

**BIOKATALYSE MIT  
CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN:  
ZUR SELEKTIVEN OXIDATION VON TERPENEN UND  
FETTSÄUREN**

VON DER FAKULTÄT CHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART  
ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
GENEHMIGTE ABHANDLUNG

VORGELEGT VON  
**MICHAEL BUDDE**  
GEBOREN IN BACKNANG

HAUPTBERICHTER: PROF. DR. ROLF D. SCHMID  
MITBERICHTER: PROF. DR. DIETER H. WOLF  
PRÜFUNGSVORSITZENDER: PROF. DR. HELMUT BERTAGNOLLI

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 02. AUGUST 2007

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART

2007

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Stuttgart, den 02.05.2007

\_\_\_\_\_

(Michael Budde)

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am ITB.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Vlada Urlacher für die Betreuung dieser Arbeit und die damit verbundenen zahlreichen und fruchtbaren Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Steffen Maurer danke ich für viele kritische und konstruktive Gespräche die meinen wissenschaftlichen und persönlichen Weg in den letzten Jahren bereichert haben.

Den Projektpartnern des Karl-Winnacker-Instituts der DECHEMA e.V. sowie des Lebensmittelchemischen Instituts der Universität Hannover danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des Pinen-Projekts. Herrn Dr. Michael Morr danke ich für die Bereitstellung vieler der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substrate.

Katja Kühnel, Isabell Rescher, Lei Wang und Michael Lienemann danke ich für ihre engagierte Mitarbeit im Pinen-Projekt.

Den Kollegen der Bioinformatikgruppe Ricardo Branco und Alexander Seifert danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und insbesondere für die Durchführung der MD-Simulationen sowie den damit verbundenen interessanten Diskussionen.

Für die Hilfe bei der Fermentation sowie bei der Proteinaufreinigung danke ich Sven Richter und Jens Niveller.

Ganz herzlich danke ich Monika Rusnak, Daniel Appel, Matthias Dietrich, Steffen Maurer, Jens Niveller, Thomas Reichart und Sven Richter für das freundschaftliche Verhältnis innerhalb und außerhalb des Instituts.

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.

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>VI</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Industrielle Biokatalyse</b>	<b>1</b>
1.1.1 Basischemikalien	1
1.1.2 Feinchemikalien	2
1.1.3 Aroma- und Duftstoffe	4
1.1.4 Polyketid Antibiotika	7
<b>1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen</b>	<b>9</b>
1.2.1 Struktur und Aufbau	10
1.2.2 Katalysemechanismus	11
1.2.3 Katalysierte Reaktionen	14
1.2.4 Die CYP102A-Familie	17
1.2.5 Biochemische Charakterisierung von P450 Monooxygenasen	19
1.2.6 P450 Monooxygenasen für industrielle Prozesse – Probleme und Lösungen	21
<b>1.3 Protein engineering</b>	<b>23</b>
1.3.1 Rationales Design	23
1.3.2 Gerichtete Evolution	23
1.3.3 Hochdurchsatzscreening	25
1.3.4 Datenbasiertes Protein-Design	28
1.3.5 Protein engineering von P450 Monooxygenasen	29
<b>1.4 Zielsetzung</b>	<b>30</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>32</b>
2.1.1 Verbrauchsmittel	32
2.1.2 Chemikalien	32
2.1.3 Kits	33
2.1.4 Stämme	34
2.1.5 Plasmide	34
2.1.6 Enzyme	35
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	35
2.1.8 Geräte	37
2.1.9 Kulturmedien	38
2.1.10 Puffer	39
2.1.11 Stammlösungen	41
<b>2.2 Methoden</b>	<b>42</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	42
2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	42
2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Zellen	44
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese	44
2.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
2.2.1.5 Restriktion der Plasmid-DNA und des Oligonukleotids	45
2.2.1.6 Ligation	45
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	46
2.2.2.1 Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	46
2.2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i>	46
2.2.2.3 Kultivierung und Stammhaltung von <i>E.coli</i>	46
2.2.2.4 Heterologe Proteinexpression in Schüttelkolben	47

2.2.2.5	Fermentation von <i>E.coli</i>	47
2.2.2.6	Heterologe Proteinexpression in Mikrotiterplatten	48
2.2.3	Biochemische Methoden und Enzymcharakterisierung	48
2.2.3.1	Zellaufschluss	48
2.2.3.2	Proteinaufreinigung	49
2.2.3.3	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	50
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.3.5	Bestimmung der P450 Konzentration	51
2.2.3.6	Bindungsspektren und Bestimmung von Dissoziationskonstanten	51
2.2.3.7	Aktivitätsmessung und Bestimmung der Kopplungseffizienz	52
2.2.3.8	Bestimmung kinetischer Konstanten	52
2.2.4	Methoden für das Hochdurchsatzscreening	53
2.2.4.1	Picken von Kolonien	53
2.2.4.2	Pipettieren von Lösungen	54
2.2.4.3	NADPH-Oxidationsscreening in Mikrotiterplatten	54
2.2.4.4	Pinenoxidation und Produktcharakterisierung aus Mikrotiterplatten	54
2.2.4.5	Produktspezifisches Screening mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz	54
2.2.5	Oxidation von Pinen <i>in vitro</i>	55
2.2.5.1	Aktivitätsbestimmung der Formiatdehydrogenase	55
2.2.5.2	Oxidation von Pinen im Zweiphasensystem	55
2.2.6	Analytik	56
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Heterologe Expression von Cytochrom P450 Monooxygenasen der CYP102A-Familie in <i>E. coli</i></b>	<b>58</b>
3.1.1	Überexpression in <i>E.coli</i> BL21 (DE3) im Schüttelkolben	58
3.1.2	30 l Batch-Fermentation von CYP102A1 A74G F87V L188Q	59
3.1.3	Optimierung der Expression in Mikrotiterplatten	60
<b>3.2</b>	<b>Proteinaufreinigung</b>	<b>61</b>
3.2.1	Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie	61
3.2.2	Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatografie	62
<b>3.3</b>	<b>Selektivoxidation hoch verzweigter Fettsäuren</b>	<b>63</b>
3.3.1	Oxidation von Iso- und Anteispentadecansäure	63
3.3.2	Oxidation weiterer hoch verzweigter Substrate	66
3.3.3	Bestimmung von Dissoziationskonstanten	69
3.3.4	Bestimmung kinetischer Konstanten	71
<b>3.4</b>	<b>Selektivoxidation von Terpenen</b>	<b>72</b>
3.4.1	Durchmusterung einer CYP102A-Bibliothek	72
3.4.2	Sättigungsmutagenese	74
3.4.3	Molekulardynamische Simulationen	77
3.4.4	Validierung des Modells	78
3.4.5	Ortsgerichtete Mutagenese	79
3.4.6	Mehrfachsättigungsmutagenese	82
3.4.6.1	Herstellung einer Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek durch Klonierung eines Genfragments	82
3.4.6.2	Herstellung einer Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek durch Verwendung degenerierter Oligonukleotide	84
3.4.6.3	Durchmusterung der Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek	84
3.4.7	Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen mit Verbenol-selektiven Mutanten von CYP102A1	88
3.4.8	Entwicklung eines verbenolspezifischen Mikrotiterplattenassays	89
3.4.9	<i>In vitro</i> Oxidation von Pinen durch CYP102A1	92
3.4.9.1	Wahl des Reaktionssystems	92
3.4.9.2	Produktquantifizierung	93
3.4.9.3	Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87V L188Q	94
3.4.9.4	Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87A L188Q	95
3.4.9.5	Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S	96

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>98</b>
4.1	Expression und Aufreinigung von P450 Monooxygenasen	98
4.2	Selektivoxidation hoch verzweigter Fettsäuren	99
4.2.1	Oxidation von Iso- und Anteiofettsäuren	99
4.2.2	Hydroxylierung von hoch verzweigten Fettsäuren und Fettsäurederivaten	100
4.2.3	Substratbindungsspektren und kinetische Konstanten	102
4.3	Rationales Proteindesign zur selektiven Oxidation von Pinen	103
4.3.1	Sättigungsmutagenese	104
4.3.2	MD-Simulation	105
4.3.3	Ortsgerichtete Mutagenese	107
4.3.4	Mehrfachsättigungsmutagenese	108
4.4	Entwicklung eines Verbenolnachweises in Mikrotiterplatten	110
4.5	<i>In vitro</i> Oxidation von Pinen mit CYP102A1	111
4.6	Ausblick	114
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BM	<i>Bacillus megaterium</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CYP	Cytochrom P450
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinadeninmononukleotid
GC	Gaschromatografie
GC/MS	Gaschromatografie gekoppelt mit Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl
kDa	Kilo Dalton
K <sub>M</sub>	Michaelis Konstante
KPi	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria Bertani
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
(m/v)	Masse / Volumen
MTBE	Methyl-tertiär-butylether
NADH	β-Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	β-Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
OD <sub>XY</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge XY
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

---

sp.	Spezies
t	Tonne
TB	Terific Broth
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Stoffmengenumsatz in $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
ÜN	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbarer Bereich des Lichts
(v/v)	Volumen / Volumen
WT	Wildtyp



## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die selektive Oxyfunktionalisierung von  $\alpha$ -Pinen sowie von hoch verzweigten Fettsäuren und Fettsäurederivaten zur Herstellung wertvoller Produkte und Synthesebausteine für die Riechstoff- und Pharmaindustrie. Die dabei verwendeten Biokatalysatoren CYP102A1 (P450 BM-3) aus *Bacillus megaterium* bzw. CYP102A2 und CYP102A3 aus *Bacillus subtilis* gehören zur Klasse der Cytochrom P450 Monooxygenasen. Diese sind in der Lage, molekularen Sauerstoff unter Aufnahme zweier Elektronen zu aktivieren und ein Sauerstoffatom auf das Substratmolekül zu übertragen, wobei das andere Sauerstoffatom in Form von Wasser freigesetzt wird. Die hier untersuchten Enzyme der CYP102A-Familie nehmen aufgrund ihrer Domänenarchitektur eine Sonderstellung unter den Monooxygenasen ein. Es handelt sich bei ihnen um Fusionsproteine, die eine FAD/FMN-enhaltende Reduktasedomäne und eine Monooxygenasedomäne in einer Polypeptidkette enthalten, was einen effizienten Elektronentransfer gewährleistet und somit für die höchsten mit P450 Monooxygenasen gemessenen Umsatzraten sorgt ( $>1500 \text{ min}^{-1}$  gegen unverzweigte Fettsäuren). Darüber hinaus sind sie nicht membrangebunden und somit wasserlöslich sowie stabil, was sie zu interessanten Kandidaten für die Etablierung biotechnologischer Prozesse macht.

Hoch verzweigte Fettsäuren und Fettsäurederivate konnten mit Hilfe von CYP102A1 und der Dreifachmutante CYP102A1 A74G F87V L188Q regioselektiv hydroxyliert und somit zu Synthesebausteinen für die Produktion von Makrolidantibiotika umgesetzt werden, die dabei erzielten Umsatzraten erreichen die für unverzweigte Fettsäuren gemessenen Größenordnungen. Durch Aufnahme von Substratbindungsspektren konnte geklärt werden, dass – entgegen der Erwartung – hoch verzweigte Substrate das aktive Zentrum von CYP102A2 und A3 nicht erreichen.

Die oben beschriebene Dreifachmutante war in der Lage, (-)- $\alpha$ -Pinen mit hoher Regioselektivität in Pinenepoxid umzuwandeln (72%, CYP102A1 A74G F87V L188Q), darüber hinaus ist es durch Anwendung von rationalem und datenbasiertem Proteindesign gelungen Mutanten herzustellen, die (-)- $\alpha$ -Pinen ebenfalls mit hoher Selektivität zu Verbenol umsetzen. Bei der Entwicklung der Mutanten kamen Methoden wie Einfachsättigungsmutagenese oder ortsgerichtete Mutagenese zum Einsatz, wobei auch im Rahmen einer Kooperation durchgeführte molekulardynamische Simulationen zur Verbesserung der Regioselektivität von CYP102A1-Mutanten bei der Oxidation von (-)- $\alpha$ -Pinen beigetragen haben. Um die durch Mehrfachsättigungsmutagenese erzeugten Mutanten

im Hochdurchsatzverfahren durchmustern zu können, wurden die dafür notwendigen Arbeitsschritte optimiert und weitgehend automatisiert. Zudem konnte ein produktspezifischer, hochdurchsatzfähiger Test entwickelt werden, der auf einer Farbreaktion zwischen Verbenol und schwefelsaurer Vanillinlösung beruht und die quantitative Bestimmung von Verbenolkonzentrationen  $>1$  mM in Mikrotiterplatten erlaubt. Nach Durchmusterung einer 5000 Klone umfassenden Mutantenbibliothek konnte schließlich die hochselektive CYP102A1 Y51V A74G F87V A111T L188S Fünffachmutante isoliert werden, die (-)- $\alpha$ -Pinen mit einer Umsatzrate von  $218 \text{ min}^{-1}$  zu 88% Verbenol hydroxyliert, was eine weitere Verbesserung der Aktivität der zuvor identifizierten CYP102A1 A74G F87A L188Q ( $83 \text{ min}^{-1}$ ) Dreifachmutante bedeutete.

Eine weitere Charakterisierung der (-)- $\alpha$ -Pinen oxidierenden Mutanten erfolgte in 10 ml Ansätzen unter Verwendung eines auf Formiatdehydrogenase basierendem Kofaktorregenerierungssystems, was den quantitativen Einsatz des teuren Kofaktors NADPH überflüssig machte. Außerdem sorgte die Verwendung einer organischen Phase für eine *in situ* Produktabtrennung, was die Stabilität der gebildeten Produkte unter Prozessbedingungen erhöhte. Die hier im 10 ml Maßstab erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten (bis zu  $450 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) übertreffen die bisher bekannten Verfahren zur mikrobiellen bzw. enzymkatalysierten Oxidation von  $\alpha$ -Pinen um Größenordnungen.

## Summary

P450 monooxygenases are highly versatile biocatalysts which are able to carry out a vast variety of oxidation reactions including epoxidation and hydroxylation of aliphatic and aromatic hydrocarbons. Their ability to introduce oxygen into non-activated C-H-bonds is one of the potentially most useful catalytic reactions. Nevertheless, P450-catalysed reactions play only a minor role in today's industrial biocatalysis. One of the main drawbacks is their cofactor dependency: The need for stoichiometric amounts of the expensive cofactors NADH or NADPH renders any industrial process uneconomical. The only known industrial processes involving P450 monooxygenases use whole cell systems, where the cofactor is provided by the cell. Further drawbacks are that those monooxygenases showing interesting selectivities are often membrane bound. Monooxygenases often show poor activity and stability and require external redox partners for electron supply. Most educts of P450 monooxygenases are highly hydrophobic and therefore insoluble in aqueous phase. Progress has been made in the last years to overcome those difficulties, including the development of enzymatic and electrochemical cofactor-regeneration methods, the improvement of enzyme activity and stability by directed evolution and rational design or the use of cosolvents to enhance educt solubility. Some of the main drawbacks of P450-catalysis can be overcome by using monooxygenases of the CYP102A family. CYP102A1 from *Bacillus megaterium*, also known as P450 BM-3 and the highly homologous proteins CYP102A2 and A3 from *Bacillus subtilis* are water soluble fusion proteins, consisting of a FAD/FMN containing reductase domain and a monooxygenase domain on one polypeptide chain rendering the coexpression of separate reductases unnecessary. Additionally, the activities of these enzymes towards fatty acids are the highest measured for P450 monooxygenases making them interesting candidates for the development of biocatalytic processes.

Still, the complexity of the monooxygenase system causes high costs in a biotechnological process. Therefore the use of P450-driven reactions is only worth being considered if cheap starting materials can be converted to valuable products with high activity and selectivity. Such reactions were the issue particularly addressed in this thesis.

### Selective oxidation of highly branched fatty acids and their derivatives

Highly branched fatty acids and derivatives isolated from the preen gland waxes of ducks and geese are interesting natural substances, as they contain several chiral centres with defined stereochemistry making them interesting candidates for use as building blocks in chemical

synthesis. One possible application is the production of macrolide antibiotics like borrelidin, which are difficult to access via classical synthetic routes. An essential step in a biocatalytic synthetic approach is the highly selective hydroxylation of the branched building blocks to allow the formation of the macrocyclic lactone (Figure 1).

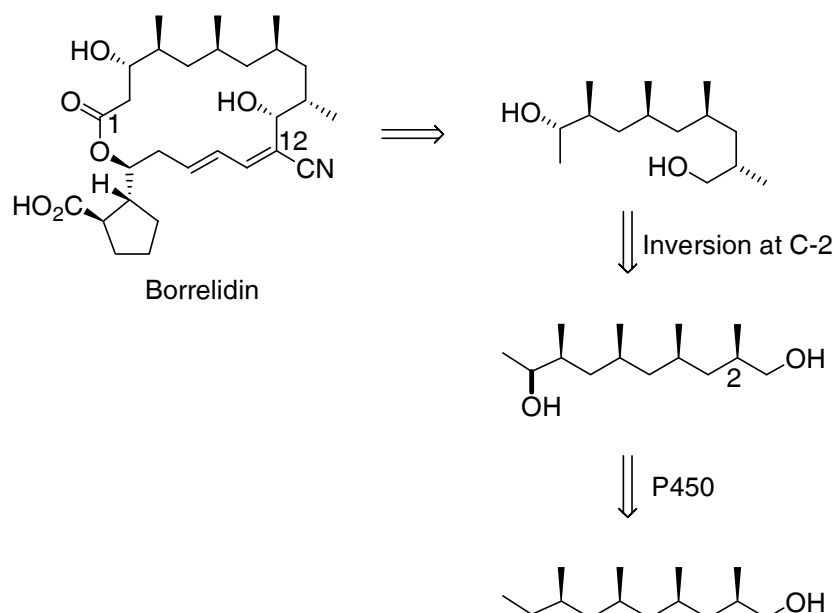


Figure 1: Retrosynthetic analysis of borrelidin starting from 2,4,6,8-tetramethylnonanol.

Wildtypes of CYP102A1, A2 and A3 as well as the CYP102A1 A74G F87V L188Q triple mutant have been screened for activity towards 16 different branched fatty acids and fatty acid derivatives. It turned out, that the A1 wildtype was able to hydroxylate most substrates with high regioselectivity but poor activity. The wildtypes of CYP102A2 and A3 were not suitable for hydroxylation of the branched substrates. In contrast, the triple mutant showed outstanding activity towards most of the investigated substrates with initial turnover frequencies up to  $1200 \text{ min}^{-1}$ . The hydroxylation took place with complete regioselectivity for the majority of substrates, increasing the chance for the development of an efficient biocatalytic process.

### Selective oxidation of (-)- $\alpha$ -pinene

Another substrate of interest was  $\alpha$ -pinene, a waste product from pulp processing, whose oxidised products are valuable compounds for the flavour-, fragrance- and pharma industry. The primary products of P450-catalysed oxidation of  $\alpha$ -pinene are verbenol, which could be used e.g. as an environmentally friendly insecticide and pinene oxide, which provides access to various compounds with characteristic sensory attributes (Figure 2).

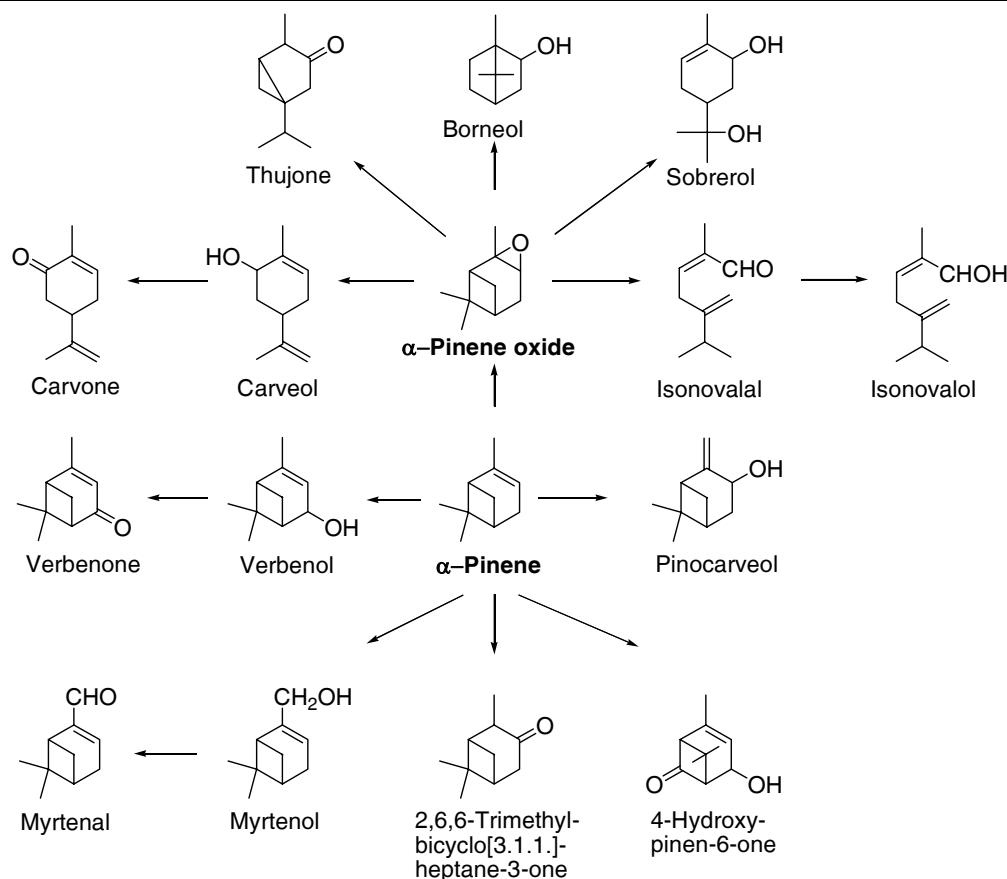


Figure 2: Oxidation products of  $\alpha$ -Pinene.

Several approaches of protein design have been used to develop mutants of CYP102A1 that are able to oxidise  $\alpha$ -pinene selectively, including site directed mutagenesis and site saturation mutagenesis. In summary, one mutant – CYP102A1 A74G F87V L188Q – could be identified which is able to convert  $\alpha$ -pinene to pinene oxide with high regioselectivity (72%) and activity ( $249 \text{ min}^{-1}$ ). In contrast, another mutant CYP102A1 A74G F87A L188Q showed a high preference for the production of verbenol (89%) with an activity of  $83 \text{ min}^{-1}$ . Screening of a mutant library with 5000 clones created by multi site saturation mutagenesis resulted in the identification of a CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S mutant which showed high selectivity for the production of verbenol (89%) and an increased initial activity of  $218 \text{ min}^{-1}$ . The regioselectivities revealed by the engineered P450 monooxygenases are the highest reported for the biocatalytic oxidation of  $\alpha$ -pinene so far.

#### Development of a high-throughput screening system for the detection of verbenol

The basis for efficient screening of mutant libraries is the availability of a high-throughput test system allowing the fast and easy detection of exactly the desired activity. The commonly

used photometric NADPH-oxidation assay for the detection of P450 activity in microtiterplates is just an indirect screening method, since the assay detects the activity of the reductase domain but not the product formed by the monooxygenase domain. Therefore a microtiterplate compatible assay for the detection of verbenol on basis of a colour reaction with vanillin/sulphuric acid was developed. As shown in Figure 3 a quantitative detection of verbenol with a detection limit  $>1$  mM is possible.

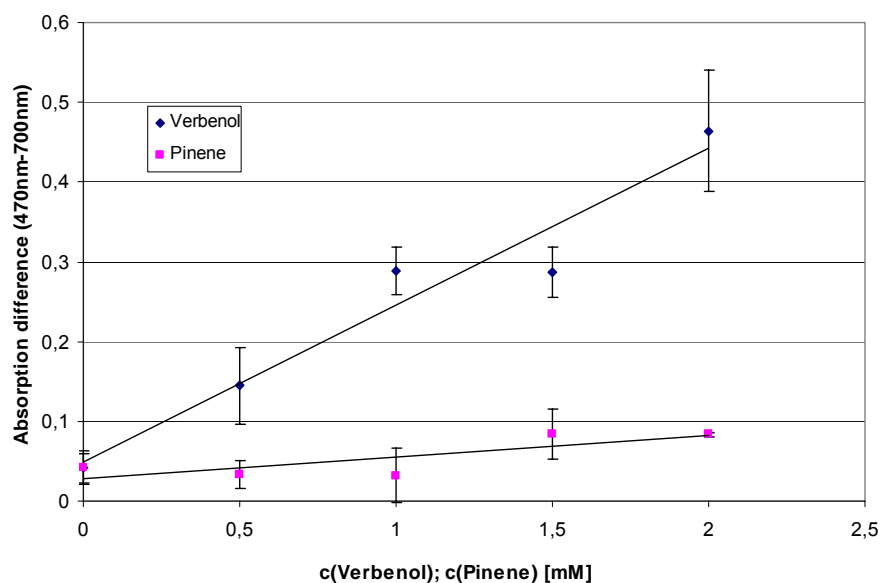


Figure 3: Dependence of colour development on substrate concentration (pinene and verbenol) after the reaction with vanillin / sulphuric acid.

### In vitro oxidation of $\alpha$ -pinene under cofactorregeneration

The most selective and active mutants of CYP102A1 for the oxidation of  $\alpha$ -pinene were characterised and used in a 10 ml scale process under cofactor regeneration with a formate dehydrogenase (FDH) from *Pseudomonas* sp. 101. The FDH oxidises formate with concomitant reduction of  $\text{NADP}^+$  to NADPH, superseding the supply of stoichiometric amounts of expensive NADPH. To prevent the degradation of the  $\alpha$ -pinene oxidation products, a biphasic system with  $\alpha$ -pinene as second organic phase was used, protecting the product from degradation and allowing the *in situ* product extraction. As an additional relevant reaction parameter, the influence of oxygen concentration was investigated. Oxygen is a cosubstrate of P450-catalysed reactions, but its solubility in aqueous media is poor (0,3 mM), so all reactions were carried out in air and in a 100% oxygen atmosphere to reveal differences in activity. Three mutants were characterised using the described reaction setup:

CYP102A1 A74G F87V L188Q, CYP102A1 A74G F87A L188Q and CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S.

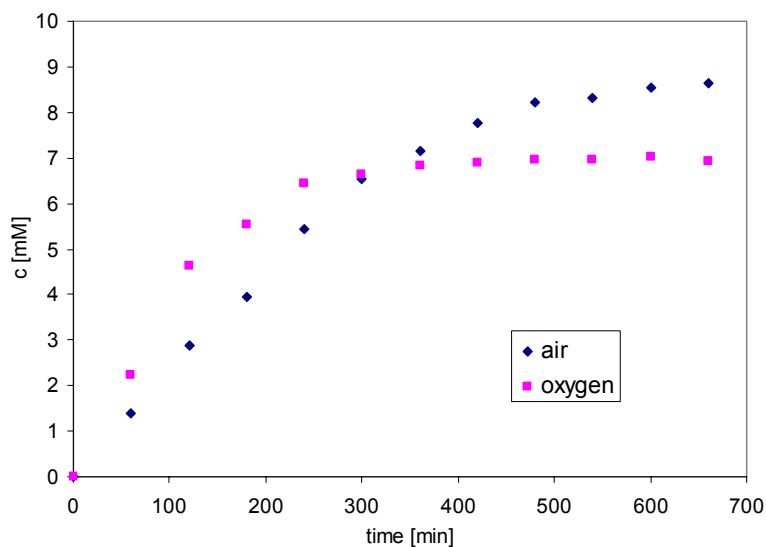


Figure 4:  $\alpha$ -pinene oxidation by CYP102A1 A74G F87V L188Q depending on oxygen supply.

As shown in Figure 4, the production of pinene oxide from  $\alpha$ -pinene by CYP102A1 A74G F87V L188Q depends on the amount of oxygen dissolved. At the beginning the reaction using pure oxygen is faster, but unfortunately the higher oxygen concentration leads to a faster deactivation of the biocatalyst as the product formation dies down after 5 hours. The reaction in air continues for several hours resulting in a higher product yield. This trend was also observed for the two other mutants. The volumetric productivities reached with the above described reaction setup are between  $130$  and  $450 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and are the highest reported for the biocatalytic oxidation of  $\alpha$ -pinene so far.

# 1 Einleitung

## 1.1 Industrielle Biokatalyse

Die industrielle oder „weiße“ Biotechnologie hat ihren Ursprung in der Herstellung alkoholischer Getränke sowie der Produktion fermentierter Lebensmittel wie z.B. Sauerkraut, Sojasauce oder Käse und führte in vielen Kulturen zur Entwicklung verschiedenster Produkte mit verbesserter Haltbarkeit oder verändertem Geschmack (Schmid 2006). Heute wird die industrielle Biokatalyse bei einer stetig wachsenden Zahl chemischer Prozesse eingesetzt: Momentan werden rund 5% aller chemischen Erzeugnisse mit Hilfe biotechnologischer Verfahren hergestellt, wobei bis 2010 mit einem Anstieg auf 10-20% zu rechnen ist (Antranikian 2006). Die entscheidende Triebkraft dieser Entwicklung sind dabei die Senkung der Prozesskosten durch Vereinfachung der Prozesse, Einsparungen bei Rohstoffen und Energieeinsatz sowie die Reduktion von Neben- und Abfallprodukten. Da enzymkatalysierte Reaktionen bei milden Bedingungen wie neutralem pH-Wert, Raumtemperatur und Atmosphärendruck durchgeführt werden, sind sie insbesondere im Hinblick auf nachhaltige Produktionsverfahren den klassisch chemischen Ansätzen überlegen. Durch den Einsatz von regio- und stereoselektiven enzymkatalysierten Reaktionen können komplexe Syntheserouten vereinfacht werden.

### 1.1.1 Basischemikalien

Die heute im großen Maßstab (>20.000 t/a) hergestellten Produkte der weißen Biotechnologie finden unter anderem Anwendung im Nahrungsmittel- und Pharmabereich sowie in der Futtermittelindustrie. Beispielsweise wird Isoglucose durch Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose unter Einsatz von Xyloseisomerase mit einer Jahresproduktion von 8.000.000 t hergestellt und dient als Süßungsmittel in der Lebensmittelindustrie (Schmid et al. 2001). Die Produktion von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) erfolgt durch Fermentation von *Penicillium chrysogenum* bzw. *Acremonium chrysogenum* und stellt einen wichtigen Vertreter der biotechnologisch hergestellten Pharmaprodukte dar (ca. 75.000 t/a) (Antranikian 2006). Ein weiterer großtechnischer Prozess ist die Synthese von Acrylamid aus Acrylnitril mit Hilfe einer Nitrilhydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* (30.000 t/a, (Schmid



2006)). In Tabelle 1.1 sind einige der heute im Tonnenmaßstab hergestellten biotechnologischen Produkte zusammengestellt.

*Tabelle 1.1: Produkte der weißen Biotechnologie, (Antranikian 2006).*

Produkt	Weltjahresproduktion [kt]	Anwendung
<b>Säuren</b>		
Citronensäure	1000	Lebensmittel, Waschmittel
Essigsäure	190	Lebensmittel
Gluconsäure	100	Lebensmittel, Textil, Metall
<b>Aminosäuren</b>		
L-Glutamat	1500	Geschmacksverstärker
L-Lysin	700	Futtermittel
L-Threonin	30	Futtermittel
L-Phenylalanin	10	Aspartam, Medizin
L-Tryptophan	>1	Ernährung, Futtermittel
L-Cystein	<1	Pharma, Lebensmittel
<b>Lösungsmittel</b>		
Bioethanol	18500	Lösungsmittel, Energieträger
<b>Antibiotika</b>		
Penicilline	45	Pharma
Cephalosporine	30	Pharma
<b>Biopolymere</b>		
Polylactid	140	Verpackung
Xanthan	40	Erdölförderung, Lebensmittel
Dextran(-derivate)	3	Blutersatzstoff
<b>Vitamine</b>		
Ascorbinsäure (Vit. C)	80	Pharma, Lebensmittel
L-Sorbose	50	Pharma, Lebensmittel
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	30	Futterzusatz, Lebensmittel
<b>Kohlenhydrate</b>		
Glucose	20000	Flüssigzucker
High Fructose Syrup	8000	Getränke, Lebensmittel
Fructooligosaccharide	11	Präbiotikum
Cyclodextrine	5	Kosmetik, Pharma, Lebensmittel, Textil

### 1.1.2 Feinchemikalien

Gemessen an der Gesamtzahl der heute realisierten biotechnologischen Prozesse ist die Zahl der Verfahren zur Herstellung von Basischemikalien gering. Eine Analyse von 134 industriellen Biotransformationen (hierbei wurden fermentative Prozesse ausgeschlossen)

ergab, dass nur neun von ihnen der Herstellung von Basischemikalien (>20.000 t/a) dienen (Straathof et al. 2002). Die chemische Industrie nutzt Biotransformationen normalerweise bei Produktmaßstäben bis 10.000 t/a. Beispiele hierfür sind die Produktion von Amiden, Aminen und Alkoholen (BASF), Aminosäuren, 6-Aminopenicillansäure (DSM) oder die Herstellung heterocyclischer Verbindungen (Lonza) (Schmid et al. 2001). Bei den eingesetzten Enzymen handelt es sich meist um einfach handhabbare Hydrolasen (Lipasen, Acylasen, Nitrilasen, Amidasen). Die Verwendung anderer Enzyme, wie z.B. Oxidoreduktasen, stellt vergleichsweise höhere Anforderungen an die Prozessführung, da beispielsweise stöchiometrische Mengen des teuren Kofaktors NAD(P)H benötigt werden. Durch den Einsatz enzymatischer Regenerierungssysteme können Kofaktoren in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden, wobei in der Praxis meist Ganzzellsysteme zur Anwendung kommen. Ein aktuelles Beispiel ist die enantioselektive Reduktion von Ketonen mit Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* und *Rhodococcus erythropolis*, welche zusammen mit einem auf Glucosedehydrogenase basierenden Kofaktorregenerierungssystem heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Mit den so hergestellten *E. coli*-Zellen können verschiedene, optisch aktive Alkohole mit Ausbeuten von bis zu 212 g l<sup>-1</sup> produziert werden (Groger et al. 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cytochrom P450-Monooxygenasen finden in der industriellen Biokatalyse ebenfalls Anwendung. So handelt es sich bei der Hydroxylierung von Reichstein S zu Hydrocortison mit *Curvularia* sp. im 100 t/a Maßstab (Schering), der Umsetzung von Progesteron zu Cortison mit *Rhizopus* sp. (Pfizer) oder auch der Synthese von Pravastatin (Marktvolumen: 3,6 Milliarden US- $\text{\$}$ ; Sankyo Pharma) um P450-katalysierte Reaktionen (Urlacher und Eiben 2006). Von einer zunehmenden Bedeutung von P450-Monooxygenasen in der industriellen Biokatalyse ist auszugehen, da ihre Eigenschaft, nicht aktivierte C-H-Bindungen selektiv hydroxylieren zu können, als „potentiell nützlichste“ aller Biotransformationen bezeichnet wurde. Dennoch stehen einer breiten Anwendung mehrere technische Probleme entgegen (van Beilen et al. 2003). P450-Monooxygenasen sind kofaktorabhängig, haben oft geringe Stabilität und Aktivität und benötigen zusätzlich Proteine für den Elektronentransport. Um den hohen Entwicklungsaufwand für die Etablierung eines biokatalytischen Prozesses mit P450-Monooxygenasen rechtfertigen zu können, muss die letztlich durchgeführte Reaktion mit einer hohen Wertschöpfung verbunden sein. Als mögliches Anwendungsgebiet kommt somit weniger die Herstellung von Basischemikalien als vielmehr die Synthese von Feinchemikalien für die Pharma- sowie die Aroma- und Duftstoffindustrie in Frage.

### 1.1.3 Aroma- und Duftstoffe

Aroma- und Duftstoffe gehören zu verschiedensten chemischen Verbindungsklassen und wurden ursprünglich durch Extraktion aus natürlichen Quellen gewonnen, zwei der ersten synthetisch hergestellten Vertreter waren Coumarin (1868) und Vanillin (1874) (Bauer et al. 2001). Seit dieser Zeit werden immer mehr Aroma- und Duftstoffe im industriellen Maßstab durch Extraktion sowie mittels chemischer oder biokatalytischer Synthese hergestellt (Marktvolumen: 18 Mrd. US-\$, 2006; [http://www.leffingwell.com/top\\_10.htm](http://www.leffingwell.com/top_10.htm)), insbesondere der Einsatz biotechnologischer Syntheseverfahren hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Triebkraft dieser Entwicklung ist zum einen die hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität enzymatischer Umsetzungen, welche bei der Produktion der meist chiralen Zielverbindungen von Vorteil ist, zum anderen können biotechnologisch hergestellte Aromastoffe unter der Bezeichnung „natürlich“ vertrieben werden, was zu einer enormen Wertschöpfung beiträgt (Serra et al. 2005). „Natürliche“ Aromastoffe sind entsprechend der US- und europäischen Gesetzgebung Substanzen, die entweder durch rein physikalische Prozesse (z.B. Extraktion) oder durch enzymatische bzw. mikrobielle Prozesse gewonnen werden. Andere Aromastoffe, die zwar ebenfalls in der Natur vorkommen, jedoch chemisch hergestellt werden, dürfen lediglich als „naturidentisch“ angeboten werden. Das hat zur Folge, dass beispielsweise der Marktpreis für chemisch synthetisiertes Vanillin bei 11 US-\$ kg<sup>-1</sup> liegt, wohingegen mit mikrobiell durch *Amycolatopsis* sp. HR 167 hergestelltem Vanillin Preise von ca. 1000 US-\$ kg<sup>-1</sup> erzielt werden können. Im Gegensatz dazu kann die erfolgreiche Einführung biokatalytischer Prozesse in die Aroma- und Duftstoffsynthese auch zu einer Reduktion der Prozesskosten und zu einem Sinken des Marktpreises führen. So konnte durch die Etablierung eines Verfahrens zur Produktion des „Pfirsicharomas“  $\gamma$ -Decalacton ausgehend von Ricinolsäure mit Stämmen von *Candida* sp. bzw. *Yarrowia lipolytica* eine Produktkonzentration von bis zu 9,5 g l<sup>-1</sup> erreicht werden, wodurch der Marktpreis für  $\gamma$ -Decalacton von über 10000 US-\$ kg<sup>-1</sup> in den frühen 80er Jahren auf ca. 300 US-\$ kg<sup>-1</sup> sank. Lipasen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Synthese von Aromastoffen, so werden verschiedene Fruchttester durch Einsatz von Lipasen in organischen Lösungsmitteln in Batch- oder kontinuierlichen Prozessen hergestellt. C6-Alkohole und Aldehyde, die sogenannten „grünen Noten“, welche z.B. nach frisch geschnittenem Gras riechen, werden im 5-10 t/a-Maßstab produziert (3000 US-\$ kg<sup>-1</sup>). Sie werden unter anderem aus Linolen- bzw. Linolsäure über drei enzymatische Schritte synthetisiert (

Abbildung 1.1). Dabei kommt Lipoxygenase enthaltendes Sojamehl und Guavenhomogenisat, welches eine Hydroperoxidlyase enthält, zum Einsatz. Die entstehenden Aldehyde können bei Bedarf durch Zugabe von Bäckerhefe zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden (Schrader et al. 2004).

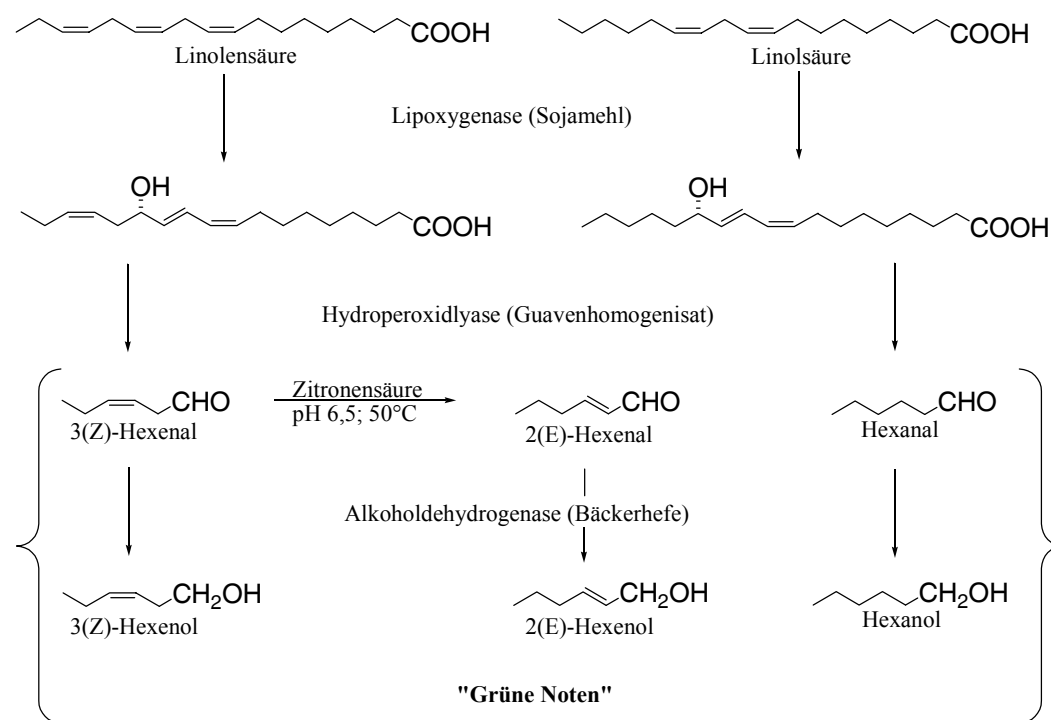


Abbildung 1.1: Biokatalytische Herstellung von „grünen Noten“ ausgehend von Linol- und Linolensäure (Schrader et al. 2004).

Eine weitere Klasse an Duft- und Aromastoffen stellen die Terpenkohlenwasserstoffe bzw. ihre oxyfunktionalisierten Derivate - die Terpenoide - dar. Insbesondere Terpenoide werden in einer Vielzahl verschiedener Produkte wie Kosmetika (blumige Noten), Nahrungsmitteln (Zitrus- und Pfefferminzaromen), Haushaltsartikeln aber auch in Pharmaka eingesetzt (Schrader und Berger 2001). Die Gewinnung dieser Substanzen aus natürlichen Ressourcen ist aus ökonomischer Sicht meist unattraktiv, da der Anteil ätherischer Öle in Pflanzen gering ist (max. 5%) und es sich bei den Ölen um komplexe Substanzmischungen handelt. Der Großteil der Terpenoide wird daher chemisch synthetisiert, wobei Terpene, die in großen Mengen verfügbar sind, als Edukte eingesetzt werden (z.B. Limonen oder Pinen).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Verwendung von Cytochrom P450 Monooxygenasen unter anderem zur selektiven Oxidation von Pinen beschrieben, weshalb im Folgenden näher auf

dieses Edukt und die sich daraus erschließende Produktpalette eingegangen wird.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen kommen als Hauptbestandteile von Kiefernrohharz, einem Abfallstoff der Zellstoffindustrie (Produktion ca. 1,5 Mio. t/a) (75-90%) oder auch in Zitrusölen (bis 12%) vor. Sie werden durch Wasserdampfdestillation in Mengen von 160.000 t ( $\alpha$ -Pinen) bzw. 26.000 t ( $\beta$ -Pinen) pro Jahr extrahiert und hauptsächlich als preiswertes Lösungsmittel in der Lack- und Farbenindustrie eingesetzt. Nur 25% dienen als Ausgangsmaterial für die chemische Riechstoffsynthese. Die gezielte Oxyfunktionalisierung von Pinen eröffnet den Weg zu verschiedenen Verbindungen mit charakteristischen sensorischen, aber auch pharmakologisch interessanten Eigenschaften (Abbildung 1.2). Alle in Abbildung 1.2 aufgeführten Produkte (mit Ausnahme von Sobrerol) sind direkt oder in Form ihrer Derivate Aroma- und Riechstoffe. Sobrerol kann als Wirkstoff bei chronischer Rhinosinuitis eingesetzt werden, aufgrund einer Antitumoraktivität wird auch ein Einsatz in der Chemotherapie diskutiert (Bellussi et al. 1990, Crowell et al. 1996). Verbenol und Verbenon sind natürliche Insektenpheromone und könnten als umweltverträgliche Pestizide Verwendung finden (Trudgill 1994).

Die bisher unternommenen Versuche zur selektiven biokatalytischen Oxyfunktionalisierung von  $\alpha$ -Pinen führten nur in Einzelfällen zu Prozessen mit hohen Produktausbeuten. Durch Biotransformation mit *Pseudomonas fluorescens* können beispielsweise 57 g l<sup>-1</sup> Isonovalal in fünf Stunden im Batch-Verfahren und mit *in situ* Produktabtrennung produziert werden (Burfield et al. 1989). Alle anderen in Abbildung 1.2 gezeigten Produkte sind zwar ebenfalls durch mikrobielle Umsetzungen zugänglich, allerdings bei geringen Ausbeuten oder niedrigen Chemoselektivitäten (vgl. Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3). Ein neues biotechnologisches Verfahren zur selektiven Oxidation von Pinen, welches höhere Produktausbeuten ermöglicht, würde die in 1.1.2 geforderte hohe Wertschöpfung, die für einen wirtschaftlichen Einsatz von Oxidoreduktasen nötig ist, beinhalten.

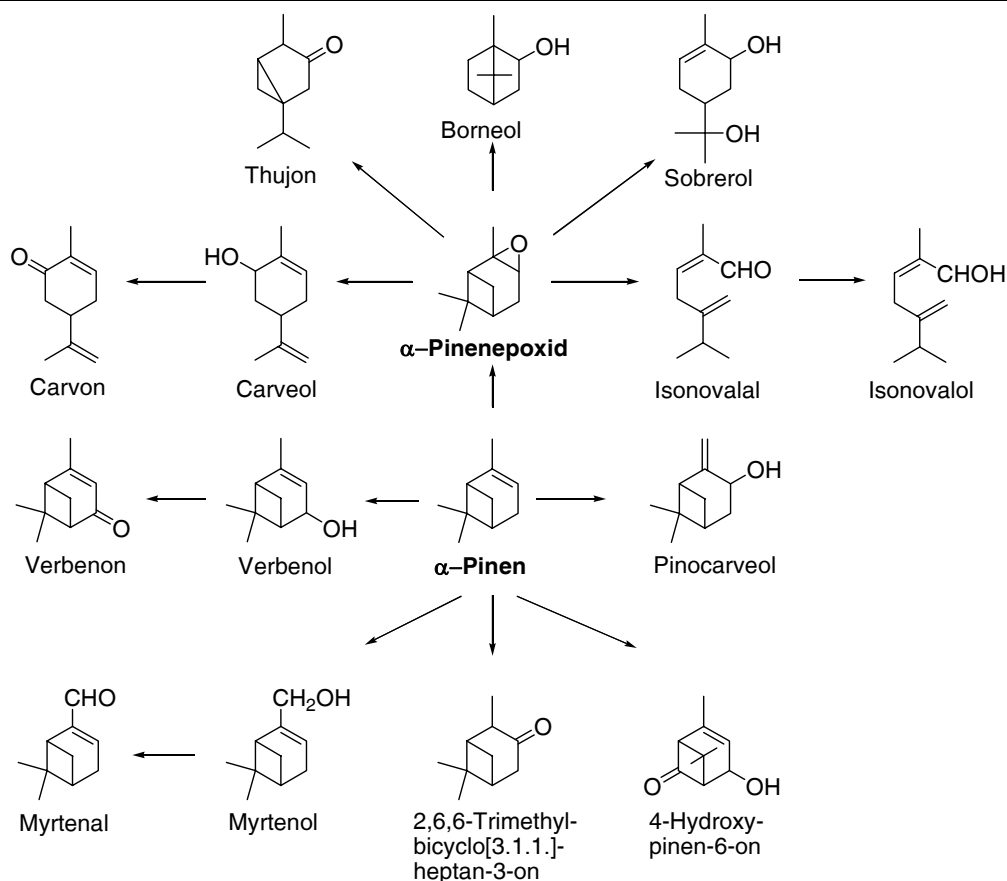


Abbildung 1.2: Mikrobielle Oxyfunktionalisierungen von  $\alpha$ -Pinen (Berger et al. 2000, Busmann und Berger 1994, Farooq et al. 2002, Trudgill 1994).

#### 1.1.4 Polyketid Antibiotika

Polyketidantibiotika, zu denen Makrolid- und Polyenantibiotika gehören, werden meist aus Streptomyceten isoliert und finden Anwendung in der Humanmedizin sowie der Tiermast. Der Marktwert klinisch eingesetzter Makrolidantibiotika liegt bei 5,7 Mrd. US-\$ (2004) (Schmid 2006). Sie bestehen aus einem makrozyklischen Lacton- oder Lactamring, der aus einer langkettigen Polyhydroxyfettsäure mit terminaler Hydroxy- oder Aminogruppe gebildet wird. Der Fettsäureanteil ist oftmals hoch verzweigt und beinhaltet mehrere Chiralitätszentren, weshalb sich die chemische Synthese dieser Substanzen sehr schwierig gestaltet. Aufgrund der stetig wachsenden Zahl antibiotikaresistenter Mikroorganismen werden jedoch Möglichkeiten zur chemischen Modifizierung bzw. zur Totalsynthese bekannter Antibiotikastrukturen gesucht, um Wirkstoffe mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften zu erzeugen. So wurde kürzlich die Totalsynthese von Borrelidin, einem Makrolidantibiotikum mit anti-Tumor-Aktivität bewerkstelligt (Duffey et al. 2003, Vong et al. 2004). Der Syntheseweg ist komplex und bietet aufgrund der vielen Stufen eine nur

geringe Produktausbeute. Die Darstellung des C1-C12 Fragments alleine erfordert 10 Syntheseschritte mit einer Ausbeute von lediglich 8%, dabei müssen die die chiralen Zentren sukzessive durch Myers-Alkylierung aufgebaut werden (Vong et al. 2003) (s. Abbildung 1.3).

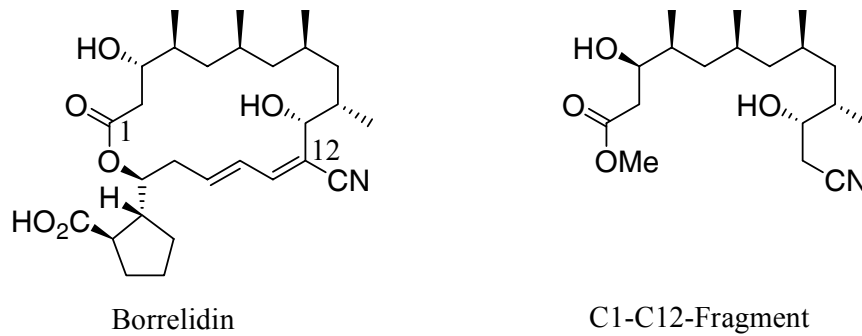


Abbildung 1.3: Struktur des Makrolidantibiotikums Borrelidin, sowie des C1-C12-Fragments.

Ein deutlich einfacherer Zugang zu dieser Borrelidinvorstufe könnte durch Verwendung chiraler Naturstoffe gefunden werden. Die in Bürzeldrüsen von Gänsen und Enten vorkommenden Wachsester enthalten hoch methylverzweigte Fettsäuren mit definierter Stereochemie und kommen daher als Synthesebausteine für die Herstellung von Makrolidantibiotika in Frage (Morr et al. 1992). Um jedoch den Ringschluss zur Bildung des makrocyclischen Lactons bewerkstelligen zu können, ist eine selektive Hydroxylierung der Fettsäuren notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Potential von Cytochrom P450 Monooxygenasen zur selektiven Hydroxylierung dieser hoch verzweigten Substrate untersucht. In Abbildung 1.4 ist eine denkbare Syntheseroute zur Darstellung einer Makrolidvorstufe mit P450 Monooxygenasen dargestellt.

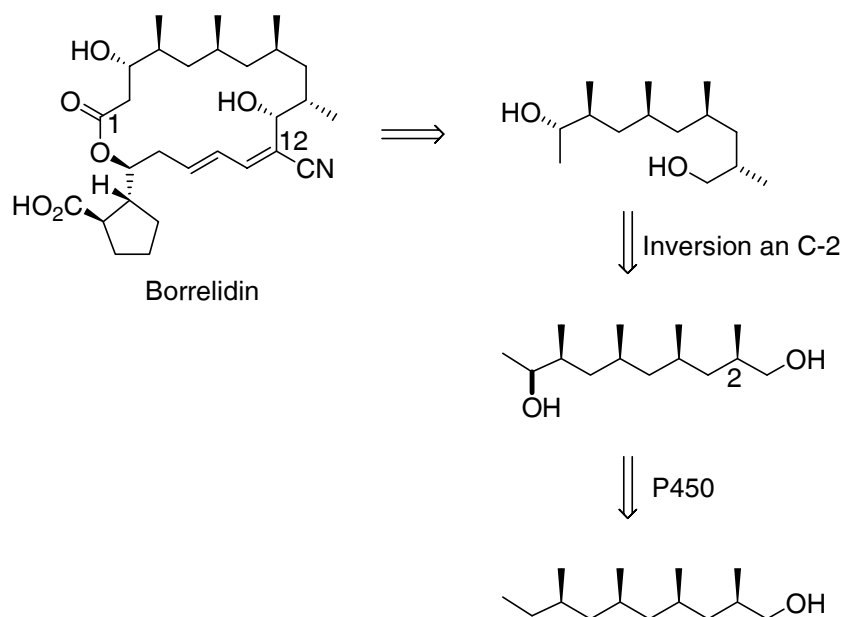


Abbildung 1.4: Retrosynthetische Analyse von Borrelidin, ausgehend von 2,4,6,8-Tetramethyldecanol als mögliches C2-C11-Fragment.

## 1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (E.C.1.14.-.-) und bilden eine der größten Enzymfamilien mit bisher 6422 bekannten Vertretern (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>; Stand: 20. Oktober 2006). Sie enthalten eine Häm-Gruppe im aktiven Zentrum, welche über ein Cysteinat als axialer (fünfter) Ligand an das Apoprotein gebunden ist. Ihren Namen verdanken sie ihrer charakteristischen Absorptionsbande bei 450 nm im UV/vis-Spektrum, die sie im reduzierten Zustand mit Kohlenmonoxid als sechstem Liganden aufweisen (Omura und Sato 1964). P450 Monooxygenasen, auch CYPs genannt, kommen in praktisch allen Organismen vor und sind dort in einer Vielzahl verschiedener Reaktionen des Metabolismus<sup>7</sup> beteiligt. Allgemein katalysieren sie die Aktivierung von molekularem Sauerstoff unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten (meist in Form von NADH oder NADPH bereitgestellt) zur Oxidation verschiedenster Substrate. Die Reaktion kann dabei hoch regio- und stereoselektiv wie zum Beispiel bei der Biosynthese von Steroiden sein, aber auch unselektiv erfolgen. Beim Abbau von Xenobiotika dient die unselektive P450-katalysierte Oxyfunktionalisierung beispielsweise einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit, was die Ausscheidung dieser Stoffe



ermöglicht. Die Klassifizierung der P450 Monooxygenasen erfolgt anhand ihrer Aminosäuresequenzidentität (Nelson et al. 1996). Der Bezeichnung CYP folgt eine Nummer für Familien (Proteine mit mehr als 40% Aminosäuresequenzidentität), ein Buchstaben für Unterfamilien (über 55% Identität) und letztlich eine Nummer für das Gen.

### 1.2.1 Struktur und Aufbau

Die Aminosäuresequenzen der P450 Monooxygenasen sind extrem divers und weisen oftmals eine nur geringe Sequenzidentität auf. Dennoch sind ihre strukturellen Merkmale insbesondere im Bereich des aktiven Zentrums konserviert, was durch eine zunehmende Zahl verfügbarer Kristallstrukturen bestätigt wird. Die erste Kristallstruktur eines P450 war die von P450<sub>cam</sub> aus *Pseudomonas putida* im Jahre 1987, mittlerweile sind die Kristallstrukturen von über 20 verschiedenen P450 veröffentlicht (Poulos und Johnson 2005). Das aktive Zentrum besteht aus einem Bündel von vier Helices (D, E, I und L), der J und K Helix, zwei  $\beta$ -Faltblattbereichen und dem sogenannten „meander“-Bereich (Abbildung 1.5). 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 Hämbindetasche 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). Unterschiede in den Strukturen gibt es am N-terminus, wo die meist membranassoziierten eukaryotischen CYPs einen Membrananker aufweisen. Weitere strukturelle Unterschiede ergeben sich aus den unterschiedlichen Substratspezifitäten der Monooxygenasen. Die sogenannten Substratbindestellen (substrate recognition sites, srs) befinden sich am oder im aktiven Zentrum bzw. entlang des Substratzugangskanals (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000).

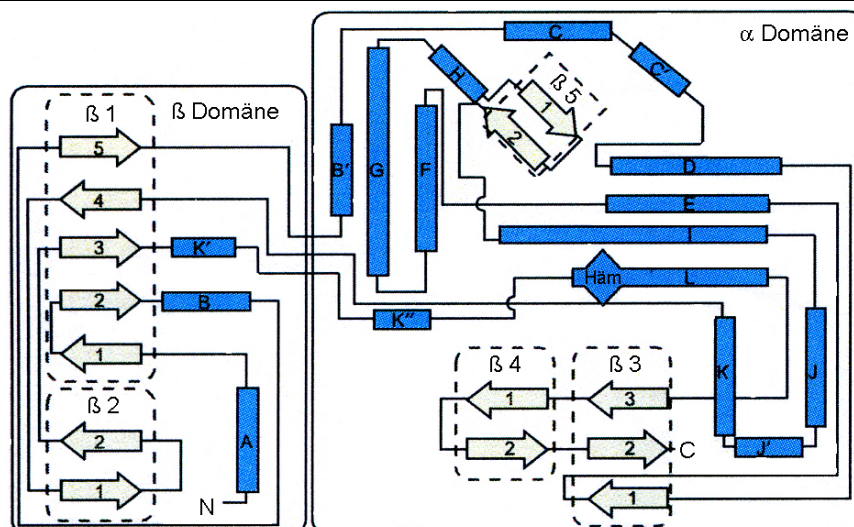


Abbildung 1.5: Sekundärstruktur von P450 Monooxygenasen (Werck-Reichhart und Feyereisen 2000).

P450 Monooxygenasen benötigen zur Aktivierung des Luftsauerstoffs Elektronen, die sie in den meisten Fällen von Reduktasen erhalten, wobei man grundsätzlich zwei Klassen von Reduktasesystemen unterscheidet. Bei Klasse I-Systemen erfolgt der Elektronentransport von NAD(P)H über eine FAD-enthaltende Ferredoxinreduktase und eine Eisen-Schwefel-Protein (Ferredoxin) zur Monooxygenase - Vertreter dieser Klasse sind bakterielle und mitochondriale P450. Klasse II-Enzyme erhalten Elektronen von NADPH über eine FAD und FMN enthaltenden Cytochrom P450 Reduktase (CPR), hierbei handelt es sich meist um mikrosomale P450. Beide Systeme können sowohl löslich als auch membranassoziiert vorliegen. Darüber hinaus werden immer mehr neue Reduktasesysteme identifiziert. Beispielsweise erhält P450RhF Elektronen über eine FMN-enthaltende Reduktase, die als Fusionsprotein mit einem Ferredoxin und der Monooxygenase vorliegt. Andere P450 setzen direkt peroxygenierte Substrate um und benötigen keine zusätzlichen Elektronen oder sie sind in der Lage, direkt mit NADH zu interagieren (McLean et al. 2005, Paine et al. 2005).

### 1.2.2 Katalysemechanismus

Der heute allgemein akzeptierte Katalysezyklus der Aktivierung molekularen Sauerstoffs durch P450 Monooxygenasen wurde bereits 1968 postuliert und in den darauffolgenden Jahrzehnten in seinen wesentlichen Punkten bestätigt (Abbildung 1.6) (Makris et al. 2005).

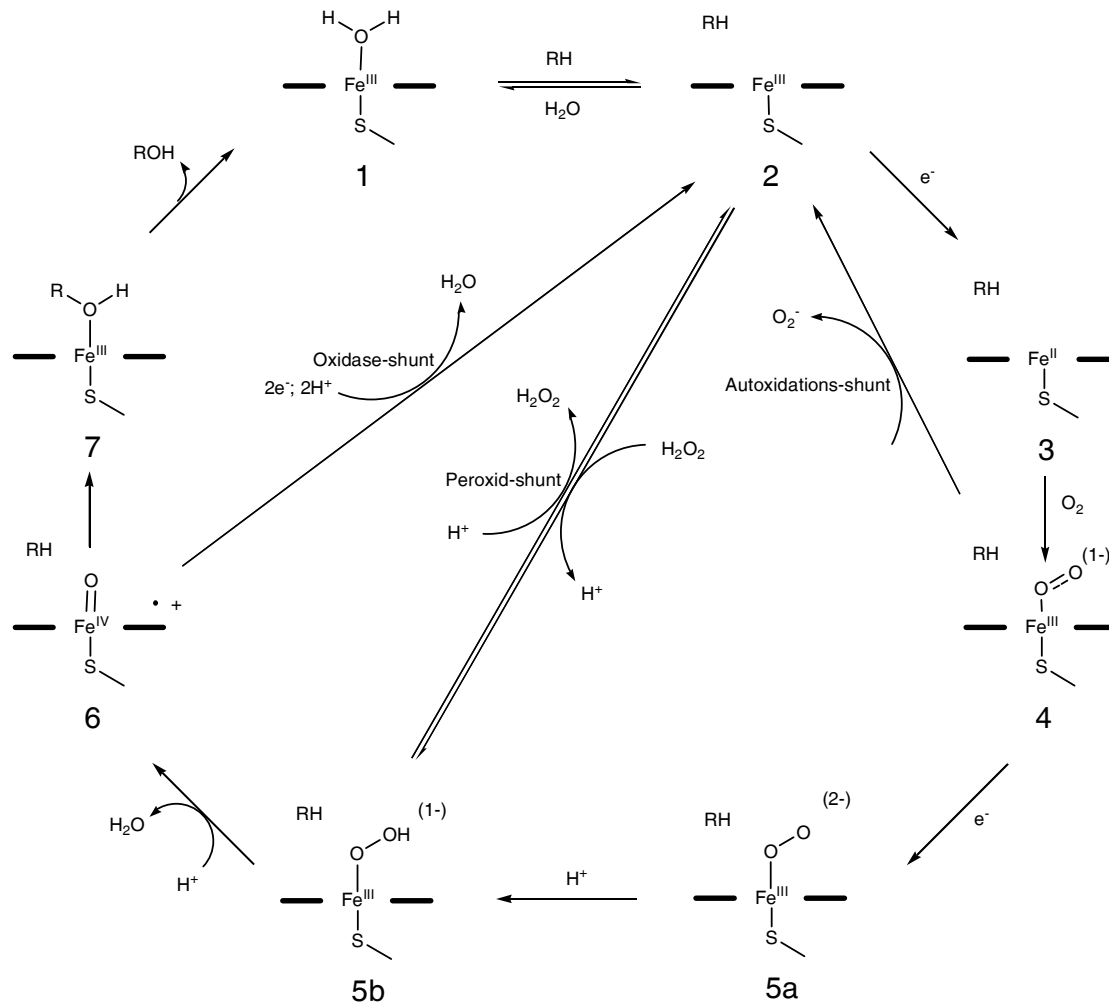


Abbildung 1.6: P450 Katalysezyklus.

Durch Substratbindung wird das im aktiven Zentrum als sechster Ligand über dem Häm liegende Wassermolekül verdrängt, was zu einer Änderung des spin-Zustandes des Häm-Eisens vom low-spin zum high-spin Zustand führt. Fe<sup>3+</sup> wandert aus der Porphyrinebene in eine Position unterhalb des Porphyrinrings (**2**), gleichzeitig wird das Redoxpotential des Eisens positiver, weshalb eine Reduktion von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> durch den Redoxpartner erfolgen kann (**3**). Das Anheben des Redoxpotentials durch die Substratbindung ist dabei ein wichtiger „Schalter“, der den unkontrollierten Verbrauch von Kofaktoren (NAD(P)H) verhindert. Nach erfolgter Reduktion bindet molekularer Sauerstoff am Häm-Eisen und bildet einen Oxy-Eisen Komplex (**4**), welcher die letzte direkt beobachtbare Zwischenstufe des Katalysezykluses darstellt. Durch weitere ein-Elektronen-Reduktion gelangt man zu einer Peroxo-Eisenspezies (**5a**), deren Protonierung eine Hydroperoxoeisenkomplex ergibt (**5b**). Durch weitere Protonierung und Wasserabspaltung erhält man letztlich den Oxo-Eisenkomplex (**6**), der das gebundene Substrat oxidiert. Da die letzten Zwischenstufen des Katalysezykluses 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. Durch Untersuchungen der Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* konnte ein Oxo-Eisenkomplex identifiziert werden, der dem in P450 Monooxygenasen vermuteten Komplex (6) entspricht. Ausgehend von dieser Spezies wird ein radikalischer „rebound“-Mechanismus diskutiert, durch welchen der Sauerstoff letztlich auf das Substrat übertragen wird (Abbildung 1.7) (Groves 2005). Diese Vorstellung wurde kürzlich von He et al. durch Oxidationsversuche von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Thujon mit P450<sub>cam</sub> und P450 BM3 bestätigt (He und de Montellano 2004).

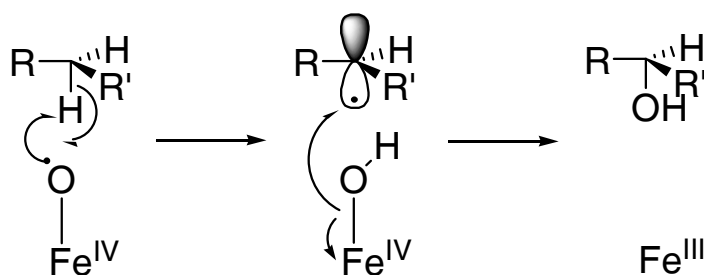


Abbildung 1.7: „Rebound“-Mechanismus.

Weiterhin beinhaltet der P450-Katalysezyklus mehrere Möglichkeiten zu Nebenreaktionen. Ausgehend von (4) kann durch einen sogenannten Autoxidations-shunt unter Abspaltung eines Superoxidanions der Zustand (2) erreicht werden. Beim Peroxid-shunt wird Wasserstoffperoxid von Komplex (5) dissoziiert, im Falle des Oxidase-shunts wird anstelle der Oxidation des Substrates unter Aufnahme zweier zusätzlicher Elektronen Wasser von Komplex (6) abgespalten. Diese Nebenreaktionen führen zum unproduktiven Verbrauch von Elektronen, also zur Entkopplung des Kofaktorverbrauchs von der Substratoxidation. Unter dem Gesichtspunkt eines biotechnologischen Einsatzes von Monooxygenasen sind diese Entkopplungs-Reaktionen aus zwei Gründen unerwünscht. Zum einen verringern sie die Effizienz der Katalyse durch Verschwendung des teuren Kofaktors, zum anderen führt die Produktion reaktiver Spezies wie Wasserstoffperoxid zu einer irreversiblen Modifikation des Apoproteins, was eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat (Karuzina und Archakov 1994a, Karuzina und Archakov 1994b).

Für das Verständnis der in dieser Arbeit untersuchten Chemo- bzw. Regioselektivitäten P450-katalysierter Reaktionen müssen zwei Aspekte in Betracht gezogen werden: so ist die beobachtete Selektivität einerseits ein Ergebnis der Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum, andererseits hat die vom Enzym aufzubringende Bindungsdissoziationsenergie ebenfalls einen Einfluss auf die Produktverteilung. Durch Kombination von MD-Simulationen und der Berechnung von Bindungsdissoziationsenergien konnte kürzlich die experimentell ermittelte Regioselektivität der Hydroxylierung von Laurinsäure bzw. von Oktan durch P450 BM-3 erklärt werden (Feenstra et al. 2007). So ist dort die nicht beobachtete  $\omega$ -Hydroxylierung auf eine hohe C-H-Bindungsdissoziationsenergie zurückzuführen, während die Regioselektivitäten der  $\omega$ -2 bis  $\omega$ -5 Hydroxylierung sehr gut mit der aus MD-Simulationen erhaltenen Verteilung der Substratorientierungen im aktiven Zentrum korreliert. Da die Bindungsdissoziationsenergien für ein gegebenes Substrat bei gleichbleibenden Reaktionsbedingungen aber konstant sind, sind beobachtete Änderungen der Chemo- bzw. Regioselektivität – etwa bei unterschiedlichen Mutanten – letztlich die Folge unterschiedlicher Substratorientierungen im aktiven Zentrum. Darum werden die in dieser Arbeit beobachteten verschiedenen Chemo- bzw. Regioselektivitäten bei der Oxidation von Pinen als Folge der Regioselektivitätsunterschiede verstanden.

### 1.2.3 Katalysierte Reaktionen

Ebenso vielseitig wie ihre natürlichen Funktionen sind die von P450 Monooxygenasen katalysierten Reaktionstypen. Im Folgenden wird ein unvollständiger Überblick über einige P450-katalysierte Reaktionen gegeben.

Die Hydroxylierung nicht-aktivierter C-H-Bindungen aliphatischer Verbindungen stellt die am häufigsten katalysierte Reaktion von P450 Monooxygenasen dar. Ein Beispiel hierfür ist die Hydroxylierung von 1(R)-(+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher durch P450<sub>cam</sub> aus *Pseudomonas putida*, was dem Bakterium erlaubt Campher als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen ( Abbildung 1.8; A) (Hedegaard und Gunsalus 1965) (Katagiri et al. 1968). Ein Vertreter der bei Biosynthesen beteiligten P450 ist P450<sub>PicK</sub>, welches innerhalb des Makrolidbiosyntheseclusters von *Streptomyces venezuelae* an der Synthese von vier verschiedenen Makrolidantibiotika beteiligt ist ( Abbildung 1.8; B) (Graziani et al. 1998, Xue et al. 1998).

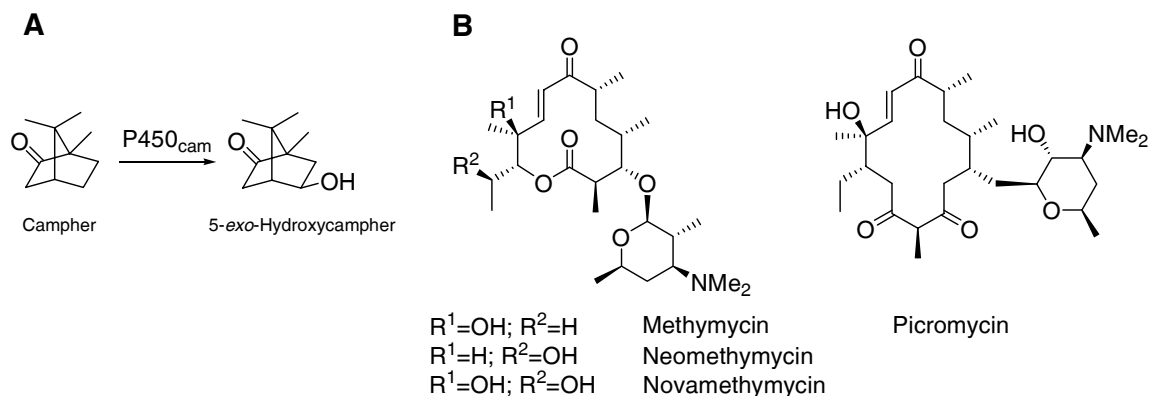


Abbildung 1.8: (A) Hydroxylierung von Campher durch  $P450_{cam}$ ; (B) durch  $P450_{PicK}$  hydroxylierte Antibiotika aus *Streptomyces venezuelae*.

Auch die Hydroxylierung von Aromaten wird durch P450 Monooxygenasen katalysiert, wobei hier biosynthetische als auch Bioabbau-Reaktionen beschrieben sind. Bei der Biosynthese von Nikkomycin, einem Inhibitor der Chitin-Synthase in *Streptomyces tendae*, sind zwei P450-katalysierte Schritte beteiligt:  $P450_{NikF}$  hydroxyliert den Pyridylring innerhalb der Peptidyl-domäne von Nikkomycin (Abbildung 1.9), während  $P450_{NikQ}$  die Oxidation eines Histidinrests katalysiert (Bruntner et al. 1999, Lauer et al. 2000). Bioabbaureaktionen von Xenobiotika wie Benzo[a]pyren oder Warfarin werden beispielsweise von P450 CYP105D1 aus *Streptomyces griseus* katalysiert (Taylor et al. 1999).

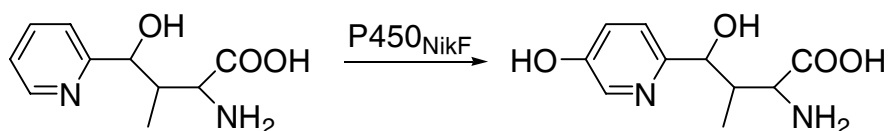


Abbildung 1.9: Aromatische Hydroxylierung eines Pyridylhomothreoninrests bei der Biosynthese von Nikkomycin durch  $P450_{NikF}$ .

Die Epoxidierung von Doppelbindungen gehört ebenfalls zu den Standardreaktionstypen von P450 Monooxygenasen. So ist  $P450_{EpoK}$  für die Epoxidierung von Epothilon D zu Epothilon B, einem Makrolakton mit Anwendungspotential in der Chemotherapie, in *Sorangium cellulosum* verantwortlich (Abbildung 1.10) (Julien et al. 2000).

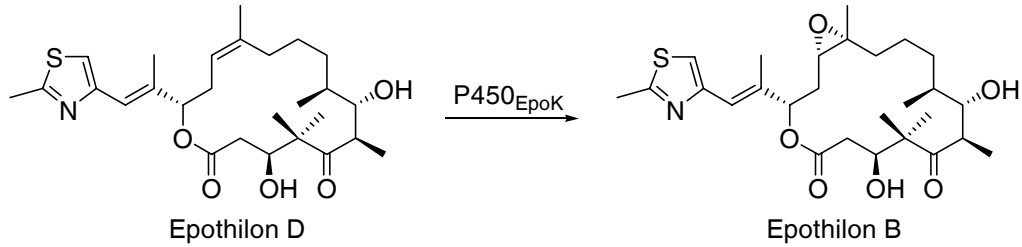


Abbildung 1.10: Epoxidierung von Epothilon D zu Epothilon B durch P450<sub>EpoK</sub>.

Dealkylierungsreaktionen werden oftmals als Nachweisreaktionen im Hochdurchsatzscreening verwendet. Dabei werden Substrate wie Alkyl-Coumarine oder Alkyl-Resorufine eingesetzt, die nach der P450-katalysierten Dealkylierung fluoreszieren (Abbildung 1.11).

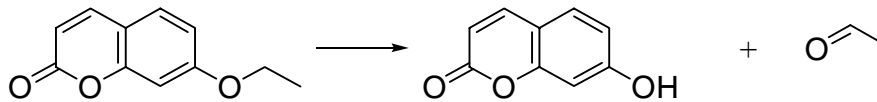


Abbildung 1.11: P450-katalysierte Dealkylierung von 7-Ethoxycoumarin.

Auch oxidative Phenolkupplungen gehören zum Repertoire von P450 Monooxygenasen. Bei der durch *Amycolatopsis balhimycina* katalysierten Synthese von Vancomycin katalysieren sie die Kopplung dreier Untereinheiten (Abbildung 1.12) (Bischoff et al. 2005). Weiterhin sind sie in der Lage C-C-Bindungen durch Mehrfachoxidationen zu spalten, beispielsweise die Demethylierung von Lanosterol durch CYP51 aus *Candida albicans* (Shyadehi et al. 1996).

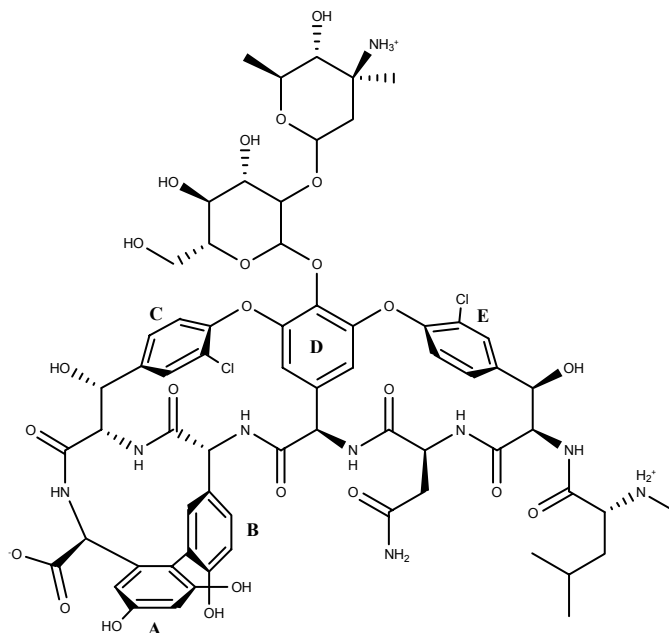


Abbildung 1.12: Struktur von Vancomycin, welches durch P450-katalysierte, oxidative Phenolkupplung der Untereinheiten AB, CD und DE synthetisiert wird.

#### 1.2.4 Die CYP102A-Familie

Die Cytochrom P450-Familie CYP102A besteht aus derzeit drei Vertretern: CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* sowie CYP102A2 und CYP102A3 aus *Bacillus subtilis*, dabei ist CYP102A1 eine der bis heute am besten untersuchten Monooxygenasen. Seine Aktivität als Fettsäurehydroxylase wurde erstmals 1974 von Miura und Fulco beschrieben (Miura und Fulco 1974). Zwölf Jahre später gelang es, das Enzym heterolog in *E. coli* zu exprimieren und zu charakterisieren (Wen und Fulco 1987). Die heute gebräuchliche Bezeichnung P450 BM-3 verdankt es der Tatsache, die dritte in *Bacillus megaterium* identifizierte P450 Monooxygenase zu sein. P450 BM-3 weist ein Molekulargewicht von 119 kDa auf und war das erste bekannte, lösliche Fusionsprotein aus einer FAD und FMN enthaltenden Reduktase und einer Monooxygenasedomäne. Durch seine Sequenzhomologie zu eukaryotischen Monooxygenasesystemen diente es als Modellsystem für diese Klasse von Enzymen. Die mit P450 BM-3 gemessenen Aktivitäten bei der subterminalen Hydroxylierung mittel- und langkettiger Fettsäuren gehören mit  $>1500 \text{ min}^{-1}$  zu den höchsten mit P450 gemessenen Umsatzraten (Li et al. 1991). Durch die Möglichkeit der effektiven rekombinanten Expression und Aufreinigung gelang es schließlich Kristallstrukturen der Monooxygenasedomäne in substratfreier und substratgebundener Form zu erhalten, was die Grundlage für das rationale



Protein Design mit P450 BM-3 schuf (Abbildung 1.13) (Li und Poulos 1997, Ravichandran et al. 1993). In den folgenden Jahren konnten somit mehrere, für die Substratinteraktion relevante Aminosäuren identifiziert werden. Besonderes Augenmerk wurde dabei unter anderem auf die Aminosäuren Tyrosin 51 und Arginin 47 am Eingang des Substratzugangskanals gelegt, da sie mit der Carboxygruppe der Fettsäure interagieren. Ost und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Mutation dieser Aminosäuren zu höheren  $K_M$ -Werten für Fettsäuren, also einer geringeren Affinität des Enzyms zum Substrat führt (Ost et al. 2000). Eine weitere, gut untersuchte Aminosäure stellt Phenylalanin 87 dar, welche durch ihre Position über der Häm-Gruppe den Zugang von Substraten zum aktiven Zentrum kontrollieren kann (Graham-Lorence et al. 1997).

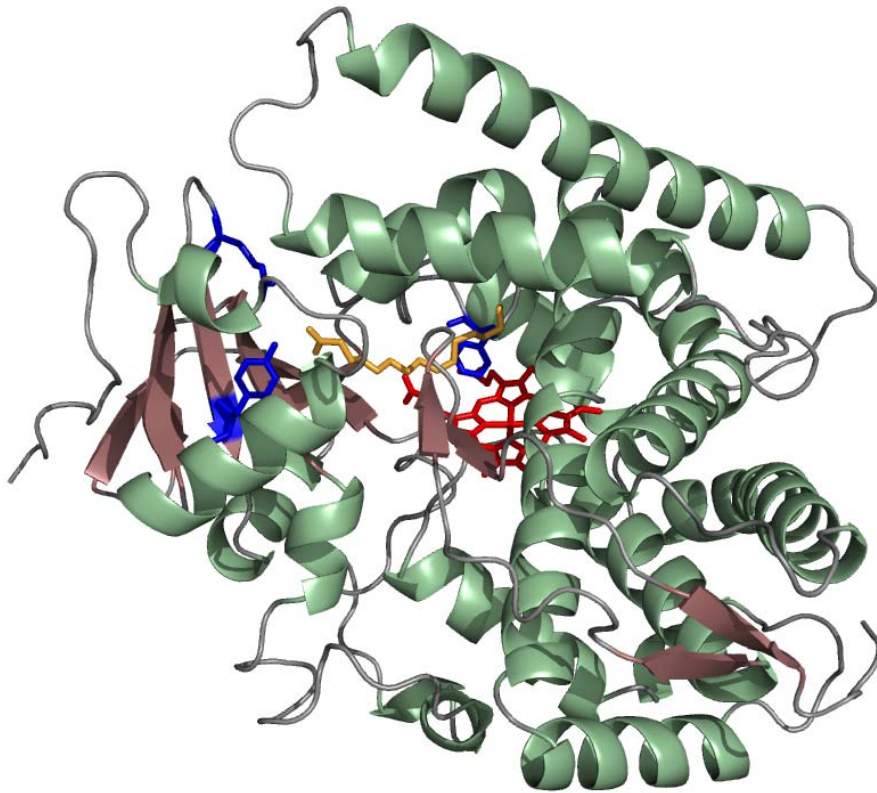


Abbildung 1.13: Kristallstruktur der Monooxygenasedomäne von P450 BM-3 (PDB-Eintrag 1FAG, (Li und Poulos 1997)). Rot: Häm-Gruppe, orange: Palmitoleinsäure, blau: drei, für die Substratbindung wichtige Aminosäuren (Y51 und R 47 am Eingang des Substratzugangskanals, F87 im aktiven Zentrum über der Häm-Gruppe).

Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Bacillus subtilis* im Jahre 1997 konnten zwei zu P450 BM-3 homologe Monooxygenasen – CYP102A2 und CYP102A3 –

identifiziert werden (ca. 64% Identität), die mittlerweile ebenfalls heterolog exprimiert und charakterisiert wurden (Budde et al. 2004, Gustafsson et al. 2004, Kunst et al. 1997, Lentz et al. 2004). Sie sind am Fettsäuremetabolismus von *B. subtilis* beteiligt, löslich und verfügen ebenfalls über eine fusionierte FAD/FMN-enthaltende Reduktasedomäne (Gustafsson et al. 2001, Lee et al. 2001).

Aufgrund der vielen Vorteile wie der Löslichkeit, dem Aufbau als Fusionsprotein aus Reduktase und Monooxygenasedomäne, der hohen Aktivität und der Stabilität sind CYP102A1, A2 und A3 aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung biotechnologischer Prozesse und wurden daher in der vorliegenden Arbeit untersucht.

### 1.2.5 Biochemische Charakterisierung von P450 Monooxygenasen

Die charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften von P450 Monooxygenasen erlauben nicht nur die exakte Bestimmung der Enzymkonzentration mittels des CO-Differenzspektrums (Omura und Sato 1964), sondern auch den Zugang zu einer Reihe verschiedener biochemischer Parameter wie Dissoziationskonstanten oder den Redoxzustand der Monooxygenasedomäne bzw. der Flavin-Kofaktoren der Reduktasedomäne. Im oxidierten, substratfreien Grundzustand weisen P450 Monooxygenasen ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei ca. 420 nm auf (Abbildung 1.14; grüne Linie), welches sich bei Substratbindung meist zu kleineren Wellenlängen verschiebt (blaue Linie). Im NADPH-reduzierten Zustand liegen die in der Reduktase vorhandenen Flavinkofaktoren ebenfalls in reduzierter Form vor, was anhand des Verschwindens einer Schulter zwischen 450 und 510 nm beobachtbar ist (schwarze Linie) (Paine et al. 2005). Nach Reduktion und Begasung mit Kohlenmonoxid bildet sich das für die P450 Monooxygenasen charakteristische und namensgebende Absorptionsmaximum bei 450 nm aus (rote Linie).

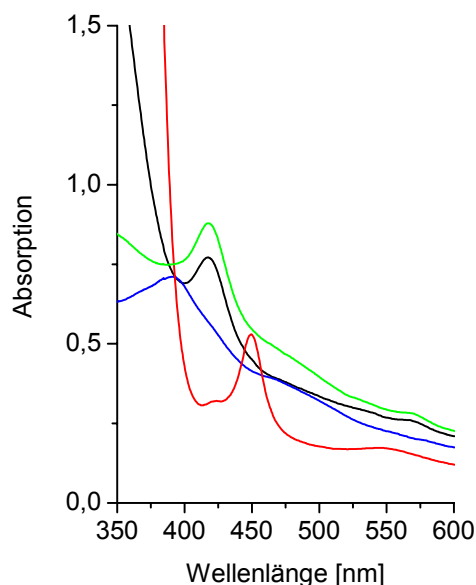


Abbildung 1.14: UV/vis-Absorptionsspektren von CYP102A2 im oxidierten Zustand (grün), im oxidierten Zustand mit gebundener Ölsäure (blau), im durch NADPH-reduzierten Zustand (schwarz) und im Dithionit-reduzierten, CO-gebundenem Zustand (rot); Abbildung aus (Budde et al. 2004).

Insbesondere die substratinduzierte Änderung des Absorptionsspektrums lässt Rückschlüsse auf die Wechselwirkung von Protein und Substrat zu und erlaubt die Bestimmung von Dissoziationskonstanten. Grundsätzlich unterscheidet man drei Arten von Substratbindungsspektren. Typ I-Spektren weisen während der Substratbindung eine Absorptionzunahme bei 390 nm und eine Absorptionsabnahme bei 420 nm auf, bei inversen Typ I-Spektren verhält es sich umgekehrt. Bei Typ II-Spektren nimmt die Absorption in einem Bereich zwischen 390 und 405 nm ab, während sie zwischen 425 und 435 nm zunimmt. Die Ursache der Änderungen des Absorptionsspektrums ist die Interaktion eines Substrates mit der Häm-Gruppe. Durch Substratbindung bzw. durch die Verdrängung des in axialer Position vorhandenen Wassers ändert sich die Aufspaltung der d-Orbitale des Häm-Eisens und somit die Energie der durch UV/vis-Spektroskopie gemessenen Elektronenübergänge. Durch Interaktion des Proteins mit Typ I Substratmolekülen wird eine Änderung des low-spin-Grundzustandes des Häm-Eisens zum high-spin Zustand bewirkt, was außerdem mit einer Änderung des Redoxpotentials einhergeht (vgl. 1.2.2). Bei Typ II Substraten handelt es sich meist um P450 Inhibitoren, die beispielsweise über ein freies Elektronenpaar direkt an das Häm-Eisen binden können (z.B. Anillin, Pyridin oder Cyanid). Die Interpretation eines inversen Typ I Spektrums gestaltet sich schwieriger, wahrscheinlich führt die Bindung eines entsprechenden Substrats zur Verdrängung weiterer, im aktiven Zentrum gebundener Wassermoleküle (Lewis 1996, Schenkman et al. 1981).

Die Messung der Aktivität von P450 Monooxygenasen geschieht durch photometrische Messung der Oxidation des Kofaktors NAD(P)H. Auf diese Weise ist es möglich eine P450-katalysierte Reaktion photometrisch *in situ* zu verfolgen, was eine exakte Bestimmung von Anfangsaktivitäten und auch 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 Reduktasedomäne 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 (der Entkopplung, 1.2.2) bestimmen zu können.

### 1.2.6 P450 Monooxygenasen für industrielle Prozesse – Probleme und Lösungen

In Abschnitt 1.1.2 wurde bereits kurz auf einige Probleme der Verwendung von P450 Monooxygenasen in der chemischen Synthese hingewiesen. Sie benötigen zusätzliche Reduktasesysteme, die den Elektronentransport ausgehend von teuren Kofaktoren wie NADH oder NADPH bewerkstelligen. Eukaryotische P450, welche aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktionstypen besonders interessant für industrielle Anwendungen sind, sind oft membrangebunden und weisen geringe Umsatzraten auf. Weitere Probleme sind der in Abschnitt 1.2.2 beschriebene unproduktive Verbrauch des Kofaktors (Entkopplung) sowie die oft geringe Stabilität des Katalysators unter Prozessbedingungen. Hinzu kommen Schwierigkeiten bei der technischen Umsetzung P450 katalysierter Prozesse. Monooxygenasen sind in organischen Lösemitteln instabil, wohingegen sich ihre Substrate und das Kosubstrat Sauerstoff in Wasser schlecht lösen. Dies macht den Einsatz von Lösungsvermittlern oder die Verwendung einer zweiten, organischen Phase erforderlich.

Ein Teil dieser Probleme, wie z.B. die Bereitstellung von Kofaktoren, kann durch die Verwendung von Ganzzellprozessen umgangen werden. Nachteile der Ganzzellbiokatalyse sind allerdings eine mögliche Toxizität des Edukts bzw. Produkts für die Zelle, Limitierung in der Substrataufnahme und der unselektive Abbau von Edukt und Produkten. Hinzu kommt ein höherer Aufwand bei der Produktisolierung (van Beilen et al. 2003).

Der Einsatz isolierter P450 Monooxygenasen stellt ebenfalls hohe Anforderungen an das Reaktionssystem, wobei hier prokaryotische P450 gegenüber ihren eukaryotischen Vertretern

einige Vorteile bieten. Sie sind meist wasserlöslich, verfügen über höhere Stabilität und weisen im Allgemeinen eine deutlich höhere Aktivität auf. Natürliche Fusionsproteine aus Monooxygenase und Reduktasedomäne wie im Fall der Monooxygenasen CYP102A1, A2 und A3 machen die zusätzliche Expression von Redoxpartnern überflüssig und tragen daher zu einer Vereinfachung des Reaktionssystems bei. Eine große Herausforderung bleibt die effiziente Versorgung der Monooxygenasen mit Elektronen. Mehrere unterschiedliche Systeme zur Kofaktorregenerierung bzw. zum Ersatz von Kofaktoren wurden in den letzten Jahren untersucht. Dabei ist die direkte Reduktion des Häm-Eisens an Elektroden (Kazlauskaitė et al. 1996) oder mit Hilfe von Mediatoren (Schwaneberg et al. 2000) eine interessante Alternative, da gänzlich auf Elektronentransportproteine und Kofaktoren verzichtet werden kann. Leider sind die bisher mit diesen Systemen gemessenen Aktivitäten für eine technische Anwendung zu gering. Eine weitere Möglichkeit ist die Reaktionsführung über den „Peroxid-shunt“-Weg (s. 1.2.2): Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid kann direkt eine reaktive Hydroperoxo-Eisen Spezies erreicht werden. Der Nachteil dieser Methode besteht in der raschen Inaktivierung des Enzyms unter diesen Reaktionsbedingungen. Die enzymatische Kofaktorregenerierung stellt das bisher effektivste Mittel zur ausreichenden Bereitstellung von Elektronen dar und konnte bereits in mehreren Prozessen erfolgreich angewandt werden. So gelang es 225 mg 14, 15-Epoxyeicosatriensäure in einem vier Liter Ansatz mit P450 BM-3 und einem auf Glucose-6-phosphatdehydrogenase basierendem Kofaktorregenerierungssystem zu synthetisieren (Falck et al. 2001). Da fast alle Dehydrogenasen, die für die Kofaktorregenerierung in Frage kommen, NADH-abhängig sind, im Gegensatz dazu aber viele P450 Monooxygenasen NADPH als Kofaktor benötigen, ist die Anzahl möglicher Regenerationssysteme begrenzt. Durch Protein Design ist es mittlerweile gelungen, die Kofaktorspezifität von P450-Reduktasen von NADPH zu NADH zu verschieben und somit die Zahl der möglichen Regenerationssysteme zu erhöhen. So konnte an unserem Institut durch Mutagenese der Reduktasedomäne von P450 BM-3 ein Prozess zur Hydroxylierung von Myristinsäure unter Verwendung einer NADH-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 etabliert werden (Maurer et al. 2005).

Weitere Eigenschaften von Proteinen, wie z.B. ihre Stabilität gegen organische Lösemittel oder hohe Temperaturen, aber auch die Aktivität gegenüber natürlichen und nicht-natürlichen Substraten, konnten in der Vergangenheit durch Protein engineering optimiert werden. Zusammen mit einer erfolgreichen Veränderung der Substratspezifität und Produktselektivität, war dies oftmals die Voraussetzung für einen wirtschaftlichen Einsatz

von Enzymen in biokatalytischen Prozessen. Im folgenden Kapitel werden einige der dabei zum Einsatz kommenden Methoden beschrieben.

## 1.3 Protein engineering

### 1.3.1 Rationales Design

Beim rationalen Protein Design nutzt man die über ein Protein verfügbaren Informationen zur gezielten Veränderung der Aminosäuresequenz durch ortsgerichtete Mutagenese. Die hierfür notwendigen Informationen stammen aus Kristallstrukturen, Homologiemodellen, Sequenzvergleichen oder bereits literaturbekannten Fakten über Struktur-Funktionsbeziehungen. Durch rationales Protein Design konnten bereits einige biotechnologisch eingesetzte Enzyme erfolgreich optimiert werden. Beispielsweise konnte die chemische und thermische Stabilität des in Waschmitteln zur Proteinhydrolyse eingesetzten Subtilisins, durch Einfügen mehrerer stabilisierender Disulfidbindungen und des Austauschs von Methionin durch Serin um mehrere Größenordnungen verbessert werden (Bryan 2000). Die bei der Synthese von  $\beta$ -Lactam Antibiotika eingesetzten Enzyme Glutarylamidase und Penicillinamidase konnten in ihrer Substratspezifität bzw. ihrer Aktivität und pH-Stabilität durch ortsgerichtete Mutagenese optimiert werden (Buchholz et al. 2005). Weitere unter den Begriff des rationalen Protein Designs zu betrachtende Ansätze sind die Optimierung der DNA-Codons zur Verbesserung heterologer Proteinexpression, Erhöhung der Löslichkeit eines Proteins durch Austausch lösemittlexponierter Aminosäuren, aber auch das *de novo* Design von Proteinen z.B. durch das Einfügen neuer Substratbindungstaschen für die Erkennung von TNT, L-Lactat, D-Lactat und Serotonin in periplasmatische Bindeproteine von *E. coli* (Looger et al. 2003).

### 1.3.2 Gerichtete Evolution

Enzyme sind die Produkte einer mehrerer Millionen Jahre langen Evolution, wodurch sie in ihrem natürlichen Umfeld perfekt auf die dort zu leistenden Aufgaben abgestimmt sind, allerdings entsprechen ihre natürlichen Eigenschaften nur selten den Anforderungen eines biotechnologischen Prozesses. Durch Nachahmung der Evolution *in vitro* ist es möglich Enzyme in kurzer Zeit, ohne nähere Kenntnis ihrer Struktur oder ihres Katalysemechanismus' entsprechend den gewünschten Eigenschaften anzupassen. Das Prinzip der gerichteten Evolution besteht in der zufälligen Erzeugung vieler Varianten des zu optimierenden Enzyms

und einem anschließenden Selektionsschritt zur Isolierung der besten Enzymvariante, die wiederum als Ausgangspunkt für die Erzeugung einer neuen Generation von Enzymvarianten dient. Nach Durchlaufen mehrerer dieser Zyklen verfügt das Enzym im Idealfall über die gewünschten Eigenschaften.

Für die Erzeugung der benötigten Vielfalt von Enzymvarianten steht eine große Bandbreite an Methoden zur Verfügung (Arnold und Georgiou 2003), wobei man generell zwei Klassen unterscheidet: die rekombinierenden und die nicht-rekombinierenden Methoden (Williams et al. 2004). Der bekannteste Vertreter bei der nicht-rekombinierenden Herstellung von Mutantenbibliotheken ist die als „error-prone-PCR“ bezeichnete fehlerhafte Polymerasekettenreaktion. Durch Verwendung einer fehleranfälligen DNA-Polymerase z.B. aus *Thermus aquaticus* in Kombination mit nicht-optimalen Reaktionsbedingungen treten bei der Synthese des Gens Fehler auf, deren Häufigkeit durch Wahl der Reaktionsparameter eingestellt werden kann. Mit Hilfe dieser Methode konnte beispielsweise die Enantioselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* von  $E=1,1$  auf  $E=25,8$  gesteigert werden (Liebeton et al. 2000). Bemerkenswert hierbei war die Tatsache, dass keine der fünf durch „error-prone-PCR“ eingeführten Mutationen im aktiven Zentrum lag, was einen der Vorteile der gerichteten Evolution unterstreicht. In einem rationalen Ansatz, z.B. durch Untersuchung der Kristallstruktur, hätten diese Positionen nie als für die Enantioselektivität des Enzyms relevant identifiziert werden können. Soll nur ein Teil eines Gens mutiert werden, können durch Kassettenmutagenese, z.B. unter Verwendung eines synthetischen Oligonukleotides, welches die gewünschten Mutationen trägt, gezielt Mutationen in einen bestimmten Bereich des Gens eingebracht werden, bei der Sättigungsmutagenese wird nur eine Aminosäure durch alle anderen 19 Aminosäuren ersetzt. Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung der Sättigungsmutagenese ist die von Wang et al. durchgeführte Änderung der Substratspezifität einer Tyrosyl-tRNA-Synthetase, die nach Sättigungsmutagenese an fünf verschiedenen Positionen im aktiven Zentrum nur noch unnatürliche Aminosäuren akzeptiert (Wang et al. 2001).

Der bekannteste Vertreter der rekombinierenden Methoden zur Herstellung von Mutantenbibliotheken ist das „DNA-shuffling“. Diese 1994 von Stemmer entwickelte Methode beruht auf der Rekombination von DNA zueinander homologer Gene (Stemmer 1994). Dabei wird die Ausgangs-DNA durch DNase I fragmentiert und ohne Zugabe von Primern mittels PCR amplifiziert. Die so erzeugten neuen Gene werden in einer anschließenden PCR unter Verwendung flankierender Primer vervielfältigt. Ausgehend von dieser Methode wurden in der darauffolgenden Zeit mehrere Verfahren zur Herstellung von

Mutantenbibliotheken entwickelt. Das „Staggered extension protocol“ (StEP) verzichtet auf die Fragmentierung durch DNase I und nutzt stattdessen viele PCR-Zyklen mit extrem kurzen Anlagerungs- und Synthesezeiten. Die dabei entstehenden Fragmente können in jedem Zyklus an eine andere Ausgangs-DNA binden (Zhao et al. 1998). Beim synthetischen „shuffling“ kommen ausschließlich synthetische Oligonukleotide zum Einsatz, welche eine definierte Zusammensetzung und definierte Überlappungsbereiche erlauben (Ness et al. 2002). Der Nachteil all dieser Methoden besteht darin, dass lediglich homologe Gene rekombiniert werden können, da ja eine gegenseitige Anlagerung während der PCR erfolgen muss. Mit Entwicklung der ITCHY-Methode durch Ostermeier können mittlerweile auch nicht homologe Gene rekombiniert werden (Ostermeier et al. 1999).

### 1.3.3 Hochdurchsatzscreening

Die größte experimentelle Herausforderung bei der gerichteten Evolution ist die Entwicklung eines leistungsfähigen Testverfahrens zur Selektion von Mutanten, welche den gewünschten Kriterien entsprechen. Solch ein leistungsfähiges Testsystem muss mehrere Eigenschaften aufweisen:

- Hochdurchsatzfähigkeit, um große Bibliotheken durchmustern zu können und somit die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Klone mit verbesserten Eigenschaften zu identifizieren
- hohe Empfindlichkeit, um in den ersten Runden der gerichteten Evolution auch Mutanten mit nur geringen Verbesserungen identifizieren zu können
- gute Reproduzierbarkeit
- Robustheit, d.h. geringe Empfindlichkeit gegen schwer zu kontrollierende und somit schwankende Reaktionsbedingungen
- Spezifität bezüglich der gewünschten Eigenschaften

Insbesondere der letzte Punkt birgt große Herausforderungen, vor allem dann, wenn im Testsystem nicht das spätere Substrat sondern Substratanaloga eingesetzt werden. Oftmals werden Substrate mit chromophoren oder fluorophoren Gruppen derivatisiert, welche nach der Reaktion durch das Enzym freigesetzt werden. Je stärker die so hergestellten Substratanaloga strukturell von dem eigentlichen Substrat abweichen, desto größer ist das Risiko, dass die im Hochdurchsatzscreening identifizierte Mutante das eigentliche Substrat nicht umsetzt („you get, what you screen for“ (You und Arnold 1996)). Einige Testverfahren



können direkt auf Agarplatten durchgeführt werden, wobei positive Klone visuell z.B. durch Farbbildung oder Farbänderung zu identifizieren sind, der Großteil der Screeningverfahren macht aber die Überführung der Mutanten in Mikrotiterplatten sowie die anschließende Kultivierung und Proteinexpression erforderlich. Liegt das Zielprotein intrazellulär vor, muss ein Zellaufschluss in Mikrotiterplatten durchgeführt werden, daran schließt sich meist ein photometrischer oder fluorometrischer Test unter Verwendung eines Mikrotiterplattenspektrometers an. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren Hochdurchsatzscreeningsysteme auf Basis von Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie oder Gaschromatografie entwickelt, die allerdings einen enormen apparativen Aufwand erfordern und somit in der breiten Anwendung momentan keine Rolle spielen (Reetz 2003).

Bei der Vielzahl der bis heute entwickelnden Hochdurchsatztests ist es an dieser Stelle nicht möglich einen umfassenden Überblick zu geben, daher beschränken sich die im Folgenden gewählten Beispiele auf Testverfahren zur Optimierung der im Rahmen dieser Arbeit behandelten P450 Monooxygenasen.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe verschiedener Hochdurchsatztests zur Optimierung von P450 Monooxygenasen durch gerichtete Evolution entwickelt. Am gebräuchlichsten sind dabei die auf Absorptionsmessung basierenden Verfahren. Eine universell einsetzbare Methode ist beispielsweise die photometrische Messung des Kofaktorverbrauchs (Glieder und Meinhold 2003). NAD(P)H absorbiert bei einer Wellenlänge von 340 nm, während es in oxidiertem Zustand keine Absorption bei 340 nm aufweist. Die Enzymaktivität kann somit unabhängig vom eingesetzten Substrat gemessen werden. Diese indirekte Bestimmung der Enzymaktivität birgt allerdings das Risiko, Mutanten im Hochdurchsatzscreening zu identifizieren, deren Kofaktorverbrauch in hohem Maß von der Produktbildung entkoppelt ist (s. 1.2.2). Dennoch konnten mit dieser Testreaktion Erfolge bei der Optimierung von P450 BM-3 erzielt werden. So konnten Glieder und Mitarbeiter eine Mutante von P450 BM-3 isolieren, die in der Lage ist Alkane mit einer Kettenlänge von C3-C8 umzusetzen (Glieder et al. 2002). Andere photometrische Tests beruhen auf der Detektion farbiger Verbindungen, welche entweder durch Reaktion des Produkts mit einer Testsubstanz entstehen oder die durch die enzymatische Reaktion aus dem Substrat freigesetzt werden. Ein Beispiel für die erste Methode ist die Detektion phenolischer Verbindungen durch Reaktion mit Gibbs' Reagenz, 4-Aminoantipyrin oder „Fast Violett B“ (Abbildung 1.15, A-C) (Otey und Joern 2003). Die Derivatisierung von Substraten (z.B. Alkane oder Fettsäuren) mit Paranitrophenol ist ein Beispiel für die letztgenannte Methode: Nach P450-katalysierter Hydroxylierung des Substrats entsteht ein instabiles Halbacetal, welches spontan zerfällt und das photometrisch

bei 410 nm detektierbare Paranitrophenolat freisetzt (Abbildung 1.15, D) (Schwaneberg et al. 1999). Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von P450 Aktivität im Hochdurchsatzscreening ist die Messung der Fluoreszenz eines entstehenden Produkts, wie im Fall der Dealkylierung von 7-Ethoxycoumarin (s. 1.2.3). Ein großer Vorteil bei der Messung von Fluoreszenzsignalen ist die im Vergleich zur Absorptionsmessung hohe Empfindlichkeit der Methode. Durch Verwendung einer zweiten enzymkatalysierten Reaktion gelang es am ITB, ein für die Produktion von 1-Oktanol selektives, hochdurchsatzfähiges Testsystem zu entwickeln. Dabei wird nach der P450-katalysierten Hydroxylierung von n-Oktan eine Alkoholdehydrogenase zugegeben, die hochspezifisch 1-Oktanol zu Oktanal oxidiert. Die dabei stattfindende Reduktion von NAD zu NADH lässt sich photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm verfolgen (Lentz et al. 2006).

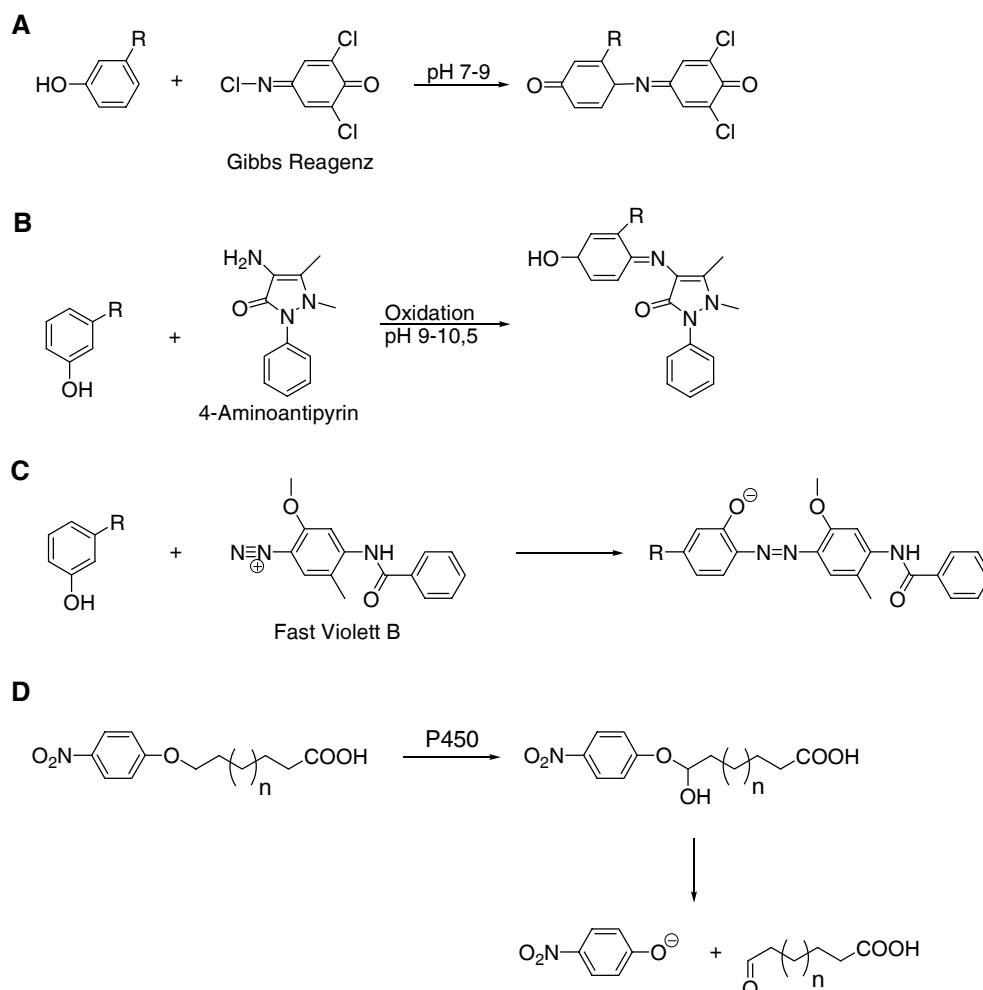


Abbildung 1.15: Nachweisreaktionen für phenolische Verbindungen mit: (A) Gibbs Reagenz; (B) 4-Aminoantipyrin; (C) Fast Violett B; (D) Detektion der Hydroxylierung von Fettsäuren mit Paranitrophenol-derivatisierten Substraten.

### 1.3.4 Datenbasiertes Protein-Design

Die Frage, welche Methode des Protein Designs mit höherer Wahrscheinlichkeit zum Erfolg führt – rationales Design oder gerichtete Evolution – stellt sich heutzutage nur noch bedingt, da mittlerweile Verfahren zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe die Vorteile beider Ansätze kombiniert werden können. Das über ein Protein vorhandene Wissen kann zur Limitierung der Größe von Mutantenbibliotheken herangezogen werden und erlaubt trotzdem die Identifizierung nicht rational vorhersagbarer Mutationen mit positiven Effekten. Unter „verfügbarem Wissen“ versteht man dabei Kristallstrukturen mit und ohne gebundenem Substrat, Informationen aus Sequenzvergleichen und phylogenetischen Bäumen, Homologiemodellen, Erkenntnisse aus molekulardynamischen Simulationen, Ergebnisse aus der Durchmusterung kleiner „Test-Bibliotheken“ und schließlich die bereits in der Literatur beschriebenen Eigenschaften des Proteins (Chaparro-Riggers et al. 2007).

Bei der Planung einer Bibliothek muss die Methode entsprechend den gewünschten Zielen gewählt werden. Steht die Optimierung der Regio- oder Stereoselektivität eines Enzyms im Vordergrund, sind meistens Aminosäuren im oder in der Nähe des aktiven Zentrums aussichtsreiche Kandidaten für Mutageneseexperimente. Andere Proteineigenschaften wie Stabilität und Aktivität können prinzipiell durch Mutationen über die ganze Proteinsequenz hinweg verbessert werden (Morley und Kazlauskas 2005). Ein weiterer zu beachtender Punkt sind durch mehrere gleichzeitige Mutationen erzielte Synergieeffekte. Um diese identifizieren zu können, müssen also beide Mutationen parallel auftreten, was beispielsweise bei Verwendung der klassischen „error-prone-PCR“ sehr unwahrscheinlich ist. Insbesondere die Eigenschaft der „error-prone-PCR“, nur wenige Aminosäuren pro Position (zwischen drei und sieben) durch die Substitution eines Nukleotids austauschen zu können, limitiert die Diversität einer Bibliothek. Die Herstellung fokussierter Bibliotheken, z.B. durch Kombination von Sättigungsmutagenese an mehreren Positionen, erlaubt dagegen die Untersuchung des gesamten Sequenzraumes in einem definierten Bereich. Das erst kürzlich von Reetz und Mitarbeitern entwickelte iterative „CASTing“-Verfahren macht sich dieses Prinzip der parallelen Sättigungsmutagenese zu Nutze und kombiniert es mit einem evolutiven Ansatz. Mit Hilfe dieser Methode konnte nach Durchmusterung von lediglich 20.000 Klonen die Enantioselektivität einer Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* von  $E=4,6$  auf  $E=115$  erhöht werden (Reetz et al. 2006).

Aufgrund der Fülle an verfügbaren Daten über das in dieser Arbeit näher untersuchte P450 BM-3 wurde versucht, datenbasierte Bibliotheken entsprechend den hier zusammengefassten

Prinzipien zu erstellen und damit die Zahl der zu durchmusternden Klone möglichst gering zu halten.

### 1.3.5 Protein engineering von P450 Monooxygenasen

Durch Anwendung von Methoden des rationalen Protein Designs sowie der gerichteten Evolution ist es in der Vergangenheit gelungen, verschiedene Eigenschaften von P450 Monooxygenasen zu verändern. So sind durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellte Mutanten von P450 BM-3 in der Lage, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe als Substrate zu akzeptieren (Carmichael und Wong 2001). Durch gerichtete Evolution konnte P450 BM-3 zu einer Ethanhydroxylase mutiert werden (Meinhold et al. 2005). Am Institut für Technische Biochemie gelang durch Sättigungsmutagenese an drei verschiedenen Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum von P450 BM-3 die Herstellung einer Indol-Hydroxylase (Li et al. 2000) die, wie sich später herausstellte, eine Vielzahl weitere Verbindungen wie Alkane, Cycloalkane, Aromaten und Heteroaromaten mit hohen Umsatzraten oxidiert (Appel et al. 2001). Kürzlich gelang eine Veränderung der Regioselektivität von CYP102A3 zur überwiegenden Produktion von 1-Oktanol (Lentz et al. 2006). P450<sub>cam</sub> aus *Pseudomonas putida* konnte anhand von Kristallstrukturen durch rationales Protein Design für die selektive Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen optimiert werden (Bell et al. 2003). Auch humane P450 Monooxygenasen wurden bereits erfolgreich durch verschiedene Methoden des Protein Designs mutiert. Wu et al. konnten die Aktivität von CYP2A6 durch „StEP“ und „error-prone-PCR“ (s. 1.3.2) gegen verschiedene Indol-Derivate erhöhen (Wu et al. 2005). Die Stabilität von Monooxygenasen wurde in der Vergangenheit ebenfalls erfolgreich verbessert, so konnte die Halbwertstemperatur der P450 BM-3 Monooxygenasedomäne bei 10-minütiger Inkubation von 46°C auf 61°C erhöht werden (Salazar et al. 2003), durch „error-prone-PCR“ wurde die Lösungsmittelstabilität von P450 BM-3 in THF um das Zehnfache gesteigert (Seng Wong et al. 2004).

## 1.4 Zielsetzung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde näher auf die mit dem biotechnologischen Einsatz von P450 Monooxygenasen verbundenen Schwierigkeiten und Chancen eingegangen, wobei besonderes Augenmerk auf die für eine erfolgreiche Etablierung eines biotechnologischen Prozesses nötige Wertschöpfung gelegt wurde. Infolgedessen bestand das Ziel dieser Arbeit in der selektiven Oxidation preiswerter Substrate mittels P450 Monooxygenasen zur Produktion teurer Feinchemikalien. Bei den untersuchten Substraten handelte es sich um  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen, welche in großen Mengen als Abfallstoff der Zellstoffindustrie anfallen sowie um eine Reihe von hoch verzweigten Fettsäuren und Fettsäurederivaten, die aus Bürzeldrüsenfetten gewonnen werden können. Die vorrangige Aufgabe war die selektive Oxidation von  $\alpha$ -Pinen zur Produktion von Pinenepoxid, welches den Zugang zu einer Reihe weiterer Verbindungen mit interessanten sensorischen und pharmakologischen Eigenschaften erlaubt (s. Abbildung 1.2), sowie zur Herstellung von Verbenol, dessen Marktpreis (abhängig vom Anbieter) bei mehreren 1.000 € kg<sup>-1</sup> liegt. Die Substitution komplexer Syntheserouten zur Produktion von Makrolidantibiotika durch selektive Hydroxylierung hoch verzweigter Substrate mit P450 Monooxygenasen war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Daraus ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

1. die Durchmusterung der am ITB bereits vorhandenen P450 Monooxygenasen CYP102A1, A2 und A3 sowie deren Mutanten, um Enzyme mit der oben beschriebenen, gewünschten Regioselektivität identifizieren zu können
2. die Weiterentwicklung der in 1. identifizierten P450 Mutanten durch verschiedene Methoden des rationalen Protein Designs bzw. des Daten-basierten Protein Designs zur Erhöhung der Regioselektivität sowie der Aktivität gegenüber den oben erwähnten Substraten
3. die Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen, produktspezifischen Testsystems zur Durchmusterung von P450 Mutantenbibliotheken
4. Optimierung und Automatisierung der Zellkultivierung, der Proteinexpression und des Zellaufschlusses von *E.coli* in Mikrotiterplatten für die Durchmusterung von P450 Mutantenbibliotheken im Hochdurchsatz

- 
5. Charakterisierung der besten P450 Mutanten in Langzeitexperimenten, um deren Potential für eine biotechnologische Anwendung abschätzen zu können, sowie die Produktion der gewünschten Produkte im Labormaßstab

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmittel

Material	Hersteller
Pipettenspitzen, Petrischalen rund 9.4 cm Ø, Mikrotiterplatten 96 Kavitäten 200 µl – 2.5 ml	Greiner, Nürtingen Ritter, Schwabmünchen
0.5, 1.5 und 2.0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter (0.2 µm und 0.45 µm Porengröße)	Millipore, Molsheim, Frankreich
UV-Küvetten QG	Hellma, Müllheim
1.5 ml Vis-Einwegküvetten	Multimed, Kirchheim u. T.
Dialysemembranen MWCO 12 kDa	Spectrum Medical Industries Inc., Laguna Hills, USA
GC-Rollrandflaschen, µ-Einsätze und PTFE-Septen	WICOM GmbH, Heppenheim

#### 2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton, Ethanol 98% für die Analyse, tert.-Butylmethylether, Natriumcarbonat, 2-Propanol, Schwefelsäure	Riedel-deHaën, Seelze
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30%, Bacto-Pepton, Pepton	Roth GmbH, Karlsruhe
Agar, Ammoniumhydroxid, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ammoniumsulfat, Ampicillin Natriumsalz, Bromphenolblau, Butylacetat, Calciumchlorid Dihydrat, Cobaltchlorid Hexahydrat, Coomassie Brilliant Blue R250, Diethylether für die Analyse, Dimethylsulfoxid (DMSO), di-Kaliumhydrogenphosphat, di-Natriumhydrogen-phosphat, Eisendichlorid Hexahydrat, Eisensulfat Heptahydrat, Ethidiumbromid, Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA), D-Glucose Monohydrat, Glycin, Hefeextrakt, Imidazol, Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid (IPTG), Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kupferchlorid Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Manganchlorid, β-Mercaptoethanol, 1-Methoxy-2-propanol, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid, Natrium-dithionit, Natriummolybdat Dihydrat, Nickelchlorid, N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), Orange-G, (-)-α-Pinen, (-)-β-Pinen, ortho-Phosphorsäure, Rubidiumchlorid, Salzsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

---

35 %, Vanillin, Wasser für die Molekularbiologie, Zinkchlorid	
Agarose, Harnstoff, 1 kb DNA Ladder	Gibco, Eggenstein
BioRad Proteinassay Kit, SDS-PAGE Proteinstandard (broad range)	BioRad, Richmond, USA
Glycerin, Methanol, Tris(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)	Roche, Mannheim
Trypton	DIFCO, Detroit, USA
Mangansulfat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs, 10 mM)	Promega, Madison, USA
Ni-Sepharose HP	Amersham Bio-science, Freiburg
Ni-NTA	Qiagen, Hilden
(-)-cis-Verbenol, trans-Sobrerol, (-)- $\alpha$ -Pinenoxid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
NE4-Puffer, BSA	New England Biolabs, Frankfurt

---

### 2.1.3 Kits

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)

---



### 2.1.4 Stämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Anbieter
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	supE44, $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1relA1	Clontech, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ; ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ); dcm; gal $\lambda$ (DE3)	Novagen, Bad Soden
<i>Escherichia coli</i>	NovaBlue (DE3)	F <sub>-</sub> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen, Leek, Niederlande

### 2.1.5 Plasmide

Plasmid	Referenz/Herkunft
pET28a(+)	EMD Biosciences (Novagen), San Diego, USA
pET22b(+)	EMD Biosciences (Novagen), San Diego, USA
pCYTEXP1	Belev et al. (Belev et al. 1991)

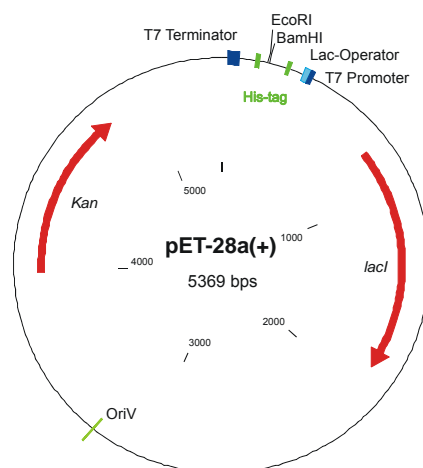


Abbildung 2.1: Plasmidkarte des pET28a(+)-Vektors; Kan: Gen für die Kanamycinresistenz (Aminoglycosid-3'-phosphattransferase); lacI: Gen für das Lac-Repressor-protein; OriV: Replikationsursprung.

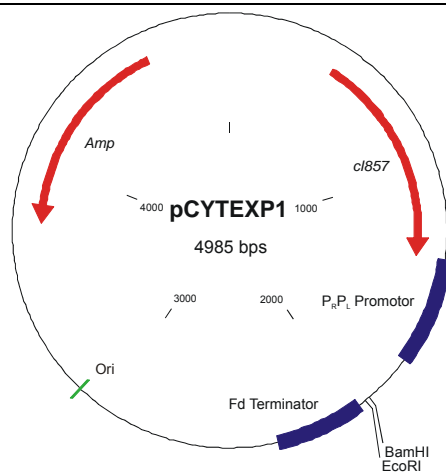


Abbildung 2.2: Plasmidkarte des pCYTEXP1-Vektors; Amp: Gen für Ampicillinresistenz ( $\beta$ -Lactamase); cI857: Gen für das cI857 Repressorprotein;  $P_{R}P_{L}$  Promotor: Tandempromotoren aus  $\lambda$ -Phage; Ori: Replikationsursprung.

### 2.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	
MunI, BspTI	Fermentas, Litauen
<b>PCR-Anwendungen</b>	
Pfu DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
<b>Weitere Enzyme und Proteine</b>	
Lysozym aus Hühnereiweiß, DNase	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Formiatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101, (NADP <sup>+</sup> -abhängige Mutante der Formiatdehydrogenase)	Jülich Chiral Solutions, Jülich
Katalase aus Rinderleber	Fluka
DNase I aus Rinderpankreas	Sigma
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Litauen

### 2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden bei Sigma-ARK, Darmstadt oder Metabion, Martinsried gekauft. Das für die Mehrfachsättigungsmutagenese verwendete Oligonukleotid wurde von Entelechon, Regensburg synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (in 5'→3' Richtung)	Verwendung
K69H_f	GCATGCGATGAATCACGCTTTGAT <b>CAC</b> AACTTA AGTCAAGGTC	Punktmutation K69H
K69H_r	GACCTTGACTTAAGTT <b>GTG</b> ATCAAAGCGTGATT CATCGCATGC	Punktmutation K69H
K69R_f	GCATGCGATGAATCACGCTTTGAT <b>AGG</b> AACTTA AGTCAAGGTC	Punktmutation K69R
K69R_r	GACCTTGACTTAAGTT <b>CCT</b> ATCAAAGCGTGATT CATCGCATGC	Punktmutation K69R
V87L_f	GCAGGAGACGGGTTA <b>TTG</b> ACAAGCTGGACGC	Punktmutation V87L
V87L_r	GCGTCCAGCTTGT <b>CAA</b> TAACCCGTCTCCTGC	Punktmutation V87L
F87I_f	GCAGGAGACGGGTTA <b>ATT</b> ACAAGCTGGACGC	Punktmutation V87I
F87I_r	GCGTCCAGCTTGT <b>AAT</b> TAACCCGTCTCCTGC	Punktmutation V87I
F87A_f	GCAGGAGACGGGTTA <b>GCG</b> ACAAGCTGGACGCA TG	Punktmutation V87A
F87A_r	CATGCGTCCAGCTTGT <b>CGC</b> TAACCCGTCTCCTG C	Punktmutation V87A
R47_f	CTTTAAATTCGAGGCGCCTGGT <b>NNN</b> GTAACGCG CTACTTATCAAGTCAG	Sättigungsmuta- genese R47
R47_r	CTGACTTGATAAGTAGCGCGTTAC <b>NNN</b> ACCAG GCGCCTCGAATTTAAAG	Sättigungsmuta- genese R47
Y51_f	CCTGGTCGTGTAACGCGC <b>NNN</b> TTATCAAGTCAG CGTC	Sättigungsmuta- genese Y51
Y51_r	GACGCTGACTTGATAA <b>NNN</b> GCGCGTTACACGA CCAGG	Sättigungsmuta- genese Y51
F87_f	GCAGGAGACGGGTTA <b>NNN</b> ACAAGCTGGACGCA TG	Sättigungsmuta- genese F87
F87_r	CATGCGTCCAGCTTGT <b>NNN</b> TAACCCGTCTCCTG C	Sättigungsmuta- genese F87
L188_f	GAAGCAATGAACAAG <b>NNN</b> CAGCGAGCAAATCC AG	Sättigungsmuta- genese L188
L188_r	CTGGATTTGCTCGCTG <b>NNN</b> CTTGTTTCATTGCTTC	Sättigungsmuta- genese L188
BM3_RO	ATGACAATTAAGAAATGCCT	Sequenzierung

**2.1.8 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarosegelelektrophoreseapparaturen</b>	
DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT, Power Pac 3000, Power Pac 300, Modell200/2.0 Power Supply	BioRad, Hercules, USA
<b>Brutschränke</b>	
<b>WTE</b>	
UM500	Binder, Tuttlingen Memmert, Schwabach
<b>Fermenter</b>	
Bioengineering 30 l	Bioengineering, Wald, Schweiz
<b>Gaschromatograf/Massenspektrometer</b>	
GC/MS QP2010	Shimadzu, Duisburg
<b>GC-Säule</b>	
FS-Supreme-5	Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
<b>Inkubatoren</b>	
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Botmingen, Schweiz
Mikrotiterplatteninkubator TiMix5 control	Bühler, Hechingen
<b>SDS-PAGE</b>	
Modell583 Gel Dryer	BioRad, Hercules, USA
Minigel-Twin G42	Whatman Biometra, Göttingen
<b>PCR</b>	
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
<b>pH-Meter</b>	
Digital pH Meter pH525	WTW, Weilheim
<b>Schüttler</b>	
Vibrax VXR für 1.5 / 2 ml Reaktionsgefäße	IKA, Staufen
MS1 Minishaker für Mikrotiterplatten	IKA, Staufen
<b>Photometer</b>	
Spectramax 340 PC für MTP	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 3000	Amersham Bioscience, Freiburg
<b>FPLC</b>	
Äkta Explorer	Amersham Bioscience, Freiburg
<b>Rotoren</b>	
A-4-62	Eppendorf, Hamburg

SS-34, SLA-3000	Sorvall, Langensfeld
<b>Thermomixer</b>	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
<b>Waagen</b>	
MC1 Research RC 210 D	Sartorius, Göttingen
HF-2000 G	A&D Weighing, San Jose, USA
<b>Ultraschalldesintegrator</b>	
Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
<b>Hochdruckhomogenisator</b>	
APV Rannie Homogenizer	Invensys APV, Unna
<b>Zentrifugen</b>	
Eppendorf Zentrifuge 5417 C, Eppendorf Zentrifuge 5415 R, Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Universal 30 F	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Concentrator 5301 ("Speedvac")	Eppendorf, Hamburg
<b>Pickroboter</b>	
Biopick automated colony picking system	Biorobotics, Woburn, USA
<b>Pipettierroboter</b>	
Janus Automated Workstation	Perkin-Elmer, Rodgau, Jügesheim

### 2.1.9 Kulturmedien

<b>LB-Medium (Hochsalz):</b>	10 g	NaCl
(Luria-Bertani)	10 g	Trypton/Pepton aus Casein
	5 g	Hefeextrakt
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
	pH	1
<b>TB-Medium</b>	12 g	Trypton/Pepton aus Casein
(Terrific Broth)	24 g	Hefeextrakt
	4 ml	Glycerin
	ad 900 ml	H <sub>2</sub> O
	100 ml	Phosphatpuffer pH 7,5 (0,17M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (separat autoklaviert)
<b>SOC-Medium</b>	20 g	Trypton/Pepton aus Casein
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl

	10 ml	250 mM KCl-Lösung
	ad 1 l	H <sub>2</sub> O
	5 ml	2 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung (separat autoklaviert)
	20 ml	1 M Glucose-Lösung (sterilfiltriert)
<b>Induktionslösung</b> (für 16 MTP)	180 ml	TB-Medium
	30 µg/ml	Kanamycin
	7 mM	5-Aminolävulinsäure
	1,75 mM	IPTG
	315 µl	Spurensalzlösung
<b>Spurensalzlösung</b>	0,5 g	MgCl <sub>2</sub>
	30 g	FeCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O
	1 g	ZnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O
	0,2 g	CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O
	1 g	NaMoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O
	0,5 g	CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O
	1 g	CuCl <sub>2</sub>
	0,2 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	1 l	HCl (10%)

Alle Kulturmedien wurden bei 121°C 20 Minuten lang autoklaviert oder sterilfiltriert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Kulturmedium vor dem Autoklavieren 16 g/l Agar zugegeben. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach Abkühlen auf ca. 50°C. Bei flüssigen Kulturen erfolgte die Zugabe des Antibiotikums erst kurz vor der Verwendung. Die Endkonzentration von Kanamycin betrug 30 µg/ml, die von Ampicillin 100 µg/ml.

#### 2.1.10 Puffer

<b>TE-Puffer</b>	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	pH	8,0
<b>EB-Puffer</b>	10 mM	Tris
	pH	8,4
<b>TAE-Puffer</b> (50-fach konzentriert)	242 g	Tris
	57 ml	Essigsäure 100%
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
	pH	8,0
<b>DNA-Probenpuffer</b>	12,01 g	Harnstoff
	0,21 g	EDTA

	25 ml	Glycerin
	50 mg	Bromphenolblau
	ad 50 ml	dH <sub>2</sub> O
<b>TfbI-Puffer</b>	0,59 g	KOAc
	2,42 g	RbCl
	0,29 g	CaCl <sub>2</sub>
	2,0 g	MnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O
	30 ml	Glycerin
	200 ml	dH <sub>2</sub> O
	pH	5,8 (HOAc)
<b>TfbII-Puffer</b>	0,21 g	MOPS
	1,1 g	CaCl <sub>2</sub>
	0,12 g	RbCl
	15 ml	Glycerin
	100 ml	dH <sub>2</sub> O
	pH	6,5 (NaOH)
<b>SDS-Elektrodenpuffer</b>	30g	Tris
	144 g	Glycerin
	10 g	SDS
	ad 2 l	dH <sub>2</sub> O
<b>Lower Tris-Puffer</b>	36.34 g	Tris
	0,8 g	SDS
	200 ml	dH <sub>2</sub> O
	pH	8,8 (HCl)
<b>Upper Tris-Puffer</b>	12,11 g	Tris
	0,8 g	SDS
	200 ml	dH <sub>2</sub> O
	pH	6.8 (HCl)
<b>SDS-Probenpuffer</b>	500 mM	Tris/HCl pH 6,8
	10% (v/v)	Glycerin
	20% (v/v)	SDS
	2% (w/v)	Mercaptoethanol
	0,05% (m/v)	Bromphenolblau
<b>Entfärbelösung</b>	300 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure (100%)
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O

<b>Färbelösung</b>	100 ml 250 mg	Entfärbelösung Coomassie Brilliant Blue
<b>IMAC-Waschpuffer</b>	100 mM 50 mM 50 mM pH	NaCl KPi Imidazol 7,5
<b>IMAC-Elutionspuffer</b>	100 mM 50 mM 400 mM pH	NaCl KPi Imidazol 7,5
<b>Kaliumphosphat-Puffer (KPi-Puffer)</b>	50 mM pH	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,5 (KOH)
<b>Formiat-Puffer (10-fach konzentriert)</b>	3 M 50 mM pH	Natriumformiat KPi 7,5
<b>Aufschlusspuffer</b>	50 mM 10 mM 1 mg/ml 0,05 U/ml pH	KPi MgCl <sub>2</sub> Lysozym DNase 7,5
<b>Vanillin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Reagenz</b>	42,5 ml 5 ml 2,5 ml 0,25 g	Ethanol Essigsäure Schwefelsäure Vanillin

### 2.1.11 Stammlösungen

Kanamycin-Stammlösung: 30 mg Kanamycinsulfat in 1 ml dH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg Ampicillin in 1 ml dH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Stammlösung: 1 M in dH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle Verfahren zur Vervielfältigung und Manipulation von DNA basieren auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1988, Saiki et al. 1985) Mit Hilfe der PCR ist es unter anderem möglich DNA-Fragmente oder ganze Plasmide zu kopieren und gezielt Mutationen einzubringen.

*Prinzip:*

1. Denaturierung: Bei 95°C wird die zu kopierende, doppelsträngige Ausgangs-DNA (Template) in ihre Einzelstränge aufgetrennt.
2. Anlagerung (Annealing): Synthetische Oligonukleotide (Primer) binden spezifisch an komplementäre Bereiche der einzelsträngigen Ausgangs-DNA. Sie markieren den zu amplifizierenden Bereich.
3. Synthese: Bei 72°C synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern in 3'-Richtung, den neuen DNA-Strang. Die Ausgangs-DNA dient dabei als Vorlage. Üblicherweise finden hier *Taq*- Polymerase aus *Thermus aquaticus*, beziehungsweise *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* Verwendung, wobei Letztere aufgrund einer geringeren Fehlerrate bevorzugt wird.

Durch erneutes Erhitzen auf 95°C erhält man wieder DNA-Einzelstränge, die im nächsten Zyklus als Template dienen. Beim Durchlaufen mehrerer Zyklen (bis zu 30) findet also eine exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA statt.

Die gezielte Einführung von Mutationen (ortsgerichtete Mutagenese) erfolgt, entsprechend der Methode des Stratagene QuikChange Kits, durch Verwendung von Punktmutationsprimern. Diese sind 30 bis 45 Basen lang und zueinander komplementär. Mittig tragen sie das neue, von der Ausgangs-DNA abweichende, Codon. Ihre Schmelztemperatur wurde mittels des im Internet frei verfügbaren Programms „Oligocalculator“ berechnet (<http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>; März 2007) und lagen zwischen 65°C und 70°C. Die typische Zusammensetzung eines Quikchange-PCR Ansatzes ist in Tabelle 2.1 dargestellt, in Tabelle 2.2 ist das dazu entsprechende Temperaturprogramm dargestellt.

Tabelle 2.1: Pipettierschema eines Quikchange-Ansatzes

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
Plasmid-DNA (40-80 ng/ $\mu$ l)	2
Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)	1
Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)	1
dNTPs (10 mM/dNTP)	1
<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	5
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2
ddH <sub>2</sub> O	38

Tabelle 2.2: Temperaturprogramm für eine Quikchange PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	0,5	
Anlagerung	60 (+0,4 $^{\circ}$ C pro Zyklus)	1	16
Synthese	72	16,5	

Nach Abschluss der Polymerase-Kettenreaktion wurden der Reaktionsmischung 2 $\mu$ l einer *DpnI*-Lösung zugegeben und 2 Stunden bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. *DpnI* ist eine DNase aus *Streptococcus pneumoniae*, die methylierte DNA selektiv abbaut. Die aus *E.coli* DH5 $\alpha$  Zellen isolierte Plasmid-DNA ist methyliert und wird dementsprechend abgebaut, wohingegen die während der PCR synthetisierten neuen DNA-Moleküle, welche die gewünschte Mutation enthalten, intakt bleiben. Nach der zweistündigen Inkubation wurden 3 $\mu$ l des PCR-Ansatzes direkt in 200  $\mu$ l kompetente *E.coli* Nova Blue (DE3) Zellen transformiert.

Eine Variation der oben beschriebenen ortsgerichteten Mutagenese stellt die Sättigungsmutagenese dar. Hierbei wird eine Aminosäure nicht durch eine definierte andere Aminosäure ersetzt, es werden vielmehr durch Einsatz von degenerierten Mutageneseprimern alle theoretisch möglichen Aminosäuren statistisch eingebaut. Nach der Transformation erhält man also eine Mutantenbibliothek, die theoretisch 20 verschiedene Mutanten enthält. Die erhaltenen Kolonien wurden in Mikrotiterplatten gepickt und dort in 150  $\mu$ l DMSO-haltigem TB-Puffer (5% v/v) bei 37 $^{\circ}$ C und 600 UpM kultiviert. Die Mikrotiterplatten wurden dann als Stammpplatten bei -80 $^{\circ}$ C gelagert.

Die Herstellung größerer Mutantenbibliotheken durch Sättigungsmutagenese an drei verschiedenen Positionen erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode. Jedoch wurde nach jeder PCR das erhaltene, *DpnI*-behandelte Produkt mittels Agarosegelelektrophorese

und anschließender Gelextraktion aufgereinigt, bevor es als Template in der nächsten PCR diente.

#### 2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des GenElute™ Miniprep Kits, basierend auf der Methode der alkalischen Lyse. Proteine und genomische DNA werden nach der alkalischen Lyse gefällt, die Plasmid-DNA wird an einer Kieselgelmembran gebunden und mit Ethanol gewaschen, bevor sie mit EB-Puffer von der Membran eluiert wird.

*Durchführung:* 5 ml einer *E.coli* Übernacht-Kultur wurden geerntet und in 200 µl DNase-haltigem Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl alkalischem Lysepuffer aufgeschlossen. Die Zugabe von 350 µl essigsäurehaltigem Neutralisierungspuffer führt zum Ausfallen von Proteinen und genomischer DNA, welche bei 13400 UpM 10 min abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde auf eine Kieselgelmembran aufgetragen, mit 600 µl Ethanol gewaschen und mit 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA entsprechend ihrer Größe erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden 40 ml 1%ige Agaroselösung in TAE-Puffer mit 5 µl einer 1%igen Ethidiumbromid Lösung versetzt und in einen Gelträger gefüllt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die mit ca. 30% (v/v) DNA-Probenpuffer versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert und 30 min bei 120 V elektrophoretisch getrennt. TAE-Puffer diente hierbei als Elektrolyt. Zur präparativen Auftrennung von DNA wurden 60 ml 1%ige Agaroselösung verwendet.

#### 2.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA wurde zur Aufreinigung aus präparativen Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers extrahiert. Maximal 400 mg Agarose mit dem entsprechenden DNA-Fragment wurden hierzu mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem Puffer bei 50°C aufgelöst. Die erhaltene Lösung wurde auf eine Kieselgelmembran gegeben. Die Isolierung der DNA erfolgte analog zu dem in Abschnitt 2.2.1.2 beschriebenen Verfahren.

## 2.2.1.5 Restriktion der Plasmid-DNA und des Oligonukleotids

Die Herstellung der Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek über einen Klonierungsansatz erforderte hier zunächst die sequenzspezifische Spaltung der Plasmid-DNA bzw. des Oligonukleotids mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *MunI* und *BspTI*, die entsprechenden Pipettierschemata sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte bei 37°C über Nacht. Das Oligonukleotid wurde nach dem Verdau mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die verdauten Plasmide wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt.

Tabelle 2.3: Pipettierschema der Restriktionsansätze.

	Restriktion des Oligonukleotids	Restriktion des Plasmids
Oligonukleotid/Plasmid-DNA	(13 ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) 35 $\mu\text{l}$	(50 ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) 25 $\mu\text{l}$
NE-Puffer (10x)	7 $\mu\text{l}$	7 $\mu\text{l}$
BSA (1 mg/ml)	7 $\mu\text{l}$	7 $\mu\text{l}$
<i>MunI</i>	10 U	10 U
<i>BspTI</i>	10 U	10 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 70 $\mu\text{l}$	ad 70 $\mu\text{l}$
Elutionsvolumen	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

## 2.2.1.6 Ligation

Die Ligation der gereinigten und geschnittenen DNA (Plasmid-DNA und Oligonukleotid) erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase bei 16 °C über Nacht, das Pipettierschema ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Pipettierschema der Ligationsansätze.

	Ligation	Religation (negativ Kontrolle)
geschnittenes Plasmid	(50 ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) 2 $\mu\text{l}$	(50 ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) 2 $\mu\text{l}$
geschnittenes Oligonukleotid	(13 ng $\mu\text{l}^{-1}$ ) 1 $\mu\text{l}$	-
T4-DNA-Ligase	1 U	1 U
T4-Ligase-Puffer (10x)	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu\text{l}$	ad 10 $\mu\text{l}$

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli* DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) und Nova Blue (DE3) erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode. Hierfür wurden 50 ml LB-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 0,5 ml einer ÜN-Kultur inokuliert und bei 37°C und 180 UpM bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>578</sub>=0,5 kultiviert. Nach dem Ernten (10 min bei 3200 g) wurden die Zellpellets 15 min auf Eis inkubiert, dann in 20 ml TfbI-Puffer resuspendiert, nochmals abzentrifugiert (10 min, 3200 g) und schließlich in 2 ml TfbII-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert (100-200  $\mu$ l) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die transformationskompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Stämme wurden 1  $\mu$ l Plasmid-Lösung (40-80 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) in 200  $\mu$ l Rubidiumchlorid-kompetente Zellen pipettiert und die Lösung 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock durch 45 s Inkubation in einem 42°C warmen Wasserbad. Nach weiterer dreiminütiger Inkubation auf Eis gab man 500  $\mu$ l SOC-Medium zu dem Transformationsansatz und ließ die Lösung 45 min bei 37°C schütteln. Im Falle einer einfachen Plasmid-Transformation wurden 100  $\mu$ l der Lösung auf Agarplatten ausplattiert. Bei Transformation von PCR-Ansätzen wurde die Lösung zuvor zentrifugiert, der Überstand größtenteils verworfen und das Zellpellet mit dem Restvolumen des SOC-Mediums resuspendiert, bevor die Zellen ausplattiert wurden. Die Agarplatte wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.2.2.3 Kultivierung und Stammhaltung von *E.coli*

Die Kultivierung aller *E.coli* Stämme erfolgte in LB- oder TB-Medium, bei Bedarf mit 30  $\mu$ g/ml Kanamycin bzw. 100  $\mu$ g/ml Ampicillin. TB-Medium wurde hauptsächlich bei der Überexpression von P450 verwendet, da es zu höheren Proteinausbeuten führt. Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurden 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer Agar-Platte inokuliert und bei 37°C und 180 UpM über Nacht geschüttelt. Zur Stammhaltung wurde die Zellsuspension mit 25% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.2.4 Heterologe Proteinexpression in Schüttelkolben

Die Überexpression aller CYP102A1 Varianten in Schüttelkolben erfolgte in *E.coli* BL21(DE3) bzw. *E.coli* NovaBlue(DE3) Zellen mit Hilfe des pET28a(+) bzw. pET22b(+)-Expressionssysteme. Das pET28-System benötigt Kanamycin als Selektionsantibiotikum, bei pET22 wird Ampicillin verwendet. Es kamen zwei unterschiedliche Expressionsprotokolle zum Einsatz:

- 1.) Zur Herstellung der Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie von einer Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 UpM inkubiert. Ein 2 l-Erlenmeyerkolben mit 400 ml TB-Medium wurde mit der Vorkultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578}=0,7-0,8$  bei 37°C und 180 UpM kultiviert. Nach Induktion mit 0,25 mM IPTG wurde die Kultur ca. 5 Stunden bei 30°C und 130 UpM inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min, 10000 g) geerntet.
- 2.) 5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von einer Agarplatte inokuliert und bis zum Auftreten einer sichtbaren Trübung (4-5 Stunden) bei 37°C und 180 UpM kultiviert. Ein 2 l-Erlenmeyerkolben wurde mit der Vorkultur inokuliert und unter denselben Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578}=0,7-0,8$  kultiviert. Nach Induktion mit 0,25 mM IPTG erfolgte die Proteinexpression bei 25°C und 130 UpM über Nacht.

#### 2.2.2.5 Fermentation von *E.coli*

Zur Herstellung größerer Mengen der CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante wurde eine Batch-Fermentation von *E.coli* DH5 $\alpha$  im 30 l-Maßstab durchgeführt. Als Expressionssystem wurde der pCYTEXP1-Vektor verwendet, welcher über einen P<sub>R</sub>P<sub>L</sub>-Tandempromotor des  $\lambda$ -Bakteriophagen verfügt. Bei Erhöhung der Temperatur auf 42°C ist die Bindung des temperaturlabilen cIts857-Repressors am P<sub>L</sub>-Promotor nicht mehr möglich und die Transkription wird initiiert (Schwaneberg et al. 1999, Winnacker 1990). Für die Vorkulturen wurden zunächst 2-mal 5 ml LB<sub>amp</sub>-Medium mit einer frisch transformierten *E.coli* DH5 $\alpha$  Kolonie inokuliert und 12 Stunden bei 37°C und 180 UpM inkubiert, nach Überimpfen der Kultur auf 2-mal 400 ml TB<sub>amp</sub>-Medium in 2 l-Erlenmeyerkolben wurde bei 30°C und 150 UpM 16 Stunden inkubiert. 600 ml der so erhaltenen Vorkultur wurden zur Inokulation von 30 l TB<sub>amp</sub>-Medium verwandt, woraus sich eine Start- $OD_{578nm}$  von 0,24 ergab. *E.coli* wurde nun bei einer Rührerdrehzahl von 385 UpM, einem Lufteintrag von 10 l min<sup>-1</sup> und einer Temperatur von 37°C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578nm}=1,99$  kultiviert (145 min). Die Induktion der P450-Expression erfolgte durch Erhöhen der

Temperatur auf 42°C. Während der Expression wurde die Rührerdrehzahl so geregelt, dass der Gelöstsauerstoffanteil 10% nicht überschritt. Die Zellernte erfolgte nach 7 Stunden durch Zentrifugation (10 min, 15000 g).

#### 2.2.2.6 Heterologe Proteinexpression in Mikrotiterplatten

Zur Herstellung der Vorkultur wurden 150 µl TB<sub>kan</sub>-Medium mit 5% (v/v) DMSO in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, 300 µl Kapazität und flachem Boden pipettiert. Die Vorkultur wurde durch dreimaliges Überimpfen aus Stammplatten inokuliert und mit einem Kunststoffdeckel sowie Klebeband verschlossen. Anschließend wurde sie 22 Stunden bei 37°C und 600 UpM inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 600 µl TB<sub>kan</sub>-Medium in Mikrotiterplatten mit 2 ml Kapazität pro Vertiefung pipettiert. Die Inokulation erfolgte durch dreimaliges Überimpfen aus den Vorkulturplatten, welche nun als neue Stammplatten dienten und bei -80°C gelagert wurden. Die Hauptkulturplatten wurden mit luftdurchlässigen Folien verschlossen und 9 Stunden bei 37°C und 600 UpM inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl Induktionslösung. Nach weiterer Inkubation bei 30°C und 600 UpM für ca. 22 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 min, 3200 g) geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und die Mikrotiterplatten bei -80°C eingefroren.

### 2.2.3 Biochemische Methoden und Enzymcharakterisierung

#### 2.2.3.1 Zellaufschluss

##### *Zellaufschluss mit Ultraschall*

Zellen aus Schüttelkolbenexpressionen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Hierfür wurden die frisch geernteten, bzw. bei -20°C gelagerten Zellen (Biofeuchtmasse 5-8 g) in ca. 10 ml 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und auf Eis gekühlt. Der Zellaufschluss wurde mittels eines Ultraschalldesintegrators mit einminütiger Pause zwischen den Ultraschallbehandlungen durchgeführt (5 x 2 min Ultraschallpulse, Leistungsabgabe 40%, Arbeitsintervall 40%). Die Zelltrümmer wurden 20 min bei 37000 g abzentrifugiert.

##### *Zellaufschluss mit Lysozym*

Nach Expression in Mikrotiterplatten wurden die bei -80°C gelagerten Zellen in 600 µl Aufschlusspuffer resuspendiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden 60 min bei 3700 g abzentrifugiert.

### *Zellaufschluss mittels eines Hochdruckhomogenisators*

Größere Zellmassen (z.B. aus Fermentation) wurden mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen. Dabei wird eine Zellsuspension (100 g Biofeuchtmasse in ca. 300 ml 50 mM KPi-Puffer, pH 7,5) unter Druck gesetzt (800 bar) und durch eine feine Düse gepresst. Die Suspension entspannt sich schlagartig, was zu einer Zerstörung der Zellwände führt. Die erhaltene Lösung wurde 2 Stunden bei 4°C und 12000 g zentrifugiert.

#### 2.2.3.2 Proteinaufreinigung

##### *Metallchelataffinitätschromatografie (IMAC)*

Die Aufreinigung der mittels des pET-Systems exprimierten Monooxygenasen erfolgte durch Metallchelataffinitätschromatografie (IMAC). Die P450-Monooxygenasen wurden im pET-Konstrukt mit einem N-terminalen Hexahistidin-Rest exprimiert, der spezifisch an immobilisierte Nickelionen bindet. Das Zielprotein kann somit in einem Aufreinigungsschritt mit hoher Reinheit isoliert werden. Bei den hier verwendeten Säulenmaterialien handelt es sich um Ni-NTA, bzw. um Ni-Sepharose, die sich im Wesentlichen in ihrer Kapazität unterscheiden.

Die aus 400 ml Kultur gewonnene Enzymlösung wurde auf eine mit ca. 3,5 ml Ni-Sepharose gefüllte Säule aufgetragen, die zuvor mit 50 mM KPi / 500 mM NaCl-Puffer (pH 7,5) equilibriert wurde. Es folgte ein Waschschriff mit ca. 5 Säulenvolumen Waschpuffer. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit einer Imidazolkonzentration von 400 mM. Das Eluat (ca. 4 ml) wurde gegen 5 l 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) bei 4°C über Nacht dialysiert. Das Säulenmaterial wurde durch Auftragen von ca. 3 Säulenvolumen 10 mM NiCl<sub>2</sub>-Lösung regeneriert und in 20%iger Ethanollösung gelagert.

##### *Anionenaustauschchromatografie*

Da die mit Hilfe des pCYTEXP1-Konstrukts exprimierten P450-Monooxygenasen nicht über einen Hexahistidinrest verfügen, wurden sie durch Anionenaustauschchromatografie aufgereinigt. 300 ml Lysat wurden hierfür auf 120 ml, zuvor mit 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) equilibrierten, Q-Sepharose-Matrix (Amersham) aufgetragen. Die Abtrennung ungewünschter Proteine sowie die Elution des Zielproteins erfolgten durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 600 mM NaCl über 12 Säulenvolumina, gefolgt von einem Stufengradient auf 1 M NaCl bei einer konstanten Flussrate von 15 ml min<sup>-1</sup>. Die Aufreinigung geschah mit Hilfe eines FPLC-Systems (ÄKTA-Explorer), P450-haltige



Fraktionen wurden durch Messung der Absorption bei 417 nm identifiziert. Die P450-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, mit einer Amicon-Ultrafiltrationszelle aufkonzentriert und über Nacht gegen 5 l 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) dialysiert.

### 2.2.3.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration der Enzymlösungen wurde mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits (Pierce) durchgeführt. Der Test beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  in Gegenwart von Proteinen in alkalischem Milieu und anschließender Komplexbildung mit Bicinchoninsäure (BCA). Die Absorption des farbigen Komplexes bei 562 nm ist proportional zur Proteinkonzentration der Lösung. Die Konzentrationsbestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. In einige der Vertiefungen wurden 10  $\mu\text{l}$  Albumin-Standardlösungen in Konzentrationen von 25 bis 2000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  zur Erstellung einer Kalibriergerade pipettiert, in andere 10  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Proteinlösung. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung wurde die Mikrotiterplatte 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption der Lösungen bestimmt.

### 2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinüberexpression sowie der Erfolg der Aufreinigung wurden mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft (Laemmli 1970). Die in einer Lösung enthaltenen Proteine werden dabei auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde zunächst ein 10%iges Polyacrylamid Trenngel gegossen, welches dann mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet wurde, die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Pipettierschema für Polyacrylamidgele

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Rotiphorese® Gel 30	2,67 ml	0,52 ml
Upper Tris-Puffer	-	1,00 ml
Lower Tris-Puffer	2,00 ml	-
dH <sub>2</sub> O	3,33 ml	2,47 ml
10 % (m/v) APS	40 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
TEMED	4 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$

Die Proteinproben wurden mit 50% SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Pro Spur wurden 15 mg Gesamtproteinmenge (ermittelt durch BCA-Assay) aufgetragen,

anschließend wurden die Proteine 70 min bei einem konstanten Strom von 25 mA elektrophoretisch getrennt.

#### 2.2.3.5 Bestimmung der P450 Konzentration

Die P450-Konzentration einer Enzymlösung kann photometrisch mit Hilfe des sog. CO-Differenzspektrums gemessen werden. Man macht sich hierbei die charakteristische Absorption der Häm- Gruppe im reduzierten, Kohlenmonoxid-gebundenen Zustand zu Nutze (Omura und Sato 1964). Die Enzymlösung wird entsprechend der erwarteten Enzymkonzentration mit 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) verdünnt (normalerweise im Verhältnis 1:10 bis 1:20), das Gesamtvolumen ist 2 ml. Die Lösung wird zur Reduktion des Häm-Eisens von  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt und anschließend auf zwei Küvetten aufgeteilt, von denen eine ca. 20 s lang mit Kohlenmonoxid begast wird. Anschließend wird ein Absorptionsspektrum der begasten Probe von 400 bis 500 nm aufgenommen, wovon das Spektrum der unbegasten Probe abgezogen wird. Die P450-Konzentration errechnet sich entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz nach folgender Formel:

$$c(P450) = \frac{A_{450nm-490nm}}{\varepsilon \cdot d}$$

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient;  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$d$ : Schichtdicke; 1cm

#### 2.2.3.6 Bindungsspektren und Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Zur Ermittlung von Dissoziationskonstanten von P450-Monooxygenasen mit verschiedenen Substraten wurden Bindungsspektren aufgenommen. Die Messung der Spektren erfolgte in 500  $\mu\text{l}$  Quarzküvetten. 500  $\mu\text{l}$  einer aufgereinigten Enzymlösung wurden mit 1  $\mu\text{l}$  substrathaltiger DMSO-Lösung versetzt, anschließend wurde das Absorptionsspektrum zwischen 300 und 500 nm gemessen. Davon wurde das Spektrum der Enzymlösung mit DMSO – ohne Substrat – abgezogen. Die Konzentration der Enzymlösungen betragen 5  $\mu\text{M}$ , die Konzentration der Substrate lag zwischen 0,5 und 1000  $\mu\text{M}$ .

Die  $K_d$ -Werte wurden durch Auftragen der Kehrwerte der Absorptionsdifferenzen zwischen 390 nm und 420 nm gegen die Kehrwerte der Konzentration bestimmt. Der  $K_d$ -Wert entspricht dann dem negativen Kehrwert des x-Achsenabschnitts.

### 2.2.3.7 Aktivitätsmessung und Bestimmung der Kopplungseffizienz

Die Aktivität der hergestellten CYP102A1-Varianten kann durch photometrische Messung der NADPH-Oxidation ermittelt werden. NADPH absorbiert im Gegensatz zu  $\text{NADP}^+$  bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm über ein bestimmtes Zeitintervall ist also ein Maß für die Aktivität des Enzyms, jedoch muss die häufig auftretende Entkopplung des NADPH-Verbrauchs von der Produktbildung berücksichtigt werden (s. 1.2.2). Die Messung der Aktivität erfolgte in 1 ml Küvetten. 1 ml Reaktionslösung enthalten: 50 mM KPi-Puffer pH 7,5; 0,2 bis 0,4 mM Substrat; 2% (v/v) DMSO; 0,1 bis 0,5  $\mu\text{M}$  P450. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1,2 mM NADPH-Lösung gestartet. Die Absorptionsänderung der ersten 30 Sekunden nach Zugabe der NADPH-Lösung ist linear und wurde zur Bestimmung der Anfangsaktivität, unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes und eines Extinktionskoeffizienten von  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für NADPH, herangezogen.

Nach vollständigem NADPH-Verbrauch wurden die Reaktionslösungen extrahiert und die gebildeten Produkte sowie deren Mengen mittels GC/MS identifiziert (s. 2.2.6). Die Kopplungseffizienz der Reaktion ergibt sich aus der Menge des gebildeten Produkts. Da der Kofaktor im Unterschuss zugegeben wurde (30 mol%), müsste der Umsatz bei vollständiger Kopplung 30% betragen, aus entsprechend geringeren Umsätzen ergeben sich Kopplungseffizienzen unter 100%.

*Durchführung:* Die wässrige Reaktionsmischung wurde im Falle von Fettsäure-oxidationen 3-mal mit 500  $\mu\text{l}$  Diethylether extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit einem Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und in 50  $\mu\text{l}$  Derivatisierungslösung resuspendiert. Diese bestand aus N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid und 1% (v/v) Trimethylchlorsilan. Nach Inkubation bei 70°C für 20 min wurden die Proben mittels GC/MS analysiert.

Die Extraktion der Pinenoxidationsansätze erfolgte ein Mal mit 500  $\mu\text{l}$  Methyl-tert-butylether. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend analysiert.

### 2.2.3.8 Bestimmung kinetischer Konstanten

Bei der Bestimmung von  $K_M$ -,  $k_{\text{cat}}$ - und  $v_{\text{max}}$ -Werten wurde das Enzymkinetikmodell nach Michaelis und Menten zugrunde gelegt. Die NADPH-Oxidation wurde bei 340 nm über eine Zeitspanne von 20 s bei variierender Substratkonzentration photometrisch gemessen und daraus, analog zu dem in Abschnitt 2.2.3.7 beschriebenen Verfahren, die

Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Messwerte in ein Lineweaver-Burk-Diagramm.

Die Abnahme der NADPH-Konzentration wurde in einer 1 ml-Küvette bestimmt, welche 0,1  $\mu$ M P450-Monooxygenase, 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5), 2% (v/v) DMSO und 0,01 bis 0,4 mM Substrat enthielt. Durch Zugabe von 100  $\mu$ l 1,2 mM NADPH-Lösung wurde die Reaktion gestartet.

## 2.2.4 Methoden für das Hochdurchsatzscreening

### 2.2.4.1 Picken von Kolonien

Für das Durchmustern von Mutantenbibliotheken müssen die nach der Transformation des entsprechenden PCR-Ansatzes entstandenen Kolonien zunächst in Mikrotiterplatten überführt werden. Dies geschah mit Hilfe des Biopick Pickroboters (Biorobotics). Das Volumen des auszuplattierenden Transformationsansatzes pro Agarplatte wurde so gewählt, dass ca. 100 bis 200 Kolonien pro Agarplatte vorhanden waren. Die Kolonien wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, die 150  $\mu$ l TB<sub>kan</sub>-Medium mit 5% (v/v) DMSO enthielten, überimpft. Die Identifizierung der Kolonien erfolgt im Pickroboter mit Hilfe einer Kamera. Für eine optimale Erkennung der Kolonien unter Vermeidung vieler falsch-positiver oder falsch-negativer Selektionen müssen einige Filterparameter optimiert werden. In Tabelle 2.6 sind alle relevanten Parameter zusammengefasst.

Tabelle 2.6: Geräteeinstellungen des Biopick Pickroboters

<b>Allgemeine Parameter</b>	
Plattengröße	88 mm
Agar-Tiefe	5 mm
Startposition	A1
Heizdauer	0,7 s
<b>Bilderkennungs-Parameter</b>	
Kleinster Durchmesser	1 mm
Größter Durchmesser	7 mm
Kleine Rundheitsabweichung	50 %
Mittlere Rundheitsabweichung	50 %
Große Rundheitsabweichung	50 %
Filterstärke	35

Nach Abschluss des Pickvorgangs werden die Mikrotiterplatten über Nacht bei 37°C und 600 UpM inkubiert und anschließend bei -80°C als Stammpplatten gelagert.

#### 2.2.4.2 Pipettieren von Lösungen

Alle beim Umgang mit Mikrotiterplatten im Hochdurchsatzscreening anfallenden Pipettierschritte wurden aus Gründen der Zeitersparnis und Reproduzierbarkeit mit einem Pipettierroboter durchgeführt (Janus, Perkin Elmer). Die mit dem Roboter durchgeführten Arbeitsschritte umfassen das Befüllen von Mikrotiterplatten mit Medium, die Induktion, die Durchführung des Zellaufschlusses, das Pipettieren des NADPH-Assays und die Extraktion von Reaktionslösungen für die spätere Analyse mittels GC/MS.

#### 2.2.4.3 NADPH-Oxidationsscreening in Mikrotiterplatten

Die NADPH-Oxidations-Versuche wurden in Mikrotiterplatten mit flachem Boden und 96 Vertiefungen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 100  $\mu$ l 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) mit 4% (v/v) DMSO und 2,5 mM (-)- $\alpha$ -Pinen pro Vertiefung pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l Zellysate, bevor durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1 mM NADPH-Lösung die Reaktion gestartet wurde. Die Absorptionsabnahme bei 340 nm in den ersten 30 s wurde als Selektionskriterium für folgende Charakterisierungen verwendet.

#### 2.2.4.4 Pinenoxidation und Produktcharakterisierung aus Mikrotiterplatten

Zur Bestimmung der Regioselektivität der in Mikrotiterplatten exprimierten Mutanten wurde die Oxidation von Pinen in Mikrotiterplatten mit einem Volumen von 2 ml pro Vertiefung durchgeführt. Zu 600  $\mu$ l einer 1,5 mM Substratlösung in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5), die außerdem 3% (v/v) DMSO enthielt, wurden 200  $\mu$ l Zellysate pipettiert. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l einer 1,2 mM NADPH-Lösung wurde 15 min inkubiert und die Reaktionslösung anschließend mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und mittels GC/MS analysiert.

#### 2.2.4.5 Produktspezifisches Screening mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz

Die Suche nach neuen, Verbenol-produzierenden Varianten von P450-Monooxygenasen setzt die Verfügbarkeit eines produktspezifischen, hochdurchsatzfähigen Tests voraus. Die Verwendung des aus der Dünnschichtchromatografie bekannten Vanillin/Schwefelsäure-Reagenzes im Mikrotiterplattenmaßstab wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Um die entstehenden Mengen an Verbenol quantifizieren zu können, wurde zunächst eine Kalibriergerade erstellt. 100  $\mu$ l 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) mit 4% (v/v) Ethanol und 0 bis 2 mM Substrat (Verbenol, bzw. (-)- $\alpha$ -Pinen als Negativkontrolle) und 100  $\mu$ l *E. coli* Zellysate wurden in eine Mikrotiterplatte aus Polypropylen mit 96 Vertiefungen und 300  $\mu$ l Kapazität

pipettiert. Anschließend wurde die Mischung mit 100  $\mu\text{l}$  Toluol extrahiert. Die organische Phase wurde in Glasmikrotiterplatten überführt und mit 200  $\mu\text{l}$  Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz versetzt. Nach Verschließen der Mikrotiterplatten mit Alufolie wurden diese bei 60°C über Nacht inkubiert. Nach Messung des Absorptionsspektrums der Proben konnte die Kalibriergerade durch Subtraktion der Absorption bei 700 nm von der Absorption bei 470 nm und Auftragen gegen die entsprechende Substratkonzentration erstellt werden.

### 2.2.5 Oxidation von Pinen *in vitro*

#### 2.2.5.1 Aktivitätsbestimmung der Formiatdehydrogenase

Der stöchiometrische Einsatz von NADPH bei größeren Reaktionsansätzen wurde durch Verwendung einer NADP<sup>+</sup>-abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Pseudomonas* sp. 101 vermieden. Die für eine Reaktion benötigte Menge an FDH wurde anhand ihrer Aktivität ermittelt. Die Bestimmung der Volumenaktivität einer FDH-Lösung erfolgte durch photometrische Messung der NADPH-Bildung bei 340 nm. Ein 1 ml Küvettenansatz enthielt 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5), 300 mM Natriumformiat und 100  $\mu\text{l}$  einer 1:10 verdünnten FDH-Lösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1,3 mM NADP<sup>+</sup>-Lösung gestartet und die Absorptionzunahme bei 340 nm über 30 s verfolgt. Die Volumenaktivität konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes und einem Extinktionskoeffizient von 6,22  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  für NADPH bestimmt werden.

#### 2.2.5.2 Oxidation von Pinen im Zweiphasensystem

Die Oxidation von (-)- $\alpha$ -Pinen erfolgte im 10 ml-Maßstab, wobei 5 ml wässrige und 5 ml Pinenphase verwendet wurden. 5 ml wässrige Phase bestanden aus 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5), 300 mM Natriumformiat, 4U Formiatdehydrogenase, 3% (v/v) DMSO, 5 mM (-)-Carvon als interner Standard, 6200 U Katalase, ca. 2 U P450-Monooxygenase (ca. 4  $\mu\text{M}$ , abhängig von der Mutante) und 0,2 mM NADP<sup>+</sup>. Nach Zugabe der organischen Phase wurde der Reaktionsansatz in einem 25 ml Rundkolben gerührt. Die Probennahme erfolgte zu Beginn alle 15 min, nach einer Stunde alle 30 min und nach 3 Stunden alle 60 min. 200  $\mu\text{l}$  der Emulsion wurden hierfür mit 150  $\mu\text{l}$  MTBE versetzt, geschüttelt und 60 s bei 12000 g abzentrifugiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und mittels GC/MS analysiert. Die Quantifizierung der gebildeten Produkte geschah mit einer Kombination aus internem und externem Standard (s. 2.2.6).

### 2.2.6 Analytik

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Produktidentifizierungen wurden mit einem Shimadzu QP2010 GC/MS durchgeführt.

#### *Allgemeine Parameter:*

*GC-Säule:* FS-Supreme-5; Polydimethylsiloxan (5% Phenylanteil): Länge: 30 m; Filmdicke: 0,25  $\mu\text{m}$ ; Innendurchmesser: 0,25 mm

*Trärgas:* Helium, Fließgeschwindigkeit: 30  $\text{cm s}^{-1}$

*GC-Einstellungen:* Injektortemperatur: 250°C; Interfacetemperatur: 285°C

*MS-Einstellungen:* Ionenquellentemperatur: 200°C

#### *Ofenprogramme:*

Pinen:            90°C isotherm, 5 min  
                    15°C  $\text{min}^{-1}$  von 90°C auf 130°C  
                    50°C  $\text{min}^{-1}$  von 130°C auf 250°C

Die Identifizierung der Produkte erfolgte anhand von Referenzsubstanzen, bzw. durch Abgleich der charakteristischen Massenfragmente mit der NIST05-Datenbank (National Institute of Standards and Technology).

Fettsäuren/Fettsäurederivate:        100°C isotherm, 1 min  
    15°C  $\text{min}^{-1}$  von 100°C auf 300°C

Regioisomere der hydroxylierten Fettsäuren wurden mit Hilfe charakteristischer, trimethylsilylierter Massenfragmente identifiziert.

#### *Quantitative Analyse der Pinenoxidation*

Für die quantitative Auswertung der *in vitro* Pinenoxidation mit Kofaktorregenerierung wurde eine Kalibriergerade durch Verdünnungsreihen der Produkte Pinenepoxid und Verbenol hergestellt. Um Fehlerquellen möglichst auszuschließen, verwendete man im Wesentlichen den in Abschnitt 2.2.5.2 beschriebenen Ansatz, auf die Zugabe von FDH und  $\text{NADP}^+$  wurde jedoch verzichtet, um die Reaktion nicht zu starten. Zu der Lösung wurden sukzessive 1, 2, 4, 8, 12 mM Pinenepoxid und Verbenol gegeben und anschließend jeweils 150  $\mu\text{l}$  Emulsion entnommen. Diese wurde mit 200  $\mu\text{l}$  MTBE versetzt, geschüttelt und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Für die Erstellung der Kalibriergerade wurde das

---

Verhältnis der Flächenintegrale der Produkte zum Flächenintegral des internen Standard (-)-Carvon (5 mM) gegen die entsprechende Substratkonzentration aufgetragen.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Heterologe Expression von Cytochrom P450 Monooxygenasen der CYP102A-Familie in *E. coli*

Die biochemische Charakterisierung eines Enzyms *in vitro* setzt zunächst seine effektive Expression und Aufreinigung voraus. Bei den hier verwendeten Konstrukten handelte es sich meist um pET-Expressionssysteme, in die die entsprechenden Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* sowie CYP102A2 und CYP102A3 aus *Bacillus subtilis* kloniert wurden. Die Konstrukte der Wildtypenzyme und einiger Mutanten waren bereits am Institut für Technische Biochemie vorhanden und konnten zur heterologen Expression in *E. coli* verwendet werden (Budde et al. 2004, Lentz et al. 2004, Maurer et al. 2003). Als Expressionssystem für die Fermentation wurde ein ebenfalls am ITB vorhandenes pCYTEXP1-Konstrukt eingesetzt (Li et al. 2000, Schwaneberg et al. 1999).

#### 3.1.1 Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) im Schüttelkolben

Die heterologe Expression der Cytochrom P450 Monooxygenasen erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) in 2 l Schüttelkolben. Da die im Schüttelkolben erreichbaren Zelldichten im Vergleich zu Fermentationen gering sind, muss das Zielprotein stark überexprimiert werden, um aus einer Schüttelkolbenexpression genug Protein für eine darauffolgende Charakterisierung zu erhalten. Dies wird durch Verwendung des pET-Systems erreicht. Der im pET-System verwendete starke T7-Promotor ermöglicht eine hohe Überexpression des Zielproteins (bis zu 50% der Gesamtproteinmenge), des Weiteren kann bei diesem Expressionssystem das Zielprotein optional mit einem N- oder C-terminalen Hexahistidinrest exprimiert werden, was eine einfache und effiziente Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie (Kapitel 3.2.1) ermöglicht.

Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) erfolgte in 2 l Schüttelkolben mit 400 ml TB-Medium. Diese wurden mit 5 ml einer ÜN-Kultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578nm}=0,7$  bei 37°C und 180 UpM kultiviert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,25 mM IPTG. Exprimiert wurde ca. 16 Stunden bei 25°C und 130 UpM. Mit dem hier verwendeten Protokoll konnten bis zu 1,4  $\mu\text{mol}$  (=166 mg) P450 pro Liter Kulturbrühe exprimiert werden.

### 3.1.2 30 l Batch-Fermentation von CYP102A1 A74G F87V L188Q

Für die Bereitstellung größerer Proteinmengen der im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend verwendeten CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante wurde eine 30 l Batch-Fermentation durchgeführt. Das hierbei eingesetzte Konstrukt des *cyp*-Gens mit dem pCYTECP1-Vektor stellt eine kostengünstige Alternative zum pET-System dar, da die Induktion über Temperaturerhöhung und nicht durch Zugabe des teuren Induktors IPTG erfolgt. Der Einsatz dieses Expressionssystems zur Herstellung kleinerer Proteinmengen im Schüttelkolben stellte sich als weniger sinnvoll heraus, da die hier erzielten Proteinausbeuten mit ca. 400 nmol pro Liter Kulturbrühe weniger als ein Drittel der Ausbeuten des pET-Systems betragen. Ein weiterer Nachteil des pCYTEXP1-Systems ist die Abwesenheit eines Hexahistidintags, was die spätere Aufreinigung des überexprimierten Enzyms erschwert.

Bei der hier durchgeführten Batch-Fermentation von *E. coli* DH5 $\alpha$  im 30 l Maßstab (s. Abschnitt 2.2.2.5) konnten nach nur sieben Stunden Fermentationszeit 11,2 g Biofeuchtmasse pro Liter Fermentationsbrühe geerntet werden. Die dabei erzielte P450 Konzentration betrug 584 nmol (=69 mg) pro Liter Fermentationsbrühe. In Abbildung 3.1 ist der Expressionsverlauf grafisch dargestellt. Sowohl aus der Wachstumskurve als auch aus dem P450-Konzentrationsverlauf ist ersichtlich, dass bei einer Fortsetzung der Fermentation noch höhere Proteinausbeuten hätten erreicht werden können. Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 3.2) zeigt die Überexpression der Monooxygenase, anhand der Zunahme der Proteinbande bei 119 kDa beginnend ab der Induktion. Ein allgemeines Problem bei Überexpressionen wird bei Betrachtung der Proteinverteilung zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion deutlich: Ein Großteil des Proteins befindet sich nach dem Zellaufschluss mittels eines Hochdruckhomogenisators nicht im Lysat, sondern in der unlöslichen Fraktion. Gründe hierfür können ein unvollständiger Zellaufschluss, Denaturierung des Proteins beim Zellaufschluss oder die Bildung von Einschlusskörpern durch zu starke Überexpression des Zielproteins in der Zelle sein.

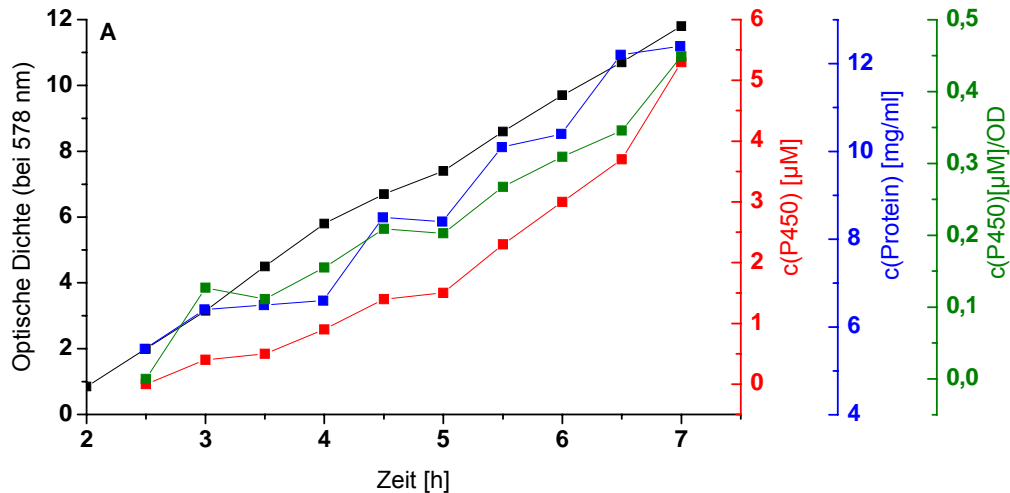


Abbildung 3.1: Verlauf der optischen Dichte bei 578 nm (schwarz); Konzentration der exprimierten P450 Monooxygenase bezogen auf das Fermentervolumen ab dem Induktionszeitpunkt (rot); Proteingesamtkonzentration (blau); Anteil an P450 bezogen auf die Zelldichte (grün).

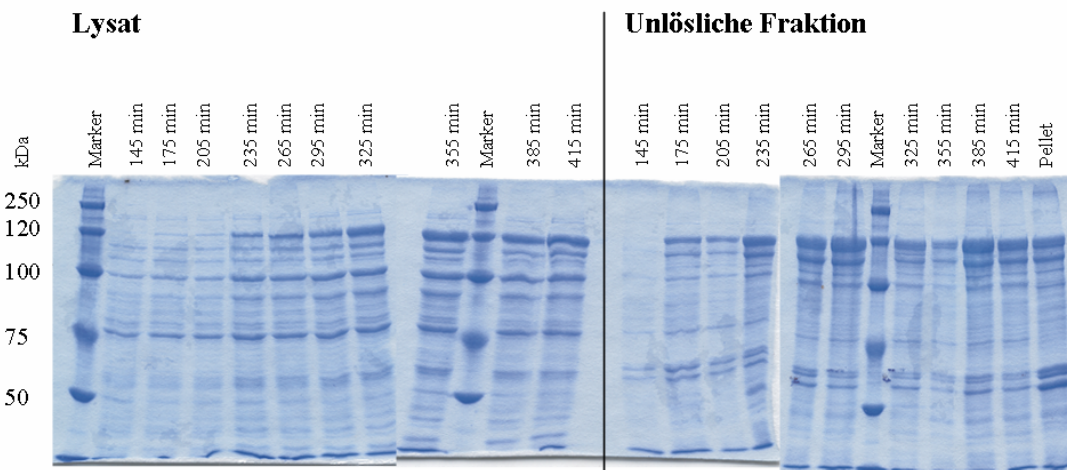


Abbildung 3.2: SDS-PAGE (10%iges Acrylamidgel) des Verlaufs einer 30 l Batch-Fermentation. Ab dem Zeitpunkt der Induktion sind Proben des Zelllysates (links) und der Zelltrümmer-Fraktion (rechts) aufgetragen.

### 3.1.3 Optimierung der Expression in Mikrotiterplatten

Die Durchmusterung von Mutantenbibliotheken setzt eine effektive Expression der Mutanten in Mikrotiterplatten voraus, da die erzielte Proteinkonzentration für den nachfolgenden Hochdurchsatztest hoch genug sein muss, um eine ausreichende Empfindlichkeit gewährleisten zu können. Hierbei ist zu beachten, dass die Expressions- und Aufschlussbedingungen nicht zu einer Destabilisierung und somit zu einer Inaktivierung eines Großteils der Mutanten führen. Das in Kapitel 2.2.2.6 beschriebene Protokoll stellt die

optimierten Expressionsbedingungen dar, mit welchem P450 Konzentrationen von bis zu 4  $\mu\text{M}$  erreicht werden konnten. Beginnend mit einer Vorkultur-Mikrotiterplatte mit 150  $\mu\text{l}$   $\text{TB}_{\text{kan}}$ -Medium, welche 22 Stunden bei 37°C und 600 UpM kultiviert wurde, erfolgte die Expression der Monooxygenase schließlich in Mikrotiterplatten mit 600  $\mu\text{l}$   $\text{TB}_{\text{kan}}$ -Medium, wobei zunächst neun Stunden bei 37°C kultiviert und nach Induktion 22 Stunden bei 30°C exprimiert wurde. Als entscheidende Parameter bei der Optimierung stellten sich die Inkubationszeit der Hauptkultur, die Schüttelgeschwindigkeit und die Expressionstemperatur heraus. Insbesondere eine Verringerung der Schüttelgeschwindigkeit auf 300 UpM bei gleichzeitiger Verringerung der Temperatur auf 25°C während der Expression führt dazu, dass nach der Expression kein P450 detektiert werden kann.

## 3.2 Proteinaufreinigung

### 3.2.1 Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie

Da *E.coli* über eine Reihe von Enzymen verfügt, die die biochemische Charakterisierung der darin überexprimierten Monooxygenasen beeinflussen können, ist eine Aufreinigung des Zielproteins unerlässlich. Die Aktivität der Monooxygenase bei der Oxidation eines Substrates wird durch photometrische Messung des NADPH-Verbrauchs ermittelt. Daher führt insbesondere die Gegenwart anderer NADPH bzw. NADH-abhängiger Enzyme zu einer Verfälschung der gemessenen Aktivitäten. Andere Enzyme sind beispielsweise in der Lage, die durch Oxidation mit P450 Monooxygenasen gebildeten Produkte weiter umzusetzen, was die gemessenen Selektivitäten verfälscht.

Die Metallchelataffinitätschromatografie stellt hier eine schnelle, einstufige und effiziente Möglichkeit dar. Exemplarisch ist hier die Aufreinigung dreier Mutanten von CYP102A1 gezeigt (Abbildung 3.3). Die Lysatfraktionen (Spuren 1-3) enthalten bereits überwiegend P450, was anhand der intensiven Bande bei 120 kDa erkennbar ist. Nach der Aufreinigung sind im Eluat (Spuren 4-6) außer P450 fast keine anderen Proteine erkennbar. Der Aufreinigungstabelle (Tabelle 3.1) ist zu entnehmen, dass ein Aufreinigungsfaktor von ca. 2 erzielt werden konnte, was in diesem Fall eine fast vollständige Aufreinigung bedeutet.

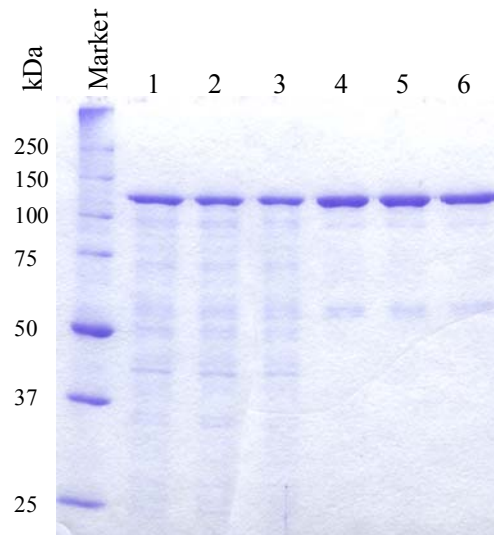


Abbildung 3.3 SDS-PAGE der Aufreinigung von CYP102A1 A74G L188Q (1: Lysat; 4: Eluat), CYP102A1 A74G F87G L188Q (2: Lysat; 5: Eluat) und CYP102A1 A74G F87V L188Q (3: Lysat; 6: Eluat).

Tabelle 3.1 Aufreinigungstabelle der Affinitätschromatografie

	Lysat			Eluat			Ausbeute [%]	Faktor
	c(P450) [mg/ml]	c(Protein) [mg/ml]	V [ml]	c(P450) [mg/ml]	c(Protein) [mg/ml]	V [ml]		
A74G F87F L188Q	4,2	229,8	14	7,1	204,8	6,5	78	1,9
A74G F87G L188Q	1,8	272,8	14	3,0	281,8	6	69	1,6
A74G F87V L188Q	4,4	277,8	14	7,9	218,8	5,5	71	2,3

### 3.2.2 Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatografie

Im Falle der Expression von CYP102A1 A74G F87V L188Q mit dem pCYTEXP1-System erfolgte die Aufreinigung des Zelllysates durch Anionenaustausch-chromatografie. Die Überexpression ist anhand der intensiven Bande bei 119 kDa zu erkennen (Abbildung 3.4). Nach der Aufreinigung liegt P450 in aufkonzentrierter Form im Eluat vor, wobei die Konzentration anderer Proteine, vor allem solche mit kleinerem Molekulargewicht deutlich reduziert ist. Der erzielte Aufreinigungsfaktor beträgt 4,5 bei einer Gesamtausbeute von 81% (Tabelle 3.2).

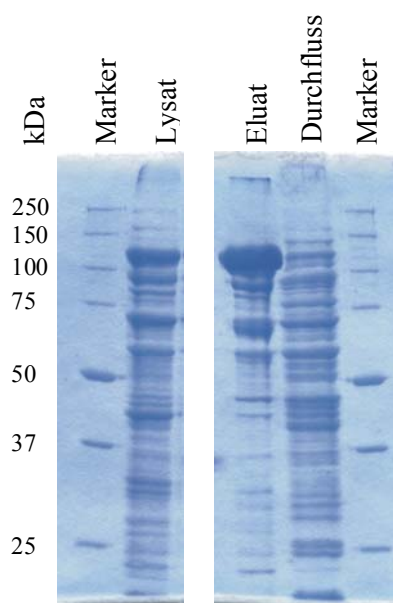


Abbildung 3.4: SDS-PAGE der Aufreinigung von CYP102A1 A74G F87V L188Q mittels Anionenaustauschchromatografie

Tabelle 3.2 Aufreinigungstabelle der Anionenaustauschchromatografie

	Lysat			Eluat			Ausbeute Faktor	
	c(P450)	c(Protein)	V	c(P450)	c(Protein)	V	[%]	
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ml]	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ml]		
A74G F87V L188Q	628	8960	1100	2356	7480	237	81	4,5

### 3.3 Selektivoxidation hoch verzweigter Fettsäuren

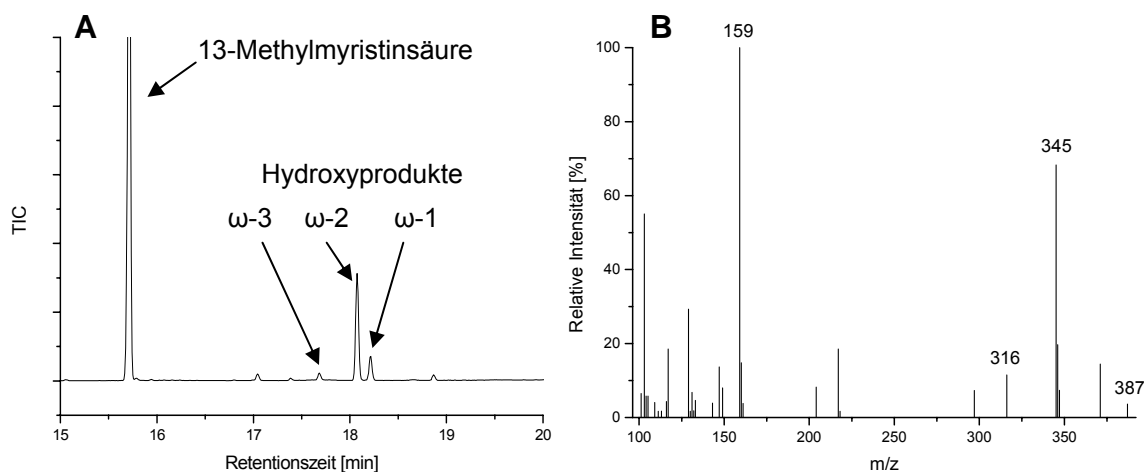
#### 3.3.1 Oxidation von Iso- und Anteispentadecansäure

Die natürliche Funktion von CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* sowie seiner homologen CYP102A2 und CYP102A3 aus *Bacillus subtilis* ist bisher noch ungeklärt. Untersuchungen zur Regulation der Expression von CYP102A1 liefern keine eindeutigen Hinweise, da eine Vielzahl verschiedener Verbindungen die Expression induzieren. Die Mehrzahl dieser Verbindungen wie z.B. Barbiturate oder nichtsteroidale Entzündungshemmer haben Einfluss auf den Fettstoffwechsel von *Bacillus megaterium* (Palmer et al. 1998).

Neueste Ergebnisse von Gustafsson beschreiben die unselektive Hydroxylierung verzweigter Fettsäuren durch CYP102A2 und CYP102A3 mit hohen Umsatzraten (Gustafsson et al. 2004). Diese verzweigten Fettsäuren (Iso- und Anteiofettsäuren) spielen bei der Regulation der Membranfluidität vieler Mikroorganismen eine Rolle. Da über 89% aller Fettsäuren in

den Membranen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium* verzweigt sind (Kaneda 1991) und da, zumindest im Falle von CYP102A1, den hier untersuchten Monooxygenasen eine Rolle im Fettsäurestoffwechsel unterstellt wird, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den verzweigten Fettsäuren der Membranen um die natürlichen Substrate von CYP102A1-A3 handeln könnte.

Die Oxidation von Iso- und Anteispentadecansäure durch CYP102A1-A3 wurde bezüglich der auftretenden Regioselektivitäten und Aktivitäten untersucht. Die Bestimmung der Anfangsaktivität erfolgte hierbei durch photometrische Messung der NADPH-Oxidation in den ersten 30 Sekunden. Die entstandenen Hydroxy-Regioisomere wurden anhand ihrer charakteristischen Fragmentierungsmuster im Massenspektrum identifiziert (Abbildung 3.5). Die charakteristischen Fragmente entstehen nach Derivatisierung der Produkte zu Trimethylsilylverbindungen durch  $\alpha$ -Spaltung benachbart zur Trimethylsiloxy-Gruppe. Dies hat die Entstehung zweier verschiedener Ionen zur Folge, welche sich durch eine hohe Intensität im Massenspektrum auszeichnen. Weiterhin entstehen durch Umlagerung der Produkte zu Trimethylsilylverbindungen weitere charakteristische Fragmente. Zusätzlich wurde das Moleküllion bzw. das Moleküllion minus 15 (CH<sub>3</sub>-Gruppe) zur Produktidentifizierung verwendet.



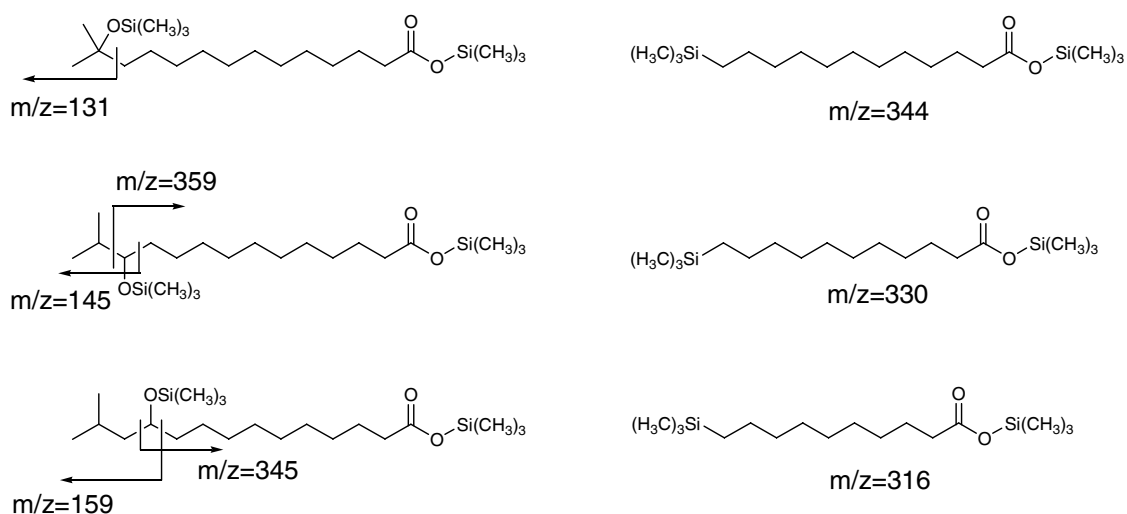
**C**

Abbildung 3.5: Exemplarische Betrachtung zur Identifizierung von Hydroxyprodukten der Isomyrestinsäureumsetzung: (A) Chromatogramm des Reaktionsextrakts der Umsetzung mit CYP102A1; (B) Massenspektrum des  $\omega$ -3-Hydroxyprodukts; (C) Darstellung der zur Produktidentifizierung verwendeten, charakteristischen Ionen.

Tabelle 3.3: Aktivität, Kopplungseffizienz und Regioselektivität der Hydroxylierung von Isopentadecan-säure durch CYP102A1-A3.

Enzym	NADPH Verbrauch [ $\text{min}^{-1}$ ]	Kopplungseffizienz [%]	Regioselektivität [%]					
			$\omega$	$\omega$ -1	$\omega$ -2	$\omega$ -3	$\omega$ -4	$\omega$ -5
A1	1850	32	1	18	76	5	-	-
A2	2950	38	-	7	91	2	-	-
A3	800	35	-	6	89	5	-	-

Tabelle 3.4: Aktivität, Kopplungseffizienz und Regioselektivität der Hydroxylierung von Anteiso-pentadecansäure durch CYP102A1-A3.

Enzym	NADPH Verbrauch [ $\text{min}^{-1}$ ]	Kopplungseffizienz [%]	Regioselektivität [%]					
			$\omega$	$\omega$ -1	$\omega$ -2	$\omega$ -3	$\omega$ -4	$\omega$ -5
A1	1900	38	1	57	12	20	1	9
A2	3600	42	1	53	16	19	-	11
A3	450	32	1	27	16	36	4	16



Die verwendeten Substrate Iso- und Anteispentadecansäure werden, wie aus Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 ersichtlich, von allen Monooxygenasen mit sehr hoher Aktivität umgesetzt. CYP102A2 weist mit einer NADPH-Oxidationsrate von 2950 bzw. 3600 min<sup>-1</sup> die höchste Aktivität auf. Die Kopplungsraten, welche den tatsächlich in die Produktbildung fließenden NADPH-Anteil beschreiben, liegen bei 38 bzw. 42 %. Der Großteil des NADPH wird also nicht für die Hydroxylierung der Substrate aufgewendet, sondern geht durch Bildung von Wasserstoffperoxid oder Wasser verloren, diesen Vorgang bezeichnet man als Entkopplung. CYP102A1 liegt in der Aktivität, bei vergleichbarer Kopplungseffizienz, etwas zurück. Die Aktivität von CYP102A3 ist im Vergleich zu CYP102A2 mit 800 bzw. 450 min<sup>-1</sup> deutlich geringer. Die Regioselektivität der Hydroxylierung ist in allen Fällen niedrig. Wie schon für unverzweigte Fettsäuren beschrieben, findet die Hydroxylierung im Bereich  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -5 statt. Beim Vergleich der Hydroxylierungsmuster von Iso- und Anteispentadecansäure wird jedoch deutlich, dass eine Hydroxylierung an einem tertiären Kohlenstoffatom, vermutlich aus sterischen Gründen, ungünstig ist. Isopentadecansäure wird daher bevorzugt an Position  $\omega$ -2 hydroxyliert (76-91%), während die Hydroxylierung bei Anteispentadecansäure vorwiegend an  $\omega$ -1 (27-57%) und  $\omega$ -3-Position (19-36%) auftritt.

### 3.3.2 Oxidation weiterer hoch verzweigter Substrate

Durch Erhöhung des Verzweigungsgrades der Substrate sollte, basierend auf den Ergebnissen der Iso- und Anteispentadecansäureumsetzung, eine verbesserte Regioselektivität bei der Oxidation erreicht werden können. Hydroxylierung an tertiären Kohlenstoffatomen fand dort praktisch nicht statt. Eine natürliche Quelle solcher hoch verzweigten Fettsäuren stellen die Bürzeldrüsenfette von Vögeln, hier der Hausgans (*Anser anser f. domestica*) und der Moschusente (*Cairina moschata*), dar. Hieraus wurden zunächst die Fettsäuren und durch weitere chemische Syntheseschritte (Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub>, etc.) Derivate wie z.B. Fettalkohole gewonnen, welche bereits am Institut für Technische Biochemie verfügbar waren (Morr et al. 1992). Eine Reihe dieser Substrate mit unterschiedlicher Kettenlänge sowie unterschiedlichem Verzweigungsgrad wurden auf Aktivität mit CYP102A1, A2 und A3 getestet. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich CYP102A1 in der Lage war, einige der Substrate zu hydroxylieren. Mit CYP102A2 und CYP102A3 konnte keine Produktbildung festgestellt werden.

Der Wildtyp von CYP102A1 setzte mehrere der untersuchten Substrate um, wobei im Fall der Substrate **2 bis 5**, **7 bis 10**, **12**, **14** und **16** Produkte mittels GC/MS nachgewiesen werden konnten. Edukte mit einer Kettenlänge von 8 bis 11 Kohlenstoffatomen wurden ausschließlich

an  $\omega$ -1 Position hydroxyliert, sofern die  $\omega$ -2 Position methylverzweigt war, sowie mit hoher Selektivität an  $\omega$ -2 Position, wenn diese nicht verzweigt war. Alkohole wurden generell mit höherer Aktivität umgesetzt als ihre entsprechenden Säuren.

Die A74G F87V L188Q Dreifachmutante war in der Lage fast alle Substrate mit hoher Aktivität zu hydroxylieren. Die Anfangsgeschwindigkeiten lagen dabei zwischen  $118 \text{ min}^{-1}$  und  $1218 \text{ min}^{-1}$  bei gleichzeitig oft hohen Kopplungseffizienzen ( $>80\%$  für **3**, **9** und **10**, s. Abbildung 3.6). Auch hier war eine ausgeprägte Regioselektivität feststellbar: Wiederum wurden Fettsäurederivate mit Methylverzweigung in  $\omega$ -2 Position ausnahmslos in  $\omega$ -1 Position hydroxyliert, dahingegen war die Selektivität bei Substraten mit unverzweigter  $\omega$ -2 Position (**11** bis **14**) gering.

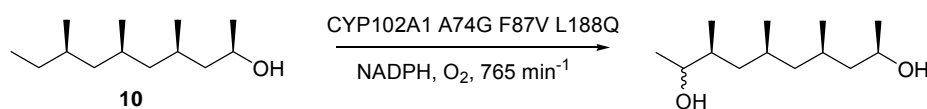
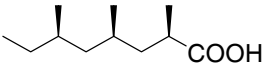
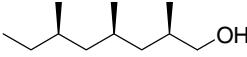
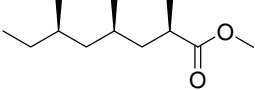
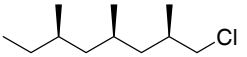
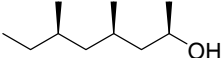
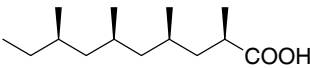
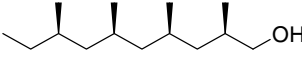
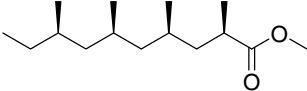
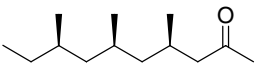
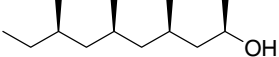
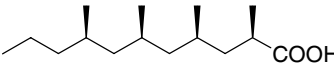
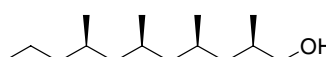
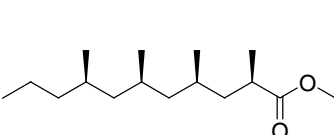

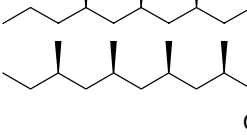
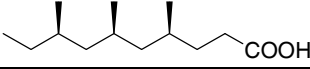


Abbildung 3.6: Selektive Hydroxylierung von 1,3,5,7-Tetramethylnonanol durch CYP102A1 A74G F87V L188Q.

Tabelle 3.5: Übersicht der mit CYP102A1 Wildtyp (WT) und CYP102A1 A74G F87V L188Q (3xMut)

umgesetzten hoch verzweigten Substrate. n.b.: nicht beobachtet

Struktur	NADPH-Verbrauch [ $\text{min}^{-1}$ ]		Regioselektivität $\omega$ -1: $\omega$ -2		Kopplungs-effizienz [%]	
	WT	3xMut	WT	3xMut	WT	3xMut
1 	2	31	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2 	37	1204	100:0	100:0	35	50
3 	11	1218	100:0	100:0	21	>90
4 	13	312	100:0	100:0	50	62
5 	18	759	100:0	100:0	3	28
6 	18	507	n.b.	100:0	n.b.	22
7 	28	595	100:0	100:0	28	73
8 	15	265	100:0	100:0	7	43
9 	16	707	100:0	100:0	72	83
10 	38	765	100:0	100:0	45	83
11 	28	720	n.b.	67:33	n.b.	35
12 	33	373	6:94	29:71	30	40
13 	16	119	n.b.	45:55	2	17
14 	41	562	4:96	64:36	40	42
15 	21	15	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
16 	51	590	100:0	100:0	8	23

### 3.3.3 Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Sowohl CYP102A2 als auch CYP102A3 zeigten keine katalytische Aktivität gegen die hoch verzweigten Substrate, was vor allem bei CYP102A2 verwunderlich ist, da es einfachverzweigte Substrate mit den höchsten Umsatzraten unter den untersuchten Monooxygenasen umsetzt. Durch Titration der aktiven Zentren mit Substratlösungen unterschiedlicher Konzentration wurde versucht, die Bindung der Substratmoleküle spektroskopisch nachzuweisen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die Bindung eines Substrates an das Häm-Eisen im aktiven Zentrum einer P450 Monooxygenase eine Änderung des Spin-Zustandes des Eisens und somit eine Änderung des Absorptionsspektrums zur Folge hat. Als Modellsubstrate wurden hier **6** und **10** verwendet.

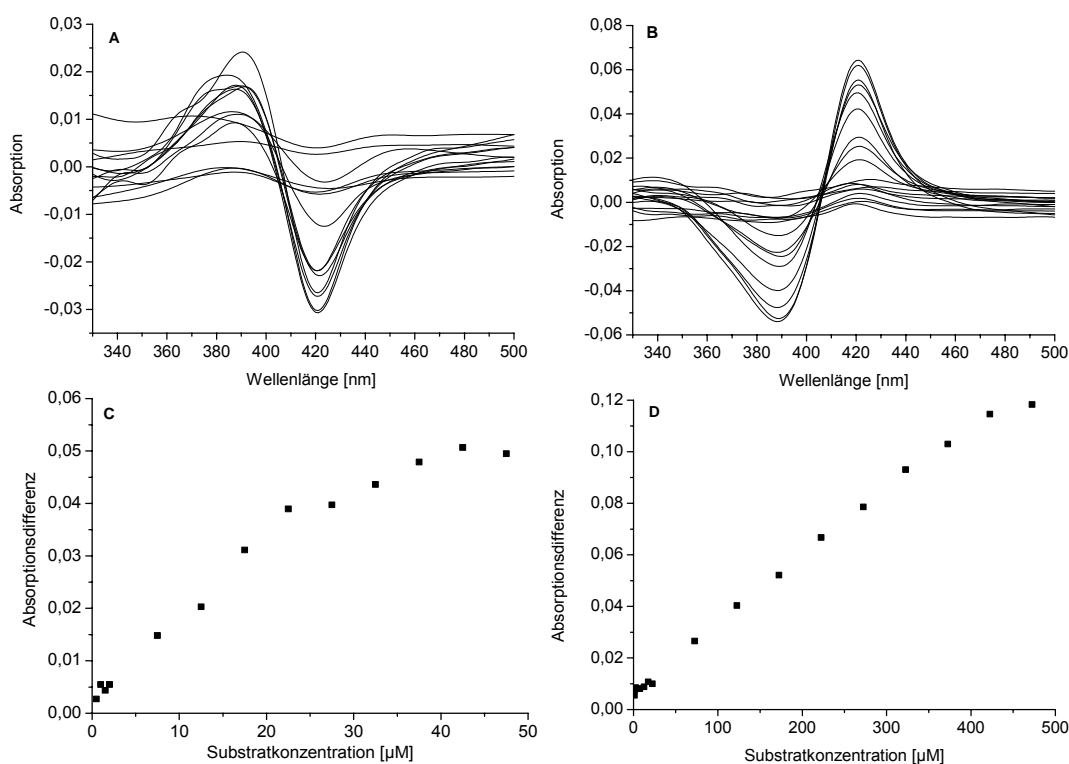


Abbildung 3.7: Bindungsspektren von CYP102A1 A74G F87V L188Q mit **6** (A) und CYP102A1 Wildtyp, ebenfalls mit **6** (B). Die Abbildungen C und D zeigen die dazugehörige Absorptionsdifferenz der Absorption bei 390 nm und 420 nm aufgetragen gegen die Substratkonzentration.

Bei der Titration von CYP102A1 A74G F87V L188Q mit 2, 4, 6, 8-Tetramethyl-dekansäure (**6**) erhält man ein charakteristisches Typ I-Bindungsspektrum (Abbildung 3.7 A), was durch eine Verschiebung des Spin-Gleichgewichtszustandes in Richtung eines high-spin-Zustandes verursacht wird. Bei zunehmender Substratkonzentration beobachtet man eine Vergrößerung

der Absorption bei 390 nm, während die Absorption bei 420 nm abnimmt. Trägt man die Absorptionsdifferenz zwischen 390 nm und 420 nm gegen die Substratkonzentration auf, ist eine Abflachung des Kurvenverlaufs ab einer Substratkonzentration von ca. 15  $\mu\text{M}$  zu erkennen, was auf eine zunehmende Sättigung des aktiven Zentrums mit Substrat hinweist (Abbildung 3.7 B). Der Kurvenverlauf entspricht dem einer rechtwinkligen Hyperbel und kann zur exakten Bestimmung der Dissoziationskonstanten analog der Eadie-Auftragung bei der Bestimmung kinetischer Konstanten aus einer Michaelis-Menten-Kinetik linearisiert werden (Fersht 1999). Der  $K_D$ -Wert der A74G F87V L188Q Dreifachmutante mit 2, 4, 6, 8-Tetramethyldecansäure ist  $K_D=23,2 \mu\text{M}$ . Die Titration des CYP102A1 Wildtyps mit demselben Substrat resultiert in einem umgekehrten Typ I-Spektrum (Abbildung 3.7 C), welches aus einer Absorptionszunahme bei 420 nm und Absorptionsabnahme bei 390 nm mit steigenden Substratkonzentrationen resultiert. Die genaue Bestimmung der Dissoziationskonstante im Falle des Wildtyps ist nicht möglich, da eine Sättigung des aktiven Zentrums nicht erreicht wird. Vielmehr steigt die Absorptionsänderung linear über einen großen Konzentrationsbereich an, bis die Löslichkeitsgrenze des Substrats erreicht ist (Abbildung 3.7 D). Daraus lässt sich lediglich ableiten, dass  $K_D>200 \mu\text{M}$  ist.

Bindungsspektren mit 1, 3, 5, 7-Tetramethylnonanol (**10**) resultierten für die CYP102A1 Dreifachmutante wiederum in einem Typ I-Bindungsspektrum (A), der  $K_D$ -Wert wurde zu  $K_D=26,2 \mu\text{M}$  bestimmt. Die Bindungsspektren des Wildtyps entsprechen wieder einem umgekehrten Typ I (B). Allerdings kann jetzt auch die Dissoziationskonstante bestimmt werden, da die Auftragung der Absorptionsdifferenz gegen die Substratkonzentration ein Erreichen der Sättigungskonzentration ab ca. 250  $\mu\text{M}$  erkennen lässt. Die Dissoziationskonstante beträgt  $K_D= 239,7 \mu\text{M}$ .

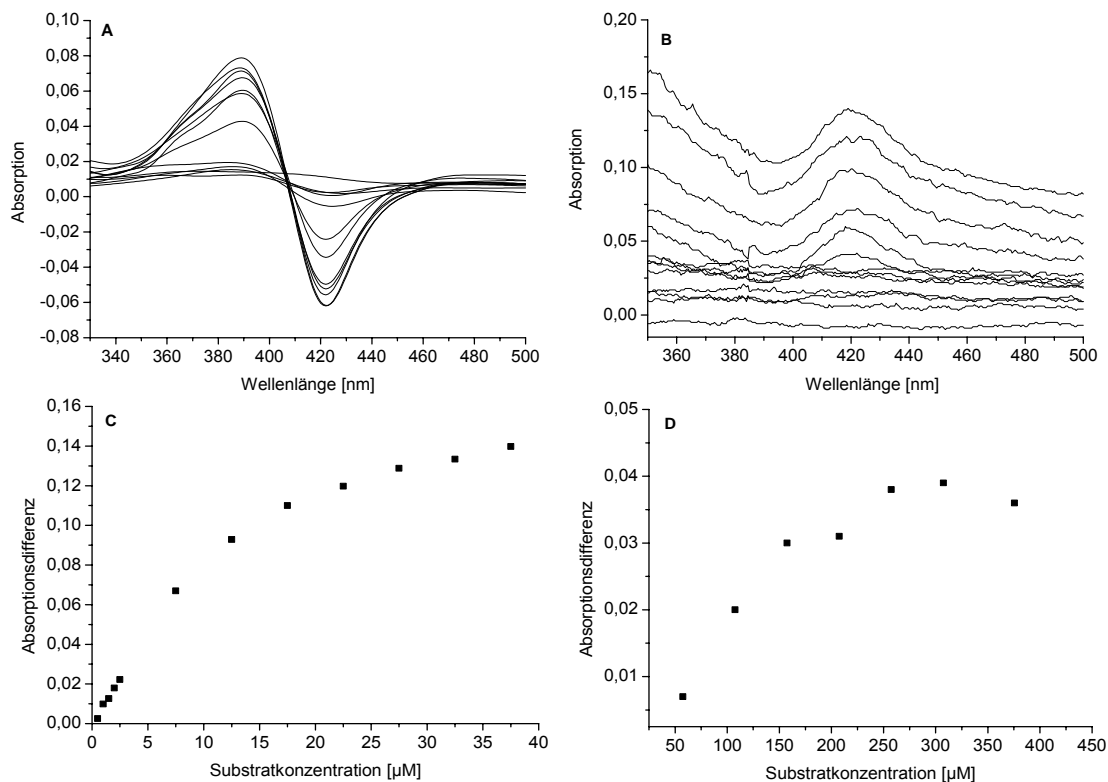


Abbildung 3.8: Bindungsspektren von CYP102A1 A74G F87V L188Q mit **10** (A) und CYP102A1 Wildtyp, ebenfalls mit **10** (B). Die Abbildungen C und D zeigen die dazugehörige Absorptionsdifferenz der Absorption bei 390 nm und 420 nm aufgetragen gegen die Substratkonzentration.

### 3.3.4 Bestimmung kinetischer Konstanten

Kinetische Konstanten des CYP102A1 Wildtyps sowie der A74G F87V L188Q Dreifachmutante wurden entsprechend dem Enzymmodell von Michaelis und Menten mit den Substraten **6**, **10** und **16** bestimmt, da diese von besonderem Interesse als Synthesebausteine für die Borrelidinsynthese sind. Eine genauere Charakterisierung als Grundlage für die Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses ist daher sinnvoll.

Tabelle 3.6: Kinetische Konstanten der Umsetzung von CYP102A1 Wildtyp und CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante mit Substraten **6**, **10** und **16**.

Substrat Nr.	A1 Wildtyp		Dreifachmutante			
	$K_M$ [mM]	$v_{max}$ [mM min <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [min <sup>-1</sup> ]	$K_M$ [mM]	$v_{max}$ [mM min <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [min <sup>-1</sup> ]
<b>6</b>	-	-	-	0,67	0.23	1512
<b>10</b>	0.53	0.08	59.5	0,04	0.07	666.7
<b>16</b>	47	0.02	150.7	0,15	0.09	939.9

Wie anhand der Daten in Tabelle 3.6 zu erkennen ist, setzt der Wildtyp die verwendeten Substrate mit geringer Aktivität um, **6** wird nicht hydroxyliert. Die Dreifachmutante wies ausgesprochen hohe Umsatzraten mit allen getesteten Substraten auf, die höchste Umsatzrate wurde mit 2, 4, 6, 8-Tetramethyldekansäure (**6**) gemessen (1512 min<sup>-1</sup>). Die Affinität der Substrate zur Dreifachmutante war ebenfalls höher als zum Wildtyp, was aus den um Größenordnungen kleineren  $K_M$ -Werten hervorgeht.

### 3.4 Selektivoxidation von Terpenen

#### 3.4.1 Durchmusterung einer CYP102A-Bibliothek

Um erste Ergebnisse bezüglich der Aktivität von P450-Monooxygenasen gegen  $\alpha$ -Pinen zu erhalten, wurden mehrere am ITB bereits vorhandene Mutanten von CYP102A1 und CYP102A3 sowie der Wildtyp von CYP102A1 hinsichtlich ihrer Aktivität und ihres Produktspektrums charakterisiert. Analog zur Vorgehensweise bei den Fettsäuren wurde der NADPH-Verbrauch in den ersten 30 s als Maß für die Anfangsaktivität bestimmt, die Reaktionsansätze wurden anschließend extrahiert und die gebildeten Produkte mittels GC/MS-Messungen identifiziert. Viele der getesteten Mutanten zeigen Aktivität gegen (+)- $\alpha$ -Pinen: Bei den Hauptprodukten handelt es sich um Pinenepoxid oder Verbenol, als Nebenprodukte entstehen Myrtenol und geringe Mengen Verbenon. Die höchste Anfangsaktivität wurde mit CYP102A1 A74G F87V L188Q gemessen (211 min<sup>-1</sup>). Aktivitäten der gleichen Größenordnung wurden auch mit Mutanten von CYP102A3 erreicht, allerdings handelte es sich hier hauptsächlich um Entkopplung (s. 1.2.2): So zeigt z.B. die CYP102A3 S189Q A330V Mutante einen anfänglichen NADPH-Verbrauch von 121 min<sup>-1</sup>, jedoch keine Produktbildung.

Tabelle 3.7: Durchmusterung mehrerer P450-Monooxygenasen und deren Mutanten bezüglich ihrer Aktivität und Regioselektivität bei der Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen; . n.b. nicht bestimmbar.

P450 Monooxygenase (Bezeichnung)	Mutation/en	NADPH- Verbrauch [1/min]	Pinen- epoxid [%]	Verbenol [%]
<b>CYP102A1</b>				
WT		10	n.b.	n.b.
F87A	F87A	30	n.b.	n.b.
F87V	F87V	63	28	72
F87S	F87S	11	n.b.	100
AA	F87A, A264G	30	54	46
L4V	F87V, L188Q	23	19	81
LFV	F87V, R47L, Y51F	44	29	71
W45	R47L, Y51F	17	37	63
W62	A264G	7	n.b.	n.b.
AL4V	F87V, L188Q; A74G,	211	23	77
C112	F87V, A74E, P386S	24	25	75
(F87V)L	F87V, L188K	27	12	88
(F87V)LA/ L7V	F87V, L188K, A74G	39	15	85
(F87V)LAR	F87V, L188K, A74G, R47F	58	n.b.	100
(F87V)LARV	F87V, A74G, L188K, R47F, V26T	38	25	75
F87G	F87G	36	21	79
L188Q	L188Q	9	n.b.	n.b.
WT		13	n.b.	n.b.
<b>CYP102A2</b>				
WT		21	n.b.	n.b.
<b>CYP102A3</b>				
WT		n.b.	n.b.	n.b.
F88V	F88V	66	0	100
S189Q	S189Q	81	0	0
F88V S189Q	F88V S189Q	185	15	85
F88V S189Q A330V	F88V S189Q A330V	n.b.	n.b.	n.b.
QV	S189Q A330V	121	n.b.	n.b.

Bei der weiteren Optimierung der Aktivität und insbesondere der Regioselektivität wurde in den folgenden Experimenten nur noch (-)- $\alpha$ -Pinen eingesetzt, da dies preiswert in größeren Mengen erhältlich ist. Außerdem hat die Stereochemie des Substrats Einfluss auf die Regioselektivität der Reaktion, was die Fokussierung auf ein Enantiomer erforderlich macht (Lienemann 2005). Die Selektivität der CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante ändert sich abhängig davon, ob (+)- $\alpha$ -Pinen oder (-)- $\alpha$ -Pinen eingesetzt wird. Bei



Verwendung von (-)- $\alpha$ -Pinen entsteht Pinenepoxid als Hauptprodukt (72%), (+)- $\alpha$ -Pinen wird hauptsächlich zu Verbenol umgesetzt (77%).

### 3.4.2 Sättigungsmutagenese

Die ersten Oxidationsversuche von Pinen mit verschiedenen Mutanten von P450 Monooxygenasen belegen den großen Einfluss einiger Mutationen auf die Aktivität und Selektivität der Reaktion. Während die Wildtypen der eingesetzten Monooxygenasen keinerlei Aktivität gegen Pinen aufwiesen, führten Mutationen an nur wenigen Aminosäurepositionen dazu, dass Pinen mit Umsatzraten bis zu  $211 \text{ min}^{-1}$  oxidiert wurde. Zunächst wurde der Einfluss von vier dieser Aminosäurepositionen untersucht: Arginin 47 und Tyrosin 51 am Eingang des Substratzuganskanals, Leucin 188 im Substratzugangskanal sowie Phenylalanin 87 im aktiven Zentrum können direkt mit dem Substrat interagieren und haben daher potentiell Einfluss auf Aktivität und Selektivität der P450-katalysierten Reaktion. Daher wurden diese Aminosäuren mittels Sättigungsmutagenese durch alle anderen 19 Aminosäuren ausgetauscht, was durch Verwendung entsprechender degenerierter Oligonukleotide bei einer Polymerase Kettenreaktion erreicht wird (2.2.1.1). Als Ausgangsmutante diente die CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante. Schließlich erhielt man vier Bibliotheken mit jeweils 96 Mutanten, wovon jede Bibliothek theoretisch alle 20 möglichen Mutanten enthalten sollte. Die Bibliotheken wurden anschließend mit Hilfe eines photometrischen NADPH-Oxidationstests durchmustert. Dieser Test kann sehr einfach mit ausreichender Sensitivität im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt werden und ist daher für ein erstes Screening von Mutantenbibliotheken geeignet. Allerdings können keine Rückschlüsse auf die Kopplungseffizienz oder die Produktverteilung getroffen werden, was eine weitere Untersuchung der selektierten Mutanten z.B. durch Gaschromatografie erforderlich macht.

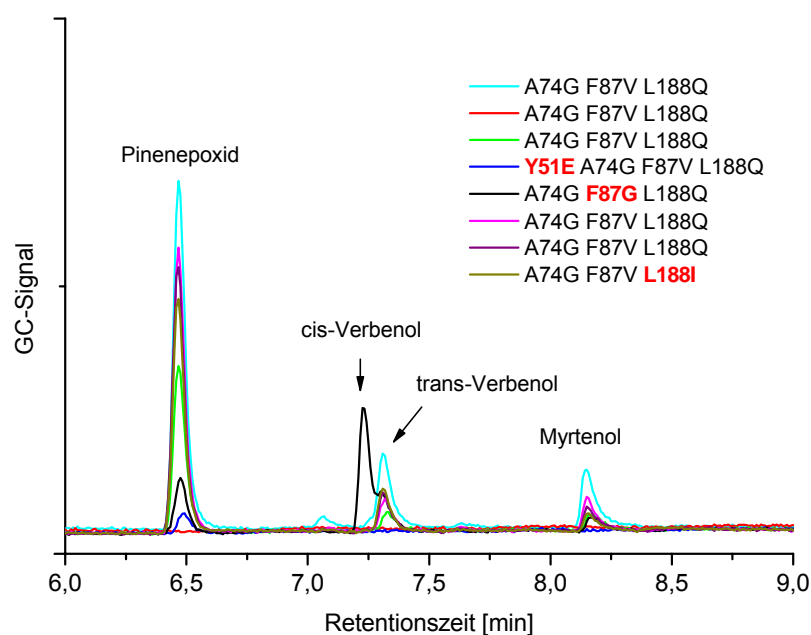


Abbildung 3.9: Überlagerung von Chromatogrammen aus der Durchmusterung von vier Sättigungsmutagenesebibliotheken. Die zwei aktivsten Mutanten jeder Bibliothek wurden bezüglich ihrer Regioselektivität untersucht.

Die Chromatogramme der (-)- $\alpha$ -Pinen Umsetzung der jeweils zwei aktivsten Mutanten jeder Bibliothek sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Fast alle Mutanten zeigen eine Selektivität zugunsten von Pinenepoxid, als Nebenprodukte werden vorwiegend *trans*-Verbenol und Myrtenol gebildet. Eine wesentliche Abweichung von diesem Muster ist bei der F87G-Mutante zu sehen, diese bildet hauptsächlich *cis*-Verbenol. Bei der Sequenzierung der Mutanten stellte sich heraus, dass es sich bei fünf der selektierten Klone um die als Edukt für die Sättigungsmutagenese eingesetzte Dreifachmutante handelte. Die anderen Mutanten wiesen eine Y51E bzw. eine L188I Mutation auf. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass Phenylalanin an Position 87 einen Einfluss auf die Regioselektivität des Enzyms hat. Um weitere F87 Mutanten mit verschiedenen Regioselektivitäten zu identifizieren und um auch solche zu berücksichtigen, die im NADPH-Oxidationstest keine erhöhte Aktivität zeigten, wurde die gesamte F87-Bibliothek mittels GC/MS-Messungen durchmusterung. Fünf Mutanten, die in einem ersten Durchmusterungsschritt Regioselektivität für die Bildung von Pinenepoxid bzw. Verbenol aufwiesen, wurden sequenziert, in Schüttelkolben exprimiert und nochmals charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Durchmusterung der Sättigungsmutagenesebibliotheken.

Mutationen	NADPH- Verbrauch [min <sup>-1</sup> ]	Pinenepoxid [%]	Verbenol [%]	Myrtenol [%]
A74G L188Q F87G	73	21	72	7
A74G L188Q F87P	(277)	30	70	0
A74G L188Q F87S	64	31	69	0
A74G L188Q F87V	249	72	20	8
A74G L188Q F87F	38	85	15	0
Y51E A74G F87V L188Q	183	58	24	18
A74G F87V L188I	110	70	23	10

Neben den Ergebnissen des NADPH-Verbrauchs ist die Regioselektivität der Mutanten dargestellt. Dabei fällt auf, dass der Austausch des Phenylalanins zu kleinen Aminosäuren wie Glycin oder Serin zu einer Präferenz für die Verbenolproduktion führt, während größere apolare Reste wie Valin oder Phenylalanin die Epoxidbildung begünstigen. Die Mutation zu Prolin führt zur höchsten gemessenen Aktivität von 277 min<sup>-1</sup>, wobei bevorzugte Verbenol gebildet wird (70%). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die gemessene Aktivität der F87P Mutante stark fehlerbehaftet ist. Ursache hierfür sind Probleme bei der Konzentrationsbestimmung. Im Gegensatz zu den anderen charakterisierten Mutanten weist die F87P Mutante eine starke Absorptionsbande bei 420 nm auf, was unterschiedliche Ursachen haben kann:

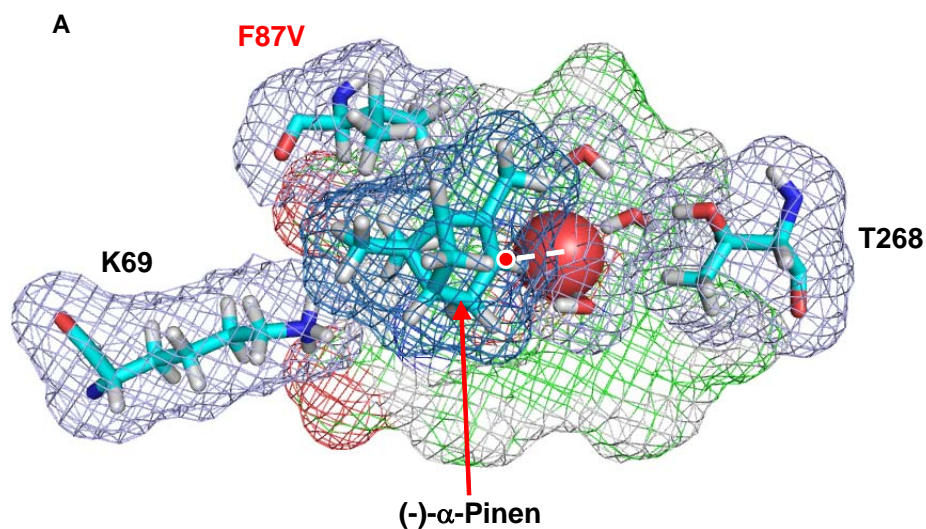
1. Prolin führt zu einer Veränderung der Sekundärstruktur im aktiven Zentrum, was zur Folge hat, dass die Häm-Gruppe nicht mehr korrekt durch ein Cysteinat, sondern durch den Imidazolring eines Histidins gebunden wird (Omura 2005).
2. Die Mutation zu Prolin begünstigt die autoxidative Inaktivierung der Monooxygenase durch vermehrte Bildung von OH<sup>-</sup>-Radikalen im Dithionit-reduzierten Zustand, was die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 450 nm zu 420 nm zur Folge hat (Karuzina und Archakov 1994b).

Abhängig davon, ob der P420-Anteil des Proteins in der Reaktion mit Pinen letztendlich aktiv ist, ist der zu 277 min<sup>-1</sup> bestimmte Wert korrekt oder nicht. Für die Berechnung der Aktivität

wurde nur der P450-Anteil im CO-Differenzspektrum berücksichtigt, sollte der P420-Peak also durch Autoxidation während der Messung des CO-Differenzspektrums zustande gekommen sein, ist die tatsächliche Aktivität deutlich geringer als die berechnete.

### 3.4.3 Molekulardynamische Simulationen

Die hier festgestellten signifikanten Unterschiede der Regioselektivität, insbesondere zwischen CYP102A1 A74G F87V L188Q (Epoxid-selektiv) und CYP102A1 A74G F87G L188Q (Verbenol-selektiv) wurden mit Hilfe von Dockingverfahren und Molekulardynamischer Simulation (MD-Simulation) im Rahmen einer Kooperation in der Arbeitsgruppe Bioinformatik am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart untersucht (Branco et al. 2007). Für die Mutanten wurden dabei unterschiedliche stabile Konformere des Substrats im aktiven Zentrum gefunden, welche die experimentell beobachteten Selektivitäten erklären.



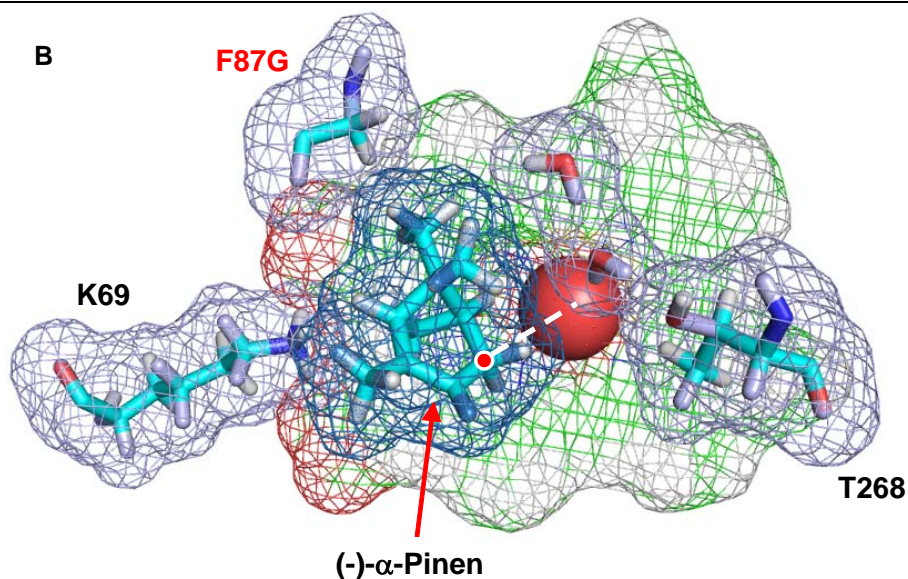


Abbildung 3.10: Darstellung der stabilen Konformationen von (-)- $\alpha$ -Pinen im aktiven Zentrum von CYP102A1 A74G F87V L188Q (A) und CYP102A1 A74G F87G L188Q (B) nach einer Simulationszeit von 4,06 ns. Das Eisen der Häm-Gruppe ist als rote Kugel dargestellt.

In Abbildung 3.10 sind Momentaufnahmen der stabilen Konformationen des Pinen im aktiven Zentrum der CYP102A1-Mutanten dargestellt. Im Falle der F87V-Mutante (A) wird Pinen offensichtlich durch Wechselwirkungen seiner drei Methylgruppen mit der Seitenkette des Valins stabilisiert, bei der F87G-Mutante entfallen diese Wechselwirkungen und das Substrat kann lediglich von der Häm-Gruppe selbst stabilisiert werden. Als Folge dieser vergleichsweise schwachen Interaktionen gibt es im Fall der F87G Mutante zwei stabile Konformationen, von denen hier eine dargestellt ist (B). Weiteren Einfluss auf die Stabilisierung der Konformere kann Lysin69 ausüben. Lysin dient der Stabilisierung einer der Propionylseitenketten des Porphyrinrings (Chen et al. 2004), kann aber gleichzeitig auch mit dem Substrat interagieren. Die Kohlenstoffatome des Pinen, die, laut den durch MD-Simulation gefundenen Konformationen, dem Häm-Zentrum zugewandt sind, werden im Experiment bevorzugt oxidiert.

#### 3.4.4 Validierung des Modells

Um die Gültigkeit des durch MD-Simulation entworfenen Modells der Bindungssituation von Pinen im aktiven Zentrum zu überprüfen, wurde (-)- $\beta$ -Pinen mit den in der MD-Simulation untersuchten Mutanten hydroxyliert. Da (-)- $\beta$ -Pinen eine ähnliche Struktur wie (-)- $\alpha$ -Pinen hat, müsste bei einer analogen Orientierung des Substrates im Falle der F87V Mutation Pinocarveol entstehen, im Falle der F87G Mutante sollte die Regioselektivität aufgrund der

möglichen Konformationen zugunsten der Bildung von Myrtanal bzw.  $\beta$ -Pinenepoxid verschoben sein.

Tabelle 3.9: Oxidation von (-)- $\beta$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87V L188Q und CYP102A1 A74G F87G L188Q.

CYP102A1	NADPH- Verbrauch [min <sup>-1</sup> ]	<i>trans</i> - Pinocarveol [%]	Nebenprodukte (Pinenepoxid, Myrtanal) [%]
A74G F87V L188Q	80	62	38
A74G F87G L188Q	80	40	60

Aus Tabelle 3.9 ist ersichtlich, dass das Hauptprodukt der (-)- $\beta$ -Pinen Oxidation im Falle der F87V Mutante *trans*-Pinocarveol ist, was der anhand des Modells vorhergesagten Regioselektivität entspricht. Diese Selektivität ist bei der F87G Mutante in Richtung der Bildung von Pinenepoxid und vor allem Myrtanal verschoben. Auch dies stimmt mit den anhand des Modells bestimmten Selektivitäten überein.

### 3.4.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Da die Relevanz der Aminosäureposition 87 für die Regioselektivität von CYP102A1 durch die vorangegangenen Experimente mehrfach bestätigt wurde, wurden nun gezielt Mutationen an Position 87 eingeführt. Durch die Durchmusterung der Sättigungsmutagenesebibliothek sollten zwar theoretisch alle möglichen F87 Mutanten abgedeckt worden sein, jedoch gibt es bei der untersuchten Menge von 96 Kolonien eine große Restwahrscheinlichkeit, dass von Anfang an nicht alle Mutanten vorhanden waren. Um eine 95%ige Chance zu haben, dass eine Bibliothek, die aus 64 möglichen Sequenzvarianten besteht, zu 100% vollständig ist, müsste die Bibliothek eine Größe von 456 Kolonien haben (Patrick et al. 2003).

Weiterhin wurden Mutationen der Lysin69 Position zu anderen basischen Aminosäuren (Histidin und Arginin) durchgeführt, um einerseits eine Stabilisierung des Pinenmoleküls zu bewirken und andererseits die Stabilisierung des Häms durch Wechselwirkung mit den Propionylseitenketten weiter sicherzustellen. Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in Abbildung 3.11 und Abbildung 3.12 zusammengefasst.

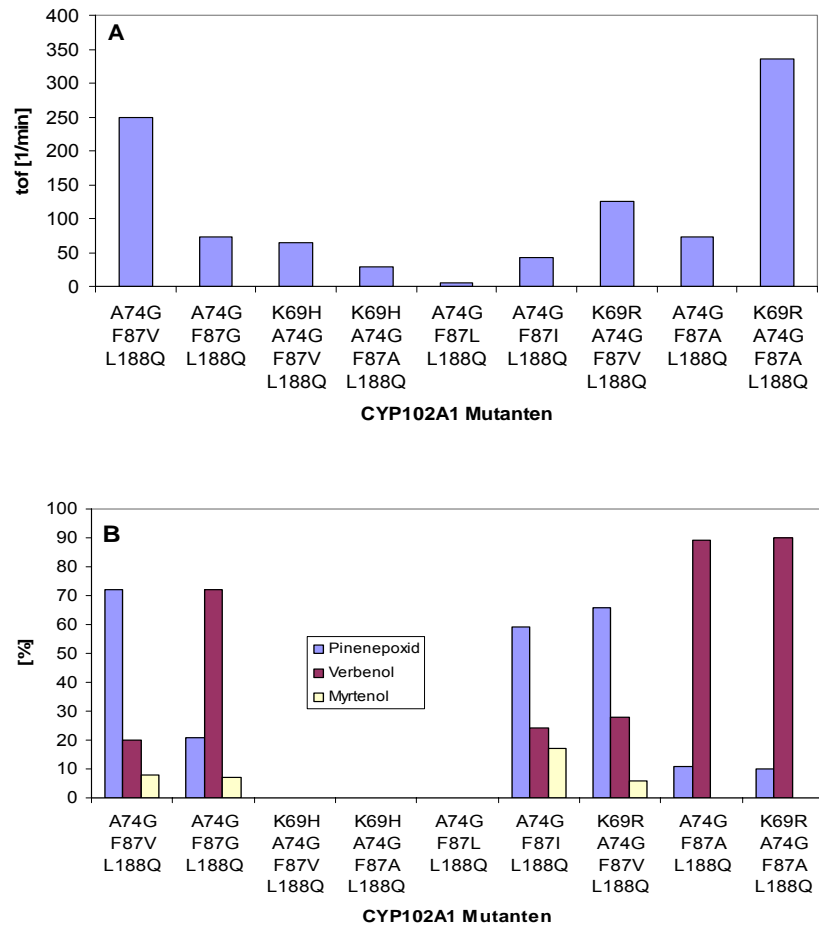
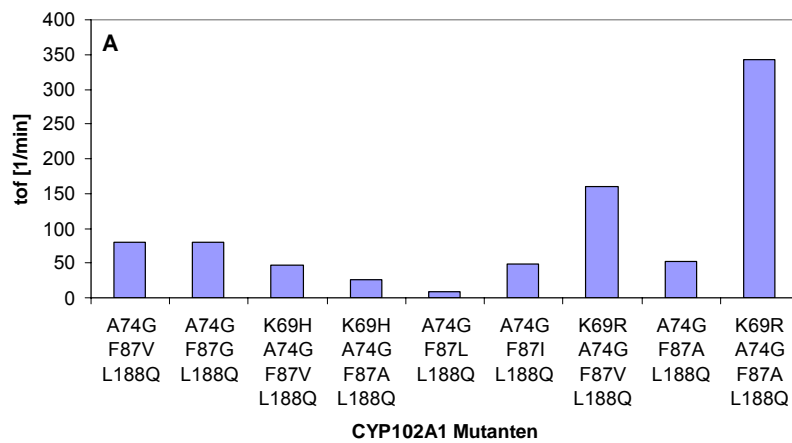


Abbildung 3.11: Aktivität (A) und Regioselektivität (B) der durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten Mutanten bei der Oxidation von (-)- $\alpha$ -Pinen.



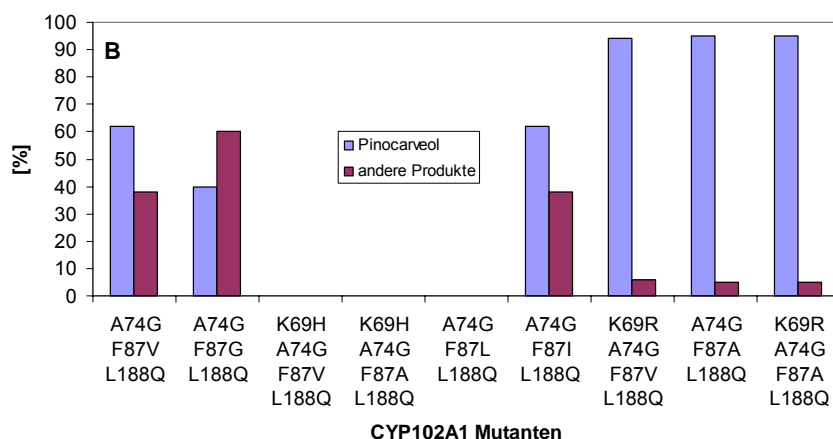


Abbildung 3.12: Aktivität (A) und Regioselektivität(B) der durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten Mutanten bei der Oxidation von (-)- $\beta$ -Pinen.

Die eingeführten Mutationen an Position 87 haben unterschiedlichen Einfluss auf die Regioselektivität und Aktivität von CYP102A1. Das Einfügen sehr sperriger Reste wie Leucin oder Isoleucin führt, ähnlich wie beim Phenylalanin des Wildtyps, zu einer Blockade des aktiven Zentrums, was im Falle von F87L dazu führt, dass keine Produktbildung nachgewiesen werden kann. Die F87I Mutante weist eine sehr niedrige Aktivität bei der Oxidation sowohl von  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Pinen auf.

Als sehr positiv hat sich dahingegen die Mutation zu Alanin an Position 87 herausgestellt. Die Regioselektivität konnte deutlich zugunsten der Bildung von Verbenol (89%) bei  $\alpha$ -Pinenoxidation sowie der Bildung von trans-Pinocarveol (95%) bei der Oxidation von  $\beta$ -Pinen verbessert werden. Dabei weist die Mutante eine Aktivität von  $83 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $55 \text{ min}^{-1}$  auf.

Durch zusätzliches Einfügen einer K69R-Mutation kann die Aktivität der A74G F87A L188Q Dreifachmutante auf  $104 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $335 \text{ min}^{-1}$  erhöht werden. Allerdings tritt bei der Konzentrationsbestimmung durch CO-Differenzspektroskopie wieder eine Absorptionsbande bei 420 nm auf. Die Aktivität kann daher aufgrund der bereits in Abschnitt 3.4.2 diskutierten Gründe fehlerbehaftet sein. Ein Austausch des Lysins an Position 69 gegen Histidin, führt zur vollständigen Inaktivierung der Monooxygenasedomäne.



### 3.4.6 Mehrfachsättigungsmutagenese

#### 3.4.6.1 Herstellung einer Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek durch Klonierung eines Genfragments

Durch Sättigungsmutagenese nur einer Aminosäureposition pro Bibliothek werden additive Effekte mehrerer gleichzeitiger Mutationen in einem Enzym nicht berücksichtigt. Außerdem führt die Kombination mehrerer Mutationen, die sich in Einzelmutanten positiv auf Aktivität, Selektivität und Stabilität ausgewirkt haben, oftmals nicht zu den erwarteten Verbesserungen. Die Konstruktion und Durchmusterung einer Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek ist daher ein geeignetes Mittel, um sich gegenseitig verstärkende, positive Effekte von Mutationen aufzudecken. Für die Konstruktion der Mutantenbibliothek wurde eine Klonierungsstrategie verwendet, bei der durch Austausch eines Genfragments durch ein synthetisches, degeneriertes Oligonukleotid gezielt Mutationen eingebracht werden sollten. Die Aminosäurepositionen 74, 75, 76, 82, 87 und 90 – alle in der Substratbindungstasche – des CYP102A1 Wildtyps wurden als Ziele für die kombinierte Sättigungsmutagenese ausgewählt. Zum Einsatz kam ein synthetisches Oligonukleotid mit nnb-Codons an den entsprechenden Aminosäurepositionen, „n“ steht dabei für den Einbau aller vier Nukleotide A, G, T, C; „B“ symbolisiert hingegen den Einbau aller Nukleotide außer A, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Stopp-Codons herabzusetzen (Abbildung 3.13).

```
5'-CGGTCGTAGTCTTAAGTCAAnnbnnbnnbTTTGTACGTGATTTTnnbGGAGAC
GGGTTAnnbACAAGCnnbACGCATGAAAAAAATTGGAAAAAAGCGCATAATATCTT
ACTTCCAAGCTTCAGTCAGCAGGCAATGAAAGGCTATCATGCGATGATGGTCGAT
ATCGCCGTGCAGCTTGTTCAAAGTGGGAGCGTCTAAATGCAGATGAGCATATTG
AAGTACCGGAAGACATGACACGTTTAAACGCTTGATACAATTGTCTTAGAAG-3'
```

Abbildung 3.13: Sequenz des synthetischen Oligonukleotides; die *Bsp*TI-Schnittstelle ist blau, die *Mun*I-Schnittstelle grün dargestellt, die roten nnb-Codons kennzeichnen den Ort der Sättigungsmutagenese.

Zur Herstellung der Bibliothek sollte aus dem pET28a+ CYP102A1-Plasmid ein Teil des *cyp*-Gens mit den Restriktionsenzymen *Mun*I und *Bsp*TI entfernt und durch das synthetische Oligonukleotid ersetzt werden. *Mun*I und *Bsp*TI wurden ausgewählt, da sie das Konstrukt jeweils nur einmal schneiden und in günstigen Bereichen vor und nach dem auszutauschenden Bereich liegen. Das entfernte 245 Basenpaare lange Fragment wurde durch das ebenfalls mit *Mun*I und *Bsp*TI Oligonukleotid ersetzt (Abbildung 3.14).

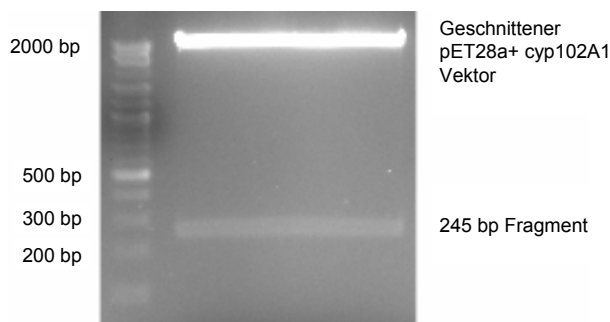


Abbildung 3.14: Agarosegel des Restriktionsverbaus von *pET28a+ cyp102A1* mit *MunI* und *BspTI*.

Nach Ligation des Oligonukleotides in das Vektorfragment und Transformation in kompetente *E.coli* NovaBlue(DE3)-Zellen erhielt man ca. 10 000 Kolonien von denen 19 zufällig ausgewählt und deren Plasmid-DNA extrahiert wurde. Die Qualität der Bibliothek wurde durch Sequenzierung des mutierten Bereichs kontrolliert (Abbildung 3.15).

Translate	Consensus	370	380	390	400	410	420	430	440	450						
		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-yRT-gy	ADaC-TTT	GTACGTG	ATTTNHB	GGAGACGG	GTAA	MHBA	CAAGCKK	KACGCATGA	
▶ 62%MA5khh8 (16>745) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-G-T-GT	CACT-TTT	GTACGTG	ATTTG	TCGGAGAC	GGGTTA	TGT	AACA	GCTGG	ACGCATGA
▶ 64%MA5khh10 (25>797) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TGT-G-A	TTAG-TTT	GTACGTG	ATTTG	AGGGAGAC	GGGTTA	ACC	CAAG	CGGT	ACGCATGA
▶ 60%MA5khh6 (28>758) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	--GG-GC	ATAAC-TTT	GTACGTG	ATTTA	TGGGAGAC	GGGTTA	GTT	AAC	GCTG	ACGCATGA
▶ 72%MA5khh18 (29>758) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TAT--T-	TTCCGTTT	GTACGTG	ATTTT	CTTGGAGAC	GGGTTA	ACC	CAAG	CGAT	ACGCATGA
▶ 66%MA5khh12 (29>740) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TTC---A	ACGCTTTT	GTACGTG	ATTTT	ACCGGAGAC	GGGTTA	ACC	CAAG	CTTT	ACGCATGA
▶ 57%MA5khh3 (34>749) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	ACGT-G	TCCG--T	TTGTAC	GTATTT	GAGGAGAC	GGGTTA	CTT	AAC	GCTG	ACGCATGA
▶ 67%MA5khh13 (34>750) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TATC-T	CCG-C-T	TTGTAC	GTATTT	TACTGGAGAC	GGGTTA	TCT	AAC	GCTT	ACGCATGA
▶ 59%MA5khh5 (33>744) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	CGCCCGT-T	---TTT	GTACGTG	ATTTT	AACGGAGAC	GGGTTA	TAT	-CA	AGCG	ACGCATGA
▶ 69%MA5khh15 (33>612) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-T-TM-C	ACNCG-T	TTGTAC	GTATTT	NAGGAGAC	GGGTTA	ANG	CAAG	CTG	ACGCATGA
▶ 63%MA5khh9 (32>754) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-C-TT	TGGC-C-T	TTGTAC	GTATTT	CCCGGAGAC	GGGTTA	CAT	AAC	AGTAC	ACGCATGA
▶ 56%MA5khh2 (42>697) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	--GGC-C	MTGAC-T	TTGTAC	GTATTT	CNMGAGAT	GGGTTA	ANC	CAAG	GCTG	ACGCATGA
▶ 55%MA5khh1 (35>685) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TA--G	CTTAT-T	TTGTAC	GTATTT	TCTGGAGAC	GGGTTA	AAT	AAC	AAG	ACGCTATGA
▶ 68%MA5khh14 (42>802) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	--GA-GG-	TCAGTTT	GTACGTG	ATTTT	GTTGGAGAC	GGGTTA	CTT	AAC	AGCTG	ACGCATGA
▶ 70%MA5khh16 (40>748) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TCT-G-A	TTGG-T	TTGTAC	GTATTT	CACGGAGAC	GGGTTA	CCG	CAAG	CTCC	ACGCATGA
▶ 73%MA5khh19 (36>790) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	--GGGT-T	ATC-T	TTGTAC	GTATTT	TCCGGAGAC	GGGTTA	ATG	CAAG	CTTC	ACGCATGA
▶ 58%MA5khh4 (41>750) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-C-TTG-	ATGAC-T	TTGTAC	GTATTT	AGGGAGAC	GGGTTA	AGC	CAAG	CTN	ACGCATGA
▶ 71%MA5khh17 (37>816) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	-TATT--	AGGC-C	TTGTAC	GTATTT	TCTGGAGAC	GGGTTA	CGC	CAAG	CTG	ACGCATGA
▶ 61%MA5khh7 (36>797) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	--CCC	AGCAT--	TTGTAC	GTATTT	CCCGGAGAC	GGGTTA	CGC	CAAG	CGGT	ACGCATGA
▶ 65%MA5khh11 (36>748) →		TGAATC	ACGCTT	TGATAAAA	AACTTAA	AGTCAA	--AA-GC	AAC-T	TTGTAC	GTATTT	AGTGGAGAC	GGGTTA	TAC	CAAG	CTCC	ACGCATGA

Abbildung 3.15: Ergebnis der Sequenzierung von 19 zufällig gewählten Mutanten der Mehrfach sättigungsbibliothek. Rote Bereiche zeigen die Positionen der Sättigungsmutagenese an.

Anhand der Ergebnisse der Sequenzierung ist erkennbar, dass die Diversität der Bibliothek sehr hoch ist und praktisch kein Wildtyp auftritt. 10 000 Kolonien der Bibliothek wurden in Mikrotiterplatten gepickt und exprimiert. Bei Überprüfung der Expression stellte sich aber heraus, dass nur ein kleiner Prozentsatz der Mutanten aktiv exprimiert wurde (ca. 3%). Auch eine Veränderung der Expressionsparameter führte nicht zu einem höheren Anteil an aktiven Mutanten, weshalb auf eine Durchmusterung dieser Bibliothek verzichtet wurde.

### 3.4.6.2 Herstellung einer Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek durch Verwendung degenerierter Oligonukleotide

Eine Reduktion der Mutationsrate sollte zu einer höheren Ausbeute an aktiv exprimierten Mutanten führen, weshalb eine Mehrfachsättigungsbibliothek mit lediglich drei Sättigungspositionen im aktiven Zentrum mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide hergestellt wurde. Zunächst wurde, ausgehend von CYP102A1 A74G L188Q, eine Sättigungsmutagenese an Position 87 analog der Vorgehensweise in Abschnitt 2.2.1.1 durchgeführt. Nach der Transformation erhielt man ca. 500 Kolonien, welche mit Kaliumphosphatpuffer von der Agarplatte gespült wurden um anschließend die Plasmid-DNA zu isolieren. Die so gewonnene DNA diente als Edukt für die folgende Sättigungsmutagenese an Position 188. Die Plasmid-DNA der hierbei erhaltenen ca. 2400 Kolonien wurde wiederum extrahiert und einer letzten Sättigungsmutagenese an Position 51 unterzogen. 5000 Kolonien dieser Bibliothek wurden in Mikrotiterplatten gepickt und bezüglich ihrer Aktivität und Selektivität bei der Umsetzung von (-)- $\alpha$ -Pinen untersucht.

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Sequenzierung der Dreifachsättigungsmutagenesebibliothek.

Kolonie Nr.	Position 51	Position 87	Position 188
1	Lysin	Phenylalanin	Asparagin
2	Tyrosin	Glutaminsäure	Asparaginsäure
3	Threonin	Lysin	Serin
4	Lysin	Phenylalanin	Glutaminsäure
5	Prolin	Threonin	Glutamin
6	Threonin	Glutamin	Serin

Die Qualität der Bibliothek wurde durch Sequenzierung einiger Kolonien zuvor überprüft. Die Sequenzierung von sechs Kolonien ergab drei Dreifachmutanten (exklusive der zuvor bereits vorhandenen A74G Mutation) und drei Zweifachmutanten (Tabelle 3.10). Die hier erhaltenen Mutanten wurden größtenteils aktiv exprimiert, weshalb eine Durchmusterung der Bibliothek sinnvoll war.

### 3.4.6.3 Durchmusterung der Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek

Die Identifizierung aktiver und regioselektiver Mutanten erfolgte stufenweise nach dem in Abbildung 3.16 dargestellten Schema. Zunächst wurden alle Mutanten mit Hilfe eines NADPH-Oxidationstests durchmustert. Die 192 aktivsten Mutanten wurden dann in zwei Mikrotiterplatten zusammengefasst, exprimiert und charakterisiert. Dies geschah, zusätzlich zur Bestimmung der NADPH-Oxidationsrate, durch Bestimmung der Regioselektivität mittels

GC/MS-Messungen. 15 der hier identifizierten regioselektiven Mutanten wurden schließlich in Schüttelkolben exprimiert.

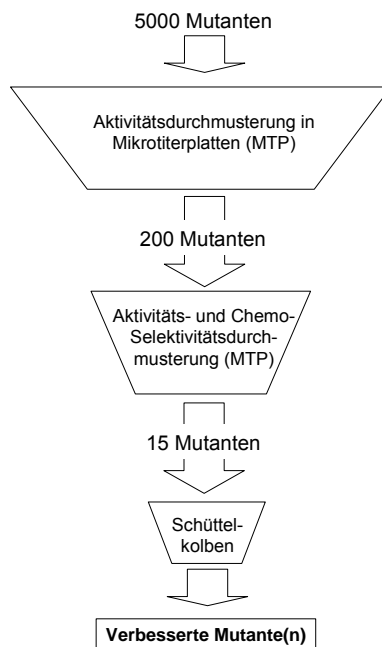


Abbildung 3.16: Durchmusterungsschema für die Mehrfach sättigungsmutagenesebibliothek.

Um eine ausreichende Empfindlichkeit des NADPH-Oxidationstests sicherzustellen, wurde eine Testmikrotiterplatte gemeinsam mit der Bibliothek exprimiert. Sie enthielt zu einem Drittel die aktive CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante als Positivkontrolle, sowie ein Drittel CYP102A1 Wildtyp und ein Drittel Puffer als Negativkontrolle. Die Ergebnisse des daraus resultierenden NADPH-Oxidationstests sind in Abbildung 3.17 grafisch ausgewertet.

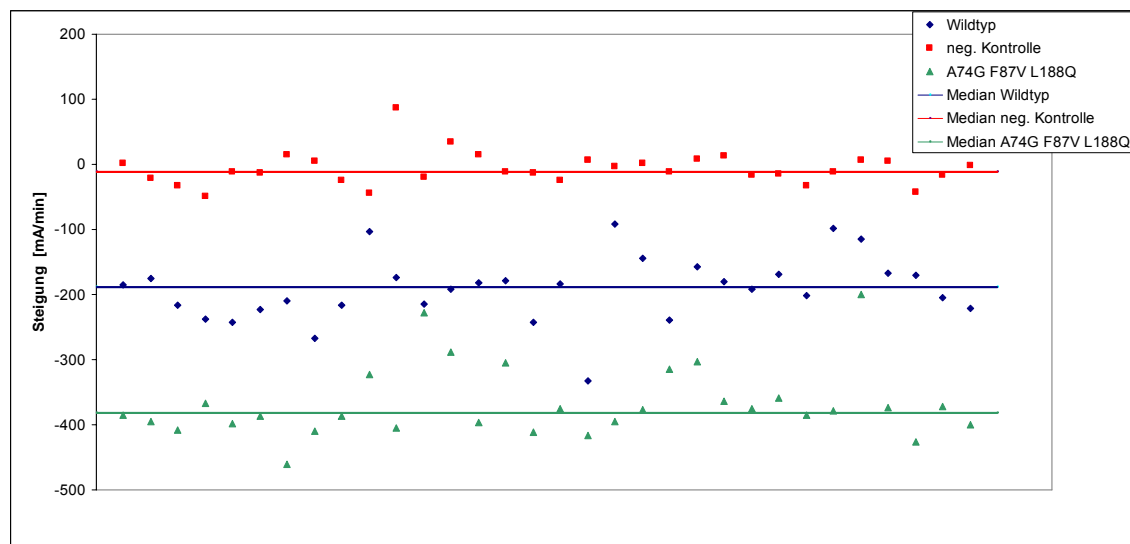


Abbildung 3.17: Auswertung des photometrischen NADPH-Oxidationstests mit der Testmikrotiterplatte. Die Steigungen der NADPH-Verbrauchskurven der ersten 30 Sekunden in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte sind aufgetragen. Die A74G F87V L188Q Dreifachmutante weist einen durchschnittlichen NADPH-Verbrauch von ca.  $380 \text{ mM min}^{-1}$  auf, wohingegen bei der Negativkontrolle kein NADPH-Verbrauch gemessen wird.

Die Auswertung der Referenzplatte zeigt, dass durch Messung der NADPH-Oxidations-rate im Mikrotiterplattenmaßstab eine ausreichende Empfindlichkeit erreicht wird. Die gemessenen Oxidationsraten der Positiv- und Negativkontrolle unterscheiden sich deutlich. Für die zweite Phase der Durchmusterung wurden die 192 aktivsten Mutanten zusammengefasst. Nach Expression dieser Mutanten wurde nun ihre Regioselektivität untersucht. Hierfür wurden 192 Reaktionsansätze extrahiert und mittels GC/MS gemessen. Die 15 Mutanten mit dem höchsten Umsatz wurden selektiert und in 250 ml Schüttelkolben exprimiert und nochmals vollständig charakterisiert und sequenziert. Das Endergebnis der Durchmusterung der Mutantenbibliothek ist in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Durchmusterung der Mehrfachsättigungsmutagenesebibliothek. Die Mutanten Nr. 2 und Nr. 7 tragen zusätzlich eine A111T Mutation, Mutante Nr. 2 produziert zusätzlich zu Verbenol und Pinenepoxid 6% Verbenon; n.b.: nicht bestimmt.

Nr.	CYP102A1				Tof [min <sup>-1</sup> ]	Kopplung [%]	Epoxid [%]	Verbenol [%]	Myrtenol [%]
	Y51	A74	F87	L188					
1	L	G	V	G	121	29	22	56	22
2	V	G	A	S	218	>90	6	88	0
3	H	G	V	S	183	29	22	56	22
4	I	G	P	A	n.b.	48	0	100	0
5	I	G	P	D	n.b.	22	0	100	0
6	F	G	L/V	I	116	16	40	40	20
7	T	G	A	E	n.b.	41	15	85	0
8	V/L/ F	G	P	V/L/ A/P	104	51	6	94	0
9	F	G	P	V	n.b.	45	4	92	4
10	V	G	A	I	19	35	9	91	0
11	F	G	V	Y	189	32	20	50	30
12	F	G	G	G	218	77	4	79	17
13	I	G	V	I	82	13	25	50	25
14	V	G	V	I	85	13	25	50	25
15	A/E/ S	G	V	A	113	26	25	63	12

Die Sequenzierung der Mutanten Nr. 6, 8 und 15 ergab, dass es hier zu einer Durchmischung mehrerer Mutanten, wahrscheinlich während der Kultivierung und Expression in Mikrotiterplatten oder auch beim automatisierten Picken der Kolonien, gekommen ist. Die Mutanten Nr. 2 und 7 tragen zusätzlich eine A111T Mutation. Die Aktivität der Mutanten Nr. 4, 5, 7 und 9 konnte nicht bestimmt werden, da eine korrekte Konzentrationsbestimmung aufgrund einer Absorptionsbande im CO-Differenzspektrum bei 420 nm und den in Abschnitt 3.4.2 diskutierten Gründen nicht möglich war.

Einige der hier identifizierten Mutanten zeigen Selektivität zugunsten der Bildung von Verbenol (Nr. 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10), wobei insbesondere Mutante Nr. 2 dabei eine hohe Kopplungseffizienz aufweist. Insgesamt zeigt sich hier ein ähnlicher Trend wie bei den Ergebnissen der Einfachsättigungsmutagenese. Hauptverantwortlich für die Regioselektivität einer Mutante ist die Aminosäure an Position 87, wobei kleine Aminosäuren (Glycin, Alanin und Prolin) die Bildung von Verbenol begünstigen. Die hier identifizierte Mutante Nr. 2 stellt eine deutliche Verbesserung der durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellten CYP102A1 A74G F87A L188Q Dreifachmutante dar, vor allem was Kopplungseffizienz und Aktivität betrifft.

### 3.4.7 Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen mit Verbenol-selektiven Mutanten von CYP102A1

Nach erfolgreicher Optimierung der Regioselektivität von CYP102A1 zur Produktion von Verbenol aus (-)- $\alpha$ -Pinen sollte nun die Selektivität der besten Verbenol-produzierenden CYP102A1-Mutanten bei der Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen bestimmt werden. Die Reaktion wurde analog der Vorgehensweise bei (-)- $\alpha$ -Pinen in 1 ml Küvetten durchgeführt. Aus der NADPH-Oxidationsrate der ersten 30 s wurde die Anfangsaktivität berechnet, die Regioselektivität wurde nach Extraktion der Reaktionsmischung mit MTBE durch GC/MS-Messungen bestimmt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen mit verschiedenen Mutanten von CYP102A1.

CYP102A1	Tof [min <sup>-1</sup> ]	Kopplung [%]	Epoxid [%]	Verbenol [%]	Andere Prod. [%]
Y51V A74G F87A A111T L188S	324	>90	12	59	29
A74G F87A L188Q	64	>90	12	58	30
K69R A74G F87A L188Q	(598)	>90	11	62	27
A74G F87G L188Q	74	>90	12	48	40
Y51V A74G F87A L188I	14	60	20	46	34

Die bereits bei der Oxidation von (-)- $\alpha$ -Pinen gemessene Selektivität zugunsten der Produktion von Verbenol ist mit (+)- $\alpha$ -Pinen ebenfalls erkennbar, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägt. So liegt der Verbenolanteil bei der mit Y51V A74G F87A A111T L188Q durchgeführten Reaktion mit dem (-)-Enantiomer bei 88%, während er mit dem (+)-Enantiomer bei nur 59% liegt. Die für (+)- $\alpha$ -Pinen gemessenen Aktivitäten unterscheiden sich nicht wesentlich von den mit (-)- $\alpha$ -Pinen erzielten Werten, die für die K69R A74G F87A L188Q Mutante gemessene hohe Aktivität ist unter Umständen aufgrund der in Abschnitt 3.4.2 für die dort untersuchte F87P-Mutante erläuterten Gründe fehlerbehaftet und deshalb eingeklammert. Auffällig ist die hohe Zahl von bis zu acht Nebenprodukten bei der Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen, die aufsummiert einen Anteil von 27-40% ergeben, während bei der Oxidation von (-)- $\alpha$ -Pinen außer Pinenepoxid und Verbenol kaum Produkte auftreten.

### 3.4.8 Entwicklung eines verbenolspezifischen Mikrotiterplattenassays

Die Durchmusterung von P450 Mutantenbibliotheken oder auch von Stammsammlungen zur Identifizierung von Spezies mit definierter Produktbildung setzt die Verfügbarkeit eines produktspezifischen, mitkrotiterplattenfähigen Tests voraus. Der hier eingesetzte photometrische NADPH-Oxidationstest erlaubt eine Messung von Aktivitäten im Mikrotiterplattenmaßstab mit ausreichender Sensitivität und ist leicht durchzuführen. Da hierbei jedoch nur der Verbrauch des Kofaktors NADPH, also die Aktivität der Reduktasedomäne gemessen wird, können keine Aussagen über gebildete Produkte oder Kopplungseffizienzen getroffen werden. Darum wurde ein Test entwickelt, mit welchem die quantitative Detektion von Verbenol in Mikrotiterplatten möglich ist. Grundlage dieses Tests ist eine Farbreaktion mit Vanillin-Schwefelsäure. Diese aus der Dünnschichtchromatografie bekannte Farbreaktion kann zur Detektion einer Vielzahl von Verbindungen wie Steroiden, Phenolen, Sesquiterpenderivaten oder auch etherische-Öl-Komponenten eingesetzt werden. (Jork 1989). Dabei entstehen unterschiedlich gefärbte Produkte, deren Farbe von Inkubationszeit und Temperatur abhängt. Der Mechanismus der Reaktionen ist nur in Teilen bekannt. Unter anderem wird eine Aktivierung des Vanillins durch Protonierung des Carbonylsauerstoffs mit Schwefelsäure, sowie ein darauffolgender, nukleophiler Angriff des Analytmoleküls (z.B. über eine Hydroxylgruppe) diskutiert (Abbildung 3.18 B)(Jork 1989). Wahrscheinlicher scheint im Falle des Verbenols allerdings die Entstehung eines Cyclohexenylkations durch Eliminierung von Wasser zu sein, da dieses mesomeriestabilisiert ist. Möglich wäre eine anschließende Kondensationsreaktion mit Vanillin bzw. die Umlagerung zu einem Cyclopentenyl-kation, welches dann mit Vanillin eine Kondensationsreaktion eingeht. Die Kondensationsprodukte polymerisieren in schwefelsaurer Lösung zu farbigen Verbindungen (Abbildung 3.18 B)(Auterhof.H und Bertram 1974, Auterhoff und Baur 1977).



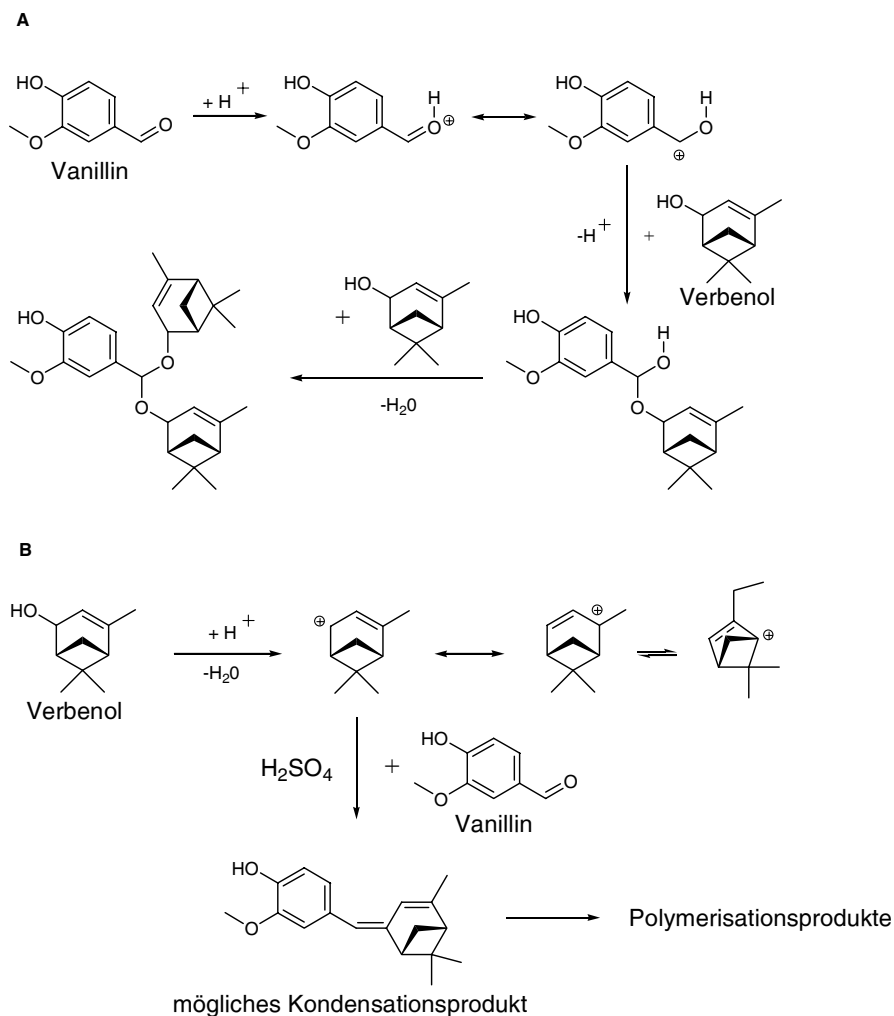


Abbildung 3.18: Mögliche Mechanismen der Vanillin-Schwefelsäure Reaktion mit Verbenol. (A) Reaktionsweg über einen nukleophilen Angriff am Carbonyl-Kohlenstoffatom des Vanillins; (B) Reaktionsweg über ein Cyclohexenylcarbokation.

Nach ersten Versuchen mit Reinsubstanzen von Pinen, Verbenol und Verbenon auf Kieselgelplatten wurde versucht die hier erfolgreich durchgeführten Farbreaktionen in Mikrotiterplatten zu wiederholen. Unterschiedliche Substratkonzentrationen wurden mit Vanillin-Schwefelsäure-Lösung versetzt und bei 60 °C inkubiert (Abbildung 3.19).

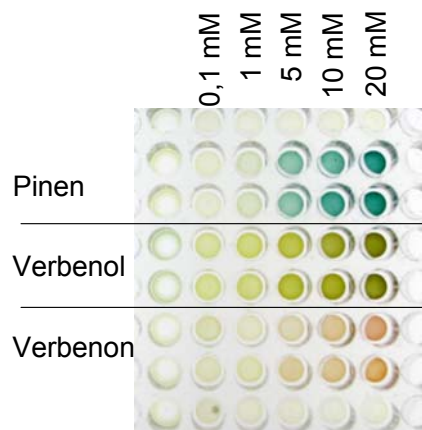


Abbildung 3.19: Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen, Verbenol und Verbenon (Reinsubstanzen) verschiedener Konzentrationen mit einer Vanillin-Schwefelsäurelösung.

Um eine Beeinträchtigung der Farbentwicklung bei der Extraktion der Substanzen aus *E.coli*-Zelllysaten ausschließen zu können, wurden die Reinsubstanzen in definierten Konzentration in typischen Reaktionslösungen, welche auch Zelllysate enthielten, gelöst. Nach Extraktion aus diesen Reaktionslösungen mit Toluol wurde Vanillin-Schwefelsäure-Lösung zugegeben und über Nacht bei 60°C inkubiert. Die Absorptionsdifferenz zwischen 470 nm und 700 nm wurde gegen die entsprechende Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 3.20).

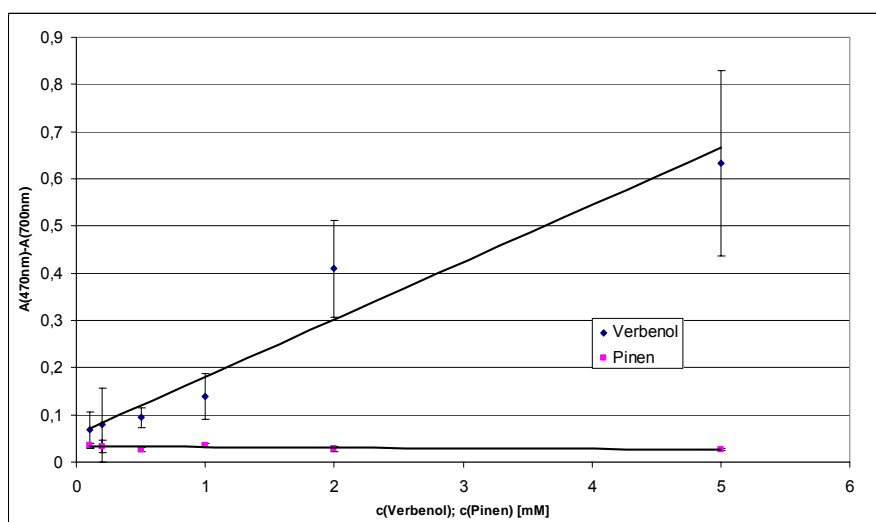


Abbildung 3.20: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration des Analyten (Verbenol und Pinen) bei Anfärbung mit Vanillin-Schwefelsäure.

Die Absorption des gebildeten Farbstoffes bei 470 nm ist proportional zur eingesetzten Verbenolkonzentration, weshalb nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Bestimmung der gebildeten Verbenolmenge in Mikrotiterplatten möglich ist. Pinen zeigt bei

470 nm praktisch keine Absorption. Die Nachweisgrenze für Verbenol liegt unter 1 mM. Verbenon wurde bei der Erstellung der Kalibriergeraden nicht berücksichtigt.

### 3.4.9 *In vitro* Oxidation von Pinen durch CYP102A1

#### 3.4.9.1 Wahl des Reaktionssystems

Die Charakterisierung der CYP102A1-Mutanten, die sowohl hohe Aktivität als auch Regioselektivität in Reaktionen mit (-)- $\alpha$ -Pinen aufwiesen, wurde in 10 ml Ansätzen in Rundkolben durchgeführt. Dabei sollte insbesondere die Stabilität der Mutanten über einen längeren Reaktionszeitraum untersucht werden. Der Einsatz von P450 Monooxygenasen im präparativem Maßstab bringt, neben der oft geringen Stabilität der Monooxygenase, weitere Schwierigkeiten mit sich. So ist der stöchiometrische Einsatz von NADPH aufgrund der hohen Kosten nicht sinnvoll, alternativ muss daher auf ein Kofaktorregenerationssystem zurückgegriffen werden. Die Verwendung einer NADP<sup>+</sup>-abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Pseudomonas* sp. 101 erlaubt die Regeneration des NADP<sup>+</sup> zu NADPH durch Oxidation von Formiat (Abbildung 3.21) (Maurer et al. 2003).

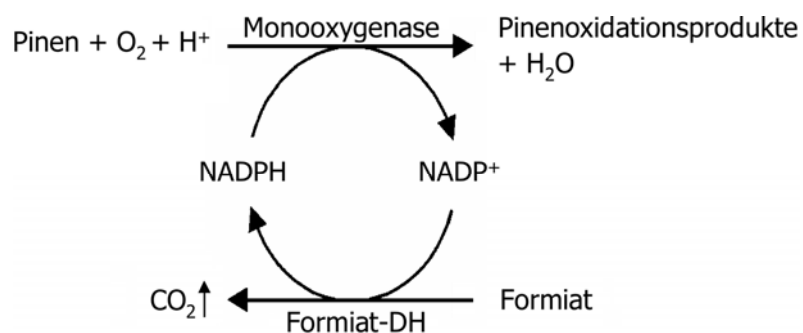


Abbildung 3.21: Prinzip der Kofaktorregenerierung mit einer Formiatdehydrogenase.

Ein weiteres Problem der Oxidation von Pinen über einen längeren Zeitraum stellt die Instabilität der Produkte in wässriger Lösung dar, so reagiert Pinenepoxid in wässriger Lösung spontan zu Sobrerol weiter (Abbildung 3.22) (Griffiths et al. 1987).

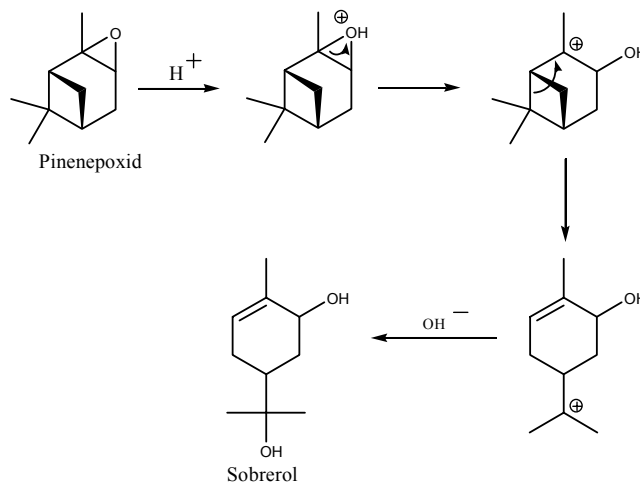


Abbildung 3.22: Mechanismus des Pinenepoxidabbaus in wässriger Lösung.

Durch Verwendung einer zweiten, organischen Phase werden die Oxidationsprodukte während der Reaktion kontinuierlich extrahiert und sind vor Folgereaktionen geschützt. Bei den hier verwendeten Reaktionssystemen wurde das Edukt – Pinen – als organische Phase eingesetzt. Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass ein Abbau von Pineneoxid zu Sobrerol dann nicht mehr auftritt (Lienemann 2005). Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist die schlechte Löslichkeit des zweiten Substrats Sauerstoff in Wasser (0,3 mM bei 20°C und 1013 mbar). Durch Verwendung einer reinen Sauerstoffatmosphäre während der Reaktion wird die Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung im Vergleich zur Reaktion in Luft um das Fünffache gesteigert, was zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führen sollte.

#### 3.4.9.2 Produktquantifizierung

Der Reaktionsverlauf in dem Zweiphasensystem wurde durch regelmäßige Probennahme und GC/MS-Messungen überwacht. Um eine möglichst exakte Quantifizierung der gebildeten Produkte gewährleisten zu können, wurde eine Kombination aus internem (Carvon) und externem Standard verwendet (2.2.6).

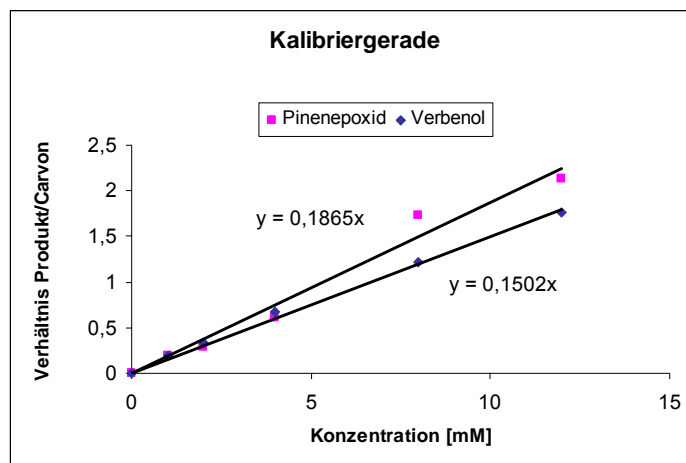


Abbildung 3.23: Kalibriergerade für die Quantifizierung von Pinenepoxid und Verbenol im Zweiphasensystem.

### 3.4.9.3 Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87V L188Q

Die Oxidation von Pinen wurde mit dem oben beschriebenen Reaktionssystem in einem 10 ml Ansatz mit CYP102A1 A74G F87V L188Q (5  $\mu$ M) durchgeführt. Die Ergebnisse der Reaktion sind in Abbildung 3.24 zusammengefasst. Es wurden maximal 8,6 mM Gesamtprodukt in zehn Stunden gebildet (1,3 g/l). Pinenepoxid war dabei das Hauptprodukt, die Konzentration von Verbenol bleibt unter 1 mM.

Deutliche Unterschiede im Reaktionsverlauf sind bei Vergleich der Reaktion in Luft mit der Reaktion in reiner Sauerstoffatmosphäre zu erkennen. Die Verwendung von reinem Sauerstoff führt anfangs tatsächlich zu der erwarteten Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Nach ca. fünf Stunden kommt die Reaktion im Sauerstoffsystem allerdings zum Erliegen, während die Reaktion in Luft noch weiter fortschreitet und letztendlich zu höheren Produktausbeuten führt. Offensichtlich führt eine hohe Sauerstoffkonzentration zur schnelleren Inaktivierung der Monooxygenase. Ein Grund hierfür könnte die hohe Reaktivität von molekularem Sauerstoff sein, aber auch eine vermehrte Bildung hoch reaktiver Nebenprodukte wie Wasserstoffperoxid, welche die Monooxygenase inaktivieren, ist denkbar. Die maximale Zyklenzahl für das Sauerstoffsystem betrug 1382, für die Reaktion in Luft betrug sie 1726.

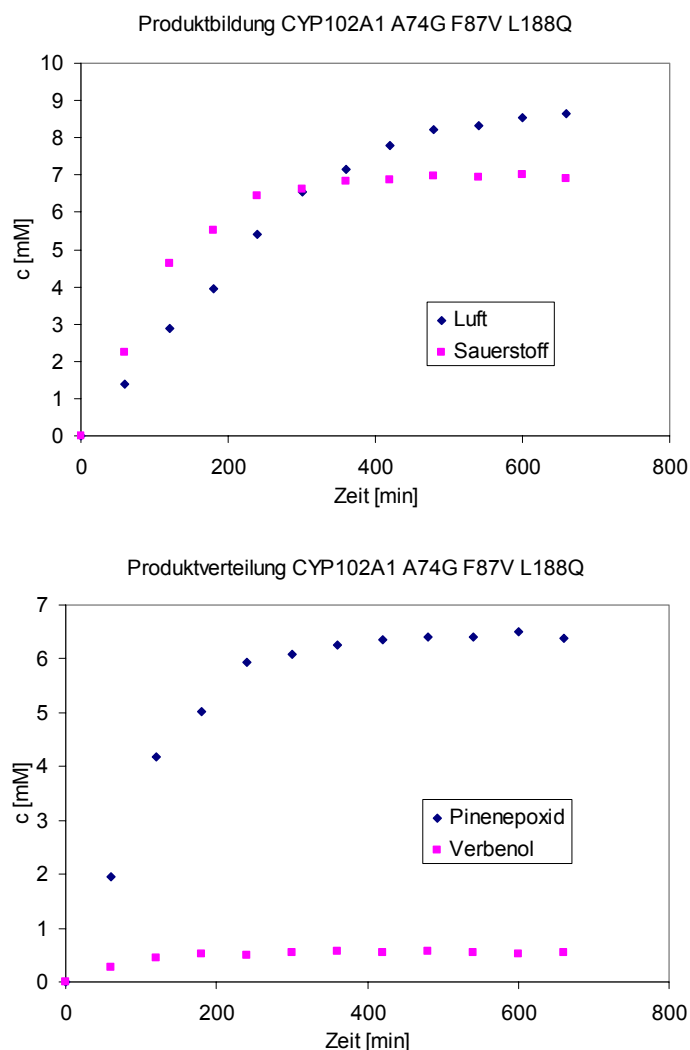


Abbildung 3.24: Ergebnisse der Umsetzung von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87V L188Q.

#### 3.4.9.4 Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87A L188Q

Bei der Umsetzung von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87A L188Q (3  $\mu$ M) wurden etwas höhere Gesamtproduktausbeuten von maximal 9,7 mM (1,5 g/l) erreicht. Allerdings konnte die im 1 ml-Maßstab gemessene hohe Selektivität nicht beobachtet werden. Das Produktgemisch besteht zu je 50% aus Pinenepoxid und Verbenol. Die Verwendung einer reinen Sauerstoffatmosphäre hat wieder die schnellere Inaktivierung des Katalysators und somit eine geringere Produktausbeute zur Folge (maximale Zyklenzahl 2433), die maximale Zyklenzahl der Reaktion in Luft war deutlich höher (3246).

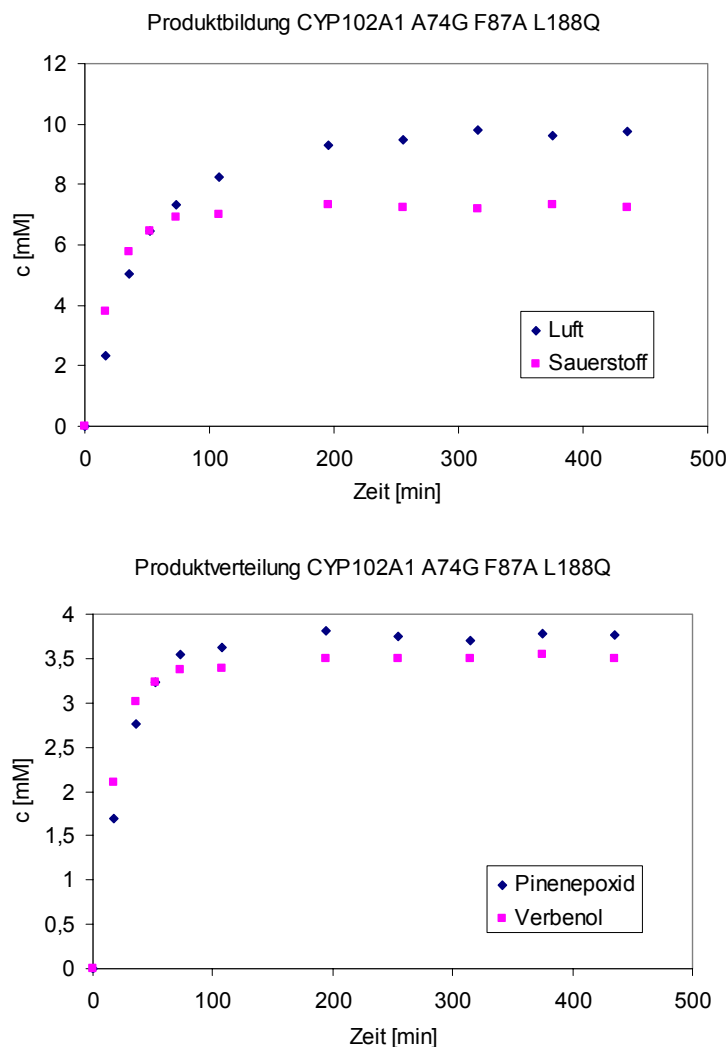


Abbildung 3.25: Ergebnisse der Umsetzung von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87A L188Q.

#### 3.4.9.5 Reaktion von (-)- $\alpha$ -Pinen mit CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S

Die aus der Durchmusterung der Mehrfach-sättigungsmutagenesebibliothek erhaltene CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S Fünffachmutante wurde ebenfalls über einen längeren Reaktionszeitraum charakterisiert. Die maximale Gesamt-produktausbeute betrug 6,79 mM (1,0 g/l). Auch hier konnte die im 1 ml-Maßstab gemessene Produktselektivität nicht reproduziert werden, das Produktverhältnis beträgt ca. 55%:45% zugunsten von Verbenol. Die maximalen Zyklenzahlen wurden zu 3395 (Luft) und 2920 (Sauerstoff) bestimmt, Sauerstoff führt also wieder zu einer früheren Inaktivierung des Enzyms.

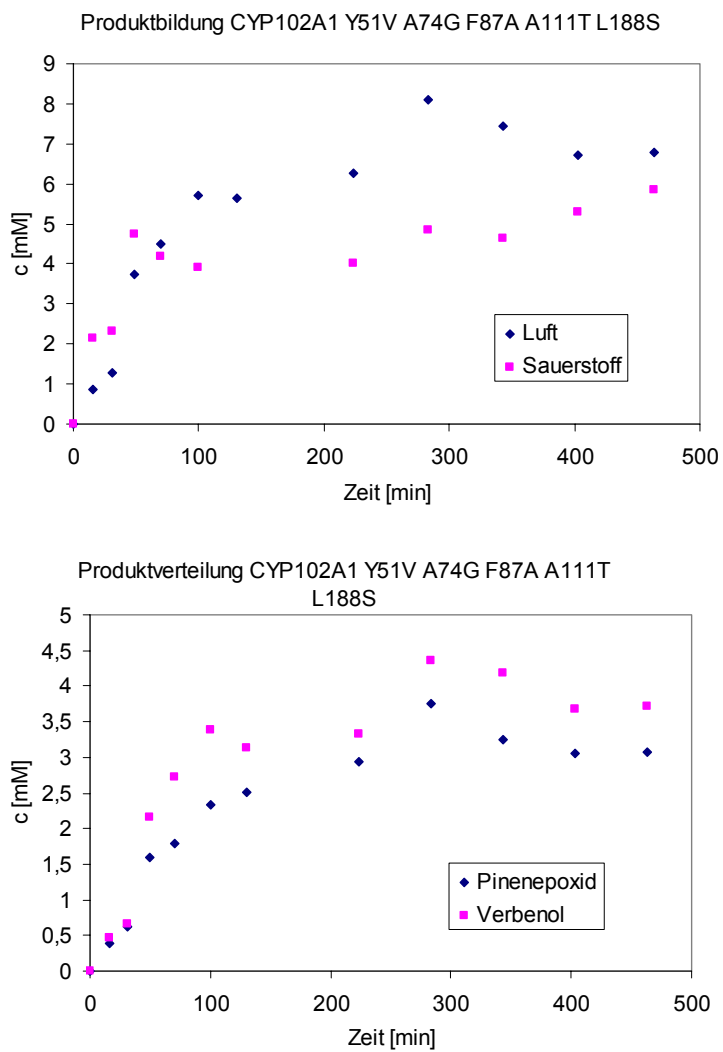


Abbildung 3.26: Ergebnisse der Umsetzung von  $(-)\text{-}\alpha\text{-Pinen}$  mit CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S.



## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Selektivoxidation mit P450 Monooxygenasen zur Herstellung von Synthesebausteinen für die Feinchemie. Die hierbei eingesetzten Substrate – Pinen, sowie eine Reihe von hoch verzweigten Fettsäuren und Fettsäurederivaten – wurden mit verschiedenen Mutanten der CYP102A1 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* sowie der CYP102A2 und A3 Monooxygenasen aus *Bacillus subtilis* umgesetzt. Dabei sollte durch verschiedene Methoden des Protein-Designs eine Optimierung der Regioselektivität bei der Oxidation der verwendeten Substrate erreicht werden. Weiterhin wurden einige Reaktionsparameter der *in vitro* Oxidation von  $\alpha$ -Pinen untersucht, um die Realisierbarkeit eines technischen Prozesses unter Verwendung der Monooxygenasen einschätzen zu können. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert und mit bisher veröffentlichten Daten verglichen.

### 4.1 Expression und Aufreinigung von P450 Monooxygenasen

Für die Bereitstellung der P450 Monooxygenasen sowie deren Mutanten wurden verschiedene Protokolle der Proteinexpression eingesetzt. Heterologe Proteinexpression in *E. coli* im Schüttelkolbenmaßstab fand unter Verwendung eines *E. coli* BL21(DE3) / pET28-Systems statt. Da die im Schüttelkolben erreichbaren Zelldichten im Vergleich zu Fermentationen gering sind, ist eine starke Überexpression des Zielproteins nötig, um vergleichbare Proteinausbeuten zu erhalten. Der im pET-System verwendete T7-Promotor ermöglichte Proteinausbeuten bis zu  $166 \text{ mg l}^{-1}$ , was den bereits für dieses System berichteten Ergebnissen entspricht (Maurer 2006). Für die Produktion größerer Proteinmengen wurde eine 30 l Batch-Fermentation durchgeführt, hierbei kam ein temperaturinduzierbares Expressionssystem (*E. coli* DH5 $\alpha$  / pCYTEXP1) zum Einsatz, welches die Verwendung des teuren Induktors IPTG im Gegensatz zum pET-System überflüssig macht. Trotz der erreichten höheren Zelldichten betrug die Proteinausbeute mit  $69 \text{ mg l}^{-1}$  nur etwa 42% der mit dem pET-System im Schüttelkolben erreichten Ausbeuten. Die Aufreinigung der Monooxygenasen erfolgte entweder durch Metall-Affinitätschromatografie oder durch Anionenaustauschchromatografie. Mit beiden Verfahren konnte durch nur eine Aufreinigungsstufe ein Großteil der unerwünschten Proteine abgetrennt werden, wobei mit der Affinitätschromatografie eine nahezu quantitative Aufreinigung bei einer Ausbeute von

69-78% und einem Aufreinigungsfaktor von 1,6-2,3 erfolgte. Nach der Anionenaustauschchromatografie waren noch einige Fremdproteine in der SDS-PAGE Analyse erkennbar, es wurden ein Aufreinigungsfaktor von 4,5 und eine Ausbeute von 81% erzielt.

## 4.2 Selektivoxidation hoch verzweigter Fettsäuren

### 4.2.1 Oxidation von Iso- und Anteiofettsäuren

Ausgangspunkt für die selektive Hydroxylierung verzweigter Fettsäuren waren die Ergebnisse von Gustafsson et al., die hohe Aktivität für die Umsetzung dieser Substrate mit CYP102A2 und CYP102A3 nachweisen konnten (Gustafsson et al. 2004), später untersuchten auch Cryle und Mitarbeiter die Hydroxylierung von Iso- und Anteiofettsäuren mit CYP102A1 (Cryle et al. 2006). Die dort gemessenen Reaktionsraten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Anfangsaktivitäten gegenübergestellt.

*Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Aktivitäten von CYP102A Monooxygenasen gegen methylverzweigte Fettsäuren sowie deren Gegenüberstellung mit bereits publizierten Werten (Cryle et al. 2006, Gustafsson et al. 2004).*

	Aktivität [ $\text{min}^{-1}$ ]		
	Diese Arbeit	(Cryle et al. 2006)	(Gustafsson et al. 2004)
<b>CYP102A1</b>			
12-Methylmyristinsäure	1900	1700	-
13-Methylmyristinsäure	1850	2900	-
<b>CYP102A2</b>			
12-Methylmyristinsäure	3600	-	4215
13-Methylmyristinsäure	2950	-	3865
<b>CYP102A3</b>			
12-Methylmyristinsäure	450	-	2055
13-Methylmyristinsäure	800	-	2160

Die Messung der Anfangsaktivitäten der Umsetzung verzweigter Fettsäuren mit CYP102A1, A2 und A3 erfolgte in dieser Arbeit bei nur einer Substratkonzentration, weshalb die Absolutwerte von den bereits publizierten Werten abweichen. Sowohl Gustafsson als auch Cryle bestimmten die Anfangsaktivitäten bei variierenden Substratkonzentrationen. Der Trend, dass CYP102A2 die höchste Aktivität mit 12- und 13-Methylmyrestinsäure aufweist, wurde jedoch bestätigt. Die hier erstmals gemessene Produktverteilung zeigt eine

erwartungsgemäß unselektive Hydroxylierung beider Substrate mit allen Monooxygenasen, wie dies auch bei unverzweigten Fettsäuren der Fall ist. Auffällig ist jedoch, dass ein tertiäres Kohlenstoffatom deutlich schlechter als ein sekundäres Kohlenstoffatom hydroxyliert wird.

#### 4.2.2 Hydroxylierung von hoch verzweigten Fettsäuren und Fettsäurederivaten

Die Insertion von Sauerstoff an verzweigten Kohlenstoffatomen ist laut den Ergebnissen der Umsetzung von Iso- und Anteispentadecansäure ungünstig. Unter Annahme eines radikalischen Reaktionsmechanismus' kommen hierfür zuerst sterische Gründe in Frage, da die Bindungsdissoziationsenergien einer C-H-Bindung bei höherem Verzweigungsgrad abnehmen. C-H-Bindungen an verzweigten Kohlenstoffatomen sollten daher aus rein energetischer Sicht bevorzugt hydroxyliert werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte nun gezeigt werden, dass durch die Verwendung hoch verzweigter Substrate, wie sie aus den Bürzeldrüsen von Wasservögeln extrahiert werden können (Morr et al. 1992), eine höhere Regioselektivität bei Oxidation durch P450 Monooxygenasen erzielt werden kann. Eine Hydroxylierung an verzweigten Positionen findet nicht statt, was eine Erhöhung der Regioselektivität bis zu 100% (abhängig vom Substrat) bedeutet. Ein - hinsichtlich eines biotechnologischen Prozesses - positives Ergebnis stellt auch die hohe Aktivität der getesteten CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante gegenüber einigen der eingesetzten Edukte dar. Ein Grund für die hohe Aktivität ist wahrscheinlich der im Vergleich zum Wildtyp vergrößerte Substratzugangskanal sowie das größere aktive Zentrum, was den Zugang sterisch anspruchsvoller Substrate begünstigt. Phenylalanin an Position 87 liegt über der Häm-Gruppe und kann den Zugang des Substrats zur aktivierten Sauerstoffspezies abschirmen, durch Mutation zu Valin wird die Seitenkette verkleinert und der Zugang des Substrats zur Häm-Gruppe erleichtert (Graham-Lorence et al. 1997). Alanin 74 liegt im Substratzugangskanal, durch Mutation zu Glycin wird der Zugangskanal erweitert (Abbildung 4.1 A und B).

Die mit CYP102A3 und insbesondere mit CYP102A2 erreichten hohen Aktivitäten bei der Hydroxylierung von Iso- und Anteisofettsäuren wurden zunächst als vielversprechendes Indiz für eine Aktivität gegen höher verzweigte Substrate gewertet. Auch ein Vergleich der Kristallstruktur von CYP102A1 mit Homologiemodellen von CYP102A2 und A3 lässt den Schluss zu, dass die *Bacillus subtilis* Monooxygenasen in der Lage sind, auch höher verzweigte Substrate umzusetzen. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in allen Wildtypmonooxygenasen konserviert (F87/88; L437/439; L181/182; I263/265) (Abbildung

4.1 A, C und D), auch im mittleren Abschnitt des Substratzugangskanals findet man hauptsächlich identische Aminosäuren. Unterschiede bestehen an Position 72 bzw. 73, hier befindet sich bei CYP102A1 Serin, wohingegen bei A2 Glutamat und bei A3 Glycin auftreten. Die größten Unterschiede sind am Eingang des Substratzugangskanals zu finden. (Positionen 42/43; 47/48 und 51/52), CYP102A2 hat hier kleinere, apolare Aminosäuren im Vergleich zu CYP102A1. Das bei CYP102A1 existierende Fettsäurebindemotiv Y51/R47, welches durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxylgruppe von Fettsäuren interagiert, existiert in CYP102A2 nicht (Cowart et al. 2001, Li und Poulos 1999, Noble et al. 1999, Oliver et al. 1997, Ost et al. 2000). CYP102A3 hat hauptsächlich apolare Aminosäuren am Eingangsbereich des Zugangskanals (Valin 48, Phenylalanin 43 und 53). Im Experiment stellte sich allerdings heraus, dass weder CYP102A2 noch CYP102A3 in der Lage sind, hoch verzweigte Substrate zu hydroxylieren, obwohl – oberflächlich betrachtet – die kleineren Aminosäuren am Eingang des Substratzugangskanals von CYP102A2 zumindest bei dieser Monooxygenase für eine bessere Zugänglichkeit sterisch anspruchsvoller Substrate zum aktiven Zentrum sorgen sollten.

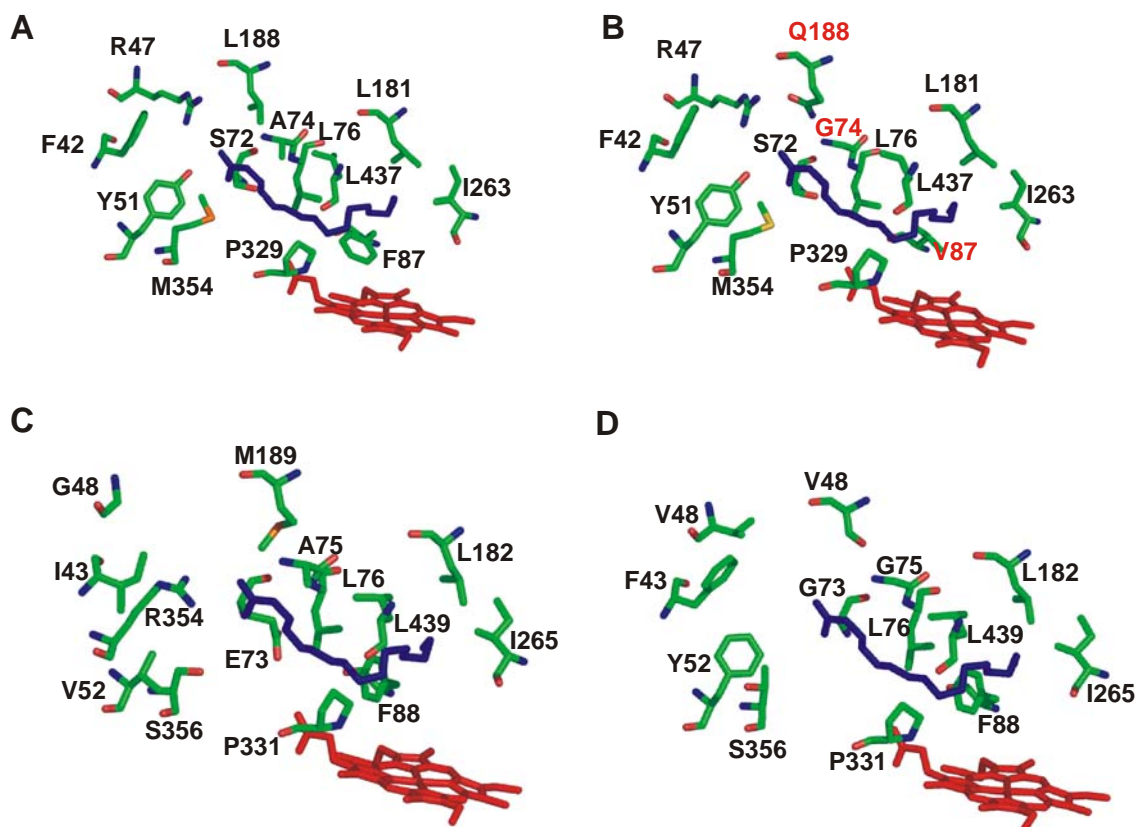


Abbildung 4.1: Aminosäuren der Substratbindungstaschen von CYP102A1 (A), CYP102A1 A74G F87V L188Q (B), CYP102A2 (C) und CYP102A3 (D). Die Häm-Gruppe ist rot dargestellt, blau die Palmitoleinsäure. Die CYP102A1-Struktur basiert auf der Kristallstruktur 1SMJ (PDB Datenbank) (Joyce et al. 2004), bei den Strukturen von CYP102A2 und A3 handelt es sich um Homologiemodelle, hergestellt mit SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>, März 2007).

### 4.2.3 Substratbindungsspektren und kinetische Konstanten

Ein Kristallstrukturvergleich der drei Monooxygenasen liefert keine Begründung für das deutlich unterschiedliche Reaktionsverhalten gegen hoch verzweigte Substrate. Dies liegt sicherlich auch an den Homologiemodellen von CYP102A2 und CYP102A3, da diese basierend auf Kristallstrukturen von CYP102A1 erstellt wurden und somit eine hohe Übereinstimmung mit der CYP102A1-Struktur vorherbestimmt ist. Die Tatsache, dass die Substrate das aktive Zentrum nicht erreichen, kann allerdings anhand von Substratbindungsspektren gezeigt werden. Bei Zugabe von Substratlösung zu den entsprechenden Enzympräparationen findet keine Änderung des UV/vis-Absorptionsspektrums und somit auch keine Interaktion der Substrate mit dem aktiven Zentrum statt (s. 1.2.5). Die Analyse der Bindungsspektren des CYP102A1 Wildtyps und der Dreifachmutante erlauben Rückschlüsse auf die Effizienz der Bindung eines Substrates im aktiven Zentrum. So ist die Ausbildung des Typ I-Bindungsspektrums im Falle der Dreifachmutante mit den Substraten **6** und **10** ein Hinweis auf effektive Positionierung des Edukts über der Häm-Gruppe (Lewis 1996, Schenkman et al. 1981). Die Gründe für die Entstehung eines inversen Typ I-Spektrums, wie im Falle des Wildtyps, sind nicht vollständig geklärt, jedoch vermutet man eine schlechteren Positionierung des Substrates in der Bindungstasche, sowie nicht verdrängte Wassermoleküle als Ursache des inversen Typ I-Spektrums. Dieses Bild wird auch durch die deutlich verschiedenen Kopplungskonstanten bestätigt: So zeigt der Wildtyp insgesamt eine hohe Entkopplung des NADPH-Verbrauchs von der Produktbildung, was durch Oxidation der nicht verdrängten Wassermoleküle zu Wasserstoffperoxid erklärt werden könnte. Die Dreifachmutante zeigt dahingegen eine hohe Kopplung mit einer Vielzahl der eingesetzten Verbindungen und hat grundsätzlich eine höhere Kopplungseffizienz als der Wildtyp.

Der wirtschaftliche Einsatz der hier untersuchten Monooxygenasen in einem biotechnologischen Prozess erfordert eine hohe katalytische Effizienz der Umsetzung, weshalb die zur Bestimmung der katalytischen Effizienz benötigten Größen  $K_M$  und  $k_{cat}$

entsprechend dem Enzymkinetik-Modell von Michaelis und Menten für drei, als Synthesebausteine für die Borrelidinsynthese interessante, Substrate bestimmt wurden. Dabei sollen die Enzyme einen niedrigen  $K_M$ -Wert, also eine hohe Affinität zum Substrat aufweisen, um schon bei geringen Substratkonzentrationen hohe Umsatzraten erreichen zu können. Dies ist insbesondere bei den hier untersuchten, in Wasser schlecht löslichen Substraten entscheidend. Darüber hinaus sind hohe  $k_{cat}$ -Werte, also hohe Umsatzraten für einen effizienten biokatalytischen Prozess erforderlich. Die hier gemessenen Umsatzraten befinden sich mit Werten zwischen  $667 \text{ min}^{-1}$  und  $1512 \text{ min}^{-1}$  in der für unverzweigte Fettsäuren gemessenen Größenordnung (Li et al. 1991). Gleichzeitig liegen die Michaelis-Konstanten im  $\mu\text{M}$ -Bereich ( $35 \mu\text{M}$  bis  $670 \mu\text{M}$ ), was letztendlich eine für P450 Monooxygenasen hohe katalytische Effizienz bedeutet. Zusätzlich vereinfacht die 100%ige Regioselektivität der Hydroxylierung die Produktisolierung, was insgesamt die P450-katalysierte Produktion chiraler Synthesebausteine für die Herstellung von Makrolidantibiotika ermöglicht.

### 4.3 Rationales Proteindesign zur selektiven Oxidation von Pinen

Eines der Ziele dieser Arbeit war die regioselektive Oxidation von  $\alpha$ -Pinen durch P450 Monooxygenasen. Verschiedene Strategien des rationalen bzw. des datenbasierten Proteindesigns wurden im Rahmen dieser Arbeit verfolgt, um die Selektivität und Aktivität der Monooxygenasen aus *B. megaterium* und *B. subtilis* entsprechend anzupassen. Um erste Informationen über Aktivität und Selektivität dieser Reaktionen zu erhalten, wurden die Wildtypenzyme sowie mehrere Mutanten von CYP102A1, A2 und A3 zur Oxidation von  $\alpha$ -Pinen eingesetzt. Mit den so erhaltenen Daten konnten zunächst einige allgemeine Aussagen getroffen werden:

- Die Wildtypen der Monooxygenasen CYP102A1, A2 und A3 setzen  $\alpha$ -Pinen nicht um.
- CYP102A1 setzt Pinen nur bei Mutation des Phenylalanins 87 mit höheren Raten um.
- Zusätzliche Mutationen an den Positionen 47, 51, 74, 87 und 188 in CYP102A1 haben Einfluss auf die Aktivität der Monooxygenase bei Oxidation von Pinen.
- CYP102A3 und seine getesteten Mutanten zeigen eine hohe Entkopplung des NADPH-Verbrauchs von der Produktbildung.

Aus den beobachteten Regioselektivitäten wurden keine direkten Schlüsse gezogen, da in diesem Versuch (+)- $\alpha$ -Pinen als Substrat verwendet wurde. Lienemann hatte im Rahmen einer

Diplomarbeit gezeigt, dass die Stereochemie des Substrats Einfluss auf die Regioselektivität der P450-katalysierten Oxidation hat (Lienemann 2005). Bei Verwendung von (+)- $\alpha$ -Pinen beträgt der Anteil an Verbenol, produziert durch die CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante, ca. 77%. Setzt man dagegen (-)- $\alpha$ -Pinen ein, verschieben sich die Produktverhältnisse und man erhält ca. 72% Pinenepoxid als Hauptprodukt. In allen weiteren Experimenten zur Optimierung der Regioselektivität und Aktivität wurde aufgrund des deutlich geringeren Preises (-)- $\alpha$ -Pinen eingesetzt. Dies ist vor allem im Hinblick auf einen späteren biotechnologischen Prozess, bei dem größere Mengen Edukt eingesetzt werden sollen, sinnvoll. Wie schon im Fall der Hydroxylierung hoch verzweigter Fettsäuren stellte sich die CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante als äußerst aktiv heraus ( $t_{of} = 211 \text{ min}^{-1}$ ).

#### 4.3.1 Sättigungsmutagenese

Der Einfluss einiger Aminosäuren, insbesondere der Aminosäure an Position 87, auf die Aktivität war anhand der ersten Ergebnisse klar erkennbar. Zu näherer Untersuchung dieser Positionen wurden darum Sättigungsmutageneseexperimente durchgeführt. Durch Austausch der Aminosäuren an den Positionen 47, 51, 87 und 188 gegen alle anderen Aminosäuren sollte ein systematischeres Bild von deren Auswirkungen auf die Aktivität und insbesondere die Selektivität der Oxidation von Pinen gewonnen werden. Position 87 ist hier wiederum aufgrund seiner Lage über der Häm-Gruppe interessant. Die Positionen 47 und 51 werden in CYP102A1 von Arginin und Tyrosin besetzt und sorgen im Wildtyp für die Bindung von Fettsäuren durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (s. 4.2.2). Eine Mutation zu apolaren Aminosäuren kann sich unter Umständen positiv auf die Oxidation des apolaren Substrats Pinen auswirken. Die Mutation von Alanin 74 und Leucin 188 führte bereits bei der Hydroxylierung von Indol und der Umsetzung von Paranitrophenoxycarbonsäuren zu höheren Aktivitäten, was deren Einfluss auf die Aktivität der Monooxygenase belegt (Li et al. 2000, Li et al. 2001). Ausgangspunkt für die Sättigungsmutagenese war die bis dahin aktivste Mutante CYP102A1 A74G F87V L188Q. Die hergestellten Mutanten wurden in Mikrotiterplatten unter Verwendung eines photometrischen NADPH-Oxidationstests durchmustert. Durch die hohe NADPH-Oxidationsrate der Ausgangsmutante war die Identifizierung aktiverer Mutanten jedoch schwierig. Da mit dem NADPH-Test zudem lediglich die Aktivität der Reduktasedomäne gemessen wird, jedoch keine Aussage über eine eventuelle Produktbildung getroffen werden kann (vgl. 1.2.5), wurden einige Mutanten, die eine hohe NADPH-Oxidationsrate aufwiesen, mittels GC/MS weiter charakterisiert. Dabei konnten Mutanten

identifiziert werden, die eine verbesserte Regioselektivität und höhere Aktivität aufwiesen. Bemerkenswert war die erstmals beobachtete deutliche Änderung der Regioselektivität der (-)- $\alpha$ -Pinenoxidation beim Einführen der F87G-Mutation, durch welche erstmals vorwiegend *cis*-Verbenol anstatt Pinenepoxid produziert wurde. Bei allen anderen Mutationen war keine signifikante Veränderung der Regioselektivität feststellbar, lediglich die Aktivität wurde beeinflusst. Als Folge dieser Ergebnisse wurde die F87 Sättigungsmutagenesebibliothek nochmals vollständig mittels GC/MS-Messungen untersucht. Hierbei wurden weitere Mutanten identifiziert, die hauptsächlich *trans*-Verbenol produzierten (F87S und F87P). Die F87P Mutante zeichnete sich zwar durch eine hohe Aktivität aus ( $\text{tof} = 277 \text{ min}^{-1}$ ; 70% Verbenol), allerdings weist die Monooxygenase nach Expression ein Absorptionsmaximum bei 420 nm statt bei 450 nm im CO-Differenzspektrum auf, was die Folge der Reaktion mit am Häm-Zentrum gebildeten OH $\cdot$ -Radikalen sein könnte (Karuzina und Archakov 1994a, Karuzina und Archakov 1994b). Denkbar wäre auch ein nicht-korrekt Einbau der Häm-Gruppe, beispielsweise durch Bindung über einen Histidinrest (Omura 2005). Es ist daher fraglich, ob die P450 Konzentration und letztlich auch die Aktivität korrekt bestimmt werden konnte. Sind durch hohe Entkopplung gebildeten OH $\cdot$ -Radikale für das Auftreten des Absorptionsmaximums bei 420 nm verantwortlich, kommt aufgrund der daraus resultierenden Instabilität des Enzyms ein Einsatz als Biokatalysator nicht in Frage.

#### 4.3.2 MD-Simulation

Die hier beschriebenen drastischen Selektivitätsänderungen, abhängig von der Art der Aminosäure an Position 87, können zwar anhand von Kristallstrukturen diskutiert werden, eine umfassende Erklärung für die beobachteten Selektivitäten ist allerdings nicht möglich. Durch Einsatz von molekulardynamischen Simulationen kann, basierend auf Kristallstrukturen von CYP102A1, die Position und Bewegung eines Substrats im aktiven Zentrum simuliert werden. Der Vorteil gegenüber einer Kristallstruktur ist hierbei, dass die Flexibilität des Proteins berücksichtigt wird. Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse wurden deshalb im Rahmen einer Kooperation MD-Simulationen mit CYP102A1 A74G F87G L188Q sowie CYP102A1 A74G F87V L188Q mit (-)- $\alpha$ -Pinen durchgeführt (Branco et al. 2007). Insgesamt konnten drei stabile Konformere identifiziert werden, die die beobachteten Selektivitäten widerspiegeln (Abbildung 4.2).



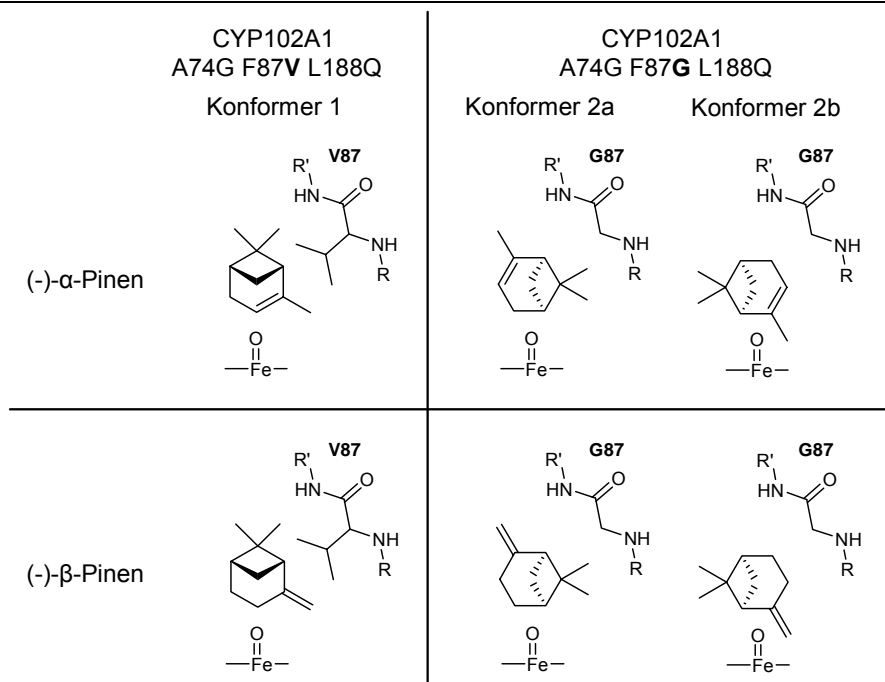


Abbildung 4.2: Stabile Konformere von (-)- $\alpha$ - und (-)- $\beta$ -Pinen in den aktiven Zentren der CYP102A1 A74G F87V L188Q und A74G F87G L188Q Mutanten, die Häm-Gruppe ist vereinfacht dargestellt.

Im Falle von CYP102A1 A74G F87V L188Q findet eine direkte Interaktion der Valin 87-Seitenkette mit Pinen statt. Die Positionierung der Seitenkette zwischen den geminalen Methylgruppen und der einzelnen Methylgruppe des Pinens stabilisiert das Molekül. Dabei ist die Doppelbindung des Pinens der Häm-Gruppe zugewandt, was die bevorzugte Epoxidierung bei dieser Mutante erklärt. Eine derartige Stabilisierung des Substrats ist bei Substitution des Valins zu Glycin aufgrund der fehlenden Seitenkette nicht möglich. Allerdings können auch hier zwei stabile Konformere des Pinens identifiziert werden, wovon eines (Konformer 2a) die bevorzugte Bildung von Verbenol erklärt. Dort zeigt die entsprechende allylische C-H-Bindung in Richtung des aktivierten Sauerstoffs der Häm-Gruppe. In Konformer 2b befindet sich ein Brückenkohlenstoffatom des bicyklischen Moleküls in Reichweite der aktiven Sauerstoffspezies, eine Hydroxylierung dieser Position ist allerdings aufgrund der schlechten Stabilisierung des radikalischen Übergangszustandes nicht begünstigt. Über die Ursachen der Stabilisierung der beiden Konformere kann nur spekuliert werden, so käme z.B. eine Stabilisierung des Pinens durch das Porphyrinsystem des Häms in Frage. Auch Lysin 69 kann eine Rolle bei der Fixierung des Pinens spielen. Seine Seitenkette dient der Stabilisierung der Propionylseitenketten der Häm-Gruppe, jedoch ist auch eine Interaktion mit dem Substrat möglich.

Die Oxidation von (-)- $\beta$ -Pinen mit beiden Mutanten sollte zeigen, ob das aus der Oxidation von (-)- $\alpha$ -Pinen abgeleitete Modell der Substratorientierung im aktiven Zentrum allgemeine Gültigkeit hat. Ist dies der Fall muss bei entsprechender Orientierung des (-)- $\beta$ -Pinsens im aktiven Zentrum bei Verwendung der CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante Pinocarveol als Hauptprodukt entstehen. Bei 87G sollte hauptsächlich eine Oxidation der Methylengruppe erfolgen. Tatsächlich war das Hauptprodukt der Oxidation von (-)- $\beta$ -Pinen mit CYP102A1 A74G F87V L188Q Pinocarveol (62%), als Nebenprodukt trat Myrtanal auf (38%). Die Verwendung der F87G-Mutante führte zur Bildung von 60% Myrtanal und 40% Pinocarveol. Dies entspricht im Wesentlichen den erwarteten Selektivitäten. Die Tatsache, dass im Fall der F87G Mutante signifikante Mengen Pinocarveol gebildet wurden, obwohl diese Position weder in Konformer 2a noch in Konformer 2b dem Häm zugewandt ist, liegt sicher an der höheren chemischen Reaktivität der allylischen C-H-Bindung im Vergleich zu den anderen C-H-Bindungen des Pinenmoleküls. Diese erhöhte chemische Reaktivität, zusammen mit der schlechteren Stabilisierung der Konformere in der F87G Mutante aufgrund der fehlenden Interaktion des Pinsens mit einer Aminosäureseitenkette, erklärt die beobachtete Bildung von Pinocarveol.

#### 4.3.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Ausgehend von diesem Modell wurden weitere Mutanten durch ortsgerechte Mutagenese hergestellt. Durch systematische Variation der Größe der Aminosäureseitenkette an Position 87 sollte geklärt werden, welche Seitenkette am besten in der Lage ist, Pinen über dem aktiven Zentrum zu stabilisieren. Es wurden daher apolare Aminosäuren mit unterschiedlicher Größe in Position 87 eingefügt: Alanin, Leucin und Isoleucin. Tryptophan wurde aufgrund der Größe seiner Seitenkette nicht verwendet, da ja bereits das im Wildtyp vorhandene Phenylalanin aufgrund seiner Größe zu einer Blockierung des aktiven Zentrums führt.

CYP102A1 A74G F87L L188Q war nicht in der Lage Pinen umzusetzen, mit der entsprechenden F87I Mutante konnte Pinen zwar oxidiert werden, jedoch mit geringer Aktivität ( $48 \text{ min}^{-1}$ ) und Selektivität (Epoxid:Verbenol:Myrtenol=59:24:17%). Als erfolgreich stellte sich hingegen die Mutation von Phenylalanin 87 zu Alanin heraus. Die Regioselektivität der Produktion von Verbenol konnte gegenüber der F87G-Mutante bei gleichzeitiger Erhöhung der Aktivität von  $73 \text{ min}^{-1}$  auf  $83 \text{ min}^{-1}$  deutlich erhöht werden (von 72% auf 89%).

Die vermutete stabilisierende Wirkung von Lysin 69 auf Pinen wurde ebenfalls untersucht. Lysin wurde gegen die anderen basischen Aminosäuren Arginin und Histidin ausgetauscht, um einerseits die Stabilisierung der Propionylseitenketten des Porphyrinrings weiter zu ermöglichen und andererseits eine eventuelle Änderung der Regioselektivität durch Interaktion mit Pinen nachzuweisen. Wie wichtig diese Aminosäureposition auf die Stabilität der Monooxygenase ist, wurde nach Expression der Mutanten deutlich. Bei Substitution des Lysins 69 zu Histidin kann das Enzym, vermutlich aufgrund einer Verschlechterung der Häm-Bindung, nicht mehr aktiv exprimiert werden. Bei Substitution zu Arginin in Kombination mit F87G wird die Monooxygenase ebenfalls inaktiv exprimiert, in Kombination mit F87A führt sie jedoch zu einer Erhöhung der Aktivität von  $83 \text{ min}^{-1}$  auf  $104 \text{ min}^{-1}$ , ohne den vermuteten Einfluss auf die Regioselektivität zu haben. Da diese Mutante ein Absorptionsmaximum bei 420 nm im CO-Differenzspektrum aufweist, kann die gemessene Erhöhung der Aktivität aufgrund der bereits in Abschnitt 4.3.1 am Beispiel der F87P-Mutation erläuterten Gründe fehlerbehaftet sein.

#### 4.3.4 Mehrfachsättigungsmutagenese

Die Relevanz der durch Einfachsättigungsmutagenese und ortsgerichteter Mutagenese untersuchten Aminosäuren für die Regioselektivität und Aktivität von CYP102A1 wurde ausführlich besprochen und experimentell belegt. Allerdings werden durch isolierte Betrachtung einzelner Aminosäurepositionen positive, additive Effekte mehrerer Mutationen nicht erkannt, weshalb eine Mehrfachsättigungsmutagenese-bibliothek mit gleichzeitiger Mutation der Aminosäurepositionen Y51, F87 und L188 basierend auf der CYP102A1 A74G L188Q Doppelmutante hergestellt wurde. Diese Ausgangsmutante hat den Vorteil, dass sie keine Aktivität gegen Pinen aufweist, was die Durchmusterung der Bibliothek mit Hilfe des NADPH-Oxidationstests erleichtert, da sich aktive Mutanten in ihrem NADPH-Verbrauch nun deutlich unterscheiden und somit leicht identifiziert werden können. Nach zwei Durchmusterungsrunden wurden 15 Mutanten aus ursprünglich 5000 zur näheren Charakterisierung in Schüttelkolben exprimiert. Untersuchungen der Regioselektivität bestätigen weitgehend die bisher gemachten Beobachtungen: Mutanten mit Alanin, Glycin und Prolin an Position 87 produzieren bevorzugt Verbenol ( $\geq 79\%$ ). Es wurden auch einige Mutanten mit einer F87V Mutation isoliert, diese zeigen aber alle eine geringere Selektivität für die Bildung von Pineneoxid ( $\leq 40\%$ ) als die bisher diskutierte CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante. Dies zeigt, dass Position 87 zwar hauptsächlich, aber nicht allein für die Regioselektivität einer Mutante verantwortlich ist. Offensichtlich führen die zusätzlich

eingeführten Mutationen, z.B. an Position Y51, zu einer Reduktion der Selektivität. Die bei allen diesen unselektiven Mutanten gemessene geringe Kopplungseffizienz ( $\leq 32\%$ ) ist ein Hinweis darauf, dass das Substrat nicht effektiv im aktiven Zentrum gebunden wird. An der Häm-Gruppe erzeugte, reaktive Sauerstoffspezies oxidieren dann möglicherweise das Substrat unselektiv.

Positive Ergebnisse wurden hinsichtlich der selektiven Oxidation von Pinen zu Verbenol erzielt. Insbesondere die Mutanten Y51V A74G F87A A111T L188S sowie Y51F A74G F87G L188G zeichnen sich durch hohe Selektivität (88% bzw. 79% Verbenolanteil), hohe Aktivität (jeweils  $218 \text{ min}^{-1}$ ) und hohe Kopplungseffizienz (77% bzw.  $>90\%$ ) aus und stellen daher eine Verbesserung gegenüber den bisher identifizierten verbenolselektiven A74G F87G L188Q und A74G F87A L188Q Mutanten dar. Insbesondere die deutlich verbesserte Aktivität ist hinsichtlich eines biotechnologischen Prozesses von Vorteil. Hierfür verantwortlich ist wahrscheinlich die Mutation des Tyrosins 51 am Eingang des Substratzugangskanals zu apolaren Aminosäuren (Phenylalanin und Valin), die Bindung des apolaren Substrates Pinen wird dadurch verbessert.

In Tabelle 4.2 werden die hier erreichten Selektivitäten denen anderer, bisher publizierter Biooxidationssysteme gegenübergestellt. Zum Vergleich ist außerdem die geringe Selektivität der Autoxidation von Pinen dargestellt.

Tabelle 4.2: Vergleich der Regioselektivität von Oxidationsreaktionen mit  $\alpha$ -Pinen.

System	Pinenepoxid	Verbenol	Verbenon	Andere	Referenz
CYP102A1 A74G F87V L188Q	72	20	-	8	diese Arbeit
CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188Q	6	88	6	-	diese Arbeit
Autoxidation bei 100°C	13	16	9	65	(Moore et al. 1956)
<i>Aspergillus niger</i>	-	20-25	2-3	72-78	(Bhattacharyya et al. 1960)
<i>Hormonema</i> sp.	-	55	45	-	(van Dyk et al. 1998)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	99	1	-	(Agrawal et al. 1999)
<i>Penicillium</i> sp.	-	98	2	-	(Agrawal et al. 1999)
P450 <sub>cam</sub>	15	85	-	-	(Bell et al. 2001)
P450 <sub>cam</sub>	2	86	5	7	(Bell et al. 2003)

Wie von Moore 1956 gezeigt, führt die Autoxidation von Pinen bei 100°C unter Zufuhr von Sauerstoff erwartungsgemäß zu einer Mischung verschiedener Oxidationsprodukte, welche über die intermediäre Bildung von Hydroperoxiden und anschließende Reduktion mit Natriumsulfid entstehen (Moore et al. 1956). Erste Versuche einer selektiven mikrobiellen Oxidation von Pinen wurden schon in den 1960er Jahren von Bhattacharyya sowie von Shukla unternommen (Bhattacharyya et al. 1960, Shukla et al. 1968). Die dabei erhaltenen Selektivitäten für die Verbenolbildung waren allerdings gering, ein Großteil des eingesetzten Pinens wurde zu CO<sub>2</sub> und Wasser abgebaut. Auch weitere Versuche der selektiven, mikrobiellen Oxyfunktionalisierung resultierten aufgrund der komplexen Terpenabbauwege in Produktmischungen, was die Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses für kommerzielle Anwendungen erschwerte. 1999 gelang Agrawal die hochselektive Oxidation von Pinen zu Verbenol mit *Penicillium* und *Aspergillus sp.*, allerdings mit sehr geringen Produktausbeuten (Agrawal et al. 1999). Kristallstrukturanalysen von P450<sub>cam</sub> führten 2001 und 2003 zur Herstellung von Mutanten, die (+)- $\alpha$ -Pinen selektiv zu (+)-cis-Verbenol hydroxylierten (Bell et al. 2003, Bell et al. 2001). Das natürliche Substrat von P450<sub>cam</sub> – Campher – wird vom Wildtyp hochselektiv zu 5-*exo*-Hydroxycampher hydroxyliert und ist Pinen strukturell sehr ähnlich. Durch geringe Veränderungen der, im Vergleich zu CYP102A1 sehr kleinen, Substratbindungstasche gelang es daher, Pinen mit einer Produktselektivität von 86% zu Verbenol umzusetzen. Nachteile dieses Systems sind zum einen die erforderliche getrennte Expression des Ferredoxins und der Ferredoxinreduktase für die Gewährleistung des Elektronentransports zur Monooxygenase, zum anderen die kleine Substratbindungstasche, die die Möglichkeit einer Veränderung der Regioselektivität, z.B. zur Produktion von Pinenepoxid erschwert.

#### 4.4 Entwicklung eines Verbenolnachweises in Mikrotiterplatten

Für die Durchmusterung von Mutantenbibliotheken werden hochdurchsatzfähige und einfach handhabbare Aktivitätstests benötigt, diese Eigenschaften treffen auf den hier verwendeten photometrischen NADPH-Oxidationstest zu. Ein wesentlicher Nachteil dieses Tests besteht allerdings darin, dass lediglich der Verbrauch eines Kofaktors (NADPH) der P450-katalysierten Oxidation als Selektionskriterium zur Verfügung steht. Der Verbrauch des Kofaktors korreliert jedoch nicht immer mit der Produktbildung (s. 1.2.2), was zur Selektion falsch positiver Mutanten führt. Weiterhin kann keine Aussage über das gebildete Produkt oder die Selektivität der Reaktion getroffen werden. Dies macht einen zweiten

Durchmusterungsschritt mittels GC/MS-Messungen notwendig, der die Identifizierung aktiver und selektiver Mutanten erlaubt, jedoch auch zeitintensiv ist. Die Verfügbarkeit eines photometrischen, produktspezifischen Tests würde demnach eine zeitliche Optimierung des Durchmusterungsverfahrens bedeuten.

In dieser Arbeit konnte ein hochdurchsatzfähiger, photometrischer Test entwickelt werden, mit dem Verbenol in Mikrotiterplatten mit einer Nachweisgrenze von unter 1 mM nachgewiesen werden kann. Die Farbentwicklung beruht auf einer Reaktion des Verbenols mit Vanillin/Schwefelsäure, einem aus der Dünnschichtchromatografie bekannten Nachweisreagenz.

Ein Nachteil dieses Tests ist seine, für die Aktivität der hier untersuchten P450 Monooxygenasen, zu geringe Empfindlichkeit. Mit den üblicherweise in Mikrotiterplatten erreichbaren P450 Konzentrationen, zusammen mit der im Vergleich zu anderen Enzymklassen – z.B. Hydrolasen – geringen Aktivität, reicht die gebildete Verbenolmenge nicht aus, um mit Vanillin/Schwefelsäure eine messbare Farbentwicklung auszulösen. Ein weiterer Grund für geringe Produktbildung von P450 Monooxygenasen in Mikrotiterplatten ist die Limitierung durch den Kofaktor NADPH, sowie der schlechte Eintrag des Kosubstrates Sauerstoff in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Kensy et al. 2005). Eine Möglichkeit, die Limitierung durch den Kofaktor NADPH auszuschließen, wäre, ein Regenerierungssystem analog zu dem in 4.5 diskutierten Verfahren einzusetzen. Schwaneberg gelang es mit Hilfe eines auf Isocitratdehydrogenase basierenden Kofaktorregenerationssystems, ein Hochdurchsatztest für P450 Monooxygenasen in Mikrotiterplatten zu etablieren (Schwaneberg et al. 2001).

#### **4.5 In vitro Oxidation von Pinen mit CYP102A1**

Nach der erfolgreichen Optimierung des Biokatalysators – der CYP102A1 Mono-oxygenase aus *Bacillus megaterium* – durch rationales und Daten-basiertes Protein Design, wurden die selektivsten und aktivsten Mutanten über einen längeren Reaktionszeitraum untersucht. Hierfür musste zunächst ein geeignetes Reaktionssystem gefunden werden. Das Hauptproblem P450-katalysierter Reaktionen ist die Abhängigkeit von teuren Kofaktoren, die ihren Einsatz für quantitative Umsetzungen aus ökonomischer Sicht ausschließen. Dieses Problem war unter anderem Gegenstand der Doktorarbeit von S. Maurer am Institut für Technische Biochemie (Maurer et al. 2003, Maurer 2006). Unter mehreren getesteten Verfahren zum Ersatz bzw. zur Regenerierung des Kofaktors NADPH stellte sich die

Regenerierung von  $\text{NADP}^+$  durch Einsatz einer Mutante der Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 als effektiv heraus. Durch Einfügen von Mutationen wurde die Kofaktorspezifität der Formiatdehydrogenase von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  geändert. Formiat wird zu  $\text{CO}_2$  oxidiert, welches aus der Reaktionslösung entweicht, während  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert wird. Das Enzym ist Temperatur- und Lösungsmittelstabil und wurde bereits im 100 l Maßstab heterolog in *E.coli* exprimiert (Rojkova et al. 1999, Tishkov et al. 1999).

Weitere Probleme der Pinenoxidation über einen längeren Reaktionszeitraum sind die geringe Löslichkeit des Edukts in Wasser sowie die geringe Stabilität der Oxidationsprodukte. Versuche der Reaktionsführung in einem wässrigen Einphasensystem zeigten, dass insbesondere Pineneoxid instabil ist und fast vollständig zu Sobrerol weiterreagiert (Lienemann 2005). Soll Pineneoxid als Hauptprodukt isoliert werden, ist eine Produktabtrennung *in situ* notwendig. Dies kann durch Verwendung eines Zweiphasensystems mit einer organischen Phase erreicht werden. Die organische Phase erfüllt dabei die Funktion eines Reservoirs für das Edukt, gleichzeitig werden die Reaktionsprodukte extrahiert. Durch starkes Rühren der Reaktionslösung kann eine Emulsion erzeugt werden, die eine verbesserte Diffusion des Edukts in die wässrige Phase bzw. des Produkts in die organische Phase ermöglicht. Ergebnisse von Lienemann bestätigten diese Annahmen: Durch Einsatz von Pinen als zweite Phase konnte zum einen genug Edukt für die P450 katalysierte Oxidation bereit gestellt werden, zum anderen wurde Pineneoxid extrahiert und blieb in der organischen Phase über Stunden stabil.

Für die Charakterisierung der verschiedenen CYP102A1 Mutanten wurde ein Zweiphasensystem mit Pinen als zweiter Phase, sowie ein Kofaktorregenerierungssystem mit Formiatdehydrogenase eingesetzt. Die mit diesem System erzielten Raum-Zeit-Ausbeuten liegen deutlich über denen der bisher publizierten biotechnologischen Verfahren (Tabelle 4.3). Viele der bisher veröffentlichten Arbeiten zur mikrobiellen bzw. enzymatischen Oxidation von Pinen beschränken sich entweder auf die Optimierung der Selektivität des Biokatalysators oder auf die Steigerung von Produktausbeuten mit Ganzzellsystemen. Eine Ausnahme stellen hier die Arbeiten von Agrawal dar. Durch klassische Stammverbesserung gelang es, *Aspergillus* und *Penicillium* Arten für die selektive Oxidation von Pinen zu Verbenol oder Verbenon zu optimieren (Agrawal et al. 1999), schließlich konnten so bis zu  $8 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Verbenol bzw. Verbenon produziert werden. Andere Verfahren bieten zwar höhere Raum-Zeit-Ausbeuten (bis zu  $110 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; (Prema und Bhattacharyya 1962)), allerdings zu Lasten der Selektivität. Der Einsatz von Basidiomyceten wie *Pleurotus flabellatus* bietet

wiederum den Vorteil hoher Selektivitäten, mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $0,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ist eine technische Anwendung allerdings nicht vorstellbar.

Tabelle 4.3: Vergleich von Raum-Zeit-Ausbeuten der  $\alpha$ -Pinen Oxidation mit ganzen Zellen und der  $\alpha$ -Pinen Oxidation *in vitro*.

System	Raum-Zeit-Ausbeute	Produkte	Referenz
CYP102A1 A74G F87V L188Q; <i>in vitro</i>	$130 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Pinenepoxid	diese Arbeit
CYP102A1 A74G F87A L188Q <i>in vitro</i>	$450 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenol, Pinenepoxid	diese Arbeit
CYP102A1 Y51V A74G F87A A111T L188S <i>in vitro</i>	$300 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenol, Pinenepoxid	diese Arbeit
<i>Aspergillus niger in vivo</i>	$110 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenol, Verbenon, Sobrerol	(Prema und Bhattacharyya 1962)
<i>Pleurotus flabellatus in vivo</i>	$0,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenon	(Busmann und Berger 1994)
<i>Hormonema sp. in vivo</i>	$7 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenon, Verbenol	(van Dyk et al. 1998)
<i>Aspergillus sp. in vivo</i>	$8 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenol	(Agrawal et al. 1999)
<i>Penicillium sp. in vivo</i>	$6 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenol	(Agrawal et al. 1999)
<i>Aspergillus niger in vivo</i>	$5 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenon	(Agrawal und Joseph 2000)
<i>Aspergillus niger</i> , immobilisierte Zellen	$1 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Verbenon	(Rozenbaum et al. 2006)

Die mit den hier etablierten *in vitro*-Prozessen erreichten Ausbeuten zwischen  $130$  und  $450 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  liegen deutlich über den bisher publizierten Werten, obwohl die Reaktion nicht systematisch optimiert wurde. Eine weitere Verbesserung der Produktivität durch Veränderung der Reaktionsparameter ist also sicherlich möglich. Die anfangs beobachteten Selektivitäten der Mutanten wurden zumindest bei der pinenepoxidselektiven A74G F87V L188Q Dreifachmutante über den gesamten Reaktionszeitraum bestätigt. Im Falle der verbenolselektiven Mutanten konnte die hohe Produktselektivität von  $>80\%$  zugunsten der Verbenolbildung nicht reproduziert werden. Die Reaktionsextrakte der A74G F87A L188Q sowie der Y51V A74G F87A A111T L188S Mutante enthielten zu jedem Zeitpunkt etwa  $50\%$  Pinenepoxid. Ursache hierfür könnte die Art der Probennahme sein. Für die Bestimmung



der Produktverteilung wurden Teile der Pinen/Wasser-Emulsion extrahiert, es wäre möglich, dass Pinenepoxid besser als Verbenol in die Pinenphase extrahiert wird, dies würde zu einer Verfälschung der gemessenen Selektivitäten führen.

Weiterhin wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Reaktion untersucht. Luftsauerstoff ist ein Edukt der P450-katalysierten Oxidation, ist jedoch schlecht in Wasser löslich (ca. 0,3 mM bei 20°C, 1013 mbar). Die geringe Sauerstoffkonzentration kann also zu einer Limitierung der Umsatzraten führen, infolgedessen könnte sich eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirken. Tatsächlich beobachtet man bei der Oxidation in reiner Sauerstoffatmosphäre eine anfangs erhöhte Produktbildungsrate, welche allerdings deutlich schneller als bei der Oxidation in Luft wieder abnimmt. Ursache hierfür ist die schnellere Desaktivierung des Enzyms in Gegenwart von reinem Sauerstoff, wahrscheinlich durch die vermehrte Bildung von Hydroperoxo- oder Peroxospezies, welche mit dem Enzym reagieren. Auch die hohe Reaktivität des Sauerstoffs selbst könnte zur Inaktivierung der Monooxygenase führen.

## 4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten regioselektive Mutanten der Cytochrom P450 Monooxygenase CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* durch Methoden des rationalen- bzw. datenbasierten Designs zur selektiven Oxidation nicht natürlicher Substrate erfolgreich hergestellt werden. Die hier entwickelten Biokatalysatoren bieten nun die Möglichkeit der Produktion von Synthesebausteinen für die Riechstoff- und Pharmaindustrie im größeren Maßstab. Erst eine Vergrößerung des Reaktionsmaßstabes unter gleichzeitiger Prozessoptimierung wird zeigen, ob einige der hier untersuchten Substrate ökonomisch sinnvoll durch P450 Monooxygenasen oxidiert werden können. Dabei müssen neben den hier durchgeführten *in vitro* Experimenten auch Ganzzellsysteme untersucht werden. Im Rahmen einer Kooperation wird die CYP102A1 A74G F87V L188Q Dreifachmutante zur *in vivo* Oxidation von Pinen in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* eingesetzt. Darüber hinaus wird momentan die Effizienz eines Biotransformationssystems mit *Pseudomonas putida* als Wirtsorganismus getestet.

Ein Prozess zur selektiven Hydroxylierung verzweigter Fettsäuren und Fettsäurederivate konnte mittlerweile im Rahmen einer Diplomarbeit etabliert werden. Dabei wurden Cyclodextrine als Lösungsvermittler eingesetzt, die die Löslichkeit der hydrophoben Substrate in Wasser verbessern. Unter Verwendung eines Kofaktorregenerationssystems

---

gelang es schließlich, Tetramethyldecan-1-ol selektiv mit Ausbeuten von  $3,5 \text{ g l}^{-1}$  zu Tetramethyldecan-1,9-diol zu hydroxylieren (Kühnel et al. 2007), welches nun als chiraler Baustein für die Synthese des Makrolidantibiotikums Borrelidin eingesetzt wird.

## 5 Literaturverzeichnis

- Agrawal, R., N. U. A. Deepika, and R. Joseph. 1999. Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of alpha-pinene to verbenol. *Biotechnology and Bioengineering* 63: 249-252.
- Agrawal, R., and R. Joseph. 2000. Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 335-337.
- Antranikian, G. 2006. White biotechnology: Status quo and future. *Nachrichten Aus Der Chemie* 54: 1202-1206.
- Appel, D., S. Lutz-Wahl, P. Fischer, U. Schwaneberg, and R. D. Schmid. 2001. A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *J Biotechnol* 88: 167-71.
- Arnold, F. H., and G. Georgiou. 2003. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Auterhof, H., and H. Bertram. 1974. Color-Reactions Via Cyclopentenyl Cations. *Archiv Der Pharmazie* 307: 742-747.
- Auterhoff, H., and C. Baur. 1977. Color-Reaction of P-Cymol with Vanillin-Sulfuric Acid. *Archiv Der Pharmazie* 310: 518-521.
- Bauer, K., D. Garbe, and H. Surburg. 2001. *Common Fragrance and Flavor Materials*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Belev, T. N., M. Singh, and J. E. G. Mccarthy. 1991. A Fully Modular Vector System for the Optimization of Gene-Expression in *Escherichia-Coli*. *Plasmid* 26: 147-150.
- Bell, S. G., X. H. Chen, R. J. Sowden, F. Xu, J. N. Williams, L. L. Wong, and Z. H. Rao. 2003. Molecular recognition in (+)-alpha-pinene oxidation by cytochrome P450(cam). *Journal of the American Chemical Society* 125: 705-714.
- Bell, S. G., R. J. Sowden, and L. L. Wong. 2001. Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450(cam) for monoterpene oxidation. *Chemical Communications*: 635-636.
- Bellussi, L., G. Manini, M. G. Buccella, and R. Cacchi. 1990. Evaluation of the efficacy and safety of sobrerol granules in patients suffering from chronic rhinosinusitis. *J Int Med Res* 18: 454-9.

- Berger, R. G., E. Latza, F. Neuser, and J. Onken. 2000. Terpenes and amino acids as progenitors of volatile flavours in microbial transformation reactions in P. Schieberle and K.-H. Engel, eds. *Frontiers of Flavour science, Proc. 9th Weurman Congress*, Garching.
- Bhattacharyya, P. K., B. R. Prema, B. D. Kulkarni, and S. K. Pradhan. 1960. Microbiological Transformation of Terpenes - Hydroxylation of Alpha-Pinene. *Nature* 187: 689-690.
- Bischoff, D., B. Bister, M. Bertazzo, V. Pfeifer, E. Stegmann, G. J. Nicholson, S. Keller, S. Pelzer, W. Wohlleben, and R. D. Sussmuth. 2005. The biosynthesis of vancomycin-type glycopeptide antibiotics--a model for oxidative side-chain cross-linking by oxygenases coupled to the action of peptide synthetases. *Chembiochem* 6: 267-72.
- Branco, R. J. F., A. Seifert, M. Budde, J. Pleiss, V. Urlacher, and R. D. Schmid. 2007. The Molecular Basis of Regioselectivity in Engineered Cytochrome P450 Monooxygenase from *B. megaterium* Towards (-)- $\alpha$ - and (-)- $\beta$ -Pinene Hydroxylation. *JACS* submitted.
- Bruntner, C., B. Lauer, W. Schwarz, V. Mohrle, and C. Bormann. 1999. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tu901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Molecular and General Genetics* 262: 102-114.
- Bryan, P. N. 2000. Protein engineering of subtilisin. *Biochim Biophys Acta* 1543: 203-222.
- Buchholz, K., V. Kasche, and U. T. Bornscheuer. 2005. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Budde, M., S. C. Maurer, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher. 2004. Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 180-6.
- Burfield, A. G., D. J. Best, and K. J. Davis. 1989. Production of 2-methyl-5-isopropylhexa-2,5-dien-1-al and of 2-methyl-5-isopropylhexa-2,4-dien-1-al in microorganisms. Eur. Patent 0304318.
- Busmann, D., and R. G. Berger. 1994. Oxyfunctionalization of Alpha-Pinene and Beta-Pinene by Selected Basidiomycetes. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 49: 545-552.
- Carmichael, A. B., and L. L. Wong. 2001. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur J Biochem* 268: 3117-25.

- Chaparro-Riggers, J. F., K. M. Polizzi, and A. S. Bommarius. 2007. Better library design: data-driven protein engineering. *Biotechnol J* 2: 180-91.
- Chen, Z. C., T. W. B. Ost, and J. P. M. Schelvis. 2004. Phe393 mutants of cytochrome P450BM3 with modified heme redox potentials have altered heme vinyl and propionate conformations. *Biochemistry* 43: 1798-1808.
- Cowart, L. A., J. R. Falck, and J. H. Capdevila. 2001. Structural determinants of active site binding affinity and metabolism by cytochrome P450 BM-3. *Arch Biochem Biophys* 387: 117-24.
- Crowell, P. L., A. Siar Ayoubi, and Y. D. Burke. 1996. Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 401: 131-6.
- Cryle, M. J., R. D. Espinoza, S. J. Smith, N. J. Matovic, and J. J. De Voss. 2006. Are branched chain fatty acids the natural substrates for P450(BM3)? *Chemical Communications*: 2353-2355.
- Duffey, M. O., A. LeTiran, and J. P. Morken. 2003. Enantioselective total synthesis of borrelidin (vol 125, pg 1458, 2003). *Journal of the American Chemical Society* 125: 12666-12666.
- Falck, J. R., Y. K. Reddy, D. C. Haines, K. M. Reddy, U. M. Krishna, S. Graham, B. Murry, and J. A. Peterson. 2001. Practical, enantiospecific syntheses of 14,15-EET and leukotoxin B (vernolic acid). *Tetrahedron Letters* 42: 4131-4133.
- Farooq, A., S. Tahara, M. I. Choudhary, Atta-ur-Rahman, Z. Ahmed, K. H. C. Baser, and F. Demirci. 2002. Biotransformation of (-)-alpha-pinene by *Botrytis cinerea*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* 57: 303-306.
- Feenstra, K. A., E. B. Starikov, V. B. Urlacher, J. N. M. Commandeur, and N. P. E. Vermeulen. 2007. Combining substrate dynamics, binding statistics, and energy barriers to rationalize regioselective hydroxylation of octane and lauric acid by CYP102A1 and mutants. *Protein Science* 16: 420-431.
- Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Glieder, A., E. T. Farinas, and F. H. Arnold. 2002. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol* 20: 1135-9.

- Glieder, A., and P. Meinhold. 2003. High-throughput screens based on NAD(P)H depletion. *Methods Mol Biol* 230: 157-70.
- Graham-Lorence, S., G. Truan, J. A. Peterson, J. R. Falck, S. Wei, C. Helvig, and J. H. Capdevila. 1997. An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem* 272: 1127-35.
- Graziani, E. I., D. E. Cane, M. C. Betlach, J. T. Kealey, and R. McDaniel. 1998. Macrolide biosynthesis: A single cytochrome P450, Pick, is responsible for the hydroxylations that generate methymycin, neomethymycin, and picromycin in *Streptomyces venezuelae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8: 3117-3120.
- Griffiths, E. T., P. C. Harries, R. Jeffcoat, and P. W. Trudgill. 1987. Purification and properties of alpha-pinene oxide lyase from *Nocardia* sp. strain P18.3. *J Bacteriol* 169: 4980-3.
- Groger, H., F. Chamouleau, N. Orogas, C. Rollmann, K. Drauz, W. Hummel, A. Weckbecker, and O. May. 2006. Enantioselective reduction of ketones with "Designer cells" at high substrate concentrations: Highly efficient access to functionalized optically active alcohols". *Angewandte Chemie-International Edition* 45: 5677-5681.
- Groves, J. T. 2005. Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action in P. R. O. d. Montellano, ed. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Gustafsson, M. C., C. N. Palmer, C. R. Wolf, and C. von Wachenfeldt. 2001. Fatty-acid-displaced transcriptional repressor, a conserved regulator of cytochrome P450 102 transcription in *Bacillus* species. *Arch Microbiol* 176: 459-64.
- Gustafsson, M. C., O. Roitel, K. R. Marshall, M. A. Noble, S. K. Chapman, A. Pessegueiro, A. J. Fulco, M. R. Cheesman, C. von Wachenfeldt, and A. W. Munro. 2004. Expression, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* cytochromes P450 CYP102A2 and CYP102A3: flavocytochrome homologues of P450 BM3 from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 43: 5474-87.
- He, X., and P. R. de Montellano. 2004. Radical rebound mechanism in cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks alpha- and beta-thujone. *J Biol Chem* 279: 39479-84.
- Hedegaard, J., and I. C. Gunsalus. 1965. Mixed Function Oxidation .4. An Induced Methylene Hydroxylase in Camphor Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 240: 4038-&.

- Jork, F., Fischer, Wimmer. 1989. *Dünnschicht-Chromatographie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Joyce, M. G., H. M. Girvan, A. W. Munro, and D. Leys. 2004. A single mutation in cytochrome P450BM3 induces the conformational rearrangement seen upon substrate binding in the wild-type enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 279: 23287-23293.
- Julien, B., S. Shah, R. Ziermann, R. Goldman, L. Katz, and C. Khosla. 2000. Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *Gene* 249: 153-160.
- Kaneda, T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* 55: 288-302.
- Karuzina, I. I., and A. I. Archakov. 1994a. Hydrogen Peroxide-Mediated Inactivation of Microsomal Cytochrome-P450 during Monooxygenase Reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 17: 557-567.
- . 1994b. The Oxidative Inactivation of Cytochrome-P450 in Monooxygenase Reactions. *Free Radical Biology and Medicine* 16: 73-97.
- Katagiri, M., B. N. Ganguli, and I. C. Gunsalus. 1968. A Soluble Cytochrome P-450 Functional in Methylene Hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* 243: 3543-&.
- Kazlauskaitė, J., A. C. G. Westlake, L. L. Wong, and H. A. O. Hill. 1996. Direct electrochemistry of cytochrome P450cam. *Chemical Communications*: 2189-2190.
- Kensy, F., H. F. Zimmermann, I. Knabben, T. Anderlei, H. Trauthwein, U. Dingerdissen, and J. Buchs. 2005. Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: Determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 698-708.
- Kühnel, K., S. Maurer, Y. Galejeva, W. Frey, S. Laschat, and V. Urlacher. 2007. *Adv Synth Catal* submitted.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, and et al. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-56.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lauer, B., R. Russwurm, and C. Bormann. 2000. Molecular characterization of two genes from *Streptomyces tendae* Tu901 required for the formation of the 4-formyl-4-imidazolin-2-one-containing nucleoside moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *European Journal of Biochemistry* 267: 1698-1706.
- Lee, T. R., H. P. Hsu, and G. C. Shaw. 2001. Transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* bscR-CYP102A3 operon by the BscR repressor and differential induction of cytochrome CYP102A3 expression by oleic acid and palmitate. *J Biochem (Tokyo)* 130: 569-74.
- Lentz, O., A. Feenstra, T. Habicher, B. Hauer, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher. 2006. Altering the regioselectivity of cytochrome P450 CYP102A3 of *Bacillus subtilis* by using a new versatile assay system. *Chembiochem* 7: 345-50.
- Lentz, O., V. Urlacher, and R. D. Schmid. 2004. Substrate specificity of native and mutated cytochrome P450 (CYP102A3) from *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* 108: 41-9.
- Lewis, D. F. 1996. Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism. Pages 115-167 in D. F. Lewis, ed. *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism*. Taylor and Francis Ltd., London.
- Li, H., and T. L. Poulos. 1997. The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol* 4: 140-6.
- . 1999. Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450(BM-3). *Biochim Biophys Acta* 1441: 141-9.
- Li, H. Y., K. Darwish, and T. L. Poulos. 1991. Characterization of recombinant *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 and its two functional domains. *J Biol Chem* 266: 11909-14.
- Li, Q.-S., U. Schwaneberg, P. Fischer, and R. D. Schmid. 2000. Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chem. Eur. J.* 6: 1481-1486.
- Li, Q. S., U. Schwaneberg, M. Fischer, J. Schmitt, J. Pleiss, S. Lutz-Wahl, and R. D. Schmid. 2001. Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant. *Biochim Biophys Acta* 1545: 114-21.



- Liebeton, K., A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, and K. E. Jaeger. 2000. Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol* 7: 709-18.
- Lienemann, M. 2005. Design und Anwendung von neuen CYP102-Mutanten zur selektiven Oxidation von (-)-alpha-Pinen in einem biphasischen System. *Institut für Technische Biochemie*. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Looger, L. L., M. A. Dwyer, J. J. Smith, and H. W. Hellinga. 2003. Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature* 423: 185-190.
- Makris, T. M., I. Denisov, I. Schlichting, and S. G. Sligar. 2005. Activation of Molecular Oxygen by Cytochrome P450 in P. R. O. d. Montellano, ed. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Maurer, S., V. Urlacher, H. Schulze, and R. D. Schmid. 2003. Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP<sup>+</sup> cofactor recycling system: towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Adv Synth Catal* 345: 802-810.
- Maurer, S. C. 2006. Oxidationsreaktionen mittels der Cytochrom P450-Monooxygenase CYP102A1 in Enzymreaktoren. *Institut für Technische Biochemie*. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Maurer, S. C., K. Kuhnel, L. A. Kaysser, S. Eiben, R. D. Schmid, and V. B. Urlacher. 2005. Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants. *Advanced Synthesis & Catalysis* 347: 1090-1098.
- McLean, K. J., M. Sabri, K. R. Marshall, R. J. Lawson, D. G. Lewis, D. Clift, P. R. Balding, A. J. Dunford, A. J. Warman, J. P. McVey, A. M. Quinn, M. J. Sutcliffe, N. S. Scrutton, and A. W. Munro. 2005. Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans* 33: 796-801.
- Meinhold, P., M. W. Peters, M. M. Chen, K. Takahashi, and F. H. Arnold. 2005. Direct Conversion of Ethane to Ethanol by Engineered Cytochrome P450 BM3. *Chembiochem* 6: 1765-1768.
- Miura, Y., and A. J. Fulco. 1974. (Omega -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from bacillus megaterium. *J Biol Chem* 249: 1880-8.
- Moore, R. N., C. Golumbic, and G. S. Fisher. 1956. Autoxidation of Alpha-Pinene. *Journal of the American Chemical Society* 78: 1173-1176.

- Morley, K. L., and R. J. Kazlauskas. 2005. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol* 23: 231-7.
- Morr, M., V. Wray, J. Fortkamp, and R. D. Schmid. 1992. (2r,4r,6r,8r)-2,4,6,8-Tetramethyldecanoic and (2r,4r,6r,8r)-2,4,6,8-Undecanoic Acid of the Preen-Gland Wax from the Domestic Goose, *Anser-a-F-Domesticus* - Isolation, Synthesis of Derivatives and of the Rac-2,4,6,8-Tetramethyldecanoic Acid. *Liebigs Ann. Chem.:* 433-439.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Nelson, D. R., L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus, and D. W. Nebert. 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
- Ness, J. E., S. Kim, A. Gottman, R. Pak, A. Krebber, T. V. Borchert, S. Govindarajan, E. C. Mundorff, and J. Minshull. 2002. Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nat Biotechnol* 20: 1251-5.
- Noble, M. A., C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, A. C. MacKay, G. A. Reid, R. P. Hanzlik, and A. W. Munro. 1999. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochem J* 339: 371-9.
- Oliver, C. F., S. Modi, W. U. Primrose, L. Y. Lian, and G. C. Roberts. 1997. Engineering the substrate specificity of *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM3: hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds. *Biochem J* 327 ( Pt 2): 537-44.
- Omura, T. 2005. Heme-thiolate proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 404-409.
- Omura, T., and R. J. Sato. 1964. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I Evidence for its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
- Ost, T. W., C. S. Miles, J. Murdoch, Y. Cheung, G. A. Reid, S. K. Chapman, and A. W. Munro. 2000. Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3. *FEBS Lett* 486: 173-7.
- Ostermeier, M., J. H. Shim, and S. J. Benkovic. 1999. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat Biotechnol* 17: 1205-9.

- Otey, C. R., and J. M. Joern. 2003. *High-Throughput Screen for Aromatic Hydroxylation*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Paine, M. J. I., N. S. Scrutton, A. W. Munro, A. Gutierrez, G. C. K. Roberts, and C. R. Wolf. 2005. Electron Transfer Partners of Cytochrome P450 in P. R. O. d. Montellano, ed. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Palmer, C. N. A., E. Axen, V. Hughes, and C. R. Wolf. 1998. The repressor protein, Bm3R1, mediates an adaptive response to toxic fatty acids in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 18109-18116.
- Patrick, W. M., A. E. Firth, and J. M. Blackburn. 2003. User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. *Protein Engineering* 16: 451-457.
- Poulos, T. L., and E. F. Johnson. 2005. Structures of Cytochrome P450 Enzymes in P. R. O. d. Montellano, ed. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Prema, B. R., and P. K. Bhattacharyya. 1962. Microbiological Transformation of Terpenes .2. Transformations of Alpha-Pinene. *Applied Microbiology* 10: 524-&.
- Ravichandran, K. G., S. S. Boddupalli, C. A. Hasemann, J. A. Peterson, and J. Deisenhofer. 1993. Crystal-Structure of Hemoprotein Domain of P450bm-3, a Prototype for Microsomal P450s. *Science* 261: 731-736.
- Reetz, M. T. 2003. An Overview of High-Throughput Screening Systems for Enantioselective Enzymatic Transformations. Pages 259-282 in F. H. Arnold and G. Georgiou, eds. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Reetz, M. T., L. W. Wang, and M. Bocola. 2006. Directed Evolution of Enantioselective Enzymes: Iterative Cycles of CASTing for Probing Protein-Sequence Space. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 2494.
- Rojkova, A. M., A. G. Galkin, L. B. Kulakova, A. E. Serov, P. A. Savitsky, V. V. Fedorchuk, and V. I. Tishkov. 1999. Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha-helices. *Febs Letters* 445: 183-188.
- Rozenbaum, H. F., M. L. Patitucci, O. A. C. Antunes, and N. Pereira. 2006. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 23: 273-279.

- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salazar, O., P. C. Cirino, and F. H. Arnold. 2003. Thermostabilization of a cytochrome p450 peroxygenase. *Chembiochem* 4: 891-3.
- Schenkman, J. B., S. G. Sligar, and D. L. Cinti. 1981. Substrate Interaction with Cytochrome-P-450. *Pharmacology & Therapeutics* 12: 43-71.
- Schmid, A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, and B. Witholt. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258-268.
- Schmid, R. D. 2006. *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Schrader, J., and R. G. Berger. 2001. Biotechnological Production of Flavor and Fragrance Compounds in H.-J. Rehm and G. Reed, eds. *Biotechnology*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Schrader, J., M. M. W. Etschmann, D. Sell, J. M. Hilmer, and J. Rabenhorst. 2004. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters* 26: 463-472.
- Schwaneberg, U., D. Appel, J. Schmitt, and R. D. Schmid. 2000. P450 in biotechnology: zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450 BM-3 F87A as a catalyst. *J Biotechnol* 84: 249-57.
- Schwaneberg, U., C. Otey, P. C. Cirino, E. Farinas, and F. H. Arnold. 2001. Cost-effective whole-cell assay for laboratory evolution of hydroxylases in *Escherichia coli*. *Journal of Biomolecular Screening* 6: 111-117.
- Schwaneberg, U., C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, and R. D. Schmid. 1999. A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Anal Biochem* 269: 359-66.
- Seng Wong, T., F. H. Arnold, and U. Schwaneberg. 2004. Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnol Bioeng* 85: 351-8.

- Serra, S., C. Fuganti, and E. Brenna. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology* 23: 193-198.
- Shukla, O. P., M. N. Moholay, and Bhattach.Pk. 1968. Microbiological Transformations of Terpenes .X. Fermentation of Alpha- + Beta-Pinenes by a Soil Pseudomonad (Pl-Strain). *Indian Journal of Biochemistry* 5: 79-&.
- Shyadehi, A. Z., D. C. Lamb, S. L. Kelly, D. E. Kelly, W. H. Schunck, J. N. Wright, D. Corina, and M. Akhtar. 1996. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 alpha-demethylase, P-45014DM, and CYP51). *J Biol Chem* 271: 12445-50.
- Stemmer, W. P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10747-51.
- Straathof, A. J. J., S. Panke, and A. Schmid. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 548-556.
- Taylor, M., D. C. Lamb, R. Cannell, M. Dawson, and S. L. Kelly. 1999. Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: Heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263: 838-842.
- Tishkov, V. I., A. G. Galkin, V. V. Fedorchuk, P. A. Savitsky, A. M. Rojkova, H. Gieren, and M. R. Kula. 1999. Pilot scale production and isolation of recombinant NAD(+)- and NADP(+)-specific formate dehydrogenases. *Biotechnology and Bioengineering* 64: 187-193.
- Trudgill, P. W. 1994. Microbial metabolism and transformation of selected monoterpenes in C. Ratledge, ed. *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Acad. Publ., London.
- Urlacher, V. B., and S. Eiben. 2006. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* 24: 324-330.
- van Beilen, J. B., W. A. Duetz, A. Schmid, and B. Witholt. 2003. Practical issues in the application of oxygenases. *Trends in Biotechnology* 21: 170-177.
- van Dyk, M. S., E. van Rensburg, and N. Moleleki. 1998. Hydroxylation of (+)-limonene, (-)-alpha-pinene and (-)-beta-pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnology Letters* 20: 431-436.

- Vong, B. G., S. Abraham, A. X. Xiang, and E. A. Theodorakis. 2003. Synthetic studies on borrelidin: Enantioselective synthesis of the C1-C12 fragment. *Organic Letters* 5: 1617-1620.
- Vong, B. G., S. H. Kim, S. Abraham, and E. A. Theodorakis. 2004. Stereoselective total synthesis of (-)-borrelidin. *Angewandte Chemie-International Edition* 43: 3947-3951.
- Wang, L., A. Brock, B. Herberich, and P. G. Schultz. 2001. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* 292: 498-500.
- Wen, L. P., and A. J. Fulco. 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: 6676-82.
- Werck-Reichhart, D., and R. Feyereisen. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1: REVIEWS3003.
- Williams, G. J., A. S. Nelson, and A. Berry. 2004. Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cell Mol Life Sci* 61: 3034-46.
- Winnacker, E.-L. 1990. *Gene und Klone*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Wu, Z. L., L. M. Podust, and F. P. Guengerich. 2005. Expansion of substrate specificity of cytochrome P450 2A6 by random and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 280: 41090-100.
- Xue, Y. Q., L. S. Zhao, H. W. Liu, and D. H. Sherman. 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: Architecture of metabolic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12111-12116.
- You, L., and F. H. Arnold. 1996. Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng* 9: 77-83.
- Zhao, H., L. Giver, Z. Shao, J. A. Affholter, and F. H. Arnold. 1998. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* 16: 258-61.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Michael Budde  
Geboren am: 5. Oktober 1978 in 71522 Backnang  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1986-1989 Grundschule in der Taus, 71522 Backnang  
1989-1998 Gymnasium in der Taus, 71522 Backnang

### Hochschulausbildung

1998-2003 Diplomstudiengang Chemie an der Universität Stuttgart  
Thema der Diplomarbeit: „Klonierung, Expression und Charakterisierung von CYP 102A2 aus *Bacillus subtilis*“ angefertigt am Institut für Technische Biochemie

02/2002 bis 08/2002 Auslandssemester an der Universität Reading, Großbritannien  
Arbeiten im Arbeitskreis von Dr. John McKendrick zur Synthese von Substanz P, sowie zur Rolle von Serin in Histidin-Ammonium-Lyase

Seit 2003 Promotionsstudium am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart