden PCR-Fragmente in die Vektoren erfolgte über *NdeI/BglII*. Beim CYP52E2-Gen wurden ebenfalls 16 Aminosäuren deletiert und durch die neun N-terminalen Aminosäuren der 17 α -Hydroxylase ersetzt. Das Fragment wurde über die Schnittstellen *NdeI/HindIII* in den Vektor ligiert. Das ursprüngliche CYP52E2 Stop-Codon, TAG, wurde durch die Primersequenz zu TGA verändert. Bei der anschließenden Sequenzierung konnte eine Punktmutation an der Aminosäure 139 (N139H) von Asparagin zu Histidin festgestellt werden.

3.2.2.2.2 Expression der CYP52E-Gene in *E. coli*

Die Expression der *C. apicola*-P450s in *E. coli* wurden mit verschiedenen Kombinationen von *E. coli*-Stämmen und Plasmiden durchgeführt (Tabelle 3-8). Bei der Klonierung der Hefe-Gene in den pCWOri-Vektor wurde die zuvor integrierte bovine 17 α -Hydroxylase nur teilweise ausgeschnitten (s. Kap. 3.2.2.2.1). Der Ersatz der CYP52E-

Anfangssequenz durch die Hydroxylase-Sequenz führt zur Veränderung des exprimierten Proteins. Die Expression des CYP52E1-Gens in BL21 (DE3)-Zellen mit Hilfe des pCWOri-Vektors erzielte mit 2,6 μM (P420 nm-Peak) die höchste P450-Konzentration (Abbildung 3-10). Mit der Expression des Gens CYP52E2 + N139H in BL21 (DE3)-Zellen konnte etwa die Hälfte an P450-Protein (1,6 μM P420 nm-Peak) produziert werden. Der pTrcHisTOPO-Vektor soll, laut Herstellerangaben, die Expression von eukaryotischen Proteinen in *E. coli* erleichtern. Bei der Proteinproduktion in TOP10-Zellen mit dem Vektor pTrcHisTOPO CYP52E2 konnte 2,2 μM P450-Protein (P420 nm-Peak), beobachtet werden. Während die Expression des CYP52E1-Proteins mit dem gleichen Stamm und dem gleichen Plasmid schlechter gelang (0,3 μM P420 nm-Peak). Alle ermittelten Cytochrom-Konzentrationen beziehen sich auf einen 420 nm-Peak. Mit dem pCold III-Vektor sollen, laut Herstellerangaben, 60 % des in herkömmlichen Expressionssystemen unlöslichen/Membran-assoziierten Proteins löslich exprimiert werden können, unter den Bedingungen: 15 °C für ~24 h. Die Verlangsamung der Zellteilung bzw. Expression führt somit auch zu einer langsameren Proteinfaltung, was in funktionsfähigen Proteinen resultieren kann. Durch die Unterstützung der Proteinfaltung bei der Benutzung des pCold III-Vektors durch sogenannte Chaperone kann die Menge an löslichem Protein erhöht werden. Die Expression der CYP52E-Gene mit dem pCold III-Vektor in *E. coli* führte zu keinerlei detektierbarer Proteinproduktion.

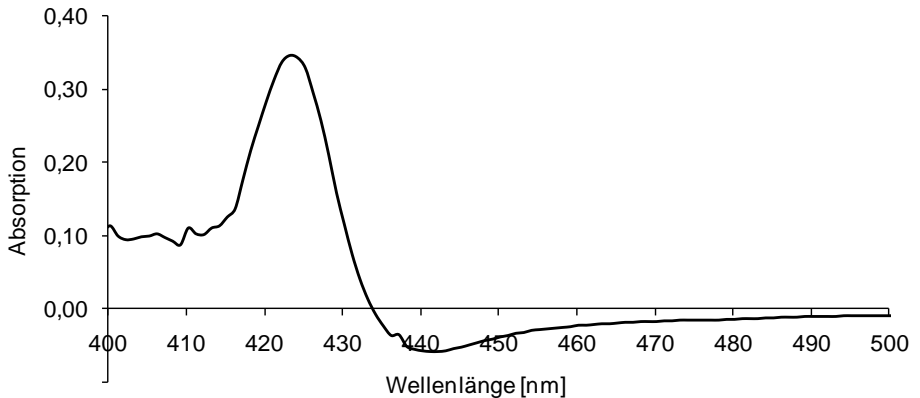


Abbildung 3-10: CO-Differenzspektrum von CYP52E1 nach der Expression vom pCWOri-Vektor in *E. coli* BL21 (DE3)

3.2.2.2.3 Expression der CYP52E-Gene in *E. coli* mit anschließender Aufreinigung der mikrosomalen Fraktion

Die Proteinproduktion in TOP10-Zellen mit Hilfe des pTrcHisTOPO CYP52E2-Plasmids erfolgte wie in Kapitel 2.6.5.2 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen aufgearbeitet und die mikrosomale Fraktion (s. Kap. 2.7.2) getestet.

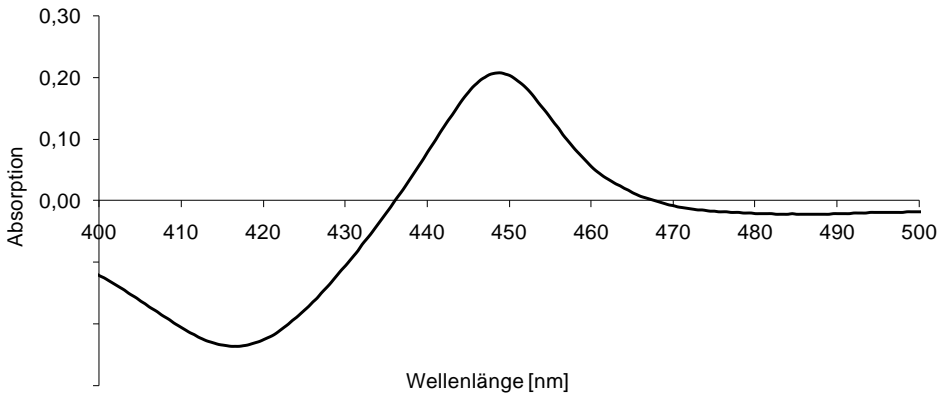


Abbildung 3-11: CO-Differenzspektrum der mikrosomalen Fraktion von CYP52E2, exprimiert in den *E. coli*-Zellen TOP10, mit Hilfe des Vektors pTrcHisTOPO

Nach Behandlung der mikrosomalen Fraktion mit Kohlenstoffmonoxid und Natriumdithionit wurde im CO-Differenzspektrum bei P450 nm (Abbildung 3-11) ein Peak detektiert, der einer Konzentration von 2,2 μM P450 (Tabelle 3-8) entsprach.

Tabelle 3-8: Verwendete Stämme und Plasmide zur Expression der CYP52E-Gene in *E. coli*

Stamm	Plasmid	CO-Differenzspektrum
BL21 (DE3)	pCW Ori CYP52E1	2,6 μ M (Peak bei 420 nm)
BL21 (DE3)	pCW Ori CYP52E2 + N139H	1,6 μ M (Peak bei 420 nm)
TOP10	pTrcHisTOPO CYP52E1	0,3 μ M (Peak bei 420 nm)
TOP10	pTrcHisTOPO CYP52E2	2,2 μ M (Peak bei 420 nm)
TOP10	pTrcHisTOPO CYP52E2	2,2 μ M (Peak bei 450 nm in der mikrosomalen Fraktion)

3.2.3 Aktivitätsanalyse des CYP52E1-Enzyms mit verschiedenen Reduktasen

Die Aktivitätsanalyse soll klären, ob ein Zusammenspiel des CYP52E1-Enzyms mit einer der drei verwendeten Reduktasen gewährleistet und somit eine Substratumsetzung nachweisbar ist. Die drei Versuchsansätze mit den CYP52E-Lysaten und dem Lysat der exprimierten *C. apicola* und *C. bombicola* und der kommerziell erhältlichen humanen Reduktase zeigten keinerlei Umsetzung des Substrates Laurinsäure in dessen Hydroxylierungsprodukte. Ebenfalls keinen Nachweis von Edukten lieferte die Kombination: CYP52E-Lysat und CPR-Pelletfraktion aus *C. apicola*.

3.3 Immobilisierung der P450 BM-3 Häm-Domäne F87A

Da Alkane in hoher Konzentration einen negativen Effekt auf die Stabilität der P450-Enzyme haben, wurde die P450 BM-3-Häm-Domäne immobilisiert. Für die Immobilisierung des aufgereinigten Enzyms P450 BM-3 Häm-Domäne F87A aus *B. megaterium* wurden drei verschiedene mesoporösen Silikate mit unterschiedlichen Eigenschaften im Hinblick auf ihre Eignung als Trägermaterial getestet. Mesoporöse Silikate, wie in der Einleitung beschrieben, sind noch nicht sehr breit für die Enzymimmobilisierung angewendet worden. Sie scheinen aber potenziell sehr attraktiv, da ihre Porengröße bei der Synthese durch die Wahl der Template bestimmt werden kann. In dieser Arbeit sollte vor allem der Effekt der Porengröße auf die Immobilisierungseffizienz und auf die Aktivität des Enzyms untersucht werden. Darüber hinaus wurden Parameter, wie Silikatbeschaffenheit, pH-Wert der Lösung, Agitationsbedingungen, Enzymvolumen, Enzymkonzentration sowie eine Mehrfachbeladung des schon zuvor behandelten Materials, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Immobilisierungseffizienz untersucht. Anschließend folgten Aktivitätsmessungen, mit freiem und immobilisiertem Enzym, mit dem Surrogatsubstrat 12-*p*NCA und mit dem kurzkettigen Alkan *n*-Octan.

3.3.1 Häm-Domäne von P450 BM3H_F87A

3.3.1.1 Herstellung der Häm-Domäne von P450 BM-3 (BM3H)

Für diesen Teil der Arbeit wurde nur die P450 BM-3-Häm-Domäne als Enzym gewählt. Als Ausgangs-DNA wurde das Plasmid pET28a+ P450 BM-3 verwendet, welches das Gesamtgen von P450 BM-3 beinhaltet. Mit spezifischen Primern konnte das 1.416 bp DNA-Fragment der Häm-Domäne amplifiziert und über die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI in einen ebenfalls geschnittenen pET28a+-Vektor ligiert werden. Unter Verwendung des neu entstandenen Plasmids pET28a+ BM3H (P450 BM-3-Häm-Domäne) wurde mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese durch PCR die Aminosäure Phenylalanin 87 zu Alanin mutiert. Durch eine Sequenzanalyse wurde die Mutation bestätigt. Für die folgenden Immobilisierungs-untersuchungen wurde das Plasmid pET28a+ BM3H_F87A (P450 BM-3-Häm-Domäne F87A) verwendet.

3.3.1.2 Expression und Aufreinigung von BM3H_F87A

Für Expressionszwecke wurde das Plasmid pET28a+ BM3H_F87A in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) inseriert. Die Expression erfolgte, wie in Kapitel 2.6.5.1 beschrieben.

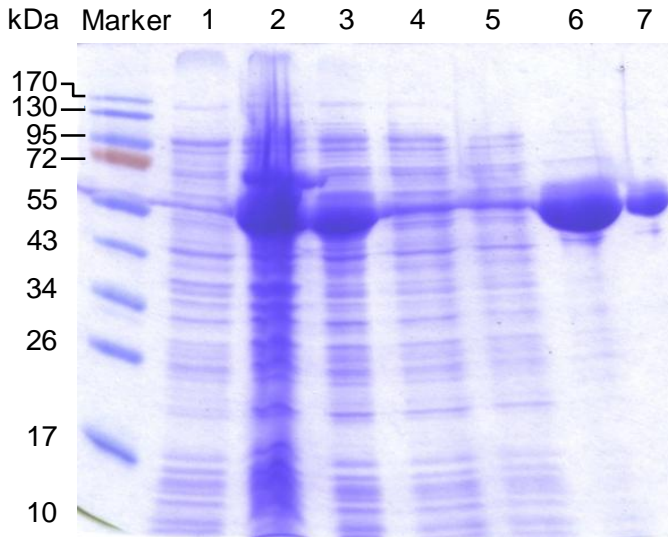


Abbildung 3-12: 12,5 %ige SDS-PAGE der Expression und Aufreinigung von BM3H_F87A

Die Trennung der Proteine aus den Aufreinigungsstufen erfolgte über eine 12,5 %ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blue-Färbung. Das gesuchte Protein besitzt eine Größe von 56 kDa.

Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder)

- 1) Ganze Zellen vor Induktion
- 2) Ganze Zellen nach Induktion
- 3) Zell-Lysat
- 4) Zell-Lysat aufgetragen mit 60 mM Imidazol (Durchfluss)
- 5) Waschschrift mit 60 mM Imidazol
- 6) Elution mit 200 mM Imidazol
- 7) Reinigen der Säule mit 300 mM Imidazol

Nach der Zellernte und einem Zellaufschluss über Ultraschall konnte das aktive Enzym im Lysat lokalisiert werden (Abbildung 3-12). Zur Reinigung des Enzyms mit Hilfe der IMAC (immobilisierten Metallaffinitätschromatographie) wurde ein über den Vektor eingebrachtes His6-Tag genutzt. Die Reinheit des Enzyms BM3H_F87A lag bei circa 90 %.

3.3.2 Charakterisierung der eingesetzten Silikate zur Immobilisierung

3.3.2.1 Eigenschaften der mesoporösen Materialien

Für die Immobilisierung des Proteins BM3H_F87A wurden zunächst fünf verschiedene Silikate mit unterschiedlichen Eigenschaften hergestellt (in Zusammenarbeit mit dem AK Gläser (Universität Leipzig), AK Hunger (Universität Stuttgart)) bzw. erworben. Die Silikate unterscheiden sich in Form, Anordnung und Durchmesser der Poren, sowie durch die Größe ihrer spezifischen Oberfläche (Tabelle 3-9). Das kommerziell erhältliche Silikat Kieselgel (Typ 62) weist ungeordnete Poren mit ungleichmäßigen Porendurchmessern ($d_p = 20-250 \text{ \AA}$) auf. Der daraus gemittelte Porendurchmesser beträgt 114 \AA , die spezifische Oberfläche $327 \text{ m}^2/\text{g}$. Die synthetisierten Materialien MCM-41 und SBA-15 (Arbeitskreis Prof. Dr. Roger Gläser, Universität Leipzig; Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Hunger, Universität Stuttgart) sind häufig eingesetzte, mesoporöse Silikate für Enzymimmobilisierungen. Sie zeichnen sich durch eine parallele Anordnung der hexagonalen Poren aus. Mit 25 \AA Porendurchmesser

besitzt MCM-41 die kleinsten Poren und die größte spezifische Oberfläche ($1.290 \text{ m}^2/\text{g}$). Das Silikat SBA-15 wurde mit zwei unterschiedlich großen Porendurchmessern synthetisiert ($d_p = 60 \text{ \AA}$ und $d_p = 133 \text{ \AA}$) mit den entsprechenden spezifischen Oberflächen ($828 \text{ m}^2/\text{g}$ und $380 \text{ m}^2/\text{g}$). Ebenso wurde SBA-15-Material ohne Poren bzw. mit nicht entferntem/ausgebranntem Templat hergestellt, welches als Kontroll-Silikat zur Bestimmung des Anteils der Oberfläche statt findenden Immobilisierung dient. Eine weitere Besonderheit der mesoporösen Silikate MCM-41 und SBA-15 ist die Dicke der Porenwände. Während SBA-15 dicke, hydrothermal stabile Silikatwände aufweist, besitzt MCM-41 deutlich dünnere und instabilere Porenwände.

Tabelle 3-9: Übersicht der Silikate zur Immobilisierung von BM3H_F87A

Silikat	Porendurchmesser d_p in [\AA]	Porenanordnung und -form	Spezifische Oberfläche [m^2/g]
Kieselgel (Typ 62)	20-250 (Mittelwert 114)	ungeordnet	327
MCM-41	25	geordnet, hexagonal	1.290
SBA-15	60	geordnet, hexagonal	828
SBA-15	133	geordnet, hexagonal	380
SBA-15	befüllte Poren	geordnet, hexagonal	-

3.3.2.1.1 N₂-Adsorptions-Desorptions-Isotherme

Die eingesetzten mesoporösen Materialien, MCM-41 und SBA-15, wurden vor und nach der Beladung mit Enzym, einer Sorptions-Messung unterzogen. Eine aussagekräftige Sorptions-Hysterese konnte für beide SBA-15-Materialien ($d_p = 60 \text{ \AA}$ und $d_p = 133 \text{ \AA}$) beobachtet werden, jedoch nicht für das MCM-41-Material ($d_p = 25 \text{ \AA}$). Die Sorptions-Isotherme beider SBA-15-Materialien, gemessen vor und nach Beladung mit Enzym, ist in Abbildung 3-13 zu sehen.

XRD-Messungen der Materialien vor und nach Beladung mit Enzym, zeigten im Falle des SBA-15 ($d_p = 133 \text{ \AA}$) eine deutliche Verringerung des Porenvolumens (integriertes Bild in Abbildung 3-13, Bild B). Während bei dem SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$) keine Veränderung der Porengröße nach Beladung mit Enzym zu beobachten ist (integriertes Bild in Abbildung 3-13, Bild A).

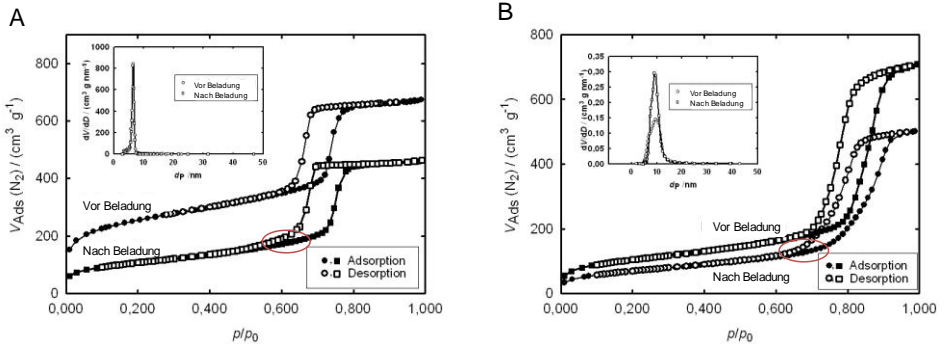


Abbildung 3-13: N_2 -Adsorptions-Desorptions-Isothermen

Die N_2 -Adsorptions-Desorptions-Isotherme wurden jeweils vor und nach Beladung mit Enzym ermittelt. Die roten Kreise weisen auf die minimale Verschiebung der Desorptions-Kurve und somit auf die Beladung des Materials mit Enzym hin. A) SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$); B) SBA-15 ($d_p = 133 \text{ \AA}$).

Die integrierten Bilder zeigen die Messergebnisse des mittleren Porenvolumens im Verhältnis zur spezifischen Oberfläche vor und nach Beladung des SBA-15-Materials mit Enzym.

3.3.2.1.2 Röntgenbeugung (X-Ray Diffraction, XRD)

Wie in der Abbildung 3-14 zu sehen, weisen MCM-41 und SBA-15 die charakteristischen XRD-Kurven für geordnete mesoporöse Materialien mit hexagonal angeordneten Poren auf. MCM-41 und SBA-15 besitzen eine regelmäßig hexagonale Anordnung von zylindrischen Mesoporen, die ein eindimensionales Porensystem bilden. Diese regelmäßige Anordnung der Kanäle ist auch für das Entstehen von Beugungsreflexen im Röntgenbeugungsdiagramm verantwortlich.

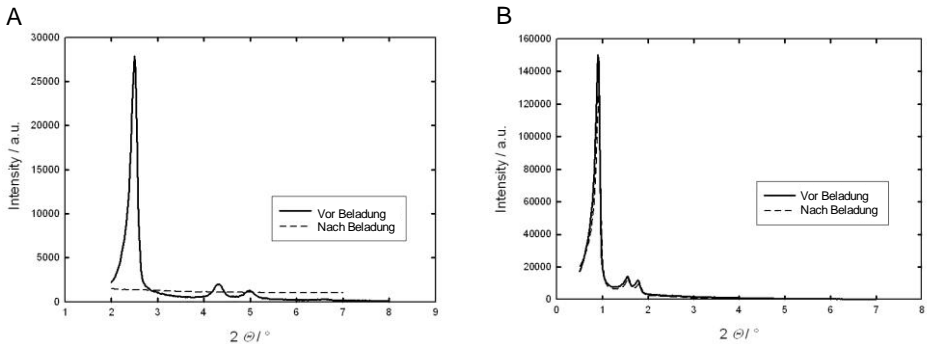


Abbildung 3-14: Ergebnisse der Röntgenbeugung der Materialien A) MCM-41 ($d_p = 25 \text{ \AA}$) und B) SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$) vor und nach Behandlung mit der Schwingmühle

Wie Abbildung 3-14 (Bild A) zeigt, wurde die Gitterstruktur des MCM-41 durch die Immobilisierungsprozedur mit der Schwingmühle komplett zerstört. Während bei dem Material SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$), mit den wesentlich dickeren und somit hydrothermal stabileren Silikatwänden keinerlei Veränderungen der Struktur nach dem Immobilisierungsprozess beobachtet werden konnte (Abbildung 3-14, Bild B).

3.3.3 Untersuchungen zur Immobilisierung

3.3.3.1 Optimierung der Immobilisierungsbedingungen

Die ersten Versuche unter verschiedenen Misch- und Temperaturbedingungen dienten der allgemeinen Optimierung des Immobilisierungsprozesses. Das Mischen von Enzym und

Trägermaterial in der Schwingmühle inaktivierte das Enzym und konnte somit nicht zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden. Unter den anderen untersuchten Immobilisierungsbedingungen, wie Mischen durch Rühren und durch Verwendung eines Rotationsschüttlers bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen (10 °C, Raumtemperatur) über einen Zeitraum von bis zu 24 h, konnte kein Verlust der Enzymaktivität und der Löslichkeit des Enzyms festgestellt werden.

Verschiedene Mischbedingungen wirkten sich aber unterschiedlich auf die Immobilisierungseffizienz aus. Bei kontinuierlichem Rühren adsorbierte das Enzym mit einer Ausbeute von 7-14 mg Enzym per g SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$). Durch langsames Drehen eines Rotationsschüttlers konnte eine weitaus höhere Immobilisierungseffizienz von 30–34 mg Enzym per g SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$) erzielt werden. Mit dem Material MCM-41 ($d_p = 25 \text{ \AA}$) konnten lediglich 22–26 mg Enzym per g Matrix erreicht werden.

3.3.3.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Immobilisierungseffizienz

Untersuchungen bezüglich des pH-Wertes der Puffer-Lösung auf die Enzymbindung auf mesoporösem SBA-15, wurde im pH-Bereich von 6–8 untersucht. Durch die Verwendung eines Rotationsschüttlers konnte das Material bei den pH-Werten 7–7,5, mit einer Enzymmenge von 30 mg und 34 mg Enzym per g SBA-15, das bestmögliche

Ergebnis erzielen. Kontinuierliches Rühren zeigte ein Optimum der Enzyymbindung bei pH 6 und 8, mit jeweils 16 mg Enzym per g SBA-15.

3.3.3.3 Abhängigkeit der Immobilisierungseffizienz von der Porengröße der eingesetzten mesoporösen Silikate

Die Porengröße der verwendeten mesoporösen Materialien ist für die Größe der Oberfläche, die für die Enzyymbindung zur Verfügung steht, von großer Wichtigkeit. Dies ist insbesondere auch dann der Fall, wenn wie in dieser Arbeit die verwendeten Porengrößen in der gleichen Größenordnung vorliegen wie der Enzymdurchmesser (80 x 70 x 60 Å). Bei der Verwendung des handelsüblichen Kieselgels Typ 62, welches keine spezifische Porengröße, sondern eine breite Verteilung verschiedener Porengrößen ($d_p = 20\text{--}250 \text{ \AA}$, Mittelwert 114 Å) auf der Oberfläche aufweist, wurde eine Immobilisierungseffizienz von 10 mg Enzym per g Kieselgel beobachtet bei einer eingesetzten Enzymkonzentration von 20 µM (Abbildung 3-15).

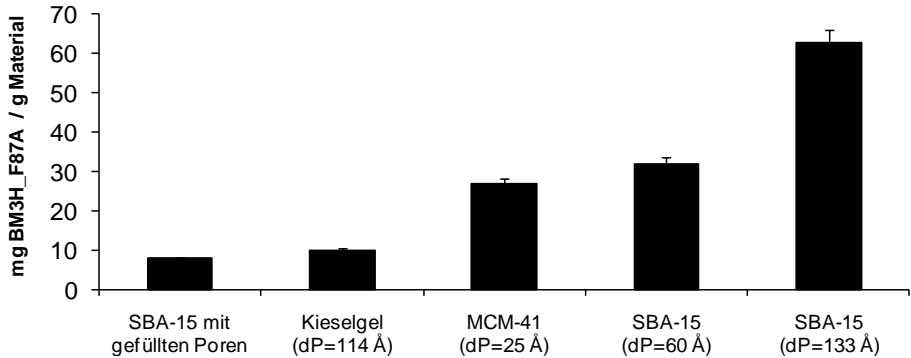


Abbildung 3-15: Beladung der Silikate Kieselgel Typ 62, MCM-41 und SBA-15 mit einer einmaligen Enzymkonzentration von 20 μM

Mit dem Material MCM-41, das eine Porengröße von 25 Å besitzt, konnte nach einmaliger Beladung größere Mengen Enzym (27 mg Enzym per g MCM-41) immobilisiert werden als mit dem Kieselgel. Das mesoporöse Material SBA-15 mit den gefüllten Poren nahm ähnlich geringe Mengen an Enzym auf (8 mg Enzym per g SBA-15), während bei einer spezifischen Porengröße von 60 Å des SBA-15 Materials, fast das Dreifache (32 mg Enzym per g SBA-15) an Enzym nach einmaliger Immobilisierungsprozedur aus der Lösung gebunden werden konnte. Bei Erweiterung der Porengröße auf 133 Å konnte die adsorbierte Enzymmenge nochmals auf 63 mg Enzym per g SBA-15 verdoppelt werden (Abbildung 3-15).

3.3.3.4 Abhängigkeit der Immobilisierungseffizienz von der Enzymkonzentration

Da die Immobilisierung ein „Steady-State“ Prozess ist, wurde der Effekt der Enzymkonzentration und der mehrfachen Beladung auf die Immobilisierungsprozedur untersucht. Die Experimente mit verschiedenen Enzymkonzentrationen zeigten, dass mit der niedrigsten verwendeten Enzymkonzentration von 31 μM eine Beladung von 25 mg Enzym per g SBA-15 erreicht wurde. Bei einer Ausgangskonzentration von 75 μM immobilisierten 17 mg und bei 112 μM Konzentration 10 mg Enzym per g SBA-15 Material (s. Kap. 3.3.3.4, Abbildung 3-16, Bild A).

Bei einer einmaligen Enzymbeladung (36,4 μM) konnten etwa 22 mg Enzym per g SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$) gebunden werden. Wurde die Beladung des SBA-15-Materials mit gleicher Enzymkonzentration wiederholt, erhöhte sich die gebundene Enzymmenge auf 37 mg Enzym per g SBA-15. Wurden insgesamt drei Beladungszyklen mit dem Enzym durchgeführt, steigerte sich der Wert sogar auf 50 mg Enzym per g SBA-15 (Abbildung 3-16, Bild B).

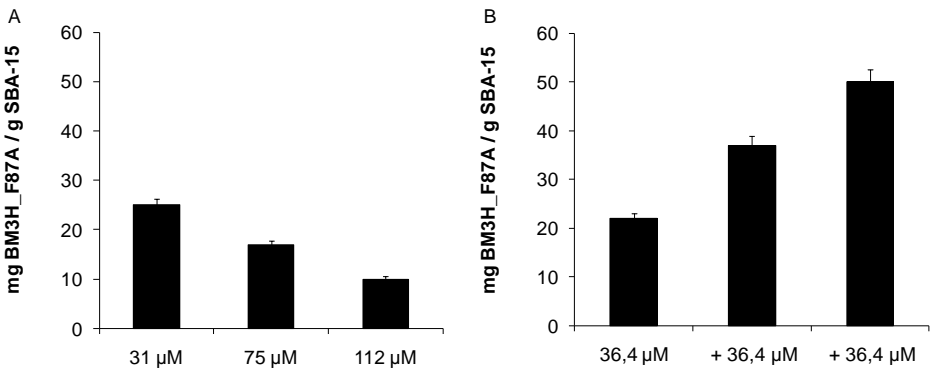


Abbildung 3-16: Abhängigkeit der Immobilisierungseffizienz von der angebotenen Enzymmenge

A) Immobilisierungseffizienz bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

B) Immobilisierungseffizienz in Abhängigkeit der Anzahl der Beladungszyklen:
jede Beladung erfolgte mit einer Enzymkonzentration von 36,4 µM

3.3.3.5 Einfluss des Arbeitsvolumens auf die Immobilisierungseffizienz

Der Einfluss des Arbeitsvolumens auf die Immobilisierungseffizienz wurde mit einer Enzymkonzentration von 48 µM ermittelt. Als Trägermaterial wurden MCM-41 ($d_p = 25 \text{ \AA}$) und SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$) getestet. Bei dem kleinsten Immobilisierungsvolumen (1 ml) konnten 17 mg (MCM-41) bzw. 15 mg (SBA-15) Enzym per g Material gebunden werden. Bei einer Verdreifachung des Volumens der Enzymlösung steigerten sich die Immobilisierungsausbeuten auf 94 mg (MCM-41) bzw. 102 mg (SBA-15) Enzym per g Material. Wurden 10 ml

Enzymlösung angeboten, absorbierten 107 mg (MCM-41) bzw. 190 mg (SBA-15) auf 1 g Material (Abbildung 3-17).

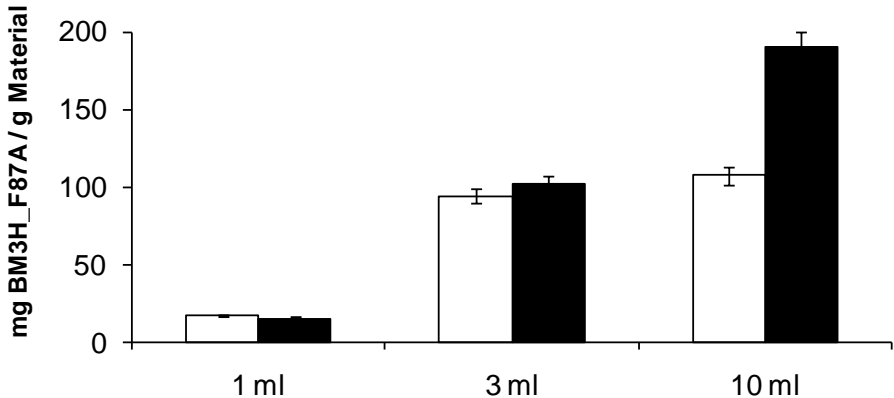


Abbildung 3-17: Einfluss des Immobilisierungsvolumens auf die Immobilisierungseffizienz

Der Immobilisierungsvorgang fand in allen Ansätzen mit einer 48 μM Enzymlösung statt. Weißer Balken: MCM-41 ($d_p = 25 \text{ \AA}$). Schwarzer Balken: SBA-15 ($d_p = 60 \text{ \AA}$).

3.3.4 Vergleichende Aktivitätsanalyse von freiem und immobilisiertem BM3H_F87A

3.3.4.1 Der 12-*p*NCA-Test

Für die Aktivitätsmessungen von freiem und immobilisiertem BM3H_F87A wurde der *p*NCA-Test verwendet [115]. Das Prinzip des Tests beruht auf einer Farbreaktion. Als Substrat diente 12-*p*NCA.

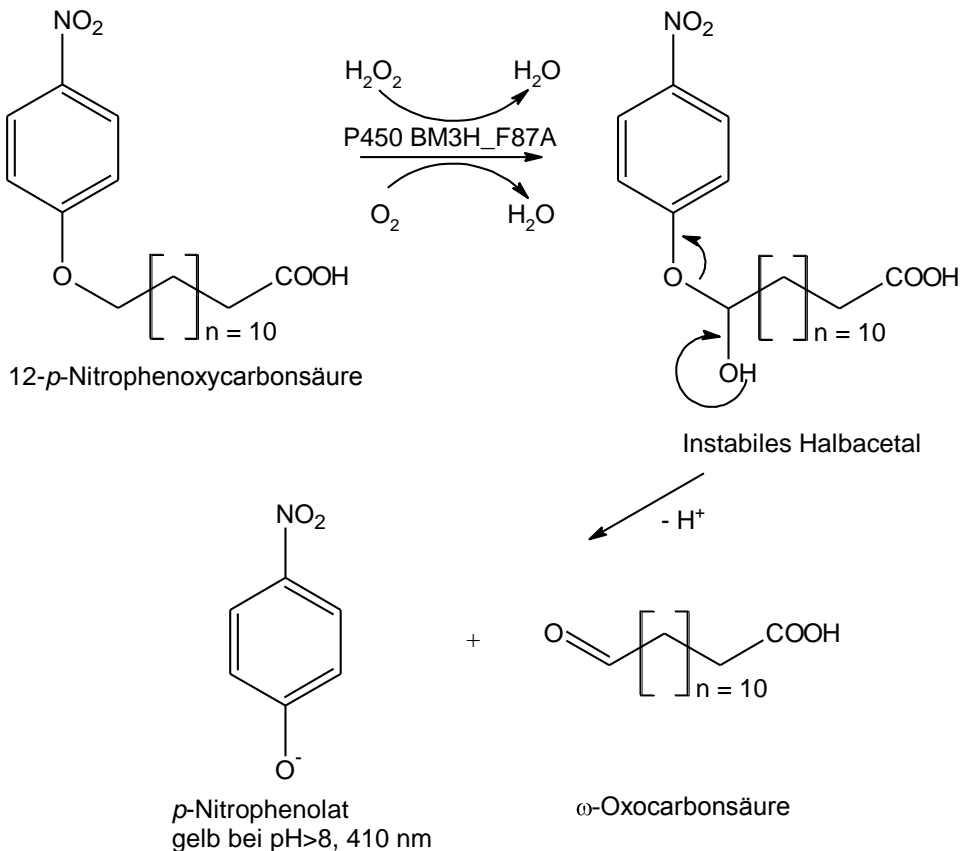


Abbildung 3-18: Reaktionsschema des 12-*p*NCA-Tests im Überblick

Die Hydroxylierung von 12-*p*-Nitrophenoxy-carbonsäure (12-*p*NCA) durch P450 BM3H_F87A in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid führt zur Bildung des instabilen Halbacetals. Dieses dissoziiert anschließend zu einer Oxocarbonsäure und dem Chromophor *p*-Nitrophenolat, welches bei einem basischen pH-Wert von >8 eine gelbliche Farbe aufweist und photometrisch bei 410 nm bestimmt werden kann.

Die Reaktion fand unter basischen Bedingungen (pH 8,1) und mit einem Überschuss des Kofaktors NADPH statt. Das entstehende *p*-Nitrophenolat wurde bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch quantifiziert (Abbildung 3-18). Die detektierte spezifische Aktivität des aufgereinigten, freien Enzyms lag bei 1.100 nmol Produkt/mg BM3H_F87A/min.

Die spezifischen Aktivitäten der immobilisierten Enzyme waren wie folgt: BM3H_F87A auf MCM-41 - 11 nmol Produkt/mg BM3H_F87A/min, BM3H_F87A auf SBA-15 mit 60 Å Porengröße - 112 nmol Produkt/mg BM3H_F87A/min und BM3H_F87A auf SBA-15 mit 133 Å Porengröße - 840 nmol Produkt/nmol BM3H_F87A/min (Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Messungen der spezifischen Enzymaktivität mit dem Surrogatsubstrat 12-pNCA

	Silikat-Porendurchmesser d_p in [Å]	Beladung [mg/g]	Spezifische Aktivität [nmol Produkt/mg BM3H_F87A/min]
Freies BM3H_F87A	-	-	1.100
Immobilisiertes BM3H_F87A	MCM-41 $d_p = 25 \text{ Å}$	27	11
Immobilisiertes BM3H_F87A	SBA-15 $d_p = 60 \text{ Å}$	32	112
Immobilisiertes BM3H_F87A	SBA-15 $d_p = 133 \text{ Å}$	90	840

3.3.4.2 Hydroxylierung von *n*-Octan

Aktivitätstests mit freiem und immobilisiertem Enzym wurden zusätzlich mit dem Substrat *n*-Octan durchgeführt.

Die Reaktion mit freiem BM3H_F87A zeigte eine Umsetzung von nur 9 % der eingesetzten *n*-Octan-Lösung (200 μM) nach zwei Stunden Inkubationszeit. Die gebildeten Hydroxylierungsprodukte waren die Regioisomere 2-, 3- und 4-Octanol im Verhältnis 2:4:3. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der GC/MS-Analyse 3-Octanon als Produkt identifiziert. Bei Untersuchungen mit immobilisierter BM3H_F87A, unter gleichen Bedingungen, konnte das *n*-Octan zu 18-20 % umgesetzt werden. Eine Verschiebung der Verteilung der Regioisomere konnte nicht festgestellt

werden. Im Allgemeinen erreichte die Anfangsgeschwindigkeit des immobilisierten Enzyms 35-40 nmol Gesamtprodukt per mg BM3H_F87A.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Hydroxylierung von acyclischen und cyclischen Alkanen mit Hilfe pro- und eukaryotischer P450-Monooxygenasen untersucht. Da Alkane sehr oft die Stabilität von Proteinen beeinträchtigen wäre es ein weiteres Ziel die Stabilität der ausgewählten P450-Monooxygenase durch Immobilisierung auf maßgeschneiderten mesoporösen Silikaten zu verbessern. Die durchgeführten Experimente sollten dazu beitragen, biotechnologische Nutzbarkeit von P450-Monooxygenasen zu untersuchen.

Folgende Teilprojekte wurden bearbeitet:

- Regioselektive Oxidation von *n*-Octan an subterminaler ω -1 Position mit Hilfe von P450 BM-3-Mutanten
- Enantioselektive Oxidation von *n*-Octan mit Hilfe von P450 BM-3-Mutanten
- Hydroxylierung cyclischer Alkane verschiedener Ringgröße (C8, C10, C12) mit Hilfe von P450 BM-3-Mutanten
- Klonierung und Charakterisierung von eukaryotischen P450-Monooxygenasen (CYP52E1 und CYP52E2) aus *Candida apicola*
- Stabilisierung von P450 BM-3-Häm-Domäne durch Immobilisierung auf mesoporösen Materialien mit unterschiedlichen Porengrößen

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert.

4.1 Hydroxylierung von acyclischen und cyclischen Alkanen mit Hilfe von P450-Monooxygenasen

4.1.1 Herstellung von 2-Octanol

Chemische Synthese von 2-Octanol gelingt nur über die Hydroborierungs-Oxidation mit Alkenen, sowie über eine katalytische Hydrierung von Aldehyden und Ketonen [126]. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von 2-Octanol ist die enzymatische Reduktion von 2-Octanon mit Hilfe von spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen [127, 128]. Dabei wird entsprechender Keton als Startsubstanz benutzt, was solche Verfahren relativ kostenaufwendig macht. Vor diesem Hintergrund erscheint eine direkte Hydroxylierung von Alkanen zu Alkoholen eine attraktive Alternative zu sein. Zur regio- und enantioselektiven Hydroxylierung eines Alkans direkt zum Alkohol wurden im Rahmen dieser Arbeit die bakterielle P450 BM-3 aus *B. megaterium* und zwei P450-Monooxygenasen aus *C. apicola* gewählt.

Da die Sequenz und die 3D-Struktur von P450 BM-3 bekannt sind, besteht die Möglichkeit über das Protein Engineering gezielt einzelne Aminosäuren auszutauschen, um die Eigenschaften des Enzyms zu verändern. Unter anderem lassen sich durch Mutationen auch die Substrat- und Produktpalette von Enzymen beeinflussen [28, 38, 39,

41, 42, 67-69, 115, 118]. Die drei in Betracht gezogenen Positionen F87, I263 und A328 befinden sich innerhalb der Substratbindetasche und somit sehr nahe am Oxidations-Zentrum (Häm) (Abbildung 4-1). An diesen drei Positionen wurden die ursprünglichen Aminosäuren durch hydrophobe und unpolare (Alanin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Valin), basische (Arginin) Aminosäuren sowie mit neutralem kleinem Glycin, ersetzt. Darüber hinaus wurden auch Doppel- und Dreifachmutanten untersucht.

Die Analyse ergab sieben P450 BM-3-Mutanten, die bis zu über 80 % 2-Octanol produzierten (Tabelle 3-1). Die Gemeinsamkeit dieser Mutanten ist die Verkleinerung des Aminosäurenrestes an Position 87 (z. B. Alanin) bei gleichzeitiger Vergrößerung des Aminosäurenrestes an Position 328 (z. B. Phenylalanin). Ein Aminosäureaustausch von I263 zu Alanin, Glycin, Arginin oder Valin führte ebenfalls zur Steigerung des 2-Octanol-Anteils. Aus der Fachliteratur sind ebenfalls P450 BM-3-Mutanten bekannt, die ähnliche Ergebnisse erzielten wie in Kapitel 1.3.1 aufgelistet. Peters und Mitarbeiter haben eine P450 BM-3-Mutante 35-E11 veröffentlicht, die vorwiegend (*S*)-2-Octanol (65 % ee) und eine andere Mutante 1-12G, die vorwiegend (*R*)-2-Octanol (55 % ee) produzierte [73, 74]. Diese Mutanten enthalten 11 bis 17 Mutationen, eingeschlossen die Mutationen an Positionen 87 und 328, was die Rolle dieser beiden Positionen für die Regioselektivität von P450 BM-3 bestätigt. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten P450 BM-3-Mutanten besitzen maximal drei Mutationen bei vergleichbar guter oder sogar besserer Regioselektivität für die 2-Octanol-

Produktion, sowie eine 10-fache Steigerung der Aktivität, im Vergleich zum P450 BM-3-WT (Tabelle 3-2). Der besonders große 2-Octanol-Produktanteil von 92 % die durch die F87V A328F-Mutante entsteht, lässt sich möglicherweise anhand der sterischen Gegebenheit am aktiven Zentrum erklären. So verursacht der Austausch des Phenylalanins zum Valin an der Position 87 zwar eine Vergrößerung des aktiven Zentrums, jedoch nur eine minimale Verschiebung der Alkoholproduktion zum 2-Octanol hin. Wird die Mutation F87V mit A328F kombiniert, wird der Häm-Ring, durch den wesentlich größeren Phenylalanin-Rest wiederum fast verdeckt, wodurch das Substrat in einer Position fixiert wird und überwiegend an der subterminalen ω -1 Position des Octans und weniger an den Positionen ω , ω -2 und ω -3 hydroxyliert werden kann.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Peters und Mitarbeitern [73] konnten zwei P450 BM-3-Mutanten mit höherer Enantioselektivität hergestellt werden: I263G produziert (*S*)-2-Octanol mit 80 % ee, F87V I263R A328F produziert (*R*)-2-Octanol mit 60 % ee (Tabelle 3-1).

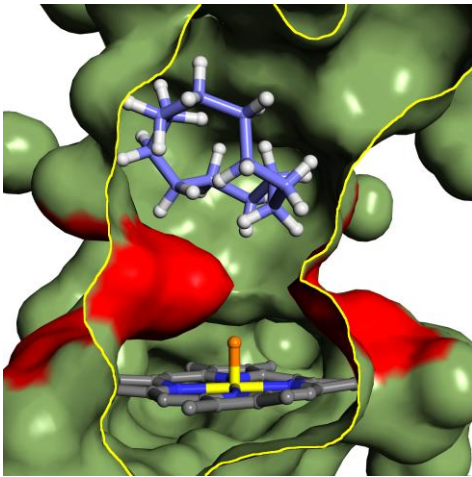
Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass es möglich ist die Aktivität sowie die Regio- und Enantioselektivität des funktionell sehr flexiblen P450 BM-3-Enzyms durch wenige Mutationen im aktiven Zentrum zu verbessern.

4.1.2 Umsetzung der cyclischen Alkane durch P450 BM-3-Mutanten

Cycloalkane sind inerte Kohlenwasserstoffe, die mit chemischen Methoden nur schwer oxidiert werden können. Am besten untersucht und in der Literatur beschrieben ist die Hydroxylierung von Cyclohexan mit heterogenen Katalysatoren [129-131]. Im Chemiekonzern BASF AG findet Cyclohexan Anwendung bei der Herstellung von Adipinsäure, die wiederum ein Zwischenprodukt für die Synthese von Nylon ist. Zuvor jedoch muss das Cyclohexan zu einem Cyclohexanol-Cyclohexanon-Gemisch chemisch oxidiert werden. Der direkte Einsatz eines enzymatisch oxidierten Cyclohexans könnte das aufwendige technische Verfahren verkürzen [132]. Besonders schwierig jedoch ist die Oxidation der inerten Cycloalkane ab einer Ringgröße von C10. In einer früheren Arbeit aus unserem Institut wurden P450 BM-3-Mutanten beschrieben die in der Lage sind, Cyclohexan zu Cyclohexanol zu hydroxylieren [123]. Für die Oxidation der Cycloalkane (C8, C10, C12) wurden daher ebenfalls P450 BM-3-Mutanten untersucht. Mit Hilfe der Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen konnte A. Seifert aus der Bioinformatik-Gruppe am ITB die Positionen 87 und 328 als besonders wichtig für Selektivität und Spezifität in P450 BM-3 identifizieren. Durch Kombination von fünf hydrophoben Aminosäuren an beiden Positionen wurde eine Mutantenbibliothek minimaler Größe, bestehend aus 24 Einfach- und Doppelmутanten, konstruiert. Einige der Mutanten zeigten eine deutlich verbesserte Aktivität im Vergleich zum P450 BM-3-WT (Tabelle 3-3).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei allen P450 BM-3-Mutanten, die die Cycloalkane C8, C10 und C12 umsetzen, das große Phenylalanin an Position 87 durch die kleineren Aminosäuren Alanin oder Valin ausgetauscht wurde. Durch diese Größenänderung wird der Raum über der Häm-Gruppe erweitert. Diese Modifikation erleichtert die Hydroxylierung aller Cycloalkane, so dass eine enorme Zunahme der Umsätze von 3-8 % (P450 BM-3-WT) auf bis zu 90 % (F87A A328F, F87A A328I, F87V) beobachtet wurde. Eine weitere Steigerung des Umsatzes konnte aber nicht erreicht werden. Die meisten Doppelmutanten zeigen sogar schlechtere Ergebnisse, wenn die Position A328 ebenfalls einer Mutation unterzogen wurde (Tabelle 3-3). Mutationen mit Leucin und Isoleucin an der Position F87 waren wenig effektiv bei der Umsetzung von Cycloalkanen, da die Aminosäurenreste zu groß und somit das zur Hydroxylierung benötigte Häm-Zentrum wahrscheinlich versperrten.

A



B

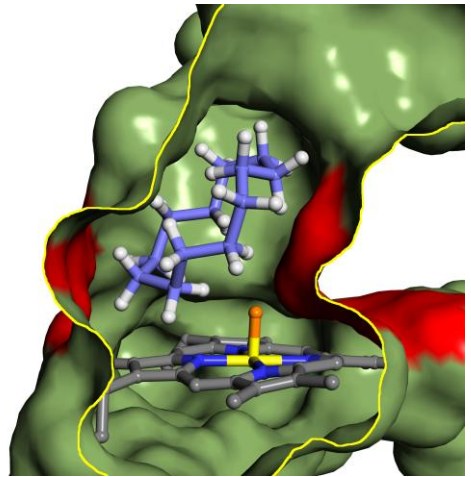


Abbildung 4-1: Die Substratbindetasche von A) P450 BM-3-WT und B) P450 BM-3-Mutante F87A A328V in Anwesenheit von Cyclododecan

Die Positionen der Mutationen sind rot eingefärbt: Position 87 (links) und 328 (rechts) im Bild. Der aktivierte Sauerstoff des Häm-Ringes ist orange gekennzeichnet. Die Bilder wurden mit Hilfe des Programms „PyMOL“ erzeugt (übernommen aus [133]).

Durch die Bestimmung der katalytischen Effizienz drei ausgewählter P450 BM-3-Mutanten, mit einem oder mehreren Cycloalkanen, wird die Affinität des Substrates (K_M) und die Umsatzraten (k_{cat}) des Enzyms überprüft. Der k_{cat} -Wert kann durch Variation der Substratkonzentration in mehreren aufeinander folgenden Messungen mit Hilfe eines Lineweaver-Burke-Plots bestimmt werden und zeigt, als sogenannte Wechselzahl, die pro Zeiteinheit maximal umsetzbare Anzahl an Substratmolekülen pro Enzymmolekül an. Die effizienteste

Wechselzahl konnte bei der P450 BM-3-Mutante F87V A328I (51 min^{-1}) bei der Umsetzung mit Cyclooctan beobachtet werden. Weisen Enzyme einen niedrigen K_M -Wert auf, besitzen sie eine hohe Affinität zum Substrat und erreichen schon bei geringen Substratkonzentrationen hohe Umsatzraten. Mit der P450 BM-3-Mutante F87A konnte der niedrigste K_M -Wert ($18 \text{ }\mu\text{M}$) mit Cyclododecan ermittelt werden (Tabelle 3-5).

4.2 Sequenzanalyse, Expression und Charakterisierung von Cytochrom P450-Systemen aus *Candida apicola*

4.2.1 NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR)

Da P450-Monooxygenasen und NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen (CPR) in meisten eukaryotischen Organismen zwei separate Proteine darstellen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Sequenz der unbekanntes CPR aus *C. apicola* zuerst identifiziert und kloniert werden. Die Identifizierung des Genes erfolgte auf der Basis eines Sequenzalignment von drei bekannten Reduktasen aus *Candida*-Stämmen mit Hilfe der Genome Walking-Methode mit degenerierten Primern (Tabelle 2-6). Die vollständige Reduktasesequenz aus *C. apicola* besteht aus 2.064 bp und besitzt eine Sequenz-Übereinstimmung von ~94 % zur CPR aus *C. bombicola*. Anschließend wurden die Membran-assoziierten CPR aus *C. apicola* und aus *C. bombicola* in *E. coli* exprimiert und deren Aktivität mit Hilfe des

Cytochrom c-Tests überprüft. Wie bereits publiziert, konnte die Membran-assoziierte CPR aus *C. bombicola* löslich und aktiv in *E. coli* exprimiert werden [10]. Anhand einer SDS-PAGE ist die Überexpression des Proteins im Lysat, sowie auch in der Pelletfraktion, ersichtlich. Die höchste Volumenaktivität des CPRs aus *C. bombicola* konnte jedoch im Lysat (744 mU/ml) nachgewiesen werden. Das exprimierte CPR-Protein aus *C. apicola* konnte in hohen Mengen in der Pelletfraktion, aber auch minimal im Lysat, detektiert werden (Abbildung 3-6, Bild A). Die hohe Volumenaktivität von 1.237 mU/ml beweist die aktive Expression des Membran-assoziiertem Protein, das beim Zellaufschluss in der Pelletfraktion bleibt (Tabelle 3-6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit die CPR aus *C. apicola* identifiziert, in *E. coli* kloniert und aktiv exprimiert werden konnte.

4.2.2 Cytochrom P450-Gene: CYP52E1 und CYP52E2

Die Fähigkeit *n*-Alkane terminal (ω) oder subterminal ($\omega-1$) zu oxidieren ist nicht nur bei bakteriellen, sondern auch bei einigen eukaryotischen P450-Systemen bekannt, zum Beispiel für CYP52E3 aus *C. bombicola* [87, 106]. Das CYP52E3-Gen besitzt eine Sequenz-Übereinstimmung von 91 % zum CYP52E2 und 82 % zum CYP52E1 aus *C. apicola* [49], weshalb im Rahmen dieser Arbeit beide *C. apicola*-Enzyme auf deren *n*-Alkan-abbauende Funktion hin untersucht wurden.

4.2.2.1 Rekombinante Expression von CYP52E-Enzymen in Hefezellen

Zur Expression beider *C. apicola*-CYP52E-Gene in Hefezellen wurden drei Vektoren (pYES2 für die Expression in *S. cerevisiae* und die Vektoren pPICZ C und pPICZ α A für die Expression in *P. pastoris*) ausgewählt. Das CYP52E1-Gen konnte in *P. pastoris* nur mit einer minimalen P450-Konzentration von 0,4 μ M (420 nm-Peak) exprimiert werden (Abbildung 3-9). Im oxidierten, substratfreien Grundzustand weisen P450-Monooxygenasen üblicherweise ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 420 nm auf und erst die Reduktion (durch NADPH oder Natriumdithionit) und die Begasung mit Kohlenstoffmonoxid führen zu dem für P450-Monooxygenasen namensgebenden Peak bei 450 nm. Spektroskopische Analyse der exprimierten CYP52E-Enzyme im reduzierten CO-gebundenem Zustand hat nur ein Peak bei der Wellenlänge von 420 nm und nicht wie erwartet bei 450 nm ergeben. Es ist bekannt, dass viele Membran-gebundene P450-Enzyme nach heterologer Expression, einen P420 nm-Peak aufweisen, jedoch eine enzymatische Aktivität bei der Umsetzung zeigten. Allerdings ist ein 420 nm-Peak des reduzierten CO-gebundenem Häm-Eisens einer P450-Monooxygenase ein Zeichen dafür, dass der Porphyrinring nicht richtig an das Apoprotein gebunden ist. Ursache dafür ist häufig eine falsche Faltung des Proteins. Aus diesem Grunde liegt die Vermutung nahe, dass beide CYP52E-Proteine in inaktiver Form (falsch gefalteter Form) exprimiert wurden.

4.2.2.2 Rekombinante Expression von CYP52E-Enzymen in *E. coli*-Zellen

Ein Vorteil der Proteinexpression in bakteriellen Systemen, wie *E. coli*, besteht in der Verwendung starker induzierbarer Promotoren und der kurzen Reproduktionsdauer von ~20 min der Zellen, wodurch große Mengen des zu exprimierenden Proteins produziert werden können. Veränderungen der Nukleotid- und teils der Aminosäuresequenz bewirken häufig auch eine bessere heterologe Expression. Bei den Membran-assoziierten oder Membran-gebundenen eukaryotischen P450-Monooxygenasen, erhöhen besonders Änderungen im N-terminalen Bereich, wie der Austausch der zweiten Aminosäure oder eine N-terminale Trunkierung, die Ausbeute an Protein [134-136]. Für die Proteinexpression der CYP52E-Gene in *E. coli* wurden drei verschiedene Vektoren verwendet.

Der pCold III-Vektor ist dafür konzipiert heterologe Proteine in *E. coli*, bei niedrigen Temperaturen von ca. 15 °C, aktiv zu exprimieren. Bei 15 °C wird die Expression langsamer und die Bildung von Inclusion bodies wird reduziert. Die Expression vom pCold III wird oft durch Co-Expression von Chaperonen unterstützt. Der zweite genutzte Vektor pCWOri besaß in unserem Fall die zuvor integrierte bovine 17 α -Hydroxylase, die zur Modifikation der Anfangssequenz der CYP52E-Gene partiell im Vektor erhalten wurde. Aus der Literatur sind Fälle bekannt, in denen eukaryotische [125] und humane [137, 138] P450s durch Modifikation der Anfangssequenz erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden konnten. Und der dritte verwendete pTrcHisTOPO-Vektor soll,

laut Herstellerangaben, die Expression von eukaryotischen u. a. auch Membran-assoziierten Proteinen in *E. coli* erleichtern.

Die höchste ermittelte P450-Konzentration wurde mit dem pCWOri-Vektor erzielt (2,6 μM , P420-Peak, Abbildung 3-10). Durch Modifikation der CYP52E-Anfangssequenz mit dem Anfang der 17 α -Hydroxylase-Sequenz führt die Veränderung des exprimierten Proteins vermutlich zu einem verbesserten Löslichkeitsverhalten.

In einem weiteren Versuch wurde das pTrcHisTOPO CYP52E2-Plasmid, in TOP10-Zellen wie in Kapitel 2.6.5.2 beschrieben exprimiert. Die Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus dem Zellpellet erfolgte über mehrere Schritte bis zur Ultrazentrifugation (s. Kap. 2.7.2). Anschließend folgten Messungen des CO-Differenzspektrums aller entstandenen Fraktionen (Abbildung 3-11, Tabelle 3-8). Der resultierende Peak bei 450 nm ist wahrscheinlich auf die Verwendung von „sanfteren“ Zellaufschlussmethoden, im Vergleich zum gängigen Zellaufschlussverfahren (5x 60s Ultraschall, s. Kap. 2.7.1.1), zurück zu führen. So wurde bei der Isolierung der mikrosomalen Fraktion der Zellaufschluss einmal enzymatisch durch Lysozym, gefolgt von einem Frier-Tau-Zyklus und weiterhin mechanisch durch kurze Ultraschallbehandlungen (5x 30 s) durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, das Membran-gebundene P450s druckempfindlicher als löslich vorliegende P450s sind und somit schneller zu einem inaktiven Protein (P420 nm-Peak) degradieren können [139]. Die somit sanftere Behandlung des druckempfindlichen Membran-gebundenen CYP52E2 resultierte in einem P450 nm-Peak mit einer Konzentration von 2,2 μM .

Zusammenfassend, wurde die Expression der *C. apicola*-P450s in *E. coli*-Zellen in verschiedenen Stamm/Plasmid-Kombinationen durchgeführt. Bei der CO-Differenzspektrometrie konnte in den meisten Fällen nur ein Peak bei 420 nm detektiert werden, was entweder auf falsche Faltung bei der Expression oder auf starke Empfindlichkeit dieser P450-Enzyme während der Aufarbeitung zurück zu führen ist. Die letzte Vermutung scheint richtig zu sein, da beim schonendem Zellaufschluss und Proteinisolierung vom pTrcHisTOPO-Vektor in TOP10-Zellen CYP52E2 exprimiert werden konnte und ein Peak bei 450 nm gebildet wurde. Allerdings benötigt dieser Aspekt weitere Untersuchungen.

4.2.3 Aktivitätstests mit CYP52E-Enzym und verschiedener CPRs

Die GC-Analyse der Umsetzungen von Laurinsäure durch die CYP52E-Enzyme mit den zwei exprimierten Reduktasen (CPR) aus *C. apicola* und *C. bombicola*, sowie mit kommerziell erhältlicher humaner CPR, hat keine Hydroxylierungsprodukte identifiziert. Das ist zum einen auf die wahrscheinlich inaktive Form des P450-Enzyms (P420 nm-Peak) oder zum anderen auf das mangelnde Zusammenspiel der Reduktasen mit dem P450-Enzym, zurück zu führen. Allerdings, um diese Vermutungen zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen, wie z. B. Optimierung von Reaktionsbedingungen, Substratlöslichkeit, usw. nötig.

Das Fazit der Versuche aus diesem Teil der Arbeit ist, dass die Expression der Gene CYP52E1 und CYP52E2 in eukaryotischen und prokaryotischen Expressionssystemen schwierig ist. Zwar konnten bei Expression in *E. coli* eine höhere Proteinausbeute erzielt werden als bei der Hefeexpression, jedoch lagen in beiden Systemen die Proteine meist in inaktiven Konformationen vor.

4.3 Immobilisierung der P450 BM-3 Häm-Domäne F87A

4.3.1 Untersuchungen der Immobilisierungsbedingungen

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Immobilisierung von P450 BM-3-Häm-Domäne auf zwei verschiedenen mesoporösen Silikaten, MCM-41 und SBA-15, untersucht. Die Mischmethode beeinflusst die Immobilisierungseffizienz in großem Maße, was möglicherweise auf das effiziente aber schonende Durchmischen des mesoporösen Materials mit Enzymlösung zurückzuführen ist. Während die Mischung in einer Schwingmühle zur kompletten Zerstörung der Struktur des dünnwandigen MCM-41-Materials führte, lieferte die Vermischung in einem Rotationsschüttler die besten Ergebnisse (Abbildung 3-14, Bild A).

Ein weiterer Faktor, die die Immobilisierungseffizienz beeinflusst ist der pH-Wert. Das Immobilisierungsmaterial ist durch das Vorhandensein der freien OH-Gruppen leicht negativ geladen. Die Berechnung der Enzym-Ladung zeigte, dass das Protein bei pH 6, 7 und 8 an der

Oberfläche negativ geladen ist, aber eine kleine positiv geladene Region besitzt. Aus der Literatur ist bekannt, dass geladene Proteine auch relativ gut auf gleichgeladenen Oberflächen binden, sofern sie eine entgegengesetzt geladene Region enthalten [140]. Die beste Bindung des Enzyms wurde bei pH 7-7,5 beobachtet. Diese Ergebnisse konnten durch bioinformatische Methoden bestätigt werden [6].

Die Untersuchung der Bindung des Enzyms BM3H_F87A mit dem Durchmesser von $80 \times 70 \times 60 \text{ \AA}$ auf Materialien mit unterschiedlichen Porengrößen ergab, dass das Material SBA-15 mit dem größten Porendurchmesser von 133 \AA die höchste Enzymmenge binden konnte (63 mg per g) (Abbildung 3-15). Besetzung der Poren und somit eine Verringerung der Porenanzahl des Enzym-beladenen SBA-15-Materials ($d_p = 133 \text{ \AA}$) konnte mit Hilfe einer N_2 -Adsorptions-Desorptions-Isothermen-Messung bestätigt werden (Abbildung 3-13, integriertes Bild B). Um vergleichen zu können, ob die gebundene Enzymmenge wirklich in den Poren lokalisiert ist, wurde ein SBA-15-Material mit gefüllten Poren synthetisiert [141]. In diesem Fall konnte nur die geringe Enzymmenge von 8 mg per g Material auf der Oberfläche des Silikats gebunden werden. Durchgeführte Aktivitätsmessungen des immobilisierten Enzyms auf SBA-15 ($d_p = 133 \text{ \AA}$) mit 12-pNCA zeigten die höchste spezifische Aktivität von 840 nmol Produkt/mg BM3H_F87A/min. Jedoch ist diese spezifische Aktivität immobilisiertem Enzyms immer noch geringer als die

gemessene spezifische Aktivität von freiem Enzym (1.100 nmol Produkt/mg BM3H_F87A/min) (Tabelle 3-10). Eine mögliche Erklärung der verminderten 12-*p*NCA-Umsetzung durch immobilisierte Enzyme, im Vergleich zum freien Enzym, wäre, dass der Substratzugang durch die Immobilisierung versperrt wurde. Untersuchungen mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnten jedoch diesen Verdacht widerlegen und bewiesen, dass die dem Substratzugangskanals gegenüber liegende Seite des Enzyms an der Oberfläche des Immobilisierungsmaterials bindet und somit der Substratzugang ungehindert stattfinden kann [6]. Jedoch wurde in einer unserer früheren Arbeiten beobachtet, dass das Substrat 12-*p*NCA, wie auch dessen Oxidationsprodukt *p*-Nitrophenolat, auf negativ geladenen Immobilisierungsmaterialien (z. B. DEAD-Cellulose) binden kann. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich das hydrophobe *n*-Octan als Substrat verwendet. Bei der Reaktion mit *n*-Octan wurde eine doppelte so hohe Umsetzung des *n*-Octans mit immobilisierten (18-20 %) im Vergleich zum freien Enzym (9 %), beobachtet. Ein möglicher Grund der höheren Umsetzung ist eine errungene Lösungsmittelstabilität des Enzyms durch Immobilisierung (s. Kap. 3.3.4.2).

Weitere Verbesserung der Immobilisierung konnte durch die mehrfache Beladung des Materials mit Enzymlösung sowie durch Erhöhung des Immobilisierungsvolumens erzielt werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Immobilisierung ein dynamischer Prozess ist. Die Erhöhung der Enzymkonzentration bei einmaliger Beladung des Trägers hat im Gegensatz dazu einen negativen Effekt

auf die Immobilisierungseffizienz (Abbildung 3-16). Dieses Phänomen lässt sich durch die leicht viskose Konsistenz der Lösung mit den hohen Enzymkonzentrationen erklären. Möglicherweise entsteht dadurch das Problem der Diffusion in die Poren. Aus der Literatur sind ähnliche Beobachtungen bei der Untersuchung verschiedener Enzymkonzentrationen bekannt. So bei der Adsorption von Lysozym auf dem Material C16-MCM-41, konnte durch Erhöhung der Enzymkonzentration um das 4-fache, nur eine geringfügige verbesserte Immobilisierung um das 1,2-fache erreicht werden [142].

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden P450 BM-3-Mutanten hergestellt die *n*-Octan zu 2-Octanol regio- und teilweise enantioselektiv hydroxylieren. Des Weiteren konnten P450-Monooxygenasen identifiziert werden, welche cyclische Alkane (C8, C10, C12), zu entsprechenden Alkoholen hydroxylieren. Die entwickelten Biokatalysatoren könnten in Zukunft für die Entwicklung von technischen Verfahren benutzt werden. Dabei können sie entweder als isolierte Enzyme oder, nach der Klonierung in bakterielle Wirte (z.B. *E. coli* oder *Pseudomonas*-Stämme) und Optimierung, in Form von Ganzzell-Biokatalysatoren eingesetzt werden. Im Falle isolierter Enzyme können mesoporöse Silikate mit ausreichender Porengröße für die Immobilisierung benutzt werden, um immobilisierte P450-Enzyme in einem Festbett-Reaktor zu realisieren.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Omura, T. and Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **239**, 2370-2378.
- [2] Lewis, D. F. V. (1996) *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism*. London: Taylor and Francis.
- [3] Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O. and et al. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* **12**, 1-51.
- [4] Poulos, T. L., Finzel, B. C. and Howard, A. J. (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* **195**, 687-700.
- [5] Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A. and Deisenhofer, J. (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450 BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* **261**, 731-736.
- [6] Sirim, D. (2010) Vorhersage struktureller und biochemischer Eigenschaften von Cytochrom P450-Monooxygenasen und Laccasen. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [7] Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. and Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 330-344.
- [8] Trower, M. K., Emptage, M. H. and Sariaslani, F. S. (1990) Purification and characterization of a 7Fe ferredoxin from *Streptomyces griseus*. *Biochim Biophys Acta* **1037**, 281-289.

- [9] Schenkman, J. B. and Jansson, I. (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* **97**, 139-152.
- [10] Van Bogaert, I. N., Develter, D., Soetaert, W. and Vandamme, E. J. (2007) Cloning and characterization of the NADPH cytochrome P450 reductase gene (CPR) from *Candida bombicola*. *FEMS Yeast Res* **7**, 922-928.
- [11] Murataliev, M. B., Feyereisen, R. and Walker, F. A. (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta* **1698**, 1-26.
- [12] Girvan, H. M., Waltham, T. N., Neeli, R., Collins, H. F., McLean, K. J., Scrutton, N. S., Leys, D. and Munro, A. W. (2006) Flavocytochrome P450 BM3 and the origin of CYP102 fusion species. *Biochem Soc Trans* **34**, 1173-1177.
- [13] Warman, A. J., Roitel, O., Neeli, R., Girvan, H. M., Seward, H. E., Murray, S. A., McLean, K. J., Joyce, M. G., Toogood, H., Holt, R. A., Leys, D., Scrutton, N. S. and Munro, A. W. (2005) Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. *Biochem Soc Trans* **33**, 747-753.
- [14] Kitazume, T., Takaya, N., Nakayama, N. and Shoun, H. (2000) *Fusarium oxysporum* fatty-acid subterminal hydroxylase (CYP505) is a membrane-bound eukaryotic counterpart of *Bacillus megaterium* cytochrome P450 BM3. *J Biol Chem* **275**, 39734-39740.
- [15] Roberts, G. A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S. L. and Turner, N. J. (2002) Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J Bacteriol* **184**, 3898-3908.
- [16] He, X. and de Montellano, P. R. (2004) Radical rebound mechanism in cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks alpha- and beta-thujone. *J Biol Chem* **279**, 39479-39484.

- [17] Dietrich, M. (2008) Untersuchungen zur selektiven enzymatischen Hydroxylierung von Fettsäuren. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [18] Budde, M. (2007) Biokatalyse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen: Zur selektiven Oxidation von Terpenen und Fettsäuren. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [19] Seifert, A. (2009) Cytochrom P450-Monooxygenasen: Modellierung, Datenbankanalyse und experimentelle Charakterisierung neuer Enzymvarianten. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [20] Koga, H., Yamaguchi, E., Matsunaga, K., Aramaki, H. and Horiuchi, T. (1989) Cloning and nucleotide sequences of NADH-putidaredoxin reductase gene (*camA*) and putidaredoxin gene (*camB*) involved in cytochrome P-450cam hydroxylase of *Pseudomonas putida*. *J Biochem* **106**, 831-836
- [21] Celik, A., Sperandio, D., Speight, R. E. and Turner, N. J. (2005) Enantioselective epoxidation of linolenic acid catalysed by cytochrome P450(BM3) from *Bacillus megaterium*. *Org Biomol Chem* **3**, 2688-2690
- [22] Shou, M., Gonzalez, F. J. and Gelboin, H. V. (1996) Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase. *Biochemistry* **35**, 15807-15813.
- [23] Cryle, M. J., Stok, J. E., De Voss, J. J. (2003) Reactions catalyzed by bacterial cytochromes P450. *Australian Journal of Chemistry* **56**, 749-762.
- [24] Narhi, L. O. and Fulco, A. J. (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450

monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **261**, 7160-7169.

- [25] Budde, M., Maurer, S. C., Schmid, R. D. and Urlacher, V. B. (2004) Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**, 180-186.
- [26] Gustafsson, M. C., Roitel, O., Marshall, K. R., Noble, M. A., Chapman, S. K., Pessegueiro, A., Fulco, A. J., Cheesman, M. R., von Wachenfeldt, C. and Munro, A. W. (2004) Expression, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* cytochromes P450 CYP102A2 and CYP102A3: flavocytochrome homologues of P450 BM3 from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **43**, 5474-5487.
- [27] Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A. and et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249-256.
- [28] Lentz, O., Urlacher, V. and Schmid, R. D. (2004) Substrate specificity of native and mutated cytochrome P450 (CYP102A3) from *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* **108**, 41-49.
- [29] Daff, S., Ingledew, W. J., Reid, G. A. and Chapman, S. K. (1996) New insights into the catalytic cycle of flavocytochrome b2. *Biochemistry* **35**, 6345-6350.
- [30] Taylor, P., Pealing, S. L., Reid, G. A., Chapman, S. K. and Walkinshaw, M. D. (1999) Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase. *Nat Struct Biol* **6**, 1108-1112.

- [31] Miura, Y. and Fulco, A. J. (1974) (Ω -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from bacillus megaterium. *J Biol Chem* **249**, 1880-1888.
- [32] Li, H. Y., Darwish, K. and Poulos, T. L. (1991) Characterization of recombinant *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 and its two functional domains. *J Biol Chem* **266**, 11909-11914.
- [33] Wen, L. P. and Fulco, A. J. (1987) Cloning of the gene encoding a catalytically self-sufficient cytochrome P-450 fatty acid monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* and its functional expression and regulation in heterologous (*Escherichia coli*) and homologous (*Bacillus megaterium*) hosts. *J Biol Chem* **262**, 6676-6682.
- [34] Li, H. and Poulos, T. L. (1997) The structure of the cytochrome p450 BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol* **4**, 140-146.
- [35] Ost, T. W., Miles, C. S., Murdoch, J., Cheung, Y., Reid, G. A., Chapman, S. K. and Munro, A. W. (2000) Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3. *FEBS Lett* **486**, 173-177.
- [36] Li, H. and Poulos, T. L. (1999) Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450 (BM-3). *Biochim Biophys Acta* **1441**, 141-149.
- [37] Urlacher, V. and Schmid, R. D. (2002) Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 557-564.
- [38] Urlacher, V. B., Makhsumkhanov, A. and Schmid, R. D. (2006) Biotransformation of beta-ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 53-59.
- [39] Li, Q. S., Ogawa, J. and Shimizu, S. (2001) Critical role of the residue size at position 87 in H₂O₂- dependent substrate

- hydroxylation activity and H₂O₂ inactivation of cytochrome P450BM-3. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1258-1261.
- [40] Dietrich, M., Do, T. A., Schmid, R. D., Pleiss, J. and Urlacher, V. B. (2009) Altering the regioselectivity of the subterminal fatty acid hydroxylase P450 BM-3 towards gamma- and delta-positions. *J Biotechnol* **139**, 115-117.
- [41] Kubo, T., Peters, M. W., Meinhold, P. and Arnold, F. H. (2006) Enantioselective epoxidation of terminal alkenes to (R)- and (S)-epoxides by engineered cytochromes P450 BM-3. *Chemistry* **12**, 1216-1220.
- [42] Meinhold, P., Peters, M. W., Hartwick, A., Hernandez, A. R., Arnold, F. H. (2006) Engineering cytochrome P450 BM3 for terminal alkane hydroxylation. *Adv. Synth. Catal.* **348**, 763-772.
- [43] Boddupalli, S. S., Estabrook, R. W. and Peterson, J. A. (1990) Fatty acid monooxygenation by cytochrome P-450 BM-3. *J Biol Chem* **265**, 4233-4239.
- [44] Li, Q. S., Schwaneberg, U., Fischer, P. and Schmid, R. D. (2000) Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry* **6**, 1531-1536.
- [45] Racker, E. (1974) History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem* **5**, 17-23.
- [46] Zagulski, M., Herbert, C. J. and Rytka, J. (1998) Sequencing and functional analysis of the yeast genome. *Acta Biochim Pol* **45**, 627-643.
- [47] Ohkuma, M., Muraoka, S., Tanimoto, T., Fujii, M., Ohta, A. and Takagi, M. (1995) CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida maltosa*: identification and characterization of eight members. *DNA Cell Biol* **14**, 163-173.

- [48] Seghezzi, W., Meili, C., Ruffiner, R., Kuenzi, R., Sanglard, D. and Fiechter, A. (1992) Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family CYP52 of *Candida tropicalis*. *DNA Cell Biol* **11**, 767-780.
- [49] Lottermoser, K., Schunck, W. H. and Asperger, O. (1996) Cytochromes P450 of the sophorose lipid-producing yeast *Candida apicola*: heterogeneity and polymerase chain reaction-mediated cloning of two genes. *Yeast* **12**, 565-575.
- [50] Edwards, R. J., Murray, B. P., Singleton, A. M. and Boobis, A. R. (1991) Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* **30**, 71-76.
- [51] Munro, A. W., Girvan, H. M. and McLean, K. J. (2007) Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 345-359.
- [52] Gutierrez, A., Grunau, A., Paine, M., Munro, A. W., Wolf, C. R., Roberts, G. C. and Scrutton, N. S. (2003) Electron transfer in human cytochrome P450 reductase. *Biochem Soc Trans* **31**, 497-501.
- [53] Eiben, S., Kaysser, L., Maurer, S., Kuhnel, K., Urlacher, V. B. and Schmid, R. D. (2006) Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases - a critical appraisal. *J Biotechnol* **124**, 662-669.
- [54] van Den Heuvel, R. H., Fraaije, M. W., Ferrer, M., Mattevi, A. and van Berkel, W. J. (2000) Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9455-9460.
- [55] Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R. D. and Pleiss, J. (2002) Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Eng* **15**, 595-601.

- [56] Barton, D. H., Csuha, E., Doller, D., Ozbalik, N. and Balavoine, G. (1990) Mechanism of the selective functionalization of saturated hydrocarbons by Gif systems: relationship with methane monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3401-3404.
- [57] Noe, C. R., Knollmüller, M., Dangler, K., Miculka, C., Gärtner, P. (1991) Ein Verfahren zur Synthese enantiomerenreiner Alkanole durch reduktive Entschwefelung von Thiophenalkoholen. *Monatsheft für Chemie*, 705-718.
- [58] Cardini, G. and Jurtshuk, P. (1968) Cytochrome P-450 involvement in the oxidation of n-octane by cell-free extracts of *Corynebacterium* sp. strain 7E1C. *J Biol Chem* **243**, 6070-6072.
- [59] Funhoff, E. G., Bauer, U., Garcia-Rubio, I., Witholt, B. and van Beilen, J. B. (2006) CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J Bacteriol* **188**, 5220-5227
- [60] Koch, D. J., Chen, M. M., van Beilen, J. B. and Arnold, F. H. (2009) In vivo evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6. *Appl Environ Microbiol* **75**, 337-344.
- [61] Fujii, T., Narikawa, T., Sumisa, F., Arisawa, A., Takeda, K. and Kato, J. (2006) Production of alpha, omega-alkanediols using *Escherichia coli* expressing a cytochrome P450 from *Acinetobacter* sp. OC4. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 1379-1385.
- [62] Kubota, M., Nodate, M., Yasumoto-Hirose, M., Uchiyama, T., Kagami, O., Shizuri, Y. and Misawa, N. (2005) Isolation and functional analysis of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 2421-2430.

- [63] Nodate, M., Kubota, M. and Misawa, N. (2006) Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 455-462.
- [64] Gunsalus, I. C. and Sligar, S. G. (1976) Redox regulation of cytochrome P450cam mixed function oxidation by putidaredoxin and camphor ligation. *Biochimie* **58**, 143-147.
- [65] Koga, H., Rauchfuss, B. and Gunsalus, I. C. (1985) P450cam gene cloning and expression in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **130**, 412-417.
- [66] Stevenson, J.-A., Westlake, A. C. G., Whittock, C., Wong, L.-L. (1996) The catalytic oxidation of linear and branched alkanes by cytochrome P450cam. *Journal of American Chemical Society* **118**, 12846-12847.
- [67] Bell, S. G., Stevenson, J. A., Boyd, H. D., Campbell, S., Riddle, A. D., Orton, E. L. and Wong, L. L. (2002) Butane and propane oxidation by engineered cytochrome P450cam. *Chem Commun (Camb)*, 490-491.
- [68] Xu, F., Bell, S. G., Lednik, J., Insley, A., Rao, Z. and Wong, L. L. (2005) The heme monooxygenase cytochrome P450cam can be engineered to oxidize ethane to ethanol. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 4029-4032.
- [69] Appel, D., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schwaneberg, U. and Schmid, R. D. (2001) A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *J Biotechnol* **88**, 167-171.
- [70] Farinas, E. T., Schwaneberg, U., Glieder, A., Arnold, F. H. (2001) Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. *Adv. Synth. Catal.* **343**, 601-606.

- [71] Boddupalli, S. S., Pramanik, B. C., Slaughter, C. A., Estabrook, R. W. and Peterson, J. A. (1992) Fatty acid monooxygenation by P450 BM-3: product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions. *Arch Biochem Biophys* **292**, 20-28.
- [72] Glieder, A., Farinas, E. T. and Arnold, F. H. (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol* **20**, 1135-1139.
- [73] Peters, M. W., Meinhold, P., Glieder, A. and Arnold, F. H. (2003) Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *J Am Chem Soc* **125**, 13442-13450.
- [74] Meinhold, P., Peters, M. W., Chen, M. M., Takahashi, K. and Arnold, F. H. (2005) Direct conversion of ethane to ethanol by engineered cytochrome P450 BM3. *Chembiochem* **6**, 1765-1768.
- [75] Fasan, R., Chen, M. M., Crook, N. C. and Arnold, F. H. (2007) Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450 (BM3) exhibiting natively like catalytic properties. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 8414-8418.
- [76] Colby, J., Stirling, D. I. and Dalton, H. (1977) The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. *Biochem J* **165**, 395-402.
- [77] Witholt, B., de Smet, M. J., Kingma, J., van Beilen, J. B., Kok, M., Lageveen, R. G. and Eggink, G. (1990) Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol* **8**, 46-52.

- [78] van Beilen, J. B., Smits, T. H., Whyte, L. G., Schorcht, S., Rothlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K. H. and Witholt, B. (2002) Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ Microbiol* **4**, 676-682.
- [79] Smits, T. H., Balada, S. B., Witholt, B. and van Beilen, J. B. (2002) Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **184**, 1733-1742.
- [80] Maurer, S. (2006) Oxidationsreaktionen mittels der Cytochrom P450-Monooxygenase CYP102A1 in Enzymreaktoren. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [81] Sariaslani, F. S., Harper, D. B. and Higgins, I. J. (1974) Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*. *Biochem J* **140**, 31-45.
- [82] Rho, E. M. and Evans, W. C. (1975) The aerobic metabolism of cyclohexanecarboxylic acid by *Acinetobacter anitratum*. *Biochem J* **148**, 11-15.
- [83] Donoghue, N. A. and Trudgill, P. W. (1975) The metabolism of cyclohexanol by *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur J Biochem* **60**, 1-7.
- [84] Trower, M. K., Buckland, R. M., Higgins, R. and Griffin, M. (1985) Isolation and Characterization of a Cyclohexane-Metabolizing *Xanthobacter* sp. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1282-1289.
- [85] Beam, H. W. and Perry, J. J. (1974) Microbial degradation and assimilation of n-alkyl-substituted cycloparaffins. *J Bacteriol* **118**, 394-399.

- [86] Schumacher, J. D. and Fakoussa, R. M. (1999) Degradation of alicyclic molecules by *Rhodococcus ruber* CD4. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 85-90.
- [87] van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. M., Witholt, B. (2003) Diversity of alkane Hydroxylase Systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology* **58**, 427-440.
- [88] Klug, M. J. and Markovetz, A. J. (1967) Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. I. Hydrocarbon assimilation. *Appl Microbiol* **15**, 690-693.
- [89] Klug, M. J. and Markovetz, A. J. (1967) Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. II. Oxidation of n-alkanes and l-alkenes by *Candida lipolytica*. *J Bacteriol* **93**, 1847-1852.
- [90] Duppel, W., Lebeault, J. M. and Coon, M. J. (1973) Properties of a yeast cytochrome P-450-containing enzyme system which catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes, and drugs. *Eur J Biochem* **36**, 583-592.
- [91] Sanglard, D. and Loper, J. C. (1989) Characterization of the alkane-inducible cytochrome P450 (P450alk) gene from the yeast *Candida tropicalis*: identification of a new P450 gene family. *Gene* **76**, 121-136.
- [92] Seghezzi, W., Sanglard, D. and Fiechter, A. (1991) Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, CYP52A2, from *Candida tropicalis*. *Gene* **106**, 51-60.
- [93] Sutter, T. R., Sanglard, D. and Loper, J. C. (1990) Isolation and characterization of the alkane-inducible NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene from *Candida tropicalis*. Identification of invariant residues within similar amino acid sequences of divergent flavoproteins. *J Biol Chem* **265**, 16428-16436.

- [94] Kim, D., Cryle, M. J., De Voss, J. J. and Ortiz de Montellano, P. R. (2007) Functional expression and characterization of cytochrome P450 52A21 from *Candida albicans*. *Arch Biochem Biophys* **464**, 213-220.
- [95] Park, H. G., Lim, Y. R., Eun, C. Y., Han, S., Han, J. S., Cho, K. S., Chun, Y. J. and Kim, D. (2010) *Candida albicans* NADPH-P450 reductase: expression, purification, and characterization of recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 534-538.
- [96] Ohkuma, M., Masuda, Y., Park, S. M., Ohtomo, R., Ohta, A. and Takagi, M. (1995) Evidence that the expression of the gene for NADPH-cytochrome P-450 reductase is n-alkane-inducible in *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 1328-1330.
- [97] Kargel, E., Menzel, R., Honeck, H., Vogel, F., Bohmer, A. and Schunck, W. H. (1996) *Candida maltosa* NADPH-cytochrome P450 reductase: cloning of a full-length cDNA, heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and function of the N-terminal region for membrane anchoring and proliferation of the endoplasmic reticulum. *Yeast* **12**, 333-348.
- [98] Iida, T., Ohta, A. and Takagi, M. (1998) Cloning and characterization of an n-alkane-inducible cytochrome P450 gene essential for n-decane assimilation by *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1387-1397.
- [99] Iida, T., Sumita, T., Ohta, A. and Takagi, M. (2000) The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* **16**, 1077-1087.
- [100] Stodola, F. H., Deinema, M. H. and Spencer, J. F. (1967) Extracellular lipids of yeasts. *Bacteriol Rev* **31**, 194-213.

- [101] Heinz, E., Tulloch, A. P. and Spencer, J. F. (1969) Stereospecific hydroxylation of long chain compounds by a species of *Torulopsis*. *J Biol Chem* **244**, 882-888.
- [102] Hardin, R., Pierre, J., Schulze, R., Mueller, C. M., Fu, S. L., Wallner, S. R., Stanek, A., Shah, V., Gross, R. A., Weedon, J., Nowakowski, M., Zenilman, M. E. and Bluth, M. H. (2007) Sophorolipids improve sepsis survival: effects of dosing and derivatives. *J Surg Res* **142**, 314-319.
- [103] Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 47-64.
- [104] Fu, S. L., Wallner, S. R., Bowne, W. B., Hagler, M. D., Zenilman, M. E., Gross, R. and Bluth, M. H. (2008) Sophorolipids and their derivatives are lethal against human pancreatic cancer cells. *J Surg Res* **148**, 77-82.
- [105] Shah, V., Doncel, G. F., Seyoum, T., Eaton, K. M., Zalenskaya, I., Hagver, R., Azim, A. and Gross, R. (2005) Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4093-4100.
- [106] Van Bogaert, I. N., Demey, M., Develter, D., Soetaert, W. and Vandamme, E. J. (2009) Importance of the cytochrome P450 monooxygenase CYP52 family for the sophorolipid-producing yeast *Candida bombicola*. *FEMS Yeast Res* **9**, 87-94.
- [107] Marchal, R. L., Jeannine; Sulzer, Caroline (1997) Method of production of sophorosides by fermentation with fed batch supply of fatty acid esters or oils. United States Patent 5.616.479.
- [108] Lee, C. H., Lang, J., Yen, C. W., Shih, P. C., Lin, T. S. and Mou, C. Y. (2005) Enhancing stability and oxidation activity of cytochrome C by immobilization in the nanochannels of

- mesoporous aluminosilicates. *J Phys Chem B* **109**, 12277-12286.
- [109] Katiyar, A., Ji, L., Smirniotis, P. G., Pinto, N. G. (2005) Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on siliceous MCM-41. *Microporous and Mesoporous Materials* **80**, 311-320.
- [110] Salis, A., Meloni, D., Ligas, S., Casula, M. F., Monduzzi, M., Solinas, V. and Dumitriu, E. (2005) Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. *Langmuir* **21**, 5511-5516.
- [111] Pires, E., Miranda, EA., Valenca, GP. (2002) Gas-phase enzymatic esterification on immobilized lipases in MCM-41 molecular sieves. *Appl Biochem Biotechnol*, 963-976.
- [112] Song, S. W., Hidajat, K. and Kawi, S. (2005) Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* **21**, 9568-9575.
- [113] Mishra, R. N., Singla-Pareek, S. L., Nair, S., Sopory, S. K., Reddy, M. K. (2002) Directional Genome Walking Using PCR. *BioTechniques* **33**, 830-834.
- [114] Weber, E., Sirim, D., Schreiber, T., Thomas, B., Pleiss, J., Hunger, P., Gläser, R., Urlacher, V. B. (2010) Immobilization of P450 BM-3 monooxygenase on mesoporous molecular sieves with different pore diameters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **64**, 29-37.
- [115] Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J. and Schmid, R. D. (1999) A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Anal Biochem* **269**, 359-366.

- [116] Van Gelder, B. and Slater, E. C. (1962) The extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* **58**, 593-595.
- [117] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- [118] Seifert, A., Vomund, S., Grohmann, K., Kriening, S., Urlacher, V. B., Laschat, S. and Pleiss, J. (2009) Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *Chembiochem* **10**, 853-861.
- [119] Selvam, P., Mohapatra, S. K. (2005) Synthesis and characterization of divalent cobalt-substituted mesoporous aluminophosphate molecular sieves and their application as novel heterogeneous catalysts for the oxidation of cycloalkanes. *Journal of Catalysis* **233**, 276-287.
- [120] Lin, S.-S., Weng, H.-S. (1993) Liquid-phase oxidation of cyclohexane using CoAPO-5 as the catalyst *Applied Catalysis A: General* **105**, 289-308.
- [121] Vanoppen, D. L., De Vos, D. E., Genet, M. J., Rouxhet, P. G., Jacobs, P. A. (1995) Cobalt-Containing Molecular Sieves as Catalysts for the Low Conversion Autoxidation of Pure Cyclohexane. *Angewandte Chemie International Edition in Englisch* **34**, 560-563.
- [122] Murahashi, S.-I., Naota, T., Komiya, N. (1995) Metalloporphyrin-Catalyzed Oxidation of Alkanes with Molecular Oxygen in the Presence of Acetaldehyde *Tetrahedron Letters* **36**, 8059-8062.
- [123] Maurer, S. C., Kühnel, K., Kaysser, L. A., Eiben, S., Schmid, R. D., Urlacher, V. B. (2005) Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1090–1098.

- [124] Seifert, A., Vomund, S., Grohmann, K., Kriening, S., Urlacher, V. B., Laschat, S. and Pleiss, J. (2009) Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *Chembiochem* **10**, 853-861
- [125] Barnes, H. J., Arlotto, M. P. and Waterman, M. R. (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5597-5601.
- [126] Vollhardt, K. P. C., Schore, N.E. (2000) *Organische Chemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 3. Auflage.
- [127] Ludwig, B., Akundi, A. and Kendall, K. (1995) A Long-Chain Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3729-3733.
- [128] Clark, D. D., Boyd, J. M. and Ensign, S. A. (2004) The stereoselectivity and catalytic properties of *Xanthobacter autotrophicus* 2-[(R)-2-Hydroxypropylthio]ethanesulfonate dehydrogenase are controlled by interactions between C-terminal arginine residues and the sulfonate of coenzyme M. *Biochemistry* **43**, 6763-6771.
- [129] Schuchardt, U., Cardoso, D., Sercheli, R., Pereira, R., da Cruz, R. S., Guerreiro, M. C., Mandelli, D., Spinacé, E. V., Pires, E. L. (2001) Cyclohexane oxidation continues to be a challenge. *Applied Catalysis A: General* **211**, 1-17.
- [130] Hao, J., Cheng, H., Wang, H., Cai, S., Zhao, F. (2007) Oxidation of cyclohexane - A significant impact of stainless steel reactor wall. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **271**, 42-45.
- [131] Hartig, J., Stoessel, A., Herrmann, G., Marosi, L. (1985) Preparation of Cyclohexanol and Cyclohexanone. United States Patent 4.543.427.

- [132] Arpe, H.-J. (2007) Industrielle Organische Chemie: Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [133] Weber, E., Seifert, A., Antonovici, M., Geinitz, C., Pleiss, J., Urlacher, V. B. (2011) Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. *Chemical Communications* **47**, 944-946. <http://dx.doi.org/910.1039/C1030CC02924F>
- [134] Chen, G. F. and Inouye, M. (1990) Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res* **18**, 1465-1473.
- [135] Looman, A. C., Bodlaender, J., Comstock, L. J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H. A. and van Knippenberg, P. H. (1987) Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*. *Embo J* **6**, 2489-2492.
- [136] Gillam, E. M., Guo, Z. and Guengerich, F. P. (1994) Expression of modified human cytochrome P450 2E1 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* **312**, 59-66.
- [137] Gillam, E. M., Baba, T., Kim, B. R., Ohmori, S. and Guengerich, F. P. (1993) Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* **305**, 123-131.
- [138] Sandhu, P., Guo, Z., Baba, T., Martin, M. V., Tukey, R. H. and Guengerich, F. P. (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*: stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic activities of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* **309**, 168-177.

- [139] Davydov, D. R., Knyushko, T. V. and Hoa, G. H. (1992) High pressure induced inactivation of ferrous cytochrome P-450 LM2 (IIB4) CO complex: evidence for the presence of two conformers in the oligomer. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 216-221.
- [140] Noh, H., Yohe, S. T. and Vogler, E. A. (2008) Volumetric interpretation of protein adsorption: ion-exchange adsorbent capacity, protein pI, and interaction energetics. *Biomaterials* **29**, 2033-2048.
- [141] Moelans, D., Cool, P., Baeyens, J., Vansant, E. F. (2005) Using mesoporous silica materials to immobilise biocatalysis-enzymes. *Catalysis Communications* **6**, 307-311.
- [142] Vinu, A., Murugesan, V., Hartmann, M. (2004) Adsorption of lysozym over mesoporous molecular sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and aluminium incorporation. *J Phys Chem B* **108**, 7323-7330.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Weber
Vorname: Evelyne
Geburtsdatum: 07.04.1980
Geburtsort: Emmendingen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

1986 – 1990 Grundschole in Herbolzheim (Breisgau)
1990 – 1996 Realschole St. Landolin in Ettenheim
1996 – 1999 Wirtschaftsgymnasium St. Landolin

Akademische Ausbildung

1999 – 2005 Studium der Biologie an der Goethe-Universität Frankfurt am Main
Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie: „Isomerase CrtH aus dem poly-*cis* Carotinoid Biosyntheseweg“

Seit 2006 Promotionsstudium am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart