



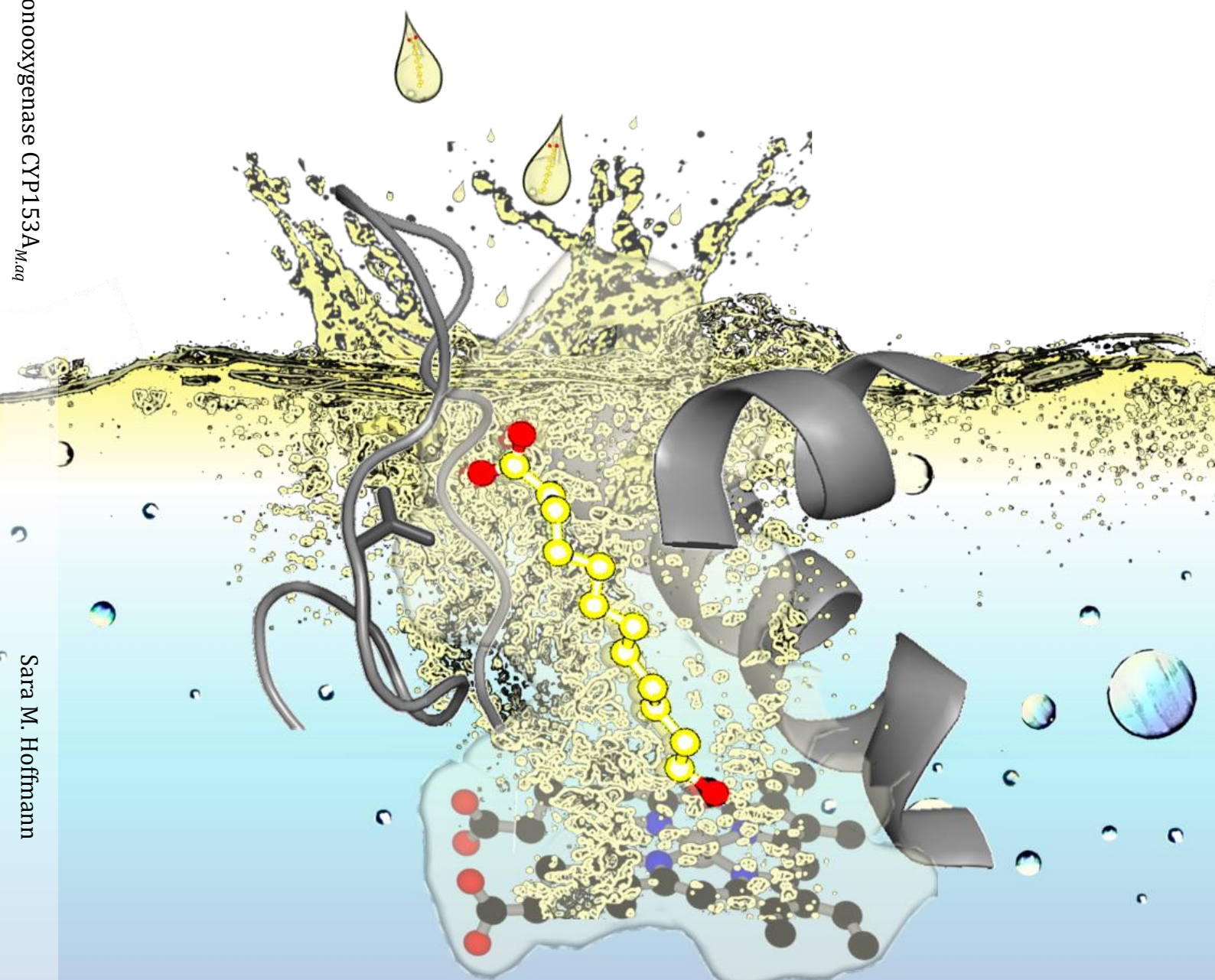
2017

Studien zur Optimierung der Katalyse mittels der Monooxygenase CYP153A_{M.aq}

Studies on optimisation of the catalysis through
the monooxygenase CYP153A_{M.aq}

Sara Maria Hoffmann

Institut für Biochemie und Technische Biochemie
Abteilung Technische Biochemie
Universität Stuttgart



**Studien zur Optimierung der Katalyse mittels der
Monooxygenase CYP153A_{M.aq}**

**Studies on optimisation of the catalysis through
the monooxygenase CYP153A_{M.aq}**

**Von der Fakultät 4 (Energie-, Verfahrens- und Biotechnik)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung**

Vorgelegt von

Sara Maria Hoffmann

aus Krappitz

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Karl-Heinz Engesser
Vorsitzender:	Prof. Dr. Ralf Takors
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2017

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

-2017-

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Studien zur Optimierung der Katalyse mittels der Monooxygenase CYP153A_{M.aq}“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled “Studies on optimisation of the catalysis through the monooxygenase CYP153A_{M.aq}” is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 05.10.2017

Sara M. Hoffmann

Cover

Eine freie Fettsäure tropft in die aktive Tasche des CYP153A_{M.aq} P450 Enzyms, das sich in einer wässrigen Lösung befindet. Dabei wird die Fettsäure in dem „*splash*“ durch die charakteristischen Strukturelemente dieses Enzyms festgehalten. Hierbei ist der terminale Kohlenstoff der Fettsäure in unmittelbarer Nähe zum Häm des Enzyms. (modifiziert nach Cover Picture ChemCatChem Volume 8, Issue 20)

Danksagung

Meine Zeit im Arbeitskreis der technischen Biologie war eine sehr bereichernde Erfahrung, für die ich mich herzlichst an dieser Stelle bedanken möchte.

An aller erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer, der mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe in dem spannenden Themengebiet der Biokatalyse zu forschen. Ganz besonders bedanke ich mich für sein Vertrauen in mich, das durch all die Freiheiten, die er mir bot, zum Ausdruck kam. Weiterhin möchte ich mich für die großartige Unterstützung und besonders die Ermöglichung der Kooperationen mit externen Partnern bedanken.

Sehr dankbar bin ich auch Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser für die freundliche Übernahme der Position des Mitberichters und der Bewertung dieser Arbeit und Prof. Dr. Ralf Takors für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein besonderer Dank gilt Jun.-Prof. Dr. Martin Weissenborn, der mich schon seit meiner Diplomarbeit herausragend betreut und unterstützt. Mit seiner offenen und herzlichen Art begeisterte er mich für die wissenschaftliche Arbeit und hielt mich mit seinen Anregungen und interessanten Vorschlägen mit vollem Eifer an diesem Thema. Auch über viele Kilometer hinweg hatte er stets ein offenes Ohr für Fragen aller Art. Für alle inspirierenden und lehrreichen Erfahrungen bin ich ihm sehr dankbar.

Für die produktiven Kooperationen und fachliche Diskussionen bedanke ich mich bei Dr. Łukasz Gricman und Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Maximillian Ebert für die Einblicke in die molekulardynamischen Simulationen, die Geduld und vor allem den netten Aufenthalt in Montreal. Ein ganz besonderer Dank gilt hier auch Prof. Dr. Joelle Pelletier, die mich in dieser Zeit so herzlich bei ihr zu Hause aufgenommen hat und mir die Möglichkeit gab mit Max in ihrer Arbeitsgruppe zusammen zu arbeiten.

Im Rahmen des EU Projekts Bioox hatte ich die Möglichkeit meine Studien international zu präsentieren und zu diskutieren, wobei ich mich vor allem bei Dr. Micheal Breuer, Prof. Dr. John Woodley, Asbjørn Toftgaard Pedersen, Prof. Dr. Sabine Flitsch und Prof. Dr. Nick Turner bedanken möchte.

Einige projektübergreifende Studien durfte ich mich mit den Studenten Tim, Niels, Benjamin, Selina, Steffen, Lea und Niklas bearbeiten. Für das eifrige Engagement, die nette und lehrreiche Zusammenarbeit möchte ich mich bei jedem einzelnen bedanken.

Für das besonders gute Arbeitsklima und den freundschaftlichen Umgang in der Gruppe danke ich allen Mitarbeitern des Instituts und vor allem Bettina Nestl und Bernd Nebel, die diese Truppe so beisammen halten. Nicht nur super Arbeitskollegen sondern auch tolle Freunde durfte ich in dieser Zeit kennenlernen. Der Laboralltag wäre ohne das großartige Biokatalyse 1 Team nur halb so produktiv gewesen. Jedem einzelnen, Nico, Julia, Maïke, Jan, Max, Rebekka, Leonie, Matthias, Andreas S., Sabrina, Svenja, Jens, Peter, Andreas H. Pascal, Lisa und Janosch möchte ich hier für tollen und immer witzigen Grillabende, Feierabendbiere, Bastelaktionen und Feiern danken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei den mittlerweile Ehemaligen, Lisa, Jule, Philipp T., Sandra, Sebastian, Sumi, Daniel, Jenny, Silke, Philipp S., Christine, Konrad, Stephan und Dennis, die mich besonders in meiner Anfangszeit unterstützt haben.

Für das Gelingen dieser Arbeit möchte ich ganz besonders meinem Mann und besten Freund Patrick Hoffmann danken, der mir mit Verständnis und liebevoller Geduld zur Seite stand und mir in schwierigen Phasen und Zweifel weiterhalf.

Mein tiefster Dank gilt abschließend meinen Eltern und meinen beiden Schwestern, die mir immer Rückhalt geben und mich besonders während meines Studiums unterstützten.

Wo die Natur aufhört ihre Abbilder zu schaffen, dort beginnt der Mensch aus natürlichen Dingen mit Hilfe der Natur unendliche Bilder zu schaffen.

Leonardo da Vinci (1452 - 1519)

Publikationsliste

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer in der Zeit von Mai 2014 bis April 2017 am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht oder sind momentan in Bearbeitung:

- I.** “Redox Partner Interaction Sites in Cytochrome P450 Monooxygenases: In Silico Analysis and Experimental Validation”
Ł. Gricman⁺, M. J. Weissenborn⁺, S. M. Hoffmann⁺, N. Borlinghaus, B. Hauer, J. Pleiss *ChemistrySelect* 2016, 6, 1243 – 1251
⁺These authors contributed equally to this work.
- II.** “The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling.”
S. M. Hoffmann[‡], M. J. Weissenborn[‡], Ł. Gricman, S. Notonier, J. Pleiss, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 1591 – 1597
[‡] These authors contributed equally to this work.
- III.** „Structure-Guided Redesign of CYP153AM.aq for the Improved Terminal Hydroxylation of Fatty Acids“
S. M. Hoffmann, H.-R. Danesh-Azari, C. Spandolf, M. J. Weissenborn, G. Grogan, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 3234 – 3239
- IV.** “Analysis of Substrate Spectrum by Computational and Experimental Characterization of Substrate Channels”
S. M. Hoffmann[‡], M. C. C. J. C. Ebert[‡], J. N. Pelletier, B. Hauer (*Manuscript in preparation*)
[‡] These authors contributed equally to this work.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	ENTWICKLUNG UND EINSATZ VON ENZYMEN IN INDUSTRIELLEN ANWENDUNGEN.....	2
1.1.1	<i>Fermentation: Die zellbasierte Katalyse</i>	<i>4</i>
1.1.2	<i>Biokatalyse: Die zellfreie Katalyse</i>	<i>5</i>
1.2	HYDROXYLIERUNG ALIPHATISCHER VERBINDUNGEN.....	7
1.2.1	<i>Chemische Synthese von aliphatischen Alkoholen.....</i>	<i>7</i>
1.2.2	<i>Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von aliphatische Alkoholen</i>	<i>8</i>
1.3	P450 ENZYME	11
1.3.1	<i>Katalytischer Mechanismus der P450 Enzyme.....</i>	<i>12</i>
1.3.2	<i>Struktur und Klassifikation.....</i>	<i>14</i>
1.3.3	<i>Beispiele industrieller Anwendungen von P450 Enzymen.....</i>	<i>19</i>
1.3.4	<i>Die P450 Familie CYP153A.....</i>	<i>20</i>
1.4	TERMINALE FETTSÄUREHYDROXYLIERUNG	22
1.4.1	<i>Chemische und biokatalytische Herstellung</i>	<i>23</i>
1.5	ZIELSETZUNG.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	MATERIALIEN	25
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	<i>25</i>
2.1.2	<i>Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten</i>	<i>25</i>
2.1.3	<i>Molekularbiologische Kits.....</i>	<i>25</i>
2.1.4	<i>Stämme.....</i>	<i>26</i>
2.1.5	<i>Plasmide und Oligonukleotide</i>	<i>26</i>
2.1.6	<i>Kulturmedien</i>	<i>34</i>
2.1.7	<i>Puffer</i>	<i>36</i>
2.1.8	<i>Stammlösungen</i>	<i>38</i>
2.2	METHODEN	38
2.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	<i>38</i>
2.2.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	<i>41</i>
2.2.3	<i>Kristallisation und Datensammlung.....</i>	<i>47</i>
2.2.4	<i>Bioinformatische Methoden</i>	<i>47</i>
2.2.5	<i>Chemisch-analytische Methoden.....</i>	<i>49</i>

3	ERGEBNISSE	50
3.1	STUDIEN ZUR OPTIMIERUNG EINER P450-FUSIONSENZYM KATALYSIERTEN REAKTION AUF DEM ENZYMLEVEL	50
3.1.1	<i>Analysen der katalytisch aktiven Häm-domäne</i>	54
3.1.2	<i>Wechselspiel Häm und Reduktase Domäne</i>	78
3.2	STUDIEN ZUR OPTIMIERUNG EINER P450-FUSIONSENZYM KATALYSIERTEN REAKTION AUF DER ZELLEBENE	87
3.2.1	<i>Fusionskonstrukte und freie Reduktasen</i>	87
3.2.2	<i>Expressionsstudie von CYP153A_{M.aq} in E.coli</i>	91
3.2.3	<i>Transport und Abbau von Substrat und Produkt</i>	93
4	DISKUSSION	96
4.1	STUDIEN ZUR OPTIMIERUNG EINER P450-FUSIONSENZYM KATALYSIERTEN REAKTION AUF DEM ENZYMLEVEL	96
4.1.1	<i>Analysen der katalytisch aktiven Häm-domäne</i>	96
4.1.2	<i>Wechselspiel Häm- und Reduktase Domäne</i>	111
4.2	STUDIEN ZUR OPTIMIERUNG EINER P450-FUSIONSENZYM KATALYSIERTEN REAKTION AUF DER ZELLEBENE	114
4.2.1	<i>Fusionskonstrukte und freie Reduktasen</i>	115
4.2.2	<i>Expressionsstudie von CYP153A_{M.aq} in E.coli</i>	116
4.2.3	<i>Transport und Abbau von Substrat und Produkt</i>	118
5	FAZIT UND AUSBLICK	120
6	ANHANG	125
7	LITERATURVERZEICHNIS	146

Abkürzungsverzeichnis

ABF	adaptive biasing force method
AdR	bovine Ferredoxin Reduktase
Adx	bovines Ferredoxin
alkB	Alkan Monooxygenase aus <i>Pseudomonas</i>
alkG	löslichen Rubredoxin aus <i>Pseudomonas</i>
alkL	Fettsäuretransportprotein aus <i>Pseudomonas</i>
AMO	Alkan Monooxygenase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BVMO	Baeyer-Villiger Monooxygenasen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CamA	Ferredoxin Reduktase aus <i>Pseudomonas</i>
CamB	Ferredoxin aus <i>Pseudomonas</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CPR	Cytochrome P450 Reduktase
CYP	Cytochrom P450
CYP102A BM3.	CYP153A monooxygenase aus <i>Bacillus megaterium</i>
CYP153A _{M. aq.}	CYP153A monooxygenase aus <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8
ddH ₂ O	Doppelt demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> , und andere
eV	Elektronenvolt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>fadD</i>	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase aus <i>E.coli</i>
<i>fadL</i>	Long-chain fatty acid transport Protein aus <i>E.coli</i>
FA	fatty acide, Fettsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FdR	Ferredoxin Reduktase aus <i>E.coli</i>
Fld	Ferredoxin aus <i>E.coli</i>
FMN	Flavinmononukleotid
fwd	forward (Oligonukleotid)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie

GC/FID	Gaschromatographie gekoppelt mit Flammen Ionisation Detektor
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
h	Stunde
ILS	Implicit Ligand Sampling
<i>in vivo</i>	Im lebendigen, Prozess, der im lebenden Organismus abläuft
<i>in vitro</i>	Im Glas, Prozess, der ohne lebenden Organismen abläuft
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilobase (DNA)
KPi	Kaliumphosphatpuffer
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	Lysogeny broth (Kulturmedium)
M	Molar (Mol/l)
M	Mili
MD	molekulardynamisch
min	Minute
MiniPrep	Minipreparation (Plasmidaufreinigung)
ml	Mililiter
mM	Milimol
MTBE	Methyl-tertiär-buthylether
NADH	β -Nicotinamadenindinucleotid
NADPH	β -Nicotinamadenindinucleotidphosphat
NDO	Naphtalen Dioxygenase aus <i>Pseudomonas putida</i>
ng	Nanogramm
OD ₆₀₀	Optische Dichte (Extinktion bei 600 nm)
omit map	Elektronendichtekarte
ω -OHFAs	ω -hydroxyfatty acids, ω -Hydroxyfettsäuren
pAH1	Alkan Monooxygenase aus <i>Pseudomonas</i>
PDB	Protein Daten Bank
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFOR	Phthalate Family Oxygenase Reductase Reduktase Domäne aus der Phthalat Familie In dem Fall aus CYP116B3
rev	Reverse (Oligonukleotid)
Rhf	Reduktase Domäne aus der <i>Rhodococcus</i> Familie In dem Fall aus CYP116B2

RMSD	root mean-square deviation; Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung
RPI's	Redox Partner Interaction sites Redox Partner Interaktionsflächen
rpm	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
s	Sekunde
sMMO	soluble methane Monooxygenase
T2MO	Toluene-2 Monooxygenasen
T4MO	Toluene-4 Monooxygenasen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TB	Terific broth
UV	Ultraviolettes Licht
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
V	Volt
Vgl.	Vergleiche
vis	Sichtbarer Bereich des Lichts
v/v	volume per volume, Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
XMO	Xylene Monooxygenase
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Fähigkeit von P450 Enzymen schwierige Oxidationsreaktionen mit hoher Spezifität und Selektivität zu katalysieren, macht diese Enzyme attraktiv für den Einsatz für viele biotechnologische Anwendungen. Durch die Herausforderung des Multienzymkomplexsystems bestehend aus Häm-domäne, Ferredoxin und Reduktase, als auch der meist niedrigen Aktivitäten und Stabilitäten sind noch wenige Applikationen bekannt. Diese Komplexität einer P450 Fusionsenzym katalysierten Reaktion wurde im Detail in dieser Arbeit studiert um Potentiale zu identifizieren, die zur Steigerung der Aktivität, Stabilität und Produktivität führen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden dabei Ansatzpunkte zur Optimierung auf der Enzymebene untersucht. Bioinformatische Verfahren wurden für die Identifizierung von Aminosäurepositionen in der Häm- als auch der Reduktasedomäne genutzt, welche mittels Mutagenese modifiziert wurden und die resultierenden Varianten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Labormaßstab getestet wurden.

Zur genaueren Beschreibung des terminal hydroxylierenden P450 Enzyms CYP153A_{M.aq} wurde in dieser Arbeit in Kooperation mit Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York, die Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq} aufgeklärt. Einige charakteristische Merkmale konnten im Vergleich zu beschriebenen Strukturelementen von P450 Enzymen identifiziert werden. Dazu zählen das Fehlen der B'-Helix und eine verlängerte F-Helix respektive ein verkürzter FG-Loop. Weiterhin konnte anhand der Kristallstruktur dargestellt werden, dass die aktive Tasche einem $\sim 20 \text{ \AA}$ langen Trichter ähnelt, dessen oberer Durchmesser ca. 12 \AA und der untere 9 \AA misst. Diese Geometrie wird als Voraussetzung für die Selektivität für die terminale Position des Substrats angenommen. Mutationsstudien legen dar, dass bei einer Änderung des unteren Durchmessers (L354I) die Selektivität für die ω -1 Position bevorzugt wird. Durch das Aufklären der Kristallstruktur mit dem Produkt 12-Hydroxydodecansäure konnte gezeigt werden, dass die Fettsäure in der aktiven Tasche vertikal positioniert ist und mit der Carboxygruppe eine Wasserstoffbrücke zu der Aminosäureseitenkette von Glutamin 129 bildet. Eine P450 Fettsäurehydroxylase mit vergleichbar ausgeprägten Strukturelementen wurde bisher noch nicht beschrieben. Diese charakteristischen Strukturelemente führten zu der

Annahme, dass Substratkanalverläufe in CYP153A_{M.aq} sich von den bisher beschriebenen unterscheiden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joelle Pelletier, Université de Montréal, konnten durch molekular dynamische Simulationen gezeigt werden, dass die bisher als sekundär beschriebenen Substratkanäle in bakteriellen P450 Enzymen, die energetisch favorisierten Kanäle in CYP153A_{M.aq} darstellen. Die Analyse von Energiebarrieren dieser Kanäle ermöglichte den Entwurf einer rationalen Mutantenbibliothek zur Steigerung der Aktivität gegenüber Fettsäuren als auch zur Erweiterung des Substratspektrums zu Alkanen.

Dabei konnte dargelegt werden, dass die Verankerung der Carboxygruppe durch das Einführen einer Guanidinogruppe in Form eines Arginins für die Dodecan- als auch für die Octansäure verbessert werden konnte. Das Entfernen der funktionellen Gruppe an dieser Position durch die Substitution zu Alanin ermöglichte den Umsatz des Alkans *n*-Octan. Weitere Positionen, wie A231 und P135 konnten durch das Analysieren der Kristallstruktur und der Substratkanäle für eine Erhöhung der Aktivität um das 3-fache gegenüber Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen identifiziert werden. So konnte S140R / A231G bzw. S140R / P135A als die besten Variante für Hexadecansäure, A231G für Dodecansäure und A231G / G307A für Octansäure identifiziert werden.

Aufgrund des Multienzymkomplexes des P450 Fusionskonstrukts wurde auf Enzymebene die Hämdomäne als katalysierende Domäne als auch das Zusammenspiel dieser mit der Reduktasedomäne analysiert. Im Fokus stand hierbei die genaue Untersuchung der Elektronenübertragung von NAD(P)H über die Reduktase hin zur Hämdomäne mit dem Ziel diese zu optimieren, einhergehend mit einer gesteigerten Stabilität des Enzyms und einer Steigerung der Aktivität.

In Kooperation mit Dr. Łukasz Gricman konnten Interaktionsflächen auf der Oberfläche (redox partner interaction sites (RPIs)) der Hämdomänen in Klasse II P450 Enzymen identifiziert werden, die für einen effizienten Kontakt zwischen den Domänen beschrieben wurden. Der Vergleich dieser Regionen zwischen Klasse I und Klasse II P450 Enzymen deckte Unterschiede der Eigenschaften der Aminosäureseitenketten auf. So konnten Positionen in CYP153A_{M.aq} identifiziert werden, die durch Mutagenese zu der entsprechenden Aminosäure geändert wurden. Ziel dabei war es, die Fusion zwischen der Klasse I Hämdomäne und der Klasse II Reduktase CPR

zu verbessern. Eine 1,3-fach verbesserte Kopplungseffizienz, was als Quotient der Produktbildungsrate und der NAD(P)H Oxidationsrate definiert ist, und somit ein Maß für die Elektronenübertragung darstellt, konnte durch eine einzelne Punktmutation auf der Oberfläche von CYP153A_{M.aq} erzielt werden.

Weitere Fusionskonstrukte mit den Reduktasedomänen PFOR aus CYP116B3 als auch Rhf aus CYP116B2 wurden erstellt um ein Klasse VII P450 zu erhalten, was der natürlichen Konstellation von Häm-domäne und Reduktasepartnern in CYP153A_{M.aq} näher kommt. Beide dieser Reduktasen tragen FMN und FeS als prosthetische Gruppen. Der Fokus dieser Studie lag dabei eine erhöhte Aktivität und Stabilität einhergehend mit verbesserter Kopplungseffizienz zu erzielen. Die initialen Aktivitäten von CYP153A_{M.aq}-Rhf waren deutlich niedriger als in der Fusion CYP153A_{M.aq}-PFOR. Letzteres wurde deshalb im Detail bezüglich der Linkersequenz studiert, die die Domänen Häm und Reduktase verbindet. Durch das Anpassen der Linkerlänge konnte in dieser Arbeit ein Fusionskonstrukt generiert werden, das eine um ~2-fache erhöhte initial rate *in vitro* gegenüber dem Substrat Dodecansäure und durch eine Kopplungseffizienz von 94 % eine um 67 % gesteigerte Stabilität der Häm-domäne und um 17 % gesteigerte Stabilität des gesamten Fusionskonstrukts aufweist.

Im zweiten Teil wurden Stellschrauben zur Verbesserung der Ganzzell-Reaktion identifiziert und adressiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR gegenüber einem System mit freien coexprimierten Reduktasen vorteilhaft ist. Als besonders große Einflussgröße konnte die Menge an aktivem Enzym identifiziert werden, weshalb die Expression im Detail untersucht wurde. Die besten Resultate (4-fache Steigerung) wurden bei einer Expression unter einem strikt regulierbaren Promotor erzielt. Auch die Erschwernis des Transports insbesondere von länger-kettigen Fettsäuren über die Zellmembran wurde als Angriffspunkt für die Optimierung der Ganzzellreaktion erfasst. Durch die Regulation der Expression der *fad* Gene konnte neben dem Transport auch der Abbau der Fettsäuren und des hydroxylierten Produkts gesteuert werden.

Die *in vitro* Mutagenese aus dem ersten Teil dieser Arbeit konnte generell auf das optimierte Ganzzellsystem übertragen werden. So stellt das in dieser Arbeit generierte P450-Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 kloniert in pBAD33 in *E.coli* BW25113Δ*fadD* einen interessanten Biokatalysator für den Einsatz für die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren dar.

Abstract

The ability of P450 enzymes to catalyse difficult oxidation reactions with high specificity and selectivity makes them attractive for the application in biotechnological processes. Just a few applications are known due to the challenge of the multi enzyme complex of heme domain, ferredoxin and reductase as well as the mostly low activities and stabilities. This complexity of a P450 fusion enzyme catalysed reaction was studied in detail in this thesis to identify potentials with the goal to improve the activity, stability and productivity.

In the first part of this thesis approaches on the enzyme level were investigated. Therefore, bioinformatic methods were used to identify positions in the heme and reductase domain, which were modified and tested *in vitro* as well as *in vivo* in a lab scale.

For a more precise description of the terminal hydroxylating enzyme CYP153A_{M.aq} the crystal structure was solved in cooperation with Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York. Some characteristic properties in respect to described structural elements of P450 enzymes could be identified. These include the missing B'-helix and an elongated F-helix respectively a shortened FG-loop. With the crystal structure, it was able to show that the active site resembles a 20 Å long truncated cone with an upper diameter of 12 Å and a lower diameter of 9 Å. This geometry is supposed as requirement for the selectivity for the terminal position of a substrate in a catalysed reaction. Mutation studies demonstrate a favoured selectivity for the ω-1 position by varying the lower diameter (L354I).

Solving the crystal structure with the product 12-hydroxy dodecanoic acid has revealed the vertical positioning of the fatty acid in the active site with a hydrogen bond between the carboxylic group and the amino acid side chain of glutamine 129. A P450 Enzyme with comparable structural elements wasn't described so far. These characteristic structural elements led to the assumption of an alternative pass of substrate channels in CYP153A_{M.aq} in respect to the so far described examples. Literature known secondary substrate channels of microbial P450 enzymes could be shown to be energetically favoured in CYP153A_{M.aq} via molecular dynamic simulations in cooperation with Prof. Dr. Joelle Pelletier, Université de Montréal,

Analysing these channels for energy barriers enabled the design of a rational mutant library for an enhanced activity towards fatty acids as well as expanding the substrate scope towards alkanes. By inserting a guanidine group as an arginine, the anchoring of a dodecanoic and octanoic acid could be improved. The removal of the functional group at this position by substituting with alanine enabled the conversion of the alkane *n*-octane. Further positions as A231 and P135 could be identified for the enhancement of the activity up to 3-fold towards fatty acids with different chain length by analysing the crystal structure as well as substrate channels. With this strategy, the best variant for hexadecanoic acid could be identified to be S140R / A231G resp. S140R / P135A for dodecanoic acid A231G and for octanoic acid A231G / G307A.

Due to the multi enzyme complex of P450 enzymes among the analysis of the heme domain also the interaction between the latter with the reductase domain was studied. The primary objective was the precise examination of the electron transfer of NAD(P)H through the reductase domain to the heme domain with the goal to optimise it and consequently enhance the stability of the enzyme and increasing the activity. In cooperation with Dr. Łukasz Gricman redox partner interaction sites (RPIs) on the surface of the heme domain in class II P450 enzymes could be identified, which were described for an efficient contact between the domains. The comparison between class I and class II P450's revealed differences in the properties of the amino acid side chains. This analysis helped identifying positions in CYP153A_{M.aq} which were targeted by mutagenesis to optimise the fusion between the class I heme domain and the class II reductase CPR. An indicator for the electron transfer is defined as ratio between the product formation rate and the NAD(P)H oxidation rate. An enhancement of this coupling efficiency could be achieved by a single point mutation at the surface of CYP153A_{M.aq}.

Further fusion constructs with the reductase PFOR of CYP116B3 as well as Rhf from CYP116B2 were designed to get a class VII P450, which resembles the natural configuration of heme and reductase domain of CYP153A_{M.aq}. Both reductases harbour an FMN and an FeS cluster as prosthetic groups. The focus was on enhancing the activity and stability along with optimised coupling efficiency.

The initial rate of the fusion CYP153A_{M.aq}-Rhf was lower than for the construct CYP153A_{M.aq}-PFOR. The latter was therefore analysed for its linker sequence which connects the heme with the reductase domain. A fusion construct with ~2-times enhanced initial rate *in vitro* towards the model substrate dodecanoic acid and with an optimised coupling efficiency of 94 % an improved stability of 67 % for the heme domain and of 17 % for the whole fusion construct could be generated by the adjustment of the linker length.

In the second part of this thesis parameters for optimising the whole cell reaction were identified and targeted. It could be shown that the fusion CYP153A_{M.aq}-PFOR is more advantageous than coexpressed free reductases. As significant influencing factor the amount of active enzyme was identified, therefore the expression was studied in detail. The best results (4-fold increase) were achieved with a strong regulated promotor system.

Further the difficulty of the transport in particular for longer chain fatty acids through the cell membrane was targeted to optimise the whole cell reaction.

The regulation of the *fad* genes allowed an optimised transport as well as the prevention of the degradation of the fatty acids and its hydroxylated products.

It was able to transfer the results of the *in vitro* mutagenesis of the first part of this thesis into the optimised whole cell fusion system. The generated P450 fusion construct CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 cloned in pBAD33 in *E.coli* BW25113ΔfadD is therefore also attractive for the application for the terminal hydroxylation of fatty acids.

1 Einleitung

Der katalytische Prozess der alkoholischen Gärung wird schon seit vielen Jahrhunderten vor Christus angewandt. Auch die Essigsäureherstellung geht auf diese Zeit zurück. Bei diesen eher zufälligen Entdeckungen handelt es sich um erste Mikroorganismen vermittelte katalytische Reaktionen.

Der Begriff der Katalyse wurde jedoch erst durch die chemischen Experimente des frühen 19. Jahrhunderts geprägt. Dazu gehörte unter anderem das von Johann Wolfgang Döbereiner beschriebene Berührungsphänomen (1823). Wobei die Zündung eines Wasserstoff-Luft-Gemisches in Anwesenheit von Platin für die Entwicklung des ersten Feuerzeugs diente. Jöns Jacob Berzelius beschreibt daraufhin 1836 eine neue Kraft, die diese Reaktionen bewirkt. Diese Kraft benannte er die katalytische Kraft. „Die katalytische Kraft scheint eigentlich darin zu bestehen, dass Körper durch ihre bloße Gegenwart, und nicht durch ihre Verwandtschaft, die bei dieser Temperatur schlummernden Verwandtschaften zu erwecken vermögen [...]“ In diesem Zitat aus seiner Arbeit verwendet er den Ausdruck der Verwandtschaft, der der heutigen Reaktionsfähigkeit entspricht.^[2]

Erst 100 Jahre später wurde von Wilhelm Ostwald die heute gültige moderne Definition des Katalysators definiert: „Ein Katalysator verändert die Geschwindigkeit der Reaktion, ohne als Produkt aufzutauchen.“^[3] Nachdem für chemische Synthesen der Katalysator nicht weg zu denken ist^[4], ist man heute angestrebt ökonomischere und vor allem ökologischere Verfahren zu entwickeln. Eine wertvolle Option stellen hierbei katalytisch wirkende Proteine (Enzyme) aus verschiedenen Organismen dar, wie sie schon für die ersten katalytischen Reaktionen verwendet wurden. Weiterhin ist bei der Herstellung von Natur-, Duft-, Geschmacks- und pharmazeutisch aktiven Stoffen die Kontrolle über Chemo-, Regio- und Stereoselektivität unabdingbar. Die einzigartigen aktiven Taschen in Enzymen schaffen einen evolutionär bedingten hoch optimierten Reaktionsraum, der genau diese Eigenschaften kontrollieren kann und zudem dies unter milden Reaktionsbedingungen in wässrigen Lösungen leistet.

1.1 Entwicklung und Einsatz von Enzymen in industriellen Anwendungen

Heute werden Enzyme in einigen industriellen Bereichen, wie der Waschmittel-, Papier-, Textil- und Lederherstellung eingesetzt. Dabei werden vor allem Amylasen, (Phospho)Lipasen, Esterasen, Proteasen, Ketoreduktasen oder Hydrolasen eingesetzt. [5, 6] Das Potential vieler anderer Enzymklassen ist auf Grund einiger Limitierungen bei weitem ausgeschöpft. Für die Anwendung in einem industriellen Prozess stellt oftmals die niedrige Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln, welche für bestimmte Produktionsschritte häufig unabdingbar sind, oder auch die eingeschränkte (Thermo-) Stabilität eine Schwierigkeit dar.

Auch die hohe Substratspezifität und begrenzte Aktivität ist häufig für eine Anwendung gegenüber der vorherrschenden Prozesse nicht ökonomisch. Diese Barrieren können durch technologisch innovative Lösungen, wie Enzym Immobilisierung auf Trägermaterialien oder durch das *Enzyme Engineering* überwunden werden.[7]

Auf diese Weise gelang es in den letzten Jahren maßgeschneiderte Enzyme für gewünschte Anforderungen zu konstruieren.[8, 9] Weiterhin war es so auch möglich nicht natürliche Reaktionen zu katalysieren. Dazu wird insbesondere auf das Beispiel der Entwicklung des Enzyms P450 BM3 aus *Bacillus megaterium* hingewiesen.[10-14] Natürlicherweise überträgt dieses Enzym ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf eine Reihe von Substraten. Durch den Einsatz synthetischer Carben- und Nitren- Vorläufern konnte schon durch das wildtypische Enzym eine geringe Aktivität für die Cyclopropanierung von Styrol mittels Diazoessigsäureethylester gezeigt werden. *Enzyme Engineering* wurde dann als Technik zur Erstellung von Varianten für die Cyclopropanierung verschiedener Moleküle und zur Steigerung der Produktivitäten angewandt. Besonders der Austausch der Häm koordinierenden Aminosäure konnte dies ermöglichen.

Solche Aminosäuresubstitutionen können auf eine rationale Weise durchgeführt werden, sofern Informationen über die Struktur des entsprechenden Enzyms und auf die Funktion des jeweiligen Aminosäureseitenrests geschlossen werden kann. Dabei können vor allem Ladung, Polarität, Hydrophobizität oder die Ausbildung von Wasserstoffbrücken Einfluss auf die Substraterkennung und das Bindungsvermögen

eines Enzyms, die Stabilisierung von Übergangszuständen und damit auf die Produktbildung haben. Computer basierte Analysen helfen oftmals bei der Auswahl der Substitutionen. Ist nicht allzu viel Wissen über das Struktur-Funktions-Verhältnis vorhanden, werden auch die Ansätze des *semi-rationalen Designs* und auch *directed evolution* angewandt. Diese Ansätze basieren auf den Arbeiten von Frances Arnold aus den 1990er Jahren. In diesen konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass durch eine zufällige Modifikationen von Enzymen und der Selektion der besten Varianten, ganz nach dem darwinistischen Evolutionsprinzip ein hoch spezialisierter und verbesserter Katalysator entwickelt werden kann.^[6] Dabei entstehen durch PCR-Techniken, wie *error prone PCR* oder *DNA shuffling*, Varianten, die durch verschiedene Selektionsparameter auf die gewünschte Eigenschaft untersucht werden und anschließend aussortiert werden.^[15-17]

Die Etablierung neuartiger Enzym katalysierter Reaktionen kann aber auch durch das Durchmustern der bioverfügbaren Enzymvielfalt erreicht werden. Dabei können Biosynthesewege studiert werden bzw. vielversprechende Bodenproben auf dem gewünschten Abbauprodukt kultiviert werden, als auch Metagenomdatenbanken nach gewünschten Enzymfunktionen durchsucht werden.^[18, 19] Eine weitere Computer gestützte Methode zu Generierung einer artifiziellen Enzymfunktion ist das *de novo Design*. Hierbei wird eine neue Struktur entworfen (*theozyme*), die in ein geeignetes Proteinrückgrat eingepasst wird. Diese neuartige Struktur wird entsprechend dem reaktiven Übergangszustands der gewünschten Reaktion *in silico* erstellt.^[20-22]

Bei der genaueren Untersuchung der alkoholischen Gärung im Jahre 1893 entdeckte E. Büchner, dass Hefeextrakt, der durch Filtration von intakten Zellen befreit wurde, immer noch die Fähigkeit behalten hatte, Glucose in Ethanol umzuwandeln.^[23, 24] Diese Beobachtung zeigt, dass die Enzyme der Gärung unabhängig von der intakten Zellstruktur funktionieren können. Diese frühe Entdeckung der Funktionstüchtigkeit isolierter Enzyme ermöglichte neben der zellbehafteten Biokatalyse (Fermentation) auch den Einsatz von isolierten Enzymen als Katalysator.

Beide Varianten bringen Vor- und Nachteile mit sich, die für jede zu katalysierende Reaktion separat zu beurteilen sind. Besonders zu beachten sind der Reaktionstyp, die Stabilität und Produktivität der Enzyme, der Verbrauch von regenerierbaren Kofaktoren als auch der Maßstab des Prozesses.

1.1.1 Fermentation: Die zellbasierte Katalyse

Durch den Einsatz von Mikroorganismen als Biokatalysator können die häufig kosten- und zeitaufwändigen Prozessschritte der Zellyse und Reinigung umgangen werden.^[25-27] Desweiteren schützt die Zellwand die eingeschlossenen Enzyme von potentiell schädlichen umgebenden Molekülen.^[28] Generell kann der Zusatz teurer Kofaktoren und dessen Regenerierung durch den Einsatz von ganzen Zellen für die Applikation von Redoxreaktionen verhindert werden.^[29] Häufig können die Edukte durch die angewandten Ganzzellkatalysatoren allein durch die Kultivierung mit kostengünstigen C- und N-Quellen selbst synthetisiert werden. So wird seit 1925 durch die Fermentation von *Aspergillus niger* Zitronensäure hergestellt.^[30] Neben dieser Fermentation eines Stammes, dessen zelleigenen Enzyme die gewünschte Reaktion katalysieren, ist auch die rekombinante Expression eines optimierten Enzyms möglich. Hierbei werden meist die gut untersuchten Stämme *E.coli* oder *S. cerevisiae* verwendet. Die Verwendung dieser gentechnisch veränderten Organismen hat den Vorteil, dass das Sicherheitsrisiko dieser Stämme eingeschätzt werden kann, die Kultivierungsbedingungen bekannt sind und mögliche Nebenreaktionen oder Feedback-Regulationen unterbunden werden können. Die Wahl des Stammes geht häufig auch auf die Exprimierbarkeit des Enzyms zurück. Einige Enzyme lassen sich rekombinant in viel höheren Mengen produzieren, hingegen werden z.B. P450 Monooxygenase als zelltoxische Proteine beschrieben, welche die Expressionsrate negativ beeinflussen.^[31, 32] Weiterhin stellen diese Enzyme als auch Dioxygenasen Multi-Komponenten Systeme dar, dessen einzelne Expression und Reinigung einen immensen Aufwand aufweisen und die Anwendung in einem Kompartiment die Komplexität vereinfacht.

Die zellbehaftete Biokatalyse kann mit *growing* oder *resting cells* erfolgen. Dabei unterscheidet man in welcher Wachstumsphase der Zellen die gewünschte Katalyse gestartet wird. Das Edukt wird bei einer *growing cell biotransformation* hinzugegeben, wenn eine gewünschte Zelldichte erreicht wird. Wohingegen bei der *resting cell biotransformation* die Zellen vor Zugabe des Edukts nach vollständiger Wachstumsphase geerntet und von Medienbestandteilen gewaschen werden. Beide Arten der Fermentation bieten eine Vielzahl an Vor- und Nachteilen. Die hohe Biomasse und höhere Aktivität bei *resting cells*, die geringere Nebenproduktbildung

als auch die weniger aufwändige Produktion der Zellen bei der *growing cell biotransformation* sind nur Einige davon.

Weiterhin ist auch eine Immobilisierung möglich, welche eine Wiederverwendung der Biokatalysatoren ermöglicht. Erst kürzlich wurde die „Teebeutel“-Technologie beschrieben, mit der die Herstellung von 1-phenylpropane-1,2-diol in einen Grammaßstab möglich ist.^[33] Die Anwendung von Biofilmen stellen ebenso eine kontinuierliche und stabile Prozessführung dar.^[34] Einige Beispiele für die Anwendung diese Technologie sind bekannt, wie die Essigsäureherstellung aus Ethanol durch einen Essigsäurebakterien Biofilm an Buchenholzspänen oder Ethanol aus hydrolysiertes Stärke durch einen Biofilm von *Zymomonas mobilis* an makroporösen Glasperlen.^[35]

Nachteile wie der Transport der Edukte und Produkte über die Zellmembran als auch mögliche Nebenreaktion durch zelleigene Enzyme können mittels *metabolic engineering* häufig umgangen werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass durch die Coexpression des Transportproteins FhuA die Oxidation von Terpenen verbessert wurde^[36]. Weiterhin konnte durch die Deletion von *caiA* in einem L(-)Carnitin produzierenden Stamm der Abbau des Produkts unterbunden werden und somit die Produktion um 42 % verbessert werden ^[37].

1.1.2 Biokatalyse: Die zellfreie Katalyse

Die zellfreie Biokatalyse wird meist für eine einstufige, nur selten für mehrstufige, Katalyseschritte angewandt. So startet der Prozess meist schon mit einem komplexeren organischen Molekül. Häufig kann dies von Vorteil sein, da ein Edukt auch kostengünstig synthetisch hergestellt werden kann. Oftmals ist die Lebensfähigkeit der Zellen durch die Edukte beeinträchtigt oder der Transport dieser über die Zellmembran ist erschwert. Des Weiteren sind auch der Produktabbau oder mögliche Nebenreaktionen durch zelleigene Enzyme verhindert. Neben der Umgehung der zellbehafteten Katalyse bringt die zellfreie Biokatalyse auch den Vorteil mit sich, dass Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur, Co-Solvent) präziser an die gewünschte Reaktion und dem entsprechenden Enzym angepasst werden können. So ist auch eine genauere Überwachung und Kontrolle möglich. Ein weiterer Vorteil der zellfreien Katalyse ist, dass die Enzymkonzentration für die gewünschte Reaktion eingestellt werden kann. So kann unter anderem die

Reaktionsgeschwindigkeit angepasst werden, was sich bei dem Einsatz in artifizialen *in-vitro* Kaskadenreaktionen vorteilhaft auswirkt.^[38]

Enzyme können isoliert direkt nach dem Zellschluss als Lysat (semi-reine Form), gereinigt oder immobilisiert eingesetzt werden. Da die Enzymaktivität in Lösungen oftmals mit der Zeit abnimmt kann das Gefriertrocknen eine schonende Methode zur Erzeugung von lagerfähigen semi-reinen oder gereinigten Enzymen sein. Unabhängig von der Anwendungsform ermöglicht der Einsatz von isolierten Enzymen einen einfacheren Versuchsaufbau. Aufgrund der reduzierten Nebenreaktionen durch den Ausschluss von zelleigenen Enzymen wird häufig auch eine einfachere Aufarbeitung des gewünschten Produkts ermöglicht.

Generell ist bei dem Einsatz isolierter Enzyme auf die Stabilität dieser zu achten. Diese kann durch *enzyme engineering* aber auch durch Technologien, wie der Immobilisierung oder Kompartimentierung optimiert werden. Auf diese Weise ist neben der Erhöhung der Stabilität der Enzyme auch eine Wiederverwendung und einfachere Handhabung dieser zu erreichen.

1.2 Hydroxylierung aliphatischer Verbindungen

Eine Hydroxylgruppe (-OH) kann in organische Moleküle vorrangig durch die Substitution einer funktionellen Gruppe oder eines Wasserstoffatoms gebildet werden. Dabei ist die Hydroxylierung von aliphatischen Verbindungen besonders herausfordernd. Dazu sind sowohl chemische als auch enzymatische Verfahren bekannt. Diese werden im Folgenden mit ihren Herausforderungen erläutert.

1.2.1 Chemische Synthese von aliphatischen Alkoholen

Um Olefine in Aldehyde umzuwandeln wird großtechnisch die Hydroformylierung bzw. Oxosynthese genutzt. Formal werden dabei ein Wasserstoffatom und eine Formylgruppe (-CHO) auf eine Doppelbindung übertragen. Dabei kann sich die Formylgruppe an jedes der an der Doppelbindung beteiligten Kohlenstoffatome ausbilden. So entstehen Gemische isomerer Aldehyde, die durch Hydrierung zu Alkoholen umgesetzt werden können.

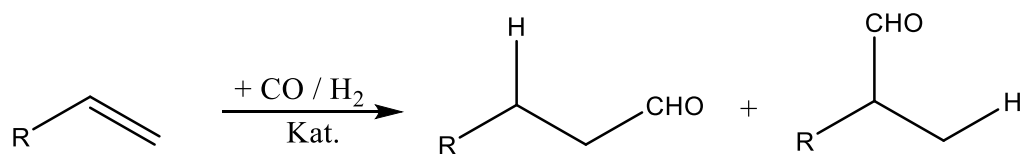


Abbildung 1 Reaktionsgleichung der Hydroformylierung nach O. Roelen.

Dieser Prozess wurde 1938 von Otto Roelen bei Untersuchungen zur Optimierung der Fischer-Tropsch-Synthese (Synthese von Kohlenwasserstoffen aus Synthesegas) entdeckt. Bei letzterem als auch bei der Oxosynthese wurde Cobaltoxid, Thorium(V)-oxid und Magnesiumoxid als Katalysator eingesetzt. Pruetz und Wilkinson konnten unabhängig voneinander mit einem Triphenylphosphin-Rhodium-Komplex als Katalysator deutlich höhere Umsätze bei mildereren Bedingungen erreichen.^[39-41] Jedoch liegen diese immer noch bei 90°C – 110°C und 1 – 4 MPa. Weiterhin ist mit diesem Prozess immer ein Produktgemisch zu erwarten. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ist demnach sehr aufwändig. Eine Kombination der Hydroformylierung und Hydrierung zur Produktion von C12-C15 Alkoholen ist im Shell-Prozess beschrieben.^[42]

Durch die Addition von Wasser an Alkene lassen sich unter Gegenwart von starken Säuren Alkohole synthetisieren. Mit der Ausnahme der Addition an Ethen sind auch bei dieser Syntheseroute Produktgemische zu erwarten.

Eine weitere Methode ist die Hydrolyse von Alkylhalogeniden. Hierbei erfolgt vorweg eine Halogenierung der gewünschten Position im Alkyl z.B. durch die Addition eines Halogens an ein Alken oder die radikalische Substitution eines Alkans. Es folgt eine Substitution nach S_N1 oder S_N2 . Auch in dem Fall erhält man unterschiedlich substituierte Produkte. Vielmehr ist bekannt, dass halogenierte Kohlenwasserstoffe giftig und/ oder kanzerogen sind. Deshalb sind für die Hydroxylierung von aliphatischen Verbindungen ökonomischere und effizientere Verfahren notwendig. Jedoch gelten heute diese chemischen Verfahren als Stand der Technik.

1.2.2 Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von aliphatische Alkoholen

In der Natur ist die alkoholische Gärung durch Hefen wie *Saccharomyces* und *Aspergillus* bekannt. Dabei wird Glucose im aeroben Stoffwechsel zu Ethanol und Kohlendioxid umgewandelt. In dem sogenannten ABE Prozess von Weizmann wird eine Mischkultur hauptsächlich bestehend aus *Clostridium acetobutylicum* fermentativ zur Herstellung der Produkte Aceton, Butanol und Ethanol eingesetzt.^[43, 44] Die fermentative Herstellung weitere Alkohole wie 1,3 Propandiol *iso*-Butanol und Butan-2,3-diol sind durch den Einsatz der synthetischen Biologie möglich geworden. So konnte durch Genencor und DuPont ein rekombinanter *E.coli* Stamm durch den Einsatz eines künstlichen Stoffwechselweg als auch durch die gezielte Veränderungen der Metabolitflüsse zu einem Industriestamm entwickelt werden, der eine Fermentation zur Herstellung von 1,3 Propandiol mit Ausbeuten von über 150 g L⁻¹ ermöglicht.^[45]

Neben der Fermentation sind die Enzyme der Klasse der Oxygenasen dafür bekannt Sauerstoffatome direkt in das Substrat einzubauen und so Hydroxygruppen zu bilden. Entsprechend der Anzahl der eingebauten Sauerstoffatome werden sie dabei in Mono- (EC 1.13.-) und Dioxygenasen (EC 1.14.-) eingeteilt. Weiterhin sind unter den Oxidoreduktasen auch die Enzymgruppen bekannt, die Peroxide als Sauerstoffdonoren verwenden können. Dabei wird zwischen Peroxidasen und Peroxygenasen unterschieden. Letztere nutzen Hydroperoxide, wie Peroxosäuren, wohingegen Peroxidasen Wasserstoffperoxid als Oxidant verwenden.

1.2.2.1 Dioxygenasen

Unter den Non-Häm Oxygenasen sind vor allem Dioxygenasen nach dem Typ „Rieske“ bekannt. Diese stellen ein Multifunktionskomplex dar, das aus der Oxygenase Domäne ($\alpha\beta\beta_3$), einer Reduktasedomäne und einem Ferredoxin besteht. Dabei trägt jede α -Untereinheit ein [2Fe-2S] Cluster. Für die Aktivierung von O_2 wird die reduzierende Kraft des Kofaktors NAD(P)H genutzt, dessen Elektronen über Reduktasepartner an die Oxygenase Domäne transferiert werden (Abbildung 2).^[46, 47]

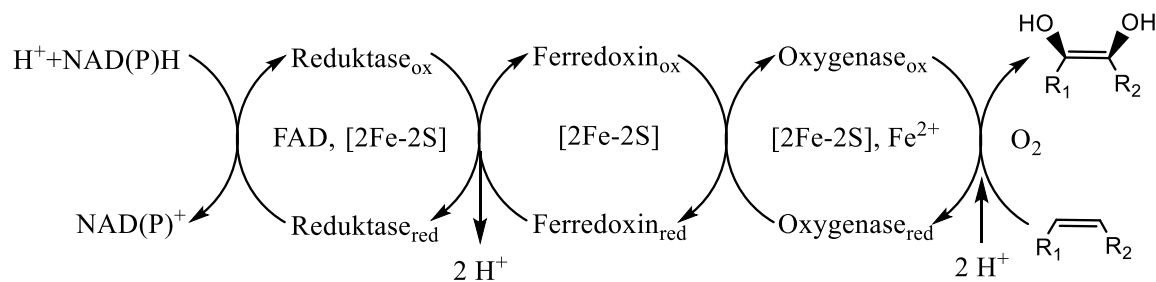


Abbildung 2 Elektronen Transfer in „Rieske Typ“ Dioxygenasen. Abbildung modifiziert nach Parales und Resnick.^[48]

Entsprechend des natürlichen Substrates und eines Sequenzalignments wurden diese Arene Dioxygenasen (1.14.12.-) in vier Familien geteilt (Toluol/Biphenyl, Naphtalen, Benzoat und Phtalat).^[49] Es sind aber noch viele weitere bekannt, die in keine dieser Familien geteilt wurden. Das Substratspektrum der asymmetrischen cis-Dihydroxylierung von C=C Doppelbindungen reicht dabei von monozyklischen aromatischen Molekülen bis hin zu polyzyklischen und heterozyklischen Arenen, substituierten Aromaten als auch aromatischen Säuren.^[50]

Weitere Oxygenasen mit der Fähigkeit des Einbaus beider Sauerstoffatome in ein Substrat stellen die Mononuklearen Eisen Dioxygenasen und die Häm-abhängigen Dioxygenasen dar. Jedoch sind auch Ausnahmen bekannt, wie die α -Ketoglutarat abhängigen Enzyme (EC 1.14.11.-), die ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff in ein Substrat und das zweite Atom auf den Kofaktor α -Ketoglutarat übertragen.

Eine Anwendung von Dioxygenasen ist selten beschrieben. Bekannt ist vor allem die Biosynthese von dem Farbstoff Indigo. Dabei wird in *E.coli* durch die Naphtalen Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas putida* die Synthese von *cis*-indole-2,3-dihydrodiol katalysiert, welches zum Indoxyl dehydratisiert und so spontan mit Luftsauerstoff zu dem Farbstoff Indol oxidiert.^[51]

1.2.2.2 *Monoxygenasen*

Wie auch in der Gruppe der Dioxygenasen ist das Substratspektrum der Monoxygenasen sehr weit. Kurzkettige Alkanen, wie Methan als auch makrocyclische Lactone stellen Substrate für diese Enzyme dar.

Monoxygenasen können anhand ihrer prosthetischen Gruppe klassifiziert werden. Neben den Kofaktor unabhängigen Monoxygenasen, werden die Kofaktor abhängigen Monoxygenasen weiter unterteilt. Darunter sind, Flavin abhängigen wie die Baeyer-Villiger Monoxygenasen (BVMO), Pterin abhängige und die Metallionen abhängigen Monoxygenasen wie Kupfer oder Eisen abhängige Enzyme bekannt.^[52] Letztere werden nach der Koordinierung des Eisens in Häm oder Nicht-Häm Monoxygenasen gegliedert.^[53]

Unter den Nicht-Häm Monoxygenasen sind die löslichen Methan Monoxygenase (soluble methane Monoxygenase) (sMMO), Xylen Monoxygenase (XMO), Toluol-2- (T2MO) bzw. Toluol-4 Monoxygenasen (T4MO), als auch die Alkan Monoxygenase (AMO) bekannt. Dabei stellen XMO und AMO Membran gebundene Oxygenasen dar, mit pAH1 und AlkB aus *Pseudomonas* als bekanntes Beispiel.^[54, 55] Dieses stellt unter den Alkan Monoxygenase die beste untersuchte Alkan Monoxygenase dar.^[56] Wie bei allen Monoxygenasen handelt es sich um ein Multikomponenten System, bestehend aus der Oxygenase alkB, einem löslichen Rubredoxin alkG und der löslichen Rubredoxin Reduktase alkT.^[56-58] Häm abhängige Monoxygenasen sind als P450 Enzyme bekannt. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.3 P450 Enzyme

Eine in der Natur weit verbreitete und zur Klasse der Monooxygenasen (E.C.1.14.-.-) gehörenden Enzymsuperfamilie, stellen die Cytochrom P450 Enzyme dar. Ihre „Endung“ P450 tragen die Enzyme auf Grund des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 450 nm bei der Komplexbildung der prosthetischen Gruppe Häm mit dem Inhibitor Kohlenstoffmonooxid.

Sie katalysieren unter Aufnahme zweier Elektronen die Übertragung eines Sauerstoffmoleküls aus molekularem Sauerstoff auf nicht aktivierte aliphatische oder aromatische C-H, N-H, S-H Bindungen. Dabei sind auch Epoxidierungen von C-C Doppelbindungen, oxidative N- und O-Dealkylierung bekannt. Die selektive Hydroxylierungsreaktion zu chemisch häufig nur schwer zugänglichen Verbindungen ist biotechnologisch die Interessanteste.



Abbildung 3 Allgemeine Reaktionsformel einer P450 katalysierten Hydroxylierungsreaktion

Durch ihre hohe Regio- und Enantioseletivität sind P450 Enzyme von großem Interesse. In der Chemie stellt eine selektive Oxyfunktionalisierung von Kohlenwasserstoffen eine Herausforderung dar. Daher sind diese Enzyme für die Biotechnologie Gegenstand intensiver Forschung. Auch in dieser Arbeit wurden diese Enzyme als Studienobjekt gewählt. Auf Grund des großen Substratspektrums dieser Enzyme ist das Interesse im Pharmabereich (rote Biotechnologie) als auch im Bereich der Fine- und Bulkchemikalien (weiße Biotechnologie).

Klassifiziert werden P450-Enzyme über ihre Aminosäuresequenzidentität^[59], wobei der Bezeichnung CYP eine Nummer folgt, die für die Familie steht (Enzyme mit einer Aminosäuresequenzidentität von über 40%). Darauf folgt ein Buchstabe für die Unterfamilie (Identität >50%) und zuletzt eine Zahl für das Gen.

1.3.1 Katalytischer Mechanismus der P450 Enzyme

Die katalytische Wirkung Cytochrom P450-Monooxygenasen besteht aus einer elektronenabhängigen Aktivierung von Luftsauerstoff mit folgender Oxidation eines Substrates. Dabei wird aus molekularem Sauerstoff ein Atom in das Substrat eingebunden, das andere wird zu Wasser reduziert. Dabei spielt das Häm in der aktiven Tasche eine entscheidende Rolle. Der Katalysemechanismus von P450 Enzymen ist heute bekannt und anerkannt.^[60]

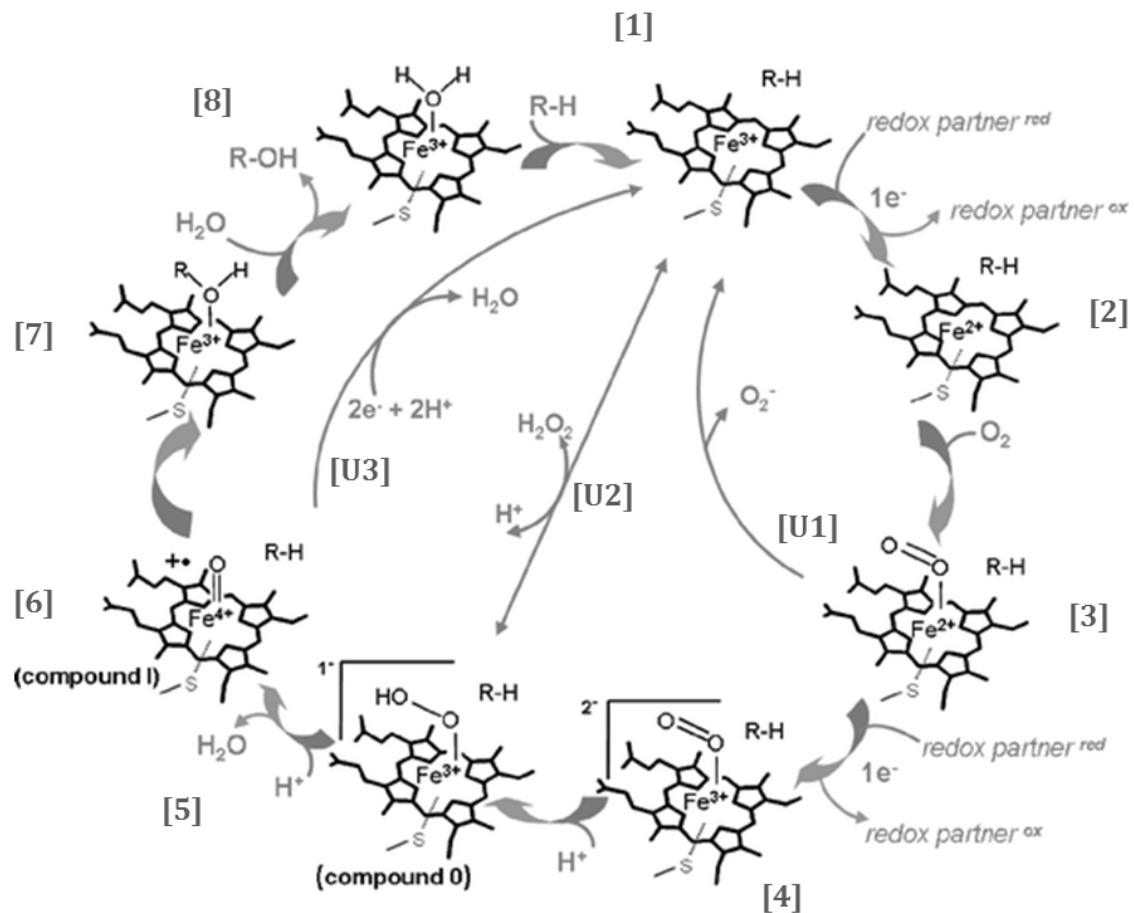


Abbildung 4 Der katalytische Mechanismus von P450 Enzymen (1-8). Die Sauerstoffaktivierung erfordert eine sequentielle Bereitstellung von zwei Elektronen von NAD(P)H über Reduktasepartner und zwei Protonen um Compound I zu bilden. Dieses ermöglicht den radikalischen Angriff des Sauerstoffs am Substrat. Mögliche Nebenwege werden als Uncoupling beschrieben. Sie implizieren einen Elektronenverbrauch ohne Substratoxidation (U1-U3). Abbildung modifiziert nach Muinro et al.^[61]

Durch die Bindung des Substrats in der Nähe der aktiven Tasche startet der Reaktionsmechanismus mit der Verdrängung des Wasserliganden, das an das Eisen(III) der Hämgruppe gebunden ist (1). Durch einen Ein-Elektronen Transport wird dieses Eisen zu Eisen(II) reduziert (2). Die Bindung von molekularem Sauerstoff führt zur Fe(II)-dioxy Spezies (3). Diese wird durch eine Reduktion und einen Protonentransfer zum hydroxo-peroxo Intermediat (4). Unter Wasserabspaltung erfolgt die heterolytische Spaltung der O-O Bindung (5). Ein Sauerstoffatom wird dabei zu Wasser protoniert, das andere bildet mit dem Porphyrinring die reaktive Spezies Compound I (6). Die Substratoxidation findet durch den radikalischen Angriff des Sauerstoffs statt (7). Bei Austritt des Produkts aus der aktiven Tasche wird Wasser koordiniert und das Enzym liegt im Grundzustand vor(8).^[61-63]

Neben diesem Ablauf sind auch verkürzte Reaktionsabläufe bekannt, die zu keiner Produktbildung führen jedoch Elektronen des NAD(P)H verbrauchen. Je weniger dieser „Uncoupling“ Fälle auftreten, desto effektiver ist die Elektronen Nutzung des NAD(P)H. Deshalb ist für die Beschreibung eines P450 Systems die Kopplungsrate als Kenngröße bekannt, die das Verhältnis des NAD(P)H Verbrauchs zur Produktbildung angibt.

Diese als „Uncoupling“ bekannten Ereignisse können die Reaktion an unterschiedlichen Schritten des oben beschriebenen Mechanismus abbrechen. (U1) Durch Autooxidation des angelagerten Sauerstoffs in (3) löst sich dieses als Superoxid. Weiterhin kann die Protonierung des hydroxo-peroxo Intermediats Wasserstoffperoxid als Abgangsgruppe bilden (U2). Beim dritten bekannten Uncoupling Reaktionsweg reagiert der Sauerstoff des Compound I mit zwei Protonen und zwei Elektronen zu Wasser (U3).^[64]

Von diesen drei Uncoupling-Arten ist die Ableitung von Wasserstoffperoxid die am häufigsten auftretende Form.^[61] Da diese Uncoupling Reaktionswege nicht zur Produktbildung führen, ist es Ziel für ein effizientes System diese zu unterbinden.

1.3.2 Struktur und Klassifikation

1.3.2.1 Generelle Struktur von P450 Enzymen

P450 Monooxygenasen sind im Allgemeinen sehr unterschiedlich in ihren Aminosäuresequenzen. Diese Diversität erstreckt sich jedoch nicht auf das aktive Zentrum. Letzteres ist über alle Enzyme hinweg weitgehend konserviert und spiegelt so einen gemeinsamen Mechanismus zur Aktivierung von Sauerstoff wieder. Die allgemeine Sekundärstruktur der Häm-Domäne von P450 besteht aus zwölf α -Helices (A-L) und fünf β -Faltblättern (1-5), einem Mäander-Loop und einer prosthetischen Gruppe. Zwischen den Helices und β -Faltblättern befinden sich Loop Strukturen. Davon werden einigen besondere Bedeutung zugeschrieben. So wird im Hinblick auf die Substraterkennung der FG-Loop beschrieben.^[65] Das aktive Zentrum wird aus der prosthetischen Häm-Gruppe, einem Bündel von vier Helices (D,E,I und L), einer J und K Helix, zwei β -Faltblattstrukturen und dem sogenannten „meander“-Bereich zwischen der α - und β -Domäne gebildet.^[66] Auf Grund unterschiedlicher Ausprägung der Strukturelemente insbesondere von FG-Loop, BC-Loop, F-Helix und B'-Helix unterscheiden sich P450 Enzym in den Substratkanälen.

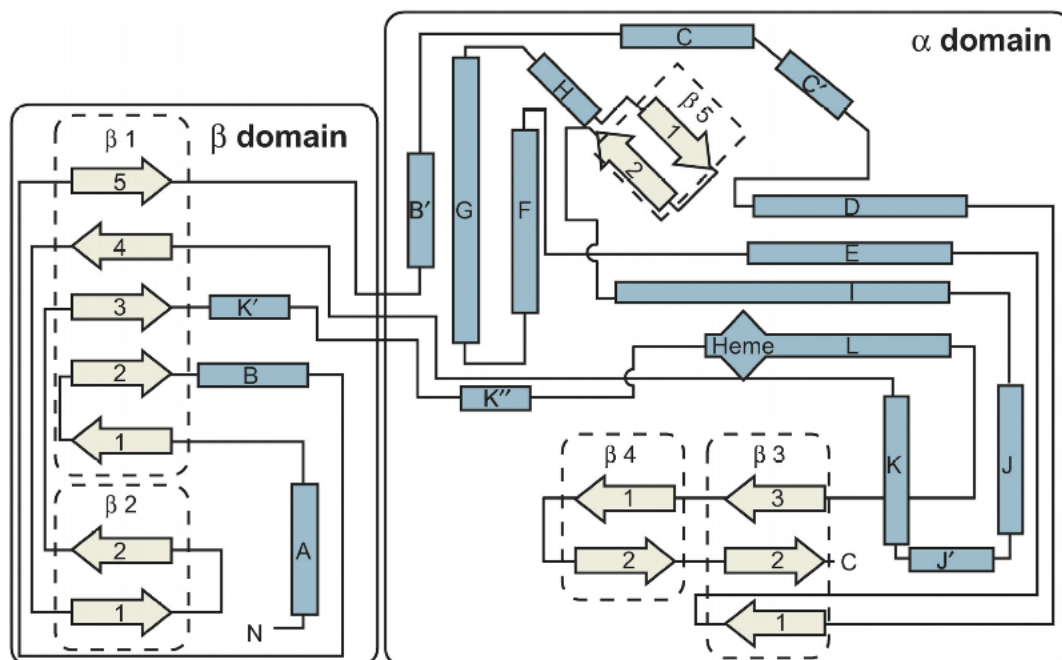


Abbildung 5 Schematische Sekundärstruktur von P450 Monooxygenasen. Blaue Balken stellen α -Helices dar, weiße Pfeile β -Faltblattstrukturen ^[58]

1.3.2.2 Substratkanäle in P450 Enzymen

Das aktive Zentrum mit dem Häm als prosthetische Gruppe liegt in P450 Enzymen tief in der Proteinstruktur. Analysen zeigten, dass 64 % der Enzyme aller Klassen Kanäle mit einer Länge von mindestens 15 Å besitzen, wovon einige zu dem jeweiligen aktiven Zentrum führen.^[67] Für die Superfamilie der P450 Enzyme konnte eine Vielzahl von Substratkanälen identifiziert werden. Ursprünglich wurden die Substratkanäle 1, 2 und 3 in P450cam als Ergebnis von Thermal Motion Pathway (TMP) identifiziert. Molekulardynamische Simulationen konnten nachweisen, dass ein Substrat diese Kanäle passieren kann.^[68] Die Ergebnisse konnten somit bestätigt werden und weisen darauf hin, dass Kanal 2 der energetisch favorisierte ist. Weitere Kanäle, wie Kanal 4 konnte in einem P450 aus Insekten identifiziert werden. Auch Wasser- (W) und Lösemittelkanäle (S) konnten anhand von kristallographischen Analysen von CYP102A1 (BM3) und P450cam beschrieben werden. Alle P450 Strukturen, die im März 2006 veröffentlicht waren, wurden von Cojocar, Winn und Wade hinsichtlich ihrer Substratkanäle untersucht.^[1] Diese Analyse mittels CAVER hinsichtlich des Substratkanals 2 zeigte, dass dieser Kanal in weitere Subklassen spezifiziert werden musste. Je nach Verlauf entlang eines Strukturelements, wie einer Helix oder eines Loops, konnten sieben verschiedene Substratkanäle 2 entdeckt werden (Abbildung 6). Dabei ist Kanal 2a für drei bakterielle P450 als favorisiert erfasst worden^[69] der Kanal 2c für ein Säuger P450^[70].

Hinsichtlich der neueren Erkenntnisse, dass auch in bakteriellen P450 nicht alle Subklassen der Kanäle 2 vorhanden sind, stellt sich die Frage ob die Substratkanäle nach den jeweiligen natürlichen Substraten evolviert sind. *Directed Evolution* Studien haben in den vergangenen Jahren immer wieder dargelegt, dass Mutationen außerhalb des aktiven Zentrums die Aktivität ausschlaggebend beeinflussen können.^[71, 72] Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäureseitenketten am Rande des Enzyms die Substratspezifität kontrollieren und weiterhin auch zufällige Nebenreaktionen, so genannte promiskuitive Aktivitäten möglich sind.^[73-76]

In den Kristallstrukturen sind die Kanäle 2a, 2c, 2ac und 2f die am häufigsten vorkommenden Substratkanäle. Diese Kanäle haben gemeinsam, dass sie durch die Strukturelemente F-Helix, G-Helix und dem dazwischenliegenden FG-Loop gebildet werden (Abbildung 6). Neben diesen Substratkanälen weisen einige P450 Enzyme zusätzliche Kanäle auf.

Als sekundäre Kanäle werden 2b, 2e und 2d beschrieben. Dabei durchdringt 2e den BC-Loop wohingegen 2b entlang dieses Loops verläuft und zwischen der B- und B'-Helix an die Oberfläche trifft. Der Kanal 2d trifft zwischen dem N-Terminus und den Helices a/A' und A auf die Oberfläche.

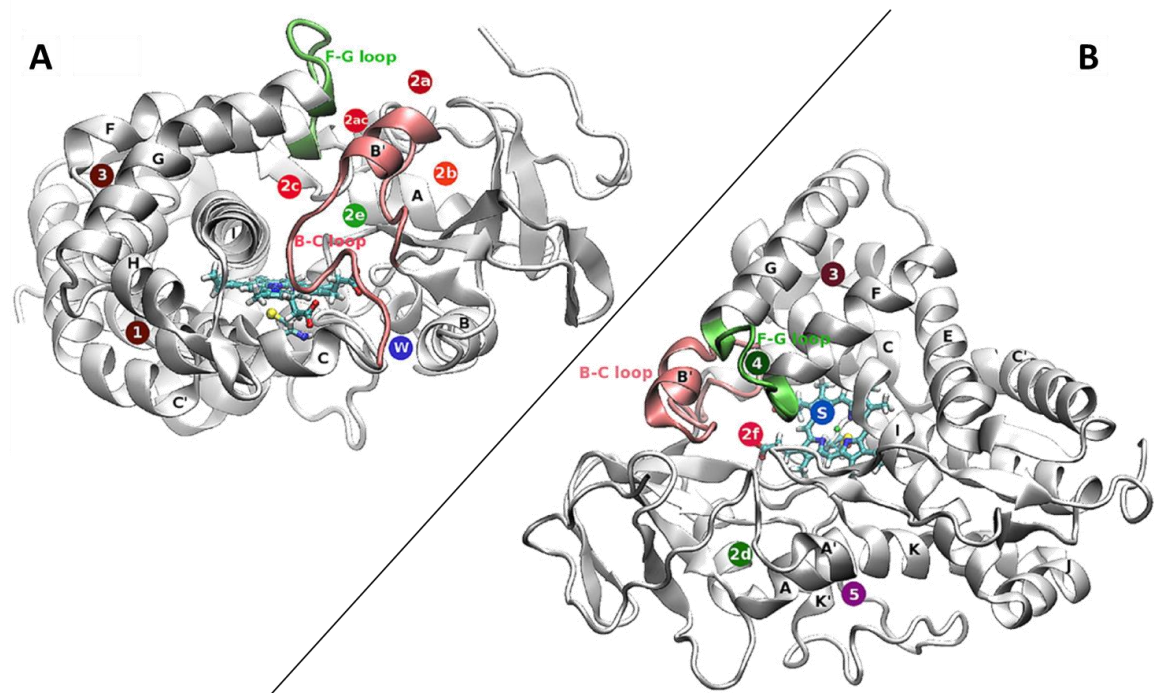


Abbildung 6 Darstellung aller in 2006 identifizierten Substratkanäle in P450cam. **A:** Hauptsubstratkanäle 2a, 2ac, 3c und 2b (in rot) sekundärer Substratkanal 2e (grün) Wasserkanal (W, blau) weitere Kanäle 1 und 3 (braun) **B:** 90° Drehung der Struktur zur Darstellung von primären Substratkanal 2f (rot), sekundärem Substratkanal 2d (grün), Solventkanal (S, blau) und weiterem Kanal 5 (lila). Cojocaru *et al*^[1]

1.3.2.3 Klassifikation der P450 Enzyme

Für die katalysierte Reaktion sind Elektronen notwendig, die durch die Oxidation des Kofaktors NAD(P)H durch Reduktasepartnern an das Hämprotein überliefert werden. Auf Grund der Variabilität der Reduktasepartner wurden die P450 Enzyme in 10 Klassen eingeteilt. Die meisten heute bekannten gehören den ersten beiden Klassen an (Abbildung 7).^[32] Dabei unterscheiden sich die beiden Klassen aufgrund der Löslichkeit der Proteine und der Kofaktorzusammensetzung. Die größte prokaryotische P450 Enzymklasse stellt Klasse I dar. Diese besteht aus einer NAD(P)H abhängigen FAD beinhaltenden Reduktase und einem [2Fe-2S] beinhaltendem Ferredoxin. Die Redoxkomponenten der Klasse II dagegen sind in der Membran verankert und verfügen über die Kofaktoren FAD und FMN. Hierzu gehören die meisten eukaryotischen P450 Enzyme.

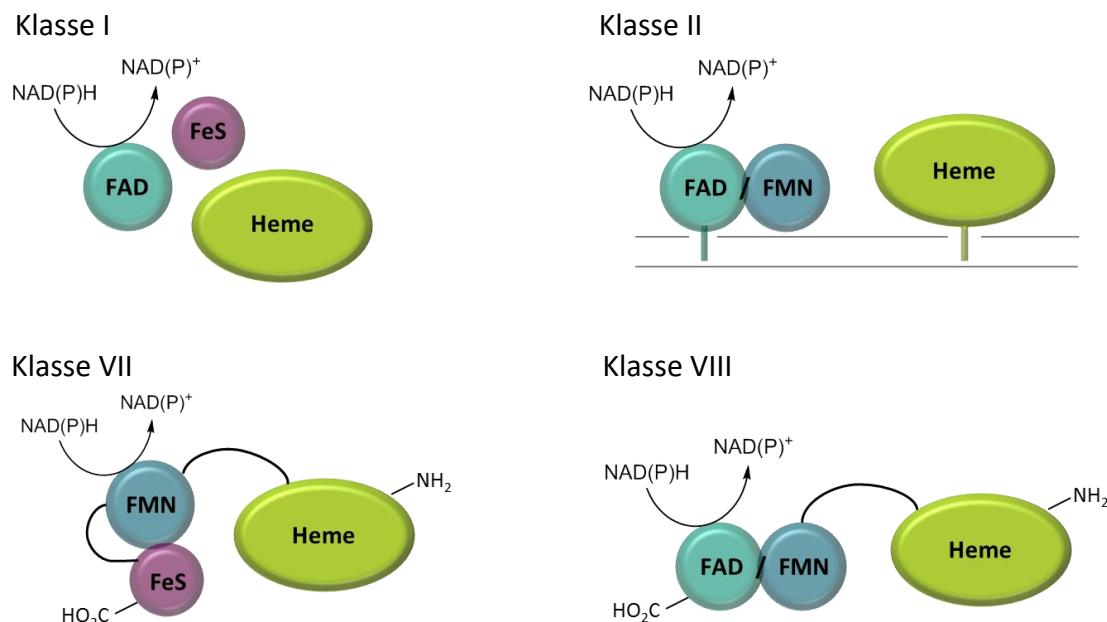


Abbildung 7 Vier Klassen der P450 Enzyme mit der Unterscheidung in der Anordnung der Häm- und der entsprechenden Reduktasepartner (FAD = flavin adenine dinucleotide; FeS = Eisen-Schwefel Ferredoxin; FMN = flavin mononucleotide). Abbildung modifiziert nach O'Reilly *et al.*, 2011.^[32]

1.3.2.4 P450 Fusionskonstrukte

Biotechnologisch interessant sind die Klassen VII und VIII durch die Verknüpfung des Hämproteins mit den Reduktasekomponenten in einer einzigen Polypeptidkette. Auch in dem Fall unterscheiden sich die Klassen in ihrer Kofaktorabhängigkeit. Enzyme der Klasse VII besitzen eine FMN und Fe-S abhängige Reduktase, die im Folgenden PFOR (phthalate family oxygenase reductase) genannt wird. Wohingegen in der Klasse VIII eine FAD und FMN abhängige Cytochrom P450 Reduktase (CPR) vertreten ist (Abbildung 7). Diese sogenannten Fusionsproteine treten natürlich auf. Das bis heute am intensivsten studierte P450 Enzym ist CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* (BM3), ein natürliches Fusionsenzym der Klasse VIII.

Artifizielle P450 Fusionskonstrukte

Die Hydroxylierung von Arachidonsäure mittels P450BM3 ist die schnellste bekannte P450 Reaktion mit einem k_{cat} von 17000 min^{-1} .^[77] Dies war Grund für viele Studien die Architektur auf andere Hämdomänen zu adaptieren um katalytisch aktivere Enzyme zu konstruieren. So wurden durch den Austausch der nativen Reduktasepartner durch die Anheftung der artfremden Reduktasedomäne von BM3 artifizielle Fusionskonstrukte gebildet.^[78-80] Der Effekt dieser Fusion war oft weniger erfolgreich wie erwartet^[81, 82], da durch solch eine Konstruktion die Elektronenübertragung verändert wurde, die in der Natur in dieser Form nicht vorkommt. Mit dieser Tatsache geht einher, dass in dem Fall keine natürliche Optimierung stattgefunden hat. Die Elektronenübertragung von Reduktasedomäne zu Hämdomäne in einem Fusionskonstrukt wird von einigen Faktoren beeinflusst. Dazu zählt der Linker, der die beiden Domänen verbindet mit seiner unterschiedlichen Länge und Aminosäurezusammensetzung, als auch die Interaktionsflächen der beiden Domänen und die Wahl der Reduktase. Diese Punkte waren auch Ziel von Optimierungen der artifiziellen Fusionskonstrukte in dieser Arbeit.

1.3.3 Beispiele industrieller Anwendungen von P450 Enzymen

Bioprozesse für die industrielle Produktion von Fine-Chemikalien erfordern Raum-Zeit Ausbeuten von mindestens $2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nur wenige heute bekannte P450 basierende Prozesse erfüllen diese Ausbeuten.^[83] Wohingegen für die Produktion von pharmazeutisch relevanten Komponenten viel niedrigere Raum-Zeit Ausbeuten akzeptiert werden.^[29] In diesem Bereich sind auch einige Beispiele bekannt. Als Beispiel sei besonders für die Herstellung von Artemisinin als Antimalaria Mittel mit CYP71AV1 aus *Artemisia annua* genannt.^[84] Weiterhin ist die Umwandlung zu der aktiven Form des Vitamin D3 durch CYP105A1 bekannt,^[85, 86] wie auch die Taxol Herstellung durch pflanzliche P450.^[87] Auch die Hydroxylierung des Aromaten ((R)-2-phenoxypropionsäure) durch *Beauveria bassiana* ist ein Beispiel für eine erfolgreiche Anwendung von P450 Enzymen.^[88] Für die Herstellung von Geschmacks- und Duftstoffen können P450 eingesetzt werden um natürlich vorkommende Terpene durch Hydroxylierung zu modifizieren.^[60] So konnte der Duftstoff (+)-Nootkaton durch die Oxidation von (+)-Valencen durch CYP109B1 synthetisiert werden, welcher natürlicherweise in Pflanzen wie der Grapefruit vorkommt und Verwendung in Lebensmitteln und umweltfreundlichen Antimückensprays findet.^[89, 90]

Häufig ist die Expression und Regulierung dieser Enzyme problematisch, weswegen in einigen Fällen der Wildtypstamm als Produktionsstamm eingesetzt wird.^[91, 92] Durch verbesserte Eigenschaften, wie z.B. die einfachere Handhabung eines Multienzymkomplexes in einer Polypeptidkette, wurden zahlreiche artifizielle Fusionen generiert. Diese bieten auch den Vorteil der Codierung auf einem Plasmid und der Expression unter einem Promotor. Für ein Ganzzell Prozess ist auf diese Weise sichergestellt, dass das Verhältnis von Reduktase zu Häm-domäne ausgeglichen ist. Das Zusammenspiel der Reduktasepartner und des Hämproteins bietet besonders für artifiziell erstellte Fusionen Raum für Optimierungen. Hierbei spielen die Interaktionsflächen auf der Oberfläche der Proteine, als auch der Linker, der die beiden Domänen verbindet eine entscheidende Rolle.

Weitere Hindernisse von P450 Enzymen wurden in Lundemo *et al.* im Kontext zu den wirtschaftlichen Kennzahlen (Ausbeute des Biokatalysators (g/g_{cdw}), finale Produktkonzentration (g/L), Reaktionsausbeute (g/g) und Raum-Zeit Ausbeute (g/L/h)) erörtert. ^[83] In dieser Analyse wurden die Anforderungen für einen

wirtschaftlichen batch Prozess bei einer Umsetzung von 10 mM Substrat nach 8 h auf > 90 % Umsatz, > 20 g/L Produkt-konzentration, > 2 g/L/h Raum-Zeit Ausbeute und > 10 g/g_{cdw} Biokatalysator Ausbeute bestimmt.^[93] In den weiteren Arbeiten von Lundemo und Notonier *et al.* konnten biologische Einflussfaktoren definiert werden wie die Bereitstellung von Kofaktoren, Substrat- und/oder Produkttoxizität, Sauerstoffanforderungen als auch Substrat und Produkttransport. Vielmehr ist aber die Aktivität von P450 Enzymen bisher noch für einige industrielle Anwendungen zu niedrig. Für einen 24 h Prozess wird von einer notwendigen turnover Rate von < 1 s⁻¹ ausgegangen.^[83]

Um das Potential dieser Enzyme effektiv einsetzen zu können, herrschen in einigen Bereichen mangelnde Kenntnisse über die Funktionsweise. Generell unverstanden ist bisher unter anderem in wie weit Sauerstoff als Cosubstrat die Reaktion beeinflusst. Kürzlich konnten durch MD Simulationen in CYP102A1 und CYP102A5 bestimmte Tunnel als Gaskanäle identifiziert werden.^[94] In der Nähe des aktiven Zentrums konnten Bereiche beschrieben werden, die wahrscheinlich als Sauerstoffreservoirs dienen. Für P450 Enzyme sind einige Substratkanäle beschrieben. Nur eine Auswahl dieser ist in einem einzelnen Enzym vertreten. Im Allgemeinen ist die Korrelation der Substratkanalverfügbarkeit und der Selektivität bzw. Aktivität der Enzyme noch wenig erforscht. Dies bietet weiterhin Ansatzpunkte für eine Optimierung einzelner P450 katalysierter Reaktionen.

1.3.4 Die P450 Familie CYP153A

In Organismen, die auf linearen Alkanen wachsen können, wurden erstmals CYP153A P450 Enzyme gefunden. Dazu gehören vor Allem α -, β - und γ -Proteobakterien (Gram-negative) und Actinomycetales (Gram-positives) aus Öl-kontaminierten Böden oder aus der Tiefsee.^[95, 96] Sie bestehen natürlicher Weise aus den 3 Komponenten, Häm-domäne, Ferredoxinreduktase und Ferredoxin und gehören somit der Klasse I der P450 Enzyme an. Kubota und Mitarbeiter konnten sechzehn CYP153A identifiziert und 8 davon als lösliche artifizielle Fusionskonstrukte in *E.coli* exprimieren.^[97] Das am besten beschriebene Enzym dieser Klasse ist CYP153A6 aus *Mycobacterium sp.* HXN-1500. Das Substratspektrum reicht von aliphatischen Alkanen (C6 bis C11) bis hin zu der Hydroxylierung und Epoxidierung von Cyclohexan, Styrene und *p*-Cymene. In einer Zwei-Phasen Biotransformation konnte

CYP153A6 für die Hydroxylierung von L-Limonene zu dem Krebswirkstoff Perillylalkohol eingesetzt werden, wobei Produktausbeuten von $6,8 \text{ g L}^{-1}$ in 75 h erreicht wurden.^[98] Eine *in vivo* Mutagenese wurde in der Arbeitsgruppe von F. Arnold durchgeführt mit dem Ziel das Substratspektrum zu kürzerkettigen, gasförmige Alkanen zu erweitern. Es konnte gezeigt werden, dass die Punktmutation A97V 75 % der Aktivitätssteigerung bedingt.^[55]

Aber auch weitere P450 der Familie CYP153A konnten als Alkanhydroxylasen beschrieben werden. Drei Vertreter dieser Familie wurden in unserem Institut beschrieben. Dabei konnten CYP153AP.sp aus *Polaromonas sp.* Stamm JS666 und CYP153A16 aus *Mycobacterium marinum* als ω -Hydroxylasen für mittelkettige *n*-Alkane und primäre Alkohole beschrieben werden.^[99, 100] Weiterhin wurde eine Substratspezifität für Fettsäuren für CYP153A16 und CYP153A_{M.aq} aus *Marinobacter aquaeolei* beobachtet.^[100] Auf Grund der höheren Aktivität und Selektivität von CYP153A_{M.aq} gegenüber Fettsäuren wurde dieses Enzym als auch CYP153AP.sp als Alkanhydroxylase weiter studiert.^[93, 101-103] Zur Vereinfachung der Handhabung der Enzyme wurden aus dem drei Domänen System bestehend aus Monooxygenase, Putidaredoxin (CamB) und Putidarredoxin Reduktase (CamA) artifizielle Fusionskonstrukte erstellt. Dabei wurden Reduktasedomänen aus natürlichen Fusionskonstrukten zur Klonierung an die Hämdomäne von CYP153AP.sp und CYP153A_{M.aq} ausgesucht. Die Reduktasedomäne CPR aus CYP102A1 (P450BM3) wurde C-terminal mit der natürlichen Sequenz des Linkers an CYP153A_{M.aq} und CYP153AP.sp fusioniert. Der Linker dient dabei als Verbindungsstück der beiden Domänen. Mit diesen Fusionskonstrukten konnte CYP153AP.sp in einem unter Druck betriebenen Reaktor für die selektive Hydroxylierung von *n*-Butan zu 1-Butanol eingesetzt werden. Prozessoptimierungen und Limitierungen konnten anhand des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}-CPR als Modellsystem für die terminale Hydroxylierung von Dodecansäure identifiziert werden.^[93, 101] Die Kofaktorabhängigkeit konnten hierbei optimiert als auch die Substrat- und Produktinhibition umgangen werden. Die Faktoren Aktivität, Stabilität und Kofaktorkopplung wurden als potentielle Einflussgrößen beschrieben.^[93]

1.4 Terminale Fettsäurehydroxylierung

Erneuerbare Ressourcen wie Fette und Öle können als Basis für verschiedene Oleochemikalien dienen und konkurrieren dabei auch nicht mit den petrochemisch gewonnen Chemikalien.^[104, 105] Alkane, Fettsäuren und Fettsäure(m)ethylester dienen als Hauptbestandteil für kommerzielle Chemikalien, wie Polymere und als Biodiesel.

ω -Hydroxyfettsäuren werden industriell in der Polymer- und Antibiotikasyntese verwendet. Durch Ringschluss können Hydroxyfettsäuren als Geruchs- und Aromastoff dienen.^[100, 106, 107] Für den Einbau einer Hydroxygruppe in einen Kohlenwasserstoff müssen hohe Bindungsenergien überwunden werden. Dabei ist diese in der terminalen Position am höchsten. Ein primäres C-Atom eines Alkans ist mit dem terminalen C-Atom in einer mittelkettigen aliphatischen Fettsäure zu vergleichen. In der Reihe von Methan, primärem, sekundärem und tertiärem C-Atom nimmt die Reaktivität zu, was auf die Stabilität der unterschiedlichen Radikale zurückzuführen ist. Diese ergibt sich durch als Hyperkonjugation beschriebene Stabilisierung der Radikalzentren durch Elektronen-Delokalisierung in partielle gefüllte p -Orbitale benachbarter σ -Bindung (C-H oder C-C). Wobei eine annähernd planare Anordnung der σ -Bindung, wie bei einer π -Bindung Voraussetzung ist. Als Konsequenz reduziert sich die Energie diese Radikale zu bilden. Dadurch wird die Erzeugung von tertiären Alkylradikalen bevorzugt.

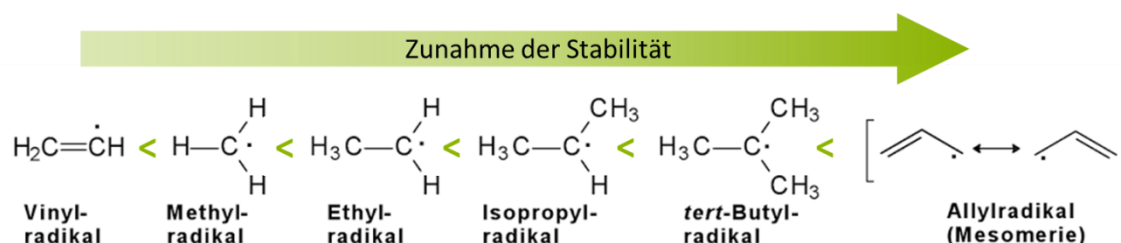


Abbildung 8 Stabilität der Alkylradikale als Folge der Delokalisierung des Elektrons. Abbildung modifiziert nach Buddrus und Schmidt.^[108]

Da im Methylradikal keine Hyperkonjugation möglich ist, ist eine Hydroxylierung in dieser Position benachteiligt. So entstehen z.B. bei der Chlorierung von Propan 1- und 2-Chlorpropan im Verhältnis 45:55 anstelle des statistisch zu erwartenden Verhältnisses 75:25^[108]. Diese Gegebenheit stellt die größte Herausforderung für die Herstellung von terminal hydroxylierten Fettsäuren dar.

1.4.1 Chemische und biokatalytische Herstellung

Die chemische Synthese terminal hydroxylierter Fettsäuren kann durch Kreuzmetathese zwischen einem langkettigen Fettalkohol und einem Methylacrylat mit anschließender Hydroformylierung und Hydrierung der Carbonylgruppe^[109] oder durch Reduktion von α,ω -Dicarbonsäuren^[110] erfolgen. Solche Prozesse benötigen extreme Reaktionsbedingungen und eine hohe Energiezufuhr.^[111] Eine weitere Möglichkeit zur chemischen Synthese ist die terminale Oxygenierung von Fettsäuren. Allerdings sind hier, wie in Kapitel 1.2.1 dargelegt, eine hohe Selektivität und hinreichende Reaktivität schwer zu erreichen.^[101]

In einigen Mikroorganismen ist die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren einer der ersten Schritte im Abbau dieser. So können durch die Kultivierung von Hefen (*Yarrowia sp.* oder *Candida*) auf Alkanen oder Fettsäuren ω -Hydroxyfettsäuren oder α,ω -Dihydroxyfettsäuren hergestellt werden. Dabei sind die P450 Enzyme der CYP52 Familie beteiligt.^[112, 113] Durch die Anwendung von *metabolic engineering* zur Unterbindung des Produktabbaus, als auch der Weiteroxidation konnten mit *Candida tropicalis* in eine 6-tägigen Biotransformation 174 g L⁻¹ ω -Hydroxyfettsäure und 6 g L⁻¹ α,ω -Dihydroxyfettsäure produziert werden.^[114] Neben CYP52 wurde das Enzym CYP153A aus *Marinobacter aquaeolei* als Fettsäurehydroxylase mit einer Selektivität für die terminale Position von >95 % beschrieben.^[100] Diese Enzyme verfügen über hoch optimierte aktive Taschen, die es ermöglichen diese nachteilige Selektivität zu kontrollieren und ermöglichen diese Reaktion unter milden Reaktionsbedingungen zu katalysieren.

1.5 Zielsetzung

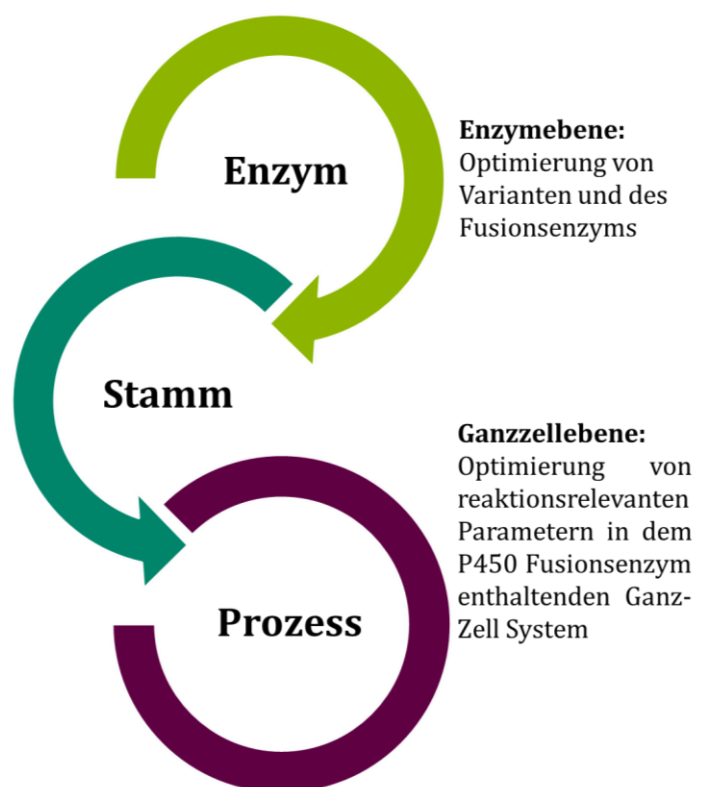
Die herausragende katalytische Leistung der Monooxygenase CYP153A aus *Marinobacter aquaeolei* (CYP153A_{M.aq}) als terminale Fettsäurehydroxylase soll auf die Aspekte analysiert werden, die sie bisher für den Einsatz in einem Ganzzellkatalysator limitieren. Generelle Limitationen von P450 Enzymen wurden in Vorarbeiten im Kontext zu wirtschaftlichen Kennzahlen erörtert. Um diese überwinden zu können, wurden biologischen Einflussfaktoren definiert wie die Aktivität des Biokatalysators, die Stabilität der Monooxygenase als auch der Reduktase und die Wahl eines robusten Stammes, der die gewünschte Katalyse hinsichtlich des Stofftransfers als auch eine geeignete Expression bewerkstelligt.^[83]

Der Einsatz der Monooxygenase CYP153A_{M.aq} als Fusionskonstrukt in der Hydroxylierung von Dodecansäure in vorausgegangenen Studien zeigte Limitierungen auf,^[93] die in dieser Arbeit auf verschiedenen Ebenen zur Optimierung der P450 Reaktion analysiert werden sollten.

Es sollten Ansatzpunkte identifiziert werden, um die oben genannten Faktoren zu adressieren. Untersuchungen zum Verständnis dieses Enzyms als auch die gezielte Maßnahme des rationalen Proteindesigns sollten dazu auf Enzymebene dienen.

So sollte sowohl die katalytische Häm-domäne als auch die effektive Elektronenübertragung von der Reduktasedomäne zur Häm-domäne analysiert werden.

Der Stamm *E.coli* soll als Ganzzellkatalysator für die Katalyse der Fettsäurehydroxylierung eingesetzt werden. Dabei sollte das optimierte Fusionsenzym eingesetzt werden und reaktionsrelevante Einflussgrößen identifiziert und optimiert werden.



2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Alfa-Aesar (Ward Hill, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH), und Sigma-Aldrich (St. Louis, US) bezogen

2.1.2 Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 1 In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
<u>Restriktionsendonukleasen</u>	
BamHI, EcoRI, DpNI, HindIII, NdeI, NcoI, XbaI, NotI,	Thermo Scientific, Waltham, US-MA
<u>DNA-modifying Enzyms</u>	
<i>Pfu</i> DNA Polymerase, Taq Polymerase, T4-DNA-Ligase,	Thermo Scientific, Waltham, US-MA
<i>Pfu</i> UltraII	Agilent, Santa Clara, US-CA
<u>Weitere Enzyme</u>	
Glucose-6-phosphat Dehydrogenase 1000 U/mL aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP), Kinase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, DE

2.1.3 Molekularbiologische Kits

Für die DNA-Reinigung (Zymoclean DNA Clean & Concentrator Kit), sowie die Plasmidpräparation (Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit) wurden molekularbiologische Kits von Zymo Research (Irvine, US) verwendet.

2.1.4 Stämme

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete *E.coli* Stämme

ITB Nr	Stamm	Genotyp	Quelle
ITB4	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F - Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ mK ⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Darmstadt, DE
ITB7	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F - ompT gal dcm lon hsdSB (rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Invitrogen, Darmstadt, DE
ITB2057	<i>Escherichia coli</i> BW25113	F - Δ (araD-araB)567 Δ lacZ4787 (::rrnB- 3) λ - rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514	National Institute of Genetics, Mishima, JPN
ITB2058	<i>Escherichia coli</i> BW25113 Δ fadD	fadD Deletion in BW25113	National Institute of Genetics, Mishima, JPN
	<i>Escherichia coli</i> TG10+	(thi, sup E, Δ (lac--pro), F' [tra D36 pro AB lacIqZ Δ (M15)], rha-14::Tn10), trägt Chaperonplasmide pAgro und pHSG	BASF, Ludwigshafen, DE

2.1.5 Plasmide und Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurde das Gen für CYP153A_{M.aq} und dessen Varianten als auch die Fusionskonstrukte CYP153A_{M.aq}-CYP102A1CPR (M.aq-CPR), und CYP153A_{M.aq}-CYP116B2Rhf (M.aq-Rhf) und CYP153A_{M.aq}-CYP116B3PFOR (M.aq-PFOR) in pET28a(+) verwendet. Das Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CYP116B3PFOR (M.aq-PFOR) und dessen Varianten wurde in verschiedenen Plasmiden (pBAD33, pCWori, pDHE) verwendet. Dabei wurden das Plasmid pCWori freundlicherweise von Prof. Dr. U. Zanger und pDHE von Dr. Michael Breuer, BASF zur Verfügung gestellt. Das Gen FadL wurde in pBAD18 kloniert. Die Gene CamA und CamB wurden in das Plasmid petDuet-1 kloniert, das freundlicherweise von Hendrik Schewe, Dechema zur Verfügung gestellt wurde.

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

ITB Nr	Plasmid	Relevante Gene	Referenz
	pET28a(+)		Novagen, Madison, US-WI
	pT7		Universität Hohenheim, Tabor und Richardson, 1985
pITB1242	pBAD18	PuO- <i>Re</i>	Phillip Scheller, Uni Stuttgart, Deutschland
pITB1236	pBAD33	R-IRED- <i>Sr</i>	Phillip Scheller, Uni Stuttgart, Deutschland
	pCWori pDHE		Prof. Dr. U. Zanger Dr. Michael Breuer, BASF
pITB1556	petDuet-1		Hendrik Schewe, Dechema
	pColaDuet	M.aq-CPR	Sumire Honda Malca, Uni Stuttgart, Deutschland
	pColaDuet	M.aq-CPR, AlkL	Sumire Honda Malca, Uni Stuttgart, Deutschland
pITB1382	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L1	diese Arbeit
pITB1383	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L2	diese Arbeit
pITB1384	pET28a(+)	M.aq(G307A)-PFOR(imp) L2	diese Arbeit
pITB1385	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) wt	diese Arbeit
pITB1386	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L3	diese Arbeit
pITB1387	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L4	diese Arbeit
pITB1388	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L5	diese Arbeit
pITB1389	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L6	diese Arbeit
pITB1390	pET28a(+)	M.aq-PFOR(imp) L7	diese Arbeit
pITB1391	pBAD33	M.aq-PFOR(imp) L2	diese Arbeit
pITB1392	pBAD33	M.aq(G307A)-PFOR(imp) L2	diese Arbeit
pITB1393	pBAD33	M.aq-PFOR(imp) wt	diese Arbeit
pITB1394	pBAD33	M.aq-PFOR(imp) L3	diese Arbeit
pITB1395	pBAD33	M.aq-PFOR(imp) L6	diese Arbeit
pITB1396	pDHE	M.aq-PFOR(imp) L2	diese Arbeit

Material und Methoden

pITB1397	pDHE	M.aq(G307A)- PFOR(imp) L2	diese Arbeit
pITB1398	pDHE	M.aq-PFOR(imp) wt	diese Arbeit
pITB1399	pDHE	M.aq-PFOR(imp) L3	diese Arbeit
pITB1400	pDHE	M.aq-PFOR(imp) L6	diese Arbeit
pITB1401	pCWori	M.aq(G307A)- PFOR(imp) L2	diese Arbeit
pITB1416	pBAD18	FadL	diese Arbeit
pITB1556	pETDuet-1	CamACamB	diese Arbeit
pITB1402	pET28a(+)	M.aqP135A	diese Arbeit
pITB1403	pET28a(+)	M.aqP135L	diese Arbeit
pITB1404	pET28a(+)	M.aqP135E	diese Arbeit
pITB1405	pET28a(+)	M.aqQ129R	diese Arbeit
pITB1406	pET28a(+)	M.aqQ129E	diese Arbeit
pITB1407	pET28a(+)	M.aqQ129L	diese Arbeit
pITB1408	pET28a(+)	M.aqQ129A	diese Arbeit
pITB1409	pET28a(+)	M.aqL139Q	diese Arbeit
pITB1410	pET28a(+)	M.aqL139A	diese Arbeit
pITB1411	pET28a(+)	M.aqL139E	diese Arbeit
pITB1412	pET28a(+)	M.aqL139R	diese Arbeit
pITB1413	pET28a(+)	M.aqR227A	diese Arbeit
pITB1414	pET28a(+)	M.aqG230A	diese Arbeit
pITB1415	pET28a(+)	M.aqA231G	diese Arbeit
pITB1543	pET28a(+)	M.aqI131A	diese Arbeit
pITB1544	pET28a(+)	M.aqI131L	diese Arbeit
pITB1545	pET28a(+)	M.aqI131E	diese Arbeit
pITB1546	pET28a(+)	M.aqI131Q	diese Arbeit
pITB1547	pET28a(+)	M.aqM228L	diese Arbeit
pITB1557	pET28a(+)	M.aqS140A	diese Arbeit
pITB1559	pET28a(+)	M.aqS140R	diese Arbeit
pITB1558	pET28a(+)	M.aqS140E	diese Arbeit
pITB1560	pET28a(+)	M.aqV141A	diese Arbeit
pITB1561	pET28a(+)	M.aqV141R	diese Arbeit
pITB1562	pET28a(+)	M.aqV141E	diese Arbeit

pITB1563	pET28a(+)	M.aqE142A	diese Arbeit
pITB1564	pET28a(+)	M.aqE142R	diese Arbeit
pITB1565	pET28a(+)	M.aqM143A	diese Arbeit
pITB1566	pET28a(+)	M.aqM143R	diese Arbeit
pITB1567	pET28a(+)	M.aqM143E	diese Arbeit
pITB1568	pET28a(+)	M.aqE242A	diese Arbeit
pITB1569	pET28a(+)	M.aqE242R	diese Arbeit
pITB1570	pET28a(+)	M.aqM228A	diese Arbeit
pITB1571	pET28a(+)	M.aqM228R	diese Arbeit
pITB1572	pET28a(+)	M.aqM228E	diese Arbeit
pITB1573	pET28a(+)	M.aqA229R	diese Arbeit
pITB1574	pET28a(+)	M.aqA229E	diese Arbeit
pITB1575	pET28a(+)	M.aqM245A	diese Arbeit
pITB1576	pET28a(+)	M.aqM245R	diese Arbeit
pITB1577	pET28a(+)	M.aqM245E	diese Arbeit
pITB1578	pET28a(+)	M.aqP136A	diese Arbeit
pITB1579	pET28a(+)	M.aqP136R	diese Arbeit
pITB1580	pET28a(+)	M.aqP136E	diese Arbeit
pITB1581	pET28a(+)	M.aqD242A	diese Arbeit
pITB1582	pET28a(+)	M.aqD242R	diese Arbeit
pITB1583	pET28a(+)	M.aqD242E	diese Arbeit
pITB1584	pET28a(+)	M.aqA231R	diese Arbeit
	pET28a(+)	M.aqA231E	diese Arbeit
	pET28a(+)	M.aqS233G	diese Arbeit
	pET28a(+)	M.aqA229G	diese Arbeit
pITB1585	pET28a(+)	M.aqE142A/S140R	diese Arbeit
pITB1586	pET28a(+)	M.aqA231R/S140R	diese Arbeit
pITB1587	pET28a(+)	M.aqQ129R/S140R	diese Arbeit
pITB1588	pET28a(+)	M.aqS140R/P135A	diese Arbeit
pITB1589	pET28a(+)	M.aqS140R/A231G	diese Arbeit
pITB1590	pET28a(+)	M.aqS140R/G307A	diese Arbeit
pITB1591	pET28a(+)	M.aqS140R/D241A	diese Arbeit
pITB1592	pET28a(+)	M.aqS140R/M245A	diese Arbeit

Material und Methoden

pITB1593	pET28a(+)	M.aqA231R/E142A	diese Arbeit
pITB1594	pET28a(+)	M.aqQ129R/E142A	diese Arbeit
pITB1595	pET28a(+)	M.aqA231G/E142A	diese Arbeit
pITB1596	pET28a(+)	M.aqP135A/E142A	diese Arbeit
pITB1597	pET28a(+)	M.aqG307A/E142A	diese Arbeit
pITB1598	pET28a(+)	M.aqD241A/E142A	diese Arbeit
pITB1599	pET28a(+)	M.aqM245A/E142A	diese Arbeit
pITB1600	pET28a(+)	M.aqQ129R/A231R	diese Arbeit
pITB1601	pET28a(+)	M.aqA231R/P135A	diese Arbeit
pITB1602	pET28a(+)	M.aqD242A/A231G	diese Arbeit
pITB1603	pET28a(+)	M.aqM245A/A231G	diese Arbeit
pITB1604	pET28a(+)	M.aqD242A/P135A	diese Arbeit
pITB1605	pET28a(+)	M.aqM245A/P135A	diese Arbeit
pITB1606	pET28a(+)	M.aqD242A/G307A	diese Arbeit
pITB1607	pET28a(+)	M.aqM245A/G307A	diese Arbeit
pITB1608	pET28a(+)	M.aqM245A/D242A	diese Arbeit
pITB1609	pET28a(+)	M.aqS140E/G307A	diese Arbeit
pITB1610	pET28a(+)	M.aqQ129A/G307A	diese Arbeit
pITB1611	pET28a(+)	M.aqQ129A/E142A	diese Arbeit
pITB1612	pET28a(+)	M.aqS140E/E142A	diese Arbeit
pITB1613	pET28a(+)	M.aqA231G/S233G	diese Arbeit
pITB1550	pET28a(+)	M.aqQ129R/G307A	diese Arbeit
pITB1551	pET28a(+)	M.aqQ129R/A231G	diese Arbeit
pITB1552	pET28a(+)	M.aqP135A/A231G	diese Arbeit
pITB1553	pET28a(+)	M.aqQ129R/P135A	diese Arbeit
pITB1554	pET28a(+)	M.aqPFORL2_Q129R	diese Arbeit

Für die in Tabelle 3 dargestellten Varianten wurden in dieser Arbeit synthetische Oligonukleotide (Primer) designt. Die Herstellung dieser Primer erfolgte durch Metabion international AG, Martinsried DE). Alle Primer für die ortsgerichtete Mutagenese und Linkererweiterung bzw. -verkürzung (Diplomarbeit Sara Semenowitsch) sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Primer für die Klonierungsarbeiten sind in Tabelle 5 und für die DNA-Sequenzierung in Tabelle 6 aufgelistet. Die Primer wurden mit ddH₂O bei 60°C für 10 min auf eine Endkonzentration von 0,1 µmol*µL⁻¹ gelöst und auf eine Arbeitskonzentration von 0,01 µmol*µL⁻¹ verdünnt.

Die Sequenzierung der Varianten, die durch die Verwendung der folgenden Oligonukleotide erhalten wurden, wurde durch GATC Biotech AG, Konstanz, Germany durchgeführt.

Tabelle 4 Primer für die ortsgerichtete Mutagenese. Die Nukleotidsequenzen für die vorwärts (fwd) bzw. rückwärts (rev) laufenden Primer sind in 5'- nach -3' notiert

Mutation	Primer fwd	Primer rev
P135A	CAAATCATTCTCGGTGACGCTCCGG AGGGGCTG	CAGCCCCTCCGGAGCGTCACCGA GAATGATTTG
P135L	CAAATCATTCTCGGTGACCTTCCGG AGGGGCTG	CAGCCCCTCCGGAAGGTCACCGA GAATGATTTG
P135E	CAAATCATTCTCGGTGACGAACCGG AGGGGCTG	CAGCCCCTCCGGTTCGTCACCGA GAATGATTTG
Q129R	CTGTTTTCCGCCGAGCCGCGTATCA TTCTCGGTGAC	GTCACCGAGAATGATACGCGGC TCGGCGGAAAACAG
Q129E	GTTTTCCGCCGAGCCGAAATCATT CTCGGTGA	TCACCGAGAATGATTTCCGGCT CGGCGGAAAAC
Q129L	CTGTTTTCCGCCGAGCCGCTGATCA TTCTCGGTGAC	GTCACCGAGAATGATCAGCGGC TCGGCGGAAAACAG
Q129A	GTTTTCCGCCGAGCCGCAATCATT CTCGGTG	CACCGAGAATGATTGCCGGCTC GGCGGAAAAC
L139Q	CTCCGGAGGGGCAGTCGGTGGAAAT GTTCATA	TATGAACATTTCCACCGACTGCC CCTCCGGA
L139A	CTCCGGAGGGGGCGTCGGTGGAAAT GTTCATA	TATGAACATTTCCACCGACGCCC CCTCCGGA
L139E	CTCCGGAGGGGGAGTCGGTGGAAAT GTTCATA	TATGAACATTTCCACCGACTCCC CCTCCGGAGGGTCA
L139R	CCTCCGGAGGGGGCGTTCGGTGGAAA TGTTTCATA	TGAACATTTCCACCGAACGCCCC TCCGGA
R227A	TTGAGTGGTCGGACGCAATGGCAGG TGCAGCAT	ATGCTGCACCTGCCATTGCGTCC GACCACTCAA
G230A	TCGGACAGAATGGCAGCTGCAGCAT CGGCCAC	GTGGCCGATGCTGCAGCTGCCA TTCTGTCCGA

A231G	ACAGAATGGCAGGTGGTGCATCGGC CACCG	CGGTGGCCGATGCACCACCTGCC ATTCTGT
I131A	AGCCGCAAATCGCTCTCGGTGACCC TCCGGA	TCCGGAGGGTCACCGAGAGCGA TTTGCGGCT
I131L	AGCCGCAAATCCTGCTCGGTGACCC TCCGGA	TCCGGAGGGTCACCGAGCAGGA TTTGCGGCT
I131E	AGCCGCAAATCGAACTCGGTGACCC TCCGGA	TCCGGAGGGTCACCGAGTTCGA TTTGCGGCT
I131Q	AGCCGCAAATCCAGCTCGGTGACCC TCCGGA	TCCGGAGGGTCACCGAGCTGGA TTTGCGGCT
M228L	TGAGTGGTTCGGACAGACTGGCAGGT GCAGCAT	ATGCTGCACCTGCCAGTCTGTCC GACCACTCA
S140A	TCCGGAGGGGCTGGCGGTGGAAATG TTCAT	ATGAACATTTCCACCGCCAGCCC CTCCGGA
S140R	CTCCGGAGGGGCTGCGTGTGGAAAT GTTCATAG	CGCTATGAACATTTCCACACGC AGCCCCCTCCGGA
S140E	CTCCGGAGGGGCTGGAGGTGGAAAT GTTCATAG	CGCTATGAACATTTCCACGAGC AGCCCCCTCCGGA
V141A	CCGGAGGGGCTGTTCGGCGGAAATGT TCATAGC	GCTATGAACATTTCCGCCGACA GCCCCCTCCGG
V141R	CCGGAGGGGCTGTTCGGTGAATGT TCATAGC	GCTATGAACATTTCCACGCGACA GCCCCCTCCGG
V141E	CCGGAGGGGCTGTTCGGAAGAAATGT TCATAGC	GCTATGAACATTTCTTCCGACA GCCCCCTCCGG
E142A	AGGGGCTGTTCGGTGGCAATGTTCAT AGCGATGG	CCATCGCTATGAACATTGCCACC GACAGCCCCT
E142R	AGGGGCTGTTCGGTGCATGTTCAT AGCGATGG	CCATCGCTATGAACATACGCACC GACAGCCCCT
M143A	GGCTGTTCGGTGGAAAGCGTTCATAGC GATGGATC	GATCCATCGCTATGAACGCTTCC ACCGACAGCC
M143R	GGCTGTTCGGTGGAAAGTTCATAGC GATGGATC	GATCCATCGCTATGAAACGTTCC CACCGACAGCC
M143E	GGCTGTTCGGTGGAAAGTTCATAGC GATGGATC	GATCCATCGCTATGAACTCTTCC ACCGACAGCC
E242A	GGGGAGTTTGCCGATGCAAATGCCA TGTTTGAC	GTCAAACATGGCATTTCATCG GCAAACCTCCCC
E242R	GGGGAGTTTGCCGATCGTAATGCCA TGTTTGAC	GTCAAACATGGCATTACGATCG GCAAACCTCCCC
M228A	GAGTGGTTCGGACAGAGCGGCAGGTG CAGCATCG	CGATGCTGCACCTGCCGCTCTGT CCGACCACTC
M228R	GAGTGGTTCGGACAGACGTGCAGGTG CAGCATCG	CGATGCTGCACCTGCACGTCTGT CCGACCACTC
M228E	GAGTGGTTCGGACAGAGGCAGGTG CAGCATCG	CGATGCTGCACCTGCCTCTCTGT CCGACCACTC
A229R	GTGGTTCGGACAGAATGCGTGGTGCA GCATCGGC	GCCGATGCTGCACCACGCATTCT GTCCGACCAC

A229E	GTGGTCGGACAGAATGGAAGGTGCA GCATCGGC	GCCGATGCTGCACCTTCCATTCT GTCCGACCAC
M245A	CCGATGAAAATGCCGCGTTTGACGA CGCGGCAG	CTGCCGCGTCGTCAAACgGCGGC ATTTTCATCGG
M245R	CCGATGAAAATGCCCGTTTTGACGA CGCGGCAG	CTGCCGCGTCGTCAAACGGGC ATTTTCATCGG
M245E	CCGATGAAAATGCCGAGTTTGACGA CGCGGCAG	CTGCCGCGTCGTCAAACCTCGGCA TTTTTCATCGG
P136A	CATTCTCGGTGACCCTGCGGAGGGG CTGTCCGGT	ACCGACAGCCCCTCCGCAGGGTC ACCGAGAATG
P136R	CATTCTCGGTGACCCTCGTGAGGGG CTGTCCGGT	ACCGACAGCCCCTCACGAGGGTC ACCGAGAATG
P136E	CATTCTCGGTGACCCTGAGGAGGGG CTGTCCGGT	ACCGACAGCCCCTCCTCAGGGTC ACCGAGAATG
D241A	GGGGAGTTTGCCGCAGAAAATGCCA TGTTTGAC	GTCAAACATGGCATTTTTCTGCG GCAAACCTCCCC
D241R	GGGGAGTTTGCCCGTGAAAATGCCA TGTTTGAC	GTCAAACATGGCATTTTTCACGG GCAAACCTCCCC
D241E	GGGGAGTTTGCCGAAGAAAATGCCA TGTTTGAC	GTCAAACATGGCATTTTTCTTCG GCAAACCTCCCC
A231R	GACAGAATGGCAGGTCGTGCATCGG CCACCGGC	GCCGGTGGCCGATGCACGACCT GCCATTCTGTC
A231E	GACAGAATGGCAGGTGAAGCATCGG CCACCGGC	GCCGGTGGCCGATGCTTCACCTG CCATTCTGTC
E142A/ S140R	CCTCCGGAGGGGCTGCGTGTGGCAA TGTTTCATAGCGATGGATC	CCATCGCTATGAACATTGCCAC ACGCAGCCCCTCCGGAGGGTCAC
M245A/ D242A	GGAGTTTGCCGCAGAAAATGCCGCG TTTGACGACGC	GCGTCGTCAAACGCGGCATTTT CTGCCGCAAACCTCC
S233G	GAATGGCAGGTGCAGCAGGCGCCAC CGGCGGGGAGTTTG	CAAACCTCCCCGCCGGTGGCGCCT GCTGCACCTGCCATTC
S140E/ E142A	CTCCGGAGGGGCTGGAGGTGGCAAT GTTTCATAGCGATGG	GCGGATCCATCGCTATGAACAT TGCCACCTCCAGCCCCTCCGG
A231G/ S233G	GGACAGAATGGCAGGTGGCGCAGGC GCCACCGGCGGGGAGTTTG	GCAAACCTCCCCGCCGGTGGCGCC TGCGCCACCTGCCATTCTGTCC
A229G	GGTCCGACAGAATGGGTGGTGCAGC ATCG	CGATGCTGCACCACCATTCTGT CCGACC

Tabelle 5 Primer für Klonierungsarbeiten. Die Nukleotidsequenzen sind in 5'- nach -3' Richtung notiert.

FadL in pBAD18

SaH_NcoIampliFadL	CGACTGACCATGGATGGTCATGAGCCAGAAAACC
SaH_XbaIampliFadL	GACTGCGGACTCTAGATCAGAACGCGTAGTTAAAG

Gibson Assembly CamA und CamB in petDuet

SaH_CamBGibs_fwd	actttaagaaggagatatacATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTC
SaH_CamBGibs_rev	aagcttgtcgTTACCATTGCCTATCGGG
SaH_ZwGibs1_fwd	gcaatggtaaCGACAAGCTTGCGGCCGC
	ttcggttcatTGCCATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAAC
SaH_ZwGibs1_rev	TAATATACTAAGATGGG
SaH_CamAGibs_fwd	acatatggcaATGAACGCAAACGACAAC
SaH_CamAGibs_rev	caaggggttatgctagtattgcTCAGGCACTACTCAGTTC

Tabelle 6 Primer für die DNA Sequenzierung. Die Nukleotidsequenzen sind in 5'- nach -3' Richtung notiert.

SaS_Maq_fwd	GCC AAC ACT GCC CAG AAC ATT TGA CGA C
SaS_CPR_rev	CGC GTG CTT CGT GCA CTG CC
SaS_Linkers_Ampli_fwd	GAT CGC AAG GAC GCA CGA AAC CAC
pT7 reverse Primer	CGC TGA GAT AGG TGC CTC AC
<u>GATC Biotech AG Primer</u>	
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG
pBAD-FP	ATGCCATAGCATT TTTTATCC
pGL3-1	GAGCTGACTGGGTTGAAG
pBR3	TCCCCATCGGTGATGTC

2.1.6 Kulturmedien

Für die Kultivierung wurde standardmäßig LB-Medium eingesetzt. Zur Selektion wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Durch die Zugabe von 1,8 % Agar-Agar vor dem Autoklavieren und entsprechendes Abfüllen in Petrischalen wurde festes Nährmedium in Form von LB-Agarplatten erhalten. Für die Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium wurden Erlenmeyerkolben mit 10% ihres Gesamtvolumens befüllt, um eine ausreichende Zufuhr von Sauerstoff zu gewährleisten. Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium angeimpft.

LB Medium

10	g	Trypton
5	g	Hefeextrakt
5	g	NaCl
1000	mL	H ₂ O

TB Medium

10	g	Trypton
20	g	Hefeextrakt
3,33	mL	86 % Glycerin
1000	mL	H ₂ O

Nach dem Autoklavieren wurde steriler 10 x KPi Puffer zu einem Zehntel des Mediums hinzugegeben.

10 x KPi

23,1	g	KH ₂ PO ₄
125,4	g	K ₂ HPO ₄
1000	mL	H ₂ O

M9-Minimalmedium

40	mL	M9 Salze (autoklaviert)
4	mL	20 % Glycerin (autoklaviert)
0,4	mL	1 M MgSO ₄ (steril filtriert)
0,02	mL	1 M CaCl ₂ (steril filtriert)
156	mL	H ₂ O (in Kolben autoklaviert)

M9 Salze

33,9	mL	Na ₂ HPO ₄
15	g	KH ₂ PO ₄
2,5	g	NaCl
6	g	NH ₄ Cl
1000	mL	H ₂ O

TSS-Medium

12,5	g	LB
50	g	10 % PEG (Polyethylenglycol MW 3350)
25	mL	5 % DMSO
3,1	g	30 mM MgCl ₂ *6H ₂ O
500	mL	Ad H ₂ O

Der pH auf 6,5 mit Salzsäure eingestellt.

2.1.7 Puffer

TfBI Puffer

0,59	g	KOAc
2,42	g	RbCl
0,29	g	CaCl ₂
2,0	g	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
30	mL	Glycerin
200	mL	H ₂ O

Der pH auf 5,8 mit Essigsäure eingestellt und steril filtriert.

TfBII Puffer

0,21	g	MOPS
0,12	g	RbCl
1,1	g	CaCl ₂
15	mL	Glycerin
100	mL	H ₂ O

Der pH wurde auf 6,5 mit Natronlauge eingestellt und steril filtriert.

100 mM Kaliumphosphat Puffer (KPi)

80,2	mL	1 M K ₂ HPO ₄
19,8	mL	1 M KH ₂ PO ₄
1	L	Ad H ₂ O

His-Tag Binding Puffer

Tris/HCl pH 7,4

His-Tag Wash Puffer

Tris/HCl pH 7,4, 5 mM Imidazol

His-Tag Elution Puffer

Tris/HCl pH 7,4, 300 mM Imidazol

50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer

242	g	Tris
57	mL	Essigsäure
100	mL	0,5 M EDTA
1	L	Ad H ₂ O

Der pH auf 8,0 mit Natronlauge eingestellt

SDS-Elektrodenpuffer

30	g	Tris
144	g	Glycerin
10	g	SDS
2	L	Ad H ₂ O

SDS-Probenpuffer

500	mM	Tris/HCl pH 6,8
10 %	(v/v)	Glycerin
20 %	(v/v)	SDS
2 %	(v/v)	B-Mercaptoethanol
0,05 %	(v/v)	Bromphenolblau

SDS-Entfärbelösung

300	mL	Methanol oder Ethanol
100	mL	Essigsäure
1	L	Ad H ₂ O

SDS Färbelösung

100	mL	SDS-Entfärbelösung
250	mg	Coomassie Brilliant Blue

Orange DNA Loading Buffer

2	g	Saccharose
10	mg	OrangeG
5	mL	Ad H ₂ O

2.1.8 Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert

Kanamycin	30 mg in 1 mL H ₂ O
Ampicillin	100 mg in 1 mL H ₂ O
Chloramphenicol	34 mg in 1 mL Ethanol
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M in H ₂ O
5-Aminolävulinsäure	1 M in H ₂ O
dNTP Mix	2,5 mM dATP/dGTP/dCTP/dTTP in H ₂ O

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Amplifikation von Genen

Die Gene wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit entsprechenden Primern vervielfältigt worden. Dabei wurde ein 25 µl Ansatz nach folgender Zusammensetzung verwendet.

X	µL	Plasmid (50 ng DNA)
5	µL	Pfu Buffer
Y	µL	H ₂ O
1	µL	dNTPs
2	µL	Primer fwd
2	µL	Primer rev
0,5	µL	Pfu Polymerase

Im Thermocycler wurde die PCR mit folgendem Programm durchgeführt.

Denaturation initial	95°C	2 min
Denaturation	95°C	30 s
Annealing	T _M -15°C	30 s
Extension	75°C	x min
Final Extension	75°C	1 min
Hold	8°C	forever

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Extension wurden 30 x wiederholt. Das PCR Programm variierte in den Annealingtemperaturen, je nach verwendetem Primer. Die Extensionszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der eingesetzten Polymerase.

2.2.1.2 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau erfolgte im 30 µL Maßstab nach dem jeweiligen Protokoll für die entsprechende Restriktionsendonuklease von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.2.1.3 Ligation

Ligation von DNA Fragmenten erfolgte im 20 µL Maßstab nach dem Protokoll für T4 Ligase von Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.2.1.4 Isolation von DNA Fragmenten

Zur analytischen oder präparativen Trennung von DNA wurden die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt. Dabei wurden 50 mL 0,7 % Agarosegel in 1 x TAE Puffer mit 5 µL GelRed zur Anfärbung der DNA versetzt. Die Proben wurden mit 6-fachem Ladepuffer versetzt und nach Aushärtung des Gels in die Probenaschen eingefüllt. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 120 mV für 45 min. Unter UV Licht konnte das Gel ausgewertet werden und die gewünschten Gelfragmente bei Bedarf ausgeschnitten werden. Die Reinigung erfolgte unter Abwandlung des Protokolls des Gel DNA Recovery Kits von Zymoclean. Wobei die DNA mit warmen Wasser eluiert wurde.

2.2.1.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese in CYP153AM.aq wurde mittels QuikChange® Site-directed Mutagenesis durchgeführt und ist in „Structure-Guided Redesign of CYP153AM.aq for the Improved Terminal Hydroxylation of Fatty Acids“ S. M. Hoffmann, H.-R. Danesh-Azari, C. Spandolf, M. J. Weissenborn, G. Grogan, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 3234 – 3239 beschrieben.

2.2.1.6 Linkererweiterung bzw. -verkürzung

Die molekularbiologische Linkererweiterung bzw. -verkürzung vom Fusionskonstrukt CYP153AM.aq-PFOR in „The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling.” S. M. Hoffmann[‡], M. J. Weissenborn[‡], Ł. Gricman, S. Notonier, J. Pleiss, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 1591–1597 beschrieben.

2.2.1.7 Gibson Assembly

Gibson Assembly wurde für die Konstruktion der Reduktasepartner CamA und CamB in den Duetvektor pETDuet-1 verwendet. Die Gene wurden dafür mittels PCR vervielfältigt. Die PCR Produkte wurden mittels DNA Purification Kit (Zymo) gereinigt und mit dem linearisierten pET-Duet Vektor gemischt. Das Gibson Assembly erfolgte wie in der Literatur beschrieben im äquimolaren Verhältnis der DNA Fragmente.^[115-117] Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde ein Kontrollverdau (siehe 2.2.1.2) durchgeführt und das gewünschte DNA Fragment mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.4) nachgewiesen. Der generierte Duetvektor wurde in chemisch kompetente *E.coli* DH5 α Zellen transformiert.

2.2.1.8 Isolierung von Plasmid DNA aus Zellen

Plasmid DNA wurde aus Zellen unter Abwandlung des Protokolls des MiniPrep Kits von ZymoResearch isoliert. Wobei die Plasmid DNA mit warmen Wasser eluiert wurde. Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop bestimmt.

2.2.1.9 Colony PCR

Eine erfolgreiche Ligation (siehe 2.2.1.3) wurde über Colony PCR nachgewiesen. Dabei wurde eine PCR (siehe 2.2.1.1) durchgeführt mit dem Ersetzen des Templats durch eine Kolonie, die nach Transformation (siehe 2.2.2.2) auf LB-Agar gewachsen ist. Eine erfolgreiche Insertion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.4) nachgewiesen.

2.2.1.10 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von GATC Biotech AG, Konstanz, Germany durchgeführt. Dabei wurde eine Probe von mind. 20 μ L mit einer Mindestkonzentration von 30 ng $\cdot\mu$ L⁻¹ mit in 2.1.5 aufgelisteten Oligonukleotiden sequenziert

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

Herstellung transformationskompetenter *E.coli* TG10+ Zellen

100 ml LB Medium wurde 1:100 mit einer Übernacht (ÜN) Kolonie angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 bis 0,8 kultiviert. Die Kultur wurde in sterile 50 ml Falcons zur Ernte überführt (10 min 4000*g, 4°C). Das Pellet wurde in 5 mL TSS Medium resuspendiert. In sterile Eppendorf Tubes wurden 25 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Transformation wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

Herstellung sonstige transformationskompetenter *E.coli*

100 ml LB Medium wurde mit einer Übernacht (ÜN) Kolonie auf OD₆₀₀ 0,05 angeimpft und bei 37°C kultiviert. Bei OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur 5 min auf Eis inkubiert und in sterile 50 mL Falcons zur Ernte überführt (10 min 4000*g, 4°C). Das Pellet wurde in insgesamt 40 mL TfbI-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis bis zur erneuten Pelletierung (10 min 4000*g, 4°C) inkubiert. Das Pellet wurde in insgesamt 5 mL TfbII-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. In sterile Eppendorf Tubes wurden 25 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Transformation wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen

Bei -80°C gelagerte chemisch kompetente Zellen (siehe 2.2.2.1) wurden zum Auftauen für 30 min auf Eis gestellt und die zu transformierende DNA auf die noch gefrorenen Zellen gegeben. Von gereinigter Plasmid-DNA wurde je 1 µL DNA, die direkt aus molekularbiologischen Arbeiten stammt, wurden je 3 µL verwendet. Der Hitzeschock erfolgte für 45 s bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 800 µL steriles LB-Medium (RT) hinzugegeben wurde. Zur Regenerierung wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50 µL der Zellsuspension auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um eine höhere Zelldichte zu erreichen wurden die Zellen zuvor 1 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, 750 µL Medium abgenommen und das Pellet in den restlichen 50 µL resuspendiert und ausplattiert.

2.2.2.3 Kultivierung und Stammhaltung von *E.coli*-Zellen

Eine langfristige Lagerung von *E.coli*-Zellen erfolgte in Glycerolstocks. Dabei wurden 900 μL der Kultur in LB Medium in 300 μL 20% Glycerin bei -80°C gelagert.

2.2.2.4 Heterologe Proteinexpression

Für jede Proteinexpression in *E.coli* wurde vor jeder Kultivierung das entsprechende Plasmid in chemisch kompetente *E.coli* Zellen transformiert (siehe 2.2.2.2). Eine Kolonie wurde zum Animpfen eines Kulturröhrchens mit 5 mL LB Medium und entsprechendem Antibiotikum verwendet. Nach Inkubation über Nacht wurden 2 mL dieser Vorkultur für die Kultivierung im 400 mL Medium Ansatz verwendet. Diese Zellen wurden bei 37°C und 180 rpm kultiviert bis sie eine Zelldichte von OD_{600} von 0,8 – 1,0 erreichten. Nach einer Induktion mit dem entsprechenden Induktor wurden die Zellen zur heterologen Proteinexpression bei 25°C und 180 rpm über Nacht angeregt. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei $10\,000 \times g$, 20 min, 4°C .

2.2.2.5 Zellaufschluss

Zur Isolierung der Enzyme von Zellen wurden diese mit Ultraschall am Sonifier aufgeschlossen. Dabei wurde die Zellkultur zum Schutz der Proteine auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei $37\,000 \times g$, 30 min 4°C abzentrifugiert. Die löslichen Proteine wurden dabei im Überstand (Lysat) erhalten.

2.2.2.6 Proteinreinigung

Die Reinigung der Proteine mit His-tag erfolgte durch eine Talon-Säule. Die Reinigung basiert dabei auf der Bindung der Histidine des Proteins, die an einem Terminus des rekombinanten Proteins liegen, mit dem immobilisierten Cobalt in der Säule. Dazu wurde die Säule zunächst mit Bindepuffer äquilibriert, dann das Lysat aufgetragen. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit Bindepuffer von der Säule gewaschen. Mit 5 mL 100 mM TrisHCl 300 mM Imidazol wurde das gebundene Protein eluiert und dabei die Proben in 1 mL Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurden die Proteine in 50 mM KPi umgepuffert.

Als alternatives Reinigungsprinzip wurde die Ionenaustauschchromatographie eingesetzt, bei der Proteine aufgrund ihrer unterschiedlich starken Affinität zu den geladenen funktionellen Gruppen der Säule getrennt werden. Es wurde ein Anionenaustausch, vollständig maschinell am ÄktaPurifier, mit einer Säule des Typs Toyopearls DEAE 650 M durchgeführt. Dabei waren die Proteine in 50 mM KPi (wenn nicht anders erwähnt, pH=7,4) gelöst. Zur Elution wurde die Salzkonzentration über einen Gradienten bis 1 M NaCl erhöht. Dabei wurde ständig die Absorption des Eluats bei verschiedenen Wellenlängen gemessen, um das gesuchte Protein zu detektieren. Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und über Nacht durch Dialyse in 50 mM KPi umgepuffert, um die Salze der Elutionslösung zu entfernen.

2.2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei einem bekannten Molekulargewicht eines Proteins, kann dieses in Proteingemischen durch eine SDS-PAGE nachgewiesen werden. Diese Methode wurde Bestimmung des Reinigungserfolgs der Reduktasepartner verwendet.

Gelvorbereitung

Zwischen zwei Glasplatten wurden ca. 6 mL 15 % Trenngellösung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das überschüssige Isopropanol mit Filterpapier abgenommen. Auf das Trenngel wurden ca. 3 mL der 5 % Sammelgellösung gegossen und eine Probenkamm eingesetzt. Dieser wurde nach der Polymerisation des Gels wieder entfernt. Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Elektrodenpuffer befüllt.

Probenvorbereitung

Die Proben sowie ein Proteinstandard wurden mit einfachem Volumen 2 x SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Vor dem Auftragen wurden diese abgekühlt und gut durchmischt.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte in einer Apparatur ohne Wasserkühlung. Durch die Diskontinuität bezüglich der pH Werte im Sammel- und Trenngel wurden die Proteine an der Trenngelfront für eine verbesserte Auftrennung aufkonzentriert. Dafür erfolgte die Elektrophorese ca. 20 min bei 15 mA pro Gel. Anschließend erfolgte die Proteintrennung bei 30 mA pro Gel mit konstanter elektrischer Spannung für ca. 45 min.

Zur Färbung der Proteinbanden wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese von den Glasplatten gelöst. Durch Inkubation über Nacht in SDS-Färbelösung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die Entfärbung erfolgte ebenfalls über Nacht in SDS-Entfärbelösung.

5 % Sammelgel (2 Minigele 10 x 10 cm) 6 mL

	H ₂ O	3,85	mL	
1 M	Tris/HCl, pH 6,8	750	μL	0,125 M
20 %	SDS	30	μL	0,1 %
40 %	Acrylamid Mix 29:1	750	μL	5 %
10 %	APS	60	μL	0,1 %
	TEMED	8	μL	

15 % Trenngel (2 Minigele 10 x 10 cm) 12 mL

	H ₂ O	4,25	mL	
1 M	Tris/HCl, pH 8,8	3,0	mL	0,375 M
20 %	SDS	60	μL	0,1 %
40 %	Acrylamid Mix 29:1	4,5	mL	15 %
10 %	APS	120	μL	0,1 %
	TEMED	6,8	μL	

2.2.2.8 Bestimmung der P450 Konzentration

Aufgrund des Absorptionsmaxima bei 450 nm des Kohlenmonooxid (CO) gebundenen Cytochroms kann die Konzentration von P450 Enzymen in einem Proteingemisch mit der CO-Differenzspektroskopie nach Omura und Sato^[118, 119] bestimmt werden. Dabei wurde eine geeignete Verdünnung der Proteinlösung zur Reduzierung des Eisens im Häm mit einer Natriumdithionitlösung (0,375 g in 10 mL 50 mM Kpi Puffer pH 7,4), die zuvor für 15 min mit CO begast wurde versetzt und zur Herstellung der Referenzprobe mit einer unbegasten Natriumdithionitlösung versetzt. Die Vermessung erfolgte im Ultrospec 3100pro Spectrophotometer, GE Healthcare, Freiburg, Germany in einem Wellenbereich von 400 – 500 nm. Dabei wurde das für Cytochrom P450 typische CO-Differenzspektrum mit einem Maximum bei 450 nm und einem Minimum bei 490 nm aufgenommen. Anhand dieser Werte wurde die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

Die Konzentration des in der Probe enthaltenen P450 kann demnach mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden:

Formel1: Lambert-Beer'sches Gesetz zur Berechnung der P450 Konzentration

$$C[\mu\text{M}] = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{450-490} * d} * 1000 * D$$

c (P450)	Konzentration
$A_{450} - A_{490}$	Differenz der Absorptionswerte bei 420 und 490 nm
D	Verdünnungsfaktor
$\epsilon_{450-490}$	Extinktionskoeffizient ($91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)

2.2.2.9 Stabilitätsanalyse

Die Stabilitätsanalyse von P450 Fusionskonstrukten erfolgte nach dem Prinzip der CO-Differenzspektroskopie nach Omura und Sato mit der Abwandlung der Reduktion des Häm Eisens. Die Durchführung ist in "The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling." [S. M. Hoffmann](#)[‡], M. J. Weissenborn[‡], Ł. Gricman, S. Notonier, J. Pleiss, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 1591–1597 beschrieben.

2.2.2.10 Kopplungseffizienz

Die Bestimmung der Kopplungseffizienz (Coupling efficiency) von P450 Fusionskonstrukten ist in "The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling." S. M. Hoffmann[‡], M. J. Weissenborn[‡], Ł. Gricman, S. Notonier, J. Pleiss, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 1591–1597 beschrieben.

2.2.2.11 In vitro Aktivitätstest

In vitro Biotransformationen mit P450 Fusionskonstrukten ist in "The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling." S. M. Hoffmann[‡], M. J. Weissenborn[‡], Ł. Gricman, S. Notonier, J. Pleiss, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 1591–1597 beschrieben. *In vitro* Biotransformationen mit CYP153AM.aq und gereinigten Reduktasen ist in „Structure-Guided Redesign of CYP153AM.aq for the Improved Terminal Hydroxylation of Fatty Acids“ S. M. Hoffmann, H.-R. Danesh-Azari, C. Spandolf, M. J. Weissenborn, G. Grogan, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 3234 – 3239 beschrieben.

2.2.2.12 In vivo Aktivitätstest

Ganzzellumsetzungen (*in vivo*) erfolgten mit lebenden, nicht mehr wachsenden Zellen (resting cells). Dabei wurden die Zellen nach der Proteinexpression (siehe 2.2.2.4) geerntet (15 min bei 8000 x g und 4°C). Das Zellpellet wurde mit 100 mM KPi Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden daraufhin gewogen und auf 100 g_{cww}*L⁻¹ mit 100 mM KPi pH 7,4 verdünnt. 10 mL dieser Zellsuspension wurde mit 10 mL Reaktionspuffer (wenn nicht anders angegeben) nach folgendem Ansatz vereint. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Substrats gestartet.

100 mM	KPi
40 mM	D-Glukose
2 %	Glycerin
30 mg*mL ⁻¹	Kanamycin
100 μM	FeSO ₄

Die Umsetzung erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C statt.

Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen alle 2 h mit 400 µL 1 M D-Glukose und 250 µL 87 % Glycerin gefüttert. In regelmäßigen Abständen (0, 1, 2, 4, 8, 10, 24 Stunden) wurden 150 µL Proben genommen und diese durch die Zugaben von 30 µL 37 % HCl abgestoppt. Bis zur Probenvorbereitung für die Analytik wurden die Proben bei - 20 °C gelagert.

2.2.3 Kristallisation und Datensammlung

Die Kristallisation und Datensammlung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gideon Grogan, University York. Die Durchführung ist aus der Veröffentlichung „Structure-Guided Redesign of CYP153AM.aq for the Improved Terminal Hydroxylation of Fatty Acids“ [S. M. Hoffmann](#), H.-R. Danesh-Azari, C. Spandolf, M. J. Weissenborn, G. Grogan, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 3234 – 3239 zu entnehmen.

2.2.4 Bioinformatische Methoden

2.2.4.1 Identifizierung von Kanälen

CAVER 3.0.1 wurde als PyMOL plugin benutzt. Die Kanalanalyse erfolgte in der Kristallstruktur von CYP153AM.aq und CYP153AP.sp. Der Minimalradius wurde dabei auf 1,2 Å gesetzt. Shell depth und Radius wurden auf 4 bzw. 5 gesetzt. Der Startpunkt für die Kalkulation wurde 2 Å über das Häm-Eisen Atom in Richtung Kanal 2 gesetzt.

2.2.4.2 MD Simulationen

Die MD Simulationen erfolgte in Kooperation mit Dr. Maximilian C. C. J. C. Ebert in der Arbeitsgruppe von Joelle N. Pelletier Université de Montréal. Als Startpunkt für die Simulationen mit GROMACS 5.0.6 wurde die Kristallstruktur CYP153A_{M.aq} (pdb code 5FYF) verwendet. Mit MolProbity und PROPKA wurden die Protonierungen und die Orientierung der Histidine überprüft. Die Wassermoleküle wurden vor der Simulation entfernt. Das Protein wurde in eine TIP3P Wasserbox mit kubisch-periodischen Randbedingungen eingebettet. Hierbei wurde eine Entfernung von 10 Å zwischen den Grenzflächen und dem Protein eingehalten. Die Gesamtladung des Proteins wurde mit 50 mM NaCl neutralisiert. Für die Energieminimierung und MD Simulation wurde das Kraftfeld AMBER99SB-ILDN und die Häm Definition des nicht oxygenierten Status

nach Shahrokh et al. genutzt. Hierbei wurde die Häm Definition von dem ursprünglichen AMBER Format in das AMBER Format von GROMACS gewandelt, um die Kraftfeld Definition zu erweitern. Der LINear Constraint Solver (LINCS) Algorithmus wurde auf alle Wasserstoff Molekül enthaltenden Bindungen angewandt. Jede ps wurde eine Momentaufnahme (*frame*) in eine XTC Trajektorie geschrieben. Zusätzlich wurden alle 100 ps eine TRR Trajektorie geschrieben. Der Nose-Hoover Thermostat und Barostat wurden für das Einhalten einer konstanten Temperatur von 304.65 K und einem Druck von 1 bar im System genutzt. Die elektrostatischen Interaktionen wurden mittels der particle-mesh Ewald Methode analysiert. Lennard-Jones Interaktionen wurden mit einer Grenze von 1,2 nm untersucht. Jedes System wurde mit dem Sollwert von kleiner als $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ mit der Steepest Descent Methode in Triplikaten energieminiert. Zur Equilibrierung wurde das System für 2 ns dem NVT Ensemble ausgesetzt um die Temperatur allmählich von 10 K auf 304.65 K zu steigern. EIN 10 ns NPT Ensemble wurde generiert um einen durchschnittlichen Druck von 1 bar zu erreichen. So wurden drei 10 ns Produktionstrajektorien für die ILS Kalkulationen generiert.

2.2.4.3 *Implicit Ligand Sampling (ILS) Berechnungen*

Die MD Simulationen mit ILS Berechnung erfolgte in Kooperation mit Dr. Maximilian C. C. J. C. Ebert in der Arbeitsgruppe von Joelle N. Pelletier Université de Montréal. Die Durchführung ist aus der Veröffentlichung „Evolution of P450 Monooxygenases toward Formation of Transient Channels and Exclusion of Nonproductive Gases“ M. C. C. J. C. Ebert, S. L. Dürr, A. A. Houle, G. Lamoureux, J. N. Pelletier *ACSCatal* 2016, 6, 7426 – 7437 bzw. in „Analysis of substrate spectrum by computational and experimental characterization of substrate channels“ S. M. Hoffmann, M. C. C. J. C. Ebert, J. N. Pelletier, B. Hauer (Manuscript in preparation) zu entnehmen

2.2.4.4 *Adaptive biasing force (ABF) Berechnung*

Die MD Simulationen mit ABF Berechnung erfolgte in Kooperation mit Dr. Maximilian C. C. J. C. Ebert in der Arbeitsgruppe von Joelle N. Pelletier Université de Montréal. Die Durchführung ist aus der Veröffentlichung „Rapid substrate-specific screening for mutational hotspots using biased molecular dynamics simulations“ M. C. C. J. C. Ebert, Guillaume Lamoureux, J. N. Pelletier *ACSCatal* 2017, 7, (just accepted)

2.2.5 Chemisch-analytische Methoden

Gaschromatographische Analytik von Fettsäuren, Hydroxyfettsäuren und Disäuren

Die Probenaufarbeitung und Analytik von Dodecan- und Hexadecansäure ist aus „Structure-Guided Redesign of CYP153AM.aq for the Improved Terminal Hydroxylation of Fatty Acids“ S. M. Hoffmann, H.-R. Danesh-Azari, C. Spandolf, M. J. Weissenborn, G. Grogan, B. Hauer *ChemCatChem* 2016, 8, 3234 – 3239 zu entnehmen. Die Probenaufarbeitung von Oktansäure, Hydroxyoktansäure und Octandisäure erfolgte, wie für Dodecan- und Hexadecansäure beschrieben. Für die Analytik wurde dasselbe Programm, wie für die Detektion von Dodecansäure verwendet.

Gaschromatographische Analytik von Alkanen, Alkoholen und Diolen

Die Probenaufarbeitung erfolgte durch zweimaliges extrahieren mit MTBE. Die organische Phase wurde dabei gesammelt. Als Standard für die Oktandetektion diente Dodecan. Als Standard für die Dodecandetektion diente Octan. Zur Analyse wurden die Proben am GC/FID mit einer HP1-MS UI Säule mit folgendem Programm analysiert. Die Starttemperatur von 60°C wurde über 3 min gehalten und danach mit 50°C/min bis 320°C erhöht, welche über 2 min gehalten wurde. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl.

Gaschromatographische Analytik von Aminen und Hydroxyaminen

Die Probenaufarbeitung erfolgte durch zweimalige alkalische Extraktion mit MTBE. Die organische Phase wurde dabei gesammelt. Zur Derivatisierung wurde Trifluoressigäureanhydrid zur organischen Phase gegeben. Als Standard diente Undecylamin. Zur Analyse wurden die Proben am GC/FID mit einer ZB5 Säule mit folgendem Programm analysiert. Die Starttemperatur von 150°C wurde über 1 min gehalten und danach mit 10°C/min bis 250°C erhöht. Weiterhin wurde mit 65°C/min auf eine Temperatur von 310°C erhöht, welche über 2 min gehalten wurde. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl.

3 Ergebnisse

Mit dem Ziel die Aktivität, Stabilität und Produktivität einer P450 katalysierten terminalen Hydroxylierung von Fettsäuren zu optimieren, wurden in dieser Arbeit Studien zur Identifizierung von Potentialen durchgeführt. Diese wurden unterteilt in Analysen des Ganzzellsystems, in dem die Reaktion stattfinden sollte und Analysen des P450 Enzyms. Hierbei wurde vorerst ein geeignetes P450 Enzym gewählt, das die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren katalysiert. Dieses wurde in den weiteren Studien in der Fusion mit verschiedenen Reduktasepartnern auf die Elektronenübertragung analysiert. Die in diesen Studien verwendeten gesättigten Fettsäuren als Substrate als auch mögliche Hydroxylierungsprodukte sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 9).

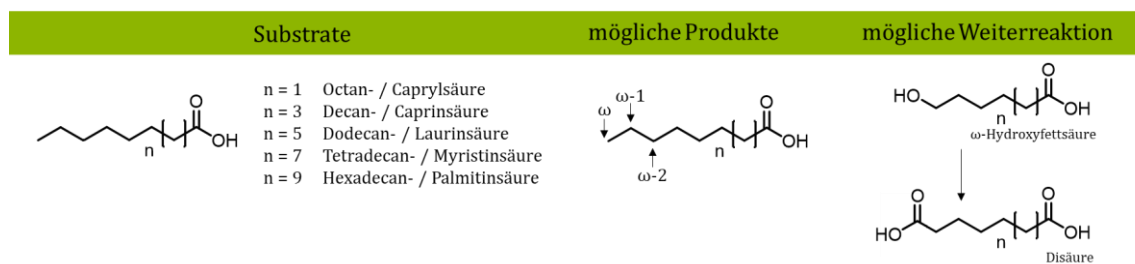


Abbildung 9 Eingesetzte Fettsäuren als Substrate und mögliche Hydroxylierungsprodukte in der Katalyse mittels getesteter P450 Enzyme

Weiterhin wurde auch die katalytisch aktive Häm-domäne untersucht. Für den Einsatz im Ganzzellsystem wurde sowohl die Expression und Aktivität sichergestellt, als auch Potentiale zur Verbesserung der zu katalysierenden Reaktion untersucht.

3.1 Studien zur Optimierung einer P450-Fusionsenzym katalysierten Reaktion auf dem Enzymlevel

Für die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren sollte zu Beginn ein geeigneter Katalysator gefunden werden. In der Bachelorarbeit von Tim Hierlemann, die im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde, wurden 17 natürlich vorkommende P450 Fusionsenzyme gegenüber Fettsäuren auf die Aktivität und Selektivität getestet. Diese Fusionsenzyme wurden von Prozomix auf Grund der Ähnlichkeit zu der Fettsäurehydroxylase CYP102A1BM3 ausgewählt, welches bisher das mit einem k_{cat} von 17000 min^{-1} für Arachidonsäure das heute aktivste P450 Enzym darstellt.^[77]

Jahrelange Untersuchungen dieses Enzyms blieben erfolglos in der Entwicklung einer Selektivität für die Hydroxylierung ausschließlich an der terminalen Position. Deshalb ist eine Analyse von verwandten Enzymen des CYP102A1BM3 in dem Fall von Interesse. Die 17 homologen Fusionsenzyme wurden von der Firma Prozomix identifiziert und wurden im Rahmen des BIOOX Projekt als Lyophilisat für eine genaue Analyse bereitgestellt. Informationen zu der Herkunft und den Gensequenzen der Enzyme wurde von Prozomix nicht preisgegeben.

Für vergleichbare Reaktionsbedingungen wurde die P450 Konzentration der Lyophilisate mittel CO Differenz Spektrum bestimmt. Die P450 Konzentration variiert zwischen den 17 Lyophilisaten sehr stark. Dabei konnte in Probe 1 nur 0.126 μM P450 detektiert werden. Für eine vergleichbare Aktivitätsmessung wurden deshalb alle Proben auf eine Konzentration von 0.126 μM P450 normiert. Für einen ersten Aktivitätstest wurden die Enzyme gegenüber den 3 verschiedenen langen gesättigten Fettsäuren Decan- Tertadecan- und Hexadecansäure getestet. Dabei konnten für Enzym 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12 und 13 für alle Substrate über 10 % Umsatz detektiert werden. Für die kürzerkettige Fettsäure Decansäure konnten Enzym 5 und 16 identifiziert werden. Für die längerkettige Hexadecansäure wurden Enzym 14 und 15 identifiziert. Enzym 2 und 7 zeigten generell sehr geringe Aktivität und nur eine Aktivität < 10 %:

Tabelle 7 Umsätze der getesteten Prozomix Enzyme 1 -17 gegenüber drei Fettsäuren.

- \triangleq 0 % Umsatz; + \triangleq <10 % Umsatz; ++ \triangleq >10 % Umsatz

Enzyme	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
C ₁₀	++	-	++	++	++	++	-	++	+	++	+	++	++	+	+	++	+
C ₁₄	++	+	++	++	+	++	-	++	+	++	+	++	++	+	++	+	++
C ₁₆	++	-	++	++	-	++	+	++	+	++	+	++	++	++	++	+	+

Die Analyse der Produkte zeigte, dass mit keinem der Enzyme das terminale Hydroxylierungsprodukt gebildet werden konnte (Abbildung 10). Bis auf die Umsetzung von Decansäure mit Enzym 9 und 11 und der Umsetzung von Hexadecansäure mit Enzym 11 sind Gemische von Hydroxylierungsprodukten an der subterminalen (ω -1), (ω -2) und (ω -3) detektiert worden.

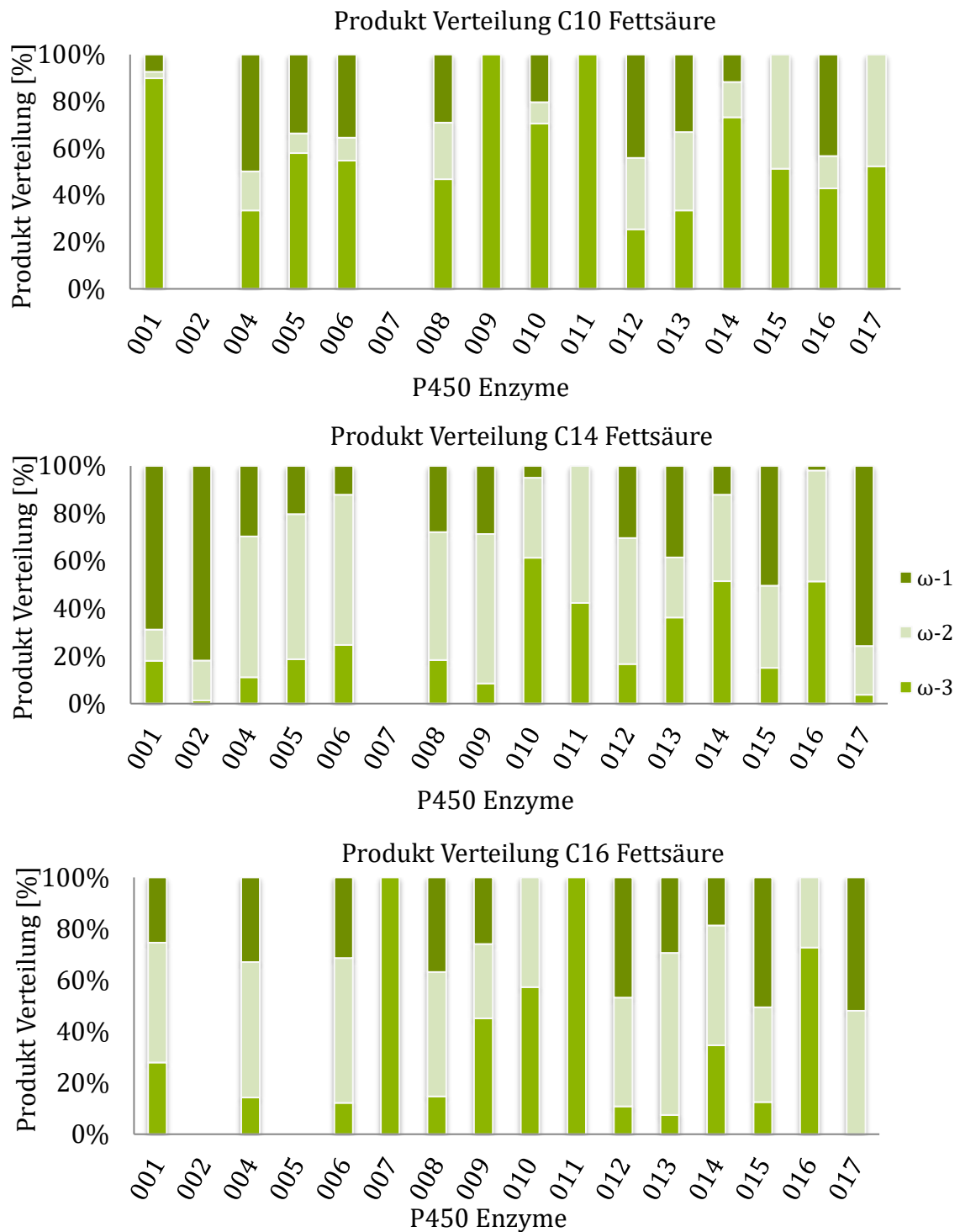


Abbildung 10 Identifizierte Produkt Verteilungen der 17 Proximix Enzyme bei der Umsetzung von C10, C14 und C16 Fettsäuren.

In Vorarbeiten von Dr. Sumire Honda Malca konnte ein P450 Enzym aus *Marinobacter aquaeolei* für die selektive ω -Hydroxylierung von Fettsäuren identifiziert werden.^[100] Dabei konnte in *in vitro* Reaktionen mit 0,2 mM Substrat eine Selektivität für die terminale Position von über 95 % für ein Substratspektrum von C8 bis C12 gesättigten Fettsäuren nachgewiesen werden (Abbildung 11). Über 60 % - 80 % Umsatz nach 4 Stunden sind für die mittelkettigen Fettsäuren Dodecan- bis Tetradecansäure detektiert worden.

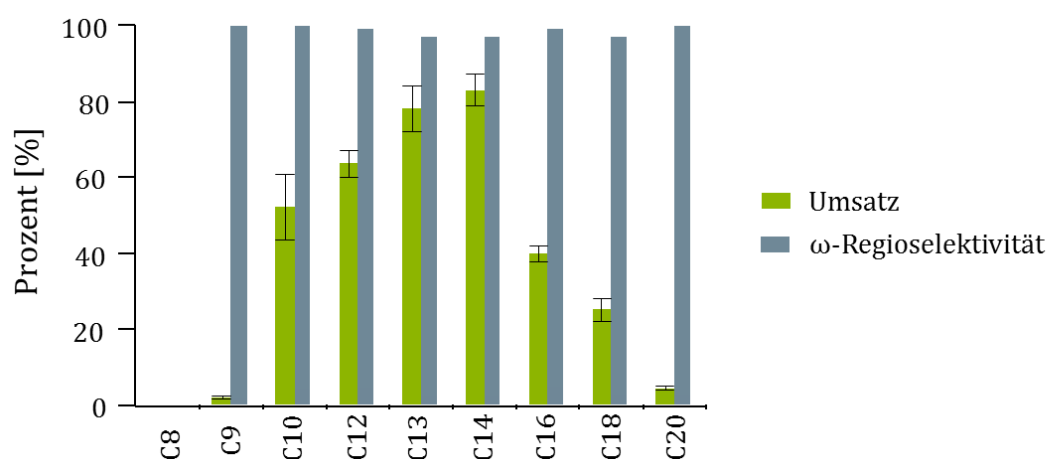


Abbildung 11 *In vitro* Umsatz (grün) und Selektivität für die terminale Position (grau) nach 4 h mittels CYP153A aus *Marinobacter aquaeolei* gegenüber 0,2 mM gesättigten Fettsäuren mit Kettenlänge von acht bis 20 Kohlenstoffen.^[100]

Dieses Enzym wurde auf Grund dieser einzigartigen Eigenschaften für die weiteren Arbeiten als Studienobjekt gewählt. Dabei wurde in den folgenden Studien die katalytisch aktive Hämdomäne im Detail untersucht, als auch das Enzym als artifizielles Fusionskonstrukt analysiert.

3.1.1 Analysen der katalytisch aktiven Häm-domäne

3.1.1.1 Aufklärung der Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq}

Diese Ergebnisse sind Teil der Publikation III, die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht wurde.

Zur Identifizierung von Positionen in der Häm-domäne zur Optimierung der Aktivität wurde die Kristallstruktur in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York gelöst. Hierbei wurde die Röntgenstrukturanalyse von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Gideon Grogan durchgeführt. Hierfür wurde vorerst ein geeignetes Reinigungsprotokoll erstellt (Abbildung 49). P450_{pyr} (PDB code 3RWL) wurde mit dem Programm DALI als nächste strukturelle homologe Struktur bestimmt. Es weist eine Sequenzidentität von 54 % zu CYP153A_{M.aq} auf und einen Z-score von 53,5. Weiterhin konnte ein RMSD (root mean-square deviation; Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung) von 2 Å zwischen 3RWL und *M.aq* bestimmt werden. Somit war die gesamte Sequenz von *M.aq* Bestandteil der Kristallisation durch molekularen Ersatz. Die Reste 1 – 53 waren in der Elektronendichte nicht sichtbar und konnten auch nicht modelliert werden.

Es gelang die Proteinstruktur in zwei Formen zu bestimmen. Als offene Form mit Häm in der aktiven Tasche und als Protein-Ligand Komplex mit Häm und dem Produkt ω-Hydroxydodecanäure. Diese wurden unter dem PDB code 5fyf und 5fyg

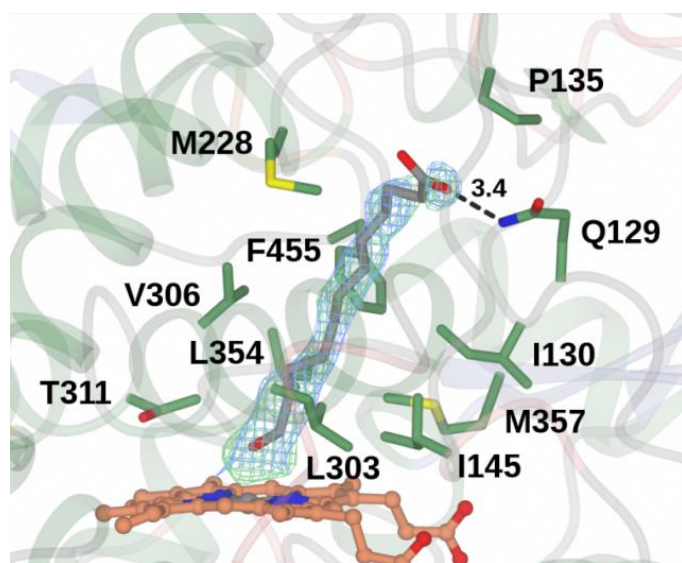


Abbildung 12 Elektronendichte für den Liganden ω-Hydroxydodecanäure in hydrophoben Tunnel im Proteininneren von CYP153A_{M.aq}.¹

veröffentlicht.^[120] Dabei wurde der Kristall mit der Ligandenlösung ω-Hydroxydodecanäure eingeweicht (soaking).

In der Elektronendichtekarte, welche unter Nichtberücksichtigung eines Teils des Modells berechnet wurde (omit map), konnte eine kontinuierliche Elektronendichte detektiert werden. Diese konnte als ω-Hydroxydodecanäure in

zwei Konformationen modelliert werden. Die Auflösung von 2,2 Å erlaubte sowohl eine Koordination der Hydroxygruppe als auch der Carboxygruppe des Liganden zum Häm-Eisen. Der Ligand wurde in beiden Orientierung unter Verwendung der gleichen omit map präzisiert. Unter Berücksichtigung der B-Faktoren konnte die Koordination der Hydroxygruppe zum Häm-Eisen als wahrscheinlichste Form angenommen werden (Abbildung 12). Die lange Alkylkette liegt dabei im Inneren der Proteinstruktur in einem hydrophoben Tunnel, der durch die Aminosäureseitenketten L303, I145, A229, M357, I131, T302, G307, T311, F455 und M228 gebildet wird. Die Carboxygruppe liegt 2,2 Å vom Häm-Eisen entfernt.

Die Gesamtstruktur von CYP153A_{M.aq}, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde, weist einige strukturelle Merkmale auf, die sich gegenüber dem zu Beginn dieser Studie verwendeten Homologiemodell und auch bisher bekannten P450 Strukturen unterscheiden. Diese Merkmale beziehen sich maßgeblich auf die Strukturelemente G-Helix, F-Helix, FG-Loop und BC-Loop. Diese werden im Folgenden erläutert.

Geometrie der Bindetasche

Die aktive Tasche ähnelt einem Trichter, der im oberen Bereich einen weiteren Durchmesser aufweist und in Richtung Häm enger wird (Abbildung 13A). Ein Durchmesser von 9 Å wurde über dem Häm durch die Aminosäureseitenketten G307-M357; I145-T311; L303-L354 (markiert in magenta) bestimmt. Im oberen Bereich des Trichters wurde ein Durchmesser von 12 Å anhand der Aminosäureseitenketten T302-F455; M143-A229; T302-I131 (markiert in orange) bestimmt. Die Gesamtlänge der aktiven Tasche von Häm-Eisen bis zur Seitenkette von P136 (in grün) befasst 20 Å. Die F-Helix (gebildet durch die Aminosäureseitenketten von 225-233) begrenzt die Tasche, weshalb bis A229 eine Distanz von 13 Å gemessen wurde. Durch die Kristallstruktur, die komplexiert ist mit dem Produkt ω-Hydroxydodecanäure wird klar, dass dieser trichterförmige Aufbau der aktiven Tasche maßgeblich zur Selektivität für die terminale Position beiträgt. Die terminale Position der langen Alkylkette der Fettsäure ist direkt über dem katalytisch aktiven Häm positioniert. Bedingt durch den trichterförmigen Aufbau ist eine Positionierung von subterminalen Positionen über dem Häm nicht möglich, was die Hydroxylierung an der terminalen Position bevorzugt.

In vorangegangenen Studien erfolgten Mutationen im unteren Bereich des Trichters. Mit diesen Varianten konnte eine Verringerung der ω -Selektivität detektiert werden.^[100] Die Produktverteilung beim Umsatz von Nonansäure mit der Variante L354 belief sich auf 76 % der (ω -1)-Hydroxy Nonansäure ((ω -1)-OHFA) wohingegen mit dem Wildtyp 97,5 % der ω -Hydroxy Nonansäure und nur 2,5% der (ω -1)-OHFA gebildet wird. Diese Auswirkung kann in dieser Studie mit Hilfe der Kristallstruktur und einer *in silico* Dockingstudie nachgewiesen werden (Abbildung 13B). Durch die Änderung des Durchmessers im unteren Trichterbereich kann der Ligand keine lineare Konformation in der aktiven Tasche einnehmen. Lediglich eine geknickte Konformation des Liganden in der aktiven Tasche kann modelliert werden, wobei die subterminale Position des Liganden dem Häm-Eisen am nächsten positioniert ist.

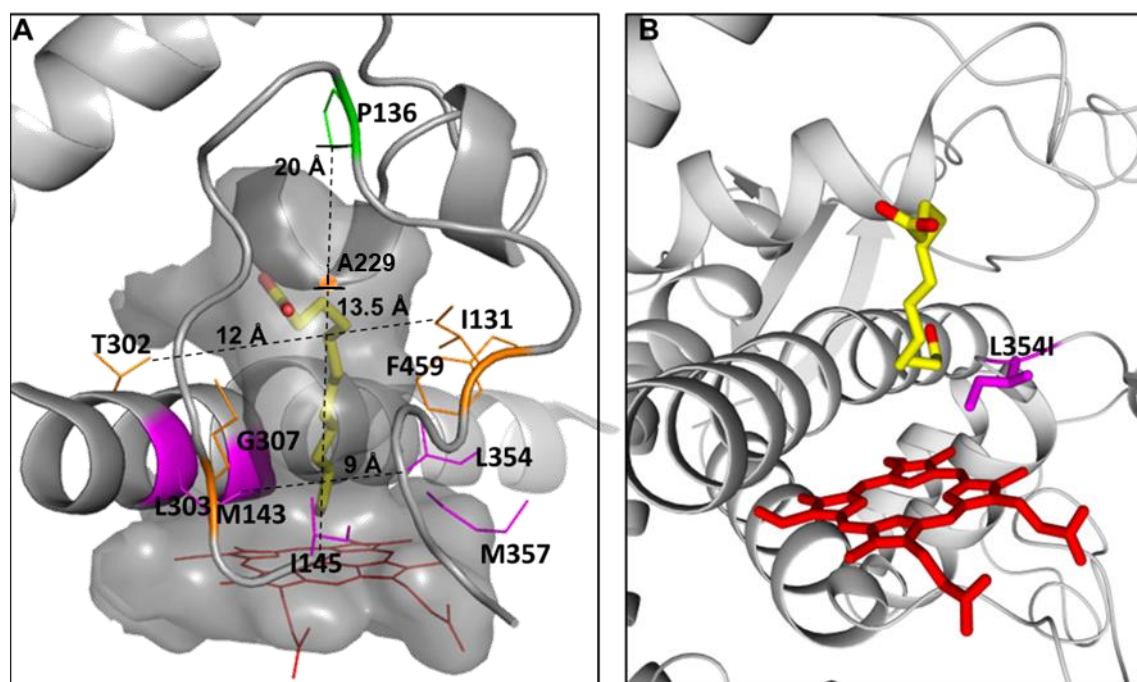


Abbildung 13 A: Geometrie der aktiven Tasche von CYP153A_{M.aq} mit gebundenem Liganden ω -Hydroxydodecansäure. Abstände sind in Å angegeben und als gestrichelte Linien dargestellt. Die Geometrie der Tasche (graue Kavität) ähnelt einem Trichter mit einer Länge von Häm-Eisen (rot) bis P136 (grün), von 20 Å bis zur F-Helix 13,5 Å. Der Durchmesser der aktiven Tasche direkt über dem Häm befasst 9 Å (bemessen anhand der Aminosäureseitenketten markiert in magenta (G307 - M357, I145 - T311; L303 - L354)). Der Durchmesser im oberen Bereich der aktiven Tasche 12 Å ergibt sich durch die Aminosäureseitenketten markiert in orange (T302-F459; M143-A229; T302-I131). Zur Übersicht sind nicht alle Seitenketten dargestellt. **B:** Darstellung der Dockingstudie von ω -Hydroxydodecansäure in die *in silico* Variante von CYP153A_{M.aq} L354I.¹

BC-Loop

Die Aminosäureseitenketten von A126 bis I145 bilden den BC-Loop in CYP15A_{M.aq}. Im Vergleich zu der generellen P450 Struktur^[66] und auch zu anderen P450 Fettsäurehydroxylasen, wie CYP102A1^[121] ist zwischen B- und C-Helix der BC-Loop durch eine B'-Helix unterbrochen. Diese ist in der Struktur von CYP15A_{M.aq} nicht vorhanden. Dieser Loop ist im Gegensatz zu den Loops in den bisher beschriebenen P450 Enzymen sehr flexibel, was durch die teilweise Abwesenheit der Elektronendichte der Seitenketten von E137 und L139 bestätigt wird. Eine besondere Eigenschaft konnte für die Position 129 des BC-Loops aufgedeckt werden. In dem Kristall, der mit dem Liganden ω -Hydroxydodecanäure komplexiert ist, ist die Amid-Seitenkette des Glutamin 129 in unmittelbarer Nähe zu der Carboxy-Gruppe der Fettsäure. Die Analyse der polaren Wechselwirkungen resultierte in der Aufdeckung einer Wasserstoffbrücke zwischen diesen Resten.

FG-Loop

Der Loop, der sich zwischen F- und G-Helix erstreckt, ist generell für P450 Enzyme für die Substraterkennung beschrieben. In der Struktur von CYP15A_{M.aq} ist dieses

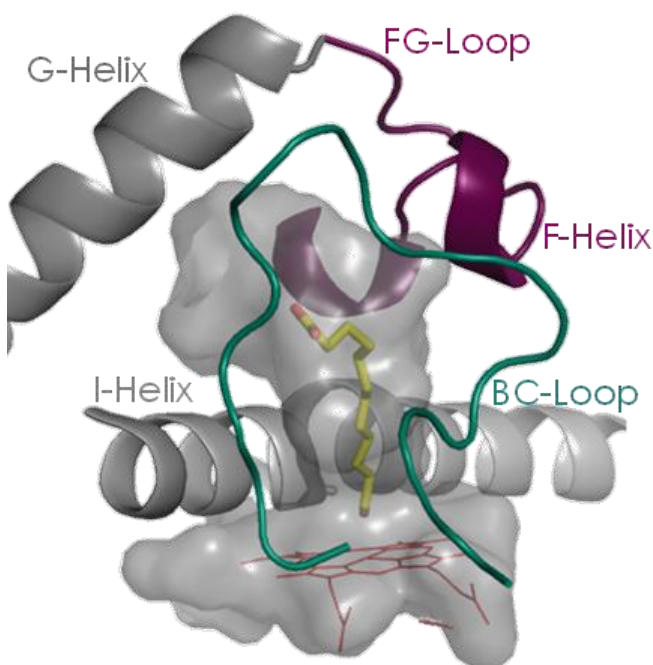


Abbildung 14 Strukturelemente in CYP15A_{M.aq}. Aktive Tasche als Kavität in grau; Ligand: Alkylkette der ω -Hydroxydodecanäure in gelb, Hydroxy- und Carboxygruppen Sauerstoff in rot; FG-Loop und F-Helix in magenta; BC-Loop in türkis.

flexible Strukturelement sehr viel kürzer, als im zuvor konstruierten Homologiemodell und auch als in den bisher aufgeklärten Strukturen anderer P450 Fettsäurehydroxylasen (Abbildung 14).

Durch diese verkürzte Länge ist keine große Beweglichkeit möglich. Weiterhin ist der FG-Loop über einem potentiellen Substrateingang durch die F-Helix abgeschirmt. Somit ist eine Wechselwirkung dieses Loops bei der Substraterkennung, wie sie in der Literatur für P450 Enzyme beschrieben ist, eingeschränkt

F-Helix

Oberhalb des Häms liegt die F-Helix, die in CYP153A_{M.aq} verlängert ist. Ein Sequenzvergleich zu P450 Enzymen aus der gleichen Homologiefamilie (CYP153A_{P.sp}) weist in dieser Region eine Insertion von zwei Aminosäuren auf (Abbildung 48). Diese Insertion in der Aminosäuresequenz führt strukturell zu einer zusätzlichen Windung und Verlängerung der F-Helix. Diese F-Helix führt weiterhin zu einem Abknicken der Alkylkette des Liganden in der aktiven Tasche. Die zusätzliche Windung der F-Helix, die durch die Positionen 230 – 234 gebildet werden, hat einen Abstand von ca. 2,7 Å zu dem BC-Loop. Dieser Bereich ist in vielen P450 Strukturen als Substrateingang beschrieben. Aufgrund der Nähe des BC-Loops zu der F-Helix ist ein Substratzugang an dieser Position in CYP153A_{M.aq} in Frage gestellt worden und wurde an einer anderen Position vermutet. Es wurde angenommen, dass somit eine abweichende Substraterkennung stattfindet. Zur besseren Charakterisierung dieses für die Katalyse wichtigen Ereignisses in CYP153A_{M.aq} wurden in den weiteren Studien die Substratkanäle untersucht.

3.1.1.2 Analyse der Substratkanäle in CYP153A_{M.aq}

Diese Ergebnisse sind Teil der Publikation IV, die im Rahmen dieser Arbeit momentan unter Erstellung ist.

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein Homologiemodell des Enzyms CYP153A_{M.aq} vor. Dieses wurde von Dr. Łukasz Gricman auf CYP153A7 von *Sphingopyxis macrogoltabida* als Templat aufgebaut. Basierend auf diesem wurde ein Substrateingang zwischen FG-Loop, B'-Helix/ BB'-Loop/ B-C-Loop und β 1-Faltblatt vermutet, der wie in den meisten P450 Enzymen wie z.B. CYP102A1_{BM3} einem 2a Kanal entsprechen würde (Nomenklatur des Kanals nach Cojocar *et. al*^[1]). Die strukturellen Besonderheiten, die durch die Analyse der Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq} aufgeklärt wurden, ließen auf eine andere Substrateingangsarchitektur schließen. Deshalb wurde die Kristallstruktur im Rahmen dieser Studie auf Substrateingänge analysiert.

Analyse der Kristallstruktur CYP153A_{M.aq} (PDB 5fyg) mittels Caver 3

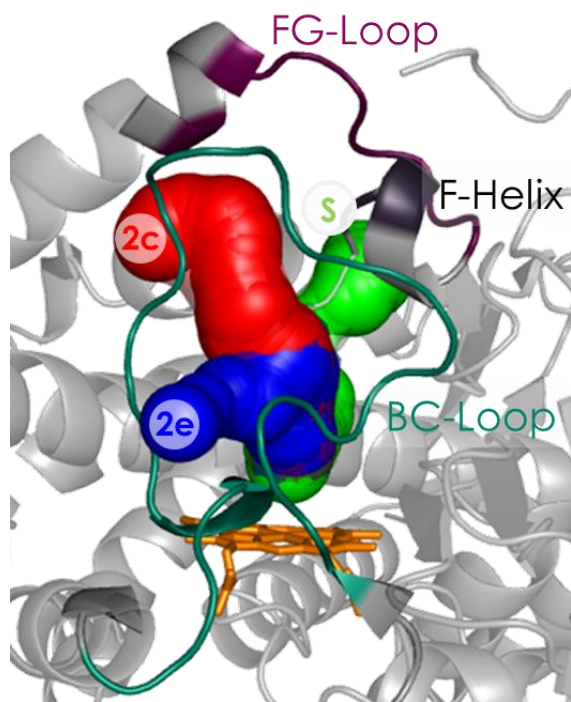


Abbildung 15 Analyse der Kristallstruktur CYP153A_{M.aq}. (PDB 5fyg) mittels CAVER 3.0. Identifiziert wurden Solventkanal (S) in grün; 2e Kanal in blau und 2c Kanal in rot. Die Proteinstruktur ist als grauer Cartoon mit Häm als sticks in orange dargestellt.

Die Kanalanalyse mittels Caver 3.0 erfolgte an der Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq} (PDB 5fyg) mit vorheriger Entfernung des Liganden und aller Wassermoleküle. Die Nomenklatur der Kanäle wurde nach Cojocar *et al.* [1] übernommen. Es wurden ein Solventkanal und zwei Substratkanäle der Klasse 2 identifiziert (Abbildung 15). Diese sind 2c, der zwischen BC-Loop und G-Helix die Öffnung aus der Proteinstruktur aufweist und 2e, der durch den BC-Loop hindurch ragt. Letzterer stellt einen sekundären Substrateingangskanal dar. Die Länge der Kanäle beträgt 20,6 Å für 2c und 18,4 Å für den 2e Kanal. Ein weiterer primärer Substratkanal wie 2a, der in den meisten P450 Enzymen bestimmt wurde, wurde für CYP153A_{M.aq} auch in der ligandenfreien Struktur 5fyf nicht identifiziert.

Analyse von 15 frames einer 300 ns MD Simulation mittels Caver 3

Insbesondere Loop Strukturen sind an der Kanalgeometrie und zu einem signifikanten Anteil an der Ausprägung und Vorkommen der Kanäle in P450 Enzymen beteiligt. Da Loops sehr flexibel sind, kann eine Analyse einer Kristallstruktur nicht alle Kanäle identifizieren. Aus diesem Grund wurde innerhalb eines Studienaufenthalts in Kooperation mit Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joelle Pelletier, Université de Montréal eine molekulardynamische (MD) Simulation über 300 ns aufgesetzt.

Es konnte beobachtet werden, dass im Besonderen der BC-Loop sehr flexibel ist. Am oberen Bereich, indem bei anderen P450 Enzymen eine B'-Helix beschrieben ist, konnte auch in CYP153A_{M.aq} eine sekundäre Strukturformation registriert werden. Eine Bildung einer Helix als auch wieder die Öffnung dieser konnte hier verfolgt werden. Der 2e Kanal durchdringt diesen BC-Loop. Weiterhin ist auch der 2c Kanal durch die Orientierung dieses Loops beeinflusst, weshalb 15 Bilder (frames) dieser Simulation auf die Substratkanäle mittels Caver 3.0 analysiert wurden.

In allen *frames* konnte unverändert zu der Analyse der Kristallstruktur der 2e Kanal (Abbildung 16 blau) als auch der Solventkanal (S) identifiziert werden (Abbildung 16 grün).

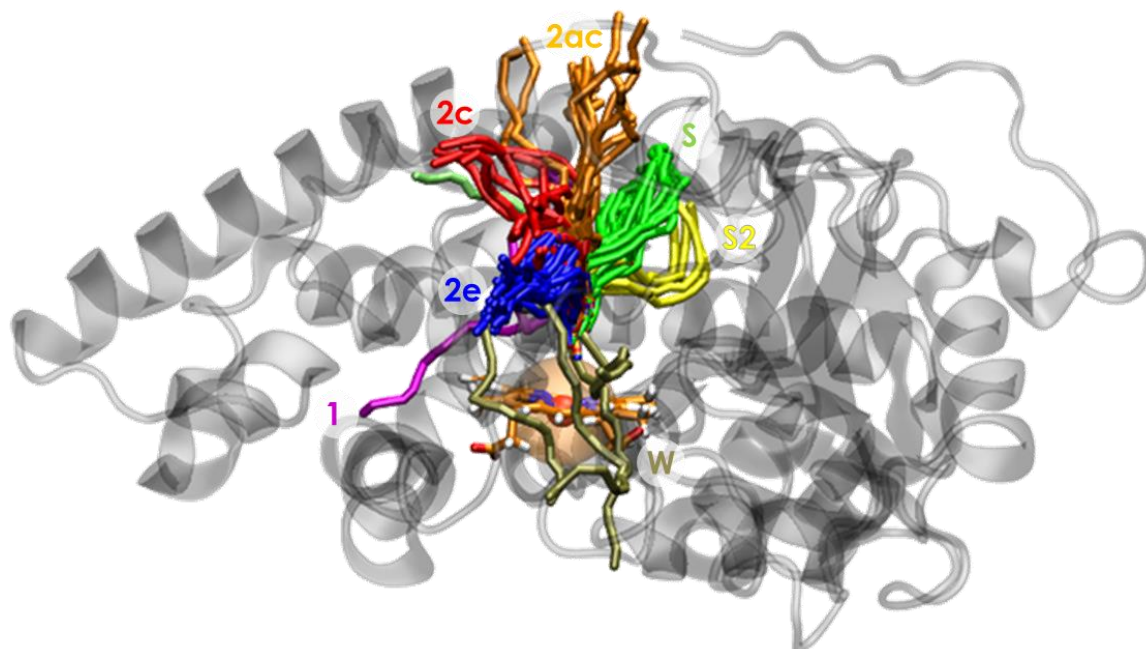


Abbildung 16 Analyse mittels Caver 3.0 einer 300 ns MD Simulation von CYP153A_{M.aq}. Identifizierte Kanäle wurden nach Cojocarú *et al.* [1] geclustert. blau: 2e Kanal; rot: 2c Kanal; orange: 2ac Kanal; grün: solvent Kanal S; gelb: alternativer Solvent Kanal S2; magenta: 1 Kanal; opaque: Wasser Kanal W. Proteinstruktur ist als Cartoon dargestellt das Häm als sticks in orange.

Neben dem beschriebenen Solventkanal (S) nach Cojocarú *et al.* [1] wurde in derselben Region ein weiterer Kanal mit einem leicht geänderten Verlauf detektiert werden. Dieser wurde hier als weiterer Solventkanal (S2) benannt (Abbildung 16 gelb). Weiterhin wurden einige Wasserkanäle (W) und der Kanal 1 identifiziert (Abbildung 16 (W = opaque) (1 = magenta)). Die genaue Bedeutung des Solventkanals und der funktionale Unterschied zwischen Wasser- und Solventkanal ist von Cojocarú *et al.* [1] nicht beschrieben worden und ist heute unbekannt.

Der Substratkanal 2c, der bereits in der Kristallstruktur identifiziert wurde, konnte auch in einigen frames der Simulation festgestellt werden (Abbildung 16 rot). In einigen frames konnte auch ein veränderter Verlauf dieses Kanals mit Öffnung in Richtung N Terminus beobachtet werden. Nach der Nomenklatur nach Cojocaru *et al.* [4] entspricht dieser Kanal einem 2ac Kanal (Abbildung 16 orange).

Die Anzahl der gefundenen Kanäle, also die Häufigkeit gibt Auskunft über die Verfügbarkeit dieser Kanäle für einen Substrateintritt zu der aktiven Tasche des Enzyms. Der Kanal 2e wurde in jedem frame gefunden 2c und 2ac sind nicht in allen frames verfügbar. Zur Überprüfung welcher Kanal als Substrateingangskanal in CYP153A_{M.aq} für Fettsäuren genutzt wird, wurden weitere Analysen durchgeführt. Weiterhin wurde auch geprüft, ob auf diese Weise theoretisch analysiert werden kann, welche weiteren Substrate die Substratkanäle in CYP153A_{M.aq} passieren können.

Implicit Ligand Sampling Analyse

Mit der Implicit Ligand Sampling (ILS) Methode ist es möglich eine 3-dimensionale Migrationsbewegung eines Gasmoleküls zu verfolgen. Somit ist es weiterhin möglich die freien Gibbs'schen Energien an jedem Punkt zu bestimmen und so die Energie Querformate von Kanälen aufzuzeichnen. Neben dem reinen Kanalverlauf, wie mit Caver können so auch potentielle Energiebarrieren bestimmt werden. Weiterhin erlaubt diese Methode nicht nur die Detektion von Kanälen, sondern auch die Beobachtung von wahrscheinlichen Regionen mit hoher Gasbelegung. Verwendet wurde für diese Analyse eine gasförmige Probe (O₂) versehen mit einer geometrischen und einer Van-der Waals Definition.

Die schematische Darstellung dieser Analyse ist in Abbildung 17 dargestellt. Der Durchmesser entlang der Kanäle entspricht der freien Gibbs'schen Energie von Sauerstoff. Je dünner der Kanal umso höher ist die Energiebarriere.

Dies wird besonders in Kanal 1 sichtbar. Hier ist eine besonders hohe Energiebarriere für O₂ detektiert worden. Auch in Kanal 2ac kann eine hohe Energiebarriere detektiert werden. Die bisher bekannten Kanäle 2e, 2c und S sind für O₂ gut passierbar wie auch die Kanäle 3 und 4, die nur mittels dieser Methode identifiziert wurden. Aufgrund der Hydrophobizität von O₂ kann diese Analyse in Ansätzen auch für weitere hydrophobe Liganden transferiert werden.

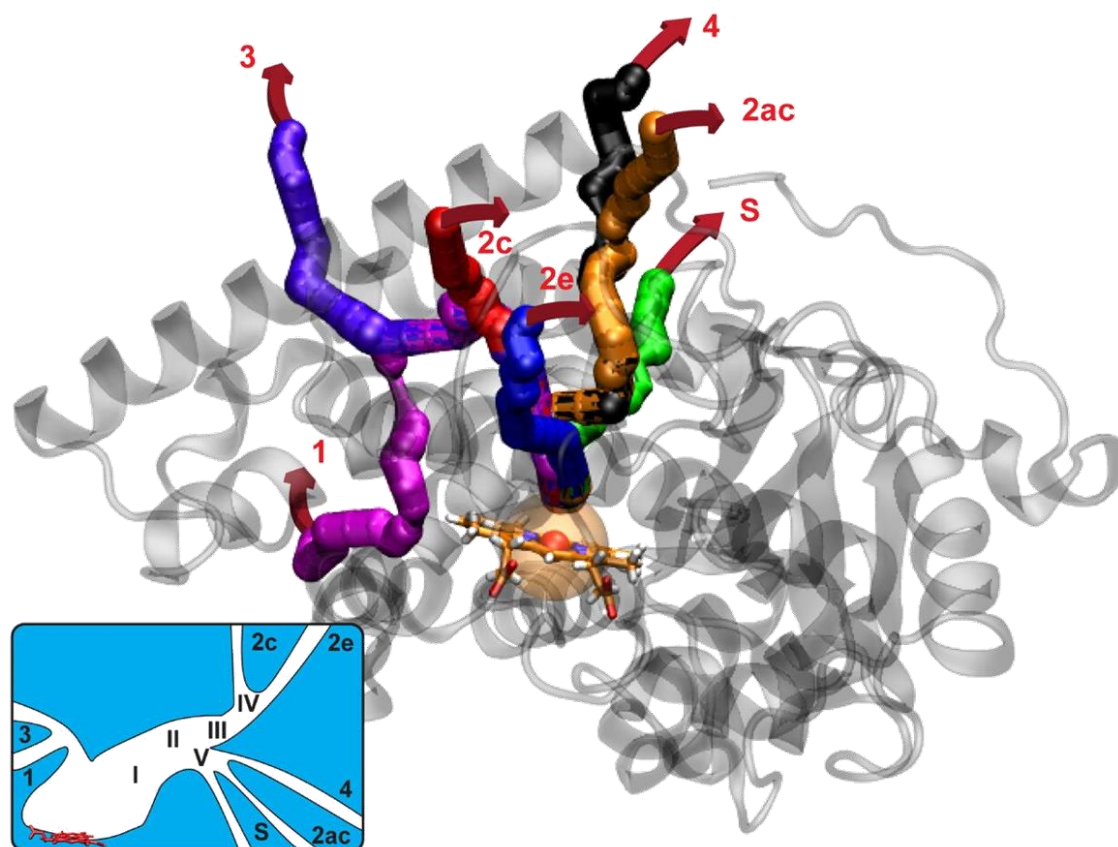


Abbildung 17 Durch Implicit Ligand Sampling (ILS) identifizierte Kanäle in CYP153A_{M.aq} (PDB 5fyg). Der Durchmesser der Kanäle zeigt die freie Gibb'sche Energie für O₂ an: je dünner, desto höher ist die Energiebarriere. Die Proteinstruktur ist als Cartoon in grau dargestellt das Häm als sticks in orange. Im unteren linken Eck ist eine schematische Darstellung aller identifizierter Kanäle dargestellt. Mit römischen Ziffern benannt sind die Bereiche an denen die Kanäle zusammenführen.

Kalkulation der freien Energie Profile

Um das Substratbindungsereignis zu studieren wurde eine molekulardynamische (MD) Simulation durchgeführt, die eine *unbiased* (unvoreingenommen) Simulation des Liganden erlaubt. Die Reaktionskoordinate für den Liganden ist dabei nicht vorbestimmt. Die freien Energie Profile der Substrate Dodecansäure, Dodecan und Dodecylamin entlang eines präferierten Substratkanals wurden mit der adaptive biasing force method (ABF) berechnet.^[122-125] Diese Methode berechnet die durchschnittliche Kraft entlang einer Reaktionskoordinate, die das Binden des Liganden beschreibt, wobei sie an jedem Punkt dieser Reaktionskoordinate die gleiche Kraft in die entgegengesetzte Richtung anbringt. So kann der Ligand lokalen Energieminima entweichen und Energiebarrieren in der freien Energielandschaft der Reaktionskoordinate durchschreiten.

Der Startpunkt der Liganden wurde so gewählt, das sowohl der 2e Kanal als auch der 2c oder 2ac Kanal als Substrateingang gewählt werden konnte.

Beobachtet werden konnte während der Simulation, dass Dodecansäure als Substrat mit dem terminalen Kohlenstoff der Alkylkette in die Proteinstruktur eindringt. Der Verlauf entspricht dabei dem 2e Kanal. Somit kann geschlossen werden, dass dieser Kanal als energetisch bevorzugt für Dodecansäure als Substrat ist. Der Austritt erfolgte entlang des 2c Kanals.

Zudem wurde auch die Energie aufgetragen, die ein Verlauf der Dodecansäure durch einen hypothetischen 2a Kanal entsprechen würde. Dabei wurde der Startpunkt des Liganden so gelegt, dass dieser Substrateingang gewählt wird. Aufgrund der unterschiedlichen Startpunkte unterscheiden sich die Energien zu Beginn der Simulation. Es konnte keine Abnahme sondern eine Zunahme der freien Energie beobachtet werden (Abbildung 18 blau). Somit ist davon auszugehen, dass dies keinen katalytischen Verlauf einer Reaktion darstellt.

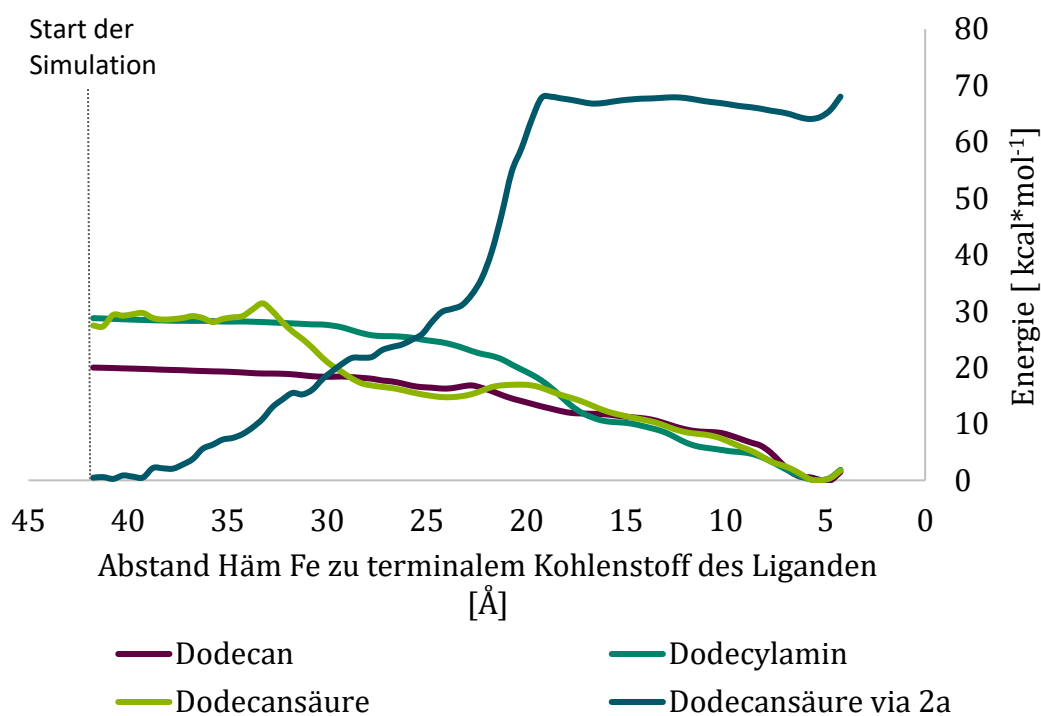


Abbildung 18 Kalkulation der Energie während Adaptive biased force (ABF) Simulation

Um das theoretische Substraterkennungsspektrum zu berechnen wurden Simulationen mit Liganden durchgeführt, die im Vergleich zur Dodecansäure keine funktionelle Gruppe (Dodecan) oder eine andere funktionelle Gruppe (Dodecylamin) aufweisen.

In den Simulationen mit Dodecan als auch mit Dodecylamin konnte der Substrateintritt mit dem terminalen Kohlenstoff voraus, anders als für die Fettsäure, entlang des 2c Kanals verfolgt werden. Auch der Austritt wurde nur durch diesen Kanal beobachtet. Die dabei errechneten freien Energien konnten in Abbildung 18 dargestellt werden.

Für alle Substrate konnte ein Abfall der Energie mit Abnahme der Distanz (in Å) des jeweiligen terminalen Kohlenstoffs zu dem Häm Eisen detektiert werden. Für Dodecansäure ist ein deutlicher Abfall der Energie bei einer Distanz des terminalen Kohlenstoffs des Liganden zum Häm-Fe von 32 Å detektiert worden. Die Kanäle weisen eine durchschnittliche Länge von ca. 20 Å auf, weshalb nach Interaktionen zwischen dem Liganden und der Proteinoberfläche gesucht wurde. Es konnten aber keine eindeutigen stabilisierenden Effekte auf der Oberfläche beobachtet werden. Insgesamt wurde eine Energiedifferenz für den kompletten Verlauf von $-29 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ für Dodecansäure detektiert. Interessanter Weise konnte für die Liganden Dodecylamin und Dodecan kein Durchdringen des 2e Kanals beobachtet werden. Beide Liganden gelangen entlang des 2c Kanals zur aktiven Tasche

Für Dodecylamin ist dabei ein Abfall der freien Energie auf unter 20 kcal/mol bei einem Abstand des terminalen Kohlenstoffs des Liganden zum Häm-Fe von 18 Å detektierbar. Somit kann geschlussfolgert werden, dass sobald sich der Ligand im Substratkanal befindet, dieser stabilisiert wird. Insgesamt ist für den kompletten Verlauf eine Energiedifferenz von $-27 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ detektiert worden (Abbildung 18 türkis). Somit könnte theoretisch eine Umsetzung dieses Liganden erfolgen.

Für Dodecan ist kein steilerer Abfall der freien Energie zu beobachten, vielmehr ist die Energie zu Beginn der Simulation auf dem gleichen Niveau, wie Dodecansäure bei einem Abstand von 30 Å zu dem Häm Eisen. Bei einem Abstand des terminalen Kohlenstoffs des Liganden zum Häm-Fe von 22 Å lässt sich eine Stabilisierung schon etwas vor dem Eintritt in den Substratkanal vermuten. Insgesamt wurde auch mit einem Alkan als Liganden für den kompletten Verlauf eine Energiedifferenz von $-19 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ detektiert (Abbildung 18 lila), was theoretisch für eine Umsetzung dieses Liganden spricht.

3.1.1.3 Mutagenesestudie in CYP153A_{M.aq}

Teile dieser Ergebnisse sind bereits in der Publikation III veröffentlicht worden. Weiterführende Ergebnisse werden momentan für die Publikation IV verwendet.

Basierend auf den Analysen der Kristallstruktur (siehe 3.1.1.1) und der Substratkanäle (siehe 3.1.1.2) konnten Positionen voraus gesagt werden, die vermutlich die Aktivität für die bereits beschriebene Reaktion der Fettsäurehydroxylierung verbessern sollten. Weiterhin sollte durch Mutagenesestudien identifiziert werden, in wieweit die Substratspezifität des 2e Kanals für Dodecansäure bestätigt werden kann. Es sollten Stellschrauben, wie die Substraterkennung im Enzym identifizieren werden mit dem Fokus das Substratspektrum des Enzyms erweitern zu können. Dazu wurden Positionen im Enzym gewählt, die Teil der beschriebenen Strukturmerkmale bilden und in den Analysen einen Einfluss auf die Substratkanäle haben.

Die Varianten sollten in *in vitro* Biotransformationen gegenüber Octan-, Dodecan- und Hexadecansäure, *n*-Octan, *n*-Dodecan und Dodecylamin getestet werden. Dabei wurden die Aktivitäten gegenüber der wildtypischen verglichen (Tabelle 8). Für die Biotransformationen von Fettsäuren wurden 200 µM Substrat eingesetzt. Für die Umsetzungen von Alkanen und Dodecylamin wurden 1 mM eingesetzt.

Tabelle 8 Umsatz für die *in vitro* Biotransformationen von Octan-, Dodecan- und Hexadecansäure und *n*-Octan mit CYP153A_{M.aq} und den Reduktasepartnern CamA und CamB. n.d. nicht detektiert. Reaktionsbedingungen bei den Umsätzen mit Fettsäuren CYP153A_{M.aq} 1,5 µM, Substratkonzentration 200 µM; Reaktionszeit 1 h bei C12, 2 h bei C8 und C16; Reaktionsbedingungen bei den Umsätzen mit *n*-Octan CYP153A_{M.aq} 3 µM, Substratkonzentration 1 mM; Reaktionszeit 4 h. Alle Biotransformationen wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und die daraus resultierende Standardabweichung berechnet.

WT	Umsatz [%]	mono-hydroxyliertes Produkt [%]	di-hydroxyliertes Produkt [%]
Octansäure	7,14 ± 0,05	100	n.d.
Dodecansäure	35,98 ± 1,44	100	n.d.
Hexadecansäure	17,78 ± 1,32	100	n.d.
<i>n</i> -Octan	5,85 ± 0,86	16,40	83,60

Mit dem Wildtypen ist gegenüber der kurzkettigen Octansäure 7 % Umsatz nach 2 h bei 30°C mit 1,5 µM P450 detektiert worden. Gegenüber der mittelkettigen Fettsäure Dodecansäure zeigt der Wildtyp eine viel höhere Aktivität. Nach 1 h Reaktionszeit bei 30°C und 1,5 µM P450 wurden 36 % der eingesetzten Fettsäure zur 12-Hydroxydodecansäure umgesetzt. Die Aktivität gegenüber der längeren Fettsäure Hexadecansäure ist niedriger. Bei den Reaktionsbedingungen 30°C, 2 h und 1,5 µM P450 konnten 18 % Umsatz detektiert werden.

Gegenüber Alkanen konnte keine Aktivität für *n*-Dodecan detektiert werden. Beim Einsatz des kürzerkettigen Alkans *n*-Octan konnte in 4 h bei 30°C und 3 µM P450 6 % Umsatz detektiert werden. Mit Dodecylamin konnte kein Umsatz beobachtet werden. Für die Umsetzungen der Fettsäuren wurde jeweils nur das monohydroxylierte Produkt detektiert. Für die Umsetzung von *n*-Octan wurden 16 % monohydroxyliertes Produkt und 84 % dihydroxyliertes Produkt detektiert.

Die Strategie der Mutagenese wurde auf die entsprechenden Substratkanäle bezogen (Abbildung 19).

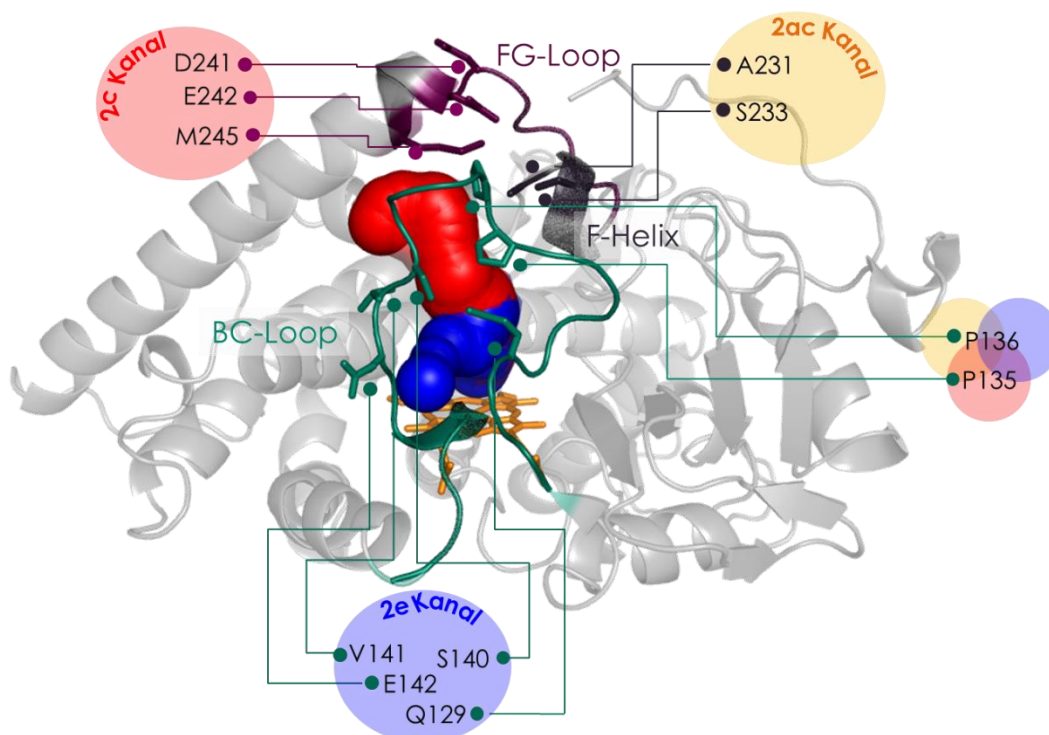


Abbildung 19 Ausgewählte Positionen für die Mutagenesestudie. Die Proteinstruktur ist als Cartoon in grau dargestellt das Häm als sticks in orange, der 2e Kanal in blau, der 2c Kanal in rot, die jeweiligen Positionen, die für die Mutagenese ausgewählt wurden, wurden farblich entsprechend des geplanten Einflusses gekennzeichnet.

So wurden die Aminosäureseitenketten, die am Eingang zum 2e Kanal liegen (Q129; S140, V141, E142, blauer Kreis) für eine Substitution ausgewählt. Alle dieser Positionen befinden sich auf dem Strukturelement BC-Loop. Auch die Aminosäureseitenketten D241, E242 und M245 (roter Kreis) wurden auf Grund der Nähe zu dem Zugang über den 2c Kanal gewählt. Diese Positionen befinden sich auf dem Strukturelement G-Helix. Weiterhin wurden auch die Aminosäureseitenketten A231 und S233 gewählt, da diese an der zusätzlichen Windung der F-Helix positioniert sind und die Öffnung des 2ac Kanals beeinflussen und vermutlich auch einen Eingang über einen potentiellen 2a Kanal verhindern. Die Aminosäureseitenketten P135 und P136 sind an der oberen Spitze des BC-Loops positioniert und können so alle der drei beobachteten Eingänge der Substratkanäle beeinflussen.

Eine Substitution zu Glycin bzw. Alanin, Arginine und Glutaminsäure wurde durchgeführt um den Effekt der Seitenkette der Aminosäuren zu studieren. Alle Positionen wurden gegenüber Alanin bzw. Glycin ausgetauscht, was einer Eliminierung der Seitenkette entspricht. Weiterhin wurden die Positionen auch zu Arginin, einer positiv geladenen Seitenkette, als auch Asparaginsäure, einer negativen Seitenkette substituiert. So sollte eine mögliche Interaktion der negativ geladenen Carboxygruppe der Fettsäure an diesen Positionen studiert werden, als auch der Einfluss einer geladenen Seitenkette am Substrateingang auf ein neutrales Alkan als Substrat.

2ac Kanal beeinflussende Einzelvarianten

Der 2ac Kanal ist in der Kristallstruktur nicht erkannt worden. In einigen frames der MD Simulation ist ein geöffneter 2ac Kanal gefunden werden. Um diesen ständig zugänglich zu machen wurde die Positionen A231 und S233 der zusätzlichen Windung der F-Helix adressiert. Dabei war die Variante S233G aus vorangegangenen Arbeiten bereits bekannt. (Dissertation Dr. Sandra Notonier) Auch die benachbarten Proline an Position 135 und 136 haben einen Einfluss auf diesen Kanal (Abbildung 19). Weiterhin ist auch die Variante G307A, die aus vorherigen Studien bekannt ist, als Vergleich hier aufgeführt. Die Varianten P135E, P135R und P136A ließen sich nicht oder nicht im ausreichenden Maße funktional exprimieren.

Auf den Umsatz mit Octansäure haben die Varianten A231R und S233G einen positiven Einfluss. Mit S233G konnten 17 % Umsatzsteigerung erzielt werden. Der Umsatz konnte mit einer Guanidinseitenkette an Position 231 um 23 % gesteigert werden. Auch in der Umsetzung von Dodecansäure ist mit dieser Variante 39 % Umsatzsteigerung detektiert worden. Die Substitution von Prolin 135 gegen Alanin erzielte eine Umsatzsteigerung von 22 %. Diese beiden Varianten haben auch in der Biotransformation mit der längerkettigen Fettsäure Hexadecansäure höhere Umsätze erbracht mit 129 % für S233G respektive 122 % für P135A. Im selben Rahmen beeinflusst auch Variante G307A den Umsatz. Für *n*-Octan konnte mit der Variante S233G eine Umsatzsteigerung von 29 % erzielt werden (Abbildung 20).

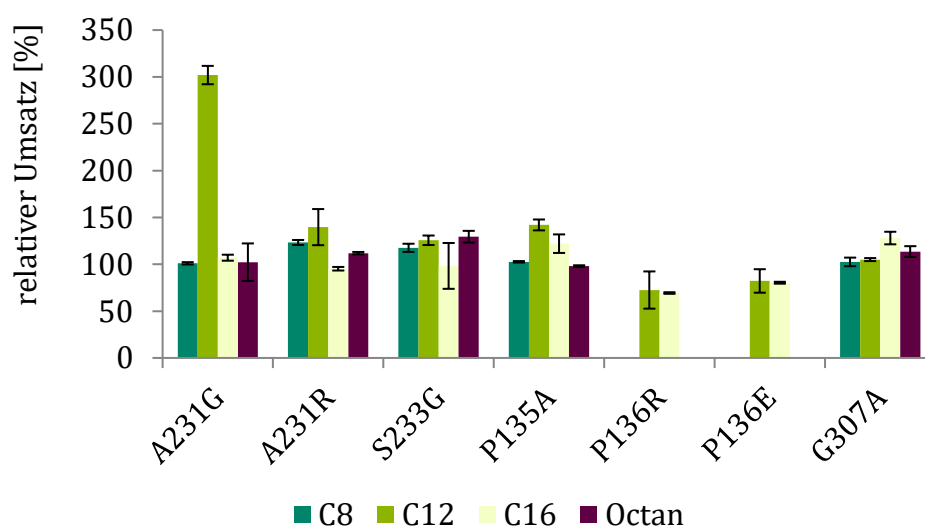


Abbildung 20 relativer Umsatz bezogen auf WT in % der 2ac Kanal beeinflussenden Einzelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Octan-, Dodecan-, Hexadecansäure und *n*-Octan.

Die Varianten der Substituierung der Position 136 beeinflussten die Umsetzung der Dodecan- und Hexadecansäure stark negativ, weswegen diese nicht für Octan und Octansäure getestet wurden. Gegenüber *n*-Dodecan und Dodecylamin konnte mit keiner Variante Umsatz detektiert werden.

2c Kanal beeinflussende Einzelvarianten

Aus den ILS Analysen konnte gezeigt werden, dass der 2c Kanal nicht für Fettsäuren präferiert ist. Vielmehr wurde hingegen beobachtet, dass die Liganden Dodecan und Dodecylamin diesen Kanal energetisch favorisieren. In den Simulationen können die Liganden die Proteinstruktur jedoch nicht gerade verlassen, sondern müssen am Ausgang vermutlich bedingt durch Aminosäureseitenketten am oberen Ende der G-

Helix eine Richtungsänderung vornehmen. Mit dem Ziel diesen Kanal zugänglicher zu machen wurden die Positionen D241, E242 und M245 adressiert (Abbildung 19).

Die Positionen D241, E242 und M245 wurden jeweils gegen Alanin, Arginin und Glutaminsäure substituiert. Auf den Umsatz mit Fettsäuren haben die Varianten an Position 241 sehr geringen Einfluss auf den Umsatz. Die Verkürzung der Seitenkette durch D241A erzielt bei der Umsetzung von Hexadecansäure 11 % Steigerung des Umsatzes. Die Verlängerung der Seitenkette durch D241E vermindert den Umsatz auf 66 % des Wildtyps. Auf den Umsatz mit *n*-Octan hat die Variation an dieser Position auch wenig Einfluss. Auch an Position 242 ist der Einfluss auf die Fettsäureumsetzung gering. Die Substitution zu Alanin übt sich jedoch bei der Umsetzung des Alkans *n*-Octan positiv aus.

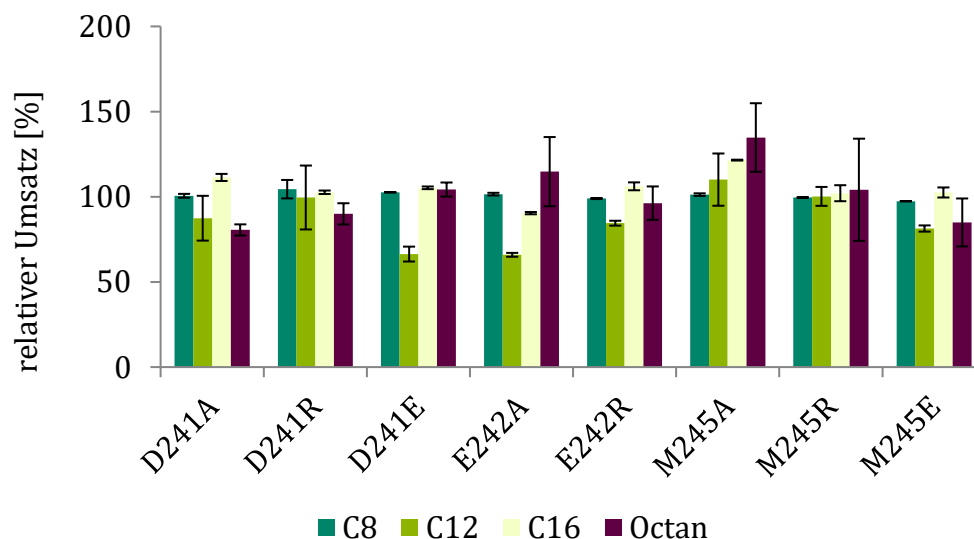


Abbildung 21 relativer Umsatz bezogen auf WT in % der 2c Kanal beeinflussenden Einzelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Octan-, Dodecan-, Hexadecansäure und *n*-Octan.

Durch das Entfernen der Seitenkette des Methionins an Position 245 konnte der Umsatz gegenüber den längerkettigen Fettsäuren Dodecan- und Hexadecansäure (10 % bzw. 21 %) und zu einem größeren Teil gegenüber *n*-Octan (35 %) gesteigert werden. Die Substitution zu Arginin an dieser Position hat keinen Einfluss. Der Austausch zu Glutaminsäure übt sich für alle Umsätze leicht negativ aus (Abbildung 21). Gegenüber *n*-Dodecan und Dodecylamin konnte mit keiner Variante Umsatz detektiert werden.

2e Kanal beeinflussende Einzelvarianten

Die MD Simulationen weisen darauf hin, dass der 2e Kanal nur für Fettsäuren zugänglich ist. Mit dem Hinblick herauszufinden, was die Spezifität ausmacht, sollte dieser Kanal auf mögliche Ankerpunkte untersucht werden und in dem Zusammenhang auch für weitere Substrate geöffnet werden. Die Positionen Q129, S140, V141 und E142 waren Ziel dieser Strategie (Abbildung 19).

Der Austausch von Glutamin an Position 129 zu Arginin hat auf den Umsatz gegenüber dem Alkan und de längerkettigen Fettsäure Hexadecansäure keinen Effekt. Für die kürzerkettigen Fettsäuren Octan- und Dodecansäure konnte der Umsatz um bis zu 2,2-fach gesteigert werden.

Die Kinetiken für die Variante Q129R wurden gegenüber der Dodecansäure aufgenommen. Der k_{cat} des Wildtypen und der Variante sind mit $6,38 \text{ min}^{-1}$ und $6,32 \text{ min}^{-1}$ gleich Der K_M -Wert hingegen ist mit $67,6 \mu\text{M}$ niedriger als für den WT ($81,5 \mu\text{M}$), was auf eine bessere Bindung des Substrats hinweist (Tabelle 9).

Tabelle 9 Kinetiken für den Wildtyp von CYP153A_{M.aq} und der Variante Q129R gegenüber Dodecansäure.

Variante	K_M [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$]
Q129R	67,6	6,38	94,38
WT	81,5	6,32	77,55

Der Austausch von Glutamin an Position 129 zu Alanin hat auf die Umsetzungen mit Fettsäuren kaum einen Effekt. Gegenüber *n*-Octan hingegen konnte der Umsatz verdoppelt werden. Der Austausch von Glutamin an Position 129 zur Glutaminsäure übt sich im Umsatz mit Dodecansäure negativ aus. Für die anderen Umsetzungen hat diese Substitution keinen Einfluss (Abbildung 22).

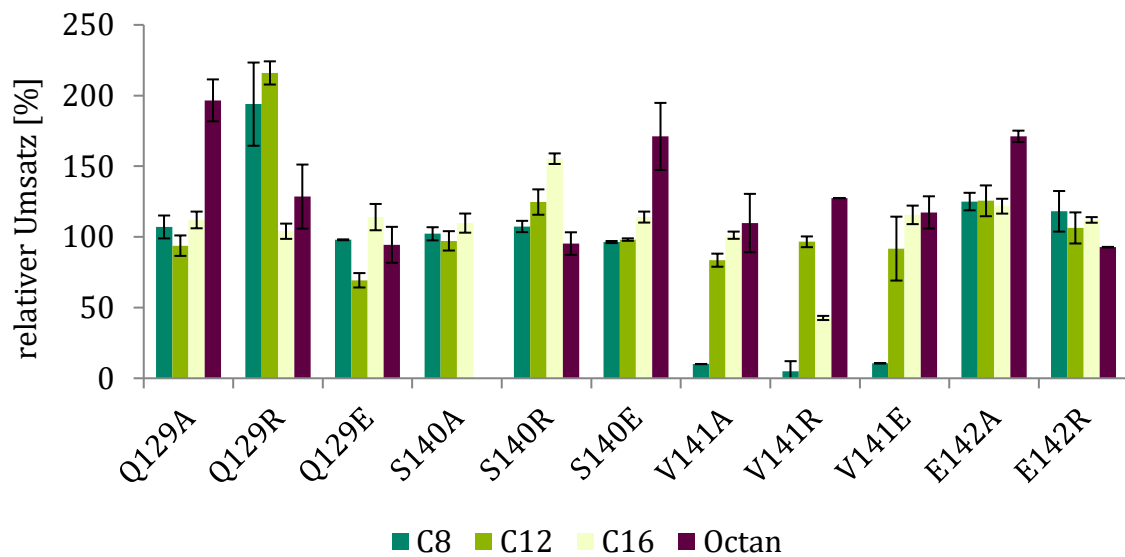


Abbildung 22 relativer Umsatz bezogen auf WT in % der 2e Kanal beeinflussenden Einzelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Octan-, Dodecan-, Hexadecansäure und *n*-Octan.

Beim Austausch des Serins an Position 140 zu Alanin konnte kein Einfluss auf die Fettsäureumsetzung detektiert werden. Für die Umsetzung von *n*-Octan konnte nicht ausreichend Enzym exprimiert werden um vergleichbare Daten zu ermitteln. Das Einführen einer Guanidinseitenkette in Form eines Arginins an dieser Position beeinflusste den Umsatz gegenüber der Dodecan- und Hexadecansäure positiv mit 25 % und 55 % Umsatzsteigerung. Gegenüber *n*-Octan wurde kaum ein Einfluss detektiert. Die Substitution zur Glutaminsäure hingegen steigerte den Umsatz des Alkans um 71 %. Bei einer Variation an Position 141 wird nur noch 10 % Umsatz gegenüber der kurzkettigen Fettsäure Octansäure ermittelt. Auch für Hexadecansäure wird der Umsatz für V141R halbiert. Auf den Umsatz mit Dodecansäure und *n*-Octan haben die Substitutionen kaum einen Einfluss. Die Variante E142A steigert den Umsatz gegenüber allen Fettsäuren um ~20 %. Der Umsatz von *n*-Octan wird bis zu 70 % gesteigert. Die Substitution zu Arginin an dieser Position ist für die Umsetzungen der Fettsäuren leicht verbessert (Octan- 118 %; Dodecan- 106 %, Hexadecansäure 112 %) für *n*-Octan leicht verschlechtert (92 %). Gegenüber *n*-Dodecan und Dodecylamin konnte mit keiner Variante Umsatz detektiert werden.

Kombination von Einzelvarianten

Die Einzelvarianten, die den höchsten positiven Effekt auf den Umsatz erbrachten, wurden kombiniert und gegenüber dem Substratspektrum getestet. Dabei sind im Folgenden die Resultate schematisch dargestellt. Die Varianten, die den Umsatz für das jeweilige Substrat positiv beeinflusst haben (grün > 105 % Umsatz) wurden zusätzlich tabellarisch aufgeführt. Nicht alle Kombinationen wurden ausgeführt, des Weiteren haben sich einige Varianten nicht oder nicht ausreichend funktional exprimieren lassen. (grau). Varianten, mit denen ein niedrigerer Umsatz (< 95 %), wie mit dem wildtypischen Enzym detektiert wurde, wurde schematisch lila, bei gleichem Umsatz hell grün dargestellt. (Abbildung 23)

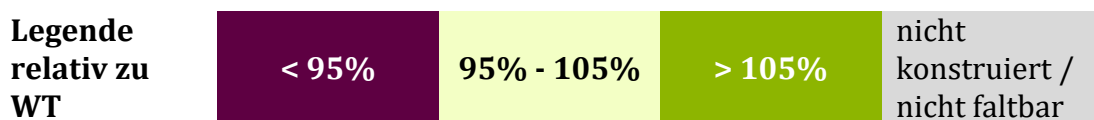


Abbildung 23 Legende zu den schematisch dargestellten Resultaten der Doppelvarianten.

Bei den *in vitro* Biotransformationen mit *n*-Octan konnten insbesondere durch die Kombination von G307A und Q129R der Umsatz gesteigert werden. Die Kombination aus diesen beiden Varianten konnte jedoch nicht funktional exprimiert werden. Eine Verdopplung des Umsatzes konnte mit der Variante Q129R/E142A erzielt werden(Tabelle 10).

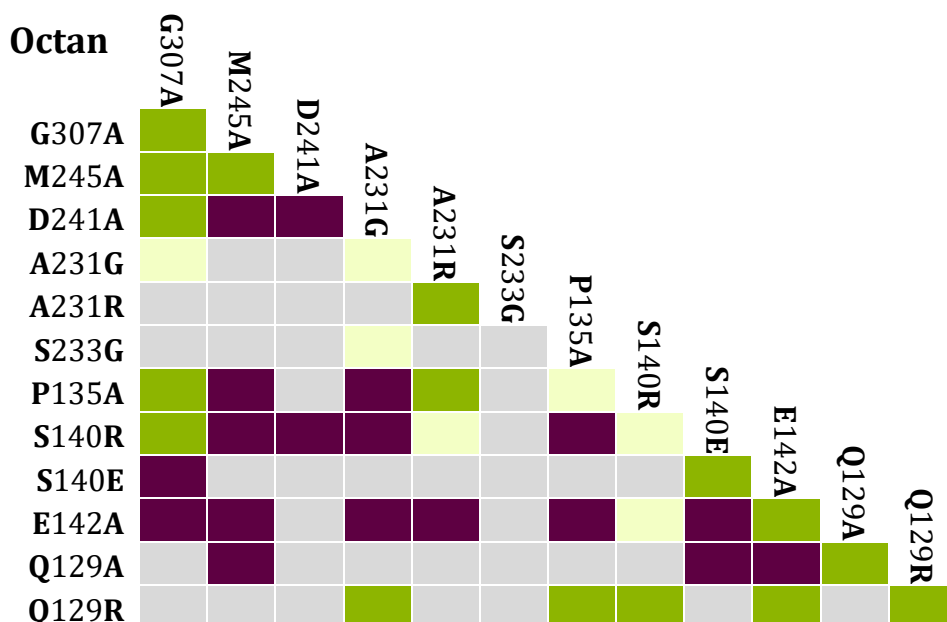


Abbildung 24 Schematisch dargestellter relativer Umsatz der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber *n*-Octan. Lila: < 95 %; Hellgrün: 95 %-105 %, Grün: > 105 %, Grau: nicht konstruiert/ nicht oder nicht ausreichend exprimierbar

Eine Verdopplung des Umsatzes im Vergleich zum WT wurde auch mit der Einzelvariante Q129A erreicht (Abbildung 22). Eine Kombination dieser Variante mit einer weiteren konnte den Umsatz nicht weiter steigern. Gleiches wurde für die Variante S140E beobachtet (Abbildung 24).

Tabelle 10 Relative Umsätze der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber *n*-Octan.

Variante	Umsatz	
M245A / G307A	133,68	± 5,04
D241A / G307A	131,89	± 0,41
P135A / G307A	193,77	± 21,83
P135A / A231R	113,32	± 2,22
S140R / G307A	176,66	± 3,57
Q129R / A231G	174,44	± 9,35
Q129R / P135A	111,20	± 8,57
Q129R / S140R	154,59	± 6,91
Q129R / E142A	199,34	± 4,94

Bei den Umsetzungen mit Octansäure haben insbesondere die Varianten in Kombination mit G307A bis zu 2,4-fach gesteigerte Umsätze erbracht (Tabelle 11). Sowohl in der Kombination mit A231, die als 2ac Kanal beeinflussende Variante identifiziert wurde, als auch mit S140 und E142, die am 2e Kanal positioniert sind.

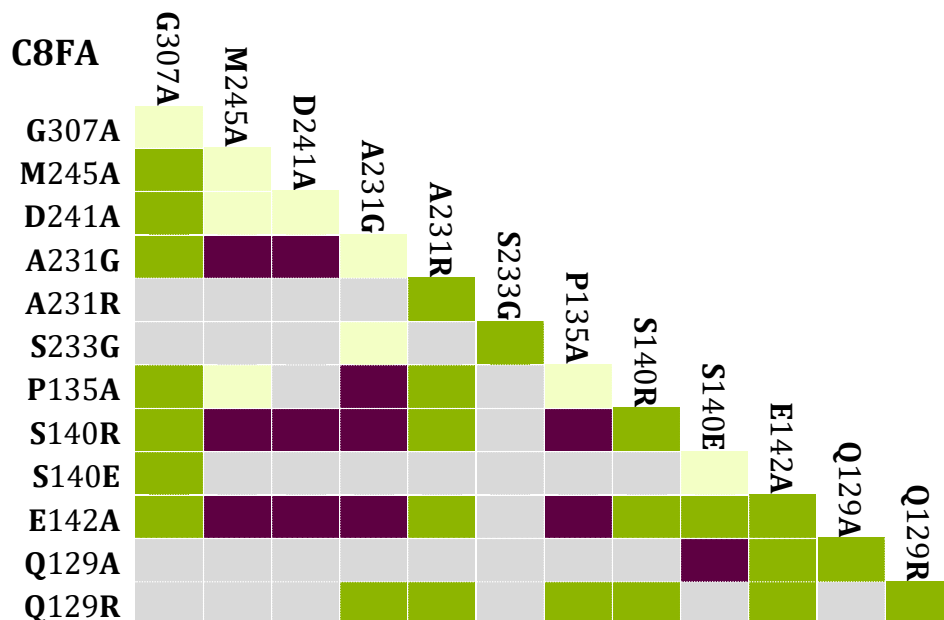


Abbildung 25 Schematisch dargestellter relativer Umsatz der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Octansäure. Lila: < 95 %; Hellgrün: 95 %-105 %, Grün: < 105 %, Grau: nicht konstruiert/nicht oder nicht ausreichend exprimierbar

Auch die Kombination der Variante A231R übte sich auf alle Varianten positiv aus. Eine 2,2-fache Steigerung der Aktivität wurde auch durch die Kombination der Ankermutation (Q129R) und A231G erzielt. Dies entspricht einer leichten Verbesserung gegenüber der Einzelvariante Q129R. Nachteilig haben sich Varianten in Kombination mit M245A und D241A ausgeübt (Abbildung 25).

Tabelle 11 Relative Umsätze der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Octansäure.

Variante	Relative Umsatz [%]		
M245A / G307A	120,18	±	5,37
D241A / G307A	124,17	±	2,11
A231G / G307A	239,85	±	1,74
P135A / G307A	121,88	±	5,31
P135A / A231R	130,88	±	12,83
S140R / G307A	170,57	±	10,88
S140R / A231R	167,46	±	14,10
S140E / G307A	240,00	±	18,42
E142A / G307A	210,81	±	19,19
E142A / A231R	159,89	±	2,11
E142A / S140R	117,56	±	0,48
E142A / S140E	114,35	±	4,33
Q129A / E142A	155,58	±	2,80
Q129R / A231G	222,88	±	33,48
Q129R / A231R	123,72	±	2,70
Q129R / P135A	164,16	±	28,28
Q129R / S140R	136,68	±	1,01
Q129R / E142A	148,24	±	6,57

Bei dem Umsatz mit Dodecansäure sind mit Doppelvarianten mit S140E und S233G niedrigere Umsätze als mit den WT detektiert worden. Bis zu 2-fache Steigerung des Umsatzes konnte in der Kombination sowohl mit M245A/G307A als auch D241A/M245A erzielt werden (Tabelle 12). Dabei wurde mit M245A alleine eine 10 % Steigerung der Aktivität detektiert. Auch die Kombination mit S140R erzielte Varianten mit erhöhten Umsätzen. Die höchste Steigerung (2,4-fach) wurde mit S140R/A231R erreicht. Den positiven Effekt von A231G konnte durch weitere Variation nicht ausgebaut werden. Auch die 2-fache Steigerung der Variante Q129R konnte durch Kombination mit anderen Varianten nicht erhöht werden (Abbildung 26).

Tabelle 12 Relative Umsätze der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Dodecansäure.

Variante	Umsatz		
M245A / G307A	205,40	±	12,44
D241A / M245A	180,98	±	3,90
A231G / G307A	156,31	±	8,69
A231G / M245A	138,00	±	14,28
P135A / G307A	127,00	±	9,42
P135A / M245A	154,59	±	2,43
P135A / A231R	148,34	±	15,45
S140R / G307A	120,23	±	5,60
S140R / A231G	155,41	±	12,94
S140R / A231R	239,62	±	17,46
S140R / P135A	122,17	±	17,53
E142A / G307A	166,87	±	17,88
E142A / M245A	121,89	±	18,22
E142A / D242A	154,75	±	9,54
E142A / A231G	130,02	±	5,60
E142A / A231R	127,27	±	7,66
Q129R / A231G	110,54	±	11,27
Q129R / A231R	180,53	±	15,23
Q129R / P135A	110,61	±	14,71
Q129R / S140R	118,89	±	0,18
Q129A / E142A	130,79	±	16,41
Q129R	216,00	±	8,20
A231G	302,00	±	9,80

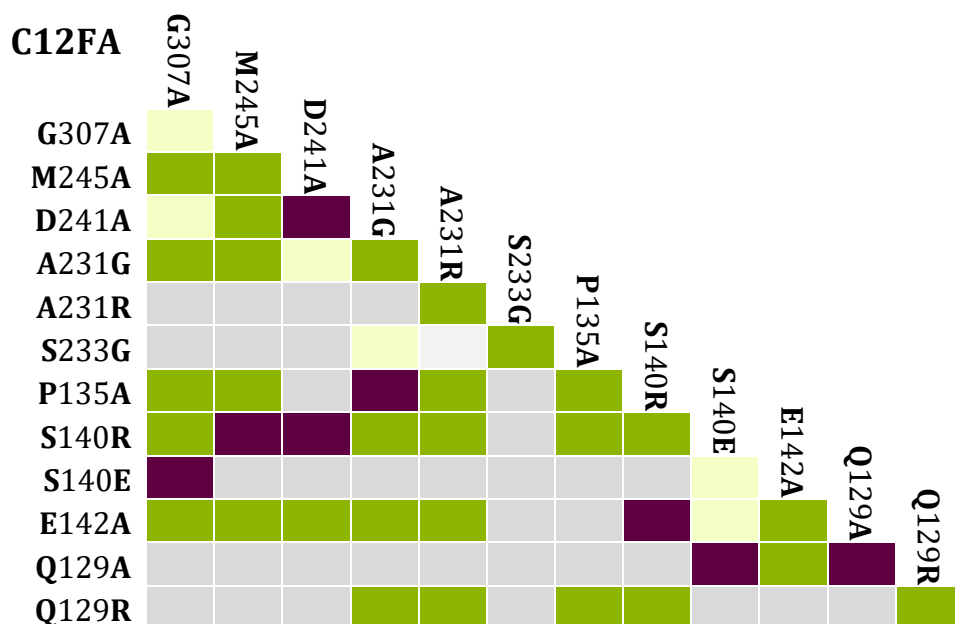


Abbildung 26 Schematisch dargestellter relativer Umsatz der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Dodecansäure. Lila: < 95 %; Hellgrün: 95 %-105 %, Grün: < 105 %, Grau: nicht konstruiert/nicht oder nicht ausreichend exprimierbar

Mit der längerkettigen Fettsäure Hexadecansäure konnte durch die Kombination der Einzelvarianten bis zu ~3-fache Steigerung des Umsatzes erzielt werden (Tabelle 13).

Tabelle 13 Relative Umsätze der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Hexadecansäure.

Variante	Umsatz	
M24A / G307A	138,78	± 19,09
A231G / G307A	138,39	± 9,40
P135A / G307A	168,27	± 8,44
P135A / M245A	112,30	± 0,00
P135A / A231G	153,98	± 6,28
P135A / A231R	127,95	± 6,20
S140R / G307A	249,04	± 26,85
S140R / M245A	194,92	± 4,52
S140R / D241A	243,34	± 8,53
S140R / A231G	241,19	± 9,97
S140R / P135A	297,10	± 45,05
E142A / G307A	163,36	± 8,60
E142A / M245A	242,37	± 24,24
E142A / D241A	166,06	± 15,07
E142A / A231G	212,95	± 9,66
Q129R / A231G	110,72	± 6,77
A231G / S233G	137,40	± 9,48

Die Kombination der Variante S140R mit G307A als auch mit Varianten, die die Substrateingangskanäle beeinflussen wie D241A, A231G und P135A erzielten ~2,5-fache Steigerung der Aktivität. Die Kombination der beiden 2ac Kanal beeinflussenden Positionen (A231G und S233G) erzielen zusammen eine Umsatzsteigerung von 37 %. Die Kombination der 2c Kanal beeinflussenden Positionen (M245A, D241A) mit A231G übten sich negativ auf den Umsatz der längerkettigen Fettsäure aus. Die positive Auswirkung der Mutation D241A konnte nur durch die Kombination mit einer 2e Kanal beeinflussenden Variante (S140 oder E142) zusätzlich verstärkt werden.

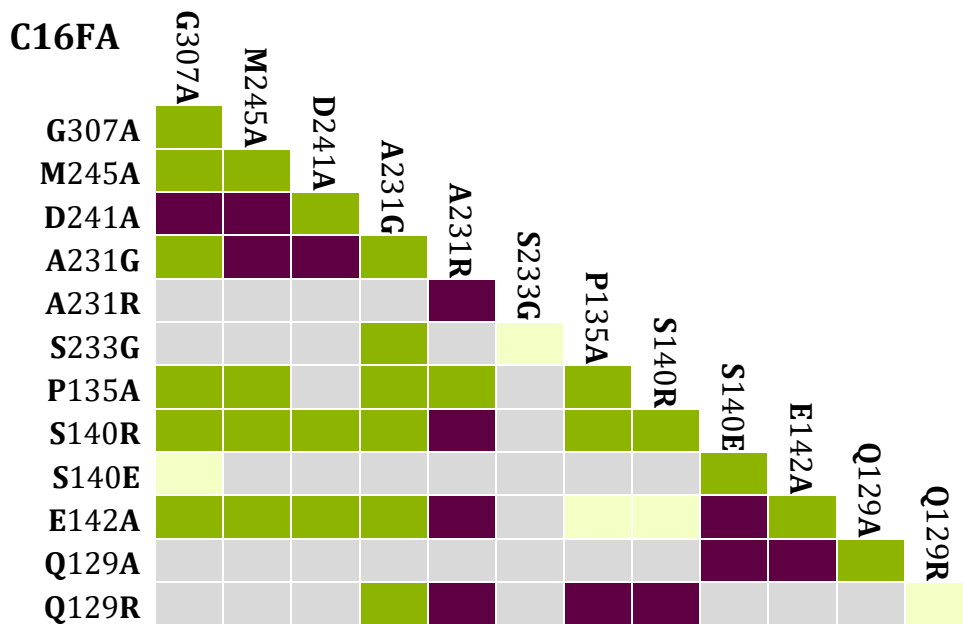


Abbildung 27 Schematisch dargestellter relativer Umsatz der Doppelvarianten von CYP153A_{M.aq} gegenüber Hexadecansäure. Lila: < 95%; Hellgrün: 95%-105 %, Grün: < 105 %, Grau: nicht konstruiert/ nicht oder nicht ausreichend exprimierbar.

3.1.2 Wechselspiel Häm und Reduktase Domäne

3.1.2.1 Einfluss der Reduktase Partner Interaktionsflächen in einem Fusionskonstrukt

Diese Ergebnisse sind Teil der Publikation I, die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht wurde.

In allen Literatur bekannten Kristallstrukturen, die den Komplex von Häm und Reduktase zeigen, sind die Interaktionsflächen in ähnlichen Regionen lokalisiert.^[126-128] Deswegen geht man davon aus, dass diese Reduktasepartner Interaktionsflächen (redox partner interaction sites) (RPISs) in allen CYPs gleich sind. Eine Analyse aller CYPs hinsichtlich konservierter Aminosäuren, konnte auf der Oberfläche der Häm Domänen Aminosäureseitenketten identifiziert werden, die spezifisch für die Interaktion sind. Diese unterscheiden sich innerhalb der P450 Klassen I und II. Eine Möglichkeit für eine Optimierung eines artifiziellen Fusionskonstrukts bietet das Anpassen der RPISs.

In Klasse II P450 Enzymen sind CYPs mit sehr hoher Sequenzdiversität vertreten, die alle von einer homologen P450 Reduktase Elektronen akzeptieren können. Literaturbekannte Positionen in Klasse II P450 wurden in vorangegangenen Studien analysiert, welche den Elektronentransport beeinflussen. Dabei konnten unter Verwendung des strukturbasierenden Klasse II spezifischen Nummerierungsschemas^[129] 27 strukturell korrespondierende Positionen von Dr. Łukasz Gricman identifiziert werden. Diese 27 Positionen konnten in 6 verschiedene Bereiche auf der Oberfläche klassifiziert werden. Diese wurden als RPISs 1 – 6 beschrieben.^[130]

Die 27 relevanten Positionen wurden auf Basis ihrer biochemischen Eigenschaft von Dr. Łukasz Gricman analysiert. Dabei viel auf, dass vor allem geladenen Aminosäuren in den RPISs beteiligt sind. Innerhalb der humanen Klasse II CYPs variieren die biochemischen Eigenschaften nur zu 10 %. Wohingegen diese innerhalb der Klasse I um 21 % variieren.

Das Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR besteht aus einer Klasse I Häm domäne und einer Klasse II Reduktase. Um dieses artifizielle Konstrukt zu optimieren, wurden die natürliche Häm domäne von CYP102A1BM3 mit der Häm Domäne CYP153A_{M.aq} im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich dieser 27 Positionen analysiert (Tabelle 14).

Tabelle 14 Vergleich der Aminosäuren zwischen CYP102A1 und CYP153A_{M.aq} an den für die Interaktion relevanten Positionen. Angegeben sind die Nummerierungen nach der strukturbasierten standardisierten Position. Positionen, die für die Mutagenese ausgesucht wurden sind fett dargestellt.^[130]

Klasse II standardisierte Position	CYP102A1	CYP153A <i>M.aq</i>	CYP153A standardisierte Position	Redox Partner Interaktions Fläche
59	K	L	115	1
63	D	S	120	1
65	S	D	122	1
68	D	S	125	1
97	K	D	153	2
99	A	Q	155	2
100	H	R	156	2
101	N	S	157	2
104	L	Q	160	2
108	S	A	164	2
110	Q	K	166	2
112	M	L	168	2
113	K	K	169	2
236	H	L	280	3
239	N	S	283	3
305	Y	-	GAP	4
310	Q	-	GAP	4
319	L	S	345	4
383	S	-	GAP	5
386	P	-	GAP	5
388	H	-	GAP	5
397	Q	V	415	6
399	A	R	417	6
404	Q	R	422	6
407	L	E	425	6

Es wurden neun Positionen ausgewählt bei denen die Aminosäuren im Vergleich zu CYP102A1BM3 sehr unterschiedliche Eigenschaften hatten (Abbildung 28). An diesen Positionen wurden in einer in dem Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit von Niels Borlinghaus die Aminosäuren von *M. aquaeolei* gegen die von *B. megaterium* ausgetauscht. Durch diesen Austausch sollte die Interaktionsfläche an die von BM3 angenähert werden. 5 dieser Varianten konnten funktional exprimiert werden und auf ihre Aktivität und Kopplungseffizienz analysiert werden. Letztere ist als Quotient der Produktbildungsrate und der NAD(P)H Oxidationsrate definiert ist und stellt somit ein Maß für die Elektronenübertragung dar.

Für die Ermittlung dieser für jede einzelne Varianten wurden die Reaktionen unter Ausschluss des NADPH Regenerationssystems photometrisch bei 340 nm verfolgt. Nach vollständigem NADPH Verbrauch wurden die Proben zur Ermittlung der Produktbildung für die Detektions mittels GC-FID aufbereitet. Aus der verbrauchten NADPH-Menge (nmol) und der gebildeten Produktmenge (nmol) wurden die Kopplungsraten berechnet. (Tabelle 15)

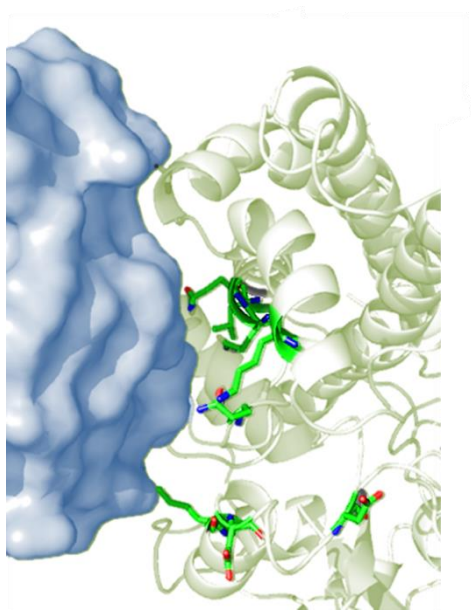


Abbildung 28 Sechs für die Mutagenese ausgewählte Amino-säureseitenketten, die auf der Oberfläche von CYP153A_{M.aq} (grün) positioniert sind und zu der Oberfläche der Reduktase von CYP102A1 (blau) ausgerichtet sind.

Mit dem Wildtypen ist mit 23,2 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \mu\text{mol}$ die höchste initiale Rate und daraus resultierend nach 1 h Reaktion der höchste Umsatz mit 80 % beobachtet worden. Für alle Varianten ist eine erniedrigte Aktivität zu verzeichnen. Variante K166Q konnte die Kopplungseffizienz verbessert werden. Zu 89 % werden die Elektronen von NADPH über die Reduktasedomäne zur Häm-domäne in die Produktbildung transportiert. Wohingegen im Wildtyp 30 % der übertragenen Elektronen zu der Bildung von Wasser oder reaktiven Sauerstoffspezies führt. Die Varianten L115K, S120D, D153K und E425L führten zu einer erniedrigten Aktivität. Die Elektronenkopplungseffizienz wurde von diesen Mutationen nicht beeinflusst.

Tabelle 15 Aktivitätsbestimmung durch initiale Rate in [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \mu\text{mol}$] und Umsatz in [%] nach 1 h und Elektronenkopplungseffizienz in [%] des Wildtypen Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}-CPR und der Varianten L115K, S120D, D153K, K166Q und E425L.^[130]

	WT	L115K	S120D	D153K	K166Q	E425L
Initiale Rate [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \mu\text{mol}$]	23.2 \pm 0.7	1.9 \pm 0.1	5.3 \pm 0.7	2.2 \pm 0.2	10.6 \pm 0.6	2.2 \pm 0.6
Umsatz nach 1 h [%]	80.1	27.4 \pm 1.7	44.4 \pm 6.0	27.2 \pm 0.4	52.8 \pm 3.7	29.8 \pm 6.1
Elektronen Kopplungseffizienz [%]	67.8 \pm 11.5	56 \pm 1.4	72.6 \pm 4.5	76.2 \pm 5.4	89.3 \pm 5.9	63.1 \pm 2.8

3.1.2.2 Einfluss der Linker Länge in einem Fusionskonstrukt

Diese Ergebnisse sind Teil der Publikation II, die im Rahmen dieser Arbeit veröffentlicht wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass die Hämdomäne mit dem natürlich vorkommenden Redoxpartner besser interagieren kann als mit einem aus fremder Herkunft wurden drei artifizielle Fusionskonstrukte mit CYP153A_{M.aq} als Hämdomäne untersucht. Die dabei genutzten Reduktasepartner waren aus Klasse I CYP101A1 (CPR) und aus Klasse II CYP116B3 (PFOR) und CYP116B2 (Rhf). Die Reduktasepartner aus Klasse II haben, wie die natürlichen Reduktasepartner von CYP153A_{M.aq} ein FMN und FeS als prosthetische Gruppe. Alle Fusionskonstrukte wurden funktional in *E. coli* exprimiert und im Lysat gegenüber Dodecansäure getestet.

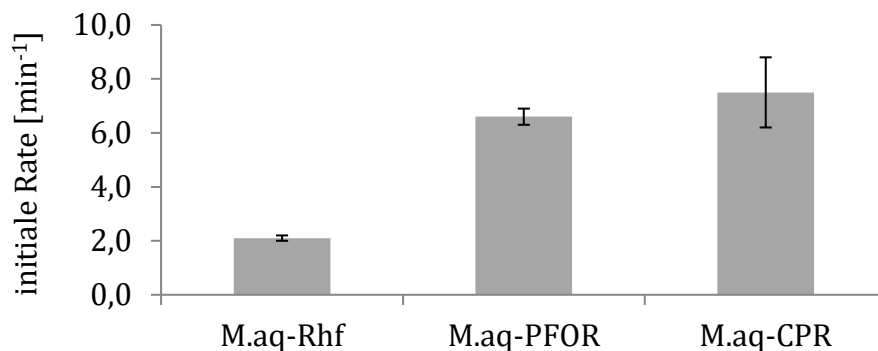


Abbildung 29 Initialen Raten [min⁻¹] der artifiziellen Fusionskonstrukte bei der Umsetzung von Dodecansäure.

Für die Fusionskonstrukte zu den Reduktasen CPR und PFOR ergaben sich ähnliche initiale Raten mit $6,6 \pm 0,3 \text{ min}^{-1}$ und $7,5 \pm 1,3 \text{ min}^{-1}$. Da die Reduktasedomäne PFOR den natürlichen Reduktasepartnern von *M.aq* ähnlicher ist, wurde dieses Fusionskonstrukt gewählt, um den Einfluss der Linkerlänge auf die Aktivität, Stabilität und Kopplungseffizienz zu untersuchen (Abbildung 29).

Für eine rationale Linkerlängenvariation wurde die Aminosäuresequenz des Linkers von 51 der 52 Mitglieder der Homologiefamilie CYP116B bioinformatisch von Dr. Łukasz Gricman analysiert. Unter Annotierung der Linkerregion wurde ein Alignment unter Verwendung von Clustal Omega^[131] erstellt und mit Hilfe von WebLogo^[132] veranschaulicht (Abbildung 30). In der generierten Abbildung ist die Konserviertheit der jeweiligen Aminosäure relativ zur Größe des 1-Buchstabencodes angezeigt.

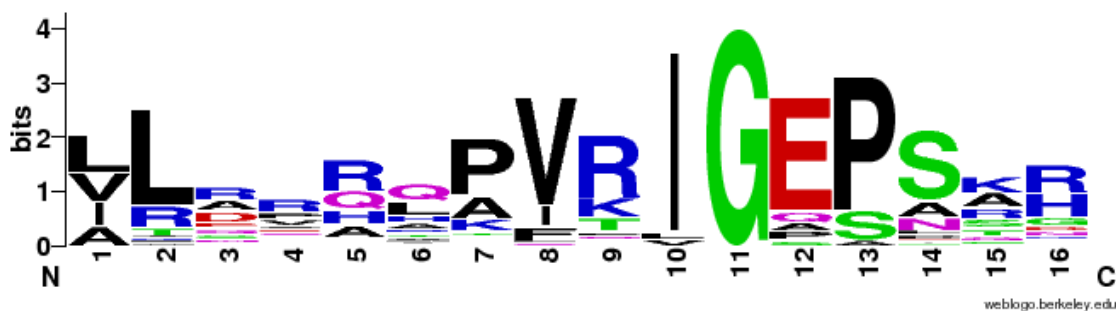


Abbildung 30 WebLogo^[132] der Linkerregion aus dem Alignment aus 51 von 52 Sequenzen der Homologiefamilie CYP116B. Abbildung modifiziert nach Hoffmann *et al.* 2016^[133] 1

Weiterhin wurden die Eigenschaften der Aminosäureseitenketten innerhalb der Linkerregion analysiert. Auf diese Weise konnte identifiziert werden, dass die ersten beiden Aminosäuren mit 96 % respektive 75 % konservierte hydrophobe Eigenschaften aufzeigen. Vier Positionen wurden innerhalb der 16 Aminosäuren langen Linkerregion als hoch konservierte Aminosäuren gefunden. An der Position 10 weisen 92 % aller Sequenzen ein Isoleucin auf. In allen Sequenzen wurde an Position 11 ein Glycin identifiziert. Position 12 und 13 wurde zu 75 % respektive 78 % eine Glutaminsäure bzw. ein Prolin identifiziert.

Aufgrund dieser hohen Konserviertheit wurde für die Linkerlängenvariation der Bereich zwischen den ersten beiden Aminosäuren und Position 10 – 13 gewählt. Sechs artifizelle Fusionskonstrukte zwischen der Hämdomäne *Maq* und der Reduktasedomäne PFOR mit verkürzter (L1 und L2) und verlängerter Linkerregion (L3 – L7) wurden durch das Ausschneiden respektive Wiederholen der weniger konservierten Region QRQHP zwischen Position 2 – 8 konstruiert. Das Prinzip der Linkerlängenerweiterung bzw. -verkürzung ist in Abbildung 31 gezeigt.

Zur Konstruktion von Variante L1 wurde QRQHP komplett entfernt um eine Linkerlänge von 11 Aminosäuren zu erzielen. Durch das Entfernen von HP wurde eine Linkerlänge von 14 Aminosäuren in Variante L2 erzielt.

Der wildtypische Linker von CYP116B3 weist 16 Aminosäuren auf. Das Wiederholen der ersten beiden konservierten Aminosäuren VL erzielte in Variante L3 einen 18 Aminosäuren langen Linker. Das Einfügen der drei weiteren Aminosäuren QRQ wurde Variante L4 konstruiert. Ein 24 Aminosäure langer Linker in Variante L5 wurde durch das Einfügen von QRQHPVVL erreicht.

Das Hinzufügen von QRQVLQRQHPVVL zu dem wildtypischen Linker nach den ersten beiden konservierten Aminosäuren wurde Variante L6 erstellt. Die längste konstruierte Linkervariante beinhaltet 21 zusätzliche Aminosäuren.

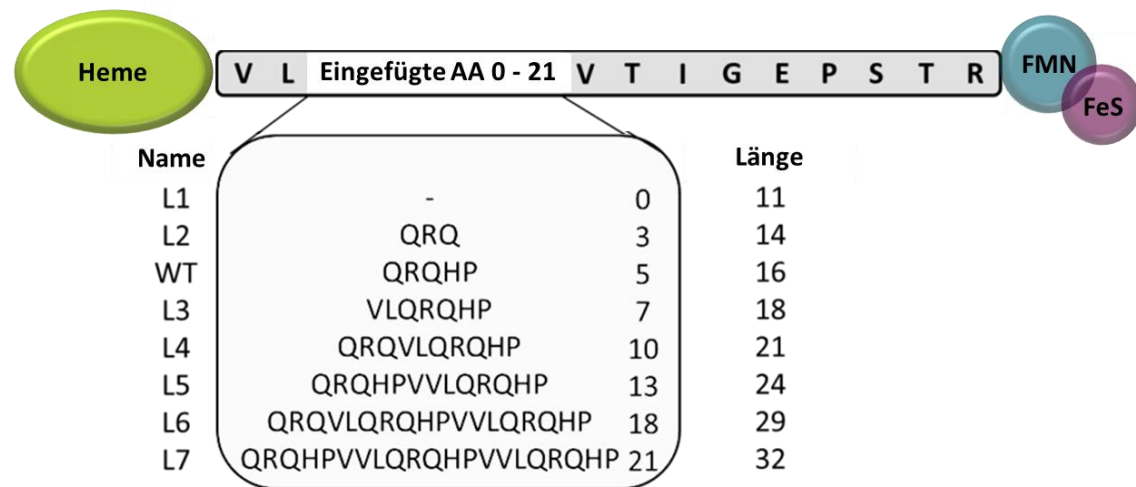


Abbildung 31 Schema der Linkerlängenerweiterung bzw. -verkürzung. Abbildung modifiziert nach Hoffmann *et al.* 2016^[133] 1

Nach erfolgreicher Konstruktion via QuikChange© und Oligo Annealing wurden die Varianten funktional in BL21 (DE3) *E. coli* exprimiert. In den normierten Lysaten wurden die Varianten auf ihre Aktivität, Stabilität und Kopplungseffizienz analysiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Geschwindigkeit der Umsetzungen von Dodecansäure ermittelt.

Für das artifizielle Fusionskonstrukt mit der natürlichen Linkersequenz konnte eine initiale Rate von $6,6 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden. Für drei der Linkervarianten wurden höhere Raten ermittelt. Für die verkürzten Varianten L1 und L2 wurden initiale Raten von $9,5 \text{ min}^{-1}$ respektive $8,8 \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Für die um zwei Aminosäuren verlängerte Variante L3 wurde die höchste Rate mit $11,3 \text{ min}^{-1}$ gemessen. Die Aktivität der Varianten L4, L6 und L7 ist vergleichbar mit der Wildtypischen. Die Aktivität der Variante L5 ist um $1,5 \text{ min}^{-1}$ geringer als der Wildtyp (Abbildung 32).

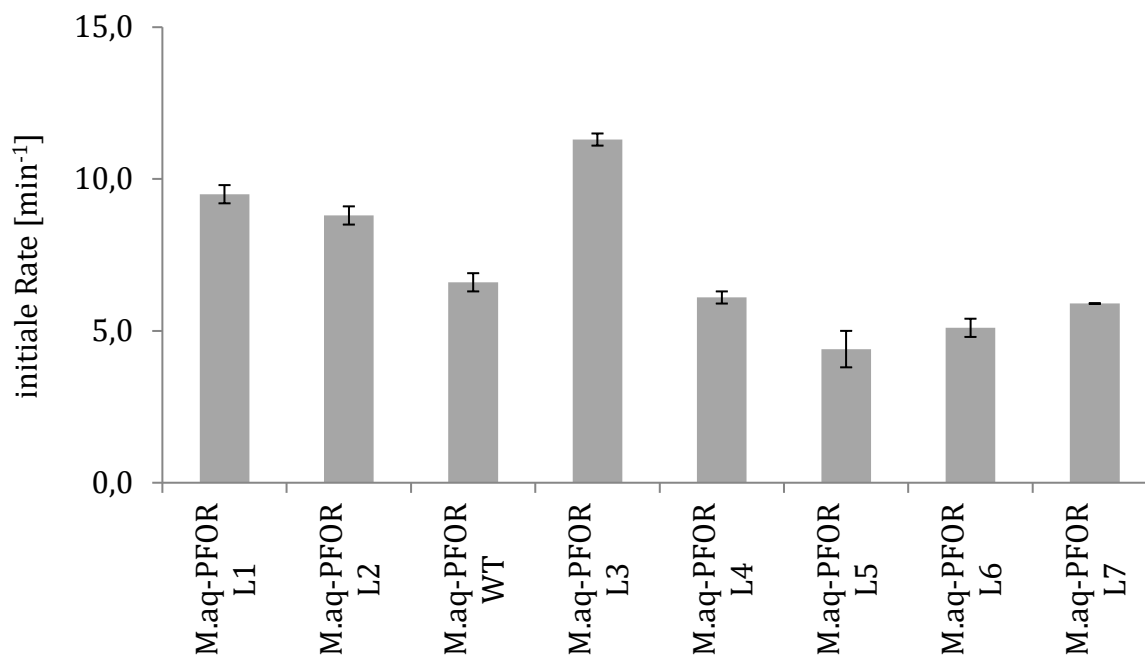


Abbildung 32 Initiale Raten der Linkervarianten bei der Umsetzung von Dodecansäure

Zur genaueren Charakterisierung einer verkürzten, einer verlängerten und der aktivsten Linkervariante wurde eine Analyse zur Bestimmung der Stabilität und der Kopplungseffizienz durchgeführt.

Zur Ermittlung der Stabilität wurde zu Beginn einer *in vitro* Biotransformation die P450 Konzentration nach Omura und Sato bestimmt (Abbildung 33 a). Durch die Reduktion des Häm Eisens durch die natürliche Reduktase mittels des natürlichen Reduktionsmittels NADPH wurde die Konzentration des funktionalen Fusionskonstrukts bestimmt (Abbildung 33 b). Mit der Methode b) wurde für alle Varianten dieselbe Konzentration gemessen, wie mit Methode a). Somit ist davon auszugehen, dass zu Beginn der *in vitro* Reaktion jede aktiv detektierte Häm-domäne als Fusion mit der Reduktase PFOR vorlag. Die gleiche Konzentrationsbestimmung wurde nach zwei stündiger Biotransformation wiederholt.

Für die Linkervariante L3 wurde die gleiche Konzentration an aktiver Häm-domäne, wie zu Beginn der Biotransformation gemessen. Somit wurden 100 % an aktiver Häm-domäne nach zwei Stunden wiedergefunden. Für die verkürzte Variante L2 waren nur noch 43 % der Häm-domäne und für die verlängerte Variante L6 50 % als aktive Häm-domäne detektierbar. Mit der wildtypischen Linkerlänge wurden nur 33 % gemessen (Tabelle 16).

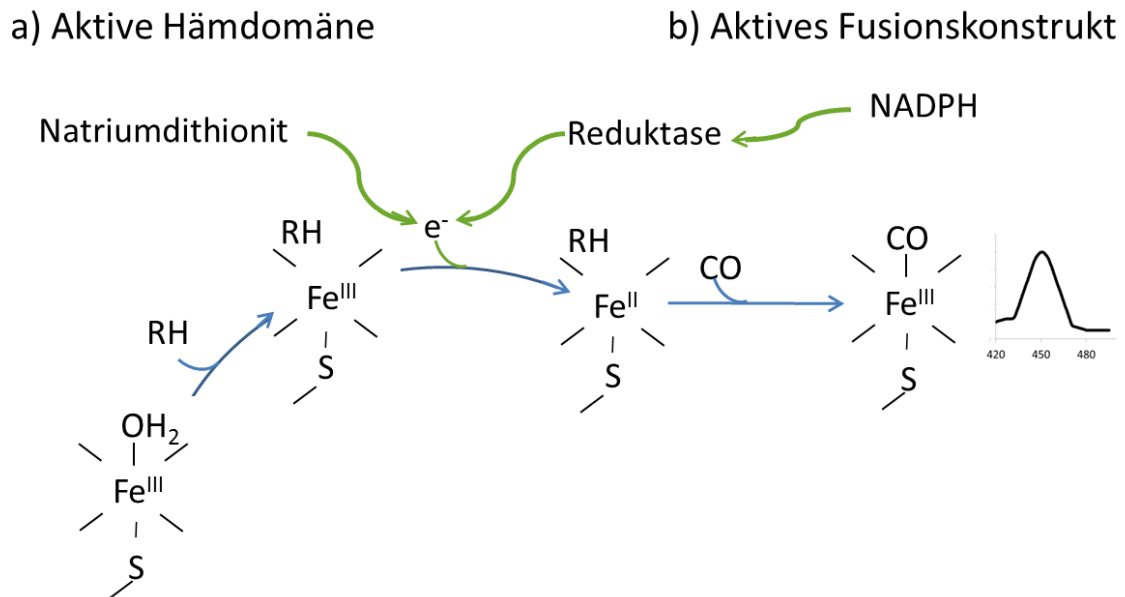


Abbildung 33 Schema zur Bestimmung der Konzentration der aktiven Häm-domäne und des aktiven Fusionskonstrukts. Abbildung modifiziert nach Hoffmann *et al.* 2016^[133] 1

Nach der zwei stündigen Reaktion wurden für alle Varianten weniger an aktivem Fusionskonstrukt, als an aktiver Häm-domäne detektiert. Für die stabilste Variante L3 wurde mit 57 % am meisten Fusionskonstrukt bestimmt. Für das Fusionskonstrukt mit der wildtypischen Linkerlänge wurden 40 % der nur 33 % vorhandenen aktiven Häm-domäne auch als aktives Fusionskonstrukt festgestellt. Die verkürzte Variante L2 weist 29 % von 43 % aktiver Häm-domäne auf. Für die verlängerte Linkervariante L6 wurden 30 % aktives Fusionskonstrukt von 50 % aktiver Häm-domäne detektiert (Tabelle 16).

Tabelle 16 Resultate der Stabilitätsanalyse nach 2-stündiger Reaktion gegenüber Dodecansäure und Elektronen Kopplungsraten Bestimmung für die Linkervarianten L2, WT, L3 und L6

	Aktive Häm-domäne [%]	Aktives Fusionskonstrukt [%]	Elektronen Kopplungsrate [%]
<i>M.aq</i> -PFOR L2	43	29	30 ± 0,40
<i>M.aq</i> -PFOR WT	33	40	39 ± 0,03
<i>M.aq</i> -PFOR L3	100	57	94 ± 0,45
<i>M.aq</i> -PFOR L6	50	30	44 ± 3,22

Die Elektronen Kopplungsrate geht einher mit der Stabilitätsanalyse. Die Ermittlung der Kopplungseffizienzen der Varianten erfolgte mittels Biotransformationen, die unter Ausschluss des NADPH Regenerationssystems photometrisch bei 340 nm verfolgt wurden. Für die Ermittlung der Produktbildungsrate wurden die Proben nach vollständigem NADPH Verbrauch für die Detektion mittels GC-FID aufbereitet. Die Kopplungsraten errechneten sich aus der verbrauchten NADPH-Menge (nmol) und der gebildeten Produktmenge (nmol). Bei einer Biotransformation von Dodecansäure mit der verkürzten Linkervariante L2 werden 30 % des verbrauchten Reduktionsmittels NADPH in die Produktformation genutzt. Für die Varianten WT und L6 wurde eine Elektronenkopplungsrate von 39 % respektive 44 % bestimmt. Mit 94 % werden nahezu alle Elektronen des NADPH für die Produktbildung mittels Linkervariante L3 verwendet (Tabelle 16).

3.2 Studien zur Optimierung einer P450-Fusionsenzym katalysierten Reaktion auf der Zellebene

Ziel dieses Projektabschnittes bestand darin das aus den vorangegangenen Kapiteln beschriebene und in *in vitro* optimierte P450 Fusionskonstrukt in einen Ganzzell Ansatz einzusetzen und für eine Umsetzung mit Fettsäuren anzuwenden.

Dazu wurde vorerst die Effektivität der Fusionskonstrukte vergleichend zu coexprimierten freien Reduktasen in einem Ganzzellsystem getestet.

Darauf aufbauend wurde die Expression untersucht. Weiterhin sollte die zu katalysierende Reaktion im Ganzzellsystem optimiert werden, wobei der Transport des Substrats in die Zelle als auch der Abbau des Substrats und des Produkts als Potential identifiziert werden konnten. Als Abschluss dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass die unter (3.1.1.3 Mutagenese) identifizierten Varianten auch im geeignetsten Fusionskonstrukt mit den optimierten Bedingungen im Ganzzellsystem einsetzbar sind.

3.2.1 Fusionskonstrukte und freie Reduktasen

Teile dieser Ergebnisse sind bereits in der Publikation II veröffentlicht worden.

Diese Untersuchung setzt sich mit der Fragestellung der Anwendbarkeit des Fusionskonstrukts in einem Ganzzell Ansatz auseinander. Es sollte getestet werden ob ein artifizielles Fusionskonstrukt von CYP153A_{M.aq} in einem Ganzzellansatz optimal ist oder ob eine Coexpression von freien Reduktasen vorteilhafter ist. Dazu wurde die C12 Fettsäure als Modells substrat gewählt.

Da die natürlichen Reduktasepartner von CYP153A_{M.aq} nicht funktional exprimierbar sind, wurden Literatur bekannte Reduktasepartner ausgesucht. Reduktasen aus *E.coli* (FdR, Fld), *Pseudomonas* (Cam A, Cam B) und *Bovine* (AdR, Adx) wurden *in vitro* getestet.

Drei der Enzyme (Cam A, Cam B, FdR) sind mit einem His-Tag versehen, was eine Reinigung mit einer Talon-Säule ermöglicht hat. Die Reinigung der anderen drei Enzyme (Fld, Adx, AdR) erfolgte durch Anionenaustausch. Jedes der Enzyme hat ein bestimmtes Absorptionsmaximum. Während der Elution wurde die jeweilige Absorption aufgezeichnet (Adx: 414 nm; AdR: 450 nm; Fld: 464 nm) und so die Fraktionen identifiziert, in denen das gewünschte Enzym enthalten war (6. Anhang).

Der Verlauf von Expression und Reinigung wurde durch die Auftrennung der gesamten Proteinmenge unterschiedlicher Zwischenschritte mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Die Aktivität der Reduktasepartner konnte für alle Partner mittels *Cytochrom c Assay* nachgewiesen werden. Dabei konnte kolorimetrisch die Absorptionzunahme durch Zunahme an reduziertem Cytochrom c bei 550 nm verfolgt werden.

In einer *in vitro* Biotransformation von Dodecansäure wurde getestet, ob die Reduktasepartner auch effektiv Elektronen auf die Hämdomäne übertragen können. Dazu wurden jeweils 5 μM Reduktase und 2,5 μM Ferredoxin zu 1 μM P450 eingesetzt. Dabei stellte ich heraus, dass nur die Reduktasepartner aus *Pseudomonas* (CamA und CamB) Elektronen auf die Hämdomäne von CYP153A_{M.aq} übertragen konnten und somit *in vitro* in 1 h 32 % Umsatz erzielten.

Für die Anwendung im Ganzzell System wurden diese Reduktasepartner in einen Duetvektor zur optimalen Expression aller beteiligten Domänen kloniert. Dazu wurden CamA und CamB in petDuet-1 und die Hämdomäne CYP153A_{M.aq} in pColaDuet mittels Gibson Assembly respektive Restriktionsverdau kloniert.

In vivo Daten freie Reduktasen und Fusionskonstrukte CYP153A_{M.aq}-CPR bzw. CYP153A_{M.aq}-PFOR

Zum Vergleich ob eine artifizielle Fusion auch *in vivo* Biotransformationen höhere Umsätze erzielt, wurden die zuvor untersuchten Fusionskonstrukte und die freie Hämdomäne verglichen. Ganzzellbiotransformation gegenüber Dodecansäure wurden durchgeführt unter Verwendung von folgenden Stämmen:

- (I) *E.coli* BL21 DE3 pColaDuet CYP153A_{M.aq} and petDuet-1 CamA, CamB
- (II) *E.coli* BL21 DE3 pet28a(+) CYP153A_{M.aq}-CPR
- (III) *E.coli* BL21 DE3 pet28a(+) CYP153A_{M.aq}-PFOR L3

Nach Proteinexpression wurden die Zellen aus der stationären Phase mit einer Dichte von 50 g_{cww} L⁻¹ für die Biotransformation eingesetzt.

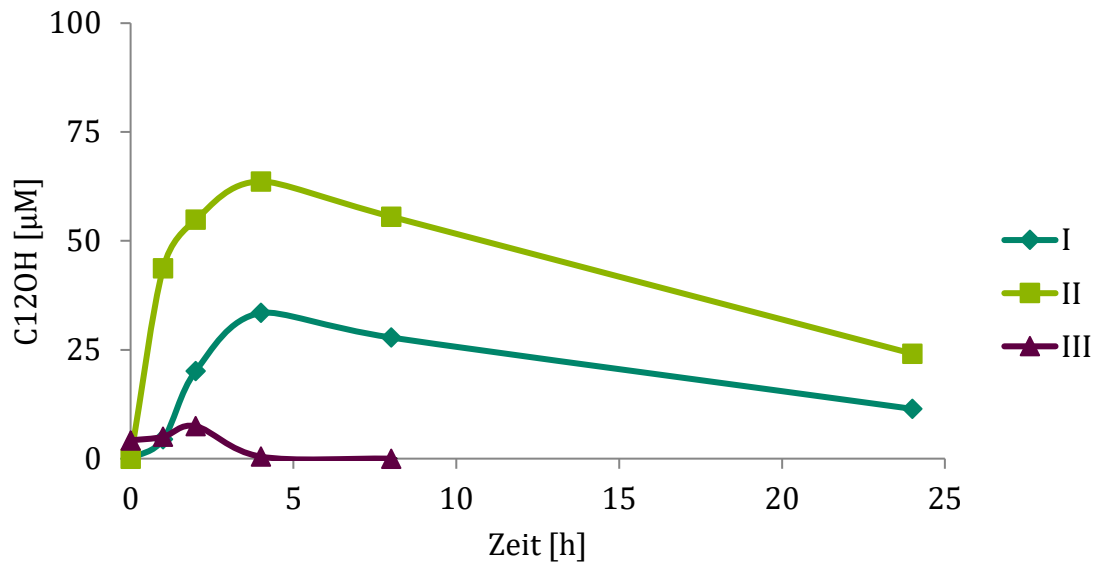


Abbildung 34 Ganzzell Biotransformation gegenüber 1 mM Dodecansäure mit I: *E.coli* DE3 BL21 pColaDuet CYP153A_{M.aq} and petDuet-1 CamA, CamB; II: *E.coli* BL21 DE3 pet28a(+) CYP153A_{M.aq}-CPR III: *E.coli* BL21 DE3 pet28a(+) CYP153A_{M.aq}-PFOR L3

Mit dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L3 konnten 7 µM Produkt detektiert werden. In der Biotransformation unter Verwendung der freien Hämndomäne mit Coexpression der Reduktasen Cam A und Cam B wurde nach derselben Zeit 20 µM und maximal nach 4 h 33 µM ω-Hydroxy Dodecanäure gebildet. Mit dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR konnte der höchste Umsatz mit 63 µM Produkt detektiert werden (Abbildung 34). Für alle Biotransformationen wurde eine Abnahme des Produkts über die Zeit beobachtet. Zur Vergleichbarkeit der Ansätze wurde für alle Biotransformationen die gleiche Zelldichte eingesetzt. Die Expression der Enzyme hingegen variierte unter den Ansätzen. In Ansatz I wurden 0,12 µM P450 in Ansatz II 1,5 µM P450 und in Ansatz III 0,15 µM P450 detektiert. Bezieht man auf die Produktbildung die Enzymkonzentration wird deutlich, dass letztere in einem Ganzzell Ansatz einen entscheidenden Faktor für ein effizientes System darstellt. CYP153A_{M.aq}-PFOR L3 wurde *in vitro* in vorangegangenen Untersuchungen als aktivstes Fusionskonstrukt beschrieben. (siehe 3.1.2.2 Einfluss der Linker Länge) Zur Überprüfung dieser Aussage in Bezug auf die Expression in einer Ganzzell Biotransformation wurden alle Linkervarianten des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}-PFOR *in vivo* gegenüber Dodecansäure getestet.

In vivo Daten der Linkervarianten von CYP153A_{M.aq}-PFOR

Nach Proteinexpression wurden die Zellen aus der stationären Phase mit einer Dichte von 50 g_{cww} L⁻¹ für die Biotransformation von 1 mM Dodecansäure eingesetzt.

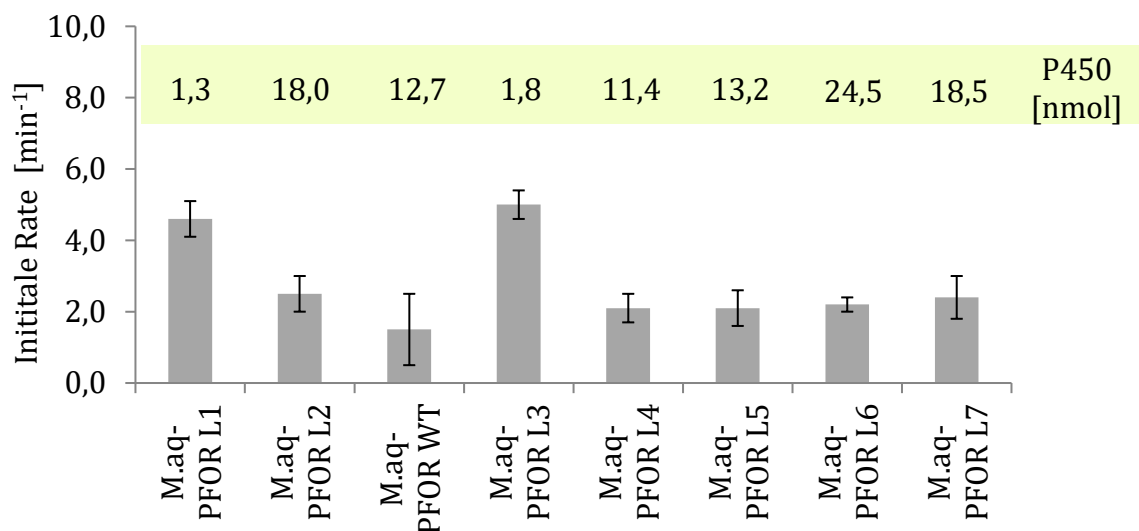


Abbildung 35 Initiale Raten [min⁻¹] und P450 Gehalt der Linkervarianten des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}-PFOR aus *in vivo* Biotransformationen gegenüber Dodecansäure.

Das Fusionskonstrukt mit dem wildtypischen Linker von CYP116B3 weist in der *in vivo* Biotransformation die niedrigste initiale Rate (1,5 min⁻¹) auf. Für die verlängerten Linkervarianten L4 – L7 wurden initiale Raten von ~2 min⁻¹ bestimmt. Die verkürzte Variante L2 zeigt mit 2,5 min⁻¹ eine leicht höhere Rate auf, L1 weist mit 4,6 min⁻¹ eine 3-fach höhere Rate gegenüber der WT Linkervariante auf. Die höchste Rate wurde für Variante L3 mit 5,0 min⁻¹ bestimmt.

Durch Korrelation der initialen Rate [min⁻¹] mit der totalen P450 Konzentration [nmol] (Abbildung 35) wird ersichtlich, dass CYP153A_{M.aq}-PFOR L3 *in vivo* nicht das produktivste System darstellt. Durch die geringe Expression werden nicht so hohe Umsätze (10 % g_{cww}⁻¹) erreicht, wie mit CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 (61 % g_{cww}⁻¹). Dieses Konstrukt stellt auch gegenüber CYP153A_{M.aq}-CPR das geeignetste System dar (Tabelle 17).

Tabelle 17 Umsätze [% g_{cww}⁻¹] aus Ganzzellbiotransformationen gegenüber Dodecansäure der Linkervarianten von M.aq-PFOR und M.aq-CPR nach 8 h. Substratkonzentration 1 mM; 50 g_{cww}; 30 °C; 180rpm; 24 h^[133]

	L1	L2	WT	L3	L4	L5	L6	L7	M.aq-CPR
Umsatz	15 ±	61 ±	43 ±	10 ±	34 ±	33 ±	62 ±	53 ±	51 ±
[% g _{cww} ⁻¹]	5	1	7	3	11	19	13	17	18

3.2.2 Expressionsstudie von CYP153A_{M.aq} in *E.coli*

Aufgrund der hohen Expressionsschwankungen zwischen den Varianten aber auch zwischen den einzelnen Expressionen derselben Variante sollte die Expression untersucht werden. Die meisten Expressionen werden in pET28 durchgeführt.^[105, 134] Dieser Vektor ist mit einem T7 Promotor ausgestattet, welches durch das T7 RNA Polymerase System reguliert ist. Dieses ist für eine hohe induzierbare heterologe Expression von Proteinen bekannt.^[135] Eine basale Expression der T7 Polymerase verhindert eine strikte Regulierung und kann somit von Nachteil bei einer Expression von zelltoxischen Proteinen darstellen. Zur Analyse ob die Expression unter strenger regulierbaren Promotoren einen Einfluss hat, wurde das Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 mit der Mutation (G307A) in verschiedene Vektoren kloniert und getestet. Diese Mutation stellte zum Zeitpunkt dieser Studie die aktivste Variante gegenüber Fettsäuren dar.

Ausgewählt wurden die Vektoren pCWori mit dem tac-Operon, pDHE ausgestattet mit dem rha-Operon und pBAD mit dem ara-Operon. Der lac als auch der tac Promotor sind durch IPTG induzierbar und somit in *E.coli* BL21 DE3 eingesetzt worden. Für die Expression mit pDHE wurde der Rhamnose defiziente Stamm *E.coli* TG10+ verwendet, der zusätzlich noch über ein Plasmid verfügt, das für Chaperone kodiert. Der pBAD33 wurde in dem Arabinose defizienten Stamm *E.coli* BW25113 eingesetzt.

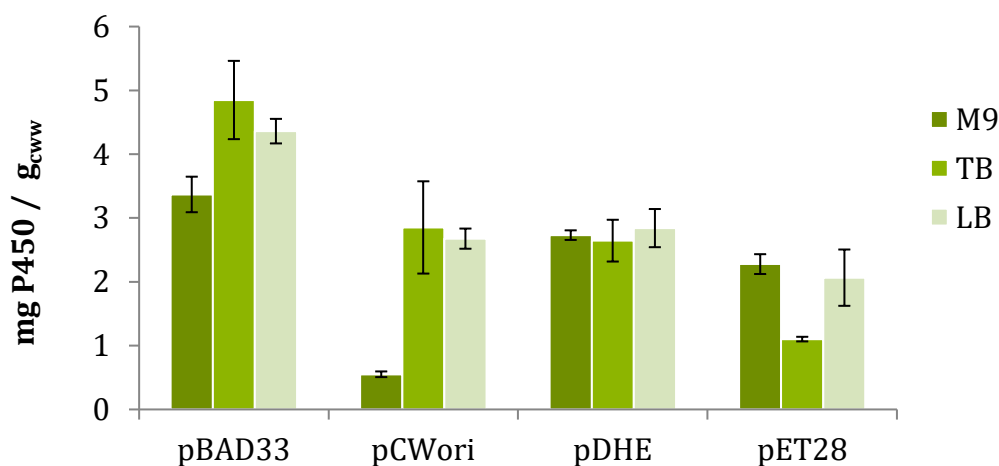


Abbildung 36 Expressionsstudie von CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 in verschiedenen Vektoren (pBAD33, pCWori, pDHE, pET28(a)+) in den jeweiligen entsprechenden Stämmen (*E.coli* BW25223, *E.coli* BL21 DE3, *E.coli* TG10+) in verschiedenen Medien (TB, LB und M9).

Die Expressionen des Fusionskonstruktes erfolgten im 200 mL Maßstab. Alle Kulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 bei 37°C angezogen mit dem jeweiligen Induktor die Proteinexpression eingeleitet und bei 25°C für 16 h bis zur Zellernte inkubiert. Die Expressionen wurden bis zu dieser Studie unter Verwendung des pET28 Vektors in TB Medium durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten 1,1 mg $P450 \cdot g_{cww}^{-1}$ detektiert werden. Erfolgte die Kultivierung in LB Medium oder in einem Glycerol basierendem M9 Medium konnte eine 2-fache P450 Menge detektiert werden. Mittels pDHE Vektor und der Chaperon unterstützen Expression konnte in allen untersuchten Medien $\sim 2,7$ mg $P450 \cdot g_{cww}^{-1}$ erzielt werden. Die Expression in pCWori erfolgte im M9 Medium am schlechtesten (0.6 mg $P450 \cdot g_{cww}^{-1}$). Die höchste Expression konnte mittels pBAD33 erreicht werden. Im Minimal Medium wurde eine Enzymkonzentration von 3,4 mg $P450 \cdot g_{cww}^{-1}$ in LB Medium von 4,3 mg $P450 \cdot g_{cww}^{-1}$ und in TB Medium bis zu 4,8 mg $P450 \cdot g_{cww}^{-1}$ exprimiert werden (Abbildung 36).

3.2.3 Transport und Abbau von Substrat und Produkt

Aufgrund der Beobachtung des Abbaus des Produkts in Ganzzell Biotransformationen in 3.2.1 setzt sich dieser Teil der Arbeit mit der Fragestellung des Transports und Abbaus des Substrats und Produkts in *E.coli* auseinander.

In vorangegangenen Studien wurde durch die Coexpression des Transportproteins AlkL ein verbesserter Transport des Fettsäuremethylesters beschrieben.^[101] Für einen erleichterten Transport von freien Fettsäuren über die Zellmembran von *E.coli* wurden in der Literatur der Fettsäuretransporter FadL beschrieben.^[136, 137] Die *fad* Proteine wurden in dieser Studie genutzt um diesen Effekt als auch den Abbau des Substrats und des Produkts zu studieren. Für einen verbesserten Transport wurde das Gen des Fettsäuretransporters FadL in pBAD18 kloniert. Unter Verwendung eines Arabinose defizienten Stamm mit dem Knock-out des Gens *fadD*, das den ersten Schritt in der β -Oxidation in *E.coli* katalysiert, sollte der Abbau des Substrates bzw. des gebildeten Produktes vermindert werden. Dieser Stamm wurde für die Biotransformation von 1 mM Hexadecansäure eingesetzt werden, da insbesondere länger-kettige Fettsäuren schlechter über die Zellmembran transportiert werden,

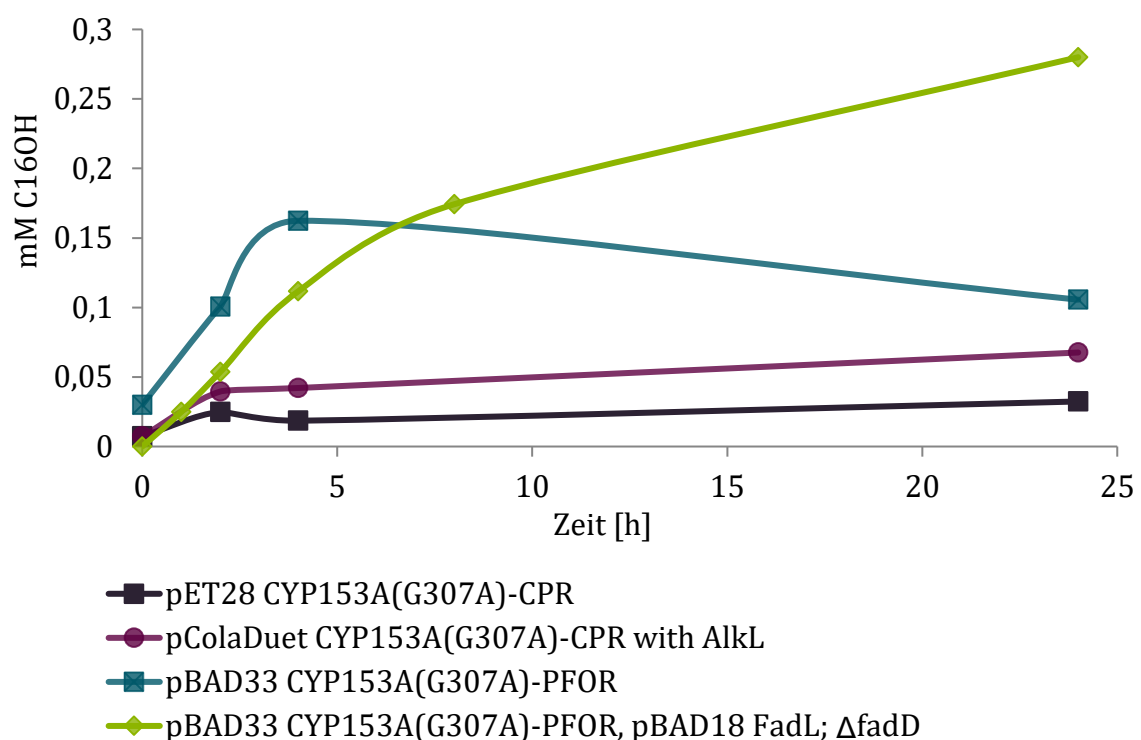


Abbildung 37 Ganzzell Biotransformationen von 1 mM Hexadecansäure mit den Fusionskonstrukten CYP153A_{M.aq}(G307A)-CPR (schwarz und lila) bzw. CYP153A_{M.aq}(G307A)-PFOR L2 (grün und türkis) coexprimiert mit einem Membrantransportprotein (AlkL (lila) bzw. FadL (grün)) in den Stämmen *E.coli* BL21 DE3 (dunkel und lila) bzw. *E.coli* BW25113 (türkis), (grün) *E.coli* BW25113 Δ fadD

In vorrausgegangenen Studien wurde bereits das Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR in Coexpression mit dem Membrantransportprotein AlkL genutzt (Abbildung 37 lila).^[101] Dieses wurde auch in dieser Studie für die Ganzzell Biotransformation von Hexadecansäure getestet. Als Vergleich wurde hier der Umsatz unter Verwendung des Fusionskonstrukts ohne Coexpression von AlkL aufgeführt (Abbildung 37 dunkel lila). Des Weiteren wurden Biotransformationen mit dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}(G307A)-PFOR L2 mit der Coexpression von FadL in pBAD18 durch *E.coli* BW25113 Δ fadD (Abbildung 37 grün) und zum Vergleich nur mit dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}(G307A)-PFOR L2 (Abbildung 37 türkis) durchgeführt. Mit dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}(G307A)-CPR ist der niedrigste Umsatz erzielt worden. Durch die Coexpression des Membrantransportproteins AlkL konnte die Produktbildung von 32 μ M ω -Hydroxy Hexadecansäure auf 67 μ M gesteigert werden. Unter Verwendung des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}(G307A)-PFOR L2 wurden nach 24 h Biotransformation 105 μ M Produkt detektiert. Nach 4 h wurden ~50 % mehr ω -Hydroxy Hexadecansäure detektiert. Unter Verwendung des Knock-out Stammes *E.coli* BW25113 Δ fadD und der Coexpression des Transporters FadL wurde kein Abbau des Produkts detektiert. Nach 24 h konnten 280 μ M ω -Hydroxy-Hexadecansäure detektiert werden (Abbildung 37). Auch in dieser Studie unterscheiden sich die P450 Konzentration in den Versuchsreihen. Generell wurde durch die Coexpression eines Membrantransportproteins die Expression des P450 Fusionskonstrukts halbiert. Trotzdem ist mit dem Konstrukt CYP153A_{M.aq}(G307A)-PFOR L2 in *E.coli* BW25113 Δ fadD und der Coexpression des Transporters FadL die höchsten Umsätze erreicht.

Proof of Principle: Einsatz der Hämvarianten im optimierten Fusionsenzym als Ganzzellkatalysator

In der Mutagenesestudie konnte für die Umsetzung von Dodecansäure die Variante Q129R als Anker für die Dodecansäure identifiziert werden. Auch die *in vivo* Biotransformation mit 1mM Dodecansäure zu ω -Hydroxy Dodecansäure konnte durch das Verwenden des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq} (Q129R)-PFOR L2 mit einer verbesserten Expression (pBAD33 in *E.coli* BW25113) mit dem knock-out Δ fadD für einen reduzierten Substrat-/ Produktabbau optimiert werden. Unter Verwendung dieses Stammes wurden 530 μ M der ω -Hydroxy Dodecansäure in 8 h in mit 50 g_{cww} L⁻¹ bei 30 °C produziert werden. Im Vergleich zu dem bisherigen Konstrukt CYP153A_{M.aq} (G307A)-PFOR L2 wurden 495 μ M der ω -Hydroxy Dodecansäure gebildet. Werden diese Ergebnisse auf die P450 Konzentration normiert, welche zwischen den Varianten unterschiedlich war (2.33 μ M für CYP153A_{M.aq} (G307A)-PFOR L2 und 1.47 μ M für CYP153A_{M.aq} (Q129R)-PFOR L2), kann zusammengefasst werden, das Variante Q129R 2-fach bessere Umsätze in der Ganzzell Biotransformation erzielte.

Tabelle 18 Ganzzell Biotransformation gegenüber Dodecansäure mit *E.coli* BW25113 Δ fadD pBAD33 CYP153A_{M.aq}(G307A)-PFOR L2 respektive pBAD33 CYP153A_{M.aq}(Q129R)-PFOR L2. Produkt (ω -Hydroxy Dodecansäure) nach 8 h detektiert.

Variante	P450 Konzentration [μ M]	ω -Hydroxy Dodecansäure [μ M]
CYP153A _{M.aq} (G307A)-PFOR L2	2.33	495 \pm 8
CYP153A _{M.aq} (Q129R)-PFOR L2	1.47	530 \pm 13

Die *in vitro* identifizierten Varianten können in die Linkervariante CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 überführt werden und mit den optimierten *in vivo* Konditionen kann eine Verbesserung des Umsatzes bezogen zum WT in gleicher Größenordnung angenommen werden.

4 Diskussion

4.1 Studien zur Optimierung einer P450-Fusionsenzym katalysierten Reaktion auf dem Enzymlevel

4.1.1 Analysen der katalytisch aktiven Hämdomäne

Die Hydroxylierung eines terminalen Kohlenstoffatoms ist chemisch die schwierigste Position eines aliphatischen Restes. Einige Fettsäurehydroxylasen, welche die subterminalen Positionen adressieren, sind bekannt. CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* ist die bisher am besten beschriebene und aktivste Fettsäurehydroxylase mit einer Selektivität für die subterminale Position.^[138] In den Arbeiten von Brühlmann wurde dieses Enzym versucht durch einige Mutagenesestudien zu einer terminalen Hydroxylase umzuwandeln.^[139] Elf Mutationen führten zu einer Selektivität von 74 %. Da diese Mutationen aus einem *random mutagenesis* Ansatz stammen, stellt dies eine Schwierigkeit dar, diese in einen rationalen Kontext zu bringen. Eine Übertragbarkeit auf homologe Enzyme ist dadurch nicht mit eindeutiger Sicherheit gegeben. Vielmehr ist eine Selektivität von 74 % nicht vorteilhafter gegenüber der chemischen Synthese. Alle in dieser Arbeit getesteten natürlichen Fusionskonstrukte, die von Proxomix vorgeschlagen wurden, wies keine Selektivität für die terminale Position auf. Eine Mutagenesestudie mit dem Ziel eine Verbesserung dieser Selektivität zu erzielen, wurde auf Grund der geringen Erfolgsaussichten, wie in den beschriebenen Analysen von Brühlmann *et al.* ^[139] als auch von Meinhold *et al.*^[140], ausgeschlossen. Eine Verfolgung dieser Enzyme im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher nicht weiter.

Das Enzym CYP153A aus *Marinobacter aquaolei* hingegen wurde für Fettsäuren mit der Kettenlänge von C8 (Octansäure) bis C20 (Eicosansäure) eine Selektivität für die terminale Position von > 95 % beschrieben. Das Substratspektrum ist jedoch beschränkt auf lineare und einfach ungesättigte Fettsäuren.^[100] Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Anwendung in Fusionskonstrukten höhere Aktivitäten erzielt werden können.^[101] Weiterhin wurden auch erste Optimierungen der Fermentationsbedingungen^[93] und semi-rationale Mutagenese^[102] zur Erhöhung der Aktivität durchgeführt.

4.1.1.1 Aufklärung der Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq}

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Enzym genauer auf die Funktionsweise analysiert werden mit dem Fokus die Enzymaktivität gegenüber Fettsäuren zu steigern und das Substratspektrum zu erweitern. Dafür wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York die Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq} gelöst.

Die Proteinstruktur wurde in zwei Formen bestimmt. Als offene Form mit dem Häm in der aktiven Tasche und als Protein-Ligand Komplex mit Häm und dem Produkt ω -Hydroxydodecanäure. Diese wurden unter dem PDB code 5fyf und 5fyg veröffentlicht. Durch die Untersuchung der Kristallstruktur und dem Vergleich mit bereits veröffentlichten P450 Kristallstrukturen konnten folgende Merkmale identifiziert werden. Ein sehr flexibler BC-Loop, der keine Unterbrechung des Loops durch eine B'-Helix aufweist, eine erweiterte F-Helix und ein verkürzter und abgeschirmter FG-Loop.

Besonders auffallend ist die Geometrie der aktiven Tasche, die trichterförmig zum aktiven Häm verläuft. Durch den Vergleich der Orientierung des Liganden in der aktiven Tasche mit der Fettsäurehydroxylase CYP102A1BM3^[141] kann der Grund für die hohe Selektivität von CYP153A_{M.aq} gegenüber des terminalen Kohlenstoffatoms geschlussfolgert werden. In CYP102A1BM3 liegt die Fettsäure horizontal in der aktiven Tasche, weshalb die subterminale Position und die terminale Position einen ähnlichen Abstand zum Häm aufweisen. Da die subterminale Position gegenüber der terminalen katalytisch bevorzugt wird, wird diese hauptsächlich hydroxyliert. Hingegen in CYP153A_{M.aq} liegt die Fettsäure vertikal in der engen Tasche, so dass nur der terminale Kohlenstoff radikalisch angegriffen werden kann. Dies kann auch durch die Variante L354I in CYP153A_{M.aq} bestätigt werden, die in der aktiven Tasche Platz für ein Abknicken des Substrats bietet.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bei einer Mutationsstudie von Yang und seiner Forschungsgruppe gemacht. Bei dem *Engineering* des terminal hydroxylierenden P450_{pyr} zur subterminalen Hydroxylierung von Alkanen, wurde eine Variante gefunden, die bei der Biotransformation von *n*-Octan 99 % als Hauptprodukt (*S*)-2-Octanol erbrachte. Die Variante resultierte strukturell in einer Erweiterung des unteren Parts der aktiven Tasche und einer horizontalen Ausrichtung des Substrats.^[142]

Auf dem BC-Loop konnte ein Glutamin an Position 129 identifiziert werden, das eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxylat des Liganden in 5fyg eingeht. Aus dieser Beobachtung wird gefolgert, dass eine Fixierung des Substrats in der aktiven Tasche stattfindet. Eine ähnliche Fixierung ist in CYP102A1BM3 beschrieben. Hier spielt ein Arginin an Position 47 eine wesentliche Rolle bei der Erkennung und Fixierung eines Fettsäuresubstrats.^[60, 143]

Sowohl in der freien Form der Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq} (pdb code 5fyf) als auch in der Struktur mit 12-Hydroxy Dodecansäure als Ligand (pdb code 5fyg) konnte keine B'-Helix identifiziert werden. Diese stellt jedoch einen festen Bestandteil in den meisten P450 Enzymen dar.^[66] Die besonders ausgeprägte Flexibilität, die auch durch die Abwesenheit von Seitenkettenresten im Kristall angedeutet wird, lässt auf eine besondere Rolle des BC-Loops für die Substraterkennung schließen. Diese konnte durch die Analysen der Substratkanäle genauer beschrieben werden (3.1.1.2 Analyse der Substratkanäle).

Die F-Helix ist im Sequenzvergleich mit einem P450 Enzym, das aus derselben Homologiefamilie stammt (CYP153A_{P.sp}), um zwei Aminosäuren erweitert. Diese Erweiterung resultiert in einer zusätzlichen Windung dieser Helix. Somit ist der Abstand der F-Helix und dem BC-Loop bis auf ca. 2,7 Å verkürzt. Auch dies deutet darauf hin, dass die Substratkanalverfügbarkeit in CYP153A_{M.aq} sich gegenüber den bisher beschriebenen unterscheiden. Des Weiteren führt die zusätzliche Windung der F-Helix zu einem verkürzten und abgeschirmten FG-Loop. In einigen Studien konnte durch eine FG-Loop Modellierung die Aktivität von P450 Enzymen gegenüber unnatürlichen Substraten gesteigert werden.^[65, 144-146] Dem FG-Loop wird deshalb die Substraterkennung als Merkmal zugesprochen.^[144]

Für den Vergleich von Aminosäureseitenketten auf identifizierten Strukturelementen von Enzymclustern wurde die Plattform 3DM von Bio-Product generiert, die auf einer einheitlichen 3D basierten Nummerierung der Aminosäuren beruht. Diese bietet die Auskunft über Aminosäureseitenketten in entsprechenden Strukturelementen, die in der Literatur durch Mutagenese zu einer Aktivitätssteigerung oder Substratverschiebung führten. Weiterhin können mit diesem Tool auch korrelierende Positionen aufgedeckt werden. Die Anwendung dieses Tools auf CYP153A_{M.aq} erlaubte keine Identifizierung logischer Positionen. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit der Tatsache zu sehen, dass eine P450 Fettsäurehydroxylase mit vergleichbar ausgeprägten Strukturelementen bisher noch nicht beschrieben wurde. Weshalb dieses Enzym strukturell weiter im Hinblick auf Substrateingangskanäle untersucht wurde.

4.1.1.2 Substratkanäle in CYP153A_{M.aq}

In P450 Enzymen liegt die aktive Tasche mit dem Häm als prosthetische Gruppe tief in der Proteinstruktur. Zu dieser verborgenen aktiven Tasche führen mehrere Kanäle von dem umgebenen Milieu in das Proteininnere. Anhand kristallographischer und molekular dynamischer Analysen konnten die Kanäle der Klasse 2 als Substratkanäle beschrieben werden.

Je nach Verlauf entlang eines Strukturelements, wie einer Helix oder eines Loops, konnten sieben verschiedene Subklasse 2 Substratkanäle (2a-f und 2ac) beschrieben werden.^[1] Diese Kanäle haben gemeinsam, dass sie durch die Strukturelemente F-Helix, G-Helix und dem dazwischen liegenden FG-Loop gebildet werden. Nicht jedes dieser Subklassen ist in jedem Enzym vorhanden. Die Kanäle 2a, 2c und 2ac konnten in der Analyse aller Kristallstrukturen, die bis März 2006 veröffentlicht wurden, am häufigsten identifiziert werden. Die Kanäle 2b, 2e und 2d wurden dabei als sekundäre Kanäle beschrieben.

Die strukturellen Unterschiede in einigen Strukturelementen in CYP153A_{M.aq} und der daraus resultierenden Substratkanalverfügbarkeit ist in Tabelle 19 im Vergleich zu der sehr gut charakterisierten Fettsäurehydroxylase CYP102A1 BM3 dargestellt.

Tabelle 19 Gegenüberstellung der P450 Fettsäurehydroxylasen CYP102A BM3 und CYP153AM.aq. Strukturelle Unterschiede sind graphisch dargestellt unter Verwendung der Kristallstrukturen pdb code: 1fag für CYP102A1 und 5fyg für CYP153A. Jeweils abgebildet das Proteingerüst als Cartoon in grau; das Häm in rot; F-Helix in lila; FG-Loop in rosa; BC-Loop (mit B'-Helix) in türkis; der Ligand (Palmitinsäure bzw. 12-Hydroxy Dodecanäure) mit gelber aliphatischer Kette; die Substratkanäle in brauntönen (analysiert mit Caver 3.0); annotierte Ausgänge nach Cojocar *et*

	CYP102A1 BM3	CYP153A M.aq
Loops	<ul style="list-style-type: none"> • BC-Loop recht starr; durch B'-Helix unterbrochen • Flexibler FG-Loop, beschrieben für die Ligandeninteraktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler BC-Loop ohne (nur teilweise eine Windung in MD Simulationen beobachtet) B'-Helix • Verkürzter FG-Loop, von F-Helix vor aktiver Tasche abgeschirmt
Helices	<ul style="list-style-type: none"> • Ausgeprägte B'-Helix 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine / nur teilweise B'-Helix • Erweiterte F-Helix, mit geringem Abstand zu BC-Loop
Substrat Kanäle	hauptsächlich als primäre beschriebene: 2a; 2d; 2b	hauptsächlich als sekundäre beschriebene: 2e; 2c; 2ac
Liganden Position	Horizontal in aktiver Tasche; mehrere C-Atome der Alkylkette haben ähnlichen Abstand zu Häm-Eisen	Vertikal in aktiver Tasche; terminales C-Atome geringsten Abstand zu Häm-Eisen
Selektivität	ω -1; ω -2; ω -3 Hydroxylierung	> 95 % ω -spezifisch

Analyse der Kristallstruktur CYP153A_{M.aq} (PDB 5fyg) mittels CAVER

Aufgrund der beschriebenen besonderen Merkmale in CYP153A_{M.aq} der Strukturelemente F-Helix, FG-Loop und BC-Loop wurde die Kristallstruktur des Enzyms auf Substratkanäle analysiert. Dabei war auffällig, dass kein 2a oder 2c Kanal gefunden wurde. Dies bestätigt, dass durch die verlängerte F-Helix und dem resultierenden verminderten Abstand zum BC-Loop ein Substrateingang an dieser Stelle nicht möglich ist. Vielmehr wurde ein Kanal identifiziert, der den BC-Loop durchdringt und nach Cojocarú *et al.* [1] dem 2e Kanal entspricht. Auch ein 2c Kanal, der an der oberen Spitze des BC-Loops die Proteinstruktur verlässt, wurde auf diese Weise gefunden. Die Vermutung, dass der BC-Loop eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung spielt, konnte somit auch bestätigt werden.

Analyse 15 frames einer MD Simulation mittels CAVER

Besonders flexible Strukturelemente stellen Loops in Enzymen dar. Die Substratkanäle in P450 Enzymen werden durch einige Loops beeinflusst. Dies trifft insbesondere auf den 2e Kanal zu, der den BC-Loop durchdringt. Dieser Kanal wurde neben dem 2c Kanal, der auch durch den BC-Loop beeinflusst wird, als einziger Substratkanal in CYP153A_{M.aq} identifiziert. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joelle Pelletier, Université de Montréal mittels MD Simulation die Bewegung dieses Loops und des gesamten Proteins verfolgt werden, um Rückschlüsse auf weitere Kanäle zu schließen.

Auf diese Weise konnte eine sekundäre Strukturbildung beobachtet werden, die eine B'-Helix entsprechen könnte. Zur Klärung dieser strukturellen Veränderung in Hinblick auf die Substratkanäle wurden 15 frames mittels Caver analysiert. Dabei konnte neben den bereits bekannten Kanälen auch ein 2ac Kanal identifiziert werden. Dieser Kanal wurde nicht in allen frames gefunden. Vermutlich wird durch die Flexibilität im BC-Loop dieser 2ac Kanal teilweise verschlossen. In allen frames wurde der 2e Kanal identifiziert, was impliziert, dass die Strukturänderung des BC-Loops keinen Einfluss auf das Vorhandensein dieses Kanals hat.

Ein 2a Kanal konnte auch innerhalb der verschiedenen Konformationen des Enzyms nicht identifiziert werden, was innerhalb der bakteriellen P450 Enzymen eine große Seltenheit darstellt.[1]

Neben CYP153A_{M,aq} sind auch weitere P450 Enzyme beschrieben, die nur über sekundäre Substratkanäle verfügen. Diese sind ein Säugetier P450 3A4 und bakterielle wie 51, 107A1 und 167A1. Das Substratspektrum dieser Enzyme variiert sehr, was mit einer hohen Variabilität im BC-Loop einhergeht. Ein Zusammenhang zwischen den Loopstrukturen und den Substratkanälen lässt sich annehmen. Jedoch ist die Komplexität der Substratkanäle noch nicht verstanden. Der Zusammenhang zwischen dem Substratkanal Portfolio und der Substratspezifität und -aktivität eines einzelnen Enzyms ist noch ungeklärt.

Neben dem Solventkanal wurde ein Weiterer mit leicht geändertem Verlauf bestimmt, als auch einige Wasserkanäle. Weiterhin wurde auch in einem frame der Kanal 1 identifiziert, der kürzlich als Sauerstoffkanal in CYP102A1BM3 beschrieben wurde.^[94] Das Vorhandensein von Xe Gas Molekülen in der Kristallstruktur von P450cam als auch die bioinformatische Analyse mit einem Gasmolekül als Ligand, konnte diesen Kanal als Sauerstoffkanal klassifizieren.^[69] Der Verlauf des beschriebenen Kanals in CYP102A1BM3 und CYP153A_{M,aq} ist von Häm beginnend bis über die F-Helix sehr ähnlich. Der Austritt aus der Proteinstruktur ist jedoch verschieden. Dies deutet darauf hin, dass neben der Interaktion zwischen Substrat und Protein im speziellen bei P450 Enzymen auch Sauerstoff als Cosubstrat für die weitere Charakterisierung und Erforschung dieser Enzyme untersucht werden muss.

Implicit Ligand Sampling Analyse

Zur Analyse der Gibb'schen freien Energie entlang der identifizierten Kanäle wurde eine Implicit Ligand Sampling Analyse durchgeführt. Mit einem 3D Algorithmus und O₂ als Probe konnten die Verläufe der Kanäle mit den geringsten Energien dargestellt werden. Aufgrund der Hydrophobizität von O₂ dient diese Analyse sowohl für O₂ als auch weiteren hydrophoben Substraten zur Identifizierung von Energiebarrieren innerhalb eines Kanals. So konnte im Kanal 1 eine Energiebarriere identifiziert werden, die zuvor auch in CYP102A1 gefunden wurde.^[94] Eine weitere energetische Barriere wurde innerhalb des 2ac Kanals identifiziert. Weiterhin ist der Verlauf dieses Kanals besonders verwinkelt.

Dies und die Tatsache, dass dieser Kanal nicht in der Kristallstruktur sondern nur in einigen frames einer Simulation gefunden wurde, lassen darauf schließen, dass dieser Kanal für einen Substrateintritt nicht besonders bevorzugt wird.

Der 2e und 2c Kanal hingegen weisen kaum Energiebarrieren auf und stellen die kürzesten Kanäle in dem Enzym dar. Diese Analyse half bei der Identifizierung von Positionen, die den Verlauf der Kanäle und energetische Barrieren beeinflussen können.

Kalkulation der freien Energie Profile

Zur Identifizierung, welcher der Kanäle durch die Fettsäure als Ligand als Substrateingang genutzt wird, wurde eine unvoreingenommene Simulation durchgeführt und mit der ABF Methode die freien Gibb'schen Energieprofile errechnet. Auf diese Weise konnte belegt werden, dass der Kanal 2e als Substrateingangskanal für den Liganden Dodecansäure dient.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kein 2a Kanal in CYP153A_{M.aq} vorhanden ist. Hierzu wurde ein Startpunkt für die Simulation gewählt, der in einem potentiellen 2a Kanal liegen würde. In dieser Simulation nimmt die freie Gibb'sche Energie bei dieser Route stetig zunimmt, was keiner katalytischen Reaktion entspricht und somit das Fehlen dieses Kanals bestätigt.

Zur theoretischen Berechnung des Substraterkennungsspektrums wurden auch die Liganden Dodecan und Dodecanamin von dieser Position aus simuliert. Für beide Simulationen ergab sich ein ähnliches Energieprofil, wie mit der Dodecansäure als Ligand. Allerdings konnte beobachtet werden, dass diese Liganden nicht den 2e Kanal passieren, sondern über den 2c Kanal zur aktiven Tasche gelangen. Daraus lässt sich auf eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen dem Liganden Dodecansäure und dem Eingang am 2e Kanal schließen. Aus den Analysen der Kristallstruktur konnte ein Glutamin an Position 129 identifiziert werden, das im Kristall 5fyg eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxylat des Liganden ω -Hydroxy Dodecansäure ausbildet. Position 129 ist im Kristall 5fyg mit der Seitenkette in die aktive Tasche orientiert und bildet mit unter Position S140, V141, P136, P135 und P128 den Substrateingang des 2e Kanals. Die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu dem Carboxylat kann eine der stabilisierenden Wechselwirkungen darstellen, die für einen Substratzugang durch den 2e Kanal für den Liganden Dodecansäure gegenüber den Liganden Dodecan und Dodecylamin begünstigt ist. Für humane P450 Enzyme wurde

ebenfalls beschrieben, dass die Wahl des Eingangskanals vom Liganden abhängig ist, während der Austritt aus der Proteinstruktur durch den selben Kanal erfolgen kann.^[147] Dies ist ein weiteres Indiz für die Hypothese des Zusammenhangs zwischen dem Substratkanal Portfolio und der Substratspezifität und -aktivität eines jeden Enzyms.

Anhand der Energie Profile können weiterhin durch die Auftragung der Entfernung zu einem Punkt (in dem Fall terminales Kohlenstoffatom des Liganden zu Häm Eisen) Regionen im Enzym identifiziert werden, an denen der Ligand durch Wechselwirkung eine Energiebarriere erfährt oder stabilisiert wird. So konnte für die Simulation der Dodecansäure bei einem Abstand des terminalen Kohlenstoffs des Liganden bis zum Häm von ca. 32 Å ein Abfall der freien Gibb'schen Energie detektiert werden.

Die Analyse der Konformationen des Liganden, die diesen Abstand aufweisen, resultierten in keiner eindeutig detektierbaren Wechselwirkungen, die spezifisch auf eine Fettsäure ausgerichtet sind. Für die Liganden Dodecan und Dodecylamin konnten keine großen Energiedifferenzen detektiert werden. Somit kann aus dieser Analyse eindeutig Q129 als wechselwirkende Aminosäure identifiziert werden, die vermutlich im Zusammenspiel mit den Positionen P128, P135, P136, S140, V141 den Zugang für andere Liganden erschwert. Es konnte theoretisch gezeigt werden, dass eine katalytische Reaktion der Liganden Dodecan und Dodecylamin mit CYP153A_{M.aq} möglich ist.

4.1.1.3 Mutagenese in CYP153A_{M.aq}

Für die Bindung von Substraten in einem Enzym sind zwei Modelle bekannt, die den Übergang von einer offenen zu einer geschlossenen Formation beschreiben. Vereinfacht wird vom Schlüssel-Schloss Prinzip gesprochen, das das Substrat als Schlüssel im passenden Schloss darstellt.^[148] Hierbei wird die Selektivität von Enzymen zu einem bestimmten Substrat besonders hervorgehoben, die durch die räumliche und chemische Komplementarität zueinander entsteht. Die Bindung in der aktiven Tasche wird dabei maßgeblich durch deren Größe. Im Besonderen aber auch durch elektrostatische, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst. Somit ist auch die Enantio- und Regiospezifität von Enzymen entscheidend durch die aktive Tasche gesteuert. Wie kürzlich am Beispiel von Ene-Reduktasen gezeigt werden konnte, ist es möglich durch eine einzige Variation in der aktiven Tasche die (*E*)-Citral Reduktion zur (*Z*)-Citral Reduktion umzukehren.^[149] Auch die Regiospezifität kann mit einer einzelnen Punktmutation geändert werden, wie in dieser Arbeit mit der Variante L354I gezeigt werden konnte. Die aktiven Taschen von Enzymen unterscheiden sich sehr in ihrer Positionierung im Proteingerüst. Es sind offen zugängliche Bindetaschen, wie bei ω -Transaminasen oder Chymotrypsin bekannt, oder eher tiefer liegende und somit schwerer zu erreichende aktive Zentren. Bei Lipasen z.B. ist ein bewegliches Strukturelement (Lid/ Deckel) beschrieben, der den Zugang zum aktiven Zentrum verschließt.^[150] Die Grenzflächenaktivierung ist verbunden mit einem Konformationsübergang des Lid und der Öffnung des Zugangs zur aktiven Tasche. Nicht nur bei Lipasen auch bei weiteren Enzymen, wie P450 Enzyme und Haloalkane Dehalogenasen, ist bekannt, dass Substratkanäle zu den jeweiligen aktiven Taschen führen, die temporär verschlossen sein können. Dies wird beim Schlüssel-Schloss Modell genauso vernachlässigt wie die Tatsache, dass Enzyme keine starren Strukturen darstellen. Vielmehr bestätigen vor allem NMR Analysen das Vorhandensein von einer Vielzahl an Konformationen.^[151]

Das conformational selection Modell beschreibt, dass sich das Substrat eines dieser vielen Protein Konformationen aussucht, welches am kompatibelsten für die Bindung ist.^[152] Es ist somit davon auszugehen, dass erst die Bewegung einzelner Strukturelemente den Zugang für das Substrat und somit die Bindung in der aktiven Tasche ermöglichen. Mit diesem Modell lässt sich auch die Bindung unterschiedlicher Substrate in der selben aktiven Tasche erklären und vielmehr auch die Promiskuität von Enzymen. Das Erforschen und Erweitern des Substratspektrums und somit das Ausreizen der Promiskuität eines Enzyms ist Ziel vieler Enzymologen.

Auch in dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass das Substratspektrum von CYP153A_{M.aq} beeinflusst werden kann. Dabei konnte durch *random mutagenesis* schon vielmals beobachtet werden, dass Positionen, die nicht in der aktiven Tasche lokalisiert sind, zu einer Erhöhung der Aktivität oder Erweiterung des Substratspektrums führten.^[73-76] Wie experimentell von Lada Biedermannova, 2012 beschrieben, führte eine Mutation im Substratkanal der Haloalkane Dehalogenase LinB zu der Veränderung der Freigabe von Bromid Ionen und somit des Reaktionsmechanismus.^[153] Auch bei P450 Enzymen, bei denen mehrere Substratkanäle bekannt sind, konnte eine Substratbindung durch eine vorangegangene Substraterkennung an der Oberfläche des Enzyms experimentell nachgewiesen werden.^[154]

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Analysen der Kristallstruktur und Substratkanäle konnten ebenso Positionen identifiziert werden, die nicht innerhalb der aktiven Tasche lokalisiert sind. Diese sollten durch Mutagenese adressiert werden, um die Hypothese der Selektivität des 2e Kanals zu bestätigen und auszubauen. Weiterhin sollte gezeigt werden, dass so auch eine Steigerung der Aktivität möglich ist. Um den Effekt der Seitenkette zu studieren, wurden diese jeweils zu einer Aminosäure mit kleiner (Alanin) oder keiner (Glycin) Seitenkette substituiert. Um den Effekt der Stabilisierung gegenüber einem Carboxylat auszubauen, wurde an den jeweiligen Positionen ein Arginin eingesetzt. Die umgekehrte Stabilisierung eines Amins sollte durch Glutaminsäure erfolgen.

Durch keine dieser Einzelvarianten war es möglich eine Umsetzung des Dodecylamins zu detektieren. Vermutlich muss dafür neben eines stabilisierenden Effekts noch weitere Öffnungen der Kanäle erfolgen. Weiterhin ist nicht bekannt, ob eine Stabilisierung durch Glutaminsäure die Geeignetste ist. Um diese Aspekte zu

untersuchen, wäre eine Mutagenese via CASTing von Vorteil um Aminosäuren auszutauschen und jeweils zu kombinieren. Damit wären Aussagen über den Einfluss verschiedener Aminosäurereste möglich. Diese Methode ist jedoch mit einem größeren Screeningaufwand verbunden, wofür ein *high-throughput Screening Assay* notwendig ist. Solch einer wurde in einer betreuten Masterarbeit (Lea Rapp) bereits für Dodecansäure etabliert und soll in weiteren Arbeiten für ein breiteres Substratspektrum ausgebaut werden. Weiterhin konnte auch kein Umsatz mit Dodecan detektiert werden. Dies liegt vermutlich an der schlechten Löslichkeit.^[155] Zwar wurden für die Bioreaktionen 2 % Cosolvent (DMSO oder Ethanol) eingesetzt, jedoch ist dies vermutlich unzureichend um eine ausreichende Löslichkeit zu erreichen. So wurde ein kürzeres Alkan gewählt, das besser in wässrigen Lösungen löslich ist. Um Aussagen treffen zu können, ob die jeweiligen Varianten einen Einfluss auf die Eigenschaft des Substrats (Alkan oder Fettsäure) oder die sterischen Wechselwirkungen überwiegen, kann der Vergleich der Umsätze gegenüber der kürzerkettigen Fettsäure Octansäure herbeigezogen werden.

In den Analysen der Kristallstruktur und der Substratkanäle konnte das Glutamin an Position 129 bereits als stabilisierender Aminosäureseitenkettenrest für das Carboxylat der Dodecansäure beschrieben werden. Dies konnte durch die Mutagenesestudie bestätigt werden. Durch den Austausch des Glutamins zu Arginin konnte für die Dodecansäure als auch für die kürzere Octansäure eine bis zu 2,2-fache Steigerung des Umsatzes erzielt werden. Dies galt nicht für die längere Fettsäure Hexadecansäure. Vermutlich überwiegen in dem Fall die sterischen Hindernisse, was zu einer gleichbleibenden Aktivität führte. Jedoch konnte ein ähnlicher Effekt für dieses längere Substrat an der sterisch begünstigteren Position 140 beobachtet werden.

Für die Variante Q129R konnten kinetische Daten den Fakt der besseren Stabilisierung gegenüber Dodecansäure bestätigen. Ein erniedrigter K_M mit $67 \mu\text{M}$ gegenüber $81 \mu\text{M}$ beim WT von CYP153A_{M.aq} weist auf eine bessere Bindung hin.

Weitere stabilisierende Effekte müssen damit entlang des 2e Kanals auftreten. Da durch den Verlust des Glutamins an Position 129 durch Substitution zu Alanin nur eine leicht verschlechterte oder gleichbleibende Aktivität gegenüber den drei getesteten Fettsäuren detektiert werden konnte. Vermutlich handelt es sich hierbei um hydrophobe Wechselwirkungen der Alkylkette. Diese könnten auch zu einem Alkan ausgebildet werden. Weshalb vermutlich durch die Variante Q129A der 2e Kanal für eine weitere Substratgruppe (Alkane) zugänglich gemacht werden konnte. Durch die Eliminierung der polaren Seitenkette konnte der Umsatz gegenüber einem Alkan (*n*-Octan) um das 2-fache gesteigert werden.

Auf alle getesteten Fettsäuren übte sich auch das Einführen der Argininseitenkette an Position 142 positiv aus. Der Effekt des Ersetzens der Glutaminseitenkette an dieser Position überwiegt jedoch und übt sich auch auf die Umsätze mit *n*-Octan aus.

Neben den 2e Kanal beeinflussenden Positionen wurden auch Positionen adressiert, die den Substratzugang am 2c Kanal beeinflussen. Dieser Kanal wurde in den Simulationen als Zugang zum aktiven Zentrum für die Liganden Alkan und Amin bestimmt. Auch mit den Einzelvarianten an diesem Kanal konnte kein Umsatz des Amins detektiert werden. Die Aminosäureseitenketten an Position 242 und 245 scheinen sterisch den Zugang zu diesem Kanal zu behindern, weshalb durch die Substitution durch Alanin eine Steigerung des Umsatzes für *n*-Octan detektiert werden konnte. Vermutlich stellt dieser Kanal auch einen Produktausgangskanal für die Fettsäuren dar, da durch die Variante M245A gegenüber dem WT der CYP153A_{M.aq} ein erhöhter Umsatz detektiert werden konnte. Die lange Seitenkette des Methionins an dieser Position verursacht vermutlich eine sterische Behinderung, so dass der Verlauf des 2c Kanals an dieser Stelle nicht gerade ist, sondern eine 90° Wendung eingeht.

Zur Öffnung des nicht in allen Konformationen von CYP153A_{M.aq} vorhandenen 2ac Kanals konnte an Position 231 ein Glycin eingesetzt werden. Auf diese Weise konnte der Umsatz gegenüber Dodecansäure bis auf das 3-fach gesteigert werden. Gegenüber den anderen Fettsäuren und auch dem Alkan konnten mit dieser Variante nicht solche Steigerungen erzielt werden. Es konnten jedoch auch keine Nachteile beobachtet

werden. Auch mit der bereits in Vorarbeiten beschriebenen Variante S233G^[156] konnte eine Erhöhung des Umsatzes detektiert werden, was vermutlich auf den gleichen Effekt zurückzuführen ist.

Ähnlich, wie an Position 129, 140 und 142 führte eine Substitution durch eine Argininseitenkette an 231 vermutlich zu einer Stabilisierung der Dodecansäure in der aktiven Tasche. Weiterhin konnte der Austausch des Prolins an Position 135 durch ein Alanin vermutlich zu einer Vergrößerung des Abstandes von BC-Loop zu der Erweiterung der F-Helix führen und somit auch zu einer Öffnung des 2ac Kanals führen. Dies führte zu einer Umsatzsteigerung für alle getesteten Fettsäuren. Gegenüber *n*-Octan war der Effekt jedoch nicht detektierbar. Dieselbe Substitution an dem benachbarten Prolin führt zu einer nicht mehr funktional exprimierbaren Variante. Allgemein gelten Proline auf Grund des Vorhandenseins eines sekundären Amins als Strukturbrecher einer α -Helix.^[157] Durch das Ersetzen dieses Prolins ist vermutlich die Flexibilität zu erhöht, was eine korrekte Faltung des Enzyms beeinträchtigt.

Ausgewählte Varianten, mit denen eine Erhöhung des Umsatzes erzielt wurde, wurden kombiniert. Die funktionale Optimierung von Lipasen^[158], Phosphotriesterase^[159] und weiteren Enzymen ist durch solche kombinatorische Mutagenese unter anderem von Reetz und seinen Mitarbeitern beschrieben.

Solch additive Effekte, wie sie für Beispiele aus *random mutagenesis* Konzepten beschrieben wurden^[15, 160, 161], konnte in dieser Studie nur für ein paar Einzelfälle beobachtet werden. Grund hierfür ist vermutlich, die mangelnde Sättigung an den jeweiligen Positionen. Mit der hier beschriebenen Strategie, des Austausches gegen drei/vier Aminosäuren Alanin/Glycin, Arginin und Glutaminsäure, konnten nicht mehrere Aspekte, wie biochemische und sterische Eigenschaft, betrachtet werden. Um die optimalste Variante zu finden, müssen all diese Aspekte abgedeckt werden. Dies geht jedoch mit einem großen Screeningaufwand einher, der ohne die Verwendung eines *high-throughput* Assays nicht möglich ist.

Es konnte jedoch beobachtet werden, dass meist Doppelvarianten ihre positiven Einflüsse addierten, wenn die einzelnen adressierten Positionen auf unterschiedlichen Strukturelementen lokalisiert sind. So konnte für *n*-Octan eine ~ 2-fache Steigerung des Umsatzes durch die Kombination einer Variante des BC-Loops mit der Variante G307A, eine aus Vorarbeiten identifizierte auf der I-Helix lokalisierte Variante.^[100] Die Einzelvarianten selber erreichten nur eine Erhöhung der Aktivität von bis zu 15 %. Die höchste Umsatzsteigerung gegenüber *n*-Octan wurde jedoch mit der Variante Q129R / E142A erreicht. Beide Varianten sind auf dem BC-Loop lokalisiert. Hierbei addieren sich vermutlich der positive Effekt der Sterik für die lange Seitenkette an Position 129, die auch für die kürzerkettige Fettsäure Octansäure beobachtet wurde, als auch die Eliminierung der negativ geladenen Seitenkette der Glutaminsäure an Position 142 durch den Austausch zu Alanin. So entstand vermutlich ein für das Alkan zugänglicher 2e Kanal, mit einer stabilisierend wirkenden Aminosäureseitenkette in der aktiven Tasche. Der Ausbau des positiven Effekts der Öffnung des 2e Kanals für ein Alkan durch Q129A war jedoch nicht möglich.

Für die Umsätze gegenüber der Fettsäuren konnten die Varianten, mit der Mutation A231G als besonders positiv identifiziert werden. Diese Mutation eröffnet vermutlich den 2ac Kanal und kann mit einer weiteren stabilisierenden Mutation die Aktivität gegenüber Fettsäuren für dieses Enzym deutlich steigern. So konnte die besten Variante für Hexadecansäure S140R / A231G bzw. S140R / P135A für Dodecansäure A231G und für Octansäure A231G / G307A identifiziert werden.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Analyse der Substratkanäle eine erfolgreiche Methode zur Identifizierung von Position zur Steigerung der Aktivität war. Auf Positionen, wie 135, 231 oder 245 wäre ohne den genauen Verlauf der Kanalstrukturen und der energetischen Berechnungen keine rationale Herleitung möglich gewesen.

4.1.2 Wechselspiel Häm- und Reduktase Domäne

Hinsichtlich der Hydroxylierung nicht aktivierter sp^3 -Kohlenstoffverbindungen wurde CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* in der Literatur als das aktivste P450 Enzym beschrieben mit einem k_{cat} von 17000 min^{-1} für Arachidonsäure.^[60] Es besteht aus einer FAD und FMN abhängigen Reduktasedomäne, die natürlicherweise an die Häm-domäne über einen Polypeptidlinker fusioniert ist. Um die Aktivität von P450 Enzymen zu verbessern, wurden in einigen Arbeitsgruppen artifizielle Fusionskonstrukte konstruiert. ^[78-80, 97, 162-164] Der Einfluss war jedoch geringer als erwartet.^[63, 81, 82] Insbesondere bei artifiziellen Fusionskonstrukten bietet das Zusammenspiel der Reduktasepartner und der Häm-domäne Raum für Optimierungen. Hierbei spielen die Interaktionsflächen auf der Oberfläche der Proteine, als auch der die beiden Domänen verbindenden Linker eine entscheidende Rolle.

4.1.2.1 Einfluss der Reduktase Partner Interaktionsflächen in einem Fusionskonstrukt

Aufgrund der Tatsache, dass im Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR die Domänen unterschiedlicher Klassen gehören, wurde durch Angleichung der RPI's von Klasse I der CYP153A_{M.aq} an Klasse II eine Steigerung der Aktivität resultierend aus einer gesteigerten Kopplungsrate erwartet. Dies konnte bereits auch schon für einige Beispiele gezeigt werden.^[165-168]

Durch die Variante K166Q konnte letzteres auch erreicht werden. In der von Ba *et al.* beschriebene Studien wird darauf hingewiesen, dass eine gesteigerte Kopplungsrate nicht zwangsweise eine gesteigerte Aktivität mit sich bringt und *vice versa*.^[165] Auch in dieser Studie führte eine gesteigerte Kopplungsrate nicht zu einer gesteigerten Aktivität gegenüber Dodecansäure. Vermutlich basiert die verbesserte Kopplungsrate auf einer entschleunigten Elektronenübertragung, die somit zu einer langsameren Katalyse führt. Dies bestätigen die initialen Raten der Variante, die um den Faktor 10 geringer ist als die des Wildtyps. Dies resultiert jedoch nur in einem 4-fach niedrigeren Gesamtumsatz. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in der Analyse des Elektronentransfers über eine Elektrode zu der Häm-domäne von CYP102A1 BM3 angestellt.^[169]

Diese Studie zeigt auf, dass eine Optimierung der Reduktase Interaktionsflächen, Potentiale für ein verbessertes Fusionsystem, das aus Domänen besteht, die unterschiedlich klassifiziert werden. Um sowohl eine gesteigerte Kopplungsrate und Aktivität zu erhalten, müssen vermutlich mehrere Positionen betrachtet werden.

4.1.2.2 Einfluss der Linker Länge in einem Fusionskonstrukt

Neben dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR wurden zwei weitere Fusionskonstrukte zu Reduktasen konstruiert, die dieselbe Kofaktorzusammensetzung aufweisen, wie die natürlichen Reduktasen von CYP153A_{M.aq}. Zur Konstruktion dieser Fusionskonstrukte wurden die jeweiligen natürlichen Polypeptidlinker der Reduktasen genutzt. Diese drei Fusionskonstrukte wurden in der Biotransformation gegenüber der Hydroxylierung von Dodecansäure miteinander verglichen. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Linkerlänge auf die Aktivität zu studieren, um ein aktiveres P450 Enzym für die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren zu generieren. Da das Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR im Vergleich die gleiche initiale Rate wie CYP153A_{M.aq}-CPR aufwies, mit dem Vorteil dieselbe Kofaktorzusammensetzung, wie die natürlichen Reduktasen von CYP153A_{M.aq} zu tragen, wurde dieses Konstrukt für die Linkerlängenvariation gewählt.

Poulos und seine Mitarbeiter studierten den Einfluss des Linkers im natürlichen Fusionskonstrukt CYP102A1. Dabei variierten sie die Länge^[170] und in einem weiteren Ansatz die Aminosäuresequenz des Linkers^[171]. Bei einer Verkürzung des Linkers um drei respektive sechs Aminosäuren wurde ein Aktivitätsverlust von 89 % respektive 99 % detektiert. Nur 53 % Aktivitätsverlust wurde bei der Substitution dreier Positionen im Linker durch Alanin beobachtet. Somit wurde der Schluss getroffen, dass die Linkerlänge die Aktivität zu einem größeren Anteil beeinflusst, als die Aminosäuresequenz. In einem artifiziellen Fusionskonstrukt zwischen P450_{cam} und der Reduktasedomäne von CYP116B2_{Rhf} konnte in der Arbeitsgruppe von Flitsch durch eine Linkerlängenverlängerung eine Verbesserung bis zu 42 % nach 24 h in einem Ganzzellumsatz erzielt werden.^[172] Basierend darauf sollte in dieser Studie der Fokus auf der Linkerlängenvariation liegen.

Eine Linkerlängenvariation geht mit einer Sequenzänderung einher, weshalb der Linkerbereich in der Homologiefamilie von CYP116 vorab bioinformatisch analysiert wurde. So erfolgte die Auswahl und Konstruktion der Linkervarianten auf der Grundlage der Analyse der konservierten Aminosäuren.

Drei der konstruierten Linkervarianten (L1, L2 und L3) zeigten höhere initiale Raten, als das Fusionskonstrukt mit dem wildtypischen Linker. Anders als bisher in der Literatur beschrieben^[170-172], hat eine Verkürzung des Linkers zu einer Verbesserung geführt. Dies deutet darauf hin, dass die vorrausgegangenen bioinformatischen Analysen notwendig für die Identifizierung der zu veränderbaren Regionen im Linker sind. So wurden lediglich nicht konservierte Aminosäuren für eine Verkürzung entfernt.

Eine Erklärung, warum die Linkervarianten mit einer Länge über 18 Aminosäuren weniger optimale Ergebnisse liefern, als mit den Kürzeren (L1 – L3) kann durch ein Modell gezogen werden, das mit SwissModel aus dem zuvor generierten Homologiemodell von CYP153A_{M.aq} und der Kristallstruktur der Reduktasedomäne PFOR (PDB Code: 2PIA) von Łukasz Gricman erstellt wurde.^[133] Hierin ist zu sehen, dass die längste Linkervariante mit 32 Aminosäuren Loop Konformationen aufweist. Vermutlich können die Häm- und Reduktasedomäne so miteinander interagieren. Dies stellt jedoch keine optimale Elektronenübertragung dar, wohingegen die Linkerlängen L1-L3 mit der geschätzten Länge zwischen dem C-terminalen Aminosäureseitenrest der Häm-domäne und dem N-terminalen Aminosäureseitenrest der Reduktasedomäne entspricht.

Die weiteren Charakterisierungen der Linkervarianten zeigen, dass eine optimierte Elektronenkopplung mit einer verbesserten Stabilität einhergehen und auf diese Weise ein artifizielles Fusionskonstrukt verbessert werden kann. Eine Verbesserung der Aktivität von 67 %, der Stabilität des Fusionskonstrukts von 17 %, der Stabilität der Häm Domäne von 67 % und eine ideale Kopplungsrate von 94% wurden so erreicht.

4.2 Studien zur Optimierung einer P450-Fusionsenzym katalysierten Reaktion auf der Zellebene

Auf Grund der Komplexität des P450 Systems bietet die Anwendung in ganzen lebenden Zellen große Vorteile.^[173, 174] Das in dieser Arbeit entwickelte Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L3 mit entsprechender Mutation in der Häm Domäne sollte erfolgreich für den Umsatz von Fettsäuren eingesetzt werden. Dabei konnten vier Stellschrauben identifiziert werden, die ein Ganzzellsystem maßgeblich beeinflussen.

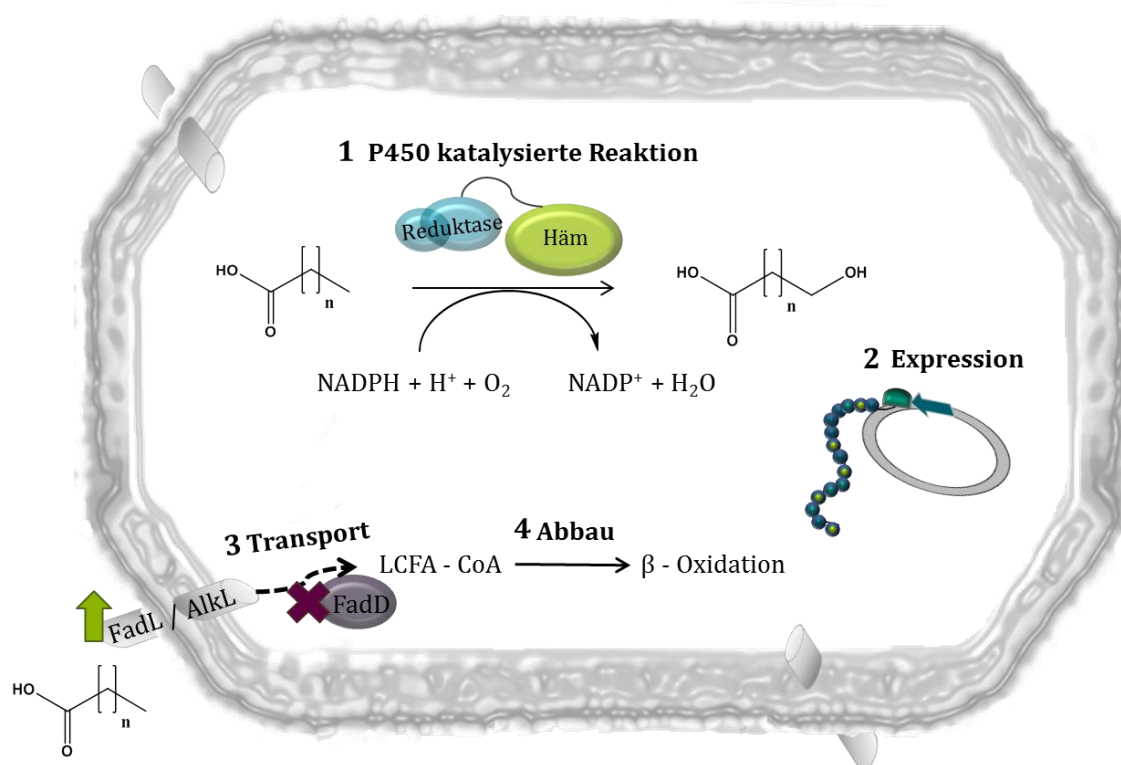


Abbildung 38 Identifizierte Potentiale in einer P450 basierten Ganzzell-Katalyse von Fettsäuren zu deren korrespondierenden Hydroxy-Fettsäuren. (1) katalysierte Reaktion durch Fusionskonstrukt oder mit Hilfe von coexprimierten freien Reduktasen; (2) Expression des Enzyms; (3) Transport von Fettsäuren über die Zellmembran; (4) Abbau der Fettsäuren durch die β -Oxidation des Kulturstammes.

Vorerst war zu Prüfen ob eine Fusion der Reduktasedomäne (1) an die Häm-domäne auch in einem Ganzzellsystem vorteilhaft ist, oder ob durch eine Coexpression freier Reduktasen eine bessere Katalyse möglich ist.

Ferner wurde beobachtet, dass der Umsatz mit der Menge an aktivem Enzym einhergeht, weshalb ein Hauptaugenmerk auf die Expression (2) des Fusionskonstrukts gelegt wurde.

Weiterhin wurde für längerkettige Fettsäuren auch die Erschwernis des Transports (3) dieser durch die Zellmembran aufgedeckt. Neben dem Transport konnte auch der Abbau (4) der Fettsäuren und des hydroxylierten Produkts beobachtet werden. Beides konnte durch die Regulation der Expression der *fad* Gene gesteuert werden (Abbildung 38).

4.2.1 Fusionskonstrukte und freie Reduktasen

Aus der Studie der Linkervariation konnte beobachtet werden, dass die Reduktasedomäne in einem Fusionskonstrukt die weniger stabile Einheit darstellt. Industriell erfolgreich eingesetzte P450 Systeme stellen oftmals die Kultivierung des natürlichen Stammes oder im Falle des rekombinanten Einsatzes des natürlichen Operons dar.^[88, 91, 92] Deshalb wurde auch in dieser Studie untersucht, ob der Einsatz eines Fusionskonstrukts für den Umsatz von Fettsäuren mit einem Ganzzellkatalysator vorteilhaft ist.

Vorerst wurde hierzu *in vitro* getestet, welche freien Reduktasen zur Rekonstruktion der Aktivität von CYP153A_{M.aq} in Frage kommen, da die Expression der natürlichen Reduktase bisher nicht erfolgreich bewerkstelligt werden konnte.^[100] Dazu wurden die bereits bekannten Reduktasedomänen CamA und CamB aus *P. putida*, Bovine AdR und Adx und *E.coli* eigene FdR und Fdx.

Alle sechs Proteine konnten erfolgreich exprimiert und gereinigt werden. Im Cytochrome c Assay konnte auch die reduzierende Wirkung nachgewiesen werden. Im Einsatz in einer Biotransformation mit CYP153A_{M.aq} wurde nur mit den Reduktasen CamA und CamB ein Umsatz detektiert. Dabei wurden alle Reduktasen mit einem Überschuss an Ferredoxin eingesetzt. Dies wurde für die meisten Reduktasen als optimal beschrieben.^[99] Da nur mit CamA und CamB die Aktivität von CYP153A_{M.aq} rekonstruiert werden konnte, wurden diese für eine Coexpression in einen Duet Vektor kloniert. So war sichergestellt, dass jedes Protein unter eigenem Promotor für die rekombinante Expression induziert werden konnte.

In der Biotransformation von Dodecansäure wurde mit diesem Ansatz ein halbiertes Umsatz erzielt im Vergleich zu dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR. Somit lässt sich schließen, dass eine Katalyse in einem Ganzzell Ansatz mit einem Fusionskonstrukt vorteilhafter ist.

Vermutlich ist in dem System das Verhältnis der Reduktase zu Ferredoxin und Häm-domäne nicht ideal ausbalanciert. Jedoch ist dies schwierig zu realisieren. Bisher beschrieben werden konnte eine erhöhte Expression der Reduktase-domäne durch mehrfache Insertion des Gens.^[175] Da die Expression der Häm-domäne jedoch schon so gering ausfiel und eine weitere Coexpression der Reduktase-gene diese noch weiter senken würde, wurde dieser Ansatz nicht in Betracht gezogen.

In der Literatur wurde beschrieben, dass eine durch die Anwendung nicht fusionierter Reduktasen höhere Produkt-titer in Ganzzell Biotransformationen erzielt wurden.^[175] Diese Studie wurde erfolglos nachgestellt.

Erstaunlich war die Beobachtung des schlechten Ergebnisses für die Biotransformation mit dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L3. Dies wurde *in vitro* gegenüber dem Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR deutlich effizienter bewertet. Auffallend war, dass die Expression des Konstrukts mit der PFOR Reduktase 10-fach niedriger ausfiel. Weiterhin konnte in dieser als auch in vorhergehenden Arbeiten^[93] beobachtet werden, dass die Expression unregelmäßig große Schwankungen aufwies. Dies sollte in der nachfolgenden Studie untersucht werden.

4.2.2 Expressionsstudie von CYP153A_{M.aq} in *E.coli*

P450 Enzyme stellen auf Grund ihrer Fähigkeit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies für Zellen zelltoxische Proteine dar. Diese sind bekanntlich schwerer zu exprimieren. Die meisten in der Literatur beschriebenen rekombinanten Proteinexpressionen erfolgen unter der Kontrolle eines T7 Promotor Systems.^[105, 134] Bekannt ist, dass diese Expression nicht strikt reguliert werden kann, was insbesondere für die Expression von zelltoxischen Proteinen von Nachteil sein kann.^[176] Für die Expression von humanen P450 Enzymen ist auch der Vektor pCWori bekannt, der unter Kontrolle des *tac* Promotors steht.^[177, 178] Dieser Operator ist ein Hybrid bestehend aus der -35 Region des *trp* Promotors und der -10 Region des *lacUV5* Promotors und ist somit, wie auch der *lac* Promotor durch die basale Expression der T7 Polymerase nicht strikt regulierbar.^[135]

Da in den vorangegangenen Studien eine sehr unregelmäßige Schwankung und generell eine sehr niedrige Expression der konstruierten Linkervarianten beobachtet wurde, sollte untersucht werden, ob strenger regulierbare Promotoren einen Einfluss

auf die Expression haben. Neben dem pET28 und pCWori wurden die Promotoren pBAD33 mit dem *ara* Operon und der pDHE mit einem *rha* Operon verwendet. Für die Expression mit pDHE wurde der Rhamnose defiziente Stamm *E.coli* TG10+ verwendet, der zusätzlich noch über ein Plasmid verfügt, das für Chaperone kodiert. Diese sind Faltungshelfer, die besonders bei großen Proteinen für eine korrekte Faltung von Vorteil sind.^[179] So konnte auch in Studien von Yamasaki und seinen Mitarbeitern die P450 Expression optimiert werden.^[180] Auch in dem Fall der Linkervarianten handelt es sich um große Proteinen mit einem Molekulargewicht von 119 kDa.

Des Weiteren wurde in einigen Studien gezeigt, dass das Kulturmedium das Wachstum der Zellen und damit einhergehend die Expression beeinflusst.^[181] In dieser Studie wurden die Komplexmedien TB und LB Medium als auch das Glycerol basierende Minimalmedium M9 verwendet, da Glukose die Induktion der *ara* und *rha* Promotoren inhibiert.^[182-184]

Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des strenger regulierbaren Promotors *rha* unter Verwendung von Chaperonen medienunabhängig eine höhere Expression möglich war. Die höchste Expression wurde mit dem *ara* Promotor in dem Komplexmedium TB erzielt. Leicht niedrigere Expressionen ergaben sich im Minimalmedium, vermutlich auf Grund des langsameren Wachstums der Zellen, jedoch ist auch in dem Fall eine Verdreifachung der Expression zu den vorrausgegangenen Bedingungen erzielt worden.

4.2.3 Transport und Abbau von Substrat und Produkt

Die Aktivität *in vitro* gegenüber längerkettigen Fettsäuren nimmt für CYP153A_{M.aq} ab.^[100] Gegenüber der Hexadecansäure konnte nur die Hälfte der Aktivität, wie für Dodecansäure detektiert werden, was $\sim 40\%$ Umsatz nach 1 h Biotransformation von 200 μM Substrat entsprach. Diese Aktivität konnte hingegen *in vivo* nur zu einem Fünftel wiedergefunden werden.

Es sollte überprüft werden, ob ein effektiver Transport dieser langkettigen Fettsäure über die Zellmembran in *E.coli* erfolgt. Als Vergleich wurde der in den vorangegangenen Arbeiten beschriebene Stamm und das Transportsystem AlkL herangezogen.^[101] Weiterhin wurde vor allem beim Einsatz des Arabinose defizienten Stammes *E.coli* BW25113 ein Abbau der Fettsäure und des hydroxylierten Produkts beobachtet. Durch den Einsatz des Transportsystems AlkL, das in vorangegangenen Studien für einen optimierten Transport von Alkylestern beschrieben wurde,^[101, 185-187] konnte eine Verdopplung des Umsatzes erzielt werden, was einem Titer von 19 mg L^{-1} ω -Hydroxy Hexadecansäure entsprechen würde. Dies bestätigt die Hypothese, dass ein Transport der längerkettigen Fettsäure über die Zellmembran nicht optimal ist. Eine optimierte Expression des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 konnte allein zu einer weiteren Steigerung des Umsatzes und somit einer Produktkonzentration von 29 mg L^{-1} , trotz gleicher Enzymkonzentration wie CYP153A_{M.aq}-CPR.

Für den Transport von Alkanen ist der Transporter AlkL beschrieben,^[188] weshalb nach alternativen spezifischeren Transportern für Fettsäuren gesucht wurde. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sowohl die Fettsäure als Substrat, als auch das hydroxylierte Produkt von dem Stamm *E.coli* BW25113 abgebaut wird, weshalb nach 4 h Biotransformation 162 μM und nach 24 h nur noch 106 μM Produkt detektiert werden konnten. Die *fad* Gene sind in *E.coli* für den Abbau und Transport von Fettsäuren beschrieben.^[189]

Durch die Überexpression des Gens *fadL*, das als Fettsäuretransporter gilt^[188] und die Deletion des *fadD*, das als erstes Gen in der β -Oxidation von Fettsäuren beschrieben wurde,^[137, 190, 191] konnte eine weitere Steigerung bis auf eine Produktkonzentration von 77 mg L^{-1} erreicht werden. Dies entspricht einer 9-fachen Verbesserung des Ganzzellsystems zum bisher beschriebenen aktivsten terminal hydroxylierenden Fusionskonstrukts.^[93]

Tabelle 20 Tabellarische Aufzählung der Optimierungen des Ganzzell Stammes für die terminale Hydroxylierung gegenüber 1 mM Hexadecansäure unter Verwendung eines Fusionsystems von CYP153A_{M.aq}

Verbesserung	Stamm	Enzyme	ω -Hydroxy-Hexadecansäure
	<i>E. coli</i> BL21	pET28 CYP153A _{M.aq} (G307A)-CPR	32 μ M \pm 9 mg L ⁻¹ nach 24 h
Transport	<i>E. coli</i> BL21	pColaDuet CYP153A _{M.aq} (G307A)-CPR AlkL	68 μ M \pm 19 mg L ⁻¹ nach 24 h
Expression Fusion	<i>E. coli</i> BW25113	pBAD33 CYP153A _{M.aq} (G307A)-PFOR L2	106 μ M \pm 29 mg L ⁻¹ nach 24 h
Expression Fusion	<i>E. coli</i> BW25113	pBAD33 CYP153A _{M.aq} (G307A)-PFOR L2	162 μ M \pm 44 mg L ⁻¹ nach 4 h
Transport Expression Fusion Abbau	<i>E. coli</i> BW25113 Δ fadD	pBAD33 CYP153A _{M.aq} (G307A)-PFOR L2 pBAD18 FadL	280 μ M \pm 77 mg L ⁻¹ nach 24 h

Zeitgleich konnten diese Studien von Byung Gee Kim bestätigt werden.^[192] In dieser Studie wurde CYP153A_{M.aq} mit den Reduktasepartnern CamA und CamB und dem Fettsäuretransporter FadL in *E. coli* BW25113 (DE3) Δ fadD coexprimiert. In einer fed-batch Biotransformation mit 10 mM Hexadecansäure konnten nach 36 h 8,8 mM ω -Hydroxy Hexadecansäure detektiert werden, was einer 5,5-fachen Steigerung gegenüber des wildtypischen Stammes ohne der Deletion des *fadD* Gens und der Coexpression des FadL Transporters. Die in dieser Studie berichteten hohen Produkttiter lassen sich vermutlich durch die Verwendung der Detergenz Triton X-100 und der Durchführung der Biotransformation als fed-batch mit einer Glukosezugabe nach pH erreichen. Diese als auch die vorangegangenen Studien zur Prozessoptimierung der Dodecansäure Hydroxylierung mittels des Fusionskonstrukts CYP153A_{M.aq}(G307A)-CPR^[93] zeigen auf, welche weitere große Steigerung des Umsatzes durch eine Anpassung der Reaktionsbedingungen erreicht werden kann.

5 Fazit und Ausblick

Das Enzym CYP153A_{M.aq} aus *Marinobacter aquaolei* ist auf Grund der besonders herausfordernden Spezifität für die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren von industrieller Sicht sehr interessant. Durch die niedrige Aktivität, Stabilität und der daraus resultierenden Produktivität ist dieses Enzym in einem industriellen Prozess noch nicht einsatzfähig. Mit dem Ziel diese limitierenden Aspekte in einer P450-Fusionsenzym katalysierten Reaktion zu optimieren, konnten in dieser Arbeit verschiedene einflussreiche Faktoren beleuchtet werden.

Die Studien beliefen sich sowohl auf dem Bereich des Einsatzes in einem Ganzzellkatalysator als auch im Detail auf unterschiedliche Aspekte auf der Enzymebene. Hierbei wurde das ganzheitliche Fusionsenzym hinsichtlich der Elektronenübertragung und der damit einhergehenden Stabilität des Enzyms analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Anpassung der Reduktasepartner Interaktionsflächen auf der Oberfläche der Häm-domäne eine effizientere Elektronenübertragung ermöglicht wird. Weiterhin wurde in einer umfassenden Studie gezeigt, dass auch die Länge des Linkers einen entscheidenden Einfluss auf die Elektronenübertragung und darüberhinausgehend auch auf die Stabilität und Aktivität in einer Fusion zu Reduktasepartnern mit ähnlichen prosthetischen Gruppe hat. Durch diese Studien konnte gezeigt werden, dass eine Optimierung des Zusammenspiels der Reduktasedomäne mit der Häm-domäne nicht nur die Elektronenübertragung verbessert werden konnte. Damit einhergehend ist auch die Stabilität des Fusionsenzym optimiert worden als auch die Aktivität, die in dem Zusammenhang von besonderem Interesse war.

Die Kristallstruktur der für die Katalyse relevante Domäne Häm konnte in Kooperation mit Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York, aufgeklärt werden. Die Kristallstruktur deckte einige charakteristische Strukturelemente auf. Mit diesen konnte die Selektivität des Enzyms beschrieben werden.

Weiterhin ließen die charakteristischen Strukturelemente erahnen, dass das Substratkanalportfolio sich von den bisher für P450 Enzyme beschriebenen unterscheidet. Eine Analyse der Kristallstruktur CYP153A_{M.aq} mittels CAVER deckte drei Kanäle (2c, 2e und den *Solvent* Kanal) auf. Auf Basis von MD Simulationen, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joelle Pelletier der Universität

Montréal durchgeführt wurden, wurde der 2e Kanal für Laurinsäure als energetisch favorisiert bewertet. Durch praktische Versuche konnte dies verifiziert werden. So konnten für CYP153A_{M.aq} durch rationales Proteindesign einige wichtige Positionen in Bezug auf Substratspezifität und Selektivität identifiziert werden. Weiterhin konnte in dieser Mutagenesestudie gezeigt werden, dass durch die Identifizierung von Schlüsselpositionen das Substratspektrum von Fettsäuren hin zu Alkanen erweitert werden konnte.

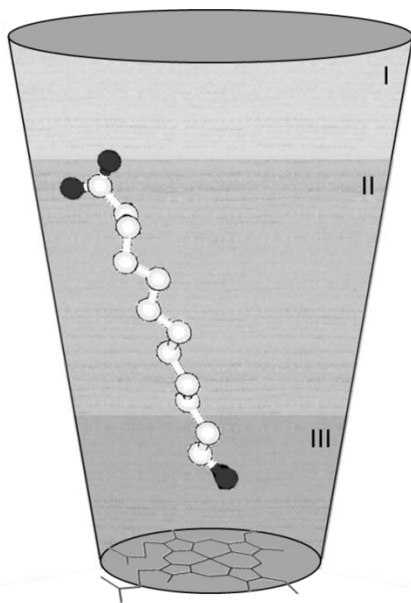
Neben CYP153A_{M.aq} sind auch weitere P450 Enzyme beschrieben, die nur über sekundäre Substratkanäle verfügen. Diese sind ein Säugetier P450 3A4 und bakterielle wie 51, 107A1 und 167A1. Das Substratspektrum dieser Enzyme variiert sehr, was mit einer hohen Variabilität im BC-Loop einhergeht. Ein Zusammenhang zwischen den Loopstrukturen und den Substratkanälen lässt sich annehmen. Jedoch ist die Komplexität der Substratkanäle noch nicht verstanden. Der Zusammenhang zwischen dem Substratkanal Portfolio und der Substratspezifität und -aktivität eines einzelnen Enzyms ist noch ungeklärt.

Diese Enzyme können für Sequenzabschnitts- und Strukturvergleiche mit CYP153A_{M.aq} im Hinblick auf Spezifität und Selektivität herangezogen werden. Besonders die Strukturelemente, welche für den Verlauf der Kanäle essentiell sind, wie der BC-Loop für den 2e und den 2c Kanal ist dabei von Interesse. Dabei kann im Einzelnen auf die Länge des Loops und die Sequenz, bzw. auf eine Konsensussequenz und konservierte Aminosäuren eingegangen werden. Darüber hinaus wäre es auch interessant zu prüfen, wie sich die Kanalarchitektur durch eine Unterbrechung des BC-Loops durch eine B'-Helix verhält.

Der 2c Kanal wird zusätzlich zum BC-Loop auch vom FG-Loop und den ersten Windungen der G-Helix gebildet. Daher kann bei der Untersuchung dieses Kanals zusätzlich Wert auf die Länge und Sequenz des FG-Loops, sowie den Beginn der G-Helix gelegt werden. Mittels Strukturvergleiche der ausgewählten Enzyme, kann auch der Frage auf den Grund gegangen werden, wodurch primäre Substratkanäle blockiert werden.

Auch die Kristallstruktur von CYP153A_{P.sp} konnte in der Kooperation mit Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York, aufgeklärt werden. Es handelt sich dabei um ein Enzym aus derselben Familie mit einer Sequenzidentität von 55 % zu CYP153A_{M.aq}, jedoch unterscheiden diese sich in ihrer Substratspezifität.

Das Enzym aus *Polaromonas sp.* (CYP153A_{P.sp.}) katalysiert selektiv die ω -Hydroxylierung von Alkanen. Dabei werden kürzerkettige Substrate (C8) gegenüber längerkettigen (C12) bevorzugt. Eine erste Analyse dieser Kristallstruktur hinsichtlich der Substratkanäle zeigt deutliche Unterschiede auf. Welche die Hypothese „Substratkanalcharakteristika beeinflussen Erkennung Bindung und Spezifität“ aufstellen lassen. Dieses Enzym könnte in vergleichenden Studien als direkter Verwandter herangezogen werden. So könnten untersucht werden, ob Substratkanäle in spezifischer unterteilt werden können. Es wird vermutet, dass ein Kanal grob in drei Regionen gegliedert werden kann.



- **Region I:** Substraterkennung?
- **Region II:** Spezifität?
- **Region III:** Selektivität?

Abbildung 39 ω -Hydroxy-Dodecansäure im Substratkanal mit Regionen I-III Regionen im Substratkanal, die die Spezifität beeinflussen. Region I putative Erkennungsstelle für funktionale Gruppe des Substrats. Region II mutmaßlich beteiligt an der Spezifität für gesättigte bzw. ungesättigte Substrate. Region III vermeintlich entscheidend für die selektive Hydroxylierung der terminalen Position. Alle drei Regionen bzw. die Länge des Tunnels sind vermutlich entscheidend für die Länge des Substrats.

Anhand von Mutagenesestudien an CYP153A_{M.aq} konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass Q129 eine Ankerposition für kurz- bis mittelkettige Fettsäuren ist. Weiterhin könnte geprüft werden, ob Region I generell als Erkennungsstelle für die funktionelle Gruppe des Substrats dient. Dazu können Aminosäuren an der Außenseite des 2e Kanals gegen Aminosäuren derselben Position in CYP153A_{P.sp.} ausgetauscht werden, welches bevorzugt Alkane statt Fettsäuren hydroxyliert.

Der mittlere Teil der Kanäle, also Region II, ist vermutlich für die Spezifität des Enzyms verantwortlich. Die Länge/Größe dieser Region beeinflusst vermutlich auch die Größe des präferierten Substrats. Dies wird durch den Vergleich der Kanäle in CYP153A_{M.aq} und CYP153A_{P.sp} deutlich, da letzteres eine Präferenz gegenüber kürzerkettigen Substraten aufweist. Weiterhin werden vermutlich Doppelbindungen und ihre Position in der linearen Kette erkannt und gegebenenfalls stabilisiert.

Die Aminosäureseitenketten L354 konnte durch Mutagenese die Selektivität für die terminale zu der subterminalen Position verschieben. Vermutlich ist dies auch in weiteren terminal hydroxylierenden Enzymen durch Positionen, die in Region III lokalisiert sind.

Auf diese Weise könnte auch versucht werden das Substratspektrum der Enzyme zu erweitern, welche sich in der funktionellen Gruppe und in Länge der Alkylkette bzw. auch in der Lokalisierung der Doppelbindung unterscheiden. Für einen verringerten Screeningaufwand könnte hierfür der Assay, der in dem Rahmen dieser Arbeit in einer betreuten Masterarbeit entwickelt wurde, erweitert und genutzt werden.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joelle Pelletier, Université de Montréal konnte in den Enzymen CYP102A1 und CYP102A5 Sauerstoffreservoirs identifiziert werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Größe und Lage im Enzym.^[94] Im Zuge der Kooperation für die Substratkanalanalysen in CYP153A_{M.aq} wurde auch in dem Fall die freie Gibb'sche Energie für O₂ berechnet. Die globalen Energieminima unterscheiden sich gegenüber der in der Familie CYP102 noch deutlicher in der Lokalisation und Größe, als die bereits beschriebenen Unterschiede zwischen CYP102A1 und CYP102A5. Diese vorläufigen Ergebnisse werfen die Frage auf, inwiefern Sauerstoff und die Bindung in den beschriebenen Reservoirs die katalytische Aktivität und Kinetik in P450 Enzymen beeinflusst. Computergestützte Analysen dieser Kanäle und der Vergleich dieser in verwandten Enzymen können Aufschluss geben. Dabei kann Sauerstoff als gasförmiges Substrat betrachtet werden und so hydrophobe Taschen identifiziert werden.

Weiterhin sind auch die Solvent- Wasserkanäle und Kanal 3 von Interesse. Für den Wasserkanal konnte in Kristallstrukturen Wasser identifiziert werden, jedoch ist für den Solventkanal bisher noch wenig bekannt, welche Moleküle diesen Kanal passieren können. Eine Charakterisierung dieser Kanäle bietet großes Potential um die Katalyse der P450 Enzyme besser zu verstehen. Diese aufbauenden Analysen sind nicht nur für die hier beschriebene Reaktion relevant. Viel mehr sind P450 Enzyme auch im Medikamentenabbau beteiligt, weswegen diese Aspekte auch für die pharmazeutische Forschung von Interesse sein kann.

Es konnte gezeigt werden, dass für CYP153A_{M.aq} in einem Ganzzellsystem eine Fusion mit der Reduktasedomäne PFOR die höchsten Umsätze erreicht werden konnten. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression dazu einen besonders großen Beitrag leistet. Diese konnte durch eine Expressionsstudie optimiert werden, wobei beobachtet wurde, dass durch einen strikt regulierbaren Vektor pBAD33 die höchste Menge an aktivem Enzym in dem Fall erreicht werden konnte. Ferner konnte beobachtet werden, dass eine Einzelmutation in der Hämdomäne die Expression beeinträchtigen kann. Deshalb müssen im Einzelfall die Parameter für eine optimale Expression überprüft werden. Der Einsatz in einer Fermentation bedingt einer Untersuchung der geeigneten Parameter.

Weiterhin konnte aufgedeckt werden, dass der Transport von längerkettige Fettsäuren durch die Zellmembran erschwert ist. Neben dem Transport konnte auch der Abbau der Fettsäuren und des hydroxylierten Produkts beobachtet werden. Beides konnte durch die Regulation der Expression der *fad* Gene gesteuert werden. Die in dieser Arbeit optimierten Fusionskonstrukte als auch der Produktionsstamm mit dem optionalen Fettsäuretransporter konnte an den Industriepartner BASF weitergegeben werden. Hier wird die Anwendbarkeit in größerem Maßstab geprüft. Die Übertragbarkeit der *in vitro* Mutagenesestudie im Einsatz in einem Ganzzellkatalysator konnte gezeigt werden, weshalb das in dieser Arbeit generierte P450-Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 kloniert in pBAD33 in *E.coli* BW25113Δ*fadD* auch für die Anwendung ein interessanter Biokatalysator für den Einsatz für die terminale Hydroxylierung von Fettsäuren darstellt.

6 Anhang

Verwendete Stämme und DNA

CYP153A *M. aq.* from *Marinobacter aqua.* strain JS666 ATCC BAA-500

ATGCCAACACTGCCCAGAACATTTGACGACATTCAGTCCCGACTGATTAACGCCACCTCC
AGGGTGGTGCCGATGCAGAGGCAAATTCAGGGACTGAAATTTCTAATGAGCGCCAAGAG
GAAGACCTTCGGCCCACGCCGACCGATGCCCGAATTCGTTGAAACACCCATCCCGGACGT
TAACACGCTGGCCCTTGAGGACATCGATGTCAGCAATCCGTTTTTATACCGGCAGGGTCA
GTGGCGGCCTATTTCAAACGGTTGCGTGATGAGGCGCCGGTCCATTACCAGAAGAACAG
CCTTTTCGGCCCTTCTGGTCCGTAACCTCGGTTTGAAGACATCCTGTTGTTGGATAAGAG
TCACGACCTGTTTTCCGCCGAGCCGCAAATCATTCTCGGTGACCCTCCGGAGGGGCTGTCCG
GTGAAATGTTTCATAGCGATGGATCCGCCGAAACACGATGTGCAGCGCAGCTCGGTGCAG
GGAGTAGTGGCACCGAAAAACCTGAAGGAGATGGAGGGGCTGATCCGATCACGCACCGGC
GATGTGCTTGACAGCCTGCCTACAGACAAACCCTTTAACTGGGTACCTGCTGTTTCCAAG
GAACTCACAGGCCGCATGCTGGCGACGCTTCTGGATTTTCCTTACGAGGAACGCCACAAG
CTGGTTGAGTGGTCCGACAGAATGGCAGGTGCAGCATCGGCCACCGGCGGGGAGTTTGCC
GATGAAAATGCCATGTTTGACGACGCGGCAGACATGGCCCGGTCTTCTCCAGGCTTTGG
CGGACAAGGAGGCGCGCCGCGCAGCAGGCGAGGAGCCCGTTTTGATTTGATCAGCCTG
TTGCAGAGCAACAAAGAAACGAAAGACCTGATCAATCGGCCGATGGAGTTTATCGGTAA
TTTGACGCTGCTCATAGTCGGCGGCAACGATACGACGCGCAACTCGATGAGTGGTGGCCT
GGTGGCCATGAACGAATTTCCCAGGGAATTTGAAAAATTGAAGGCAAACCGGAGTTGA
TTCCGAACATGGTGTCCGAAATCATCCGCTGGCAAACGCCGCTGGCCTATATGCGCCGAA
TCGCCAAGCAGGATGTCGAACTGGGCGGCCAGACCATCAAGAAGGGTGATCGAGTTGTCA
TGTGGTACGCGTCGGGTAACCGGGACGAGCGCAAATTTGACAACCCCGATCAGTTCATCA
TTGATCGCAAGGACGCACGAAACCACATGTCGTTCCGGCTATGGGGTTCACCGTTGCATGG
GCAACCGTCTGGCTGAACTGCAACTGCGCATCCTCTGGGAAGAAATACTCAAGCGTTTTG
ACAACATCGAAGTCGTCGAAGAGCCCGAGCGGGTGCAGTCCAACCTTCGTGCGGGGCTATT
CCAGGTTGATGGTCAAACCTGACACCGAACAGTTA

Codon optimized (geneart) Pfor_{116B3} gene fragment from *Rhodococcus ruber* DSM 44319

GTTCTGCAGCGTCAGCATCCGGTTACCATTGGTGAACCGAGCACCCGTAGCGTTAGCCGT
ACCGTTACCGTTGAACGTCTGGATCGTATTGTTGATGATGTTCTGCGTGTTGTTCTGCGT
GCACCGGCAGGTAATGCACTGCCTGCATGGACACCGGGTGCACATATTGATGTTGATCTG
GGTGCCTGAGCCGTCAGTATAGCCTGTGTGGTGCACCTGATGCACCGACCTATGAAATT
GCAGTTCTGCTGGATCCGGAAAGCCGTGGTGGTAGCCGTTATGTTTCATGAACAGCTGCGT
GTTGGTGGTAGCCTGCGTATTCGTGGTCCGCGTAATCATTTTGCCTGGATCCGGATGCA
GAACATTATGTTTTTTGTTGCCGGTGGTATTGGTATTACACCGGTGCTGGCAATGGCAGAT
CATGCACGTGCTCGTGGTGGAGCTATGAACTGCATTATTGTGGTCGTAATCGTAGCCGT
ATGGCATATCTGGAACGTGTTGCAGGTCATGGTATCGTGCAGCTCTGCATGTTAGTGCC
GAAGGCACCCGTGTTGATCTGGCAGCACTGCTGGCAACACCGGTGAGCGGCACCCAGATT
TATGCATGTGGTCCGGGTCGTCTGCTGGCAGGTCTGGAAGATGCAAGCCGTCATTGGCCT
GATGGTGCCTGCATGTTGAACATTTTACCAGCAGCCTGACCGCACTGGATCCTGACGTT
GAACATGCATTTGATCTGGATCTGCGTGATAGTGGTCTGACCGTTCGTGTTGAACCGACC
CAGACCGTTCTGGATGCACTGCGTGCAAATAATATTGATGTTCCGAGCGATTGCGAAGAG
GGTCTGTGTGGTAGCTGTGAAGTTACCGTGCTGGAAGGTGAAGTTGATCATCGTGATACC
GTTCTGACCAAAGCAGAACGTGCAGCAAATCGTCAGATGATGACCTGTTGTAGCCGTGCA
TGTGGTATCGTCTGACCCTGCGTCTGTAA

CYP102A1 (CPR_{BM3})reductase from *Bacillus megaterium*

ATTCCTTCACCTAGCACTGAACAGTCTGCTAAAAAAGTACGCAAAAAGGCAGAAAACGCT
CATAATACGCCGCTGCTTGTGCTATACGGTTCAAATATGGGAACAGCTGAAGGAACGGCG
CGTGATTTAGCAGATATTGCAATGAGCAAAGGATTTGCACCGCAGGTCGCAACGCTTGAT
TCACACGCCGGAAATCTTCCGCGCGAAGGAGCTGTATTAATTGTAACGGCGTCTTATAAC
GGTCATCCGCCTGATAACGCAAAGCAATTTGTCGACTGGTTAGACCAAGCGTCTGCTGAT
GAAGTAAAAGGCGTTCGCTACTCCGTATTTGGATGCGGCGATAAAAACTGGGCTACTACG
TATCAAAAAGTGCCTGCTTTTATCGATGAAACGCTTGCCGCTAAAGGGGCAGAAAACATC
GCTGACCGCGGTGAAGCAGATGCAAGCGACGACTTTGAAGGCACATATGAAGAATGGCGT
GAACATATGTGGAGTGACGTAGCAGCCTACTTTAACCTCGACATTGAAAACAGTGAAGA
TAATAAATCTACTCTTTCACTTCAATTTGTGACAGCGCCGCGGATATGCCGCTTGCGAA
AATGCACGGTGCCTTTTCAACGAACGTCGTAGCAAGCAAAGAACTTCAACAGCCAGGCAG
TGCACGAAGCACGCGACATCTTGAAATTGAACTTCCAAAAGAAGCTTCTTATCAAGAAGG
AGATCATTTAGGTGTTATTCCTCGCAACTATGAAGGAATAGTAAACCGTGTAACAGCAA
GGTTCGGCCTAGATGCATCACAGCAAATCCGTCTGGAAGCAGAAGAAGAAAAATTAGCTC
ATTTGCCACTCGCTAAAACAGTATCCGTAGAAGAGCTTCTGCAATACGTGGAGCTTCAAG
ATCCTGTTACGCGCACGCAGCTTCGCGCAATGGCTGCTAAAACGGTCTGCCCGCCGCATA
AAGTAGAGCTTGAAGCCTTGCTTGAAAAGCAAGCCTACAAAGAACAAGTGCTGGCAAAA
CGTTTAACAATGCTTGAAGTCTTGAAAAATACCCGGCGTGTGAAATGAAATTCAGCGAA
TTTATCGCCCTTCTGCCAAGCATAACGCCGCGCTATTACTCGATTTCTTCATCACCTCGTG
TCGATGAAAAACAAGCAAGCATCACGGTCAGCGTTGTCTCAGGAGAAGCGTGGAGCGGA
TATGGAGAATATAAAGGAATTGCGTCGAACTATCTTGCCGAGCTGCAAGAAGGAGATAC
GATTACGTGCTTTATTTCCACACCGCAGTCAGAATTTACGCTGCCAAAAGACCCTGAAAC
GCCGCTTATCATGGTCCGACCGGGAACAGGCGTCGCGCCGTTTAGAGGCTTTGTGCAGGC
GCGCAAACAGCTAAAAGAACAAGGACAGTCACTTGGAGAAGCACATTTATACTTCCGGCTG
CCGTTACCTCATGAAGACTATCTGTATCAAGAAGAGCTTGAAAACGCCCAAAGCGAAGG
CATCATTACGCTTCATACCGCTTTTTCTCGCATGCCAAATCAGCCGAAAACATACGTTCA
GCACGTAATGGAACAAGACGGCAAGAAATTGATTGAACTTCTTGATCAAGGAGCGCACT
TCTATATTTGCGGAGACGGAAGCCAAATGGCACCTGCCGTTGAAGCAACGCTTATGAAAA
GCTATGCTGACGTTACCAAGTGAGTGAAGCAGACGCTCGCTTATGGCTGCAGCAGCTAG
AAGAAAAAGGCCGATACGCAAAGACGTGTGGGCTGGGTAA

Putidaredoxin reductase (CamA) from *Pseudomonas putida*

GTGAACGCAAACGACAGCGGCTGGGAAGGCAATATCCGGTTGGTGGGGGATGCGACGGT
AATTC³CCCATCACCTACCACCGCTATCCAAAGCTTACTTGGCCGGCAAAGCCACAGCGGA
AAGCCTGTACCTGAGAACCCAGATGCCTATGCAGCGCAGAACATCCA³ACTACTCGGAGG
CACACAGGTAACGGCTATCAACCGCGACCGACAGCAAGTAATCCTATCGGATGGCCGGGC
ACTGGATTACGACCGGCTGGTATTGGCTACCGGAGGGCGTCCAAGACCCCTACCGGTGGC
CAGTGGCGCAGTTGAAAGGGCAACA³ACTTTCGATACCTGCGCACACTCGAGGACGCCGA
GTGCATTGCGCCGGCAGCTGATTGCGGATAACCGTCTGGTGGTATTGGTGGCGGCTACAT
TGGCCTTGAAGTGGCTGCCACCGCCATCAAGGCGAACATGCACGTCACCCTGCTTGATAC
GGCAGCCCGGGTTCTGGAGCGGGTTACCGCCCCGCCGGTATCGGCCTTTTACGAGCACCT
ACACCGGAAGCCGGCGTTGACATACGAACCGGCACGCAGGTGTGCGGGTTCGAGATGTC
GACCGACCAACAGAAGGTTACTGCCGTCCTCTGCGAGGACGGCACAAGGCTGCCAGCGGA
TCTGGTAATCGCCGGGATTGGCCTGATACCAA³ACTGCGAGTTGGCCAGTGGCGCCGGCCT
GCAGGTTGATAACGGCATCGTGATCAACGAACACATGCAGACCTCTGATCCCTTGATCAT
GGCCGTGCGCGACTGTGCCCGATTTACAGTCAGCTCTATGACCGCTGGGTGCGTATCGA
ATCGGTGCCAATGCCTTGGAGCAGGCACGAAAGATCGCCGCCATCCTCTGTGGCAAGGT
GCCACGCGATGAGGCGGCGCCCTGGTTCTGGTCCGATCAGTATGAGATCGGATTGAAGAT
GGTCCGACTGTCCGAAGGGTACGACCGGATCATTGTCCGCGGCTCTTTGGCGCAACCCGA
CTTCAGCGTTTTCTACCTGCAGGGAGACCGGGTATTGGCGGTCGATACAGTGAACCGTCC
AGTGGAGTTCAACCAGTCAAAACAAATAATCACGGATCGTTTGCCGGTTGAACCAAACCT
ACTCGGTGACGAAAGCGTGCCGTTAAAGGAAATCATCGCCGCCGCAAAGCTGAACTGAG
TAGTGCCTGA

Putidaredoxin (CamB) from *Pseudomonas putida*

ATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTCACATGATGGAACGCGTCGCGAACTGGATGTGGCGGAT
GGCGTCAGCCTGATGCAGGCTGCAGTCTCCAATGGTATCTACGATATTGTCGGTGATTGT
GGCGGCAGCGCCAGCTGTGCCACCTGCCATGTCTATGTGAACGAAGCGTTCACGGACAAG
GTGCCCCGCCCAACGAGCGGGAAATCGGCATGCTGGAGTGGTTCACGGCCGAACTGAAG
CCGAACAGCAGGCTCTGCTGCCAGATCATCATGACGCCCGAGCTGGATGGCATCGTGGTC
GATGTTCCCGATAGGCAATGGTAA

FadL (Fatty acid transporter) from *Escherichia coli*

ATGGTCATGAGCCAGAAAACCCTGTTTACAAAGTCTGCTCTCGCAGTCGCAGTGGCACTT
ATCTCCACCCAGGCCTGGTCGGCAGGCTTTCAGTTAAACGAATTTTCTTCCTCTGGCCTG
GGCCGGGCTTATTCAGGGGAAGGCGCAATTGCCGATGATGCAGGTAACGTCAGCCGTAAC
CCCGCATTGATTACTATGTTTTGACCGCCCGACATTTTCTGCGGGTGCGGTTTATATTGAC
CCGGATGTAAATATCAGCGGAACGTCTCCATCTGGTCGTAGCCTGAAAGCCGATAACATC
GCGCCTACGGCATGGGTTCGGAACATGCACTTTGTTGCACCGATTAACGACCAATTTGGT
TGGGGCGCTTCTATTACCTCTAACTATGGTCTGGCTACAGAGTTTAACGATACTTATGCA
GGCGGCTCTGTGCGGGGTACAACCGACCTTGAAACCATGAACCTGAACCTAAGCGGTGCG
TATCGCTTAAATAATGCATGGAGCTTTGGTCTTGGTTTCAACGCCGTCTACGCTCGCGCG
AAAATTGAACGTTTCGCAGGCGATCTGGGGCAGTTGGTTGCTGGCCAAATTATGCAATCT
CCTGCTGGCCAAACTCAGCAAGGGCAAGCATTGGCAGCTACCGCCAACGGTATTGACAGT
AATACCAAATCGCTCATCTGAACGGTAACCAGTGGGGCTTTGGCTGGAACGCCGGAATC
CTGTATGAACTGGATAAAAATAACCGCTATGCACTGACCTACCGTTCTGAAGTGAAAATT
GACTTCAAAGGTAACACTACAGCAGCGATCTTAATCGTGCGTTTAATAACTACGGTTTGCCA
ATTCCTACCGCGACAGGTGGCGCAACGCAATCGGGTTATCTGACGCTGAACCTGCCTGAA
ATGTGGGAAGTGTGAGGTTATAACCGTGTTGATCCACAGTGGGCGATTCACTATAGCCTG
GCTTACACCAGCTGGAGTCAGTTCAGCAGCTGAAAGCGACCTCAACCAGTGGCGACACG
CTGTTCCAGAAACATGAAGGCTTTAAAGATGCTTACCGCATCGCGTTGGGTACCACTTAT
TACTACGATGATAACTGGACCTTCCGTACCGGTATCGCCTTTGATGACAGCCCAGTTCCT
GCACAGAATCGTTCTATCTCCATTCGGGACCAGGACCGTTTCTGGCTGAGTGCAGGTACG
ACTTACGCATTTAATAAAGATGCTTCAGTCGACGTTGGTGTTCCTTATATGCACGGTCAG
AGCGTGAAAATTAACGAAGGCCCATACCAGTTCGAGTCTGAAGGTAAAGCCTGGCTGTTC
GGTACTAACTTTAACTACGCGTTCTGA

Plasmidkarten

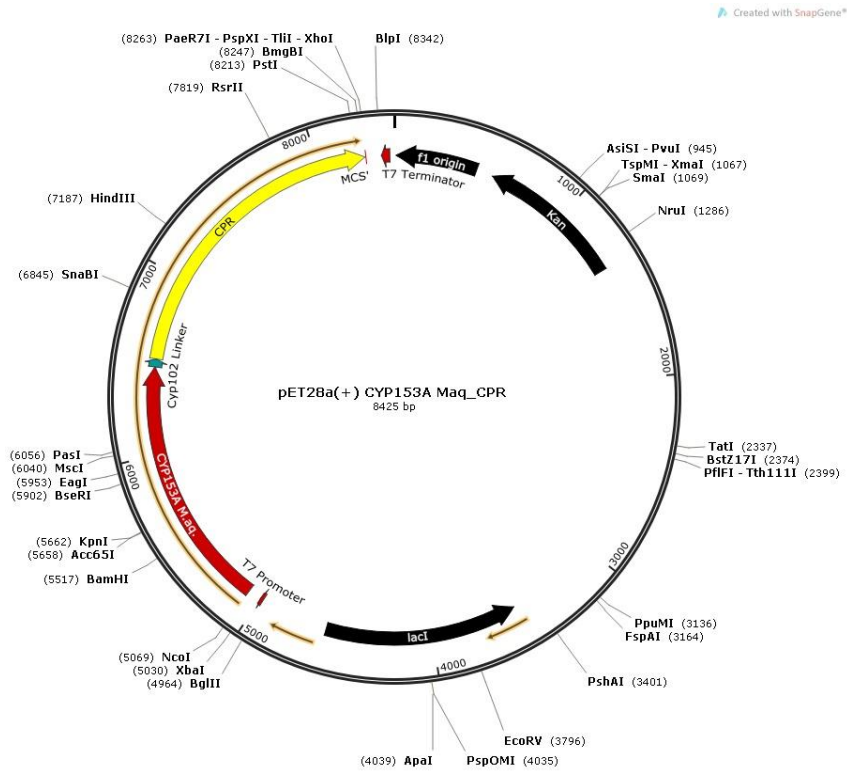


Abbildung 40 Plasmidkarte des pET28a(+) Vektors mit dem Insert Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-CPR

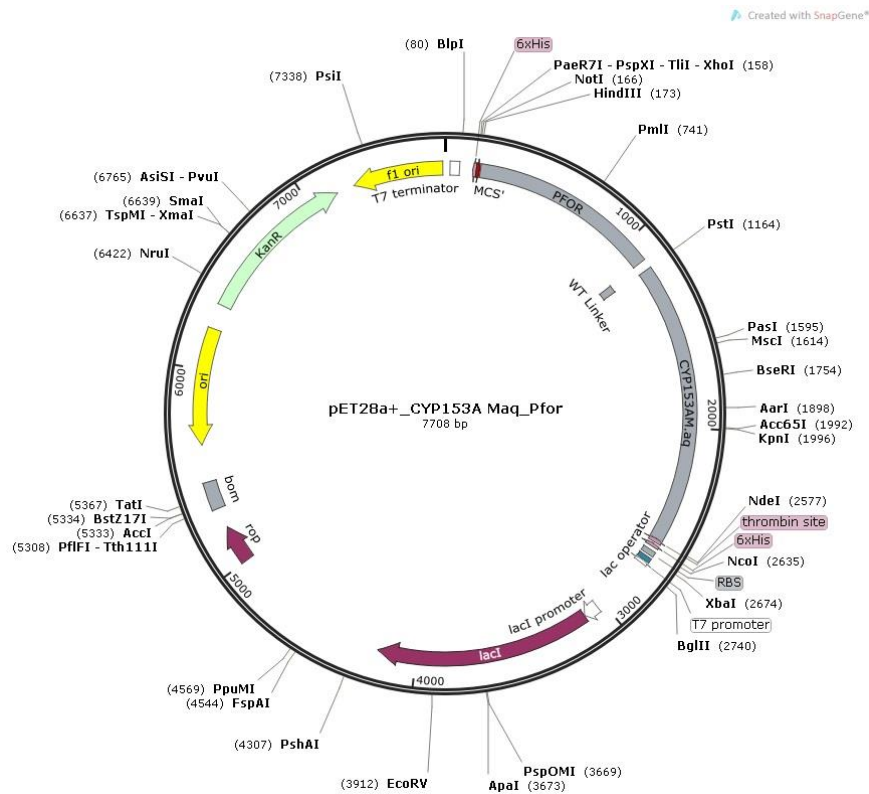


Abbildung 41 Plasmidkarte des pET28a(+) Vektors mit dem Insert Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR

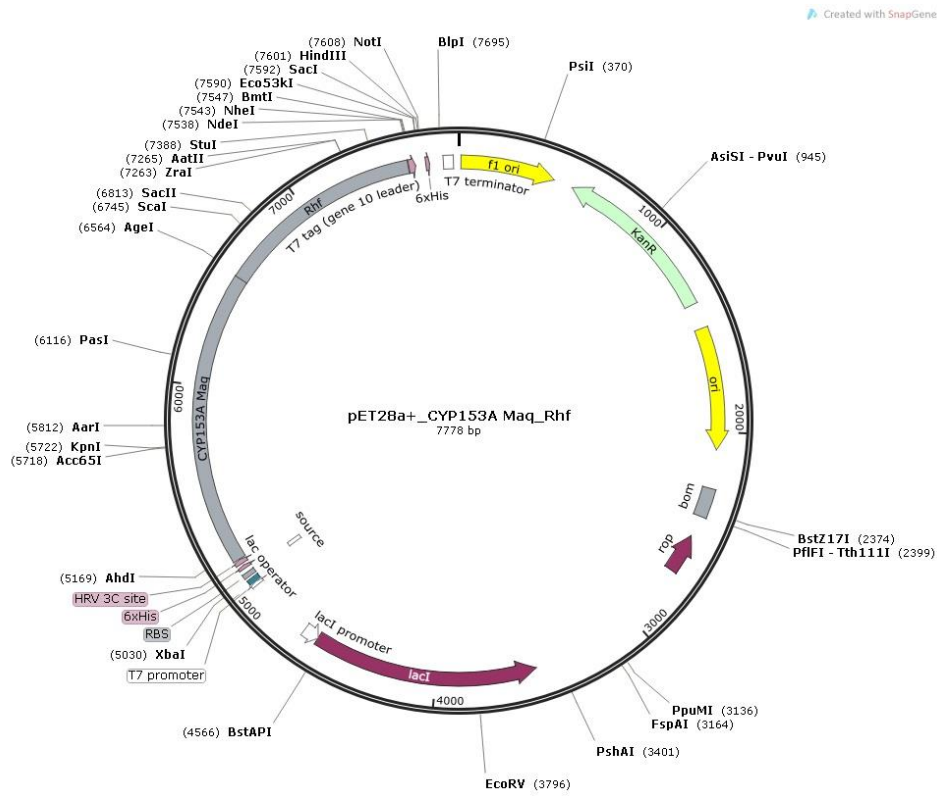


Abbildung 42 Plasmidkarte des pET28a(+) Vektors mit dem Insert Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-Rhf

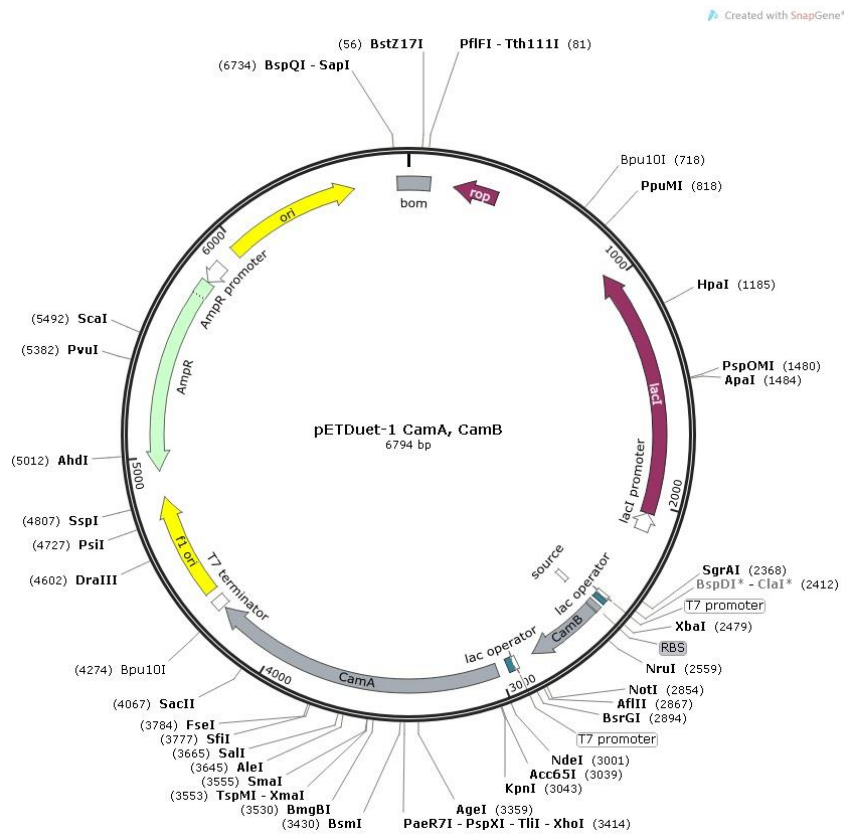


Abbildung 43 Plasmidkarte des pETDuet-1 Vektors mit dem Insert CamA und CamB

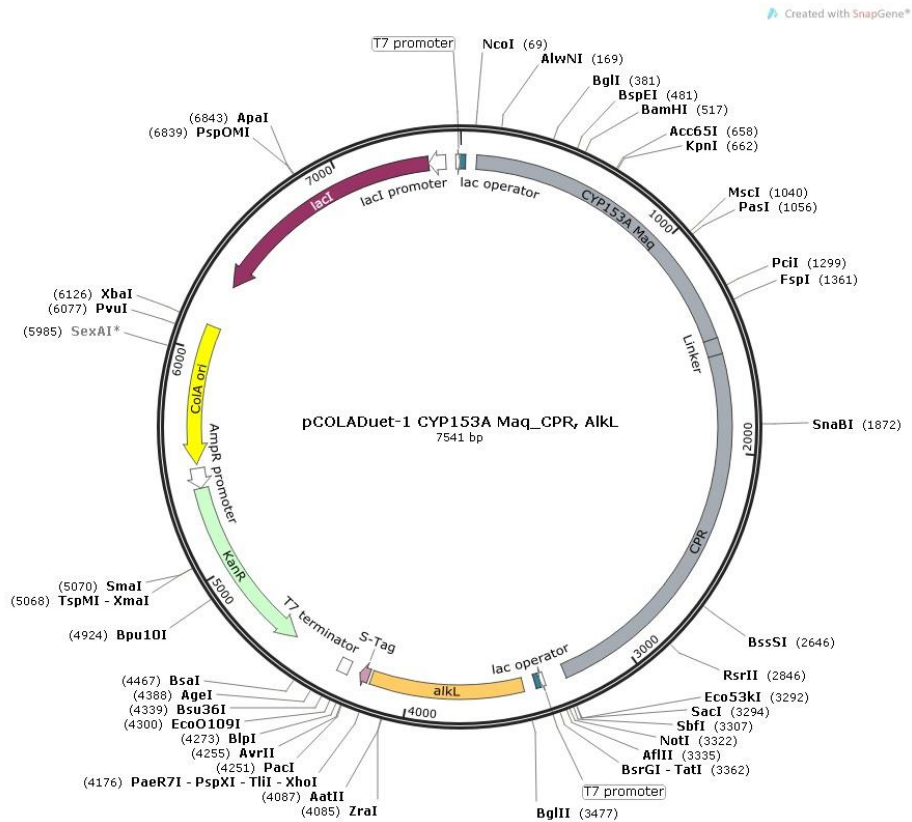


Abbildung 44 Plasmidkarte des pCOLADuet-1 Vektors mit dem Insert Fusionskonstrukt CYP153A_{Maq}-CPR und AlkL

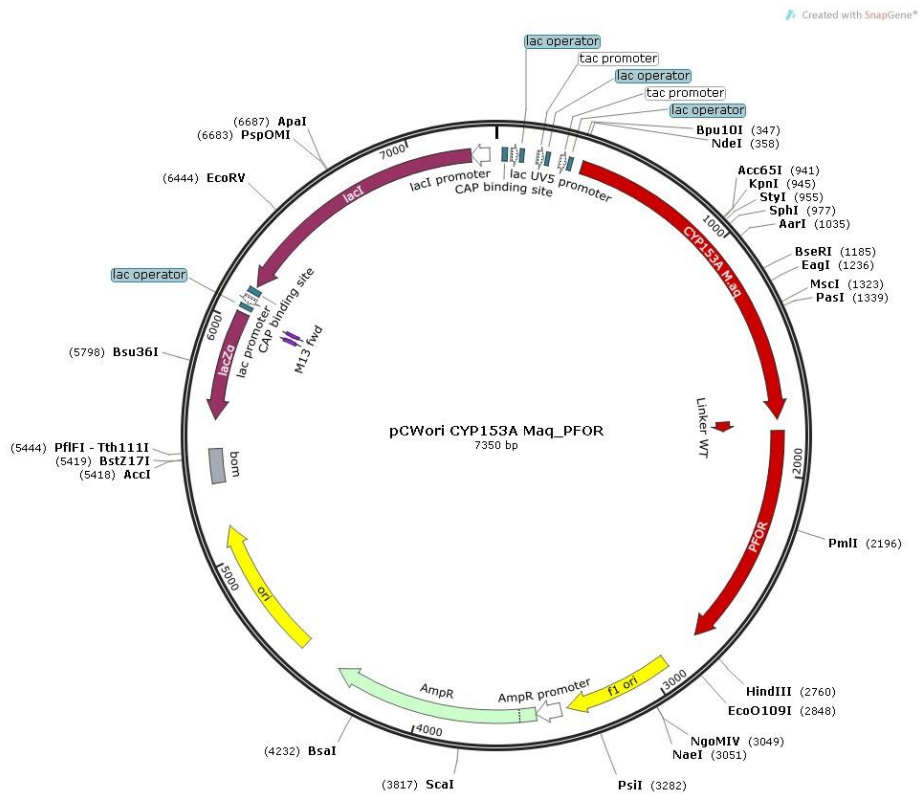


Abbildung 45 Plasmidkarte des pCWori Vektors mit dem Insert Fusionskonstrukt CYP153A_{Maq}-PFOR

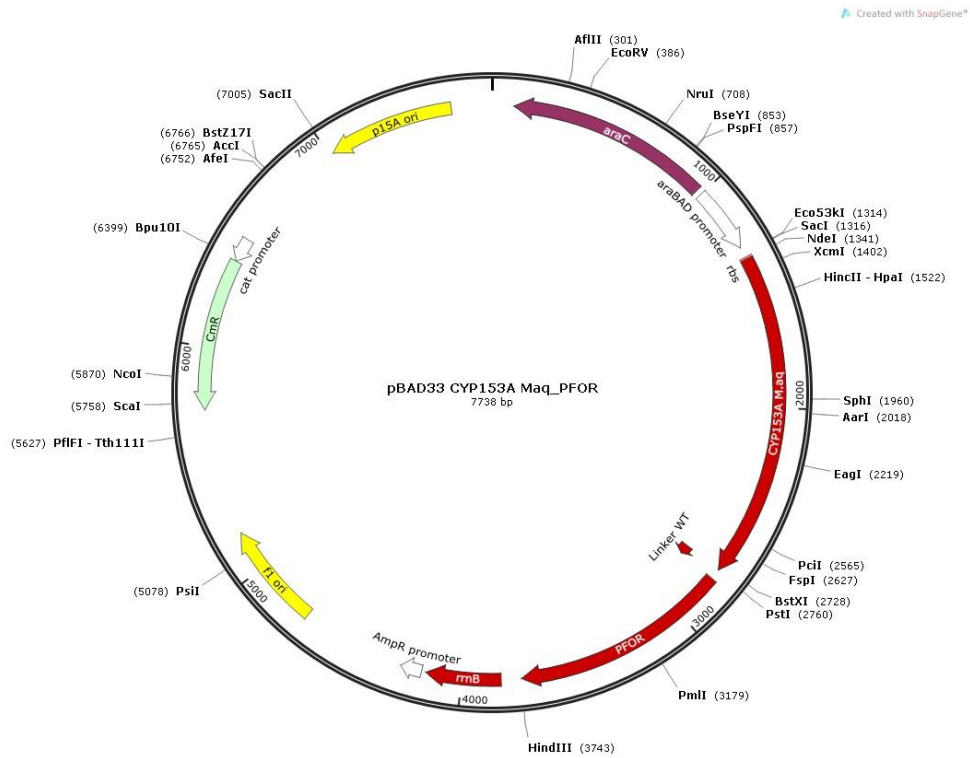


Abbildung 46 Plasmidkarte des pBAD33 Vektors mit dem Insert Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR

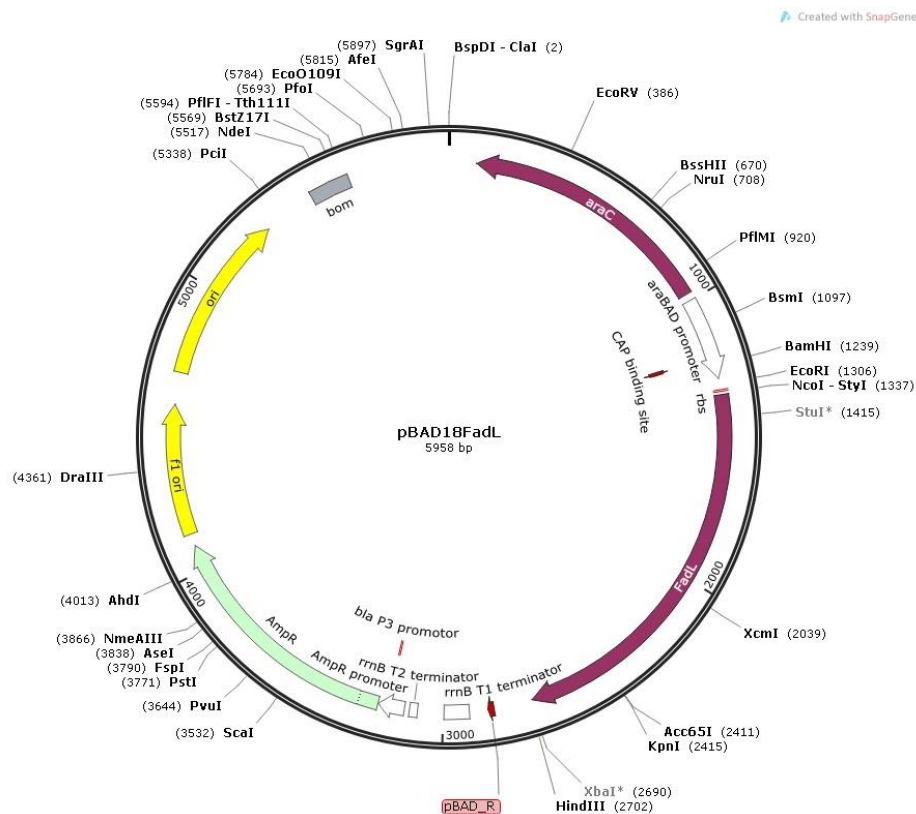


Abbildung 47 Plasmidkarte des pBAD18 Vektors mit dem Insert FadL

Informationen zur Kristallstruktur**Tabelle 21:** Datensammlung und Statistik der Auflösung für CYP153A_{M.aq} und CYP153A_{M.aq}im Komplex mit 12-Hydroxy Dodecanäure

	CYP153A _{M.aq} -heme	CYP153A _{M.aq} -12-Hydroxydodecan acid complex
Beamline	Diamond I03	Diamond I04
Wavelength (Å)	0.97623	0.97949
Resolution (Å)	107.59-2.04 (2.09-2.04)	56.89-2.22 (2.29-2.22)
Space Group	<i>P2₁2₁2₁</i>	<i>P2₁2₁2₁</i>
Unit Cell	a = 59.59 Å; b = 71.11 Å; c = 215.18 Å α = β = γ = 90.00°	a = 59.02 Å; b = 71.31 Å; c = 213.82 Å α = β = γ = 90.00°
No. of molecules in the asymmetric unit	2	2
Unique reflections	59290 (4331)	47442 (4069)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
R _{merge} (%)	0.06 (0.65)	0.14 (0.63)
R _{p.i.m.}	0.04 (0.42)	0.08 (0.39)
Multiplicity	6.5 (6.5)	6.6 (6.8)
<I/σ(I)>	15.6 (2.8)	10.0 (2.6)
CC _{1/2}	1.00 (0.77)	1.00 (0.83)
Overall B factor from Wilson plot (Å ²)	37	23
R _{cryst} /R _{free} (%)	19.9/23.7	18.7/23.9
r.m.s.d. 1-2 bonds (Å)	0.017	0.015
r.m.s.d. 1-3 bonds (°)	1.849	1.836
Avg main chain B (Å ²)	46	36
Avg side chain B (Å ²)	49	39
Avg water B (Å ²)	47	31
HDDA B (Å ²)	-	52

Informationen zu bioinformatischen Analysen**Tabelle 22** Alignment der Linkerregion der Homologiefamilie CYP116B

```

ncbi_gi:62869557    ...VLQRQHPVTIGEPSTR...
ncbi_gi:301632669  ...LAQGSE-----...
ncbi_gi:338169160  ...LLSVHQPVVRI GEP SAH...
ncbi_gi:256584644  ...ILDRQLKIKIGQPSKR...
ncbi_gi:400200507  ...LLAQRQPVVRI GEP SAH...
ncbi_gi:167615445  ...ARRPALAVRIGESNAR...
ncbi_gi:407279383  ...VLQRHHPVTIGEPSTR...
ncbi_gi:359361273  ...LLQGQHPVRI GEP SSH...
ncbi_gi:167567497  ...----RATVRI GESNAR...
ncbi_gi:118434914  ...LANGNHRFPV G APARR...
ncbi_gi:134250353  ...ARRCALAVRIGESNAR...
ncbi_gi:388537622  ...ILNRQHPIRL G EPSTH...
ncbi_gi:350600363  ...VLENPTHFHIGAPIKD...
ncbi_gi:72122438   ...LLAQQTPVRI G EP SQ...
ncbi_gi:385675649  ...ITELRRPVRI G EP SKR...
ncbi_gi:239803146  ...LRAVQVPVRI G EP SRH...
ncbi_gi:256689424  ...ILDRHRPITIGEP SKG...
ncbi_gi:121225121  ...ARRCALAVRIGESNAR...
ncbi_gi:383464185  ...ILDRQVKITIGEP SRR...
ncbi_gi:333747633  ...LLQARQPVRI G EALQG...
ncbi_gi:148501191  ...AKTPRPLQLLGSPPRS...
ncbi_gi:353220267  ...VRDVPVVTIGEPATR...
ncbi_gi:311891074  ...ILDERQPVKIGEP SKT...
ncbi_gi:394312942  ...APAVLAKFQIGPPP KD...
ncbi_gi:193225838  ...LLAVRQPVRI G EP SAH...
ncbi_gi:400225160  ...VLRPRAAVRI G EP SSH...
ncbi_gi:160361720  ...LLQARQPVRI G EALQG...
ncbi_gi:400203775  ...-ARQITTFPI G APDLK...
ncbi_gi:167584410  ...VLEPRAAVRI G EP SSH...
ncbi_gi:167840308  ...ARRSALAVRIGESNAR...
ncbi_gi:310761157  ...LLVQAQPVRI G EPSTH...
ncbi_gi:296091881  ...ILRRRLPVQIGSA-RR...
ncbi_gi:359733660  ...LLSRRQPVKIGEP SKN...
ncbi_gi:372271820  ...VLATHEAIKIGSPSKD...
ncbi_gi:357941080  ...VREARAVVRI G EP SSH...
ncbi_gi:379253426  ...ILDRQLKIKIGQPSKR...
ncbi_gi:113529722  ...LLEVHQPVVRI G EP SAH...
ncbi_gi:124898390  ...VLRPRAAVRI G EP SSH...
ncbi_gi:371450243  ...VLAEQQPVRI G ESSQG...
ncbi_gi:224460421  ...LLSRRQPVKIGEP SKN...
ncbi_gi:373098050  ...LLDVQVPVRI G EPAGH...
ncbi_gi:402699676  ...IVDShLPLKIGPPARA...
ncbi_gi:257142016  ...ARRPALAVRIGESNAR...
ncbi_gi:384465483  ...ATRLHRSF SVGPPARR...
ncbi_gi:374659875  ...LLRRRLKVRIGEP SRK...
ncbi_gi:21622608   ...VLHRHQPVTI G EPAAR...
ncbi_gi:384521811  ...ILDRKLKIKIGQPSKR...
ncbi_gi:93357706   ...VLAPRDAVRI G EPTGG...
ncbi_gi:292813877  ...LLNTAHPVRI G EPSSH...
ncbi_gi:198040471  ...ALRARTAVRI G EPSSH...
ncbi_gi:262211154  ...VLAEQQPVRI G ESSQG...
ncbi_gi:340008433  ...LLSRRQPVKIGEP SKN...

```

Anhang

Tabelle 23 Aminosäure Verteilung der Linkerregion in der Homologiefamilie CYP116B. Die Zellen sind nach der prozentualen Verteilung mit einem Gradienten von weiß (0%) nach rot (100%) gekennzeichnet. Die Aminosäureeigenschaften wurden wie folgt eingeteilt: hydrophob: A, G, I, M, L, P, V, positiv geladen: H, K, R, negativ geladen: D, E, polar: C, N, Q, S, T, aromatisch: F, W, Y

Linker Position	Hydrophobe Aminosäuren	Positive geladene Aminosäuren	Negativ geladene Aminosäuren	Aromatische Aminosäuren	Hydrophile Aminosäuren	Proline	Glycine
1	96%	0%	2%	0%	2%	0%	0%
2	73%	20%	0%	2%	4%	2%	0%
3	22%	24%	27%	0%	25%	2%	0%
4	37%	27%	2%	0%	14%	14%	6%
5	16%	51%	8%	0%	22%	2%	2%
6	39%	20%	2%	0%	35%	4%	0%
7	24%	16%	2%	0%	8%	51%	0%
8	84%	0%	2%	8%	2%	4%	0%
9	10%	71%	0%	0%	18%	2%	0%
10	90%	8%	0%	0%	2%	0%	0%
11	10%	0%	0%	0%	0%	0%	90%
12	6%	0%	69%	0%	12%	6%	8%
13	6%	2%	4%	0%	14%	75%	0%
14	20%	4%	0%	0%	71%	6%	0%
15	22%	37%	0%	0%	33%	2%	6%
16	4%	67%	4%	0%	16%	2%	8%

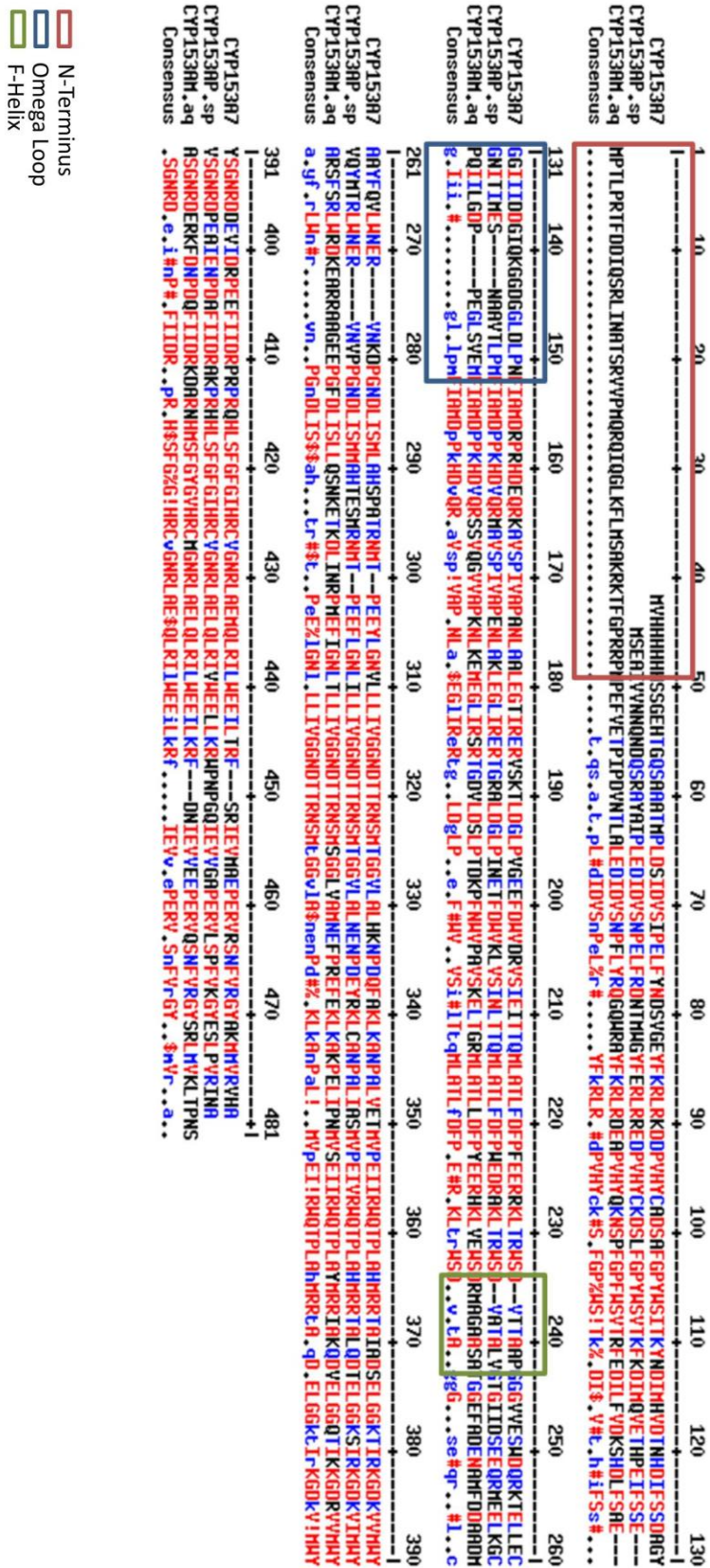


Abbildung 48 Alignment dreier P450 Sequenzen aus der Familie CYP153A (CYP153A7, CYP153AP.sp und CYP153AM.aq). Hervorgehoben sind die deutlichsten Unterschiede im N-Terminus (rot), des BC-Loops/Omega-Loops (blau) und der F-Helix (grün). Letztere ist nur in CYP153AM.aq um 2 Aminosäuren erweitert. Weiterhin ist auch der N-Terminus in CYP153AM.aq deutlich verlängert.

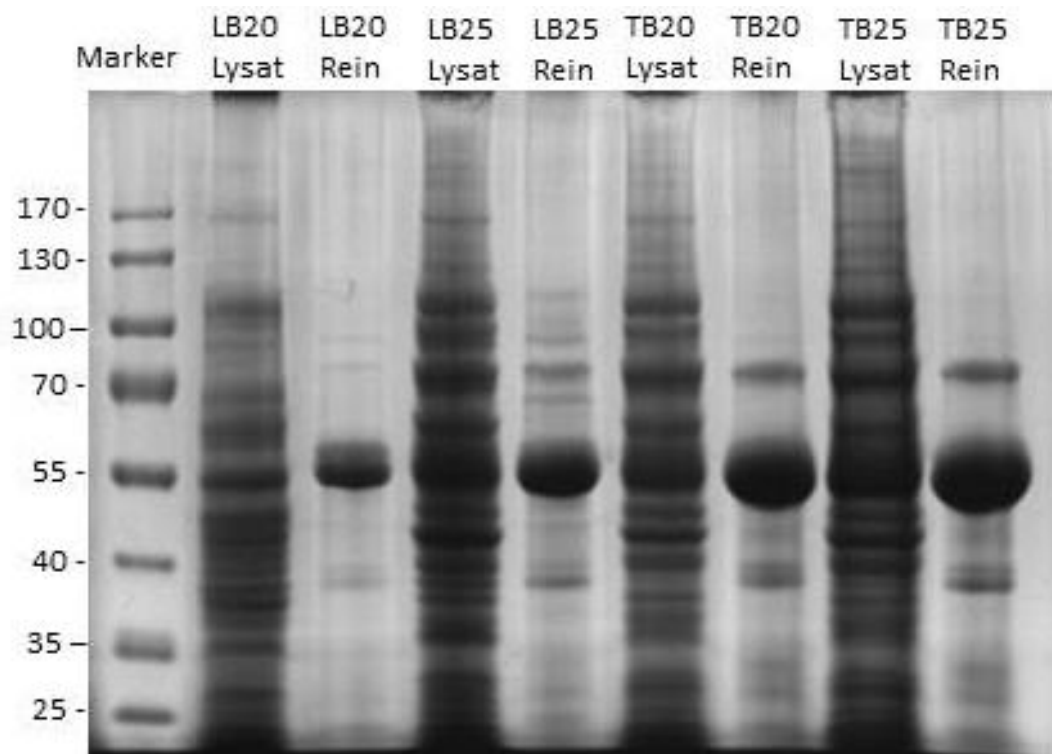
SDS Gele

Abbildung 49 SDS-PAGE zum Nachweis des Reinigungserfolgs der Häm-domäne von CYP153A_{M.aq.} auf verschiedenen Expressionen. Jeweils Zellsuspension das Lysat nach dem Zellaufschluss und das gereinigte Protein (Rein) nach der Dialyse. Spur 1: Marker; Spur 2+3: Expression in LB Medium bei 20°C; Spur 4+5: Expression in LB Medium bei 25°C; Spur 6+7: Expression in TB Medium bei 20°C; Spur 8+9: Expression in TB Medium bei 25°C

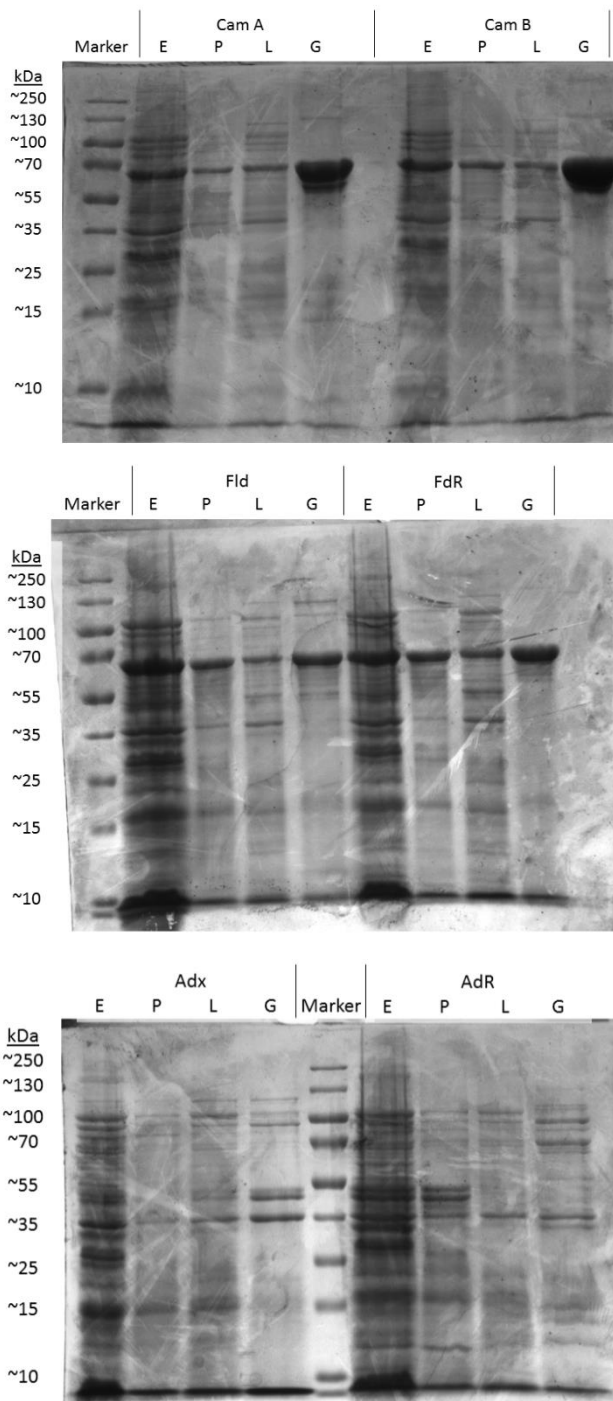


Abbildung 50 SDS-PAGE der sechs exprimierten Proteine Flavodoxin (Fld), Flavodoxinreduktase (FdR), Adrenodoxin (Adx), Adrenodoxinreduktase (AdR), sowie Cam A und Cam B. Jeweils Zellsuspension direkt nach der Ernte (E), das Pellet (P) sowie das Lysat (L) nach dem Zellaufschluss und das gereinigte Protein (G) nach der Dialyse.

Äkta Reinigungsverläufe

Bei allen Reinigungen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Diese korreliert mit der Gesamtmenge an Protein und zeigt, dass in den weiterverwendeten Fraktionen auf jeden Fall Protein eluiert wurde. Außerdem ist zu sehen, dass während dem Waschschrift zu Beginn (Fraktion X1 und X2) erhebliche Mengen Protein, das nicht an die Säule gebunden war, abgewaschen wurden. Dabei sind allen Fällen sowohl ein Peak bei 280 nm, als auch ein deutlicher Peak bei der spezifischen Wellenlänge zu sehen. Deshalb sind diese Diagramme für sich gesehen noch kein ausreichender Nachweis für die erfolgreiche Reinigung.

Für Adx wurde die Absorption bei 414 nm gemessen. Es war ein deutlicher Peak der Absorption in den Elutionsfraktionen B7, B6 und B5 zu sehen (Abbildung 51), welche für die weitere Aufreinigung vereinigt wurden

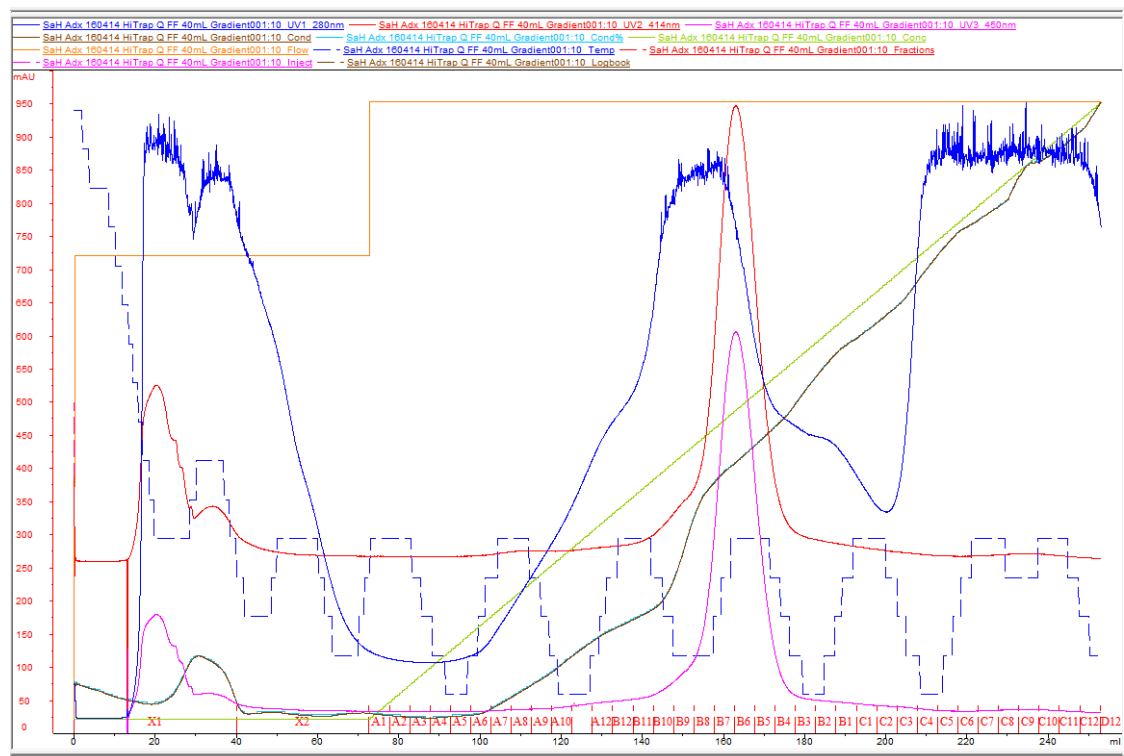


Abbildung 51 Reinigung von Adrenodoxin (Adx) per Anionenaustausch (Äkta). Analyse der Elution bei steigendem Salzgradienten. Rot: Absorption bei 414 nm; Magenta: Absorption bei 450 nm; Blau: Absorption bei 280 nm; Grün: Salzgradient. Die X-Achse zeigt das eluierte Volumen mit den zugehörigen Fraktionen, die Y-Achse zeigt die Absorption bei 414 nm (rot).

AdR absorbiert bei 450 nm, welches ein Maximum in den Fraktionen B10 und B9 aufwies (Abbildung 52).

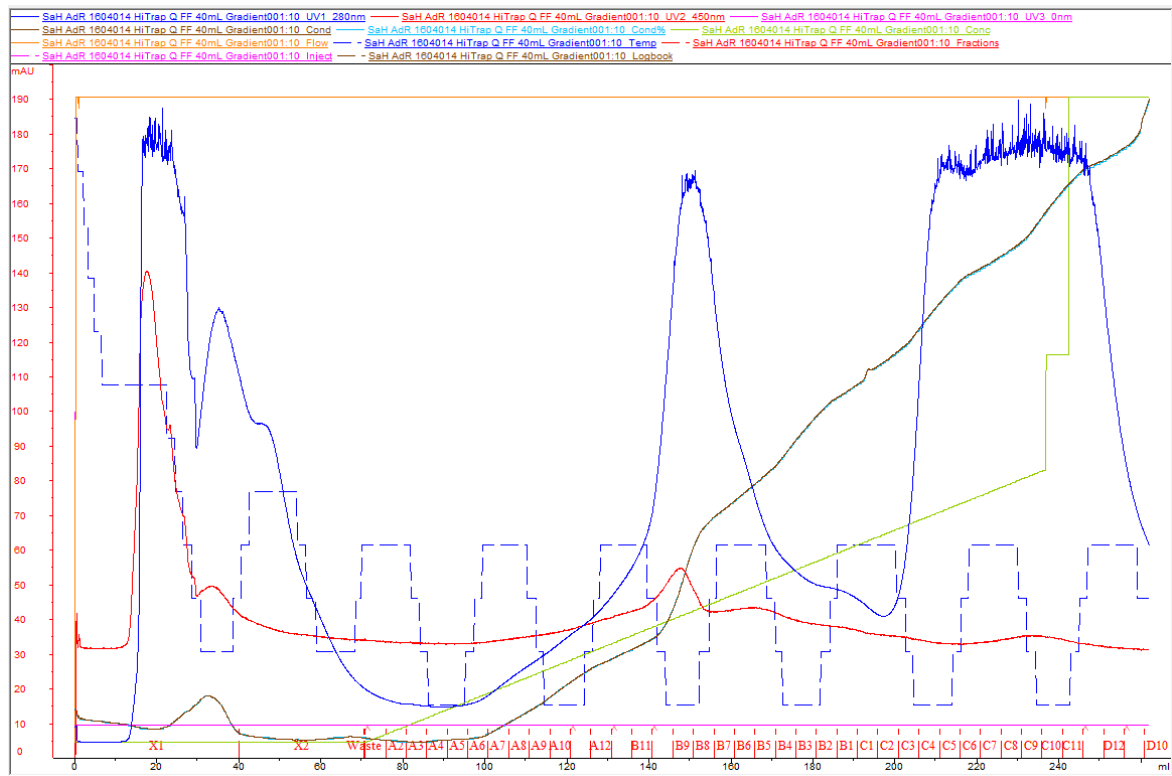


Abbildung 52: Reinigung von Adrenodoxinreduktase (AdR) per Anionenaustausch (Äkta). Analyse der Elution bei steigendem Salzgradienten Rot: Absorption bei 450 nm; Blau: Absorption bei 280 nm; Grün: Salzgradient. Die X-Achse zeigt das eluierte Volumen mit den zugehörigen Fraktionen, die Y-Achse zeigt die Absorption bei 450 nm (rot).

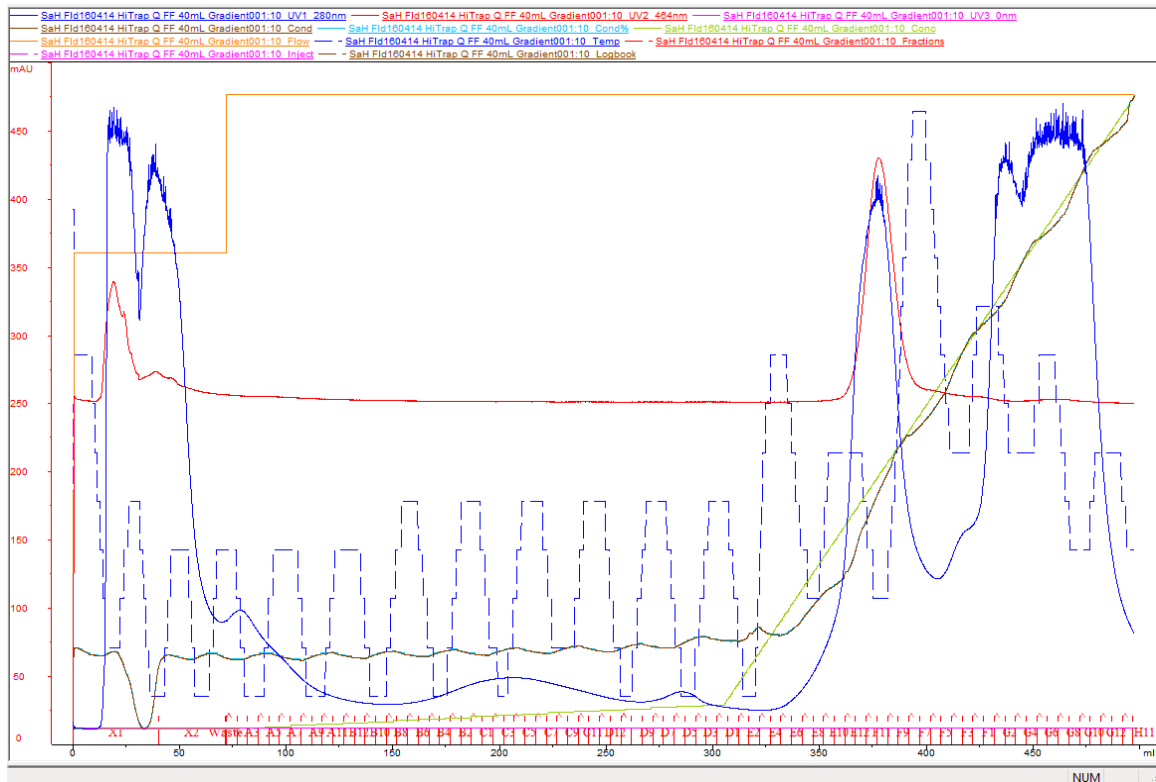


Abbildung 53: Reinigung von Flavodoxin (Fld) per Anionenaustausch (Äkta). Analyse der Elution bei steigendem Salzgradienten Rot: Absorption bei 464 nm; Blau: Absorption bei 280 nm; Grün: Salzgradient. Die X-Achse zeigt das eluierte Volumen mit den zugehörigen Fraktionen, die Y-Achse zeigt die Absorption bei 450 nm (rot).

Die charakteristische Absorption von Fld liegt bei 464 nm. Hier wurde das Enzym in den Fraktionen F12, F11 und F10 eluiert (Abbildung 53).

Chromatogramme der gaschromatographischen Analyse

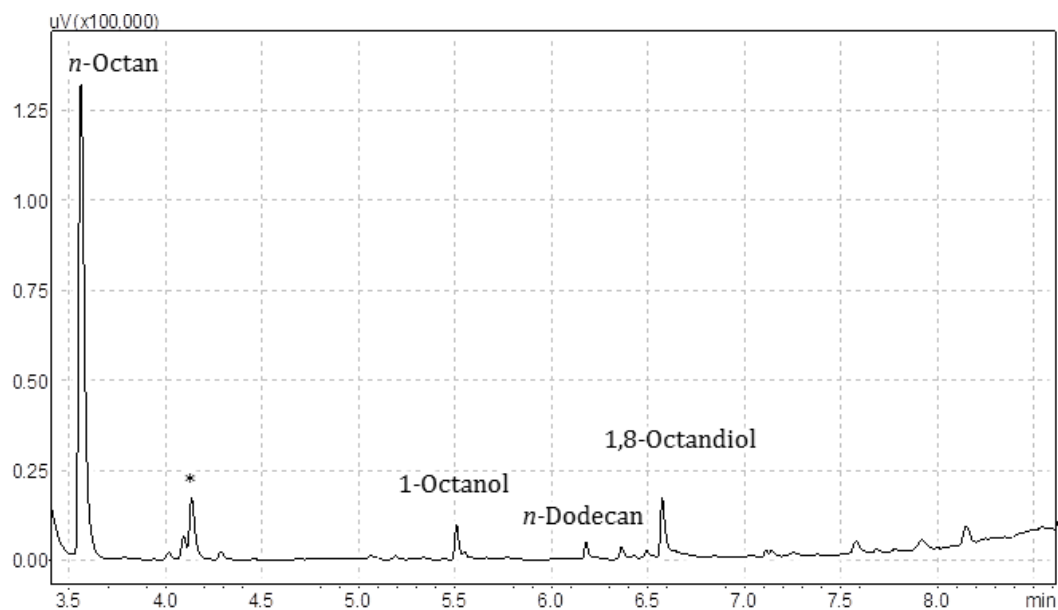


Abbildung 54: GC Chromatogramm für eine CYP153A_{M.aq} katalysierte Reaktion mit *n*-Octan.
* Unreinheiten.

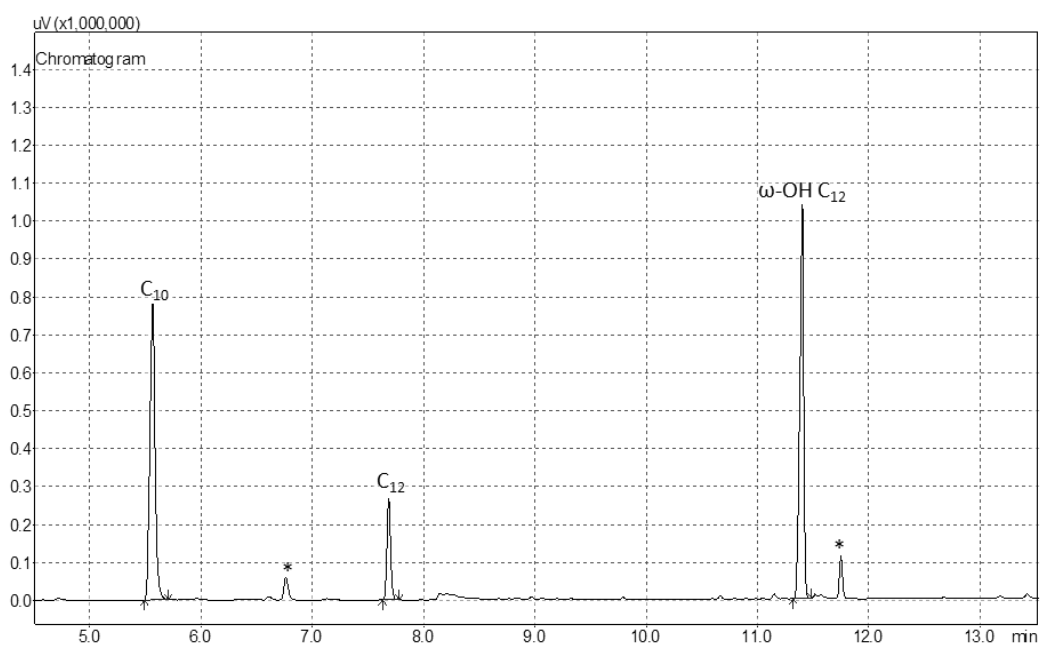


Abbildung 55: GC Chromatogramm für eine CYP153A_{M.aq}-PFOR katalysierte Reaktion mit Dodecansäure. Das Substrate und die gebildeten Produkte wurden als TMS Derivate gemessen. Abkürzungen: C₁₀, Decansäure, C₁₂, Dodecan Säure, ω-OH C₁₂, 12-Hydroxy Dodecansäure;
* Unreinheiten.

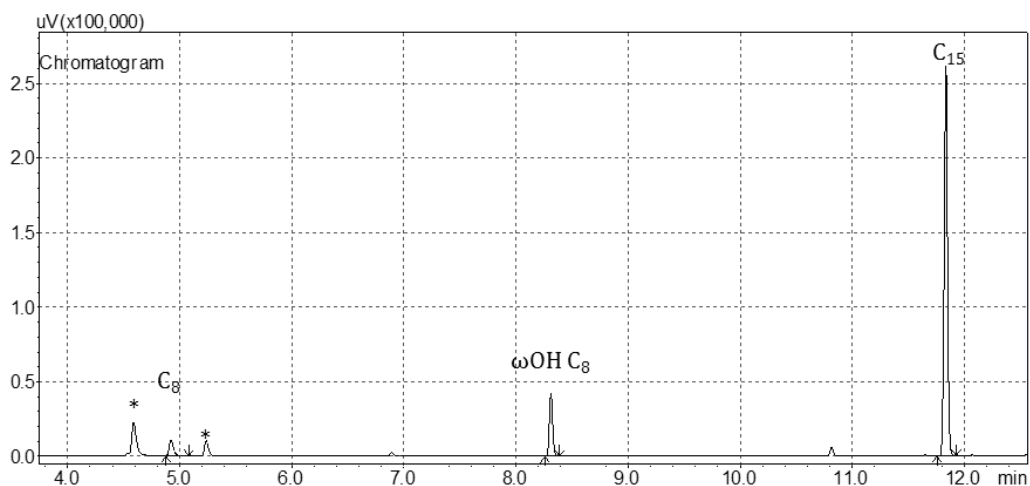


Abbildung 56 GC Chromatogramm für eine CYP153A_{M.aq} katalysierte Reaktion mit Octansäure. Das Substrate und die gebildeten Produkte wurden als TMS Derivate gemessen. Abkürzungen: C₁₅, Pentadecansäure, C₈, Octan Säure, ω-OH C₈, 8-Hydroxy Octansäure;
* Unreinheiten.

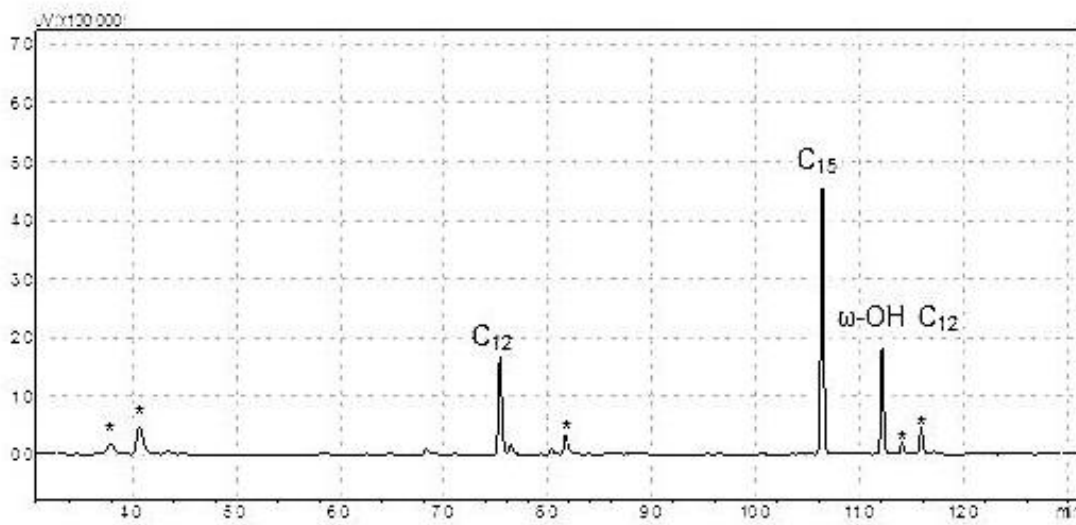


Abbildung 57: GC Chromatogramm für eine CYP153A_{M.aq} katalysierte Reaktion mit Dodecansäure. Das Substrate und die gebildeten Produkte wurden als TMS Derivate gemessen. Abkürzungen: C₁₂, Dodecan Säure, C₁₅, Pentadecansäure, ω-OH C₁₂, 12-Hydroxy Dodecansäure;
* Unreinheiten.

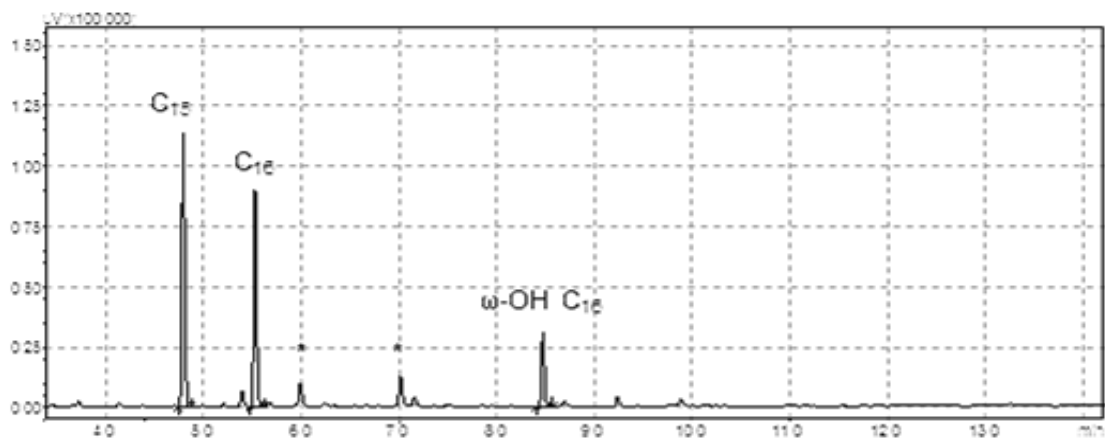


Abbildung 58: GC Chromatogramm für eine CYP153A_{M.aq} katalysierte Reaktion mit Hexadecansäure. Das Substrate und die gebildeten Produkte wurden als TMS Derivate gemessen. Abkürzungen: C₁₅, Pentadecansäure, C₁₆, Hexadecan Säure, ω-OH C₁₆, 16-Hydroxy Hexadecansäure;
* Unreinheiten.

7 Literaturverzeichnis

- [1] P. J. Winn, V. Cojocar, R. Wade, *Febs Journal* **2007**, 274, 261.
- [2] J. J. Berzelius, *Jahresber. Chem. Tübingen* **1836**, 15, 242
- [3] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1894**, 706.
- [4] M. Braun, O. Teichert, A. Zweck, *VDI, e. V., Technik und Wissenschaft* **2010**.
- [5] K. R. Jegannathan, P. H. Nielsen, *Journal of Cleaner Production* **2013**, 42, 228.
- [6] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185.
- [7] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, **2000**.
- [8] R. J. Kazlauskas, U. T. Bornscheuer, *Nature Chemical Biology* **2009**, 5, 526.
- [9] F. H. Arnold, *Nature* **2001**, 409, 253.
- [10] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, 339, 307.
- [11] P. S. Coelho, Z. J. Wang, M. E. Ener, S. A. Baril, A. Kannan, F. H. Arnold, E. M. Brustad, *Nature Chemical Biology* **2013**, 9, 485.
- [12] Z. J. Wang, H. Renata, N. E. Peck, C. C. Farwell, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, 53, 6810.
- [13] J. A. McIntosh, P. S. Coelho, C. C. Farwell, Z. J. Wang, J. C. Lewis, T. R. Brown, F. H. Arnold, *Angewandte Chemie-International Edition* **2013**, 52, 9309.
- [14] C. C. Farwell, J. A. McIntosh, T. K. Hyster, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136, 8766.
- [15] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, 137.
- [16] O. Kuchner, F. H. Arnold, *Trends in Biotechnology* **1997**, 15, 523.
- [17] F. H. Arnold, *Accounts of Chemical Research* **1998**, 31, 125.
- [18] K. Mitsukura, M. Suzuki, K. Tada, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, 8, 4533.
- [19] P. N. Scheller, S. Fademrecht, S. Hofelzer, J. Pleiss, F. Leipold, N. J. Turner, B. M. Nestl, B. Hauer, *Chembiochem* **2014**, 15, 2201.
- [20] F. Richter, A. Leaver-Fay, S. D. Khare, S. Bjelic, D. Baker, *Plos One* **2011**, 6.
- [21] H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, 17, 221.
- [22] G. Kiss, N. Celebi-Olcum, R. Moretti, D. Baker, K. N. Houk, *Angewandte Chemie-International Edition* **2013**, 52, 5700.
- [23] E. Buchner, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1897**, 117.
- [24] E. Buchner, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1899**, 32, 2086.
- [25] R. Schmid, *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*, **2001**.
- [26] de Carvalho C.C.C.R., d. F. M.M.R., *Biotransformations In Comprehensive Biotechnology*, **2011**.
- [27] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Organic Process Research & Development* **2011**, 15, 266.
- [28] de Carvalho C.C.C.R., *Biotechnology Advances* **2011**, 29, 75.
- [29] A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, 548.
- [30] W. A. Lotfy, K. M. Ghanem, E. R. El-Helow, *Bioresource Technology* **2007**, 98, 3464.
- [31] B. Miroux, J. E. Walker, *Journal of Molecular Biology* **1996**, 260, 289.
- [32] E. O'Reilly, V. Kohler, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *Chemical Communications* **2011**, 47, 2490.

- [33] J. Wachtmeister, P. Mennicken, A. Hunold, D. Rother, *Chemcatchem* **2016**, *8*, 607.
- [34] X. Z. Li, J. S. Webb, S. Kjelleberg, B. Rosche, *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72*, 5678.
- [35] B. Rosche, X. Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, K. Buehler, *Trends in Biotechnology* **2009**, *27*, 636.
- [36] A. J. Ruff, M. Arlt, M. van Ohlen, T. Kardashliev, M. Konarzycka-Bessler, M. Bocola, A. Dennig, V. B. Urlacher, U. Schwaneberg, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2016**, *134*, 285.
- [37] P. Areense, V. Bernal, D. Charlier, J. L. Iborra, M. R. Foulquie-Moreno, M. Canovas, *Microbial Cell Factories* **2013**, *12*.
- [38] I. Oroz-Guinea, E. Garcia-Junceda, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 1039.
- [39] R. L. Pruett, J. A. Smith, *Journal of Organic Chemistry* **1969**, *34*, 327.
- [40] D. Evans, G. Yagupsky, Wilkinso.G, *Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical* **1968**, 2660.
- [41] G. Yagupsky, C. K. Brown, G. Wilkinson, *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **1969**, 1244.
- [42] K. Weissermel, H.-J. Arpe, *Industrial organic chemistry*, Weinheim, **2003**.
- [43] C. Weizmann, *Vol. US1315585 A*, US Patent, **1919**.
- [44] D. T. Jones, D. R. Woods, *Microbiological Reviews* **1986**, *50*, 484.
- [45] C. E. Nakamura, G. M. Whited, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 454.
- [46] D. J. Ferraro, L. Gakhar, S. Ramaswamy, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *338*, 175.
- [47] J. Chakraborty, D. Ghosal, A. Dutta, T. K. Dutta, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2012**, *30*, 419.
- [48] R. E. Parales, S. M. Resnick, *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology*, **2006**.
- [49] D. T. Gibson, R. E. Parales, *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, *11*, 236.
- [50] J. M. Joern, T. Sakamoto, A. A. Arisawa, F. H. Arnold, *Journal of Biomolecular Screening* **2001**, *6*, 219.
- [51] B. D. Ensley, B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett, D. T. Gibson, *Science* **1983**, *222*, 167.
- [52] L. M. Blank, B. E. Ebert, K. Buehler, B. Buhler, *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, *13*, 349.
- [53] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 2841.
- [54] R. G. Lageveen, G. W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, B. Witholt, *Applied and Environmental Microbiology* **1988**, *54*, 2924.
- [55] D. J. Koch, M. M. Chen, J. B. van Beilen, F. H. Arnold, *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 337.
- [56] T. H. M. Smits, B. Witholt, J. B. van Beilen, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **2003**, *84*, 193.
- [57] D. J. Owen, G. Eggink, B. Hauer, M. Kok, D. L. Mcbeth, Y. L. Yang, J. A. Shapiro, *Molecular & General Genetics* **1984**, *197*, 373.
- [58] T. Ueda, M. J. Coon, *Journal of Biological Chemistry* **1972**, *247*, 5010.
- [59] D. R. Nelson, 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, D. W. Nebert, *Pharmacogenetics* **1996**, *6*, 1.

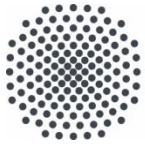
- [60] C. J. Whitehouse, S. G. Bell, L. L. Wong, *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 1218.
- [61] M. A. Noble, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, A. C. Mackay, G. A. Reid, R. P. Hanzlik, A. W. Munro, *Biochemical Journal* **1999**, *339*, 371.
- [62] F. P. Guengerich, E. M. Isin, *Acta Chimica Slovenica* **2008**, *55*, 7.
- [63] P. R. O. d. Montellano, *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*, **2005**.
- [64] F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, R. Bernhardt, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2007**, *1770*, 330.
- [65] S. C. Dodani, G. Kiss, J. K. B. Cahn, Y. Su, V. S. Pande, F. H. Arnold, *Nature Chemistry* **2016**, *8*, 419.
- [66] D. Werck-Reichhart, A. Hehn, L. Didierjean, *Trends in Plant Science* **2000**, *5*, 116.
- [67] L. Pravda, K. Berka, R. S. Varekova, D. Sehnal, P. Banas, R. A. Laskowski, J. Koca, M. Otyepka, *Bmc Bioinformatics* **2014**, *15*.
- [68] S. K. Ludemann, O. Carugo, R. C. Wade, *Journal of Molecular Modeling* **1997**, *3*, 369.
- [69] R. C. Wade, P. J. Winn, E. Schlichting, Sudarko, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98*, 1175.
- [70] R. C. Wade, D. Motiejunas, K. Schleinkofer, Sudarko, P. J. Winn, A. Banerjee, A. Kaniakin, C. Jung, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2005**, *1754*, 239.
- [71] N. J. Turner, *Nature Chemical Biology* **2009**, *5*, 568.
- [72] K. E. Atkin, R. Reiss, V. Koehler, K. R. Bailey, S. Hart, J. P. Turkenburg, N. J. Turner, A. M. Brzozowski, G. Grogan, *Journal of Molecular Biology* **2008**, *384*, 1218.
- [73] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 317.
- [74] Q. S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, R. D. Schmid, *Chemistry-a European Journal* **2000**, *6*, 1531.
- [75] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, K. E. Jaeger, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 709.
- [76] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angewandte Chemie-International Edition* **2015**, *54*, 3351.
- [77] A. J. Warman, O. Roitel, R. Neeli, H. M. Girvan, H. E. Seward, S. A. Murray, K. J. McLean, M. G. Joyce, H. Toogood, R. A. Holt, D. Leys, N. S. Scrutton, A. W. Munro, *Biochemical Society Transactions* **2005**, *33*, 747.
- [78] F. P. Guengerich, A. W. Munro, *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 17065.
- [79] A. W. Munro, H. M. Girvan, K. J. McLean, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2007**, *1770*, 345.
- [80] S. Y. Li, L. M. Podust, D. H. Sherman, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 12940.
- [81] K. D. Belsare, A. J. Ruff, R. Martinez, A. V. Shivange, H. Mundhada, D. Holtmann, J. Schrader, U. Schwaneberg, *Biotechniques* **2014**, *57*, 13.
- [82] A. W. Munro, D. G. Leys, K. J. McLean, K. R. Marshall, T. W. B. Ost, S. Daff, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, C. C. Moser, C. C. Page, P. L. Dutton, *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 250.
- [83] M. T. Lundemo, J. M. Woodley, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2015**, *99*, 2465.

- [84] C. J. Paddon, P. J. Westfall, D. J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D. R. Polichuk, K. H. Teoh, D. W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Dengrove, D. Diola, G. Dorin, K. W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S. P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, H. Jiang, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L. F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievens, P. S. Covello, J. D. Keasling, K. K. Reiling, N. S. Renninger, J. D. Newman, *Nature* **2013**, *496*, 528.
- [85] N. Sawada, T. Sakaki, S. Yoneda, T. Kusudo, R. Shinkyō, M. Ohta, K. Inouye, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *320*, 156.
- [86] K. Hayashi, H. Sugimoto, R. Shinkyō, M. Yamada, S. Ikeda, S. Ikushiro, M. Kamakura, Y. Shiro, T. Sakaki, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11964.
- [87] S. Jennewein, C. D. Rithner, R. M. Williams, R. B. Croteau, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 13595.
- [88] C. Dingler, W. Ladner, G. A. Krei, B. Cooper, B. Hauer, *Pesticide Science* **1996**, *46*, 33.
- [89] M. Girhard, K. Machida, M. Itoh, R. D. Schmid, A. Arisawa, V. B. Urlacher, *Microbial Cell Factories* **2009**, *8*.
- [90] S. Janocha, D. Schmitz, R. Bernhardt, *Biotechnology of Isoprenoids* **2015**, *148*, 215.
- [91] K. Gbewonyo, B. C. Buckland, M. D. Lilly, *Biotechnology and Bioengineering* **1991**, *37*, 1101.
- [92] R. K. Gudimichi, C. Randall, D. J. Opperman, O. A. Olaofe, S. T. L. Harrison, J. Albertyn, M. S. Smit, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2012**, *96*, 1507.
- [93] M. T. Lundemo, S. Notonier, G. Striedner, B. Hauer, J. M. Woodley, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, *100*, 1197.
- [94] M. C. C. J. C. Ebert, S. L. Durr, A. A. Houle, G. Lamoureux, J. N. Pelletier, *Acs Catalysis* **2016**, *6*, 7426.
- [95] J. B. van Beilen, Z. Li, W. A. Duetz, T. H. M. Smits, B. Witholt, *Oil & Gas Science and Technology-Revue D Ifp Energies Nouvelles* **2003**, *58*, 427.
- [96] T. H. M. Smits, S. B. Balada, B. Witholt, J. B. van Beilen, *Journal of Bacteriology* **2002**, *184*, 1733.
- [97] M. Kubota, M. Nodate, M. Yasumoto-Hirose, T. Uchiyama, O. Kagami, Y. Shizuri, N. Misawa, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2005**, *69*, 2421.
- [98] E. G. Funhoff, U. Bauer, I. Garcia-Rubio, B. Witholt, J. B. van Beilen, *Journal of Bacteriology* **2006**, *188*, 5220.
- [99] D. Scheps, S. H. Malca, H. Hoffmann, B. M. Nestl, B. Hauer, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 6727.
- [100] S. Honda Malca, D. Scheps, L. Kuhnel, E. Venegas-Venegas, A. Seifert, B. M. Nestl, B. Hauer, *Chem Commun* **2012**, *48*, 5115.
- [101] D. Scheps, S. H. Malca, S. M. Richter, K. Marisch, B. M. Nestl, B. Hauer, *Microbial Biotechnology* **2013**, *6*, 694.
- [102] S. Notonier, Ł. Gricman, J. Pleiss, B. Hauer, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1550.
- [103] M. J. Weissenborn, S. Notonier, S. L. Lang, K. B. Otte, S. Herter, N. J. Turner, S. L. Flitsch, B. Hauer, *Chemical Communications* **2016**, *52*, 6158.
- [104] V. B. Urlacher, M. Girhard, *Trends in Biotechnology* **2012**, *30*, 26.
- [105] T. Fujii, T. Narikawa, F. Sumisa, A. Arisawa, K. Takeda, J. Kato, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2006**, *70*, 1379.

- [106] J. O. Metzger, U. Bornscheuer, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *71*, 13.
- [107] E. Duplus, M. Glorian, C. Forest, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 30749.
- [108] J. Bruddrus, B. Schmidt, *Grundlagen der organischen Chemie*, **2015**.
- [109] S. Warwel, H. G. Jagers, S. Thomas, *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology* **1992**, *94*, 323.
- [110] T. Yokota, A. Watanabe, US5191096 A, US Patent, **1992**.
- [111] J. A. Labinger, J. E. Bercaw, *Nature* **2002**, *417*, 507.
- [112] A. Beopoulos, J. Verbeke, F. Bordes, M. Guicherd, M. Bressy, A. Marty, J. M. Nicaud, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98*, 251.
- [113] Y. Wache, M. Aguedo, J. M. Nicaud, J. M. Belin, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *61*, 393.
- [114] W. H. Lu, J. E. Ness, W. C. Xie, X. Y. Zhang, J. Minshull, R. A. Gross, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 15451.
- [115] L. A. Mitchell, Y. Z. Cai, M. Taylor, A. M. Noronha, J. Chuang, L. X. Dai, J. D. Boeke, *Acs Synthetic Biology* **2013**, *2*, 473.
- [116] D. G. Gibson, L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Nature Methods* **2009**, *6*, 343.
- [117] D. G. Gibson, *Synthetic Biology, Pt B* **2011**, *498*, 349.
- [118] T. Omura, R. Sato, *Journal of Biological Chemistry* **1964**, *239*, 2370.
- [119] T. Omura, R. Sato, *Journal of Biological Chemistry* **1964**, *239*, 2379.
- [120] S. M. Hoffmann, H.-R. Danesh-Azari, C. Spandolf, M. J. Weissenborn, G. Grogan, B. Hauer, *Chemcatchem* **2016**, *8*, 3234.
- [121] D. Sirim, M. Widmann, F. Wagner, J. Pleiss, *Bmc Structural Biology* **2010**, *10*.
- [122] J. Henin, G. Fiorin, C. Chipot, M. L. Klein, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2010**, *6*, 35.
- [123] E. Darve, A. Pohorille, *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 9169.
- [124] E. Darve, D. Rodriguez-Gomez, A. Pohorille, *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128*.
- [125] J. Henin, C. Chipot, *Journal of Chemical Physics* **2004**, *121*, 2904.
- [126] N. Strushkevich, F. MacKenzie, T. Cherkesova, I. Grabovec, S. Usanov, H. W. Park, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 15535.
- [127] Y. Hiruma, M. A. S. Hass, Y. Kikui, W. M. Liu, B. Olmez, S. P. Skinner, A. Blok, A. Kloosterman, H. Koteishi, F. Lohr, H. Schwalbe, M. Nojiri, M. Ubbink, *Journal of Molecular Biology* **2013**, *425*, 4353.
- [128] S. Tripathi, H. Y. Li, T. L. Poulos, *Science* **2013**, *340*, 1227.
- [129] L. Gricman, C. Vogel, J. Pleiss, *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2015**, *83*, 1593.
- [130] L. Gricman, M. J. Weissenborn, S. M. Hoffmann, N. Borlinghaus, B. Hauer, J. Pleiss, *Chemistryselect* **2016**, *1*, 1243.
- [131] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Z. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson, D. G. Higgins, *Molecular Systems Biology* **2011**, *7*.
- [132] G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, S. E. Brenner, *Genome Research* **2004**, *14*, 1188.
- [133] S. M. Hoffmann, M. J. Weissenborn, Ł. Gricman, S. Notonier, J. Pleiss, B. Hauer, *Chemcatchem* **2016**, *8*, 1591.

- [134] M. Nodate, M. Kubota, N. Misawa, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *71*, 455.
- [135] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *Journal of Molecular Biology* **1986**, *189*, 113.
- [136] J. E. Schaffer, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2002**, *282*, E239.
- [137] P. N. Black, C. C. DiRusso, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2003**, *67*, 454.
- [138] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 6683.
- [139] F. Bruhlmann, L. Fourage, C. Ullmann, O. P. Haefliger, N. Jeckelmann, C. Dubois, D. Wahler, *Journal of Biotechnology* **2014**, *184*, 17.
- [140] P. Meinhold, M. W. Peters, A. Hartwick, A. R. Hernandez, F. H. Arnold, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348*, 763.
- [141] H. Y. Li, T. L. Poulos, *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 140.
- [142] Y. Yang, J. Liu, Z. Li, *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53*, 3120.
- [143] K. G. Ravichandran, S. S. Boddupalli, C. A. Hasemann, J. A. Peterson, J. Deisenhofer, *Biophysical Journal* **1993**, *64*, A350.
- [144] O. Gotoh, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 83.
- [145] C. F. Butler, C. Peet, A. E. Mason, M. W. Voice, D. Leys, A. W. Munro, *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 25387.
- [146] M. Iwasaki, T. A. Darden, L. G. Pedersen, D. G. Davis, R. O. Juvonen, T. Sueyoshi, M. Negishi, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 759.
- [147] A. Magistrato, J. Sgrignani, R. Krause, A. Cavalli, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2017**, *8*, 2036.
- [148] A. Eschenmoser, *Angew Chem Int Edit.* **1995**, *33*, 2363.
- [149] N. Kress, J. Rapp, B. Hauer, *Chembiochem* **2017**, *18*, 717.
- [150] S. Rehm, P. Trodler, J. Pleiss, *Protein Science* **2010**, *19*, 2122.
- [151] A. Gutteridge, J. Thornton, *Journal of Molecular Biology* **2005**, *346*, 21.
- [152] J. P. Changeux, *Annual Review of Biophysics, Vol 41* **2012**, *41*, 103.
- [153] L. Biedermannova, Z. Prokop, A. Gora, E. Chovancova, M. Kovacs, J. Damborsky, R. C. Wade, *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 29062.
- [154] J. Catalano, K. Sadre-Bazzaz, G. A. Amodeo, L. Tong, A. McDermott, *Biochemistry* **2013**, *52*, 6807.
- [155] G. H. Bell, *Chemistry and Physics of Lipids* **1972**, *10*, 1
- [156] S. Notonier, L. Gricman, J. Pleiss, B. Hauer, *Chembiochem* **2016**, *17*, 1550.
- [157] K. A. Williams, C. M. Deber, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8919.
- [158] S. A. Funke, A. Eipper, M. T. Reetz, N. Otte, W. Thiel, G. Van Pouderoyen, B. W. Dijkstra, K. E. Jaeger, T. Eggert, *Biocatalysis and Biotransformation* **2003**, *21*, 67.
- [159] X. J. Luo, J. Zhao, C. X. Li, Y. P. Bai, M. T. Reetz, H. L. Yu, J. H. Xu, *Biotechnology and Bioengineering* **2016**, *113*, 2350.
- [160] S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science* **2016**, *354*, 1048.
- [161] M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K. E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Bocola, N. Otte, *Chembiochem* **2007**, *8*, 106.
- [162] Y. J. Chun, T. Shimada, F. P. Guengerich, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1996**, *330*, 48.
- [163] A. Parikh, F. P. Guengerich, *Protein Expression and Purification* **1997**, *9*, 346.
- [164] O. Sibbesen, J. J. DeVoss, P. R. O. deMontellano, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 22462.

- [165] L. Ba, P. Li, H. Zhang, Y. Duan, Z. L. Lin, *Biotechnology and Bioengineering* **2013**, 110, 2815.
- [166] W. Mao, M. A. Schuler, M. R. Berenbaum, *Insect Molecular Biology* **2007**, 16, 481.
- [167] Y. Yasutake, T. Nishioka, N. Imoto, T. Tamura, *Chembiochem* **2013**, 14, 2284.
- [168] H. Kabumoto, K. Miyazaki, A. Arisawa, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2009**, 73, 1922.
- [169] Darimont D., Nebel B. A., Weissenborn M. J., H. B., *Bioelectrochemistry* **2017**, *accepted*.
- [170] S. Govindaraj, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1995**, 34, 11221.
- [171] S. Govindaraj, T. L. Poulos, *Protein Science* **1996**, 5, 1389.
- [172] A. Robin, G. A. Roberts, J. Kisch, F. Sabbadin, G. Grogan, N. Bruce, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Chemical Communications* **2009**, 2478.
- [173] W. H. Lee, M. D. Kim, Y. S. Jin, J. H. Seo, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, 97, 2761.
- [174] M. Schrewe, M. K. Julsing, B. Buhler, A. Schmid, *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 6346.
- [175] E. Jung, B. G. Park, M. M. Ahsan, J. Kim, H. Yun, K. Y. Choi, B. G. Kim, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, 100, 10375.
- [176] J. W. Dubendorff, F. W. Studier, *Journal of Molecular Biology* **1991**, 219, 45.
- [177] S. Zelasko, A. Palaria, A. Das, *Protein Expression and Purification* **2013**, 92, 77.
- [178] E. Amann, B. Ochs, K. J. Abel, *Gene* **1988**, 69, 301.
- [179] M. J. Todd, P. V. Viitanen, G. H. Lorimer, *Science* **1994**, 265, 659.
- [180] E. Inoue, Y. Takahashi, Y. Imai, T. Kamataki, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, 269, 623.
- [181] G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, *Frontiers in Microbiology* **2014**, 5.
- [182] J. T. Lis, R. Schleif, *Journal of Molecular Biology* **1973**, 79, 149.
- [183] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, *Journal of Bacteriology* **1995**, 177, 4121.
- [184] A. Wegerer, T. Q. Sun, J. Altenbuchner, *Bmc Biotechnology* **2008**, 8.
- [185] J. B. van Beilen, G. Eggink, H. Enequist, R. Bos, B. Witholt, *Molecular Microbiology* **1992**, 6, 3121.
- [186] J. B. van Beilen, S. Panke, S. Lucchini, A. G. Franchini, M. Rothlisberger, B. Witholt, *Microbiology-Sgm* **2001**, 147, 1621.
- [187] A. M. Chakrabarty, G. Chou, I. C. Gunsalus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, 70, 1137.
- [188] E. M. Hearn, D. R. Patel, B. W. Lepore, M. Indic, B. van den Berg, *Nature* **2009**, 458, 367.
- [189] K. Klein, Steinber.R, B. Fiethen, P. Overath, *European Journal of Biochemistry* **1971**, 19, 442.
- [190] K. Kameda, W. D. Nunn, *Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256, 5702.
- [191] J. D. Weimar, C. C. DiRusso, R. Delio, P. N. Black, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 29369.
- [192] J. H. Bae, B. G. Park, E. Jung, P. G. Lee, B. G. Kim, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, 98, 8917.



Universität Stuttgart

Institut für Biochemie und Technische Biochemie
Abteilung Technische Biochemie
Universität Stuttgart

Allmandring 31
D - 70569 Stuttgart
Deutschland

Tel.: +49 711 685 63193
Web: www.itb.uni-stuttgart.de

