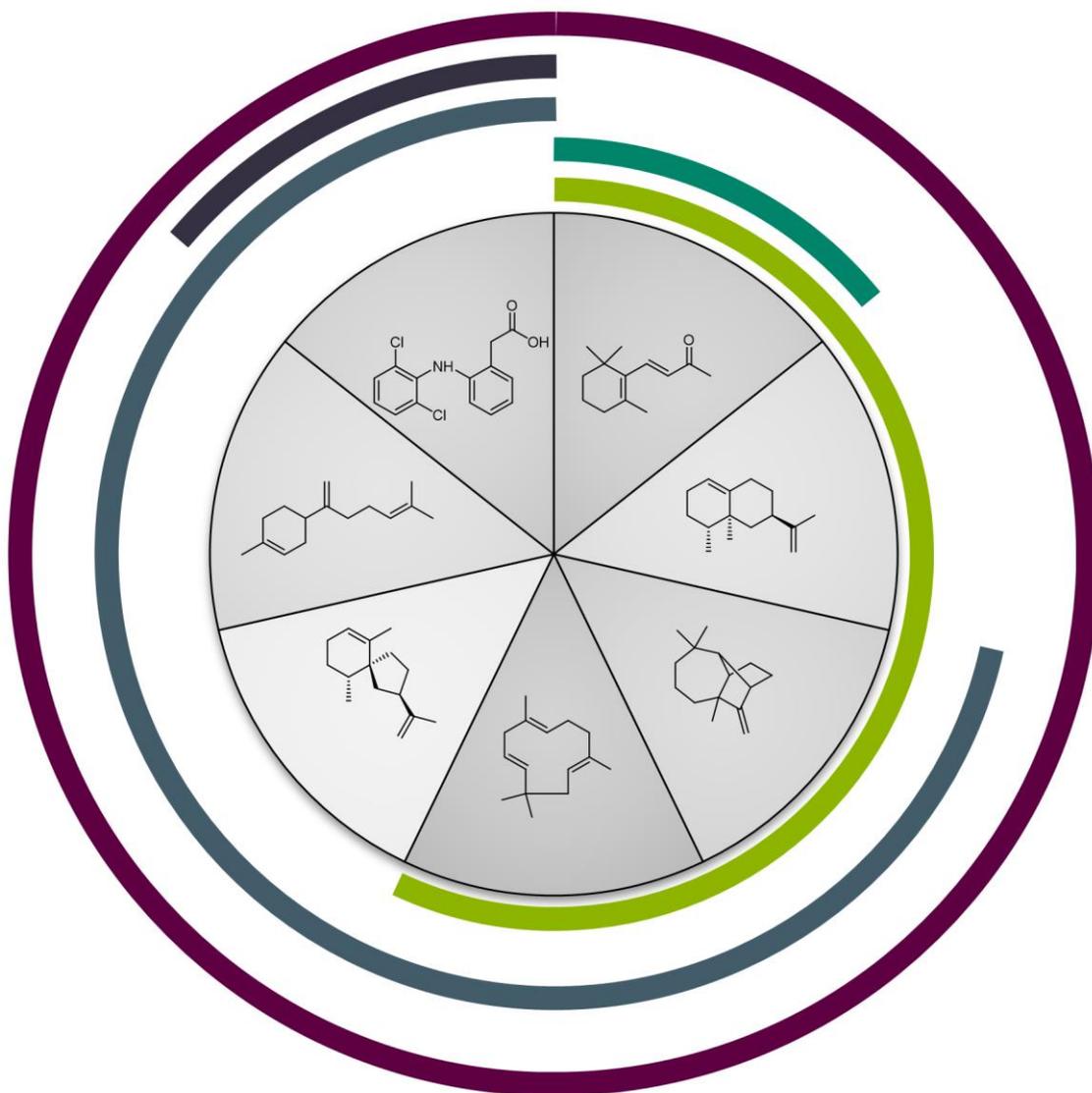


Identifikation und Charakterisierung neuer Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung

Identification and characterization of novel biocatalysts for
C-H-oxygenation



Jan Michael Klenk

Institut für Biochemie und Technische Biochemie

Abteilung Technische Biochemie

Universität Stuttgart

Identifikation und Charakterisierung neuer Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung

-

Identification and characterization of novel biocatalysts for
C-H-oxyfunctionalization

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

Dissertation

Vorgelegt von
Jan Michael Klenk
aus Stuttgart

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Ralf Takors
Vorsitzender:	Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2018

Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart
Abteilung Technische Biochemie

- 2018 -

„Die Zeit verweilt lange genug für denjenigen, der sie nutzen will.“

- *Leonardo da Vinci (1452 – 1519)* -

Cover

JK-Clock: Übersicht der in dieser Arbeit identifizierten Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung unterschiedlicher industriell relevanter C-H-Verbindungen. Jeder Farbbereich steht für einen oder mehrere Biokatalysatoren mit dem jeweils zugehörigen Substratspektrum.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Identifikation und Charakterisierung neuer Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren bestätige ich ausdrücklich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde

Declaration of Authorship

I hereby declare that the present thesis entitled “Identification and characterization of novel biocatalysts for C-H-oxyfunctionalization” is the result of my own work, that all sources used or quoted have been indicated, and that I have not used any illegitimate means. I further declare that I have not submitted this thesis for a degree in some form or another.

Tamm, 26.03.2018

Jan M. Klenk

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Die experimentellen Arbeiten entstanden im Zeitraum von März 2014 bis August 2017 im Rahmen des siebten europäischen Rahmenprogramms (EU FP7) namens *BIOOX – Developing a validated technology platform for the application of oxygen dependent enzymes in synthesis and transformation of alcohols* (grant agreements no 613849).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

J. M. Klenk, B. A. Nebel, J. L. Porter, J. K. Kulig, S. A. Hussain, S. M. Richter, M. Tavanti, N. J. Turner, M. A. Hayes, B. Hauer & S. L. Flitsch. The self-sufficient P450 RhF expressed in a whole cell system selectively catalyzes the 5-hydroxylation of diclofenac. *Biotechnology Journal*, **12**, 1–8 (2017).

J. M. Klenk, L. Kontny, B. A. Nebel & B. Hauer. Synthesis of oxyfunctionalized NSAID metabolites by microbial biocatalysts. *bioRxiv, preprint*, <https://doi.org/10.1101/315374> (2018).

J. M. Klenk, P. Dubiel, M. Sharma, G. Grogan & B. Hauer. Characterization and structure-guided engineering of the novel versatile terpene monooxygenase CYP109Q5 from *Chondromyces apiculatus* DSM436. *Microbial Biotechnology*, *in press*, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13354>.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Personen bedanken, die mich im Laufe der Arbeit begleitet, unterstützt und gefördert haben.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die ausgezeichnete Betreuung dieses vielseitigen und herausfordernden Themengebiets sowie die überlassene Freiheit beim Bearbeiten der Dissertation. Insbesondere unsere vielen interessanten und hilfreichen Diskussionen sowie die darin vermittelten Erfahrungen bergen einen unschätzbaren Wert und inspirieren mich stets.

Herrn Prof. Dr. Ralf Takors danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser für die freundliche Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Bettina Nestl und Dr. Bernd Nebel für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge während meiner Promotion, die freundschaftliche Atmosphäre, die kritische Korrektur verschiedener Manuskripte und die hervorragende Kooperation in unterschiedlichen Projekten.

Bei Sven Richter möchte ich mich herzlich für die wertvolle Zusammenarbeit und Hilfestellung in der Proteinaufreinigung sowie der Kultivierung und Biotransformation im Bioreaktor-Maßstab bedanken. Danke auch an Lisa Kontny für die Mitarbeit in unterschiedlichen Projekten sowie insbesondere die Hilfe im Labor während meiner Zeit auf Krücken.

Des Weiteren danke ich dem NMR-Kompetenzteam Dr. Lars Hinner, Nico Kress, Jens Schmid, Sabrina Henche und insbesondere Andreas Schneider für die Unterstützung beim Auswerten komplizierter NMR-Spektren.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern danke ich herzlich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank Sara, Sandra, Stephan, Nico, Lars, Ludwig, Rebecca, Peter, Leonie, Nils, Ondrej, Dominique, Thorsten, Sandy, Maïke, Silke, Matthias, Janosch, Julian, Lea, Philipp, Christine, Andreas S., Mihaela, Conny, Tobi und Jenny, um nur einige der Personen zu nennen, die zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beitragen und für gelungene, entspannte Abende sorgen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Studenten Julia Hallmen, Tim Hierlemann und Alexander Rau sowie den Teilnehmern des Industrial Biotechnology Praktikums WS 16/17 für ihre Mitarbeit in den verschiedenen Abschnitten dieser Arbeit. Für eure weitere wissenschaftliche Laufbahn wünsche ich euch alles erdenklich Gute.

Den Kooperationspartnern im Rahmen des EU-Projektes BIOOX möchte ich hiermit für die zahlreichen Diskussionen, die wertvollen Erfahrungen u.a. auf Meetings und die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Ich danke dem Land Baden-Württemberg für die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG).

Des Weiteren gilt mein Dank insbesondere dem großartigsten Labor, das man sich vorstellen kann. Vielen Dank liebe Wellness Oase für die überragende Zeit mit unschätzbaren Momenten. Dr. Lisa Kühnel, Max-Philipp Fischer und Andreas Hunold, ihr seid die Besten und ich werde unsere gemeinsame Zeit am ITB nie vergessen. Ich danke insbesondere dir, Max, für dein offenes Ohr bei Problemen jeglicher Art, deine Tipps und Ratschläge sowie für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit – Best Lab-Buddy.

Tiefste Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meiner Familie und meinen Freunden, welche mir nicht nur während meines Studiums einen großen Rückhalt gaben.

Der größte Dank gilt meiner Frau Felicitas, die mich auch in schwierigen Zeiten bedingungslos unterstützt, an mich glaubt, wieder aufbaut sowie mich durch ihre Art und Zuneigung jederzeit zum Strahlen bringt. Jeder Tag mit dir und unseren Zwillingen Jonathan und Samuel ist ein Geschenk!

Für Felicitas, Jonathan und Samuel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abstract.....	IV
Zusammenfassung.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Cytochrom P450 Monooxygenasen – versatile Oxidoreduktasen	2
1.2 P450 – ein komplexes Multikomponentensystem	7
1.3 Potenzielle Zielmoleküle für die Synthese hochpreisiger Produkte.....	11
1.4 Oxyfunktionalisierungen in der Biokatalyse	14
1.5 <i>Protein Engineering</i> zur Adaptation von P450s	18
1.6 Identifikation neuer Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung	20
1.7 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Enzyme.....	25
2.1.3 Molekularbiologische Kits, DNA- und Molekulargewichtsmarker.....	26
2.1.4 Synthetische DNA	26
2.1.5 Verwendete Organismen	27
2.1.6 Verwendete Plasmide	28
2.1.7 Nährmedien	28
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Prokaryoten.....	30
2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Eukaryoten	30
2.2.4 DNA-Sequenzierung.....	30
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
2.2.7 DNA-Aufreinigung	31

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.9 QuikChange® (ortsgerichtete Mutagenese)	33
2.2.10 Gibson Assembly®.....	35
2.2.11 Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen.....	37
2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
2.2.13 Kolonie PCR.....	38
2.3 Mikrobiologische Methoden	38
2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	38
2.3.2 Kultivierung und Stammhaltung von Eukaryoten.....	38
2.3.3 Kultivierung und Stammhaltung von <i>Arthrobacter</i> sp.....	39
2.3.4 Kultivierung und Stammhaltung von <i>Phenyllobakterium immobile</i> Stamm E.....	39
2.3.5 Kultivierung und Stammhaltung von <i>Chondromyces apiculatus</i> DSM436	39
2.3.6 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	40
2.3.7 Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	40
2.3.8 Heterologe Proteinexpression im Schüttelkolben.....	40
2.3.9 Heterologe Proteinexpression im Bioreaktor	42
2.3.10 Zelllyse.....	43
2.4 Biochemische Methoden.....	44
2.4.1 Proteinaufreinigung.....	44
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	48
2.4.4 Proteomanalyse von <i>Arthrobacter</i> sp. und <i>Beauveria bassiana</i>	48
2.4.5 UV/Vis-Spektroskopische und Fluorometrische Methoden.....	49
2.5 Biotransformationen.....	52
2.5.1 Biotransformation mit Eukaryoten	52
2.5.2 Analytische Biotransformationen <i>in vitro</i>	53
2.5.3 Bestimmung von kinetischen Konstanten	53
2.5.4 Analytische Biotransformationen <i>in vivo</i>	54
2.5.5 Präparative Biotransformationen.....	55
2.5.6 Biotransformation im Bioreaktor.....	55

2.6 Chemisch-analytische Methoden	56
2.6.1 GC-FID und GC-MS Analytik.....	56
2.6.2 HPLC und LC-MS Analytik	59
2.6.3 Aufreinigung präparativer Biotransformationen	60
2.6.4 NMR-Spektroskopie.....	62
2.7 Bioinformatische Methoden.....	71
2.7.1 Identifikation der NSAIDs hydroxylierenden Eukaryoten	71
2.7.2 Genomanalyse von <i>Arthrobacter</i> sp.	72
2.7.3 Untersuchung der Verwandtschaft sowie Annotierung von P450s.....	72
2.7.4 Homologiemodellierung, <i>Docking</i> , Rationales Proteindesign.....	72
3. Ergebnisse.....	73
3.1 Selektive Hydroxylierung von Diclofenac (8) durch P450 RhF	73
3.2 Untersuchung von Eukaryoten für die NSAID Hydroxylierung.....	79
3.3 Rationale Mutagenese von CYP116B3	84
3.4 Identifikation neuer P450 Biokatalysatoren mittels Proteomanalyse	88
3.4 Klonierung, Expression und Charakterisierung neuer P450 Biokatalysatoren	94
3.4.1 Rekonstitution der Aktivität der P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.....	99
3.5 Weiterführende Charakterisierung der P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.....	101
3.5.1 Untersuchung der Redoxpartner und des Substratspektrums der P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.	101
3.5.2 Determinierung der natürlichen Substrate durch <i>Spin-State</i> Experimente.....	106
3.5.3 Determinierung der Effizienz der neuen Biokatalysatoren <i>in vitro</i>	110
3.5.4 Generierung effizienter P450 Ganzzellbiokatalysatoren.....	115
3.6 Bakterielle P450-Fusionsproteine für die Terpenoxyfunktionalisierung	116
3.6.1 Rationales Enzymdesign des Fusionsproteins ITB1693.....	118
3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus <i>Chondromyces apiculatus</i>	121
3.7.1 Rationales Enzymdesign von CYP109Q5	125
3.7.2 <i>In vitro</i> Charakterisierung der CYP109Q5-Mutantenbibliothek.....	128
3.7.3 Generierung eines effizienten CYP109Q5-Ganzzellbiokatalysators	137
4. Diskussion.....	143

4.1 Entwicklung eines effizienten P450 Ganzzellprozesses am Beispiel P450 RhF	143
4.2 Neue mikrobielle Biokatalysatoren für die NSAID-Oxyfunktionalisierung	146
4.3 Strategien für die P450-katalysierte Terpenoxyfunktionalisierung.....	148
4.3.1 Rationale Mutagenese eines natürlichen P450-Fusionsproteins.....	149
4.3.2 Identifikation neuer Biokatalysatoren aus terpenmetabolisierenden Organismen	150
4.3.3 Neuartige P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.....	152
4.3.4 P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp. als effektive Biokatalysatoren.....	155
4.3.5 Katalytische <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Effizienz der P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.....	161
4.3.6 Natürliche P450-Fusionsproteine.....	164
4.3.7 Homologe P450s zu terpenhydroxylierenden Enzymen	166
4.4 Neue Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung.....	181
5. Ausblick.....	189
6. Literaturverzeichnis	193
7. Anhang.....	215
7.1 Aminosäuren	215
7.2 P450 Rhf.....	215
7.3 NSAID-Hydroxylierung durch Eukaryoten	216
7.4 Neue P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Ralstonia metallidurans</i> und <i>C. apiculatus</i>	217
7.4.1 Wachstumsversuche mit <i>Arthrobacter</i> sp.....	217
7.4.2 Spektroskopische Charakterisierung der <i>Arthrobacter</i> sp. P450s.....	218
7.4.3 Dual-Vektor-Systeme	220
7.4.4 CO-Differenzspektren und ausgewählte GC-Chromatogramme der ITB1693 Varianten.....	223
7.4.5 Spektroskopische Charakterisierung der <i>C. apiculatus</i> P450s	225
7.4.6 <i>Screening</i> alternativer Redoxpartner.....	226
7.4.7 Gesamtüberblick der <i>Screenings</i> der neu identifizierten P450s.....	228
7.4.8 Initiales <i>Screening</i> der CYP109Q5 Varianten.....	232
7.4.9 <i>Screening</i> der aufgereinigten CYP109Q5 Varianten, CYP125E3 und CYP109B1.....	235

7.4.10 Ausgewählte GC-Chromatogramme der präparativen CYP109Q5 <i>in vivo</i> Biotransformationen	239
7.5 Verwendete Oligonukleotide	240
7.6 Verwendete Plasmide	245
7.7 DNA-Sequenzen	250
7.8 NMR-Spektren	253
7.9 Vektorkarten	270
8. Abbildungsverzeichnis.....	271
9. Tabellenverzeichnis	274

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	CYP / P450	Cytochrom P450
ACN	Acetonitril		Monooxygenase
Amax	Maximale Absorption	DAD	<i>diode array detector</i>
Amp	Ampicillin	DCF	Diclofenac
AdR	<i>Bovine</i> Adrenodoxin- Reduktase	ddH ₂ O	doppelt demineralisiertes
AdX	<i>Bovine</i> Adrenodoxin		Wasser
AEBSF	4-Benzensulfonylfluorid	dH ₂ O	destilliertes Wasser
5-Ala	5-Aminolävulinsäure	DNA	engl.
APS	Ammoniumperoxo- disulfat	dNTP	<i>Desoxyribonukleinsäure</i> Desoxyribonukleotidtri- phosphat
AS	Aminosäuren		
<i>B. bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	d.h.	das heißt
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
bp	Basenpaare	DTT	Dithiothreitol
BCA	Bichinoninsäure	EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure
Blast	<i>Basic Local Alignment</i> <i>Search Tool</i>	<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> , und andere
BMR	Diflavin- Reductasedomäne von P450 BM3	eV <i>E. coli</i>	Elektronenvolt <i>Escherichia coli</i>
BSA	Rinderserumalbumin	FA	Ameisensäure
BSTFA	N,O- Bistrifluoroacetamide	FAD	Flavin-Adenin- Dinukleotid
bzw.	beziehungsweise	FdR	<i>E. coli</i> Flavodoxin- Reduktase
C-H	Kohlenwasserstoff	FdX	<i>E. coli</i> Flavodoxin
CAM	Chloramphenicol	FeRed_1	Ferredoxin-Reduktase_I aus <i>Arthrobacter</i> sp.
CamA	<i>P. putida</i> Putidaredoxin- Reduktase	FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
CamB	<i>P. putida</i> Putidaredoxin	FeSO ₄	Eisensulfat
<i>C. apiculatus</i>	<i>Chondromyces apiculatus</i>	FID	Flammenionisations- detektor
<i>C. nebularis</i>	<i>Clitocybe nebularis</i>		
CO	Kohlenstoffmonooxid	FlavRed	Flavodoxin-Reduktase aus <i>Arthrobacter</i> sp.
CPR	Eukaryotische NADPH- Cytochrom-P450- Oxidoreduktase	FldX	Flavodoxin aus <i>Arthrobacter</i> sp.

Abkürzungsverzeichnis

FMN	Flavin-Mononukleotid	k_{cat}	Wechselzahl, Umsatz eines Enzyms an Substratmolekülen pro Zeiteinheit
FPP	Farnesyldiphosphat		
fw	<i>forward</i> (Oligonukleotid)		
G6PDH	Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase	K_d kDa	Dissoziationskonstante Kilo Dalton
g	Gramm	KGM	Kartoffel-Glucose- Medium
GC	Gaschromatographie		
GGPP	Geranylgeranyl- diphosphat	K_m	Michaelis-Konstante, Substratkonzentration bei $\frac{1}{2} k_{cat}$
Glc	Glucose		
GPP	Geranyldiphosphat	$k_{cat} K_m^{-1}$	Katalytische Effizienz
h	Stunde	KPi	Kaliumphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssig- keits-chromatographie	kV L	Kilovolt Liter
IEX	Ionenaustausch- chromatographie	LB LSU	<i>Lysogeny broth</i> <i>28S nuclear ribosomal large subunit rRNA gene</i>
IPTG	Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid		
IMAC	Immobilisierte- Metallionen- Affinitätschromato- graphie	M m m^3 MeOH	molar (Mol L ⁻¹) Milli Kubikmeter Methanol
<i>in situ</i>	am Ort; komplette Biosynthese	min MiniPrep	Minute Minipreparation (DNA)
CIP	<i>Cleaning in place</i>	mL	Milliliter
<i>in vitro</i>	im Glas; Prozess außerhalb des lebendigen Organismus	mM MOPS	Millimol 3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure
<i>in vivo</i>	im lebendigen; Prozess im lebendigen Organismus	<i>M. hiemalis</i> MS MTBE	<i>Mucor hiemalis</i> Massenspektrometrie methyl tert-butyl ether
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>	NADH	β -Nicotinamidadenin- dinukleotid
Kan	Kanamycin	NADPH	β -Nicotinamidadenin- dinukleotidphosphat
kb	Kilobase (DNA)	n.a. n.b.	nicht analysiert nicht bestimmt

n.d.	nicht detektiert		
ng	Nanogramm	TLC	Dünnschicht-
nm	Nanometer		chromatographie
NSAIDs	Nicht-steroidale Antirheumatika	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
NMR	Kernspinresonanz	U	Unit
OD ₆₀₀	optische Dichte (bei 600 nm Extinktion)	UV	Ultraviolett, ultraviolettes Licht
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	μ	Mikro
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase- kettenreaktion	μg μL μm	Mikrogramm Mikroliter Mikrometer
PDB	<i>Protein Data Base</i>	V	Volt
PFOR	Phthalat-Dioxygenase- Reduktase-Domäne	v/v WT	Volumen pro Volumen Wildtyp
PMSF	Phenylmethansulfonyl- fluorid	w/v z.B. δ	Gewicht pro Volumen zum Beispiel Chemische
ppm	<i>parts per million</i>		Verschiebung
ng	Nanogramm		
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>		
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute		
rv	<i>reverse</i> (Oligonukleotid)		
s	Sekunde		
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
<i>S. cellulorum</i>	<i>Sorangium cellulorum</i>		
sp.	Spezies		
SRS	<i>Substrate recognition site</i>		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TB	<i>terrific broth</i>		

Abstract

In modern biocatalysis, the enzyme class of cytochrome P450 monooxygenases represents an environmentally friendly alternative to the often under harsh reaction conditions and with limited selectivity proceeding chemical synthesis. Furthermore, P450s are also able to selectively oxyfunctionalize unactivated carbon-hydrogen bonds and thus complement synthetic methods as well as generate valuable natural products under mild reaction conditions. This class of enzymes represent ubiquitous, promiscuous, highly diverse and highly evolvable biocatalysts. However, despite the versatility and unique catalytic properties of P450s, is due to the complexity of the multicomponent system a gradual improvement indispensable for an industrial application, which is relatively sophisticated.

The establishment of new P450 biocatalysts for the generation of valuable oxyfunctionalized drug metabolites as well as interesting products for the flavor and fragrance industry were the objectives of the present dissertation. Nature has a tremendous repertoire of potential biocatalysts in the highly diverse P450 superfamily for specific applications, but with only about 5,000 characterized P450s a small fraction of the rapidly growing number of annotated sequences (> 38,000) has been studied. Ultimately, P450 whole-cell biocatalysts are mandatory for industrial process implementation due to their cofactor dependency. The transfer of the complex P450-based processes to the bioreactor scale with the aim of establishing efficient catalysts under process-relevant conditions has until now been very seldom carried out. For such an approach, a first part of this work explored the possibility of efficiently producing oxyfunctionalized drug metabolites, which are essential for toxicological and environmental studies. As biocatalyst, the natural fusion construct P450 RhF from *Rhodococcus* sp. was used. In previous work, it was shown that P450 RhF can selectively functionalize the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac to 5-hydroxydiclofenac using NADPH. This enzyme system was transferred to the bioreactor scale, where high and reproducible expression and product titers of up to 0.58 g L⁻¹ could be achieved. However, the activity varied strongly between resting and growing cells. One reason for this purpose is presumably the limitation of NADPH availability in the *E. coli* cells depending on the cell status. In addition, a further metabolite (quinoneimine) was detected, whose formation is catalysed non-enzymatically as a function of the salt concentration and the temperature. The oxyfunctionalized drug metabolites are chemically difficult to access and therefore, assuming their availability, have a high market value of several hundred euros per mg, for what reason this work also focused on a platform of different catalysts for NSAID hydroxylations besides P450 RhF. With the filamentous fungi *Beauveria bassiana*, *Clitocybe nebularis* and *Mucor hiemalis* it was possible to produce different diclofenac metabolites with isolated yields of over 50% in a simple and inexpensive process using 0.6 g L⁻¹ substrate. Moreover, a previously unknown compound 3',4'-dihydroxydiclofenac

could be synthesized. In addition, high isolated yields of the hydroxylated metabolites above 99% (1 g L⁻¹ substrate) were achieved with other NSAID drugs such as ibuprofen, naproxen or mefenamic acid; these yields and product titers exceed previous methods with microorganisms and heterologously expressed P450s by over 250%.

Another focus of this work was the identification of new biocatalysts for the oxyfunctionalization of complex and bulky terpenes, which are so far only insufficiently biocatalytically or chemically accessible. Ultimately, P450 enzymes were designed to catalyze the final step in the biosynthesis of valuable terpenoids in terpene-producing *E. coli* whole-cell systems. Different strategies were pursued for this purpose: I) investigation of promiscuous activities of P450s, II) adaptation of P450s by rational mutagenesis, III) search for new P450s from terpene metabolizing organisms, and IV) search for homologous of terpene hydroxylating P450s.

In a first approach, no promiscuous activities towards the terpenes were initially identified with already characterized P450 fusion proteins. For this reason, efforts have been made to alter the bacterial natural fusion construct CYP116B3 from *Rhodococcus ruber* in such a way to extend the broad substrate spectrum of the enzyme towards selected terpenes.

However, this was unsuccessful, so terpene metabolizing organisms were searched as another strategy to identify new P450s. In biotransformations with *B. bassiana*, the first hydroxylated terpenes have been identified indicating a functionalization by P450s. By applying a proteomic analysis, the number of 83 potential P450s in *B. bassiana* could be reduced to one to four likely responsible P450s per substrate. However, the functional heterologous expression of the eukaryotic genes in *E. coli* failed. Searching for new P450s, an interesting papaverine-degrading organism, the Gram-positive bacterium *Arthrobacter* sp., was tested, which was able to grow on some terpenes as the sole C-source. Since the hydroxylation catalyzed by P450s is often the first step in the metabolism of, for instance, xenobiotic compounds, a proteomic analysis was applied to identify the responsible enzymes in *Arthrobacter* sp. The evaluation led to the identification of a potential cluster of two P450s with the putative electron-donating redox partners, which could be linked to papaverine degradation. With respect to the terpenes, however, no evidence was obtained. The activity of three P450s from *Arthrobacter* sp. could be reconstituted using physiological or heterologous redox partners that allowed further characterization of the corresponding enzymes. Similar to other members of the CYP199A family, CYP199A25 preferentially accepted benzoic acids as a substrate, which were regioselectively demethylated or hydroxylated in the *para*-position. The other P450s from *Arthrobacter* sp. are enzymes from P450 families with yet unknown function. The proteomic analysis as well as the postulated papaverine metabolism gave indications for possible phenylacetic acids as substrates, which could be confirmed experimentally. In the papaverine metabolism the P450s CYP1232A24 and CYP1232F1 catalyze the two-fold demethylation of 3,4-dimethoxyphenylacetic acid to

3,4-dihydroxyphenylacetic acid with different selectivities for the *meta*- and *para*-position. Interestingly, electrons from the clustered redox partners, a ferredoxin reductase and a flavodoxin, could be efficiently transferred, corresponding to a first functional physiological P450 class III system. In addition to detailed characterization of the substrate spectra, coupling efficiencies and kinetic parameters of the three enzymes were investigated as well as highly active whole-cell biocatalysts developed, which produced up to 1.77 g L⁻¹ of demethylated product.

However, except for an activity of CYP1232A24 towards β -ionone in the allylic position, all tested terpenes were not functionalized, so an uncharacterized panel of natural fusion constructs was tested for promiscuous activities. The substrate spectrum of an enzyme with low initial activities towards β -ionone and valencene was finally extended by rational enzyme design, which allowed the oxyfunctionalization of some of the selected sesquiterpenes. When applied in an α -humulene-producing *E. coli* strain of a cooperation partner, ITB1693 variant F95A selectively produced about 300 mg L⁻¹ α -humulene-6,7-epoxide *in situ*.

In addition, based on a homology search for terpene hydroxylases, five P450s from the myxobacterium *Chondromyces apiculatus* were isolated, whereof two could be further characterized. Both enzymes are able to accept a wide range of substrates and even functionalized the ionone ring of β -ionone in non-allylic positions. A focused mutant library of CYP109Q5 further shifted the selectivity to non-allylic positions and, for the first time, allowed the simultaneous synthesis of the rare and for carotenoid synthesis important products 2- and 3-hydroxy- β -ionone. With CYP109Q5, it was also possible to oxyfunctionalize the complex sesquiterpenes, with some variants exhibiting an enormous increase in activity and shift of selectivity. An efficient whole-cell system finally enabled the identification of products of selected biotransformations. Using the most active variant V80A/A280I and the solvent mediator cyclodextrin, the main products longifolenaldehyde and solavetivol were synthesized. The latter serves, among others, as a precursor of solavetivone, a valuable phytoalexin. Overall, CYP109Q5 proved to be highly evolvable and efficient. The studies in this work demonstrate that using rational mutagenesis the highly versatile CYP109Q5 generalist with an enormous substrate scope (terpenes, steroids, and NSAIDs) can be progressively evolved to an industrially valuable specialist for the synthesis of specific products.

Zusammenfassung

Die Enzymklasse der Cytochrom P450 Monooxygenasen stellt in der modernen Biokatalyse eine umweltfreundliche Alternative zu der oftmals unter harschen Reaktionsbedingungen und mit limitierter Selektivität ablaufenden chemischen Synthese dar. Weiterhin sind P450s in der Lage, auch nicht-aktivierte Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen selektiv zu oxyfunktionalisieren und somit synthetische Methoden zu komplementieren sowie wertvolle natürliche Produkte unter milden Reaktionsbedingungen zu generieren. Bei dieser Enzymklasse handelt es sich um ubiquitär vorkommende, promiskuitive, hoch diverse und hoch evolvierbare Biokatalysatoren. Trotz vielseitiger Anwendungsmöglichkeiten und der einzigartigen katalytischen Eigenschaften von P450s ist aufgrund der Komplexität des Multikomponentensystems allerdings eine schrittweise Verbesserung für eine industrielle Anwendung unabdingbar, die sich verhältnismäßig aufwändig gestaltet.

Die Etablierung neuer P450 Biokatalysatoren zur Generierung wertvoller oxyfunktionalisierter Medikamentenmetaboliten sowie für die Duft- und Aromastoffindustrie interessante Produkte waren Ziele der vorliegenden Dissertation. Die Natur hält in der hoch diversen P450-Superfamilie ein enormes Repertoire potenzieller Biokatalysatoren für spezifische Anwendungen bereit, jedoch ist mit bislang etwa 5000 charakterisierten P450s nur ein geringer Teil der rapide wachsenden Anzahl annotierter Sequenzen (> 38000) untersucht worden. Für die Implementierung in industrielle Prozesse sind letztendlich P450-Ganzzellbiokatalysatoren aufgrund ihrer Cofaktorabhängigkeit obligat. Der Transfer der komplexen P450-basierten Prozesse in den Bioreaktormaßstab mit dem Ziel, leistungsfähige Katalysatoren unter prozessrelevanten Bedingungen zu etablieren, wurde bis dato erst sehr selten durchgeführt. Für einen solchen Ansatz wurde in einem ersten Teil dieser Arbeit die Möglichkeit zur effizienten Herstellung von oxyfunktionalisierten Medikamentenmetaboliten untersucht, deren Bereitstellung essenziell für toxikologische und ökologische Studien ist. Als Biokatalysator wurde das natürliche Fusionskonstrukt P450 RhF aus *Rhodococcus* sp. eingesetzt. In vorhergehenden Arbeiten konnte festgestellt werden, dass P450 RhF das nicht-steroidale Antirheumatikum (NSAID) Diclofenac unter NADPH-Verbrauch selektiv zu 5-Hydroxydiclofenac funktionalisieren kann. Dieses Enzymsystem wurde in den Bioreaktormaßstab transferiert, wobei hohe und reproduzierbare Expressionen und Produkttiter von bis zu 0,58 g L⁻¹ erzielt werden konnten. Die Aktivität variierte dabei stark zwischen ruhenden und wachsenden Zellen. Eine Ursache hierfür stellt vermutlich die Limitierung der NADPH-Verfügbarkeit in den *E. coli* Zellen in Abhängigkeit vom Zellstatus dar. Darüber hinaus wurde ein weiterer Metabolit (Quinonimin) detektiert, dessen Bildung nicht-enzymatisch in Abhängigkeit von der Salzkonzentration sowie der Temperatur katalysiert wird. Die oxyfunktionalisierten Medikamentenmetaboliten sind chemisch oftmals schwer zugänglich und besitzen deshalb, ihre Verfügbarkeit vorausgesetzt, einen hohen

Marktwert von mehreren hundert Euro pro mg, weshalb in dieser Arbeit neben P450 RhF an einer Plattform unterschiedlicher Katalysatoren für NSAID Hydroxylierungen gearbeitet wurde. Mit den filamentösen Pilzen *Beauveria bassiana*, *Clitocybe nebularis* und *Mucor hiemalis* gelang es, unterschiedliche Diclofenacmetabolite bei einer Substratkonzentration von 0,6 g L⁻¹ in isolierten Ausbeuten über 50% in einem einfachen und günstigen Verfahren herzustellen. Darüber hinaus konnte eine bisher nicht bekannte Verbindung 3',4'-Dihydroxydiclofenac synthetisiert werden. Auch von weiteren NSAID-Medikamenten wie Ibuprofen, Naproxen oder Mefenaminsäure wurden hohe isolierte Ausbeuten von über 99% (1 g L⁻¹ Substrat) der hydroxylierten Metabolite erhalten; diese Ausbeuten respektive Produkttiter übertreffen bisherige Verfahren mit Mikroorganismen und heterolog exprimierten P450s um über 250%.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung neuer Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung komplexer und sperriger Terpene, die bislang nur unzureichend biokatalytisch oder chemisch zugänglich sind. Hierbei sollten P450 Enzyme letztlich in Terpene produzierenden *E. coli* Ganzzellsystemen den letzten Schritt in der Biosynthese zu wertvollen Terpenoiden katalysieren. Unterschiedliche Strategien wurden zu diesem Zweck verfolgt: I) Untersuchung promiskuitiver Aktivitäten von P450s, II) Anpassung der P450s durch rationale Mutagenese, III) Suche nach neuen P450s aus Terpene metabolisierenden Organismen und IV) Suche nach homologen zu Terpene hydroxylierenden P450s.

In einem ersten Ansatz wurden mit bereits charakterisierten P450-Fusionsproteinen zunächst keine promiskuitiven Aktivitäten gegenüber den Terpenen festgestellt. Aus diesem Grund wurde angestrebt, das bakterielle natürliche Fusionskonstrukt CYP116B3 aus *Rhodococcus ruber* dergestalt zu verändern, das breite Substratspektrum des Enzyms auf ausgewählte Terpene auszuweiten.

Dies war jedoch nicht erfolgreich, weshalb als weitere Strategie nach neuen P450s in Terpen-metabolisierenden Organismen gesucht wurde. In Biotransformationen mit *B. bassiana* wurden erste hydroxylierte Terpene festgestellt, die auf eine Funktionalisierung durch P450s hinweisen. Durch eine Proteomanalyse konnte die Anzahl von 83 potenziellen P450s in *B. bassiana* pro Substrat auf ein bis vier vermutlich verantwortliche P450s reduziert werden. Allerdings misslang die funktionale heterologe Expression der eukaryotischen Gene in *E. coli*. Auf der Suche nach neuen P450s wurde weiterhin ein interessanter Papaverin abbauender Organismus, das gram-positive Bakterium *Arthrobacter* sp., getestet, das auf einigen Terpenen als alleinige C-Quelle wachsen konnte. Da die Hydroxylierung durch P450s häufig den ersten Schritt im Metabolismus von beispielsweise xenobiotischen Verbindungen darstellt, wurde *Arthrobacter* sp. mittels Proteomanalyse auf die verantwortlichen Enzyme hin untersucht. Die Auswertung führte zur Identifikation eines potenziellen Clusters aus zwei P450s mit den putativen elektronenliefernden Redoxpartnern, die mit dem Papaverinabbau in Verbindung gebracht werden konnten. Hinsichtlich der Terpene wurden dagegen keine

Hinweise erhalten. Mit Hilfe von physiologischen oder heterologen Redoxpartnern konnte mit drei P450s aus *Arthrobacter* sp. eine Aktivität rekonstituiert werden, die eine weitere Charakterisierung der entsprechenden Enzyme ermöglichte. Ähnlich zu anderen Mitgliedern der CYP199A Familie akzeptierte CYP199A25 bevorzugt Benzoesäuren als Substrat, die regioselektiv in *para*-Position demethyliert oder hydroxyliert wurden. Bei den anderen P450s aus *Arthrobacter* sp. handelt es sich um Enzyme aus P450-Familien mit bislang noch unbekannter Funktion. Durch die Proteomanalyse sowie den postulierten Papaverinmetabolismus wurden Hinweise auf mögliche Phenyllessigsäuren als Substrate erhalten, die experimentell bestätigt werden konnten. Die P450s CYP1232A24 sowie CYP1232F1 katalysieren im Papaverinmetabolismus die zweifache Demethylierung der 3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure zur 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure und weisen hierbei unterschiedliche Selektivitäten für die *meta*- und *para*-Position auf. Interessanterweise konnten Elektronen von den im *Cluster* befindlichen Redoxpartnern, eine Ferredoxin-Reduktase und ein Flavodoxin, effizient transferiert werden, was einem ersten funktionalen physiologischen P450-Klasse III System entspricht. Neben der detaillierten Charakterisierung der Substratspektren wurden Kopplungseffizienzen und kinetische Parameter der drei Enzyme untersucht sowie hoch aktive Ganzzellbiokatalysatoren entwickelt, die bis zu 1,77 g L⁻¹ demethyliertes Produkt bildeten.

Bis auf eine Aktivität von CYP1232A24 gegenüber β -Ionon in allylischer Position wurden alle getesteten Terpene jedoch nicht umgesetzt, weshalb ein bislang nicht charakterisiertes Panel aus natürlichen Fusionskonstrukten auf promiskuitive Aktivitäten hin getestet wurde. Das Substratspektrum eines Enzyms mit geringen initialen Aktivitäten gegenüber β -Ionon sowie Valenzen wurde schließlich durch rationales Enzymdesign erweitert, was die Oxyfunktionalisierung einiger der ausgewählten Sesquiterpene ermöglichte. Eingesetzt in einen α -Humulen-produzierenden *E. coli* Stamm eines Kooperationspartners konnten durch die ITB1693 Variante F95A selektiv etwa 300 mg L⁻¹ α -Humulen-6,7-epoxid *in situ* hergestellt werden.

Darüber hinaus wurden auf Grundlage einer Homologiesuche zu Terpen-Hydroxylasen fünf P450s aus dem Myxobakterium *Chondromyces apiculatus* isoliert, wovon zwei näher charakterisiert werden konnten. Beide Enzyme sind in der Lage, eine große Bandbreite an Substraten zu akzeptieren, wobei im Iononring des β -Ionons auch nicht-allylische Positionen funktionalisiert wurden. Durch eine fokussierte Mutantenbibliothek von CYP109Q5 konnte die Selektivität weiter zu den nicht-allylischen Positionen hin verschoben und zum ersten Mal die für die Carotenoidsynthese bedeutenden und seltenen Produkte 2- und 3-Hydroxy- β -ionon simultan synthetisiert werden. Mit CYP109Q5 gelang es zudem, die komplexen Sesquiterpene umzusetzen, wobei einzelne Varianten eine zum Teil enorme Steigerung der Aktivität und Verschiebung der Selektivität aufwiesen. Ein effizientes Ganzzellsystem erlaubte schließlich die Identifizierung von Produkten ausgewählter Biotransformationen.

Mit Hilfe der aktivsten Variante V80A/A280I und der Verwendung des Lösungsmittelvermittlers Cyclodextrin wurden die Hauptprodukte Longifolenaldehyd und Solavetivol synthetisiert. Letzteres dient unter anderem als Vorstufe des Solavetivons, einem wertvollen Phytoalexin. Insgesamt erwies sich CYP109Q5 als hoch evolvierbar und effizient. Die Studien dieser Arbeit zeigen, dass durch rationale Mutagenese aus dem hoch versatilen CYP109Q5-Generalisten mit einem enormen Substratspektrum (Terpene, Steroide und NSAIDs) schrittweise ein industriell wertvoller Spezialist zur Synthese spezifischer Produkte entwickelt werden kann.

1. Einleitung

„Living organisms are without doubt the best chemists on Earth — a plethora of reaction types is catalysed by the thousands of different enzymes present in every cell“

Uwe Bornscheuer, 2016¹

Mit diesem Zitat beschreibt Uwe Bornscheuer im Journal *Nature Chemical Biology* die Vielfalt an enzymatischen Biokatalysatoren, die die Natur im Laufe von Jahrmilliarden evolvierte und Schlüssel für komplexe biochemische Prozesse bereitstellte. In der heutigen Biokatalyse gilt es, dieses Potenzial zu entdecken, nutzbar zu machen und weiterzuentwickeln. Die Implementierung der Biokatalysatoren in biotechnologische Prozesse ermöglicht eine nachhaltige biosynthetische Chemie, durch die im industriellen Maßstab beispielsweise petrochemische Verfahren ersetzt oder ergänzt ebenso wie komplett neue Syntheserouten kreiert werden können.²⁻⁴ Im Verhältnis zu vielen heute verwendeten chemischen Katalysatoren zeichnen sich Enzyme durch ihre häufig sehr hohe Stereo- und Regiospezifität aus, wobei die Katalyse häufig unter milden Reaktionsbedingungen wie etwa Raumtemperatur oder Atmosphärendruck erfolgen kann. Die Identifikation neuer Biokatalysatoren für spezifische industrielle Anwendungen erfolgt hierbei auf verschiedene Weisen, von der klassischen Suche in geeigneten Mikroorganismen über die gezielte strukturbasierte Veränderung der Enzyme durch *Rational Design* bis hin zur Nachahmung des Darwinschen-Prinzips durch den Ansatz der *Directed Evolution*.⁵⁻⁷ Dieser Prozess wird maßgeblich durch stetige Weiterentwicklungen in der Molekularbiologie sowie neue und immer spezifischer werdende computerbasierte Methoden vorangetrieben.⁸

Neben Hydrolasen, Lyasen und Transferasen sind Oxidoreduktasen wichtige Bausteine in vielen nativen Biosynthesewegen sowie biosynthetischen Anwendungen.⁹ Insbesondere die ubiquitären und vielseitigen Cytochrom P450 Monooxygenasen stellen hierbei eine bedeutende Enzymfamilie dar, die eine der größten Herausforderungen in der organischen Synthese erlaubt, die Funktionalisierung nicht aktivierter C-H-Verbindungen. Trotz ihres großen Potenzials, das in einer in der Natur unübertroffenen Vielfalt an katalysierten Reaktionen besteht, wird der industrielle Einsatz von Vertretern dieser Enzymfamilie durch die Komplexität des Enzymsystems selbst eingeschränkt.¹⁰ Im Fokus der aktuellen Forschung an Cytochrom P450 Monooxygenasen steht daher, durch die Kombination klassischer und moderner Ansätze die Identifikation neuer Enzymsysteme mit industrieller Relevanz voranzutreiben. Kenntnisse aus der Weiterentwicklung der Biokatalysatoren liefern gleichzeitig einen wichtigen Beitrag für die Implementierung der Enzymsysteme in die industrielle Biotechnologie. Eine interdisziplinäre Kooperation zwischen Chemie, Biologie, Verfahrenstechnik und Informatik ist letztlich entscheidend, um das biosynthetische Potenzial der Natur industriell wirtschaftlich nutzbar zu machen.

1.1 Cytochrom P450 Monooxygenasen – versatile Oxidoreduktasen

Oxidationsreaktionen gehören zu den bedeutendsten Reaktionen in der chemischen Synthese. Allerdings sind diese in der Regel mit Limitationen bezüglich der Stereoselektivität behaftet und finden häufig unter extrem harschen Reaktionsbedingungen und unter dem Einsatz von Katalysatoren wie etwa toxischen Schwermetallen statt. Dies führt zu einer relativ geringen Wirtschaftlichkeit dieser Prozesse bei gleichzeitig teils extrem hoher Umweltbelastung. Die selektive Oxyfunktionalisierung nicht-aktivierter C-H-Bindungen stellt chemisch selbst unter solchen extremen Bedingungen eine der größten Herausforderungen dar. Im Zuge der meist durch Radikale erzielten C-H-Oxidation werden aufgrund stereoelektronischer Effekte lediglich die reaktivsten C-H-Bindungen angegriffen.¹¹ Diese chemisch anspruchsvolle Reaktion wird von Cytochrom P450 Monooxygenasen (kurz CYP oder P450s) katalysiert.

Bei der Enzymklasse der P450 Monooxygenasen handelt es sich um NAD(P)H abhängige, Häm enthaltende Oxidoreduktasen, die als prosthetische Gruppe mit Hilfe eines Eisen-Porphyrins molekularen Sauerstoff aktivieren können. Ein Sauerstoffatom wird so auf das Substrat übertragen, während das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird.¹² Der Name Cytochrom P450 Monooxygenase beruht dabei auf den besonderen spektralen Eigenschaften des reduzierten Kohlenstoffmonooxid-gebundenen Komplexes, der zu einer charakteristischen Verschiebung des Soret-Bandes von 420 nm (oxidierte substratfreie Form) auf eine Absorption des Häms von ungefähr 450 nm führt (Abbildung 1).^{13,14} Dieses spektrale Charakteristikum wird durch den über alle P450s hinweg konservierten proximalen Cystein-Liganden herbeigeführt. Proteine mit einem Imidazol-Liganden, wie etwa Hämoglobin, oder mutierte P450s mit einem Serin-Liganden haben beispielweise charakteristische Soret-Maxima bei 420, respektive 411 nm.^{15,16} Die besonderen spektralen Eigenschaften der P450s können darüber hinaus genutzt werden, um die Bindung potenzieller Substrate zu untersuchen. Die oxidierte Form des Häms befindet sich in einem *Low-Spin* Zustand und kann durch Verdrängung des Wassers mit einem funktionalen Substrat in einen *High-Spin*-Zustand überführt werden. Dieses Stadium der P450s hat ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 390 nm und stellt den ersten Schritt im katalytischen Mechanismus der P450s dar (vgl. Abbildung 1, links). Anhand der Substratbindung wird das Redoxpotenzial des katalytischen Eisens erhöht, wodurch die nachfolgende Reduktion durch Elektronen der Redoxpartner begünstigt wird.^{17,18} Simultan wird auf diese Weise der ineffektive Verbrauch von Reduktionsäquivalenten verhindert. Eine Determinierung der *Spin*-Verschiebung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration kann somit genutzt werden, um die Bindungsdissoziationskonstante (K_d) eines Substrat-Enzym-Paares zu bestimmen.

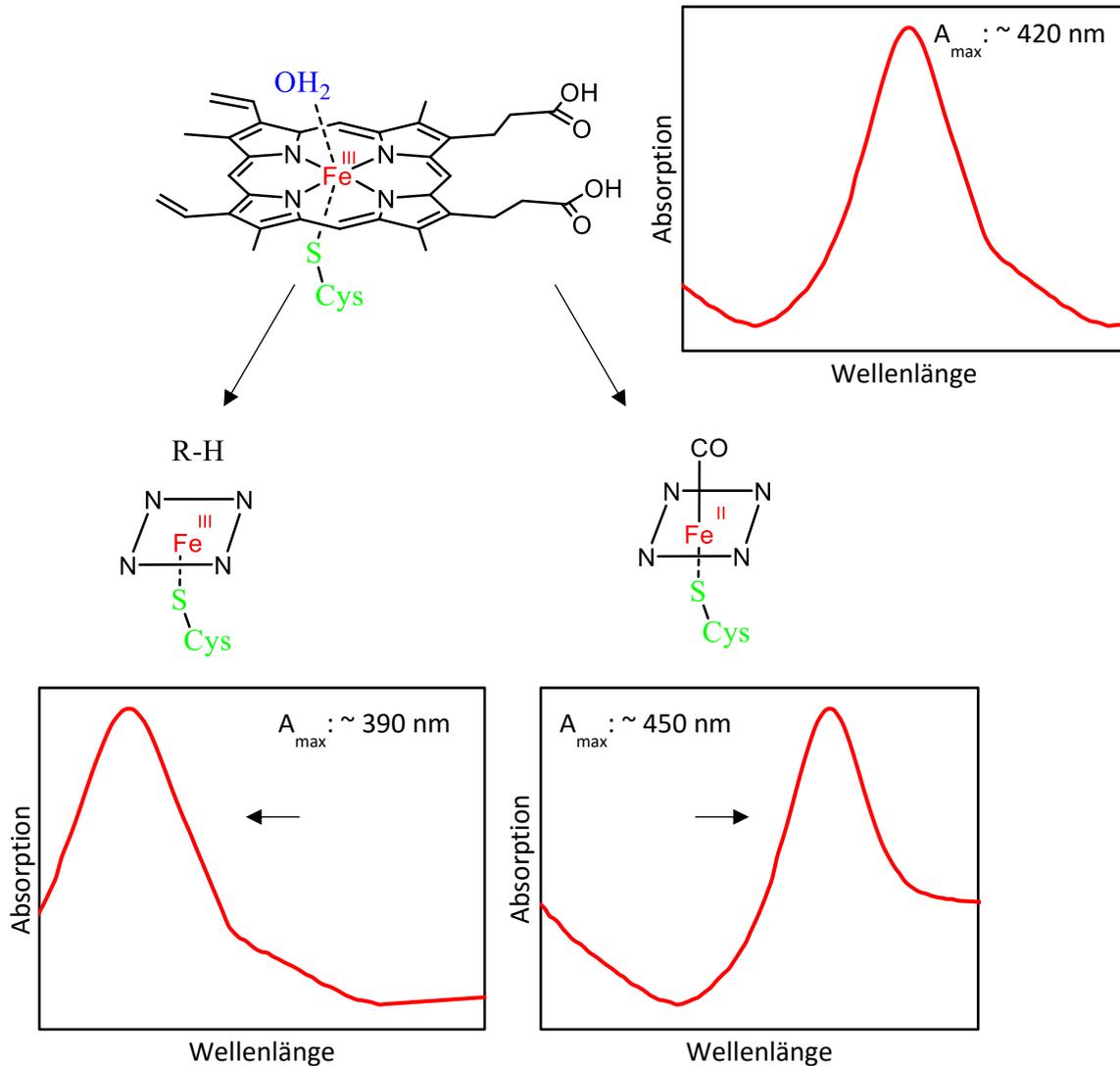


Abbildung 1: Spektrale Charakteristika von P450s in Abhängigkeit vom Zustand des Häm. Die oxidierte Wasser-gebundene Form absorbiert bei einem Maximum von 420 nm. Die Reduktion und Bindung von CO führt in P450s zur charakteristischen Verschiebung des Soret-Bandes zu 450 nm. Wird der Wasser-Ligand durch ein Substrat verdrängt, kann es zu einer *Spin*-Verschiebung zu ca. 390 nm kommen (*High-Spin*-Zustand).

Durch den einzigartigen katalytischen Mechanismus der P450s kann die Oxidation von nicht-aktivierten C-H-Verbindungen enantio-, chemo- und stereoselektiv unter vergleichsweise milden Reaktionsbedingungen ermöglicht werden.¹⁹ Die besondere Reaktivität liegt hierbei in der reaktiven Spezies *Compound I* (Abbildung 2, links), die durch den schrittweisen Transfer zweier Elektronen im katalytischen Mechanismus zur Aktivierung des Luftsauerstoffs gebildet wird.²⁰ Der komplexe Katalysezyklus wurde 2005 von Denisov und Kollegen aufgeklärt und ist gegenwärtig allgemein anerkannt.²¹ Die tatsächliche Oxyfunktionalisierung durch *Compound I* ist bislang nicht vollständig entschlüsselt, ein radikalischer *Rebound*-Mechanismus wird jedoch als wahrscheinlich angenommen (Abbildung 2).²¹⁻²³

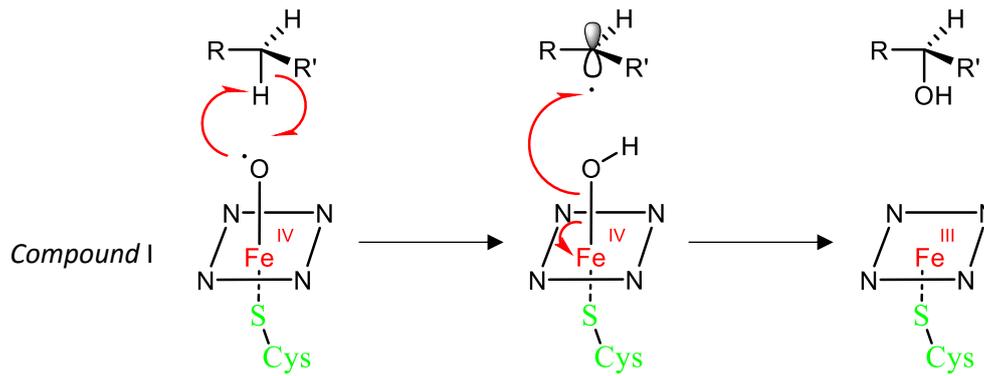


Abbildung 2: P450-katalysierte Hydroxylierung (*Rebound*-Mechanismus).

Nach vorherrschender Meinung kommt es im Zuge der Katalyse vermutlich zunächst zu einer Wasserstoff-Abstraktion durch *Compound I*, die durch eine homolytische Spaltung der C-H-Bindung mit der Bildung eines Substratradikals einhergeht. Der resultierende intermediäre Alkohol bindet in einem folgenden Schritt über den Sauerstoff an das Substrat, das unter Bildung des hydroxylierten Produkts abdissoziiert. Neben dem in Abbildung 2 dargestellten gibt es weitere mögliche Reaktionsmechanismen, die zur Dissoziation des aktivierten Sauerstoffs ohne eine Funktionalisierung des Substrats führen. Die als Entkopplungsreaktionen bekannten Wege im Katalysezyklus wandeln den aktivierten Sauerstoff an unterschiedlichen Stadien im Zyklus zu Wasserstoffperoxid, Superoxidationion oder Wasser um, sodass Elektronen ohne tatsächliche Produktbildung verloren gehen können. Hierdurch gebildete reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid können schließlich eine Destabilisierung des P450s unter gleichzeitigem nicht-produktivem Verbrauch der Reduktionsäquivalente des Cofaktors NAD(P)H verursachen. Ein zur Reaktionsgeschwindigkeit passender, konsekutiver Transfer der Elektronen zum aktiven Zentrum ist schließlich notwendig, um die Elektronen für eine effiziente Katalyse zur Verfügung zu haben.²⁴

P450s besitzen ein sehr breites Substratspektrum und sind in der Lage, eine Vielzahl an Reaktionen zu katalysieren. Neben den gängigen Aktivitäten wie etwa die Hydroxylierung azyklischer und zyklischer Kohlenwasserstoffverbindungen, Epoxidierung, Dealkylierung und Sulfoxidierung, sind auch eher seltene Reaktionen wie etwa die Cyclopropanierung über Carben-Transfer, intramolekulare C-H-Aminierung oder der Knüpfung von C-C-Bindungen literaturbekannt (Abbildung 3).²⁵⁻²⁹

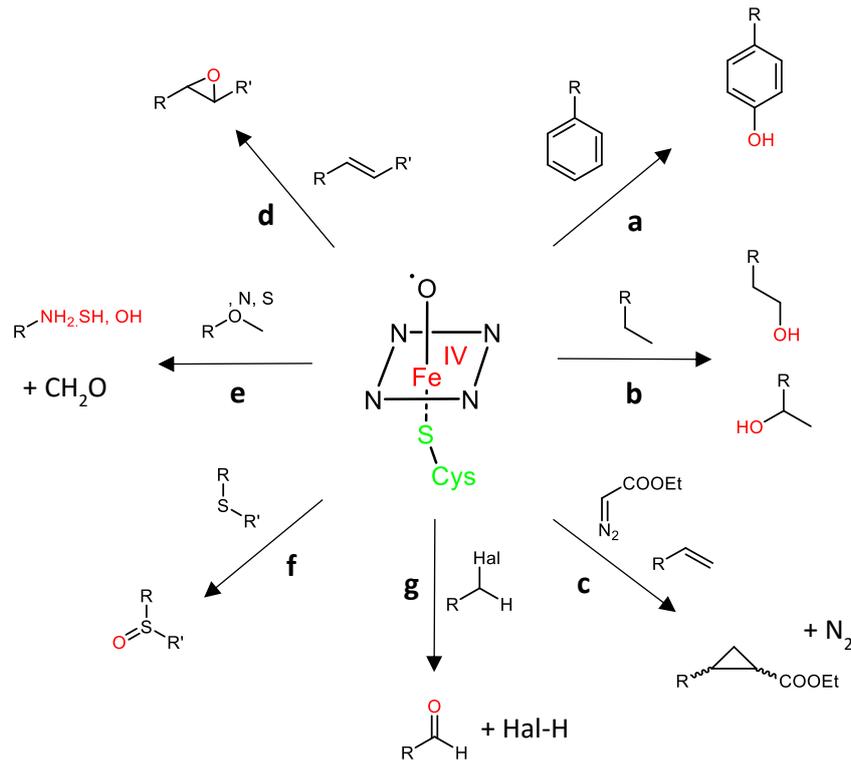


Abbildung 3: Beispiele P450-katalysierter Reaktionen. **a**: aromatische Hydroxylierung; **b**: aliphatische Hydroxylierung; **c**: Cyclopropanierung über Carben-Transfer; **d**: Epoxidierung; **e**: O-, N- oder S-Demethylierung; **f**: Sulfoxidierung; **g**: oxidative Dehalogenierung.

P450s gehören mit über 52000 bekannten Sequenzen (CYPED-Datenbank, Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart, Stand 23.09.2017) zu den größten und vielfältigsten Superfamilien von Enzymen und kommen in allen Reichen der Lebewesen vor.³⁰ Bereits vor der Entstehung der ancestralen Eukaryoten waren P450 Monooxygenasen am Metabolismus der ursprünglichen Prokaryoten beteiligt, da Enzyme der CYP51 Familie ubiquitär in Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*) vorzufinden sind.^{31,32} Die Evolution der in Eukaryoten an der Synthese von Sterolen, essentiellen Bestandteilen der Plasmamembranen, beteiligten P450s konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden.³³ Die weitere Evolution der P450s kann aber durch Anpassung an Umwelteinflüsse begründet werden; die unter Mitwirken von P450s synthetisierten vielseitigen Sekundärmetabolite in Pflanzen, die oftmals dem Schutz vor Fraßfeinden oder der Anlockung biotischer Bestäuber dienen, entstanden im Zuge der Co-Evolution der Pflanzen und den tierischen Bestäubern.³⁴ Durch Prozesse wie Genduplikation und Mutation ist so im Laufe der Evolution eine Diversifikation der P450 Monooxygenasen entstanden, die zu einer großen Vielfalt an unterschiedlichen pflanzlichen Metaboliten führte. Große Bedeutung hat die Forschung an P450s vor allem aufgrund ihrer Beteiligung an diversen primären und sekundären Stoffwechselwegen wie der Steroidsynthese oder der Detoxifikation xenobiotischer Verbindungen erlangt. Auch im Menschen spielen 57 P450s bei der Steroid-, Vitamin- und Fettsäurebiosynthese sowie im Metabolismus von Arzneimitteln in der Leber bedeutende Rollen.^{35,36} In pflanzlichen Genomen lassen sich dagegen teils mehr

als 300 P450-codierende Gene finden. In Prokaryoten sind P450s hingegen nicht am primären Metabolismus beteiligt; im Genom von *Escherichia coli* finden sich beispielsweise keine P450s. Vielmehr sind P450s in Prokaryoten an der Produktion sekundärer Metabolite und bei der Anpassung an wechselnde Umwelteinflüsse beteiligt. Die enorme Variabilität der unterschiedlichen Enzyme in Kombination mit der Vielzahl an durchführbaren Reaktionen machen P450s für die biotechnologische Anwendung besonders interessant.^{10,37} Hierbei steigt der Bedarf an neuen Varianten von P450s stetig an, während die Lücke zwischen charakterisierten P450s (derzeit etwa 5000) und der rapide anwachsenden Zahl an Sequenzen durch immer mehr sequenzierte Genome kontinuierlich größer wird.

Die Klassifizierung der P450s wird von Professor David R. Nelson am *Health Science Center* der Universität von Tennessee verwaltet und basiert auf der Aminosäuresequenzidentität.³⁸ Ab einer Sequenzidentität von 40% werden P450s in dieselbe Familie eingeordnet, was durch die Nummerierung im Namen gekennzeichnet wird, zum Beispiel CYP109. Enzyme, die eine Sequenzidentität von mehr als 55% aufweisen, werden zudem derselben Unterfamilie zugeordnet, was durch einen Buchstaben im Namen kenntlich gemacht wird, etwa CYP109Q. Isoformen einer Unterfamilie werden schließlich mit einer fortlaufende Nummerierung versehen, wie etwa CYP109Q5. Analog zu dieser Nomenklatur besteht der P450 Name aus der Nummer für die P450-Familie, einem Buchstaben für die Unterfamilie und einer fortlaufenden Nummer für die Isoformen innerhalb der Unterfamilie.

Entgegen der hohen Diversität der P450s existiert über alle P450-Familien hinweg eine hohe Konservierung entscheidender struktureller Elemente. Mit P450cam aus *Pseudomonas putida* und P450 BM3 aus *Bacillus megaterium* wurden 1985 beziehungsweise 1993 die beiden ersten Kristallstrukturen von Vertretern der P450 Monooxygenasen gelöst.^{39,40} Inzwischen sind über 1000 weitere Strukturen bekannt, die insbesondere im Proteinkern um die prosthetische Hämgruppe stark konserviert sind. Der konservierte Kern wird dabei durch vier Helices (D, E, I und L, *four-helix bundle*), die Helices J und K, zwei β -Faltblattstrukturen sowie einen Häm-bindenden *Loop* (*Meander-Loop*) gebildet (Abbildung 4).^{31,41} Über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen wird dieser *Meander-Loop* dabei von einem ebenfalls hoch konservierten ExxR-Motiv (in Helix K) in seiner Position fixiert.⁴² Auch der proximale fünfte Ligand Cystein befindet sich in einem P450 charakteristischen Häm-Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz FxxGxxxCxG.⁴³ Neben den konservierten Regionen existieren auch hoch flexible Bereiche, die für die große Diversität der P450s verantwortlich sind. Diese befinden sich überwiegend in der Substratbindungstasche und werden demnach mit der Substraterkennung und -bindung assoziiert (*substrate recognition sites*, SRS).⁴⁴ Mutationsstudien mit Aminosäuren der SRS haben demzufolge einen großen Einfluss auf die Determinierung der Substratspezifität gezeigt.⁴⁵

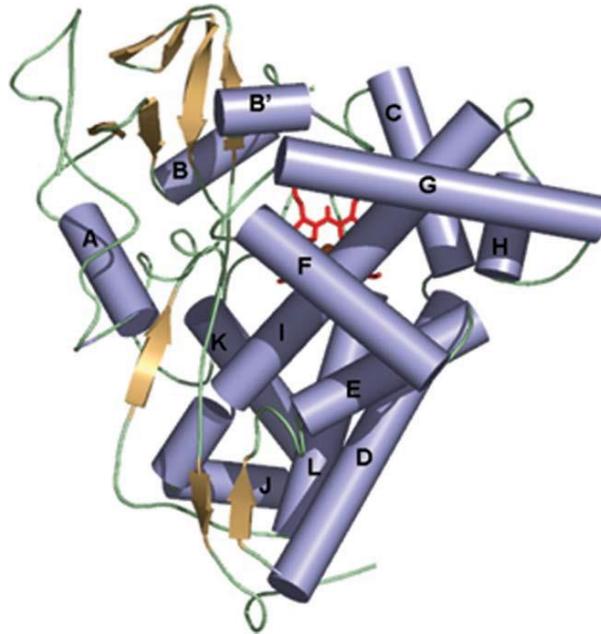


Abbildung 4: Aufbau der konservierten Sekundärstrukturelemente am Beispiel von P450cam (aus Munro *et al.*⁴⁶). α -Helices sind als blaue Zylinder und β -Faltblattstrukturen als braune Pfeile dargestellt. Das Häm (rot) ist im Zentrum des Proteins koordiniert.

Besonders aufgrund dieser flexiblen Bereiche handelt es sich bei P450s um hochgradig dynamische Enzyme, in denen die Substratbindung zu starken Verschiebungen in der Tertiärstruktur des Proteins führt.^{47,48} Ein nicht-konservierter, flexibler *F-G-Loop* über dem Substrateingangskanal übernimmt hierbei die strukturelle Funktion eines Deckels und steht im Verdacht, die Substratspezifität aufgrund seiner Interaktion mit dem Substrat sowie der damit einhergehenden Bewegung maßgeblich zu beeinflussen.^{49,50} Des Weiteren wurden Sauerstoff-, Lösungsmittel-, und verschiedene Substratkanäle in P450s detektiert, die für die katalytische Aktivität essenziell sind und damit potenzielle Ziele für Mutagenese-Studien darstellen.⁵¹

1.2 P450 – ein komplexes Multikomponentensystem

Im vorhergehenden Kapitel wurde auf die einzigartigen Eigenschaften sowie die Diversität der P450 Monooxygenasen eingegangen. Wie bereits beschrieben, ist für die Bildung der aktiven Spezies *Compound I* eine konsekutive Übertragung zweier Elektronen obligat. Dieser Elektronentransfer wird über Redoxpartner ermöglicht, die zusammen mit der P450-Domäne ein komplexes Multikomponentensystem bilden. Basierend auf den zugehörigen elektronenliefernden Redoxproteinen, die die Elektronen schrittweise vom Cofaktor NAD(P)H zum aktiven Zentrum transportieren und somit für die katalytische Aktivität essenziell sind, werden P450s in unterschiedliche Klassen unterteilt (Abbildung 5).⁵²⁻⁵⁴

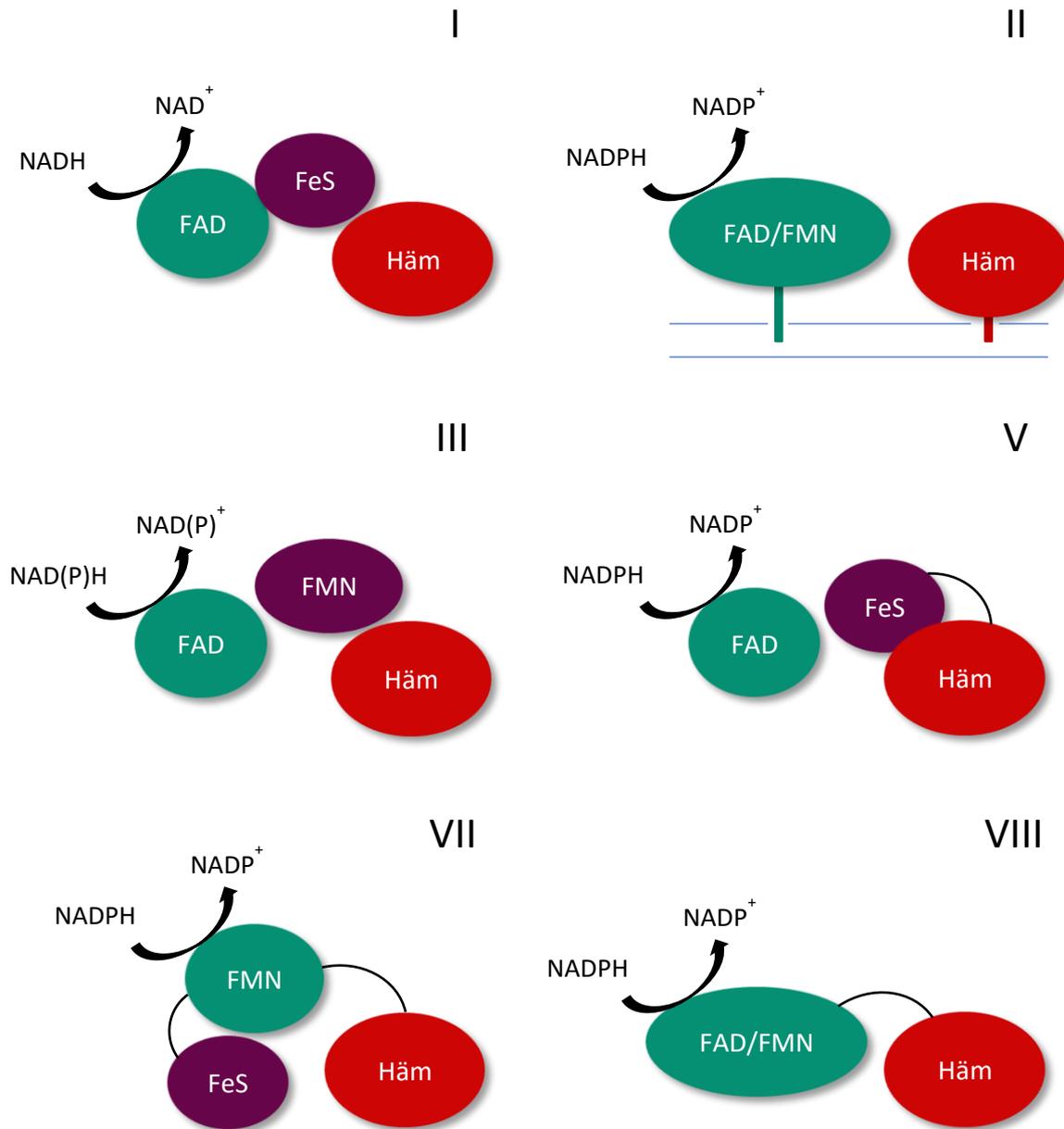


Abbildung 5: Auswahl unterschiedlicher Cytochrom P450 Systeme nach Hannemann und Kollegen (2007).⁵⁴ **I**: Klasse I, bakterielles System (P450cam); **II**: Klasse II, mikrosomales System (CYP3A4); **III**: Klasse III, bakterielles System mit einem Flavodoxin anstelle eines Ferredoxins (P450cin); **V**: Klasse V, bakterielles P450-Ferredoxin Fusionssystem (Sterol 14 α -demethylase CYP51); **VII**: Klasse VII, bakterielles P450-PFOR Fusionssystem (P450 RhF); **VIII**: Klasse VIII, bakterielles P450-CPR Fusionssystem (P450 BM3). FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid; FMN: Flavin-Mononukleotid; FeS: Eisen-Schwefel Ferredoxin.

Klasse I wird aus den meisten bakteriellen sowie mitochondrialen P450s in Eukaryoten gebildet und stellt ein Dreikomponentensystem dar, bestehend aus einer FAD-enhaltenen Reduktase, einem Eisen-Schwefel-Ferredoxin sowie der P450-Domäne. Typische Beispiele sind die adrenalen mitochondrialen P450s, bei denen die Elektronen durch die Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und das Adrenodoxin (AdX) zum katalytisch aktiven Eisen transportiert werden, sowie das bakterielle P450cam System aus P450-Domäne, Putidaredoxin-Reduktase (CamA) und Putidaredoxin (CamB).⁵⁵⁻⁵⁷ Ein ähnliches System liegt in der Klasse V vor, bei

dem die P450-Domäne an das Ferredoxin fusioniert ist. Die Klasse III besitzt anstelle eines Ferredoxin ein FMN-enthaltendes Flavodoxin, über das die Elektronen auf das Häm-Eisen übertragen werden. Das bisher einzige Beispiel dieser Klasse umfasst ein gemischtes System aus P450cin und Cindoxin mit der heterologen *E. coli* Ferredoxin-Reduktase FdR.⁵⁸⁻⁶¹ Mit P450 RhF wurde der erste Vertreter der Klasse VII identifiziert, das in *Rhodococcus* sp. C-Terminal fusioniert mit einer Phthalat-Dioxygenase-Reduktase-Domäne (PFOR, FMN-Reduktase und Eisen-Schwefel-Ferredoxin) vorliegt.⁶² P450 BM3 stellt ein weiteres Fusionsprotein dar, bei dem jedoch die Häm-Domäne mit einer bifunktionalen Reduktase (CPR, NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase) auf derselben Polypeptidkette liegt und durch eine Linker-Sequenz miteinander verbunden ist (Klasse VIII, Abbildung 5). Solche natürlich vorkommenden P450-Fusionsproteine sind von besonderem Interesse, da sie häufig sehr hohe spezifische Aktivitäten aufweisen und die Expression des Fusionsproteins in der Regel mit weniger Aufwand verbunden ist als die Expression der drei einzelnen Proteine bei nicht-fusionierten Enzymsystemen.^{63,64} Ferner entfällt bei P450 Fusionsproteinen die Suche nach den physiologischen Elektronentransferpartnern, die häufig verstreut im Genom des jeweiligen Organismus zu finden sind. So konnte beispielsweise die Aktivität von CYP101D1 aus *Novosphingobium aromaticivorans* mit CamA und dem physiologischen Ferredoxin ArX rekonstituiert werden, jedoch steigerte die Identifikation und der Einsatz der physiologischen Reduktase ArR die Aktivität um etwa 300%.⁶⁵ Während eukaryotische P450s und deren Redoxpartner häufig membranständig sind, handelt es sich bei den bakteriellen P450s in der Regel um nicht-assoziierte wasserlösliche Proteine.

Die Interaktion zwischen Redoxpartnern und P450-Domäne spielt eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Aktivität und Effizienz. Aufgrund der häufig geringen Stabilität der einzelnen am Enzymsystem beteiligten Proteine *in vitro* und der Cofaktorabhängigkeit sind für den industriellen Einsatz vor allem Ganzzellsysteme von Bedeutung. Neben der zelleigenen Regeneration der Cofaktoren, der Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) und der physiologischen Umgebung für die Enzyme gewinnen weitere Parameter an Bedeutung, wenn der Einsatz von P450s *in vivo* beabsichtigt wird. Hier müssen vor allem substrat- und produktspezifische Faktoren wie deren Transport über die Zellmembran oder zelltoxische Eigenschaften berücksichtigt werden. Durch eine geeignete Wahl des Wirtsorganismus, *Metabolic Engineering* Ansätzen sowie dem Einsatz von Lösungsmitteln kann der *in vivo* Prozess den Eigenschaften der verwendeten P450s angepasst werden. So konnte etwa durch ein schrittweises *Engineering* der am Stoffwechsel beteiligten Proteine in Kombination mit unterschiedlichen *E. coli* Stämmen *in situ* bis zu 105 mg L⁻¹ der zur Synthese des Antimalariamedikamentes Artemisinin benötigten Vorstufe Artemisininsäure produziert werden.⁶⁶ Die Überschichtung des Reaktionsansatzes mit einer Dodecanphase führte zudem zu einer Verschiebung der Produktverteilung und Erhöhung der Gesamtausbeute der Produkte auf 553 mg L⁻¹. Die von Michelle Chang und Kollegen 2007 publizierten Arbeiten

stellen ein gutes Beispiel für die schrittweise Verbesserung des komplexen P450-Multikomponentensystems dar. Eine erhöhte Expression, der Elektronentransfer durch eine physiologische Reduktase sowie die Anwendung verschiedener Expressionsplasmide und *E. coli* Produktionsstämmen führte hierbei zu einer Steigerung der Produktivität.⁶⁶ Die zu beachtenden Parameter sowie Lösungsansätze und Literaturbeispiele sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Herausforderungen in einem P450-basierten Prozess.

Parameter	Lösungsansatz	Beispiele
Expression	Wechsel des Expressionssystems, Anpassung der Prozessparameter	63,66–71
Aktivität	<i>Protein Engineering</i>	72–88
Redoxpartnerabhängigkeit	Elektrochemische Reduktion (Elektroden), Alternative Redoxpartner	24,89–94
Elektronentransfer / Kopplungseffizienz	<i>Protein Engineering</i> der Redoxpartner, Redoxpartner-Fusionen	95–105
Protein-Stabilität	<i>Protein Engineering</i> , Verwendung von Ganzzellsystemen	104,106–110
Substrat-/ Produkttransport über die Zellemembran	Permeabilisierung, alternativer Wirtsorganismus, Co-Expression von Transportproteinen, Lösungsmittel	111–115
Substrat-/ Produkttoxizität	Zweiphasensysteme, Substratfütterung, alternativer Wirt	67,104,116–118
Cofaktorverfügbarkeit	Änderung des Biotransformationsmodus oder des Wirts, Co-Expression von Dehydrogenasen	119–123

Aufgrund der Komplexität der Biokatalysatoren und der damit verbundenen verhältnismäßig hohen Anforderungen an potenzielle Produktionsanlagen eignen sich P450s ökonomisch eher für die Herstellung hochpreisiger Feinchemikalien für die Pharma-, Duft- und Aromastoffindustrie als für die Produktion von *Bulk*-Chemikalien.¹²⁴

Die Suche nach Mikroorganismen, die bereits wildtypisch Aktivität auf Substrate von Interesse aufweisen, stellen eine erfolgversprechende Alternative zur Anwendung heterolog oder homolog exprimierter P450s dar, da das häufig große native Set an unterschiedlichen P450s und weiteren Oxygenasen unter physiologischen Bedingungen im Ursprungsorganismus Reaktionen mit hohen Aktivitäten und Bandbreiten katalysieren kann. In den vergangenen Jahrzehnten wurden deshalb zahlreiche Mikroorganismen getestet, um die Produktion hochpreisiger Feinchemikalien zu untersuchen. Insbesondere hinsichtlich der Oxyfunktionalisierung von Steroiden wurde eine große Anzahl an Mikroorganismen identifiziert, die unterschiedliche Positionen in Verbindungen wie Progesteron oder Testosteron hydroxylieren können.¹²⁵ Zur selektiven Hydroxylierung von Progesteron wurden erste Biotransformationen bereits zu Beginn der Fünfzigerjahre unter Verwendung der Schimmelpilze *Rhizopus arrhizus* und *Aspergillus niger* durchgeführt. Durch den Einsatz dieser Organismen wurden mehrere Schritte der chemischen Synthese überflüssig, wodurch die Herstellungskosten von Cortison von 200 \$ g⁻¹ auf 1 \$ g⁻¹ gesenkt werden konnten.^{125,126}

Auch die 11- β -Hydroxylierung von Deoxycortison zu Hydrocortison wurde mikrobiell durch den Pilz *Curvularia* sp. bei der Schering AG (Berlin, Deutschland; heute Bayer Pharma AG) realisiert.¹²⁷ Aufgrund seiner Fähigkeit, Verbindungen verschiedener Stoffklassen, wie etwa Amide, Steroide, aromatische Verbindungen oder Terpene versatil zu hydroxylieren, stellt der anamorphe Schlauchpilz *Beauveria bassiana* einen der am häufigsten verwendeten Mikroorganismen für die Produktion von Feinchemikalien dar.¹²⁸⁻¹³³ *B. bassiana* kam außerdem in einem der bis dato effizientesten Hydroxylierungsprozesse zum Einsatz. Hier wurde bei BASF SE (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland) ein modifizierter *B. bassiana* Stamm im 100 m³ Maßstab für die selektive Hydroxylierung von 2-Phenoxypropionsäure (**120**) zur 2-(4'-Hydroxy-phenoxy)-propionsäure eingesetzt, die als Baustein für Agrochemikalien fungiert.¹³⁴⁻¹³⁶ Der Großteil der industriell unter Einsatz von mikrobiellen Systemen durchgeführten Hydroxylierungen ist jedoch von bisher unbekanntem endogenen P450s katalysiert, deren Identifizierung immenses Potenzial für zukünftige, noch spezifischere Anwendungen birgt.

Ungeachtet der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten und der außergewöhnlichen katalytischen Eigenschaften, sind heterolog exprimierte P450s trotz jahrelanger Forschung in der Industrie nur wenig etabliert.¹³⁷ Auch der *Scale-Up* in den Prozessmaßstab in Bioreaktoren gestaltet sich als Hürde für den Einsatz der P450s in der industriellen Biotechnologie. Mehrere Faktoren bzw. Herausforderungen müssen in P450-basierten Prozessen überwunden werden. In Verbindung mit ihrer guten Exprimierbarkeit in heterologen Expressionssystemen wie *E. coli* und einer oftmals höheren spezifischen Aktivität im Vergleich zu eukaryotischen P450s erlangen prokaryotische P450s immer mehr Interesse für potenzielle industrielle Anwendungen.

1.3 Potenzielle Zielmoleküle für die Synthese hochpreisiger Produkte

Für mögliche Anwendungen in der industriellen Biotechnologie sind P450s insbesondere für die Pharma- sowie Duft- und Aromastoffindustrie interessant, da durch diese einzigartigen Oxidationsbiokatalysatoren chemische Prozesse ersetzt oder ergänzt sowie sogar neuartige Produkte generiert werden können. Gleichzeitig stellt die Tatsache, dass enzymatisch produzierten Verbindungen in der Regel weniger umweltbelastende Prozesse zu Grunde liegen und dementsprechend deklariert werden können, eine ökonomische Wertsteigerung des Produkts und einen Vorteil gegenüber rein chemischen Synthesen dar.¹³⁸ So liegt beispielsweise der Marktwert von natürlichem Vanillin bei mehreren hundert \$ kg⁻¹, während aus Eugenol oder Guaijacol petrochemisch synthetisiertes Vanillin für weniger als 10 \$ kg⁻¹ gehandelt wird.¹³⁹⁻¹⁴¹

Eine Stoffklasse aus dem Feld der Duft- und Aromastoffe, für die diese Marktvorteile besonders relevant sind, stellen die zu den Naturstoffen gehörenden Terpene dar. Terpene umfassen eine große heterogene Stoffklasse zyklischer und azyklischer Kohlenwasserstoffe, die als Charakteristikum den Aufbau aus mindestens zwei Isopreneinheiten aufweisen, wobei die Nomenklatur auf der Anzahl der Isopreneinheiten der Verbindungen beruht, so wird etwa zwischen Monoterpenen (C₁₀: zwei Isopreneinheiten), Sesquiterpenen (C₁₅: drei Isopreneinheiten) und Diterpenen (C₂₀: vier Isopreneinheiten) unterschieden. Diese sind in variierenden Anteilen die Hauptbestandteile pflanzlicher ätherischer Öle, sind somit für den spezifischen Geruch, die Farbe oder den Geschmack verantwortlich, und werden hauptsächlich durch Extraktion aus Pflanzen gewonnen.¹⁴² Ferner werden Terpene auch von Insekten als Pheromone synthetisiert. Neben ihrer Verwendung in der Duft- und Aromastoffindustrie konnte für einige Terpene bereits eine antimikrobielle und antiproliferative Wirkung nachgewiesen werden, was diese Stoffklasse für den Einsatz als umweltfreundliche Insektizide oder als pharmazeutische Komponente interessant macht.¹⁴³ Großes Potenzial als biologisch aktive Stoffe oder deren Vorläufer besitzen vorwiegend zu Alkoholen, Aldehyden und Ketonen funktionalisierte Terpene, die Terpenoide.¹⁴⁴ Hierbei kommen Terpene und Terpenoide natürlich jedoch fast ausschließlich als hochkomplexe Stoffgemische vor, deren Aufarbeitung aufwendig und kostenintensiv und zudem je nach Art der Pflanze stark saisonabhängig ist.¹⁴⁵ Aus diesem Grund werden die meisten kommerziell eingesetzten Terpene chemisch synthetisiert.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Demgegenüber steht jedoch, dass besonders bei für die Anwendung am Menschen vorgesehenen Produkten wie Kosmetika vom Kunden verstärkt auf natürliche Inhaltsstoffe geachtet wird; die in den häufig umweltbelastenden chemischen Synthesen eingesetzten toxischen Schwermetalle können aber nur schwer oder nicht vollständig wieder entfernt werden. Gleichzeitig ist die Selektivität in chemischen Prozessen limitiert. Der Einsatz der wertvolleren „natürlich produzierten“ Duft- und Aromastoffe ist dementsprechend industriell von besonderem Interesse.

Mit Hilfe von P450 Monooxygenasen können verschiedene Terpene hoch selektiv und spezifisch zu Terpenoiden mit hohem Wert für die Industrie oxidiert werden. Die Funktionalisierung kann an dieser Stelle zu sehr unterschiedlichen Eigenschaften führen, wodurch eine Vielzahl möglicher Produkte generiert werden kann. Inzwischen konnten Wege gefunden werden, die Biosynthese ausgehend von einfachen Zuckern wie Glucose (*in situ*) hin zu komplexen funktionalisierten Terpenoiden in Mikroorganismen durchzuführen.¹⁴⁹ Der Mevalonat-Stoffwechselweg in *Saccharomyces cerevisiae* sowie der DXP-Stoffwechselweg in *E. coli* stellen hierbei die Isoprenoid-Bausteine wie GPP (C₁₀), FPP (C₁₅) oder GGPP (C₂₀) bereit, die schließlich durch Terpensynthasen zu zyklischen Terpenen umgewandelt werden (Abbildung 6). Die weitere Funktionalisierung wird in der Natur zumeist durch P450s erzielt, weshalb diese für biotechnologische Prozesse einen essenziellen und zumeist finalen Schritt

darstellen.¹⁵⁰ Die Möglichkeit, Terpenoide *in situ* zu synthetisieren, kann schließlich die Abhängigkeit von der pflanzlichen Extraktion und chemischen Synthese überwinden.

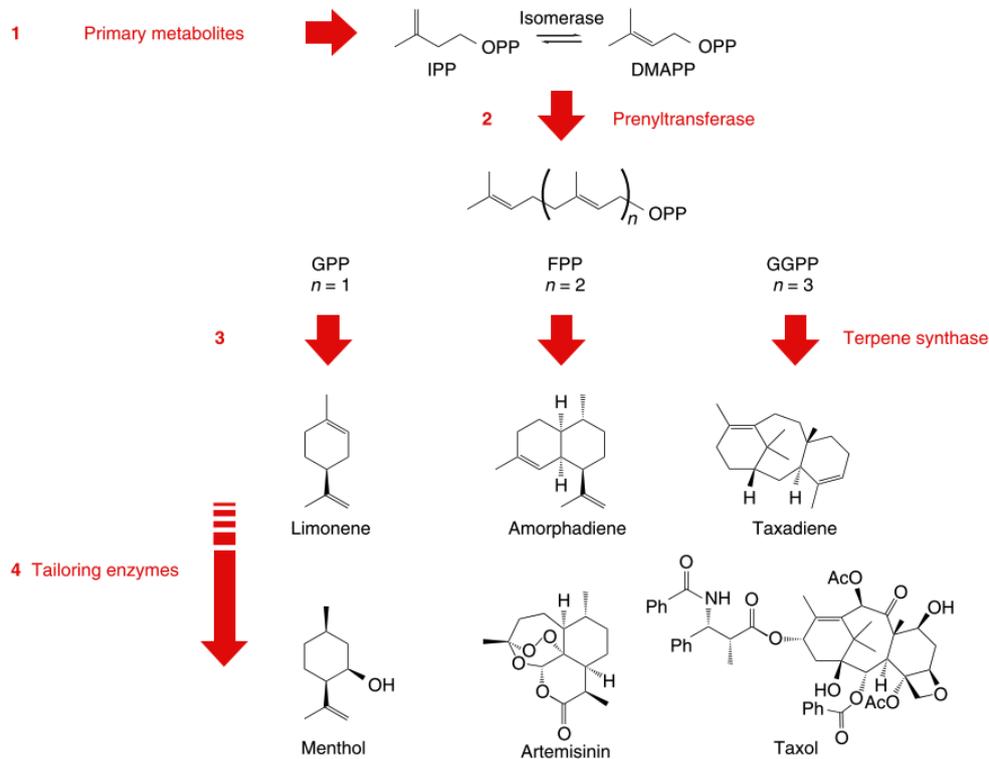


Abbildung 6: Isoprenoid-Syntheseweg und generierte potenzielle Terpenoide nach Chang und Kollegen.¹⁴⁹ IPP: Isopentenyl diphosphate (C₅); DMAPP: Dimethylallyl diphosphate (C₅); GPP: Geranyl diphosphate (C₁₀); FPP: Farnesyl diphosphate (C₁₅); GGPP: Geranylgeranyl diphosphate (C₂₀).

Durch ihre Fähigkeit synthetisch herausfordernden Oxidationsreaktionen zu katalysieren, spielen P450s eine entscheidende Rolle im Metabolismus toxischer endogener und exogener Verbindungen.¹⁵¹ So sind sie zum Beispiel im Menschen für die Pharmakokinetik von Arzneistoffen maßgeblich verantwortlich, wobei etwa 80% der Phase I Reaktionen P450-katalysiert sind.^{152,153} Für die Zulassung neuer Medikamente sind Kenntnisse über die entstehenden Zwischenprodukte im Metabolismus sowie die Verfügbarkeit der Verbindungen für toxikologische Studien obligat.^{151,154–156}

Aufgrund der häufig schwierigen chemischen Synthese ist der Wert der Arzneistoffmetabolite von bis zu mehreren hundert Euro pro Gramm enorm. So ist beispielsweise die Herstellung der im Menschen detektierten Metabolite von Diclofenac, einem nicht-steroidalen Antirheumatikum (NSAID) zur Schmerzlinderung, chemisch nur sehr aufwändig und unter dem Einsatz harscher Reaktionsbedingungen zu bewerkstelligen.^{157–159} Mikrobielle Prozesse mit heterolog exprimierten P450s sowie wildtypischen Organismen haben sich als wertvolle Alternative zu den chemischen Synthesen dieser Intermediate erwiesen.¹⁶⁰ Der Bedarf an Metaboliten von Medikamenten steigt dabei simultan mit der Anzahl an neu entwickelten Arzneistoffen, deren Pharmakokinetik untersucht und somit die Bildung toxischer Verbindungen ausgeschlossen werden muss.^{161,162}

1.4 Oxyfunktionalisierungen in der Biokatalyse

Der Einsatz von Mikroorganismen sowie heterolog und homolog exprimierten P450 Monooxygenasen hat sich industriell als umweltfreundliche Alternative zur organischen Synthese von Verbindungen aus diversen Stoffklassen etabliert. Durch die häufig regio- und stereoselektive Oxyfunktionalisierung und der Möglichkeit, auch chemisch weniger reaktive Positionen zu adressieren, ermöglichen enzymbasierte Biokatalysatoren die Synthese hochpreisiger natürlicher und sogar neuartiger Produkte unter milden Reaktionsbedingungen. So sind in der Literatur zahlreiche Beispiele bekannt, welche die Hydroxylierung der industriell sehr interessanten Terpene beschreiben. Die Generierung von hydroxylierten Norisoprenoiden, wie beispielsweise β -Ionon, die als Zwischenprodukte in der Synthese vieler Carotinoide essenziell sind, ist hierbei einer der am häufigsten beschriebenen Prozesse (Abbildung 7).¹⁶³

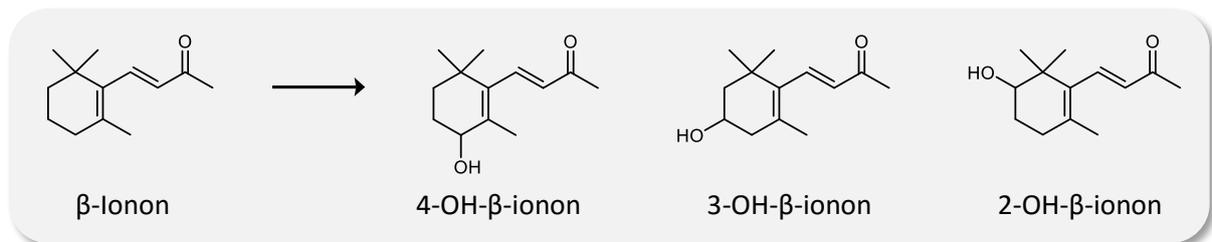


Abbildung 7: Beispiele hydroxylierter β -Ionon Produkte.

Eine allylische Oxidation des Iononrings wurde bereits durch chemische Katalysatoren wie Pyridinium Chlorochromat ermöglicht, ebenso existieren für diese Art der Oxidation aber auch einige chromfreie Verfahren.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Als Alternative zu chemischen Verfahren erwies sich die mikrobielle Hydroxylierung durch *A. niger*, während derer das Substrat β -Ionon in die Produkte 2-Hydroxy- β -ionon, 4-Hydroxy- β -ionon und deren Oxo-Derivate umgesetzt wird.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Ferner zeigten 15 von 215 *Streptomyces* sp. Stämmen die regioselektive Hydroxylierung des β -Ionons zum 4-Hydroxy- β -ionon.¹⁷⁰ Ebenso sind zahlreiche bereits charakterisierte P450s in der Lage, β -Ionon regioselektiv zu oxidieren. In rekombinanten *E. coli* Ganzzellsystemen, in denen verschiedene P450s aus *Actinomyceten* heterolog überexprimiert wurden, konnten Celik und Kollegen 2005 ebenfalls eine regioselektive Umsetzung von α - und β -Ionon in allylischer Position feststellen.¹⁷¹ Das für die Zeaxanthin- und Astaxanthinsynthese benötigte 3-Hydroxy- β -ionon konnte bisher allerdings lediglich unter Verwendung dreier verschiedener Enzyme hergestellt werden. Während CYP264B1 aus *Sorangium cellulosum* in der Lage ist, β -Ionon auch in nicht-allylischer Position zum 3-Hydroxy- β -ionon selektiv zu hydroxylieren, produzieren CYP101C1 und CYP101B1 aus *Novosphingobium aromaticivorans* Mischungen aus allylisch und nicht-allylisch hydroxyliertem β -Ionon.^{65,172}

Eine weitere Verbindung, deren Biosynthese bereits intensiv untersucht wurde, ist das in Grapefruitsaft gefundene Nootkaton, das für den typischen Grapefruitgeruch verantwortlich ist. Eine mögliche Syntheseroute geht dabei von der C2-Hydroxylierung des Sesquiterpens Valencen zu einer Mischung aus *cis*- und *trans*-Nootkatol aus, die durch weitere Oxidation zum Keton umgewandelt werden (Abbildung 8). Dies konnte sowohl chemisch als auch mikrobiell durch den Einsatz von Stämmen der Gattung *Chlorella* bewerkstelligt werden.¹⁷³ Girhard und Kollegen testeten 2009 125 bakterielle P450s aus einer rekombinanten P450-Bibliothek auf die Fähigkeit hin, diese Reaktion zu katalysieren.¹¹⁸ In dieser Studie konnten zwei Monooxygenasen als potenzielle Kandidaten identifiziert werden, P450 MoxA aus *Nonomuraea recticatena* sowie CYP109B1 aus *B. subtilis*. Letzteres lieferte hierbei sechs unterschiedliche Oxidationsprodukte, wobei die C2-Regioselektivität mit 65% deutlich höher war als die von P450 MoxA (< 10%). Daher wurde CYP109B1 für weitere Untersuchungen ausgewählt, während derer sich herausstellte, dass die fünf weiteren Produkte aus der Überoxidation vor allem von Nootkaton in wässrigem Medium herrühren. Deshalb wurde ein Zweiphasensystem entwickelt und in Bezug auf eine größtmögliche Ausbeute an C2-hydroxyliertem Produkt angepasst. Durch den Einsatz von 10% Dodecan und 2% DMSO als Lösungsmittel ließ sich die C2-Regioselektivität auf 96% steigern. Jedoch reduzierte sich bei der Verwendung dieses Systems die volumetrische Produktivität aufgrund des auf die Bakterienzellen toxisch wirkenden Lösungsmittels. Insgesamt konnten im dergestalt angepassten Zweiphasensystem 120 mg L⁻¹ der C2-Produkte produziert werden, was im Vergleich zur Ausbeute von 83 mg L⁻¹ im rein wässrigen System einer Steigerung von annähernd 50% gleichkommt, wobei der Anteil von Nootkaton lediglich 2,7% betrug.

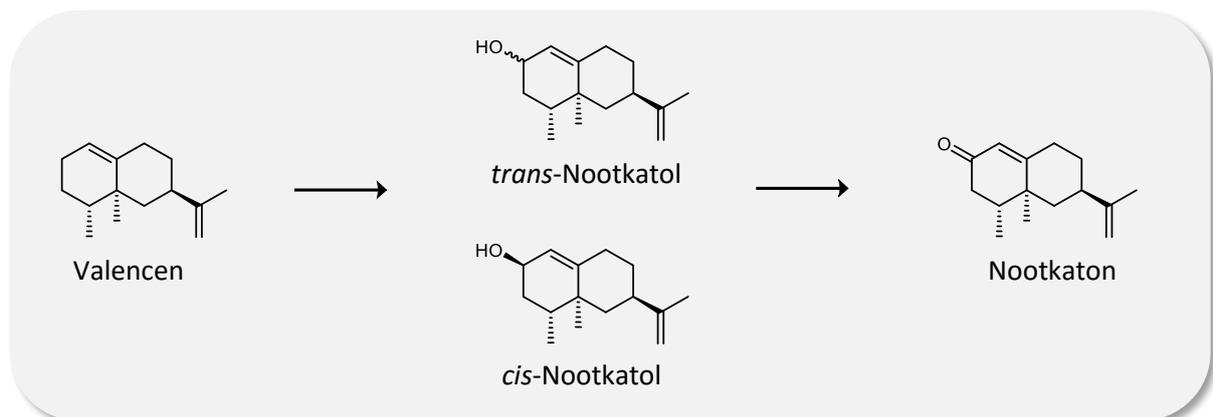


Abbildung 8: Synthese des Nootkatons aus dem Sesquiterpen Valencen.

Für die Hydroxylierung des Sesquiterpens Premnaspriodien in C2-Position zu Solavetivol, das weiter zum ebenfalls industriell bedeutenden Solavetivon, einem zu den Phytoalexinen gehörenden antimikrobiellen Abwehrstoff, oxidiert werden kann, wurden bisher zwei pflanzliche P450s identifiziert.^{174,175} Ebenso konnte für die selektive Hydroxylierung von

α -Humulen zu 8-Hydroxy- α -humulen, einem Zwischenprodukt in der Biosynthese des potenziell antikanzerogenen Zerumbon, einem Hemmstoff der NF- κ B-Aktivierung,^{176,177} mit CYP71BA1 aus *Zingiber zerumbet* Smith lediglich ein pflanzliches P450 identifiziert werden.^{144,178} Auch hier war die Produktivität zum gewünschten Produkt mit wenigen mg L⁻¹ sehr gering.

Neben der Oxyfunktionalisierung von Terpenen wurde auch jene von Arzneistoffen in den letzten Jahren intensiv erforscht. Hierbei kamen vor allem heterolog exprimierte humane P450s zum Einsatz, die für die Bildung entsprechender im menschlichen Körper detektierbarer Metabolite verantwortlich sind.¹⁷⁹ So wurde beispielsweise das humane CYP2C9 rekombinant in unterschiedlichen Wirtssystemen exprimiert und schließlich erfolgreich für die Produktion von 468 mg L⁻¹ 4'-Hydroxydiclofenac eingesetzt.^{160,180,181} Ausbeuten in dieser Größenordnung stellen hierbei jedoch Ausnahmen dar, denn oft liegen die erzielten Produktausbeuten mit hetero- oder homolog exprimierten P450s oder Ganzzellverfahren mit Mikroorganismen im niedrigen mg L⁻¹ Bereich.¹⁸²⁻¹⁸⁸

Die US-amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) hat 2008 Richtlinien für Metaboliten in der Arzneimittelprüfung herausgegeben und einen Grenzwert von 10% definiert. Zahlreiche Metaboliten werden in Mengen oberhalb der 10%-Grenze des ursprünglichen Arzneimittels im menschlichen Kreislauf detektiert, was toxikologische Studien zu diesen Metaboliten unabdingbar macht.¹⁸⁹ Daher ist es entscheidend, die Herstellung dieser chemisch schwer zugänglichen Metabolite auf quantitative Weise zu ermöglichen. Die Ausweitung des Anwendungsgebietes auf unterschiedliche Medikamentenklassen stellt hierbei eine exzellente Möglichkeit dar, den Einsatz von P450s und Mikroorganismen in der industriellen Biotechnologie zu erweitern.¹⁹⁰⁻¹⁹² In Tabelle 2 sind weitere industriell interessante Oxyfunktionalisierungen zur Synthese wertvoller Produkte im Bereich der Pharma-, Duft- und Aromastoffindustrie dargestellt.

Neben den in 1.2 erwähnten mikrobiellen Prozessen sind nur wenige P450-basierte biotechnologische Produkte in der Industrie etabliert. Ausnahmen bilden insbesondere zwei kommerzielle Prozesse, die als Präzedenzfälle für zukünftige Arbeiten dienen können. Zum Einen ist hier die *in situ* Synthese des Steroids Pregnenolon in *S. cerevisiae* unter der Verwendung humaner P450s zu nennen, die zukünftig durch Sanofi (Paris, Frankreich) betrieben werden soll.^{193,194} Die Produktion des Antimalariamedikaments Artemisinin ist jedoch der wohl bekannteste P450-basierte Prozess. Die langjährige Forschung am Prozess wurde von der *Bill & Melinda Gates Foundation* (Seattle, USA) finanziert und von Sanofi seit 2014 als gemeinnütziges Projekt auf semi-synthetischer Basis im Tonnenmaßstab (60 Tonnen Jahr⁻¹) betrieben.¹⁹⁵ Durch dieses Projekt kann eine stabilere und günstigere Versorgung als Alternative zur Extraktion des Wirkstoffs aus *Artemisia annua* erzielt werden. Mittels eines veränderten *S. cerevisiae* Stamms, in dem der Mevalonat-Weg angepasst und durch die Enzyme Amorphadien-Synthase sowie CYP71AV1 ergänzt wurde, konnten

zunächst Titer von 100 mg L⁻¹ Artemisininsäure erreicht werden.^{196,197} Auf Basis dieser Arbeiten konnte 2012 die Ausbeute durch Verbesserung der Expression der beteiligten Enzyme, *Metabolic Engineering* des Produktionsstamms sowie der Weiterentwicklung des Fermentationsprozesses auf bis zu 41 g L⁻¹ der Vorstufe Amorpha-4,11-dien respektive 2,3 g L⁻¹ Artemisinsäure *in situ* gesteigert werden.^{198,199} Aufgrund der für hohe Produkttiter nicht ausreichenden Aktivität von CYP71AV1 wurden ergänzend zwei Dehydrogenasen sowie Cytochrom b₅ aus *A. annua* in den Biosyntheseweg integriert, die die Oxidation durch CYP71AV1 in drei Schritten unterstützen. Hierdurch konnten schließlich kommerziell relevante Produkttiter von 25 g L⁻¹ Artemisininsäure fermentativ hergestellt werden.²⁰⁰ Für die letzten vier Oxidationsschritte zu Artemisin durch reaktiven Singlet-Sauerstoff (¹O₂) gelang es schließlich, einen photochemischen Prozess im Reaktormaßstab zu etablieren, um Artemisin mit einer Ausbeute von über 55% zu synthetisieren.²⁰¹

Tabelle 2: Auswahl interessanter Oxyfunktionalisierungen für die industrielle Biotechnologie.

Substrat	Produkt	Biokatalysator	Referenz
Epi-Isozizaene	Albaflavenol/ Albaflavenon	CYP170A1	202,203
α-Guaien	Rotundol/ Rotundon	CYP71BE5	204
α-Humulen	8-Hydroxy-α-humulen	CYP71BA1	144,178
Valencen	Nootkaton	P450s und Mikroorganismen	112,118,205
Amorpha-4,11-dien	Artemisininsäure	CYP71AV1	196
(S)-Limonen	(-)-Perillylalkohol	CYP153A6	111,206
Narbomycin	Pikromycin	P450 PikC	96,98,207
Compactin	Pravastatin	CYP105A3	208,209
Vitamin D ₃	1-α,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃	CYP105A1	210,211
Diclofenac	4'-Hydroxydiclofenac	CYP2C9, <i>Actinoplanes</i> sp.	160,212
<i>In situ</i> , Glucose	Progesteron, Hydrocortison	Humane P450s	213,214
Taxadien	Taxadien-5-α-ol	Taxadien 5-α-Hydroxylase	215

Der *Scale-Up* von anfänglich 100 mg L⁻¹ auf 25 g L⁻¹ Artemisininsäure zeigt indes das enorme Potenzial der P450-basierten Biotechnologie. Auch die Oxyfunktionalisierung weiterer Sesquiterpene wie Premnaspriodien oder α-Humulen wurde bislang durch überwiegend pflanzliche P450s realisiert. Wie an diesem Beispiel gut zu erkennen ist, steht die bemerkenswerte Chemie, die durch pflanzliche P450s ermöglicht wird, jedoch häufig im kommerziellen Konflikt mit der Komplexität der benötigten Systeme sowie den vergleichsweise niedrigen spezifischen Aktivitäten, die durch die Enzyme erreicht werden können. Bakterielle P450s stellen diesbezüglich interessante Alternativen zu pflanzlichen P450s dar, da sie in der Regel besser exprimierbar sind und weit höhere Aktivitäten

bereitstellen können. Das Spektrum an bakteriellen P450s für die Oxyfunktionalisierung von insbesondere komplexen Sesquiterpenen ist bislang jedoch nur unzulänglich erforscht.

1.5 Protein Engineering zur Adaptation von P450s

Die Veränderung ihrer Enzymeigenschaften wie Substratspezifität, Selektivität oder Aktivität kann entscheidend für den Einsatz von P450s in der industriellen Biokatalyse sein. In der Regel werden die Enzyme hinsichtlich einer bestimmten Reaktivität zielgerichtet adaptiert und verbessert. Für das rationale Proteindesign (*Rational Design*) werden Informationen aus Kristallstrukturen, Homologiemodellen, Literaturdaten oder Sequenzvergleichen genutzt, um Proteine durch ortsgerichtete Mutagenese gezielt zu verändern. Hierbei sind Kenntnisse derjenigen Schlüsselaminosäuren notwendig, die bestimmte Enzymeigenschaften beeinflussen. Demgegenüber steht die gerichtete Evolution (*Directed Evolution*), die inzwischen erfolgreich von Pionieren wie Frances H. Arnold (*California Institute of Technology*, Pasadena, USA) angewendet wird. Hierbei werden Enzyme durch verschiedene Methoden *in vitro* hinführend zu gewünschten Eigenschaften evolviert, wobei keine Kenntnisse der Struktur oder des Reaktionsmechanismus erforderlich sind. Die Methode basiert dabei auf iterativen Zyklen von willkürlichen Aminosäureaustauschen im Enzym, gefolgt von der Selektion der Variantenbibliotheken hinsichtlich verbesserter Eigenschaften. Ein möglichst produktspezifisches *high throughput screening* Verfahren ist für die Anwendung obligat, die Realisierung gestaltet sich hierbei jedoch häufig aufgrund mangelnder *screening* Methoden schwierig. Fortschritte in der Molekularbiologie und Bioinformatik können inzwischen zu einem schnelleren Erfolg beitragen, indem kleinere und intelligenter Bibliotheken generiert werden.^{5,8,216} Unter anderem wurden so eine Sesquiterpencyclase und eine *in silico* designte Retro-Aldolase evolviert.²¹⁷⁻²²⁰ Frances H. Arnold und Manfred Reetz legten in den letzten Jahren den Fokus der *Directed Evolution* auf die Anpassung von P450s, wobei vor allem P450 BM3 als stabiles, versatiles und bisher aktivstes Enzym dieser Klasse adressiert wurde.^{27,221-223} Während aufbauend auf der Aktivität des Wildtyps oder einer Einzelvariante die Verbesserung der Regio- und Stereoselektivität im Vordergrund stand, wurde auch die Interaktion zwischen Redoxpartner und Häm-Domäne verbessert.^{216,224-226}

P450 BM3 wurde weiterhin dergestalt evolviert, die Effizienz der Oxyfunktionalisierung von Terpenen und Arzneistoffen zu steigern. Durch gezielte und ungerichtete Mutagenese gelang es beispielsweise Urlacher und Mitarbeitern 2006, die allylische Aktivität von P450 BM3 zur Umsetzung von β -Ionon um das 280-fache zu steigern.⁸¹ Die mit 39% mäßige Enantioselektivität der Reaktion wurde in weiterführenden Arbeiten bis auf 65% für das (R)-4-Hydroxy- β -ionon erhöht.²²⁷ Sowden und Kollegen testeten 2005 P450cam- und

P450 BM3-Mutanten auf ihre Fähigkeit hin, Valencen zu Nootkaton umzusetzen.⁷⁸ Die beste P450cam-Mutante F87V/Y96F/L244A oxidierte Valencen zu 38% Nootkatol und 47% Nootkaton, allerdings mit relativ geringer spezifischer Aktivität. Als essenzielle Mutation für die hohe Regioselektivität der Oxidation in C2-Position wurde die Aminosäure an Position 87 ausgemacht, die die Bindung und Oxidation des relativ sperrigen Substrats Valencen begünstigt. Im Vergleich dazu wiesen die P450 BM3-Mutanten eine geringe Regioselektivität auf. Die Mutante P450 BM3 R47L/Y51F/F87A zeigte hierbei die höchste Ausbeute von 7,7% zu dem gewünschten Produkt Nootkaton, jedoch mit einer höheren spezifischen Aktivität im Vergleich zu den P450cam-Mutanten. Eine möglicherweise problematische Produktinhibierung des P450 Enzyms durch Nootkaton konnte bei diesen Kandidaten nicht festgestellt werden.²²⁸ Alexander Seifert und Kollegen identifizierten 2009 schließlich durch gerichtete Mutagenese an P450 BM3 vier Varianten mit Doppelmutationen, die 26% (F87A/A328I), 14% (F87V/A328I), 11% (F87L/A328I) und 4% (F87V/A328V) Nootkaton aus Valencen *in vitro* umsetzen konnten (Abbildung 9).²²⁹

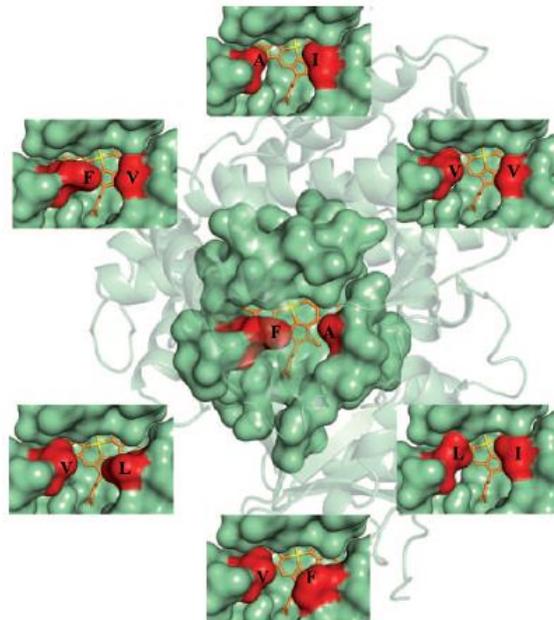


Abbildung 9: Oberflächendarstellung der aktiven Tasche von P450 BM3.²²⁹ Die rot markierten Positionen wurden mit hydrophoben Aminosäuren variierender Größe ausgetauscht, um eine Vielfalt in der Substratbindung mit unterschiedlichen Terpenen zu ermöglichen.

In Abhängigkeit von der Variante ließ sich hierbei der Anteil an Nootkaton durch eine erhöhte NADPH-Konzentration weiter steigern, was ein Indiz für die P450-katalysierte Oxidation in zwei Schritten darstellt. Im Hinblick auf die industrielle Anwendung dieser P450s wird künftig allerdings eine weitere deutliche Steigerung der Produktivität zur Umsetzung zum Zielprodukt Nootkaton die Hauptaufgabe sein. Zudem wurden mittels *Directed Evolution* auch die niedrigen Aktivitäten und Selektivitäten des P450 BM3-Wildtyps gegenüber Arzneistoffen wie NSAIDs verbessert. Hierdurch konnten Varianten generiert werden, die eine deutlich

verbesserte Oxidation von beispielsweise Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen oder Mefenaminsäure ermöglichen.^{185,230-233}

Die zahlreichen Studien des *Rational Design* sowie *Directed Evolution* weisen auf eine hohe Evolvierbarkeit der P450s hinsichtlich Aktivität, Selektivität und Substratspezifität hin. Das Enzymgerüst der Enzyme wurde schließlich durch *Directed Evolution* an nicht-natürliche respektive promiskuitive Reaktionen wie eine effiziente Olefincyclopropanierung adaptiert und somit das Anwendungsspektrum der P450s deutlich erweitert.^{16,25,221,234-237} Der Austausch des hoch konservierten Cysteinliganden zu Serin oder Histidin war hierbei entscheidend, um die promiskuitive Cyclopropanierung, die auch in anderen Metalloproteinen detektiert werden kann, zu steigern.^{16,238,239} Inspiriert durch diese Arbeiten und die außergewöhnliche Reaktivität des P450-Häms konnte inzwischen sogar das Grundgerüst anderer stabiler Metalloproteine, eines thermostabilen CYP119 sowie Myoglobins, genutzt werden, um das aktive Eisen durch Metallsubstitution auszutauschen.²⁴⁰ Mittels eines Iridium-Porphyrins anstelle des Eisen-Porphyrins wurde das Spektrum der chemischen Reaktivität auf nicht-natürliche Reaktionen ausgeweitet. Die künstlichen Metalloenzyme ließen sich darüber hinaus durch *Directed Evolution* sogar dergestalt evolvieren, nicht reaktive C-H-Bindungen selektiv durch Carbeninsertion sowie Carbenaddition (Cyclopropanierung) zu modifizieren.^{241,242}

Während die Aktivität oder Selektivität in der Regel von den Gegebenheiten in der aktiven Tasche determiniert wird, werden entscheidende Aminosäuren für die Enzym-Stabilität über das gesamte Protein hinweg identifiziert. Da der Einfluss dieser Aminosäurereste, die häufig weit von der aktiven Tasche entfernt liegen, auf die Eigenschaften eines Enzyms auch mit modernen *in silico* Methoden nur schlecht oder gar nicht zu bestimmen ist, eignet sich für die Mutagenese dieser Positionen besonders der Ansatz der *Directed Evolution*. Jedoch müssen hierbei die gewünschte Eigenschaft oder das Produkt klar definiert sein und, falls möglich, ein geeignetes *high throughput screening* Verfahren entwickelt werden. Die Konservierung der P450s im Bereich des aktiven Häms in Kombination mit den zahlreichen gelösten Kristallstrukturen und Mutationsstudien ermöglichen ein zielgerichtetes *Rational Design* als Alternative. Durch das *Protein Engineering* lassen sich P450-Wildtypen schließlich den Anforderungen der modernen industriellen Biokatalyse entsprechend adaptieren.

1.6 Identifikation neuer Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung

Aufgrund des großen Potenzials und der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von P450 Monooxygenasen in Kombination mit ihrer sehr großen Diversität bedarf es weiterhin intensiver Forschung, um geeignete Kandidaten für künftige industrielle Anwendungen zu identifizieren. Besonders für den Einsatz bei der umweltfreundlichen Herstellung von

Arzneistoffmetaboliten, spezifischer Terpenoide für die Duft- und Aromastoffindustrie, wie etwa Solavetivon, oder gänzlich neuer Produkte sind diese Biokatalysatoren als Alternativen zu schwierig zu bewerkstellenden und weniger umweltverträglichen chemischen Synthesen essenziell. Inzwischen existieren zahlreiche Konzepte, um neue Biokatalysatoren mit erwünschten Eigenschaften zu identifizieren oder *de novo* zu kreieren.^{5,6} Die klassische Strategie besteht in der Suche nach Organismen, die die gewünschte Reaktion bereits katalysieren können, um entweder die verantwortlichen Enzyme zu identifizieren und heterolog zu exprimieren oder durch *Strain Engineering* den Organismus hin zu besserer *Performance* zu adaptieren. Der Organismus *Streptomyces venezuela* ist beispielsweise dafür bekannt, die drei Makrolidantibiotika Methymycin, Neomethymycin und Pikromycin zu synthetisieren.^{243,244} Durch die Analyse des für die Makrolidbiosynthese verantwortlichen Gen-Clusters, *Knockout*-Experimenten sowie der heterologen Expression in *E. coli* und anschließenden Charakterisierung der Enzyme konnte mit P450 PikC ein Kandidat identifiziert werden, der die entscheidenden Hydroxylierungen in der Makrolidbiosynthese katalysiert.^{207,245,246}

Die Anzahl an verfügbaren P450 Sequenzen, die an diversen Stoffwechselwegen beteiligt sind und neuartige Oxyfunktionalisierungen ermöglichen können, steigt aufgrund der rapiden Sequenzierung von Genomen stetig an.³⁷ Diese metagenomischen Bibliotheken können genutzt werden, um schnell eine große Vielfalt an unterschiedlichen in der Natur vorkommenden Enzymen auf die gewünschten Eigenschaften hin zu untersuchen. Die immer günstiger werdenden Technologien zur Gensynthese beschleunigen eine derartige Strategie, da so für viele Expressionssysteme codonoptimierte Varianten der Gene leicht zugänglich sind. Besonders erfolgsversprechend ist jedoch eine Kombination dieses Konzepts mit der klassischen Suche in Organismen, um wildtypische Enzyme zu identifizieren und schließlich heterolog in größeren Titern herstellen und charakterisieren zu können. Organismen mit besonderem Sekundärmetabolismus, wie etwa das Myxobakterium *Sorangium cellulosum* Soce56, können an dieser Stelle als interessante Quellen für P450 Monooxygenasen dienen.²⁴⁷⁻²⁴⁹ Das gesamte CYPom von *S. cellulosum* Soce56 wurde isoliert und die andauernde Charakterisierung der P450s deckt seit mehreren Jahren immer weiter neue Reaktivitäten der unterschiedlichen P450s auf.²⁵⁰⁻²⁵³ Das *Screening* nach noch nicht getesteten Substanzen offenbart weitere neue interessante respektive promiskuitive Reaktionen der P450s, insbesondere wenn das natürliche Substrat nicht bekannt ist. So konnte beispielsweise bei dem ursprünglich als Steroidhydroxylase identifizierten CYP106A2 aus *B. megaterium* eine Aktivität auf das Diterpen Abietinsäure detektiert werden.^{115,254} Basierend auf den bereits charakterisierten P450s kann die Suche nach homologen Enzymen in Datenbanken auch zu einer zielgerichteteren Metagenomanalyse führen. Nah verwandte P450s mit einer Aminosäuresequenzidentität über 40% können in eine Familie eingruppiert werden und besitzen aufgrund der hohen Konservierung im Bereich der aktiven Tasche

oftmals ähnliche Funktionen. Neben neuen Biokatalysatoren stellt das *Protein Engineering* zur Veränderung von Enzymeigenschaften wie Selektivität, Aktivität oder Substratspezifität Möglichkeiten bereit, um das Anwendungsspektrum bereits bekannter P450s zu erweitern. Die Expression neuer P450s kann aufgrund hoher GC-Gehalte der Gene, zahlreicher seltener Codons oder der Toxizität der P450s für die Zelle selbst eingeschränkt sein. Auch liegen viele eukaryotische P450s membranassoziiert vor oder benötigen für die Bildung eines aktiven Proteins posttranslationale Modifikationen. In prokaryotischen Expressionssystemen, in denen keine Kompartimentierung vorliegt, können sie dementsprechend in der Regel nicht hergestellt werden.⁷¹ Aus diesem Grund sind für die Expression in gängigen prokaryotischen Expressionstämmen, wie etwa *E. coli* oder *P. putida*, besonders prokaryotische P450s von Interesse, die hier überwiegend in löslicher Form exprimiert werden können. Für die Expression eukaryotischer P450s hingegen werden in der Regel eukaryotische Expressionssysteme, wie *S. cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, vorgezogen.^{112,255–258} Neben der Expression aller benötigter Komponenten müssen weitere Faktoren für die initiale Charakterisierung der P450s berücksichtigt werden (Abbildung 10).

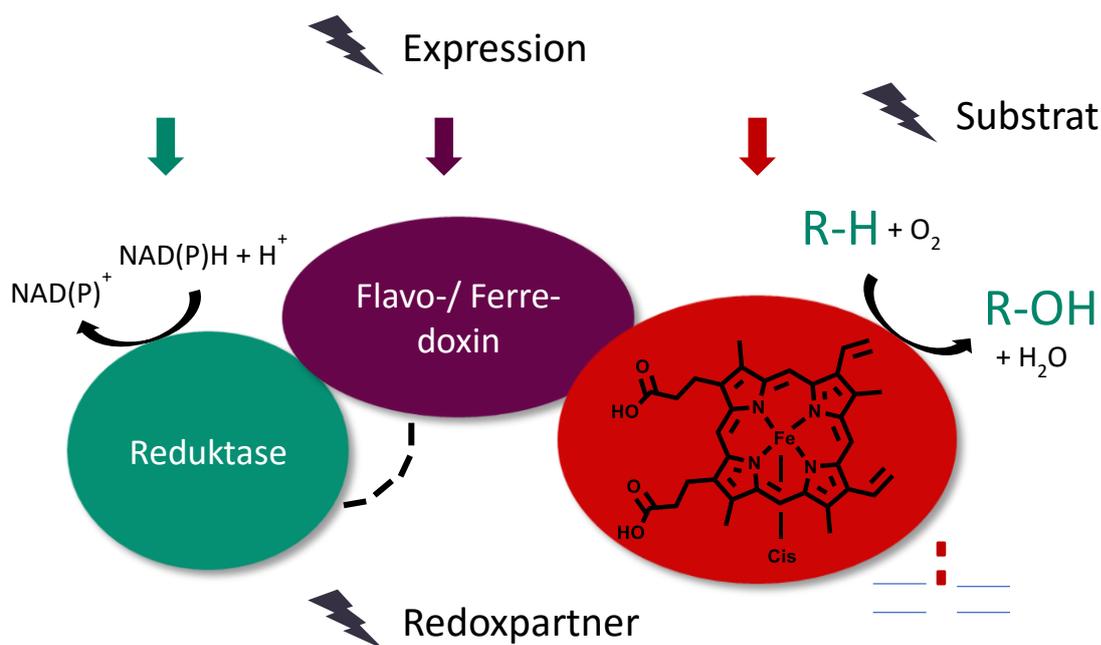


Abbildung 10: Herausforderungen bei der Charakterisierung neuer Cytochrom P450 Monooxygenasen.

Die unterschiedlichen P450-Redoxpartnersysteme wurden in Abbildung 5 (Kapitel 1.2) bereits veranschaulicht. Die sehr große Vielfalt an potenziellen elektronenliefernden Redoxkomponenten kann für die Rekonstitution der P450-Aktivität *in vitro* ein Problem darstellen. Andererseits bietet sie gleichzeitig die Möglichkeit, Redoxpartnersysteme unterschiedlicher Organismen zu verwenden oder diese gar zu mischen.^{59,91,259,260} Für versatile Redoxpartner wie die eukaryotischen Adrenodoxin (AdX) und Adrenodoxinreduktase (AdR) konnte bereits gezeigt werden, dass sie Elektronen zu diversen

P450s unterschiedlicher Herkunft funktional transportieren können. Solche heterologen Redoxpartner können als Alternative bei der Rekonstitution der Aktivität dienen, da die physiologischen Redoxpartner häufig verstreut über das gesamte Genom liegen, während das direkte assoziierte Vorkommen in einem *Gen-Cluster* nur selten der Fall ist.²⁶¹⁻²⁶³ Hinweise auf potenzielle Substrate lassen sich in manchen Fällen aus dem Phänotyp des Organismus, wie etwa dem Metabolismus bestimmter xenobiotischer Stoffe oder der Synthese spezifischer Sekundärmetaboliten, oder aus der Homologie zu bereits charakterisierten P450s ableiten. Trotz aller verfügbarer Datenbanken und weiterer bioinformatischer Methoden stellt die initiale Rekonstitution der Aktivität eines neuartigen P450 Systems aufgrund der beschriebenen Komplexität im Zusammenspiel mehrerer Komponenten eine anspruchsvolle Herausforderung von höchstem akademischen Interesse dar.

1.7 Zielsetzung

Eine der größten Herausforderungen in der chemischen Synthese ist die selektive Oxyfunktionalisierung nicht-aktivierter C-H-Verbindungen. Die Biokatalyse kann hier einen Beitrag durch den Einsatz von versatilen Cytochrom P450 Monooxygenasen leisten. In den vorhergehenden Kapiteln wurden auf die Besonderheiten und Chancen dieses Biokatalysators eingegangen, aber auch Limitationen des komplexen Multikomponentensystems aufgezeigt, die dem großtechnischen Einsatz in der industriellen Biotechnologie im Wege stehen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Plattform von P450 Monooxygenasen zu entwickeln, die in der Lage sind, ein ausgewähltes Panel aus Norisoprenoiden, Terpenen und Diclofenac möglichst an einer Vielzahl von Positionen selektiv und mit hoher Aktivität zu oxyfunktionalisieren (Abbildung 11). Substrate wie etwa Premnaspriodien oder β -Bisabolen sind in dieser Hinsicht bislang nur unzulänglich erforscht oder die literaturbekannten Enzyme weisen eine geringe Selektivität und Aktivität auf. Des Weiteren sind nur wenige Beispiele von P450-Enzymen mit der Fähigkeit den Iononring der Norisoprenoide selektiv zu funktionalisieren bekannt. Aus diesem Grund sollten neuartige P450-enthaltende Mikroorganismen oder heterolog exprimierte P450s identifiziert, charakterisiert und schließlich eingesetzt werden, um eine möglichst große Vielfalt an Produkten zu generieren.

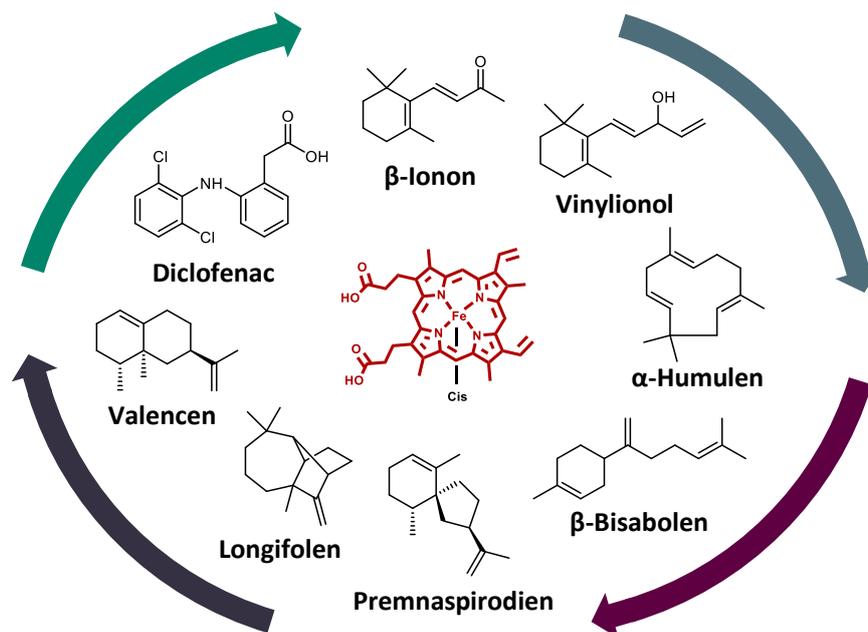


Abbildung 11: Norisoprenoide, Terpene und Diclofenac, deren Oxyfunktionalisierung in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Die zu untersuchenden Substrate bergen hierbei zahlreiche Positionen für putative Oxyfunktionalisierungen, die zu wertvollen Medikamentenmetaboliten sowie Produkten für die Aroma- und Geruchstoffindustrie führen können. Hier galt es, eine Plattform unterschiedlicher Biokatalysatoren für die Implementierung in industrielle Prozesse zu entwickeln und somit das Spektrum der C-H-Oxyfunktionalisierung zu erweitern. Weiter sollten die identifizierten komplexen Enzymsysteme charakterisiert und dergestalt adaptiert werden, dem Einsatz von P450-basierten Biokatalysatoren in der industriellen Biotechnologie näher zu kommen. Erste Biotransformationen im präparativen Maßstab sollten die Charakterisierung der generierten Produkte ermöglichen und Aufschluss über die Regioselektivität der Oxyfunktionalisierung liefern. Hierfür lag der Fokus auf effizienten Ganzzellbiokatalysatoren, die entscheidend für die industrielle Anwendung der cofaktorabhängigen Enzyme sind. Insbesondere bakterielle P450s bieten diesbezüglich die Möglichkeit einer heterolog funktionalen Expression und genügen zudem durch relativ hohe Aktivitäten den Ansprüchen eines ökonomischen Prozesses.¹²⁴ Durch die Kombination aus Chemie, Biologie, Bioverfahrenstechnik und Informatik sollte das biosynthetische Potential der Oxyfunktionalisierung ausgelotet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Medien sind mit wenigen Ausnahmen kommerziell erhältlich und wurden in den höchsten verfügbaren Reinheitsgraden, sofern nicht anders vermerkt, von Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Macherey-Nagel (Düren), Alfa-Aesar (Ward Hill, Massachusetts, USA) und Carl-Roth (Karlsruhe) bezogen. Das Substrat Imidacloprid **36** (Sigma-Aldrich) wurde von Herrn Dr. Heiko Käfferlein (IPA Bochum) dankend erhalten. Im Rahmen des EU-Projektes BIOOX wurden die Substrate β -Ionon **1**, Vinylionol **2** (beide BASF SE, Ludwigshafen am Rhein), α -Humulen **3**, β -Bisabolen **4**, Premnaspriodien **5**, Longifolen **6** sowie Valencen **7** (alle Firmenich International SA, Genf, Schweiz) chemisch oder enzymatisch synthetisiert, aufgereinigt und bereitgestellt. Der authentische Standard 4-Hydroxy- β -ionon **71** wurde vom Kooperationspartner BiCT (Lodi, Italien) dankbar erhalten.

2.1.2 Enzyme

Die für Klonierungsarbeiten eingesetzten Enzyme T4-DNA-Ligase, *DpnI*, *NdeI*, *HindIII*, *EcoRI* wurden zusammen mit den zugehörigen Puffern von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *L. mesenteroides* wurde von Roche Diagnostics International AG (Rotkreuz, Schweiz) bezogen. Die *PfuUltra II* Fusion HS DNA Polymerase wurde von Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, Kalifornien, USA), die DNase I von Sigma-Aldrich, die KOD HS Polymerase von Novogene Inc. (Madison, Wisconsin, USA), die Rinderleber-Katalase von Fluka, das Lysozym von AppliChem GmbH (Darmstadt) und die Enzyme für das *Gibson Assembly*[®] (T5 Exonuklease, *Phusion*[®] High-Fidelity DNA-Polymerase, *Taq* DNA Ligase) von NEB (Frankfurt am Main) bezogen.

2.1 Material

2.1.3 Molekularbiologische Kits, DNA- und Molekulargewichtsmarker

Hersteller	Kit
Zymo Research Corp. (Irvine, Kalifornien, USA)	Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit DNA Clean & Concentrator™ Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit ZR Fungal/Bacterial DNA Microprep™ Kit
Solis BioDyne (Tartu, Estland)	HOT FIREPol® MultiPlex Mix RTL
Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa) Gene JET Genomic DNA Purification Kit Pierce Micro BCA™ Protein Assay Kit
PeqLab (Erlangen)	PeqGold Cycle Pure Kit

2.1.4 Synthetische DNA

2.1.4.1 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) für die ortsgerechte Mutagenese, Amplifikation von DNA-Fragmenten, *Gibson Assembly*® sowie für Sequenzierungen wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Eine vollständige Liste aller verwendeten Primer findet sich im Anhang (7.5).

2.1.4.2 Synthetische Gene

Die synthetischen Gene für CYP51F1, CYP52A10, CYP548A5 sowie die bifunktionale Reduktase von *B. bassiana* wurden bereits integriert im Klonierungsvektor pMA-T bei Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.) in Auftrag gegeben. Das synthetische Gen für ITB1696 wurde im pET-28a(+) Vektor von Genescript (Piscataway, New Jersey, USA) bezogen. Die vollständigen Sequenzen respektive die *Accession number* befinden sich im Anhang (7.7).

2.1.5 Verwendete Organismen

Organismus	Genotyp	Beschreibung/ Verwendung	Quelle
Prokaryoten			
<i>E. coli</i> DH5- α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi</i> - 1 <i>gyrA96 relA1</i>	Klonierungsstamm sowie Expressionsstamm von pCWori(+)-Konstrukten	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^q</i> <i>Z</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Klonierungsstamm	Agilent Technologies Inc.
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1</i> <i>sam7 nin5</i>])	Expressionsstamm	Novogene Inc.
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96</i> <i>recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14-</i> [F' <i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15] <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺)	Expressionsstamm	Promega (Mannheim)
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pRARE	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> <i>lacY1</i> (DE3) pRARE6 (Cm ^R)	Expressionsstamm für Gene mit <i>rare codons</i>	Novogene Inc.
<i>E. coli</i> JW5510	F ⁻ Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>) λ - <i>DyggJG763</i> :: <i>kan</i> <i>rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsdR514</i>	Expressionsstamm für pBAD-Vektoren	Coli Genetic Stock Center (Yale Universität)
<i>E. coli</i> Rosetta- gami™ B(DE3) plysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm lacY1</i> <i>ahpC</i> (DE3) <i>gor522</i> ::Tn10 <i>trxBpLysSRARE</i> (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)	Expressionsstamm für eukaryotische Gene	Novogene Inc.
<i>Arthrobacter</i> sp.	wildtypisch	in Hohenheim isoliert ²⁶⁴	O. Reznicek ²⁶⁵
<i>Phenyllobakterium</i> <i>immobile</i> Stamm E	wildtypisch	in Ecuador isoliert ²⁶⁶	O. Reznicek ²⁶⁵
<i>Chondromyces</i> <i>apiculatus</i> DSM436	wildtypisch	Myxobakterium	DSMZ
Eukaryoten			
<i>Mucor hiemalis</i>	wildtypisch	Umwelt-Isolat	Lisa Kontny (ITB)
<i>Clitocybe nebularis</i>	wildtypisch	Umwelt-Isolat	-
<i>B. bassiana</i>	mutagenisiert	durch UV-Licht und Selektion generierter Stamm ²⁶⁷	M. Breuer (BASF)

2.1 Material

2.1.6 Verwendete Plasmide

Die Plasmide pkkHC_AdX, pBAR1607_AdR wurden von Prof. Rita Bernhardt (Universität Saarland) und das Plasmid pET-YSBLIC_P450_RhF von Prof. Sabine Flitsch (Universität Manchester) dankend erhalten. Eine vollständige Auflistung aller bezogenen oder in dieser Arbeit konstruierten Plasmide findet sich im Anhang (7.6).

2.1.7 Nährmedien

Für die Kultivierung von *E. coli* Zellen wurde LB-Medium (10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g L⁻¹ NaCl) oder TB-Medium (12 g L⁻¹ Trypton, 24 g L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g L⁻¹ Glycerol, 1x TB-Puffer: 0,17 M KH₂PO₄ und 0,72 M K₂HPO₄) eingesetzt. Alle verwendeten Nährmedien wurden, sofern nicht anders angegeben, autoklaviert oder bei hitzesensitiven Komponenten sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße). Für die Herstellung von Festmedien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g L⁻¹ Agar hinzugefügt. Nach Abkühlen der Medien auf unter 55 °C wurde, sofern eine Selektion erforderlich war, ein sterilfiltriertes oder in Ethanol gelöstes spezifisches Antibiotikum zugegeben. Zur Kultivierung von *P. immobile* Stamm E wurde das Mineralsalz-Medium B^{265,266} mit Antipyrin als Kohlenstoffquelle verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden Eukaryoten in KGM-Flüssigmedium (Kartoffel-Glucose-Medium, Carl-Roth, Karlsruhe) oder auf KGM-Festmedium mit 25 g L⁻¹ Agar versetzt kultiviert.

VY/2 Medium (*Chondromyces apiculatus*)

1,36 g L ⁻¹	CaCl ₂ x 2H ₂ O
15 g L ⁻¹	Difco Agar
pH 7.2 mit KOH	
5 g L ⁻¹	Frische Bäckerhefe (als 5 g 100 mL ⁻¹ Stocklösung, pH 6.5 mit KOH, autoklaviert)
0,5 mg L ⁻¹	Vitamin B12

M9 Medium (<i>E. coli</i> P450 RhF)			
1x M9-Salze	7,5 g L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄	4 g L ⁻¹	Glucose
	3 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄	1 mg L ⁻¹	Biotin
	0,5 g L ⁻¹ NaCl	1 mg L ⁻¹	Thiamin
pH 7.2 mit NaOH	0,5 g L ⁻¹ NH ₄ Cl	246,5 mg L ⁻¹	MgSO ₄
		44,1 mg L ⁻¹	CaCl ₂
1x Spurenelement- Lösung	50 mg L ⁻¹ EDTA		
	8,3 mg L ⁻¹ FeCl ₃ ·6H ₂ O		
	0,84 mg L ⁻¹ ZnCl ₂		
	0,13 mg L ⁻¹ CuCl ₂ ·2H ₂ O		
	0,1 mg L ⁻¹ CoCl ₂ ·2H ₂ O		
	0,1 mg L ⁻¹ H ₃ BO ₃		
	0,016 mg L ⁻¹		
	MnCl ₂ ·4H ₂ O		
MSB-Medium (<i>Arthrobacter</i> sp.)			
20 mL L ⁻¹	Hutners Base (durch Cohen-Bazire und Kollegen abgewandelte Version) ⁴⁶⁶		
5,68 g L ⁻¹	40 mM Na ₂ HPO ₄		
6,96 g L ⁻¹	40 mM KH ₂ PO ₄		
1 g L ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄		
C-Quelle nach Bedarf			

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Plasmide aus *E. coli* wurden durch das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit nach Herstellervorschrift isoliert und anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde 35 µL ddH₂O eingesetzt. Die Konzentration der eluierten Plasmid-DNA wurde mittels des NanoDrop-Photometers (NanoDrop 2000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, was dem Absorptionsmaximum der DNA entspricht. Das gemessene Probenvolumen betrug dabei 1,1 µL.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Prokaryoten

Für die Isolierung der genomischen DNA aus *Arthrobacter* sp. wurde eine Vorkultur mit 1% Glucose für 24 h bei 30°C kultiviert und die DNA schließlich mittels des Gene JET Genomic DNA Purification Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution der DNA wurde mit 200 µL ddH₂O durchgeführt.

Die Isolation der genomischen DNA aus *Chondromyces apiculatus* DSM436 erfolgte direkt von einer VY/2-Agarplatte. Die Zellen wurden abgeschabt und in ddH₂O resuspendiert. Die Gewinnung der DNA wurde schließlich ebenfalls mit dem Gene JET Genomic DNA Purification Kit nach Herstellerangaben durchgeführt und die DNA mit 200 µL ddH₂O eluiert.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Eukaryoten

Für die Isolierung der genomischen DNA aus Eukaryoten wurden Vorkulturen der unterschiedlichen filamentösen Pilze auf KGM-Medium für etwa 3 d bei 27 °C kultiviert. Eine erste Zellyse wurde durch Abzentrifugieren der Kulturen, Einfrieren bei -80 °C für 10 min und Zerkleinern der eingefrorenen Mycelien mit Hilfe eines Mörsers erreicht. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe des ZR Fungal/Bacterial DNA Microprep™ Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution der DNA erfolgte mit 25 µL ddH₂O.

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Für die Analyse der DNA wurden Proben mit einem Volumen von 20 µL und einer Konzentration von 50 – 70 ng µL⁻¹ eingesetzt. Die Sequenzierung übernahm die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, DE) mit Hilfe der in Kapitel 7.5 erwähnten Oligonukleotiden.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die analytische oder präparative Auftrennung von DNA-Molekülen in Abhängigkeit von deren Größe, beziehungsweise ihrer Form. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Moleküle durch die stark vernetzte Agarose-Matrix zur positiven Anode, wobei kleinere Moleküle eine höhere Mobilität aufweisen. Für die Detektion der DNA im Agarosegel wurde dieses mit den DNA-Farbstoffen GelRed (GeneON GmbH, Ludwigshafen) oder peqGREEN (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) versetzt. Die mit einem 10x Ladepuffer (0,01% w/v Bromphenolblau, 50% Glycerol) vermischten Proben wurden in einem 100 V Spannungsfeld aufgetrennt und anschließend analysiert. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder verwendet.

2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolation der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden diese unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, gewogen sowie mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit nach Herstellerangaben behandelt. Die isolierte DNA wurde nachfolgend mit 20 µL ddH₂O eluiert.

2.2.7 DNA-Aufreinigung

Eine Aufreinigung der DNA kann insbesondere nach Behandlung mit Restriktionsenzymen nach der QuikChange®-Methode oder vor der Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Stämme erforderlich sein, um die dabei eingesetzten Enzyme und Puffer aus der DNA-Probe zu entfernen. Die Proben wurden hierzu über einem 0,025 µm MF-Millipore Membran-Filter (Merck, Darmstadt) gegenüber 30 mL ddH₂O für 20 min dialysiert, anschließend wiederaufgenommen und für weitere Klonierungsarbeiten weiterverwendet.

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde verwendet, um gezielt DNA-Fragmente von genomischer DNA zu amplifizieren. Hierbei wird durch die sich zyklisch wiederholenden Schritte der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, dem Primer-*Annealing* sowie der *Elongation* im Idealfall der zu amplifizierende Bereich in jedem Zyklus verdoppelt und somit eine exponentielle Amplifikation des Amplifikats gewährleistet. Für die *Elongation* kam entweder die *Pfu* Ultra II Fusion HS Polymerase oder die KOD HS Polymerase zum Einsatz. Bei kritischen Reaktionen, beispielsweise bei hohem GC-Gehalt des zu amplifizierenden Bereichs, wurden dem Reaktionsansatz zudem 5% v/v DMSO beigesetzt und die *Annealing*-Zeit reduziert. Der Erfolg der PCR-Reaktionen wurde durch ein Agarosegel kontrolliert und die DNA-Fragmente anschließend direkt isoliert. Im Falle geringer Ausbeuten, aber korrekter Größe im Agarosegel, wurde das aufgereinigte DNA-Fragment als Templat für eine erneute PCR eingesetzt. Die Reaktionsansätze für ein Gesamtvolumen von 50 µL sowie die dazugehörigen PCR-Programme sind nachfolgend aufgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Arthrobacter sp. PCR-Ansätze

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x <i>Pfu</i> Ultra II Fusion Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 2 µL	je 0,4 µM
10 mM dNTP-Mix	2,5 µL	je 500 µM
Templat DNA	3 µL	~ 5 ng µL ⁻¹
<i>Pfu</i> Ultra II Fusion HS Polymerase	1 µL	2,5 U µL ⁻¹
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

Chondromyces apiculatus und Eukaryoten PCR-Ansätze

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x KOD HS Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1,5 µL	je 0,3 µM
10 mM dNTP-Mix	2,5 µL	je 500 µM
25 mM MgSO ₄	4 µL	2 mM
DMSO	2,5 µL	5% v/v
Templat DNA	20 µL (<i>C. apiculatus</i>) 6,5 µL (<i>M. hiemalis</i>) 2,5 µL (<i>C. nebularis</i>)	~ 3 – 4 ng µL ⁻¹
KOD HS Polymerase	1 µL	1 U µL ⁻¹
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

Arthrobacter sp. PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	92 °C	2 min
2. Denaturierung	92 °C	20 s
3. <i>Annealing</i>	61 °C	30 s
4. Elongation	68 °C	A) 55 s B) 25 s
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (30x)		
5. Finale Elongation	68 °C	3 min
6. Halten	8 °C	∞

A) P450s, FeRed_1
B) FldX, FlavRed

***Chondromyces apiculatus* + Eukaryoten PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. <i>Annealing</i>	55 °C	15 s
4. Elongation	70 °C	1 min 30 s
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (30x)		
5. Finale Elongation	70 °C	5 min
6. Halten	8 °C	∞

2.2.9 QuikChange® (ortsgerichtete Mutagenese)

Der gezielte Basenaustausch in einer Gensequenz (Modifikation, Insertion, Deletion) wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mittels der QuikChange® Methode erzielt. Hierzu werden zwei entgegengesetzte und dem zu verändernden DNA-Abschnitt komplementäre Primer in der PCR eingesetzt, die beide die gewünschte Modifikation beinhalten. Während die Mutagenese bei CYP116B3 und ITB1693 mit sehr hoher Effizienz von bis zu 36 Basendeletionen sowie 21 Baseninsertionen ablief mussten der PCR-Ansatz und das PCR-Programm bei der genetischen Modifikation von CYP109Q5 angepasst werden. Durch den sehr hohen GC-Gehalt (Templat 70%, Primer bis zu 78%) war eine Erhöhung der DMSO-Konzentration im Ansatz, durch die die Bildung von Sekundärstrukturen des Templats reduziert und somit das Primer-*Annealing* verbessert wird²⁶⁸, notwendig, um die Insertion von Primer-Multimeren zu verhindern. Die QuikChange®-Ansätze für ein Gesamtvolumen von 50 µL sowie die zugehörigen PCR-Programme sind nachfolgend aufgeführt.

CYP116B3 und ITB1693 PCR-Ansätze

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x KOD HS Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1 µL	je 0,2 µM
2 mM dNTP-Mix	5 µL	je 200 µM
25 mM MgSO ₄	4,5 µL	2,25 mM
Templat DNA	0,75 µL	~ 1 – 2 ng µL ⁻¹
KOD HS Polymerase	1 µL	1 U µL ⁻¹
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

2.2 Molekularbiologische Methoden

CYP109Q5 PCR-Ansätze

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x KOD HS Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1 µL	je 0,2 µM
2 mM dNTP-Mix	5 µL	je 200 µM
25 mM MgSO ₄	4,5 µL	2,25 mM
DMSO	A) 2,5 µL B) 5 µL	A) 5% v/v B) 10% v/v
Templat DNA	0,5 µL	~ 1 ng µL ⁻¹
KOD HS Polymerase	1 µL	1 U µL ⁻¹
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

CYP116B3 und ITB1693 PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. <i>Annealing</i>	60 °C	30 s
4. Elongation	70 °C	4 min 15 s
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (20x)		
5. Finale Elongation	70 °C	5 min
6. Halten	8 °C	∞

CYP109Q5 PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. <i>Annealing</i>	A) 60 °C B) 66 °C	10 s
4. Elongation	70 °C	3 min
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (20x)		
5. Finale Elongation	70 °C	5 min
6. Halten	8 °C	∞

Die QuikChange® der Positionen Q35, T229, I232, A233, T237 und A280 in CYP109Q5 erfolgte jeweils unter Zusatz von 5% v/v DMSO bei einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C (Ansatz A)

während die Positionen V80, I283 sowie F381 mit 10% v/v DMSO bei 66 °C *Annealing*-Temperatur durchgeführt wurden (Ansatz B).

Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit 1 µL *DpnI* (10 U µL⁻¹) versetzt und bei 37 °C für 2 h inkubiert, um die methylierte Templat-DNA abzdauen. Insgesamt 8 µL QuikChange®-Ansatz, der gegebenenfalls durch Dialyse aufgereinigt wurde, wurden für die Transformation in 100 µL chemisch kompetenter *E. coli* XL1-Blue oder DH5-α Zellen eingesetzt. Die erfolgreiche Einbringung der gewünschten Mutation wurde nach Isolierung der Plasmide durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

2.2.10 *Gibson Assembly*®

Das von Dr. Daniel Gibson und Kollegen entwickelte *Gibson Assembly*® stellt eine schnelle und effektive Methode dar, mehrere DNA-Fragmente unabhängig von Restriktionsschnittstellen zusammenzufügen. Modifikationen wie etwa die Insertion eines His₆-Tags können dabei gleichzeitig eingebracht werden.²⁶⁹ Die Methode beruht auf drei verschiedenen enzymatischen Prozessen, die jedoch simultan bei derselben Temperatur ablaufen, sodass keine Temperaturprofile während der Reaktion gefahren werden müssen. Durch eine im Vorfeld gefahrene PCR mit spezifischen Primern werden Überhänge an die resultierenden Amplifikate angebracht, die homolog zu den benachbarten Regionen der zu ligierenden Fragmente sind. Die 5'-Enden der doppelsträngigen linearen Fragmente werden im ersten Schritt des *Gibson Assembly*® durch eine T5-Exonuklease abgedaut. Die einzelsträngigen, homologen Überhänge der eingesetzten Fragmente können miteinander annealen, während die entstandenen Lücken von einer DNA-Polymerase aufgefüllt und schließlich durch eine thermostabile *Taq*-DNA-Ligase zum einem geschlossenen, doppelsträngigen Plasmid verknüpft werden.

Analog zur *Gibson Assembly*® Methodik wurden zunächst separate PCR-Reaktionen des Vektors und des, beziehungsweise der, Inserts mit den jeweils spezifischen Primer-Paaren (Anhang 7.5) durchgeführt. Der Standardansatz und das Programm für die vorgeschalteten PCRs sowie der Ansatz des *Gibson Assembly*® Master Mixes sind nachfolgend aufgeführt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Gibson Assembly® PCR-Ansätze

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x KOD HS Puffer	5 µL	1x
Primer <i>forward</i> und <i>reverse</i>	je 1,5 µL	je 0,3 µM
10 mM dNTP-Mix	2,5 µL	je 400 µM
25 mM MgSO ₄	4 µL	2 mM
DMSO	2,5 µL	5% v/v
Templat DNA	0,75 µL	~ 1 – 2 ng µL ⁻¹
KOD HS Polymerase	1 µL	1 U µL ⁻¹
ddH ₂ O	auf 50 µL	-

Gibson Assembly® PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 s
3. <i>Annealing</i>	5 °C unter T _m (Primerpaar)	30 s
4. Elongation	72 °C	30 s pro kb
Weitere Zyklen ab Schritt 2. (34x)		
5. Finale Elongation	72 °C	4 min
6. Halten	8 °C	∞

Gibson Assembly® Mix

Komponenten	Volumen
5x Iso Reaktionspuffer (500 mM Tris/HCl pH 7.5, 25% PEG-8000, 50 mM MgCl, 50 mM DTT, 5 mM NAD, je 1 mM dATP, dCTP, DGTP, dTTP)	320 µL
T5 Exonuklease (10 U µL ⁻¹)	0,64 µL
<i>Phusion</i> ® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U µL ⁻¹)	20 µL
<i>Taq</i> DNA Ligase (40 U µL ⁻¹)	160 µL
ddH ₂ O	auf 1,2 mL
Aliquotiert zu 15 µL, gelagert bei -20°C	

Nach erfolgter PCR wurden die Ansätze über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente unter Verwendung des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits aus dem Gel isoliert. Den 15 µL Aliquots des *Gibson Assembly*® Mixes wurden schließlich 5 µL DNA-Mix bei einem molaren Verhältnis Vektor:Insert(s) von 1:5, insgesamt ~ 300 ng DNA, zugefügt. Das

Gibson Assembly[®] selbst wurde schließlich bei 50 °C für 1 h durchgeführt. Nach Transformation von 8 µL des nicht weiter aufbereiteten Ansatzes in 100 µL chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue oder DH5-α Zellen wurde das Konstrukt durch DNA-Sequenzierung auf die korrekte Modifikation hin überprüft.

2.2.11 Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen

In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, welche *sticky ends* produzieren, da hierdurch bei der Ligation des DNA-Fragments in das Plasmid eine korrekte Orientierung gewährleistet wird. Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. bezogen und nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Im Falle von *Double digest* Ansätzen diente das Online-Tool *DoubleDigest Calculator* von Thermo Fisher Scientific zur Planung des Restriktionsansatz-*Setups*. Nach erfolgter Restriktion für wenige Stunden oder über Nacht bei 37 °C wurden die Ansätze für die anschließende Ligation von den eingesetzten Puffern und Enzymen befreit. Die DNA wurde hierzu entweder über die Isolierung aus einem Agarosegel mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit oder mittels des DNA Clean & Concentrator™ Kit (Ansätze < 100 µL, Elution in 20 µL ddH₂O) respektive PeqGold Cycle Pure Kit (Ansätze > 100 µL, Elution in 50 µL ddH₂O) gereinigt.

2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Moleküle energieabhängig enzymatisch miteinander verknüpft. Das in dieser Arbeit eingesetzte Enzym T4-DNA Ligase katalysiert dabei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe des einen Moleküls mit der 5'-Phosphatgruppe des anderen, wobei ATP als Energielieferant benötigt wird. Hierbei wurde das Insert im dreifachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt, um die Bildung von Vektor-Dimeren oder die Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µL. Das Insert und der Vektor wurden zuerst mit dem entsprechenden Volumen ddH₂O versetzt und für 10 min auf 65 °C erhitzt, um eventuell gebildete Multimere aufzuschmelzen, und anschließend für 1 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µL 10x Ligasepuffer und 1 µL T4-DNA Ligase. Die Ligation fand schließlich über Nacht bei 16 °C statt. Nach Transformation von 8 µL des nicht weiter aufbereiteten Ligationsansatzes in 100 µL chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue oder DH5-α Zellen wurde die Plasmid-DNA erneut isoliert. Für eine Vorauswahl wurden die Plasmide mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease geschnitten, um die Größe der erwarteten resultierenden Fragmente mittels analytischer Agarosegelelektrophorese zu analysieren. Die Überprüfung der korrekten Konstrukte erfolgte letztlich durch DNA-Sequenzierung.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.13 Kolonie PCR

Die Kolonie PCR stellt eine schnelle und einfache Methode dar, um Ligationen oder *Gibson Assembly*[®] auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen. Ein spezifischer DNA-Bereich im Templat wird hierbei gezielt amplifiziert, der entweder nach Modifikation eine bestimmte Fragment-Größe besitzt oder erst nach Einbau des Inserts durch Ligation respektive *Gibson Assembly*[®] im Plasmid integriert ist. Die Kontrolle erfolgt schließlich über die analytische Agarosegelelektrophorese. In dieser Arbeit wurde das Solis Biotec Hot Firepol Kit mit integriertem Ladepuffer nach Herstellerangaben verwendet. Für die Kontrolle der *Gibson Assembly*[®] wurden in der Kolonie-PCR-Reaktion die Primer zur Amplifikation der Inserts eingesetzt, um dessen Integration zu überprüfen. Eine Einzelkolonie wurde mit einer Pipettenspitze gepickt und mehrfach in einen 20 µL Reaktionsansatz gedipt. Anschließend wurde mit derselben Pipettenspitze Zellmaterial auf einer Master-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen und diese zur späteren Weiterverwendung bei 37 °C kultiviert. Die initiale Denaturierung des PCR-Ansatzes wurde bei 95 °C für 12 min durchgeführt, um durch thermischen Aufschluss die Plasmid-DNA aus den *E. coli* Zellen freizusetzen und somit das Templat für die weiteren PCR-Schritte bereitzustellen.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in der Regel auf Agar-Festmedium (LB-Platten) durch Inkubation im Brutschrank bei 37 °C über Nacht. Das Wachstum in Flüssigkultur erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 mL LB-Medium bei 37 °C und 180 rpm über Nacht. Hierzu wurde eine Einzelkolonie einer Agarplatte überimpft. Zur Selektion dienten Ampicillin (Arbeitskonzentration von 150 µg mL⁻¹), Kanamycin (Arbeitskonzentration von 30 µg mL⁻¹), Chloramphenicol (Arbeitskonzentration von 30 µg mL⁻¹) oder, im Falle von mehreren co-transformierten Plasmiden, eine Kombination aus diesen. Für die Stammhaltung wurden 500 µL der Übernachtskulturen zu 500 µL sterilem 50% Glycerol gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Kultivierung und Stammhaltung von Eukaryoten

Die in dieser Arbeit eingesetzten filamentösen Pilze wurden in KGM-Medium kultiviert. Auf KGM-Festmedium wurden die fädigen Hyphen neu ausgestrichen und bei 27 °C im Brutschrank für mehrere Tage inkubiert (*Mucor hiemalis*: 3 d; *Beauveria bassiana*: 4 d; *Clitocybe nebularis*: 5 d). Die Kultivierung in Flüssigkultur erfolgte nach Animpfung von 50 mL

KGM-Medium in 250 mL Rundkolben mit Hyphen für 4 d bei 27 °C und 180 rpm. Für die Stammhaltung wurde KGM-Festmedium in 2 mL Reaktionsgefäßen mit Schraubverschluss (KGM-Stichagar) mit Hyphen überimpft, bei 27 °C für mehrere Tage im Brutschrank inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.3.3 Kultivierung und Stammhaltung von *Arthrobacter* sp.

Die Kultivierung von *Arthrobacter* sp. erfolgte in Flüssigkultur in Rundkolben in 20 mL MSB-Medium, dem 1% Glucose zugesetzt wurde, bei 30 °C und 180 rpm über Nacht. Dieses Medium konnte durch im Vorfeld durchgeführte Tests mit unterschiedlichen Minimal-Medien, wie etwa M9- oder MBR-Medium²⁶⁵, als besser geeignet in Bezug auf Wachstum identifiziert werden. Für die Stammhaltung wurden 500 µL der Übernachtskultur zu sterilen 500 µL 50% Glycerol gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.3.4 Kultivierung und Stammhaltung von *Phenylobakterium immobile* Stamm E

Die Kultivierung von *Phenylobakterium immobile* erfolgte in Flüssigkultur in Rundkolben in 20 mL Medium B, dem 0,1% Antipyrin zugesetzt wurde, bei 30 °C und 180 rpm für 4 d. Zur Analyse der Akzeptanz alternativer C-Quellen wurde eine Vorkultur mit 0,1% Antipyrin angesetzt, anschließend abzentrifugiert und in Medium B ohne C-Quelle gewaschen. Schließlich erfolgte die Kultivierung mit einer Start OD₆₀₀ von 0,07 mit 0,1% der alternativen C-Quellen bei 30 °C und 180 rpm für mehrere Tage. Für die Stammhaltung wurden 500 µL der mit Antipyrin gewachsenen Kultur zu sterilen 500 µL 50% Glycerol gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Kultivierung und Stammhaltung von *Chondromyces apiculatus* DSM436

Bei *Chondromyces apiculatus* handelt es sich um ein Myxobakterium, das sich auf Agar-Platten durch Schwarmbildung fortbewegen und unter Nährstoffmangel rötliche Fruchtkörper ausbildet. Für die Kultivierung wurden unterschiedliche Medien für Myxobakterien wie CK1-Agar, WAT-Agar, CT-Agar, CAS-Agar und VY/2-Agar getestet.²⁷⁰ Ein hinreichendes Wachstum konnte nur unter Verwendung von VY/2-Agar, der mit frischer Bäckerhefe anstelle von Hefeextrakt versetzt war, erreicht werden. Für die Kultivierung wurde ein Stück VY/2-Agar mit schwarmbildenden *C. apiculatus* über Kopf in die Mitte einer neuen Agarplatte gelegt und für 4 d bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Die Stammhaltung erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einer VY/2-Agarplatte, wobei der Organismus alle 2 – 3 Monate frisch kultiviert wurde.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Unter Verwendung der Rubidiumchlorid-Methode wurde natürlich nicht-kompetente *E. coli* chemisch kompetent gemacht. Im Zuge dieser Methode wird die Durchlässigkeit der Zellmembran und somit die Fähigkeit der *E. coli* Zellen, Fremd-DNA aufzunehmen, erhöht. Hierzu wurde 100 mL vorgewärmtes LB-Medium mit 250 µL einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stamms überimpft und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Zellkulturlösung bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 30 mL eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15% v/v Glycerin; pH 5.8 (1 M Essigsäure); sterilfiltriert durch 0,2 µm Filter) resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 90 min wurde die Zellsuspension erneut pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 4 mL eiskaltem TFB2-Puffer (75 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 15% v/v Glycerin, pH 8.0 (1 M KOH); sterilfiltriert durch 0,2 µm Filter) resuspendiert. Nach weiterer Inkubation auf Eis für 15 min wurden die Zellen zu je 50 µL aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.3.7 Hitzeschocktransformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Zu 50 µL Zellen wurde 0,75 µL Plasmid-DNA-Lösung oder 8 µL eines *Gibson Assemblys*[®] bzw. eines anderen Ligationsansatzes zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin für 90 s bei 42 °C im Thermoblock einem Hitzeschock unterzogen und danach für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL auf 37 °C vorgewärmtem LB-Medium erfolgte die Regeneration der Zellen für 60 min bei 37°C und 180 rpm im Thermomixer. Die transformierten Zellen wurden schließlich auf selektiven LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.3.8 Heterologe Proteinexpression im Schüttelkolben

Die heterologe Proteinexpression in *E. coli* erfolgte, falls nicht anders angegeben, in 400 mL TB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Aus einer 5 mL Übernachtskultur in LB Medium wurden 3 mL für die Inokulation eingesetzt und die Kultur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,5 – 1,8 bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen langsam bis zur Expressionstemperatur abgekühlt und gemäß Tabelle 3 induziert. Für die Unterstützung der heterologen P450-Expression wurde bei der Induktion 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) als Vorstufe des Häms

zugefügt, da *E. coli* natürlicherweise keine P450s besitzt und somit die Proteinbiosynthese nicht auf die Überexpression ausgelegt ist. Als weitere unterstützende Komponente für die Ausbildung aktiver Häm-Domänen wurde Eisensulfat zugegeben.

Tabelle 3: Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit in *E. coli* erfolgreich exprimierten Proteine. Eine vollständige Liste aller in dieser Arbeit exprimierten Proteine respektive Plasmide inkludierend Plasmide, die zu keiner oder nicht hinreichender Expression führten, ist im Anhang (7.6) aufgeführt.

Konstrukt	Expressionsstamm	Expressions-temperatur	Induktor
P450s			
pET-22b(+)_CYP116B3	BL21(DE3)	20°C	je 0,1 mM IPTG, 5-Ala, FeSO ₄
pET-YSBLIC_P450_RhF	BL21(DE3)	20°C	je 0,4 mM IPTG, 5-Ala, FeSO ₄
pET-28a(+)_ITB1693	Rosetta(DE3)	25°C	0,2 mM IPTG, je 0,5 mM 5-Ala, FeSO ₄
pET-28a(+)_CYP109B1	BL21(DE3)	25°C	je 0,2 mM IPTG, 5-Ala, FeSO ₄
pET-28a(+)_CYP1005C4	Rosetta(DE3)	25°C	
pCWori(+)_CYP125E3	DH5-α	20°C	je 0,5 mM IPTG, 5-Ala, FeSO ₄
pCWori(+)_CYP1232F1	DH5-α	20°C	
pBAD33_ITB1696	JW5510	25°C	
pBAD33_CYP1232A24	JW5510	20°C	
pBAD33_CYP199A25	JW5510	20°C	
pBAD33_CYP109Q5	JW5510	25°C	0,02% L-Arabinose, je 0,5 mM 5-Ala, FeSO ₄
pBAD33_CYP264A4	JW5510	30°C	
pBAD33_CYP264M1	JW5510	30°C	
pBAD33_CYP263A1	JW5510	30°C	
Weitere Proteine/ Redoxpartner			
pET-28a(+)_FldX	Rosetta(DE3)	20°C	0,5 mM IPTG, 0,5 mM FeSO ₄
pET-28a(+)_FeRed_1	Rosetta(DE3)	15°C (48h)	0,5 mM IPTG
pET-28a(+)_FlavRed	Rosetta(DE3)	15°C (48h)	
pET-28a(+)_CamB	BL21(DE3)	25°C	0,3 mM IPTG, 0,3 mM FeSO ₄
pET-28a(+)_CamA	BL21(DE3)	25°C	
pBAR1607_AdR	JM109	20°C	0,3 mM IPTG
pkkHC_AdX	JM109	20°C	
pET-16b_FdR	BL21(DE3)	20°C	0,2 mM IPTG
pET-11a_FdX	BL21(DE3)	20°C	
pBAD33_CYP199A25_PFOR	JW5510	25°C	0,02% L-Arabinose, je 0,5 mM 5-Ala, FeSO ₄

2.3 Mikrobiologische Methoden

Konstrukt	Expressionsstamm	Expressions-temperatur	Induktor
pBAD33_CYP109Q5 pBAD18_CamA+B	JW5510	25°C	
pBAD33_CYP199A25 pBAD18_CamA+B	JW5510	25°C	0,1% L-Arabinose, 0,5 mM 5-Ala, 1 mM FeSO ₄
pBAD33_CYP1232A24 pBAD18_FeRed_1+FldX	JW5510	25°C	
pCola_CYP1232F1+CamB pETDuet_CamA+B	Rosetta(DE3)	25°C	
pCola_CYP1232F1+FldX pETDuet_FeRed_1+FldX	Rosetta(DE3)	25°C	0,75 mM IPTG, 0,5 mM 5-Ala, 1 mM FeSO ₄

Die Expression erfolgte für alle Konstrukte über Nacht und wurde am Folgetag durch Zentrifugation der Zellen bei 6000 × g und bei 4 °C für 15 min beendet. Die Zellpellets wurden folglich für *in vivo* Experimente oder für den Zellaufschluss weiterverwendet. Vor der Zellyse wurden die Pellets bei -20 °C bis zur Verwendung eingefroren.

2.3.9 Heterologe Proteinexpression im Bioreaktor

Die Proteinexpression im Bioreaktor wurde in 1 L beziehungsweise 5 L Multifors Reaktoren (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit 0,8 L beziehungsweise 4 L angereichertem M9-Medium (2x M9-Bestandteile, 1% Glucose) durchgeführt. Das Plasmid pET-YSBLIC P450 RhF wurde vor jeder Kultivierung frisch in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Einzelkolonie wurde verwendet, um eine Vorkultur in 50 – 100 mL M9-Medium zu inokulieren. Nach Kultivierung über Nacht bei 37 °C und 180 rpm wurde diese für die Inokulation des Bioreaktors auf eine Start OD₆₀₀ von 0,05 eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C, 800 rpm Rührerdrehzahl und 2 vvm bis zu einer OD₆₀₀ von 6,0 – 7,0 kultiviert. Die Temperatur wurde im Anschluss auf die Expressionstemperatur von 23 °C reduziert (~ 1 h) und 1 mM MgSO₄, 0,3 mM CaCl₂ und 5 g L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ hinzugefügt. Die Expression von P450 RhF wurde schließlich bei einer OD₆₀₀ von 9,0 – 10,0 mit der Zugabe von je 0,4 mM IPTG, FeSO₄ and 5-Ala induziert. Bei der verhältnismäßig hohen OD₆₀₀ von ~ 10,0 kann mit der initial im Medium befindlichen Glucose keine hinreichende Bereitstellung der C-Quelle gewährleistet werden. Ebenso kann es bedingt durch die gemischte Säuregärung in Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen zu einer hohen Acetatbildung kommen²⁷¹. Daher wurde eine lineare Fütterungsstrategie mit Glycerol als C-Quelle gewählt, um die beschriebenen Effekte zu vermeiden. Durch die Fütterungslösung wurden über die Expressionsphase insgesamt ein äquivalent M9-Salze und 40 g L⁻¹ Glycerol zugeführt. Ein pH-Wert von 7.4 wurde während der 13 h andauernden P450 RhF Expression bei 23 °C durch automatisierte Titration von NH₄OH (25% v/v) und H₃PO₄ (10% v/v) aufrechterhalten. Antifoam 204 wurde gegen Schaumbildung im Bioreaktor nach Bedarf zugegeben. Für die spätere Auswertung der P450

Expression wurde die Biotrockenmasse (BTM) aus 2 mL Proben in Triplikaten bestimmt. Hierfür wurden die 2 mL Proben für 2 min bei $20800 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur kompletten Trocknung inkubiert. Gleichzeitig wurden in Triplikaten 8 mL Proben lysiert und die P450 RhF Konzentration in der löslichen Fraktion über CO-Spektroskopie bestimmt. Für den Vergleich unterschiedlicher Expressionen im Bioreaktor wurde die P450 Konzentration auf die Biotrockenmasse normiert.

2.3.10 Zelllyse

2.3.10.1 *E. coli*

Nach der Proteinexpression und Abzentrifugation der Zellen wurden die Zellpellets für die Zelllyse in 3 mL pro 1 g Zellen resuspendiert. Hierbei wurde je nach späterer Verwendung entweder der Reaktionspuffer (50 mM KPi pH 7.0, 150 mM NaCl, 2,5% Glycerol) für die Konzentrationsbestimmung oder *in vitro* Biotransformationen, der IMAC Aufreinigungspuffer (Reaktionspuffer mit 10% Glycerol) oder der Puffer für die Aufreinigung über IEX (50 mM KPi pH 7.5, 0,5% Glycerol oder 50 mM Tris/HCl pH 8.2 (RT), 0,5% Glycerol) verwendet. Direkt vor dem Zellaufschluss wurden 0,1 mM des Serinproteasen Inhibitors PMSF zugegeben. Der Aufschluss erfolgte schließlich durch Ultraschall (Branson Sonifier 250 ausgerüstet mit einem Mikrotip: 1/8" Durchmesser, Danbury, Connecticut, USA) auf Eis für 4 min (Puls: Output 3 – 5, Duty cycle: 35%). Für die Trennung des Lysats mit der löslichen Proteinfraction von dem die unlöslichen Zelltrümmer beinhaltenden *Debris* wurden die aufgeschlossenen Proben für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $55000 \times g$ abzentrifugiert (Beckman Avanti J-26S XP mit einem JA-25.50 Rotor, Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) und das den Überstand darstellende Lysat mit einer Porengröße von $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ filtriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lysate auf Eis gelagert.

2.3.10.2 *Arthrobacter* sp.

Für den Zellaufschluss des gram-positiven Organismus *Arthrobacter* sp. wurden verschiedene Kits zur chemischen Lyse sowie mechanische Methoden über Ultraschall, Hochdruckhomogenisation oder Glasbeads wie auch der enzymatische Aufschluss über Lysozym untersucht. Eine effektive Lyse konnte schließlich durch die Kombination unterschiedlicher Methoden realisiert werden. Nach Zentrifugation bei $6000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min wurden die Zellpellets in 3 mL Lysispuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% Triton-X, 100 mM NaCl) pro 1 g Zellen resuspendiert. Der lysozymbedingte Verdau der Zellwandproteine wurde durch die Zugabe von 1 mg mL^{-1} Lysozym gestartet. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 1 mM DTT, $20 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ DNase I sowie der Proteaseinhibitoren Pepstatin ($1 \text{ }\mu\text{M}$), AEBSF (0,1 mM) und PMSF (0,1 mM). Nach 2 h Lysozymverdau bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in Lysispuffer, um einen ersten Aufschluss und eine Schwächung der Zellwand zu erreichen,

2.4 Biochemische Methoden

wurden 5 x 5 Minuten-Zyklen im Hochdruckhomogenisator (EmulsiFlex-C5, Avestin, Ottawa, Kanada) unter maximal möglichem Druck im Bereich 1700 bar angewendet. Damit wird ein Druck ähnlich einer French Press (~2000 bar) und gleichzeitig ein höherer Durchsatz erreicht, da die Zellen die Druckkammer mehrfach während der 5-Minuten-Zyklen durchlaufen. Nachteil ist hier allerdings das relativ große benötigte Volumen, was im Vergleich zur French-Press zu einer starken Verdünnung der Probe führt. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall (Branson Sonifier 250 ausgerüstet mit einem Mikrotip: 1/8“ Durchmesser) auf Eis für 5 min (Puls: Output 5 – 6, Duty cycle: 35%) behandelt, um die verbliebene DNA, deren Vermeidung für die spätere Analyse essenziell ist, vollends durch Ultraschall zu scheren.

2.3.10.3 *Beauveria bassiana*

Für den Zellaufschluss von *B. bassiana* wurden Flüssigkulturen abzentrifugiert und die Mycellien anschließend über einem Filterpapier mit ddH₂O gewaschen und getrocknet. In einer Petrischale wurden die Proben lyophilisiert (Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz), um diese später als erster Teilaufschluss mit dem Mörser zu verreiben. Je 35 – 50 mg Pulver wurden mit einem äquivalenten Volumen Glasbeads (0,1 – 0,25 mm) und 1 mL Urea-Puffer²⁷² (25 mM Tris/HCl pH 6,8, 9 M Urea, 1% SDS, 1 mM EDTA, direkt vor Verwendung 0,7 M DTT) versetzt. Nachfolgend wurden die Proben für den Zellaufschluss für 2 min auf 95 °C erhitzt, für 1 min durch Vortexen geschüttelt und erneut für 1 min bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abtrennen der Glasbeads durch kurze Zentrifugation wurde die DNA durch Ultraschall (Branson Sonifier 250 ausgerüstet mit einem Mikrotip: 1/8“ Durchmesser, Puls: Output 2, Duty cycle: 35%) für 30 s geschert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinaufreinigung

2.4.1.1 IMAC

Für die Aufreinigung von Proteinen mit His₆-tag kann die Affinität des Polyhistidin-tags zu immobilisierten Metallionen wie z.B. Nickel oder Cobalt unter spezifischen Puffer-Bedingungen ausgenutzt werden (IMAC: *Immobilized metal ion affinity chromatography*, Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie). Diese Methode stellt ein schnelles und effektives Verfahren dar, um Proteine im Labormaßstab mit hoher Reinheit (> 90%) zu erhalten. Für die IMAC-Proteinaufreinigung wurde das Zelllysate nach der Zellyse im IMAC-Aufreinigungspuffer (50 mM KPi pH 7,0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol) durch einen 0,45 µm Filter im Kühlraum filtriert und auf eine mit acht Säulenvolumen IMAC-Aufreinigungspuffer

gewaschene His GraviTrap Talon Säule (Cobalt beladen, GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Nachdem das Lysat vollständig die Säule passiert und die His₆-tag-Proteine gebunden hatte, wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen IMAC-Aufreinigungspuffer mit 10 mM Imidazol und anschließend mit weiteren fünf Säulenvolumen IMAC-Aufreinigungspuffer mit 20 mM Imidazol gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des Zielproteins erfolgte schließlich mit acht Säulenvolumen IMAC-Aufreinigungspuffer mit 150 mM Imidazol. Die His GraviTrap Talon Säule wurde anschließend durch 15 Säulenvolumen IMAC-Aufreinigungspuffer mit 600 mM Imidazol regeneriert und in 20%-iger Ethanol-Lösung bis zur nächsten Verwendung bei 4 °C gelagert. Das eingesetzte Imidazol, welches mit dem His₆-tag um die Bindung an den Co²⁺-Ionen konkurriert und so bei steigender Konzentration zur Elution des Zielproteins führt, muss nach der Aufreinigung möglichst komplett entfernt werden, da es die Aktivität und Stabilität der Proteine beeinflussen kann.^{273,274} Deshalb wurden die Eluate (maximal 30 mL) in 5 L kaltem IMAC-Aufreinigungspuffer über Nacht dialysiert (25 oder 43 mm breite Dialyseschläuche mit 12 kDa cutoff, Sigma-Aldrich), anschließend zu 150 – 300 µL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Alle Arbeiten mit Zelllysate oder aufgereinigten Proteinen erfolgten stets auf Eis oder zusätzlich im Kühlraum, um einen möglichen Aktivitätsverlust durch die Temperatur minimal zu halten.

2.4.1.2 IEX

Proteine ohne His₆-tag wurden basierend auf ihrer Nettoladung (Ladung und Größe) mit der IEX (*Ion Exchange Chromatography*, Ionenaustauschchromatographie) über ein ÄKTApurifier 10 System mit einem Frac-950 Fraktionssammler (GE Healthcare) aufgereinigt. Je nach eingesetztem Puffersystem kann die Nettoladung des Zielproteins positiv oder negativ sein. In der IEX-Chromatographie wählt man dementsprechend eine Gelmatrix, die entweder positiv oder negativ geladene funktionale Gruppen trägt und so die entgegengesetzt-geladenen Moleküle binden kann (Anionenaustauscher oder Kationenaustauscher). Nach der Bindung wird schließlich durch Anlegen eines Salzgradienten (NaCl) langsam die Bindung des Zielproteins an die Gelmatrix reduziert, indem die Salz-Ionen mit den geladenen Gruppen des Zielproteins konkurrieren und diese verdrängen. Dies führt zur Elution in Abhängigkeit von der angelegten Salzkonzentration, der Nettoladung und der Gelmatrix. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Anionenaustauscher verwendet, d.h. der pH-Wert des Puffersystems wurde oberhalb des isoelektrischen Punkts der Zielproteine gewählt (> pH 1.5 Unterschied), sodass dieses eine negative Gesamtladung besitzt. Als Anionenaustauscher wurden folgende Chromatographie-Medien (Gelmatrix) und Säulenvolumen verwendet: Q Sepharose FF XK16/20 12 mL (GE Healthcare), Toyopearl DEAE 650M XK16/40 30 mL und Gigacap DEAE 650M XK50/20 90 mL (beide Tosoh Bioscience, Griesheim). Für die IEX-Proteinaufreinigung wurden die Zelllysate nach der Zellyse in einem der beiden IEX-Aufreinigungspuffer

2.4 Biochemische Methoden

(KPi pH 7.5, 0,5% Glycerol oder Tris/HCl pH 8.2 (RT), 0,5% Glycerol) durch einen 0,45 µm Filter im Kühlraum filtriert. Im Folgenden sind die IEX-Programme mit den verwendeten Chromatographie-Medien sowie ein Aufreinigungsbeispiel (Abbildung 12) dargestellt:

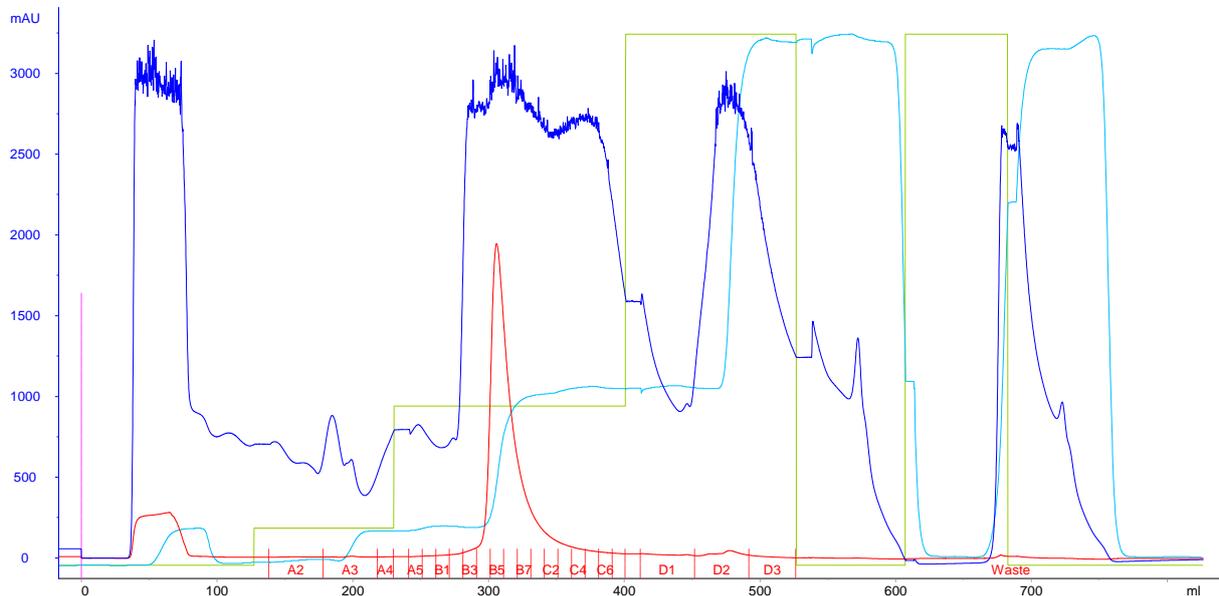


Abbildung 12: IEX-Aufreinigung von CYP109Q5. Magenta: Injektionszeitpunkt; Blau: Gesamtprotein (280 nm); Rot: P450 (420 nm) und Fraktionierung; Grün: Konzentration des Elutionspuffers mit 1 M NaCl (7, 30, 100% Stufen); Cyan: Leitfähigkeitsmessung.

IEX-Aufreinigungsmethoden

Protein	Puffer	Chromatographie-Medium	Programm	
			IEX-Aufreinigungspuffer / IEX-Aufreinigungspuffer + 1M NaCl (Elutionspuffer)	
AdR, AdX, FdR, FdX	KPi pH 7.5, 0,5% Glycerol	Toyopearl DEAE 650M (cv = 30 mL)	- Fluss Äquilibration und Elution: 4 mL min ⁻¹ , ~ 30 – 35 mL Zellysate injiziert	
			100 / 0: 3 cv Äquilibration 100 / 0: 2 cv Washout mit 2 mL/min 100 / 0 – 0 / 100: Gradient über 10 cv 0 / 100: 2 cv Reinigung 100 / 0: 2 cv Re-Äquilibration	
CamA, CamB, CYP109B1, CYP1232F1		Q Sepharose FF (cv = 12 mL)	- Fluss Äquilibration und Elution: 2,75 mL min ⁻¹ , ~ 12 – 15 mL Zellysate injiziert	
			100 / 0: 3 cv Äquilibration 100 / 0: 2 cv Washout mit 2 mL min ⁻¹ 100 / 0 – 0 / 100: Gradient über 10 cv 0 / 100: 2 cv Reinigung 100 / 0: 2 cv Re-Äquilibration	

Protein	Puffer	Chromatographie-Medium	Programm
			IEX-Aufreinigungspuffer / IEX-Aufreinigungspuffer + 1M NaCl (Elutionspuffer)
			- Fluss Äquilibration und Elution: 9 mL min ⁻¹ , ~ 35 – 40 mL Zellysate injiziert 100 / 0: 1 cv Äquilibration 100 / 0: 2 cv Washout mit 5,5 mL min ⁻¹
CYP1232A24,	Tris/HCl pH 8.2 (RT) + 0,5% Glycerol	Toyopearl Gigacap DEAE 650M (cv = 90 mL)	93 / 07: 1 cv Elution
CYP199A25,			70 / 30: 1,75 cv Elution
CYP199A25-PFOR,			0 / 100: 1,25 cv Elution
CYP109Q5,			100 / 0: 0,75 cv (CIP)
CYP125E3			0 / 100: 0,75 cv (CIP)
			100 / 0: 0,5 cv (CIP)
			100 / 0: 1 cv Re-Äquilibration

CYP109B1, FdR, CamA und CamB wurden nach der IMAC-Proteinaufreinigung durch Vivaspin20 (10 kDa cutoff, Sartorius, Goettingen) bei 4 °C umgepuffert und über IEX-Chromatographie ein zweites Mal gereinigt. Die im ÄKTA-Purifier benutzten Puffer wurden vor der Verwendung gefiltert und entgast, um Partikel sowie Gase im System zu vermeiden. Die Zellysate wurden über einen 50 mL *Loop* injiziert. Die IEX-Chromatographie wurde bei 8 °C betrieben und der Fraktionsammler auf Eis gelagert, um einen möglichen temperaturbedingten Aktivitätsverlust der vorwiegend noch nicht charakterisierten Proteine minimal zu halten. Mittels UV-Detektor wurde die Menge an Gesamtprotein bei 280 nm verfolgt während gleichzeitig die spektralen Eigenschaften der Zielproteine für die Detektion ausgenutzt wurden: P450s bei 420 nm, CamA bei 454 nm²⁷⁵, CamB bei 415 nm²⁷⁵, FdR bei 456 nm²⁷⁶, FdX bei 464 nm²⁷⁷, AdR bei 450 nm²⁷⁸ und AdX bei 414 nm²⁷⁹. Fraktionen, die das Zielprotein beinhalten (Abbildung 12), wurden schließlich vereinigt und über Vivaspin20 bei 4 °C aufkonzentriert sowie gleichzeitig auf den Reaktionspuffer mit 10% Glycerol (50 mM KPi pH 7.0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol) umgepuffert. Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend zu 150 – 300 µL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten und aufgereinigten Enzym-Lösungen wurde mittels des Pierce Micro BCA™ Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die qualitative Analyse der Proteinexpression und -aufreinigung sowie als Ausgangspunkt der Proteomanalysen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese angewendet (PerfectBlue™ Twin S System mit einem 12er-Probenkamm von Peqlab Biotechnologie GmbH). Die Trennleistung hängt hierbei von der gewählten Gelmatrix ab und wird durch ein elektrisches Feld erreicht. Die durch SDS negativ geladenen Proteine werden zunächst in einem 5%igen Sammelgel (1,4 ml dH₂O, 330 µL 30% Acrylamidlösung, 250 µl 1 M Tris-HCl pH 6.8, 20 µL 10% w/v SDS, 20 µL 10% Ammoniumperoxidsulfat, 2 µL TEMED) mit neutralem pH-Wert fokussiert, um anschließend im basischen Trenngel (a: dH₂O b: Acrylamidlösung, 1,3 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 50 µL 10% w/v SDS, 50 µL 10% Ammoniumperoxidsulfat, 2 µL TEMED) aufgrund ihrer Größe getrennt zu werden. Basierend auf dem errechneten Molekulargewicht des Zielproteins wurden 10%ige (a: 1,9 mL; b: 1,7 mL), 12%ige (a: 1,6 mL; b: 2,0 mL) oder 15%ige (a: 1,1 mL; b: 2,5 mL) Trenngele verwendet. Für die Probenvorbereitung wurden 15 µL der zu analysierenden Probe (Aufgereinigte Proteine: ~ 10 – 15 µg, Zelllysate: ~ 35 µg) mit 5 µL 6x SDS-Ladepuffer (3,5 mL 1 M Tris/HCl pH 6.8, 3 mL Glycerol, 1 g SDS, 0,93 g DTT, 1,2 mg Bromphenolblau, mit ddH₂O auf 10 mL) versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Das fertige Gel wurde mit 1x Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% w/v SDS) befüllt, der Kamm aus dem Gel entfernt und schließlich mit 20 µL der Proben pro Tasche beladen. Als Molekulargewichtsstandard dienten 7 µL des PageRuler™ prestained Protein ladder. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel durchgeführt und nachfolgend bei 25 mA fortgesetzt. Im Anschluss wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mittels Coomassie-Färbelösung (0,1% w/v Coomassie Brillantblau R-250, 10% Essigsäure, 30% Ethanol, 60% ddH₂O) über Nacht gefärbt. Am Folgetag wurde das Gel bis zum gewünschten Grad entfärbt (10% Essigsäure, 30% Ethanol, 60% ddH₂O) und zum Schluss in 100% dH₂O zur Stärkung des Kontrasts inkubiert und gelagert. Wenn nötig, wurden die SDS-Gele mittels kolloidaler Coomassie Färbung nochmals gefärbt (Färbelösung: 10% Ethanol, 5% w/v Al₂SO₄·16H₂O, 2% Phosphorsäure, 0,02% w/v Coomassie Brillantblau G-250; Entfärbelösung: 10% Ethanol, 2% Phosphorsäure), um eine noch bessere Detektion zu erzielen (Detektionsgrenze bis zu 1 ng pro Bande).²⁸⁰

2.4.4 Proteomanalyse von *Arthrobacter* sp. und *Beauveria bassiana*

Für die Kultivierung von *Arthrobacter* sp. mit alternativen C-Quellen wurde eine in Glucose gewachsene Vorkultur abzentrifugiert, in MSB-Medium ohne C-Quelle wiederaufgenommen und schließlich für die Inokulation von 200 mL MSB-Medium mit 0,1% der entsprechenden

C-Quelle verwendet (Start OD₆₀₀ von 0,1). Im Falle von α -Humulen (**3**) als C-Quelle wurde aufgrund eines nur geringen Wachstums 0,2% Glucose zusätzlich hinzugefügt, um genügend Zellmasse für die Proteomanalyse zu erhalten (OD₆₀₀: 1,1 nach 7 d). Die Kulturen mit 0,1% Bisabolen (**4**) und Premnaspirodien (**5**) erreichten nach 4 d eine OD₆₀₀ von 1,6. Alle Kulturen, inklusive einer auf Glucose gewachsenen Kultur als Referenz, wurden für 15 min bei 8000 x g und 4 °C abzentrifugiert und entsprechend 2.3.10.2 lysiert. Für ein detaillierteres Ergebnis in der Proteomanalyse wurden die aufgeschlossenen Zellen für 30 min bei 55000 x g und 4 °C pelletiert, um anschließend das Zellysate (= lösliche Proteinfraction) sowie die Zelltrümmer (*Debris*= nicht-lösliche Proteinfraction) getrennt zu analysieren. Der *Debris* wurde in einem äquivalenten Volumen zum Zellysate resuspendiert und beide Fraktionen unverdünnt auf ein 10%iges und ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, um die Zellproteine aufzutrennen und zu analysieren. Im Falle von *B. bassiana* wurde eine 3 d KGM-Vorkultur verwendet, um 100 mL KGM mit 1/75 Volumen der Vorkultur zu inokulieren. Die Biotransformationen wurden nach 24 h Inkubation mit der Addition von 0,5 g L⁻¹ der Substrate bzw. Glucose als Referenz gestartet. Nach 48 h (α -Humulen (**3**), Bisabolen (**4**), Premnaspirodien (**5**), 2-Phenoxypropionsäure (**120**)) respektive 68 h (Vinylionol (**2**), Diclofenac (**8**), Imidacloprid (**36**)) konnten Produkte nachgewiesen und die Reaktionen gestoppt werden. Die Zellen wurden daraufhin wie in 2.3.10.3 beschrieben lysiert und die Proteine der Proben unverdünnt als Ganzzellsuspension über ein 10%iges und ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel getrennt und analysiert. Die Proteomanalyse wurde an der Serviceeinheit Massenspektrometrie in Hohenheim (Gruppe Dr. Pfannstiel) durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine aus den SDS-Gelen isoliert, Trypsin-verdaut und die resultierenden Peptidfragmente über QTRAP LC-MS/MS analysiert. Die Identifizierung der Proteine erfolgte basierend auf dem Abgleich mit einer eigens erzeugten fokussierten Oxidations-Reduktions-Proteinliste von *Arthrobacter* sp. sowie durch globalen Vergleich mit der Proteindatenbank NCBI.

2.4.5 UV/Vis-Spektroskopische und Fluorometrische Methoden

2.4.5.1 Bestimmung der Konzentration von Redoxpartnern

Für die Konzentrationsmessung wurden die aufgereinigten Proteine im Wellenlängenbereich von 350 – 500 nm vermessen und die Konzentration anhand der spezifischen spektralen Eigenschaften (Absorptionsmaximum und Extinktionskoeffizient) wie folgt ermittelt:

- CamA²⁷⁵: 378, 454 und 480 nm; (ϵ) 9,7, 10,0 und 8,5 mM⁻¹ cm⁻¹
- CamB²⁷⁵: 415 und 455 nm; (ϵ) 11,1 und 10,4 mM⁻¹ cm⁻¹
- FdR²⁷⁶: 456 nm; (ϵ) 7,1 mM⁻¹ cm⁻¹
- FdX²⁷⁷: 464 nm; (ϵ) 8,42 mM⁻¹ cm⁻¹
- AdR²⁷⁸: 450 nm; (ϵ) 10,9 mM⁻¹ cm⁻¹

- AdX²⁷⁹: 414 nm; (ϵ) 11,0 mM⁻¹ cm⁻¹

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der *Arthrobacter* sp. Reduktase FeRed₁ erfolgte in der Masterarbeit von Julia Hallmen und wurde bei 454 nm auf (ϵ) 10,69 mM⁻¹ cm⁻¹ bestimmt und zur Konzentrationsmessung verwendet.²⁸¹ Das Ferredoxin FldX aus *Arthrobacter* sp. wies eine konstante Absorption im Spektrum von 300 – 600 nm ohne Maxima auf, weshalb für dieses Protein keine spezifische Konzentrationsbestimmung möglich war.

2.4.5.2 CO-Differenzspektroskopie

Die CO-Spektroskopie von Cytochrom P450 Monooxygenasen nach Omura und Sato¹³ stellt eine effektive Methode dar, um zum einen die P450-Konzentration zu bestimmen und zum anderen eine Aussage über eine korrekte Faltung des löslichen Proteins zu treffen. Hierzu wird das für P450s charakteristische Absorptionsmaximum des reduzierten CO-gebundenen Cytochroms bei etwa 450 nm (= Soret-Band) genutzt. Für die Reduktion des Eisens im Häm wurden 17,5 g L⁻¹ Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) im Reaktionspuffer (50 mM KPi pH 7,0, 150 mM NaCl, 10% Glycerol) gelöst, aufgeteilt und eine Fraktion mit CO begast. Die Probe wurde jeweils einmal mit der begasten und als Referenz einmal mit der unbegasten Na₂S₂O₄-Lösung verdünnt (je 1 mL in einer Küvette). Nach kurzer Inkubationszeit wurde schließlich ein CO-Differenzspektrum im Wellenlängenbereich 400 – 500 nm an einem Spektralphotometer (Ultraspec 3100, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgezeichnet und die P450-Konzentration anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$c(P450) = \frac{\Delta A(450 - 490) * F}{\epsilon * d}$$

c(P450):	Cytochrom P450 Konzentration [mM]
$\Delta A(450 - 490)$:	Differenz der Absorptionswerte bei 450 nm und 490 nm
F:	Verdünnungsfaktor
ϵ :	Extinktionskoeffizient [91 mM ⁻¹ cm ⁻¹]
d:	Schichtdicke der Küvette [1 cm]

Ein funktionales P450 weist diesbezüglich ein Absorptionsmaximum bei 450 nm und im Optimalfall ein Minimum bei 420 nm auf. Wird bei 420 nm ein Maximum gemessen, liegt ein Teil des P450s fehlgefaltet vor, wodurch Rückschlüsse auf die Integrität des P450 Enzyms gezogen werden können.^{14,282} Je nach Enzym und gewähltem Expressionssystem kann das lösliche P450 auch komplett im nicht-aktiven, fehlgefalteten Zustand vorliegen (Maximum bei 420 nm und keines bei 450 nm im CO-Differenzspektrum). Für die Untersuchung der Integrität von Fusionsproteinen wurde eine abgewandelte Methodik der CO-Spektroskopie angewendet. Hierbei diente der Elektronentransferpartner als Mittel zur Reduktion, um mit

Seite | 50

Hilfe des Cofaktors NADPH als Reduktionsmittel Elektronen zum Häm zu transportieren, ähnlich der normalen Reaktion.^{103,250} Für die Messung wurde die Probe mit 1 mM NADPH sowie 1 mM Substrat versetzt, die Probe aufgeteilt und eine von zwei Küvetten mit CO begast. Das aufgenommene CO-Differenzspektrum wurde mit dem chemisch reduzierten ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) verglichen, um eine Aussage über die Integrität der Elektronentransferkette treffen zu können.

2.4.5.3 Spin-state Spektren (Bindungsaffinität)

Die Bindung von Substraten an Cytochrom P450 Monooxygenasen kann mittels Typ-I-Differenzspektren untersucht werden. Wird das axial gebundene Wasser als sechster Ligand durch ein Substrat verdrängt, kann es zu einer Verschiebung des Soret-Bands von ~ 420 nm (= *Low-Spin* Zustand der oxidierten, Substrat-freien Form) auf ~ 390 nm kommen (= *High-Spin* Zustand, Typ-I-Verschiebung).^{283,284} In dieser Arbeit wurde die Bindung der charakterisierten P450s zu den identifizierten Substraten mit Hilfe dieser Methode analysiert. Hierzu wurden Spektren in Mikrotiter-Platten an einem Plattenleser (PolarStar Omega 96 well, BMG Labtech GmbH, Ortenberg) aufgezeichnet. Zu 200 μL einer 3 μM P450-Lösung in Reaktionspuffer (10% Glycerol) wurde schrittweise Substrat zugefügt (1, 5 oder 50 mM Stocklösung in DMSO) und ein Spektrum zwischen 320 – 480 nm aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 30 °C in Triplikaten, während 3 μM P450-Lösungen mit demselben Volumen an reinem DMSO versetzt als Referenz dienten, um Verdünnungseffekte auszugleichen. Eine Verschiebung der Absorption (ΔA) wurde durch Subtraktion der Probe mit Substrat von der Referenz ermittelt. Für die Determinierung der Bindungskonstanten K_d wurde schließlich die Differenz $\Delta A_{390} - \Delta A_{420}$ gegen die eingesetzte Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen und mit Hilfe des Solver-Analysetools in Excel durch eine hyperbolische Kurve anhand der folgenden Gleichung gefittet:

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max} * [S]}{K_d + [S]}$$

2.4.5.4 NAD(P)H-Assay und Bestimmung der Kopplungseffizienz

Die Reaktion der P450s kann indirekt photometrisch verfolgt werden, indem die Abnahme respektive der Verbrauch des elektronenliefernden Cofaktors NAD(P)H bei 340 nm in Abhängigkeit von der Zeit detektiert wird. Wird gleichzeitig eine Reaktion ohne Substrat durchgeführt, kann aus der Differenz der Probe mit Substrat und der Reaktion ohne Substrat (Hintergrundaktivität weiterer NAD(P)H-abhängiger Enzyme) die insgesamt verbrauchte Menge an Cofaktor mit der produzierten Produktmenge (durch anschließende GC- oder HPLC-Analytik) korreliert und die Kopplungseffizienz bestimmt werden. Bei einer 100%igen Effizienz wandern 100% der Elektronen aus dem Cofaktor in die Produktbildung, ohne dass Elektronen in Nebenreaktionen, wie z.B. die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezien, fließen. Für den NAD(P)H-Assay wurden aufgereinigte P450s und Redoxpartner im

2.5 Biotransformationen

stöchiometrischen Verhältnis 1: 1,5: 15 im Reaktionspuffer eingesetzt, bei 0,25 μM P450 und 200 μL Gesamtvolumen. Im Falle der Redoxpartner-Kombination FeRed_1 und FldX wurden standardmäßig 8 μL der aufgereinigten FldX-Lösung eingesetzt. Die Komponenten wurden zusammen mit 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Katalase vermischt und 0,5 mM Substrat (5 mM Stocklösung in DMSO) zugefügt. Nach 2 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion schließlich mit 300 μM NAD(P)H (5 mM Stocklösung in Reaktionspuffer) gestartet und die Abnahme von NAD(P)H bei einer Wellenlänge von 340 nm am Plattenleser (PolarStar Omega 96 well, BMG Labtech GmbH) verfolgt. Nachdem der Cofaktor komplett aufgebraucht war (keine weitere Abnahme), wurden die Reaktionen durch 10 μL HCl gestoppt und die Produktbildung später mittels Gaschromatographie quantifiziert. Die Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt, währenddessen Reaktionen ohne Substratzugabe als Referenz dienten und für jede 96-well Platte eine neue Kalibriergerade von NAD(P)H zur Quantifizierung der Cofaktorabnahme aufgezeichnet wurde.

2.4.5.5 7-Ethoxycoumarin-Assay

Der 7-Ethoxycoumarin-Assay basiert auf den fluoreszierenden Eigenschaften des durch eine P450-katalysierte Demethylierungsreaktion generierten 7-Hydroxycoumarin, welches bei 405 nm angeregt eine Wellenlänge von 460 nm emittiert. Dieses Hochdurchsatzscreening-Verfahren wurde bereits für die *random* Mutagenese von CYP116B3 erfolgreich eingesetzt.⁷⁵ In dieser Arbeit fand der Assay als Methode zur Determinierung der spezifischen Aktivität von CYP116B3 Varianten gegenüber 7-Ethoxycoumarin (**22**) Verwendung. Hierzu wurden 1 mM 7-Ethoxycoumarin (50 mM Stock-Lösung in DMSO) und 0,5 μM P450-Zellysate mit Reaktionspuffer in 96-well Platten vermischt (Reaktionsvolumen 200 μL). Nach 2 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion mit der Zugabe von 400 μM NADPH (10 mM Stocklösung in Reaktionspuffer) gestartet und die Bildung des Produkts 7-Hydroxycoumarin am Plattenleser verfolgt (Anregung bei 405 nm, Emission bei 460 nm, PolarStar Omega 96 well, BMG Labtech GmbH). Die Messungen wurden in Triplikaten bei 30 °C für 20 Zyklen in 90 s Intervallen durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer 7-Hydroxycoumarin-Kalibriergerade und als Kontrolle wurde Lysat einer pET-22b(+)-Leervektor Expression eingesetzt.

2.5 Biotransformationen

2.5.1 Biotransformation mit Eukaryoten

Biotransformationen mit filamentösen Pilzen stellen eine große Herausforderung dar, da diese in der Regel in Flüssigmedium Myzelien bilden, welche sich zu Klumpen zusammenlagern. Der in dieser Arbeit verwendete *B. bassiana* wurde durch UV-Strahlung

dergestalt verändert, dass ein Hefe-ähnliches Wachstum in Flüssigkultur möglich ist.²⁶⁷ Hier reichte eine einmalige Inokulation von 50 mL KGM-Medium mit einer Impfösen-Spitze an Hyphen aus, während im Falle von *Mucor hiemalis* und *Clitocybe nebularis* mehrere Inokulationen mit Hyphen nötig waren, um das klumpenartige Myzelienwachstum möglichst zu minimieren. Die Kulturen wurden für 4 d bei 27 °C und 180 rpm kultiviert und die 50 – 400 mL Hauptkulturen schließlich mit 1/75 Volumen (*B. bassiana*) oder mit über Filterpapier abfiltrierten Myzelien (*Mucor hiemalis* und *Clitocybe nebularis*) überimpft und weiter kultiviert. Nach 24 h erfolgte der Start der Biotransformation mit 1 g L⁻¹ Substrat (50 g L⁻¹ Stocklösung in DMSO) oder im Falle von Diclofenac (**8**) mit 0,6 g L⁻¹ für 72 – 144 h. In regelmäßigen Abständen wurden 500 µL Proben entnommen, abzentrifugiert und der Überstand für die Analyse mittels Gaschromatographie oder HPLC verwendet.

2.5.2 Analytische Biotransformationen *in vitro*

Die *in vitro* Reaktionen wurden, sofern nicht anders angegeben, in einem Volumen von 200 µL in Reaktionspuffer (50 mM KPi pH 7.0, 150 mM NaCl, 2,5% Glycerol) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten in 1,5 mL Reaktionsgefäßen, während Monoterpene (**84**, **86 – 94**, **99**) in 2 mL Glas-Reaktionsgefäßen getestet wurden. Zur Regenerierung des Cofaktors NAD(P)H wurde das Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-System verwendet (12 U mL⁻¹ G6PDH, 5 mM G6P, 1 mM MgCl₂). Die *in vitro* Reaktionen enthielten standardmäßig 100 µg mL⁻¹ Katalase, 2 mM NAD(P)H und 1 mM Substrat (50 mM Stocklösung in DMSO oder Ethanol). Im Falle der Steroide (**96**, **97**) und Papaverin (**35**) wurden lediglich 0,4 mM des Substrats eingesetzt. Alle Komponenten wurden vermischt und die Biotransformation mit der Zugabe eines Mix aus P450 (Lysat oder aufgereinigt), Reduktase, Flavodoxin oder Ferredoxin im stöchiometrischen Verhältnis 1:1,5:15 (2 µM: 3 µM: 30 µM) gestartet. Im Falle des FeRed₁ und FldX Redoxpartnersystems kamen 30 µL aufgereinigte FldX-Lösung zum Einsatz. Die Reaktionen wurden für 2 – 24 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert und anschließend mittels Gaschromatographie oder HPLC analysiert. Als Negativkontrollen dienten entweder durch die Expression des Leervektors generierte Lysate oder im Falle von Reaktionen mit aufgereinigten P450s alle Reaktionskomponenten außer des P450.

2.5.3 Bestimmung von kinetischen Konstanten

Michaelis-Menten-Kinetiken wurden verwendet, um kinetische Konstanten wie K_m und k_{cat} (v_{max}) zu determinieren, die charakteristisch für ein bestimmtes Enzym-Substrat-Paar sind, wobei das Verhältnis $k_{cat} K_m^{-1}$ ein Maß für die katalytische Effizienz eines Enzyms darstellt. Für die Aufnahme der Kinetik wurden unterschiedliche

Enzymkonzentrationsverhältnisse und Reaktionszeiten getestet, sodass bei der am niedrigsten eingesetzten Substratkonzentration ein maximaler Umsatz von 10% erzielt wird. Dadurch werden die Bedingungen einer Michaelis-Menten-Kinetik mit variierenden Substratkonzentrationen erfüllt (Fließgleichgewicht, *steady-state*). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 500 μL in 50 mM KPi pH 7.0 angesetzt und beinhalteten standardmäßig eine nicht-limitierende Konzentration des Cofaktors NAD(P)H von 2 mM sowie 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Katalase. Letzteres sollte die Denaturierung der Proteine durch eventuell gebildetes Wasserstoffperoxid durch *Uncoupling* ausschließen. P450, CamA und CamB wurden in einem Verhältnis von 1: 1,5: 15 eingesetzt, während das System P450, FeRed_1 und FldX zu 1: 1,5: 30 μL Verwendung fand. Die Substratkonzentrationen (1 – 1000 μM) wurden durch unterschiedliche Stocklösungen in DMSO eingestellt, damit sich in jeder Reaktion eine DMSO-Konzentration von 2% v/v befand. Zunächst wurde Puffer, Cofaktor, Katalase und Substrat in 1,5 mL Reaktionsgefäße vorgelegt und für 5 min bei 30 °C inkubiert. Für den Start der Reaktionen wurden 100 μL eines kurz vorgewärmten Enzym-Mix aus P450 und Redoxpartnern über einen Multistepper hinzugegeben und die Reaktion bei 30 °C und 750 rpm im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt. Folgende Setups wurden für die aufgenommenen Kinetiken eingesetzt:

- 0,125 μM CYP199A25 + CamA, CamB, 4-Methoxybenzoesäure (**37**): 30 min
- 0,04 μM CYP1232F1 + CamA, CamB, 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**): 30 min
- 0,03 μM CYP1232F1 + FeRed_1, FldX, 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**): 20 min
- 0,03 μM CYP1232A24 + FeRed_1, FldX, Homovanillinsäure (**40**): 20 min

Zum Abstoppen der Reaktion wurden 50 μL einer 50% HCl-Lösung zugegeben, durch Vortexen durchmischt und die Produktbildung über die Gaschromatographie quantifiziert.

2.5.4 Analytische Biotransformationen *in vivo*

Nach der Expression der natürlichen Fusionsprodukte oder der Dual-Vektor-Systeme in *E. coli* und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in 100 mM KPi pH 7.0 und 30 mM Glucose zu 0,2 g mL^{-1} resuspendiert. Die Reaktionen der ruhenden Zellen (*resting cells*) fand schließlich in verschließbaren 20 mL Glas-Reaktionsgefäßen mit einem Reaktionsvolumen von 1 mL, einer finalen Zellkonzentration von 0,1 g mL^{-1} , mit 30 mM Glucose und mit 2, 5 oder 10 mM Substrat (1 M Stocklösung in DMSO oder Ethanol) für 24 h bei 30 °C und 180 rpm statt. Im Anschluss wurden die Reaktionen in 2 mL Reaktionsgefäße überführt, abzentrifugiert und der Überstand mittels Gaschromatographie oder HPLC analysiert.

2.5.5 Präparative Biotransformationen

Für die Aufreinigung und anschließende Charakterisierung der Produkte wurden größere Mengen der Produkte durch präparative Biotransformationen generiert. Diese erfolgten ähnlich wie in 2.5.4 beschrieben. Während β -Ionon (**1**) und Diclofenac (**8**) in DMSO gelöst zu 5 mM (250 mM Stock) respektive 2 mM (100 mM Stock) eingesetzt wurden, war die Verwendung von 2% 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Lösungsmittelvermittler ein entscheidender Schritt zur Steigerung der Produktbildung mit den Sesquiterpenen Premnaspirodien (**5**) und Longifolen (**6**). Cyclodextrin fixiert die hydrophoben flüchtigen Substrate durch Komplexbildung in der Lösung und führt gleichzeitig zu einer teilweisen Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch der Substrattransport gesteigert werden kann.^{114,285,286} Hierzu erfolgte die langsame Zugabe der Substrate aus einer 250 mM Stocklösung in Ethanol zu einer 10% w/v Cyclodextrin-Lösung in ddH₂O bis zu einer 3,75 mM Substrat-Endkonzentration. Die fertige Substrat-Cyclodextrin-Lösung wurde schließlich 1/5 verdünnt für die präparative Biotransformation mit den Sesquiterpenen eingesetzt ($\hat{=}$ final 750 μ M Substratkonzentration). Die Reaktionen wurden schließlich in 250 oder 500 mL Schikanenkolben (50 oder 100 mL Reaktionsvolumen) für 24 h bei 30 °C und 180 rpm durchgeführt.

2.5.6 Biotransformation im Bioreaktor

Nach der Expression von P450 RhF im Bioreaktor wurden die Biotransformationen entweder mit wachsenden (*growing cells*) oder ruhenden Zellen (*resting cells*) in 1 L Multifors Bioreaktoren (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Für den zuletzt genannten Ansatz wurden die Zellen für 15 min bei 4000 x g und 4 °C abzentrifugiert (Avanti J-26S XP mit einem JLA-8.1000 Rotor, Beckman Coulter) und mit 100 mM KPi pH 7.5, 30 mM Glucose und 30 μ g mL⁻¹ Kanamycin auf eine Zellkonzentration von 0,05 – 0,075 g mL⁻¹ resuspendiert. Der Bioreaktor wurde bei 20 °C, 2 vvm und 400 rpm betrieben und Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten mittels HPLC gemessen. Für die Quantifizierung der Produktkonzentration wurde eine Kalibriergerade in M9-Minimalmedium (0,0078 – 2,0 g L⁻¹) mittels des in dieser Arbeit aufgereinigten Produkts 5-Hydroxydiclofenac (**9**) erstellt.

Zu Beginn wurden zunächst die Biotransformationsbedingungen getestet, um den Einfluss der Substratkonzentration und der Fütterung der C-Quelle zu untersuchen. Die Zellen einer 4 L Expression wurden als ruhende Zellen für 29 h unter vier unterschiedlichen Reaktorbedingungen getestet. Zwei Reaktoren wurden mit 0,6 g L⁻¹ Diclofenac (**8**, von einer 75 g L⁻¹ Stocklösung in DMSO) gestartet und mit weiteren 0,4 und 0,2 g L⁻¹ nach 6 und 19 h supplementiert (R1 + R2). Dagegen wurden die Biotransformationen von zwei anderen

Reaktoren mit einer größeren Konzentration von $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Diclofenac (**8**) ohne weitere Supplementierung gestartet (R3 + R4). Der Einfluss einer gleichzeitigen Glycerol-Zufütterung als C-Quelle zusätzlich zur initialen 30 mM Glucose wurde mit der Zugabe von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ an den Reaktionen R2 und R4 untersucht. Die Biotransformationen mit wachsenden Zellen wurden dagegen für 144 h in Triplikaten mit drei unterschiedlichen Zellklonen und einer gesamten Transformations-Agarplatte (Ganzzellsuspension) als Ausgangspunkt durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Diclofenac (**8**) gestartet und weitere $0,2 \text{ g L}^{-1}$ nach 23 h hinzugegeben. Eine Fütterungslösung (20x M9-Salze, 50% Glycerol) wurde über die gesamte Prozessdauer mit einer Rate von $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zugegeben. Für einen direkten Vergleich zwischen wachsenden und ruhenden Zellen wurden schließlich vier separate Expressionen durchgeführt (aus Vorkulturen zweier Zellklone), die für je zwei Biotransformationen mit wachsenden oder ruhenden Zellen zum Einsatz kamen. Die Biotransformationen wurden in der Folge mit $0,3 \text{ g L}^{-1}$ Diclofenac (**8**) gestartet sowie weitere $0,1 \text{ g L}^{-1}$ nach 8 und 23 h zugegeben.

2.6 Chemisch-analytische Methoden

2.6.1 GC-FID und GC-MS Analytik

Leicht flüchtige Moleküle respektive Moleküle, deren Flüchtigkeit durch Derivatisierung erhöht werden kann, wurden über die Gaschromatographie (GC) analysiert. Hierzu wurden die *in vitro* (200 μL) oder *in vivo* (Überstand: 750 μL) Proben mit demselben Volumen MTBE extrahiert. Im Falle einer nötigen Derivatisierung der zu analysierenden Moleküle erfolgte zunächst das Ansäuern der Proben durch 10 μL (*in vitro*) oder 35 μL HCl (*in vivo*), bevor diese mit MTBE extrahiert wurden. Die organische Phase wurde anschließend an einem Genevac EZ-2 Plus Evaporator (Genevac Ltd., Ipswich, England) verdampft und in einem Mix aus 50% MTBE und 50% BSTFA + TMCS (99:1) resuspendiert. Die Derivatisierung der Proben (*in vitro* bzw. Kinetiken: 90 μL , *in vivo*: 300 μL) erfolgte in GC-vials bei 70 °C für 30 min. Wenn eine Quantifizierung durch einen Produktstandard möglich war, wurde die Extraktion mit MTBE plus einem darin gelösten geeigneten internen Standard durchgeführt. Die GC-Analyse wurde an einem Shimadzu GC-2010, ausgestattet mit einem AOC-20i Autoinjektor (Shimadzu, Nakagyo-ku, Japan), realisiert. Die Proben wurden je nach eingesetzter oder zu erwartender Konzentration des Analyten mit unterschiedlichem Split-Verhältnis injiziert (Injektortemperatur 250 °C, Trägergas H_2 , 30 cm s^{-1}) und über eine DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) oder HP-1ms-ui Säule (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm , beide Agilent Technologies Inc.) aufgetrennt. Die Detektion der Analyten erfolgte über einen Flammenionisationsdetektor (FID, Detektortemperatur 330 °C) anhand der unten aufgeführten Programme.

Für eine erste Produktidentifizierung wurden die Proben über ein GC-MS System des Typs GC-2010, ausgestattet mit einem Shimadzu GCMS-QP2010 Detektor und einem AOC-5000 Autoinjektor (Shimadzu), sowie Helium als Trägergas (lineare Geschwindigkeit 30 cm s^{-1}) analysiert. Die Analyten wurden über eine DB-5 Säule getrennt und mit identischen Temperaturprogrammen zur GC-FID Analytik vermessen. Für die Aufnahme der Massenspektren wurde eine Ionisierung (EI, *Electron Ionization*) von 70 eV, eine Interface Temperatur von $250 \text{ }^\circ\text{C}$ und eine *Ion Source* Temperatur von $200 \text{ }^\circ\text{C}$ verwendet. Die Detektion der Massenfragmente erfolgte schließlich im Scan-Modus von 35 bis 300 m/z respektive bei den derivatisierten Proben von 40 bis 450 m/z.

2.6 Chemisch-analytische Methoden

GC-FID Programme

Substrat	Säule	Deriva- tisierung	Injektion	Temperaturprogramm
1 – 7, 22, 24, 32, 75, 77 – 83, 85, 95, 98, 121, 122	HP-1ms-ui	Nein	<i>In vitro</i> (2 µL, Split 1,5) <i>In vivo</i> (2 µL, Split 2)	130 °C, 1 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 185 °C, 2 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 220 °C 50 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
84, 86 – 94, 99	HP-1ms-ui	Nein	<i>In vitro</i> (2 µL, Split 1,5) <i>In vivo</i> (2µL, Split 2)	85 °C, 1 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 120 °C 7 °C min ⁻¹ bis 170 °C 15 °C min ⁻¹ bis 200 °C 50 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
28, 30, 34, 43, 44, 65 – 67, 123, 124, 128, 130	HP-1ms-ui	Nein	<i>In vitro</i> (2 µL, Split 1,5)	100 °C, 1 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 200 °C, 1 min halten 50 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
27, 29, 31, 33, 69, 100	HP-1ms-ui	Nein	<i>In vitro</i> (2 µL, Split 1,5)	55 °C, 2 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 150 °C, 1 min halten 50 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
129	HP-1ms-ui	Nein	<i>In vitro</i> (2 µL, Split 1,5)	160 °C, 1 min halten 11 °C min ⁻¹ bis 270 °C, 2 min halten 50 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
125, 131	HP-1ms-ui	Nein	<i>In vitro</i> (2 µL, Split 1,5)	50 °C, 2 min halten 8 °C min ⁻¹ bis 120 °C 12 °C min ⁻¹ bis 170 °C 50 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
62, 63	DB-5	Ja	<i>In vitro</i> (1 µL, Split 5)	130 °C, 1 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 250 °C, 1 min halten 65 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
13, 19, 64, 120, 132	DB-5	Ja	<i>In vitro</i> (1 µL, Split 5) <i>In vivo</i> (1 µL, Split 10)	150 °C, 1 min halten 10 °C min ⁻¹ bis 280 °C, 1 min halten 65 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
15, 45, 48, 49, 51, 57, 60, 68, 70, 116, 117, 119, 126, 127	DB-5	Ja	<i>In vitro</i> (1 µL, Split 5) <i>In vivo</i> (1 µL, Split 10)	90 °C, 1 min halten 12 °C min ⁻¹ bis 280 °C, 1 min halten 65 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten
37 – 41	DB-5	Ja	Kinetik (2 µL, Split 1,5) <i>In vitro</i> (1 µL, Split 1,5) <i>In vivo</i> (1 µL, Split 10)	180 °C, 1 min halten 14 °C min ⁻¹ bis 195 °C 7 °C min ⁻¹ bis 225 °C 65 °C min ⁻¹ bis 320 °C, 3 min halten

2.6.2 HPLC und LC-MS Analytik

Für die nur schwer verdampfenden Moleküle (**8**, **35**, **36**, **96**, **97**) kam die HPLC- und LC-MS-Analytik zum Einsatz. Die analytische Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) wurde an einem Agilent 1200 System (Agilent Technologies Inc.), ausgestattet mit einer G1311A quaternären Pumpe, einem HIP ALS G1367A Autosampler und einem G1315D DAD-Detektor, realisiert. Für die LC-MS Analytik wurde eine Agilent 1260 HPLC, ausgestattet mit einem *single quad* ESI-MS Detektor (MS-Parameter: ESI Ionisierung; scan-Modus 80 - 400 m/z; *drying gas* Temperatur 350 °C und Fluss 9.0 mL min⁻¹; *nebulizer pressure* 35 psi; *Capillary Voltage* + 3000 V; Fragmentierungsspannung 70 eV), eingesetzt. Vor der Analyse wurden die Proben, bzw. der Überstand bei *in vivo* Reaktionen, über einen 0,45 µm Membranfilter filtriert. Die Biotransformationen mit Papaverin (**35**) wurden vor der Filtration mit 50 µL Acetonitril versetzt. Im Falle der Steroide (**96**, **97**) erfolgte die Probenvorbereitung durch Extraktion mit demselben Volumen MTBE (200 µL), Evaporation der organischen Phase an einem Genevac EZ-2 Plus Evaporator (Genevec Ltd.) und Aufnahme der Rückstände in 150 µL der verwendeten mobilen Phase. Als stationäre Phasen für die chromatographische Trennung wurden eine Eclipse XDB C₁₈-Säule (150 x 4,6 mm, 5 µm) und eine Kinetex C₁₈-Säule (150 x 2,6 mm; 1,8 µm) von Phenomenex (Aschaffenburg) sowie eine Supelco C₁₈ Discovery (150 x 4,0 mm, 5 µm) von Sigma-Aldrich eingesetzt. Die angewendeten Programme und Parameter zur Detektion der Analyten sind nachfolgend aufgeführt:

HPLC und LC-MS Programme

Substrat	Säule	Mobile Phase	Programm (Zeit)	Flussrate/ Temperatur/ Injektionsvolumen	DAD Wellenlänge
HPLC					
35	Eclipse XDB C ₁₈	A: H ₂ O + 0,1% FA B: ACN	80% A, 20% B (5 min) 70% A, 30% B (9 min) 80% A, 20% B (16 min)	1 mL min ⁻¹ / 40 °C/ 1 µL	230, 252, 278, 300 nm
HPLC und LC-MS					
8, 36, 133	Kinetex C ₁₈	A: H ₂ O + 0,1% FA B: ACN	85% A, 15% B (0 min) 10% A, 90% B (13 min) 10% A, 90% B (18 min) 85% A, 15% B (18,01 min) 85% A, 15% B (30 min)	0,2 mL min ⁻¹ / 40 °C/ 1 µL	8 254, 278 nm 36 270 nm 133 254 nm
LC-MS					
96, 97	Supelco C ₁₈ Discovery	A: H ₂ O + 0,1% FA B: MeOH	Isokratisch 40% A / 60% B (20 min)	1 mL min ⁻¹ / 30 °C/ 10 µL	244 nm

ACN: Acetonitril, MeOH: Methanol, FA: Ameisensäure

2.6 Chemisch-analytische Methoden

2.6.3 Aufreinigung präparativer Biotransformationen

2.6.3.1 HPLC-SemiPrep

Die HPLC-SemiPrep stellt eine elegante und effektive Methodik dar, um Substrat-Produkt-Mischungen ohne große Verluste des Produkts bzw. der Produkte zu trennen. Mit einer geeigneten stationären und mobilen Phase können schließlich sogar Produktmischungen effektiv getrennt und simultan aufgereinigt werden. Für die Produktaufreinigung wurde der Überstand aus präparativen Biotransformationen mit dem identischen Volumen Ethylacetat oder Dichlormethan zweimal extrahiert, während im Falle der Biotransformationen mit **13**, **15** und **19** der Überstand wie bei den analytischen Reaktionen vorab mit HCl angesäuert wurde. Die organischen Phasen wurden kombiniert, am Rotationsverdampfer vollständig verdampft und der Rückstand in einem möglichst geringen Volumen Acetonitril gelöst und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Ansätze wurden schließlich mittels einer Umkehrphasen-Semi-präparativen HPLC auf einem Agilent 1200 System (Agilent Technologies Inc.), ausgestattet mit einer G1311A quaternären Pumpe, einem HIP ALS G1367B Autosampler (400 oder 1200 μL Loop), einem G1315D DAD-Detektor und einem analytischen G1364C Fraktionssammler, aufgereinigt. Das Injektionsvolumen wurde schrittweise gesteigert und die Fraktionierung dementsprechend angepasst. Die Trennung der Analyten erfolgte mit Hilfe einer Trentec Reprisil® 100-5 C₁₈-Säule (250 x 20 mm; 5 μm) von Dr. Maisch GmbH (Ammerbuch-Entringen) anhand der unten aufgeführten Programme. Ein Beispiel der Aufreinigung über HPLC-SemiPrep ist in Abbildung 13 dargestellt. Die drei hydroxylierten Produkte (**71**, **72**, **73**) konnten ausreichend getrennt und damit effektiv sowie mit hoher Reinheit fraktioniert werden. Mehrere Läufe wurden jeweils durchgeführt, die identischen Produktfraktionen vereint und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

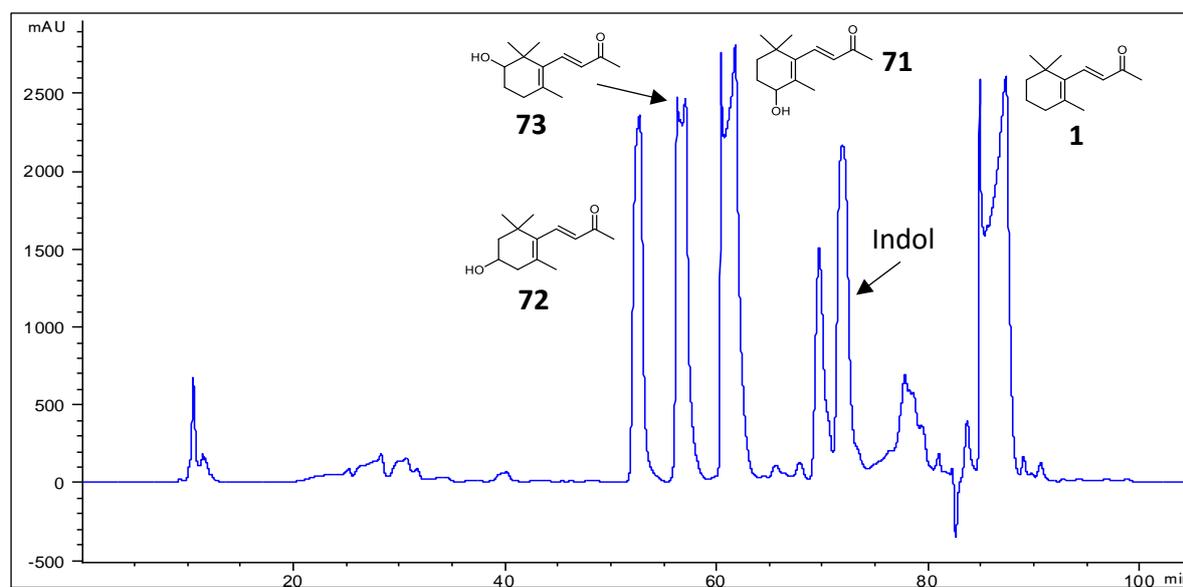


Abbildung 13: HPLC-SemiPrep-Aufreinigung der CYP109Q5 A280V/T229L präparativen Biotransformation mit β -Ionon (**1**).

HPLC-SemiPrep Programme

Substrat	Mobile Phase	Programm (Zeit)	Flussrate/ Temperatur/ Injektionsvolumen	DAD Wellenlänge	Fraktion (min)
HPLC-SemiPrep (P450 RhF)					
8	A: H ₂ O + 0,1% FA B: ACN	100% A, 0% B (0 min)	5 mL min ⁻¹ (31 – 63 min), sonst 3 mL min ⁻¹ / 20 °C/ 150 µL	272 nm	~ 28 – 30
		100% A, 0% B (30,5 min)			
		100% A, 0% B (31 min)			
		55% A, 45% B (34 min)			
		15% A, 85% B (34,01 min)			
		15% A, 85% B (50 min)			
		100% A, 0% B (50,01 min)			
100% A, 0% B (63 min)					
36	A: H ₂ O + 0,1% FA B: ACN	93% A, 7% B (0 min)	5,5 mL min ⁻¹ (61 – 81 min), sonst 4,5 mL min ⁻¹ / 20 °C/ 150 µL	270 nm	~ 65 – 67
		80% A, 20% B (57min)			
		80% A, 20% B (61min)			
		40% A, 60% B (61,01min)			
		40% A, 60% B (81 min)			
		93% A, 7% B (81,01 min)			
		93% A, 7% B (88 min)			
		93% A, 7% B (88,01 min)			
93% A, 7% B (90 min)					
HPLC-SemiPrep (Eukaryoten und CYP109Q5)					
8, 13, 15, 19	A: H ₂ O + 0,1% FA B: ACN	85% A, 15% B (0 min)	5 mL min ⁻¹ / 20 °C/ 200 – 1000 µL	8 272 nm	8^{A)}
		20% A, 80% B (63min)			
		20% A, 80% B (67min)			
		85% A, 15% B (67,01 min)			
		85% A, 15% B (83 min)			
1	A: H ₂ O + 0,1% FA B: ACN	80% A, 20% B (0 min)	4,9 mL min ⁻¹ / 20 °C/ 1000 µL	287 nm	1^{E)}
		55% A, 45% B (65 min)			
		15% A, 85% B (65,01min)			
		15% A, 85% B (90 min)			
		80% A, 20% B (90,01 min)			
80% A, 20% B (105 min)					

A) ~ 43 – 45 min (Dihydroxylierung, **12**), ~ 49 – 52 min (Monohydroxylierungen)

B) ~ 38 – 41 min (**14**)

C) ~ 26 – 28 min (Dihydroxylierung, **18**), ~ 36 – 38 min (**16**), ~ 42 – 43 min (**17**)

D) ~ 46 – 47 min (**20**), ~ 48 – 49 min (**21**)

E) ~ 52 – 53 min (**72**), ~ 56 – 57 min (**73**), ~ 61 – 62 min (**71**)

Die verbliebene wässrige Phase wurde mit dem identischen Volumen MTBE dreimal extrahiert und die organische Phasen anschließend am Rotationsverdampfer evaporiert sowie über Stickstoff getrocknet. Die Rückstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.6.3.2 Kieselgelaufreinigung (Säulenchromatographie)

Für die Kieselgelaufreinigung wurde der Überstand aus präparativen Biotransformationen mit dem identischen Volumen Ethylacetat zweimal extrahiert. Die organischen Phasen wurden kombiniert, am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand (bräunliches Öl) bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Die Rückstände wurden schließlich über 200 mL Kieselgele 60 (0,04 – 0,063 mm, Macherey-Nagel, Düren) mittels Säulenchromatographie unter der Verwendung folgender Laufmittel aufgereinigt:

- β -Ionon (**1**): 80% Cyclohexan 20% Ethylacetat (R_f -Werte: (**1**) 0,75; Indol 0,48; (**73**) 0,12; (**71**) 0,10; (**72**) 0,08); Während (**73**) rein isoliert werden konnte, wurde eine Mischung aus (**71**) und (**72**) erhalten, weshalb die Aufreinigung durch HPLC-SemiPrep wie in 2.6.3.1 beschrieben wiederholt wurde.

- Premnaspirodien (**5**): 75% Cyclohexan 25% Ethylacetat (R_f -Werte: (**5**) ~ 1,0; P1 + P2 0,81; Indol 0,5; (**113**) 0,375; P4 0,188); Alle Produkte wurden kombiniert, am Rotationsverdampfer eingengt und erneut über Säulenchromatographie aufgereinigt: 95% Cyclohexan 5% Ethylacetat (R_f -Werte: (**5**) ~ 1,0; P1 + P2 0,62; Indol 0,2; (**113**) 0,08; P4 0,03). Nachdem die Fraktionen mit P1 und P2 durchgelaufen waren, wurde der Anteil an Ethylacetat alle 100 mL in 10% Schritten bis auf 50% erhöht, um die Produkte P3 und P4 zu erhalten.

- Longifolen (**6**): 95% Cyclohexan 5% Ethylacetat (R_f -Werte: (**6**) ~ 1,0; P1 – P4 0,64 – 0,7; Indol 0,2); Alle Produkte wurden kombiniert, am Rotationsverdampfer eingengt und erneut über Säulenchromatographie aufgereinigt: 99% Cyclohexan 1% Ethylacetat (R_f -Werte: (**6**) ~ 1,0; P1 – P4 0,27 – 0,35). Nachdem die Fraktion mit dem Substrat (**6**) durchgelaufen war, wurde der Anteil an Ethylacetat alle 100 mL in 10% Schritten bis auf 50% erhöht, um die Produkte P1, P2, P3 und P4 zu erhalten.

Der Verlauf der Aufreinigungen wurde über Dünnschichtchromatographie (Alugram® Xtra Sil G/UV₂₅₄, 0,2 mm Kieselgel 60, Macherey-Nagel) mittels Anfärbung durch Anisaldehyd-Lösung (0,5 mL Anisaldehyd, 50 mL Essigsäure, 1 mL Schwefelsäure) kontrolliert. Die aufgereinigten Produktfraktionen wurden jeweils vereint, durch ein Filterpapier von restlichem Kieselgel befreit und schließlich am Rotationsverdampfer eingengt. Rückstände von organischen Lösungsmitteln wurden durch Stickstoff verdampft und die Produkte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.6.4 NMR-Spektroskopie

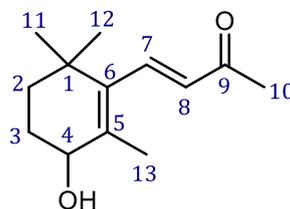
Für die Charakterisierung der aufgereinigten Produkte wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die Aufnahme von ¹H-, ¹H-COSY- (*Correlated Spectroscopy*) und ¹³C-NMR-Spektren erfolgte mittels eines Bruker Avance 500 Spektrometers bei 500.15 respektive 125.76 MHz oder eines Bruker Ascend 700™ Spektrometers bei 700.36 respektive 176.10 MHz (beide Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA). Die chemische Verschiebung δ wurde in

ppm (parts per million) gemessen und auf TMS (Tetramethylsilan) $\delta = 0$ ppm als Standard bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden 10 mg des Produkts für die NMR Analyse verwendet. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren befinden sich im Anhang (7.8).

Produkte aus Biotransformationen mit β -Ionon (1)

480 mg β -Ionon (1) wurden in 4 x 100 mL Reaktionsvolumen durch 40g_{cww} der Variante CYP109Q5 A280V/T229L *in vivo* für 24 h umgesetzt, wodurch nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung insgesamt 220 mg der Produkte isoliert werden konnten (Isolierte Ausbeute 42,3%).

- 4-Hydroxy- β -ionon (71) wurde als dunkelbraunes Öl erhalten; ~ 91% Reinheit (GC); 208 m/z (GC-MS).

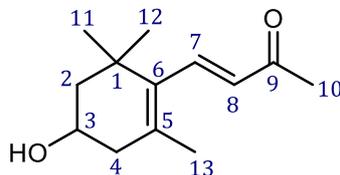


^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.06 (s, 3H, C-11), 1.07 (s, 3H, C-12), 1.43 – 1.49 (m, 1H, C-2), 1.63 – 1.70 (m, 1H, C-2), 1.70 – 1.74 (m, 1H, C-3), 1.85 (s, 3H, C-13), 1.90 – 1.98 (m, 1H, C-3), 2.32 (s, 3H, C-10), 4.04 (t, 1H, $J = 4.9$ Hz, C-4), 6.13 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, C-8), 7.2 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, C-7).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 18.5 (C13), 27.3 (C10), 27.5 (C11), 28.2 (C3), 28.8 (C12), 34.6 (C1 und C2), 70.0 (C4), 133.1 (C7), 133.8 (C5), 139.6 (C6), 143.0 (C8), 199.0 (C9).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁷

- 3-Hydroxy- β -ionon (72) wurde als bräunliches Öl erhalten; ~ 90% Reinheit (GC); 208 m/z (GC-MS).

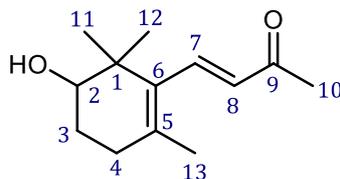


^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.11 (s, 3H, C-11), 1.12 (s, 3H, C-12), 1.5 (t, 1H, $J = 3.5$ Hz, C-2), 1.77 (s, 3H, C-13), 1.80 – 1.84 (m, 1H, C-2), 2.06 – 2.11 (m, 1H, C-4), 2.30 (s, 3H, C-10), 2.41 – 2.47 (m, 1H, C-4), 3.98 - 4.04 (m, 1H, C-3), 6.12 (br d, 1H, $J = 16.2$ Hz, C-8), 7.21 (br d, 1H, $J = 16.4$ Hz, C-7).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 21.6 (C13), 27.3 (C10), 28.6 (C12), 30.0 (C11), 36.9 (C1), 42.7 (C2), 48.3 (C4), 64.6 (C3), 132.4 (C7), 132.7 (C5), 135.6 (C6), 142.5 (C8), 198.7 (C9).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.⁶⁵

- 2-Hydroxy- β -ionon (**73**) wurde als orangefarbenes Öl erhalten; ~ 96% Reinheit (GC); 208 m/z (GC-MS).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.08 (s, 3H, C-11), 1.12 (s, 3H, C-12), 1.75 (s, 3H, C-13), 1.71 – 1.79 (m, 1H, C-3), 1.82 – 1.88 (m, 1H, C-3), 2.12 – 2.24 (m, 2H, C-4), 2.30 (s, 3H, C-10), 3.56 (dd, 1H, $J = 9.1, 3.1$ Hz, C-2), 6.11 (br d, 1H, $J = 16.6$ Hz, C-8), 7.21 (br d, 1H, $J = 16.2$ Hz, C-7).

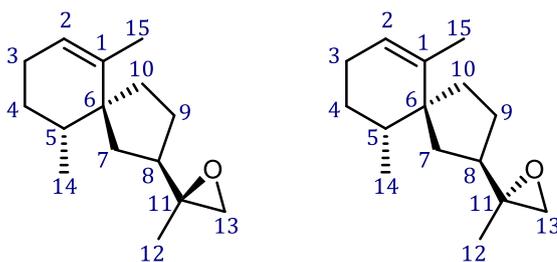
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 21.4 (C13), 22.1 (C10), 26.1 (C12), 26.7 (C11), 27.3 (C1), 30.5 (C4), 39.0 (C3), 75.4 (C2), 132.5 (C7), 134.2 (C5), 134.3 (C6), 142.9 (C8), 198.7 (C9).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁶⁷

Produkte aus Biotransformationen mit Premnaspirodien (**5**)

184 mg Premnaspirodien (**5**) wurden in 12 x 100 mL Reaktionsvolumen durch 120g_{cww} der Variante CYP109Q5 V80A/A280I *in vivo* für 24 h umgesetzt, wodurch nach zweifacher Kieselgelaufreinigung insgesamt 37 mg der Produkte isoliert werden konnten (Isolierte Ausbeute 18,6%).

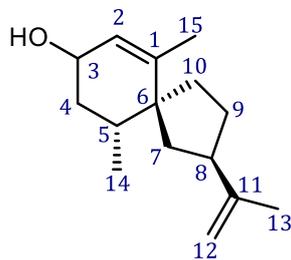
- P1 + P2, Premnaspirodien-11,12-epoxide (**110** und **111**) wurden als gelbes Öl erhalten; > 95% Reinheit (GC); Verhältnis P1 zu P2 45%: 55%; 220 m/z (GC-MS).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.87 (d, 3H, $J = 7$ Hz, C-14), 1.2 (s, 3H, C-12), 1.38 – 1.51 (m, 4H), 1.53 – 1.62 (m, 2H), 1.63 – 1.64 (m, 1H), 1.65 (s, 3H, C-15), 1.69 – 1.79 (m, 1H), 1.81 – 1.89 (m, 1H), 1.96 – 2.03 (m, 2H), 2.06 – 2.10 (m, 1H), 2.53 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, C-13), 2.63 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, C-13), 5.29 (s, 1H, C-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 20.1, 20.5, 26.9, 29.1, 30.2, 31.4, 33.3, 34.6, 34.9, 36.7, 39.9, 43.9, 52.6, 121.4, 138.6.

- P3, Solavetivol (**112**) wurde als grünes Öl erhalten; 60% Reinheit (GC), Verunreinigungen durch Nebenprodukte aus der Substratsynthese (17% β -Elemene + 13% (+)-Aromadendren (**79**)); 220 m/z (GC-MS); Nebenprodukte 204 m/z (GC-MS).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.00 (d, 3H, $J = 6.95$ Hz, C-14), 1.33 (s, 1H, C-10), 1.33 – 1.36 (m, 1H, C-5), 1.57 – 1.58 (m, 1H, C-7), 1.58 – 1.60 (m, 1H, C-9), 1.71– 1.72 (m, 2H, C-4 und C-10), 1.73 (s, 3H, C-15), 1.74 (s, 3H, C-13), 1.76 – 1.77 (m, 1H, C-7), 1.82 – 1.85 (m, 1H, C-9), 1.85 – 1.87 (m, 1H, C-4), 2.46 – 2.52 (m, 1H, C-8), 4.16 – 4.22 (m, 1H, C-3), 4.69 (s, 1H, C-12), 4.71 (s, 1H, C-12), 5.33 (t, 1H, $J = 1.2$ Hz, C-2).

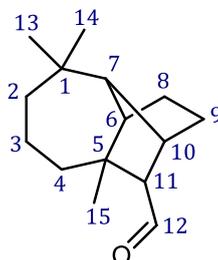
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 16.4, 19.5, 20.3, 31.9, 32.2, 36.9, 37.0, 39.8, 46.8, 48.0, 66.2, 107.3, 123.9, 143.7, 147.2.

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁷⁵

Produkte aus Biotransformationen mit Longifolen (**6**)

184 mg Longifolen (**6**) wurden in 12 x 100 mL Reaktionsvolumen durch 120g_{cww} der Variante CYP109Q5 V80A/A280I *in vivo* für 24 h umgesetzt, wodurch nach zweifacher Kieselgelaufreinigung insgesamt 43 mg der Produkte P1 – P4 isoliert werden konnten (Isolierte Ausbeute 21,7%).

- P1 + P2 + P3 + P4 wurden als gelbes Öl erhalten; 90% Reinheit (GC); Verhältnis P1 zu P3 zu P4 16%: 24%: 60%; mit Longifolenaldehyd (**134**) als Hauptprodukt; 220 m/z (GC-MS).



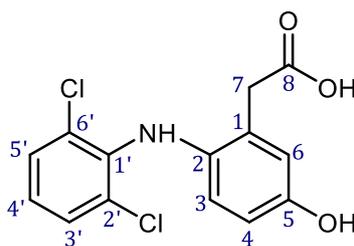
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.95 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.41 – 1.43 (m, 2H), 1.46 – 1.48 (m, 2H), 1.69 – 1.72 (m, 2H), 1.93 – 1.99 (m, 2H), 2.06 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz), 2.15 – 2.20 (m, 1H), 2.43 (t, 1H, $J = 4.3$ Hz), 2.63 – 2.66 (m, 1H, H-1), 9.87 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, C-12).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 206.0 (C12).

Produkte aus Biotransformationen mit Diclofenac (8)

4 L Fermentationslösung aus den P450 RhF Experimenten wurden auf 400 mL konzentriert und mit 2 x 400 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden kombiniert, am Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand in 10 mL Acetonitril aufgenommen und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die HPLC-SemiPrep-Aufreinigung wurde nach Erreichen von etwa 300 mg 5-Hydroxydiclofenac (**9**) gestoppt.

- 5-Hydroxydiclofenac (**9**) wurde als orangener Feststoff erhalten; > 95% Reinheit (HPLC); 312 m/z (LC-MS).

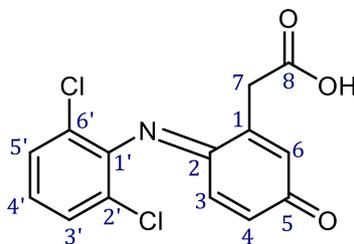


¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 3.71 (s, 2H; C-7), 6.37 (d, J = 8.8 Hz, 1H; C-3), 6.55 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H; C-4), 6.72 (d, J = 2.5 Hz, 1H; C-6), 6.96 (t, J = 7.8 Hz, 1H; C-4'), 7.34 (d, J = 7.8 Hz 2H; C-3' und 5').

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 39.2 (C7), 115.3 (ArCH-4), 118.3 (ArCH-6), 121.9 (ArCH-3), 124.1 (ArCH-4'), 129.2 (ArC-2), 129.3 (ArC-1'), 130.1 (2ArCH-3' und 5'), 136.4 (ArC-1), 140.5 (2CCl), 154.1 (C-OH), 175.8 (COOH).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁸⁸

- 5-Hydroxyquinonimin (**10**) wurde als bräunlicher Feststoff erhalten; > 95% Reinheit (HPLC); die Oxidation von 5-Hydroxydiclofenac (**9**) zum Quinonimin wurde durch eine von der Literatur abgewandelte Synthese mittels Silber(I)-nitrat anstatt Silber(I)-oxid erreicht¹⁵⁴ (durchgeführt von Dr. Bernd Nebel, ITB); 310 m/z (LC-MS). 100 mg 5-Hydroxydiclofenac (**9**) wurden durch das Silber(I)-nitrat vollständig zum 5-Hydroxyquinonimin (**10**) katalysiert.

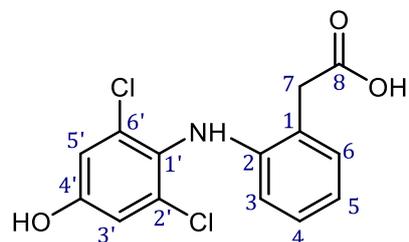


¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) 3.69 (s, 2H; C-7), 6.59 (dd, J = 10.1, 2.5 Hz, 1H; C-4), 6.74 (d, J = 10.1 Hz, 1H; C-3), 6.80 (d, J = 2.5 Hz, 1H; C-6), 7.25 (t, J = 8.2 Hz, 1H; C-4'), 7.58 (d, J = 7.6 Hz, 2H; C-3' und 5').

^{13}C -NMR (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ (ppm) 36.3 (C7), 123.1 (ArC), 126.6 (ArC), 128.6 (ArC), 129.1 (ArC), 133.1 (ArC), 133.5 (ArC), 143.4 (ArC-1'), 145.1 (ArC-1), 160.4 (ArC-2), 170.6 (COOH), 186.9 (C=O).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁸

- 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) wurde als weißer Feststoff (Kristalle) erhalten. 480 mg Diclofenac (**8**) wurden in 2 x 400 mL Reaktionsvolumen durch *Mucor hiemalis* für 144 h umgesetzt, wodurch nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung insgesamt 312 mg 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) isoliert werden konnten. Isolierte Ausbeute 61,7%; > 95% Reinheit (HPLC); 312 m/z (LC-MS).



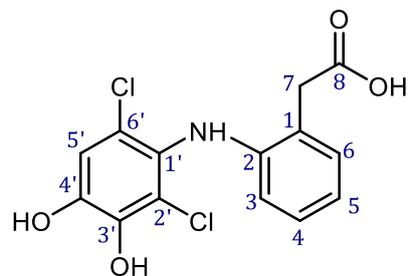
^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 3.7 (s, 2H, C-7), 6.26 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, C-3), 6.8 (t, 1H, $J = 7.4$, C-5), 6.88 (s, 2H, C-3' und C-5'), 7.02 (t, 1H, $J = 7.5$, C-4), 7.17 (d, 1H, $J = 7.4$, C-6).

^1H -COSY (500 MHz, CD_3OD): (7.17) δ (ppm) 3.7, 6.8, (7.02) δ (ppm) 6.26, 6.8.

^{13}C -NMR (126 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 39.2 (C7'), 116.4 (ArC), 116.9 (2ArC), 121.3 (ArC), 124.2 (ArC), 128.9 (ArC), 130.5 (ArC), 131.9 (2ArC), 133.7 (ArC), 145.5 (ArC), 156.3 (ArC-4'), 175.9 (COOH).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁸

- 3',4'-Dihydroxydiclofenac (**12**) wurde als orange bis rötlicher Feststoff erhalten. 480 mg Diclofenac (**8**) wurden in 2 x 400 mL Reaktionsvolumen durch *Beauveria bassiana* für 144 h umgesetzt, wodurch nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung insgesamt 252 mg 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) und 28 mg 3',4'-Dihydroxydiclofenac (**12**) isoliert werden konnten. Isolierte Ausbeute 55,1%; > 95% Reinheit (HPLC); 328 m/z (LC-MS).

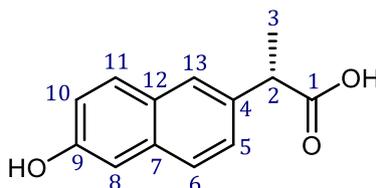


^1H NMR (700 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 3.72 (s, 2H, C-7), 6.29 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, C-3), 6.80 (t, 1H, $J = 7.6$, C-5), 6.86 (s, 1H, C-5'), 7.02 (t, 1H, $J = 7.9$ Hz, C-4), 7.17 (d, 1H, 3.5 Hz, C-6).

Produkte aus Biotransformationen mit Naproxen (13)

100 mg Naproxen (**13**) wurden in 2 x 50 mL Reaktionsvolumen durch *Mucor hiemalis* für 72 h umgesetzt, wodurch nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung insgesamt 98 mg 6-*o*-Desmethylnaproxen (**14**) isoliert werden konnten (Isolierte Ausbeute: > 99%).

- 6-*o*-Desmethylnaproxen (**14**) wurde als gelblicher Feststoff erhalten; > 95% Reinheit (GC); 216 m/z (GC-MS, Silylierung subtrahiert).



¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1.50 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz, C-3), 3.81 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, C-2), 7.03 - 7.09 (m, 2H, C-8 und C-10) 7.35 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, C-11), 7.59 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, C-13), 7.64 (s, 1H, C-5), 7.67 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, C-6).

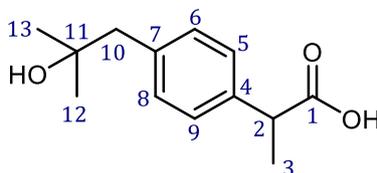
¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 15.4 (C7), 113.2 (ArC), 114.5 (ArC), 117.9 (ArC), 127.3 (ArC), 127.5 (ArC), 128.7 (ArC), 133.3 (ArC), 134.9 (ArC), 135.1 (ArC), 135.2 (ArC), 141.6 (ArC), 150.2 (ArC), 172.1 (COOH).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²³¹

Produkte aus Biotransformationen mit Ibuprofen (15)

150 mg Ibuprofen (**15**) wurden in 3 x 50 mL Reaktionsvolumen durch *Mucor hiemalis* für 72 h umgesetzt, wodurch nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung insgesamt 149 mg der Produkte isoliert werden konnten (Isolierte Ausbeute: 92,2%).

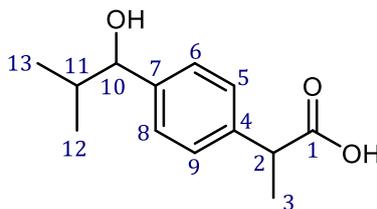
- 2-Hydroxyibuprofen (**16**) wurde als weiß-gelblicher Feststoff erhalten; 77% Reinheit (GC); 222 m/z (GC-MS, Silylierung subtrahiert).



¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1.16 (s, 6H, C-12 und C-13), 1.43 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz, C-3), 2.72 (s, 2H, C-10), 3.68 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, C-2), 7.18 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, C-5 und C-9), 7.22 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, C-6 und C-8).

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 19.1 (C3), 29.2 (C12 und C13), 46.4 (C2), 50.3 (C10), 71.8 (C11), 128.0 (2x ArC), 131.9 (2x ArC), 138.5 und 140.3 (C4 und C7), 178.6 (COOH).

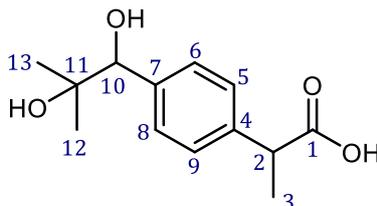
- 1-Hydroxyibuprofen (**17**) wurde als bräunlicher Feststoff erhalten; 83% Reinheit (GC); Einwaage für NMR-Messung: 2,8 mg; 222 m/z (GC-MS, Silylierung subtrahiert).



¹H-NMR (700 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) 0.73 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, C-12) 0.85 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, C-13), 1.32 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz, C-3), 1.77 (oct, 1H, $J = 16.4$ Hz, C-11), 3.58 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, C-2), 4.19 (d, 1H, $J = 6.2$, C-10), 7.19 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, C-5 und C-9), 7.21 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, C-6 und C-8).

¹³C-NMR (176 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) 17.4 (C3), 18.2 und 18.5 (C12 und C13), 34.3 (C11), 44.4 (C2), 76.8 (C10), 125.9 und 126.1 (4x ArC), 139.6 und 142.6 (C4 und C7), 175.3 (COOH).

- 1,2-Dihydroxyibuprofen (**18**) wurde als weiß-gelblicher Feststoff erhalten; > 65% Reinheit (GC); Produkt möglicherweise instabil; 238 m/z (GC-MS, Silylierung subtrahiert).



¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 1.12 (s, 6H, C-12 und C-13), 1.43 (d, 3H, $J = 3.4$ Hz, C-3), 3.69 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz, C-2), 4.43 (s, 1H, C-10), 7.26 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, C-5 und C-9), 7.34 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, C-6 und C-8).

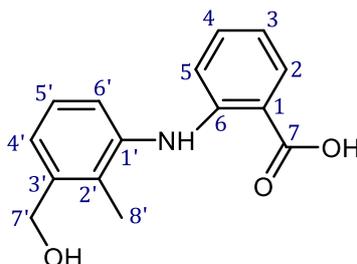
¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 19.1 (C3), 25.3 und 26.0 (C12 und C13), 46.7 (C2), 74.0 (C11), 81.6 (C10), 127.8 (2x ArC), 129.2 (2x ArC), 141.7 und 141.8 (C4 und C7). Die COOH-Gruppe ist aufgrund einer zu geringen Einwaage kaum sichtbar.

Die gemessenen NMR-Daten der Ibuprofen-Produkte stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁹

Produkte aus Biotransformationen mit Mefenaminsäure (19)

100 mg Mefenaminsäure (19) wurden in 2 x 50 mL Reaktionsvolumen durch *Beauveria bassiana* für 72 h umgesetzt, wodurch nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung insgesamt 52 mg der Produkte isoliert werden konnten (Isolierte Ausbeute: 48%).

- 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (20) wurde als orange-brauner Feststoff erhalten; > 95% Reinheit (GC); 257 m/z (GC-MS, Silylierung subtrahiert).

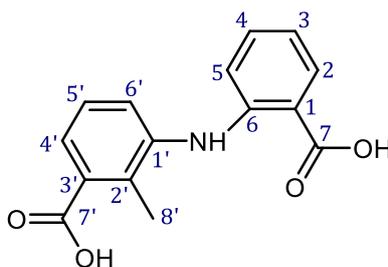


¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) 2.11 (s, 3H, C-8'), 4.53 (s, 2H, C-7'), 6.68 – 6.73 (m, 2H, C-2 und C-4), 7.18 – 7.25 (m, 3H, C-4', 5' und 6'), 7.31 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, C-3), 7.89 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, C-5).

¹³C-NMR (126 MHz, (CD₃)₂SO): δ (ppm) 12.4 (C8'), 61.3 (C7'), 111.6 (ArC), 112.9 (ArC), 116.3 (2ArC-3 und 4'), 122.6 (ArC), 123.5 (ArC), 125.9 (ArC), 129.9 (ArC), 131.6 (ArC), 134.0 (ArC), 138.2 (ArC), 141.8 (ArC), 170.0 (COOH).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁸⁸

- 3'-Carboxymefenaminsäure (21) wurde als bräunlicher Feststoff erhalten; > 95% Reinheit (GC); 271 m/z (GC-MS, Silylierung subtrahiert).



¹H-NMR (500 MHz, (CD₃OD): δ (ppm) 2.43 (s, 3H, C-8'), 6.71 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, C-4), 6.75 (d, 1H, $J = 4.3$ Hz, C-2), 7.28 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz, C-3, und C-5'), 7.46 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, C-4'), 7.62 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, C-6'), 7.98 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, C-5).

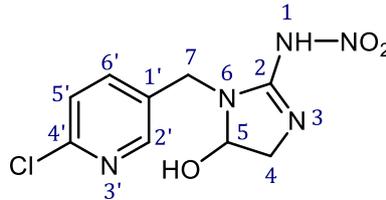
¹³C-NMR (126 MHz, (CD₃OD): δ (ppm) 15.4 (C8'), 113.2 (ArC), 114.5 (ArC), 117.9 (ArC), 127.3 (ArC), 127.5 (ArC), 128.7 (ArC), 133.3 (ArC), 134.9 (ArC), 135.1 (ArC), 135.2 (ArC), 141.6 (ArC), 150.2 (ArC), 172.1 (2 x COOH).

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁹⁰

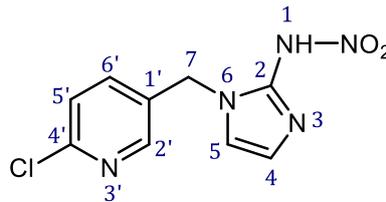
Produkte aus Biotransformationen mit Imidacloprid (36)

1 g Imidacloprid (**36**) wurde in einer 4 L Kultivierung und Biotransformation im Bioreaktor mit P450 RhF eingesetzt und nach Aufarbeitung und HPLC-SemiPrep-Aufreinigung 30 mg des Produkts 5-Hydroxyimidacloprid (**101**) erhalten (Isolierte Ausbeute: 3%).

- 5-Hydroxyimidacloprid (**101**) wurde als weißer Feststoff erhalten; > 95% Reinheit (HPLC); Verhältnis **101** zu Olefin (**102**) 80% zu 20%; 272 m/z (LC-MS); (**102**) 253 m/z (LC-MS).



¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 3.54 (dd, 1H, $J = 12.2, 1.3$ Hz, C-4), 3.9 (dd, 1H, $J = 12.2, 3.8$ Hz, C-4), 4.5 (m, 1H, C-7), 4.7 (m, 1H, C-7), 5.31 (dd, 1H, $J = 7.6, 1.1$ Hz, C-5), 7.44 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, C-5') 7.87 (dd, 1H, $J = 8.1, 1.0$ Hz, C-6'), 8.39 (s, 1H, C-2').



- Olefin (**102**)

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 5.19 (s, 2H, C-7), 7.05 (s, 1H, C-4), 7.23 (s, 1H, C-5), 7.45 – 7.47 (m, 1H, C-5') 7.80 – 7.85 (m, 1H, C-6'), 8.42 (s, 1H, C-2').

Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁹¹

2.7 Bioinformatische Methoden

2.7.1 Identifikation der NSAIDs hydroxylierenden Eukaryoten

Die Identifikation der beiden Eukaryoten erfolgte mittels der Biomarker LSU (28S *nuclear ribosomal large subunit rRNA gene*) sowie ITS (*internal transcribed spacer*), die in Kombination eine hohe Wahrscheinlichkeit für die zuverlässige Annotation der Spezies erlauben.²⁹² Hierzu wurden die Biomarker-Regionen von der isolierten genomischen DNA (2.2.3) mit Hilfe der Primer-Paare (LSU: LR0R-LR5, ITS: ITS4-ITS5, Anhang 7.5) wie in 2.2.8 beschrieben durch PCR amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte über ein Agarosegel wurden die Fragmente sequenziert und schließlich das *Pairwise sequence alignment Tool* (<http://www.fungalbarcoding.org>) sowie der globale NCBI-Blast zur Identifikation der Eukaryoten verwendet.

2.7.2 Genomanalyse von *Arthrobacter* sp.

Die globale Annotierung des Genoms durch LGC Genomics® (Berlin) wurde hinsichtlich Redoxproteinen durchsucht, die entsprechenden ORFs (*Open reading frames*) in der Software Snapgene visualisiert und durch globalen NCBI-Blast weiterführend annotiert. Eine Proteinliste aus interessanten Reduktasen, Flavodoxinen, Ferredoxinen und Oxygenasen wurde erstellt, um die gezielte Suche mittels Proteomanalyse zu ermöglichen (2.4.4).

2.7.3 Untersuchung der Verwandtschaft sowie Annotierung von P450s

Die Verwandtschaftsanalyse der P450s erfolgte mittels globalem NCBI-Blast sowie durch Prof. David Nelson's P450 blast server (<http://blast.uthsc.edu>). Die endgültige Annotierung bisher noch nicht beschriebener P450s wurde dankend durch Prof. David Nelson (*Health Science Center, Universität Tennessee*) durchgeführt.

2.7.4 Homologiemodellierung, *Docking*, Rationales Proteindesign

Die Homologiemodellierung erfolgte mit Hilfe einer P450-3DM-Datenbank, die vom Kooperationspartner Bio-Product (Nijmegen, Netherlands) generiert und zur Verfügung gestellt wurde. Die 3DM-Technologie basiert darauf, die Daten von Superfamilien zu sammeln, zu integrieren und zu kombinieren, synchronisiert durch Alignments mit einer einheitlichen 3D-Nummerierung. Diese repräsentiert die strukturell-konservierten Regionen (*core*) in einer Superfamilie und steht für eine Aminosäure, die sich in unterschiedlichen Proteinen der Superfamilie an derselben Position im dreidimensionalen Raum befindet. Dadurch ist es möglich, unterschiedliche Proteine in ihrer Kernstruktur in vergleichender Weise zu analysieren. Daten von Proteinen, die über die 3D-Nummer verknüpft sind, stellen neben Sequenz (> 39000)- und Struktur (> 1150)-Informationen Protein-Ligand-Interaktionen, Mutationen und deren Auswirkung (> 29000, Literatur-basiert) sowie viele weitere Protein-relevante Informationen dar. Mit Hilfe der P450-3DM-Datenbank wurden die Homologiemodelle basierend auf dem bestem Templat (Auflösung und Sequenzidentität) erstellt und über die Software YASARA visualisiert. Durch die Verknüpfung der 3D-Nummerierung der Aminosäuren mit der Datenbank, war es möglich, die darin enthaltenen Informationen für das rationale Proteindesign zu verwenden. Mit Hilfe von YASARA konnte ferner durch Energieminimierung die geringste Potenzialenergie eines Proteins, beispielsweise nach *in silico*-Mutagenese, gefunden werden. Dies entspricht dem wahrscheinlichsten Zustand eines Proteins. Das *Docking* von Substraten in die aktive Tasche der P450s erfolgte schließlich mittels des in YASARA implementierten AutoDock Vina.

3. Ergebnisse

3.1 Selektive Hydroxylierung von Diclofenac (**8**) durch P450 RhF

P450-basierte Prozesse sind noch wenig in der industriellen Anwendung etabliert, was sich vor allem mit den Besonderheiten eines Mehrkomponentensystems erklären lässt. Die Aktivität und vor allem die Stabilität des Biokatalysators in Kombination mit den elektronenliefernden Komponenten muss gewährleistet sein. Faktoren wie Entkopplungsreaktionen mit der Generierung von Wasserstoffperoxid, Cofaktorabhängigkeit, Stabilität des gesamten Ganzzellsystems in Verbindung mit zumeist toxischen Stoffen, den Biokatalysator betreffende Parameter sowie der Prozess selbst müssen für eine großtechnische Anwendung schrittweise verbessert werden.¹²⁴ P450-basierte Prozesse sind neben der Anwendung in der Duft- und Aromastoffindustrie auch in der pharmazeutischen Industrie potenziell interessant. Hier können P450s entweder als wertvoller Baustein zur Synthese von neuen Medikamenten eingesetzt werden oder zur Herstellung relevanter Medikamentenmetaboliten für Toxikologiestudien. In letzterem Punkt sind vor allem nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAIDs) wie Diclofenac (**8**) in den Fokus der Forschung gerückt.^{293,294}

In Zusammenarbeit mit der Universität Manchester wurde deshalb mit P450 RhF, CYP116B2 aus *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, ein potenzielles Enzym für eine biotechnologische Anwendung ausgewählt, das selektiv Diclofenac (**8**) zu 5-Hydroxydiclofenac (**9**) umsetzen kann. Ziel war es, das natürliche Fusionsprotein P450 RhF weiter zu charakterisieren und gleichzeitig den Prozess zu verbessern. P450 RhF wurde anfänglich wie in 2.3.8 beschrieben heterolog in *E. coli* BL21(DE3) im Schüttelkolben exprimiert. In ersten *in vivo* Biotransformationen konnten bis zu 70% Diclofenac (**8**, 2 mM eingesetzt) umgesetzt werden. Neben der Hydroxylierung zum Produkt 5-Hydroxydiclofenac (**9**) wurde eine geringe Menge eines Nebenprodukts detektiert (Abbildung 14). Die Aufklärung, worum es sich bei dem Nebenprodukt handelt, sollte nach präparativen Biotransformationen anhand einer ausreichenden Menge des Produkts erfolgen.

3.1 Selektive Hydroxylierung von Diclofenac (8) durch P450 RhF

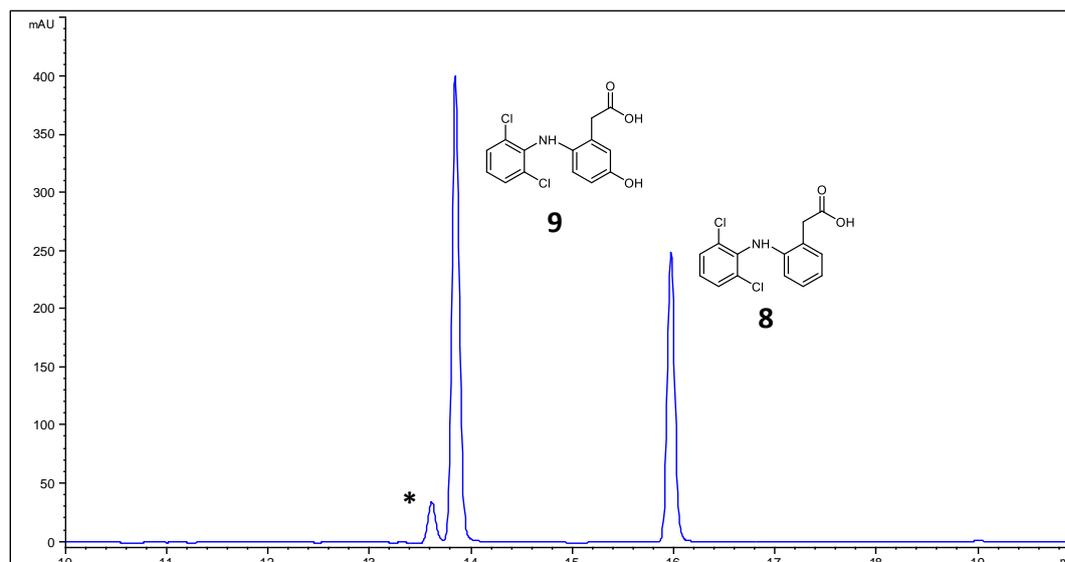


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm der *in vivo* Biotransformation von Diclofenac (**8**) mit P450 RhF im analytischen Maßstab (1 mL). Die Biotransformation erfolgte mit ruhenden Zellen für 24 h. Eingesetzt wurden 2 mM des Substrats bei einer Zellkonzentration von 0,1 g mL⁻¹ in KPi Puffer pH 7,5, 30 µg mL⁻¹ Kanamycin und 30 mM Glucose. Neben dem Hauptprodukt 5-Hydroxydiclofenac (**9**) wurde ein Nebenprodukt (*) detektiert.

Die Ausbeuten der analytischen Biotransformationen sollten schließlich im Bioreaktor nachgestellt und gleichzeitig das System analysiert werden, um dem Ziel eines effizienten Ganzzellkatalysators im großtechnischen Maßstab näherzukommen. Die Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Ganzzellsystems im Bioreaktor wurde hierzu in zwei Abschnitte unterteilt, die Expressions- und Biotransformationsphase. Schrittweise wurde zunächst durch Variation der Expressionstemperatur (20 °C oder 25 °C) und des Zeitpunkts der Induktion (OD₆₀₀ von 5,0 oder 10,0) die Expression im Bioreaktor analysiert. Die beste P450 Expression pro Gramm Biotrockenmasse (BTM) und gleichzeitig die größte gesamte Zellmasse wurden mit der Induktion bei OD₆₀₀ von 10,0 und einer Expressionstemperatur von 25 °C erreicht. Mit dieser Bedingung wurde anschließend eine 4 L Kultivierung durchgeführt, deren Zellmasse nach Expression in vier 1 L Bioreaktoren als ruhende Zellen zur Untersuchung der Biotransformation (Fütterung von C-Quelle und Substrat) eingesetzt wurde (Tabelle 4). Die Biotransformationen wurden entweder mit einer einmaligen Substratzugabe gestartet (R3 + R4) oder es wurde nach und nach Substrat zugefüttert (R1 + R2). Gleichzeitig wurde der Einfluss einer Glycerolfütterung als zusätzliche C-Quelle analysiert (2.5.6), die sich negativ auf die Aktivität auswirkte. Das beste Ergebnis mit einer Produktivität von 20 mg L⁻¹ h⁻¹ wurde schließlich ohne Zufütterung von Glycerol und mit Zufütterung von Diclofenac (**8**) erzielt. Bei einer Ausgangssituation von 14,5 mg_{P450} g_{BTM}⁻¹ entsprach dies bei Prozessende 0,58 g L⁻¹ des hydroxylierten Produkts (**9**), was einem Umsatz des Substrats von etwa 2 mM entspricht. Bemerkenswert war weiterhin, dass auch nach 24 h weiter Produkt gebildet wurde, was gleichbedeutend mit einer relativ hohen Stabilität des Biokatalysators ist.

Tabelle 4: Analyse der Biotransformationsbedingungen mit ruhenden Zellen und Vergleich der 5-Hydroxydiclofenac (9) Produktion zwischen wachsenden und ruhenden Zellen.

Kultur	P450-Konzentration ^{a)} ($\text{mg}_{\text{P450}} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$)	Maximale Konzentration ($\text{g}_{5\text{-OH DCF}} \text{L}^{-1}$)	Maximale spezifische Aktivität ^{b)} ($\text{mg}_{5\text{-OH DCF}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1} \text{mg}_{\text{P450}}^{-1}$)	Produktivität ^{c)} ($\text{mg}_{5\text{-OH DCF}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	BTM Gesamt (g)	Produkt Gesamt (mg)
Ruhende Zellen: 29 h^{d)}						
30 mM Glukose, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin 0.075 $\text{g}_{\text{cww}} \text{mL}^{-1}$						
R1: DCF-Fütterung (0,6-0,4-0,2 g L^{-1})	14,5	0,58	0,316	20,0	7,7	299,0
R2: DCF-Fütterung (0,6-0,4-0,2 g L^{-1}) Glycerol-Fütterung (1 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	14,5	0,23	0,080	7,8	7,7	112,5
R3: Batch DCF (1,2 g L^{-1})	14,5	0,26	0,143	8,9	7,7	129,5
R4: Batch DCF (1,2 g L^{-1}) Glycerol-Fütterung (1 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	14,5	0,08	0,023	2,8	7,7	40,5
Wachsende Zellen: 144 h^{e)}						
Feed (0,25 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) 50% Glycerol, 50% (40x M9 salts)						
Klon 1	42,5	0,29	0,008	2,0	8,7	222,0
Klon 2	38,0	0,29	0,010	2,0	9,1	218,0
Klon 3	38,0	0,27	0,010	1,9	9,1	203,0
Schwemmkultur	36,0	0,33	0,013	2,3	8,7	196,0

a) Gemessen durch CO-Differenzspektroskopie.

b) Maximale spezifische Aktivität am Punkt des höchsten Produktanstiegs pro Stunde berechnet.

c) Produktivität über die gesamte Prozessdauer von 29 h (ruhende Zellen) oder 144 h (wachsende Zellen) kalkuliert.

d) Die Zellen wurden in einem 5 L Bioreaktor kultiviert und anschließend gleichförmig aufgeteilt um unterschiedliche Biotransformationsbedingungen durchzuführen und analysieren zu können. Für die Reaktionen im Batch-Modus wurden 1,2 g L^{-1} Diclofenac als Start zugefügt. Für die Reaktionen mit Fütterung (feed) wurde 0,6 g L^{-1} Diclofenac als Start eingesetzt und 0,4 g L^{-1} nach 6 h sowie 0,2 g L^{-1} nach 19 h zugefüttert.

e) Drei unterschiedliche transformierte Zellen sowie eine Schwemmkultur der kompletten Transformations-Agarplatte wurden für vier 1 L Bioreaktoren verwendet. Die Reaktion wurde mit 0,3 g L^{-1} Diclofenac gestartet und nach 23 h weitere 0,2 g L^{-1} zugefügt.

Für die Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Systems wurden weiterhin unterschiedliche Kolonien sowie Schwemmkulturen von der Transformationsplatte miteinander verglichen (Tabelle 4, unten). Hierbei zeigte sich eine sehr hohe und vor allem reproduzierbare P450 Expression von 38,5 $\text{mg}_{\text{P450}} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ im Durchschnitt. Bei der anschließenden Biotransformation mit wachsenden Zellen wurde jedoch eine sehr geringe Produktivität respektive maximale spezifische Aktivität erzielt, welche konstant über eine Prozessdauer von 144 h anhielt. Insgesamt wurden ähnliche Produktmengen erhalten wie mit ruhenden Zellen, allerdings resultierte aus einer höheren Biotrockenmasse bei gleichzeitiger höherer Expression pro Gramm Zellen eine deutlich geringere maximale spezifische Aktivität.

3.1 Selektive Hydroxylierung von Diclofenac (8) durch P450 RhF

Für einen direkten Vergleich beider Biotransformationsmodi wurden vier 1 L Bioreaktoren zur Doppelbestimmung mit Vorkulturen aus zwei unterschiedlichen Transformanten inokuliert und mit dem finalen Protokoll wie in 2.3.9 beschrieben exprimiert. Aus beiden Transformanten resultierte so je ein Ansatz mit ruhenden und einer mit wachsenden Zellen (2.5.6). Ähnlich zu den bisherigen Ergebnissen zeigten sich bei den ruhenden Zellen hohe Raten für Produktivität und spezifische Aktivität im Vergleich zu den wachsenden Zellen, obwohl derselbe Klon verwendet, eine vergleichbare P450 Expression und totale Zellmassen erzielt sowie gleiche Zellkonzentration in der Biotransformation eingesetzt wurden (Abbildung 15, Tabelle 5). Insgesamt wurden mit wachsenden Zellen im Durchschnitt 0,024 im Vergleich zu 0,071 $\text{mg}_{5\text{-OH-DCF}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1} \text{mg}_{\text{P450}}^{-1}$ mit ruhenden Zellen erhalten. Nach 30,5 h Prozessdauer entspricht dies im Durchschnitt 0,36 g L^{-1} total 5-Hydroxydiclofenac (9) und 11,7 $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ Produktbildungsrate mit P450 RhF und ruhenden Zellen. Damit werden die Werte der wachsenden Zellen mit im Durchschnitt 0,08 g L^{-1} und 2,6 $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ Produkt unter identischer optischen Dichte und Bioreaktorbedingungen übertroffen.

Tabelle 5: Ganzzellaktivitäten von P450 RhF als wachsende und ruhende Zellen.^{a)}

Kultur	P450-Konzentration ^{b)} ($\text{mg}_{\text{P450}} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$)	Maximale Konzentration ($\text{g}_{5\text{-OH DCF}} \text{L}^{-1}$)	Maximale spezifische Aktivität ^{c)} ($\text{mg}_{5\text{-OH DCF}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1} \text{mg}_{\text{P450}}^{-1}$)	Produktivität ^{d)} ($\text{mg}_{5\text{-OH DCF}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	BTM Gesamt (g)	Produkt Gesamt (mg)
Wachsende Zellen: Transformante 1	22,5	0,072	0,024	2,4	7,5	57,5
Wachsende Zellen: Transformante 2	24,5	0,085	0,023	2,8	7,3	67,7
Ruhende Zellen: Transformante 1	27,0	0,370	0,077	12,2	7,9	235,1
Ruhende Zellen: Transformante 2	28,5	0,344	0,064	11,3	8,0	221,7

^{a)} Vorkulturen zweier Klone wurden verwendet, um vier 1 L Bioreaktoren zu inokulieren (800 mL Arbeitsvolumen).

^{b)} Gemessen durch CO-Differenzspektroskopie.

^{c)} Maximale spezifische Aktivität am Punkt des höchsten Produktanstiegs pro Stunde berechnet.

^{d)} Produktivität über die gesamte Prozessdauer von 30,5 h kalkuliert.

Insgesamt wurden in diesen Experimenten bis zu 235 mg 5-Hydroxydiclofenac (9) mit einem 800 mL Reaktionsansatz produziert. Für die Untersuchung der Integrität des Biokatalysators selbst wurden CO-Differenzspektren mit NADPH als Reduktionsmittel durchgeführt (2.4.5.2) und mit einem Standard-CO-Spektrum mit Natriumdithionit als Reduktionsmittel verglichen. Hierbei konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Anhang 7.2, Tabelle S1), was darauf hinweist, dass das natürliche P450-Fusionskonstrukt in beiden Biotransformationsmodi selbst nach 30,5 h Prozessdauer weiterhin intakt war.

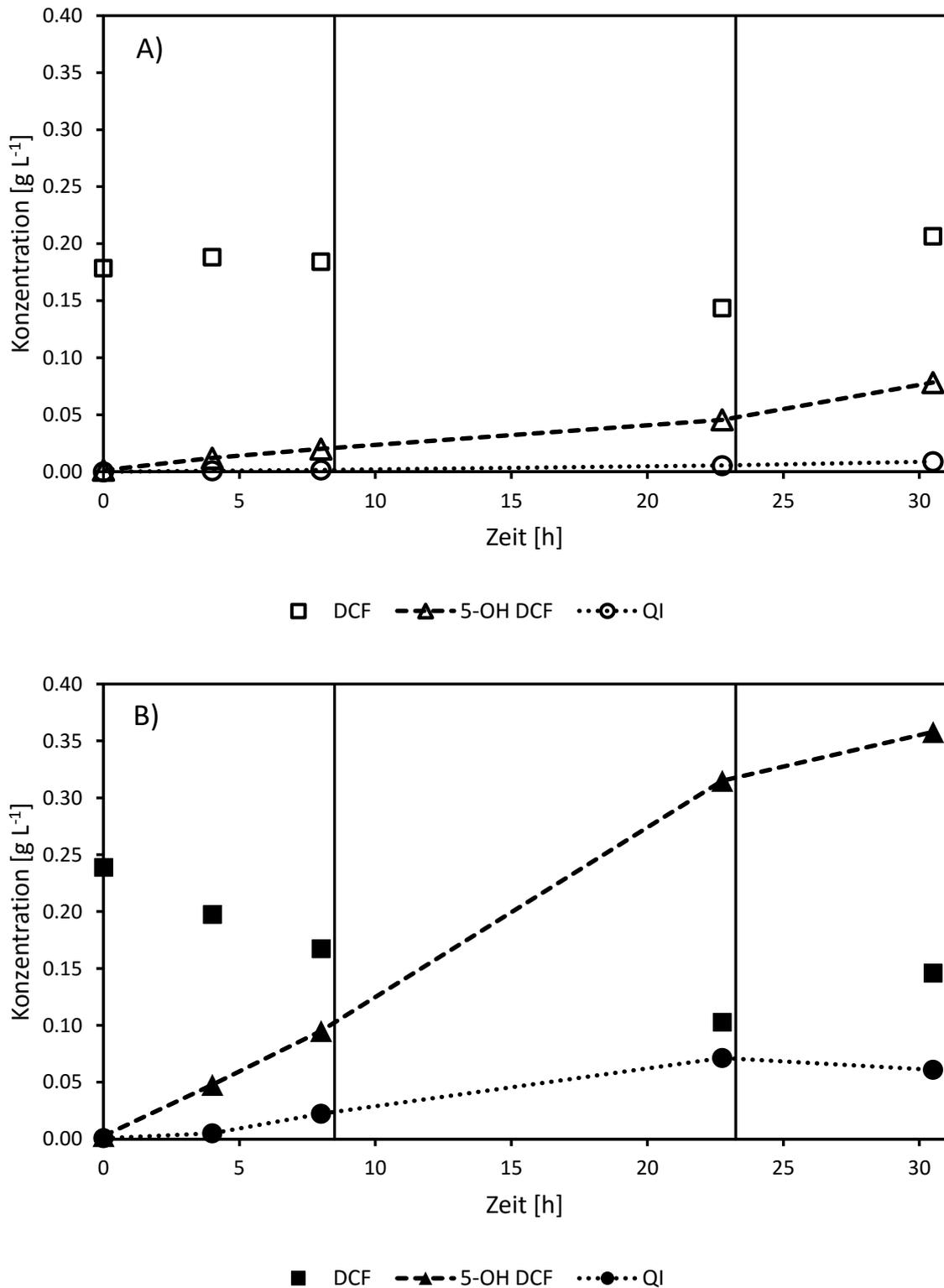


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf über die P450 RhF katalysierte Reaktion von Diclofenac (**8**, DCF) zu 5-Hydroxydiclofenac (**9**, 5-OH-DCF) und Bildung des Quinonimins (**10**, QI) mit A) wachsenden Zellen und B) ruhenden Zellen. Die Fütterungszeitpunkte des Substrats Diclofenac (**8**) sind durch vertikale Linien angegeben. Die Experimente wurden in Duplikaten mit zwei unterschiedlichen Transformanten durchgeführt.

Das Produkt wurde durch HPLC-SemiPrep aufgereinigt (2.6.3.1) und als 5-Hydroxydiclofenac (**9**) durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigt (2.6.4). Von den hydroxylierten Diclofenacmetaboliten werden in der Literatur Quinonimine als Intermediate respektive Weiteroxidationsprodukte beschrieben.²⁹⁵ Für die Untersuchung dieser Hypothese stand so genügend 5-Hydroxydiclofenac (**9**) zur Verfügung, um eine silberkatalysierte Oxidation zum Quinonimin durchzuführen. Die Oxidation erfolgte fast vollständig und das entstandene Produkt konnte durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie als 5-Hydroxyquinonimin (**10**) bestätigt werden (2.6.4). HPLC- und LC-MS-Analysen (2.6.2) zeigten schließlich, dass es sich bei dem in der Reaktion von P450 RhF gebildeten Nebenprodukt um das Quinoniminderivat (**10**) handelt (Anhang 7.2, Abbildung S1).

Eine Weiteroxidation durch P450 RhF oder Komponenten aus *E. coli* Lysat konnte durch *in vitro* Reaktionen mit dem Produkt 5-Hydroxydiclofenac (**9**) als Substrat ausgeschlossen werden. Jedoch zeigte sich, dass die Oxidation des Produkts hin zum Quinonimin (**10**) stark abhängig von der Temperatur und dem Salzgehalt des Puffers ist. Hierzu wurden Experimente mit unterschiedlichen Inkubationstemperaturen sowie Wasser oder M9-Minimalmedium als Lösungsmittel für den aufgereinigten Produktstandard (**9**) durchgeführt (Abbildung 16).

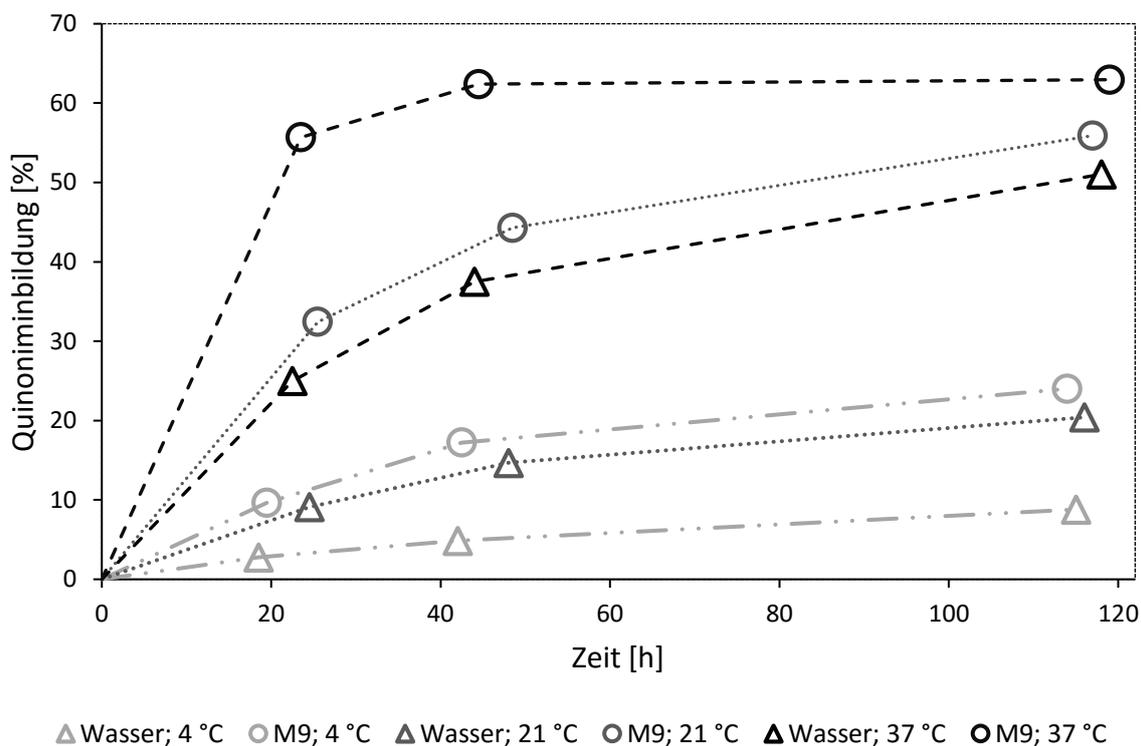


Abbildung 16: Quinoniminbildung (**10**) aus 5-Hydroxydiclofenac (**9**) unter unterschiedlichen Bedingungen und Zeitpunkten. Aufgereinigtes 5-Hydroxydiclofenac ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) wurde in M9-Minimalmedium oder Wasser gelöst und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $21 \text{ }^\circ\text{C}$ oder $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die resultierende Quinoniminbildung wurde über HPLC verfolgt.

Die Bildung des Quinonimins (**10**) wächst mit steigender Temperatur, wobei sie im salzhaltigen M9-Minimalmedium weiter beschleunigt wird. Letzteres konnte in

vergleichbarem Ausmaß bereits mit der Zugabe von M9 Einzelkomponenten wie MgSO_4 oder CaCl_2 in wässrigem Milieu beobachtet werden. Eine vollständige Umwandlung ist jedoch nicht ohne chemische Katalysatoren wie Silber möglich, sodass ein maximaler Anteil von etwa 62% des Quinonimins (**10**) erreicht wird. Dagegen kann das aufgereinigte 5-Hydroxydiclofenac (**9**) in Pulverform bei 4 °C mehrere Wochen stabil gelagert werden.

Aufgrund der Fähigkeit von P450 RhF Diclofenac (**8**) selektiv und effizient zu hydroxylieren galt es im Rahmen eines weiteren Projektes in Kollaboration mit dem IPA Bochum (Institut für Prävention und Arbeitsmedizin), den biotechnologischen Zugang zu 5-Hydroxyimidaclopid (**101**) zu ermöglichen. Dieser Metabolit kann im Menschen nachgewiesen werden¹⁵⁶ und sollte dem IPA Bochum zur Etablierung einer geeigneten Analytik am Menschen bereitgestellt werden. Imidaclopid (**36**) ist stark toxisch für Bienen (TD_{50} 8 ng Biene⁻¹), wobei für einige Metabolite noch größere Toxizitäten nachgewiesen wurden.²⁹⁶ Die Arbeiten zu dem als Pestizid eingesetzten Imidaclopid (**36**) wurden parallel zur Verbesserung des P450 RhF Prozesses durchgeführt und erfolgten nach ersten *in vivo* Tests im analytischen Maßstab (1 mL) mit wachsenden Zellen in einem 5 L Bioreaktor. Ähnlich zu den 1 mL Reaktionen konnte eine geringe Produktbildung an hydroxyliertem Produkt durch LC-MS Analytik (2.6.2) detektiert werden. Nach Isolation des Produkts durch HPLC-SemiPrep (2.6.3.1) wurden aus 1 g eingesetztem Substrat 30 mg des aufgereinigten Moleküls erhalten. Die isolierte Produktausbeute war zwar sehr gering, jedoch handelte es sich um das gesuchte 5-Hydroxyimidaclopid (**101**), bestätigt durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie (2.6.4). Ähnlich zu Diclofenac (**8**), wurde auch hier ein mit der Zeit ansteigender Anteil eines weiteren Metaboliten bereits im NMR-Spektrum detektiert, wobei es sich um das Olefin (**102**) des 5-Hydroxyimidaclopid (**101**) handelte.

3.2 Untersuchung von Eukaryoten für die NSAID Hydroxylierung

Durch die Arbeiten an Diclofenac (**8**), selektiv hydroxyliert durch P450 RhF, entwickelte sich die Idee einer Plattform unterschiedlicher Katalysatoren für NSAID Hydroxylierungen. Hier sollte ein möglichst breites Spektrum an Metaboliten effektiv generiert werden, um gleichzeitig zusammen mit P450 RhF potenzielle Biokatalysatoren für neue Anforderungen bereitzustellen.

Für die Untersuchung der Fähigkeit zur NSAID-Hydroxylierung wurde ein kleines Spektrum an Mikroorganismen ausgewählt. Erstens der filamentöse Pilz *Beauveria bassiana*, der bekannt für effektive Hydroxylierungsreaktionen ist und von Dingler und Kollegen durch UV-Strahlung hin zu hefeähnlichem Wachstum selektiert wurde.^{128,130,131,267,297} Zweitens ein filamentöser Organismus, der in parallelen Arbeiten am ITB zum Abbau von Diclofenac (**8**) aus Erdproben nahe Ludwigshafen isoliert wurde und in diesen Experimenten ein

hydroxyliertes Produkt bildete. Der dritte filamentöse Pilz schließlich wurde als Kontamination eines 5-Hydroxydiclofenac (**9**) Standards in M9-Minimalmedium nach etwa anderthalb Jahren aerober Inkubation isoliert. Diese filamentösen Pilze wurden in KGM-Medium (Kartoffel-Glucose-Medium) kultiviert (2.3.2). Für die weitergehenden Untersuchungen mussten die noch unbekanntenen Pilze zunächst identifiziert werden, um eine Pathogenität auszuschließen und S1-Klassifizierung zu gewährleisten. Hierzu wurde die Identifikation mittels der Biomarker LSU (28S *nuclear ribosomal large subunit rRNA gene*) sowie ITS (*internal transcribed spacer*), wie in 2.7.1 beschrieben, über eine PCR-Reaktion durchgeführt. Für die Organismen konnten DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 1000 bp (LSU-Region) beziehungsweise etwa 700 bp (ITS-Region) erhalten werden (Anhang 7.3, Abbildung S2), die schließlich durch DNA-Sequenzierung analysiert wurden. Der Abgleich der Sequenzen mit der *Fungalbarcoding* und der NCBI-Datenbank ergab, dass es sich bei der Kontamination mit größer 99%iger Übereinstimmung um den S1-Organismus *Clitocybe nebularis* (nebelgrauer Trichterling) handelt (bestätigt durch LSU- und ITS-Biomarker). Für den anderen Organismus wurde mittels des LSU-Biomarkers eine über 98%ige Übereinstimmung zum S1-Organismus *Mucor hiemalis* (Köpfchenschimmel) gefunden. Aufnahmen der unterschiedlichen Wuchsformen unter dem Mikroskop oder in KGM-Flüssigkultur sind im Anhang beigefügt (7.3, Abbildung S3).

Alle drei Pilze wurden zunächst, wie in 2.5.1 beschrieben, kultiviert und die Biotransformation in Duplikaten in 400 mL mit einer Startkonzentration von 0,6 g L⁻¹ Diclofenac (**8**) durchgeführt. Der Verlauf der Reaktion wurde über die Zeit durch HPLC verfolgt und nach 144 h beendet (Abbildung 17). Alle gebildeten Produkte wurden über HPLC-SemiPrep (2.6.3.1) aufgereinigt und die Strukturen durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie aufgeklärt (2.6.4). Obwohl eine Trennung der Metaboliten 5-Hydroxydiclofenac (**9**), dem zugehörigen Quinonimin (**10**) und 4'-Hydroxydiclofenac (**11**), durch HPLC sehr schlecht durchzuführen war, konnten die Substanzen im NMR-Spektrum im Falle von vorliegenden Mischungen gut separiert werden.

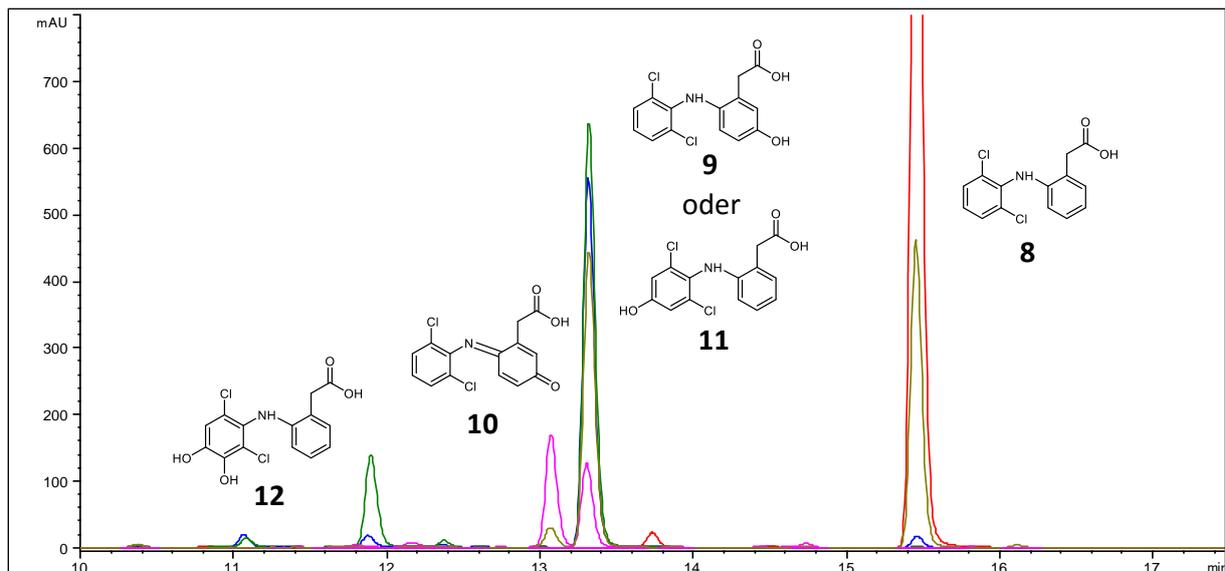


Abbildung 17: Diclofenac (**8**) Biotransformationen mit den filamentösen Pilzen *Beauveria bassiana*, *Clitocybe nebularis* sowie *Mucor hiemalis*. Die Reaktionen erfolgten in 400 mL KGM-Medium mit 0,6 g L⁻¹ Substrat für 144 h bei 27 °C und 180 rpm. Rot: Negativkontrolle ohne Zellen; Magenta: Standard aus 5-Hydroxydiclofenac (**9**), dem Quinonimin (**10**) und 4'-Hydroxydiclofenac (**11**); Grün: *B. bassiana*; Blau: *M. hiemalis*; Ocker: *C. nebularis*. Die Retentionszeiten für die unterschiedlichen Metabolite sind: 11,9 min (**12**); 13,1 min (**10**); 13,3 min (**9** und **11**); 15,5 min (**8**).

In den Experimenten konnte eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den Duplikaten festgestellt werden. Nach 144 h konnte unter Verwendung von *M. hiemalis* und *B. bassiana* kein Diclofenac (**8**) mehr nachgewiesen werden, da das Substrat vollständig verstoffwechselt respektive von der Biomasse absorbiert wurde. *M. hiemalis* bildete selektiv 4'-Hydroxydiclofenac (**11**), während bei *C. nebularis* eine Mischung aus 5-Hydroxydiclofenac (**9**), dem zugehörigen Quinonimin (**10**), sowie 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) detektiert wurde (Abbildung 18). Im Falle von *B. bassiana* konnte neben dem 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) als Hauptprodukt ein bisher noch nicht charakterisierter Metabolit, 3',4'-Dihydroxydiclofenac (**12**), bestätigt durch LC-MS und NMR-Spektren, erhalten werden (2.6.2, 2.6.4). Die gebildeten Produkte nahmen in den unterschiedlichen Biotransformationen über die Zeit nicht feststellbar ab.

Während *B. bassiana* ein hefeähnliches Wachstum zeigte und erst in der späten Wachstumsphase Klumpen bildete, zeigten die beiden anderen identifizierten filamentösen Pilze ein typisches Myzelienwachstum in Flüssigkultur mit starker Klumpenbildung. In Zusammenarbeit mit Lisa Kontny (ITB) wurde schließlich versucht, die Biotransformationsbedingungen zu verbessern. Der Einsatz von Glasperlen unterschiedlicher Größe zum Zwecke der mechanischen Zerreißung der Zellklumpen reichte für diesen Zweck nicht aus. Auch die Zugabe von unterschiedlichen Substratkonzentrationen (0,2 – 1,5 g L⁻¹) in der Hauptkultur oder bereits in der Vorkultur sowie eine Substratfütterung in der Hauptkultur (0,2 g L⁻¹ alle 24 h bis 0,6 g L⁻¹) ergaben keine Steigerung der Ausbeute im Vergleich zur bisherigen Prozedur mit der sofortigen Zugabe von 0,6 g L⁻¹ Diclofenac (**8**). Einzig das mehrmalige Animpfen mit mehreren Hyphen verbesserte die Klumpenbildung in

Form von mehreren kleineren Myzelien. Dennoch zeigten die filamentösen Pilze in den in Duplikaten durchgeführten Biotransformationen im 400 mL Maßstab mit Diclofenac (**8**) hohe Ausbeuten von über 50% der Produkte bei einer Substratkonzentration von $0,6 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung 18).

Für die weiterführende Untersuchung der Fähigkeit der filamentösen Pilze NSAIDs zu hydroxylieren wurden mit den Arylpropionsäurederivaten Naproxen (**13**), Ibuprofen (**15**) und Ketoprofen (**132**) sowie dem Anthranilsäurederivat Mefenaminsäure (**19**) weitere Substrate (1 g L^{-1}) im 50 mL Maßstab getestet. Gleichzeitig wurde 2-Anilinophenylelessigsäure (**133**) als ähnliches Molekül zu Diclofenac (**8**) gewählt, um den Einfluss der Chloratome in Diclofenac zu untersuchen. Die 2-Anilinophenylelessigsäure (**133**) nahm in den Biotransformationen stetig ab ohne Detektion eines Produktes. In den Biotransformationen mit Ketoprofen (**132**) konnten ebenfalls keine Produkte festgestellt werden. Hingegen zeigten jeweils mindestens zwei filamentöse Pilze Aktivitäten gegenüber den weiteren getesteten NSAIDs (Abbildung 18). Die Strukturen aller generierten Produkte konnten schließlich nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung (2.6.3.1) mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (2.6.4). *B. bassiana* und *M. hiemalis* demethylierten Naproxen (**13**) zu 6-*o*-Desmethylnaproxen (**14**), letzterer Organismus mit einer isolierten Ausbeute von mehr als 99%. In den Biotransformationen mit Ibuprofen (**15**) und *M. hiemalis* und *B. bassiana* wurden mehrere Produkte detektiert. Die Aufreinigung im Falle von *M. hiemalis* ergab erneut eine hohe isolierte Ausbeute von 92,2% mit den Produkten 2-Hydroxyibuprofen (**16**, ~ 90%), 1-Hydroxyibuprofen (**17**, ~ 2%) sowie dem zweifach hydroxylierten Folgeprodukt 1,2-Dihydroxyibuprofen (**18**, ~ 8%). Auf das Anthranilsäurederivat Mefenaminsäure (**19**) zeigten *C. nebularis* und *B. bassiana* eine Hydroxylierungsaktivität. Mit einer isolierten Ausbeute von 48% bei 1 g L^{-1} Substratkonzentration wies die Biotransformation mit *B. bassiana* das hydroxylierte Produkt 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (**20**, ~ 68%) sowie das Produkt 3'-Carboxymefenaminsäure (**21**, ~ 32%) auf.

Ähnlich zu P450 RhF im vorhergehenden Kapitel (3.1) wurde mit den filamentösen Pilzen das Substrat Imidacloprid (**36**) untersucht. Mit allen konnten geringe Mengen hydroxyliertes Produkt detektiert werden, jedoch mit geringerer Aktivität im Vergleich zu P450 RhF. Insgesamt wurden mit den filamentösen Pilzen hohe isolierte Ausbeuten mit hoher Reinheit erzielt mit der Generierung teilweise nicht charakterisierter neuer Metaboliten. Daneben erlauben die einfachen Kultivierungsbedingungen eine umweltfreundliche und kostengünstige Synthese. Dies zeigt das Potenzial dieser Pilze für die biotechnologische Anwendung mit einfachen Systemen, hohen Effizienzen und vielseitigem Substratspektrum, um den Bedarf an neuen Biokatalysatoren zu decken.

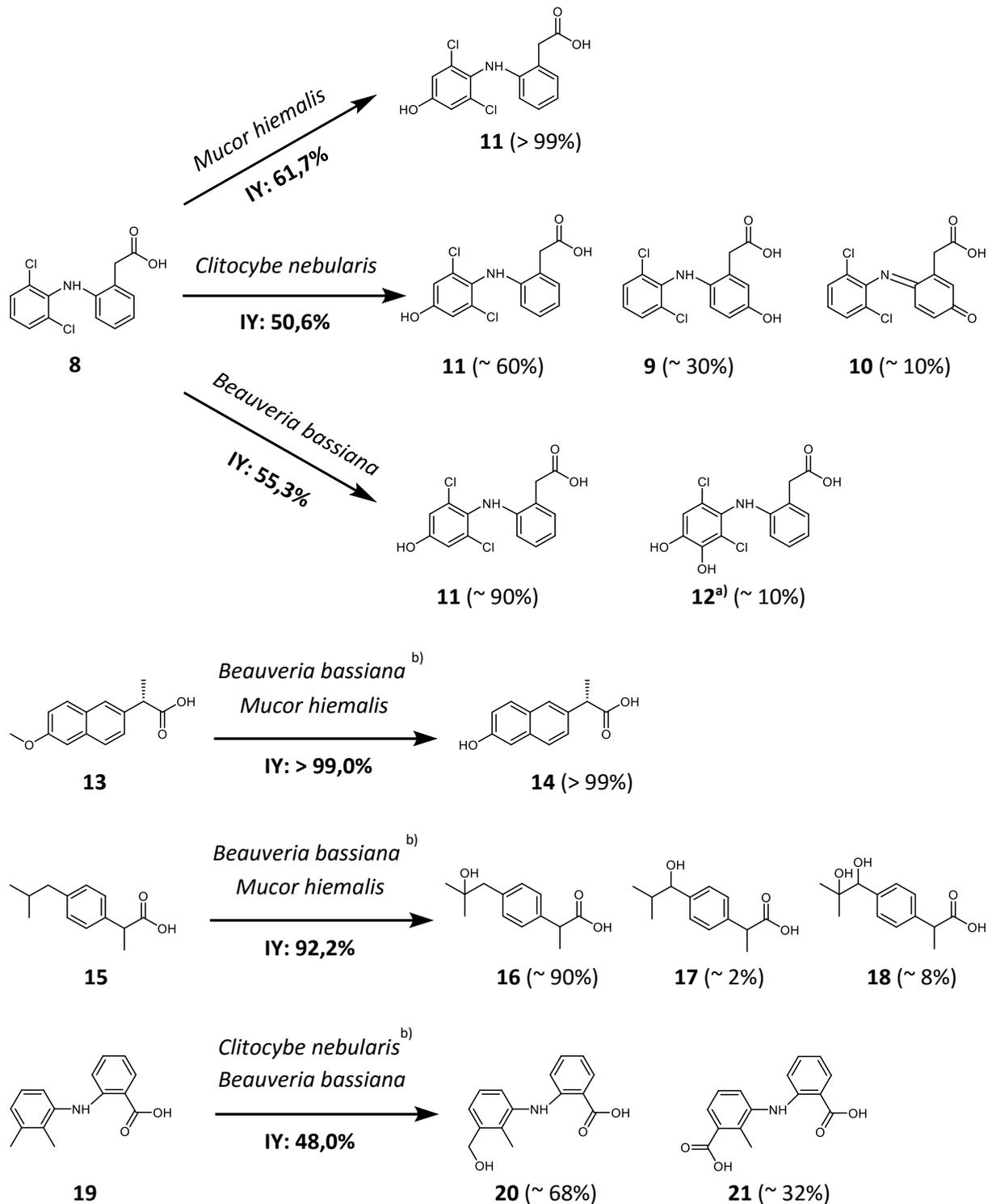


Abbildung 18: Übersicht über die NSAID Biotransformationen katalysiert durch *Beauveria bassiana*, *Clitocybe nebularis* und *Mucor hiemalis*. Eingesetzt wurden jeweils 1 g L⁻¹ Substrat in einem 50 mL Maßstab respektive 0,6 g L⁻¹ Diclofenac (8) im 400 mL Maßstab. IY: Isolierte Ausbeute nach Aufreinigung durch HPLC-SemiPrep a) Bei dem Produkt 3',4'-Dihydroxydiclofenac (12) handelt es sich um einen bisher nicht beschriebenen Diclofenacmetaboliten. b) Die Produkte wurden nicht aufgereinigt, weshalb keine isolierten Ausbeuten sowie exakten Produkte angegeben werden können.

3.3 Rationale Mutagenese von CYP116B3

Zentrales Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von P450 Monooxygenasen industriell relevante Produkte herzustellen, wobei die Enzyme optimiert in einer Ganzzellbiotransformation Verwendung finden sollten. Die stereoselektive Hydroxylierung von Terpenen zu wertvollen Produkten für die Geschmack- und Geruchsstoffindustrie sowie für die chemische Synthese sollte hierbei angestrebt werden. An dieser Stelle sollen sowohl vorhandene Limitationen chemischer Synthesen überwunden, als auch die Entwicklung möglicher neuer Produkte realisiert werden. Für die Entwicklung von Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen lag der Fokus zunächst auf natürlichen oder künstlichen Fusionsproteinen, die bereits mit den Elektronentransferproteinen fusioniert vorliegen.

In ersten Experimenten wurden die Fusionsproteine CYP153A_{M.aq.}-PFOR (*Mycobacterium aquaeolei*)⁹⁹, P450 RhF (*Rhodococcus* sp.), CYP153A_{P.sp.}-BMR (*Polaromonas* sp.)⁹⁷ sowie CYP116B3 (*Rhodococcus ruber*)²⁹⁸ auf Aktivität gegenüber dem Zielterpenpanel β -Ionon (**1**), Vinylionol (**2**), α -Humulen (**3**), β -Bisabolen (**4**), Premnapirodien (**5**), Longifolen (**6**) und Valencen (**7**) getestet. Die wildtypischen Enzyme zeigten keine promiskuitiven Aktivitäten, sodass CYP116B3, das als natürliches Fusionsprotein aus einem Ferredoxin, einer FMN-haltigen Reduktase und einer P450-Monooxygenase aufgebaut ist, für weitere Studien im Zuge einer rationalen Mutagenese ausgewählt wurde. Zusätzlich zu der meist höheren katalytischen Effizienz von natürlichen Fusionsproteinen ist das breite Substratspektrum des Enzyms mit zum Teil relativ sperrigen Substraten wie 7-Ethoxycoumarin (**22**) oder Fluoren (**24**) für den Einsatz der Terpenoxyfunktionalisierung von besonderem Interesse.²⁹⁸ In vorangegangenen Dissertationen wurden des Weiteren eine *random* sowie rationale Mutagenese durchgeführt und die Expression von CYP116B3 am ITB durch Tobias Klaus verbessert.^{75,299} Die auf das natürliche Substrat 7-Ethoxycoumarin aktivsten Varianten (A53F, V281L und A317L) wurden zunächst ebenfalls auf Aktivität gegenüber den Terpenen getestet, was jedoch in keiner messbaren Aktivität resultierte. Allerdings wurden diese Varianten hinsichtlich des natürlichen Substrats entworfen und selektiert, weshalb ein neuer Ansatz mit Fokus auf die zu untersuchenden Terpene durchgeführt wurde. Basierend auf den Vorarbeiten sollte schließlich ein rationales Proteindesign durchgeführt werden, um die Oxyfunktionalisierung der zum Teil sehr großen und damit sperrigen Zielterpene mit weiteren Varianten zu ermöglichen. Mit Hilfe einer P450 Monooxygenasen 3DM Datenbank konnte ein Homologiemodell von CYP116B3 erstellt werden (2.7.4), das auf PDB-File 1Z80 (P450EryF) basierte (29% Aminosäuresequenzidentität). In Kombination mit bioinformatischen Dockingstudien der Zielterpene wurden vier Aminosäuren identifiziert (E27, H139, S377 und F378), die den Substratkanal scheinbar verengen (Abbildung 19). Die am nächsten zum aktiven Eisen des Häms liegende Position F378 wurde als Position mit dem größten Einfluss

auf die Kavität des Substrateingangskanals angenommen und deshalb als Ausgangspunkt für Doppelvarianten verwendet. Aufgrund der im Substratkanal und im aktiven Zentrum überwiegend hydrophoben Aminosäuren, wurden für den Austausch vor allem kleine hydrophobe Aminosäuren wie Alanin, Valin, Glycin und Threonin ausgewählt und durch die QuikChange® Methode (2.2.9) eine fokussierte Mutantenbibliothek mit insgesamt 16 Enzymvarianten erstellt. Hierdurch sollte der Substratkanal deutlich vergrößert werden, um die Passage der relativ großen und sperrigen Terpensubstrate zu ermöglichen.

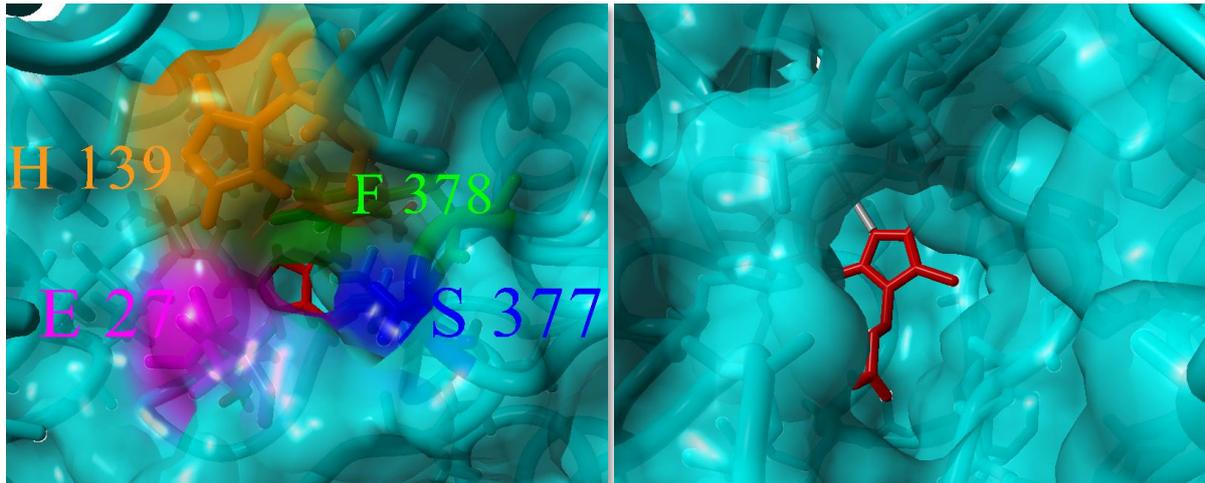
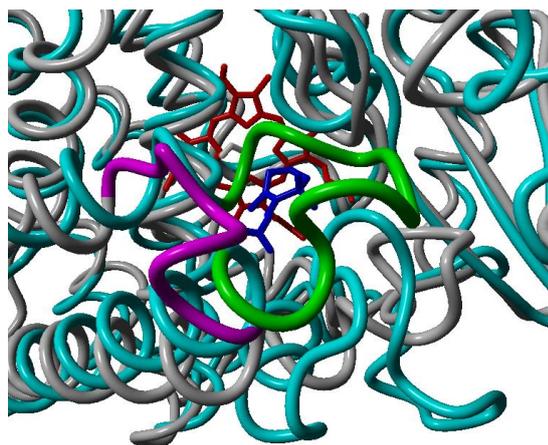


Abbildung 19: Vergleich der Substratkanäle von CYP116B3 und P450 BM3. *Links*: Substratkanal von CYP116B3 mit den vier ausgewählten Aminosäuren E27 (Pink), H139 (Orange), S377 (Blau) und F378 (grün). *Rechts*: der weite Substratkanal von CYP102A1 (P450 BM3) aus *Bacillus megaterium* (pdb file 4KF0). Letzteres Enzym ist in der Lage, relativ große und sperrige Substrate zu hydroxylieren. Das Homologiemodell von CYP116B3 wurde durch die 3DM-Technologie basierend auf dem pdb file 1Z80 generiert. Im Zuge der Dockingstudien stellte sich ein weiterer Bereich von CYP116B3 als interessant heraus. Der F-G-Loop, der vergleichbar zu einem Deckel über dem Substratkanal liegt, wird mit der Substraterkennung in Verbindung gebracht.³⁰⁰ In Strukturvergleichen des Loops von CYP116B3 mit Enzymen, die in der Lage sind Terpene und andere große Substrate zu hydroxylieren, zeigte sich, dass diese in einigen Fällen deutlich kürzere F-G-Loops besitzen (Abbildung 20). Dies macht den Loop von CYP116B3, der scheinbar den Zugang zum Substratkanal verdeckt, zu einem interessanten Ziel für eine weitere Bibliothek. Somit wurden in Bezug darauf zwei Strategien verfolgt. Zum ersten die Verkürzung des intrinsischen CYP116B3 F-G-Loops zur Ausweitung des Raums vor dem Eingang zur aktiven Tasche und zum Zweiten der Austausch des Loops mit entsprechenden Loop-Regionen von P450 BM3, CYP101B1 und CYP101C1. Diese Austauschpartner wurden aufgrund ihrer Aktivität gegenüber Terpenen wie β -Ionon (**1**) ausgewählt.



F-G-Loop Varianten	Aminosäuresequenz ^{3DM Nummerierung}
CYP116B3 WT	T ¹⁴⁰ VNTWGRPAPEEQVAV ¹⁴⁸
F378A_short_1	T ¹⁴⁰ RPAPEEQVAV ¹⁴⁸
F378A_short_2	T ¹⁴⁰ VNTWGRPV ¹⁴⁸
F378A_short_3	T ¹⁴⁰ VNTWGRPAPEV ¹⁴⁸
F378A_short_4	T ¹⁴⁰ RPV ¹⁴⁸
F378A_BM3	T ¹⁴⁰ VNTWGPDDPAYDRPAPEV ¹⁴⁸
F378A_B1	T ¹⁴⁰ RPGMDMTV ¹⁴⁸
F378A_C1	T ¹⁴⁰ RPDGSMTV ¹⁴⁸

Abbildung 20: Vergleich der F-G-Loops bekannter P450 Monooxygenasen. *Links*: Vergleich des F-G-Loops von CYP116B3 (hervorgehoben in grün, Struktur in cyan) mit dem kurzen Loop von CYP101C1 (hervorgehoben in magenta, Struktur in grau, PDB file: 3OFU), welches in der Lage ist β -Ionon (**1**, Blau) zu hydroxylieren. *Rechts*: Konstruierte F-G-Loop Varianten von CYP116B3. Zusätzlich zu verkürzten Loop Varianten wurden drei Varianten konzipiert, die durch einen Austausch den Loop von Terpen hydroxylierenden P450s nachahmen sollten (P450 **BM3**, CYP101**B1** sowie CYP101**C1**).

Zunächst wurde der F-G-Loop um vier, fünf, sieben und 14 Aminosäuren verkürzt und in einem zweiten Schritt mit Aminosäuren aus den verglichenen P450s ergänzt. Insgesamt wurden bei diesem Ansatz sieben Varianten mittels der QuikChange® Methode hergestellt (2.2.9). Zu einer ersten Charakterisierung der Aktivität diente das für die Familie von CYP116B3 kennzeichnende Substrat 7-Ethoxycoumarin (**22**). Die fluoreszierende Eigenschaft des Produkts 7-Hydroxycoumarin kann hierbei spektrofluorometrisch für die Determination der spezifischen Aktivität eingesetzt werden (2.4.5.5). Die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp variierte stark zwischen den einzelnen Varianten, wobei eine Variante, die eine zusätzliche spontane Punktmutation (A205T) aufwies, mit höherer Aktivität detektiert werden konnte (Tabelle 6). Einzelne Varianten waren zwar auf 7-Ethoxycoumarin (**22**) aktiv, jedoch konnten keine spezifische Aktivitäten aufgrund einer geringen Expression beziehungsweise eines hohen Anteils fehlgefalteten Enzyms ermittelt werden. Die F-G-Loop Varianten konnten gut exprimiert werden, jedoch wiesen sie kein typisches Absorptionsmaximum von 450 nm im CO-Differenzspektrum zur P450-Konzentrationsbestimmung auf, sondern ein für den fehlgefalteten Zustand charakteristisches bei 420 nm (2.4.5.2). Beim *Screening* mit den Terpenen (**1** – **7**) konnte mit allen generierten Varianten jedoch keine Hydroxylierungsaktivität festgestellt werden.

Aufgrund des bisherigen Substratspektrums von CYP116B3 wurden weitere aromatische Substrate getestet. Es stellte sich heraus, dass CYP116B3 eine große Bandbreite von teilweise pharmazeutisch relevanten Aromaten hydroxylieren kann und die Varianten zum Teil eine erhöhte Aktivität sowie Regioselektivität aufweisen (Abbildung 21). Mit dem Wildtyp und den CYP116B3 Varianten wurden die aromatischen Verbindungen 4-Ethylphenol (**30**),

Anisol (**31**), Diphenylmethan (**32**), Allylbenzen (**33**) und 4-Allylanisol (**34**) zu zumeist mehreren Produkten umgesetzt.

Tabelle 6: Rational konstruierte Varianten des Substrateingangskanals und des F-G-Loops von CYP116B3. Die spezifischen Aktivitäten gegenüber dem natürlichen Substrat 7-Ethoxycoumarin (**22**) wurden über Fluoreszenzmessung des Produkts 7-Hydroxycoumarin (**23**) in Mikrotiterplatten ermittelt und mit dem Wildtyp verglichen. Ja/-: Aktivität; n.d.: P450-Konzentration unter der Startkonzentration von 0,5 μ M oder nicht detektierbar im CO-Differenzspektrum, weshalb hier die spezifische Aktivität nicht ermittelt werden kann.

CYP116B3 Varianten	Spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp [%]
	
CYP116B3 Varianten	Spezifische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp [%]
pET-22b(+)-empty	-
WT	100
F378A	9
F378A S377A	Ja / n.d.
F378A S377G	-
F378A E27A	56
F378A E27V	Ja / n.d.
F378A H139A	62
F378A H139V	78
F378A H139G	Ja / n.d.
F378T	50
F378T S377A	91
F378T S377G	Ja / n.d.
F378T E27A	Ja / n.d.
F378T E27V	Ja / n.d.
F378T H139A	95
F378T H139V	95
F378T H139G	30
F378T H139G A205T	152
F-G-Loop Varianten	
WT	100
F378A _short_1	-
F378A _short_2	-
F378A _short_3	-
F378A _short_4	-
F378A _BM-3	-
F378A _B1	-
F378A _C1	-

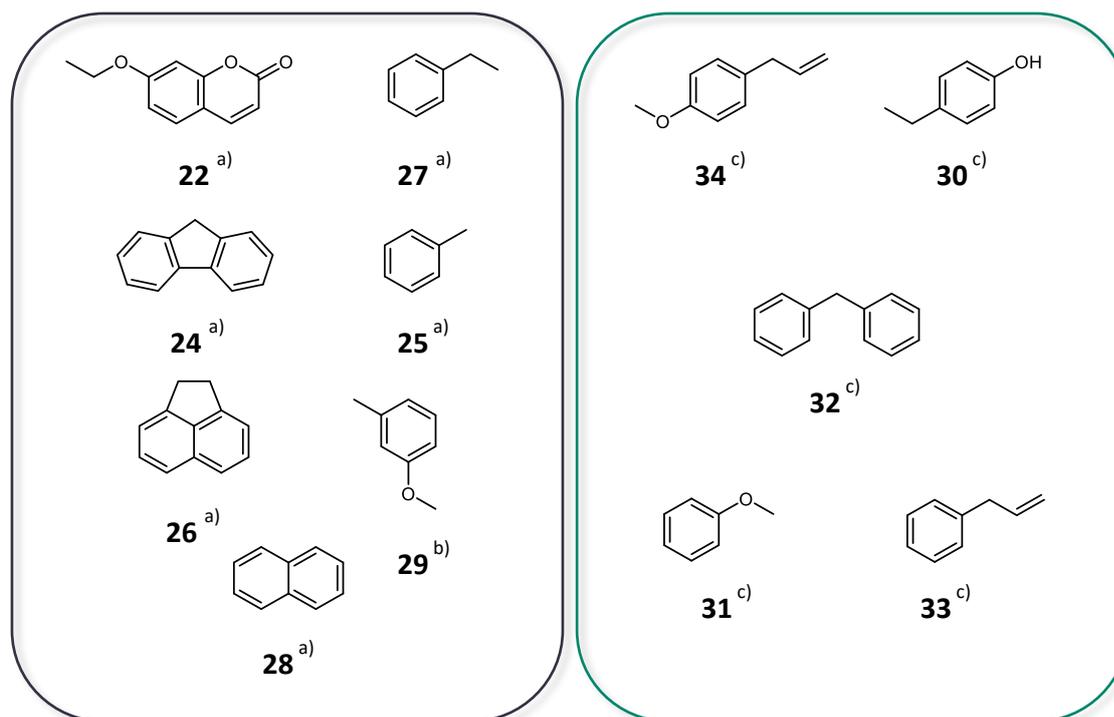


Abbildung 21: Substratspektrum von CYP116B3 aus *Rhodococcus ruber*. Identifiziert durch: a) Liu und Kollegen²⁹⁸ b) Dissertation Tobias Klaus²⁹⁹ c) Diese Arbeit.

Mit den generierten aktiven Enzymvarianten aus der Substratkanalbibliothek konnten zwar nicht die Zielterpene umgesetzt werden, allerdings wurden unterschiedliche planare aromatische Moleküle akzeptiert. Die Hydroxylierung erfolgte hierbei nahezu ausschließlich an den Seitenketten der Aromaten, was CYP116B3 zu einem interessanten Biokatalysator für solche Synthesen macht.

3.4 Identifikation neuer P450 Biokatalysatoren mittels Proteomanalyse

Neben der Untersuchung von promiskuitiven Reaktionen von P450s sowie der Mutagenese bieten klassische *Screenings* nach neuen P450s eine wissenschaftlich wertvolle Alternative. Natürliche Sekundärmetabolite oder Untersuchungen der Stoffwechselwege in Organismen können hierbei Hinweise über enthaltene Enzyme und deren physiologische Rolle implizieren. Oftmals sind Mono- oder Dioxygenasen entscheidende Bestandteile des Metabolismus und besitzen vor allem in den initialen Reaktionen eine wichtige Funktion. Eine Genomsequenzierung von *Arthrobacter* sp. respektive *Phenylobacterium immobile* Stamm E durch *Shotgun*-Sequenzierung am Institut für Technische Biochemie hat viele potenzielle neue P450 Monooxygenasen und weitere Oxidoreduktasen mit möglicher Hydroxylierungsaktivität hervorgebracht.^{301,302} Einen zielgerichteten Ansatz stellt die Proteomanalyse dar, mit der etwa im Fall eines Wachstums auf einer bestimmten Substanz als C-Quelle beteiligte Enzyme identifiziert werden können. Die Anzahl an möglichen

Proteinen kann dadurch stark eingeschränkt und gleichzeitig Informationen über potenzielle Substrate erhalten werden. Zur Identifikation neuer P450s für die Umsetzung der Terpene wurde zunächst das Wachstum beider Stämme auf Minimalmedium mit jeweils 0,1% des Terpens als alleinige C-Quelle untersucht (2.3.4). Während *P. immobile* Stamm E kein Wachstum auf den Terpenen **1 – 7** zeigte, war *Arthrobacter* sp. in der Lage auf α -Humulen (**3**), β -Bisabolen (**4**) sowie Premnaspriodien (**5**) als alleinige C-Quelle zu wachsen (Anhang 7.4.1, Abbildung S4). Letztgenannter Organismus wurde durch den Metabolismus des natürlich vorkommenden Alkaloids Papaverin (**35**) als alleinige C-Quelle beschrieben.²⁶⁴ Aufgrund der Komplexität handelt es sich bei Papaverin (**35**) um eine interessante Verbindung, deren zur Verstoffwechselung notwendigen Schlüsselenzyme bislang nicht identifiziert und charakterisiert sind. Daneben wurde ein weiterer Organismus getestet, der zwar nicht effektiv auf den Terpenen wachsen konnte, bei dem allerdings in Biotransformationen hydroxylierte Produkte der Terpene detektiert wurden (Abbildung 22). Dieser filamentöse Pilz *B. bassiana* besitzt 83 putative P450s³⁰³, weshalb auch in diesem Fall eine Proteomanalyse wertvolle Informationen liefern kann; die Proteinbiosynthese mancher P450s wird möglicherweise erst nach Exposition des Organismus mit einer xenobiotischen Verbindung als Schutzmaßnahme reguliert.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Proteomanalyse von *B. bassiana* beschrieben. Hierfür mussten die Proben aufgeschlossen und die Proteine freigesetzt werden. Die Kontrolle des Zellaufschlusses und gleichzeitige Analyse erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 2.4.3). Der Aufschluss des filamentösen Pilzes stellte sich als kritischer Faktor der Proteomanalyse heraus. Unterschiedliche chemische, mechanische und enzymatische Methoden erwiesen sich als nicht effizient genug, verdünnten die Probe zu stark oder führten zu Schmierbildung auf dem SDS-Gel. Schließlich gelang der Aufschluss am effektivsten unter stark reduzierenden Bedingungen in der Gegenwart von Harnstoff sowie vorhergehendem Zerreiben der gefriergetrockneten Zellprobe. Proben aus Biotransformationen mit den entsprechenden Substraten wurden letztendlich, wie in 2.3.10.3 beschrieben, aufgearbeitet und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

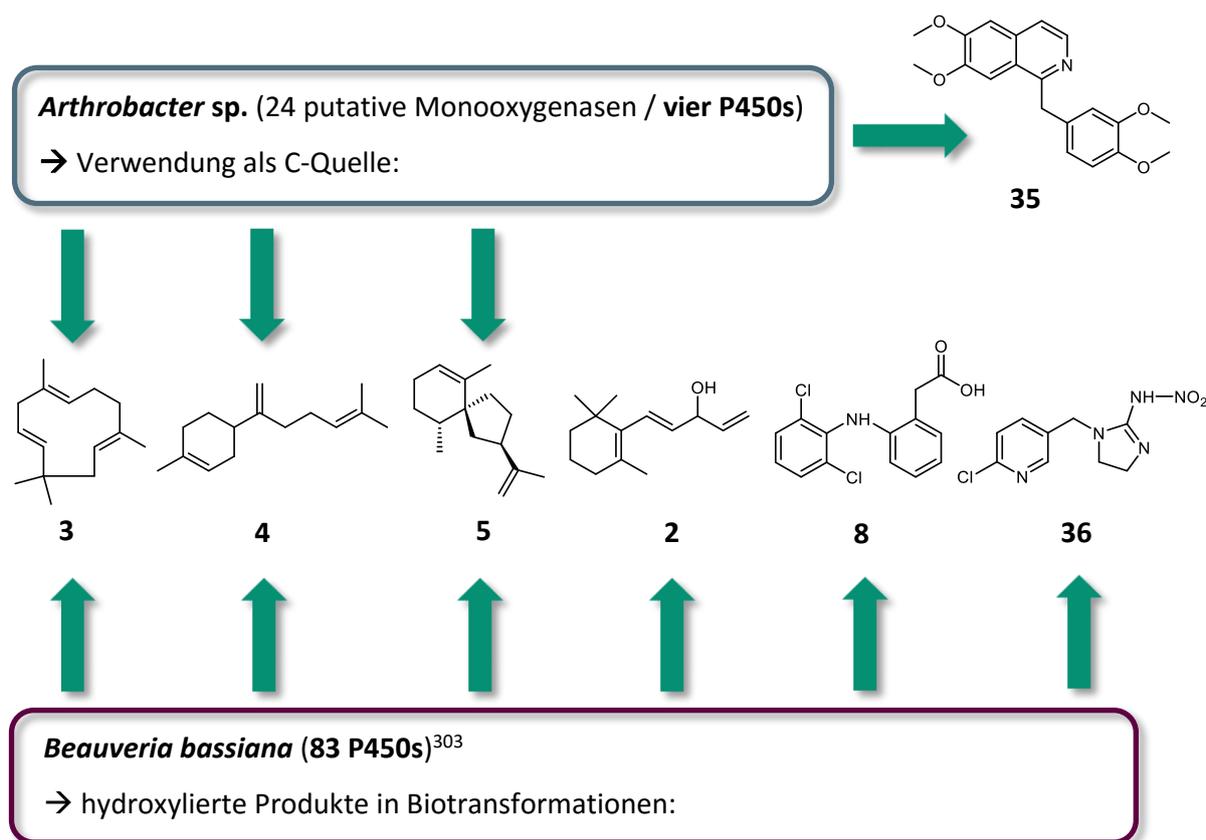
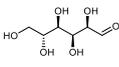
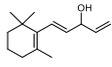
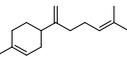
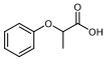
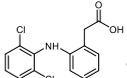
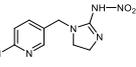


Abbildung 22: Übersicht der von *Arthrobacter sp.* metabolisierten und von *Beauveria bassiana* hydroxylierten Verbindungen. Die Wachstumsversuche erfolgten auf Minimalmedium mit 0,1% des Terpens. Für die Biotransformationen mit *B. bassiana* wurden 0,5 g L⁻¹ der Substrate eingesetzt. **2**: Vinylionol; **3**: α -Humulen; **4**: β -Bisabolon; **5**: Premnaspirodien; **8**: Diclofenac; **35**: Papaverin; **36**: Imidacloprid.

Einen der effektivsten Prozesse in der Biokatalyse stellt die Produktion der (*R*)-2-(4-Hydroxyphenoxy)-propionsäure mit *B. bassiana* dar, weshalb das Substrat 2-Phenoxypropionsäure (**120**) ebenfalls eingesetzt wurde. Zum einen wurde es als Positivkontrolle in Biotransformationen verwendet und zum anderen zur Herstellung einer Probe für die Proteomanalyse, um die katalysierenden P450s respektive das P450 zu identifizieren. Die Proteomanalyse erfolgte in Kooperation mit der Universität Hohenheim (Serviceeinheit Massenspektrometrie), an welcher Stelle die Proteine aus dem SDS-Gel isoliert, trypsinverdaut und die Fragmente analysiert wurden (2.4.4). Die Fragmente wurden schließlich mit dem in der NCBI-Datenbank enthaltenen Proteom von *B. bassiana* abgeglichen (Tabelle 7). Das Ergebnis zeigte zum Teil deutliche Hinweise auf mit den spezifischen Substraten hochregulierte P450s, impliziert durch die Anzahl an detektierten und zuzuordnenden Fragmenten. Neben einer NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, die in allen Proben identifiziert wurde, wurden mit Vinylionol (**2**) und Diclofenac (**8**) zwei P450s, CYP548A5 und CYP51F1, exklusiv detektiert, die in der Glucoseprobe als Referenz nicht feststellbar waren.

Tabelle 7: Ergebnisse der Proteomanalyse der mit unterschiedlichen Substraten durchgeführten Biotransformationen mit *B. bassiana*. Die Zahl steht für die Anzahl an eindeutig zuzuordnenden Peptidfragmenten zu einem Protein. Eine höhere Zahl bedeutet eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass das Protein tatsächlich in der Probe vorliegt. Eine Probe mit Glucose als Substrat diente als Referenz.

								
	Glc	2	3	4	5	120	8	36
NADPH-CYP-Reduktase	14	12	13	1	14	10	9	4
CYP52A10	2	0	11	0	8	11	0	0
CYP52A13	5	0	0	2	9	0	0	1
CYP548A5	0	4	0	0	0	0	5	0
CYP51F1	0	7	2	0	0	0	1	0
CYP52X1	0	0	3	1	0	0	0	0
CYP684A2	0	0	0	0	0	2	0	0
CYP505D4	0	0	1	0	0	0	0	0

Mit α -Humulen (**3**) wurde im Vergleich zu Glucose eine hohe Anzahl an Fragmenten von CYP52A10 detektiert, was auf ein häufigeres Vorkommen des Proteins hindeuten kann. Gleichzeitig wies die Probe Fragmente von CYP51F1, CYP52X1 sowie CYP505D4 auf. Im Falle von β -Bisabolon (**4**) wurde eine geringe Anzahl von Fragmenten gefunden, die CYP52A13 und CYP52X1 zugeordnet werden konnten. Die Probe mit Premnaspriodien (**5**) enthielt eine höhere Anzahl Fragmente von CYP52A10 und CYP52A13 als die Referenz. In der Probe mit 2-Phenoxypropionsäure (**120**) als Substrat wurden ausschließlich Fragmente von CYP684A2 sowie elf Fragmente von CYP52A10 gefunden. Die Biotransformation mit Imidacloprid (**36**) ergab die geringste Anzahl an festgestellten Fragmenten mit lediglich einem Fragment, das CYP52A13 zugeordnet werden konnte. Interessanterweise wurde das Spektrum von 83 potenziell involvierten P450s auf sieben exprimierte P450s reduziert, die teilweise in mehreren Proben zu finden waren.

Durch die Proteomanalyse von *Arthrobacter* sp., der die Fähigkeit aufweist Papaverin (**35**) und einige Terpene als alleinige C-Quelle zu verwerten, lassen sich möglicherweise P450s identifizieren, die essenzielle Schritte im Metabolismus dieser xenobiotischen Stoffe katalysieren. Ähnlich zu *B. bassiana* war auch mit diesem Organismus die Zellyse ein

kritischer Faktor der Proteomanalyse. Der gram-positive *Arthrobacter* sp. ließ sich kaum durch chemische, mechanische und enzymatische Methoden aufschließen. Letztendlich gelang die Zellyse, wie in 2.3.10.2 beschrieben, mit einer Kombination aus unterschiedlichen Methoden. Nach Schwächung der Zellwand durch Lysozym erfolgte der Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisator unter maximalem Druck von 1700 bar. Rückstände von DNA in den Proben wurden durch Ultraschall geschert. Die Kulturen wurden mit den C-Quellen bis zu einer OD_{600} von etwa 2,0 kultiviert, wobei im Falle von α -Humulen (**3**) ein geringeres Wachstum auftrat (Anhang 7.4.1, Abbildung S4) und Glucose als Co-Substrat für die Generierung ausreichender Zellmasse eingesetzt wurde. Die Proteine der aufgeschlossenen Proben wurden durch die SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennt und analysiert. Für eine detailliertere Untersuchung bezüglich der Lokalisation der Proteine im Organismus wurde die lösliche Fraktion (Lysat) von der unlöslichen Fraktion (*Debris*, Membranproteine etc.) separiert aufgetragen (Abbildung 21). Auf dem SDS-Gel konnten zum Teil deutliche Unterschiede in den Proteinbandenmustern und das Expressionslevel implizierenden Stärke der Banden der verschiedenen Proben festgestellt werden (Abbildung 21, rote Pfeile).

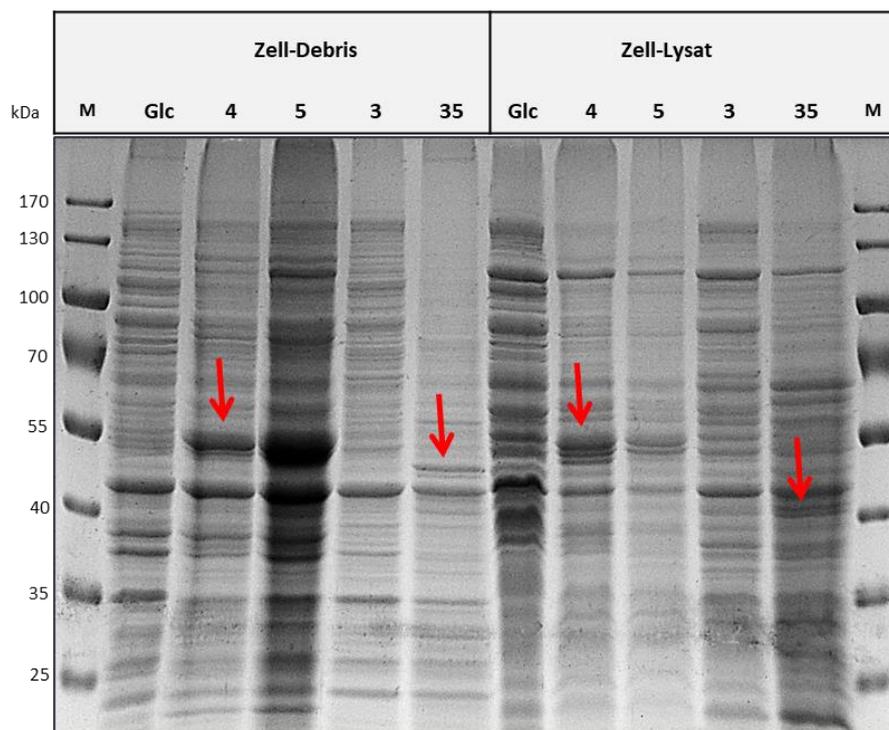


Abbildung 21: SDS-Polyacrylamidgel der auf unterschiedlichen C-Quellen gewachsenen *Arthrobacter* sp. Kulturen. Auf dem 10%igen SDS-Gel wurde die *Debris*- und Lysat-Fractionen getrennt aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels kolloidaler Coomassie Färbung. **Glc**: Glucose (Referenz); **3**: α -Humulen + 0,2% Glucose; **4**: β -Bisabolen; **5**: Premnaspirdien; **35**: Papaverin.

Die Proteomanalyse erfolgte wiederum in Kooperation mit der Universität Hohenheim. Identifizierte Fragmente wurden schließlich mit einer Oxidations-Reduktions-Proteinliste von *Arthrobacter* sp. sowie der Proteindatenbank NCBI verglichen. Hierbei ließen sich vor allem in den mit Papaverin versetzten Proben zwei P450s eindeutig identifizieren (Tabelle 8).

Die Tatsache, dass diese nicht in der mit Glucose versetzten Negativkontrolle gefunden wurden, stellt ein Indiz für die Beteiligung der beiden P450s am Papaverin-Metabolismus dar.

Tabelle 8: Ergebnisse der Proteomanalyse der auf unterschiedlichen C-Quellen gewachsenen *Arthrobacter* sp. Zellen. Die *Debris*-Fraktionen sind den Lysat-Fraktionen ähnlich und sind deshalb zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die Zahl steht für die Anzahl an eindeutig zuzuordnenden Peptidfragmenten zu einem Protein. Eine höhere Zahl impliziert eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass das Protein in der Probe vorliegt. Weitere relevante Proteine, die nicht in der Proteomanalyse detektiert werden konnten, jedoch zu potenziellen *Clustern* zugeordnet werden können, sind ebenfalls aufgeführt. Die finale Annotierung der P450s wurde dankenswerterweise durch Prof. David Nelson anhand der allgemeinen P450-Nomenklatur durchgeführt. **Glc**: Glucose (Referenz); **3**: α -Humulen + 0,2% Glucose; **4**: β -Bisabolon; **5**: Premnaspirodien; **35**: Papaverin.

	Identifizierte Proteine (durch Blast search: 76 insgesamt)	Kurzform (in dieser Arbeit)	Molekular- gewicht	C-Quelle				
				Glc	3	4	5	35
				Lysat	Lysat	Lysat	Lysat	Lysat
Cluster 1	CYP1232A24		46 kDa	0	0	0	0	7
	CYP1232F1		44 kDa	0	0	0	0	6
	Ferredoxin-NADP(+) Reduktase	(FeRed_1)	43 kDa	0	0	0	0	4
	Flavodoxin	(FldX)	20 kDa	Keine Fragmente detektiert				
	Flavin-Reduktase	(FlavRed)	22 kDa	Keine Fragmente detektiert				

Beide Gene liegen direkt hintereinander auf dem Genom von *Arthrobacter* sp. und kommen dort in einem möglichen *Cluster* mit einer Ferredoxin-Reduktase FeRed_1, die ebenso ausschließlich in der mit Papaverin versetzten Probe detektiert wurde, einer zweiten Reduktase FlavRed und eines putativen Flavodoxins FldX vor (Abbildung 22).

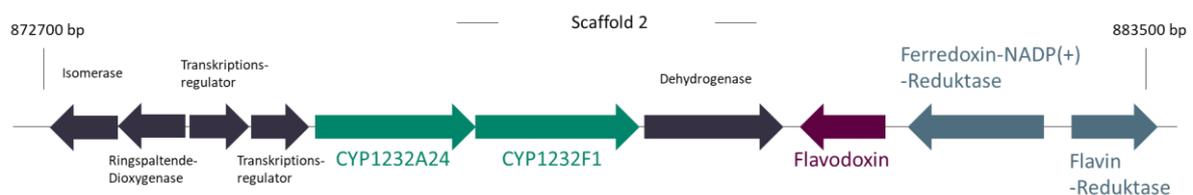


Abbildung 22: Potenzielles *Cluster* auf dem Genom (Scaffold 2) von *Arthrobacter* sp. Die durch Proteomanalyse mit Papaverin als C-Quelle identifizierte P450s liegen direkt hintereinander auf dem Genom und sind möglicherweise mit ihren Redoxpartnern in der nahen Umgebung *geclustert*.

Häufig sind P450 Enzyme und ihre Elektronentransferpartner weit verstreut auf dem Genom zu finden. Die Entdeckung und Identifikation potenzieller *Cluster* in *Arthrobacter* sp. ist daher von hoher Relevanz.

3.4 Klonierung, Expression und Charakterisierung neuer P450 Biokatalysatoren

Die Proteomanalysen von *B. bassiana* und *Arthrobacter* sp. ergaben erste Hinweise auf Biokatalysatoren, die für die Fähigkeit, Verbindungen in Biotransformationen zu hydroxylieren oder Verbindungen als alleinige C-Quelle zu metabolisieren, verantwortlich sein können. Der entscheidende, aber auch problematischere, folgende Schritt ist jedoch, die entsprechenden Biokatalysatoren in funktionaler Konformation zu exprimieren und eine physiologische oder nicht-physiologische Aktivität herzustellen. Letzteres kann im Falle des komplexen Multikomponentensystems der P450-Monooxygenasen ein kritisches Problem darstellen. Neben der Suche nach akzeptierten Substraten müssen funktionale Systeme mit elektronenliefernden Redoxpartnern zur Rekonstitution der P450-Aktivität gefunden werden.

Die Ergebnisse der Proteomanalyse von *B. bassiana* legten nahe, ausgewählte P450s zu klonieren und deren Aktivität mit den entsprechenden Substraten zu überprüfen. Gleichzeitig wurden in allen Proben Fragmente einer bifunktionalen Reduktase als elektronenliefernder Redoxpartner detektiert (Tabelle 7). Die Klonierung der Proteine kann schließlich durch zwei mögliche Verfahrensweisen ermöglicht werden. Zum einen die Isolation der mRNA aus den Biotransformationszellen, die durch die reverse Transkriptase in cDNA übersetzt und in einen geeigneten Vektor kloniert werden kann, oder zum anderen die Verwendung von synthetischen codonoptimierten Genen für die heterologe Expression in *E. coli*. Zunächst wurde letztere Vorgehensweise gewählt, da auch die bisherigen Reaktionskaskaden zur Herstellung von Terpenen der Kooperationspartner in *E. coli* etabliert sind. Gleichzeitig bietet die heterologe Expression in *E. coli* einige Vorteile, wie ein etabliertes sowie simples System und in der Regel hohe Ausbeuten. Insgesamt drei P450s, CYP52A10, CYP548A5 sowie CYP51F1, wurden hinsichtlich der Ergebnisse aus der Proteomanalyse und der Zuordnung zu unterschiedlichen P450-Unterfamilien als interessante Kandidaten für die Gensynthese ausgewählt. Daneben wurde bei der Firma Invitrogen ebenso ein codonoptimiertes Gen für die bifunktionale Reduktase in Auftrag gegeben (2.1.4). Alle Gene wurden in ihrem Klonierungsplasmid vermehrt und anschließend über *Nde*I- und *Hind*III-Schnittstellen in das Expressionsplasmid pCWori(+) kloniert (2.2.11 und 2.2.12), das häufig für die Expression von eukaryotischen P450s Verwendung findet.^{71,304–306} Alle P450s ließen sich löslich exprimieren, jedoch in inaktiver Form, gekennzeichnet durch ein Maximum bei 420 nm im CO-Differenzspektrum (2.4.5.2). Auch die Verwendung von Expressionsstämmen, die fähig sind Disulfidbrücken zu bilden (2.1.5), konnte keine Verbesserung bewirken. Während die funktionale Expression von eukaryotischen Proteinen in Prokaryoten unter anderem aufgrund des Fehlens von posttranslationalen Modifikationen schwer zu erreichen ist oder nur sehr gering ausfällt, wurden die Ergebnisse der Proteomanalyse gleichzeitig an zwei Kooperationspartnern für das Ziel einer heterologen Expression der P450s in *S. cerevisiae*

sowie *Aspergillus* sp. weitergegeben. Diese Arbeiten werden von den Kooperationspartnern zurzeit noch durchgeführt.

Im Falle von *Arthrobacter* sp. wurden zusätzlich zu den in der Proteomanalyse identifizierten Enzymen, zwei weitere P450s im Genom durch NCBI-Blast annotiert. Diese wurden zusammen mit allen in Tabelle 3 aufgeführten Proteinen erfolgreich von der genomischen DNA amplifiziert (2.2.2 sowie 2.2.8) und in pET-28a(+) kloniert. Gleichzeitig erfolgte der Austausch von in *E. coli* seltenen Start- und Stopcodons durch gängigere mittels der zur Amplifikation eingesetzten Primer (Anhang 7.5). Die Expression der *Arthrobacter*-Proteine (vier P450s und die in den *Clustern* befindlichen Redoxpartner) wurden aufgrund des hohen GC-Gehalts der Gensequenzen und der zahlreichen *rare codons* bevorzugt im *E. coli* Stamm Rosetta(DE3) durchgeführt und unterschiedliche Expressionsbedingungen getestet. Drei der vier P450s ließen sich auch nach umfangreichen Versuchen mit weiteren Expressionsstämmen, unterschiedlichen Medien und Expressionstemperaturen nicht in hinreichenden Mengen exprimieren und wurden dementsprechend mittels Restriktionsverdau und Ligation (2.2.2 sowie 2.2.8) oder *Gibson Assembly*[®] (2.2.10) in die Vektoren pCWori(+) und pBAD33 umkloniert und erneut getestet. Hier zeigte sich eine teils enorme Steigerung an potenziell aktiven P450 Enzymen, was schließlich die erfolgreiche Aufreinigung mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC, 2.4.1.1) oder Ionenaustausch-Chromatographie (IEX, 2.4.1.2), falls keine Fusion mit einem His₆-tag vorlag, ermöglichte (Tabelle 9). Alle aufgereinigten P450s konnten dem kalkulierten Molekulargewicht entsprechend auf einem Kontroll-SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden (2.4.3, Abbildung 23).

Tabelle 9: Expression der *Arthrobacter* sp. P450s. Angegeben sind die Expressionsbedingungen sowie die durch CO-Differenzspektroskopie gemessene Konzentration an funktionalem P450 im Zellysate.

P450	Molare Masse [kDa]	Expressionsvektor	Expressionsstamm	Expressions-temperatur über Nacht [°C]	P450-Konzentration [µmol L ⁻¹ (Zellkultur)]
CYP1232A24	46	pBAD33	<i>E. coli</i> JW5510	20	0,57
CYP1232F1	44	pCWori(+)	<i>E. coli</i> DH5-α	20	1,47
CYP1005C4	43	pET-28a(+)	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	25	0,66
CYP199A25	46	pBAD33	<i>E. coli</i> JW5510	20	4,24

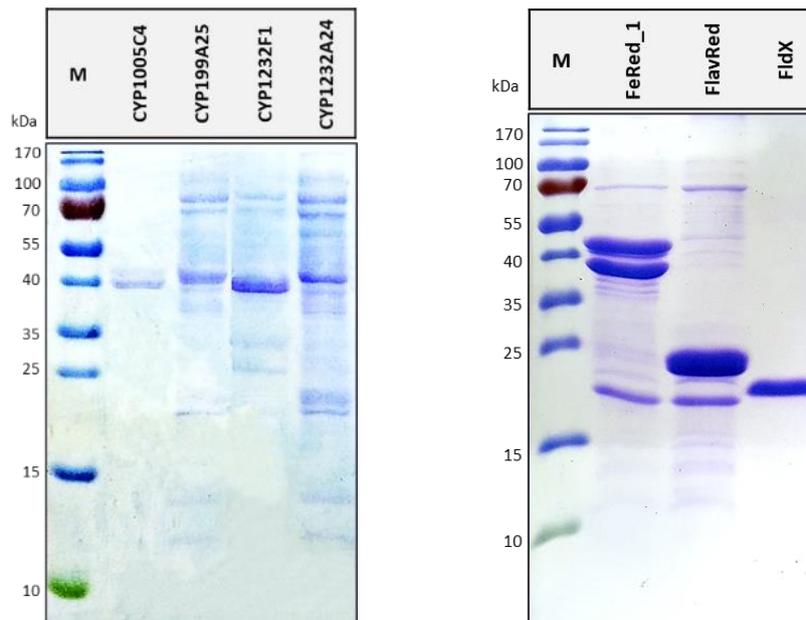


Abbildung 23: Proteinaufreinigungen der P450s und physiologischen Redoxpartner aus *Arthrobacter* sp. Während CYP1005C4, FeRed_1, FlavRed und FldX über IMAC aufgereinigt wurde, erfolgte die Aufreinigung von CYP199A25, CYP1232F1 und CYP1232A24 mittels IEX. Die Eluate wurden über 15%ige SDS-Gele ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Alle aufgenommenen CO-Differenzspektren zeigten den für P450s typischen *Shift* des Soret-Bandes mit einem Maximum bei etwa 450 nm (Abbildung 24). Von den potenziellen Redoxpartnern konnten schließlich mittels Expression von pET-28a(+) in *E. coli* Rosetta(DE3) lösliche Zielproteine im Zellysat erhalten werden (2.3.8). Nach IMAC Aufreinigung (2.4.1.1) wurde der Erfolg über SDS-PAGE kontrolliert (2.4.3). Hierbei konnten deutlich überexprimierte, aufgereinigte Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 23). Von den Redoxpartnern wurden Spektren von 300 – 600 nm für eine erste Charakterisierung aufgezeichnet. Mittels der Bestimmung der Absorption und des Extinktionskoeffizienten der Proteine bei der spezifischen Wellenlänge lassen sich ähnlich zu den CO-Differenzspektren exakte Konzentrationswerte bestimmen. Insgesamt wies jedoch nur FeRed_1 ein eindeutiges Absorptionsmaximum bei 373 und 454 nm auf (Anhang 7.4.2, Abbildung S5). Die Bestimmung des zugehörigen Extinktionskoeffizienten wurde im Rahmen einer betreuten Masterarbeit von Julia Hallmen durchgeführt (2.4.5.1).²⁸¹ Für FeRed_1 wurde der Extinktionskoeffizient auf ϵ_{454} : 10,69 mM⁻¹ cm⁻¹ bestimmt und zur Konzentrationsmessung verwendet.

Häufig können die physiologischen Redoxpartner nicht direkt identifiziert oder unter deren Verwendung nur geringe Aktivitäten festgestellt werden. Oftmals kann dies durch den Einsatz von Redoxsystemen aus anderen Organismen kompensiert werden. Aus diesem Grund wurden gleichzeitig drei nicht-physiologische Redoxpartnersysteme aus *E. coli* (FdR und FdX), *P. putida* (CamA und CamB) sowie die *bovinen* AdR und AdX ausgewählt, exprimiert und erfolgreich über IMAC oder IEX aufgereinigt (2.3.8, 2.4.1.1 sowie 2.4.1.2, Abbildung 25). Beispiele aus der Literatur haben gezeigt, dass, obwohl die physiologischen Partner der

meisten P450 Enzyme noch nicht identifiziert wurden, eine Aktivität durch nicht-physiologische Reduktasen und Ferredoxine wiederhergestellt werden kann.^{37,54,121,307-310}

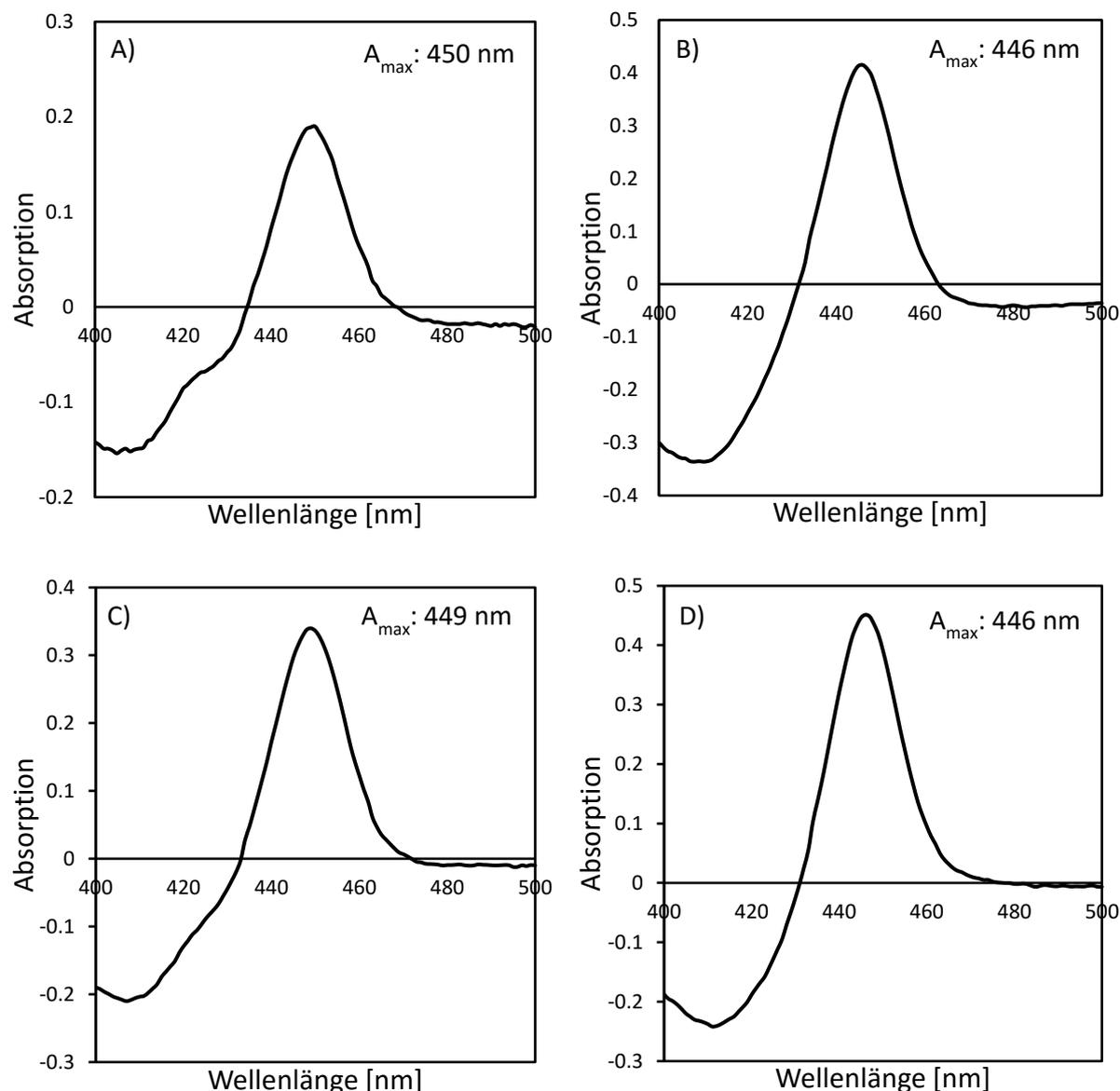


Abbildung 24: Charakterisierung der neuartigen P450s aus *Arthrobacter* sp. mittels CO-Differenzspektren. A) CYP1232A24; B) CYP1232F1; C) CYP199A25; D) CYP1005C4.

Zusätzlich zu den heterologen Redoxpartnern wurde CYP109B1 aus *B. subtilis* ausgewählt, um als Positivkontrolle zu fungieren. Dieses P450 ist in der Lage, β -Ionon (**1**) in allylischer Position zu 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) zu hydroxylieren sowie Valencen (**7**) zu oxidieren.³¹¹ Die Reaktionsbedingungen für die neuen P450s sollten durch die Positivkontrolle vorab getestet und die Aktivität der heterologen Redoxpartner bestätigt werden.

Für die erstmalige Charakterisierung von P450s stellt insbesondere die Identifizierung der richtigen Kombination aus P450, Redoxpartnern und Substrat eine Herausforderung dar. Eine häufige Methode beinhaltet den Vergleich der P450-Aminosäuresequenzen. Neue P450s können dadurch möglicherweise P450-Familien oder -Unterfamilien zugeordnet werden, wodurch erste Hinweise auf potenzielle Substrate erhalten werden können. Denn oftmals

weisen P450s aus derselben Familie ähnliche Substratspektren auf. Bei den Enzymen aus der CYP102 Familie, die auch das am besten charakterisierte CYP102A1 (P450 BM3) umfasst, handelt es sich z.B. typischerweise um Fettsäure-Hydroxylasen.³¹²⁻³¹⁴ Ist eine solche Einordnung aufgrund einer zu niedrigen Identität zu bekannten P450s nicht möglich (< 40%), stehen weiterhin indirekte und direkte Methoden für die initiale Charakterisierung zur Verfügung. Zum einen kann die Abnahme des Cofaktors NAD(P)H während der Reaktion verfolgt und so die Aktivität unabhängig vom eingesetzten Substrat (indirekt) gemessen werden.³¹⁵ Andererseits kann die Interaktion mit dem Redoxpartner durch CO-Differenzspektroskopie³¹⁶ oder die durch Substratbindung initiierten *Spin-Shifts*²⁸⁴ direkt ermittelt werden.

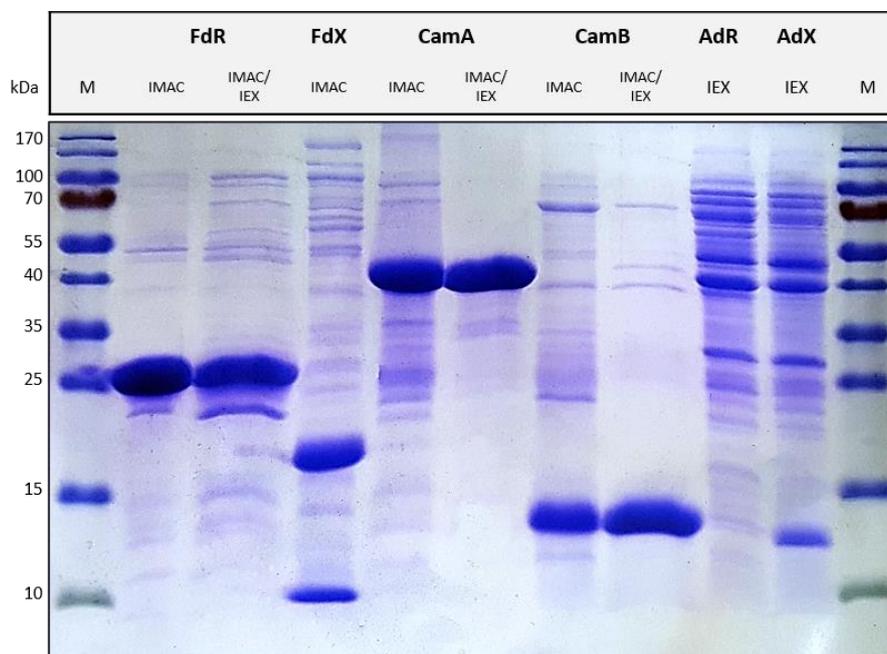


Abbildung 25: SDS-Polyacrylamidgel der in dieser Arbeit eingesetzten, aufgereinigten heterologen Redoxpartner. Die Proteine wurden mit Hilfe eines His₆-tag über IMAC und/oder über IEX gereinigt. FdR und FdX (aus *E. coli*), CamA und CamB (*P. putida*) sowie AdR und AdX (*Bos taurus*) wurden über ein 15%iges SDS-Gel aufgetrennt.

Für die Untersuchung der Verwandtschaft der *Arthrobacter* sp. P450s zu bereits annotierten P450s wurde der Abgleich durch einen globalen NCBI-Blast sowie durch David Nelson's P450 blast server durchgeführt (2.7.3). Alle P450s konnten Familien respektive Unterfamilien (> 55% Sequenzidentität) zugewiesen werden, anhand derer auch die Namensgebung erfolgte. Den Mitgliedern der CYP1232 und CYP1005 Familie konnte bislang keine Funktion zugewiesen werden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Aminosäuresequenzvergleiche der *Arthrobacter* sp. P450s. Die Vergleiche wurden anhand der NCBI-Datenbank und des Blast-Server der Cytochrom P450 Homepage durchgeführt.

Verwandschaftsanalyse					
P450 Name	Spezies	P450 Name	Gen ID	% Identität	Familienmitglied charakterisiert
CYP1232A24	<i>Leucobacter salsicius</i>	CYP1232A16	WP_017792084	62	Nein
CYP1232F1	<i>Citricoccus</i> sp.	CYP1232E5	WP_010145742	48	Nein
CYP1005C4	<i>Paenarthrobacter aurescens</i>	CYP1005C3	WP_043805855	87	Nein
CYP199A25	<i>Rhodococcus opacus</i>	CYP199A17	WP_005256572	75	Ja ^{261,317}

Dagegen existieren in der CYP199A Unterfamilie bereits zwei charakterisierte P450s aus *Rhodopseudomonas palustris* Stämmen (CYP199A2 und CYP199A4) mit einer 57%igen Sequenzidentität zu CYP199A25. Die Einordnung weist auf ein mögliches Substratspektrum aus substituierten Benzoesäuren- und Zimtsäurederivaten hin.^{261,317}

3.4.1 Rekonstitution der Aktivität der P450s aus *Arthrobacter* sp.

Für die Rekonstitution der Aktivität muss neben dem passenden Substrat gleichzeitig die Funktionalität aller Komponenten gegeben sein. Zur Untersuchung des Elektronentransfers von der Reduktase auf das entsprechende Ferredoxin oder Flavodoxin wurde in einer betreuten Masterarbeit (Julia Hallmen) der Cytochrom C Assay verwendet.²⁸¹ Spektroskopisch wird hierbei die Reduktion von Cytochrom C durch die Elektronen der Redoxpartner verfolgt.²⁸² Hohe Übertragungseffizienzen konnten zwischen den Elektronentransferpartnern mit einem Überschuss an Ferredoxin oder Flavodoxin erzielt werden. Zusätzlich wurde die Aktivität mit CYP109B1 und β -Ionon (**1**) als Substrat überprüft. Hohe Umsatzraten *in vitro* konnten mit den Kombinationen FdR und FdX sowie CamA und CamB erhalten werden, jedoch nur geringe mit AdR und AdX (2.5.2). Aus diesem Grund wurde die funktionale Kombination FdR und AdX getestet,³¹⁸ die in einer höheren Aktivität resultierte und deshalb in den folgenden Experimenten anstatt AdR und AdX verwendet wurde.

Aufgrund der Hinweise aus der Verwandschaftsanalyse erfolgte die Herstellung der Aktivität von CYP199A25 in dieser Masterarbeit zunächst mit einem fokussierten Substratpanel aus *para*-substituierten Benzoesäurederivaten *in vitro* (2.5.2).²⁸¹ Die Biotransformationen wurden nach Derivatisierung mittels GC-FID analysiert (2.6.1). Erste positive Tests konnten mit 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) in Kombination mit den Redoxpartnern CamA und CamB erzielt werden, während mit FdR und AdX sowie FdR und FdX keine Aktivität festgestellt wurde. Die 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) wurde dabei selektiv in *para*-Position zur

3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (**48**) demethyliert. Mit einem 15-fachen Überschuss des Ferredoxins CamB sowie einer äquivalenten Menge CamA und CYP199A25 wurde das Substrat fast vollständig regioselektiv umgesetzt, während eine Steigerung des Reduktase-Anteils oder Reduzierung des Ferredoxin-Überschusses zu einer Verringerung des Umsatzes nach 24 h führte.

Für CYP1005C4 wurden keine Hinweise aus der Verwandtschaftsanalyse oder Proteomanalyse erhalten. Erste Charakterisierungen hinsichtlich Redoxpartner und möglicher Substrate mittels Spektroskopischer Methoden boten sich zunächst an. Die Reduktion des P450 im CO-Differenzspektrum durch die Redoxpartnern zur Untersuchung, ob ein Elektronentransfer möglich ist,³¹⁶ wurde mit und ohne Substrat durch CYP109B1 als Positivkontrolle getestet. Dabei konnte kein *Shift* des Soret-Bandes zu 450 nm und damit kein Elektronentransport gemessen werden, obwohl *in vitro* hohe Aktivitäten nachweisbar waren. Diese Methode wurde dementsprechend nicht weiterverfolgt. Die Messung von *Spin*-Verschiebungen bietet ein schnelles Verfahren potenzielle Substrate zu identifizieren, jedoch kommt es häufig zu falsch-positiven Ergebnissen³¹⁸ oder es werden trotz Aktivität keine *Spin-Shifts* induziert.⁷⁸ In Zusammenarbeit mit Julia Hallmen wurde deshalb zunächst an einer häufig eingesetzten, schnellen und indirekten *Screening*-Methode mittels Determinierung der Abnahme der Cofaktors NAD(P)H durch die P450-katalysierte Reaktion gearbeitet. Die Hintergrundaktivität der eingesetzten Komponenten (CYP109B1 plus Redoxpartner) war selbst ohne Substrat jedoch zu hoch, um ein zuverlässiges initiales Substratscreening zu erlauben. Die Hintergrundaktivität der enthaltenen NAD(P)H-abhängigen Proteine konnte selbst nach zweifacher Aufreinigung (Abbildung 25) nicht substantiell reduziert werden. Aus diesem Grund erfolgte das *Screening* nach Substraten für CYP1005C4 in Kombination mit allen drei heterologen Redoxpartnern mittels *in vitro* Biotransformationen und GC- sowie HPLC-Analytik (2.5.2, 2.6.1 und 2.6.2). In der betreuten Masterarbeit wurden über 100 Verbindungen aus unterschiedlichen Stoffklassen getestet, ohne Identifikation eines positiven Substrats.²⁸¹

Bei den beiden der CYP1232 Familie zuzuordnenden P450s aus *Arthrobacter* sp. waren ebenfalls keine charakterisierten Familienmitglieder bekannt (Tabelle 10). Die Ergebnisse aus der Proteomanalyse lieferten jedoch Hinweise auf potenzielle Substrate. Sowohl CYP1232A24 als auch CYP1232F1 wurden in der Proteomanalyse nur in der auf Papaverin (**35**) als alleinige C-Quelle gewachsenen Kultur detektiert (Tabelle 8). Die Untersuchung der Abbauprodukte von Papaverin wurde bereits vor über 35 Jahren durchgeführt und beinhaltet mehrere mögliche P450-katalysierte Reaktionen ohne Kenntnis der letztlich beteiligten Proteine.^{264,319} Darunter die Hydroxylierung von Papaverin (**35**) und die Demethylierung von 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**). Beide Reaktionen wurden zunächst untersucht. Mittels der heterologen Redoxpartner wurde *in vitro* keine Aktivität gegenüber Papaverin (**35**) festgestellt (2.5.2 und 2.6.2). Allerdings wurde die 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) mit

CYP1232F1 in Kombination mit CamA und CamB nahezu vollständig umgesetzt, während CYP1232A24 eine minimale Aktivität zeigte. Beide P450s kommen in einem potenziellen *Cluster* mit Redoxpartnern auf dem Genom vor, von denen eine Reduktase ebenfalls in der Proteomanalyse mit Papaverin (**35**) identifiziert wurde (FeRed_1, Tabelle 8). Beide Enzyme wurden deshalb auch mit den potenziellen physiologischen Redoxpartnern FeRed_1 und FldX getestet. Die eingesetzte Konzentration von FeRed_1 betrug das 1,5-fache der P450s bei 30 µL aufgereinigter FldX-Lösung (2.5.2). Hierbei zeigten beide Enzyme eine hohe Demethylierungsaktivität mit NADPH als Cofaktor. Während CYP1232F1 die 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) in *para*-Position zur Homovanillinsäure (**40**) vollständig umsetzte, erfolgte mit CYP1232A24 eine vollständige zweifache Demethylierung zur 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**).

Insgesamt konnten mit drei P450s aus *Arthrobacter* sp. erste Aktivitäten gefunden werden, die vielfältige Möglichkeiten einer weiteren Charakterisierung erlauben. Durch die Proteomanalyse sowie Verwandtschaftsanalyse zu bereits charakterisierten P450s wurden entscheidende Informationen zur Rekonstitution der Aktivität erhalten. Sowohl physiologische als auch nicht-physiologische Redoxpartner waren hierbei in der Lage Elektronen für die P450-katalysierte Reaktion zu liefern. Mit CYP1232A24 und CYP1232F1 wurde schließlich ein seltenes physiologisches P450 Klasse III-System mit dem Flavodoxin FldX und der Ferredoxin-Reduktase FeRed_1 gebildet.

3.5 Weiterführende Charakterisierung der P450s aus *Arthrobacter* sp.

Die Erfassung der funktionalen Kombination aus P450, Redoxpartnern und passendem Substrat erlaubten die Möglichkeit für weitere Charakterisierungen. Enzymeigenschaften wie das katalysierte Substratspektrum, Selektivitäten sowie *in vitro* und *in vivo* Aktivitäten können schließlich erforscht werden, wodurch eine nahezu vollständige Charakterisierung der neuen P450s erreicht wird. Die Tatsache, dass z.B. mit den P450s der CYP1232 Familie aus *Arthrobacter* sp. eine erste Funktion gefunden wurde, macht die weitergehende Charakterisierung besonders interessant.

3.5.1 Untersuchung der Redoxpartner und des Substratspektrums der P450s aus *Arthrobacter* sp.

Das Substratspektrum von CYP199A25 wurde im Rahmen der betreuten Masterarbeit (Julia Hallmen) weitergehend untersucht.²⁸¹ Insbesondere *para*- und *meta*-substituierte Benzoessäure-, Phenylelessigsäure-, sowie Zimtsäurederivate kamen hierbei zum Einsatz (Abbildung 26).

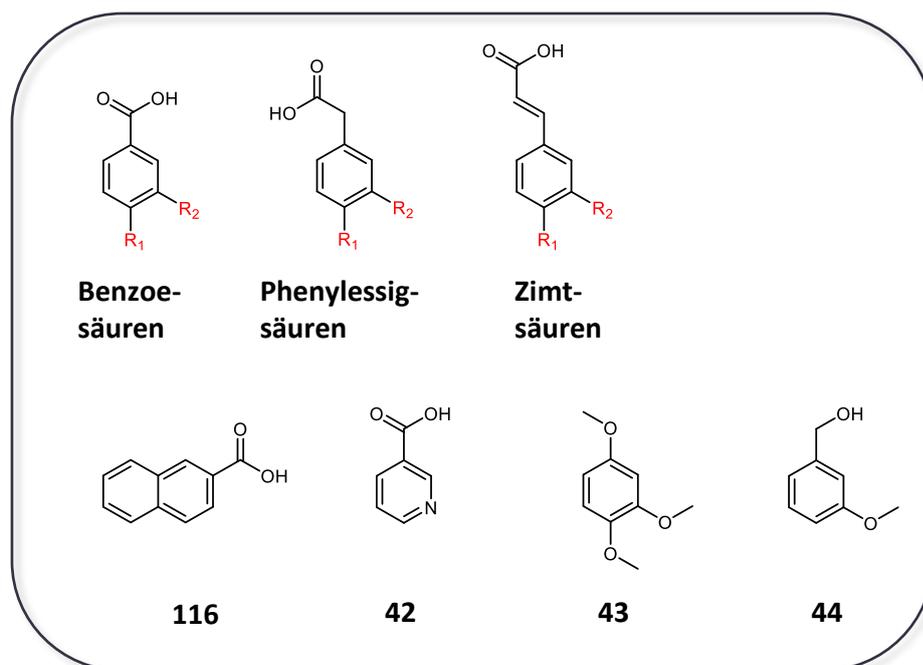


Abbildung 26: Ausgewählte Substrate für die *in vitro* Biotransformation mit CYP199A25. **42**: Nikotinsäure; **43**: 1,2,4-Trimethoxybenzen; **44**: (3-Methoxyphenyl)-methanol; **116**: 2-Naphthoesäure.

Darüber hinaus wurden strukturell ähnliche Verbindungen ausgewählt, um den Einfluss der Säuregruppe und des Aromaten zu untersuchen. Aufgrund des Fokus dieser Arbeit auf Terpene erfolgten Tests sowohl mit den Zielterpenen (**1** – **7**) als auch mit Monoterpenen. Insgesamt wurden durch *in vitro* Biotransformationen mit CamA und CamB als Redoxpartner (2.5.2) sieben positive Substrate erhalten und, falls vorhanden, das Produkt durch einen Produktstandard verifiziert. Neben der bereits bekannten 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**, 95% Umsatz) wurden 4-Methoxybenzoesäure (**37**, > 99% Umsatz), *p*-Toluylsäure (**49**, 50% Umsatz), 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (**45**, 45% Umsatz), 4-Methoxyzimtsäure (**60**, 15% Umsatz) sowie 4-Ethylbenzoesäure (**51**) und 4-Isopropylbenzoesäure (**57**) als Substrate akzeptiert (Abbildung 27). Die Demethylierung oder Hydroxylierung erfolgte hierbei regioselektiv ausschließlich in *para*-Position. Im Falle von 4-Ethylbenzoesäure (**51**) und 4-Isopropylbenzoesäure (**57**) lagen keine Produktstandards vor, um die erhaltenen Produktmischungen zu identifizieren. Bis auf die 4-Methoxyzimtsäure (**60**) wurden ausschließlich Benzoesäurederivate von CYP199A25 umgesetzt.

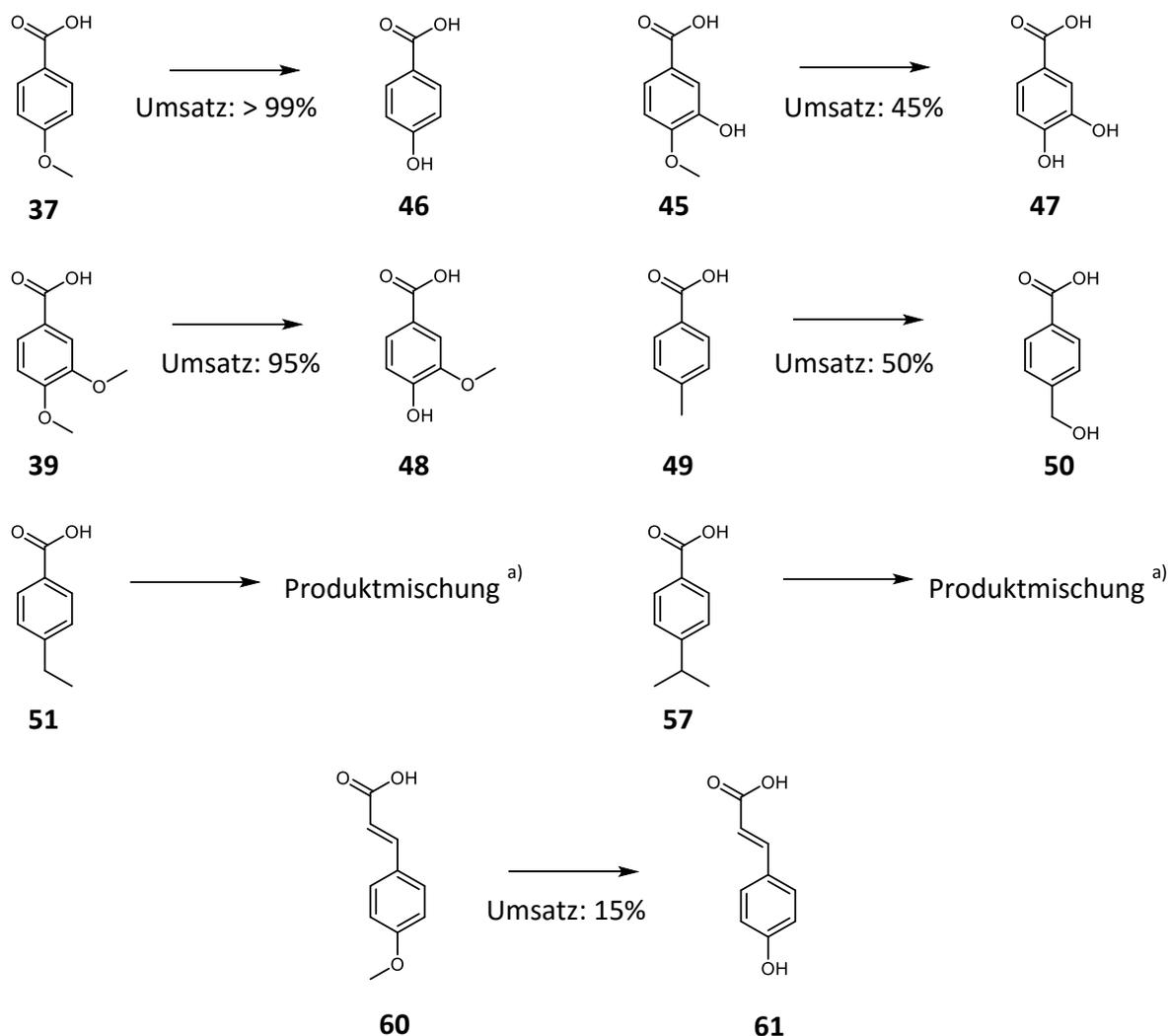


Abbildung 27: Zusammenfassung der CYP199A25-katalysierten Reaktionen. Der Umsatz von 1 mM Substrat wurde mit 2 μ M P450, G6PDH-Cofaktor-Regenerationssystem über 24 h gemessen und anhand des gebildeten Produkts quantifiziert. a) Für die Produktmischungen lagen keine Produktstandards vor. Die Biotransformationen wurden während der betreuten Masterarbeit von Julia Hallmen durchgeführt.²⁸¹

Für die Charakterisierung der Substratspektren von CYP1232A24 und CYP1232F1 wurden ähnliche Substrate wie bei CYP199A25 getestet. Während für CYP1232F1 CamA und CamB für den Elektronentransfer verwendet wurden, erfolgte die Reduktion bei CYP1232A24 mit dem physiologischen Redoxpartnersystem FeRed_1 und FldX (2.5.2). CYP1232F1 wies dabei, ähnlich wie bei CYP199A25, ein sehr enges Substratspektrum auf. Die 3,4-Dimethoxyphenylacetic acid (38) war mit großem Abstand das bisher beste Substrat, das selektiv in *para*-Position zu Homovanillinsäure (41) demethyliert wurde. Von den vielen *para*- und/oder *meta*-substituierten Carbonsäuren oder Aromaten wurden lediglich die 3-Hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid (41), Eugenol (65), 3-Chloro-4-methoxyanilin (66) und 3-Methoxyphenylacetic acid (68) umgesetzt (Abbildung 28). Bei CYP1232F1 wurden ausschließlich Demethylierungsreaktionen detektiert. Die Aktivität reduzierte sich dabei stark, wenn in *meta*-Position demethyliert, sowie wenn der *meta*-Substituent von einer Methoxy zu einer Hydroxygruppe getauscht wurde. Von den drei P450s von *Arthrobacter* sp.

zeigte CYP1232A24 das vielseitigste Substratspektrum. Neben unterschiedlich substituierten Phenylessigsäurederivaten wurden auch Benzoesäuren wie z.B. Isovanillinsäure (**45**) oder auch die 4-Methoxyzimtsäure (**60**) akzeptiert (Abbildung 29). Des Weiteren wurden *meta*- und *para*-substituierte aromatische Verbindungen demethyliert sowie die Laurinsäure (**62**) in geringem Maße in den ω -1,-2,-3-Positionen hydroxyliert. Interessanterweise erfolgte ebenfalls eine Hydroxylierung des Zielterpens β -Ionon (**1**) in allylischer Position zum 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) und eine Demethylierung von Naproxen (**13**). Die Homovanillinsäure (**40**) wurde von allen Substraten am besten umgesetzt.

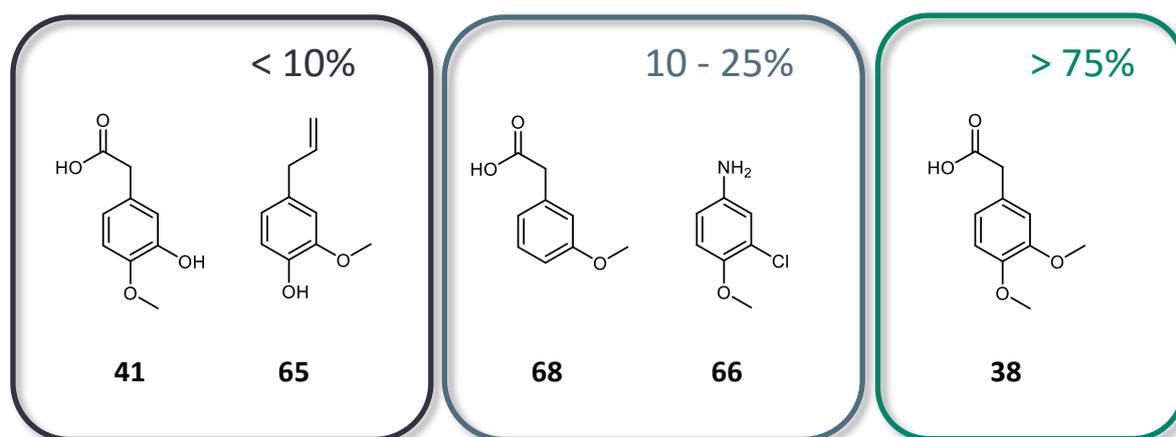


Abbildung 28: Substratspektrum von CYP1232F1. Die *in vitro* Biotransformationen wurden mit 1 mM Substrat, 2 μ M P450, CamA und CamB als Redoxpartner und G6PDH-Cofaktor-Regenerationssystem über 2 h gemessen. Die Verbindungen wurden basierend auf der erzielten Produktbildung geordnet.

Die zum Teil sehr hohen Aktivitäten mit CYP1232A24 wurden durch die im *Cluster* befindlichen physiologischen Redoxpartner FeRed_1 und FldX erzielt, während nur eine geringe Aktivität mit den heterologen Redoxpartnern CamA und CamB erhalten wurde. Im Falle von CYP1232F1 erfolgte die Demethylierung der 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure (**38**) mit den Redoxsystemen CamA und CamB sowie FeRed_1 und FldX annähernd vollständig zur Homovanillinsäure (**40**). Das Redoxsystem FeRed_1 und FldX wurde weiterhin mit CYP199A25 getestet. Hierbei wurden nur Spuren des Produkts 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure detektiert (**48**). Allerdings gelang die funktionale Mischung aus FeRed_1 und CamB mit einem Umsatz von 54% (Anhang 7.4.6, Tabelle S4)²⁸¹, in dem die Elektronen des NADPH von FeRed_1 auf CamB und von dort auf CYP199A25 übertragen wurden.

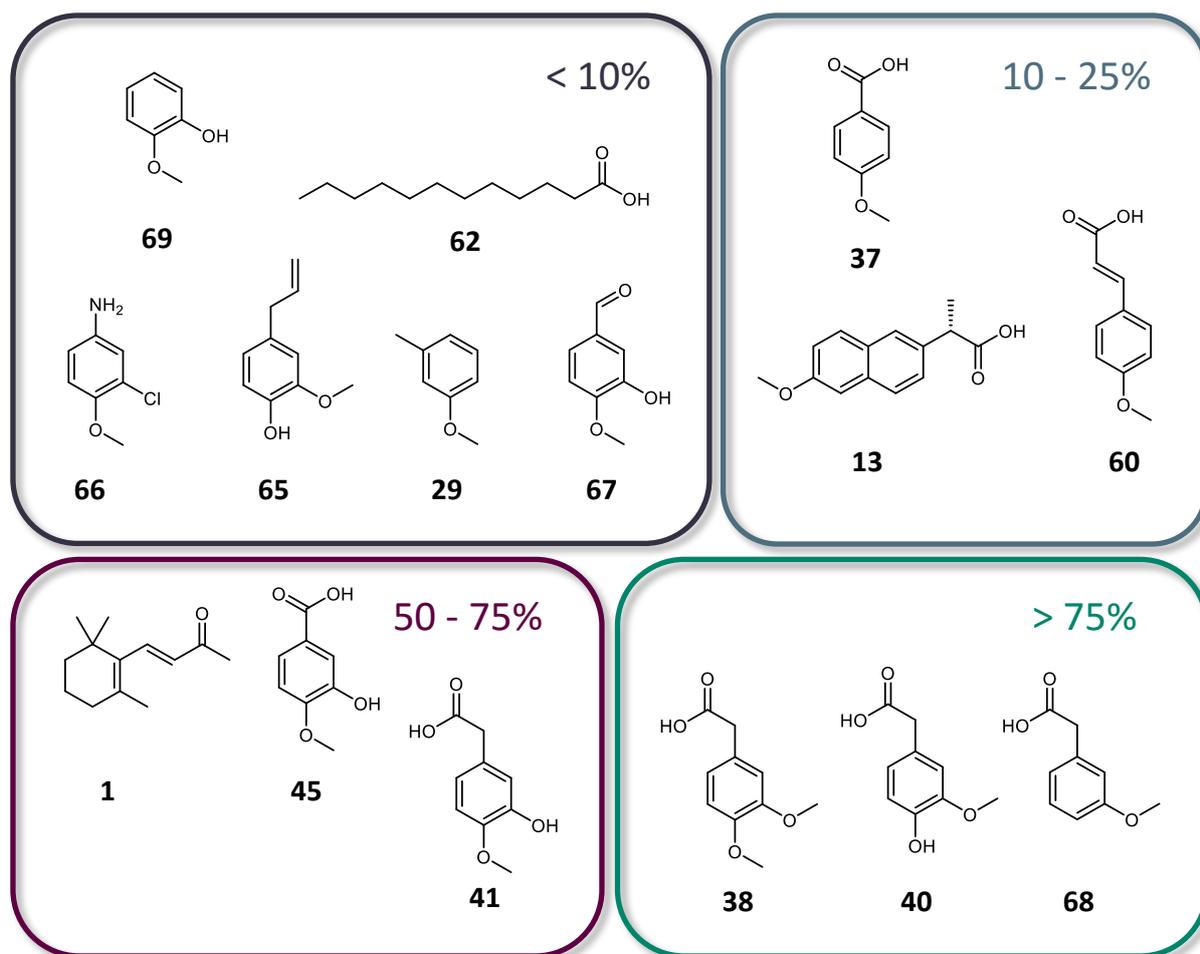


Abbildung 29: Substratspektrum von CYP1232A24. Die *in vitro* Biotransformationen wurden mit 1 mM Substrat, 2 μ M P450, FeRed_1 und FldX als Redoxpartner und G6PDH-Cofaktor-Regenerationssystem über 2 h gemessen. Die Verbindungen wurden basierend auf der erzielten Produktbildung geordnet.

Sowohl die Variation der Redoxpartnersysteme als auch die Mischung untereinander besitzen enormes Potenzial zur Steigerung der P450-Aktivität. Aus diesem Grund wurden dankenswerterweise von einem Kooperationspartner 24 Ferredoxine als aufgereinigte Lyophilisate (darunter CamB) sowie drei Ferredoxin-Reduktasen (darunter CamA) als aufgereinigte Präzipitate bezogen, mit denen sich insgesamt 24 funktionale Kombinationen bilden lassen. Alle drei P450s aus *Arthrobacter* sp. wurden mit diesem Set an neuen Redoxsystemen anhand eines geeigneten Substrats getestet (Anhang 7.4.6, Tabelle S4). Mit CYP1232A24 und β -Ionon (**1**) als Substrat wurde eine Kombination gefunden (CamA + FdX-05) mit 3,5-facher Aktivität im Vergleich zu CamA und CamB, jedoch lag diese weit unter der Aktivität mit FeRed_1 und FldX. Im Falle von CYP1232F1 konnte ebenfalls mit CamA und FdX-05 zusätzlich zu CamA und CamB und FeRed_1 und FldX ein vollständiger Umsatz von 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure erhalten werden. Bei CYP199A25 konnte mit der Kombination CamA und FdX-05 sogar eine Steigerung der Aktivität im Vergleich zu CamA und CamB gemessen werden. Die insgesamt sehr unterschiedlichen Aktivitäten verdeutlichen die Relevanz der verschiedenen Redoxpartnersysteme. Im Falle von nicht-identifizierten

physiologischen Redoxpartnern ist die Rekonstitution mit heterologen Systemen obligat. Gleichzeitig beinhalten die Redoxpartner das größte Potenzial zur Steigerung der Aktivität von P450-katalysierten Reaktionen. Das Redoxsystem aus *P. putida* CamA und CamB konnte effektiv Elektronen auf CYP199A25 und CYP1232F1 übertragen, während das System FeRed_1 und FldX die Aktivität mit den beiden im *Cluster* liegenden CYP1232F1 und CYP1232A24 noch weiter steigerte. Für die Herstellung der Aktivität von CYP1232A24 war das physiologische System essenziell und zeigt, wie wichtig es ist, nach physiologischen Redoxpartnern im Genom zu suchen.

3.5.2 Determinierung der natürlichen Substrate durch *Spin-State* Experimente

Für drei P450s aus *Arthrobacter* sp. konnten Aktivitäten mit physiologischen oder heterologen Redoxpartnern erzielt werden. Die *in vitro* Biotransformationen deuteten bereits auf mögliche natürliche Substrate hin. Für eine detailliertere Charakterisierung sowie für Kenntnisse der Substratspezifität wurden *Spin-State* Experimente durchgeführt. Die Bindungsaffinität von Substraten an P450s kann hierbei mittels Typ-I-Differenzspektren untersucht werden. Diese sind durch eine Verschiebung des Soret-Bandes von ~ 420 nm auf ~ 390 nm gekennzeichnet (= *High-Spin* Zustand, Typ-I-Verschiebung) und werden infolge der Verdrängung des axialen am Häm-Eisen gebundenen Wasserliganden durch das Substrat (= Substratbindung) induziert. Zu einer P450-Lösung wurde hierzu stoßweise Substratlösung zugegeben und die Verschiebung spektroskopisch verfolgt (2.4.5.3). Als Referenz diente eine Probe ohne Substrat, zu der reines DMSO anstelle der Substratlösung zugegeben wurde, um Verdünnungseffekte auszugleichen. Durch diese Methode wurde zunächst die Bindung der 4-Methoxybenzoesäure (**37**) und der 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) an CYP199A25 untersucht (Abbildung 30).

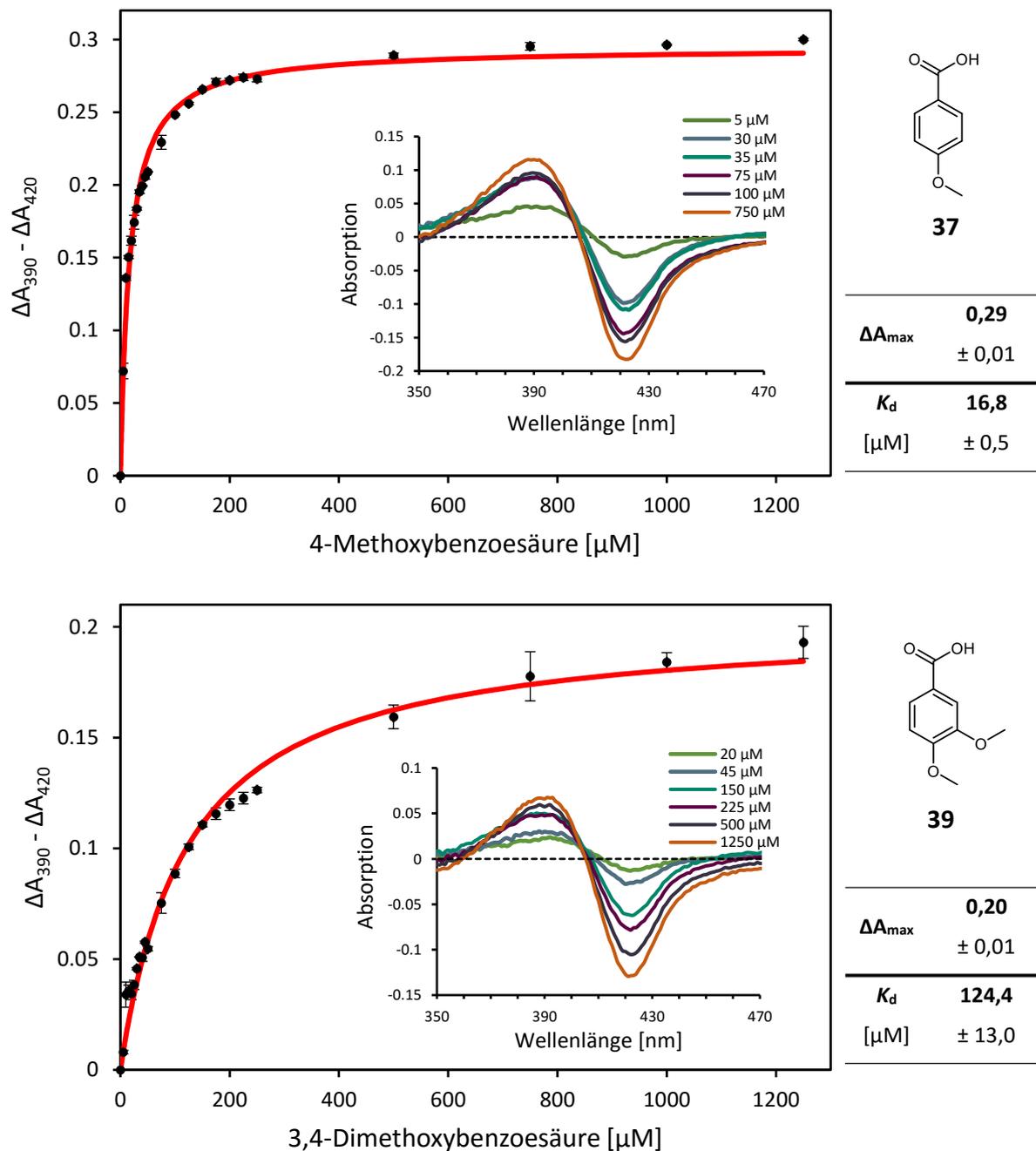


Abbildung 30: *Spin-State*-Spektren von CYP199A25. Zu einer 3 μM P450-Lösung wurden schrittweise Substrat-Lösungen variierender Konzentration (in DMSO) hinzugegeben bis zum Erreichen der Substrat-Sättigung (A_{\max}). Die *High-Spin*-Verschiebung ΔA wurde durch Subtraktion mit der P450-Probe ohne Substrat als Referenz erhalten. Für die Determinierung der Dissoziationskonstanten K_d wurde ΔA gegenüber der eingesetzten Substratkonzentration aufgetragen und mittels einer hyperbolischen Kurve mit Excel Solver gefittet. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Das Substrat 4-Methoxybenzoesäure (**37**) wies mit $16,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ eine geringere Dissoziationskonstante und damit stärkere Bindung zu CYP199A25 auf im Vergleich zu 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) mit $124,4 \pm 13,0 \mu\text{M}$. Die zwei von CYP1232F1 umgesetzten Phenylessigsäuren wurden ebenfalls mittels *Spin-State*-Spektren untersucht (Abbildung 31).

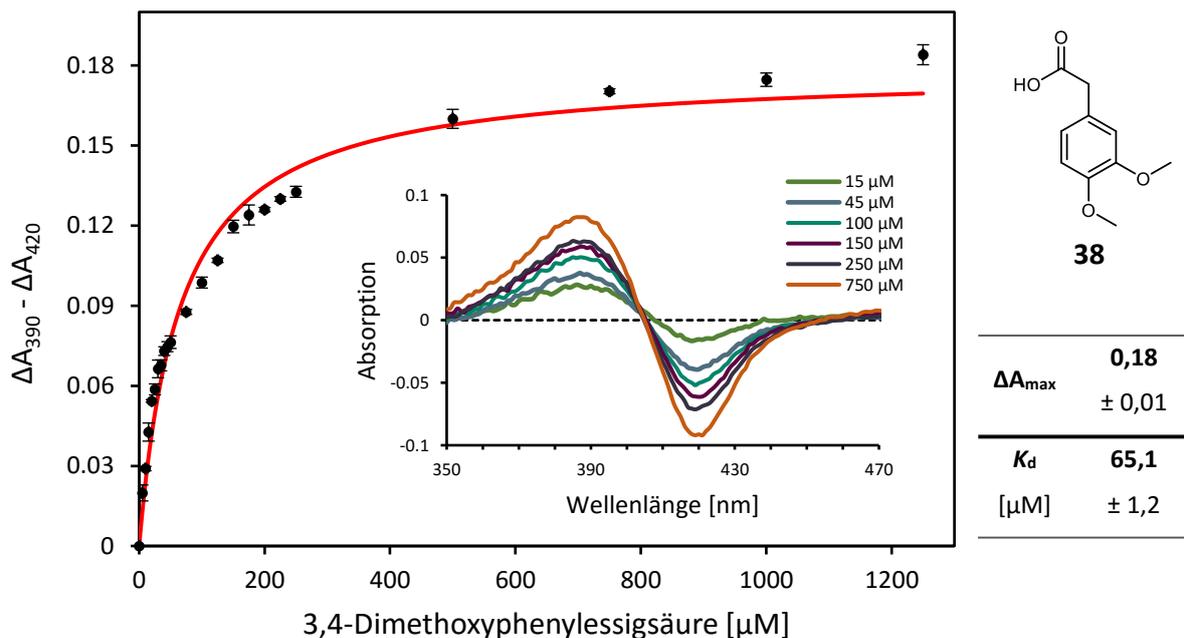
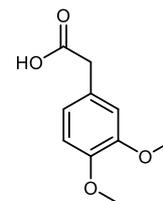
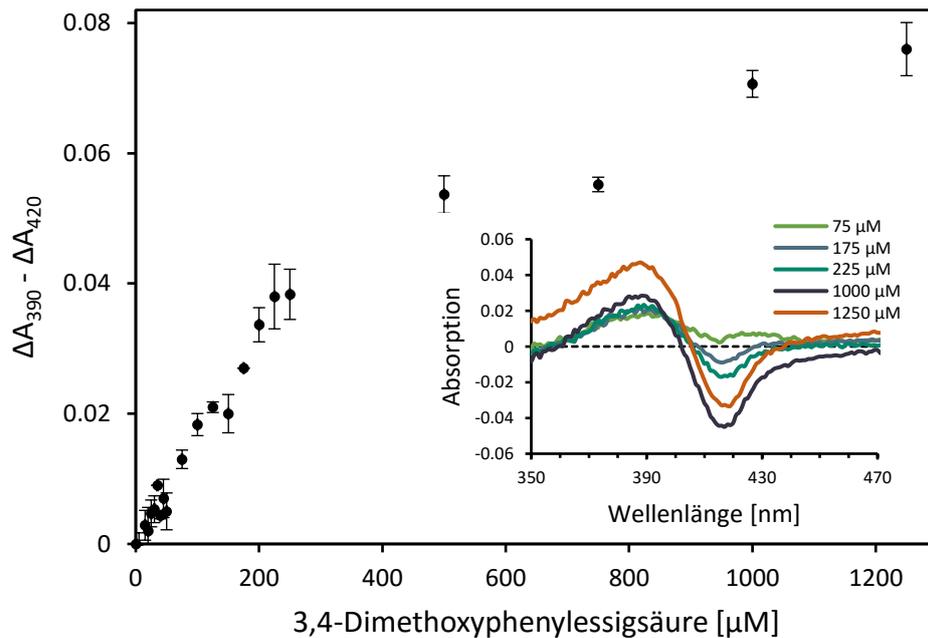
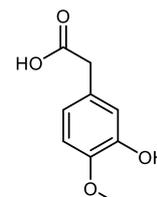
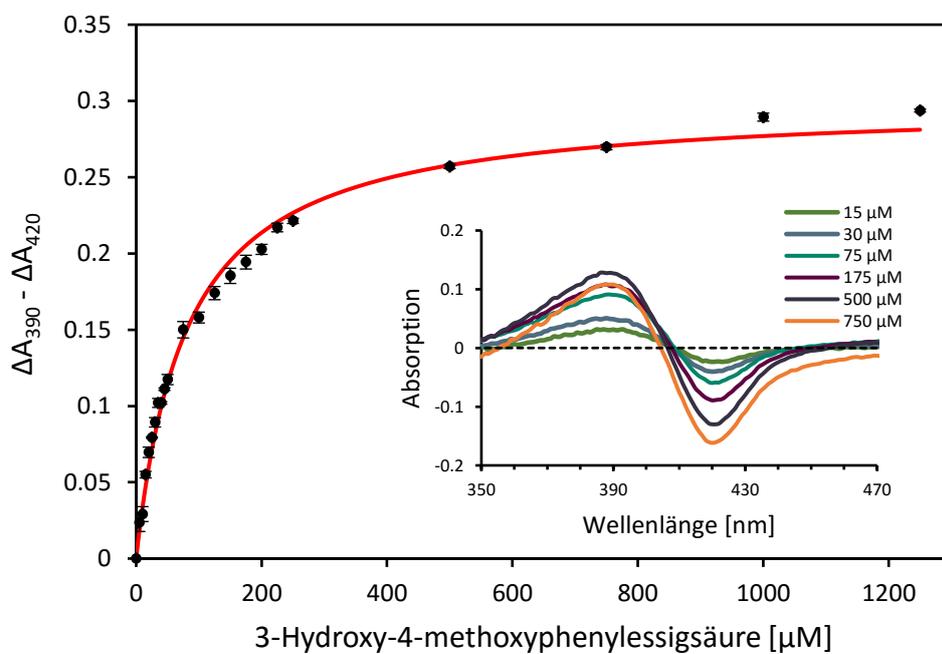


Abbildung 31: *Spin-State*-Spektrum von CYP1232F1. Zu einer 3 μM P450-Lösung wurden schrittweise Substrat-Lösungen variierender Konzentration (in DMSO) hinzugegeben bis zum Erreichen der Substrat-Sättigung (A_{\max}). Die *High-Spin*-Verschiebung ΔA wurde durch Subtraktion mit der P450-Probe ohne Substrat als Referenz erhalten. Für die Determinierung der Dissoziationskonstanten K_d wurde ΔA gegenüber der eingesetzten Substratkonzentration aufgetragen und mittels einer hyperbolischen Kurve mit Excel Solver gefittet. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Während 3,4-Dimethoxyphenylacetic acid (**38**) eine *High-Spin*-Verschiebung mit einer Dissoziationskonstanten von $65,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$ bewirkte, konnte mit der 3-Hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid (**41**) nur eine geringe Verschiebung zu 390 nm Wellenlänge erzielt werden. Mit dem Substrat Homovanillic acid (**40**) war keine Verschiebung detektierbar. Für die letztendliche Aufklärung der physiologischen Rollen von CYP1232A24 und CYP1232F1 am Papaverin (**35**)-Metabolismus in *Arthrobacter* sp. wurden die von CYP1232A24 umgesetzten unterschiedlichen Phenylacetic acid-derivate mittels *Spin-State* Experimenten untersucht (Abbildung 32). Die *Spin-State* Experimente mit CYP1232A24 ergaben eine sinkende Dissoziationskonstante und damit stärkere Bindung von der 3,4-Dimethoxyphenylacetic acid (**38**: nur geringe Verschiebung zu 390 nm Wellenlänge, wobei kein Maximum mit 1250 μM Substrat erreicht wurde) über die 3-Hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid (**41**: $80,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$) bis zur Homovanillic acid (**40**: $22,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$).

**38** ΔA_{max} n.b. K_d n.b.
[μM]**41** ΔA_{max} **0,30**
 $\pm 0,01$ K_d **80,1**
[μM] $\pm 2,1$

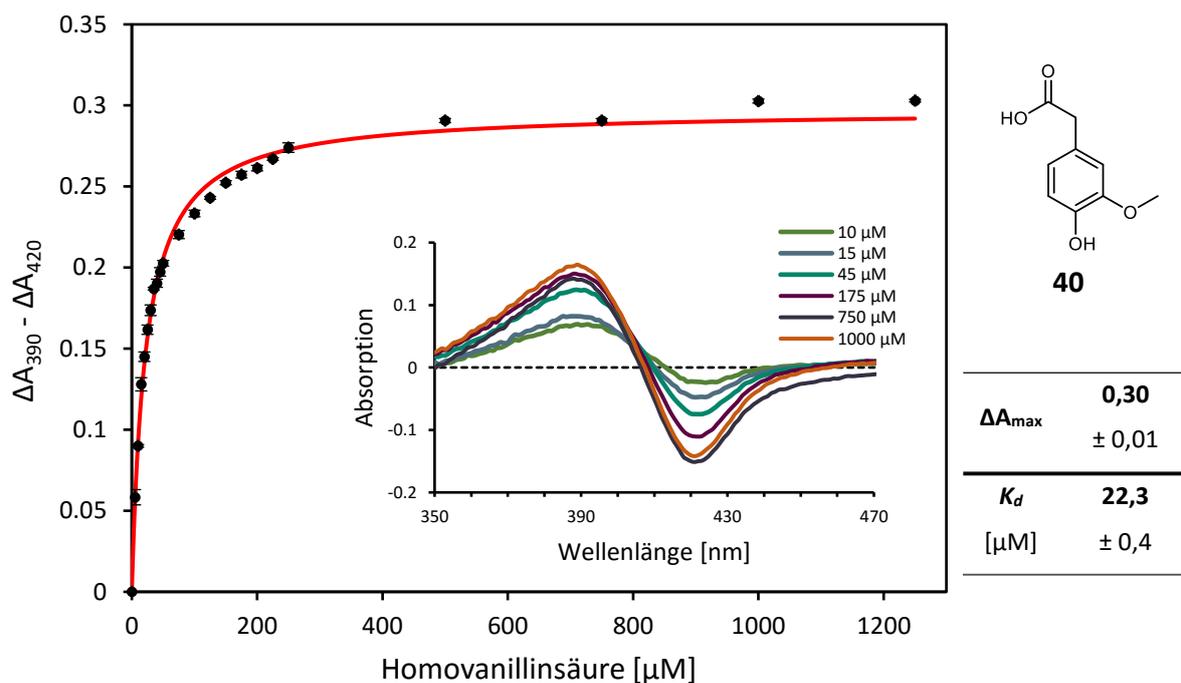


Abbildung 32: *Spin-State*-Spektren von CYP1232A24. Zu einer 3 μM P450-Lösung wurden schrittweise Substrat-Lösungen variierender Konzentration (in DMSO) hinzugegeben bis zum Erreichen der Substrat-Sättigung (A_{\max}). Die *High-Spin*-Verschiebung ΔA wurde durch Subtraktion mit der P450-Probe ohne Substrat als Referenz erhalten. n.b.: nicht bestimmbar (nur minimaler *Spin-State shift* detektierbar bzw. kein Maximum erreicht); Für die Determinierung der Dissoziationskonstanten K_d wurde ΔA gegenüber der eingesetzten Substratkonzentration aufgetragen und mittels einer hyperbolischen Kurve mit Excel Solver gefittet. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

Der Abbau des Papaverins (**35**) erfolgt über das Zwischenprodukt 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**41**), die durch zweifache Demethylierung zur 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**) umgesetzt wird.³¹⁹ Die *Spin-State*-Spektren spiegeln die im Zuge der *in vitro* Biotransformationen erzielten Ergebnisse wieder und erlauben einen Rückschluss auf das potenzielle natürliche Substrat. CYP1232F1 zeigt lediglich zu 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) eine enge Bindung. Dagegen kann CYP1232A24 zwar alle Phenylelessigsäurederivate binden und wie im vorhergegangenen Kapitel beschrieben auch demethylieren, jedoch wurde die stärkste Bindung mit Homovanillinsäure (**40**) gemessen. Die Ergebnisse aus den *in vitro* Biotransformationen und *Spin-State* Experimenten weisen darauf hin, dass die 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) zunächst durch CYP1232F1 in *para*-Position zu Homovanillinsäure (**40**) demethyliert, welche durch eine zweite Demethylierung, katalysiert durch CYP1232A24, zur 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**) weiter umgesetzt wird. Im Falle von CYP199A25 weisen die *Spin*-Spektren auf 4-Methoxybenzoesäure (**37**) als natürliches Substrat hin.

3.5.3 Determinierung der Effizienz der neuen Biokatalysatoren *in vitro*

Für die Determinierung der kinetischen Konstanten und Kopplungseffizienzen wurden die jeweiligen natürlichen respektive besten Substrate gewählt. Die Werte erlauben schließlich

eine Beurteilung der katalytischen *in vitro* Effizienz der Biokatalysatoren. Zur Bestimmung der Kopplungsraten wurden die Reaktionen anhand der Abnahme des Cofaktors NAD(P)H spektroskopisch bei 340 nm verfolgt (2.4.5.4). Nach Ende der Reaktion (keine weitere Abnahme des Cofaktors), konnte die verbrauchte NADP(H)-Menge und Oxidationsrate bestimmt und zur Bestimmung der Kopplungseffizienz mit der Menge an gebildetem Produkt korreliert werden. CYP1232A24 wies in Kombination mit FeRed_1 und FldX eine NADPH-Oxidationsrate von $87,8 \text{ nmol nmol}_{\text{P450}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ mit dem Substrat Homovanillinsäure (**40**) auf (Tabelle 11). Hierbei konnte eine hohe Kopplungseffizienz von 87% erhalten werden, d.h. 87% der Elektronen von NADPH sind in die Produktbildung geflossen. Im Zuge von *in vitro* Biotransformationen wurden mit diesem System 2 mM Substrat innerhalb von 30 min zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**) demethyliert.

Auch mit CYP1232F1 wurde in Kombination mit FeRed_1 und FldX nach 30 min die gesamte Menge der eingesetzten 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) verbraucht. In diesem Fall konnten höhere NADPH-Oxidationsraten von $103,8 \text{ nmol nmol}_{\text{P450}}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erreicht werden, bei einer größer 99%igen Kopplungseffizienz. Das CYP1232F1-System wurde gleichzeitig zur Überprüfung der Cofaktorspezifität von FeRed_1 verwendet. Nur eine geringe Oxidationsrate und Kopplungseffizienz konnte mit NADH als Cofaktor gemessen werden (Tabelle 11). Darüber hinaus wurde CamA und CamB als alternativer Redoxpartner getestet. Hierbei erreichte die Reaktion mit CYP1232F1 NADH-Oxidationsraten von $28,2 \text{ nmol nmol}_{\text{P450}}^{-1} \text{ min}^{-1}$, eine Kopplungseffizienz von 84% und eine *in vitro* Produktbildung von 88,1% nach 30 min. Damit lagen die Aktivitäten sowie die Kopplungseffizienz mit CamA und CamB unter der mit FeRed1 und FldX ermittelten. CYP199A25 bildete mit CamA und CamB als Redoxpartner 63,2% 4-Hydroxybenzoesäure (**46**) nach 30 min. Die NADH-Oxidationsrate und Kopplungseffizienz konnte in diesem Fall nicht bestimmt werden, da sich die Hintergrundaktivität (Abnahme des Cofaktors auch ohne Substrat) nicht eindeutig von der Reaktion mit Substrat abhob (Anhang 7.4.2, Abbildung S6).

3.5 Weiterführende Charakterisierung der P450s aus *Arthrobacter* sp.

Tabelle 11: *In vitro* Produktbildung, NAD(P)H Assay und Kopplungseffizienzen der *Arthrobacter* sp. P450s. Der NAD(P)H Assay erfolgte in Triplikaten mit 0,25 μM aufgereinigtem P450 in Mikrotiterplatten. Der Verlauf der Reaktion wurde spektroskopisch bei 340 nm verfolgt.

P450	Substrat	Redox-partner	Cofaktor	NAD(P)H-	Kopplungs-effizienz ^{b)}	<i>In vitro</i> Produktbildung ^{c)}
				Oxidationsrate [nmol _{NAD(P)H} nmol _{P450} ⁻¹ min ⁻¹] ^{a)}		
CYP1232A24	40	FeRed_1 + FldX	NADPH	87,8 ± 2,8	87%	99,8 ± 1,0%
		FeRed_1 + FldX	NADPH	103,8 ± 4,6	> 99%	99,9 ± 2,9%
CYP1232F1	38	FeRed_1 + FldX	NADH	2,5 ± 0,1	9%	n.a.
		CamA/B	NADH	28,2 ± 0,4	84%	88,1 ± 2,8%
CYP199A25	37	CamA/B	NADH	n.d.	n.d.	63,2 ± 1,8%

n.d. nicht detektiert, Hintergrund der Cofaktor Oxidation zu hoch

n.a. nicht analysiert

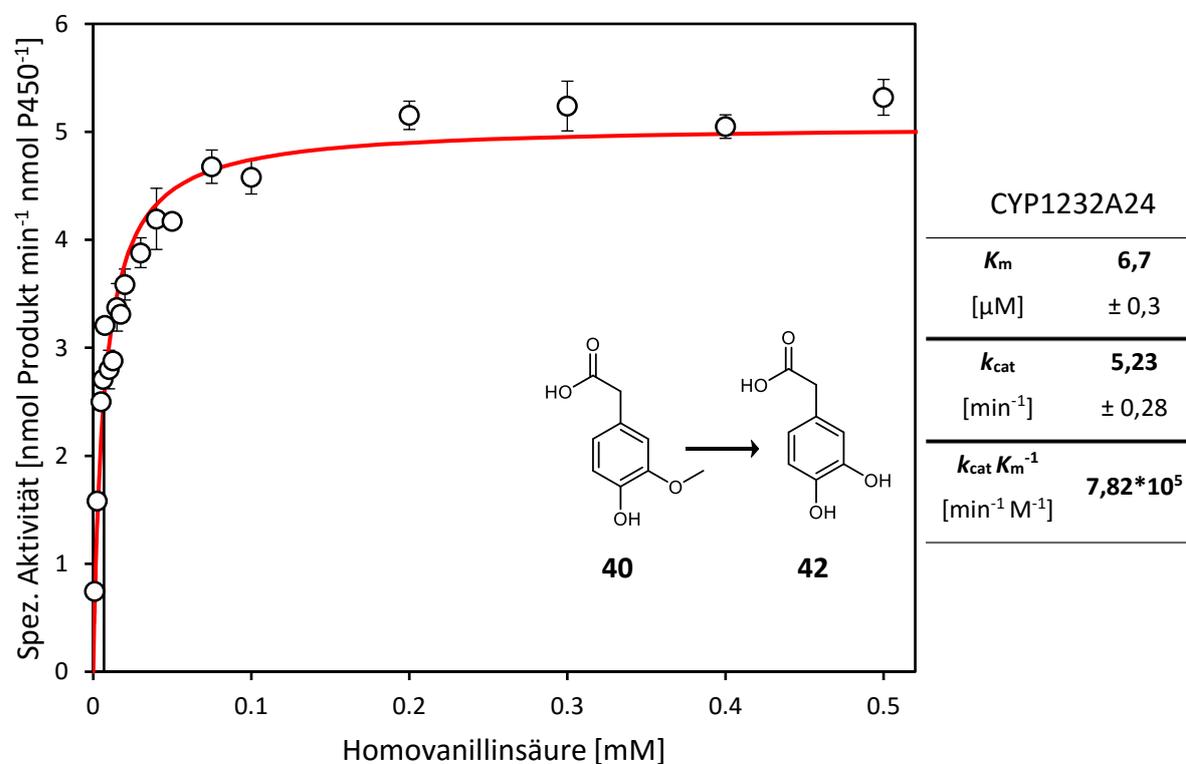
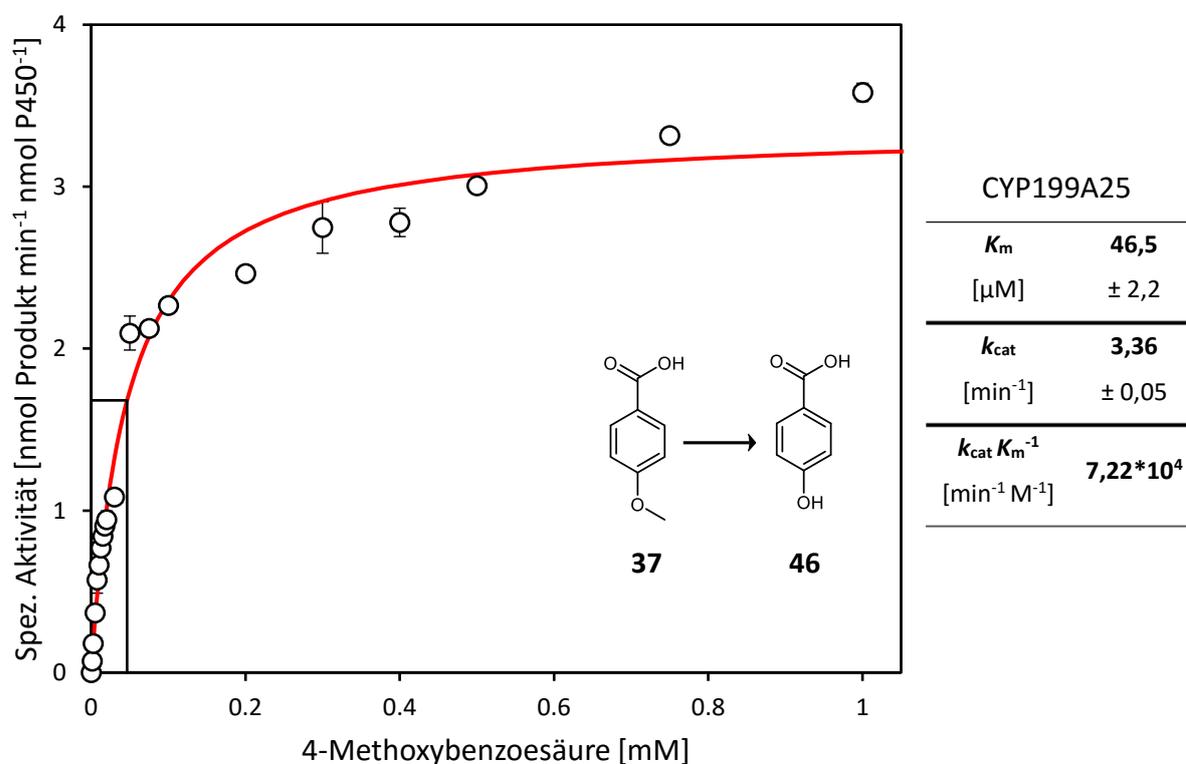
a) Die Oxidationsrate wurde abzüglich der NAD(P)H Abnahme der eingesetzten Proteine ohne Substrat als Hintergrund berechnet.

b) Die Kopplungseffizienz stellt die Effizienz dar, mit der der Cofaktor NAD(P)H genutzt wird, um das Produkt zu bilden.

c) Für die Determinierung der *in vitro* Produktbildung wurden 2 μM P450, 2 mM Substrat sowie das G6PDH-Cofaktor-Regenerationssystem eingesetzt und die Reaktion nach 30 min durch HCL Zugabe gestoppt.

Für die Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden die Enzymkonzentration und Reaktionszeit so gewählt, dass die Produktbildung maximal 10% der am niedrigsten eingesetzten Substratkonzentration entspricht (2.5.3). Die hierdurch aufgenommenen Michaelis-Menten-Kinetiken wurden mittels Excel Solver unter Verwendung der *least square* Methode mit dem GRG-nichtlinearen Algorithmus gefittet, um die Konstanten K_m und k_{cat} zu bestimmen. Die Umsetzung der 4-Methoxybenzoesäure (**37**) zu 4-Hydroxybenzoesäure (**46**) durch CYP199A25 erfolgte mit einer katalytischen Geschwindigkeit k_{cat} von $3,36 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$, bei einem K_m -Wert von $46,5 \pm 2,2 \mu\text{M}$ (Abbildung 33). CYP1232A24 wies mit FeRed_1 und FldX einen k_{cat} von $5,23 \pm 0,28 \text{ min}^{-1}$ und einen K_m -Wert von $6,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$ auf. Die Reaktionseigenschaften der 3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure (**38**) zur Homovanillinsäure (**40**) durch CYP1232F1 wurden zum einen mit den heterologen Redoxpartnern CamA sowie CamB und zum anderen mit den physiologischen Redoxpartnern FeRed_1 und FldX aus *Arthrobacter* sp. determiniert. Mit FeRed_1 und FldX wurde ein k_{cat} von $5,40 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ im Vergleich zu $2,28 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ mit CamA und CamB erhalten. Die K_m -Werte hängen von der P450-Domäne und dem Substrat ab und waren demnach mit $5,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ identisch. Ein Maß für die katalytische Effizienz eines Enzyms stellt der Quotient $k_{cat} K_m^{-1}$ dar. Die höchste Effizienz konnte mit den physiologischen Redoxpartnern erzielt werden. Der Wert für CYP1232F1 betrug $1,05 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und für CYP1232A24 $7,82 \cdot 10^5 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$, jeweils mit FeRed_1 und FldX als Elektronentransferpartner. Mit den heterologen Redoxpartnern CamA

und CamB wurde eine etwa halb so große katalytische Effizienz erzielt. Der geringste Wert von $7,22 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ wurde im System CYP199A25 mit CamA und CamB erhalten.



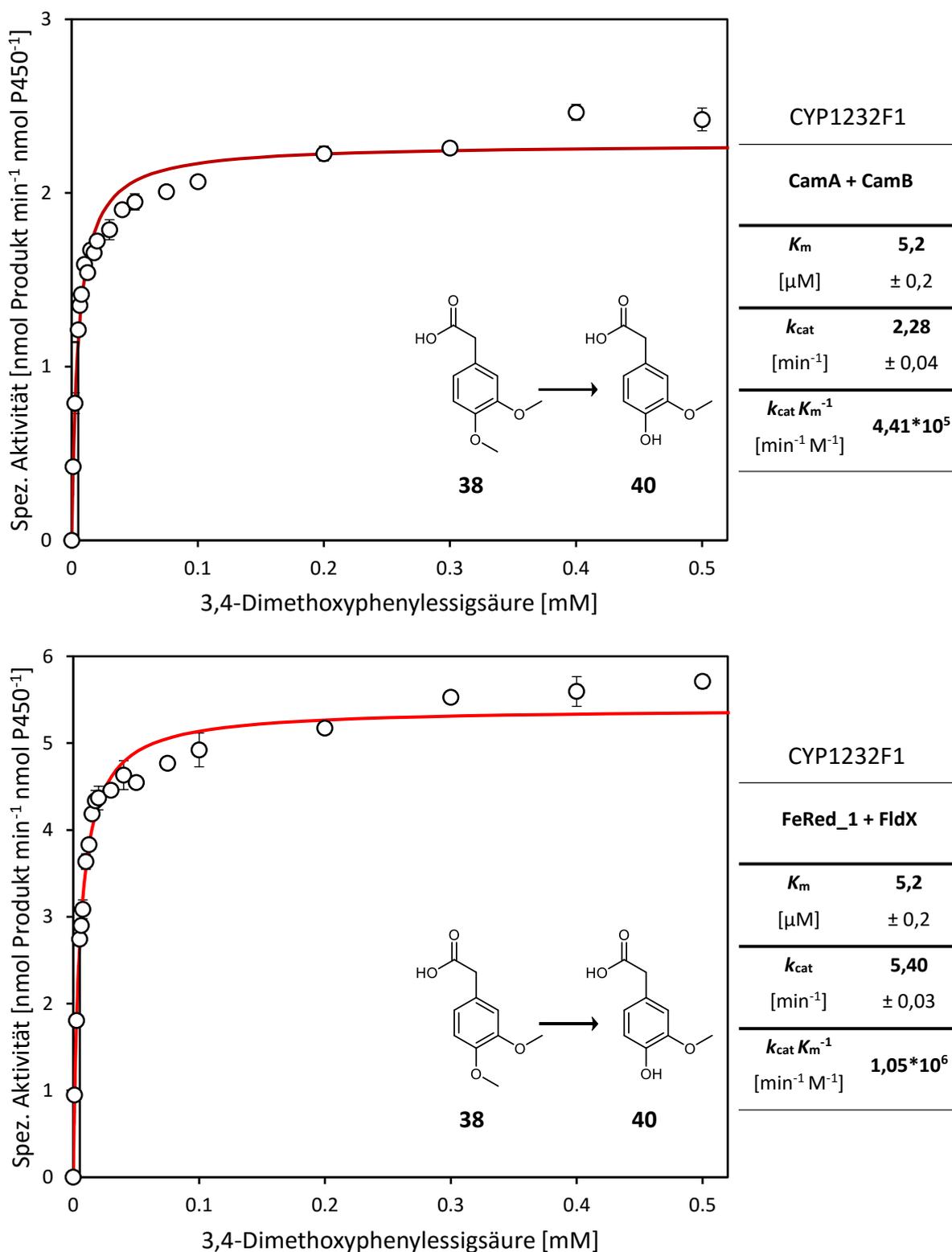


Abbildung 33: Determinierung der kinetischen Konstanten der *Arthrobacter* sp. P450s. Folgende Reaktionen wurden analysiert: CYP199A25 mit CamA und CamB katalysierte Demethylierung der 4-Methoxybenzoesäure (**37**) zur 4-Hydroxybenzoesäure (**46**). CYP1232A24 mit FeRed_1 und FldX katalysierte Demethylierung der Homovanillinsäure (**40**) zur 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (**42**). CYP1232F1 katalysierte Demethylierung in *para*-Position der 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure (**38**) zur Homovanillinsäure (**40**) mittels der Redoxpartner CamA und CamB oder FeRed_1 und FldX. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m durch Fitten mit Excel Solver unter Verwendung der *least square* Methode mit dem GRG-nichtlinearen Algorithmus ermittelt.

3.5.4 Generierung effizienter P450 Ganzzellbiokatalysatoren

Für den Einsatz in der industriellen Biokatalyse sind effiziente Ganzzellbiokatalysatoren obligat. Die *in vivo* Leistungsfähigkeit der neu-charakterisierten P450s aus *Arthrobacter* sp. sollten schließlich auch in dieser Arbeit untersucht werden. Für die Generierung eines Ganzzellbiokatalysators existieren im Falle von P450s der Klasse I oder III (Dreikomponentensysteme) unterschiedliche Möglichkeiten: Die Expression auf nur einem Plasmid, die Expression aller Komponenten durch Dual-Vektor-Systeme oder die chimäre Fusion mit einer bifunktionalen Reduktase. Letztere Möglichkeit wurde zuerst mittels der aufgereinigten BMR-Domäne von P450 BM3 *in vitro* überprüft. Hierbei konnten mit allen drei P450s kein Elektronentransfer und damit keine Aktivität festgestellt werden. Eine weitere Option war die direkte Fusion mit der bifunktionalen Reduktase PFOR von CYP116B3, die bereits erfolgreich in chimären Systemen eingesetzt wurde.^{103,320} Die Klonierung erfolgte mittels *Gibson Assembly*[®] (2.2.10) und die Expression der korrekten pBAD33-Konstrukte schließlich in *E. coli* JW5510 unter Arabinoseinduktion (2.3.8). Alle Proteine konnten funktional exprimiert werden, gekennzeichnet durch ein Absorptionsmaximum bei 420 nm im CO-Differenzspektrum (2.4.5.2). Allerdings wurde nur bei dem Konstrukt CYP199A25-PFOR eine geringe Aktivität festgestellt. *In vitro* wurden nach 30 min 5,2% der 4-Hydroxybenzoesäure (**37**) umgesetzt, weshalb die Fusionen nicht weiterverfolgt wurden. Als weitere Strategie wurden kompatible Dual-Vektor-Systeme (pCola und pETDuet) gewählt, die eine Expression von bis zu vier Proteinen jeweils unter der Kontrolle eines eigenen starken T7-Promotors erlaubt. Die für eine hohe Aktivität im Überschuss benötigten Ferredoxine oder Flavodoxine wurden hierbei in beiden kompatiblen Plasmiden integriert, um eine höhere Transkriptanzahl und damit höhere Expression zu gewährleisten. Die Konstrukte pCola_CYP1232F1 + FldX respektive CamB sowie pETDuet_FldX + FeRed_1 wurden über *Gibson Assembly*[®] kloniert (2.2.10). Das Plasmid pETDuet_CamA + CamB lag bereits vor und wurde von Sara Hoffmann (ITB) bezogen. Aufgrund der guten Expression im pBAD33-Vektor bei gleichzeitiger sehr geringen Expression im T7-Promotor-System pET-28a(+) wurde für den Ganzzellansatz mit CYP1232A24 und CYP199A25 das zu pBAD33 kompatible Plasmid pBAD18 für die Co-Expression der Redoxpartner gewählt. Das Grundgerüst dieses Vektors inklusive zweier arabinoseinduzierbarer pBAD-Promotoren wurde von Leonie Schön (ITB) bezogen und die entsprechenden Redoxpartner FldX und FeRed_1 sowie CamA und CamB durch *Gibson Assembly*[®] über die entsprechenden Primer kloniert (2.2.10).

Die Konstrukte wurden wie in 2.3.8 beschrieben exprimiert und *in vivo* mit 0,1 g mL⁻¹ ruhenden Zellen und 10 mM Substratkonzentration für 24 h getestet (2.5.4). CYP1232A24 demethylierte die eingesetzte Homovanillinsäure (**40**) vollständig, was einem Titer des Produkts 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**) von etwa 1,8 g L⁻¹ entspricht (Tabelle 12).

3.6 Bakterielle P450-Fusionsproteine für die Terpenoxyfunktionalisierung

Tabelle 12: Ganzzellbiotransformationen der *Arthrobacter* sp. P450s mittels Dual-Vektor-Systemen. Das jeweilige natürliche Substrat wurde in einer 10 mM Konzentration eingesetzt.

P450	Redoxpartner	Expressionssystem	Substrat	<i>In vivo</i> Produktbildung ^{a)}
CYP1232A24	FeRed_1 + FldX	pBAD33_P450 pBAD18_FldX + FeRed_1	40	1,77 ± 0,04 g L ⁻¹ (± 10,5 ± 0,2 mM)
CYP1232F1	FeRed_1 + FldX	pCola_P450 + FldX pETDuet_FldX + FeRed_1	38	0,93 ± 0,01 g L ⁻¹ (± 5,1 ± 0,1 mM)
	CamA + CamB	pCola_P450 + CamB pETDuet_CamA + CamB		0,06 ± 0,01 g L ⁻¹ (± 0,35 ± 0,01 mM)
CYP199A25	CamA + CamB	pBAD33_P450 pBAD18_CamA + CamB	37	1,30 ± 0,01 g L ⁻¹ (± 9,4 ± 0,1 mM)

a) Die analytischen Biotransformationen wurden in 1 mL bei einer Zellkonzentration von 0,1 g mL⁻¹ für 24 h durchgeführt.

Auch das zweite pBAD-Dual-Vektor-System setzte die 10 mM Substrat fast vollständig um. CYP199A25 demethylierte 4-Methoxybenzoesäure (**37**) zu 1,3 g L⁻¹ 4-Hydroxybenzoesäure (**46**) *in vivo*. Im Falle der T7 basierten Dual-Vektoren wurde mit CYP1232F1, FeRed_1 und FldX die Hälfte des Substrats 3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure (**38**) selektiv umgesetzt, was einem Produkttiter von etwa 0,9 g L⁻¹ der Homovanillinsäure (**40**) entspricht. Dagegen wurde mit CamA und CamB nur eine sehr geringe Aktivität *in vivo* erreicht. Zur Untersuchung, ob die niedrige Aktivität durch das P450 oder durch die Redoxpartner verursacht wird, wurden Zellen aus derselben Expression aufgeschlossen und die Zellysate über SDS-PAGE sowie CO-Differenzspektren analysiert (2.3.10.1, 2.4.3 und 2.4.5.2). Es zeigte sich, dass die Redoxproteine gut exprimiert wurden, jedoch CYP1232F1 im Falle von CamA und CamB vollständig nicht funktional und mit FeRed1 und FldX nur zu sehr geringem Anteil funktional exprimiert wurden (Anhang 7.4.3, Abbildung S7). Dennoch konnte in Kombination mit FeRed1 und FldX die Hälfte des Substrats demethyliert werden. Der Einsatz eines geeigneteren Systems ähnlich des pBAD-Systems stellt eine Möglichkeit zur Umsatzsteigerung dar. Insgesamt konnten mit dem pBAD18 und pBAD33 Vektorsystem effiziente Ganzzellbiokatalysatoren konstruiert werden, die sehr hohe Produktausbeuten ermöglichen.

3.6 Bakterielle P450-Fusionsproteine für die Terpenoxyfunktionalisierung

Bei den P450 Monooxygenasen handelt es sich um eine der größten bekannten Enzymfamilien mit stark ausgeprägter Diversität. Die Enzyme sind von den elektronenliefernden Redoxpartnern abhängig, die die Elektronen vom Cofaktor NAD(P)H zum aktiven Zentrum transportieren. Zumeist lassen sich die physiologischen Partner, die über das gesamte Genom verteilt lokalisiert sein können, nur schwer identifizieren. Einen

großen Vorteil stellen hierbei natürliche Fusionsproteine dar, die alle Komponenten auf einer Polypeptidkette und über Linker verbunden tragen, wodurch ein effektiverer Elektronentransport gewährleistet werden kann.

Für die Identifizierung neuer Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen wurde deshalb ein weiterer interessanter Ansatz gewählt. Von einem Kooperationspartner wurden für ein *Screening* gegenüber Terpenen 17 noch nicht charakterisierte, natürliche P450-Fusionskonstrukte in lyophilisierter Form bereitgestellt. Alle getesteten Enzyme können dabei der Familie der am besten charakterisierten Fettsäure-Hydroxylase P450 BM3 zugeordnet werden. In einer betreuten Bachelorarbeit erfolgten schließlich *in vitro* Untersuchungen zur Aktivität gegenüber Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge sowie zur Aktivität gegenüber den Zielterpenen **1** – **7**.³²¹ Alle 17 Enzyme waren in der Lage C12- und C14-Fettsäuren zu hydroxylieren, jedoch zeigten die meisten keine Aktivität gegenüber den Terpenen. Es konnten jedoch fünf Enzyme identifiziert werden, die die Umsetzung von β -Ionon (**1**) zu 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) katalysierten sowie ein Enzym, das Valencen (**7**) zu Nootkatol (**74**) und Nootkaton (**75**) umsetzte. Das Enzym, das beide Terpene hydroxylieren konnte (ITB1693, aus *Ralstonia metallidurans*), sowie ein Enzym, das die größte β -Ionon (**1**) Umsetzung zeigte (ITB1696, aus *Ktedonobacter racemifer*), wurden schließlich für weitere Charakterisierungen ausgewählt (Abbildung 34).

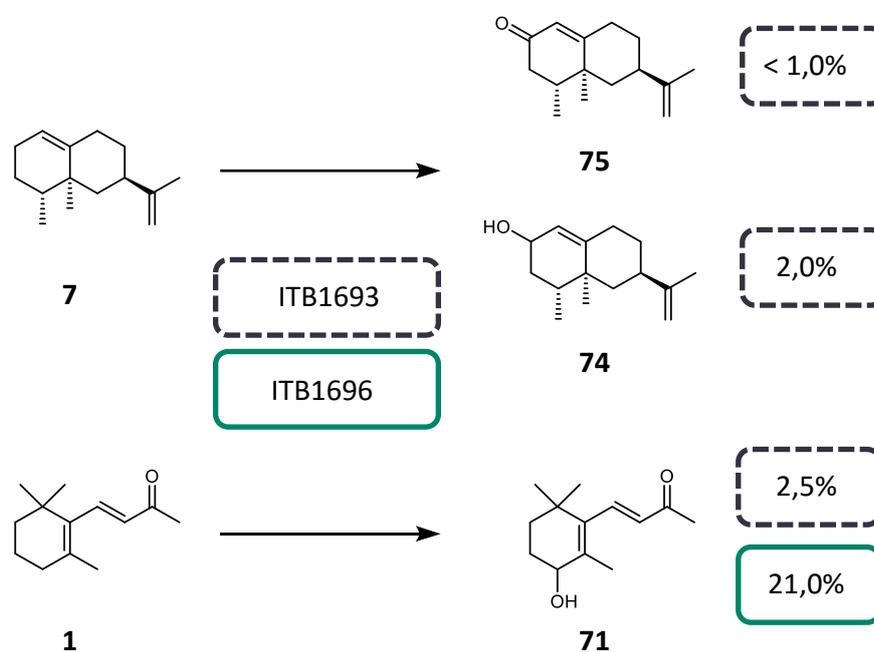


Abbildung 34: Zusammenfassung der *in vitro* Biotransformationen mit 17 lyophilisierten natürlichen Fusionsproteinen bakteriellen Ursprungs mit den Terpenen **1** – **7**. Dargestellt ist das Enzym ITB1696, das den höchsten Umsatz von β -Ionon (**1**) zu 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) zeigte sowie das Enzym ITB1693, welches zudem Valencen (**7**) als Substrat akzeptierte. Die Biotransformationen wurden durch Tim Hierlemann durchgeführt.³²¹

Nach Verbesserung der Expression und Wiederholung der Experimente *in vivo* konnte die Aktivität gegenüber den Terpenen bestätigt werden. In den *in vivo* Umsetzungen mit Valencen (**7**) wurde gleichzeitig eine Abnahme des Produkts Nootkaton (**75**) festgestellt.

ITB1693 wurde aus diesem Grund mit Nootkaton (**75**) als Substrat getestet, womit höhere Aktivitäten als mit Valencen (**7**) und ein hydroxyliertes Hauptprodukt festgestellt werden konnten. Aufgrund der breiteren Anwendung mit Terpenen lag der Fokus letztendlich auf Enzym ITB1693 aus *Ralstonia metallidurans*, das weiterhin ein sehr breites Substratspektrum gegenüber Aromaten wie etwa 4-Ethylphenol (**30**), Diphenylmethan (**32**), 4-Allylanisol (**34**), 1,2-Dichlorbenzol (**100**) aufwies (Anhang 7.4.7, Tabelle S5). Aufgrund der zahlreichen *rare codons* im ITB1693 Gen wurde die Expression in *E. coli* Rosetta(DE3) schließlich wie in 2.3.8 beschrieben durchgeführt, wodurch die weitergehende Untersuchung ermöglicht wurde.

3.6.1 Rationales Enzymdesign des Fusionsproteins ITB1693

Das P450 ITB1693 kann der Familie der am besten charakterisierten Fettsäure-Hydroxylase P450 BM3 zugeordnet werden. Interessant ist hierbei, dass dieses Enzym bisher nicht beschrieben wurde, die Vorteile eines natürlichen Fusionsproteins besitzt und aufgrund der Ähnlichkeit zu P450 BM3 im aktiven Zentrum eine nahezu identische Struktur wie dieses aufweist. Durch eine P450-3DM-Datenbankanalyse konnte nun ein Homologiemodell von ITB1693 erstellt und *hotspot*-Regionen, wie etwa F87, identifiziert werden, die bereits in P450 BM3 zu drastischen Änderungen hinsichtlich der Enzymeigenschaften geführt haben.³²² Die Generierung einer *smart library* von ITB1693 ging deshalb von dieser Position aus. Für den Austausch wurden vor allem kleine hydrophobe Aminosäuren wie Alanin oder Valin ausgewählt und durch die QuikChange® Methode eine fokussierte Mutantenbibliothek mit insgesamt fünf Enzymvarianten (F95A/V/I/G/L) erstellt (2.2.9). Der Austausch des Phenylalanins in der aktiven Tasche durch kleine hydrophobe Aminosäuren hatte zum Teil gravierende Veränderungen in den Enzymeigenschaften zur Folge. Insbesondere war dies beim Austausch durch Alanin feststellbar (Abbildung 35). Bei dieser Variante konnten sterisch anspruchsvolle Terpene wie etwa α -Humulen (**3**), Premnaspirodien (**5**) und Longifolen (**6**) *in vitro* und *in vivo* hydroxyliert werden (2.5.2 und 2.5.4), jedoch mit vergleichsweise moderater Aktivität und Selektivität (Anhang 7.4.4, Abbildung S9). Auch wurde mit der F95A Variante im *Screening* gegenüber β -Ionon (**1**) eine etwa 10-fache Steigerung an produziertem 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) erzielt (Abbildung 36). Arbeiten an dem am besten charakterisierten P450 BM3 in vorherigen Dissertationen haben gezeigt, dass der gleichzeitige Austausch einer gegenüberliegenden Position zu F87 in BM3 einen beträchtlichen Einfluss auf die Selektivität besitzt.²²⁹ Zur Steigerung der Aktivität sowie der zum Teil noch geringen Selektivität gegenüber Terpenen wurden ausgehend von den

Varianten F95A sowie F95V Doppelmutanten generiert, bei denen die gegenüberliegende Position von F95 im aktiven Zentrum (A337) adressiert wurde (Abbildung 35).

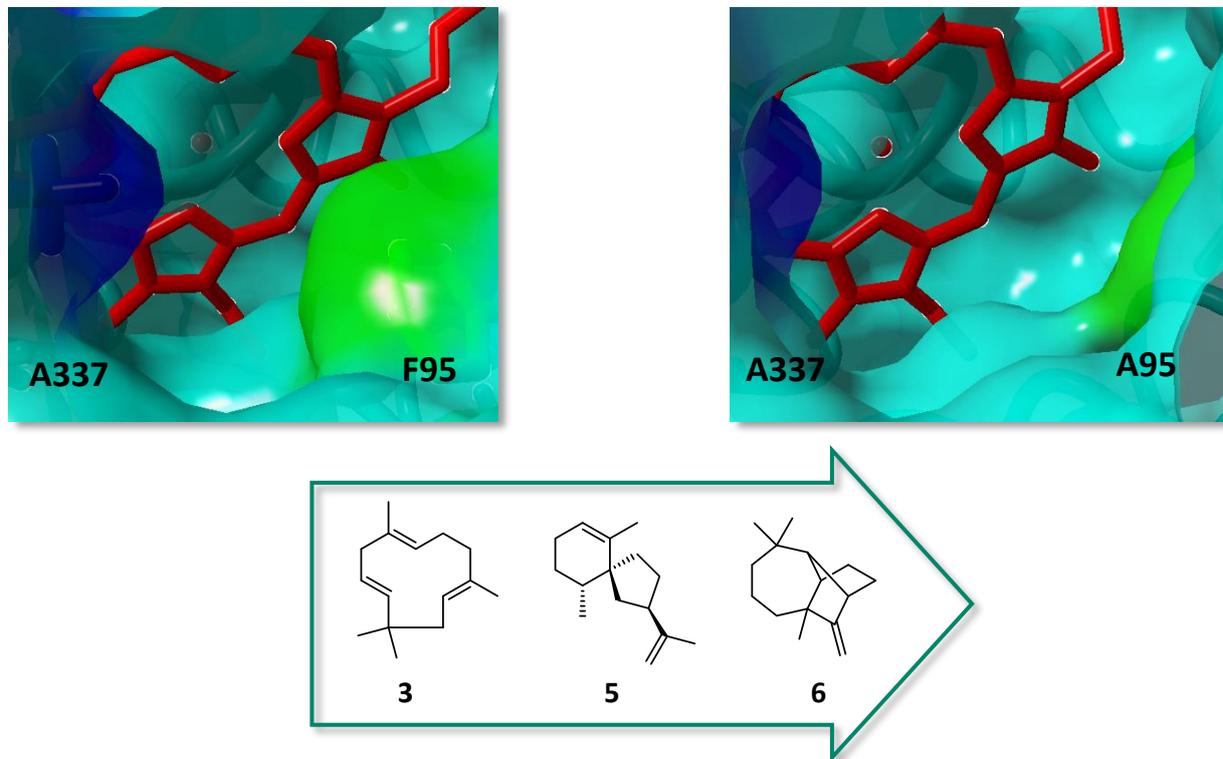


Abbildung 35: 3DM-Homologiemodell von ITB1693 (aus *Ralstonia metallidurans*). Die *hotspot*-Positionen in der aktiven Tasche sind grün (F95) und blau (A337) dargestellt. Der Austausch F95A (rechts) führte zu einer Vergrößerung der aktiven Tasche und damit zur Fähigkeit, die sperrigen Terpene α -Humulene (3), Prennapirodiene (5) und Longifolene (6) umzusetzen.

Alle generierten Varianten konnten funktional, jedoch mit zum Teil stark variierenden Konzentrationen exprimiert werden (Anhang 7.4.4, Tabelle S3). Im Gegensatz zu den Einzelvarianten F95A und F95G wurden in *in vitro* und *in vivo* Biotransformationen mit den Doppelvarianten keine Aktivitäten gegenüber den Terpenen 2 – 7 detektiert. Allerdings konnte bei einigen Varianten *in vivo* eine bis zu 17-fache Steigerung in Bezug auf den Umsatz von β -Ionon (1) zum allylischen 4-Hydroxy- β -ionon (71) verglichen mit dem Wildtyp erzielt werden (Abbildung 36). Die Veränderungen im Hinblick auf die Umsetzung von Valencen (7) waren bei allen Varianten im Vergleich zum Wildtyp minimal. Neben den Zielterpenen wurden mit den beiden erfolgreichen Einzelvarianten F95A und F95G auch weitere interessante und anspruchsvolle Terpene getestet. Die mit dem Wildtypen nur in Spuren umgesetzten Sesquiterpene Caryophyllenoxid (77) und Aromadendren (79) konnten mit den Einzelvarianten mit einer deutlich höheren Aktivität oxyfunktionalisiert werden (Anhang 7.4.4, Abbildung S10), was die Bedeutung der Vergrößerung der aktiven Tasche an der Position F95 für die Akzeptanz großer und sperriger Moleküle bekräftigt.

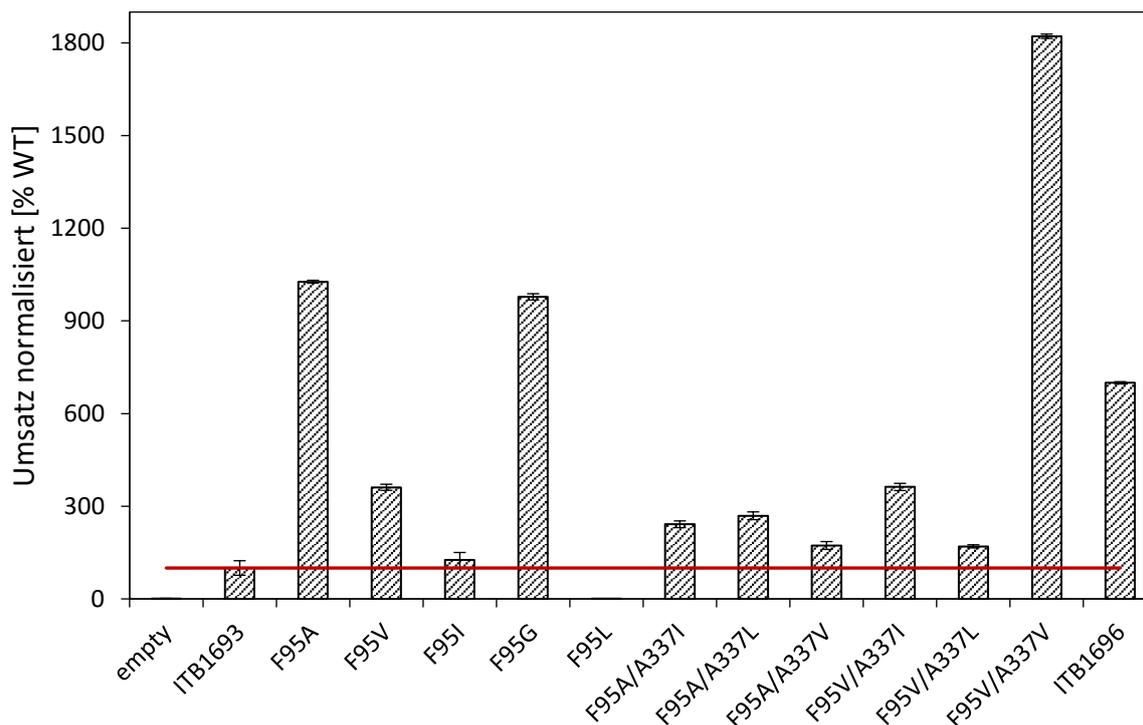


Abbildung 36: *In vivo* Biotransformationen der ITB1693 Varianten mit β -Ionon (**1**) als Substrat. Die Umsätze wurden auf den Wildtypen normalisiert und miteinander verglichen. Der Leervektor pET-28a(+) (*empty*) diente als Negativkontrolle, während ITB1696 als weiterer Vergleich hinzugefügt wurde. Die Biotransformationen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ Zellen in 100 mM KPi Puffer pH 7.5, 30 mM Glucose, 5 mM β -Ionon (**1**) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm über 24 h .

Insgesamt wurde die Umsetzung diverser Sesquiterpene durch rationales Enzymdesign ermöglicht, die vom Wildtyp nicht oder nur in Spuren umgesetzt werden. Die Expression nur eines Enzyms, gekoppelt mit einer guten Aktivität und vielseitigen Einsetzbarkeit, sind Vorteile der Varianten des natürlichen Fusionsproteins ITB1693. Für erste Versuche der Leistungsfähigkeit in einem terpenproduzierenden *E. coli* Stamm wurden die Varianten zu einem Kooperationspartner transferiert. In einem α -Humulen (**3**)-produzierenden *E. coli* Stamm wurden mit der Variante F95A selektiv etwa 300 mg L^{-1} des α -Humulen-6,7-epoxids (**108**, bestätigt durch NMR des Kooperationspartners), im Schüttelkolbenmaßstab hergestellt (Abbildung 37).

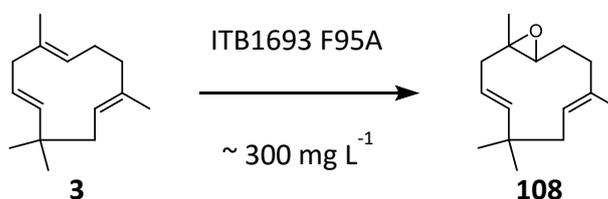


Abbildung 37: *In vivo* Produktion des Oxyfunktionalisierten α -Humulens (**3**) in *E. coli*. Das P450 stellt das letzte Enzym in der Biosynthese des funktionalisierten Terpens ausgehend von der Glucose dar.

Dieses initiale Ergebnis kann als Grundlage weiterer Untersuchungen und Verbesserungen dienen. Interessanterweise wurde bei der kontinuierlichen Synthese von α -Humulen (**3**) eine höhere Selektivität erzielt als bei einmaliger Zugabe wie in dieser Arbeit.

3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus *Chondromyces apiculatus*

Erste vielversprechende Ergebnisse wurden mit einigen der Zielterpene **1** – **7** erzielt. Neue Funktionalitäten konnten mit diversen P450s identifiziert oder auch durch *Enzyme Engineering* erst ermöglicht werden. Insbesondere für die Oxyfunktionalisierung der Sesquiterpene und Vinylionol (**2**) sind bisher jedoch nur sehr wenige P450s bekannt. Durch eine zielgerichtete Strategie sollte das Enzymspektrum in dieser Arbeit schließlich noch weiter komplettiert werden.

Für diesen Ansatz wurde nach Homologen zu terpenhydroxylierenden P450s gesucht. Wie auch in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, weisen P450s aus einer Familie, respektive Unterfamilie, ein ähnliches Substratspektrum auf. Hierzu wurde insbesondere nach Organismen gesucht, die eine große Anzahl an potenziell interessanten P450s für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen besitzen. In Arbeiten rund um das Myxobakterium *Sorangium cellulosum* ce56 wurden bereits P450s charakterisiert, die erfolgreich Norisoprenoide und Sesquiterpene hydroxylieren können.^{323,324,172,325} Verwandte Organismen zeigen häufig auch große Sequenzidentitäten zwischen ihren Proteinen. Deshalb wurde nach verwandten Myxobakterien zu *S. cellulosum* ce56 gesucht, deren Genom bereits entschlüsselt wurde. Die Wahl fiel auf *Chondromyces apiculatus* DSM436, das ein großes Potenzial mit 25 putativen und noch nicht charakterisierten P450s besitzt. Basierend auf Verwandtschaftsanalysen wurden diese analysiert und für die Terpenoxyfunktionalisierung interessante Kandidaten ausgewählt (Tabelle 13). Insbesondere die zu CYP109 und CYP264 zuzuordnenden P450s waren aufgrund der verwandten terpenhydroxylierenden Mitglieder interessant. Die CYP125 Familie wird mit dem Steroidmetabolismus in Verbindung gebracht.³²⁶ Steroide stellen, ähnlich der Sesquiterpene, große, sperrige Moleküle dar, weshalb CYP125E3 als weiteres P450 ausgesucht wurde. Zuletzt wurde noch ein Mitglied der bisher noch nicht charakterisierten CYP263 Familie für eine Untersuchung bestimmt. Der Organismus *C. apiculatus* DSM436 wurde von der DSMZ bezogen und die genomische DNA von einer VY/2-Agarplatte isoliert (2.2.2). Die Gene der jeweiligen P450s wurden durch die entsprechenden Primer mittels PCR amplifiziert (2.2.8), über ein Agarosegel aufgereinigt (2.2.6) und über Restriktionsschnittstellen in pET-28a(+) kloniert (2.2.11 und 2.2.12). Gegebenenfalls wurde ein für *E. coli* häufigeres Stopcodon mit Hilfe der Amplifikations-Primer integriert.

3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus *Chondromyces apiculatus*

Tabelle 13: Verwandtschaftsanalyse ausgewählter P450s aus *Chondromyces apiculatus* DSM436. Die Annotierung wurde dankenswerterweise von Professor D. Nelson durchgeführt, basierend auf der P450-Nomenklatur.

P450 Name	Gen ID	Verwandtschaftsanalyse			
		Spezies	P450 Name	Sequenz-identität [%]	Mitglied charakterisiert
CYP109Q5	WP_044244829	<i>Chondromyces crocatus</i>	CYP109Q1	70	311,327
CYP125E3	WP_044235968	<i>Chondromyces crocatus</i>	CYP125E2	79	328,329
CYP263A4	WP_081864854	<i>Sorangium cellulosum</i>	CYP263A1	76	Nein
CYP264M1	WP_044236373	<i>Archangium gephyra</i>	CYP264F1	50	172,325
CYP264A4	WP_044240715	<i>Sorangium cellulosum</i>	CYP264A1	61	

Alle P450s konnten zunächst mit *E. coli* BL21(DE3) oder Rosetta(DE3) nicht funktional exprimiert werden. Dementsprechend wurden die Gene in die alternativen Expressionsvektoren pCWori(+) sowie pBAD33 kloniert (2.2.12), die Expression untersucht und durch Variation der Temperatur verbessert. Schließlich konnten mit allen P450s trotz des hohen GC-Gehalts und der zahlreichen *rare codons* in den Genen funktionale und zum Teil sehr hohe P450-Expressionen erzielt werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Expressionsbedingungen der ausgewählten P450s aus *Chondromyces apiculatus* DSM436. Die Expression erfolgte in 400 mL TB-Medium über Nacht.

P450 Name	Molare Masse [kDa]	Expressionsvektor	Expressionsstamm	Expressions-temperatur [°C]	P450-Konzentration [$\mu\text{mol L}^{-1}$ (Zellkultur)]
CYP109Q5	44	pBAD33	JW5510	25	1,33
CYP125E3	44	pCWori(+)	DH5- α	20	2,35
CYP263A4	57	pBAD33	JW5510	30	0,39
CYP264M1	44	pBAD33	JW5510	30	0,59
CYP264A4	44	pBAD33	JW5510	30	0,14

Die funktionale Expression von CYP109Q5, CYP263A4, CYP264M1 sowie CYP264A4 im Zellysate war lediglich im pBAD33-Vektor unter dem streng regulierten Arabinosepromoter möglich. Die ersten Tests mit den Zielterpenen **1 – 7** erfolgten zunächst *in vitro* mit Zellysate und den drei aufgereinigten heterologen Redoxpartnersystemen CamA und CamB, FdR und FdX oder FdR und AdX (2.5.2).

Keine Aktivität konnte mit CYP263A4 und CYP264A4 erhalten werden (Tabelle 15). Dagegen wiesen CYP264M1 und CYP125E3 Aktivitäten mit CamA und CamB als Redoxpartner

gegenüber β -Ionon (**1**) auf. Während bei CYP125E3 ein zweites Produkt zusätzlich zum allylischen 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) detektiert werden konnte, wurde des Weiteren eine Aktivität von CYP264M1 gegenüber Longifolen (**6**) erzielt. Mit CYP109Q5 konnten schließlich alle Zielterpene **1 – 7** oxyfunktionalisiert werden. Die Aktivität mit den Redoxpartnern CamA und CamB war dabei höher als mit FdR und FdX.

Tabelle 15: *Screening* der *Chondromyces apiculatus* P450s auf Aktivität gegenüber den Terpen-Zielsubstraten **1 – 7**. Für das *Screening* wurden jeweils die Redoxpartner CamA + CamB, FdR + FdX oder FdR + AdX eingesetzt, um einen funktionalen Elektronentransfer zu gewährleisten. Das *Screening* erfolgte *in vitro* mittels Zellysat (2 μ M P450) und 1 mM Substrat für 24 h.

P450	Redoxpartner	1	2	3	4	5	6	7
CYP109Q5	CamA + CamB > FdR + FdX	+	+	+	+	+	+	+
CYP125E3	CamA + CamB	+	Spuren	-	-	-	-	-
CYP263A4	nicht identifiziert	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CYP264M1	CamA + CamB	+	-	Spuren	-	-	+	-
CYP264A4	nicht identifiziert	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: bisher kein funktionaler Redoxpartner identifiziert, +: Aktiv, -: nicht-aktiv

Die drei aktiven P450s sollten schließlich nach Aufreinigung weitergehend untersucht werden. Die P450s wurden deshalb mittels Ionenaustauscher (IEX, 2.4.1.2) aufgereinigt, jedoch konnte CYP264M1 im Tris/HCl Puffer pH 8.2 nicht erfolgreich an die Gelmatrix gebunden werden. Der Erfolg der Aufreinigung von CYP109Q5 und CYP125E3 wurde durch eine SDS-PAGE sowie CO-Differenzspektren überprüft (2.4.3 und 2.4.5.2, Anhang 7.4.5, Abbildung S11). Mit den beiden P450s wurden die *in vitro* Biotransformationen mit CamA und CamB als elektronenliefernde Redoxpartner wiederholt und die Substratspektren von CYP109Q5 und CYP125E3 weitergehend untersucht (Abbildung 38). Neben unterschiedlichen Norisoprenoiden wurden von beiden P450s verschiedene zyklische und azyklische Monoterpene wie Geranylaceton (**88**) oder Limonen (**92**) oxyfunktionalisiert. Gleichzeitig waren beide in der Lage, *cis*-Stilben (**95**) sowie Ibuprofen (**15**) zu hydroxylieren. CYP109Q5 wies darüber hinaus neben den Zielsesquiterpenen (**3 – 7**) Aktivitäten gegenüber Diclofenac (**8**), Mefenaminsäure (**19**), Aromadendren (**79**), Nerolidol, (**89**) und Camphor (**90**) auf. Weiterhin setzte CYP109Q5, im Gegensatz zu CYP125E3, die Steroide Progesteron (**96**) und Testosteron (**97**) um. Insgesamt zeigte sowohl CYP109Q5 als auch CYP125E3 ein sehr breites Substratspektrum mit interessanten Reaktivitäten. Die für die CYP109 Familie charakteristische Hydroxylierung von Fettsäuren wurde mit CYP109Q5 nur in Spuren erzielt (Anhang 7.4.7, Tabelle S5).

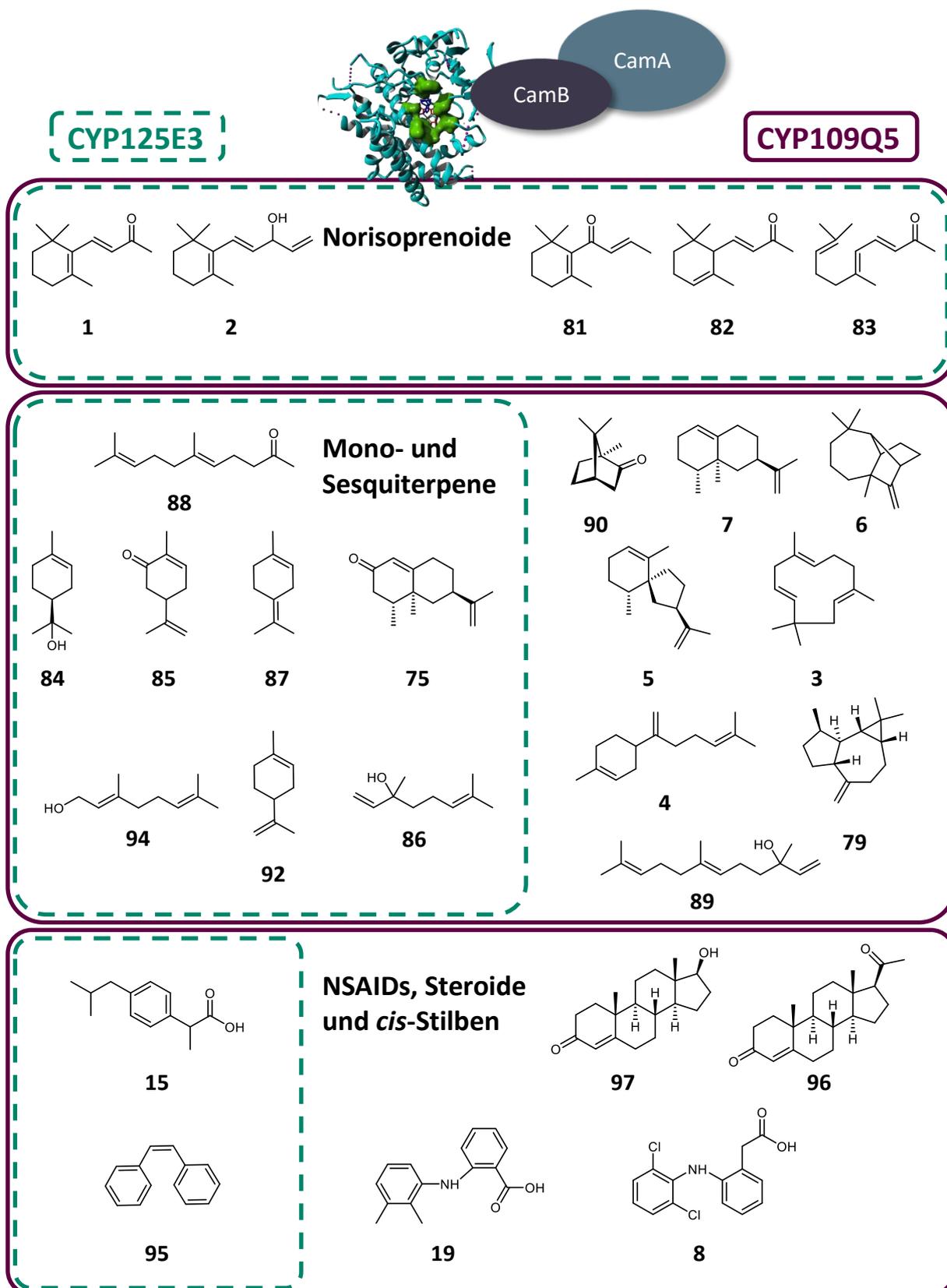


Abbildung 38: Substratspektren von CYP109Q5 und CYP125E3 aus *C. apiculatus*. Die *in vitro* Biotransformationen wurden mit aufgereinigten P450 (2 μ M) sowie CamA und CamB als Redoxpartner für 24 h durchgeführt.

3.7.1 Rationales Enzymdesign von CYP109Q5

Mit dem neu-charakterisierten CYP109Q5 aus *C. apiculatus* DSM436 konnten alle Zielterpene **1 – 7** sowie viele weitere bedeutende Verbindungen umgesetzt werden. An dieser Stelle war der Ansatz eines rationalen Enzymdesigns von großem Interesse, um die Aktivitäten und Selektivitäten positiv zu beeinflussen. Hierzu wurde zunächst ein Homologiemodell von CYP109Q5 über die P450-3DM-Datenbank erzeugt und die Zielterpene **1 – 7** mittels der Software YASARA ins aktive Zentrum gedockt (2.7.4, Abbildung 39). Basierend auf der Analyse der P450-3DM-Datenbank über *hotspot*-Regionen in P450 Enzymen sowie dem Kontakt zu den gedockten Substraten, wurden Aminosäurereste für die Mutagenese ausgewählt.

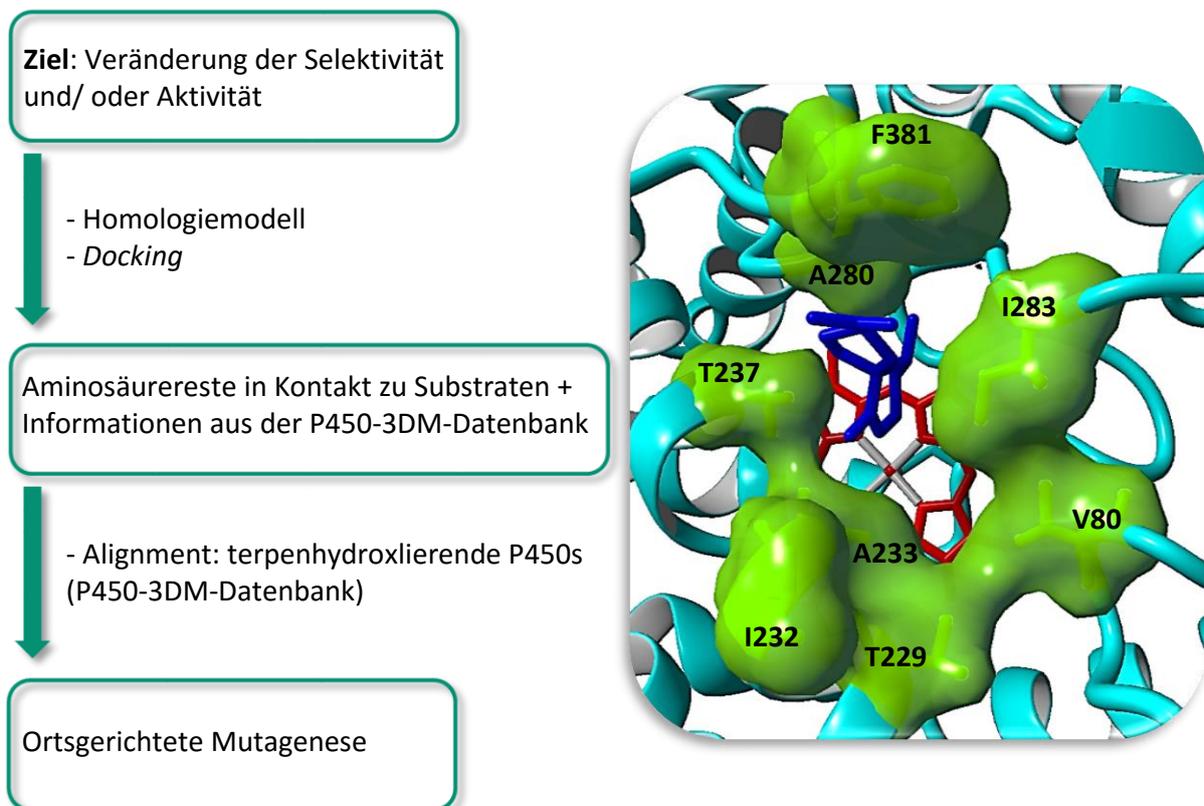


Abbildung 39: Strategie des rationalen Enzymdesigns von CYP109Q5. Das Homologiemodell von CYP109Q5 basierte auf dem Templat 2BVJ (P450 PikC, CYP107L1). Die Oberflächen der zur Mutagenese ausgewählten Aminosäuren sind grün dargestellt. In das aktive Zentrum (Häm, rot) wurde Premnaspodiolen (**5**, blau) durch AutoDock Vina modelliert.

Für den Austausch wurden insbesondere hydrophobe Aminosäuren unterschiedlicher Größe gewählt. Die P450-Datenbank lieferte gleichzeitig Informationen darüber, welche Aminosäurenverteilung in der ganzen P450-Superfamilie an einer spezifischen Position existiert. Des Weiteren wurde durch ein fokussiertes Alignment (*subset*) mit terpenhydroxylierenden P450s gezielt betrachtet, welche Aminosäuren an der entsprechenden Position vorkommen. Dadurch können durch die Natur entwickelte Strategien abgeleitet und gleichzeitig die Veränderung zu möglichen nicht-funktionalen

Aminosäuren, die zu einer Fehlfaltung durch Zerstörung der Quartärstruktur führen, verhindert werden. Zudem wurden Doppelvarianten, basierend auf den beiden *hotspot*-Positionen (V80 und A280), generiert. V80 entspricht dem F87 in P450 BM3 (Position 57 in 3DM), welche in diesem P450 eine entscheidende Rolle in der Determinierung der Aktivität und Selektivität besitzt.³²² Bei der Aminosäure A280 handelt es sich um die fünfte Aminosäure nach dem konservierten ExxR-Motiv, deren Mutagenese ebenfalls einen großen Einfluss auf die Enzymeigenschaften zeigte.³³⁰ Auch in dieser Arbeit konnten anhand der Varianten mit ITB1693 interessante Ergebnisse bezüglich der beiden *hotspot*-Regionen erzielt werden. Diese Positionen wurden weiterhin in Kombination mit Aminosäuren adressiert, die sich nahe am katalytisch aktiven Häm befinden (T237, I283 und T229). Insgesamt 28 Einzel- und Doppelvarianten wurden schließlich durch die QuikChange® Methode generiert. Entscheidender Faktor war hierbei die Addition von DMSO bei gleichzeitiger Reduktion der *Annealing*-Zeit in der PCR, da ansonsten, aufgrund eines sehr hohen GC-Gehalts (Templat 70%, Primer bis zu 78%), Primermultimere integriert wurden (2.2.9).

Alle Varianten wurden heterolog im *E. coli* Stamm JW5510 exprimiert (2.3.8), aufgeschlossen (2.3.10.1) und schließlich *in vitro* mit Zellysate sowie CamA und CamB als Redoxpartner für 24 h getestet. Die Ergebnisse mit den Zielterpenen **1** – **7** wurden schließlich analysiert und der Effekt des Austausches festgestellt (Tabelle 16). In der Regel zeigte die jeweilige Variante mit den unterschiedlichen Zielterpenen insgesamt einen analogen Effekt (Anhang 7.4.8, Abbildung S12). Wie bereits mit dem Wildtyp beobachtet, wurden über eine Reaktionsdauer von 24 h mehrere Produkte detektiert, deren Verteilung sich zum Teil stark von der des Wildtyps unterschied. Der Austausch Q35V, an einer möglichen Ankerposition für die Carboxylgruppe von Fettsäuren in Fettsäure-Hydroxylasen, bewirkte eine leichte Steigerung der Aktivität mit einigen Substraten im Vergleich zum Wildtyp. Der Austausch der Position V80 hatte zum Teil einen starken Effekt auf die Aktivität und Selektivität zur Folge. Während die kleinen hydrophoben Aminosäuren Glycin und Alanin eine teilweise hohe Steigerung der Aktivität mit den meisten Terpenen bewirkte, nahm die Aktivität über Leucin bis hin zum Isoleucin im Vergleich zum Wildtyp (Valin) deutlich ab. Die Mutationen T229L sowie T229S hatten einen positiven Einfluss auf die Aktivität und führten im Vergleich aller Varianten zu der größten Veränderung der Produktverteilung. Dies konnte insbesondere mit den Norisoprenoiden β -Ionon (**1**) und Vinylionol (**2**) beobachtet werden (Anhang 7.4.8 Abbildung S12). Die Position I232 wurde zu der sehr ähnlichen Aminosäure Leucin ausgetauscht, da alle terpenhydroxylierenden P450s im *subset* diese Aminosäure an der Position besitzen. Dies zog keine wirkliche Veränderung der Enzymeigenschaften nach sich, ebenso wenig wie die Mutagenese an Position A233. In der P450-Superfamilie (~ 38000 Sequenzen) besitzen 85% der Proteine ein Threonin an Position 237, was mit der O₂-Aktivierung in Verbindung gebracht wird.^{61,235,331} Das Threonin wurde deshalb zur kürzeren,

aber ebenfalls polare Aminosäure, Serin, ausgetauscht (6% der Proteine), was einen positiven Effekt auf die Aktivität und Selektivität herbeiführte.

Tabelle 16: Ergebnisse des rationalen Enzymdesigns von CYP109Q5. Die Varianten wurden zunächst *in vitro* mit Zelllysat (2 μ M P450) sowie CamA und CamB als Redoxpartner für 24 h mit den Zielterpenen **1** – **7** getestet. Adressierte Positionen sind mit dem jeweiligen durchgeführten Austausch sowie der Ergebnisse aus den bioinformatischen Analysen dargestellt. Basierend auf den Biotransformationen mit **1** – **7** wurden folgende Effekte beobachtet: ↓ negativer Effekt; → wildtypisch; ↗ geringer positiver Effekt; ↑ positiver Effekt; ↑↑ starker positiver Effekt.

Position	Analyse	Austausch	Effekt
Einzelvarianten			
Q35	Anker für Fettsäuren?	V	↗
V80	<i>hotspot</i> -Position 57 ^{3DM}	G, A, I, L	↑↑ (G, A) → (L) ↓ (I)
T229	<i>hotspot</i> -Position 211 ^{3DM}	S, L	↑ (vor allem bei Norisoprenoiden)
I232	Terpen-Hydroxylasen (100% Leu)	L	→
A233	<i>hotspot</i> -Position + Kontakt	G, V	→
T237	konserviert: O ₂ -Aktivierung?	S	↑
A280	fünf Reste nach ExxR-Motiv	V, L, I, F	↑↑ (I, V) ↓ (L, F)
I283	Kontakt mit Substrat	L, V	↑↑
F381	<i>hotspot</i> -Position: Regioselektivität	V	↗
Doppelvarianten			
	Kombination		
V80A	A280L, A280I, A280V		↑↑
V80G	A280I, A280V		↑↑
V80G	I283L, T237S^{a)}		↑
V80G	T229S, T229L		- ^{b)}
A280V	T229L		↑↑

a) geringe funktionale Expression

b) kein funktionales P450 nach Expression

Die *hotspot*-Position A280 wurde dergestalt mutiert, dass der Einfluss von hydrophoben Aminosäuren variierender Größe an der Stelle des Alanins untersucht werden konnte. Während der Austausch zu Leucin und Phenylalanin einen negativen Effekt auf die Aktivität von CYP109Q5 zur Folge hatte, bewirkten A280I sowie A280V mit den meisten Substraten eine starke Steigerung der Aktivität bei gleichzeitiger Veränderung der Produktverteilung.

Ein ähnlich positiver Effekt konnte mit der Mutagenese der Position I283 erzielt werden, hier insbesondere mit dem Austausch I283L (Anhang 7.4.8 Abbildung S12). Die letzte Einzelvariante F381V hatte einen geringen positiven Effekt als Resultat. Die Doppelvarianten, bestehend aus V80G oder V80A mit dem Austausch an Position A280, besaßen alle einen stark positiven Einfluss auf die Aktivität und Selektivität von CYP109Q5 (Tabelle 16). Weiterhin wurden gesteigerte Aktivitäten mit den Doppelvarianten V80G und I283L respektive T237S erzielt. Allerdings wiesen diese Varianten eine geringe funktionale Expression auf, charakterisiert durch ein starkes Maximum bei 420 nm im CO-Differenzspektrum (2.4.5.2). Von den Doppelvarianten V80G und T229S respektive T229L wurde sogar kein korrekt gefaltetes P450 nach Expression erhalten. Die Kombination A280V und T229L hingegen konnte gut exprimiert werden und zeigte einen starken positiven Effekt auf Aktivität und Selektivität im Vergleich zum Wildtyp.

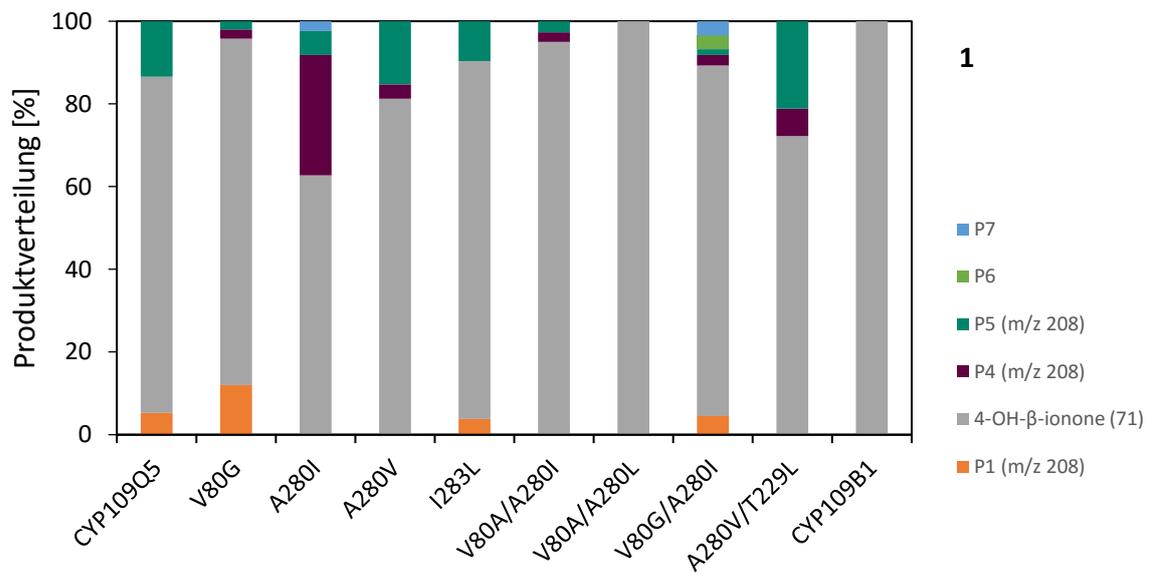
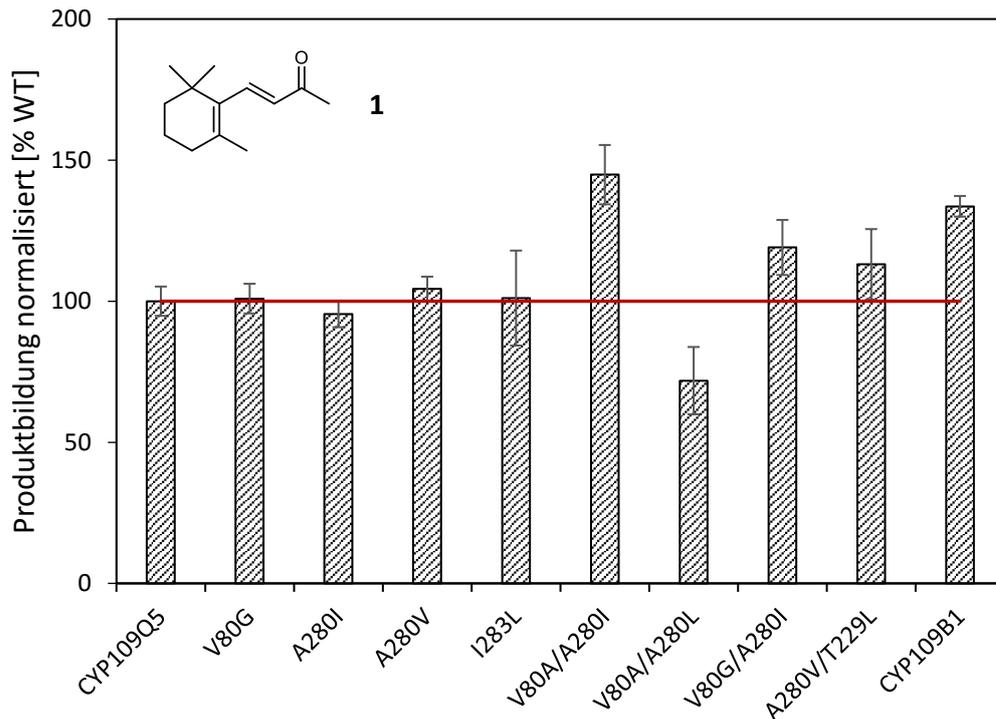
Insgesamt wurden durch das rationale Enzymdesign Positionen detektiert und adressiert, deren Austausch zu starken Veränderungen hinsichtlich der Reaktivität gegenüber den Zielterpenen **1 – 7** führte. Durch die zahlreichen unbekanntes sowie oftmals weiteroxidierten Produkte, die durch GC-MS festgestellt wurden (2.6.1), fällt es zu diesem Zeitpunkt schwer, Urteile über die Produktselektivität zu treffen. Die weitere detailliertere Charakterisierung sollte letztlich mit aufgereinigten Enzymen erfolgen.

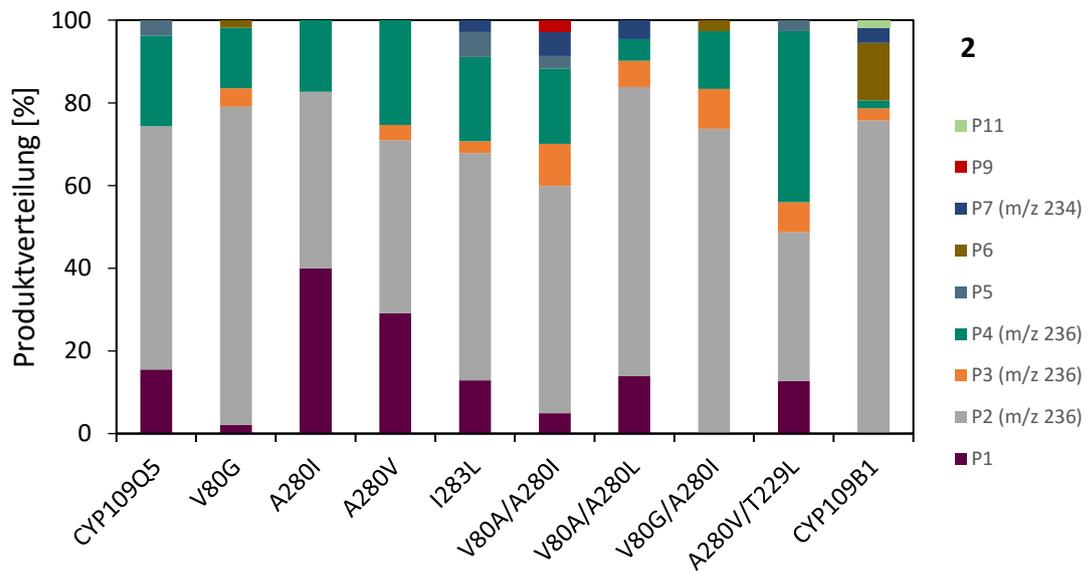
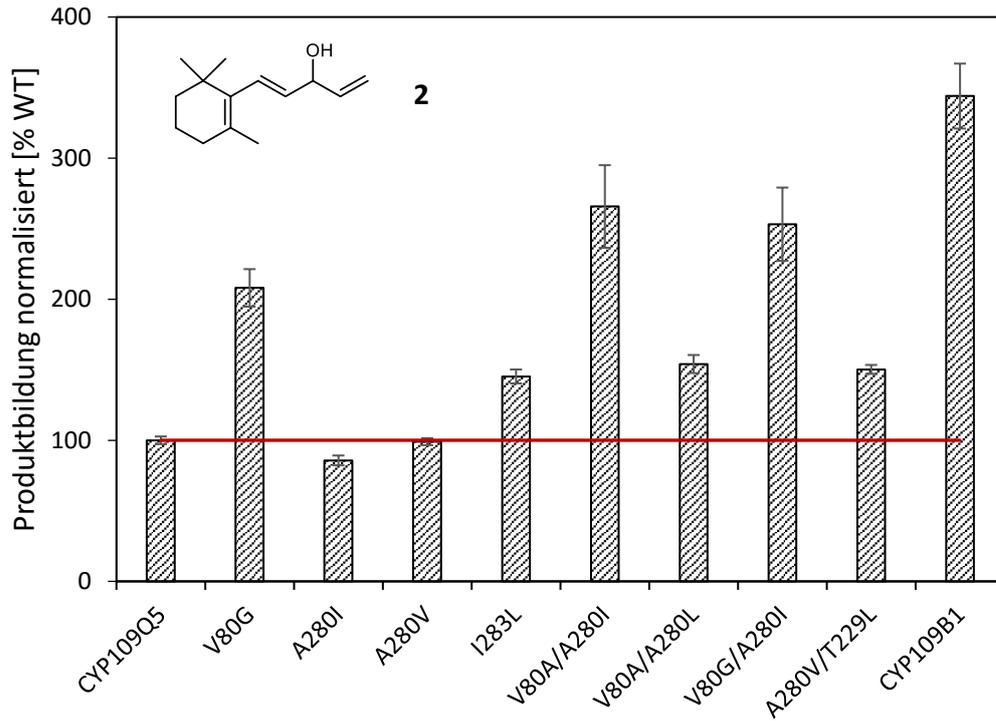
3.7.2 *In vitro* Charakterisierung der CYP109Q5-Mutantenbibliothek

Für die Aufreinigung und weitergehende Charakterisierung *in vitro* wurden acht Varianten ausgewählt, die den größten Effekt hinsichtlich Aktivität und Selektivität im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Insgesamt vier Einzelvarianten (V80G, A280I, A280V, I283L) sowie vier Doppelvarianten (V80A/A280I, V80A/A280L, V80G/A280I, A280V/T229L) wurden erfolgreich mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt (2.4.1.2) und deren Konzentration und Funktionalität durch CO-Differenzspektroskopie überprüft (2.4.5.2). Zunächst wurden auch alternative Redoxpartner mit CYP109Q5 auf einen effizienten Elektronentransport hin untersucht. Von den bereits in Kapitel 3.5.1 beschriebenen 24 Redoxpartnerkombinationen (darunter CamA und CamB) wurde mit CYP109Q5 unter der Verwendung des Substrats β -Ionon (**1**) kein aktiveres Redoxpartnersystem detektiert als CamA und CamB. Die Biotransformationen mit den aufgereinigten Varianten sowie dem Wildtyp wurden dementsprechend *in vitro* mit CamA und CamB als Redoxpartner für zwei Stunden mit den Zielterpenen **1 – 7** durchgeführt. Als Vergleich wurde des Weiteren CYP109B1 aus *B. subtilis* eingesetzt. Es stellte sich heraus, dass dieses Enzym bis auf β -Bisabolen (**4**) alle Zielterpene umsetzen kann (Abbildung 40), in Addition zu den bisher bekannten Substraten β -Ionon (**1**) sowie Valencen (**7**).³¹¹ Die Aufreinigung sowie Reduktion der Reaktionszeit reduzierte zwar die Nebenproduktbildung in geringem Maße, jedoch

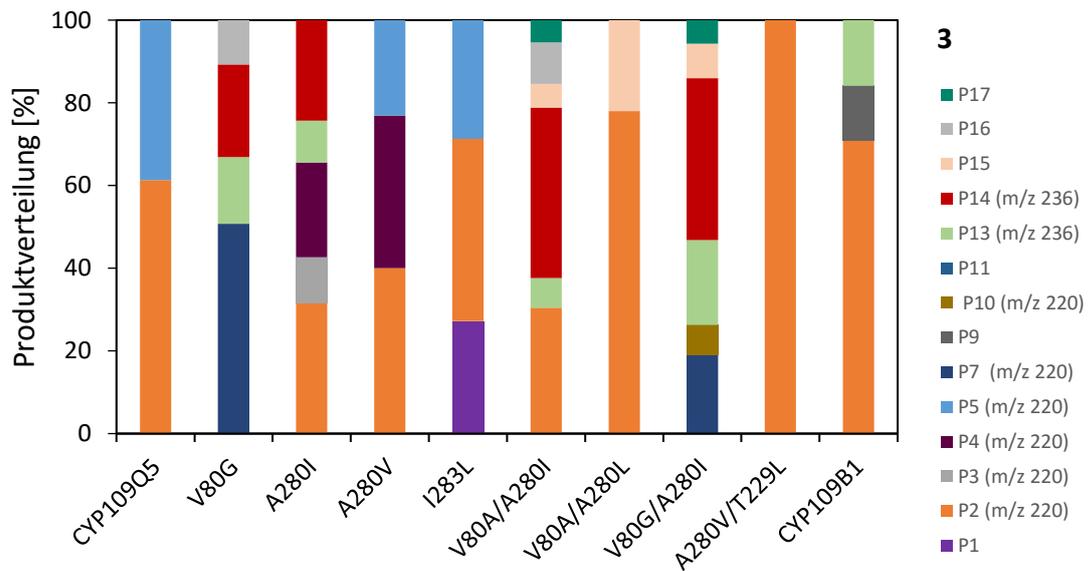
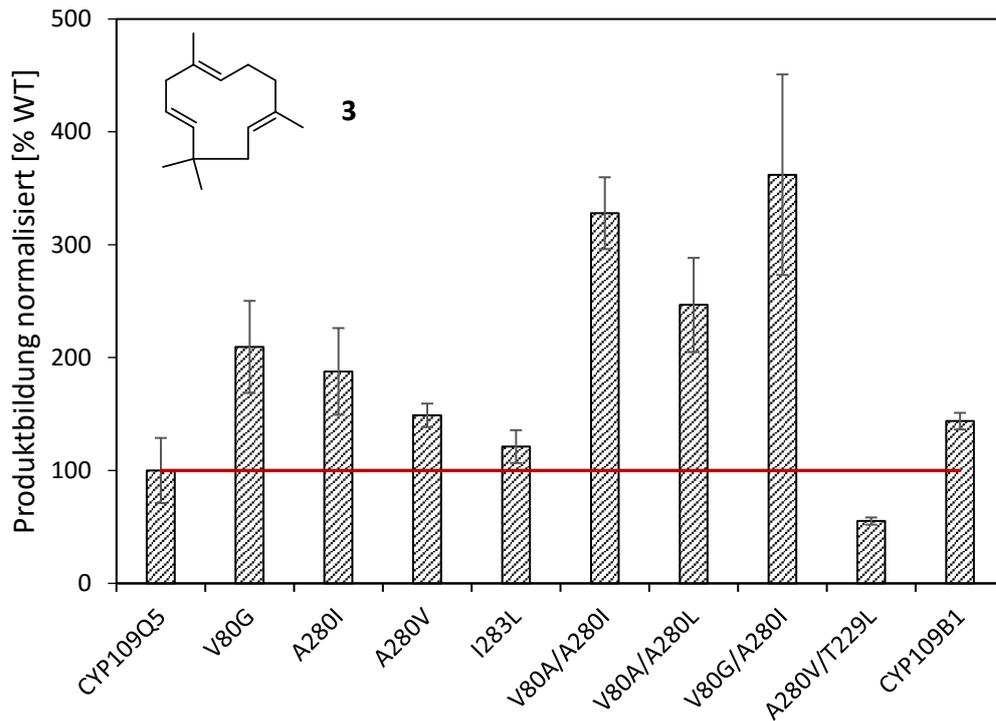
wurden weiterhin viele unterschiedliche Produkte und Weiteroxidationen detektiert, die schließlich über GC-FID und GC-MS analysiert wurden (2.6.1). Mit β -Ionon (**1**) als Substrat wurden mit den unterschiedlichen Varianten etwa gleiche Aktivitäten erzielt. Interessanterweise zeigten diese jedoch, wie bereits im *Lysat-Screening* beobachtet, Verschiebungen in der Produktverteilung. Während CYP109B1 selektiv nur in allylischer Position hydroxylierte, wurden beim CYP109Q5-Wildtypen zwei weitere hydroxylierte Produkte detektiert (208 m/z, Abbildung 40). Mit den Varianten konnten weitere Produkte wie P4 (A280I) sowie Verschiebungen etwa zum Produkt P5 (A280V/T229L) erzielt werden. Ähnliche Verschiebungen wurden mit Vinylionol (**2**) als Substrat beobachtet, das zudem mit den Varianten V80G, V80A/A280I, V80G/A280I sowie CYP109B1 mit einer höheren Aktivität katalysiert wird im Vergleich zum CYP109Q5-Wildtypen. Nahezu alle Varianten wiesen mit α -Humulen (**3**) eine erhöhte Aktivität auf mit einer zum Teil bis zu vierfachen Steigerung. Auch die Produktverteilung variierte stark, mit teilweise gänzlich neuen oder zweifach hydroxylierten Produkten (236 m/z). Das Substrat β -Bisabolen (**4**) war von allen Zielterpenen diejenige Verbindung, mit der die geringsten Aktivitäten erzielt wurden. Unterschiedliche Produkte konnten hier nur mit dem CYP109Q5 Wildtypen und den Varianten A280I, A280V, I283L, V80A/A280I sowie A280V/T229L generiert werden. Mit dem Substrat Premnaspirodien (**5**) konnte mit den Varianten A280I sowie V80A/A280I eine etwa dreifache Steigerung der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp erhalten werden. Beide enthielten dementsprechend ein weiteroxidiertes zweifach hydroxyliertes Produkt (234 m/z). Mit den Varianten kam es eher zu einer Verschiebung der Verhältnisse von P4, P5 und P11 anstatt weiterer neu gebildeter Produkte. In den Biotransformationen mit Longifolen (**6**) fiel insbesondere Variante V80A/A280I auf mit einer fünffach gesteigerten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier kam es zu Weiteroxidationen und zur Bildung zahlreicher neuer Produkte im Vergleich zum CYP109Q5-Wildtyp. Die größte Steigerung der Aktivität wurde mit Valencen (**7**) gemessen. Eine bis zu zehnfache Erhöhung wurde abermals mit Variante V80A/A280I erreicht, die vor allem Weiteroxidationsprodukte von Nootkaton zeigte.

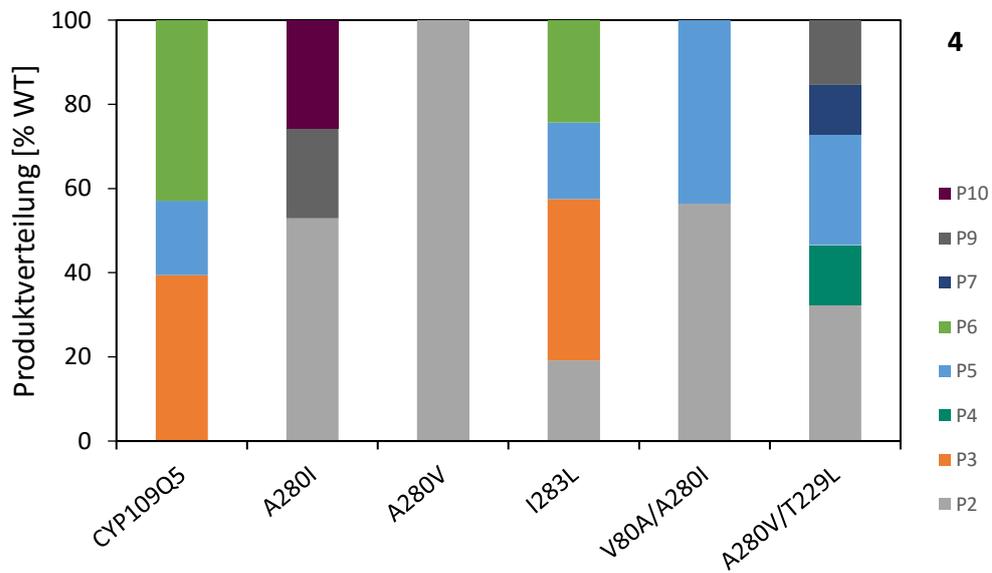
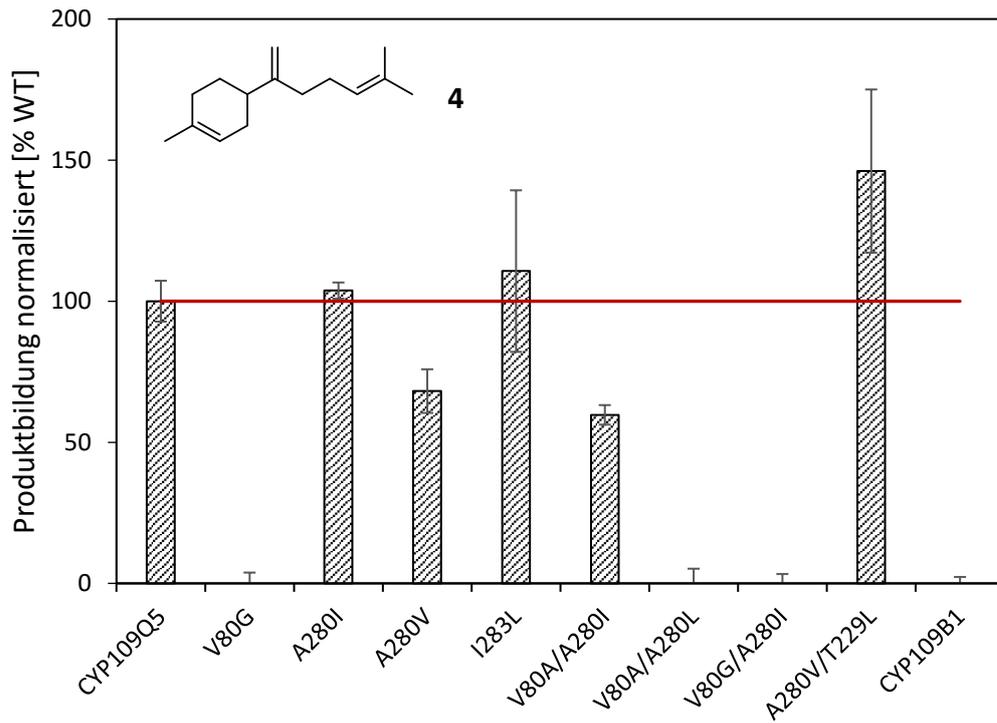
3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus *Chondromyces apiculatus*



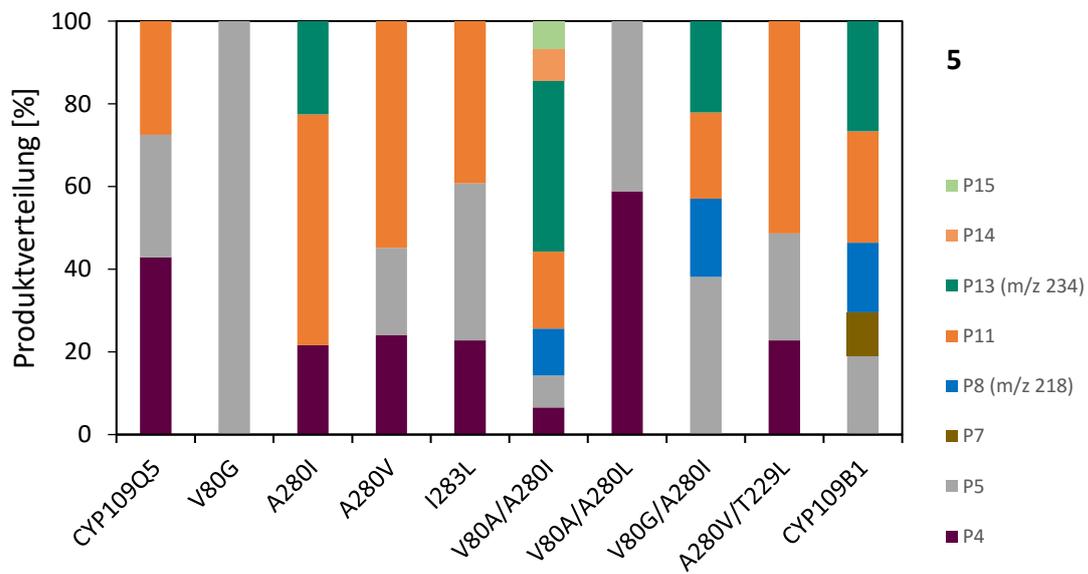
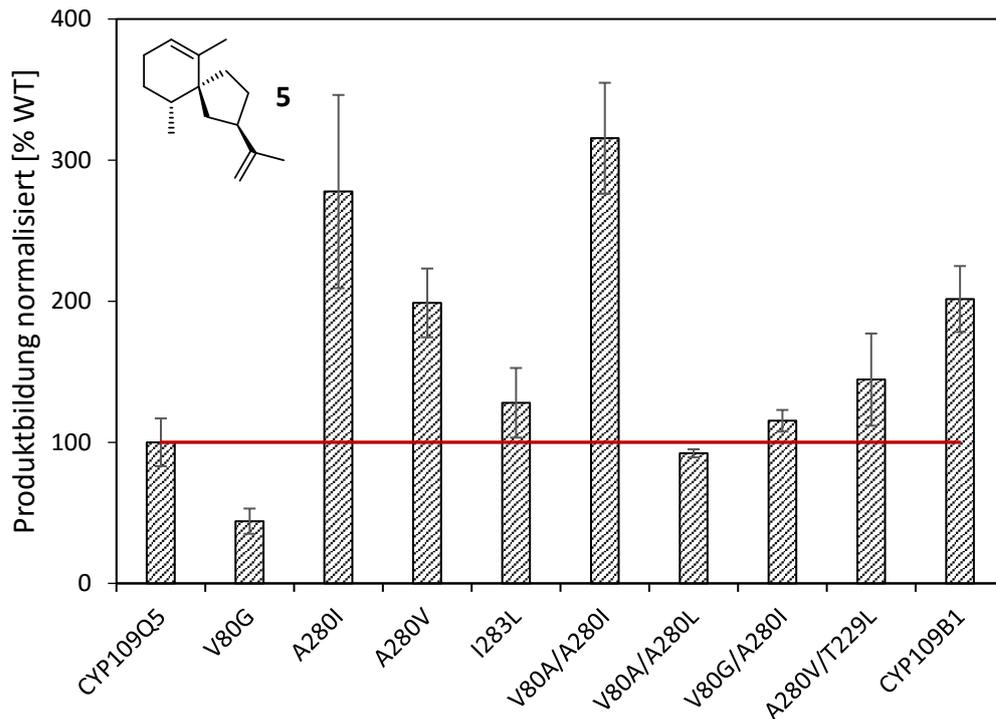


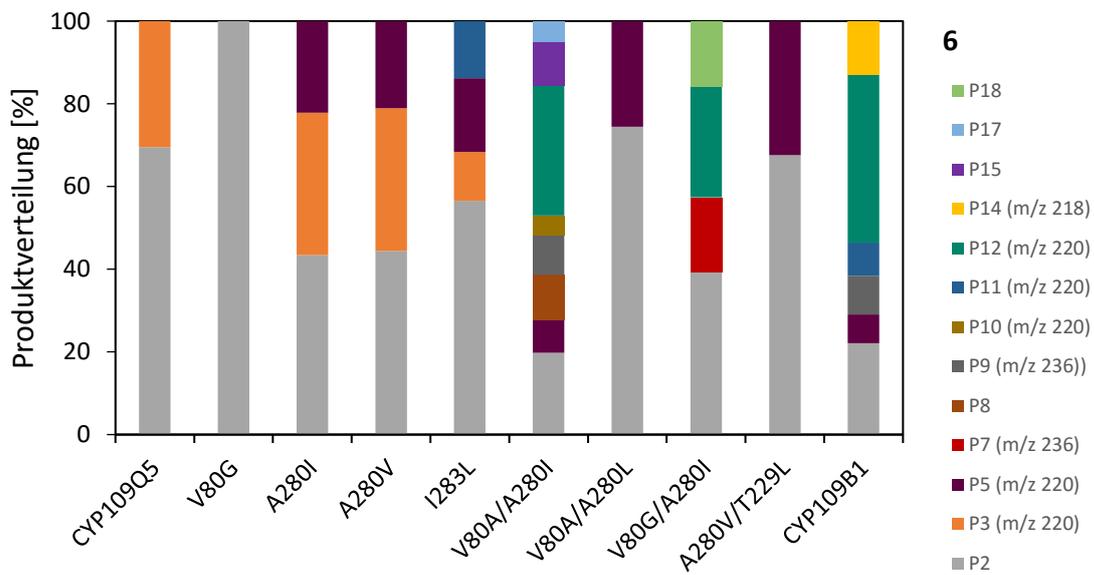
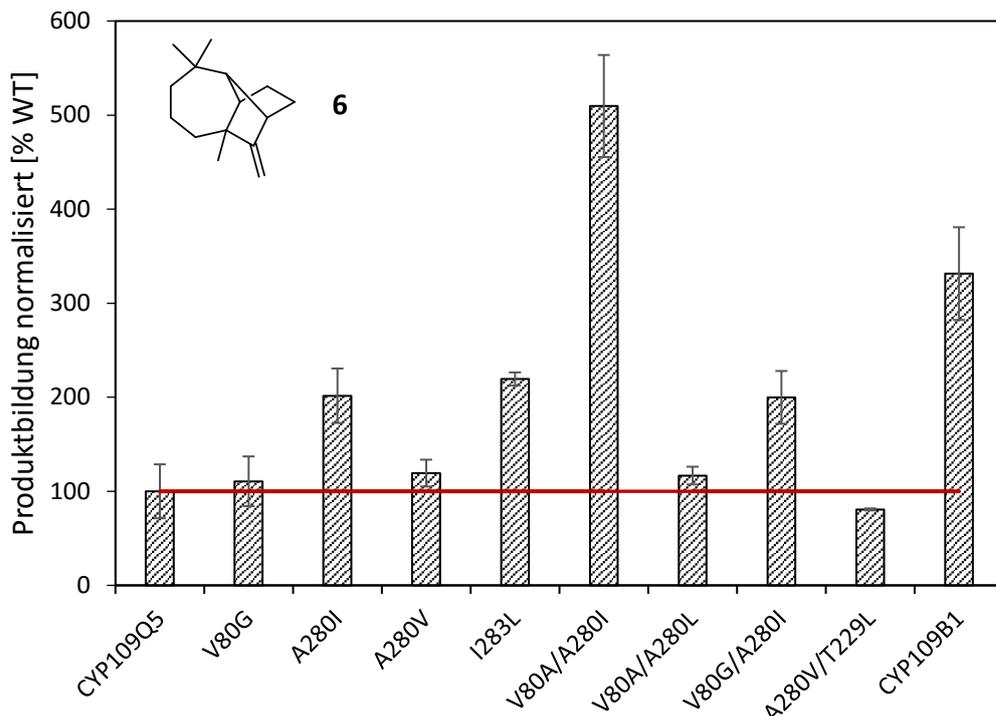
3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus *Chondromyces apiculatus*





3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus *Chondromyces apiculatus*





3.7 Neue P450-Biokatalysatoren aus *Chondromyces apiculatus*

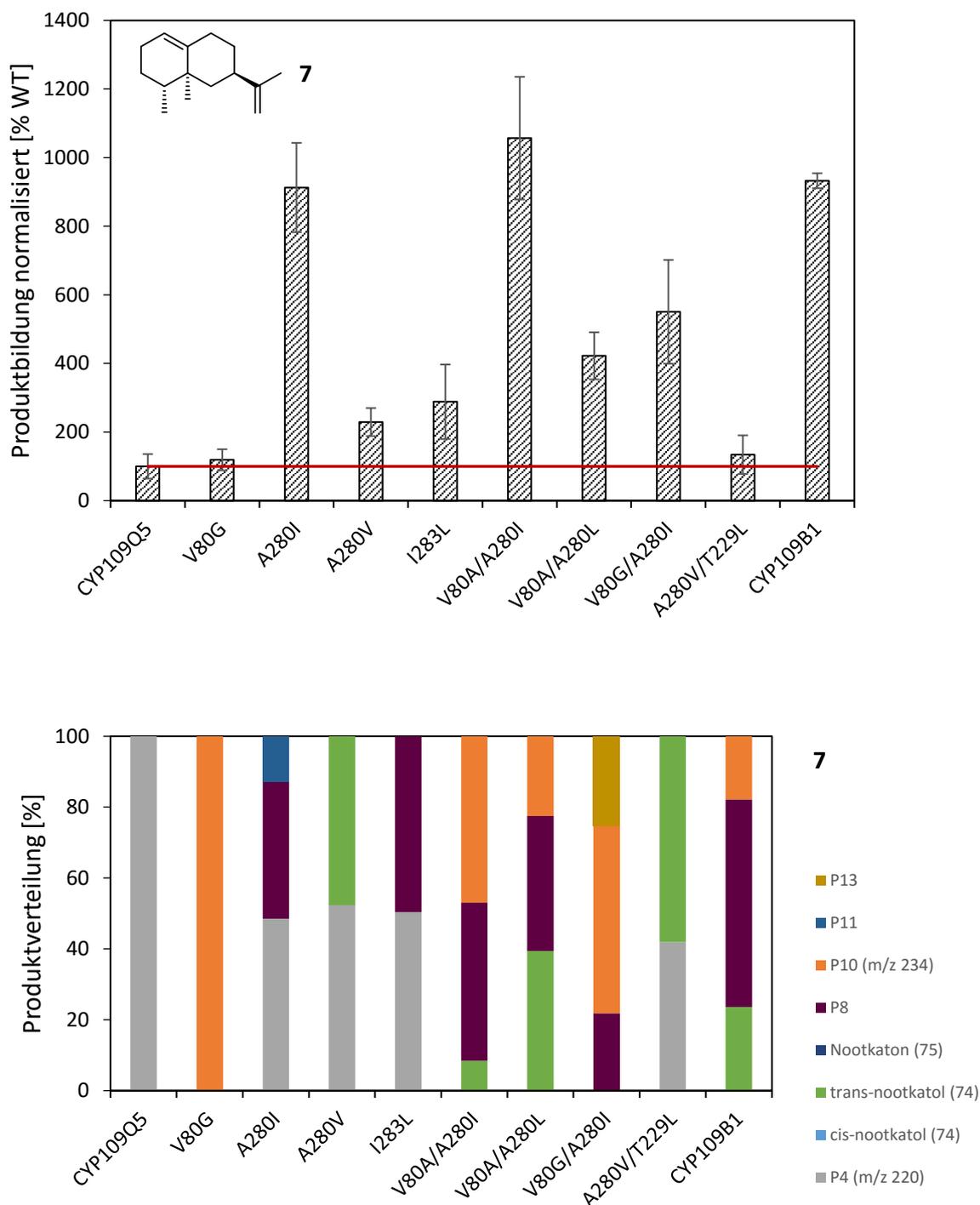


Abbildung 40: *In vitro* Biotransformationen mit den Zielterpenen **1** – **7**. Der CYP109Q5-Wildtyp aus *C. apiculatus* und ausgewählte Varianten sowie CYP109B1 aus *B. subtilis* wurden als aufgereinigte Enzyme mit CamA und CamB als Redoxpartner getestet. Die Biotransformationen wurden mit 2 μ M P450 sowie 1 mM Substrat für 2 h durchgeführt und mittels GC-FID und GC-MS analysiert. Für die Quantifizierung der gebildeten Produkte wurden diese auf den internen Standard Carvon bezogen. Hierbei wurde ein *threshold*-Wert von 0,07 respektive 0,04 bei Bisabololen (**4**) für jedes Produkt definiert und die gesamte Produktbildung auf den CYP109Q5-Wildtypen normalisiert.

Insgesamt wurden zahlreiche Varianten generiert, die eine erhöhte Aktivität und veränderte Produktverteilungen aufwiesen als der CYP109Q5-Wildtyp. Ähnlich zum CYP109B1-Wildtypen aus *B. subtilis* wurden mehrere Produkte detektiert. Varianten mit höherer Aktivität produzierten zumeist mehr Produkte als diejenigen mit niedrigerer Aktivität. Eine

Weiteroxidation der Produkte der ersten Oxyfunktionalisierung konnte hier oftmals identifiziert werden. In Biotransformationen mit möglichen Produkten wie Nootkaton (**75**) und Caryophyllenoxid (**77**) wurden generell höhere Aktivitäten im Vergleich zu den ähnlichen nicht-oxyfunktionalisierten Verbindungen α -Humulen (**3**) sowie Valencen (**7**) erhalten. Zusätzlich zu den Zielterpenen wurden weitere Verbindungen wie Diclofenac (**8**), Mefenaminsäure (**19**), β -Caryophyllen (**78**) und Aromadendren (**79**) getestet und auch hier resultierte eine zum Teil enorme Steigerung der Aktivität durch einzelne Varianten (Anhang 7.4.9 Abbildung S13). Mit Mefenaminsäure (**19**) wurde mit allen Varianten sehr selektiv 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (**20**) gebildet.

In Ergänzung wurden CYP125E3 aus *C. apiculatus*, CYP109B1 aus *B. subtilis*, CYP109Q5 aus *C. apiculatus* sowie CYP109Q5 Varianten gegenüber unterschiedlichen Norisoprenoiden sowie Ibuprofen (**15**) getestet. CYP109B1 zeigte mit Ibuprofen (**15**) die höchste Aktivität, während mit der Variante I283L etwa 50% Umsatz und CYP125E3 mit sehr geringer Aktivität selektiv das Produkt 2-Hydroxyibuprofen (**16**) gebildet wurde (Anhang 7.4.9 Abbildung S13). Mit den Norisoprenoiden β -Damascon (**81**), α -Ionon (**82**) und Pseudoionon (**83**) wurden mit den Konstrukten vergleichbare Ergebnisse zu den Biotransformationen mit β -Ionon (**1**) erzielt. Auch hier wurden zusätzlich zu den allylisch hydroxylierten Positionen bei CYP109B1 weitere hydroxylierte Produkte gebildet. Die Aktivitäten mit CYP125E3 waren dagegen im Vergleich sehr gering. Durch die Konstrukte wurden mit einer großen Bandbreite an Substraten vielfältige oxyfunktionalisierte Produkte gebildet, die sich letztlich durch die Mutantenbibliothek von CYP109Q5 effektiv modulieren ließen.

3.7.3 Generierung eines effizienten CYP109Q5-Ganzzellbiokatalysators

Für die meisten Zielterpene **1** – **7** existieren keine Produkstandards, was die Identifizierung der Produkte erschwerte. Erste Hinweise wurden durch die Analyse mittels GC-MS erhalten, jedoch erlauben diese nicht die exakte Strukturaufklärung. Hier sind effiziente Ganzzellbiokatalysatoren notwendig, die eine ausreichende Menge der Produkte generiert. Nach Aufreinigung der Produkte ausgewählter Biotransformationen sollte schließlich die Identifikation durch NMR einen Aufschluss über die exakten Strukturen der synthetisierten Produkte geben.

Zur Generierung eines P450-Ganzzellbiokatalysators standen im Falle von CYP109Q5 zwei Alternativen zur Wahl, die direkte Fusion an eine bifunktionale Reduktase oder ein Dual-Vektor-System. Nachdem die aufgereinigte BMR-Domäne von P450 BM3 *in vitro* keine Elektronen liefern konnte, wurde die direkte Fusion mit PFOR (bifunktionale Reduktase aus CYP116B3) in pBAD33 getestet. Die Expression lieferte gute Ausbeuten eines funktionalen P450s, allerdings konnte keine Aktivität festgestellt werden. Aufgrund der Gegebenheit, dass sich CYP109Q5 allein nur in pBAD33 herstellen ließ, wurde das bereits in Kapitel 3.5.4

eingeführte System aus pBAD33 und pBAD18 für den Dual-Vektor Ansatz gewählt. Die Co-Expression der Plasmide pBAD33_CYP109Q5 und pBAD18_CamB_CamA wurde zunächst in *E. coli* BL21(DE3) und JW5510 mit unterschiedlichen Induktorkonzentrationen und Expressionstemperaturen über Nacht getestet, um den aktivsten Kompromiss der Expression aller drei Proteine, kombiniert in einem Organismus, zu untersuchen (Anhang 7.4.3, Abbildung S8). Bei BL21(DE3) handelt es sich nicht um einen arabinosedefizienten Stamm, weshalb mit 0,2% L-Arabinose eine hohe Induktorkonzentration zugegeben wurde. Die gemessene Aktivität mit 5 mM β -Ionon (**1**) als Substrat war mit diesem System jedoch sehr gering (Anhang 7.4.3, Abbildung S8). Die Analyse über eine SDS-PAGE zeigte die Expression der Redoxpartner bei ca. 12 kDa (CamB) und 45 kDa (CamA), allerdings wies das CO-Differenzspektrum kein funktionales P450 auf (2.4.3 und 2.4.5.2, Anhang 7.4.3, Tabelle S2). Das beste Ergebnis mit der höchsten Aktivität pro Zelle wurde schließlich mit *E. coli* JW5510 mit einer Induktorkonzentration von 0,1% L-Arabinose und einer Expressionstemperatur von 25 °C über Nacht erhalten. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich bei CYP1232A24 mit den Redoxpartnern FeRed1 und FldX sowie 5 mM β -Ionon (**1**) als Substrat feststellen (Anhang 7.4.3, Abbildung S8). Die Experimente mit CYP109Q5 wurden schließlich nach Expression im Dual-Vektor-System (2.3.8) mit ruhenden Zellen und den Zielsubstraten **1** – **7** *in vivo* durchgeführt (2.5.4). Während mit β -Ionon (**1**) sowie Vinylionol (**2**) gelöst in DMSO als Lösungsmittel gute Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde eine sehr geringe Aktivität mit den restlichen Terpenen detektiert. Der Einsatz in größerem Maßstab (Schüttelkolben) reduzierte die Aktivität noch weiter. Auch die Addition von DMSO, Durchführung der Reaktion in Kolben oder die Übersichtung mit einer Dodecanschicht als Substrat-Produktspeicher bewirkte keine Verbesserung. Im Falle des Zweiphasensystems mit 10% Dodecan wurden unterschiedliche Reaktionsgefäße und Schüttlergeschwindigkeiten getestet, die zu einer geringen Produktbildung führten. Tests mit β -Ionon (**1**) als Substrat wiesen hierbei ebenfalls nur eine sehr geringe Aktivität auf.

Ein entscheidender Faktor zur Verbesserung der *in vivo* Aktivität mit den Sesquiterpenen **3** – **7** war schließlich die Verwendung von 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Lösungsmittelvermittler. Dieses wurde bereits erfolgreich in Biotransformationen mit Sesquiterpenen eingesetzt²⁸⁵ und ermöglichte im vorliegenden System eine deutliche Steigerung (Abbildung 41). Während im Schüttelkolben mit dem Substrat gelöst in Ethanol kein Produkt detektiert werden konnte, wurde die Produktbildung mit steigendem Anteil an 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin sowie dem darin gelösten Substrat erhöht. Letztlich erfolgten die *in vivo* präparativen Biotransformationen mit den Sesquiterpenen mit 2% 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin und 750 μ M des Substrats (2.5.5). Für die Produktcharakterisierung der Sesquiterpenbiotransformationen mit CYP109Q5 wurden Premnaspirodien (**5**) und Longifolen (**6**) als Substrate ausgewählt sowie die aktivste *in vitro* Variante V80A/A280I. Die Überstände mehrerer Biotransformationen des gleichen Substrats

wurden gesammelt, extrahiert und schließlich über Kieselgelaufreinigung fraktioniert (2.6.3.2).

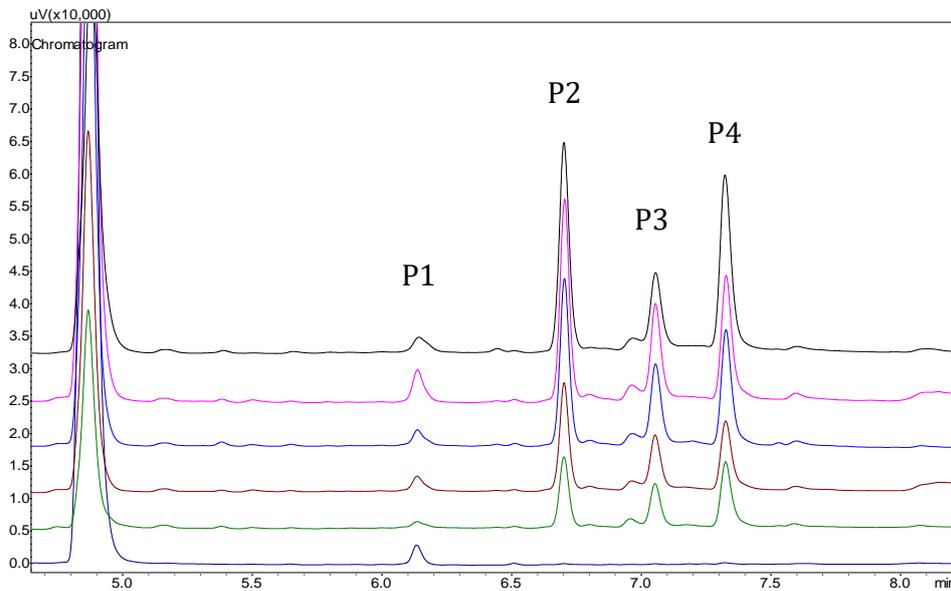


Abbildung 41: Steigerung der Aktivität der CYP109Q5 *in vivo* Biotransformationen gegenüber den Sesquiterpenen durch 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-H β C). Nach Co-Expression der Variante V80A/A280I mit CamA und CamB wurde die Biotransformation von Longifolen (**6**) *in vivo* mit 0,1 g mL⁻¹ ruhenden Zellen für 24 h untersucht. Variierende Konzentrationen an 2-H β C (w/v) und Substrat (**6**) wurden eingesetzt. Dunkelblau: 2,5 mM (**6**, in Ethanol); Grün: 1% 2-H β C + 200 μ M (**6**); Braun: 1% 2H β C + 500 μ M (**6**); Blau: 2% 2-H β C + 400 μ M (**6**); Magenta: 2% 2-H β C + 1 mM (**6**); Schwarz: 500 mL Schikanenkolben (100 mL Zellen) mit 2% 2-H β C + 750 μ M (**6**).

Aus den Biotransformationen mit Premnapirodiolen (**5**) wurden insgesamt vier Produkte isoliert (Anhang 7.4.10, Abbildung S14). Bei den durch Kieselgelaufreinigung nicht trennbaren Produkten P1 und P2 handelt es sich um zwei Enantiomere des Premnapirodiolen-11,12-epoxids (**110** und **111**, 2.6.4). Das Produkt P3 wurde aufgrund von Verunreinigungen aus der Substratsynthese nur in einer 60%igen Reinheit (GC-FID) erhalten, konnte jedoch eindeutig als das in allylischer Position hydroxylierte Solavetivol (**112**) identifiziert werden (2.6.4). Bei dieser Verbindung handelte es sich um das Hauptprodukt der *in vivo* Biotransformation mit der Variante V80A/A280I (~ 47%, Abbildung 42). Im Falle von Produkt P4 wurde nach Kieselgelaufreinigung keine ausreichende Menge und Reinheit für ein eindeutiges NMR-Spektrum erhalten.

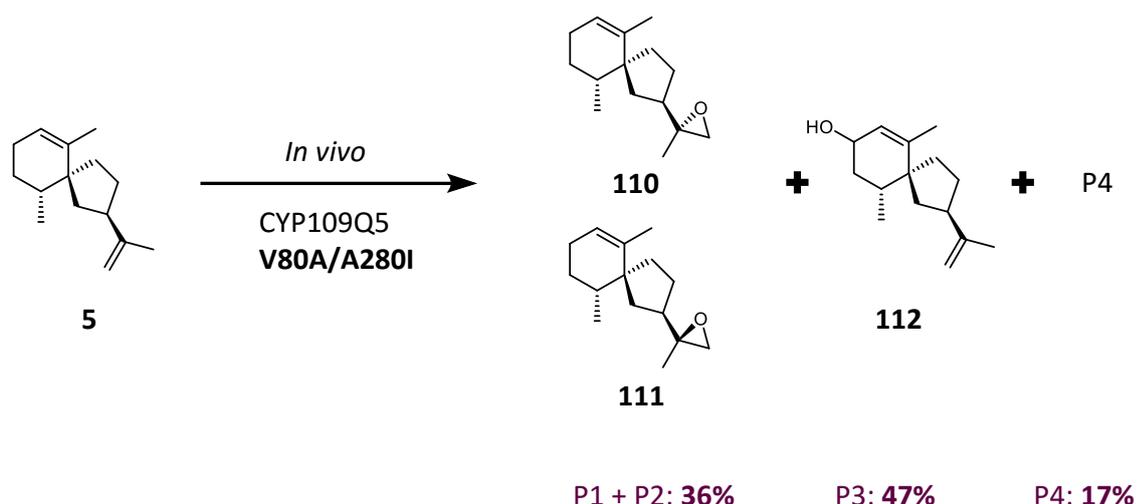


Abbildung 42: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 V80A/A280I und Premnaspriodien (**5**). Die Produktverteilung nach der *in vivo* Biotransformation mit 2% 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin und 750 μ M Substrat ist in der Farbe Pflaume angegeben. Die Produkte wurden durch Kieselgele aufgereinigt und durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. P1 + P2: Premnaspriodien-11,12-epoxide (**110** und **111**); P3: Solavetivol (**112**); P4: unbekannt.

Ebenfalls vier Produkte wurden mit den Biotransformationen von Longifolen (**6**) detektiert (Anhang 7.4.10, Abbildung S15), allerdings wurde das Produkt P1 nicht durch den P450-Biokatalysator gebildet und war demnach auch in der Negativkontrolle sichtbar. Alle vier Produkte konnten nicht durch Kieselgelaufreinigung getrennt werden, sodass ein NMR-Spektrum der Mischung aufgenommen wurde (2.6.4). Hierbei lies sich Longifolenaldehyd (**134**) als Hauptprodukt identifizieren, dessen Anteil bei gleichzeitiger Reduktion des Produkts P2 während der Lagerung in Lösung anstieg. Die Produktverteilung direkt nach der *in vivo* Biotransformation mit der Variante V80A/A280I war 6% P1, 43% P2, 18% P3 und 33% P4 (Abbildung 43). Neben dem Longifolenaldehyd (**134**) wurden zwei weitere, bisher nicht zuzuordnende, unterschiedliche Aldehyde im NMR-Spektrum detektiert (Anhang 7.8).

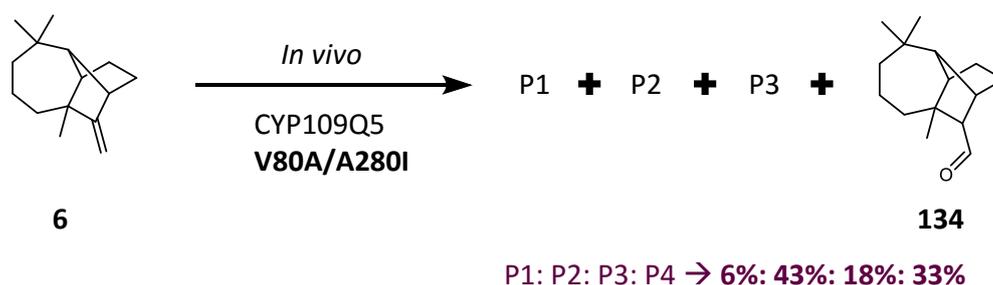


Abbildung 43: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 V80A/A280I und Longifolen (**6**). Die Produktverteilung nach der *in vivo* Biotransformation mit 2% 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin und 750 μ M Substrat ist in der Farbe Pflaume angegeben. Die Produkte wurden durch Kieselgele aufgereinigt und durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. P1 – P3: unbekannt; P4: Longifolenaldehyd (**134**).

Neben den Sesquiterpenen wurde auch das Produkt der Diclofenac (**8**)-Umsetzung mit der aktivsten *in vitro* Variante V80A/A280I (Anhang 7.4.9, Abbildung S13) charakterisiert. Nach Aufreinigung über HPLC-SemiPrep wurde das Produkt als sehr reines 4'-Hydroxydiclofenac

(**11**) durch NMR-Spektroskopie identifiziert (2.6.3, Abbildung 44). In der präparativen Biotransformation (2 x 100 mL) wurde mit DMSO als Lösungsmittel des Substrats eine isolierte Ausbeute von 31,6% erzielt.

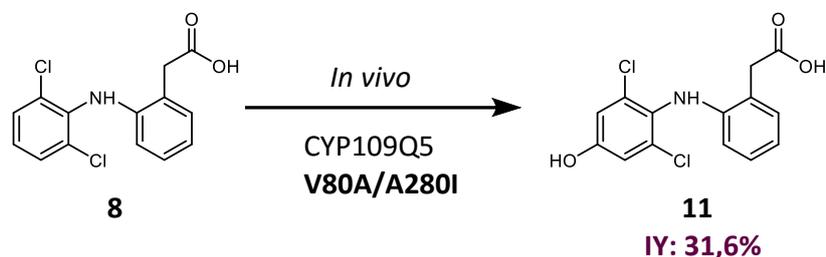


Abbildung 44: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 V80A/A280I und Diclofenac (**8**). Die isolierte Ausbeute (IY) nach Aufreinigung betrug 31,6% bei einer eingesetzten Substratkonzentration von 2 mM (\cong etwa 0,6 g L⁻¹). Das Produkt 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) wurde nach HPLC-SemiPrep-Aufreinigung durch NMR-Spektroskopie identifiziert.

Bei der Biotransformation mit β -Ionon (**1**) als Substrat hatte der Einsatz von 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin keinen positiven oder negativen Einfluss, weshalb an dieser Stelle ebenfalls DMSO als Lösungsmittel für die Supplementierung des Substrats verwendet wurde. Für die Charakterisierung der Produkte erfolgten die präparativen Biotransformationen mit der CYP109Q5 Variante A280V/T229L, die *in vitro* eine hohe Aktivität aufwies bei gleichzeitiger Verschiebung des Produktspektrums hin zu den bisher unbekanntem hydroxylierten Produkten (Abbildung 40 voriges Kapitel). Ähnlich zu den *in vitro* Biotransformationen wurden mit β -Ionon (**1**) deutlich höhere Aktivitäten im Vergleich zu den Sesquiterpenen *in vivo* detektiert. Insgesamt 2,5 mM (\cong etwa 0,5 g L⁻¹) der oxyfunktionalisierten Produkte wurden in den präparativen Biotransformationen im 100 mL Maßstab generiert. Die Produkte wurden zunächst extrahiert und mittels Kieselgel aufgereinigt, jedoch reichte die Trennleistung mit dem verwendeten Laufmittel (80% Cyclohexan, 20% Ethylacetat) nicht für eine vollständige Trennung der Produkte aus (2.6.3.2). Deshalb wurde eine HPLC-SemiPrep-Aufreinigung entwickelt, durch die sich schließlich alle drei Produkte effizient aufreinigen ließen (Abbildung 13, 2.6.3.1). Als Hauptprodukt der Biotransformation mit 74% wurde das allylisch hydroxylierte 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) mittels eines Produktstandards sowie NMR-Spektroskopie identifiziert (Abbildung 45). Der zweite Produktpeak (7%) in der GC-FID respektive erste in der HPLC-SemiPrep stellte sich als 3-Hydroxy- β -ionon (**72**) heraus (2.6.4). Ferner wurde ein zweites Produkt identifiziert, das ebenfalls in nicht-allylischer Position hydroxyliert wurde. Hierbei handelt es sich um das mit einem 19%igen Anteil gebildete 2-Hydroxy- β -ionon (**73**).

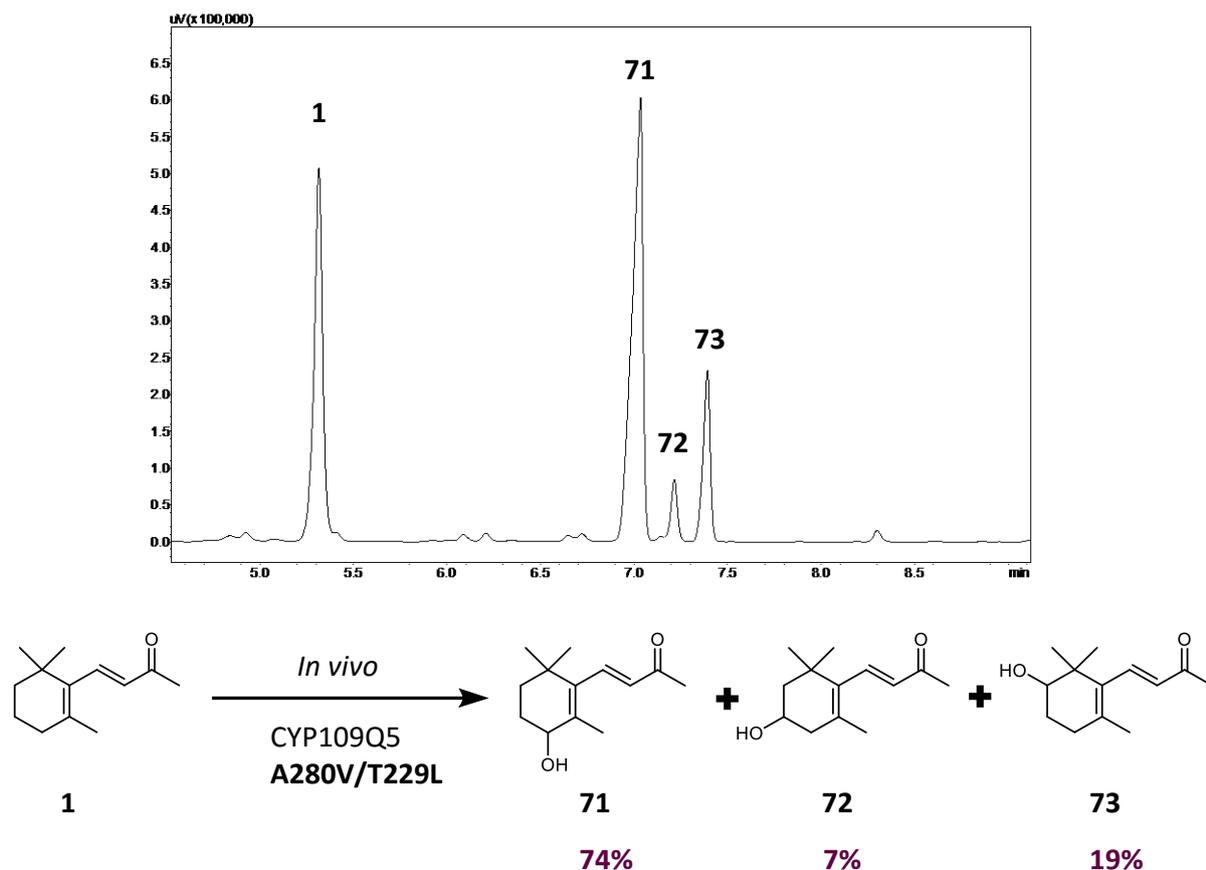


Abbildung 45: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 A280V/T229L und β -Ionon (**1**). Die Produktverteilung nach der *in vivo* Biotransformation mit 5 mM Substrat (in DMSO) ist in der Farbe Pflaume angegeben. Diese wurden durch HPLC-SemiPrep aufgereinigt und durch NMR-Spektroskopie identifiziert. 4-Hydroxy- β -ionon (**71**); 3-Hydroxy- β -ionon (**72**); 2-Hydroxy- β -ionon (**73**).

Im Falle der Sesquiterpene (**5** und **6**) wurden durch den Lösungsmittelvermittler 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin deutliche Steigerungen der Aktivität erzielt, bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenproduktbildung respektive Weiteroxidation der Produkte. Die Generierung des effizienten CYP109Q5 *in vivo* Systems, bestehend aus den kompatiblen Vektoren pBAD33 und pBAD18, ermöglichte die Produktcharakterisierung der ausgewählten Biotransformationen. Hier konnten neue oder chemisch schwer zugängliche Produkte wie die nicht-allylisch hydroxylierten β -Ionone (**72** und **73**) hergestellt werden. Gleichzeitig ermöglicht das Ganzzellsystem nun die Identifikation weiterer Produkte aus dem sehr breiten Substratspektrum von CYP109Q5.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung von C-H-Verbindungen identifiziert, untersucht und weiterentwickelt werden. Chemisch schwer durchzuführende Reaktionen sollten insbesondere durch P450 Monooxygenasen ermöglicht werden, die durch ihren einzigartigen Katalysemechanismus in der Lage sind, auch nicht-aktivierte Bindungen zu oxidieren. In dieser Arbeit sollte die Oxyfunktionalisierung industriell relevanter Verbindungen, wie das nicht-steroidale antiinflammatorische Medikament Diclofenac (**8**) sowie ein Panel aus interessanten Terpenen (**1 – 7**), im Fokus stehen. Gleichzeitig galt es, mit dem hochkomplexen System Cytochrom P450 Monooxygenase effiziente Ganzzellbiokatalysatoren zu entwickeln, um einer Erweiterung der P450-basierten industriellen Prozesse näher zu kommen.

4.1 Entwicklung eines effizienten P450 Ganzzellprozesses am Beispiel P450 RhF

Der Zugang zu pharmazeutisch aktiven Substanzen und deren Metaboliten nimmt einen großen Stellenwert in der industriellen Biotechnologie ein. Aus diesem Grund wird versucht, die zumeist mittels toxischen Katalysatoren sowie unter hohen Temperaturen und Drücken ablaufenden chemischen Synthesen durch biologische Systeme zu ersetzen. In diesem Punkt haben sich vor allem Biokatalysatoren wie P450 Monooxygenasen als Alternative hervorgetan, jedoch haben sich diese, ungeachtet der jahrzehntelangen P450-Forschung, aufgrund der oftmals niedrigen Aktivität, Stabilität und der daraus resultierenden geringen Effizienz kaum etabliert.^{37,332,333} Nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs) wie Diclofenac (**8**) sind in den letzten Jahren in den Fokus gerückt, jedoch mangelt es an effektiven Biokatalysatoren und Prozessen für die Synthese der Metaboliten. Gleichzeitig stellen Diclofenac und die hydroxylierten Metabolite 4'- und 5-Hydroxydiclofenac (**9**, **11**) aufgrund der geringen Abbaubarkeit ein umwelttechnisches Problem dar.^{334,335} Die Herstellung solcher Verbindungen für ökologische und toxikologische Studien ist deshalb obligat.

Insbesondere die chemische Synthese von 5-Hydroxydiclofenac (**9**) ist langwierig und wurde nur in geringen Ausbeuten mit hoher Nebenproduktbildung erreicht³³⁶, was sich in dem Marktwert von etwa 250 \$ mg⁻¹ (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) widerspiegelt. Dies macht den Metaboliten zu einem exzellenten Zielmolekül für die Biokatalyse mit P450 Monooxygenasen. Ein interessantes Enzym für einen solchen Ansatz ist P450 RhF, das selektiv Diclofenac (**8**) zu 5-Hydroxydiclofenac (**9**) umsetzen kann und infolgedessen für eine weitergehende Untersuchung ausgewählt wurde (Abbildung 46).⁶⁷ Das natürliche Fusionskonstrukt P450 RhF (CYP116B2 aus *Rhodococcus* sp.) ist an eine Reduktase

gekoppelt, die aus einem Flavin-Mononukleotid (FMN) und einem 2Fe-2S Ferredoxin besteht.^{337,338} Die bifunktionale Reduktase wurde bereits erfolgreich zur Rekonstitution der Aktivität nicht-physiologischer P450s verwendet,^{98,339-341} hingegen ist die katalytische P450-Domäne noch wenig erforscht. Sie zeigte zwar eine hohe Substratpromiskuität, jedoch mit vergleichsweise niedrigen Aktivitäten.^{342,343} Anhand des neu identifizierten Substrats Diclofenac (**8**) sollte P450 RhF schließlich weitergehend charakterisiert und der Prozess in den Bioreaktor transferiert und verbessert werden. Der *Scale-up* von Biooxidationen wurde bis auf wenige Beispiele nur selten durchgeführt und stellt eine große Herausforderung im Hinblick auf die oftmals geringen Aktivitäten, Expressionsraten und Stabilitäten der P450 Biokatalysatoren dar.³⁴⁴⁻³⁴⁷ Gleichzeitig muss eine hohe Reproduzierbarkeit des Prozesses gewährleisten sein.

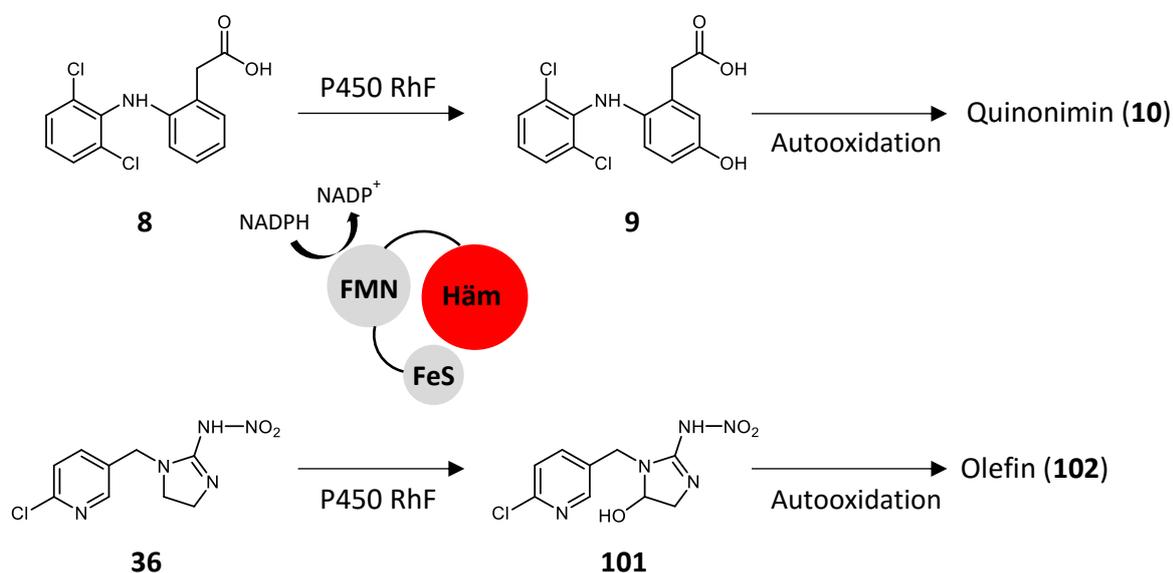


Abbildung 46: Übersicht über die P450 RhF-katalysierten Reaktionen von Diclofenac (**8**) und Imidacloprid (**36**). Die Experimente wurden im präparativen Maßstab im Bioreaktor durchgeführt.

Insgesamt wurden in den Experimenten für die Herstellung des wertvollen Produkts 5-Hydroxydiclofenac (**9**) reproduzierbare hohe Expressionsraten und Produkttiter festgestellt, die das große Potenzial von P450 RhF in der biotechnologischen Produktion aufzeigen. Gleichzeitig wurde ein seltener Vergleich zwischen wachsenden und ruhenden Zellen ermöglicht, der die Komplexität des Systems P450 Monooxygenase widerspiegelt.¹²⁴ Als weiteres Produkt wurde das sehr reaktive Quinonimin (**10**) identifiziert, das bereits in vorhergehenden Studien detektiert wurde.^{155,288,348} Eine enzymkatalysierte Bildung wurde zum Teil postuliert.²⁹⁵ Die enzymatische Autooxidation zu Quinonimin (**10**) konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen und Einflussfaktoren wie Salzkonzentration des Puffers und Temperatur als Ursache festgestellt werden (Abbildung 15). Neben der Hydroxylierung von Diclofenac wurde das Insektizid Imidacloprid (**36**) ebenfalls selektiv in der C5-Position hydroxyliert (**101**). Die Produkttiter waren allerdings geringer im Vergleich zu Diclofenac (**8**) und den bisher publizierten Biotransformationen mit wildtypischen Mikroorganismen.^{349,350}

Auch hier wurde die Entstehung des sehr reaktiven Olefins (**102**) durch Autooxidation beobachtet.

Die oftmals stark schwankenden Expressionslevel toxischer P450-Proteine sind ein grundsätzliches Problem in der P450-Forschung, das jedoch in Publikationen zumeist ausgeblendet wird. Ein Grund für die sehr hohe Reproduzierbarkeit des P450 RhF Prozesses lag vermutlich in der vor jeder Expression durchgeführten frischen Transformation der Zellen mit dem Plasmid. Beispielsweise nimmt der Anteil an plasmidtragenden *E. coli* BL21(DE3) mit der Zeit ab, insbesondere nach Induktion.³⁵¹ Mit einer durchschnittlichen P450 RhF Expression von 33 mg aktivem Enzym pro Gramm Biotrockenmasse wurden über die gesamten Experimente hinweg hohe Expressionsraten erzielt. Dieser Wert ist vergleichbar mit der optimierten Produktion des am besten untersuchten P450 BM3, mit dem die bisher höchsten Expressionsraten eines P450s erzielt wurden.⁶⁸ In den Biotransformationen mit ruhenden Zellen wurden der Einfluss der Kohlenstofffütterung (Glycerol) sowie der Substratfütterung untersucht, da es sich bei Diclofenac (**8**) um eine für Zellen toxische Verbindung handelt.^{67,288,294} Die Verwendung einer Substratfütterung ohne Zufütterung von Glycerol ergab mit $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ die höchste Produktivität, was einem vergleichsweise hohen Produkttiter von $0,58 \text{ g L}^{-1}$ des hydroxylierten Produkts (**9**) entsprach (Tabelle 4). In den folgenden Experimenten mit wachsenden Zellen wurde eine hohe Reproduzierbarkeit des Systems in der Expression sowie Biotransformation erzielt (Tabelle 4, unten). Allerdings resultierte der Prozess in sehr niedrigen Produktivitäten und erreichte erst nach 144 h annähernd die Produkttiter der ruhenden Zellen. Aus diesem Grund wurden die beiden Biotransformationsmodi in einem Experiment direkt in Duplikaten verglichen (Abbildung 15, Tabelle 5). Während die Aktivitäten mit den wachsenden Zellen sehr gering ausfielen, wurden mit den ruhenden Zellen eine spezifische Aktivität von im Durchschnitt $0,071 \text{ mg}_{5\text{-OH-DCF}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}_{\text{P450}}^{-1}$ erhalten, was nach Prozessende einer hohen Produktivität von $11,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Produkt entspricht. Eine Denaturierung des natürlichen Fusionskonstrukts P450 RhF konnte durch Bestätigung der Fusionsintegrität mittels CO-Spektroskopie als Ursache ausgeschlossen werden. Der Biokatalysator wies damit *in vivo* eine hohe Stabilität auf, die sich in einer Produktbildung über 24 h widerspiegelte (Abbildung 15). Ein möglicher Faktor, der zu dem beobachteten großen Unterschied in der Aktivität abhängig vom Zellstatus führt, stellt die zur Verfügung stehende Menge an NADPH in der Zelle dar. Die in *E. coli* selbst produzierten NADPH-Level von etwa 0,2 mM sind katabolisch insuffizient.³⁵² Eine ausreichende NADPH-Verfügbarkeit und eine damit verbundene adäquate Redoxbilanz in der Zelle können bei hohen Aktivitäten NAD(P)H-abhängiger Enzyme zum limitierenden Faktor werden. Insbesondere dann, wenn durch Entkopplungsreaktionen der P450s Elektronen der Cofaktoren nicht für die Produktbildung verwendet werden. Die Bestimmung der Kopplungsrate von P450 RhF und Diclofenac (**8**) konnte jedoch aufgrund der nicht mehr funktionalen Fusion nach IMAC-Aufreinigung nicht determiniert werden (Anhang 7.2,

Tabelle S1). Die NADPH-Konzentration ist bei nicht-wachsenden oder langsam wachsenden Zellen (z.B. unter Glukose-Limitierung) maximal bzw. das Redoxgleichgewicht liegt auf Seiten des NADPH.^{353,354} Dementsprechend wurden bei ruhenden Zellen mit Zufütterung von Glycerol deutlich geringere Aktivitäten erzielt als ohne (Tabelle 4). Im Falle von wachsenden Zellen wird NADPH insbesondere für das Zellwachstum und die Zellerhaltung eingesetzt und steht möglicherweise nicht mehr ausreichend für die Hydroxylierung von Diclofenac (**8**) zur Verfügung. Gleichzeitig kann der Pufferwechsel bei ruhenden Zellen einen Vorteil darstellen, da im Expressionsmedium möglicherweise Stoffe produziert werden oder verbleiben, die die Zellphysiologie beeinträchtigen können.

Der effiziente Prozess mit P450 RhF stellt insgesamt ein vielversprechendes Beispiel für die industrielle Herstellung wertvoller Produkte dar. Limitierende Faktoren wie die Cofaktorverfügbarkeit in der Zelle wurden identifiziert und können als Basis für weitere P450-basierte Prozesse im Bioreaktor bzw. weitere Verbesserungen dienen. Allerdings handelt es sich bei P450 Monooxygenasen um ein hoch komplexes System, das, abhängig vom Enzym, der Zelle und der jeweiligen Reaktion, immer wieder neu konzipiert werden muss.

4.2 Neue mikrobielle Biokatalysatoren für die NSAID-Oxyfunktionalisierung

Der Bedarf an benötigten Biokatalysatoren, insbesondere für die Bereitstellung von Medikamentenmetaboliten für z.B. Toxikologiestudien, steigt stetig an. Die Preise im Bereich mehrerer hundert Euro pro mg hydroxylierten Metabolit symbolisieren den Wert dieser Moleküle. Gleichzeitig kommen immer neue Medikamente auf den Markt, die in klinischen Studien über Jahre getestet werden müssen. Hier gilt es, Biokatalysatoren für die effektive Synthese der Medikamentenmetaboliten zur Verfügung zu stellen. Als Alternative zu den humanen P450s, die den Abbau der xenobiotischen Verbindungen initiieren,^{348,355–357} haben sich neben den mikrobiellen P450s wie P450 RhF auch Mikroorganismen bewährt. Die traditionell identifizierten und weiterentwickelten mikrobiellen Biokatalysatoren dienen hierbei mit ihrem vielseitigen Metabolismus als Zellfabriken für biotechnologische Anwendungen.^{126,134} Das Spektrum an Biokatalysatoren für die effektive Synthese von NSAID-Metaboliten sollte schließlich als Ergänzung zu der effizienten Produktion von 5-Hydroxydiclofenac (**9**) durch P450 RhF mittels Mikroorganismen erweitert werden.

Neben dem bekannten Organismus *Beauveria bassiana* wurden zwei weitere filamentöse Pilze verwendet, die durch eine Analyse der universellen Biomarker LSU (28S *nuclear ribosomal large subunit rRNA gene*) sowie ITS (*internal transcribed spacer*) als *Clitocybe nebularis* und *Mucor hiemalis* (beides S1-Organismen) identifiziert werden konnten. In den Biotransformationen mit den NSAIDs erzielten die filamentösen Pilze hohe und reproduzierbare Produkttiter. Wichtig für den biotechnologischen Einsatz ist, dass die

gebildeten Produkte nicht weiter verstoffwechselt werden, was in allen Fällen nicht festgestellt werden konnte. Die Metaboliten 5-Hydroxydiclofenac (**9**), das zugehörige Quinonimin (**10**) sowie 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) wurden teilweise sehr selektiv gebildet. Ferner produzierte *B. bassiana* neben dem 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) als Hauptprodukt mit 3',4'-Dihydroxydiclofenac (**12**) einen bisher noch nicht charakterisierten Metaboliten. Auch gegenüber den weiteren untersuchten NSAIDs wurden teilweise extrem hohe Aktivitäten erzielt. *M. hiemalis* demethylierte beispielsweise Naproxen (**13**) vollständig zu 6-*o*-Desmethylnaproxen (**14**) mit einer isolierten Ausbeute von über 99% (Abbildung 18). Damit wurden die *in vitro* Biotransformationen mit P450 BM3 Varianten sowie *Aspergillus niger* in Bezug auf die Selektivität und Ausbeute bei weitem übertroffen.^{231,233,358} Weiterhin hydroxylierte *M. hiemalis* 1 g L⁻¹ Ibuprofen (**15**) nahezu vollständig zu den Metaboliten 1- und 2-Hydroxyibuprofen (**16** und **17**) sowie 1,2-Dihydroxyibuprofen (**18**). Die bisher höchsten Produkttitert wurden mit einer P450 BM3 Variante *in vitro* mit etwa 0,4 g L⁻¹ 2-Hydroxyibuprofen (**16**) erzielt.^{185,233,359} Hierbei musste zudem eine aufwändige Aufarbeitung des Biokatalysators für die *in vitro* Biotransformationen sowie die Addition teurer Cofaktoren und Komponenten des Regenerationssystems in Kauf genommen werden. Mikroorganismen wie *Trametes versicolor* und *Nigospora sphaerica* oder die P450s CYP2C9 sowie CYP267A1 und B1 wiesen mit unter 30 mg L⁻¹ deutlich geringere Ausbeuten auf.^{187,190,289,360} Im Falle des Anthranilsäurederivats Mefenaminsäure (**19**) wurde mit *B. bassiana* mit einer isolierten Ausbeute von 48% bei 1 g L⁻¹ Substratkonzentration die höchste Aktivität erzielt. Neben der 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (**20**) als Hauptprodukt wurde das Produkt 3'-Carboxymefenaminsäure (**21**) gebildet. Im Menschen wird die Mefenaminsäure (**19**) durch CYP2C9 vor allem zur 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (**20**) umgesetzt, das durch weitere Oxidation zum Carboxymetaboliten (**21**) funktionalisiert wird.³⁶¹ Eine evolvierte P450 BM3 Variante generierte neben **20** die weiteren von humanen P450s katalysierten Metabolite 4'- und 5-Hydroxymefenaminsäure, die jeweils am Aromaten hydroxyliert wurden.^{230,232} Auch hier lagen die *in vitro* Produktkonzentrationen mit 216 mg L⁻¹ unter den mit *B. bassiana* erzielten Werten. In Abbauversuchen produzierte der Wildtyporganismus *Phaenerochaete sordida* (Weißfäule-Pilz) unterschiedliche Mefenaminsäuremetabolite ebenfalls mit deutlich geringeren Ausbeuten von unter 3 mg L⁻¹.¹⁸⁸

Ein mögliches Hindernis beim Einsatz filamentöser Pilze in Biotransformationen stellt deren Myzelienwachstum dar. Durch diese Zellform ist die mögliche Oberfläche zum Medium und damit der Austausch von Substanzen zwischen Medium und Zellen limitiert. Zellen, die im Inneren verborgen sind, können deshalb möglicherweise nicht mehr an der Biokatalyse teilnehmen. In dieser Arbeit wurde versucht, dies zu verbessern, jedoch ohne bedeutenden Erfolg. Dennoch wurden mit den Klumpen bildenden Organismen die bislang höchsten Produkttitert mit den NSAIDs erzielt. Die beteiligten Enzyme (P450s) bleiben beim Einsatz von

mikrobiellen Zellfabriken zumeist verborgen. Die Proteomanalyse von *B. bassiana* mit Diclofenac (**8**) konnte allerdings CYP548A5 sowie CYP51F1 aus vielen weiteren P450s identifizieren. In dieser Arbeit hat sie sich damit als zielgerichtete Methode zur Identifikation beteiligter Proteine in Eukaryoten erwiesen.

Häufig werden niedrige Aktivitäten, eine schwierige Handhabung oder eine hohe Nebenproduktbildung als Kriterien gegen den Einsatz von Mikroorganismen illustriert.¹⁹⁰ Die in dieser Arbeit identifizierten Mikroorganismen erwiesen sich jedoch bei geringer Nebenproduktbildung als hoch effizient sowie einfach und günstig kultivierbar. Mittels der entwickelten HPLC-SemiPrep-Aufreinigung konnten darüber hinaus alle NSAID-Metabolite mit hohen Reinheiten und ohne nennenswerten Verlust isoliert werden. Damit stellen die identifizierten filamentösen Pilze eine interessante Plattform dar, um die wertvollen NSAID-Metabolite effektiv und günstig herzustellen. Gleichzeitig ist die Ausweitung des Anwendungsgebiets auf weitere Medikamente vielversprechend.

4.3 Strategien für die P450-katalysierte Terpenoxyfunktionalisierung

Terpene stellen eine große, vielseitige Stoffklasse dar, die durch das Einbringen von Funktionalitäten, wie z.B. einer Hydroxygruppe, eine weitere Diversifikation erfährt. In dieser Arbeit galt es, neue P450-Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung der Terpene **1** – **7** zu identifizieren und weiterzuentwickeln. Während für die allylische Hydroxylierung von β -Ionon (**1**) sowie die Hydroxylierung von Valencen (**7**) viele Beispiele existieren, sind bisher nur wenige P450s bekannt, die in der Lage sind, die übrigen Kandidaten des zu untersuchenden Terpenspektrums zu akzeptieren.³⁶² Während im Falle von β -Ionon (**1**) vor allem die bisher wenig zugänglichen nicht-allylischen Positionen des Iononrings erzielt werden sollten, stand die Selektivität mit den Substraten **2** – **7** nicht im Vordergrund. Vielmehr galt es, ein Panel aus P450s zu identifizieren, die fähig sind, ein Spektrum an unterschiedlichen Produkten zu bilden. Gesucht werden anstelle von Spezialisten also eher Generalisten, die vielseitig in der Duft- und Aromastoffindustrie Verwendung finden können. In Abhängigkeit von der späteren Anwendung lassen sich die Biokatalysatoren schließlich durch *Protein Engineering* in einen Spezialisten mit spezifischen Eigenschaften verwandeln.^{2,5,19} Für die effiziente Anwendung der identifizierten Enzyme oder Varianten sollten letztendlich Ganzzellsysteme entwickelt werden, die in terpenproduzierenden Mikroorganismen den finalen Schritt zur Synthese wertvoller Verbindungen für die Duft- und Aromastoffindustrie katalysieren sollten.

Für die Identifikation neuer terpenhydroxylierender P450s wurden unterschiedliche Strategien verfolgt:

- Suche nach promiskuitiven Aktivitäten, vor allem von natürlichen P450-Fusionsproteinen

- rationale Mutagenese, um das Substratspektrum hin zu den Terpenen zu erweitern
- Suche nach neuen P450s in terpenmetabolisierenden Organismen
- Homologie basierte Identifikation (terpenhydroxylierende P450s)

4.3.1 Rationale Mutagenese eines natürlichen P450-Fusionsproteins

Bei P450-Fusionsproteinen handelt es sich um Enzyme, die in einer Polypeptidkette direkt über einen Linker mit den zugehörigen Redoxpartnern verknüpft sind. Dies bietet oftmals den Vorteil, dass nur ein relativ großes Protein exprimiert werden muss und durch die direkte Verknüpfung der an der Katalyse beteiligten Partner eine hohe Aktivität erzielt werden kann.^{99,322,363} Ein Panel aus natürlichen und künstlichen P450-Fusionsproteinen zeigte keine promiskuitive Aktivität mit den Zielterpenen **1** – **7**. Aufgrund der Fähigkeit von CYP116B3 (aus *Rhodococcus ruber*), zum Teil sehr sperrige Substrate umzusetzen,²⁹⁸ wurde dieses natürliche Fusionsprotein ausgewählt, um eine geeignete Mutantenbibliothek zu erstellen. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der 3DM-Datenbank des Kooperationspartners Bio-Product ein Homologiemodell von CYP116B3 erstellt. Durch Strukturvergleiche mit Kristallstrukturen von P450 BM3 sowie einem P450, das β -Ionon (**1**) am C3 und C4 hydroxyliert,³⁶⁴ konnten Positionen identifiziert werden, die den Substratkanal möglicherweise verkleinern und somit den Durchgang der sperrigen Substrate verhindern könnten (Ser377, Phe378, His139 und Glu27, Abbildung 19). Der Austausch zu kleineren hydrophoben Aminosäuren ermöglichte den Varianten jedoch nicht die Terpene als Substrat zu akzeptieren. In einem zweiten Ansatz wurde der F-G-Loop von CYP116B3 adressiert. Aufgrund seiner Flexibilität und dem geringen Grad an Konservierung in der P450-Superfamilie wird dem F-G-Loop die Funktion eines flexiblen Deckels über dem Substratkanal zugeordnet, der demnach eine Rolle bei der Substraterkennung und damit bei der Determinierung der Substratspezifität in P450 Enzymen spielen könnte.^{51,365-367} Anhand der 3DM-Datenbank wurden Vergleiche mit dem Ziel eines *Remodelings* des *Loops* angestellt (Abbildung 20). Zum einen sollte der *Loop* verkürzt werden, ähnlich CYP108D1 (hydroxyliert sperrige Substrate wie α -Terpineol (**84**))³⁰⁰, zum anderen der F-G-Loop nachgebildet werden, ähnlich CYP101B1 und CYP101C1 (katalysieren β -Ionon (**1**) zu 3- und 4-Hydroxy- β -ionon (**71**, **72**))⁶⁵ sowie P450 BM3. Obwohl der F-G-Loop als nicht konserviert und hoch flexibel beschrieben wird, führten alle Veränderungen (*Loop-Grafting* sowie Verkürzung um vier bis 14 Aminosäuren) zu einem fehlgefalteten Protein und zeigten demzufolge im Assay mit dem natürlichen Substrat 7-Ethoxycoumarin (**22**) auch keine Aktivität. Die Substratkanalvarianten wiesen dagegen stark variierende Aktivitäten gegenüber dem natürlichen Substrat auf (Tabelle 6). Das vorwiegend planare Aromaten umfassende Substratspektrum von CYP116B3 wurde in dieser Arbeit erweitert (Abbildung 21) und durch die generierten Varianten teilweise eine

erhöhte Aktivität und veränderte Regioselektivität erzielt. CYP116B3 konnte jedoch nicht dergestalt verändert werden, die Zielterpene **1 – 7** als Substrate zu akzeptieren.

4.3.2 Identifikation neuer Biokatalysatoren aus terpenmetabolisierenden Organismen

Der Abbau von insbesondere xenobiotischen Verbindungen wird oftmals durch Mono- oder Dioxygenasen initialisiert. Das Einfügen einer Hydroxygruppe bewirkt, dass die Moleküle hydrophober und dadurch löslicher werden. Dies kann zur Reduzierung der Toxizität der Xenobiotika oder auch zum Katabolismus hin zu einfacheren Verbindungen beitragen. In letzterem Falle können dementsprechend das Wachstum auf bestimmten Verbindungen und die Detektion von Zwischenprodukten wichtige Hinweise auf die im Stoffwechselweg beteiligten Enzyme liefern. Insbesondere mittels Transkriptomik und Proteomik lassen sich schließlich die Enzyme gezielt nachweisen, wenn die Synthese von mRNA Transkripten oder der daraus translatierten Proteine als Reaktion auf Umwelteinflüsse reguliert respektive angeschaltet werden. Die Klonierung, funktionale Expression und Charakterisierung der P450s besitzen eine hohe Relevanz, da hierdurch neue Enzyme mit möglicherweise großem wissenschaftlichem Stellenwert identifiziert und charakterisiert werden. Beispielsweise führte die Analyse des Camphor abbauenden *P. putida* zur Identifizierung von P450cam, das die Verstoffwechslung durch die Oxidation von Camphor zu 5-exo-Hydroxycamphor initiiert.^{368,369} Neben wertvollen Informationen für die Grundlagenforschung bietet die Proteomanalyse gleichzeitig ein spannendes und zielgerichtetes Verfahren, um potenzielle Kandidaten für die selektive Hydroxylierung von Terpenen zu erhalten.

Die hierzu verwendeten Organismen stellen interessante Kandidaten für einen solchen Ansatz dar, da bislang noch keine Cytochrom P450 Monooxygenasen aus diesen kloniert wurden. Der bereits in der NSAID-Oxyfunktionalisierung eingesetzte filamentöse Pilz *B. bassiana* besitzt über 83 P450s³⁰³ und war ebenso in der Lage, einige Terpene zu hydroxylieren. Mittels der Proteomanalyse von Biotransformationen mit unterschiedlichen Substraten wurden die verantwortlichen katalysierenden P450s möglicherweise identifiziert (Tabelle 7). Die Gesamtanzahl von 83 P450s im Genom des Organismus wurde abhängig vom Substrat deutlich reduziert. Im Gegensatz zu vielen Prokaryoten fungiert in Eukaryoten als Elektronendonator für viele unterschiedliche P450 Enzyme typischerweise eine bifunktionale Reduktase, die aus dem Flavodoxin fusioniert mit der Ferredoxin-Reduktase besteht.³⁷⁰ Bei *B. bassiana* konnte diese nahezu in allen Proben detektiert werden, was im Hinblick auf eine spätere Rekonstitution der Aktivität einen Vorteil darstellt, da hier der physiologische funktionale Partner bereits zugeordnet werden kann. Im Falle der P450s wurden Enzyme detektiert, die bereits in der Glucosekontrolle exprimiert und die Expression nach Exposition mit den Substraten scheinbar hochreguliert wurde (Tabelle 7, CYP52A10, CYP52A13). Zum anderen wurden auch Enzyme identifiziert, die exklusiv in den Biotransformationen mit

beispielsweise Vinylionol (**2**) und α -Humulen (**3**) detektiert wurden (Tabelle 7, CYP51F1). Mit 2-Phenoxypropionsäure (**120**) als Substrat wurden schließlich in der Proteomanalyse Fragmente von CYP684A2 sowie CYP52A10 gefunden. Mindestens eines der P450s ist demnach wahrscheinlich für einen der effektivsten oxidativen Prozesse, der selektiven Produktion von über 120 g L^{-1} (*R*)-2-(4-Hydroxyphenoxy)-propionsäure durch *B. bassiana* LU700, verantwortlich.^{136,267} An der Universität York (Prof. Gideon Grogan) wird bereits seit mehreren Jahren an der heterologen Expression von *B. bassiana* P450s in *E. coli* gearbeitet, bislang ohne Erfolg. Die Ergebnisse der Proteomanalyse liefern diesbezüglich entscheidende Informationen über potenzielle Substrate. Eine funktionale Expression des Zielproteins scheitert allerdings oft an der veränderten Expressionsmaschinerie des heterologen Expressionsstammes, da vor allem posttranslationale Modifikationen, die sehr häufig in Eukaryoten wie Pilzen zu finden sind, essenziell für die Funktion des Proteins sein können. Wie in York konnten auch in dieser Arbeit keine funktionalen P450s mit codonoptimierten Genen in *E. coli* hergestellt werden. Eine Expression in einem pilzlichen Expressionssystem scheint demnach zielführender zu sein. Hierzu werden die P450s in Zusammenarbeit mit zwei Kooperationspartnern in *S. cerevisiae* sowie *Aspergillus* sp. heterolog exprimiert und untersucht.

Als weitere Organismen mit potenziell interessanten P450s wurden *Phenylbacterium immobile* Stamm E sowie *Arthrobacter* sp. ausgewählt, deren Genome erst vor kurzem am Institut für Technische Biochemie entschlüsselt wurden.^{301,302} Von diesen zeigte *Arthrobacter* sp. die Fähigkeit, einige der Zielterpene als C-Quelle zu metabolisieren, was die Beteiligung von Oxygenasen am Abbau nahelegt. Mittels der Proteomanalyse der auf unterschiedlichen C-Quellen gewachsenen Kulturen wurden zwei putative P450s in der Papaverin (**35**)-Kultur identifiziert, die nicht in der Glucosekontrolle vorhanden waren (Tabelle 8). Auch nach DSD-PAGE konnten zusätzliche Proteinbanden in der Papaverin (**35**)-Kultur detektiert werden, die den P450s mit den Molekulargewichten 44 respektive 46 kDa entsprechen könnten (Abbildung 21). Beide P450s sind direkt hintereinander auf dem Genom lokalisiert, zusammen mit potenziellen Redoxpartnern wenige Basenpaare *upstream* liegend (Abbildung 22). In einigen der Proben wurden darüber hinaus Fragmente einer 4-Hydroxyphenylelessigsäure 3-Monooxygenase festgestellt. Im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation konnte diese Monooxygenase bereits in einer Proteomanalyse mit Papaverin (**35**) detektiert werden, allerdings nicht die beiden P450s.²⁶⁵ Diese Dissertation befasste sich mit der Klonierung und Charakterisierung von Dioxygenasen, die vermutlich den ersten Schritt im Abbau von Papaverin (**35**) durch Bildung eines vicinalen Diols katalysieren.²⁶⁴ Auch in dieser Arbeit wurden die damals identifizierten Fragmente einer 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure 2,3-Dioxygenase und einer Vanillat *O*-demethylase Oxygenase Komponente in der Papaverin (**35**)-Kultur identifiziert. Dass es sich bei zwei putativen Proteinen in der ursprünglichen Annotation, die zunächst lediglich mit Oxidations-

Redox-Prozessen in Verbindung gebracht wurden, um P450s handelt, wurde erst nach erneuter Blast-Suche in NCBI festgestellt. Dies ist möglicherweise der Grund, weshalb keine P450s in der Proteomanalyse der vorhergehenden Dissertation identifiziert wurden.

4.3.3 Neuartige P450s aus *Arthrobacter* sp.

Der gram-positive Organismus *Arthrobacter* sp. kann in die Familie der *Micrococcaceae* eingeordnet werden und repräsentiert darin die Gattung mit der größten Anzahl an Spezien.³⁷¹ Als einer der häufigsten isolierten Bodenbakterien besitzt *Arthrobacter* sp. eine bemerkenswerte metabolische Diversität. Neben dem Abbau von schädlichen aliphatischen, aromatischen und polyzyklischen Verbindungen ist er in der Lage, den komplexen alkaloiden Naturstoff Papaverin zu verstoffwechseln.^{264,371-373} Die Gattung *Arthrobacter* erweist sich dabei zumeist als wahrer Überlebenskünstler, der selbst unter extremen Umwelteinflüssen wie Trockenheit, Radioaktivität oder sogar im arktischen Eis isoliert werden kann.³⁷⁴⁻³⁷⁷ Das universelle Vorkommen von *Arthrobacter* Spezien wird dabei der Fähigkeit zur Anpassung an die extremen Umwelteinflüsse sowie des versatilen Metabolismus zugeschrieben.^{378,379} Es wurden bereits einige mögliche Stoffwechselwege des Abbaus von Verbindungen wie Papaverin (**35**), Phthalaten oder Sulfadiazinen postuliert,^{264,319,380-383} jedoch sind die beteiligten Enzyme oftmals nicht bekannt oder wurden noch nicht für eine detaillierte Charakterisierung heterolog exprimiert. Mittels der Proteomanalyse wurden schließlich Hinweise für die am Papaverin (**35**)-Abbau beteiligten P450s erhalten. Die Klonierung und Expression dieser sowie weiterer Oxygenasen sollten die erstmalige Charakterisierung ermöglichen und die Überprüfung der Aktivität gegenüber den Zielterpenen **1** – **7** erlauben. In Kombination mit der Genomanalyse wurde des Weiteren bereits ein mögliches *Cluster* identifiziert (Tabelle 8). In einer betreuten Masterarbeit (Julia Hallmen) erfolgte schließlich die Untersuchung weiterer potenzieller *Cluster* mit unterschiedlichen Reduktasen, Flavodoxinen, Ferredoxinen und bifunktionalen Reduktasen.²⁸¹ Damit besitzt *Arthrobacter* sp. eine große Bandbreite an P450-Redoxsystemen, die aus der biologischen Diversität bekannt sind.⁴⁶

Die Identifikation interessanter Oxygenasen und möglicher *Cluster* in *Arthrobacter* sp. bietet neben der Möglichkeit, zielgerichtet P450s für die Terpenhydroxylierung zu entdecken, ein hohes wissenschaftliches Potenzial zur Aufklärung und Funktion dieser Enzymklasse im Organismus. Alle über die Proteom- sowie Genomanalyse identifizierten Oxygenasen und potenzielle Redoxpartner wurden in pET-28a(+) kloniert und exprimiert. Die Expression der P450s stellte sich als Herausforderung dar. Letztlich konnten die P450s allerdings in unterschiedlichen Vektoren wie pBAD33 effektiv und funktional hergestellt und aufgereinigt werden (Tabelle 9, Abbildung 23). Im CO-Differenzspektrum zeigten schließlich alle die für P450s typische Verschiebung des Soret-Bandes von 420 auf etwa 450 nm im reduzierten CO-

gebundenen Zustand.^{13,14} Auch die physiologischen Redoxproteine wurden überexprimiert sowie erfolgreich aufgereinigt und standen für Untersuchungen zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit zur Rekonstitution der Aktivität von P450s stellt der Elektronentransfer von nicht-physiologischen Redoxpartnern dar.^{172,311} Ein Set aus unterschiedlichen heterologen Redoxpartnern wurde aus diesem Grund ausgewählt, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Aktivitätsrekonstitution zu erhöhen (Abbildung 25). Mittels des Cytochrom C Assays und der *in vitro* Biotransformationen mit CYP109B1 (aus *B. subtilis*) als Positivkontrolle konnte letztendlich die Aktivität der heterologen Redoxpartner nachgewiesen und somit ein intaktes Redoxsystem gewährleistet werden.²⁸¹

Zunächst galt es, eine funktionale Kombination aus P450, Redoxpartner(n) und Substrat zu finden. Neben den Erkenntnissen aus der Proteomanalyse sind hierfür Hinweise auf potenzielle Substrate obligat. Diesbezüglich stehen für die initiale Charakterisierung neuer P450s unterschiedliche Methoden zur Auswahl:

- Analyse der Homologie zu bereits charakterisierten P450s; Enzyme, die insbesondere derselben Unterfamilie zugeordnet werden können (> 55% Sequenzidentität), weisen häufig ähnliche Funktionen und damit Substratspektren auf.
- *Spin-Shift*-Experimente, in denen die Bindung zu einem Substrat untersucht werden können;²⁸⁴ Hierbei werden allerdings häufig falsch positive Substrate detektiert oder die Substrate induzieren keinen *Spin-Shift*, werden dafür aber effektiv umgesetzt.^{254,311,318,384} Eine Bindung ist nicht automatisch gleichbedeutend mit einer Katalyse, weshalb diese Methode nur für eine spätere Charakterisierung angewendet wurde.
- CO-Differenzspektren der P450s mit den Elektronentransferpartnern und NAD(P)H als Reduktionsmittel.³¹⁶
- Ein NAD(P)H-Assay, der die indirekte, also vom Substrat unabhängige, Messung der Aktivität des kompletten Multikomponentensystems erlaubt.³¹⁵

Im Falle von CYP1005C4 sind keine verwandten P450s charakterisiert (Tabelle 10). Eine mögliche Detektion funktionaler Redoxpartner stellt ein elegantes Verfahren dar, um die Kombinationsmöglichkeiten vorab zu reduzieren. Die aufgereinigten heterologen Redoxpartner FdR und FdX (aus *E. coli*), CamA und CamB (aus *P. putida*) sowie AdR und AdX (aus *Bos taurus*) wurden zu diesem Zweck mit CYP109B1 getestet. Sowohl mit als auch ohne Substrat, konnte kein Elektronentransfer und damit die Reduktion des P450s im CO-Differenzspektrum detektiert werden.²⁸¹ Alle drei Redoxpartnersysteme sind allerdings in der Lage, die Aktivität von CYP109B1 *in vitro* effektiv herzustellen. Im Gegensatz dazu wurde beispielsweise mit CYP109C1 und physiologischen Redoxpartnern ein Elektronentransfer festgestellt, jedoch keine Aktivität mit dem korrekten Substrat erzielt.³⁸⁵ Aus diesen genannten Gründen kam diese Methode für die P450s aus *Arthrobacter* sp. nicht zur Anwendung. Auch der NAD(P)H-Assay erwies sich als nicht sensitiv genug, denn selbst nach zweifacher Aufreinigung der Redoxpartner war die Hintergrundaktivität der

Cofaktorabhängigen Proteine auch ohne Substrat zu hoch. Die Abnahme des Cofaktors unterschied sich im Falle von CYP109B1 und β -Ionon (**1**) oder Valencen (**7**) als Substrat kaum von den Experimenten ohne Substrat. Infolgedessen erfolgte in einer betreuten Masterarbeit das *Screening* von CYP1005C4 mit den heterologen Redoxpartnern und einem großen Spektrum an unterschiedlichen Substratklassen *in vitro* mittels HPLC- und GC-Analytik, jedoch bislang ohne Detektion eines funktionalen Systems.²⁸¹ Auch die Herstellung der Aktivität zweier in der Proteomanalyse (mit den Terpenen und Papaverin (**35**) als C-Quelle) detektierten Monooxygenasen, darunter die putative 4-Hydroxyphenylelessigsäure-Monooxygenase, gelang bisher nicht.

Basierend auf der Verwandtschaftsanalyse konnten mit CYP199A25 dagegen Hinweise auf potenzielle Substrate erhalten werden (Tabelle 10). Dies war entscheidend für die Rekonstitution der Aktivität des neuen CYP199A Mitglieds aus *Arthrobacter* sp. Mittels des Elektronentransfers über CamA und CamB konnte schließlich eine hohe Demethylierungsaktivität mit der 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) selektiv in *para*-Position erzielt werden.²⁸¹

Die beiden verbliebenen CYP1232F1 und CYP1232A24 sind Mitglieder einer P450-Familie mit bisher unbekannter Funktion (Tabelle 10). Fragmente beider Enzyme wurden jedoch in der *Arthrobacter* sp. Kultur mit Papaverin (**35**) detektiert, was deren Beteiligung am Metabolismus impliziert. Der von Lingens, Haase-Aschoff sowie Hauer vorgeschlagene Papaverinstoffwechselweg verläuft über den Metaboliten 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**), der durch Demethylierungen weiter prozessiert wird.^{264,319} Eine Beteiligung von Cytochrom P450 Monooxygenasen an diesem Schritt des Stoffwechselweges war vorstellbar und wurde nach Untersuchungen schließlich bestätigt. Während CYP1232F1 mit FeRed_1 und FldX sowie den heterologen Redoxpartnern CamA und CamB die 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) selektiv in *para*-Position demethylierte, erfolgte eine zweifache Demethylierung mit CYP1232A24 und dem physiologischen Partnern FeRed_1 und FldX. Bei FldX handelt es sich um ein FMN-enthaltendes Flavodoxin, das hohe Ähnlichkeiten zu den FMN-Teilen der Stickstoffmonooxidsynthase-Reduktasen aufweist. Neben den bifunktionalen Reduktasen BMR (von P450 BM3) und CPR (Eukaryoten) gehören diese zu der FAD-FMN-Proteinfamilie.³⁸⁶ Auch zu bekannten Flavodoxinen wie etwa das Cindoxin aus *Citrobacter braakii* besteht eine hohe Aminosäuresequenzidentität von 40%. Bei der FAD-enthaltenden NADPH-Ferredoxin-Reduktase FeRed_1 kann dabei eine ebenfalls hohe Sequenzidentität von 35% zu der putativen Cindoxin-Reduktase festgestellt werden.

Die Rekonstitution der P450-Aktivität mittels der sich in einem *Cluster* befindenden Redoxpartner stellt eine Besonderheit in Mikroorganismen dar. Oftmals sind die physiologischen Redoxpartner über das gesamte Genom verstreut und dadurch schwer zu identifizieren.^{53,65,262} Bisherige Ausnahmen umfassen das gut charakterisierte P450cam, P450cin sowie P450terp, die in *Clustern* mit den Redoxpartnern vorkommen und den ersten

Schritt des Abbaus von Camphor (**90**), Cineol respektive α -Terpineol (**84**) katalysieren.^{58,387,388} P450cin stellt dabei das bisher einzige Klasse III P450 System dar. Im Vergleich zu Klasse I Systemen wie P450cam werden die Elektronen von einem Flavodoxin (Cindoxin) anstatt eines Eisen-Schwefel-Proteins (Ferredoxin) übertragen.^{389,390} Die zugehörige physiologische Cindoxin-Reduktase konnte bislang jedoch nicht in einer aktiven Form heterolog hergestellt und damit charakterisiert werden.²⁵⁹ Gleichermäßen können die in dieser Arbeit identifizierten CYP1232 Familienmitglieder in die seltene P450 Klasse III eingeordnet werden, da sie ihre Elektronen von dem physiologischen Flavodoxin FldX erhalten. Dementsprechend repräsentieren CYP1232A24 und CYP1232F1 durch die Identifikation und Herstellung des kompletten Multikomponentensystems mit der NADPH-Ferredoxin-Reduktase Fered_1 die ersten Beispiele eines vollständig physiologischen sowie funktionalen Klasse III P450 Systems.

4.3.4 P450s aus *Arthrobacter* sp. als effektive Biokatalysatoren

Die Möglichkeit einer weiteren Charakterisierung von neuartigen P450 Biokatalysatoren ist aufgrund der Komplexität des Multikomponentensystems sowie der spektralen Eigenschaften beträchtlich. Entscheidende Faktoren für den Einsatz in der industriellen Biokatalyse stellen das Substratspektrum, die Selektivität und Aktivität der Reaktionen sowie die Leistungsfähigkeit als Ganzzellbiokatalysator dar. Diese sollten mit den neuartigen P450s aus *Arthrobacter* sp. evaluiert werden.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen wurden zunächst die Substratspektren analysiert. Die *in vitro* Biotransformationen mit CYP199A25 sowie CamA und CamB wurden in einer betreuten Masterarbeit von Julia Hallmen durchgeführt.²⁸¹ Ein Spektrum an unterschiedlichen *para*- und *meta*-substituierten Benzoesäure-, Phenyllessigsäure- und Zimtsäurederivaten sowie Terpenen und substituierten Aromaten ohne Säuregruppe wurden dafür ausgewählt. Bis auf die 4-Methylzimtsäure (**60**) wurden ausschließlich Benzoesäurederivate von CYP199A25 akzeptiert (Abbildung 27). Hierbei zeigte sich, dass CYP199A25 regioselektiv in *para*-Position demethyliert oder Alkylreste hydroxyliert. Das Substratspektrum und die Regioselektivität ist damit sehr ähnlich zu den beiden bisher charakterisierten CYP199A-Mitgliedern CYP199A2 und CYP199A4 aus *Rhodopseudomonas palustris*.^{261,391} Die hohe Selektivität für die *para*-substituierten Benzoesäurederivate lässt sich aus den Kristallstrukturen der offenen und substratgebundenen Konformationen von CYP199A2 und CYP199A4 herleiten.

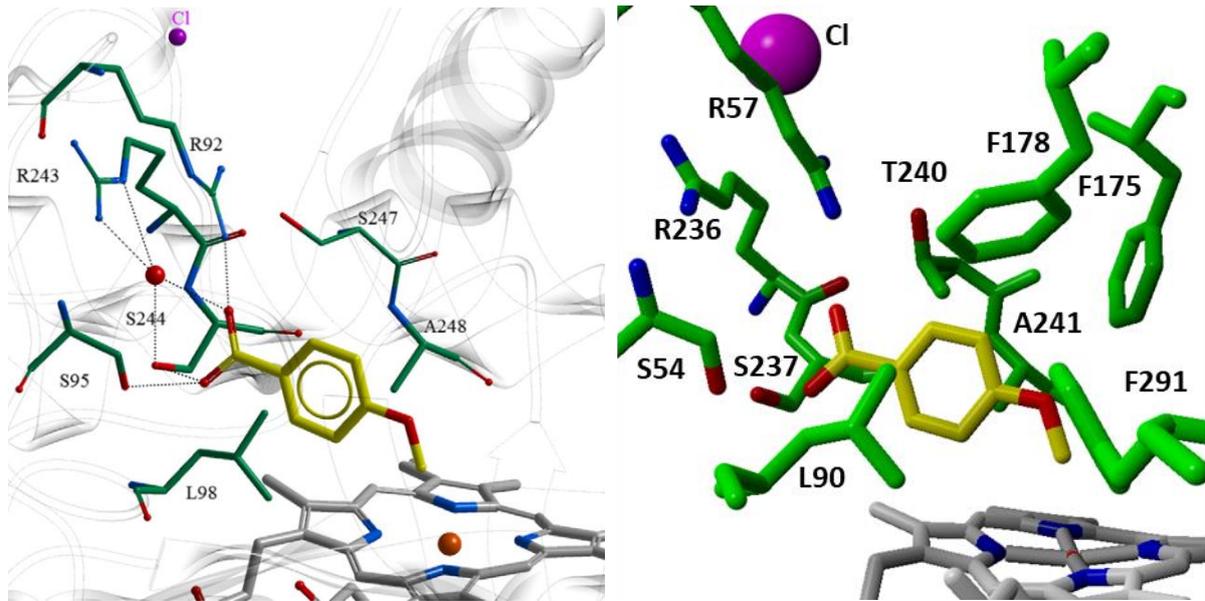


Abbildung 47: Vergleich der Kristallstruktur von CYP199A4 (verändert nach Coleman *et al.*, 2016)³⁹² mit dem Homologiemodell von CYP199A25 aus *Arthrobacter* sp. Das Homologiemodell von CYP199A25 wurde durch die 3DM-Technologie basierend auf dem PDB-File 4D01 generiert. Das Substrat 4-Methoxybenzoesäure (**37**, gelb) wurde im Templat 4D01 co-kristallisiert. Häm (grau); Reste der aktiven Tasche (grün); Sauerstoffatome (rot); Chloridion (magenta); Stickstoffatome (blau).

In dem Homologiemodell von CYP199A25 lassen sich nahezu identische Aminosäurereste wie in der Kristallstruktur von CYP199A4 finden, die die aktive Tasche bilden und für die Substratkoordinierung zuständig sind (Abbildung 47). Bis auf Serin247, an dessen Position sich in CYP199A25 die ähnliche Aminosäure Threonin (T240) befindet, wird die aktive Tasche von den identischen Aminosäuren gebildet. Die konvergenten Substratspektren lassen sich schließlich durch die analoge Enzymarchitektur in der CYP199A Unterfamilie erklären. Das Substrat 4-Methoxybenzoesäure (**37**) wird in der aktiven Tasche so koordiniert, dass die Methoxygruppe in *para*-Position direkt über dem Häm liegt (Abbildung 47).³⁹³ Durch die Substratbindung werden Seitenketten- und Sekundärstrukturbewegungen, einhergehend mit der Umlagerung von ionischen und Wasserstoffbrückenbindungen am Substrateingangskanal, induziert.³⁹⁴ Die Säuregruppe wird dabei von polaren und basischen Ankerpositionen über Wasserstoffbrücken koordiniert (Abbildung 47). Gleichzeitig wird angenommen, dass ein Chloridion an der Oberfläche bindet und den Eingangskanal verschließt. Insbesondere aromatische hydrophobe Phenylalanine (F175, F178, F291) sowie die Seitenketten L90 und A241 stabilisieren schließlich den Benzenring über hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte und sorgen damit für die Koordination des Substrats vor dem Häm. Die stringente Bindung der 4-Methoxybenzoesäure (**37**) im aktiven Zentrum erklärt auch die regioselektive Demethylierung der 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) in *para*-Position, bei der die Methoxygruppe in *meta*-Position vom aktiven Häm wegzeigt.³¹⁷ Die Kristallstrukturen erklären darüber hinaus die starke Präferenz für Benzoesäurederivate und die Effekte der Substituenten auf die Aktivität. Mit CYP199A25 wurde 4-Methoxybenzoesäure (**37**) am besten umgesetzt, wobei eine zusätzliche Methoxygruppe in

meta-Position keinen großen Einfluss auf die Aktivität hatte (Abbildung 48). Währenddessen reduzierte eine kleinere Hydroxygruppe an dieser Position (**45**) die Aktivität deutlich, vermutlich aufgrund der destabilisierenden Wirkung des polaren Substituenten in einer sonst hydrophoben aktiven Tasche. Auch die Veränderung des *para*-Substituenten zu einem Methylrest reduzierte die Aktivität durch eine größere Distanz zum Häm-Eisen. Längere respektive größere Substituenten werden toleriert (**51**, **57**), jedoch sinkt die Aktivität. In den Biotransformationen mit der 4-Ethylbenzoesäure (**51**) und 4-Isopropylbenzoesäure (**57**) wurden mehrere Produkte detektiert, die nicht durch Standards identifiziert werden konnten. Analog zu den in der Literatur charakterisierten CYP199-Mitgliedern kommt es hier jeweils vermutlich zu einer Desaturierung oder Hydroxylierung in *para*-Position.³¹⁷ Veränderungen an der Carboxylgruppe führten zu einer gravierenden Reduktion der Aktivität, was bereits auch für CYP199A4 festgestellt wurde.³⁹² Die korrekte Koordination der Carboxylatgruppe scheint kritisch für die Katalyse der CYP199-Mitglieder zu sein. Nicht die veränderte Distanz zum Häm-Eisen scheint der bestimmende Faktor zu sein, sondern vielmehr die Planarität des Carboxy-Substituenten. Im Falle der nicht-planaren Phenyllessigsäure (**38**) führt dies zu einer nicht mehr detektierbaren Katalyse (Abbildung 48), wohingegen das planare Zimtsäurederivat (**60**) trotz der längeren Kette noch umgesetzt wird. CYP199A4 zeigte diesbezüglich Aktivitäten mit unterschiedlich substituierten Zimtsäuren.³⁹⁵ Im Vergleich mit den literaturbekannten CYP199A2 und A4 scheint CYP199A25 aus *Arthrobacter* sp. allerdings weniger große Substrate zu akzeptieren, was durch den fehlenden Umsatz mit 2-Naphtoesäure (**116**) veranschaulicht wird.^{317,396,397}

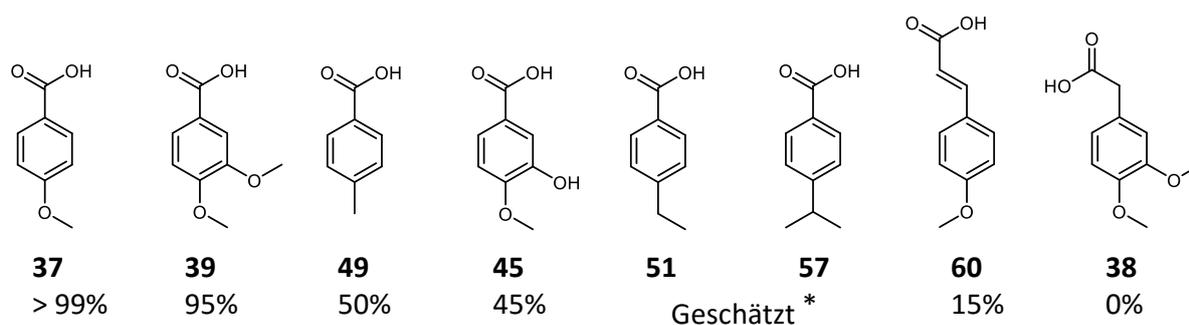


Abbildung 48: Tendenz der *in vitro* Aktivitäten mit CYP199A25. Die Biotransformationen wurden in einer betreuten Masterarbeit durch Julia Hallmen durchgeführt.²⁸¹ *Die Produktidentifizierung und die damit einhergehende Quantifizierung konnte nicht durch authentische Standards erfolgen.

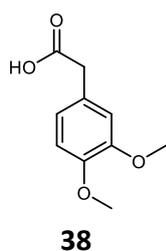
Außer dem vermutlich natürlichen Substrat 3,4-Dimethoxyphenyllessigsäure (**38**) konnten mit CYP1232F1 und den heterologen Redoxpartnern CamA und CamB nur geringe Aktivitäten mit weiteren Substraten erhalten werden. Die Demethylierungsaktivität in *para*-Position reduzierte sich ähnlich zu CYP199A25 gravierend, wenn die Methoxygruppe in *meta*-Position durch eine Hydroxygruppe ausgetauscht wurde (Abbildung 28). Anders als bei CYP199A25

wurden mit CYP1232F1 auch Substrate mit einer Methoxygruppe in *meta*-Position wie z.B. 3-Methoxyphenylelessigsäure (**68**) akzeptiert, einhergehend jedoch mit einem großen Aktivitätsverlust. Während Benzoessäure- und Zimtsäurederivate nicht oxidiert wurden, demethylierte CYP1232F1 Eugenol (**65**) und 3-Chloro-4-methoxyanilin (**66**), die beide keine Carboxygruppe besitzen. Die detektierten Substrate weisen auf eine ähnliche Enzymarchitektur wie bei CYP199A25 hin, jedoch erfolgte die Demethylierung durch CYP1232F1 auch in *meta*-Position. Substituenteneffekte, wie z.B. eine Methylgruppe in *para*-Position von Phenylelessigsäure, wurden in diesem Fall nicht analysiert, was eine Ursache für die bisher festgestellte ausschließliche Demethylierungsaktivität von CYP1232F1 darstellen könnte.

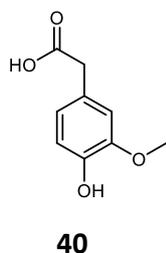
Das vielseitigste Enzym wurde schließlich mit CYP1232A24 identifiziert, das neben Benzoessäure-, Phenylelessigsäure- und Zimtsäurederivaten auch viele weitere substituierte aromatische Verbindungen demethylieren konnte (Abbildung 29). Das sehr sperrige Molekül Naproxen (**13**) wurde beispielsweise demethyliert und eine geringe Hydroxylierungsaktivität gegenüber Laurinsäure (**62**) detektiert. Gleichzeitig zeigte sich eine Präferenz bzw. höhere Aktivität mit Methoxygruppen in *meta*-Position. Beides deutet auf eine weitaus flexiblere und größere aktive Tasche im Vergleich zu CYP199A25 und CYP1232F1 hin. Aufgrund der geringen Aminosäuresequenzidentität gegenüber den bisher gelösten P450-Kristallstrukturen konnte jedoch für CYP1232A24 und CYP1232F1 kein adäquates Homologiemodell erstellt werden. Bis auf die Hydroxylierung von β -Ionon (**1**) in allylischer Position durch CYP1232A24 wurden mit den neu identifizierten *Arthrobacter* sp. P450s keine Aktivitäten gegenüber den Zielterpenen festgestellt. Falls eine Oxidation der erste Schritt im Metabolismus von α -Humulen (**3**), β -Bisabolen (**4**) und Premnaspriodien (**5**) ist, müssen demnach vermutlich andere, bisher nicht detektierte Mono- oder Dioxygenasen hierfür verantwortlich sein.

Erste Hinweise auf die natürlichen Substrate der P450s wurden durch die *in vitro* Aktivitäten gewonnen. Für eine detailliertere Charakterisierung wurden schließlich jeweils die beiden aktivsten Substrate mittels *Spin-State*-Experimenten verglichen. Nach Substrattitrierung zum P450 lässt sich die Bindung mit Hilfe eines *Shifts* des Soret-Bandes von 420 auf 390 nm, der aus der Verdrängung des Wasserliganden von Häm resultiert, feststellen. Die daraus ermittelte Dissoziationskonstante (K_d) sollte in der Folge Aufschluss über die natürlichen Substrate geben. Im Falle von CYP199A25 wurde eine deutlich geringere K_d und damit stärkere Bindungsaffinität mit 4-Methoxybenzoessäure (**37**) im Vergleich zur 3,4-Dimethoxybenzoessäure (**39**) gemessen, was mit den *in vitro* Daten und der Literatur übereinstimmt.³⁹⁴ 4-Methoxybenzoessäure (**37**) oder eine analoge Verbindung scheint das natürliche Substrat für CYP199A25 darzustellen. CYP1232F1 und CYP1232A24 liegen auf dem *Arthrobacter* sp. Genom in einem funktionalen *Cluster* mit physiologischen

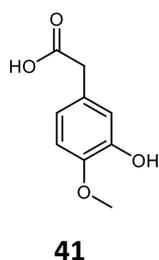
Redoxpartnern und wurden durch die Proteomanalyse mit dem Papaverin (**35**)-Abbaueweg in Verbindung gebracht. Hier kommt es zu einer zweifachen Demethylierung von 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**). Beide Enzyme akzeptieren dieses Substrat, zeigen aber unterschiedliche Regioselektivitäten. Durch die Kombination aus *in vitro* Biotransformationen und *Spin-State* Experimenten wurden schließlich klare Indizien für die Beteiligung am Papaverin (**38**)-Metabolismus erhalten (Abbildung 49). CYP1232F1 demethyliert dabei spezifisch 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) in *para*-Position zu Homovanillinsäure (**40**), während mit den beiden anderen Substraten (**40** + **41**) nur eine minimale oder keine Aktivität sowie Bindung festgestellt werden konnte (Abbildung 49). Dem gegenüber ist CYP1232A24 in der Lage, alle drei Substrate zu binden und zu demethylieren. Die stärkste Bindung wird mit Homovanillinsäure (**40**) erzielt, die effektiv in *meta*-Position demethyliert wird. Die Verbindung 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) wird zwar am schwächsten gebunden, *in vitro* jedoch kommt es zu einer hohen Aktivität mit einer zweifachen Demethylierung.



P450	K_d^a [μM]	<i>In vitro</i> Produktbildung
CYP1232A24	n.b.	> 99% ^{c)}
CYP1232F1	65,1 \pm 1,2	> 99%



P450	K_d [μM]	<i>In vitro</i> Produktbildung
CYP1232A24	22,3 \pm 0,4	> 99%
CYP1232F1	n.b.	-



P450	K_d [μM]	<i>In vitro</i> Produktbildung
CYP1232A24	80,1 \pm 2,1	50 – 75%
CYP1232F1	n.b.	< 10%

Abbildung 49: Vergleich der *in vitro* Produktbildung sowie Bindungsaffinität von CYP1232F1 und CYP1232A24 zu den unterschiedlichen Phenylelessigsäurederivaten. n.b.: nicht bestimmbar (nur minimaler *Spin-State shift* detektierbar bzw. kein Maximum erreicht); c) Zweifache Demethylierung; **38**: 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure; **40**: Homovanillinsäure; **41**: 3-Hydroxy-4-methoxyphenylelessigsäure.

Die Ergebnisse der *in vitro* und *Spin-State* Experimente lassen letztlich zwei mögliche Routen im Papaverin (**35**)-Metabolismus zu. Eine Route wird anhand der erzielten Ergebnisse

präferiert genutzt. Hierbei wird 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) zunächst durch CYP1232F1 in *para*-Position regioselektiv zu Homovanillinsäure (**40**) demethyliert. Mittels einer weiteren Demethylierung in *meta*-Position durch CYP1232A24 wird 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**) gebildet, die somit dem weiteren Abbau zur Verfügung steht (Abbildung 50). Die alternative Route könnte durch das vielseitige Reaktionsspektrum anhand CYP1232A24 ohne Beteiligung von CYP1232F1 erfolgen. CYP1232A24 besitzt eine Präferenz für die *meta*-Position, jedoch wurde die Regioselektivität mit dem Substrat 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) nicht evaluiert. Sowohl eine erste Demethylierung in *para*- oder *meta*-Position als auch eine sehr wahrscheinliche Mischung ist vorstellbar, da letztlich beide resultierenden Verbindungen von CYP1232A24 weiter oxidiert werden können. Aufgrund der katalytischen Eigenschaften der Enzyme sowie der Detektion von CYP1232A24 und CYP1232F1 in der Proteomanalyse, wird der Hauptanteil vermutlich über die Route mit beiden Enzymen ablaufen. Dies stimmt mit den Arbeiten von Hauer und Kollegen überein, in denen Homovanillinsäure (**40**) als Metabolit in *Arthrobacter* sp. detektiert wurde.³¹⁹

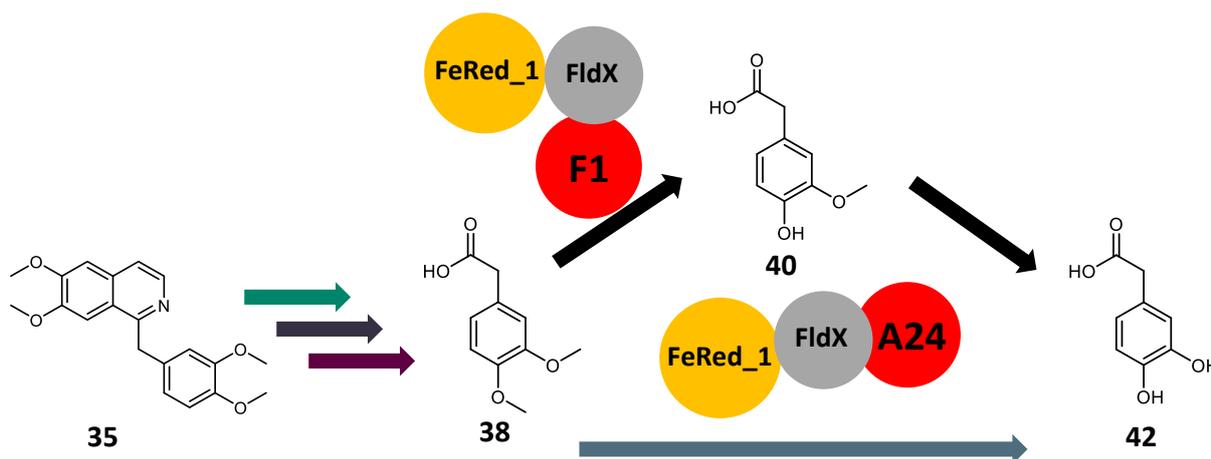


Abbildung 50: Beteiligung von CYP1232F1 und CYP1232A24 am Papaverin (**35**)-Abbauweg in *Arthrobacter* sp. Das Schema wurde von Lingens, Haase-Aschoff und Hauer abgeleitet.^{264,319} Papaverin (**35**) wird über mehrere Stufen zur 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (**38**) prozessiert. **Schwarze Route:** Mittels der physiologischen Elektronentransferpartner FeRed_1 und FldX erfolgt der weitere Abbau durch CYP1232F1 und CYP1232A24 über die Homovanillinsäure (**40**) zum demethylierten Produkt 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (**42**); **Graue Route:** Beide Demethylierungsschritte werden durch CYP1232A24 katalysiert.

Durch die Proteomanalyse mit Papaverin (**35**) konnten schließlich zwei P450s und die in einem Gen-Cluster liegenden Klasse III-bildenden Redoxpartner (FeRed_1 und FldX) identifiziert und deren physiologische Rolle experimentell entschlüsselt werden. Der erste Schritt des komplexen Stoffwechselweges wird vermutlich durch eine initiale Dihydroxylierung des Heteroaromaten im Isochinolinteil von Papaverin (**35**) mittels einer Dioxygenase katalysiert.²⁶⁴ Die Identifizierung der verantwortlichen Dioxygenase war Bestandteil einer vorangegangenen Dissertation, jedoch konnte eine Beteiligung noch nicht vollständig geklärt werden.²⁶⁵ Des Weiteren wurde die erfolgreiche Klonierung und

Biotransformation mit der ringspaltenden, cofaktorunabhängigen 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure 2,3-Dioxygenase durchgeführt, die in den Proteomanalysen mit Papaverin (35) detektiert wurden.^{265,398} Dieses Enzym ist für die weitere Prozessierung von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (40) durch Spaltung des aromatischen Rings verantwortlich,³¹⁹ befindet sich allerdings auf dem Genom weit entfernt vom CYP1232F1 und CYP1232A24 Gen-Cluster. Die Aktivität und damit Beteiligung am Papaverin (35)-Metabolismus einer 4-Hydroxyphenylelessigsäure 3-Monooxygenase, die in den Proteomanalysen nachgewiesen wurde, konnte in einer betreuten Masterarbeit nicht rekonstituiert werden.²⁸¹ In weiteren Arbeiten wurden mit unterschiedlichen Mikroorganismen demethylierte Produkte von Papaverin (35) aus Biotransformationen isoliert, eine solche Aktivität wurde mit CYP1232F1 und CYP1232A24 mittels Papaverin (35) als Substrat nicht festgestellt.³⁹⁹

4.3.5 Katalytische *in vitro* und *in vivo* Effizienz der P450s aus *Arthrobacter* sp.

Neben der Analyse des Substratspektrums und der physiologischen Funktion stellt die Analyse der Effizienz eines Enzym-Substrat-Systems einen bedeutenden Faktor in der Charakterisierung neuer P450s dar. Diese wird maßgeblich durch das gewählte Substrat und die Leistungsfähigkeit der Elektronentransferpartner beeinflusst. Kinetische Konstanten beschreiben hierbei die Effizienz einer bestimmten Enzym-Substrat-Kombination bzw. im Falle der P450s auch eines ganzen Multikomponentenkomplexes. Des Weiteren dient die Kopplungsrate als Maß für die Effizienz des Elektronentransfers. In einem effizienten P450 System werden zur Produktbildung möglichst viele Elektronen des Cofaktors NAD(P)H auf das Substrat übertragen, ohne dass Elektronen in Nebenreaktionen, z.B. der Bildung von Wasserstoffperoxid, verloren gehen. Dies kann dementsprechend auch die Stabilität des Biokatalysators maßgeblich beeinflussen. In der industriellen Biokatalyse steht die Verwendung von P450s als Ganzzellbiokatalysatoren im Fokus. Neben einer oftmals besseren Stabilität werden zusätzliche Schritte, wie der Zellaufschluss sowie gegebenenfalls eine Aufreinigung der Proteine, eingespart und die Cofaktorregenerierung durch Glucose, anstatt durch weitere, extern zugeführte Komponenten gewährleistet.

Basierend auf der Korrelation der NAD(P)H-Abnahme und der dabei gebildeten Produktmenge wurden die Kopplungseffizienzen der P450s bestimmt (Tabelle 11). Die physiologischen Systeme CYP1232F1 und CYP1232A24 erreichten hierbei eine sehr hohe Effizienz, d.h. die Elektronen des Cofaktors NADPH flossen nahezu vollständig in die Produktbildung. Die Präferenz der Reduktase FeRed_1 für den Cofaktor NADPH lag deutlich über der des NADH (Tabelle 11), was in vielen P450-Reduktasen festgestellt werden kann.^{54,124} Die Möglichkeit zur Veränderung der Cofaktorspezifität zum günstigeren NADH wurde bereits mit P450 Systemen und weiteren Reduktasen durch rationales Proteindesign

4.3 Strategien für die P450-katalysierte Terpenoxyfunktionalisierung

erreicht.^{116,400–402} Verglichen mit den physiologischen, wurde mit den heterologen Redoxpartnern CamA und CamB aus *P. putida* mit CYP1232F1 eine niedrigere, aber ebenfalls hohe Effizienz erzielt. Im Fall von CYP199A25 konnte mit CamA und CamB die NADH-Oxidationsrate sowie die Kopplungseffizienz nicht exakt ermittelt werden, da die Hintergrundaktivität zu hoch war. Insbesondere in der Aufreinigung von CYP199A25 müssen demnach Proteinverunreinigungen enthalten sein, die den Cofaktor NADH auch ohne Substrat in hohem Maße oxidieren. Insgesamt wurden hohe katalytische Effizienzen ($k_{cat} K_m^{-1}$) erzielt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse der neuen P450s aus *Arthrobacter* sp.

P450	Redox-partner	Kopplungs-effizienz	K_m [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	$k_{cat} K_m^{-1}$ [$\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$]	<i>In vitro</i> Produkt-bildung ^{a)}	<i>In vivo</i> Produkt-bildung ^{b)}
CYP1232A24	FeRed_1 und FldX	87%	6,7 $\pm 0,3$	5,23 $\pm 0,28$	$7,82 \cdot 10^5$	$99,8 \pm 1,0\%$	$1,77 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$
CYP1232F1	FeRed_1 und FldX	> 99%	5,2 $\pm 0,2$	5,40 $\pm 0,03$	$1,05 \cdot 10^6$	$99,9 \pm 2,9\%$	$0,93 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$
	CamA/B	84%	5,2 $\pm 0,2$	2,28 $\pm 0,04$	$4,41 \cdot 10^5$	$88,1 \pm 2,8\%$	$0,06 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$
CYP199A25	CamA/B	n.d.	46,5 $\pm 2,2$	3,36 $\pm 0,05$	$7,22 \cdot 10^4$	$63,2 \pm 1,8\%$	$1,30 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$

n.d. nicht detektiert, Hintergrund der Cofaktor Oxidation zu hoch.

a) Für die Determinierung der *in vitro* Produktbildung wurden 2 μM P450, 2 mM Substrat sowie das G6PDH-Cofaktor-Regenerationssystem eingesetzt und die Reaktion nach 30 min durch HCL Zugabe gestoppt.

b) Die analytischen Biotransformationen wurden in 1 mL bei einer Zellkonzentration von 0,1 g mL^{-1} für 24 h durchgeführt. Die Reaktionen mit CYP1232A24 und CYP199A25 erfolgten im pBAD33/pBAD18 System und die Reaktionen mit CYP1232F1 im pETDuet/pCola-System.

Eine im Vergleich zu den heterologen Redoxpartnern CamA und CamB etwa zweifach höhere spezifische Aktivität und damit Effizienz wurde mit CYP1232A24 und dem physiologischen System aus FeRed_1 und FldX gemessen. Dies konnte auch häufig in der Literatur festgestellt werden, wie im Fall des Austausches von CamB zum physiologischen Ferredoxin Pux mit CYP199A2.^{393,397} Möglicherweise liegt aus diesem Grund auch die katalytische Geschwindigkeit k_{cat} von CYP199A25 niedriger als die der beiden anderen *Arthrobacter* sp. P450s. Die erreichten *in vitro* Aktivitäten und auch Bindungsaffinitäten sind im Vergleich zu den CYP199A2 und A4 aus *R. palustris* generell niedriger,³⁹¹ obwohl teilweise ebenfalls die physiologischen Redoxpartner und Substrate eingesetzt wurden. Die k_{cat} -Werte des bisher aktivsten Dreikomponentensystems P450_{cam} (4200 min⁻¹)⁵² wurden in den letzten Jahrzehnten nicht annähernd erreicht und nur durch natürliche Fusionsproteine wie P450foxy oder das insgesamt aktivste P450 BM3 übertroffen.^{322,403} Dennoch wiesen die *Arthrobacter* sp. P450s hohe *in vitro* Aktivitäten auf und demethylierten innerhalb von 30 min 2 mM der Substrate vollständig.

Bei der Generierung von Ganzzellsystemen stellte sich die Kombination der kompatiblen pBAD33 und pBAD18-Expressionsvektoren unter der Kontrolle streng regulierter Arabinosepromotoren als hoch effektiv heraus. Dieses System ist bekannt dafür, toxische Proteine effizient zu exprimieren.⁴⁰⁴ Die hohen Produkttiter von 1,77 g L⁻¹ (CYP1232A24) respektive 1,3 g L⁻¹ (CYP199A25) zeigen, dass neben den P450s auch die Redoxpartner gut exprimiert werden konnten (Tabelle 17). Während CYP199A2 und A4 aus *R. palustris* *in vitro* noch deutlich aktiver waren, wurden *in vivo* letztendlich vergleichbare Ergebnisse erzielt.^{391,405,406} Mit CYP1232A24 konnten außerdem im Vergleich zu dem bisher einzigen Klasse III System P450cin (1 g L⁻¹ Produkt nach 3 d) höhere *in vivo* Ausbeuten in kürzere Zeit erreicht werden.⁴⁰⁷ Im Falle des pETDuet und pCola-Systems mit CYP199F1 ist es möglich, vier Proteine mit einem jeweils eigenen starken T7-Promoter zu exprimieren. Mit CYP101C1 und CYP101B1 aus *Novosphingobium aromaticivorans* konnten mit diesem Expressionssystem effiziente Ganzzellbiokatalysatoren erfolgreich generiert werden.⁶⁵ Eine Analyse der CYP1232F1-Biotransformationen ergab jedoch, dass das P450 nur sehr gering und nahezu vollständig nicht-funktional exprimiert wurde. Im Hinblick darauf ist eine deutliche Steigerung im pBAD-System zu erwarten. Die strenge Regulation der Expression im pBAD-System scheint im Vergleich zu der oftmals nicht absolut regulierten (*leaky*) Expression mit T7-Vektoren ein entscheidender Faktor zur Herstellung der zelltoxischen P450s zu sein.^{256,408}

Mittels ausbalancierten Expressionsbedingungen zwischen den drei heterolog exprimierten Proteinen, die durch CYP1232A24 evaluiert wurden (Anhang 7.4.3, Abbildung S7), konnten insbesondere mit den pBAD-Systemen sehr hohe Produkttiter erreicht werden. Hierbei wurden noch keine Untersuchungen zur Verbesserung der Biotransformation durchgeführt. Ein Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie

Wasserstoffperoxid auf die Biokatalysatorstabilität kann vermutlich aufgrund der hohen Kopplungseffizienzen und der in *E. coli* vorhandenen Schutzmechanismen (z.B. Superoxid-Dismutase) vernachlässigt werden.⁴⁰⁹ Die oxidative Demethylierung erfolgt über eine Hemiacetalbildung und sich direkt anschließende Eliminierung von Formaldehyd unter Bildung des Produkts.⁴¹⁰ Die Generierung einer großen Menge Formaldehyd, die dementsprechend mit der hohen *in vivo* Aktivität einhergeht, wurde nicht untersucht, scheint aber aufgrund der sehr hohen Produkttiter den Biokatalysator nicht maßgeblich zu beeinträchtigen. Ähnlich der Biotransformation mit P450 RhF und Diclofenac (**8**) sind vermutlich die Cofaktorverfügbarkeit sowie der Transport der Verbindungen über die Zellmembran limitierende Faktoren und damit Ansatzpunkte für weitere Steigerungen der Produktivität. Gleichzeitig zeigt die weitere Evaluation der Substratspektren und das rationale Proteindesign im Falle von CYP199A2 und A4 das Potenzial der Ganzzellbiokatalysatoren für synthetische Anwendungen.^{406,411} Aufgrund der hohen Produktivität und Selektivität der Biokatalysatoren können industriell bedeutende Reaktionen wie die selektive Demethylierung von 3,4-Dimethoxybenzoesäure (**39**) in *para*-Position zu Vanillinsäure (**48**) als alternative Vanillinsyntheseroute Verwendung finden.

4.3.6 Natürliche P450-Fusionsproteine

Natürliche P450-Fusionsproteine besitzen durch die direkte Fusion an den physiologischen Redoxpartnern oftmals hohe katalytische Aktivitäten sowie Effizienzen. Gleichzeitig erleichtert die Expression nur eines Proteins die Anwendung. In dieser Arbeit wurden bereits hohe Ausbeuten mit P450 RhF und Diclofenac (**8**) erzielt.⁶⁷ Ferner zeigte die am besten charakterisierte Fettsäure-Hydroxylase P450 BM3 promiskuitive Aktivitäten mit Terpenen, die mittels zahlreicher *Enzyme Engineering* Ansätze weiter verbessert werden konnten.^{64,81,83,229,412-415} Für die Identifizierung neuer Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen wurden aus diesem Grund 17 noch nicht charakterisierte natürliche Fusionsproteine von einem Kooperationspartner bezogen. Basierend auf ihrer Aminosäuresequenz können diese in die CYP102 Familie von P450 BM3 eingeordnet werden.

Während alle P450s entsprechend ihrer Unterfamilie Aktivitäten als Fettsäure-Hydroxylasen aufwiesen, zeigten die Enzyme ITB1693 und ITB1696 in einer betreuten Bachelorarbeit eine Oxyfunktionalisierung mit β -Ionon (**1**) und Valencen (**7**).³²¹ Analog zur Evolvierung von P450 BM3 sollte ein rationales Enzymdesign schließlich die Aktivität, Selektivität sowie Substratspezifität hinsichtlich der Katalyse der Terpene **1** – **7** beeinflussen. Als Startpunkt diente das Enzym ITB1693 (aus *Ralstonia metallidurans*), das *in vitro* und *in vivo* neben Nootkaton (**75**) auch eine große Bandbreite an Aromaten hydroxylieren konnte. Die Verwendung der P450-3DM-Datenbank, in der die Informationen zahlreicher

Mutagenesestudien von P450 BM3 implementiert sind, war prädestiniert für die Durchführung eines rationalen Proteindesigns der P450 BM3-Homologen. Obwohl ITB1693 nur eine Sequenzidentität von 40% zu P450 BM3 besitzt, sind die beiden Fettsäure-Hydroxylasen in den konservierten Bereichen, die auch die aktive Tasche bilden, sehr ähnlich, was bereits bei CYP199A25 und CYP199A4 beobachtet werden konnte (Kapitel 4.3.4). Ein zielgerichtetes Design mit dem Fokus auf entscheidende *hotspot*-Positionen zur Änderung der Enzymeigenschaften konnte demnach verfolgt werden. Durch den Austausch des direkt über der aktiven Tasche angesiedelten großen hydrophoben Phenylalaninrestes (Abbildung 35) durch die kleineren Aminosäuren Alanin und Glycin wurde schließlich genug Platz in der aktiven Tasche generiert, um die Sesquiterpene α -Humulen (**3**), Premnaspirodien (**5**) und Longifolen (**6**) zu mehreren Produkten zu oxidieren. Dieser Austausch hat schließlich auch in P450 BM3 gravierende Veränderungen zur Folge und ermöglicht in vielen Fällen die Hydroxylierung nicht-natürlicher sperriger Substrate. Das in der CYP102 Familie konservierte Phenylalanin spielt damit eine Hauptrolle in der Determinierung der Spezifität und Aktivität der Enzyme.³²² Mit den Varianten F95A und F95G wurde gleichzeitig die Aktivität der allylischen Hydroxylierung von β -Ionon (**1**) zu 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 10,0 gesteigert. Aufbauend auf diesen Varianten wurden mit weiteren Mutationen, die eine gegenüberliegende Position adressierten, die aktive Tasche wieder ein Stück kleiner modelliert. Dies sollte die Aktivität und Selektivität gegenüber den Sesquiterpenen **3**, **4** und **6** beeinflussen, führte jedoch zum Verlust der Fähigkeit die Sesquiterpene zu oxidieren. Der Platz im aktiven Zentrum war nach dem Austausch der Aminosäure Alanin an Position 337 zu größeren hydrophoben Aminosäuren demnach zu gering für die Katalyse der Sesquiterpene. Die Variante F95V/A337V zeigte schließlich eine 17-fache Steigerung der β -Ionon (**1**)-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp, was die Möglichkeit einer Anpassung der aktiven Tasche an ein bestimmtes Substrat verdeutlicht. Aufbauend auf den beiden erfolgreichen Einzelvarianten müssen weitere Positionen in der aktiven Tasche von ITB1693 schließlich sukzessive verändert werden, um die Aktivität und Produktselektivität des Biokatalysators im Hinblick auf die Oxyfunktionalisierung von Terpenen zu verbessern.

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand darin, versatile P450-Biokatalysatoren für die letzte Stufe in der Terpenoidbiosynthese in *E. coli* zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde von einem Kooperationspartner die Variante F95A von ITB1693 in einen α -Humulen (**3**)-produzierenden Stamm integriert. *In situ* wurde über den Mevalonatbiosyntheseweg (MEV) produziertes Farnesylpyrophosphat (C_{15}) durch eine α -Humulen-Synthase (TS) zyklisiert und schließlich durch das P450 zu 300 mg L^{-1} Produkt oxidiert. Das sukzessiv gebildete Substrat wurde mit der Variante F95A dabei selektiv zu α -Humulen-6,7-epoxid (**108**) umgesetzt (Abbildung 51), während das Überangebot bei einer initialen Substratzugabe in dieser Arbeit zu mehreren Produkten führte.

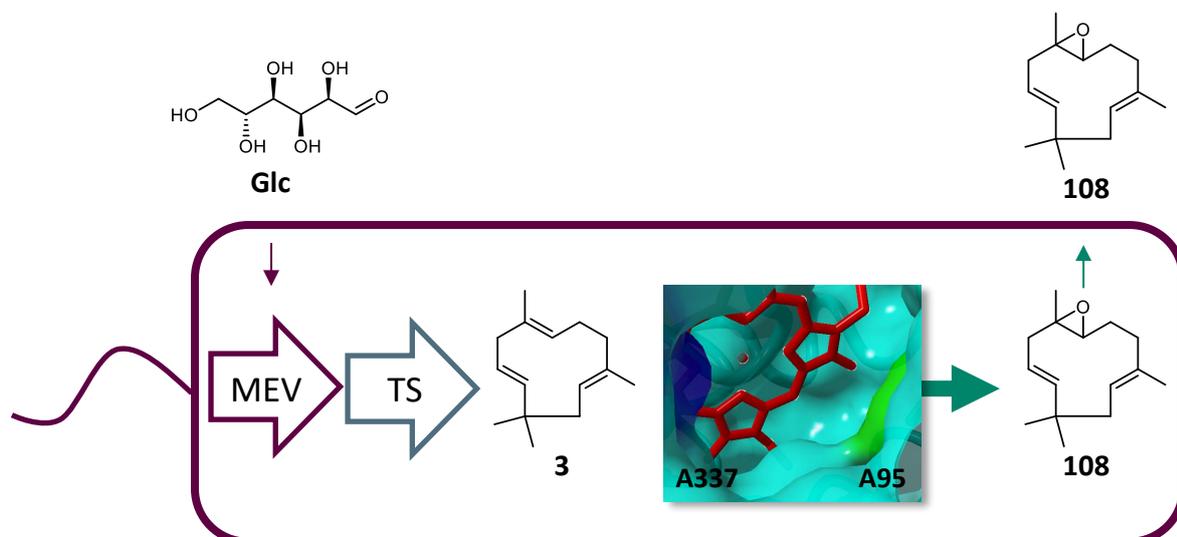


Abbildung 51: Implementierung von ITB1693 F95A in einen α -Humulen (**3**) produzierenden *E. coli* Stamm. Ausgehend von Glucose als Energiequelle wurde der Mevalonat-Biosyntheseweg (MEV), eine Terpen-Synthase (TS) und schließlich das P450 genutzt, um das Produkt α -Humulen-6,7-epoxid (**108**) *in vivo* in einer Zelle zu bilden.

Der noch nicht exakt untersuchte Prozess lag damit bereits weit über den Produkttitern der 8-Hydroxy- α -humulen-Produktion durch das pflanzliche CYP71BA1 aus *Zingiber zerumbet*.¹⁴⁴ In einem ähnlichen *E. coli*-System wurden hierbei lediglich 3 mg L^{-1} des Produkts erzielt. Dies zeigt das Potenzial des Einsatzes der ITB1693 Varianten in der industriellen Biokatalyse, das durch ergänzende schrittweise Modifikation z.B. durch *Enzyme Engineering* weiter verbessert werden kann.

4.3.7 Homologe P450s zu terpenhydroxylierenden Enzymen

In den vorherigen Kapiteln wurden unterschiedliche Biokatalysatoren identifiziert bzw. weiterentwickelt, die erste gute Aktivitäten gegenüber verschiedenen Zielterpenen zeigten. Insbesondere bakterielle P450s wiesen dabei ein hohes Potenzial auf. Diese Plattform sollte schließlich durch weitere bakterielle P450-Biokatalysatoren ergänzt und auch die Oxyfunktionalisierung der weiteren Zielterpene wie β -Bisabolene (**4**) ermöglicht werden.

Die homologiebasierte Identifikation stellte eine zielgerichtete Methode dar, um neue Terpen-Hydroxylasen zu entdecken. Analog zu den bisherigen Verfahren zur Identifikation potenzieller Substrate, wurden diesem Ansatz folgend direkt entsprechende P450s über Verwandtschaftsanalysen gesucht. Bakterielle P450s, die in der Lage sind, Norisoprenoide oder Sesquiterpene zu hydroxylieren, wurden in den letzten Jahren insbesondere aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* Soce56 durch die Gruppe um Rita Bernhardt isoliert.^{172,323-325} Myxobakterien besitzen die größten bakteriellen Genome und einen vielseitigen Sekundärmetabolismus, was sie für die biotechnologische Anwendung besonders interessant macht.^{247,416-420} Aus einem verwandten Myxobakterium, dessen Genom bekannt, dessen Proteom jedoch noch kaum erforscht ist, wurden basierend auf Homologievergleichen

interessante P450s für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen identifiziert (Tabelle 13). Der Organismus *Chondromyces apiculatus* DMS436 kommt natürlicherweise in Rinde und fauligem Holz vor und bildet auf VY/2-Agarplatten Zellschwärme aus, die langsam ringförmig nach außen gleiten und unter Nährstoffmangel die für Myxobakterien typischen orangeroten Fruchtkörper bilden.^{249,421} Für die Herstellung der P450s aus *C. apiculatus* DMS436 war letztlich, wie mit einigen anderen P450s in dieser Arbeit, die Verwendung des pBAD33-Expressionsvektors der entscheidende Faktor (Tabelle 14). In ersten Biotransformationen mit Zelllysat und den heterologen Redoxpartnern CamA und CamB, FdR und FdX oder FdR und AdX konnten bereits initiale Aktivitäten mit CYP109Q5, CYP125E3 und CYP264M1 und den Zielterpenen **1** – **7** hergestellt werden. Die weiteren P450s CYP263A3 und CYP264A4 sind dagegen entweder nicht in der Lage, die getesteten Substrate umzusetzen, oder der funktionale Elektronentransfer über die eingesetzten heterologen Redoxpartner ist nicht möglich. Für eine weitergehende Charakterisierung und Bestätigung der Ergebnisse sollten die neuen P450s schließlich in aufgereinigter Form angewendet werden. Obwohl CYP264M1 einen theoretischen isoelektrischen Punkt von etwa 5.9 besitzt, konnte mit einem Tris/HCl Puffer pH 8.2 (Raumtemperatur) das Protein nicht an die Gelmatrix in der Anionenaustauschchromatographie gebunden werden. Hier stellen Aufreinigungsmethoden wie die Affinitätschromatographie durch einen His₆-tag Alternativen dar, die in dieser Arbeit jedoch nicht weiterverfolgt wurden. Mittels der erfolgreich aufgereinigten CYP109Q5 und CYP125E3 konnten in Kombination mit CamA und CamB die Substratspektren evaluiert werden. Beide Enzyme zeigten eine große Bandbreite an katalysierten Reaktionen von diversen Norisoprenoiden über Mono- und Sesquiterpene bis hin zu NSAIDs (Abbildung 38). Interessanterweise zeigte CYP109Q5 nur eine minimale Aktivität mit Fettsäuren, was dieses Enzym von den eigentlich als Fettsäure-Hydroxylasen deklarierten CYP109-Mitgliedern wie CYP109B1, CYP109C1, CYP109C2 oder CYP109D1 abhebt.^{248,250,311} Die Aminosäuresequenzidentität beträgt dabei zu CYP109B1 39% bzw. zu CYP109C1 44%, zu CYP109C2 43% und zu CYP109D1 38%. Weiterhin ist CYP109Q5 im Gegensatz zu CYP125E3 in der Lage, die Steroide Progesteron (**96**) und Testosteron (**97**) zu hydroxylieren, obwohl letzteres Enzym basierend auf der P450-Familie mit dem Steroidmetabolismus in Zusammenhang gebracht wurde.³²⁶ Allerdings besitzt CYP125E3 nur eine 34%ige Aminosäuresequenzidentität zu dem bisher einzigen *in vitro* charakterisierten Mitglied CYP125A1, einer Steroid-Hydroxylase.^{328,329,422} Arbeiten an dem Steroid hydroxylierenden CYP109E1 aus *B. megaterium* (36% Identität zu CYP109Q5) zeigten, dass dieses Enzym im Vergleich zu den bereits charakterisierten P450s in der Literatur enger verwandt zu der Steroid-Hydroxylase CYP106A1 ist.⁴²³ Die Eingruppierung in eine P450-Familie repräsentiert demnach eine starke Evidenz für ein bestimmtes Substratspektrum, jedoch können sich die Präferenzen respektive natürlichen Substrate in großen und heterogenen P450-Familien wie die von CYP109Q5 oder CYP125E3 unterscheiden. Insgesamt wiesen die beiden umfassend

untersuchten P450s aus *C. apiculatus* DSM436 ein enormes Anwendungspotenzial auf, wobei CYP109Q5 in Bezug auf Aktivität und Breite des Substratspektrums CYP125E3 noch übertraf. CYP109Q5 war insbesondere in der Lage, alle Terpene **1** – **7** zu oxyfunktionalisieren (Abbildung 52), was dieses Enzym zu einer hoch attraktiven Plattform für einen *Enzyme Engineering* Ansatz macht.

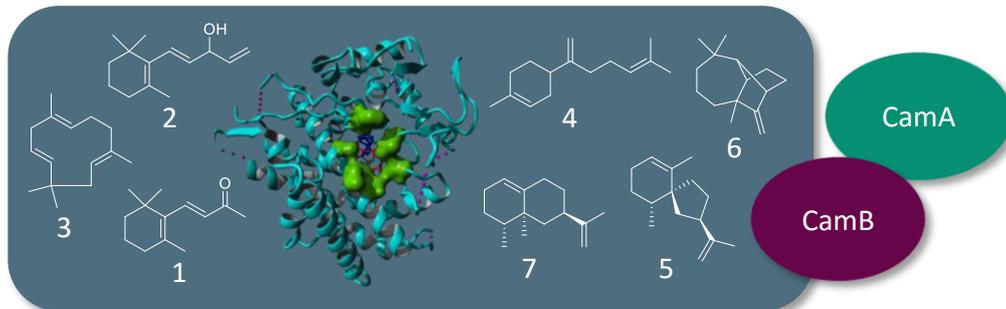


Abbildung 52: CYP109Q5 basierte Biokatalyse der Zielterpene **1** – **7**. Ein funktionaler Elektronentransfer durch die heterologen Redoxpartner CamA und CamB ermöglichte die Oxyfunktionalisierung der Terpene.

Als geeignetstes Templat für das Homologiemodell diente das Makrolid hydroxylierende P450 PikC (PDB 2BVJ) mit einer Aminosäuresequenzidentität von 39%.²⁰⁷ Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen mit der 3DM-Technologie kam für das rationale Enzymdesign eine kombinierte Strategie aus Substrat-*Docking*, Vergleichen mit Terpen-Hydroxylasen sowie Mutationsdaten aus der Literatur zur Anwendung (Abbildung 39). Gleichzeitig wurde der Fokus auf zwei bedeutende Positionen in P450s gelegt, mit denen die Aktivität und Selektivität entscheidend beeinflusst werden sollten. Die generierten Varianten sind schließlich aufgrund des breiten Substratspektrums für unterschiedliche Anwendungen wie die Terpen-, Steroid-, oder NSAID-Hydroxylierung interessant, um aus Generalisten Spezialisten zu bilden. Die geringe Selektivität mit dem CYP109Q5-Wildtypen könnte dementsprechend auf bestimmte Produkte hin mutiert und selektiert werden. Eine fokussierte Mutantenbibliothek aus 18 Einzel- und zehn Doppelvarianten wurde zunächst *in vitro* mit Zellysate gegenüber den Zielterpenen **1** – **7** getestet, um eine Vorselektion interessanter Varianten zu erhalten (Anhang 7.4.8, Abbildung S12). Insbesondere die Austausche an den Positionen V80, T229, I283 und A280 zeigten einen großen positiven Einfluss auf die Aktivität und veränderten das gebildete Produktspektrum, wobei zum Teil ein additiver Effekt feststellbar war. Auf die Bedeutung der Positionen V80 und A280 in der P450-Superfamilie wurde bereits in den vorherigen Kapiteln eingegangen. Die Position 57 in der 3DM-Datenbank (V80 in CYP109Q5) sowie die Position fünf Aminosäurereste nach dem konservierten ExxR-Motiv (A280) zeigen in den bislang untersuchten P450s in Richtung des Häms. Hierbei kann angenommen werden, dass diese Reste mit allen Substraten interagieren, wodurch der hohe Einfluss auf die Aktivität und Selektivität resultiert. Die beiden Positionen I283 und T229 befinden sich weiter entfernt vom katalytisch aktiven Häm-Eisen und stehen

ebenfalls in direktem Kontakt zu den Substraten, wodurch vermutlich hauptsächlich die Selektivität beeinflusst wird. Als entscheidende Position zur Orientierung der Substrate für die regioselektive Oxidation wurde z.B. eine äquivalente Position zu T229 in der humanen CYP2A6 (N297) identifiziert.⁴²⁴ Insgesamt wurden schließlich acht Varianten ausgewählt, aufgereinigt und *in vitro* weitergehend charakterisiert (Abbildung 53).

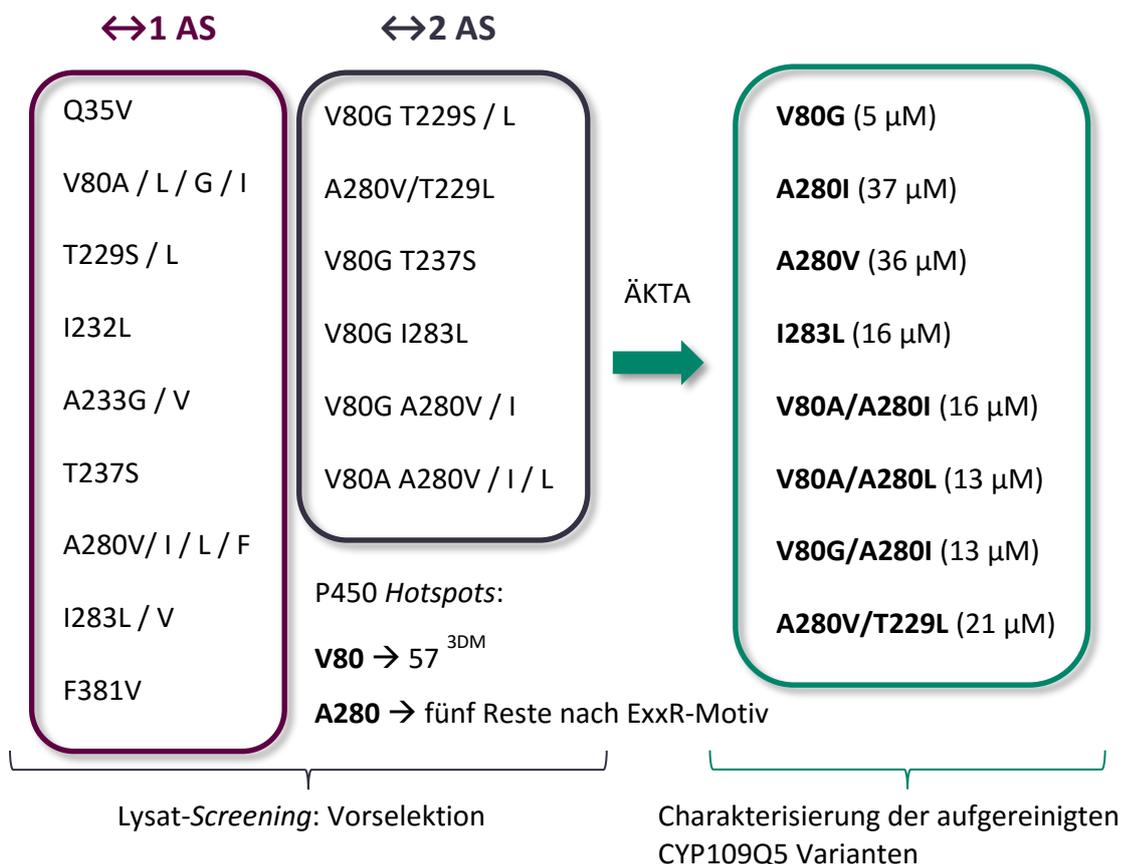


Abbildung 53: Fokussierte Mutantenbibliothek von CYP109Q5. Die Einzel- und Doppelvarianten mit den stärksten positiven Effekten hinsichtlich Aktivität und Selektivität in Lysat-Screenings wurden über Anionenaustauschchromatographie mittels eines ÄKTA-Systems aufgereinigt und weitergehend untersucht. Bei den Positionen V80 und A280 handelt es sich um P450 *hotspot*-Positionen, die durch die 3DM-Technologie identifiziert wurden.

Als Referenz wurde CYP109B1 aus *B. subtilis* mitgeführt und analog behandelt, das bis auf β -Bisabolen (**4**) erstaunlicherweise alle Zielterpene oxidierte. CYP109B1 hydroxylierte β -Ionon (**1**) ausschließlich in allylischer Position, während mit CYP109Q5 zwei weitere hydroxylierte Nebenprodukte detektiert werden konnten. Die Produktverteilung hin zu den Nebenprodukten wurde vor allem durch die Varianten A280I und A280V/T229L ermöglicht (Abbildung 40). Auch mit weiteren Norisoprenoiden wie Vinylionol (**2**) oder β -Damascon (**81**) wurden ähnliche Resultate erzielt. Ein möglicher Zugang zu den nicht-allylisch hydroxylierten Produkten war zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich, musste jedoch noch nähergehend untersucht werden. Für die exakte Strukturaufklärung mussten deshalb effiziente Ganzzellsysteme von CYP109Q5 entwickelt werden, um eine ausreichende Menge

der Produkte zu generieren. Hier stellte sich das pBAD33/pBAD18-Expressionssystem erneut als äußerst effektiv heraus. Basierend auf dem Substrat β -Ionon (**1**) wurden *in vivo* Biotransformationen mit unterschiedlich exprimierten Kulturen durchgeführt und somit ein möglichst aktiver Kompromiss zwischen der Expression des P450s und den Redoxpartnern CamA sowie CamB gewährleistet (Anhang 7.4.3, Abbildung S8). Mit diesem System konnten schließlich in präparativen Biotransformationen (100 mL Maßstab) etwa $0,5 \text{ g L}^{-1}$ der Produkte synthetisiert werden. Das Verhältnis der Produkte war hierbei äquivalent zu dem der *in vitro* Biotransformationen. Dies ermöglichte letztlich die Aufreinigung und Strukturaufklärung der gebildeten Nebenprodukte durch die CYP109Q5 Variante A280V/T229L. Interessanterweise wurden neben dem allylisch oxidierten Hauptprodukt die beiden nicht-allylischen Positionen des Iononrings hydroxyliert (Abbildung 54).

Bis auf wenige Ausnahmen hydroxylieren P450s in der Regel in allylischer Position. Sogar die exzessiven Mutationsstudien mit P450 BM3 konnten bisher keine Variante mit einer Aktivität in nicht-allylischer Position von Norisoprenoiden hervorbringen.^{81,83,227,425} Der Grund hierfür liegt in der Reaktivität der Positionen im Iononring. Die Regioselektivität wird dabei maßgeblich durch die Bindungsdissoziationsenergie und die sterische Zugänglichkeit kontrolliert. Durch die beiden Methylgruppen am Iononring wird die Oxidation zum sterisch zugänglicheren C3 gelenkt. Die elektronische Aktivierung der allylischen C-H-Bindung (niedrige Dissoziationsenergie) durch die Doppelbindung am Iononring führt schließlich zu einer Oxidation der energetisch bevorzugten C4-Position.^{362,426,427} Die Oxyfunktionalisierung der C2- und C3-Position am Iononring durch CYP109Q5 stellt damit eine Besonderheit dar.

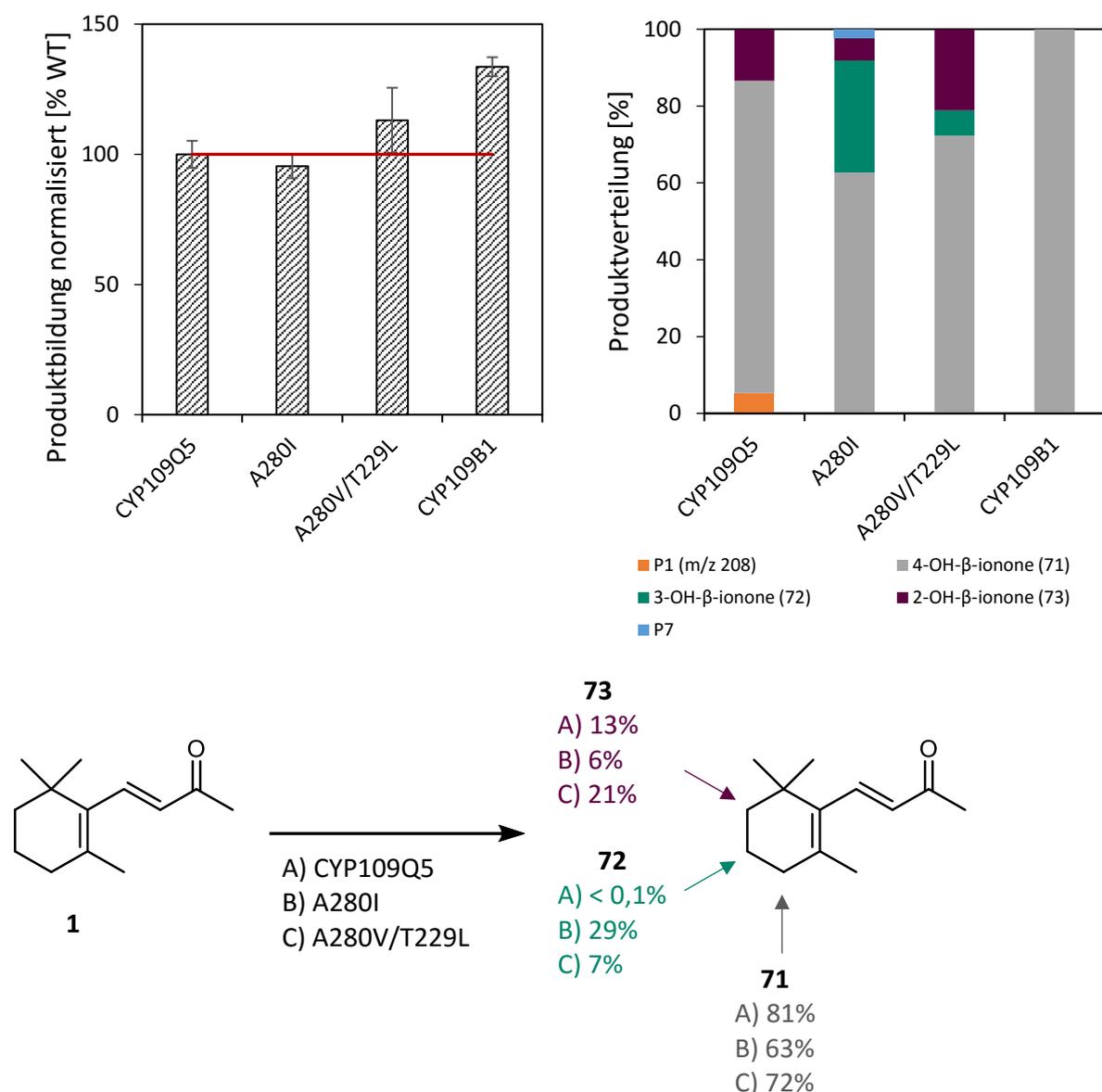


Abbildung 54: CYP109Q5-katalysierte Oxyfunktionalisierung von β-Ionon (**1**). Die *in vitro* Produktbildung und -verteilung ist für eine Auswahl an Enzymen und Varianten dargestellt. Die gebildeten Produkte wurden durch NMR-Spektroskopie identifiziert.

Gleichzeitig konnten die Produktverteilungen durch ein erstes *Enzyme Engineering* verschoben werden (Abbildung 40). Während die Doppelvariante A280V/T229L *in vitro* 21% 2-Hydroxy-β-ionon (**73**) bildete, produzierte die Variante A280I mit 29% bevorzugt 3-Hydroxy-β-ionon (**72**). Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Aktivitäten und Verschiebungen lässt sich im Homologiemodell von CYP109Q5 finden (Abbildung 55).

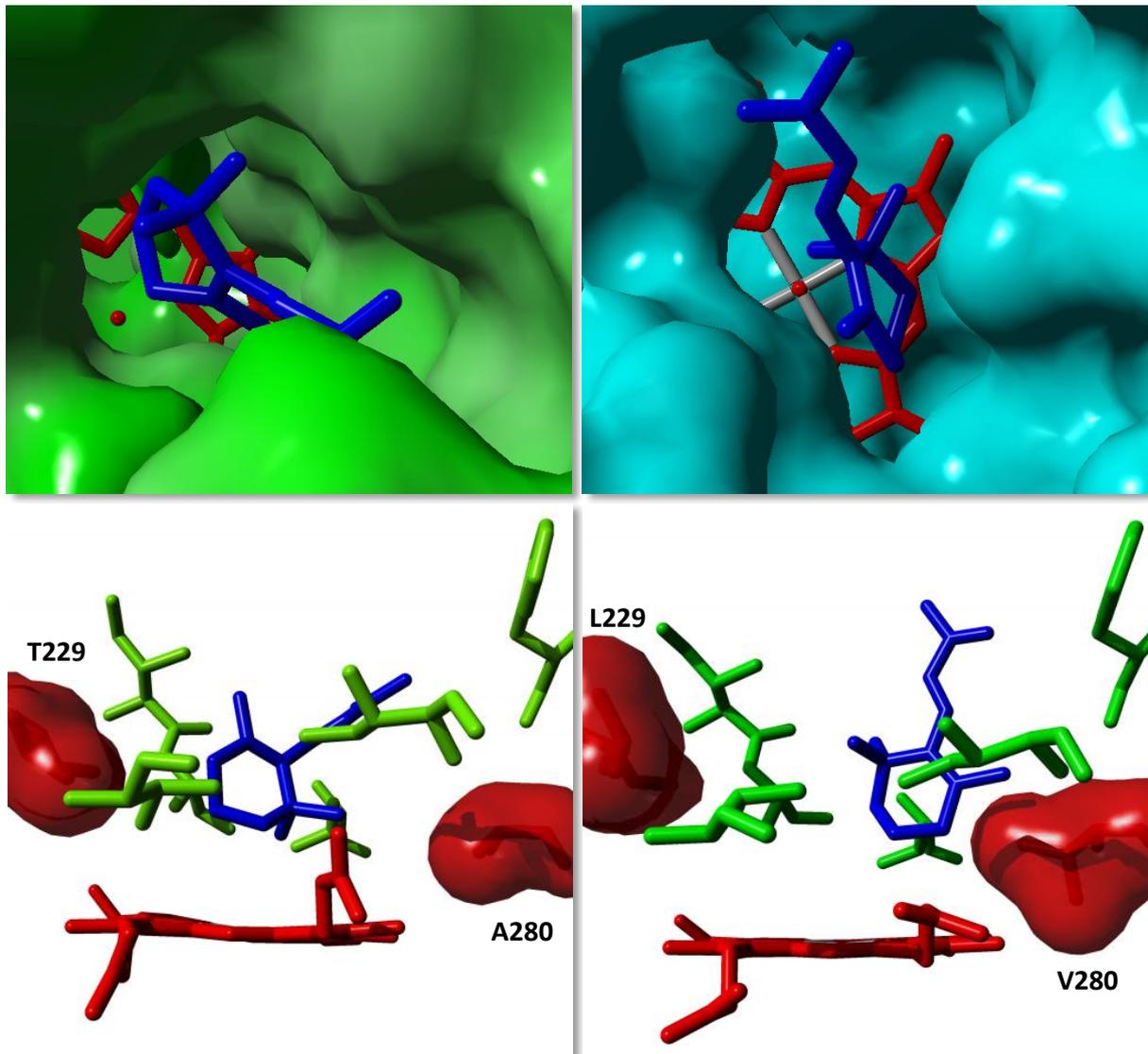


Abbildung 55: Vergleich der aktiven Taschen von CYP101C1 und CYP109Q5. Das Substrat β -Ionon (**1**, Blau) wurde im Falle des CYP109Q5 Homologiemodells über AutoDock Vina in die aktive Tasche gebunden. **Oben, links:** CYP101C1 aus *N. aromaticivorans* co-kristallisiert mit β -Ionon (**1**), PDB file: 3OFU; **Oben, rechts:** Homologiemodell des CYP109Q5-Wildtyps mit β -Ionon (**1**), Templat 2BVJ; **Unten, links:** Seitlicher Blick auf das aktive Zentrum des CYP109Q5-Wildtyps; **Unten, rechts:** Seitlicher Blick auf das aktive Zentrum der CYP109Q5 Variante A280V/T229L. Die *in silico* Mutagenese wurde mittels YASARA durchgeführt und die Struktur anschließend Energieminimiert.

Während CYP109Q5 eine sehr große aktive Tasche besitzt, in die beispielsweise auch Steroide passen, lässt die Kristallstruktur von CYP101C1 aus *N. aromaticivorans* co-kristallisiert mit β -Ionon (**1**) eine Bindung mit wenig Freiheitsgraden erkennen. Dieses Enzym ist in der Lage, β -Ionon (**1**) zu 75% in allylischer Position und zu 25% in der C3-Position zu hydroxylieren.⁶⁵ Diese Aktivität kann anhand der Kristallstruktur rationalisiert werden, in der die C4-Position des Iononrings am nächsten zum aktiven Häm-Eisen steht (Abbildung 55, oben links). Im Gegensatz dazu weisen die *Docking*-Experimente mit CYP109Q5 auf eine mögliche Orientierung der C2- und C3-Position von β -Ionon (**1**) zum Häm hin (Abbildung 55, oben rechts). Dementsprechend scheint genug Platz in der aktiven Tasche für die funktionale Bindung aller drei Positionen zu sein, was schließlich die Bildung einer Produktmischung aus

71, 72 und **73** erklären kann. Betrachtet man weitergehend die durch Mutagenese veränderte Konformation der A280V/T229L Doppelvariante so wird ersichtlich, dass beide Positionen einen entscheidenden Einfluss auf die Orientierung von β -Ionon (**1**) vor dem katalytisch aktiven Häm besitzen (Abbildung 55, unten links und rechts). Die aktive Tasche lässt sich dementsprechend modellieren, um die Selektivität hinsichtlich eines bestimmten Produkts zu bevorzugen. Ähnliche Produktverschiebungen wurden darüber hinaus mit weiteren Norisoprenoiden beobachtet, weshalb hier ebenfalls die Produktion nicht-allylisch oxyfunktionalisierter Produkte wahrscheinlich ist.

In Bezug auf die weiteren Zielterpene wurden mit einigen Varianten zum Teil enorme Steigerungen in der *in vitro* Produktbildung erhalten (Abbildung 40). Gleichzeitig wurden im Vergleich zum Wildtypen neue oder mit den aktivsten Varianten sogar zweifach hydroxylierte Produkte gebildet. Zunächst erweckte dies den Anschein, dass die Selektivität durch die Mutagenese vermindert wurde. Es stellte sich jedoch heraus, dass im Vergleich zu detektierten Produktpuren mit dem Wildtyp manche Produkte durch die höhere Aktivität vermehrt gebildet wurden. Tatsächlich stellen die Produkte bessere Substrate dar als das ursprünglich eingesetzte Ausgangssubstrat, was unter anderem aufgrund einer besseren Wasserlöslichkeit durch die Oxyfunktionalisierung erklärt werden kann. Dies wird durch eine höhere Aktivität gegenüber den potenziellen Produkten Nootkaton (**75**), Caryophyllenoxid (**77**) und Zerumbon (**80**) bekräftigt (Anhang 7.4.9, Abbildung S13). Basierend auf GC-MS Daten wurde letztere Verbindung interessanterweise in CYP109Q5-Biotransformationen in einer Doppelbindung reduziert und anschließend hydroxyliert. Eine Reduzierung durch Proteinverunreinigungen aus *E. coli* konnte auch in Biotransformationen mit CYP110E1 festgestellt werden.⁴²⁸ Insgesamt wiesen aktivere Varianten im Vergleich zum Wildtyp auch erhöhte Aktivitäten mit den potenziellen Produkten auf, was zu der vermehrten Weiteroxidation der Produkte führen kann. Dagegen erfolgte die Oxyfunktionalisierung der NSAIDs Ibuprofen (**16**) und Mefenaminsäure (**19**) sehr selektiv zu den Produkten 2-Hydroxyibuprofen (**16**) respektive 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (**20**), die mittels der in dieser Arbeit generierten authentischen Produktstandards identifiziert wurden.

Hinsichtlich Aktivität oder Selektivität unterschieden sich die ausgewählten CYP109Q5 Varianten in allen durchgeführten *in vitro* Biotransformationen stark untereinander sowie im Vergleich zu den weiteren getesteten P450s wie CYP109B1 oder CYP125E3. Auch die Oxyfunktionalisierung von Substraten wie Aromadendren (**79**), das nur in Spuren vom CYP109Q5-Wildtypen umgesetzt wird, wurde mit einzelnen Varianten effektiver möglich. Von den getesteten Enzymen und Varianten wurden durch die CYP109Q5 Doppelvariante V80A/A280I mit den meisten Substraten die höchsten Aktivitäten erzielt (Abbildung 40 und Anhang 7.4.9, Abbildung S13). Anhand dieser Variante sollten letztlich ausgewählte präparative Biotransformationen zur Charakterisierung einzelner Produkte führen. Mit dem NSAID Diclofenac (**8**) wurde mit einer relativ hohen Ausbeute von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ das Produkt

4'-Hydroxydiclofenac (**11**), das bereits in den Biotransformationen mit den filamentösen Pilzen detektiert wurde, selektiv gebildet.

Im Falle der Sesquiterpene **3 – 7** handelt es sich um relativ flüchtige Verbindungen, deren Katalyse oftmals durch den Einsatz einer organischen Schicht von etwa 10% (Zweiphasensystem) in der Biotransformation verbessert wird. Sie dient vor allem als Speicher der Produkte sowie als Reservoir für das Substrat.^{99,169,311,429} Sowohl DMSO als Lösungsmittel als auch Dodecan als zweite Schicht hatten keinen positiven Effekt auf die Produktbildung oder reduzierten die Aktivität sogar, da vermutlich die Biokatalysatorstabilität oder Substratverfügbarkeit vermindert wurde. Mittels 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin als Lösungsmittelvermittler wurde schließlich eine ausreichende Produktbildung im präparativen Maßstab erzielt. Cyclodextrine fixieren die hydrophoben flüchtigen Substrate durch Komplexbildung, sodass die Substrate sowie Produkte in Lösung gehalten werden und die Toxizität hoher Konzentrationen auf die Zelle reduziert wird.^{113,121,286} Darüber hinaus bewirken sie eine teilweise Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch der Substrattransport über die Membran verbessert werden kann.^{114,430} Die Cyclodextrine wurden vor allem in Steroidbiotransformationen, aber kürzlich auch bei Sesquiterpenen erfolgreich eingesetzt.^{125,285} Ein weiterer positiver Nebeneffekt der Komplexbildung von Verbindungen stellte sich bei der Analyse der *in vivo* Biotransformationen heraus. Die *in vitro* detektierten Weiteroxidationen zur Ketogruppe bzw. die zweiten Hydroxylierungen wurden mittels des eingesetzten Cyclodextrin *in vivo* deutlich reduziert. Letztlich wurden präparative Biotransformationen mit den beiden Sesquiterpenen Premnaspriodien (**5**) und Longifolen (**6**) unter Verwendung von Cyclodextrin durchgeführt, um die durch CYP109Q5 Variante V80A/A280I oxyfunktionalisierten Produkte zu identifizieren.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Biotransformationen wurden *in vivo* mit Longifolen (**6**) nur noch vier Produkte detektiert und aufgereinigt (Anhang 7.4.10, Abbildung S15). Die Produkte (6% P1, 43% P2, 18% P3 und 33% P4) konnten durch Kieselgelaufreinigungen nicht getrennt werden, was auf ähnliche Polaritäten hindeutete. Im NMR-Spektrum konnten schließlich drei Aldehyde klar anhand der Aldehydprotonen bei 9.5 – 10.0 ppm identifiziert werden, wobei das Longifolenaldehyd (**134**) mit 60% als Hauptprodukt festgestellt wurde. Interessanterweise reduzierte sich nach der Aufreinigung und der NMR-Spektroskopie der Anteil an P2 in GC-FID-Messungen bei gleichzeitiger Zunahme des Longifolenaldehyds (**134**) P4 (Anhang 7.4.10, Abbildung S15). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei P2 entweder um Longifolol (**137**) handelt, das in Abhängigkeit von der Zeit zum Longifolenaldehyd (**134**) autooxidiert oder aber um ein Longifolenepoxid (**138**), das sich durch Epoxidringöffnung zum stabileren Aldehyd (**134**) umwandelt.^{431,432} Die Produkte P1 und P3 entsprechen demnach den zwei weiteren im NMR-Spektrum detektierten Aldehyden, deren GC-FID-Verhältnisse zu P4 auch mit denen des NMR-Spektrums übereinstimmen (Anhang 7.8). P1

wird dabei auch in der Substratlösung und der Negativkontrolle in gleichem Maße detektiert wie in der Biotransformation, weshalb von keiner enzymatisch katalysierten Bildung von P1 durch CYP109Q5 ausgegangen werden kann. Die Produkte P2, P3 und P4 konnten schließlich auch *in vitro* durch den CYP109Q5-Wildtyp sowie die Varianten I283L und V80A/A280L gebildet werden, wobei P2 als Hauptprodukt detektiert wurde (Abbildung 56). Mit einer im Vergleich zum Wildtyp fünfmal gesteigerten Aktivität wurden mit der Variante V80A/A280I viele weitere unbekannte Produkte festgestellt, die sich durch den Einsatz von Cyclodextrin *in vivo* reduzieren ließen.

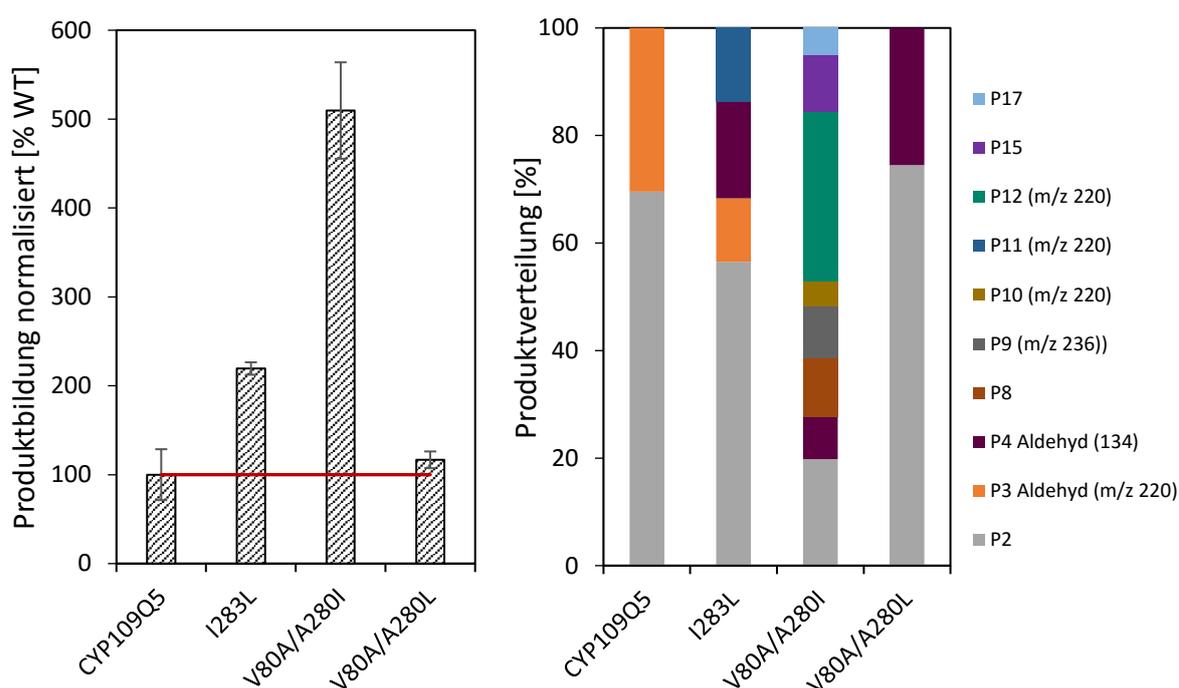


Abbildung 56: *In vitro* Biotransformationen ausgewählter CYP109Q5 Varianten mit Longifolen (**6**) für 2 h. Die Produktbildung und -verteilung ist für den Wildtypen und die Varianten angegeben.

In den *in vivo* Biotransformationen mit Premnaspirodien (**5**) konnten insgesamt drei der vier Produkte durch NMR-Spektren identifiziert werden. Die Produkte P1 und P2 ließen sich aufgrund gleicher Polarität nicht über Kieselgele trennen. Das NMR-Spektrum bestätigte, dass es sich hierbei um zwei Enantiomere von Premnaspirodien-11,12-epoxid (**110** und **111**) handeln muss. P3 entsprach dagegen allylisch hydroxylierten Solavetivol (**112**), das bisher nur von dem pflanzlichen Enzym CYP71D55 aus *Hyoscyamus muticus* produziert werden konnte.¹⁷⁵ Das letzte Produkt P4 konnte nicht durch NMR-Messung identifiziert werden, besaß jedoch in der GC-MS die Masse 236 m/z, was mit einem zweifach hydroxylierten Produkt übereinstimmen würde. Die zahlreichen weiteren Produkte in den *in vitro* Biotransformationen ließen sich durch Cyclodextrin mit der Variante V80A/A280I *in vivo* zu 36% der Premnaspirodien-11,12-epoxide (**110** und **111**), zu 47% Solavetivol (**112**) und zu 17% P4 reduzieren (Abbildung 42). An den mittels GC-MS ermittelten Massen der *in vitro*

Reaktionen lassen sich die Weiteroxidationen anschaulich verfolgen. Neben den Epoxiden (**110** und **111**) und Solavetivol (**112**) wurde P8 detektiert, dessen Molmasse mit der des Ketons von Solavetivol übereinstimmen würde (Abbildung 57). Die Oxidation zum Solavetivon (**139**) wird dabei vermutlich durch das P450 selbst katalysiert.¹⁷⁵ Bei P11 in den *in vitro* Biotransformationen handelt es sich um das zweifach hydroxylierte P4 *in vivo* (236 m/z). Mit den Varianten V80A/A280I und A280I wird eine Hydroxygruppe, vermutlich ähnlich zur Bildung von Solavetivon (**139**), zur Ketogruppe oxidiert oder Solavetivon (**139**) selbst wird nochmals hydroxyliert (P13, 234 m/z).

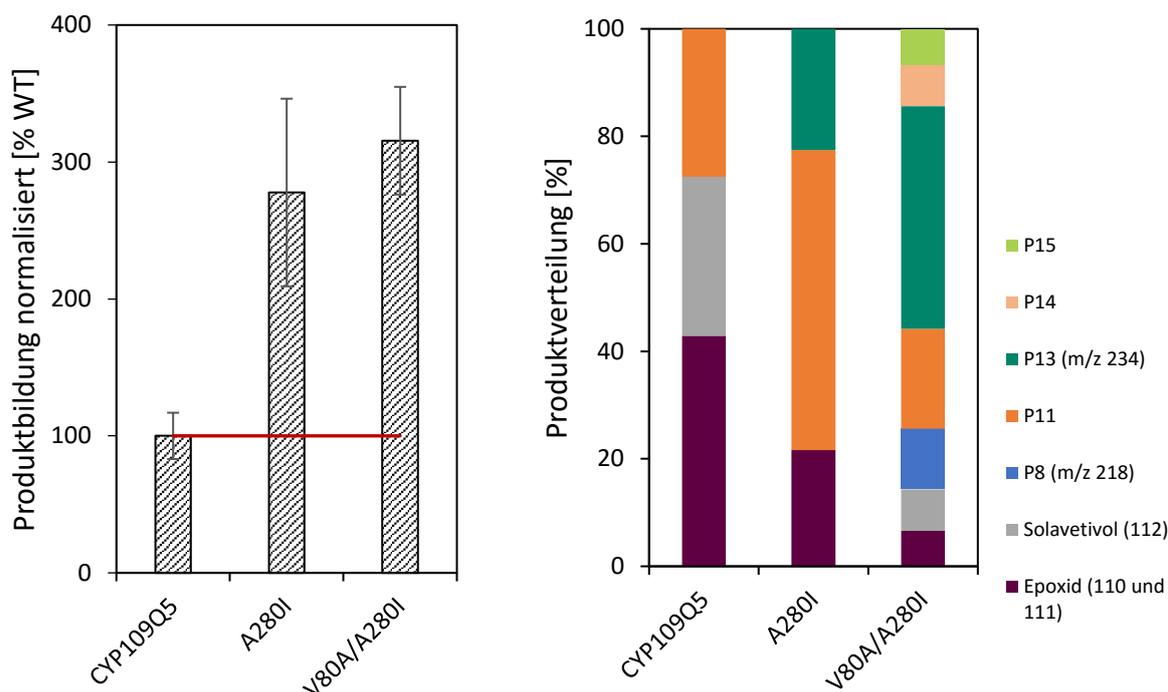


Abbildung 57: *In vitro* Biotransformationen ausgewählter CYP109Q5 Varianten mit Premnaspirodien (**5**) für 2 h. Die Produktbildung und -verteilung ist für den Wildtypen und die Varianten angegeben.

Im Fall des Substrats Premnaspirodien (**5**) wurde also vermutlich mit den CYP109Q5 Varianten anstatt der Bildung neuer Produkte vielmehr die Produktverteilung zwischen Epoxidierung und Hydroxylierung maßgeblich beeinflusst. Hierbei wurde gleichzeitig die Weiteroxidationen durch die gesteigerte Aktivität begünstigt. Im Homologiemodell von CYP109Q5 wird der starke Einfluss der Positionen V80 und A280 deutlich (Abbildung 58).

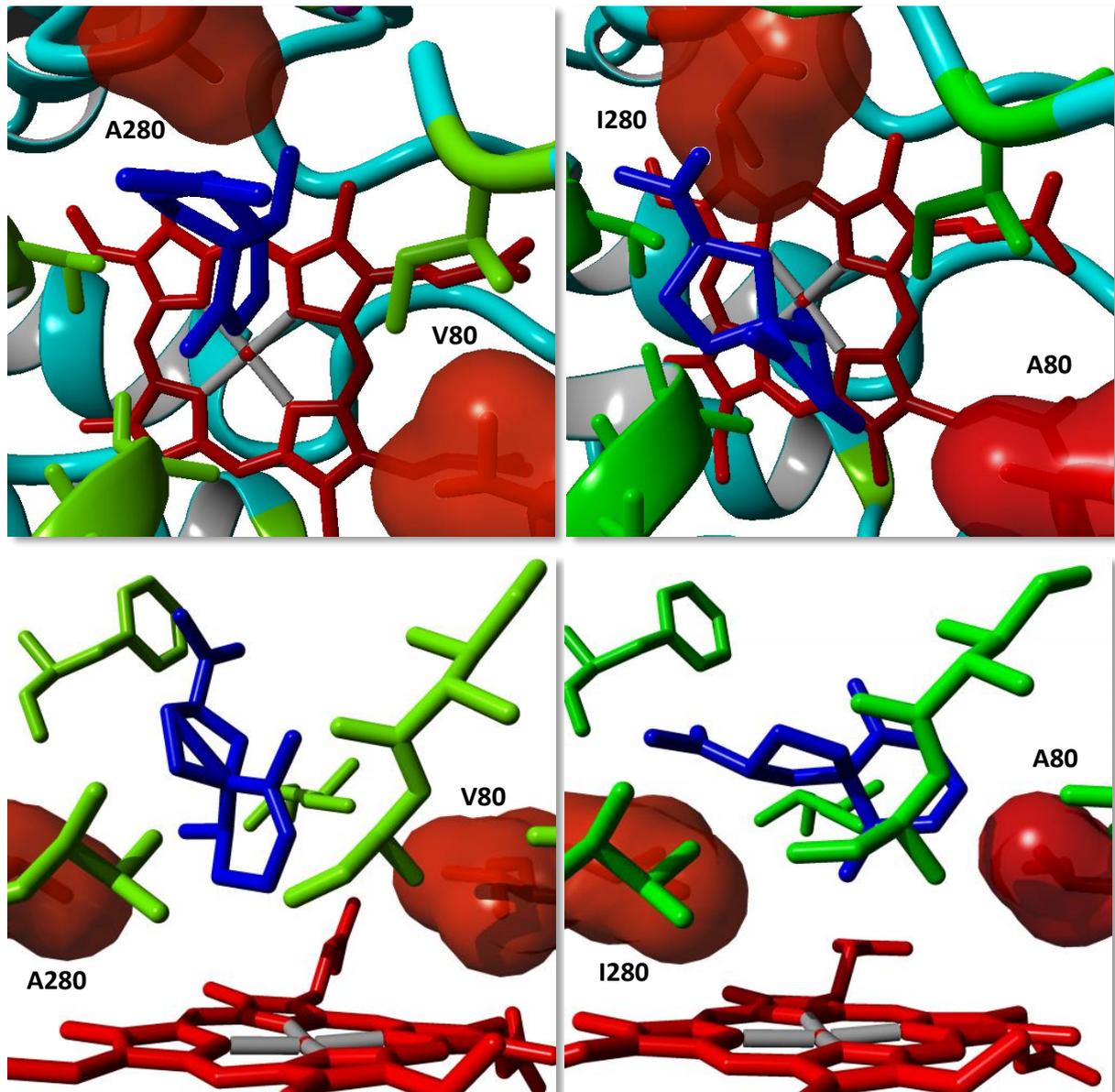


Abbildung 58: Vergleich des Substrateingangskanals und des aktiven Zentrums des CYP109Q5-Wildtyps und der Variante V80A/A280I. Das Substrat Premnaspriodien (**5**, Blau) wurde in das CYP109Q5 Homologiemodell (Templat: 2BJV) über AutoDock Vina in die aktive Tasche gebunden. Links, oben und unten: CYP109Q5-Wildtyp; Rechts, oben und unten: CYP109Q5 Variante V80A/A280I. Die *in silico* Mutagenese wurde mittels YASARA durchgeführt und die Struktur anschließend Energie-minimiert.

Beide Positionen sind entscheidend für die Positionierung des Substrats Premnaspriodien (**5**) über dem katalytischen Häm-Eisen, ähnlich einer Zange. Durch die Mutagenese zu hydrophoben Aminosäuren variierender Größe kann die Positionierung enorm moduliert werden. Der Austausch zu einer größeren Aminosäure an der einen Seite (A280I) bei gleichzeitiger Reduktion der Aminosäureseitenkette an der gegenüberliegenden Position (V80A) verschiebt das Substrat vermutlich an eine Position direkt über dem aktiven Häm-Eisen (Abbildung 58, Vgl. links und rechts). Eine passendere Positionierung des Substrats in der sehr großen aktiven Tasche bei gleichzeitiger Beeinflussung der Freiheitsgrade der

Bindung kann schließlich ausschlaggebend für die erhaltenen Aktivitätssteigerungen und Selektivitätsverschiebungen der Doppelvariante V80A/A280I sein.

Aufgrund der Größe der aktiven Tasche und der guten Aktivitäten auch mit Steroiden kann von einem natürlichen Substrat mit großem Platzanspruch ausgegangen werden. Eine Verengung respektive Verschiebung der Konformation am Ende des Substratkanals, in der Nähe des Häms, könnte demnach den positiven Effekt der V80A/A280I Variante gegenüber einer großen Bandbreite von getesteten Molekülen erklären. Die Passage durch den sehr weiten Substratkanal sowie die aktive Tasche selbst stellt hierbei scheinbar kein Hindernis für die großen und sperrigen Verbindungen dar. Die aktive Tasche kann jedoch an die jeweiligen Substrate angepasst und die Reaktivität des P450s hierbei mittels Mutagenese gesteuert werden. Die Theorie der Ausrichtung der Substrate in eine funktionalere Konformation über dem Häm-Eisen wird durch die in der Regel höheren Aktivitäten der Einzelvariante A280I bekräftigt. Der entscheidende Faktor, der letztlich die Oxyfunktionalisierung der Terpene ermöglicht, stellt aber vermutlich die Aminosäure an Position V80 dar. Die äquivalente Position in P450 BM3 (F87) wurde bereits als eine Art „Gatekeeper“⁴³³ bezeichnet und ermöglicht die Oxidation sperriger Substrate durch den Austausch mit kleineren hydrophoben Aminosäuren.^{73,82,322,434–436} In CYP109Q5 existiert an dieser Stelle mit Valin bereits eine relativ kleine Aminosäure. Wird diese durch größere hydrophobe Aminosäuren wie Leucin oder Isoleucin ausgetauscht, kann ein negativer Einfluss mit verminderter Aktivität gegenüber den Zielterpenen **1** – **7** festgestellt werden (Tabelle 16). Hierdurch können wahrscheinlich nur noch sehr kleine Substrate an das aktive Häm-Eisen binden. Die Kenntnisse aus den Effekten der unterschiedlichen Mutationen können zukünftig genutzt werden, um CYP109Q5 hinsichtlich der Aktivität, Spezifität und Selektivität der Oxyfunktionalisierung gezielt zu modulieren.

Mit dem in dieser Arbeit neu charakterisierten CYP109Q5 aus *C. apiculatus* DSM436 konnte eine große Bandbreite an unterschiedlichen zyklischen und azyklischen Terpenen oxyfunktionalisiert werden. Die *in vitro* Aktivität des Wildtyps in Abhängigkeit von den Substraten ist in Abbildung 59 dargestellt. Während mit den Norisoprenoiden **1** und **2** die höchsten Umsätze erzielt wurden, nahm die Aktivität über Sesquiterpenoide zu Sesquiterpenen und schließlich zu zyklischen und azyklischen Monoterpenen hin ab. Interessanterweise konnte durch Mutagenese z.B. die Valencen (**7**)-Oxidation mit der Variante V80A/A280I um das etwa zehnfache gesteigert werden. Damit lag die Aktivität über der des CYP109B1 aus *B. subtilis*, das vergleichbare Produktselektivitäten *in vitro* zeigte (Abbildung 40). Mit dem Ziel der Synthese des wertvollen Naturstoffs Nootkaton (**75**) wurde CYP109B1 bereits verwendet und der Prozess über mehrere Jahre hinweg verbessert, sodass bis zu 120 mg L⁻¹ der Produkte *in vivo* generiert wurden.^{118,437} Dies zeigt das Potenzial vor allem der CYP109Q5 Varianten für die industrielle Biokatalyse. Die Oxidation der Nootkatol (**74**)-Hauptprodukte zu Nootkaton (**75**) könnte des Weiteren durch Alkohol-

Dehydrogenasen durchgeführt und die Weiteroxidation von Nootkaton (**75**) durch den Einsatz von Cyclodextrin vermindert werden. In der Tat fanden diese Maßnahmen in einer *in vitro* Enzymkaskade mit einer P450 BM3 Variante Anwendung, um die Produktverteilung hin zu Nootkaton (**75**) zu beeinflussen.⁴³⁸

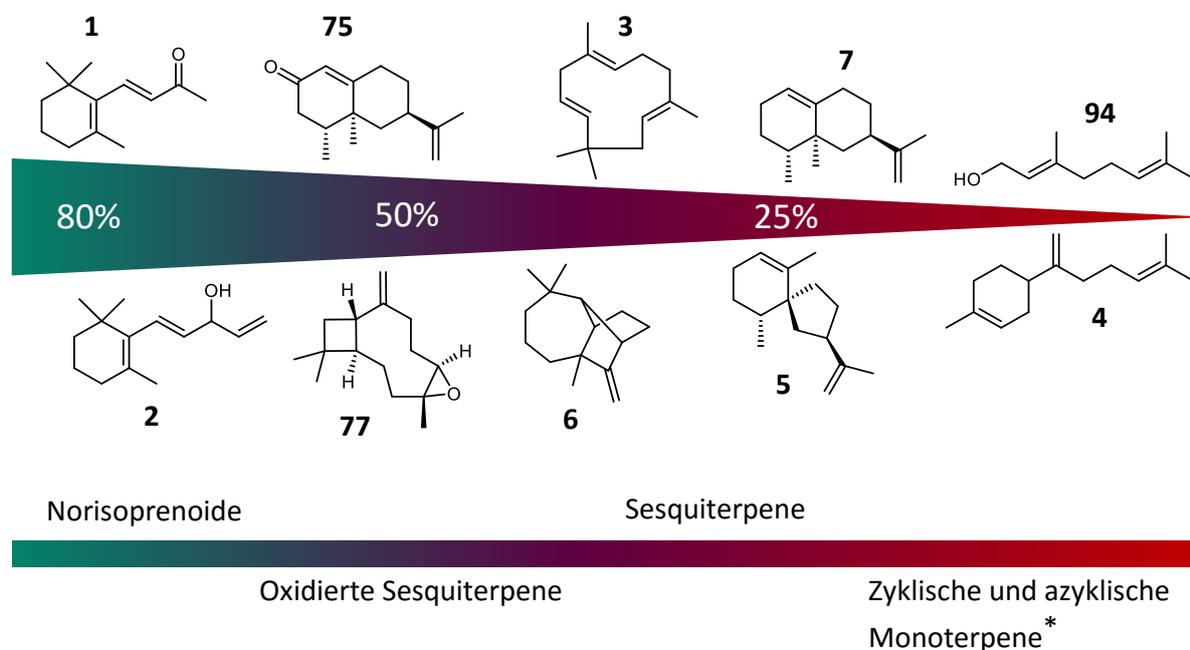


Abbildung 59: Tendenz der Aktivitäten mit CYP109Q5. *mit Ausnahme von Geranylaceton (**88**), das effektiv oxyfunktionalisiert wurde.

Mit Hilfe einer detaillierten Sesquiterpen GC-MS-Datenbank eines Kooperationspartners wurden erste Hinweise auf mögliche Produkte der *in vitro* Biotransformationen mit den CYP109Q5 Varianten erhalten. Die GC-MS Messung der Proben erfolgte hierbei basierend auf den in dieser Arbeit angewendeten GC-Methoden und wurden vom Kooperationspartner durchgeführt. Eine Zusammenfassung der über NMR-Spektroskopie und GC-MS identifizierten Produkte ist in Abbildung 60 aufgeführt. In Biotransformationen mit α -Humulen (**3**) wurden hierbei hohe Übereinstimmungen in der GC-MS-Datenbank mit unterschiedlichen Epoxiden, einem Diepoxid (**107**) sowie 1-Hydroxy- α -humulen (**106**) erzielt. Neben dem bereits durch NMR identifizierten Longifolenaldehyd (**134**) wurde das Longifolenepoxid (**138**) als mögliche Vorstufe des Aldehyds detektiert. Bei diesem Aldehyd (**136**) handelt es sich möglicherweise um eines der beiden Aldehyde P1 oder P3 im NMR-Spektrum. In den *in vitro* Biotransformationen mit Valencen (**7**) wurden neben den bereits bekannten Produkten ebenfalls ein Epoxid (**76**) mit hoher Übereinstimmung zur Datenbank gefunden. Das Substrat β -Bisabolen (**4**) wurde möglicherweise zu Bisabolen-2,3-epoxid (**103**) sowie (*Z*)-Lanceol (**104**) umgesetzt. Der Abgleich mit der GC-MS-Datenbank ergab mit Aromadendren (**79**) ebenfalls ein Epoxid (**115**) und 7-Hydroxyaromadendren (**114**) als potenzielle Produkte. Das effiziente CYP109Q5

4.3 Strategien für die P450-katalysierte Terpenoxyfunktionalisierung

Ganzzellsystem mit CamA und CamB als Redoxpartner kann letztendlich zur Identifikation respektive Bestätigung der weiteren Produkte aus dem sehr breiten Substratspektrum dienen. Die Produktion der zum Teil chemisch schwer zugänglichen Produkte wurde durch CYP109Q5 sowie dessen Varianten erzielt. Gleichzeitig kann die Analyse der Verbindungseigenschaften letzten Endes Aufschluss über den Wert bzw. Nutzen der teilweise neuartigen Produkte für die industrielle Biotechnologie geben. Ein breites Spektrum an oxyfunktionalisierten Terpenoiden wurde generiert, das jedoch weiter erforscht werden muss. In zukünftigen Arbeiten wird durch Kenntnisse über die gebildeten Produkte ein jeweils spezifisches *Enzyme Engineering* ermöglicht. Aus dem CYP109Q5 Generalisten lassen sich infolgedessen dem Substrat oder Produkt maßgeschneiderte Spezialisten entwerfen.

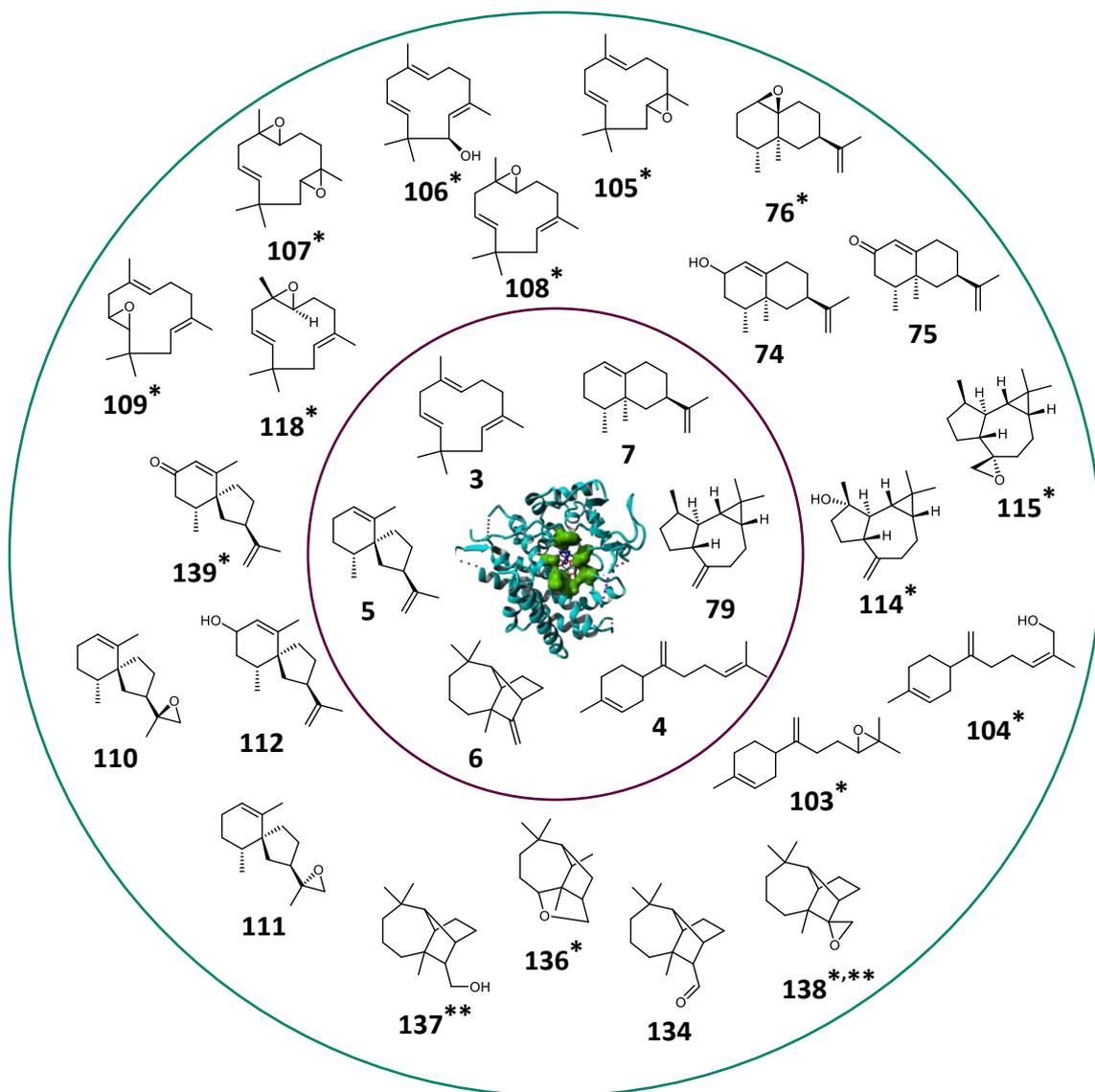


Abbildung 60: Zusammenfassung der über NMR-Spektroskopie und GC-MS identifizierten Produkte aus *in vitro* und *in vivo* Sesquiterpenbiotransformationen mit CYP109Q5 Varianten. *Hohe Übereinstimmung mit einer GC-MS Datenbank (Kooperationspartner); **Vermutung.

4.4 Neue Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung

Am Abbau von Diclofenac (**8**) im menschlichen Körper sind unterschiedliche P450s beteiligt, welche die Verbindung durch das Einfügen einer Hydroxygruppe hydrophiler und damit für weitere Enzyme besser zugänglich machen.^{44,439,440} Die verantwortlichen humanen P450s und die nach Exposition mit Diclofenac (**8**) gebildeten unterschiedlich hydroxylierten Metabolite sind seit längerer Zeit bekannt.^{348,357} Neben dem Hauptmetaboliten 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) lassen sich im menschlichen Urin 5-Hydroxydiclofenac (**9**), 3'-Hydroxydiclofenac (**140**) und 4',5-Dihydroxydiclofenac (**141**) nachweisen.¹⁸² Chemische Synthesen können diesbezüglich nur unzureichende Mengen der Metabolite bereitstellen und sind aufwendig sowie wenig effizient und nicht ökologisch.^{157-159,336,441} Durch die Notwendigkeit, die Medikamentenmetabolite für toxikologische oder ökologische Studien in ausreichender Menge herzustellen, wurden inzwischen zahlreiche Versuche unternommen, biotechnologische Prozesse als effektive, umweltfreundliche sowie kostengünstige Alternative zur Synthese der Metaboliten zu entwickeln (Tabelle 18). Ähnlich der Verteilung der Produkte im Menschen wurde hierbei vor allem der Metabolit 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) in Biotransformationen mit P450s und Mikroorganismen produziert. Auch in dieser Arbeit wurde bevorzugt die 4'-Position adressiert (Abbildung 61). Neben der Identifikation teilweise sehr selektiver Biokatalysatoren wurde mit 3',4'-Dihydroxydiclofenac (**12**) ein völlig unbekannter Metabolit hergestellt.

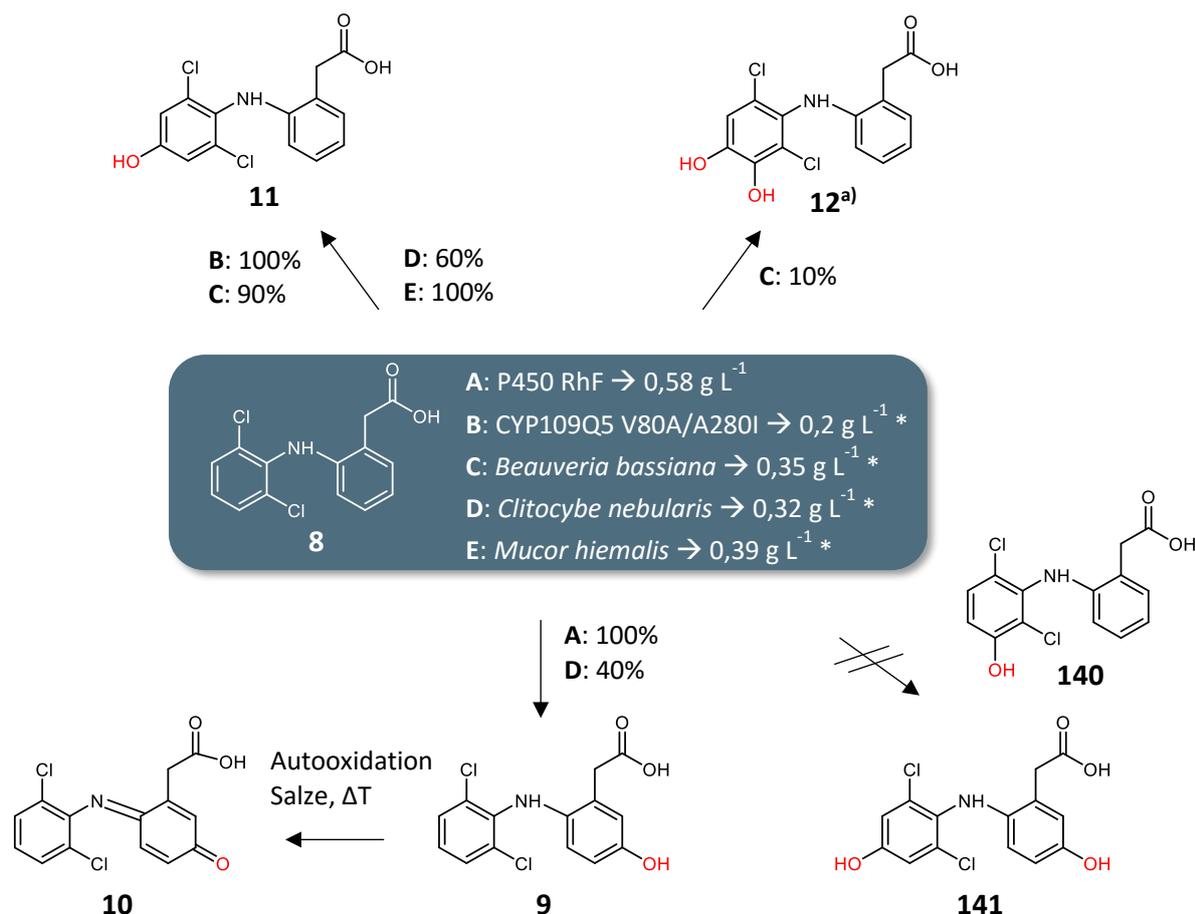


Abbildung 61: Überblick über die in dieser Arbeit identifizierten P450s und Mikroorganismen für die Oxyfunktionalisierung des NSAIDs Diclofenac (**8**). Die Produktverteilungen sind jeweils in Prozent zusammen mit den erzielten Ausbeuten angegeben. Die humanen Metabolite 3'-Hydroxydiclofenac (**140**) und 4',5-Dihydroxydiclofenac (**141**) wurden in dieser Arbeit nicht detektiert. * Isolierte Ausbeute in Produkttitern umgerechnet.

Auf der Suche nach Mikroorganismen mit einer Aktivität gegenüber Diclofenac (**8**) oder der Fähigkeit, dieses zu verstoffwechseln, werden in der Regel filamentöse Pilze identifiziert, die mit sehr geringen Aktivitäten überwiegend 4'-Hydroxydiclofenac (**11**) bilden.^{184,188,442,443} In den Arbeiten mit den Pilzen *Epicoccum nigrum* und *Cunninghamella elegans* wurden präparative Biotransformationen mit Produkttitern von 16 respektive 57 mg L⁻¹ erzielt.^{442,444} Mittels der in dieser Arbeit identifizierten filamentösen Pilze konnten letztendlich deutlich höhere Werte erhalten werden (Tabelle 18). Oftmals werden schwierige Kultivierungsbedingungen und hohe Nebenproduktbildungen als Argumente gegen den Einsatz von Mikroorganismen aufgeführt.¹⁹⁰ Demgegenüber ließen sich die drei filamentösen Pilze einfach sowie äußerst kostengünstig kultivieren und produzierten die Metaboliten ohne störende Nebenprodukte in hohen Produkttitern. Diese lagen zum Teil weit über den bisher bekannten pilzlichen Systemen oder auch P450-basierten Prozessen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Zusammenfassung der biotechnologischen Prozesse zur Herstellung von Diclofenacmetaboliten. * Isolierte Ausbeute in Produkttiter umgerechnet.

Biokatalysator	Modus	Produkt(e)	Prozessdauer ^{a)} / Maßstab	Produkttiter	Referenz
<i>E. nigrum</i>	-	> 90% 11	2 T / 20 L (Bioreaktor)	16 mg L ⁻¹ *	442
CYP267B1 in <i>E. coli</i>	(<i>In vivo</i>) Wachsende Zellen	11	3 T / Schüttelkolben	24 mg L ⁻¹	190
CYP105D7 in <i>E. coli</i>	(<i>In vivo</i>) Ruhende Zellen	11	1,5 T / 0,5 mL	44 mg L ⁻¹	183
<i>C. elegans</i>	Immobilisierte Zellen	11	18 T / Schüttelkolben	57 mg L ⁻¹ *	444
CYP2C9 in <i>E. coli</i>	(<i>In vivo</i>) Ruhende Zellen	11	5 T / 1 L (Bioreaktor)	110 mg L ⁻¹ *	180
CYP505X F90V	(<i>in vitro</i>) Lyophylisat	11	2 T / 300 mL (Minireaktor)	135 mg L ⁻¹ *	445
CYP109Q5 V80A/A280I	(<i>In vivo</i>) Ruhende Zellen	11	2 T / Schüttelkolben	200 mg L ⁻¹	Diese Arbeit
<i>B. bassiana</i> <i>C. nebularis</i> <i>M. hiemalis</i>	-	9, 11, 12	7 T / Schüttelkolben	320 – 390 mg L ⁻¹ *	Diese Arbeit
CYP2C9 in <i>S. pombe</i>	(<i>In vivo</i>) Ruhende Zellen	11	6 T / Schüttelkolben	468 mg L ⁻¹ *	160
P450 BM3 Varianten	(<i>In vitro</i>) Aufgereinigtes P450	9, 11	-	512 mg L ⁻¹ *	231
P450 RhF	(<i>In vivo</i>) Ruhende Zellen	9	2 T / 800 mL (Bioreaktor)	357 (max.) 580) mg L ⁻¹	Diese Arbeit ⁶⁷
<i>Actinoplanes</i> sp.	-	9, 11, 141	5 T / Schüttelkolben	848 mg L ⁻¹ *	212

a) Die Prozessdauer umfasst die Zellaufzucht der Hauptkultur, die Expression (bei rekombinant hergestellten P450s) und die anschließende Biotransformation in Tagen (T).

* Der Produkttiter wurde aus einer isolierten Ausbeute kalkuliert.

Die Verwendung dieser Mikroorganismen als effektive, kostengünstige Plattform zur Synthese von Medikamentenmetaboliten wurde schließlich durch die in Biotransformationen mit Naproxen (**13**), Ibuprofen (**15**) und Mefenaminsäure (**19**) bislang höchsten erzielten Produkttiter belegt. Auch die in dieser Arbeit etablierten P450 Ganzzellbiokatalysatoren CYP109Q5 und P450 RhF wiesen ein hohes Potenzial in der Oxyfunktionalisierung von Diclofenac (**8**) auf. Beide übertrafen dabei einige P450-basierte Prozesse hinsichtlich der Produkttiter, während im Falle von P450 RhF bereits der erfolgreiche Transfer in den Bioreaktormaßstab erfolgte. Die selektive Oxyfunktionalisierung mit P450 RhF ergab

vergleichbare Titer zu dem humanen CYP2C9, heterolog exprimiert in *Schizosaccharomyces pombe* sowie einer *in vitro* eingesetzten P450 BM3 Variante (Tabelle 18). Die bisher höchsten Produkttiter wurden mit dem Bakterium *Actinoplanes* sp. erzielt, jedoch im Gegensatz zu P450 RhF mit deutlich geringerer Selektivität.

Bei der Oxyfunktionalisierung der Terpene ging es in erster Linie nicht darum, bestimmte Produkte in hohen Ausbeuten zu generieren. Vielmehr sollten zunächst neuartige Biokatalysatoren identifiziert werden, die ein breites Spektrum an Terpenen akzeptieren und zu einer möglichst großen Vielfalt oxidieren können. Neue bzw. schwer zugängliche Produkte sollten dadurch generiert werden, um diese für weitere Untersuchungen verfügbar zu machen. In der Natur existieren vielfältige Lösungen für die meisten Probleme der heutigen Zeit, die mittels der großen heterogenen P450-Superfamilie allerdings obgleich der jahrzehntelangen Forschung noch unzureichend gefunden wurden. Neben promiskuitiven Aktivitäten wurden gänzlich neue Biokatalysatoren durch Homologievergleiche oder klassische Beobachtungen natürlicher mikrobieller Stoffwechselwege untersucht. Gleichzeitig stellte die Molekularbiologie ein Werkzeug zur gezielten Anpassung der Biokatalysatoren dar.

Durch die unterschiedlichen Herangehensweisen zur Identifikation neuer Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen konnte schließlich das Spektrum an bekannten Enzymen respektive Organismen deutlich erweitert werden (Tabelle 19 + 20). In Bezug auf die Norisoprenoidhydroxylierung wurden in der Literatur viele Versuche durchgeführt, um die nicht-allylischen Positionen im Iononring von β -Ionon (**1**) zu hydroxylieren. Diese Funktionalisierung würde eine Möglichkeit darstellen, neue effiziente biosynthetische Routen zur Produktion von Carotinoiden wie Astaxanthin oder Zeaxanthin zu entwickeln.^{163,446-449} Jedoch wurde bislang nahezu ausschließlich die allylische Funktionalisierung in der C4-Position detektiert, was auch mit einigen in dieser Arbeit charakterisierten P450s festgestellt werden konnte (Tabelle 19). Interessanterweise zeigten nur wenige Studien die Funktionalisierung der nicht-allylischen Positionen, die, wie bereits im vorherigen Kapitel dargelegt, schwer zu adressieren sind. Neben den P450s 101B1 und 101C1 aus *N. aromaticivorans*, die eine Mischung aus 4-Hydroxy- β -ionon (**71**) und 3-Hydroxy- β -ionon (**72**) bilden, wurde das CYP264B1 aus *S. cellulosum* mit einer hohen Regioselektivität für die C3-Position identifiziert.^{172,260} Die C2-Position konnte bisher nur durch *Aspergillus* Stämme funktionalisiert werden, allerdings häufig mit einer Weiteroxidation zur Ketogruppe.^{168,450}

Tabelle 19: Biokatalysatoren mit Aktivität gegenüber den Norisoprenoiden **1** und **2**. n.b.: nicht bestimmt.

Substrat	Biokatalysator	Produkt(e)	Referenz
β -Ionon (1)	P450 BM3 Varianten, CYP102A7, CYP109B1, CYP109D1, CYP267B1, 15 von 215 Streptomyceten	71	81,227,287,311,323,324,451,452
	ITB1693, ITB1696, CYP1232A24	71	Diese Arbeit
	P450 Soy C, SU1, SU2	71 & n.b.	171
	CYP260B1	71 & Epoxide	324
	<i>Aspergillus niger</i> Stämme	71, 73 & Weiteroxidation	167–169,450
	CYP125E3	71, 73	Diese Arbeit
	CYP101B1, CYP101C1	71, 72	65,260,364,453
	CYP264B1	72	172
	CYP109Q5	71, 72, 73	Diese Arbeit
Vinyllionol (2)	CYP109B1, CYP109Q5, CYP125E3	n.b.	Diese Arbeit

Mit den in dieser Arbeit identifizierten CYP125E3 und CYP76C2 wurden neben dem allylischen Hauptprodukt 2-Hydroxy- β -ionon (**73**) als Nebenprodukt gebildet (Abgleich durch die Biotransformation mit CYP109Q5). Durch CYP109Q5 aus *C. apiculatus* wurde des Weiteren erstmalig die Funktionalisierung aller drei Positionen erzielt, deren Produktverteilung sich durch Mutagenese verschieben ließ. Auch die Oxyfunktionalisierung von Vinyllionol (**2**) wurde durch CYP125E3, CYP109B1 und CYP109Q5 zum ersten Mal ermöglicht. Die *in vivo* erzielten Aktivitäten mit CYP109Q5 A280V/T229L lagen mit 0,5 g L⁻¹ gebildeten Produkten weit über denen vergleichbarer Systeme wie etwa der P450s aus *S. cellulosum*.³²⁴ Im Vergleich zu dem bisher aktivsten, über Jahre hinweg entwickelten β -Ionon (**1**)-Biokatalysator CYP101B1, wurde damit nur eine leicht geringere Ausbeute erzielt.^{65,453}

Von den getesteten Sesquiterpenen stellt Valencen (**7**) das am besten untersuchte Substrat dar. Zahlreiche Studien hatten zum Ziel, den biotechnologischen Zugang zur Produktion des Grapefruitduftstoffs Nootkaton (**75**) zu ermöglichen. Insbesondere heterolog in *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* exprimierte pflanzliche P450s wurden hierbei etabliert, die allerdings bis auf den Prozess unter Verwendung der *H. muticus* Premnaspirodien-Oxygenase (CYP71D55) mit 208 mg L⁻¹ Nootkaton (**75**, *in situ* produziert) nur geringe Ausbeuten aufwiesen.^{112,454–456} Auch Prozesse mit den bakteriellen P450s, P450 BM3 sowie CYP109B1, wurden entwickelt (Tabelle 20). Das zuletzt genannte Enzym produzierte in einem Zweiphasensystem bis zu 120 mg L⁻¹ der Produkte.¹¹⁸ Eine ähnliche Produktbildung kann mit CYP109Q5 Varianten und dem effizienten pBAD33/pBAD18-System *in vivo* erwartet werden, da die *in vitro* Aktivitäten

4.4 Neue Biokatalysatoren für die C-H-Oxyfunktionalisierung

im Bereich des CYP109B1 lagen (Abbildung 40). Im Gegensatz zu Valencen (**7**) existieren in Bezug auf die weiteren Zielterpene nur wenige Beispiele an Biokatalysatoren, was diese Verbindungen besonders interessant macht. Die bisherigen Beispiele zur Produktion von 5- oder 8-Hydroxy- α -humulen wurden durch die in dieser Arbeit identifizierten Biokatalysatoren erweitert (Tabelle 20). Die Oxyfunktionalisierung von β -Bisabolen (**4**) wurde zum ersten Mal durch ein heterolog exprimiertes P450 ermöglicht. Auch für die Hydroxylierung von Premnaspirodien (**5**) und Longifolen (**6**) existierte bisher jeweils nur ein Beispiel in der Literatur.^{175,383} Vor allem die in *in vivo* Biotransformationen mit CYP109Q5 generierten Produkte sind deshalb von besonderem Interesse. Die über die Proteomanalyse identifizierten P450s aus *B. bassiana* werden dieses Spektrum noch erweitern können.

Tabelle 20: Biokatalysatoren mit Aktivität gegenüber den Zielterpenen **3** bis **7**. n.b.: nicht bestimmt.

Substrat	Biokatalysator	Produkt(e)	Referenz
α -Humulen (3)	CYP264B1	5-OH- α -humulen & n.b.	285,325
	CYP71BA1	8-OH- α -humulen	144,178
	<i>C. cochlioides</i>	Divers	457
	ITB1693 F95A/G, CYP109B1 CYP109Q5, <i>B. bassiana</i>	u.a. 108	Diese Arbeit
β -Bisabolen (4)	CYP109Q5, <i>B. bassiana</i>	n.b.	Diese Arbeit
Premnaspirodien (5)	CYP71D55 (HPO), EPA	113, 139	174,175
	CYP109B1, CYP109Q5, <i>B. bassiana</i>	u.a. 110 - 112, 139	Diese Arbeit
Longifolen (6)	<i>Arthrobacter ilicis</i>	u.a. 137	383
	CYP109B1, CYP109Q5, <i>B. bassiana</i>	u.a. 134	Diese Arbeit
Valencen (7)	CYP109B1, P450 BM3 Varianten, Valencen-Dioxygenase, CYP71AV8, CYP71D51, CYP71D55, CYP71BE5, CYP706M1, CYP264B1	u.a. 74, 75	78,112,118,204,229,325,454– 456,458,459
	u.a. <i>Mucor</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>P. sapidus</i>	u.a. 74, 75	173,460–462
	ITB1693, CYP109Q5	u.a. 74, 75	Diese Arbeit

Ein entscheidendes Kriterium, das den Einsatz von P450s in der industriellen Biokatalyse bisher limitierte, stellt die katalytische Effizienz dar. Aus den *in vitro* Experimenten ließ sich mit den elektronenliefernden Redoxpartnern der maßgeblicher Faktor zur Determinierung der P450-Aktivität identifizieren. Die Übertragung der Elektronen vom Ferredoxin oder Flavodoxin auf das Häm-Eisen ist hierbei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.^{275,307}

Gleichzeitig handelt es sich bei diesen Proteinen in der Regel um die instabilste Komponente im Multikomponentensystem, weshalb diese für eine hohe katalytische Aktivität im Überschuss zugegeben werden müssen.^{106,463} Vor allem *in vivo* stellt dies eine erhebliche Anforderung an ein Ganzzellsystem dar. In der Literatur wurden deshalb chimäre Fusionen erforscht, die sich der sehr hohen Aktivitäten der natürlichen Fusionsproteine zum Vorbild nahmen.^{103,117,464,465} Auch in dieser Arbeit wurde die Möglichkeit einer Fusion mit BMR und PFOR untersucht, allerdings wurde mit Ausnahme einer geringen Aktivität mit PFOR und CYP199A25 kein funktionaler Elektronentransfer beobachtet. Die Arbeiten an CYP1232F1 und CYP1232A24 zeigten, dass homologe Redoxpartner essenziell zur Rekonstitution der Aktivität sein können bzw. höhere Aktivitäten aufweisen, was die Bedeutung der Suche nach den natürlichen Elektronentransferpartnern erkennen lässt. Dennoch stellten sich hier insbesondere CamA und CamB aus *P. putida* als universell einsetzbares heterologes elektronenlieferndes System heraus. Eine mögliche Steigerung der Effizienz des Elektronentransfers zu den P450s konnte schließlich anhand eines Panels aus unterschiedlichen heterologen Redoxpartnern untersucht und mit FdX-05 ein interessanter Kandidat für weitere Arbeiten identifiziert werden (Anhang 7.4.6, Tabelle S4). Die Untersuchung funktionaler Redoxpartner ist neben der Charakterisierung der P450s deshalb entscheidend für die katalytische Effizienz.

Zusammenfassend konnte durch die unterschiedlichen Methoden eine Vielzahl an neuen Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung der Zielterpene **1 – 7** identifiziert werden (Abbildung 62). Insbesondere die bakteriellen P450s wiesen ein hohes Potenzial für den Einsatz in der industriellen Biokatalyse auf. Auf den Ergebnissen dieser Dissertation kann schließlich aufgebaut, eine Verbesserung der Biokatalysatoren angestrebt und die Implementierung in industriellen Ganzzellprozessen vorangetrieben werden. Basierend auf der entwickelten Plattform an neuartigen P450s und Redoxpartnern, können die Kenntnisse aus dieser Arbeit in künftiger Forschung genutzt und ausgebaut werden. Vor allem das durch Sequenzierungsprojekte zunehmende Enzymrepertoire wird die Anzahl potenzieller Terpenbiokatalysatoren weiter erhöhen. Ähnlich des Weges zur Identifikation von CYP109Q5 wird aufbauend auf dieser Arbeit die Metagenomanalyse zur Suche nach homologen Proteinen sowie die immer günstigere Gensynthese zu einem rapiden Wachstum neuer mikrobieller P450-Biokatalysatoren führen. Dies wird die Vielfalt an potenziellen Terpenoiden für die industrielle Biotechnologie erweitern. Als Triebfeder fungiert letztlich der für die Generierung natürlicher Produkte in der Pharma-, Duft- und Aromastoffindustrie wachsende Bedarf an neuartigen mikrobiellen Syntheserouten.

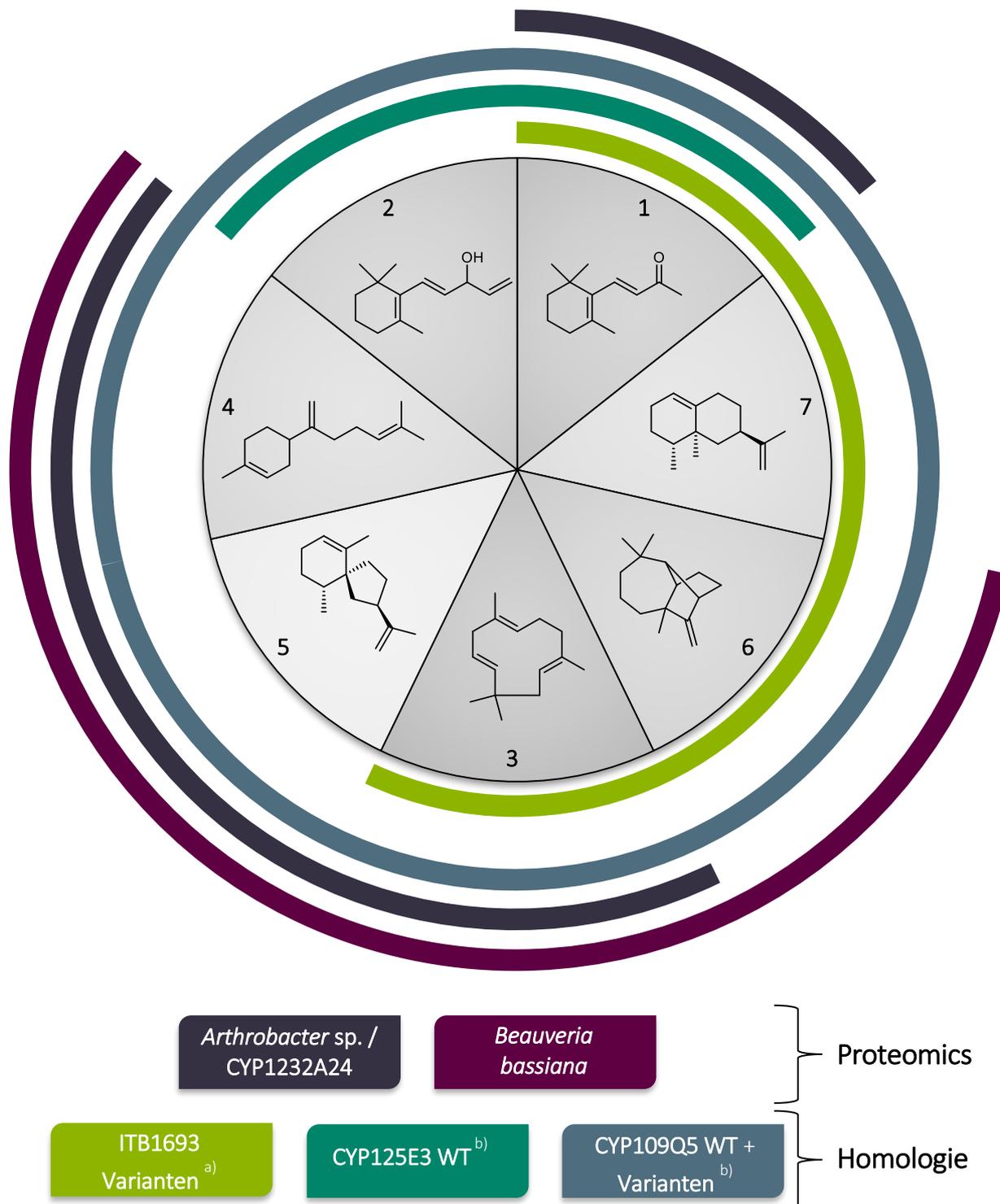


Abbildung 62: Übersicht der in dieser Arbeit identifizierten Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung der Zielterpene 1 – 7. Das Wachstum von *Arthrobacter* sp. auf den Substraten 3, 4 und 5 stellt ein Indiz für beteiligte Oxygenasen dar, die bislang jedoch nicht identifiziert werden konnten. a) aus *Ralstonia metallidurans*; b) aus *Chondromyces apiculatus*.

5. Ausblick

Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen ein enormes biokatalytisches Potenzial, das neben der einzigartigen katalytischen Reaktivität und hohen Evolvierbarkeit vor allem durch eine enorme natürliche Diversität geprägt wird. So wird die Oxyfunktionalisierung von Terpenen und Terpenoiden in der Natur hauptsächlich durch pflanzliche P450s gewährleistet. Für den Einsatz in bakteriellen Produktionsstämmen wie *E. coli* werden allerdings besonders bakterielle P450s benötigt, da, wie auch in dieser Arbeit festgestellt, eukaryotische Enzyme nur schwer in Prokaryoten löslich und funktional zu exprimieren sind und oftmals geringere Aktivitäten aufweisen. Neue Sequenzierungsprojekte von Organismen mit besonderem Sekundärstoffwechsel wie etwa Myxobakterien bieten eine vielversprechende Ressource für neue attraktive P450s.

Als Methode mit den besten Erfolgchancen, Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung von Terpenen zu entdecken, hat sich die Homologie basierte Suche erwiesen. Durch die hohe Konservierung in der aktiven Tasche ähneln sich die Substratspektren homologer P450s innerhalb einer Unterfamilie (> 55% Aminosäuresequenzidentität) häufig sehr stark. Die Einordnung in eine P450-Familie (> 40% Sequenzidentität) kann wichtige Hinweise auf potenzielle Substrate liefern, jedoch können die Substratspektren aufgrund der Überlappung mit anderen P450-Familien leicht variieren, was auch in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. Das Repertoire an potenziellen P450-Biokatalysatoren ist mit der stetig wachsenden Anzahl von Sequenzen (> 38000) enorm und kann schließlich durch die Fortschritte in der Gensynthese schnell verfügbar gemacht werden. Ähnlich des Beispiels mit den P450 BM3-homologen Fusionsproteinen in dieser Arbeit ist es möglich, eine große Bandbreite an potenziellen Enzymen für die jeweilige Anwendung bereitzustellen. So können Enzymlibliotheken generiert werden, die sich beispielsweise nur in der Aktivität und Produktselektivität voneinander unterscheiden. Letztendlich bietet die genetisch gezielte oder willkürliche Veränderung die Möglichkeit, Biokatalysatoren für spezifische Anwendungen anzupassen. So wurde beispielweise Enzym ITB1693 durch nur eine Mutation dazu befähigt, komplexere Sesquiterpene umzusetzen. Ausgehend von den Einzelvarianten F95A und F95G sind weitere Mutagenesestudien in der aktiven Tasche relevant, welche die Aktivität oder Selektivität weiter beeinflussen könnten. Auch die P450-Superfamilien-Datenbank (3DM-Technologie) hat sich in dieser Arbeit bewährt und ist basierend auf der großen Anzahl an verfügbaren Sequenzen sowie Informationen aus Mutationsstudien ein leistungsstarkes Instrument für die rationale Mutagenese.

Der Organismus *Arthrobacter* sp. hat sich in dieser Arbeit als interessante Quelle für P450 Biokatalysatoren erwiesen. Obwohl die für den Metabolismus der Terpene verantwortlichen Oxygenasen nicht gefunden wurden, konnten neue und hoch spezialisierte Enzyme identifiziert und charakterisiert werden. Neben der Entschlüsselung der am Papaverin-

Metabolismus beteiligten P450s hat sich vor allem CYP1232A24 als vielseitiges Enzym mit breitem Anwendungsspektrum erwiesen. Inzwischen wurde in Kooperation mit der Universität York eine erste Struktur dieses neuartigen Enzyms mit einer Auflösung von 1.7 Angström aufgeklärt. Komplexe mit Liganden werden weiterhin Aufschluss über die Präferenz von CYP1232A24 für die Demethylierung in *meta*-Position im Vergleich zu den *para*-demethylierenden CYP199A25 und CYP1232F1 ermöglichen. Gleichzeitig können aus den Studien mit den *Arthrobacter* sp. P450s wertvolle Methodiken zur initialen Rekonstitution der Aktivität entnommen werden. Die hoch versatilen P450 Systeme mit einer Vielzahl an möglichen Redoxpartnern wurden in dieser Arbeit mit der Herstellung des ersten kompletten physiologischen P450 Klasse III Systems erweitert und können durch weitere Untersuchungen wertvolle Erkenntnisse für die P450 Forschung liefern. Gleichzeitig könnten die selektiven Demethylierungen oder Hydroxylierungen in *para*- oder *meta*-Position in der Schutzgruppenchemie oder für neue biosynthetische Routen, etwa zur Herstellung von Vanillin, eingesetzt werden. Hierzu stehen bereits effiziente Ganzzellbiokatalysatoren zur Verfügung.

In dieser Arbeit hat sich insbesondere CYP109Q5 als universell einsetzbarer Biokatalysator für die Oxyfunktionalisierung einer großen Bandbreite an Sesquiterpenen und weiterer Verbindungen herausgestellt. Welche industriell relevanten Produkte letztlich unter Verwendung dieses Enzyms generiert werden, muss basierend auf dem entwickelten Ganzzellsystem in zukünftigen Arbeiten evaluiert werden. Ferner sind gänzlich neue Produkte vorstellbar, deren Eigenschaften durch die CYP109Q5-katalysierte Synthese untersucht werden können. Die teilweise geringen Selektivitäten sind hierbei zunächst positiv zu sehen, da so, wie angestrebt, eine große Vielfalt an Produkten generiert wird. Sind diese Produkte identifiziert, lassen sich aufbauend auf der Evolvierbarkeit des Enzyms schließlich maßgeschneiderte Spezialisten entwerfen. Die Möglichkeit, nicht-aktivierte C-H-Verbindungen zu oxidieren, wie im Falle des β -Ionons (**1**), macht CYP109Q5 für industrielle Prozesse besonders interessant und bietet einen exzellenten Startpunkt für weitere Untersuchungen. Neben den bisher umgesetzten NSAIDs, Steroiden sowie Mono- und Sesquiterpenen ist eine Erweiterung des Substratspektrums naheliegend. Da auch sehr große, sperrige Substrate wie Progesteron (**96**) effektiv oxyfunktionalisiert werden, ist beispielsweise die Untersuchung von Di- und Triterpenen als Substrate ein nächster logischer Schritt. Auch von CYP109Q5 konnten in Kooperation mit der Universität York erste Proteinkristalle erhalten werden, deren Strukturaufklärung wichtige Informationen für weiterführende Mutagenesestudien und der Charakterisierung weiterer akzeptierter Substrate respektive des natürlichen Substrats liefern wird.

Für die Identifikation neuer P450s müssen geeignete Expressionssysteme verfügbar sein. In dieser Arbeit haben sich, sowohl für die allgemeine Herstellung aufgrund ihres hohen GC-Gehalts oder vieler *rare codons* kritischer P450-Konstrukte als auch zur Generierung

effizienter *in vivo* Ganzzellbiokatalysatoren, pBAD-Vektoren bewährt. Ein entscheidender Vorteil dieser Vektoren liegt in dem arabinoseinduzierbaren pBAD-Promoter, der im Vergleich zu z.B. T7-Vektoren eine strenge Regulierung der Proteinexpression ermöglicht. Dieses Expressionssystem kann in Zukunft die bisherigen Standardvektoren pET-28a(+) und pCWori(+) ersetzen und auf diese Weise zur effizienten Bereitstellung neuer P450-Biokatalysatoren beitragen. Gleichzeitig ist die stetige Weiterentwicklung der Redoxpartner für die Aktivität der P450s fundamental. Die oftmals schwierige Identifikation der physiologischen Redoxpartner kann die Katalyse entscheidend beschleunigen oder gar erst ermöglichen, was auch in dieser Arbeit anhand des P450 Klasse III Systems mit FeRed_1 und dem Flavodoxin FldX festgestellt wurde. Dennoch können oftmals variabel einsetzbare heterologe Redoxpartner-Paare wie die *bovinen* AdR-AdX oder CamA-CamB (*P. putida*) effektiv Elektronen auf eine Vielzahl an P450s transferieren. Eine Erweiterung des Spektrums an universell einsetzbaren Redoxpartnern kann die Identifikation und schließliche Anwendung neuer P450s beschleunigen. Die Suche nach alternativen Redoxpartnern, wie im Beispiel der Tests von 24 unterschiedlichen Ferredoxine sowie drei Reduktasen eines Kooperationspartners, liefert wertvolle Informationen über die Redoxsysteme und bietet die Möglichkeit zur Steigerung der katalytischen Effizienz der P450s. In Kombination mit der Metagenomik und der immer günstiger werdenden Gensynthese könnten durch den Einsatz universeller Redoxpartner Enzybibibliotheken etwa von der großen Klasse I P450s im Mikrotiterplattenmaßstab schnell auf bestimmte Aktivitäten hin getestet werden. Homologie basierte Bibliotheken sowie der Einsatz möglichst diverser Enzymfamilien könnten hierbei schnell zu bedeutenden neuen Biokatalysatoren führen.

Die in dieser Arbeit untersuchte Oxyfunktionalisierung von Diclofenac (**8**) durch P450 RhF ist eines der wenigen Beispiele für erfolgreiches *Upscaling* und zeigt, dass viele Faktoren schrittweise verbessert werden müssen. Aufbauend auf diesen unter prozessrelevanten Bedingungen erzielten Ergebnissen kann eine weitere Steigerung der Produktivität erfolgen. Die limitierenden Faktoren müssen jeweils in Abhängigkeit vom Substrat-Enzym-System und den eingesetzten Komponenten immer neu identifiziert werden, was einen Grund für die wenigen Beispiele P450-katalysierter Prozesse darstellt. Obwohl der Bedarf an P450-Biokatalysatoren weiter steigt, kann die klassische Verwendung von Mikroorganismen wertvolle Alternativen darstellen. Studien dieser Arbeit veranschaulichen das Potenzial der filamentösen Pilze als Biokatalysator für die NSAID-Oxyfunktionalisierung, die in Zukunft wertvolle Metabolite neuer sowie bekannter Medikamente effizient und kostengünstig herstellen könnten.

Erste identifizierte Biokatalysatoren werden bei Kooperationspartnern bereits für die Generierung von Terpenoiden eingesetzt und deren Leistungsfähigkeit evaluiert. Ein großes Produktportfolio von wertvollen oxyfunktionalisierten Verbindungen wurde in dieser Doktorarbeit ermöglicht, das in nachfolgenden Arbeiten um die versatile und

herausfordernde Enzymklasse P450 erweitert wird. Nicht zufällig sind in der Natur P450s an den meisten Stoffwechsel- und Biosynthesewegen beteiligt, was ihre Bedeutung für die Katalyse essenzieller Schritte und ihr damit einhergehendes Potenzial für zukünftige industrielle Anwendungen offenbart.

6. Literaturverzeichnis

1. Bornscheuer, U. T. A radical change in enzyme catalysis. *Nature* **540**, 345–346 (2016).
2. Otte, K. B. & Hauer, B. Enzyme engineering in the context of novel pathways and products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 16–22 (2015).
3. Becker, J. & Wittmann, C. Biotechnologie von Morgen: metabolisch optimierte Zellen für die biobasierte Produktion von Chemikalien und Treibstoffen, Materialien und Gesundheitsprodukten. *Angew. Chemie* **127**, 3383–3407 (2015).
4. Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A. & Hauer, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 3070–3095 (2014).
5. Bornscheuer, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194 (2012).
6. Davids, T., Schmidt, M., Böttcher, D. & Bornscheuer, U. T. Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 215–220 (2013).
7. Turner, N. J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 567–573 (2009).
8. Arnold, F. H. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* **409**, 253–257 (2001).
9. Grogan, G. Biotransformations. *Annu. Reports Sect. "B" (Organic Chem.)* **109**, 15 (2013).
10. Bernhardt, R. & Urlacher, V. B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: Chances and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6185–6203 (2014).
11. Fasan, R. Tuning P450 Enzymes as Oxidation Catalysts. *ACS Catal.* **2**, 647–666 (2012).
12. Ortiz de Montellano, P. R. *Cytochrome P450 - Structure, Mechanism, and Biochemistry.* (Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005).
13. Omura, T. & Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370–2378 (1964).
14. Omura, T. & Sato, R. Isolation of cytochromes P-450 and P-420. *Methods Enzymol.* **10**, 556–561 (1967).
15. Dawson, J. H., Anderssons, L. A. & Sono, M. Spectroscopic Investigations. *J. Biol. Chem.* **257**, 3606–3617 (1982).
16. Coelho, P. S. *et al.* A Serine-Substituted P450 Catalyzes Highly Efficient Carbene Transfer to Olefins In Vivo. *Nat Chem Biol* **9**, 485–487 (2013).
17. Sligar, S. G., Cinti, D. L., Gibson, G. G. & Schenkman, J. B. Spin state control of the hepatic cytochrome P450 redox potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 925–932 (1979).
18. Fisher, M. T. & Sligar, S. G. Control of Heme Protein Redox Potential and Reduction Rate: Linear Free Energy Relation between Potential and Ferric Spin State Equilibrium. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 5018–5019 (1985).
19. Girhard, M., Koschorreck, K. & Urlacher, V. B. Enzyme: Biokatalyse - Schlüssel zur selektiven oxidation. *BioSpektrum* **18**, 212–215 (2012).
20. Rittle, J. & Green, M. T. Cytochrome P450 Compound I. *Science (80-.)*. **330**, 933–938 (2010).
21. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G. & Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.* **105**, 2253–77 (2005).
22. Ortiz de Montellano, P. R. Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **110**, 932–948 (2010).
23. Ortiz de Montellano, P. R. & Nelson, S. D. Rearrangement Reactions Catalyzed by Cytochrome P450s. *Arch Biochem Biophys* **507**, 95–110 (2011).

24. Llaudet, E. C. *et al.* Expanding an Efficient, Electrically Driven and CNT-Tagged P450 System into the Third Dimension: A Nanowired CNT-Containing and Enzyme-Stabilising 3 D Sol-Gel Electrode. *ChemBioChem* **17**, 1367–1373 (2016).
25. Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. Olefin Cyclopropanation via Carbene Transfer Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes. *Science (80-.)*. **339**, 307–310 (2013).
26. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. & Dawson, J. H. Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* **96**, 2841–2888 (1996).
27. McIntosh, J. A., Farwell, C. C. & Arnold, F. H. Expanding P450 catalytic reaction space through evolution and engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 126–134 (2014).
28. Howard-Jones, A. R. & Walsh, C. T. Nonenzymatic Oxidative Steps Accompanying Action of the Cytochrome P450 Enzymes StaP and RebP in the Biosynthesis of Staurosporine and Rebeccamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11016–11017 (2007).
29. McIntosh, J. A. *et al.* Enantioselective Intramolecular C-H Amination Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes *In Vitro* and *In Vivo*. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 9309–9312 (2013).
30. Nelson, D. R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 14–18 (2011).
31. Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**, 1–9 (2000).
32. Chen, W. *et al.* Fungal cytochrome P450 monooxygenases: Their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. *Genome Biol. Evol.* **6**, 1620–1634 (2014).
33. Nelson, D. R. A world of cytochrome P450s. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120430 (2013).
34. Omura, T. Contribution of cytochrome P450 to the diversification of eukaryotic organisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **60**, 4–8 (2013).
35. Estabrook, R. W. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1461–1473 (2003).
36. Estabrook, R. W., Cooper, D. Y. & Rosenthal, O. The light reversible carbon monoxide inhibition of steroid C21-Hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.* **338**, 741–755 (1963).
37. Urlacher, V. B. & Girhard, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* **30**, 26–36 (2012).
38. Nelson, D. R. *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1–42 (1996).
39. Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasermann, C. A., Peterson, J. A. & Deisenhofer, J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science (80-.)*. **261**, 731–736 (1993).
40. Poulos, T. L., Finzelsy, B. C., Gunsalus, I. C., Wagner, G. C. & Kraut, J. The 2.6-Å Crystal Structure of *Pseudomonas putida* Cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **260**, 16122–16130 (1985).
41. Poulos, T. L. & Li, H. The structure of BM-3. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 140–146 (1997).
42. Poulos, T. L. & Johnson, E. F. in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (ed. Ortiz de Montellano, P. R.) 3–32 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-12108-6_1
43. Leys, D. *et al.* Atomic structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 to 1.06 Å reveals novel features of cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **278**, 5141–5147 (2003).
44. Graham, S. E. & Peterson, J. A. How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us? *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 24–29 (1999).
45. Gricman, Ł., Vogel, C. & Pleiss, J. Identification of universal selectivity-determining positions in cytochrome P450 monooxygenases by systematic sequence-based literature mining. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 1593–1603 (2015).

46. Munro, A. W., Girvan, H. M. & McLean, K. J. Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 585–609 (2007).
47. Winn, P. J., Lüdemann, S. K., Gauges, R., Lounnas, V. & Wade, R. C. Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5361–5366 (2002).
48. Podust, L. M. & Sherman, D. H. Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1251–1266 (2012).
49. Poulos, T. L. Cytochrome P450 flexibility. *PNAS* **100**, 13121–13122 (2003).
50. Ekroos, M. & Sjögren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 13682–13687 (2006).
51. Cojocar, V., Winn, P. J. & Wade, R. C. The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 390–401 (2007).
52. Munro, A. W., Girvan, H. M. & McLean, K. J. Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**, 345–359 (2007).
53. McLean, K. J., Luciakova, D., Belcher, J., Tee, K. L. & Munro, A. W. in *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450* (eds. Hrycay, E. G. & Bandiera, S. M.) 299–317 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-16009-2_11
54. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. & Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**, 330–344 (2007).
55. Sevrioukova, I. F., Poulos, T. L. & Churbanova, I. Y. Crystal structure of the putidaredoxin reductase-putidaredoxin electron transfer complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 13616–13620 (2010).
56. Sagara, Y., Takata, Y., Miyata, T., Hara, T. & Horiuchi, T. Cloning and sequence analysis of adrenodoxin reductase cDNA from bovine adrenal cortex. *J. Biochem.* **102**, 1333–1336 (1987).
57. Sagara, Y. *et al.* Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 627–630 (1993).
58. Hawkes, D. B., Adams, G. W., Burlingame, A. L., Ortiz De Montellano, P. R. & De Voss, J. J. Cytochrome P450cin (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 27725–27732 (2002).
59. Stok, J. E. & De Voss, J. Expression, purification, and characterization of Biol: a carbon-carbon bond cleaving cytochrome P450 involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 351–360 (2000).
60. Khmelevtsova, L. E., Sazykin, I. S., Sazykina, M. A. & Seliverstova, E. Y. Prokaryotic cytochromes P450 (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **53**, 401–409 (2017).
61. Stok, J. E., Slessor, K. E., Farlow, A. J., Hawkes, D. B. & De Voss, J. J. in *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450* (eds. Hrycay, E. G. & Bandiera, S. M.) 319–339 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-16009-2_12
62. Roberts, G. A. *et al.* A self-sufficient cytochrome p450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center. *J. Biol. Chem.* **278**, 48914–48920 (2003).
63. Gilardi, G. *et al.* Molecular Lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 133–145 (2002).
64. Urlacher, V. B. & Schmid, R. D. Protein engineering of the cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium*. *Methods Enzymol.* **388**, 208–224 (2004).
65. Bell, S. G., Dale, A., Rees, N. H. & Wong, L.-L. A cytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 163–175 (2010).
66. Chang, M. C. Y., Eachus, R. A., Trieu, W., Ro, D.-K. & Keasling, J. D. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 274–277 (2007).
67. Klenk, J. M. *et al.* The self-sufficient P450 RhF expressed in a whole cell system selectively catalyses the 5-hydroxylation of diclofenac. *Biotechnol. J.* **12**, 1–8 (2017).

68. Pflug, S., Richter, S. M. & Urlacher, V. B. Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from *Bacillus megaterium* in *E. coli*. *J. Biotechnol.* **129**, 481–488 (2007).
69. Zhang, J.-D., Li, A.-T. & Xu, J.-H. Improved expression of recombinant cytochrome P450 monooxygenase in *Escherichia coli* for asymmetric oxidation of sulfides. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **33**, 1043–1049 (2010).
70. Alonso-Gutierrez, J. *et al.* Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metab. Eng.* **19**, 33–41 (2013).
71. Zelasko, S., Palaria, A. & Das, A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using *Escherichia coli* expression systems. *Protein Expr. Purif.* **92**, 77–87 (2013).
72. Bell, S. G., Harford-Cross, C. F. & Wong, L. L. Engineering the CYP101 system for in vivo oxidation of unnatural substrates. *Protein Eng.* **14**, 797–802 (2001).
73. Carmichael, A. B. & Wong, L. L. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3117–3125 (2001).
74. Rabe, K. S., Gandubert, V. J., Spengler, M., Erkelenz, M. & Niemeyer, C. M. Engineering and assaying of cytochrome P450 biocatalysts. *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 1059–1073 (2008).
75. Liu, L., Schmid, R. D. & Urlacher, V. B. Engineering cytochrome P450 monooxygenase CYP 116B3 for high dealkylation activity. *Biotechnol. Lett.* **32**, 841–845 (2010).
76. Bell, S. G., Yang, W., Dale, A., Zhou, W. & Wong, L.-L. Improving the affinity and activity of CYP101D2 for hydrophobic substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 3979–3990 (2013).
77. Sayayama, A. M., Chen, M. M. Y. & Arnold, F. H. A Panel of Cytochrome P450 BM3 Variants To Produce Drug Metabolites and Diversify Lead Compounds. *Chemistry (Easton)*. **15**, 11723–11729 (2009).
78. Sowden, R. J., Yasmin, S., Rees, N. H., Bell, S. G. & Wong, L. Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450cam and P450BM-3. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 57–64 (2005).
79. Wong, L.-L., Bell, S. G. & Carmichael, A. B. Process for oxidizing terpenes. (2007). doi:10.1021/BP0256263.Related
80. Li, Q., Ogawa, J., Schmid, R. D. & Shimizu, S. Engineering Cytochrome P450 BM-3 for Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5735–5739 (2001).
81. Urlacher, V. B., Makhsumkhanov, A. & Schmid, R. D. Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 53–59 (2006).
82. Le-Huu, P., Heidt, T., Claasen, B., Laschat, S. & Urlacher, V. B. Chemo-, Regio-, and stereoselective oxidation of the monocyclic diterpenoid -cembrenediol by P450 BM3. *ACS Catal.* **5**, 1772–1780 (2015).
83. Venkataraman, H., Beer, S. B. A. De, Geerke, D. P., Vermeulen, N. P. E. & Commandeur, J. N. M. Regio- and stereoselective hydroxylation of optically active α -ionone enantiomers by engineered cytochrome P450 BM3 mutants. *Adv. Synth. Catal.* **354**, 2172–2184 (2012).
84. Weber, E. *et al.* Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. *Chem. Commun.* **47**, 944–946 (2011).
85. Duan, Y. *et al.* Semi-rational engineering of cytochrome CYP153A from *Marinobacter aquaeolei* for improved ω -hydroxylation activity towards oleic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 8779–8788 (2016).
86. Munday, S. D., Shoji, O., Watanabe, Y., Wong, L.-L. & Bell, S. G. Improved oxidation of aromatic and aliphatic hydrocarbons using rate enhancing variants of P450Bm3 in combination with decoy molecules. *Chem. Commun.* **52**, 1036–1039 (2015).
87. Honda Malca, S. *et al.* Bacterial CYP153A monooxygenases for the synthesis of omega-hydroxylated fatty acids. *Chem. Commun.* **48**, 5115–5117 (2012).
88. Darimont, D., Weissenborn, M. J., Nebel, B. A. & Hauer, B. Modulating proposed electron transfer pathways in P450BM3 led to improved activity and coupling efficiency. *Bioelectrochemistry* **119**, 119–123 (2018).

89. Ringle, M., Khatri, Y., Zapp, J., Hannemann, F. & Bernhardt, R. Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based *Escherichia coli* whole-cell bioconversions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 7741–7754 (2013).
90. Milhim, M., Gerber, A., Neunzig, J., Hannemann, F. & Bernhardt, R. A Novel NADPH-dependent flavoprotein reductase from *Bacillus megaterium* acts as an efficient cytochrome P450 reductase. *J. Biotechnol.* **231**, 83–94 (2016).
91. Girhard, M., Tieves, F., Weber, E., Smit, M. S. & Urlacher, V. B. Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: Versatile redox partner for bacterial P450s. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1625–1635 (2013).
92. Bell, S. G. *et al.* A phthalate family oxygenase reductase supports terpene alcohol oxidation by CYP238A1 from *Pseudomonas putida* KT2440. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **60**, 9–17
93. Schwaneberg, U., Appel, D., Schmitt, J. & Schmid, R. D. P450 in biotechnology: zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450 BM-3 F87A as a catalyst. *J. Biotechnol.* **84**, 249–257 (2000).
94. Sadeghi, S. J., Fantuzzi, A. & Gilardi, G. Breakthrough in P450 bioelectrochemistry and future perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 237–248 (2011).
95. Bell, S. G. *et al.* Tailoring an alien ferredoxin to support native-like P450 monooxygenase activity Supplementary. *Chem. Commun.* **48**, 11692–11694 (2012).
96. Li, S. *et al.* Selective oxidation of carbonyl C-H bonds by an engineered macrolide P450 monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18463–18468 (2009).
97. Nebel, B. A. *et al.* Biooxidation of n-butane to 1-butanol by engineered P450 monooxygenase under increased pressure. *J. Biotechnol.* **191**, 86–92 (2014).
98. Li, S., Podust, L. M. & Sherman, D. H. Engineering and analysis of a self-sufficient biosynthetic cytochrome P450 PikC fused to the RhFRED reductase domain. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12940–12941 (2007).
99. Scheps, D. *et al.* Synthesis of ω -hydroxy dodecanoic acid based on an engineered CYP153A fusion construct. *Microb. Biotechnol.* **6**, 694–707 (2013).
100. Cirino, P. C. & Arnold, F. H. A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew. Chemie* **42**, 3299–3301 (2003).
101. Choi, K. Y., Jung, E. O., Yun, H., Yang, Y. H. & Kim, B. G. Engineering class I cytochrome P450 by gene fusion with NADPH-dependent reductase and *S. avermitilis* host development for daidzein biotransformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 8191–8200 (2014).
102. Bakkes, P. J. *et al.* Engineering of versatile redox partner fusions that support monooxygenase activity of functionally diverse cytochrome P450s. *Sci. Rep.* **7**, 9570 (2017).
103. Hoffmann, S. M. *et al.* The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling. *ChemCatChem* **8**, 1591–1597 (2016).
104. Lundemo, M. T., Notonier, S., Striedner, G., Hauer, B. & Woodley, J. M. Process limitations of a whole-cell P450 catalyzed reaction using a CYP153A-CPR fusion construct expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 1197–1208 (2016).
105. Gricman, Ł. *et al.* Redox Partner Interaction Sites in Cytochrome P450 Monooxygenases: *In Silico* Analysis and Experimental Validation. *ChemistrySelect* **1**, 1243–1251 (2016).
106. Grinberg, A. V. *et al.* Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **40**, 590–612 (2000).
107. Julsing, M. K., Kuhn, D., Schmid, A. & Bühler, B. Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1109–1119 (2012).
108. Notonier, S., Gricman, L., Pleiss, J. & Hauer, B. Semirational Protein Engineering of CYP153A.aq.-CPRBM3 for Efficient Terminal Hydroxylation of Short- to Long-Chain Fatty Acids. *ChemBioChem* **17**, 1550–1557 (2016).

109. Eiben, S., Bartelmäs, H. & Urlacher, V. B. Construction of a thermostable cytochrome P450 chimera derived from self-sufficient mesophilic parents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 1055–1061 (2007).
110. Emmerstorfer, A. *et al.* Over-expression of ICE2 stabilizes cytochrome P450 reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnol. J.* **10**, 623–635 (2015).
111. Cornelissen, S. *et al.* Whole-cell-based CYP153A6-catalyzed (S)-limonene hydroxylation efficiency depends on host background and profits from monoterpene uptake via AlkL. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1282–1292 (2013).
112. Wriessnegger, T. *et al.* Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metab. Eng.* **24**, 18–29 (2014).
113. Wu, Y. *et al.* Enhancement of steroid hydroxylation yield from dehydroepiandrosterone by cyclodextrin complexation technique. *Steroids* **84**, 70–77 (2014).
114. Kiss, F. M., Lundemo, M. T., Zapp, J., Woodley, J. M. & Bernhardt, R. Process development for the production of 15 β -hydroxycyproterone acetate using *Bacillus megaterium* expressing CYP106A2 as whole-cell biocatalyst. *Microb. Cell Fact.* **14**, 28 (2015).
115. Bleif, S. *et al.* A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto- β -boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1135–1146 (2012).
116. Maurer, S. C. *et al.* Catalytic Hydroxylation in Biphasic Systems using CYP102A1 Mutants. *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1090–1098 (2005).
117. Luan, Z. J., Yin, Y. C., Li, A. T., Yu, H. L. & Xu, J. H. Monoterpene hydroxylation with an artificial self-sufficient P450 utilizing a P450SMO reductase domain for the electron transfer. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **116**, 78–82 (2015).
118. Girhard, M. *et al.* Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microb. Cell Fact.* **8**, 36 (2009).
119. Schewe, H., Kaup, B. A. & Schrader, J. Improvement of P450BM-3 whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 55–65 (2008).
120. Lee, W. H., Park, J. B., Park, K., Kim, M. D. & Seo, J. H. Enhanced production of ϵ -caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* harboring cyclohexanone monooxygenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 329–338 (2007).
121. Tieves, F., Erenburg, I. N., Mahmoud, O. & Urlacher, V. B. Synthesis of chiral 2-alkanols from n-alkanes by a *P. putida* whole-cell biocatalyst. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 1845–1852 (2016).
122. Fasan, R. *et al.* Improved product-per-glucose yields in P450-dependent propane biotransformations using engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 500–510 (2011).
123. Walton, A. Z. & Stewart, J. D. Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Prog.* **20**, 403–411 (2004).
124. Lundemo, M. T. & Woodley, J. M. Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2465–2483 (2015).
125. Donova, M. V. & Egorova, O. V. Microbial steroid transformations: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 1423–1447 (2012).
126. Carballeira, J. D. *et al.* Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol. Adv.* **27**, 686–714 (2009).
127. Petzoldt, K., Annen, K., Laurent, H. & Wiechert, R. Process for the preparation of 11 β -hydroxy steroids. (1982).
128. Grogan, G., Sime, J. T. & Turner, N. J. Diastereoselective hydroxylation and reduction of derivatised tetrahydrofurans by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 119–124 (2001).
129. Huszcza, E., Dmochowska-Gładysz, J. & Bartmańska, A. Transformations of steroids by *Beauveria bassiana*. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **60**, 103–108 (2005).

130. Xiong, Z. *et al.* Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by *Beauveria bassiana*. *Steroids* **71**, 979–983 (2006).
131. Buchanan, G. O. & Reese, P. B. Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Phytochemistry* **56**, 141–151 (2001).
132. Buchanan, G. O., Williams, L. A. D. & Reese, P. B. Biotransformation of cadinane sesquiterpenes by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Phytochemistry* **54**, 39–45 (2000).
133. Osorio-Lozada, A., Tovar-Miranda, R. & Olivo, H. F. Biotransformation of N-piperidinylacetophenone with *Beauveria bassiana* ATCC-7159. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **55**, 30–36 (2008).
134. Schrewe, M., Julsing, M. K., Bühler, B. & Schmid, A. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6346–6377 (2013).
135. Van Beilen, J. B., Duetz, W. A., Schmid, A. & Witholt, B. Practical issues in the application of oxygenases. *Trends Biotechnol.* **21**, 170–177 (2003).
136. Zelinski, T. & Hauer, B. in *The Mycota: Industrial Applications* (ed. Osiewacz, H. D.) 283–301 (Springer Berlin Heidelberg, 2002). doi:10.1007/978-3-662-10378-4_14
137. Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**, 128–145 (2006).
138. Bicas, J. L., Dionísio, A. P. & Pastore, G. M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. *Chem. Rev.* **109**, 4518–4531 (2009).
139. Fache, M., Boutevin, B. & Caillol, S. Vanillin Production from Lignin and Its Use as a Renewable Chemical. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 35–46 (2016).
140. Walton, N. J., Mayer, M. J. & Narbad, A. Vanillin. *Phytochemistry* **63**, 505–515 (2003).
141. Priefert, H., Rabenhorst, J. & Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 296–314 (2001).
142. Hüsnü, K., Başer, C. & Demirci, F. in *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (ed. Berger, R. G.) 43–86 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-49339-6_4
143. Gliszczyńska, A. *et al.* Microbial transformation of (+)-nootkatone and the antiproliferative activity of its metabolites. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 2464–2469 (2011).
144. Yu, F. *et al.* Zingiber zerumbet CYP71BA1 catalyzes the conversion of α -humulene to 8-hydroxy- α -humulene in zerumbone biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1033–1040 (2011).
145. Emmerstorfer-Augustin, A. & Pichler, H. in *Biotechnology of Plant Secondary Metabolism: Methods and Protocols* (ed. Fett-Neto, A. G.) 79–89 (Springer New York, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-3393-8_8
146. Scragg, A. H. in *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (ed. Berger, R. G.) 599–614 (Springer Berlin Heidelberg, 2007). doi:10.1007/978-3-540-49339-6_25
147. Müller, M. *et al.* Method for the production of flavor-active terpenes. (2010).
148. Muller, B., Dean, C., Schmidt, C. & Kuhn, J.-C. Process for the preparation of nootkatone. (1998).
149. Chang, M. C. Y. & Keasling, J. D. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 674–681 (2006).
150. Daviet, L. & Schalk, M. Biotechnology in plant essential oil production : progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. *Flavour Fragr. J.* **25**, 123–127 (2010).
151. Guengerich, F. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* **8**, E101–E111 (2006).
152. Bernhardt, R. Cytochrome P450 : versatile Enzymsysteme mit Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin. *Mag. Forsch.* **1**, 10–16 (2004).
153. Guengerich, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70–83 (2008).

154. Naisbitt, D. J. *et al.* Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites. *Toxicol. Lett.* **168**, 45–50 (2007).
155. den Braver, M. W., Zhang, Y., Venkataraman, H., Vermeulen, N. P. E. & Commandeur, J. N. M. Simulation of interindividual differences in inactivation of reactive para-benzoquinone imine metabolites of diclofenac by glutathione S-transferases in human liver cytosol. *Toxicol. Lett.* **255**, 52–62 (2016).
156. Taira, K., Fujioka, K. & Aoyama, Y. Qualitative profiling and quantification of neonicotinoid metabolites in human urine by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
157. Waterhouse, I. Synthesis of deuterium labelled 4'-Hydroxydiclofenac. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **42**, 1075–1083 (1999).
158. Moser, P., Sallmann, A. & Wiesenberg, I. Synthesis and quantitative structure-activity relationships of diclofenac analogs. *J. Med. Chem.* **33**, 2358–2368 (1990).
159. Kim, S. H., Kwon, J. H. & Yoon, S. H. An improved synthesis of 4'-hydroxydiclofenac. *Bull. Korean Chem. Soc.* **31**, 3007–3009 (2010).
160. Drăgan, C. A. *et al.* Convenient gram-scale metabolite synthesis by engineered fission yeast strains expressing functional human P450 systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **163**, 965–980 (2011).
161. Guengerich, F. P. & MacDonald, J. S. Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 344–369 (2007).
162. Daily, E. B. & Aquilante, C. L. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. *Pharmacogenomics* **10**, 1489–1510 (2009).
163. Moise, A. R., Al-babili, S. & Wurtzel, E. T. Mechanistic Aspects of Carotenoid Biosynthesis. *Chem. Rev.* **114**, 164–193 (2014).
164. Müller, R. K., Mayer, H., Noack, K. & Daly, J. J. 273. Absolute Configuration of Actinioerythrin. *Helv. Chim. Acta* **61**, 2881–2887 (1978).
165. Yang, M. *et al.* Homogeneous and Heterogeneous Performances of Pyridinium Ionic Liquids in the Allylic Oxidation of Ionone-like Dienes. *Chinese J. Chem. Eng.* **17**, 967–975 (2009).
166. Rickert, A. Enzymatische allylische Oxidation mit Lyophilisaten des *Pleurotus sapidus*. (Gießen, 2016).
167. Mikami, Y., Watanabe, E., Fukunaga, Y. & Kisaki, T. Formation of 2S-Hydroxy-beta-ionone and 4-Hydroxy-beta-ionone by microbial hydroxylation of beta-ionone. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1075–1077 (1978).
168. Larroche, C., Creuly, C. & Gros, J.-B. Fed-batch biotransformation of beta-ionone by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 222–227 (1995).
169. Grivel, F. & Larroche, C. Phase transfer and biocatalyst behaviour during biotransformation of beta-ionone in a two-phase liquid system by immobilised *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.* **7**, 27–34 (2001).
170. Lutz-wahl, S. Selektive Hydroxylierung von α - und β -Ionon durch *Streptomyces* Stämme und molekulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon-Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae* Tü 27. (Stuttgart, 1999).
171. Celik, A., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Efficient terpene hydroxylation catalysts based upon P450 enzymes derived from actinomycetes. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 2930–2934 (2005).
172. Ly, T. T. B., Khatri, Y., Zapp, J., Hutter, M. C. & Bernhardt, R. CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56: a fascinating norisoprenoid and sesquiterpene hydroxylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 123–133 (2012).
173. Furusawa, M., Hashimoto, T., Noma, Y. & Asakawa, Y. Highly efficient production of nootkatone, the grapefruit aroma from valencene, by biotransformation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **53**, 1513–1514 (2005).

174. Greenhagen, B. T., Griggs, P., Takahashi, S., Ralston, L. & Chappell, J. Probing sesquiterpene hydroxylase activities in a coupled assay with terpene synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 385–394 (2003).
175. Takahashi, S. *et al.* Functional Characterization of Premnaspirodiene Oxygenase, a Cytochrome P450 Catalyzing Regio- And Stereo-specific Hydroxylations of Diverse Sesquiterpene Substrates. *J. Biol. Chem.* **282**, 31744–31754 (2007).
176. Tsuboi, K. *et al.* Zerumbone inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. *Oncol. Rep.* **31**, 57–64 (2014).
177. Shamoto, T. *et al.* Zerumbone inhibits angiogenesis by blocking NF- κ B activity in pancreatic cancer. *Pancreas* **43**, 396–404 (2014).
178. Harada, H. *et al.* Efficient functional analysis system for cyanobacterial or plant cytochromes P450 involved in sesquiterpene biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 467–476 (2011).
179. Geier, M., Braun, A., Emmerstorfer, A., Pichler, H. & Glieder, A. Production of human cytochrome P450 2D6 drug metabolites with recombinant microbes – a comparative study. *Biotechnol. J.* **7**, 1346–1358 (2012).
180. Vail, R. B., Homann, M. J., Hanna, I. & Zaks, A. Preparative synthesis of drug metabolites using human cytochrome P450s 3A4, 2C9 and 1A2 with NADPH-P450 reductase expressed in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 67–74 (2005).
181. Rushmore, T. H., Reider, P. J., Slaughter, D., Assang, C. & Shou, M. Bioreactor Systems in Drug Metabolism: Synthesis of Cytochrome P450-Generated Metabolites. *Metab. Eng.* **2**, 115–125 (2000).
182. Bort, R. *et al.* Hepatic metabolism of diclofenac: Role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 787–796 (1999).
183. Xu, L. H. *et al.* Structural basis for the 4'-hydroxylation of diclofenac by a microbial cytochrome P450 monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 3081–3091 (2015).
184. Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G. & Vicent, T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J. Hazard. Mater.* **176**, 836–842 (2010).
185. Tsotsou, G. E., Sideri, A., Goyal, A., Di Nardo, G. & Gilardi, G. Identification of mutant Asp251Gly/Gln307His of cytochrome P450 BM3 for the generation of metabolites of diclofenac, ibuprofen and tolbutamide. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 3582–3588 (2012).
186. Ferrando-Climent, L. *et al.* Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **438**, 404–413 (2012).
187. Borges, K. B. *et al.* LC-MS-MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 915–925 (2011).
188. Hata, T., Kawai, S., Okamura, H. & Nishida, T. Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation* **21**, 681–689 (2010).
189. Smith, D. A. & Obach, R. S. Metabolites in safety testing (MIST): Considerations of mechanisms of toxicity with dose, abundance, and duration of treatment. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 267–279 (2009).
190. Kern, F., Khatri, Y., Litzenburger, M. & Bernhardt, R. CYP267A1 and CYP267B1 from *sorangium cellulosum* so ce56 are highly versatile drug metabolizers. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 495–504 (2016).
191. Litzenburger, M., Kern, F., Khatri, Y. & Bernhardt, R. Conversions of tricyclic antidepressants and antipsychotics with selected P450s from *sorangium cellulosum* so ce56. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 392–399 (2015).
192. Reinen, J. *et al.* Efficient Screening of Cytochrome P450 BM3 Mutants for Their Metabolic Activity and Diversity toward a Wide Set of Drug-Like Molecules in Chemical Space. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 1568–1576 (2011).
193. Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E. & Pompon, D. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotech* **16**, 186–189 (1998).

194. Schmid, R. D. *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. (WILEY-VCH Verlag, 2016).
195. Peplow, M. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. *Nature* **530**, 389–390 (2016).
196. Teoh, K. H., Polichuk, D. R., Reed, D. W., Nowak, G. & Covello, P. S. Artemisia annua L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Lett.* **580**, 1411–1416 (2006).
197. Ro, D.-K. *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**, 940–943 (2006).
198. Lenihan, J. R., Tsuruta, H., Diola, D., Renninger, N. S. & Regentin, R. Developing an industrial artemisinic acid fermentation process to support the cost-effective production of antimalarial artemisinin-based combination therapies. *Biotechnol. Prog.* **24**, 1026–1032 (2008).
199. Westfall, P. J. *et al.* Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E111–E118 (2012).
200. Paddon, C. J. *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **496**, 528–532 (2013).
201. Amara, Z. *et al.* Applying green chemistry to the photochemical route to artemisinin. *Nat. Chem.* **7**, 489–495 (2015).
202. Zhao, B. *et al.* Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* **283**, 8183–8189 (2008).
203. Moody, S. C. *et al.* Investigating conservation of the albaflavenone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in streptomycetes. *FEBS J.* **279**, 1640–1649 (2012).
204. Takase, H. *et al.* Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (-)-rotundone. *J. Exp. Bot.* **67**, 787–798 (2016).
205. Fraatz, M. A., Berger, R. G. & Zorn, H. Nootkatone--a biotechnological challenge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 35–41 (2009).
206. Willrodt, C., Hoschek, A., Bühler, B., Schmid, A. & Julsing, M. K. Coupling limonene formation and oxyfunctionalization by mixed-culture resting cell fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1738–1750 (2015).
207. Xue, Y., Wilson, D., Zhao, L., Liu, H. & Sherman, D. H. Hydroxylation of macrolactones YC-17 and narbomycin is mediated by the pikC-encoded cytochrome P450 in *Streptomyces venezuelae*. *Chem. Biol.* **5**, 661–667 (1998).
208. Watanabe, I., Nara, F. & Serizawa, N. Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450sca-in2 from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor. *Gene* **163**, 81–85 (1995).
209. Sakaki, T. Practical Application of Cytochrome P450. *Biol. Pharm. Bull.* **844**, 844–849 (2012).
210. Hayashi, K. *et al.* Structure-Based Design of a Highly Active Vitamin D Hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1. *Biochemistry* **47**, 11964–11972 (2008).
211. Hayashi, K. *et al.* Three-step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1: Enzymes and catalysis. *FEBS J.* **277**, 3999–4009 (2010).
212. Osorio-Lozada, A., Surapaneni, S., Skiles, G. L. & Subramanian, R. Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: Case study of diclofenac metabolism by actinoplanes species. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 234–240 (2008).
213. Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E. & Pompon, D. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat. Biotechnol.* **16**, 186–189 (1998).
214. Szczebara, F. M. *et al.* Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat. Biotechnol.* **21**, 143–149 (2003).
215. Ajikumar, P. K. *et al.* Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli*. *Science (80-.)*. **330**, 70–74 (2010).

216. Roiban, G. D., Agudo, R. & Reetz, M. T. Cytochrome P450 catalyzed oxidative hydroxylation of achiral organic compounds with simultaneous creation of two chirality centers in a single C-H activation step. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 8659–8663 (2014).
217. Giger, L. *et al.* Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling. *Nat Chem Biol* **9**, 494–498 (2013).
218. Obexer, R. *et al.* Emergence of a catalytic tetrad during evolution of a highly active artificial aldolase. *Nat Chem* **9**, 50–56 (2017).
219. O'Maille, P. E. *et al.* Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene syntheses. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 617–623 (2008).
220. O'Maille, P. E., Chappell, J. & Noel, J. P. A single-vial analytical and quantitative gas chromatography-mass spectrometry assay for terpene syntheses. *Anal. Biochem.* **335**, 210–217 (2004).
221. Arnold, F. H. The nature of chemical innovation: new enzymes by evolution. *Q. Rev. Biophys.* **48**, 404–410 (2015).
222. Roiban, G.-D. & Reetz, M. T. Expanding the toolbox of organic chemists: directed evolution of P450 monooxygenases as catalysts in regio- and stereoselective oxidative hydroxylation. *Chem. Commun.* **51**, 2208–2224 (2015).
223. Wong, L.-L. P450(BM3) on steroids: the Swiss Army knife P450 enzyme just gets better. *Chembiochem* **12**, 2537–2539 (2011).
224. Wang, J., Ilie, A. & Reetz, M. T. Chemo- and Stereoselective Cytochrome P450-BM3-Catalyzed Sulfoxidation of 1-Thiochroman-4-ones Enabled by Directed Evolution. *Adv. Synth. Catal.* **359**, 2056–2060 (2017).
225. Kille, S., Zilly, F. E., Acevedo, J. P. & Reetz, M. T. Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution. *Nat. Chem.* **3**, 738–743 (2011).
226. Fasan, R., Chen, M. M., Crook, N. C. & Arnold, F. H. Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450BM3 exhibiting natively catalytic properties. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 8414–8418 (2007).
227. Zehentgruber, D., Urlacher, V. B. & Lütz, S. Studies on the enantioselective oxidation of β -ionone with a whole *E. coli* system expressing cytochrome P450 monooxygenase BM3. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **84**, 62–64 (2012).
228. Tassaneeyakul, W., Guo, L. Q., Fukuda, K., Ohta, T. & Yamazoe, Y. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 356–363 (2000).
229. Seifert, A. *et al.* Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *Chembiochem* **10**, 853–861 (2009).
230. Venkataraman, H. *et al.* Application of engineered cytochrome P450 mutants as biocatalysts for the synthesis of benzylic and aromatic metabolites of fenamic acid NSAIDs. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 5613–5620 (2014).
231. Ren, X. *et al.* Drug Oxidation by Cytochrome P450BM3 : Metabolite Synthesis and Discovering New P450 Reaction Types. *Chemistry* **21**, 15039–15047 (2015).
232. Capoferri, L. *et al.* Insights into regioselective metabolism of mefenamic acid by cytochrome P450 BM3 mutants through crystallography, docking, molecular dynamics, and free energy calculations. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **84**, 383–396 (2016).
233. Rentmeister, A., Brown, T. R., Snow, C. D., Carbone, M. N. & Arnold, F. H. Engineered Bacterial Mimics of Human Drug Metabolizing Enzyme CYP2C9. *ChemCatChem* **3**, 1065–1071 (2011).
234. Renata, H., Wang, Z. J. & Arnold, F. H. Ausdehnung des Enzym-Universums: Zugang zu nicht-natürlichen Reaktionen durch mechanismusgeleitete, gerichtete Evolution. *Angew. Chemie* **127**, 3408–3426 (2015).
235. Gober, J. G. *et al.* Mutating a Highly Conserved Residue in Diverse Cytochrome P450s Facilitates Diastereoselective Olefin Cyclopropanation. *ChemBioChem* **17**, 394–397 (2016).

236. Wang, Z. J. *et al.* Improved cyclopropanation activity of histidine-ligated cytochrome P450 enables enantioselective formal synthesis of levomilnacipran. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 6810–6813 (2014).
237. Heel, T., McIntosh, J. A., Dodani, S. C., Meyerowitz, J. T. & Arnold, F. H. Non-natural olefin cyclopropanation catalyzed by diverse cytochrome P450s and other hemoproteins. *ChemBioChem* **15**, 2556–2562 (2014).
238. Bordeaux, M., Tyagi, V. & Fasan, R. Highly Diastereoselective and Enantioselective Olefin Cyclopropanation Using Engineered Myoglobin-Based Catalysts. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 1744–1748 (2015).
239. Bajaj, P., Sreenilayam, G., Tyagi, V. & Fasan, R. Gram-Scale Synthesis of Chiral Cyclopropane-Containing Drugs and Drug Precursors with Engineered Myoglobin Catalysts Featuring Complementary Stereoselectivity. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 1–6 (2016).
240. Ward, T. R. Gerichtete Evolution von Iridium-substituiertem Myoglobin: vielseitige künstliche Metalloenzyme für enantioselektive C-C-Kupplungen. *Angew. Chemie* **128**, 15131–15133 (2016).
241. Dydio, P. *et al.* An artificial metalloenzyme with the kinetics of native enzymes. *Science (80-)*. **354**, 102–106 (2016).
242. Key, H. M., Dydio, P., Clark, D. S. & Hartwig, J. F. Letter containing noble metals in place of iron. *Nature* **534**, 534–537 (2016).
243. Maezawa, I., Kinumaki, A. & Suzuki, M. Isolation and identification of picronolide, methynolide, and neomethynolide produced by *S. venezuelae*. *J. Antibiot.* **27**, 84–85 (1974).
244. Lambalot, R. H. & Cane, D. E. Isolation and characterization of 10-Deoxymethynolide produced by *Streptomyces venezuelae*. *J. Antibiot.* **45**, 1981–1982 (1992).
245. Cane, D. E., Lambalot, R. H., Prabhakaran, P. C. & Ott, W. R. Macrolide biosynthesis. 7. Incorporation of polyketide chain elongation intermediates into methymycin. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 522–526 (1993).
246. Xue, Y., Zhao, L., Liu, H. W. & Sherman, D. H. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12111–12116 (1998).
247. Schneiker, S. *et al.* Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1281–1289 (2007).
248. Khatri, Y., Hannemann, F., Perlova, O., Müller, R. & Bernhardt, R. Investigation of cytochromes P450 in myxobacteria: Excavation of cytochromes P450 from the genome of *Sorangium cellulosum* so ce56. *FEBS Lett.* **585**, 1506–1513 (2011).
249. Shimkets, L. J., Dworkin, M. & Reichenbach, H. in *Prokaryotes* (eds. Dworkin, M., Stanley, F., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E.) 31–115 (Springer New York, 2006). doi:10.1007/0-387-30747-8
250. Khatri, Y. *et al.* The CYPome of *sorangium cellulosum* so ce56 and identification of CYP109D1 as a new fatty acid hydroxylase. *Chem. Biol.* **17**, 1295–1305 (2010).
251. Khatri, Y. *et al.* Substrate Hunting for the Myxobacterial CYP260A1 Revealed New 1 α -Hydroxylated Products from C-19 Steroids. *ChemBioChem* **17**, 90–101 (2016).
252. Bernhardt, R. *et al.* A natural heme-signature variant of CYP267A1 from *Sorangium cellulosum* so ce56 executes diverse omega-hydroxylation. *FEBS J.* **282**, 74–88 (2015).
253. Khatri, Y., Carius, Y., Ringle, M., Lancaster, C. R. D. & Bernhardt, R. Structural characterization of CYP260A1 from *Sorangium cellulosum* to investigate the 1 α -hydroxylation of a mineralocorticoid. *FEBS Lett.* **590**, 4638–4648 (2016).
254. Bleif, S. *et al.* Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase. *Chembiochem* **12**, 576–582 (2011).
255. Schlegel, S. *et al.* Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. *Microb. Biotechnol.* **3**, 403–411 (2010).

256. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).
257. Durairaj, P. *et al.* Fungal cytochrome P450 monooxygenases of *Fusarium oxysporum* for the synthesis of ω -hydroxy fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **14**, 45 (2015).
258. Theron, C. W., Labuschagné, M., Gudimich, R., Albertyn, J. & Smit, M. S. A broad-range yeast expression system reveals *Arxula adenivorans* expressing a fungal self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase as an excellent whole-cell biocatalyst. *FEMS Yeast Res.* **14**, 556–566 (2014).
259. Hawkes, D. B., Slessor, K. E., Bernhardt, P. V & De Voss, J. J. Cloning, Expression and Purification of Cindoxin, an Unusual Fmn-Containing Cytochrome P450 Redox Partner. *ChemBioChem* **11**, 1107–1114 (2010).
260. Bell, S. G. & Wong, L.-L. P450 enzymes from the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 666–672 (2007).
261. Bell, S. G. *et al.* Cytochrome P450 enzymes from the metabolically diverse bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 191–196 (2006).
262. Ewen, K. M. *et al.* Genome mining in *Sorangium cellulosum* So ce56: Identification and characterization of the homologous electron transfer proteins of a Myxobacterial cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **284**, 28590–28598 (2009).
263. Brill, E. *et al.* A new cytochrome P450 system from *Bacillus megaterium* DSM319 for the hydroxylation of 11-keto- β -boswellic acid (KBA). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1703–1717 (2014).
264. Haase-Aschoff, K. & Lingens, F. Mikrobieller Abbau von Papaverin. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **360**, 621–632 (1979).
265. Reznicek, O. Metabolismus nicht-physiologischer Substrate in Mikroorganismen. (Stuttgart, 2016).
266. Lingens, F. *et al.* *Phenylobacterium immobile* gen. nov. sp. nov. a Gram-Negative Bacterium That Degrades the Herbicide Chloridazon. *J. Syst. Bacteriol.* **35**, 26–39 (1985).
267. Dingler, C., Ladner, W., Krei, G. A., Cooper, B. & Hauer, B. Preparation of (R)-2-(4-Hydroxyphenoxy) propionic Acid by Biotransformation. *Pestic. Sci.* **46**, 33–35 (1996).
268. Chakrabarti, R. & Schutt, C. E. The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene* **274**, 293–298 (2001).
269. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
270. Atlas, R. M. *Handbook of Microbiological Media*. (CRC Press LLC, 2004).
271. Holms, H. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 85–116 (1996).
272. Osherov, N. & May, G. S. Optimization of protein extraction from *Aspergillus nidulans* for gel electrophoresis. *Fungal Genet. Newsl.* **45**, 38–40 (1998).
273. Franklin, M. R. & Constance, J. E. Comparative 1-Substituted Imidazole Inhibition of Cytochrome P450 Isozyme-Selective Activities in Human and Mouse Hepatic Microsomes. *Drug Metab. Rev.* **39**, 309–322 (2007).
274. Zhang, W. *et al.* Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 314–318 (2002).
275. Purdy, M. M., Koo, L. S., Ortiz de Montellano, P. R. & Klinman, J. P. Steady-state kinetic investigation of cytochrome P450cam: interaction with redox partners and reaction with molecular oxygen. *Biochemistry* **43**, 271–281 (2004).
276. McIver, L. *et al.* Characterisation of flavodoxin NADP⁺ oxidoreductase and flavodoxin; key components of electron transfer in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **257**, 577–585 (1998).
277. Fujii, K. & Huennekens, F. M. Activation of Methionine Synthetase by a Reduced Triphosphopyridine. Activation of Methionine Synthetase by a Reduced Triphosphopyridine Flavoprotein System. *J. Biol. Chem.* **249**, 6745–6753 (1974).

278. Chu, J.-W. & Kimura, T. Studies on Adrenal Steroid Hydroxylases. *J. Biol. Chem.* **248**, 2089–2094 (1973).
279. Huang, J. J. & Kimura, T. Adrenal steroid hydroxylases. Oxidation- reduction properties of adrenal iron-sulfur protein (adrenodoxin). *Biochemistry* **12**, 406–409 (1973).
280. Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M. & Kang, C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Communications* **23**, 1511–1512 (2002).
281. Hallmen, J. Expression und Charakterisierung neuartiger Monooxygenasen aus dem gram-positiven Organismus *Arthrobacter* sp. (Stuttgart, 2016).
282. Guengerich, F. P., Martin, M. V, Sohl, C. D. & Cheng, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat. Protoc.* **4**, 1245–1251 (2009).
283. Schenkman, J. B., Sligar, S. G. & Cinti, D. L. Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.* **12**, 43–71 (1981).
284. Luthra, A., Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction Intermediates. *Arch Biochem Biophys* **507**, 26–35 (2012).
285. Ly, T. T. B., Schiffrin, A., Nguyen, B. D. & Bernhardt, R. System for the Production of Oxygenated Sesquiterpene Derivatives Improvement of a P450-based Recombinant *E. coli* Whole-cell System for the Production of Oxygenated Sesquiterpene Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3891–3899 (2017).
286. Singh, M., Sharma, R. & Banerjee, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* **20**, 341–359 (2002).
287. Zhang, A. *et al.* The crystal structure of the versatile cytochrome P450 enzyme CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Mol. Biosyst.* **11**, 869–881 (2015).
288. Gröning, J. *et al.* Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere* **69**, 509–516 (2007).
289. Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T. & Caminal, G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* **74**, 765–772 (2009).
290. Godejohann, M., Berset, J. D. & Muff, D. Non-targeted analysis of wastewater treatment plant effluents by high performance liquid chromatography-time slice-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance/time-of-flight-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1218**, 9202–9209 (2011).
291. Dai, Y. J. *et al.* Microbial hydroxylation of imidacloprid for the synthesis of highly insecticidal olefin imidacloprid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 927–934 (2006).
292. Schoch, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1–6 (2012).
293. van Leeuwen, J. S., Vermeulen, N. P. E. & Vos, J. C. Involvement of the pleiotropic drug resistance response, protein kinase C signaling, and altered zinc homeostasis in resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to diclofenac. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5973–5980 (2011).
294. van Leeuwen, J. S. *et al.* Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. *Toxicol. Lett.* **200**, 162–168 (2011).
295. Tang, W. *et al.* Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: Identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 365–372 (1999).
296. Fossen, M. Environmental Fate of Imidacloprid. *Regulation* 1–16 (2006).
297. Grogan, G. J. & Holland, H. L. The biocatalytic reactions of *Beauveria* spp. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **9**, 1–32 (2000).
298. Liu, L., Schmid, R. D. & Urlacher, V. B. Cloning, expression, and characterization of a self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44319. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 876–882 (2006).

299. Klaus, T. Novel route to vanillin – an enzyme-catalyzed multi-step cascade synthesis. (Stuttgart, 2016).
300. Bell, S. G. *et al.* Structure and function of CYP108D1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444: an aromatic hydrocarbon-binding P450 enzyme. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **68**, 277–291 (2012).
301. Reznicek, O., Facey, S. J. & Hauer, B. Draft Genome Sequence of a Papaverine-Degrading , Gram-positive *Arthrobacter* sp. , Isolated from Soil Near Hohenheim , Germany. *Genome Announc* **3**, 1999–2000 (2015).
302. Reznicek, O., Luesken, F., Facey, S. J. & Hauer, B. Draft Genome Sequence of *Phenylobacterium immobile* Strain E (DSM 1986), Isolated from Uncontaminated Soil in Ecuador. *Genome Announc.* **3**, 10–11 (2015).
303. Xiao, G. *et al.* Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci. Rep.* **2**, 483 (2012).
304. Chen, J. *et al.* Cloning, expression and purification of isoflavone-2'-hydroxylase from *Astragalus membranaceus* Bge. Var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. *Protein Expr. Purif.* **107**, 83–89 (2015).
305. Barnes, H. J., Arlotto, M. P. & Waterman, M. R. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5597–5601 (1991).
306. Jenkins, C. M., Pikuleva, I. & Waterman, M. R. in *Cytochrome P450 Protocols. Methods in Molecular Biology* (eds. Phillips, R. & Shephard, E. A.) **107**, 181–193 (Humana Press, 1998).
307. Ewen, K. M., Ringle, M. & Bernhardt, R. Adrenodoxin-A versatile ferredoxin. *IUBMB Life* **64**, 506–512 (2012).
308. von Bühler, C. J. & Urlacher, V. B. A novel P450-based biocatalyst for the selective production of chiral 2-alkanols. *Chem. Commun.* **50**, 4089–4091 (2014).
309. von Bühler, C., Le-Huu, P. & Urlacher, V. B. Cluster screening: An effective approach for probing the substrate space of uncharacterized cytochrome P450s. *ChemBioChem* **14**, 2189–2198 (2013).
310. Bogazkaya, A. M. *et al.* Selective allylic hydroxylation of acyclic terpenoids by CYP154E1 from *Thermobifida fusca* YX. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 1347–1353 (2014).
311. Girhard, M., Klaus, T., Khatri, Y., Bernhardt, R. & Urlacher, V. B. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 595–607 (2010).
312. Munday, S. D., Maddigan, N. K., Young, R. J. & Bell, S. G. Characterisation of two self-sufficient CYP102 family monooxygenases from *Ktedonobacter racemifer* DSM44963 which have new fatty acid alcohol product profiles. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 1149–1162 (2016).
313. Budde, M., Maurer, S. C., Schmid, R. D. & Urlacher, V. B. Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Botechnol.* **66**, 180–186 (2004).
314. Chowdhary, P. K., Alemseghed, M. & Haines, D. C. Cloning, expression and characterization of a fast self-sufficient P450: CYP102A5 from *Bacillus cereus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 32–43 (2007).
315. Boddupalli, S., Estabrook, R. & Peterson, J. Fatty Acid Monooxygenation by Cytochrome P450 BM3. *J. Biol. Chem.* **265**, 4233–4239 (1990).
316. Khatri, Y. The cytochrome P450 complement of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 and characterization of two members, CYP109D1 and CYP260A1. (Saarland, 2009).
317. Bell, S. G. *et al.* Investigation of the substrate range of CYP199A4: Modification of the partition between hydroxylation and desaturation activities by substrate and protein engineering. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 16677–16688 (2012).
318. Ringle, M. Charakterisierung ausgewählter Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 Neue potentielle Biokatalysatoren. (Saarland, 2013).
319. Hauer, B., Haase-Aschoff, K. & Lingens, F. Papaverine Degradation with Papaverine Mutants of a *Nocardia* sp. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **363**, 499–506 (1982).

320. Zhang, W. *et al.* New reactions and products resulting from alternative interactions between the P450 enzyme and redox partners. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 3640–3646 (2014).
321. Hierlemann, T. Selektive Oxidationen mit natürlichen P450 Fusionsproteinen. (Stuttgart, 2015).
322. Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G. & Wong, L.-L. P450(BM3) (CYP102A1): connecting the dots. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1218–1260 (2012).
323. Khatri, Y., Bernhardt, R., Girhard, M., Hannemann, F. & Urlacher, V. B. Biocatalyst for hydroxylation and / or epoxidation. (2011).
324. Litzenburger, M. & Bernhardt, R. Selective oxidation of carotenoid-derived aroma compounds by CYP260B1 and CYP267B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 4447–4457 (2016).
325. Schifrin, A., Litzenburger, M., Ringle, M., Ly, T. T. B. & Bernhardt, R. New sesquiterpene oxidations with CYP260A1 and CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* so ce56. *ChemBioChem* **16**, 2624–2632 (2015).
326. Bergstrand, L. H., Cardenas, E., Holert, J., van Hamme, J. D. & Mohn, W. W. Delineation of steroid-degrading microorganisms through comparative genomic analysis. *MBio* **7**, 1–14 (2016).
327. Khatri, Y. *et al.* Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* so ce56. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 485–495 (2010).
328. McLean, K. J. *et al.* The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: Molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *J. Biol. Chem.* **284**, 35524–35533 (2009).
329. Ouellet, H. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol. Microbiol.* **77**, 730–742 (2010).
330. Seifert, A. & Pleiss, J. Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: a systematic analysis of the substrate recognition site 5. *Proteins* **74**, 1028–1035 (2009).
331. Aikens, J. & Sligar, S. G. Kinetic Solvent Isotope Effects during Oxygen Activation by Cytochrome P-450cam. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1143–1144 (1994).
332. Urlacher, V. & Schmid, R. D. Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 557–564 (2002).
333. Urlacher, V. B. & Schmid, R. D. Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 156–161 (2006).
334. Langford, K. & Thomas, K. V. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *J. Environ. Monit.* **13**, 416–421 (2011).
335. Richardson, S. D. & Kimura, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* **88**, 546–582 (2016).
336. Kenny, J. R. *et al.* Syntheses and characterization of the acyl glucuronide and hydroxy metabolites of diclofenac. *J. Med. Chem.* **47**, 2816–2825 (2004).
337. Hunter, D. J. B. *et al.* Analysis of the domain properties of the novel cytochrome P450 RhF. *FEBS Lett.* **579**, 2215–2220 (2005).
338. Roberts, G. A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Identification of a New Class of Cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J. Bacteriol.* **184**, 3898–3908 (2002).
339. Robin, A. *et al.* Engineering and improvement of the efficiency of a chimeric [P450cam-RhFRed reductase domain] enzyme. *Chem. Commun.* **18**, 2478–2480 (2009).
340. Robin, A. *et al.* Chimeric self-sufficient P450cam-RhFRed biocatalysts with broad substrate scope. *Beilstein J. Org. Chem.* **7**, 1494–1498 (2011).
341. Kulig, J. K. *et al.* A P450 fusion library of heme domains from *Rhodococcus jostii* RHA1 and its evaluation for the biotransformation of drug molecules. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 5603–5609 (2015).

342. O'Reilly, E. *et al.* Substrate promiscuity of cytochrome P450 RhF. *Catal. Sci. Technol.* **3**, 1490–1492 (2013).
343. Celik, A. *et al.* Probing the substrate specificity of the catalytically self-sufficient cytochrome P450 RhF from a *Rhodococcus* sp. *Chem. Commun.* **0**, 4492–4494 (2006).
344. Caswell, J. M., O'Neill, M., Taylor, S. J. C. & Moody, T. S. Engineering and application of P450 monooxygenases in pharmaceutical and metabolite synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 271–275 (2013).
345. Schewe, H., Holtmann, D. & Schrader, J. P450BM-3-catalyzed whole-cell biotransformation of α -pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous-organic two-phase system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 849–857 (2009).
346. Kaluzna, I. *et al.* Enabling Selective and Sustainable P450 Oxygenation Technology. Production of 4-Hydroxy- α -isophorone on Kilogram Scale. *Org. Process Res. Dev.* **20**, 814–819 (2016).
347. Brummund, J. *et al.* Process development for oxidations of hydrophobic compounds applying cytochrome P450 monooxygenases in-vitro. *J. Biotechnol.* **233**, 143–150 (2016).
348. Shen, S., Marchick, M. R., Davis, M. R., Doss, G. A. & Pohl, L. R. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: Role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 214–222 (1999).
349. Dai, Y. J. *et al.* Enhanced hydroxylation of imidacloprid by *Stenotrophomonas maltophilia* upon addition of sucrose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 995–1000 (2007).
350. Lu, T.-Q. *et al.* Regulation of Hydroxylation and Nitroreduction Pathways during Metabolism of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid by *Pseudomonas putida*. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 4866–4875 (2016).
351. Marisch, K., Bayer, K., Cserjan-Puschmann, M., Luchner, M. & Striedner, G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microb. Cell Fact.* **12**, 58 (2013).
352. Fuhrer, T. & Sauer, U. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J. Bacteriol.* **191**, 2112–2121 (2009).
353. Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. & Fischer, E. The Soluble and Membrane-bound Transhydrogenases UdhA and PntAB Have Divergent Functions in NADPH Metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 6613–6619 (2004).
354. Fischer, E. & Sauer, U. A Novel Metabolic Cycle Catalyzes Glucose Oxidation and Anaplerosis in Hungry *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**, 46446–46451 (2003).
355. Blum, W., Faigle, J. W., Pfaar, U. & Sallmann, A. Characterization of a novel diclofenac metabolite in human Spectrometry, by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **685**, 251–263 (1996).
356. Leemann, T., Transon, C. & Dayer, P. Cytochrome P450TB (CYP2C): A major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci.* **52**, 29–34 (1993).
357. Dorado, P., Berecz, R., Cáceres, M. C. & LLerena, A. Analysis of diclofenac and its metabolites by high-performance liquid chromatography: Relevance of CYP2C9 genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **789**, 437–442 (2003).
358. He, A. & Rosazza, J. P. N. Microbial transformations of S-naproxen by *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Pharmazie* **58**, 420–422 (2003).
359. Di Nardo, G., Dell'Angelo, V., Catucci, G., Sadeghi, S. J. & Gilardi, G. Subtle structural changes in the Asp251Gly/Gln307His P450 BM3 mutant responsible for new activity toward diclofenac, tolbutamide and ibuprofen. *Arch. Biochem. Biophys.* **602**, 106–115 (2015).
360. Neunzig, I. *et al.* Production and NMR analysis of the human ibuprofen metabolite 3-hydroxyibuprofen. *J. Biotechnol.* **157**, 417–420 (2012).
361. Venkataraman, H., Den Braver, M. W., Vermeulen, N. P. E. & Commandeur, J. N. M. Cytochrome P450-mediated bioactivation of mefenamic acid to quinoneimine intermediates and inactivation by human glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 2071–2081 (2014).

362. Janocha, S., Schmitz, D. & Bernhardt, R. in *Biotechnology of Isoprenoids. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 148. (eds. Schrader, J. & Bohlmann, J.) 215–250 (Springer, 2015). doi:10.1007/10
363. Kitazume, T., Tanaka, A., Matsuyama, S., Takaya, N. & Shoun, H. Analysis of fungal P450foxy (CYP505), a fused protein of cytochrome P450 and its reductase. *Int. Congr. Ser.* **1233**, 143–149 (2002).
364. Ma, M. *et al.* Structural Analysis of CYP101C1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444. *Chembiochem* **12**, 88–99 (2011).
365. Hasemann, C. A., Ravichandran, K. G., Peterson, J. A. & Deisenhofer, J. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3Å resolution. *J. Mol. Biol.* **236**, 1169–1185 (1994).
366. Dunn, A. R., Dmochowski, I. J., Bilwes, A. M., Gray, H. B. & Crane, B. R. Probing the open state of cytochrome P450cam with ruthenium-linker substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12420–12425 (2001).
367. Yang, W. *et al.* The structure of CYP101D2 unveils a potential path for substrate entry into the active site. *Biochem. J.* **433**, 85–93 (2011).
368. Katagiri, M., N., G. B. & Gunsalus, I. C. A Soluble Cytochrome P-450 Functional in Methylene Hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **243**, 3543–3546 (1968).
369. Peterson, J. A., Lorence, M. C. & Amarneh, B. Putidaredoxin Reductase and Putidaredoxin. *J. Biol. Chem.* **265**, 6066–6073 (1990).
370. Kim, J. P., Shen, A. L. & Xia, C. in *Handbook of Flavoproteins Volume 2 Complex Flavoproteins, Dehydrogenases and Physical Methods* (eds. Russ, H., Susan, M. & Bruce, P.) 73–101 (De Gruyter, 2013). doi:10.1515/9783110298345.73
371. Busse, H.-J. & Wieser, M. in *The Prokaryotes - Actinobacteria* (eds. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lor, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F.) 105–132 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/0-387-30743-5
372. Strong, L. C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M. J. & Wackett, L. P. *Arthrobacter aurescens* TC1 Metabolizes Diverse s-Triazine Ring Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5973–5980 (2002).
373. Gil, M., Haïdour, A. & Ramos, J. L. Degradation of o-methoxybenzoate by a two-member consortium made up of a gram-positive *Arthrobacter* strain and a gram-negative *Pantotea* strain. *Biodegradation* **11**, 49–53 (2000).
374. Robinson, J. B., Salonijs, P. O. & Chase, F. E. A note on the differential response of *arthrobacter* spp. and *pseudomonas* spp. to drying in soil. *Can. J. Microbiol.* **11**, 746–748 (1965).
375. Boylen, C. W. Survival of *Arthrobacter crystallopoietes* during prolonged periods of extreme desiccation. *J. Bacteriol.* **113**, 33–37 (1973).
376. Labeda, D. P., Liu, K. C. & Casida, L. E. Colonization of soil by *Arthrobacter* and *Pseudomonas* under varying conditions of water and nutrient availability as studied by plate counts and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 551–561 (1976).
377. Marshall, S. J. & White, G. F. Complete denitration of nitroglycerin by bacteria isolated from a washwater soakaway. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2622–2626 (2001).
378. Niewerth, H. *et al.* Complete genome sequence and metabolic potential of the quinaldine-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. Rue61a. *BMC Genomics* **13**, 534 (2012).
379. Mongodin, E. F. *et al.* Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet.* **2**, 2094–2106 (2006).
380. Eaton, R. W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* **183**, 3689–3703 (2001).
381. Pieper, D. H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 170–191 (2005).
382. Deng, Y., Mao, Y., Li, B., Yang, C. & Zhang, T. Aerobic Degradation of Sulfadiazine by *Arthrobacter* spp.: Kinetics, Pathways, and Genomic Characterization. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 9566–9575 (2016).

383. Bhosle, S., Kaliwal, S. M., Paknikar, S. K. & Mavinkurve, S. Molecular Rearrangement of Longifolene by Molecular Rearrangement of Longifolene by *Arthrobacter ilicis* T2. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2–5 (1993).
384. Lewis, D. G. Characterization of *Mycobacterium* sp. P450 systems. (Leicester, 2007).
385. Khatri, Y. *et al.* Novel family members of CYP109 from *Sorangium cellulosum* so ce56 exhibit characteristic biochemical and biophysical properties. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **60**, 18–29 (2013).
386. Iyanagi, T. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 520–528 (2005).
387. Peterson, J. A. Camphor binding by *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **144**, 678–693 (1971).
388. Peterson, J. A. *et al.* Cytochrome P-450terp. *J. Biol. Chem.* **267**, 14193–14203 (1992).
389. Kimmich, N. *et al.* Electron Transfer between Cytochrome P450cin and Its FMN-containing Redox Partner, Cindoxin. *J. Biol. Chem.* **282**, 27006–27011 (2007).
390. Stok, J. E., Yamada, S., Farlow, A. J., Slessor, K. E. & De Voss, J. J. Cytochrome P450cin (CYP176A1) D241N: Investigating the role of the conserved acid in the active site of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 688–696 (2013).
391. Bell, S. G., Tan, A. B. H., Johnson, E. O. D. & Wong, L.-L. Selective oxidative demethylation of veratric acid to vanillic acid by CYP199A4 from *Rhodopseudomonas palustris* HaA2. *Mol. BioSyst.* **6**, 206–214 (2010).
392. Coleman, T., Chao, R. R., De Voss, J. J. & Bell, S. G. The importance of the benzoic acid carboxylate moiety for substrate recognition by CYP199A4 from *Rhodopseudomonas palustris* HaA2. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1864**, 667–675 (2016).
393. Bell, S. G. *et al.* Crystal Structure of CYP199A2, a Para-Substituted Benzoic Acid Oxidizing Cytochrome P450 from *Rhodopseudomonas palustris*. *J. Mol. Biol.* **383**, 561–574 (2008).
394. Bell, S. G. *et al.* The crystal structures of 4-methoxybenzoate bound CYP199A2 and CYP199A4: structural changes on substrate binding and the identification of an anion binding site. *Dalt. Trans* **41**, 8703–8714 (2012).
395. Chao, R. R., De Voss, J. J. & Bell, S. G. The efficient and selective catalytic oxidation of para-substituted cinnamic acid derivatives by the cytochrome P450 monooxygenase, CYP199A4. *RSC Adv.* **6**, 55286–55297 (2016).
396. Furuya, T. & Kino, K. Biocatalytic synthesis of dihydroxynaphthoic acids by cytochrome P450 CYP199A2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2796–2799 (2009).
397. Furuya, T. & Kino, K. Regioselective oxidation of indole- and quinolinecarboxylic acids by cytochrome P450 CYP199A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1861–1868 (2010).
398. Bakker, T. Identifizierung und Klonierung von Dioxygenasen eines Papaverin-abbauenden Mikroorganismus. (Stuttgart, 2014).
399. Rosazza, J. P. *et al.* Microbial Models of Mammalian Metabolism *O* -Demethylations of Papaverine. *Xenobiotica* **7**, 133–143 (1977).
400. Döhr, O., Paine, M. J. I., Friedberg, T., Roberts, G. C. K. & Wolf, C. R. Engineering of a functional human NADH-dependent cytochrome P450 system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 81–86 (2001).
401. Neeli, R., Roitel, O., Scrutton, N. S. & Munro, A. W. Switching pyridine nucleotide specificity in P450 BM3: mechanistic analysis of the W1046H and W1046A enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 17634–17644 (2005).
402. Borlinghaus, N. & Nestl, B. Switching the cofactor specificity of an imine reductase. *ChemCatChem* **10**, 183–187 (2018).
403. Kitazume, T. *et al.* Kinetic analysis of hydroxylation of saturated fatty acids by recombinant p450foxy produced by an *Escherichia coli* expression system. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2075–2082 (2002).

404. Saïda, F., Uzan, M., Odaert, B. & Bontems, F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, 47–56 (2006).
405. Furuya, T., Arai, Y. & Kino, K. Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6087–6094 (2012).
406. Furuya, T., Shitashima, Y. & Kino, K. Alteration of the substrate specificity of cytochrome P450 CYP199A2 by site-directed mutagenesis. *J. Biosci. Bioeng.* **119**, 47–51 (2015).
407. Slessor, K. E. *et al.* An in vivo cytochrome P450 cin (CYP176A1) catalytic system for metabolite production. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **79**, 15–20 (2012).
408. Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the Arabinose PBAD Promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130 (1995).
409. Imlay, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* **77**, 755–776 (2008).
410. Guengerich, F. P. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–650 (2001).
411. Coleman, T., Chao, R. R., Bruning, J. B., De Voss, J. J. & Bell, S. G. CYP199A4 catalyses the efficient demethylation and demethenylation of para-substituted benzoic acid derivatives. *RSC Adv.* **5**, 52007–52018 (2015).
412. Watanabe, Y. *et al.* Oxidation of acyclic monoterpenes by P450 BM-3 monooxygenase: influence of the substrate E/Z-isomerism on enzyme chemo- and regioselectivity. *Tetrahedron* **63**, 9413–9422 (2007).
413. Chen, C. K. J. *et al.* Scanning chimeragenesis: The approach used to change the substrate selectivity of fatty acid monooxygenase CYP102A1 to that of terpene ω -hydroxylase CYP4C7. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 159–174 (2010).
414. Dietrich, J. A. *et al.* A novel semi-biosynthetic route for artemisinin production using engineered substrate-promiscuous P450BM3. *ACS Chem. Biol.* **4**, 261–267 (2009).
415. Seifert, A., Antonovici, M., Hauer, B. & Pleiss, J. An efficient route to selective bio-oxidation catalysts: an iterative approach comprising modeling, diversification, and screening, based on CYP102A1. *Chembiochem* **12**, 1346–1351 (2011).
416. Diez, J. *et al.* Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microb. Cell Fact.* **11**, 52 (2012).
417. Wenzel, S. C. & Müller, R. Myxobacteria-‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites. *Mol. Biosyst.* **5**, 567–574 (2009).
418. Wang, H., Zhang, L. & Shi, N. Screening of myxobacteria strains producing bioactive substances against breast cancer. *Mod. Appl. Sci.* **5**, 86–91 (2011).
419. Caspari, F. *et al.* Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 429–439 (2005).
420. Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Hofle, G.; Reichenbach, H. Apicularens A and B , New Cytostatic Macrolides from *Chondromyces* Species (Myxobacteria): Production, Physico-chemical and Biological Properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **51**, 1075–1080 (1998).
421. Kühlwein, H. Untersuchungen über *Chondromyces apiculatus* Thaxter (?). *Arch. Mikrobiol.* **408**, 403–407 (1952).
422. Capyk, J. K. *et al.* Mycobacterial cytochrome P450 125 (Cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of C27 steroids. *J. Biol. Chem.* **284**, 35534–35542 (2009).
423. Józwiak, I. K. *et al.* Structural basis of steroid binding and oxidation by the cytochrome P450 CYP109E1 from *Bacillus megaterium*. *FEBS J.* **283**, 4128–4148 (2016).
424. Di, Y. M., Chow, V. D.-W., Zhou, L.-P. Y. & Zhou, S.-F. Structure, Function, Regulation and Polymorphism of Human Cytochrome P450 2A6. *Current Drug Metabolism* **10**, 754–780 (2009).
425. Eiben, S. *et al.* Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases - a critical appraisal. *J. Biotechnol.* **124**, 662–669 (2006).

426. Khursan, S. L., Mikhailov, D. A., Yanborisov, V. M. & Borisov, D. I. AM1 calculations of bond dissociation energies. Allylic and benzylic C-H bonds. *React. Kinet. Catal. Lett.* **61**, 91–95 (1997).
427. Gossauer, A. *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle*. (Helvetica Chimica Acta, 2006).
428. Makino, T. *et al.* Biocatalytic synthesis of flavones and hydroxyl-small molecules by recombinant *Escherichia coli* cells expressing the cyanobacterial CYP110E1 gene. *Microb. Cell Fact.* **11**, 95 (2012).
429. Vallon, T. *et al.* Production of 1-Octanol from n-Octane by *Pseudomonas putida* KT2440. *Chemie Ing. Tech.* **85**, 841–848 (2013).
430. Shen, Y. *et al.* The Mechanism of β -cyclodextrin on the 11 β -Hydroxylation Biotransformation of Steroid. *3rd Int. Conf. Biomed. Eng. Informatics 1964–1967* (2010).
431. Asakawa, Y., Ishida, T., Toyota, M. & Takemoto, T. Terpenoid biotransformation in mammals IV. Biotransformation of (+)-longifolene, (-)- caryophyllene, (-)-caryophyllene oxide, (-)-cyclocolorenone, (+)-nootkatone, (-)-elemol, (-)- abietic acid and (+)-dehydroabietic acid in rabbits. *Xenobiotica* **16**, 753–767 (1986).
432. Bichlmaier, I. *et al.* Potent inhibitors of the human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 derived from the sesquiterpenoid alcohol longifolol. *ChemMedChem* **2**, 881–889 (2007).
433. Butler, C. F. *et al.* Human P450-like oxidation of diverse proton pump inhibitor drugs by “gatekeeper” mutants of flavocytochrome P450 BM3. *Biochem. J.* **460**, 247–259 (2014).
434. Neufeld, K., Marienhagen, J., Schwaneberg, U. & Pietruszka, J. Benzylic hydroxylation of aromatic compounds by P450 BM3. *Green Chem.* **15**, 2408–2421 (2013).
435. Roberts, A. G. *et al.* The role of cytochrome P450 BM3 phenylalanine-87 and threonine-268 in binding organic hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 669–677 (2016).
436. Ko, S., Yang, Y. H., Choi, K. Y. & Kim, B. G. rational design and directed evolution of CYP102A1 (BM3) for regio-specific hydroxylation of isoflavone. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **20**, 225–233 (2015).
437. Girhard, M. Bacterial Cytochrome P450 Monooxygenases: Investigations on Redox Partners and Optimization for Whole-Cell Biocatalysis. (Düsseldorf, 2010).
438. Schulz, S. *et al.* Selective enzymatic synthesis of the grapefruit flavor (+)-nootkatone. *ChemCatChem* **7**, 601–604 (2015).
439. Harford-Cross, C. F. *et al.* Protein engineering of cytochrome P450cam (CYP101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Protein Eng. Des. Sel.* **13**, 121–128 (2000).
440. Conner, K. P., Woods, C. M. & Atkins, W. M. Interactions of cytochrome P450s with their ligands. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 56–65 (2011).
441. Lill, J. S. *et al.* Pharmacokinetics of diclofenac sodium in chronic active hepatitis and alcoholic cirrhosis. *J. Clin. Pharmacol.* **40**, 250–257 (2000).
442. Webster, R., Pacey, M., Winchester, T., Johnson, P. & Jezequel, S. Microbial oxidative metabolism of diclofenac: Production of 4'-hydroxydiclofenac using *Epicoccum nigrum* IMI354292. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 371–376 (1998).
443. Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T. & Lema, J. M. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation* **23**, 145–156 (2012).
444. Quinn, L., Dempsey, R., Casey, E., Kane, A. & Murphy, C. D. Production of drug metabolites by immobilised *Cunninghamella elegans*: from screening to scale up. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 799–806 (2015).
445. Weis, R. *et al.* A diversified library of bacterial and fungal bifunctional cytochrome P450 enzymes for drug metabolite synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **351**, 2140–2146 (2009).
446. Sandmann, G. in *Biotechnology of Isoprenoids* (eds Schrader, J. & Bohlmann, J.) 449–467 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/10_2014_277
447. Li, X.-R., Tian, G.-Q., Shen, H.-J. & Liu, J.-Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce zeaxanthin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 627–636 (2015).

448. Blasco, F., Kauffmann, I. & Schmid, R. D. CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first β -carotene hydroxylase of the P450 superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 671–674 (2004).
449. Khachik, F. & Chang, A.-N. Process or synthesis of (3S)- and (3R)-3-Hydroxy-beta-ionone, and their transformation to zeaxanthin and beta-cryptoxanthin. (2012). doi:10.1016/j.(73)
450. Sode, K., Karube, I., Araki, R. & Mikami, Y. Microbial conversion of beta-ionone by immobilized *Aspergillus niger* in the presence of an organic solvent. *Biotechnol Bioeng* **33**, 1191–1195 (1989).
451. Lutz-Wahl, S. *et al.* Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3878–3881 (1998).
452. Dietrich, M. *et al.* Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 931–940 (2008).
453. Hall, E. A. & Bell, S. G. The efficient and selective biocatalytic oxidation of norisoprenoid and aromatic substrates by CYP101B1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444. *RSC Adv.* **5**, 5762–5773 (2015).
454. Cankar, K. *et al.* Valencene oxidase CYP706M1 from Alaska cedar (*Callitropsis nootkatensis*). *FEBS Lett.* **588**, 1001–1007 (2014).
455. Gavira, C. *et al.* Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* **18**, 25–35 (2013).
456. Cankar, K. *et al.* A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Lett.* **585**, 178–182 (2011).
457. Abraham, W. R. & Stumpf, B. Biotransformation of humulene by fungi and enantioselectivity of the strains used. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **42**, 79–86 (1987).
458. Krügener, S., Krings, U., Zorn, H. & Berger, R. G. A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresour. Technol.* **101**, 457–462 (2010).
459. Kolev, J. N., Zaengle, J. M., Ravikumar, R. & Fasan, R. Enhancing the Efficiency and Regioselectivity of P450 Oxidation Catalysts by Unnatural Amino Acid Mutagenesis. *ChemBioChem* **15**, 1001–1010 (2014).
460. Furusawa, M., Ashimoto, T. H., Oma, Y. N. & Sakawa, Y. A. Biotransformation of Citrus Aromatics Nootkatone and Valencene by Microorganisms. *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 1423–1429 (2005).
461. Kraker, J. De *et al.* Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron* **59**, 409–418 (2003).
462. Kaspera, R., Krings, U., Nanzad, T. & Berger, R. G. Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 477–483 (2005).
463. Mouri, T., Kamiya, N. & Goto, M. Increasing the catalytic performance of a whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam system by stabilization of an electron transfer component. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1509–1513 (2006).
464. Belsare, K. D. *et al.* P-Link: A method for generating multicomponent cytochrome P450 fusions with variable linker length. *Biotechniques* **57**, 13–20 (2014).
465. Ciaramella, A., Minerdi, D. & Gilardi, G. Catalytically self-sufficient cytochromes P450 for green production of fine chemicals. *Rend. Fis. Acc. Lincei* **28**, 1–13 (2017).
466. Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. & Stanier, R. Y. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* **49**, 25–68 (1957).

7. Anhang

7.1 Aminosäuren

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

7.2 P450 Rhf

Tabelle S1: Analyse der P450 RhF Fusion Integrität durch CO-Differenzspektroskopie.

Probe	Reduktionsmittel	Änderung der Absorption		Verdünnung	P450-Konzentration (μM)
		450 nm	490 nm		
Lysat (von wachsenden Zellen)	Natriumdithionit	0,132	0,025	8	9,4
	NADPH	0,197	0,005	4	8,4
Lysat (von ruhenden Zellen)	Natriumdithionit	0,11	0	8	9,7
	NADPH	0,0176	-0,006	4	8,0
IMAC gereinigtes P450 RhF	Natriumdithionit	0,135	0,003	10	14,5
	NADPH	0,008	0,004	10	0,44

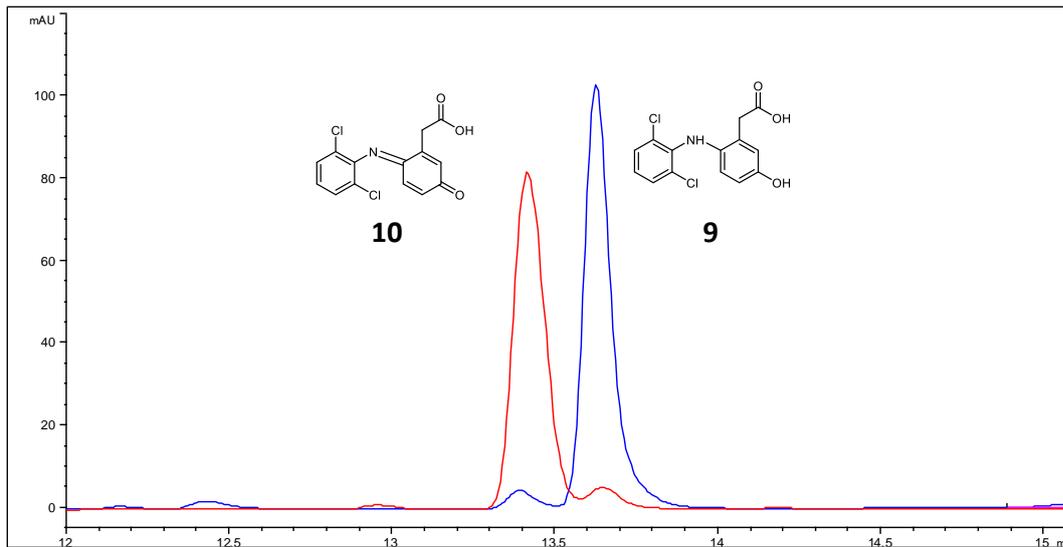


Abbildung S1: HPLC-Chromatogramm der beiden durch NMR-charakterisierten Diclofenacmetaboliten (**9**) und (**10**). Die beiden Metaboliten wurden einzeln gemessen und die Chromatogramme anschließend überlagert.

7.3 NSAID-Hydroxylierung durch Eukaryoten

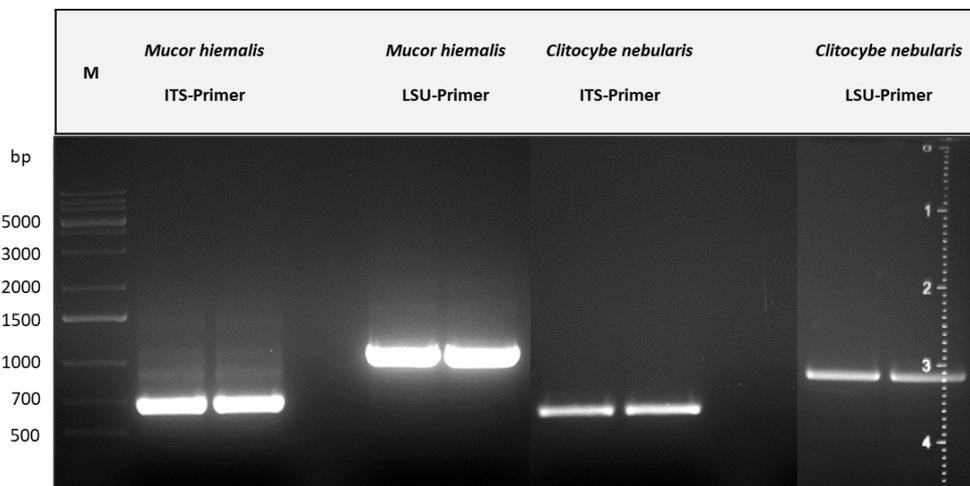


Abbildung S2: Agarosegel der PCRs mit den LSU und ITS Primer. Die Fragmente wurden auf einem 1,5% Agarosegel getrennt.

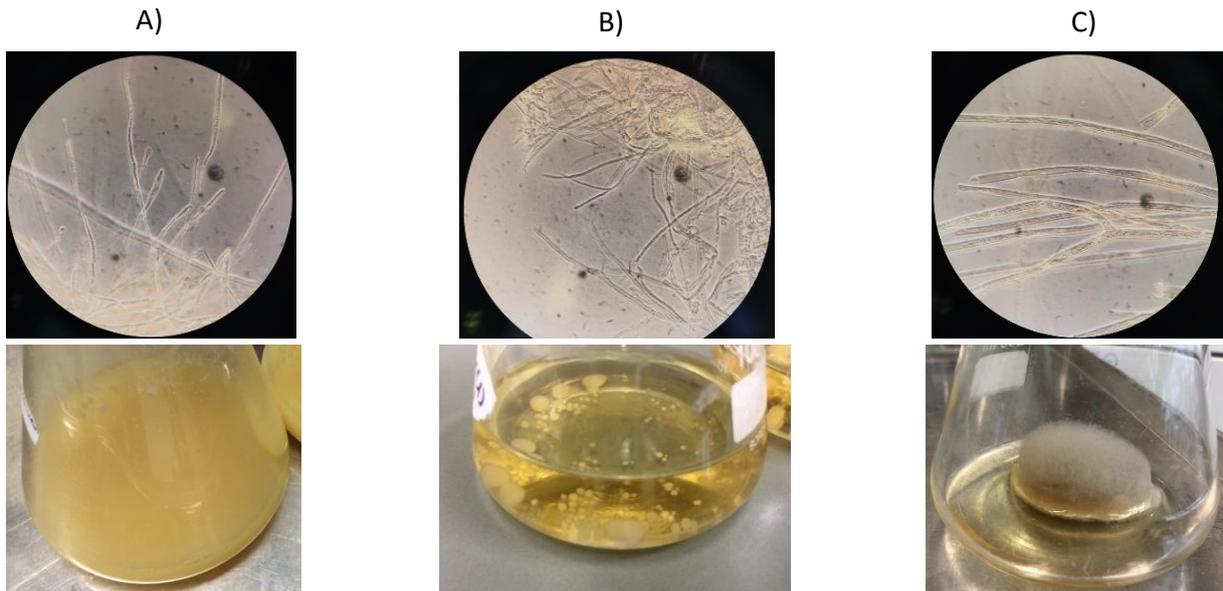


Abbildung S3: Unterschiedliche Wuchsformen der filamentösen Pilze unter dem Mikroskop und in KGM-Flüssigkultur. A) *Beauveria bassiana*; B) *Clitocybe nebularis*; C) *Mucor hiemalis*.

7.4 Neue P450s aus *Arthrobacter* sp., *Ralstonia metallidurans* und *C. apiculatus*

7.4.1 Wachstumsversuche mit *Arthrobacter* sp.

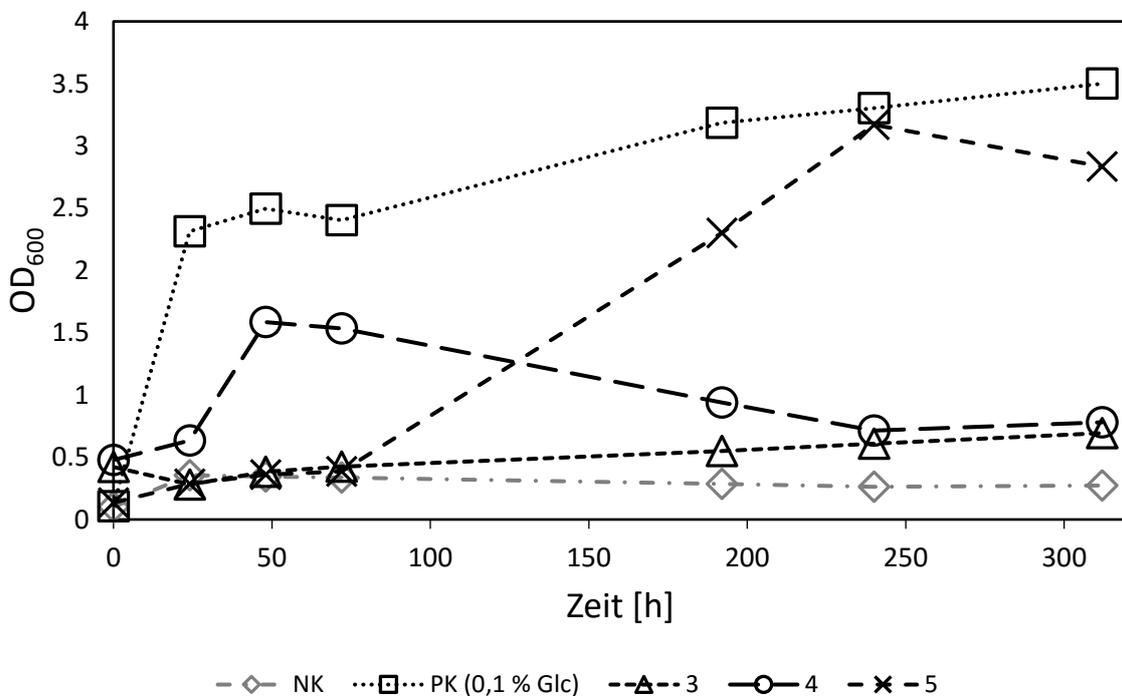


Abbildung S4: Wachstumsversuche auf unterschiedlichen C-Quellen mit *Arthrobacter* sp. Die Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. NK: ohne C-Quelle; 3: α -Humulene; 4: β -Bisabolene; 5: Premnaspriodien

7.4.2 Spektroskopische Charakterisierung der *Arthrobacter* sp. P450s

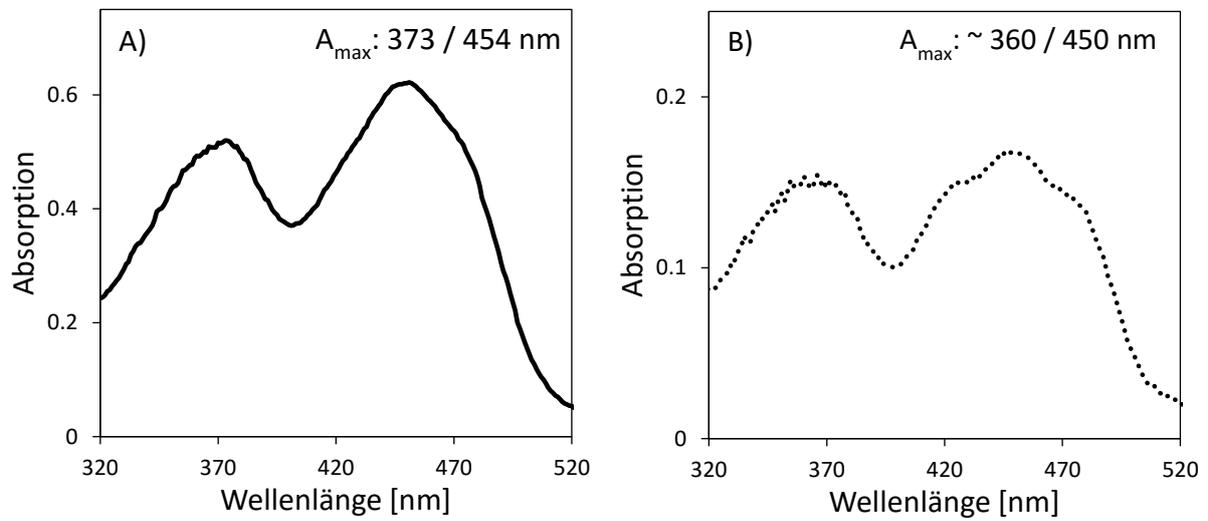


Abbildung S5: Absorptionsspektren der physiologischen Redoxpartner FeRed_1 und FADox aus *Arthrobacter* sp. A) FeRed_1 B) FADox.

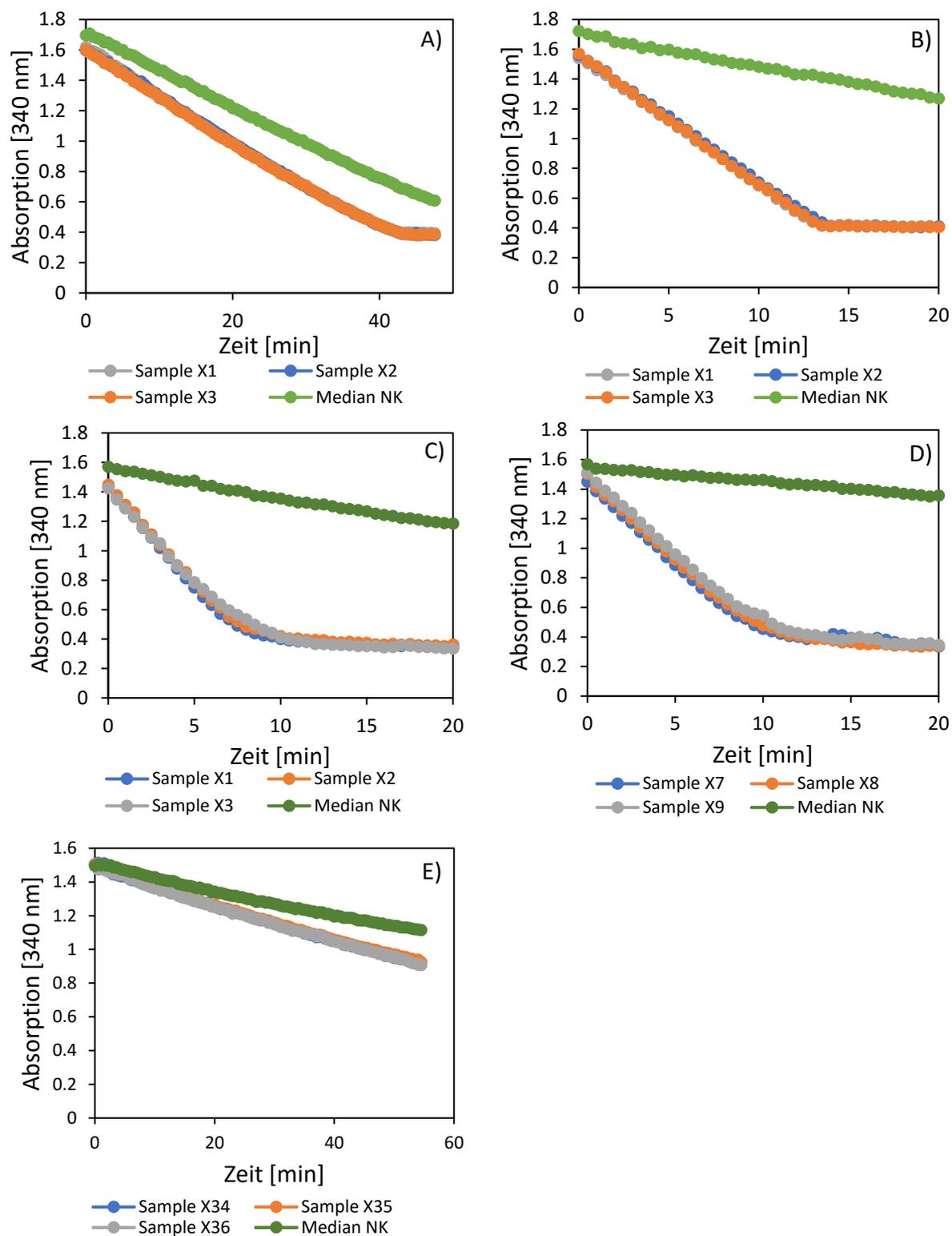
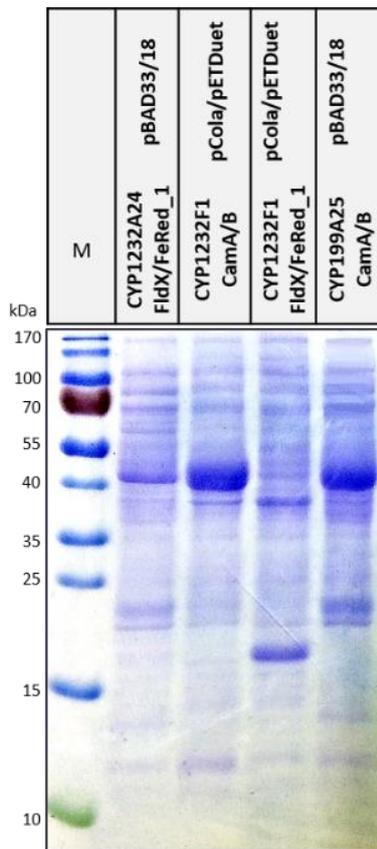


Abbildung S6: NAD(P)H-Assay der P450s aus *Arthrobacter* sp. A) CYP199A25 + CamA/B + 37 (NADH); B) CYP1232F1 + CamA/B + 38 (NADH); C) CYP1232F1 + FeRed_1/FldX + 38 (NADPH); D) CYP1232A24 + FeRed_1/FldX + 40 (NADPH); E) CYP1232F1 + FeRed_1/FldX + 38 (NADH).

7. Anhang

7.4.3 Dual-Vektor-Systeme



Expressionsstamm	Konstrukt	Änderung der Absorption			Verdünnung	P450-Konzentration [μM]
		420 nm	450 nm	490 nm		
JW5510	pBAD33_CYP1232A24 pBAD18_FldX + FeRed_1	0	0,192	-0,005	2	4,3
Rosetta (DE3)	pCola_CYP1232F1 + CamB pETDuet_CamB + CamA	0,05	0	0	2	0
Rosetta (DE3)	pCola_CYP1232F1 + FldX pETDuet_FldX + FeRed_1	0,047	0,002	-0,005	2	0,15
JW5510	pBAD33_CYP199A25 pBAD18_CamB + CamA	0	1,309	0,378	4	40,9

Abbildung S7: SDS-PAGE und CO-Differenzspektroskopie der *Arthrobacter sp.* *in vivo* Dual-Vektor Systeme.

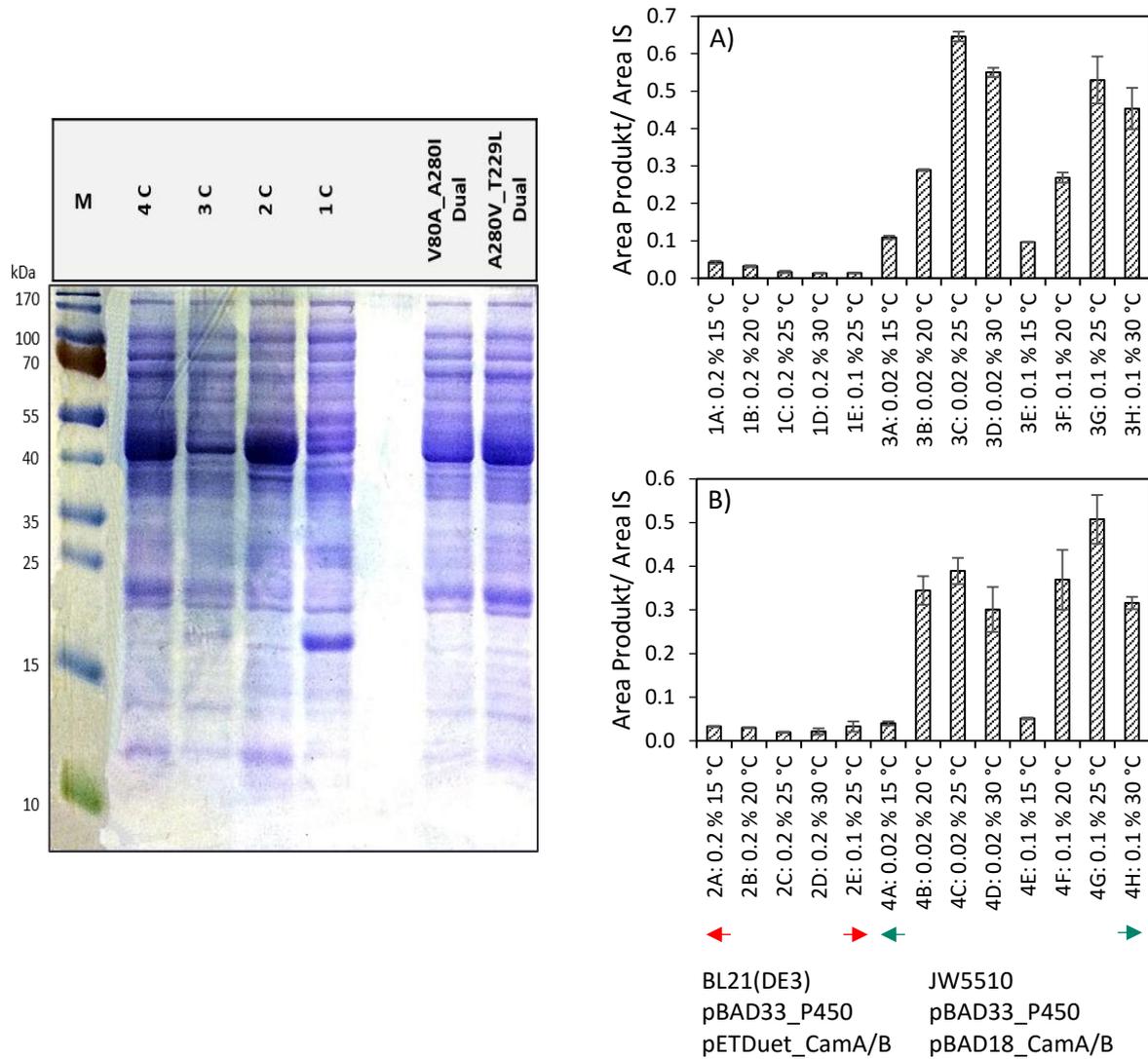


Abbildung S8: Untersuchung unterschiedlicher Bedingungen zur Expression und Biotransformation der Dual-Vektor-Systeme CYP109Q5 CamA/B und CYP1232A24 FeRed1/FldX. Das SDS-PAGE zeigt die CYP109Q5 Varianten V80A/A280I und A280V/T229L mit CamA/B sowie die Expressionen 1C (*E. coli* BL21(DE3) pBAD33_CYP1232A24 pETDuet_FldX und FeRed_1), 2C (*E. coli* BL21(DE3) pBAD33_CYP109Q5 pETDuet_CamA/B), 3C (*E. coli* JW5510 pBAD33_CYP1232A24 pBAD18_FldX und FeRed_1) und 4C (*E. coli* JW5510 pBAD33_CYP109Q5 pBAD18_FldX und FeRed_1). Diagramm A zeigt die *in vivo* Aktivitäten unterschiedlicher Expressionen mit CYP1232A24 respektive CYP109Q5 (B) und 5 mM β -Ionon als Substrat.

7. Anhang

Tabelle S2: CO-Differenzspektren der auf dem SDS-PAGE in Abbildung S8 aufgetragenen Expressionen.

Probe	Expressions-stamm	Konstrukt	Änderung der Absorption			Verdünnung	P450-Konzentration [μM]
			420 nm	450 nm	490 nm		
1C	BL21 (DE3)	pBAD33_CYP1232A24 pETDuet_FldX + FeRed_1	0,02	0	0	2	0
2C	BL21 (DE3)	pBAD33_CYP109Q5 pETDuet_CamB + CamA	0,06	0	0	2	0
3C	JW5510	pBAD33_CYP1232A24 pBAD18_FldX + FeRed_1	0	0,107	-0,002	2	2,4
4C	JW5510	pBAD33_CYP109Q5 pBAD18_CamB + CamA	0	0,262	0,005	2	5,7
V80A_ A280I_ Dual	JW5510	pBAD33_CYP109Q5_V80A_ A280I pBAD18_CamB + CamA	0,4	0,226	0,099	4	5,6
A280V_ T229L_ Dual	JW5510	pBAD33_CYP109Q5_A280V _T229L pBAD18_CamB + CamA	0,4	0,411	0,155	4	11,2

7.4.4 CO-Differenzspektren und ausgewählte GC-Chromatogramme der ITB1693 Varianten

Tabelle S3: CO-Differenzspektren der Lysate von ITB1693 Varianten und des ITB1696 WT.

Konstrukt	Änderung der Absorption			Verdünnun g	P450-Konzentration [μM]
	420 nm	450 nm	490 nm		
WT	-0,015	0,057	0	4	2,5
F95A	0,03	0,028	0,005	4	1,0
F95G	0,044	0,015	0,008	8	0,6
F95V	-0,017	0,185	0	4	8,3
F95I	0,032	0,046	0,022	8	2,1
F95L	0,056	0,15	0,035	8	10,1
F95A/A337L	0,062	0,051	0	8	4,5
F95A/A337I	0,101	0,008	-0,013	8	1,8
F95A/A337V	0,022	0,054	0,002	4	2,3
F95V/A337L	-0,013	0,048	-,018	8	5,8
F95V/A337I	0,071	0,021	0,015	8	0,5
F95V/A337V	0,066	0,059	-0,005	8	5,6
ITB1696 WT (pBAD33)	0,163	0,124	0,071	4	2,3

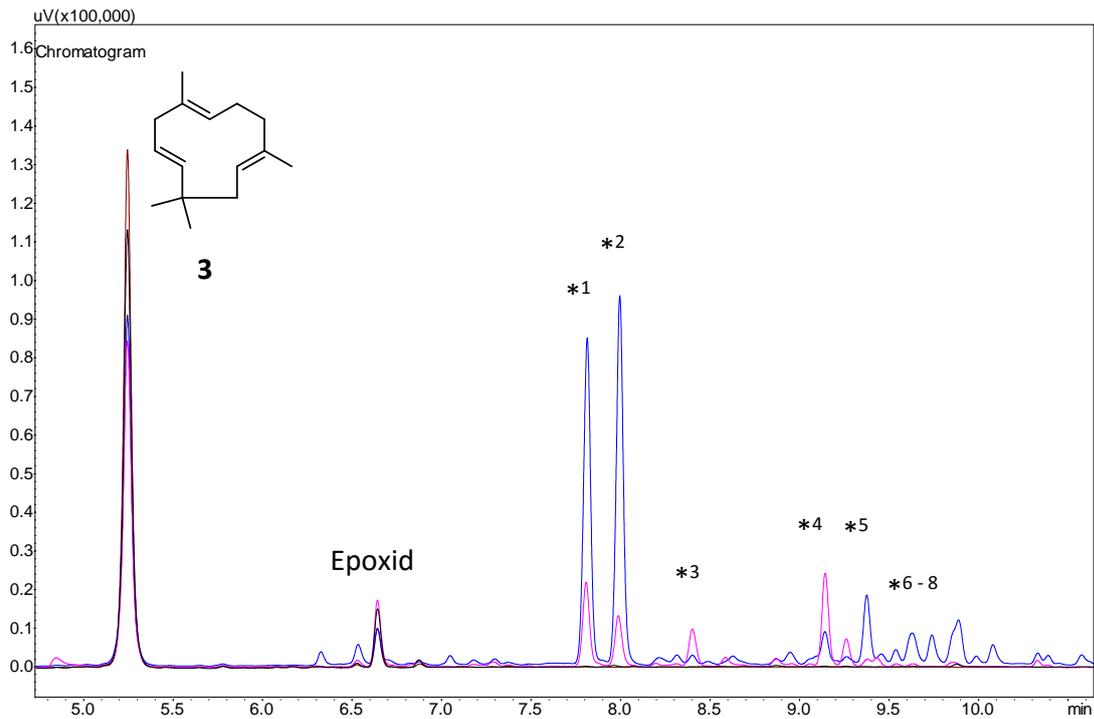


Abbildung S9: GC-Chromatogramm der ITB1693 *in vivo* Biotransformationen mit α -Humulen (**3**). Braun: NK ohne Zellen, Schwarz: ITB1693 WT; Magenta: ITB1693 F95A; Blau: ITB1693 F95G. *1 - 8 m/z 220 (Hydroxylierungs- oder Epoxidierungsprodukte).

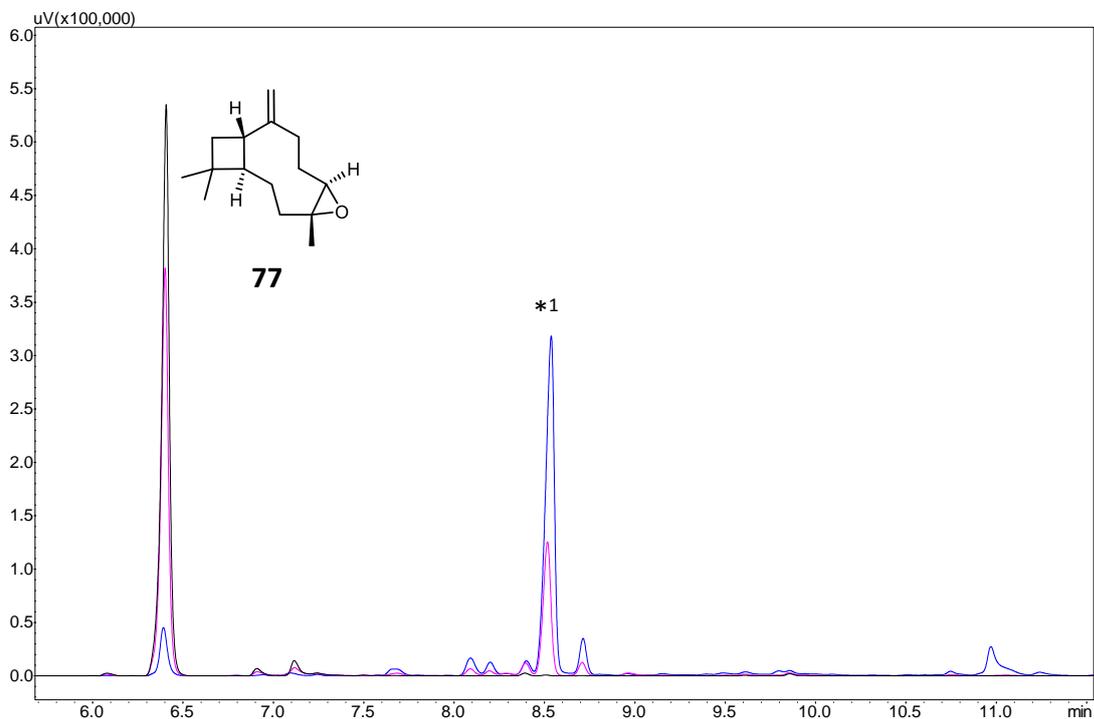


Abbildung S10: GC-Chromatogramm der ITB1693 *in vivo* Biotransformationen mit Caryophyllenoxid (**77**). Schwarz: ITB1693 WT; Magenta: ITB1693 F95A; Blau: ITB1693 F95G. *1: m/z 236 (Hydroxylierungs- oder Epoxidierungsprodukt).

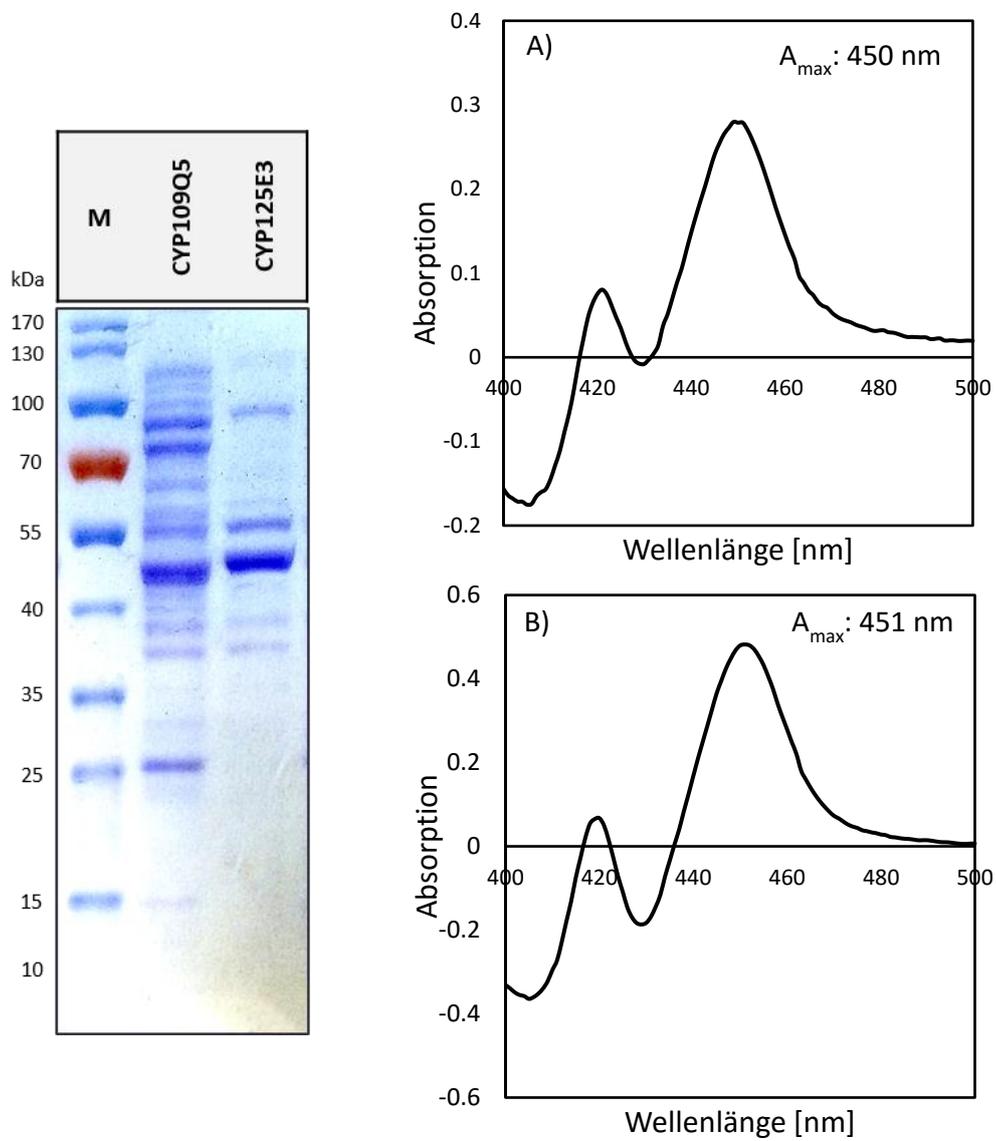
7.4.5 Spektroskopische Charakterisierung der *C. apiculatus* P450s

Abbildung S11: SDS-PAGE und CO-Spektren der aufgereinigten *C. apiculatus* P450s CYP109Q5 (A) und CYP125E3 (B).

7. Anhang

7.4.6 Screening alternativer Redoxpartner

Tabelle S4: *Screening* unterschiedlicher Redoxpartnerkombinationen mit CYP1232A24, CYP1232F1, CYP199A25 und CYP109Q5. Als Vergleich diente das Redoxsystem CamA und CamB (definiert als 100%). n.a. (nicht analysiert)

Nicht-physiologische Redoxpartner	Stoichiometrie / Volumenverhältnis (P450: Reduktase: Ferredoxin)	CYP1232	CYP1232F1	CYP199A25	CYP109Q5
		A24 β-Ionon	3,4-Dimethoxy-phenyl-essigsäure	3,4-Dimethoxy-benzoesäure	β-Ionon
Umsatz [% CamA + CamB]					
CamA + CamB	1 : 1,5 : 15	100	100	100	100
FdR + AdX	1 : 1,5 : 15	0	Spuren	0	n.a.
FdR + FdX	1 : 1,5 : 15	0	Spuren	0	10
BMR	1: 1,5	0	2	Spuren	1
Mix 1 (Cam A + FdX-01)	1: 1,5: 25 µL	n.a.	92	164	94
Mix 2 (FdR-01 + CamB)	1: 10 µL: 15	n.a.	18	62	28
FdR-01 + FdX-01	2 µM: 10 µL: 25 µL	26	37	107	37
FdR-02 + FdX-02	2 µM: 10 µL: 25 µL	34	10	3	15
FdR-03 + FdX-03	2 µM: 10 µL: 25 µL	72	0	3	14
FdR-03 + FdX-04	2 µM: 10 µL: 25 µL	41	0	1	6
CamA + FdX-05	1: 1,5: 25 µL	358	106	173	19
FdR-02 + FdX-07	2 µM: 10 µL: 25 µL	56	97	95	33
CamA + FdX-08	1: 1,5: 25 µL	24	2	1	2
CamA + FdX-09	1: 1,5: 25 µL	27	3	1	3
CamA + FdX-10	1: 1,5: 25 µL	24	3	0	2
FdR-03 + FdX-11	2 µM: 10 µL: 25 µL	27	3	0	3
CamA + FdX-12	1: 1,5: 25 µL	26	0	0	4
CamA + FdX-13	1: 1,5: 25 µL	26	3	0	3
FdR-02 + FdX-14	2 µM: 10 µL: 25 µL	26	55	110	7
CamA + FdX-15	1: 1,5: 25 µL	23	12	19	5
FdR-03 + FdX-15	2 µM: 10 µL: 25 µL	52	93	81	13
FdR-03 + FdX-16	2 µM: 10 µL: 25 µL	24	0	1	3

Nicht-physiologische Redoxpartner	Stoichiometrie / Volumenverhältnis (P450: Reduktase: Ferredoxin)	CYP1232 A24	CYP1232F1	CYP199A25	CYP109Q5
		β -Ionon	3,4-Dimethoxy-phenyl-essigsäure	3,4-Dimethoxy-benzoesäure	β -Ionon
Umsatz [% CamA + CamB]					
CamA + FdX-17	1: 1,5: 25 μ L	32	7	3	58
CamA + FdX-18	1: 1,5: 25 μ L	31	3	1	6
FdR-02 + FdX-19	2 μ M: 10 μ L: 25 μ L	32	29	17	11
FdR-02 + FdX-20	2 μ M: 10 μ L: 25 μ L	26	0	0	3
FdR-03 + FdX-21	2 μ M: 10 μ L: 25 μ L	21	0	1	1
FdR-02 + FdX-22	2 μ M: 10 μ L: 25 μ L	22	2	0	3
FdR-03 + FdX-23	2 μ M: 10 μ L: 25 μ L	21	0	0	4
FdR-02 + FdX-24	2 μ M: 10 μ L: 25 μ L	23	0	0	3
Arthrobacter sp. Redoxpartner					
FeRed_1 + FldX	1: 1,5 : 30 μ L	1980	100	Spuren	n.a.
FlavRed + FldX	2 μ M: 10 μ L : 30 μ L	0	n.a.	n.a.	n.a.
Mischung					
CamA + FldX	1: 1,5 : 30 μ L	n.a.	n.a.	0	n.a.
FeRed1_CamB	1: 1,5: 15	n.a.	n.a.	54	n.a.

7.4.7 Gesamtüberblick der Screenings der neu identifizierten P450s

Tabelle S5: Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Substrate und Übersicht der erzielten Ergebnisse, mit den weitergehend untersuchten CYP1232A24, CYP1232F1, CYP1005C4, CYP199A25, CYP125E3 sowie CYP109Q5. Außer CYP116B3 und ITB1693 handelt es sich bei den P450s um Klasse II P450s, die die Elektronen über nicht-fusionierte Redoxpartner erhalten. Die Substrate wurden jeweils mit einem funktionalen aktiven Redoxpartner getestet. Für CYP1005C4 wurde bislang keine aktive Kombination aus Substrat und Redoxpartner gefunden weshalb für alle getesteten Substrate die Redoxpartner CamA und CamB, FdR und FdX sowie FdR und AdX verwendet wurden. Die Umsätze wurden, falls kein Produktstandard vorlag, anhand der Verhältnisse der Produkt-Peakflächen zum internen Standard abgeschätzt. - (kein Umsatz), + (< 10%), ++ (10 - 50%), +++ (> 50%), s (selektiv, 1 Produkt), n.a. (nicht analysiert).

Nummer	Substrat	CYP116B3	ITB1693	CYP1232A24	CYP1232F1	CYP1005C4	CYP199A25	CYP125E3	CYP109Q5
Norisoprenoide, Mono- und Sesquiterpene									
1	β -Ionon	-	+ (s) ^{c)}	+++ (s)	-	- a)	- a)	++	+++
2	Vinylionol	-	-	-	-	- a)	- a)	Spuren	++
3	α -Humulen	-	-	-	-	- a)	- a)	-	++
4	β -Bisabolen	-	-	-	-	- a)	- a)	-	+
5	Premnaspirodien	-	-	-	-	- a)	- a)	-	++
6	Longifolen	-	-	-	-	- a)	- a)	-	+
7	Valencen	-	+ ^{c)}	-	-	- a)	- a)	-	+
75	Nootkaton	-	+	-	-	- a)	- a)	+	+
77	Caryophyllenoxid	n.a.	Spuren	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++
78	β -Caryophyllen	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++
79	Aromadendren	n.a.	Spuren	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	Spuren
80	Zerumbon	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+
81	β -Damascon	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+++
82	α -Ionon	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+++
83	Pseudoionon	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++	++
84	α -Terpineol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	+	+
85	Carvon	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	+	+
86	Linalool	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	+	+
87	Terpinolen	n.a.	+	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	+	Spuren
88	Geranylaceton	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	+++	+++

Nummer	Substrat	CYP11B3	ITB1693	CYP123A24	CYP123F1	CYP1005C4	CYP199A25	CYP125E3	CYP109Q5
89	Nerolidol	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	+
90	Camphor	n.a.	n.a.	n.a.	-	- a)	n.a.	Spuren	+
91	Pinen	n.a.	n.a.	n.a.	-	- a)	n.a.	n.a.	-
92	Limonen	n.a.	n.a.	n.a.	-	- a)	n.a.	+	+
93	Geraniol	n.a.	n.a.	n.a.	-	- a)	- a)	n.a.	n.a.
94	Nerol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	+	+
98	Farnesen	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	n.a.	n.a.
99	Citral	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	- a)	n.a.	n.a.
NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)									
8	Diclofenac	n.a.	n.a.	n.a.	-	- a)	n.a.	n.a.	++ (s)
13	Naproxen	n.a.	n.a.	++ (s)	-	n.a.	n.a.	-	-
15	Ibuprofen	n.a.	n.a.	Spuren	Spuren	n.a.	n.a.	Spuren	++ (s)
19	Mefenaminsäure	n.a.	n.a.	-	-	n.a.	n.a.	-	++ (s)
Aromaten									
24	Fluoren	+ b)	n.a.	n.a.	-	- a)	- a)	n.a.	-
27	Ethylbenzen	++	+++	n.a.	-	- a)	n.a.	n.a.	n.a.
28	Naphthalen	+ b)	n.a.	n.a.	-	- a)	n.a.	n.a.	n.a.
29	3-Methylanisol	++	+++	+	-	- a)	- a)	n.a.	n.a.
30	4-Ethylphenol	++	+	n.a.	n.a.	- a)	n.a.	n.a.	n.a.
31	Anisol	++	++	n.a.	-	- a)	- a)	n.a.	n.a.
32	Diphenylmethan	+	+++	n.a.	-	- a)	n.a.	n.a.	n.a.
33	Allylbenzen	+	+++	n.a.	-	- a)	n.a.	n.a.	n.a.
34	4-Allylanisol	++	+++	n.a.	n.a.	- a)	- a)	n.a.	n.a.
43	1,2,4-Trimethoxybenzen	n.a.	n.a.	n.a.	-	- a)	- a)	n.a.	n.a.
44	3-Methoxybenzylalkohol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- a)	- a)	n.a.	n.a.
65	Eugenol	n.a.	n.a.	+	+	- a)	n.a.	-	-
67	3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd	n.a.	n.a.	+(s)	n.a.	- a)	- a)	n.a.	n.a.

Nummer	Substrat	CYP116B3	ITB1693	CYP123A24	CYP123F1	CYP1005C4	CYP199A25	CYP125E3	CYP109Q5
69	Guajacol	n.a.	n.a.	+	-	- ^{a)}	- ^{a)}	-	-
95	<i>cis</i> -Stilben	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+	+
100	1,2-Dichlorbenzol	-	+	n.a.	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
121	Phenanthren	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	n.a.	n.a.	-
122	<i>trans</i> -Stilben	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	-
123	Mequinol	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
124	Acetophenon	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	n.a.	n.a.	n.a.
125	Cumol	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	-
Carbonsäuren									
37	4-Methoxybenzoesäure	n.a.	n.a.	++ (s)	Spuren	n.a.	+++ (s) ^{a)}	n.a.	n.a.
38	3,4-Dimethoxyphenyl- essigsäure	n.a.	n.a.	+++ (s)	+++ (s)	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
39	3,4- Dimethoxybenzoesäure	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	+++ (s) ^{a)}	n.a.	n.a.
40	Homovanillinsäure	n.a.	n.a.	+++ (s)	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
41	3-Hydroxy-4- methoxyphenyl- essigsäure	n.a.	n.a.	+++ (s)	+	(s)	n.a.	n.a.	n.a.
45	3-Hydroxy-4- methoxybenzoesäure (Isovanillinsäure)	n.a.	n.a.	+++ (s)	Spuren	n.a.	++ (s) ^{a)}	n.a.	n.a.
48	3-Methoxy-4- hydroxybenzoesäure (Vanillinsäure)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.
49	<i>p</i> -Toluylsäure	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++ ^{a)}	n.a.	n.a.
51	4-Ethylbenzoesäure	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++ ^{a)}	n.a.	n.a.
57	4-Isopropylbenzoesäure	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+ ^{a)}	n.a.	n.a.
60	4-Methoxyzimtsäure	n.a.	n.a.	++ (s)	-	n.a.	++ (s) ^{a)}	n.a.	n.a.
68	3-Methoxyphenyl- essigsäure	n.a.	n.a.	+++ (s)	+	(s)	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.

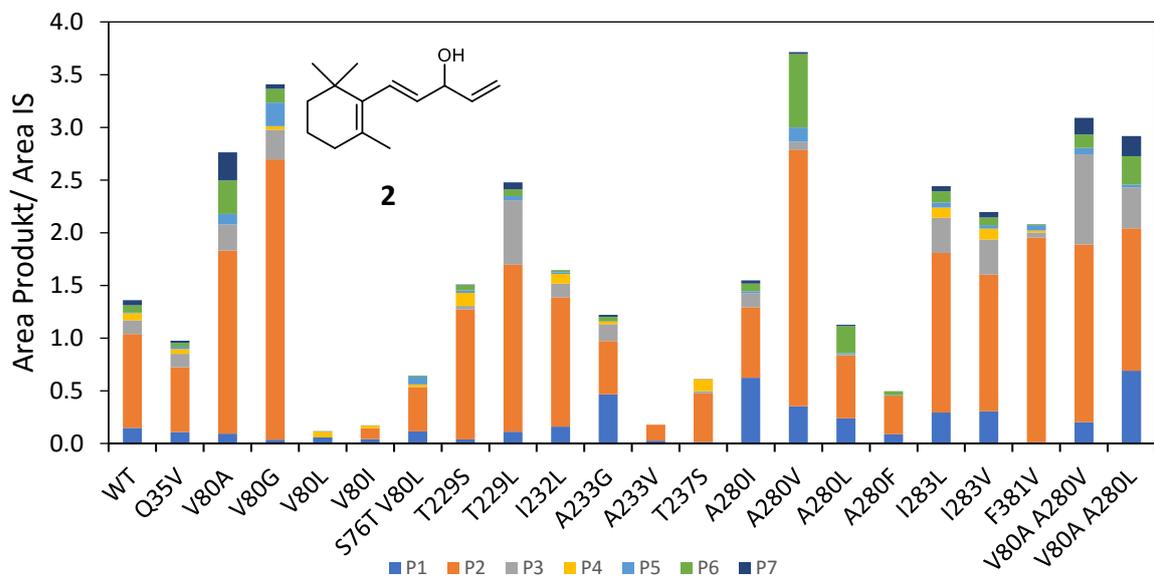
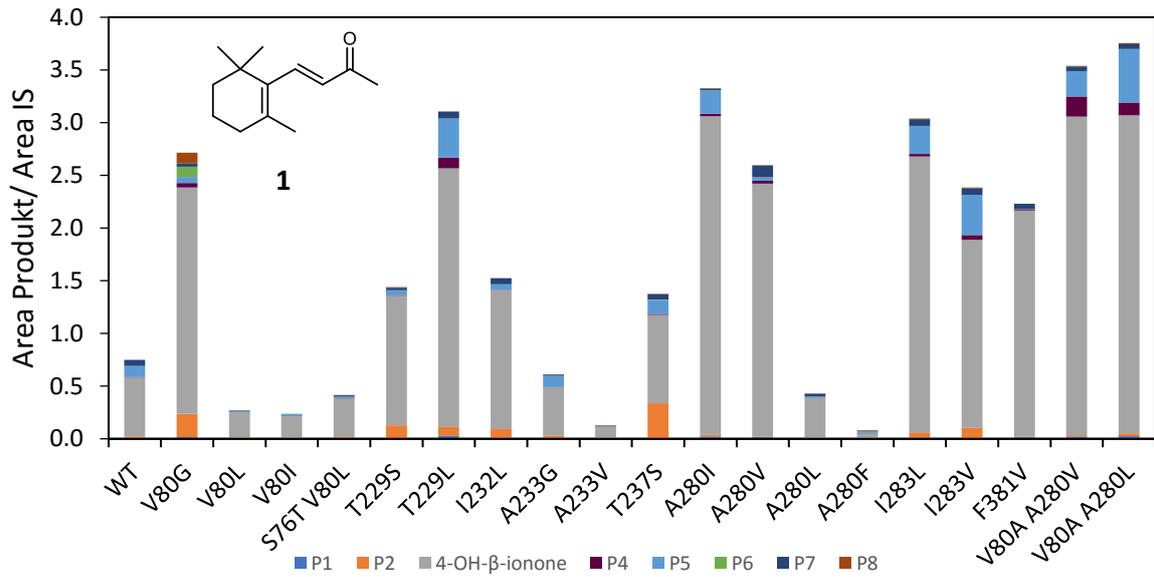
Nummer	Substrat	CYP116B3	ITB1693	CYP1232A24	CYP1232F1	CYP1005C4	CYP199A25	CYP125E3	CYP109Q5
70	Zimtsäure	n.a.	n.a.	-	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	-
116	2-Naphtoesäure	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- ^{a)}	n.a.	n.a.
117	Nikotinsäure								
119	Phenylelessigsäure	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	-
120	2-Phenoxypropionsäure	n.a.	n.a.	-	n.a.	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
126	4-Hydroxyphenyl- essigsäure	n.a.	n.a.	-	n.a.	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
127	3-Hydroxy-4- methoxyzimtsäure	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	- ^{a)}	n.a.	n.a.
Fettsäuren									
62	Laurinsäure (C12)	n.a.	Spuren _{c)}	+	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	Spuren
63	Mirystinsäure (C14)	n.a.	Spuren _{c)}	n.a.	n.a.	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	Spuren
64	Palmitinsäure (C16)	n.a.	+ ^{c)}	n.a.	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	Spuren
Steroide									
96	Progesteron	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- ^{a)}	n.a.	-	++
97	Testosteron	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- ^{a)}	n.a.	-	++
Weitere Substrate									
22	7-Ethoxycoumarin	++ (s)	-	-	-	- ^{a)}	- ^{a)}	-	-
35	Papaverin	n.a.	n.a.	-	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
36	Imidacloprid	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	- ^{a)}	n.a.	n.a.	n.a.
66	3-Chloro-4- methoxyanilin	n.a.	n.a.	+(s)	++	- ^{a)}	- ^{a)}	-	-
128	Dodecan	n.a.	- ^{c)}	n.a.	-	- ^{a)}	n.a.	n.a.	n.a.
129	4-Nitroacetanilid	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	- ^{a)}	n.a.	n.a.
130	trans-5-decene	n.a.	- ^{c)}	n.a.	-	n.a.	- ^{a)}	n.a.	n.a.
131	octanol	n.a.	n.a.	n.a.	-	- ^{a)}	n.a.	n.a.	n.a.

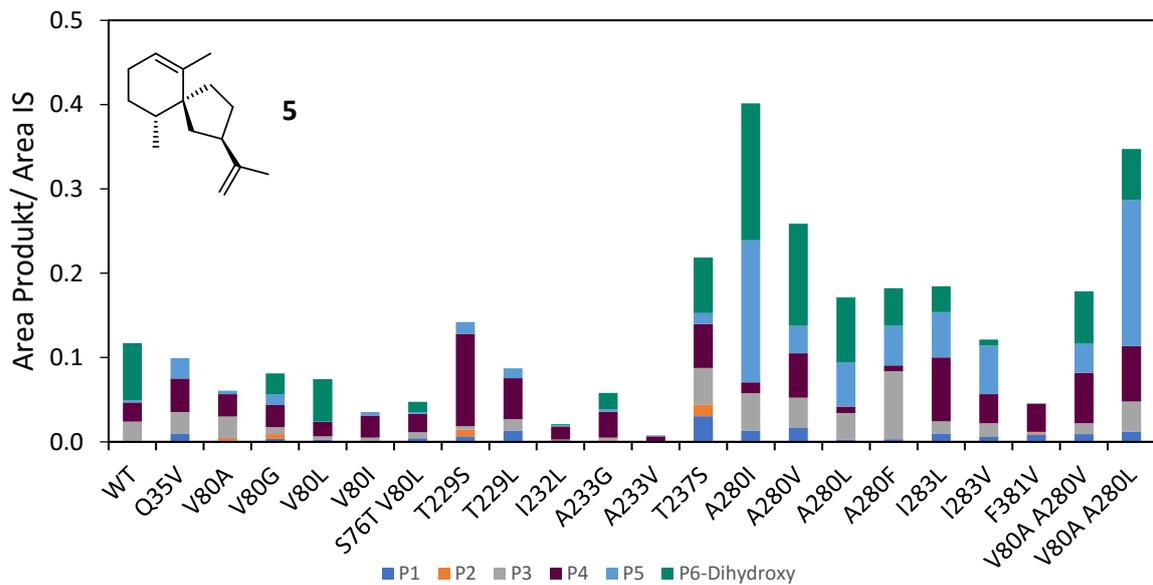
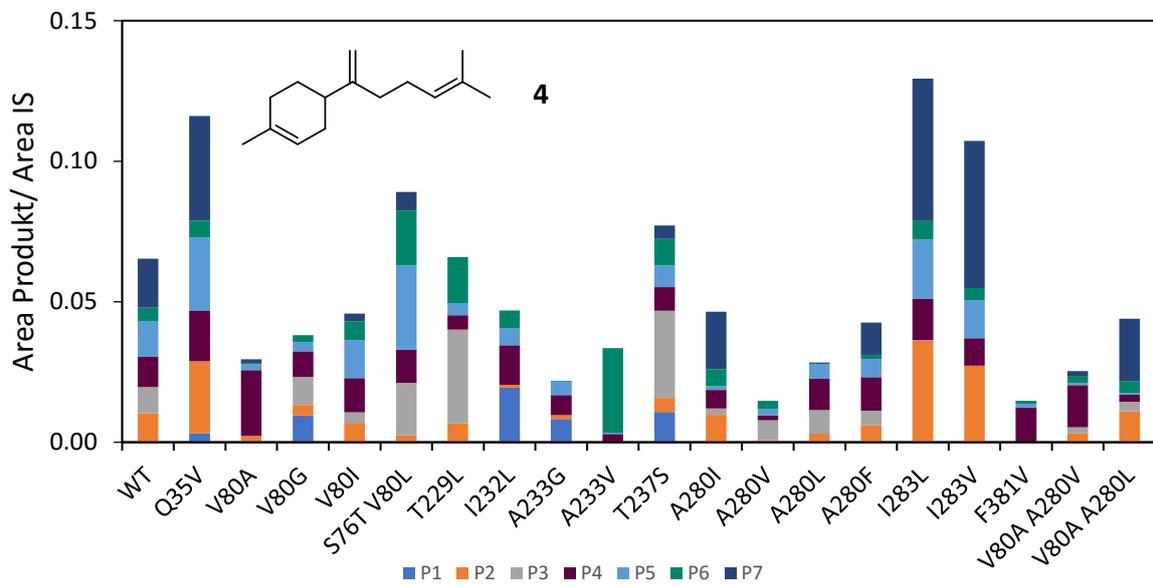
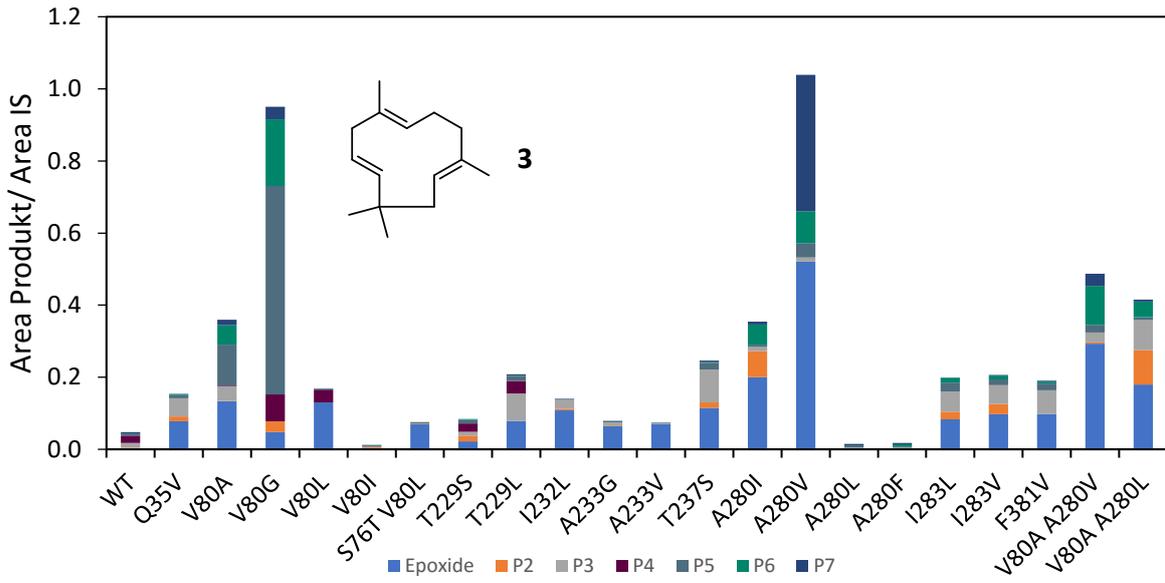
a) Durchgeführt durch Julia Hallmen (Masterarbeit). Weitere getestete Moleküle für CYP1005C4 und CYP199A25 können der Masterarbeit entnommen werden.

b) Liu *et al.*

c) Durchgeführt durch Tim Hierlemann (Bachelorarbeit).

7.4.8 Initiales Screening der CYP109Q5 Varianten





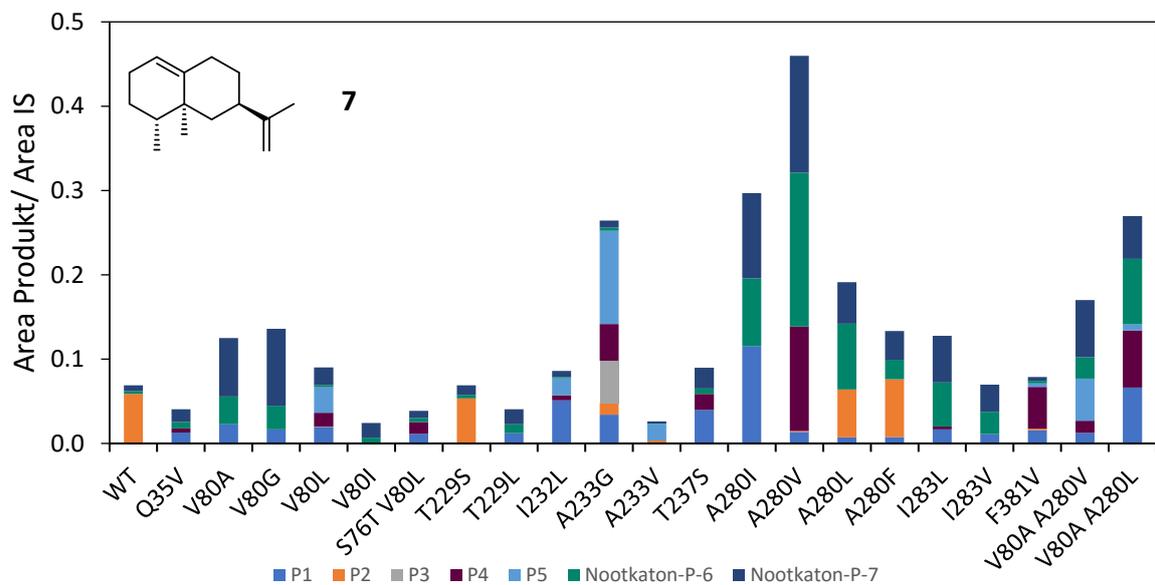
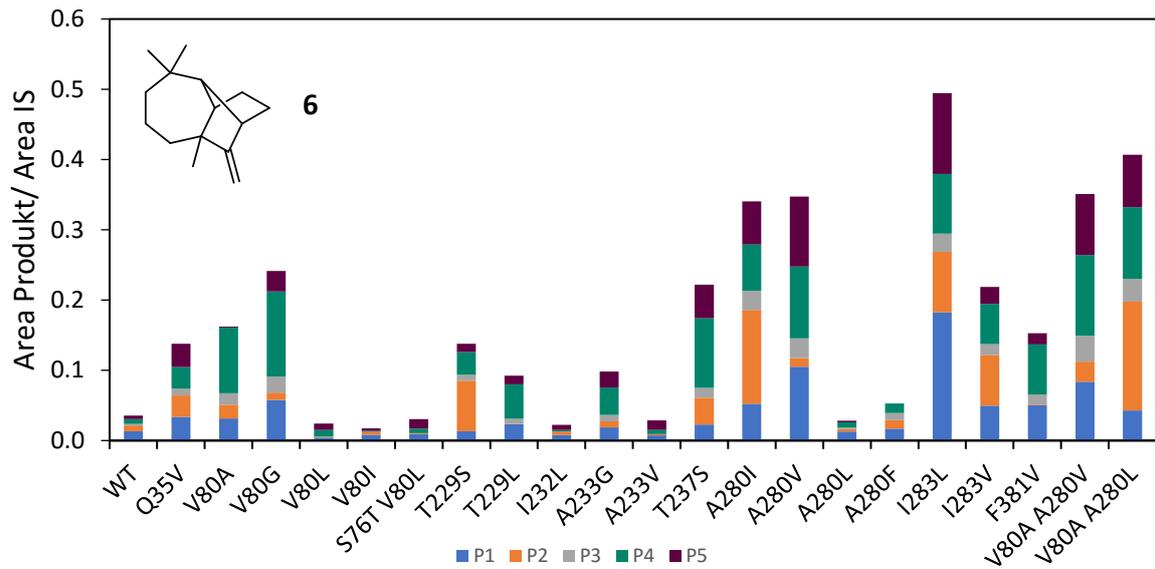
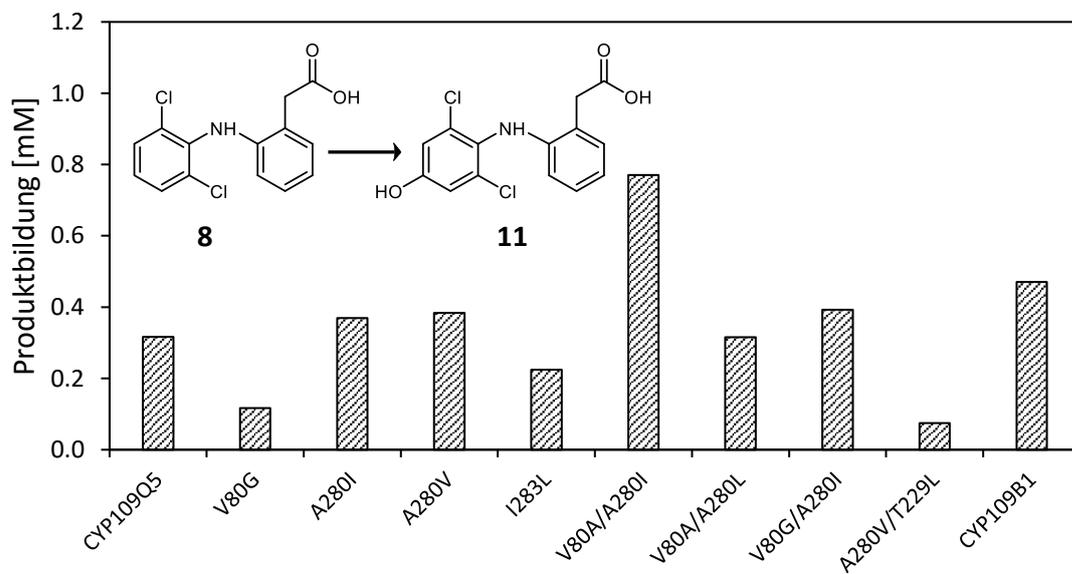
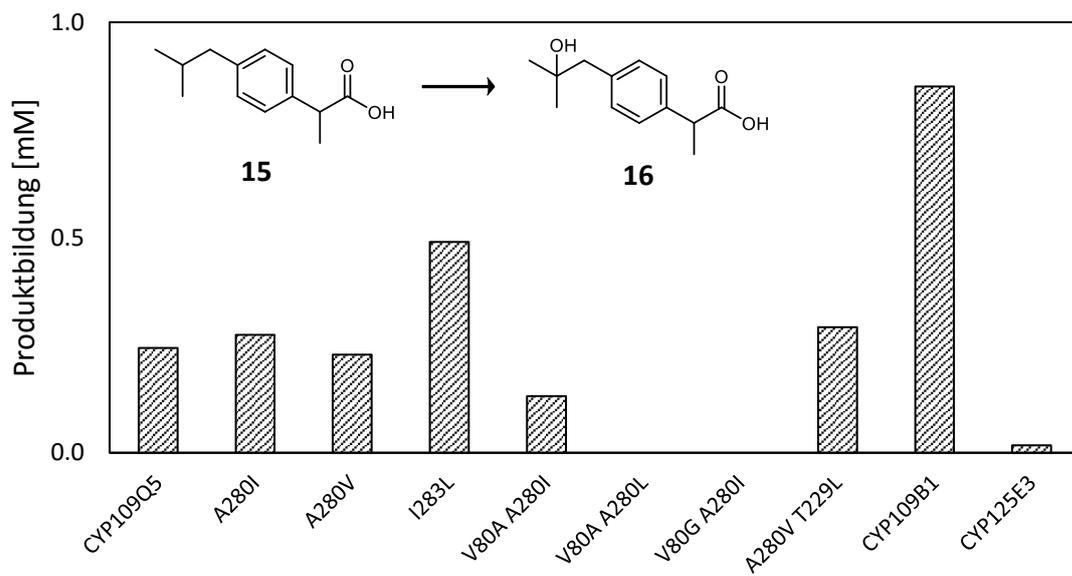
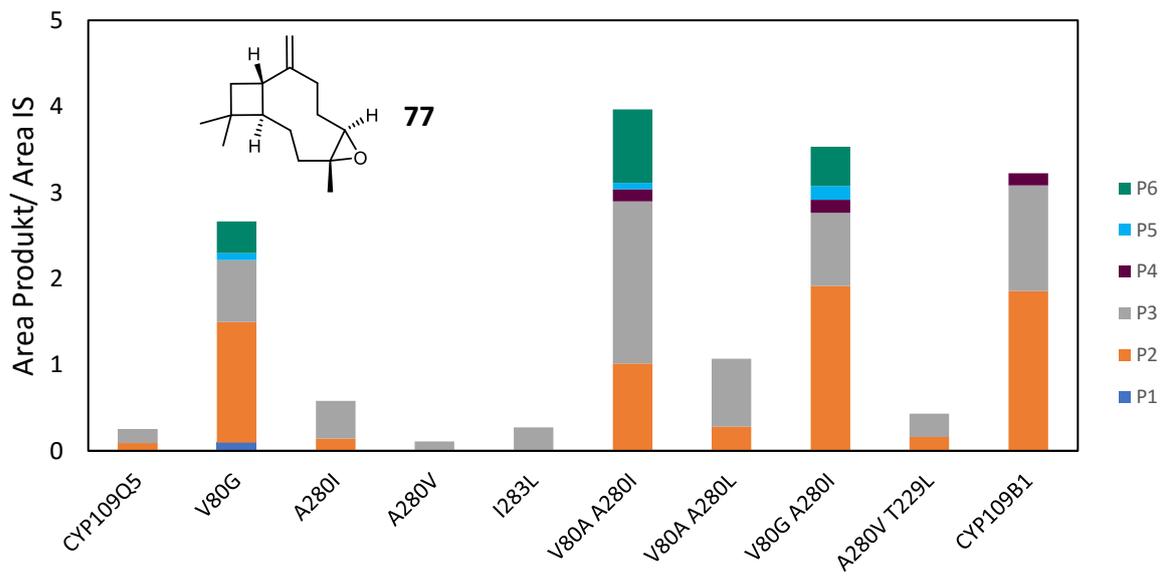
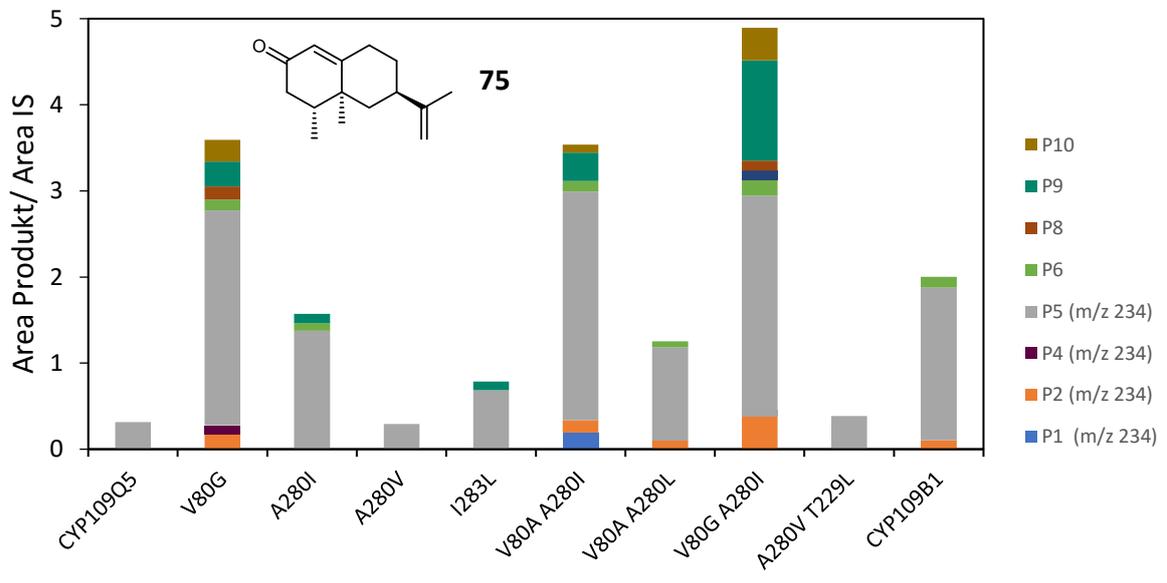
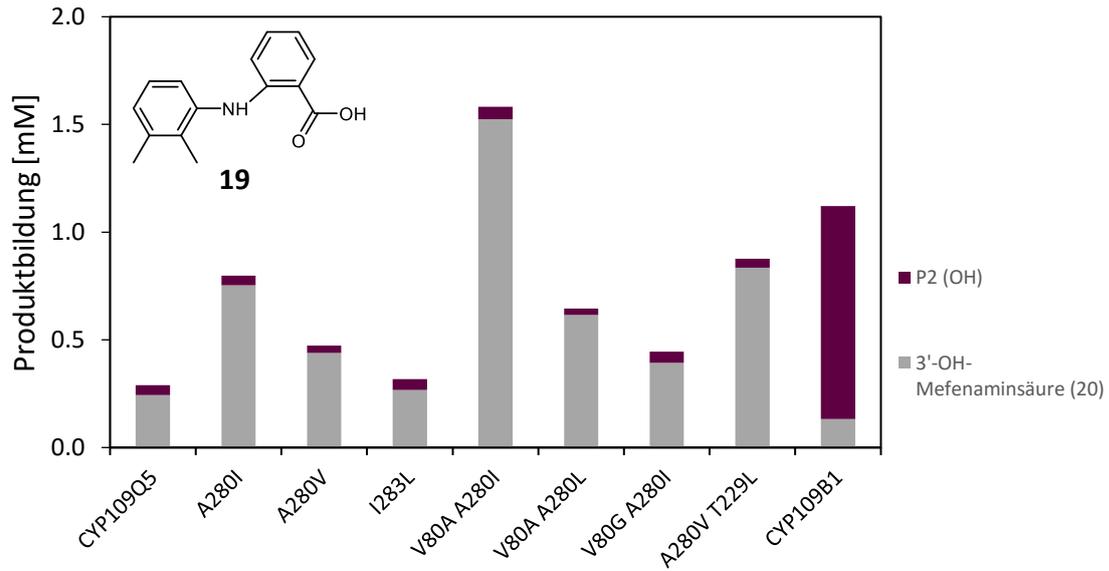
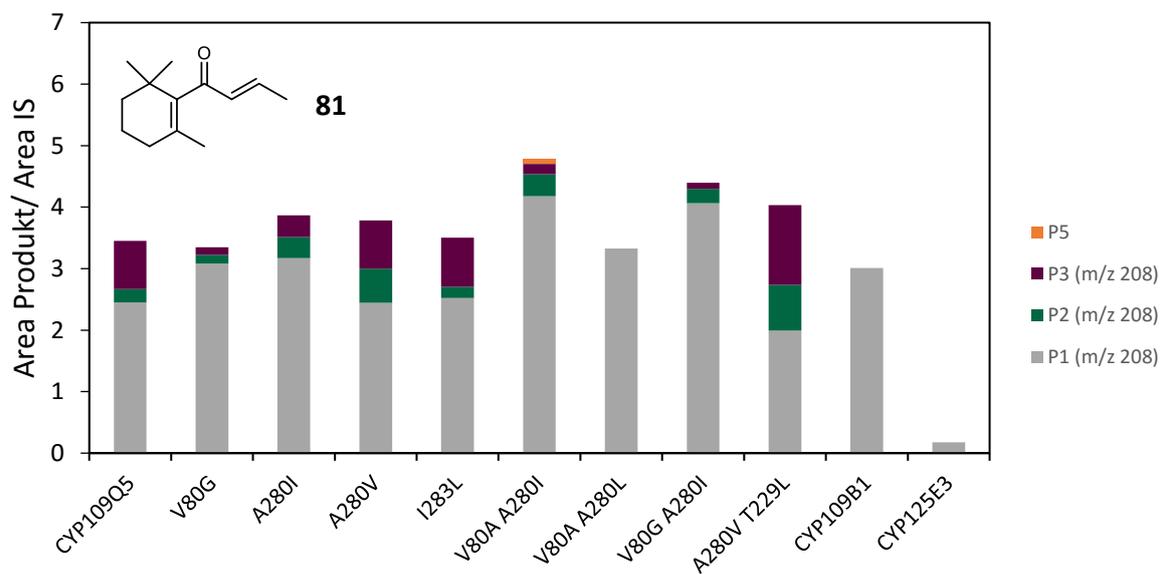
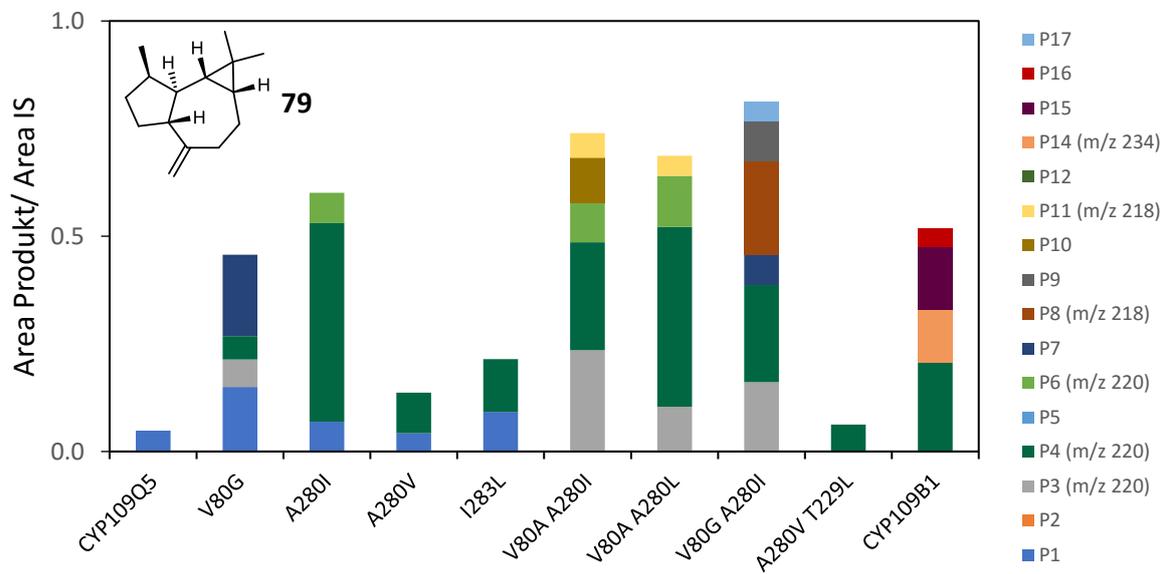
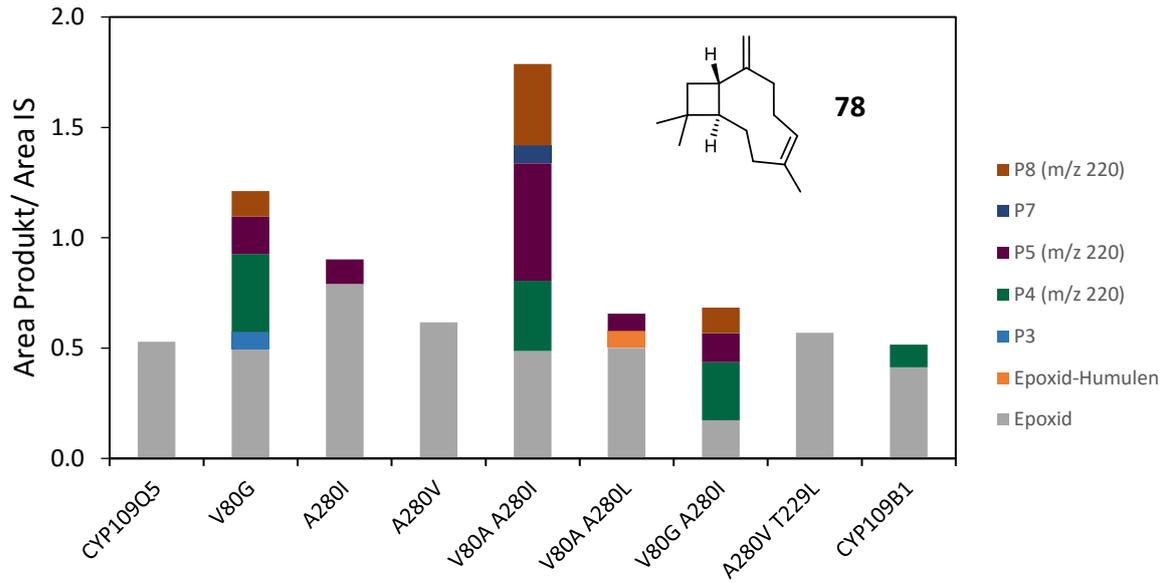


Abbildung S12: Initiales *Screening* der CYP109Q5 Varianten (Lysat) mit den Zielterpenen 1 – 7. Die Reaktionen wurden mit 3 μM Lysat und dem Redoxpartnersystem CamA/B für 24 h durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels GC-FID und GC-MS.

7.4.9 Screening der aufgereinigten CYP109Q5 Varianten, CYP125E3 und CYP109B1







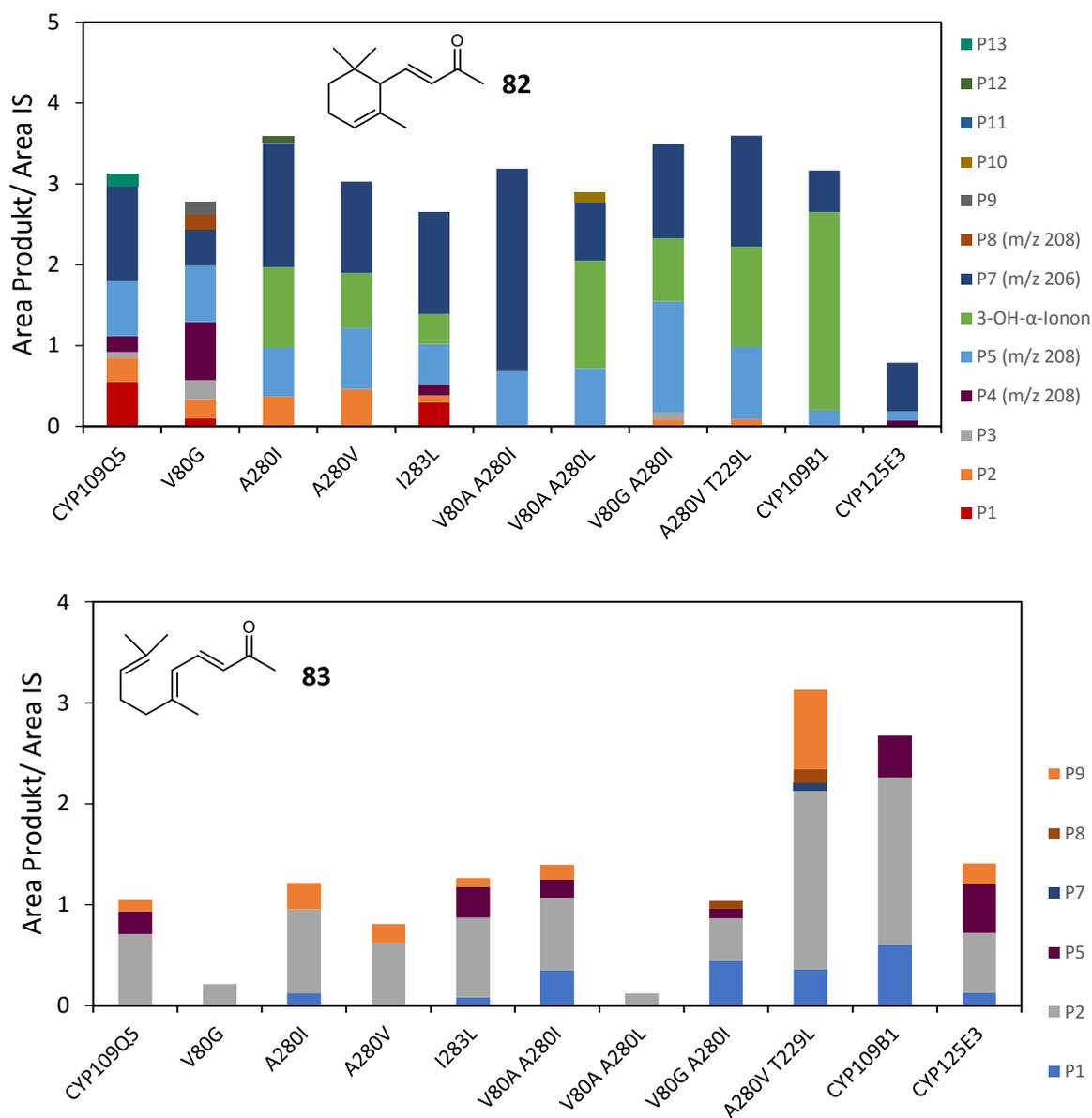


Abbildung S13: *In vitro* Screening der aufgereinigten CYP109Q5 Varianten sowie CYP125E3 und/oder CYP109B1. **8**: Diclofenac; **11**: 4-Hydroxydiclofenac; **15**: Ibuprofen; **16**: 2-Hydroxyibuprofen; **19**: Mefenaminsäure; **75**: Nootkaton; **77**: Caryophyllenoxid; **78**, β-Caryophyllen; **79**: Aromadendren; **81**: β-Damascon; **82**: α-Ionon; **83**: Pseudoionon. Die Masse m/z ist für eindeutig zuordenbare Produkte angegeben.

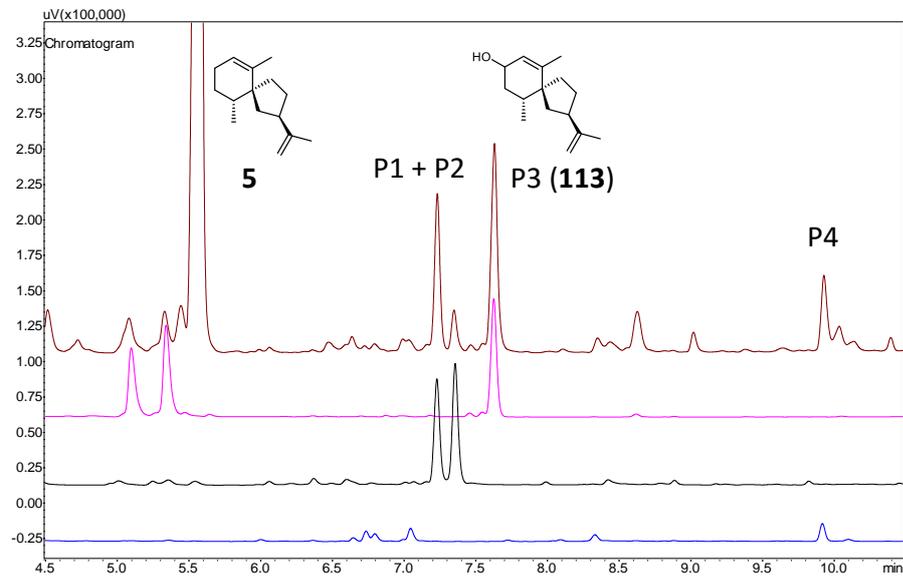
7.4.10 Ausgewählte GC-Chromatogramme der präparativen CYP109Q5 *in vivo* Biotransformationen

Abbildung S14: GC-Chromatogramm der CYP109Q5 V80A/A280I *in vivo* Biotransformationen mit Premnaspirodien (**5**). Blau: Aufreinigung P4; Schwarz: Aufreinigung P1 und P2; Magenta: Aufreinigung P3; Braun: Biotransformation.

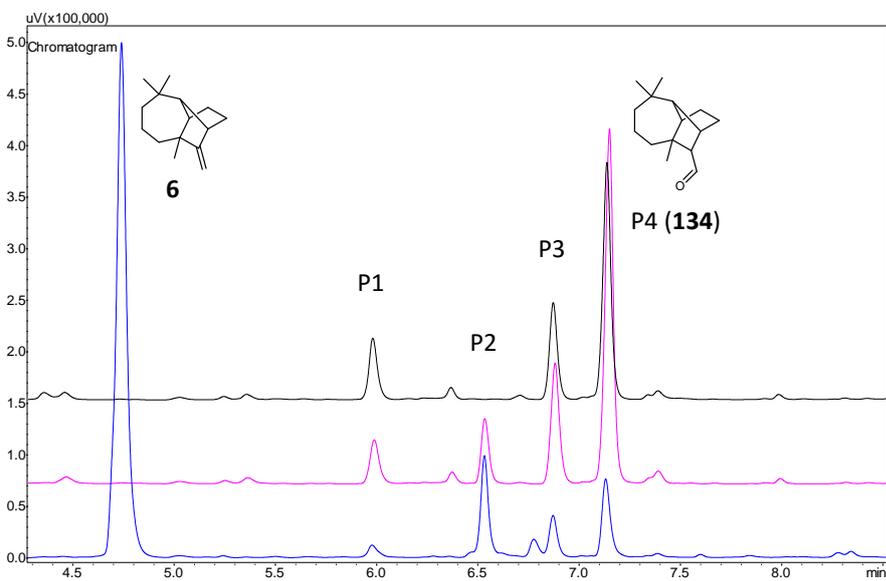


Abbildung S15: GC-Chromatogramm der CYP109Q5 V80A/A280I *in vivo* Biotransformationen mit Longifolen (**6**). Blau: Biotransformation; Magenta: Nach Aufreinigung; Schwarz: nach NMR; P4: Longifolenaldehyd.

7.5 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3') Primer <i>forward</i> / Primer <i>reverse</i>
Primer für die ortgerichtete Mutagenese mittels QuikChange® - Bereich des Basenaustausches ist Fettgedruckt - // Deletion	
CYP116B3_F378T	GCCGAATACCAGC AC ACGTGGTCCGGATCATG/ CATGATCCGGACCACG TGT GCTGGTATTCCGGC
CYP116B3_E27V	CACCGGTTAGCGAA GTA GCAACCGCAACCCTGG/ CCAGGGTTGCGGTTG CTACT TCGCTAACCGGTG
CYP116B3_E27A	CACCGGTTAGCGAA GC AGCAACCGCAACCCTGG/ CCAGGGTTGCGGTTG CT TCGCTAACCGGTG
CYP116B3_F378A_S377 A	CTGCCGAATACC GCC GCACGTGGTCCGG/ CCGGACCACGTGC GGC GGTATTCCGGCAG
CYP116B3_F378A_S377 G	CTGCCGAATACC GGC GCACGTGGTCCGG/ CCGGACCACGTGC GGC GGTATTCCGGCAG
CYP116B3_F378T_S377 A	CTGCCGAATACC GCC ACACGTGGTCCGG/ CCGGACCACGTGT GGC GGTATTCCGGCAG
CYP116B3_F378T_S377 G	CTGCCGAATACC GGC ACACGTGGTCCGG/ CCGGACCACGTGT GGC GGTATTCCGGCAG
CYP116B3_H139V	CGTAAATATTCAATTGCC GTT ACCGTTAATACCTGGGG/ CCCCAGGTATTAACGGT AAC GGCAATTGAATATTTACG
CYP116B3_H139A	CGTAAATATTCAATTGCC GCT ACCGTTAATACCTGGGG/ CCCCAGGTATTAACGGT AGC GGCAATTGAATATTTACG
CYP116B3_H139G	CGTAAATATTCAATTGCC GGT ACCGTTAATACCTGGGG/ CCCCAGGTATTAACGGT ACC GGCAATTGAATATTTACG
CYP116B3_Loop_short_ 1	CGTAAATATTCAATTGCCCATACC//CGTCCGGCACCGGAAGAAC/ GTTCTTCCGGTGCCGGACG//GGTATGGGCAATTGAATATTTACG
CYP116B3_Loop_short_ 2	CCGTAAATACCTGGGGTCGTCCG//GTTGCAGAAGCAGTTGGTTCG/ CGACCAACTGCTTCTGCAAC//CGGACGACCCAGGTATTAACGG
CYP116B3_Loop _short_3	GTCGTCCGGCACCGGAA//GTTGCAGAAGCAGTTGG/ CCAAGTCTTCTGCAAC//TTCCGGTGCCGGACGAC
CYP116B3_Loop _short_4	CGTAAATATTCAATTGCCCATACCCGTCG//GTTGCAGAAGCAGTTGGTC/ GACCAACTGCTTCTGCAAC//CGGACGGGTATGGGCAATTGAATATTTACG
CYP116B3_Loop_BM3	CCGTAAATACCTGGGGT CCAGATGATCCTGCATATGAT CGTCCGGCACCGGAAGA AC/ GTTCTTCCGGTGCCGGACG ATCATATGCAGGATCATCTGG ACCCAGGTATTAAC GG
CYP116B3_Loop_C1	CAATTGCCCATACCCGTCG GATGGATCTATGACT GTTGCAGAAGCAGTTGGTC/ GACCAACTGCTTCTGCAAC AGTCATAGATCCATC CGGACGGGTATGGGCAATTG
CYP116B3_Loop_B1	CAATTGCCCATACCCGTCG GGAATGGATATGACT GTTGCAGAAGCAGTTGGTC/ GACCAACTGCTTCTGCAAC AGTCATATCCATTCC CGGACGGGTATGGGCAATTG
ITB1693_F95A	CATGGCCGGCGACGGCCT GGCA ACCGCGCACAGCGAC/ GTCGCTGTGCGCGGT TGC AGGCCGTCGCCGGCCATG
ITB1693_F95V	CATGGCCGGCGACGGCCT GTC ACCGCGCACAGCGAC/ GTCGCTGTGCGCGGT GAC AGGCCGTCGCCGGCCATG
ITB1693_F95L	CATGGCCGGCGACGGCCT GTTA ACCGCGCACAGCGAC/ GTCGCTGTGCGCGGT TAAC AGGCCGTCGCCGGCCATG
ITB1693_F95I	CATGGCCGGCGACGGCCT GATC ACCGCGCACAGCGAC/ GTCGCTGTGCGCGGT GAT CAGGCCGTCGCCGGCCATG
ITB1693_F95G	CATGGCCGGCGACGGCCT GGC ACCGCGCACAGCGAC/ GTCGCTGTGCGCGGT GCC AGGCCGTCGCCGGCCATG
ITB1693_A337V	GTTGTGGCCGACCG GTG CCCCCCTTTCGCG/ CGCGAAGGCGGG CAC GGTCGGCCACAAC
ITB1693_A337L	GTTGTGGCCGACCG CTG CCCCCCTTTCGCG/ CGCGAAGGCGGG CAG GGTCGGCCACAAC

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3') Primer <i>forward</i> / Primer <i>reverse</i>
ITB1693_A337I	GTTGTGGCCGACCA ATT CCCCGCTTCGCG/ CGCGAAGGCGGG AAT GGTCGGCCACAAC
CYP109Q5_Q35V	GGCCGCTGCAGCCCC GTG GGCTTCATGGCCGTGGGG/ CCCCACGGCCATGAAGCC CAC GGGCTGCAGGCGGCC
CYP109Q5_V80G	CATGCCTCCCTCCATC GGT CAGGTTCGATCCGCCCGC/ GCGGGGCGGATCGACCT GACC GATGGAGGGAGGCATG
CYP109Q5_V80A	CATGCCTCCCTCCATC GCC CAGGTTCGATCCGCCCGC/ GCGGGGCGGATCGACCT GGC GATGGAGGGAGGCATG
CYP109Q5_V80I	CATGCCTCCCTCCATC ATT CAGGTTCGATCCGCCCGC/ GCGGGGCGGATCGACCT GAAT GATGGAGGGAGGCATG
CYP109Q5_V80L	CATGCCTCCCTCCATC CTG CAGGTTCGATCCGCCCGC/ GCGGGGCGGATCGACCT CAG GATGGAGGGAGGCATG
CYP109Q5_T229S	CTGAGCTTCGCGAAC TCG CTGCTCATCGCCGGCAAC/ GTTGCCGGCGATGAGCAG CGAG TTTCGCGAAGCTCAG
CYP109Q5_T229L	CTGAGCTTCGCGAAC CTG CTGCTCATCGCCGGCAAC/ GTTGCCGGCGATGAGCAG CAG TTTCGCGAAGCTCAG
CYP109Q5_T229D	CTGAGCTTCGCGAAC GAT CTGCTCATCGCCGGCAAC/ GTTGCCGGCGATGAGCAG ATC GTTTCGCGAAGCTCAG
CYP109Q5_I232L	GCGAACACGCTGCTC CTG GGCCGGCAACGAGACGACG/ CGTCGTCTCGTTGCCGG CAG GAGCAGCGTGTTCGC
CYP109Q5_A233G	GAACACGCTGCTCATC GGC GGCAACGAGACGACGACG/ CGTCGTCTCGTTGCC GCC GATGAGCAGCGTGTTC
CYP109Q5_A233V	GAACACGCTGCTCATC GTG GGCAACGAGACGACGACG/ CGTCGTCTCGTTGCC CAC GATGAGCAGCGTGTTC
CYP109Q5_T237S	CATCGCCGGCAACGAG TCG ACGACGAGCCTCATCGGC/ GCCGATGAGGCTCGT CGA CTCGTTGCCGGCGATG
CYP109Q5_A280V	CGCTACGAGAGCCCG GTG CAGTGCATCTTCCGGCAG/ CTGCCGGAAGATGCACT GAC CGGGCTCTCGTAGCG
CYP109Q5_A280L	CGCTACGAGAGCCCG CTG CAGTGCATCTTCCGGCAG/ CTGCCGGAAGATGCACT GAC CGGGCTCTCGTAGCG
CYP109Q5_A280I	CGCTACGAGAGCCCG ATT CAGTGCATCTTCCGGCAG/ CTGCCGGAAGATGCACT GAAT CGGGCTCTCGTAGCG
CYP109Q5_A280F	CGCTACGAGAGCCCG TTT CAGTGCATCTTCCGGCAG/ CTGCCGGAAGATGCACT AAA CGGGCTCTCGTAGCG
CYP109Q5_I283L	GAGCCCGGCGCAGTGC CTG TTCCGGCAGACCATGACG/ CGTCATGGTCTGCCGGAA CAG GCCTGCGCCGGGCTC
CYP109Q5_I283V	GAGCCCGGCGCAGTGC GTG TTCCGGCAGACCATGACG/ CGTCATGGTCTGCCGGAA CAC GCCTGCGCCGGGCTC
CYP109Q5_F381A	GTGGTCGCCGCTCGTTC GCG ATCCGGTCCGGAGCAGC/ CGTGCTCGGCGACCGGAT CGC GAACGACGGCGACCAC
Primer zur Amplifikation von genomischer DNA	
- Eingelegte Restriktionsschnittstellen für die anschließende Subklonierung sind Fett-gedruckt	
- Start- und Stopcodons sind unterstrichen markiert	
Arthro_CYP1232A24 (<i>NdeI</i> + <i>EcoRI</i>)	GACTACTA CATATG ACCAGCAGGATTACTTGAAGCACC/ GTCCTA GAATTC ATGCGAGTTCCGACCTAACTG
Arthro_CYP1232F1 (<i>NdeI</i> + <i>HindIII</i>)	GACTACTA CATATG AAGAACAACCTTGAACGAACAGCACCC/ CTATGA AAGCTT ACCATGCGACTCGAAGAGCCGTTG (häufigeres Stopcodon integriert)
Arthro_FeRed_1 (<i>NdeI</i> + <i>EcoRI</i>)	GACTACTA CATATG TCAGTGCCTCAGATAGCCGTCG (häufigeres Startcodon integriert Val → Met)/ GTCTTA GAATTC ATGTTAGGGCGCTCCTTGTACTAG
Arthro_FlavRed (<i>NdeI</i> + <i>HindIII</i>)	GACTACTA CATATG ACGCCTACGGGTGGAGGGCTAATAATC (häufigeres Startcodon integriert Val → Met)/ CTAGTA AAGCTT ATCCCGCGGTGACCATTTTGGC (häufigeres Stopcodon integriert)

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3') Primer <i>forward</i> / Primer <i>reverse</i>
Arthro_FldX (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACACCTACATATGAAAGTATCAATCCTCTACGGAAC/ CTATGAAAGCTTAGGCCGGGTGTTGTTTCGTAAG
Arthro_CYP1005C4 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGTCTGCGGAAGCGGGACTTCCC/ CTATGAAAGCTTACCAGGCTCTACCACCACTGTTC (häufigeres Stopcodon integriert)
Arthro_CYP199A25 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGACAACCATCATCAGCGACCCC/ CTATGAAAGCTTACTTCCTTGTAAGGTGGAACCTG
C.apic_CYP125E3 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGAAACTTGAGAGATGAGCATCGC (<i>Hind</i> III-Schnittstelle entfernt/ CTATGTAAGCTTACCAGCGAACGGGCAACTGAGC (häufigeres Stopcodon integriert)
C.apic_CYP264A4 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGACGTACGCATCGACATTCTTTCACCCGTC/ CTATGTAAGCTTAGGAGGACAGCAGCCGGAGC (häufigeres Stopcodon integriert)
C.apic_CYP264M1 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGCATGAACGACTGGACCTGCTCTCACC/ CTATGTAAGCTTAGGTACGTCAGCGGACCCAGAG (häufigeres Stopcodon integriert)
C.apic_CYP109Q5 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGATCGCCGACATCGACATCACC/ CTATGTAAGCTTTAGGCGCTCGCCACCGTGGCCCG (häufigeres Stopcodon integriert)
C.apic_CYP183B2 (<i>Nde</i> I + <i>Eco</i> RI)	GACTACTACATATGATCACCGCCAGCCCCATCGCCAC/ GTCATAGAATTCATGAGGGCTGCTGGGTCTGTGCG
C.apic_CYP263A4 (<i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III)	GACTACTACATATGACCCCCAAGCGTGACGATCGG/ CTATGTAAGCTTAGGTGCGGGCGCTGTAGGGACAG (häufigeres Stopcodon integriert)
Primer zur Identifikation von Eukaryoten (Biomarker)²⁹²	
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG
Primer zur Klonierung mittels <i>Gibson Assembly</i>[®]	
GA_Wori_CYP1232A24 (Insert)	ATCGATGCTTAGGAGGTCATATGGGCAGCAGCCATCAT/ ACAGCTTATCATCGATAAGCTCATGCGAGTCCGACCTAACT
GA_Wori_CYP1232A24 (Vektor)	TGATGATGGCTGCTGCCCATATGACCTCCTAAGCATCGATGG/ TTAGGTCGGAACCTCGCATGAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGCAGA
GA_pBAD_CYP1232A24 (Insert)	TGGTACCAGGAGGATTACATATGACCGCAGGATTACTTGAAGC/ ATCCGCCAAAACAGCCAAGCTCATGCGAGTCCGAC
GA_pBAD_CYP1232A24 (Vektor)	TTAGGTCGGAACCTCGCATGAGCTTGGCTGTTTTGGCG/ TCAAGTAATCCTGCGGTCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAGC
GA_pETDuet (Vektor)	CAAGGAGCGCCCTAACATGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG/ TAGAGGATTGATACTTTTCATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTT CTAGAGG
GA_pETDuet_FldX (Insert_1)	ACTTTAAGAAGGAGATATACATGAAAGTATCAATCCTCTACGGAACCTGAG/ AGCATTATGCGGCCGCAAGCTTAGGCCGGGTGTTG
GA_pETDuet_Mid (Insert_2)	ACGAAACAACACCCGCTAAGCTTGGCGCCG/ GCTATCTGAGGCACTGACATATGTATATCTCCTTCTTATACTAACTAATATACTA AGATGGG
GA_pETDuet_Fered1 (Insert_3)	TATAAGAAGGAGATATACATATGTCAGTGCCCTCAGATAGCC/ GGGTTATGCTAGTTATTGCTCATGTTAGGGCGCTCCTTGTC
GA_pCola_A24 (Vektor)	TTAGGTCGGAACCTCGCATGACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGC/

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3') Primer <i>forward</i> / Primer <i>reverse</i>
	TCAAGTAATCCTGCGGTCATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATT TCTACAGGG
GA_pCola_CYP1232A24 (Insert)	CTTTAATAAGGAGATATACCATGACCGCAGGATTACTTGAAGC/ TACAATACGATTACTTTCTGTGCATGCGAGTTCCGACCTAACTGC
GA_Fusion_vec_CYP12 32A24 (Vektor)	CAGTTAGGTCGGAACCTCGCAGTTCTGCAGCGTCAGCATC/ TCAAGTAATCCTGCGGTCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAG
GA_Fusion_CYP1232A2 4 (Insert)	TGGTACCAGGAGGATTACATATGACCGCAGGATTACTTGAAGC/ GGATGCTGACGCTGCAGAACTGCGAGTTCCGACCTAACTGC
GA_Fusion_vec_CYP19 9A25 (Vektor)	GTTCCACCTTTACAAGGAAGGTTCTGCAGCGTCAGCATC/ TCGCTGATGATGGTTGTCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAGC
GA_Fusion_CYP199A25 (Insert)	TGGTACCAGGAGGATTACATATGACAACCATC/ GGATGCTGACGCTGCAGAACCTTCCTTGTAAGGTGGAACCTTGCTTTGAC
GA_Duet_CamB (Vektor)	TTCCCGATAGGCAATGGTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCG/ ACATACTACTTTAGACATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAATAATACT AAGATGGG
GA_CamB (Insert)	TATAAGAAGGAGATATACATATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTCACATGATGG/ GTGGCAGCAGCCTAGGTTAATTACCATTGCCTATCGGGAACATCG
GA_Fusion_vec_CYP10 9Q5 (Vektor)	GGGCCACGGTGGCGAGCGCCGTTCTGCAGCGTCAGCATCC/ ATGTCGATGTGGCGATCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAG
GA_Fusion_CYP109Q5 Insert	TGGTACCAGGAGGATTACATATGATCGCCGAC/ GGATGCTGACGCTGCAGAACGGCGCTCGCCACCG
GA_Fusion_vec_CYP12 32F1 (Vektor)	CGGCTCTTCGAGTCGCATGGGTTCTGCAGCGTCAGCATC/ GTTTCGTTCAAGTGTTCTCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAGC
GA_Fusion_CYP1232F1 (Insert)	TGGTACCAGGAGGATTACATATGAGAACACTTGAACGAACAGCACC/ GGATGCTGACGCTGCAGAACCCATGCGACTCGAAGAGCC
GA_pCola_1 (Vektor)	CTCTTCGAGTCGCATGGTAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGC/ GTTTCGTTCAAGTGTTCTCATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATT TCTACAGG
GA_pCola_CYP1232F1 (Insert)	CTTTAATAAGGAGATATACCATGAGAACACTTGAACGAACAGCAC/ TACAATACGATTACTTTCTGTTACCATGCGACTCGAAGAGCC
GA_CYP109Q5_CamB (Vektor)	CCACGGTGGCGAGCGCCTAATTGTACACGGCCGCATAATCG/ ATGTCGATGTGGCGATCATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATT TCTACAGGG
GA_CYP109Q5_Duet (Insert)	CTTTAATAAGGAGATATACCATGATCGCCGACATCGACAT/ GATTATGCGGCCGTGTACAATTAGGCGCTCGCCACC
GA_pCola_FldX (Vektor)	ACGAAACAACACCCGCTAACCACCGCTGAGCAATAACTAGC/ TAGAGGATTGATACTTTTCATATGTATATCTCCTTCTTATACTTAATAATACT AAGATGGGGAA
GA_FldX_Dual (Insert)	TATAAGAAGGAGATATACATATGAAAGTATCAATCCTCTACGGAACTGAG/ TAGTTATTGCTCAGCGGTGGTTAGGCGGGTGTGTTTCGTAAGAATTTCG
GA_CYP199A25_Duet (Vektor)	CTTTAATAAGGAGATATACCATGACAACCATCATCAGCGACC/ GATTATGCGGCCGTGTACAATTACTTTCCTTGTAAGGTGGAACCTTGCTTTG
GA_CYP199A25_CamB (Insert)	CCACCTTTACAAGGAAGTAATTGTACACGGCCGCATAATCG/ TCGCTGATGATGGTTGTCATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATT TCTACAGGGGAAT
GA_FldX_pBAD18	GGCTAGCAGGAGGATTAACCATGAAAGTATCAATCCTCTACGGAACTGAG/ TCGACTCTAGACCCGGGTATTAGGCGGGTGTGTTTCGTAAGAA
GA_V_pBAD18_Art	CAAGGAGCGCCCTAACATGATAATCTAGACTGCAGAAGCTTGGCTGTTT/ TAGAGGATTGATACTTTTCATGGTTAATCCTCCTGCTAGCC
GA_Pro2_Art	ACGAAACAACACCCGCTAATAACCCGGGTCTAGAGTCGAC/ GCTATCTGAGGCACTGACATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAG

7. Anhang

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3') Primer <i>forward</i> / Primer <i>reverse</i>
GA_Fer1_pBAD18	TGGTACCAGGAGGATTACATATGTCAGTGCCTCAGATAGCC/ AGCTTCTGCAGTCTAGATTATCATGTTAGGGCGCTCCTTGT
GA_CamB_pBAD18	GGCTAGCAGGAGGATTAACCATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTCACATGATGG/ TCGACTCTAGACCCGGGTATTACCATTGCCTATCGGGAACATCG
GA_V_pBAD18_Cam	CTGAACTGAGTAGTGCCTGATAATCTAGACTGCAGAAGCTTGGC/ ACATACACTACTTTAGACATGGTTAATCCTCCTGCTAGCC
GA_Pro2_Cam	TTCCCGATAGGCAATGGTAATAACCCGGGTCTAGAGTCGAC/ ACGTTGTCGTTTGC GTTCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAG
GA_CamA_pBAD18	TGGTACCAGGAGGATTACATATGAACGCAAACGACAACGT/ AGCTTCTGCAGTCTAGATTATCAGGCACTACTCAGTTCAGCTTTG
Sequenzierprimer	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pTrcHis-RP	CTGATTTAATCTGTATCAGG
CYP116B3_fw_seq.1	GCGGTAAAGCAGATCTGG
CYP116B3_fw_seq.2	GTAGCCATCAGTGTATGG
pCWori_rv_Promoter	GACCTCCTAAGCATCGATGG
PFOR_Fus_Seq_1	CAGAACTGCAATTTTCATAGGTCG
PFOR_Fus_Seq_2	GCGTTTCACTTCTGAGTTCGG
ACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT
DuetDOWN1	GATTATGCGCCGTGTACAA
pETDuet_2	GTAATCGTATTGTACACGG
pBAD18_Fus_Seq	TCCACATTGATTATTTGCAC

7.6 Verwendete Plasmide

Plasmid	Insert	ITB #	Quelle/ generiert durch
pET-22b(+)	-	-	ITB
pET-28a(+)	-	-	ITB
pCWori(+)	-	-	ITB
pBAD33	-	-	ITB
pCola-Duet	-	-	ITB
pET-YSBLIC	P450 RhF	pITB1685	Prof. Sabine Flitsch (Universität Manchester)
pET-22b(+)	CYP116B3 WT	-	T. Klaus
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A	-	T. Klaus
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/E27V	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/E27A	pITB1686	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/H139V	pITB1687	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/H139A	pITB1688	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/H139G	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/S377A	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A/S377G	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante Short_1	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante Short_2	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante Short_3	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante Short_4	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante BM3	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante CYP101B1	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378A Loop Variante CYP101C1	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/E27V	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/E27A	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/H139V	pITB1689	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/H139A	pITB1690	Diese Arbeit/ QuikChange®

7. Anhang

Plasmid	Insert	ITB #	Quelle/ generiert durch
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/H139G	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/S377A	pITB1692	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/S377G	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-22b(+)	CYP116B3 F378T/H139G/A205T	pITB1691	Diese Arbeit/ QuikChange®, Spontane Mutation
pET-28a(+)	ITB1693 WT (<i>Ralstonia metallidurans</i>)	pITB1693	Prozomix Ltd. (Haltwhistle, England)
pET-28a(+)	ITB1696 WT (<i>Ktdedonobacter racemifer</i>)	pITB1694	Prozomix Ltd.
pBAD33	ITB1696 WT	pITB1696	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	ITB1693 F95A	pITB1697	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95V	pITB1698	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95L	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95I	pITB1700	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95G	pITB1699	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95A/A337V	pITB1701	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95A/A337I	pITB1702	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95A/A337L	pITB1703	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95V/A337V	pITB1704	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95V/A337I	pITB1705	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	ITB1693 F95V/A337L	pITB1706	Diese Arbeit/ QuikChange®
pCWori(+)	CYP51F1 (<i>B. bassiana</i>)	pITB1707	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pCWori(+)	CYP52A10 (<i>B. bassiana</i>)	pITB1708	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pCWori(+)	CYP548A5 (<i>B. bassiana</i>)	pITB1709	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pCWori(+)	NADPH-Reduktase (<i>B. bassiana</i>)	pITB1710	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP1232A24 (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1711	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP1232A24 (mit His ₆ -tag)	pITB1712	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pBAD33	CYP1232A24	pITB1713	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pET-28a(+)	CYP1232F1 (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1714	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP1232F1	pITB1715	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP199A25 (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1716	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA

Plasmid	Insert	ITB #	Quelle/ generiert durch
pCWori(+)	CYP199A25	pITB1717	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pBAD33	CYP199A25	pITB1718	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP1005C4 (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1719	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pET-28a(+)	FeRed_1 (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1720	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pET-28a(+)	FlavRed (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1721	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pET-28a(+)	FldX (<i>Arthrobacter</i> sp.)	pITB1722	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pBAD33	P450 Maq-PFOR L2	-	Sara Hoffmann (ITB) ¹⁰³
pBAD33	CYP1232F1-PFOR (Fusion)	pITB1726	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pBAD33	CYP199A25-PFOR (Fusion)	pITB1724	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pBAD33	CYP109Q5-PFOR (Fusion)	pITB1725	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pBAD33	CYP1232A24-PFOR (Fusion)	pITB1723	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pET-28a(+)	CYP264M1 (<i>C. apiculatus</i>)	pITB1727	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP264M1	pITB1728	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pBAD33	CYP264M1	pITB1729	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP264A4 (<i>C. apiculatus</i>)	pITB1730	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP264A4	-	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pBAD33	CYP264A4	pITB1731	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP125E3 (<i>C. apiculatus</i>)	pITB1732	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP125E3	pITB1733	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP183B2 (<i>C. apiculatus</i>)	pITB1734	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pET-28a(+)	CYP263A4 (<i>C. apiculatus</i>)	pITB1735	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP263A4	pITB1736	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pBAD33	CYP263A4	pITB1737	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pET-28a(+)	CYP109Q5 (<i>C. apiculatus</i>)	pITB1738	Diese Arbeit/ Klonierung von genomischer DNA
pCWori(+)	CYP109Q5	pITB1739	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pBAD33	CYP109Q5	pITB1740	Diese Arbeit/ Klonierung über Restriktionsschnittstellen
pBAD33	Q35V	pITB1741	Diese Arbeit/ QuikChange®

7. Anhang

Plasmid	Insert	ITB #	Quelle/ generiert durch
pBAD33	V80G	pITB1742	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80A	pITB1743	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80I	pITB1744	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80L	pITB1745	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	T229S	pITB1746	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	T229L	pITB1747	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	T229D	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	I232L	pITB1748	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A233G	pITB1749	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A233V	pITB1750	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	T237S	pITB1751	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A280V	pITB1752	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A280L	pITB1753	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A280I	pITB1754	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A280F	-	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	I283L	pITB1755	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	I283V	pITB1756	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	F381V	pITB1757	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80G/A280V	pITB1758	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	A280V/T229L	pITB1759	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80G/T237S	pITB1760	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80G/I283L	pITB1761	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80G/T229S	pITB1762	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80G/T229L	pITB1763	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80A/A280I	pITB1764	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80G/A280I	pITB1765	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80A/A280V	pITB1766	Diese Arbeit/ QuikChange®
pBAD33	V80A/A280L	pITB1767	Diese Arbeit/ QuikChange®
pET-28a(+)	BMR (Reduktase von P450 BM3)	-	Dominique Darimont (ITB)

Plasmid	Insert	ITB #	Quelle/ generiert durch
pkkHC	AdX (<i>Bos taurus</i> Ferredoxin)	pITB1768	Rita Bernhardt (Universität Saarland)
pBAR1607	AdR (<i>Bos taurus</i> Reduktase)	pITB1769	Rita Bernhardt (Universität Saarland)
pET-11a	FdX (<i>E. coli</i> Flavodoxin)	-	ITB ³¹¹
pET-16b	FdR (<i>E. coli</i> Reduktase)	-	ITB ³¹¹
pET-28a(+)	CamB (<i>P. putida</i> Ferredoxin)	-	ITB ³¹¹
pET-28a(+)	CamA (<i>P. Putida</i> Reduktase)	-	ITB ³¹¹
pET-28a(+)	CYP109B1 (<i>B. subtilis</i>)	-	ITB ³¹¹
pETDuet	CamA + CamB	-	Sara Hoffmann (ITB)
pETDuet	FeRed_1 + FldX	pITB1770	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pCola	CYP1232A24 + FldX	pITB1771	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pCola	CYP1232F1 + FldX	pITB1772	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pCola	CYP199A25 + CamB	pITB1774	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pCola	CYP1232F1 + CamB	pITB1773	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pCola	CYP109Q5 + CamB	pITB1775	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pBAD18	R-IRED + PuO (2 Promotoren)	-	Leonie Schön (ITB)
pBAD18	CamA + CamB	pITB1776	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®
pBAD18	FeRed_1 + FldX	pITB1777	Diese Arbeit/ Gibson Assembly®

7.7 DNA-Sequenzen

CYP116B3 (*Rhodococcus ruber* DSM 44319): Accession number: AY957485

ITB1693 (*Ralstonia metallidurans*): Accession number *Q1LHN7*

ITB1696 (*Ktedonobacter racemifer*): Accession number *D6TEN2*

CYP1005C4 (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

ATGTCTGCGGAAGCGGGACTTCCCAGAACCGGCCGCTGTCCCTACCGGGTATTGCGGAACCCCGACAC
TGTGAGGGAAGTGTGCATAGACCCCAGGACTTCAGTCCGGCAAATGCCCTGCTGGCGGTAACCTCCCT
TGAGCGGACAGGCGCTACGCATATTGCAGAAGGCCCGGTTTGGCGTGCCTCCGATCCTTGGGAGCAAC
GATACCGAGACCCATGCCGGGATTCGAAAAGTGGTGGCGGGATTCTTACCCCGCAAGAGTGGCGGC
CATGGAGCCACGTATTCGGGGCTTGGCCCCGGGAATCGGCAGCCCCGGGCCGGAAGCGTCTGGCCTCTG
GGGGAAGCGTGGACCTGGTGCAGGCGCTCGCCGCAAATCCCCCGGCTGTTCATCATGCTGGAGATGTTG
GGGCTGCCCGTGCCTGACCTCCCCGCGTTGAAGACCTGGAGCCTGGACTCCCTGGAAGTGTCTGGGG
TTGGCCGGATGCTGACCGCAACTCGAATTGGCACACAGCGCCGCGGATTTCTACCGCTGGTTGAGGG
AAGTGGTTGTGGAGTTCGTGGCGTCCGGCGAACCAACCTCTTCAACGCGCTGGCCCGCCACGGTCTG
AGCACACCGGAGATCTGCTCCCTGGGCTACTTCCCTCCTGATCGCGGGCAAGAGACCACTACCCAAC
CATCAGCACCACGCTGTTCCGGCTGGCCGAGGGCTCCCGGGGCATCTCGTGGAGTGGAGCGCAACGG
CCCTGAAGGCACGCGACCTGGTCCGGCACGTCTCGCAACCGAGTCATCCGTTCCACATGGCGGCGT
GTGGCAATCCAGGACACCTATTTGGACGGACGAGCCATCGCGCCGGTGGAGAGCTGCTGCTGGAATT
GACCGGCAACCACGGATTCCTTGGGCCGAAACAGCGGCCCGCGAGGCGGCAGACGCTGACCATCCCG
GGACCGACCGCCCGGACCGACACCCTACGGCTTGGCGTTCCGGTCCGGGATCCACCGCTGCCTCGGC
GCCAACTCGCAGAGCTGGAGGCCCGCGTCTGTCGTTTCATGAAACAGCAGCGGCCATCAAGGGGGTCCG
GCTGCATAATTCAAACCCGGACTGGATACGGTTGCTGTCTTCCAAGCCCCCGAACAGTGGTGGTAG
AGCCTGGGTAA

CYP1232A24 (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

ATGACCGCAGGATTACTTGAAGCACCCACCGCAGATTGGGTACATCTAGCAGATCTATAACCAGAACCC
ATTTCCGATTTTCGAGCGACTTCGCTCGGAGTCACCTGTGCCTGGGTACCCGAGGCTGGGCGCTATC
TGATCACCAGCTATAGCGGGTTCGGCCCGGATGTGACCAAACCACGTTTTCGGCCAATGAAAAG
AAATCTCTCATGCTAAGGGCCATGGGGCATTCCATGCTTCGAAAGGATGACCCGATCACCAGGTGGA
ACGGCGTGTGGCAACCGTCCCTGAAACCCGGGACGGTAAAAAAGGTATGGAAGCAAAAGTTTGCTG
AGAACGCTGACCGGTATTTGGACGCTTACATCGACGCAGGGTCAGGCTCAGACTTCATGCAGGGTTTC
GCCGCTCCTTTCGTCGCCGAAAATCTCCGAGCCCTCATAGGTTTCGAGAACGCTTCCGAGGCAGATTT
GCAAAGATGGTCTCAGACTCTCATCGATGGCGCAGGCAATTACCCGATGACCCTGACGTTTGGGCGA
AAGCCAAACAGTCTCTGACGAGATCGACGCAGCGCTCGAGGAGATGATCCAGTGGCACTCCGGTCTGA
CCTGGAGACTCACTCCTTTCATACCTTCTCAGAAGCGCTGACTACCAGATGCCTCTGGAGTCCATCCG
GTCGAACATAAAGATGACGATCGGGGGAGGACTTAACGAACCGCGAGACGTTTGGGAGTCTCAACGC
TTGCCCTCCTGAGTTCGTCAAACAATTGGAACCTGCTTTCGAGATCCCAAACGTGGGGAGCGGTA
TTTGAGGAGTCCATCCGGTGGGTGGCGCCATTGGAATGGTGCCTCGCCAGACAGTCGTAGACACGGA
ACTGGATGGATATTTTCATCCCTCGTGGAGCCAAGCTTGGGCTTTCGATTTTGTGGCGAACCGGGATC
GGAGCGTTTGGTTCAGATCCCACAGGTTTCGACATCGAGCGCGGTTCTGAGGCTCACCTCGCTTTCGGC
AAGGGTGTGCACGTTTGCCTGGGAGCCTGGGCCCGCCGTTCCCAAGTAGCGGACGTGGGTCTTCCGGC
ACTTTTCTCCCGCTTGAAGGGTTTACGTCTCGACCCGAATCAGGAAGCTACACATGGGGGATGGGTCT
TTCGGGGCCCGTTGTCGTTGCCTTTAGTTTGGGACAAAGCAGTTAGGTCCGAACTCGCATGA

CYP1232F1 (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

ATGAGAACAACCTGAACGAACAGCACCCGTTGGCCGATTGGGTTGACGTGAATGAACTCGCCGACGATCC
TTACCCAAGCTACGAACGTCTTCGACATGAAGCTCCCGTGCCTACGTTCCGCAGCTCAATCGCTATC
TCGTGACGCGCTTTCAGGACTGCTTCGATGCGGAGATGGACCAGGAAACCTTCAGCTGCCACGAACGG
GCGGAGCGGTCCCTCATGATCCGTGCAATGGGGCGGCCGCTTGTTCGCCGGGACGATCCGGAACACTC
CACGGAACGGAGCTCCTTCGCGGCGGCGCTGCGGCCGAAAGCCATCAAGACAGCATGGCTTCATGTGT
TCGAGCAGAACCGCTCAAAGCACATAGAGCGGCTACGCGAAGCCGGCCCTGGAGTGCACCTCTTCAAG

GATTTGCCATTCTTACGCTGCTGACAACCTAAGCGCCGTTCTTGGGCTGCACGGTGTTCGATGCCGG
GACGATGATGCGCTGGTTCGCATACGCTCGTCGAGGGGACGGGCAATATTGCAGATGATGAGGCCGTTT
GGGCCC GAACCCGCGCCGTCTCCGAAGAGATTGATGCCGCCATTGAGGAGTCTTTCGGTTCGCGAAC
GCCGGCGAAGTCCCTTCCATGCTGCAGGCAATGGTCTCAAGCGGGTCTATCTCAAACGAATCCATCTC
GGCAAACGTGAAACTGACGATCGCAGGCGGAATGAATGAACCCAGCCATGTCATCTCGTTCGGTGTAT
GGGCGCTCTTGTGACACAACCTCAGCTGCAGGCACTGACTGCCGGGGATCGGAATTTTCGGGATGTG
TTCCAAGAAGCGGCACGATTCTGTTTCCCCCGTGGGCATGTATCCCCGGATAGTCACCAAGGACACGTC
GCTGGGTGGTTTCTCCATTCCCAGGGGCTCCACAGTCGGTTTGGTCATCGCCTCGGCAAACCGTGATG
ATGCCCGCTTTGAAAACGCATCGGTTTTTCGACGTGAGACGGGAAGCCCGGACAAATTTGGCTTTTCGGC
AACGGCACTCACGCTGCGCCGGAAACTGGGTAGCTCGGGCAATGGTGGGAGCAGTTGCCCTTCCCAG
ACTATTTGAAGCGTTTCCGACACTGCGGCTTCCGATTGAGACCCCGTCAATTTGCCGGTGGATCT
TCCGAGGAACAACGGCTCTTCGAGTCGCATGGTAA

CYP19A25 (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

ATGACAACCATCATCAGCGACCCCAAATCCCCTGCACTGACGTTCGATCCGTTTCAGCCGGGATGTCTT
GGAAGATCCGCTCCCCTTCCAATCAGAACTCCGGGCTGCCGGCCCTGTGGTCTATCTCAACAAATACG
ACGCTTACGCCATGGGCCGGTACGGGGAAGTGCAGGCCGCTCTGACCGACTGGCAAACATTCAGTCC
GCGGCCGGTGTGGCCCTCAGCAACTTCCGGAAGGAAATGCCATGGCGACCACCGAGCCTTCTTCTCGA
AGCTGACCCGCCCCACCATGACCGCCACGTGCCGTGCTGACCAAGATTCTAGGACCCCGGGAGATCC
GCAAAC TGGCGGAATCCTGGACAGTCGACGCCGAAGAGCTGGTGGACCAGGTCCTGTCCCCTGGCCCC
GAGTTCGACGCCGTCGCGGACCTGGCTGCGGCTTTCGCTTTCGATGCTGTGGGCAT
CCCCAGGCCGGCAGGGAGAACCTGCTCCCGTACGGAGACCACGCGTTCAATGCCTTTGGCCCCCCCA
ACGAGCTCGTGGCCAAGGGAGCGCCGCGGGTACCCGAGCTGTCCGCTTCGATCGCCTCGCAGTGTGCT
CGGGAGGTGCTTACCAAGGACGGATTCCGGTGCCCGGATCTGGGCCGCCGCGGATCGTGGGGACATCAC
TGAGGCGCAGGCTCCGTTGATTGTCCGGTTCGCTGCTCACTGCCGGCGTGGACACCCTGTTAACGGCC
TGGCCGCTGTTCTTACGCATTTGCCACCAACCCTGGCCAATGGTCCCAGCTTCGCGAAAACCTCCTCG
CTGTACGTACGGCCTTTGACGAAGCAGTCCGCTTCGAGTCAACGGTCCAGACCTTCTTCCGGACCAC
CACGCGGGACATCGAGGTGGCGGGACGCTCATCCCCGAGGGCAGGAAGATTCTCATGTTCTGGGAT
CAGCTAACCGGGATCCTCGGCGCTGGGACAATCCGGACACCTTCGACCTGAACCGGGATCCCTCCGGG
CACGTGGGGTTTCGGTTTTGGGATCCACCAGTGCCTCGGCCAACACATTGCCCGACTTGAAGCATCCAC
CCTCCTCGAAGTGCTCGCTCGAAGGATCGAAACCATCGAAATCTGTGGCCCCACACGAAGGCACCACA
ACAACACACTGCGGGCGTGGCAATCCTTGCCCGTGCCTCAAGACAAGTTCCACCTTTACAAGGAAG
TAA

FeRed_1 (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

ATGTCAGTGCCTCAGATAGCCGTCGTCGGCGCCGGTCCATCCGGATGCTACGCGGCACTTTCGATTTT
AAAGAAGTTTTCCCGGAGCCGAAATTTGTGATTTTTGATCAGCTCCCTGTGCCCTTTCGGGCTTATTCGTT
ACGGAGTGGCAGCGGACCATCAGGGAACGAAGGCTGTTACCGCGCAGTTTGAACGAATGTTCTCCTCG
GGCACAGCCCGCTTCGTCGGGGGCATCCAAATTTGGAGGAAGTCTCGAACTGGAAGACATTTTGATGC
CTTCGATGTCGTCATCTGGGCTGTTGGTCTTGTCTGATCGTAACCTTGGGATTCGGGGCAGGACA
CCCCTGGTGTATATGGCTCAGGTGTCGTGAGCCGGCTTTGGAATGCACATCCGGGAACGACGGGCGCC
CAAGTACGGATAGGGCGTCGTGTTGCGATTATTGGTGGCGGCAATGTGAGTCTGGACTTGGCCCGTCT
GCTGATAAAGCCGCATGCTCAGCTAGCCGGATCCGATCTCGATGAAACTTTCGACGAATCGGTACCAG
ACCCGGTAGAGGACGTATCGATCCTCGTCAGGGGAGAGCCCGCTGCGCCAAATGGGATGCGGCAATG
ATTCCGGGAGTTTGGGTCCATTGAGGGCCTGAGCGTGAACACCGACCCGAACAACCTACGCATCCTTGCG
CCTCGCCGACAGAGGATGGACATTTGCCAGTTCGCGCTTCTTGATCTCATCGAGGCTGAAAGTCCCA
CTCATCTCCGAGCCCGATGCTGGTTTTCGTTTTGGCACCAGGCCAATCGCTGTATCCGGTGACTCCCGC
GTCACGGGTTTTGAAATCGAAGGCCCCGAAGGTCGGCAGCATTTAGCAGTGGACACTGTACTTACGGC
TATCGGGTTTTAAAACCGATGACTCACCGGATCATCCCCGAGTCTTTGCAGCCGGCTGGGCTCGGACGG
GGCCGAGGGGTACCATCCCCTCGCTCAGGACCGCATCCCCGGGCCCTGGCCAGCGAGGTGGAACACGCT
GTCGCGGCCGACCGGTCGCGGTGGGATCTCAAGCTTGCATCTTCCAATCAGAAGGTGACGTCATT
TGACGACTGGGTGAGATTGATGCCACGAGATCGCCTCGGCCCCCGAGGACCGGTGCCGGAAAAAAA
TTCGTGACATTTCTGTCATTGACTCACTACTCACTAGTACAAGGAGCGCCCTAACATGA

FldX (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

ATGAAAGTATCAATCCTCTACGGAACCTGAGAGCGGCAATGCCGAACCTCGTTGCCGACGACGTAGCTGA
GTCACCTCGAAGACTCAAATGTAACAATCGAGGACCTGCAGGACGCAGACGTGTTGGCCTTAAGCACAG
ACACCCCTCTACCTCATCATTTGTTCCACCCATGGCGAGGGAAACCTCCCGGAGAGCGCCCAACCCTTT
GCGGAGGCATTGGAAGCGGAGAAAACCTGATCTTCAGGGCATTTCGATTCCGCATGTTTCGGTCTGGGGGA
CAGCACCTACGAGCACTACAGCCGAGGAAGTGAACATATCGACCACCGGTTGAGGGCGCTGGGTGCGA
CACGTGTCGGCGAATACGGGCGGCACGATGCTTCTTCCCGTTCTCCGCCAGCGAAGTCGCTGTTGCC
TGGGCAGCGGGCGTCTTGCGGAATTCTTACGAAACAACACCCGCCTA

FlavRed (*Arthrobacter* sp.): Genome ID CVLG01000001-CVLG01000003

CYP125E3 (*Chondromyces apiculatus*): Accession number EYF08073

CYP109Q5 (*Chondromyces apiculatus*): Accession number EYF04172

CYP264A4 (*Chondromyces apiculatus*): Accession number EYF06094

CYP264M1 (*Chondromyces apiculatus*): Accession number EYF08163

CYP263A4 (*Chondromyces apiculatus*): Accession number EYF06073

CYP109B1 (*Bacillus subtilis*): Accession number 4RM4_A

CamA (*Pseudomonas putida*): Accession number P16640

CamB (*Pseudomonas putida*): Accession number P00259

FdX (*E. coli*.): Accession number P61949

FdR (*E. coli*.): Accession number P28861

AdX (*Bos taurus*): Accession number P00257

AdR (*Bos taurus*): Accession number P08165

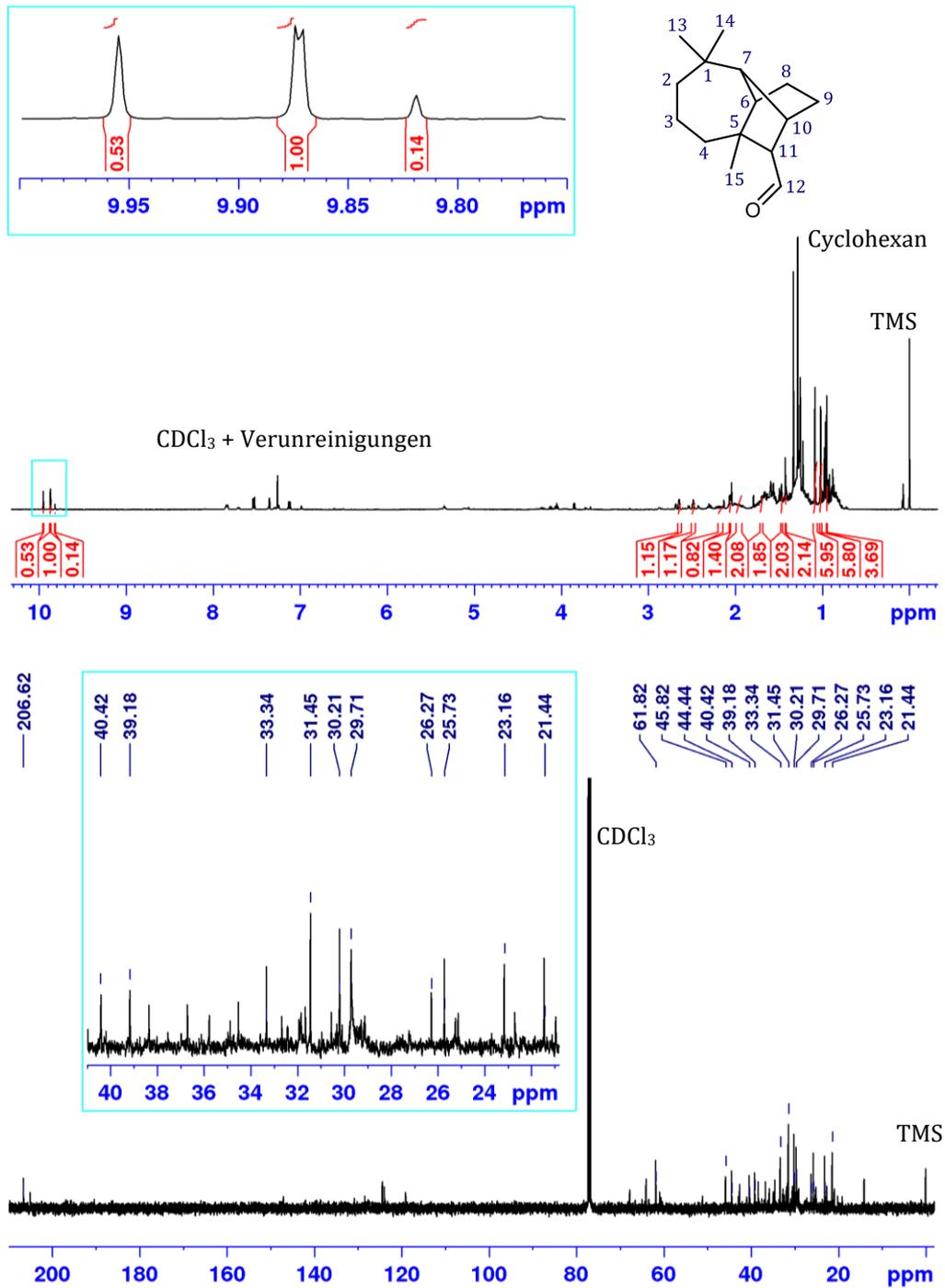
CYP51F1 (*Beauveria bassiana*): Accession number XP_008593540

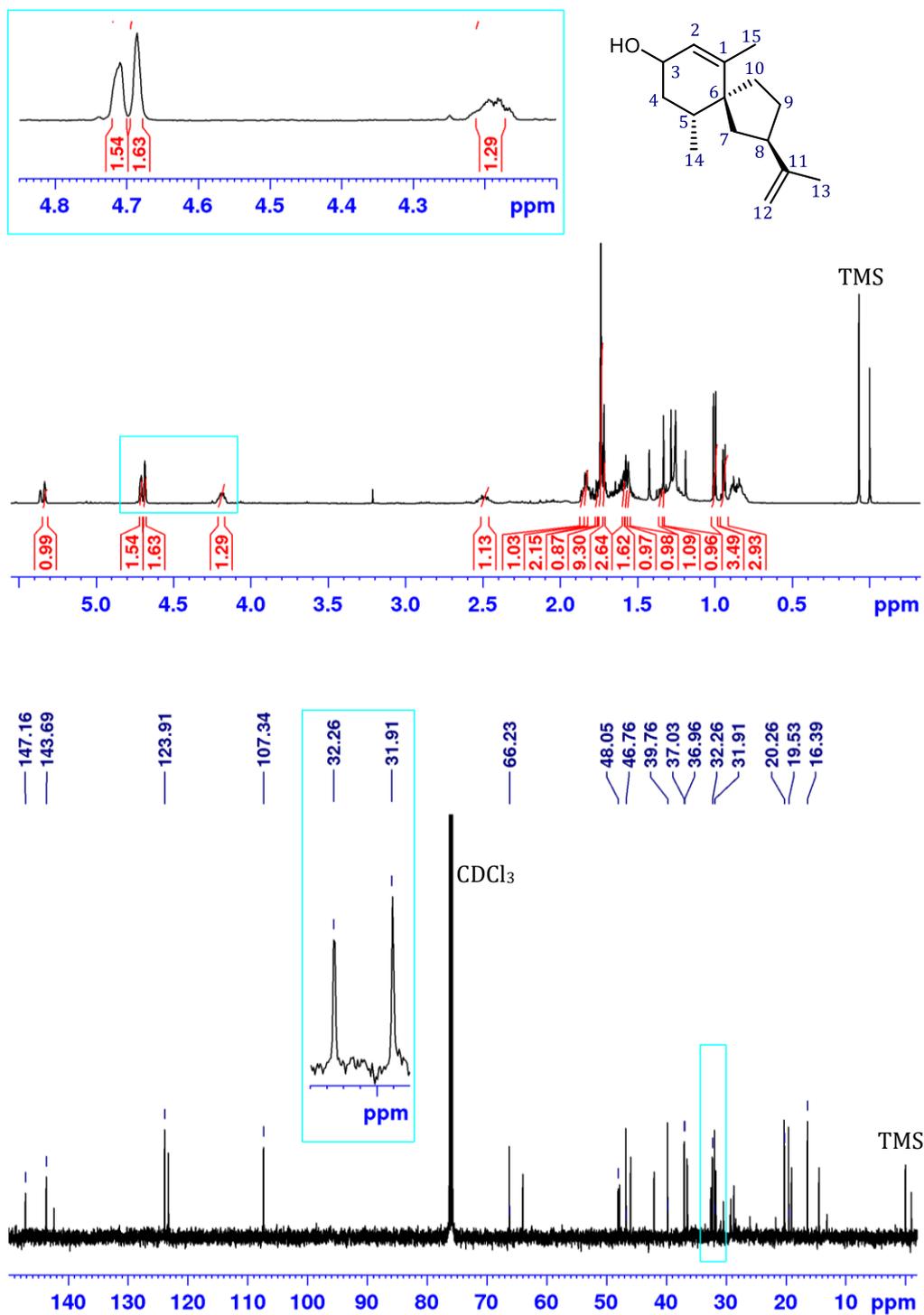
CYP52A10 (*Beauveria bassiana*): Accession number KGQ08241

CYP548A5 (*Beauveria bassiana*): Accession number XP_008594834

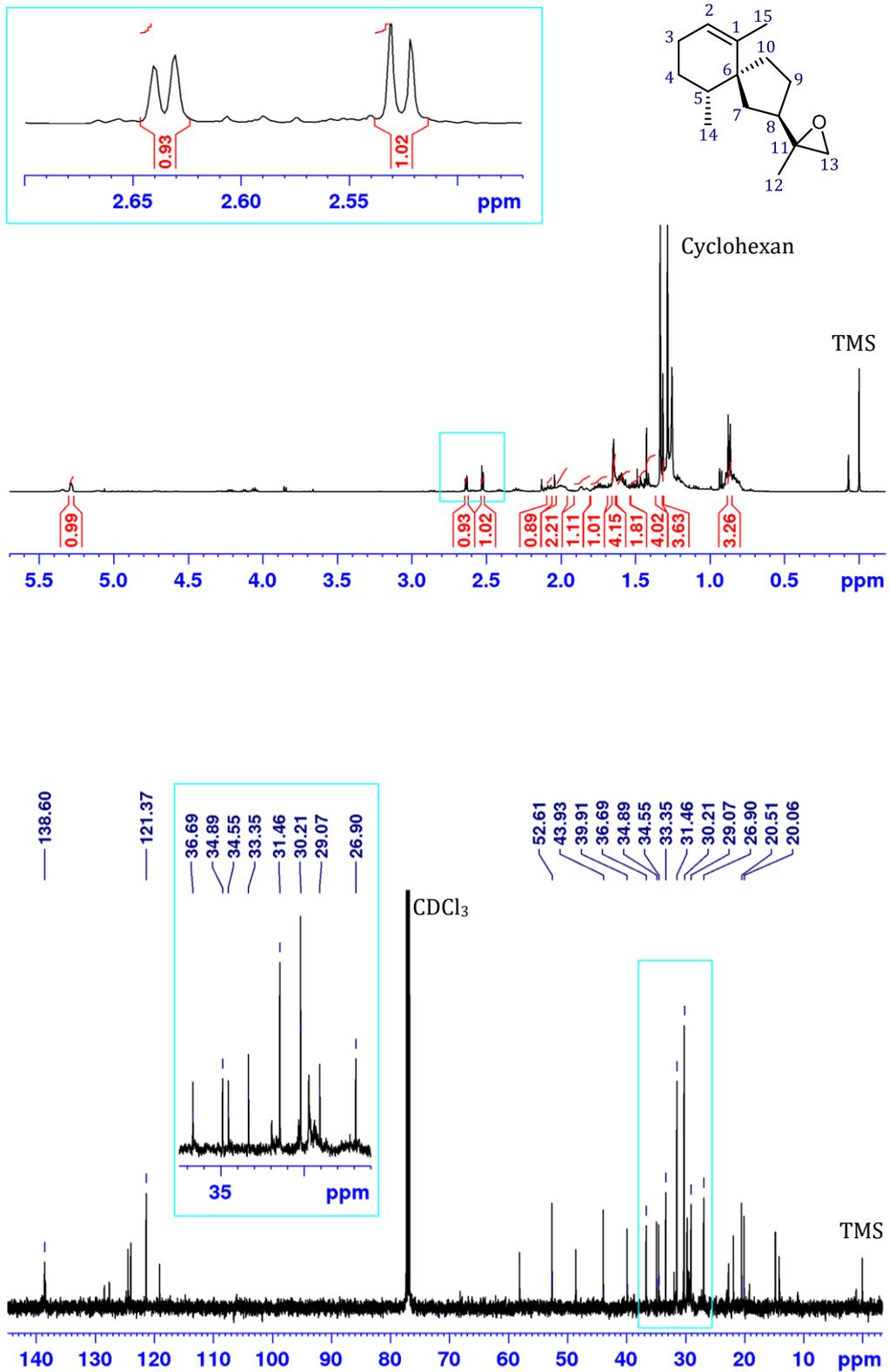
NADPH-Reductase (*Beauveria bassiana*): Accession number KGQ03132

7.8 NMR-Spektren

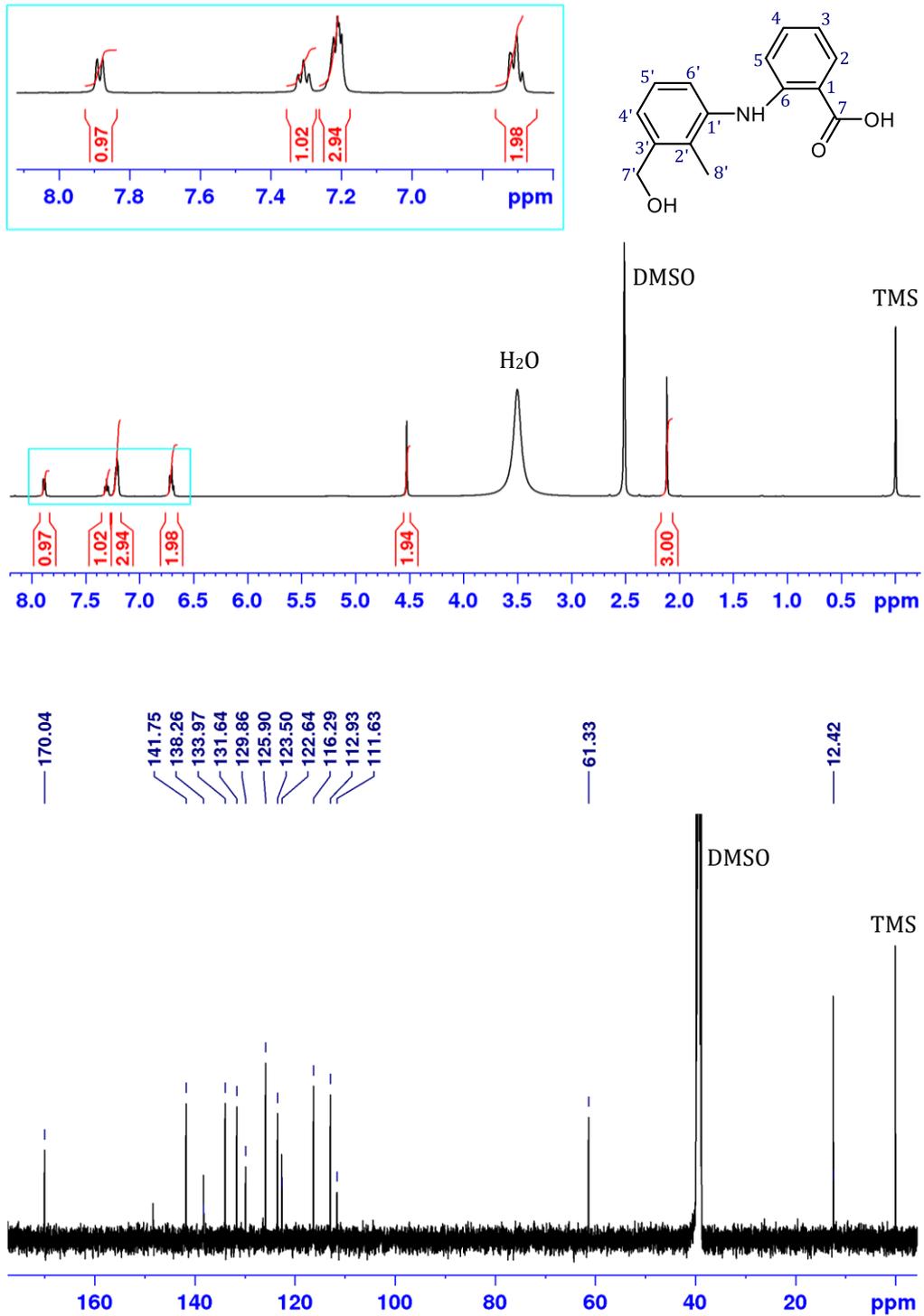
- Longifolenaldehyd (**134**) als Hauptprodukt:

- Solavetivol (**112**):

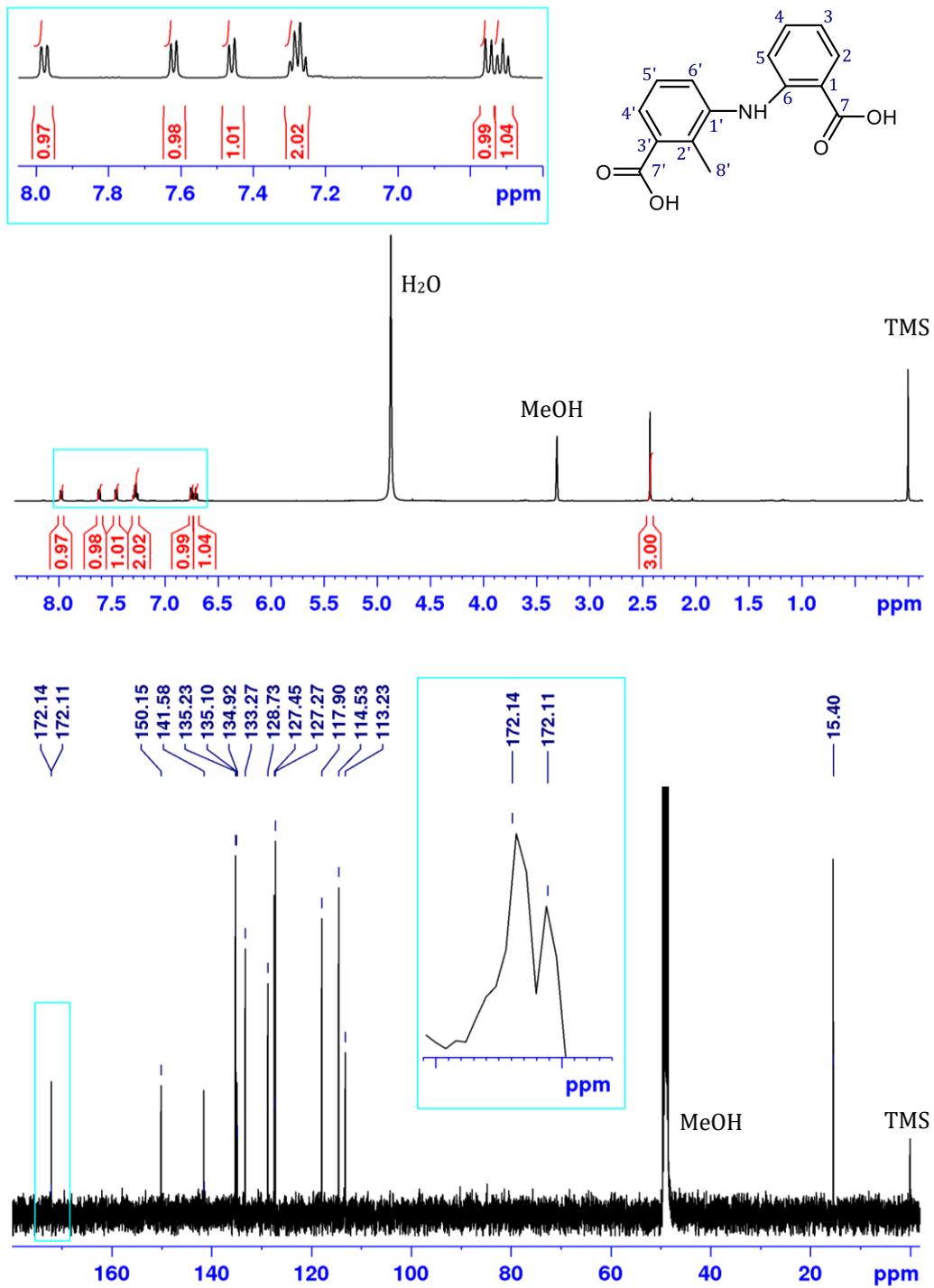
- Premnaspirodien-11,12-epoxide (**110** und **111**):

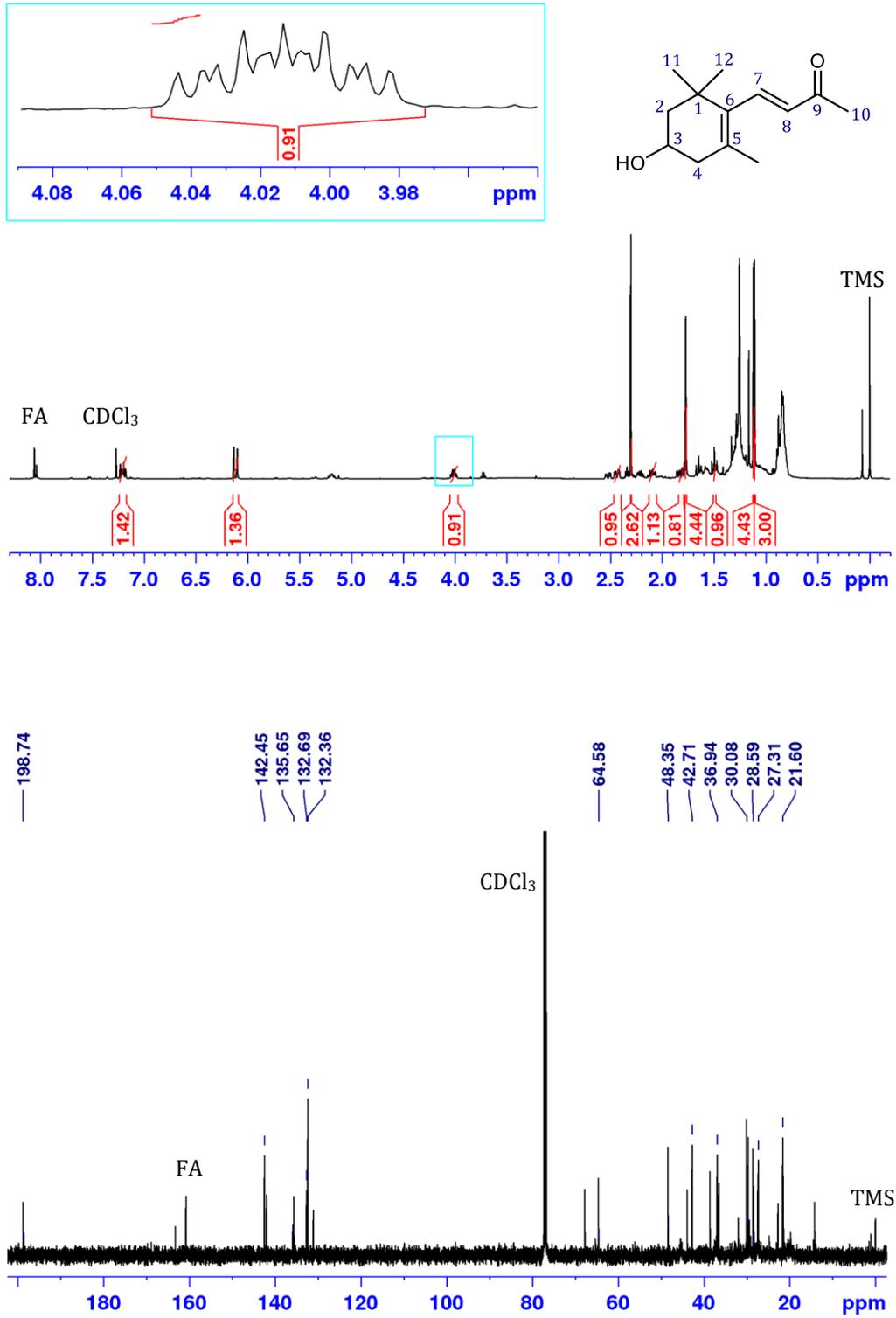


- 3'-Hydroxymethylmefenaminsäure (20):

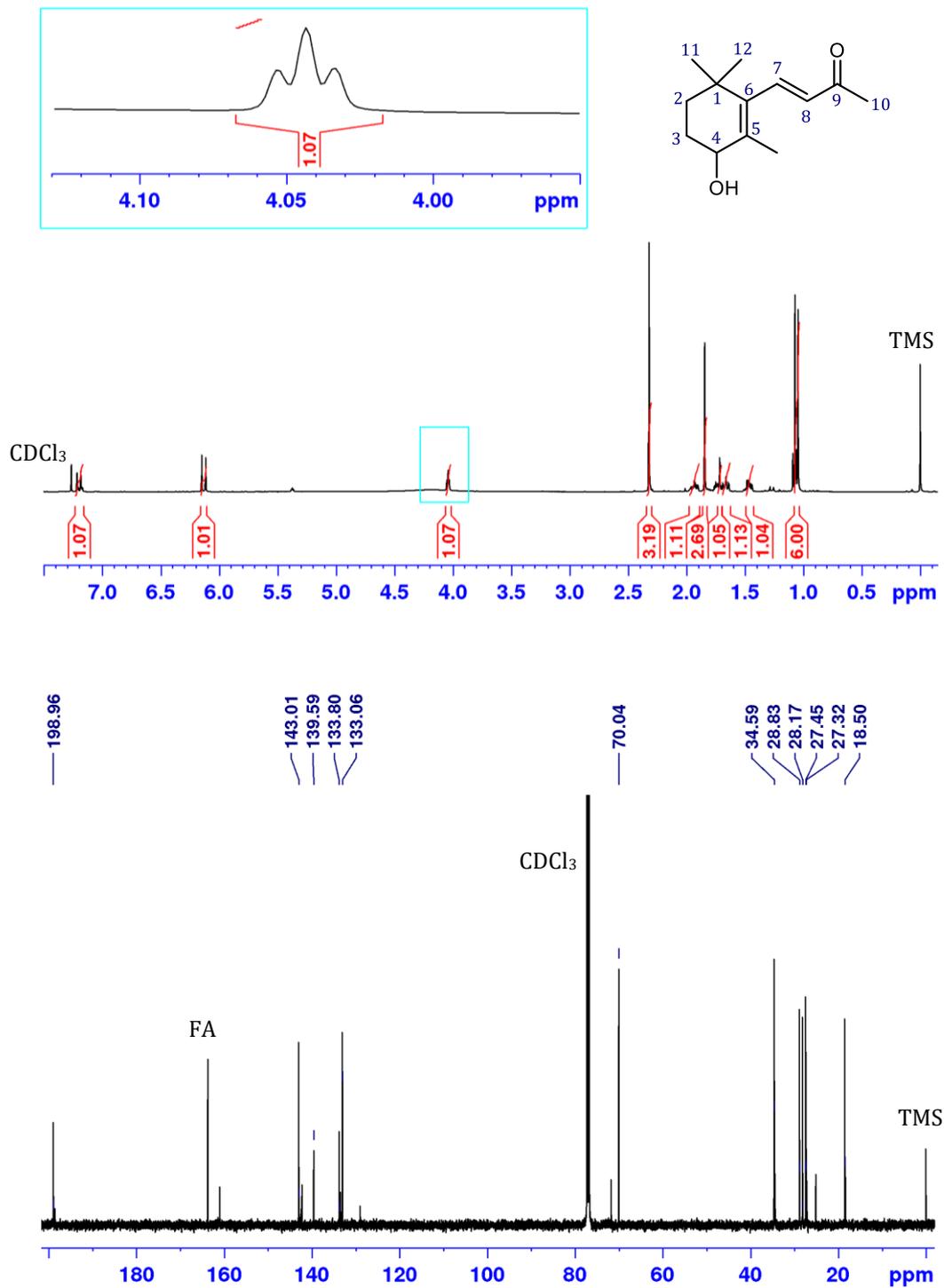


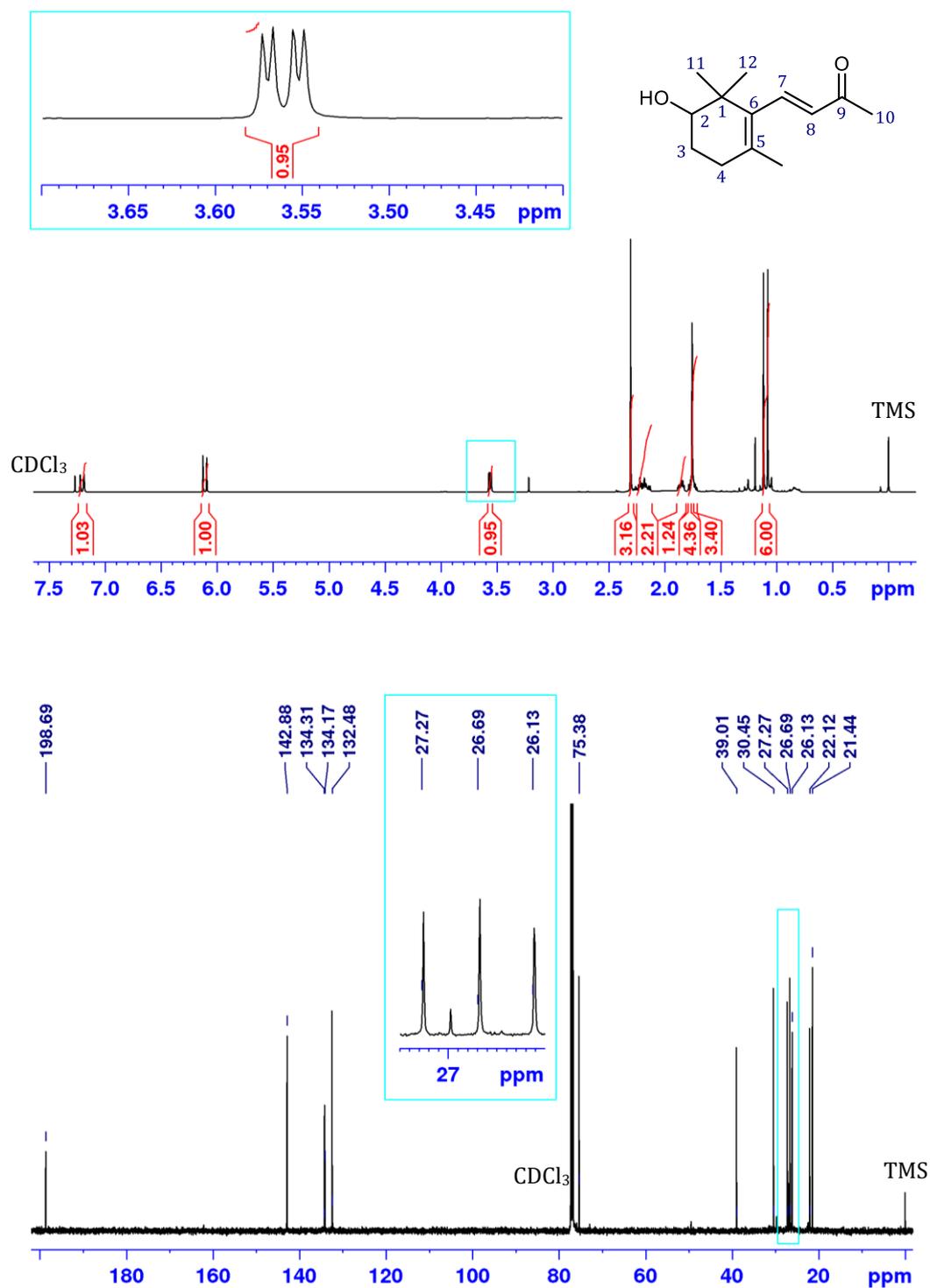
- 3'-Carboxymefenaminsäure (21):

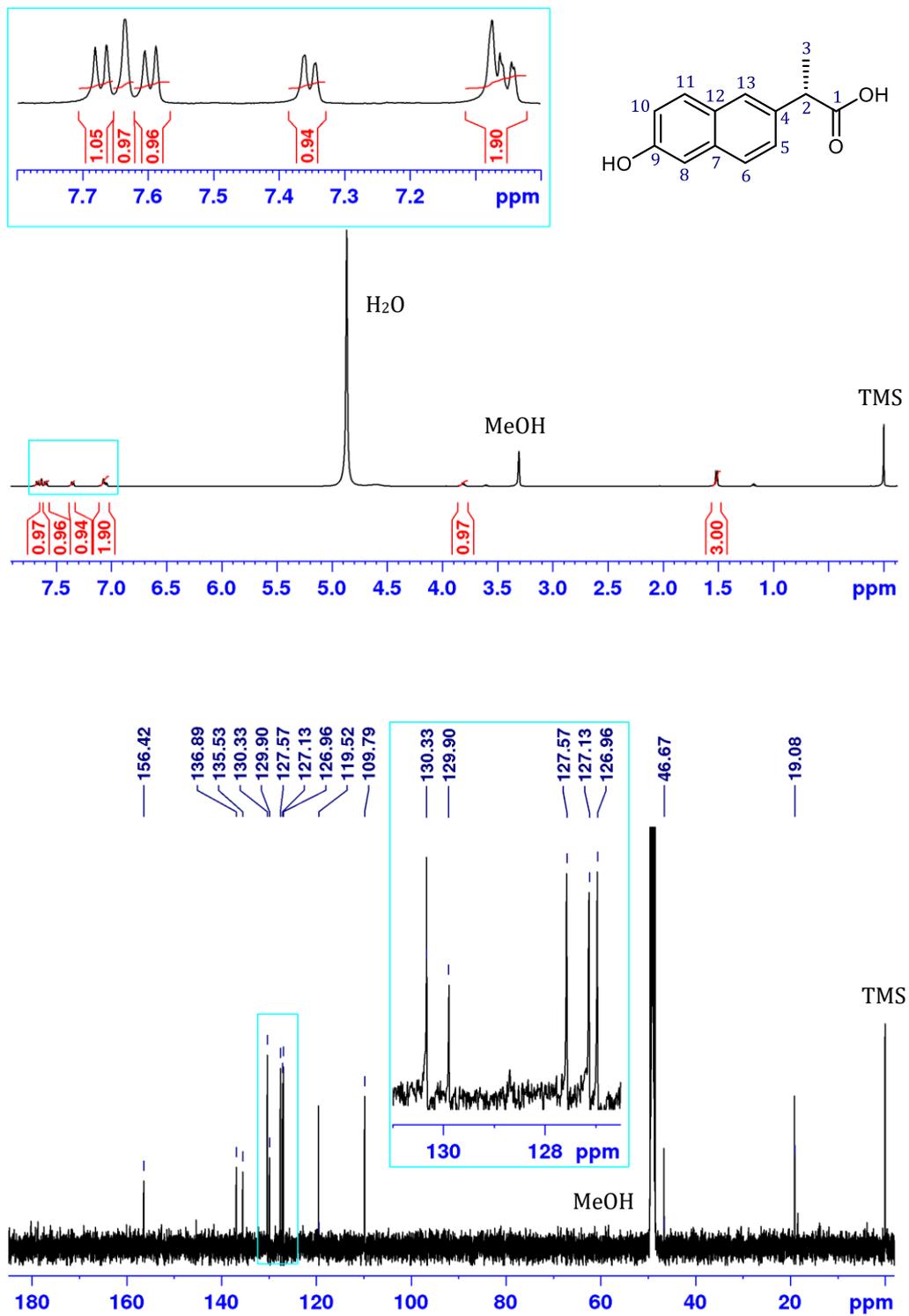


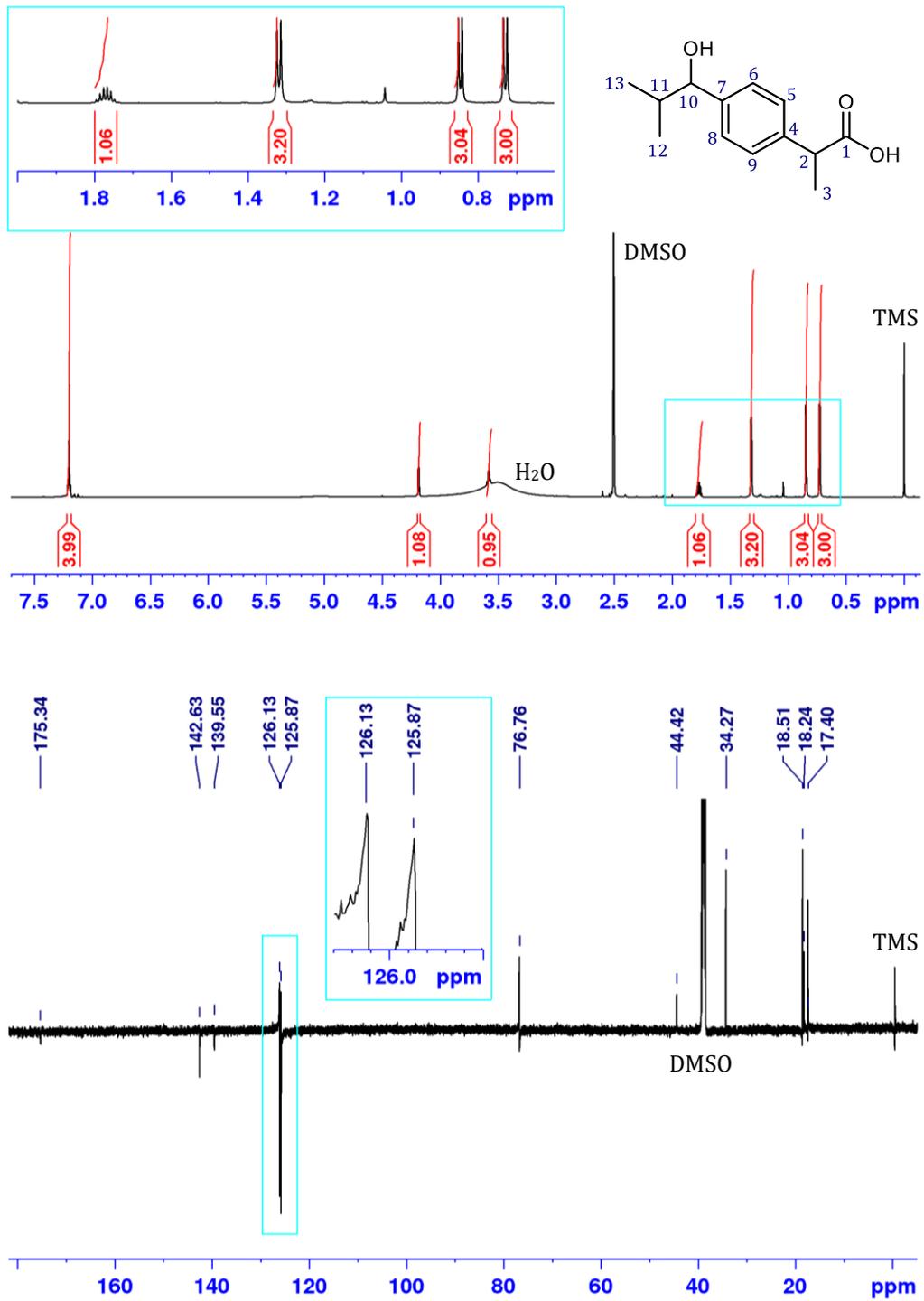
- 3-Hydroxy- β -ionon (**72**):

- 4-Hydroxy- β -ionon (**71**):

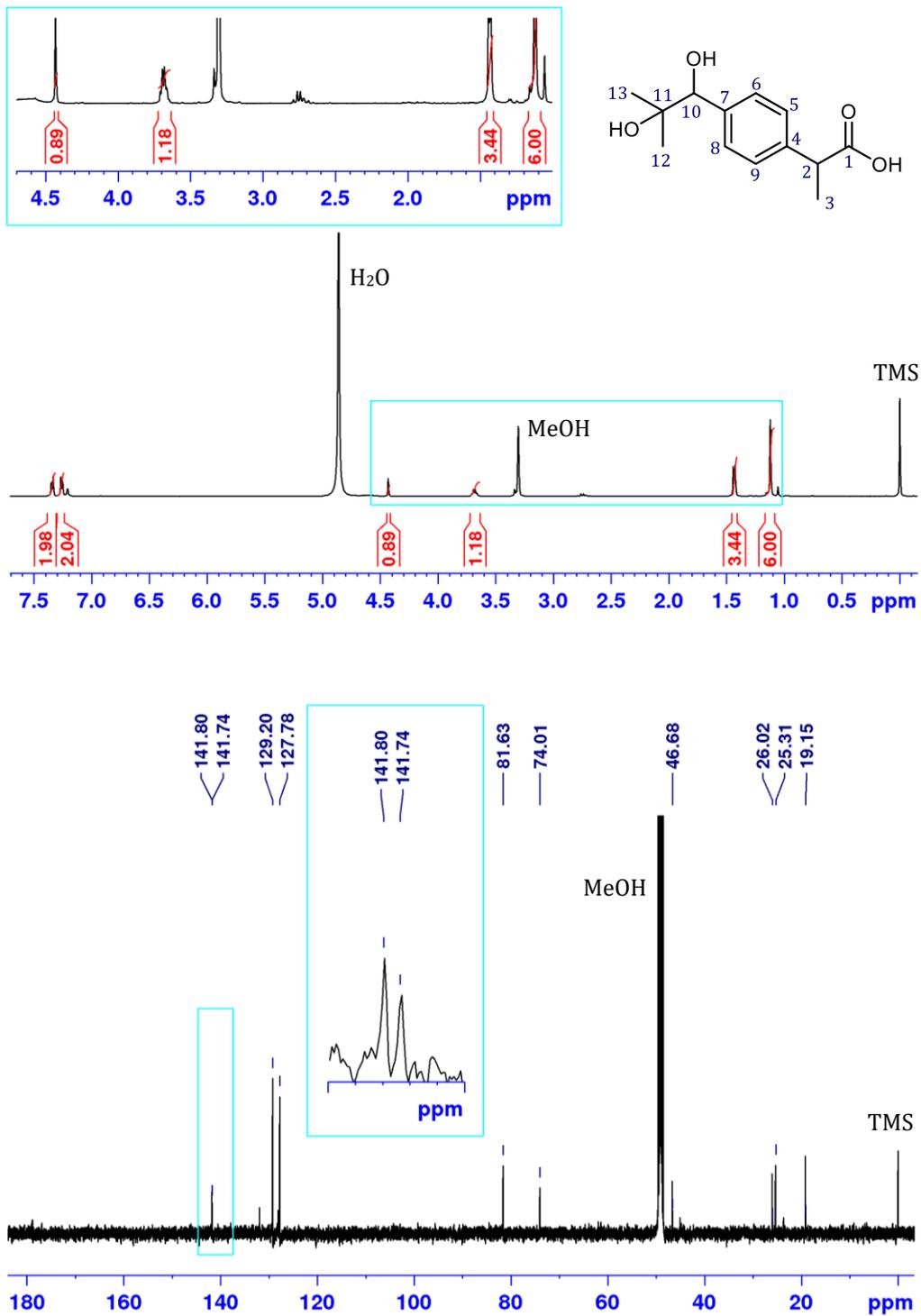


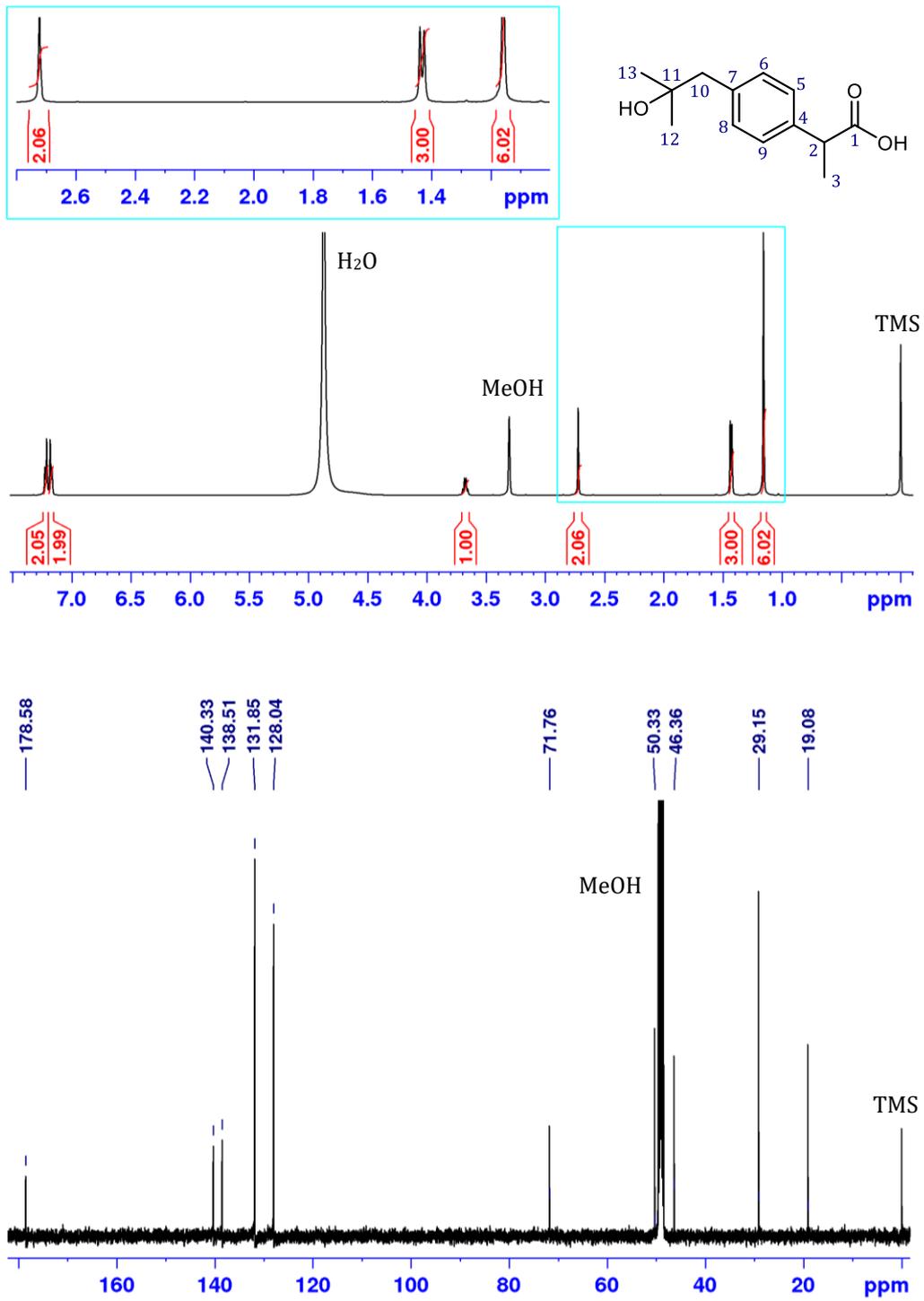
- 2-Hydroxy- β -ionon (73):

- 6-*o*-Desmethylnaproxen (**14**):

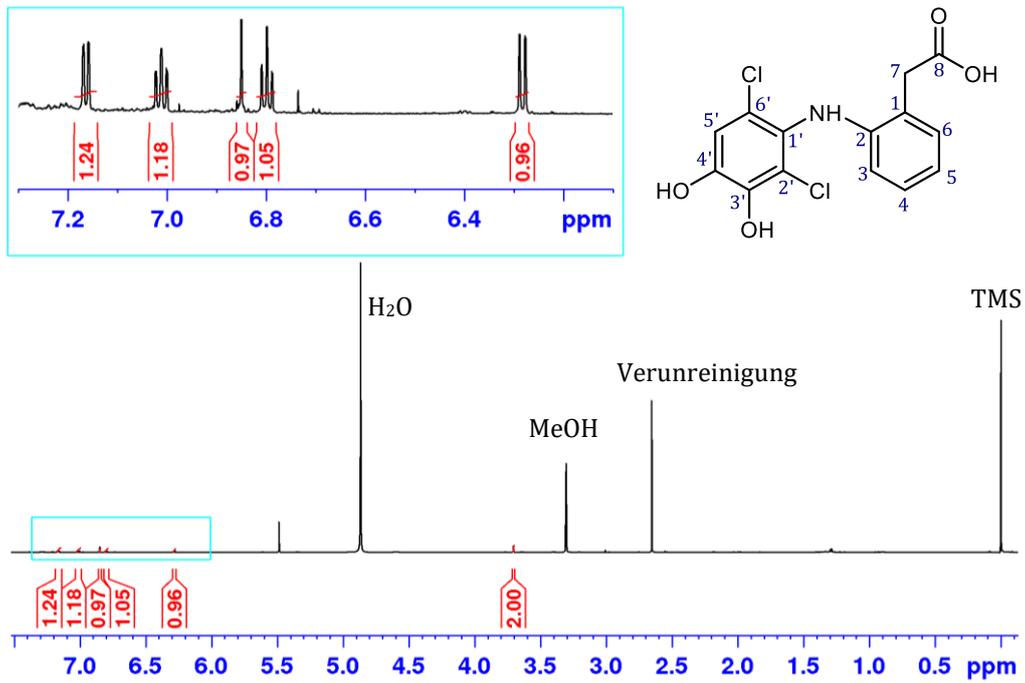
- 1-Hydroxyibuprofen (**17**):

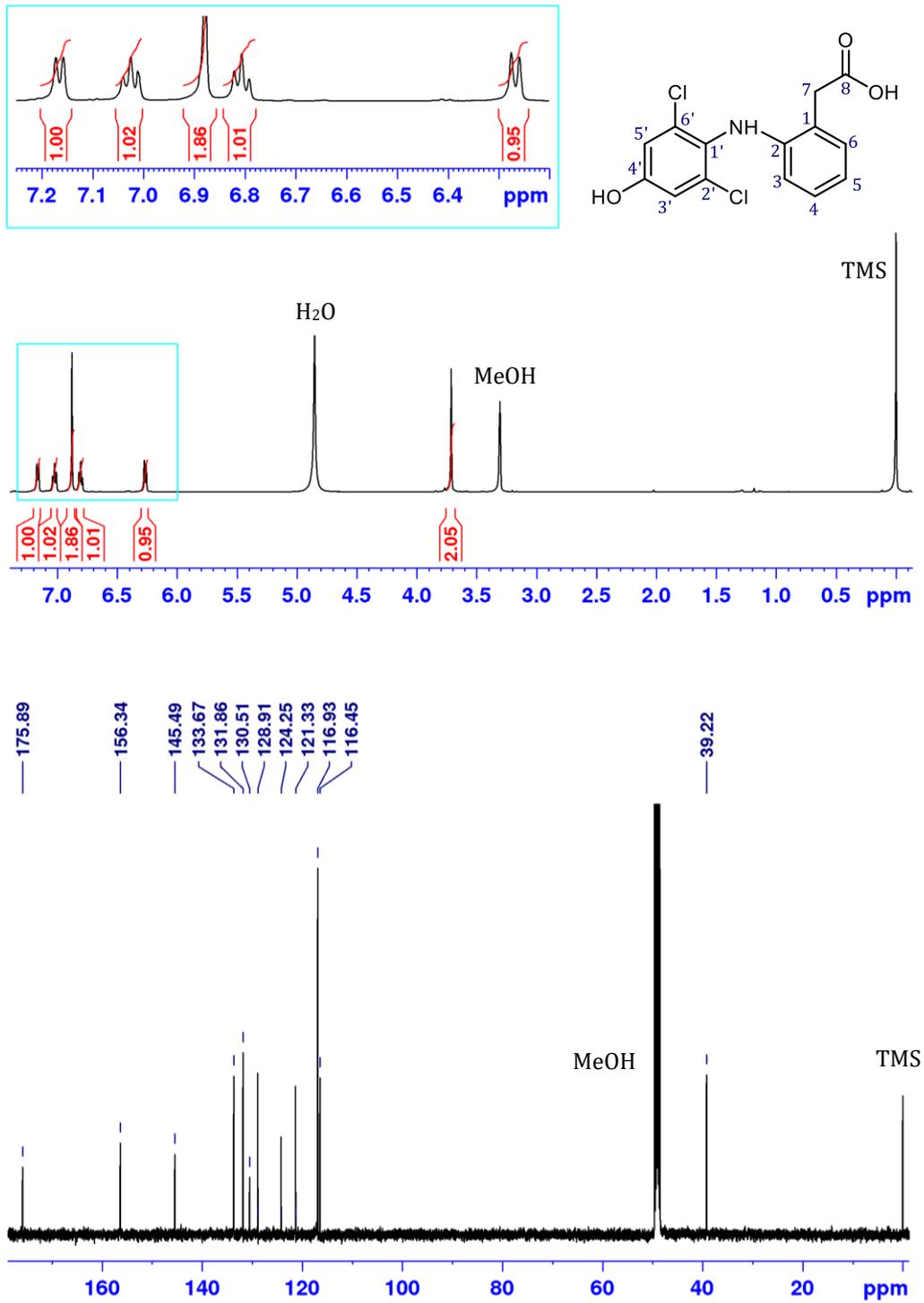
- 1,2-Dihydroxyibuprofen (**18**):

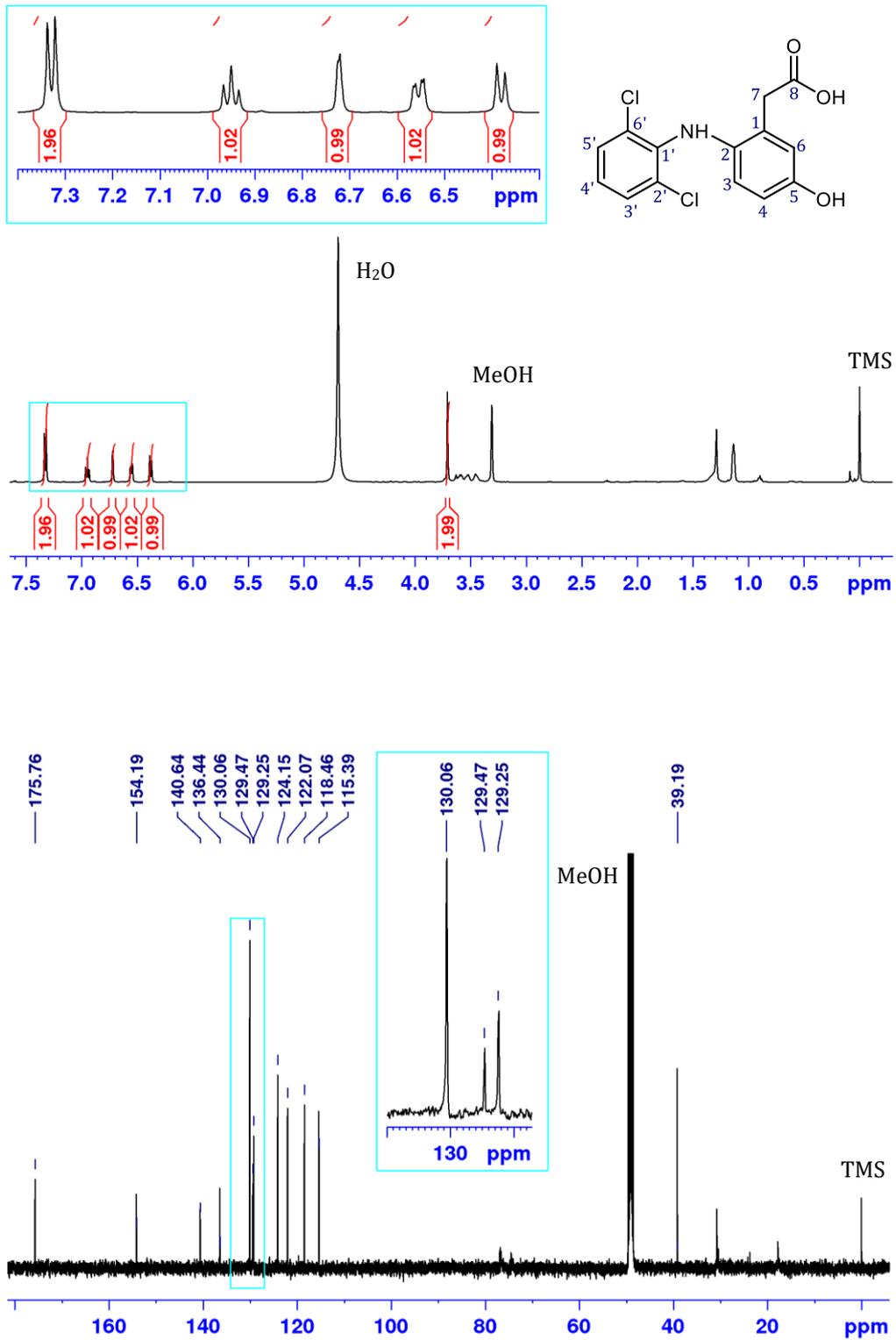


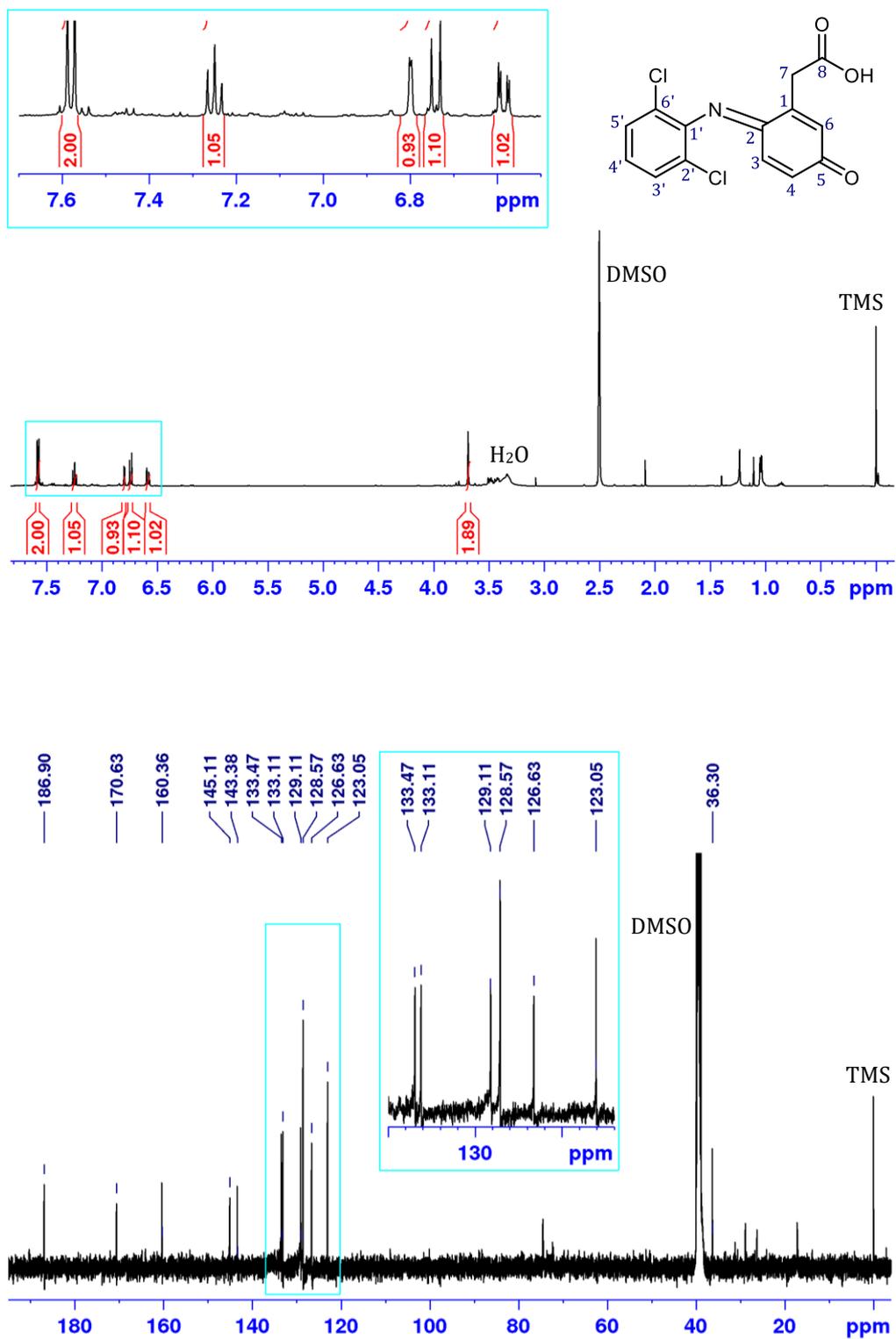
- 2-Hydroxyibuprofen (**16**):

- 3',4'-Dihydroxydiclofenac (**12**):

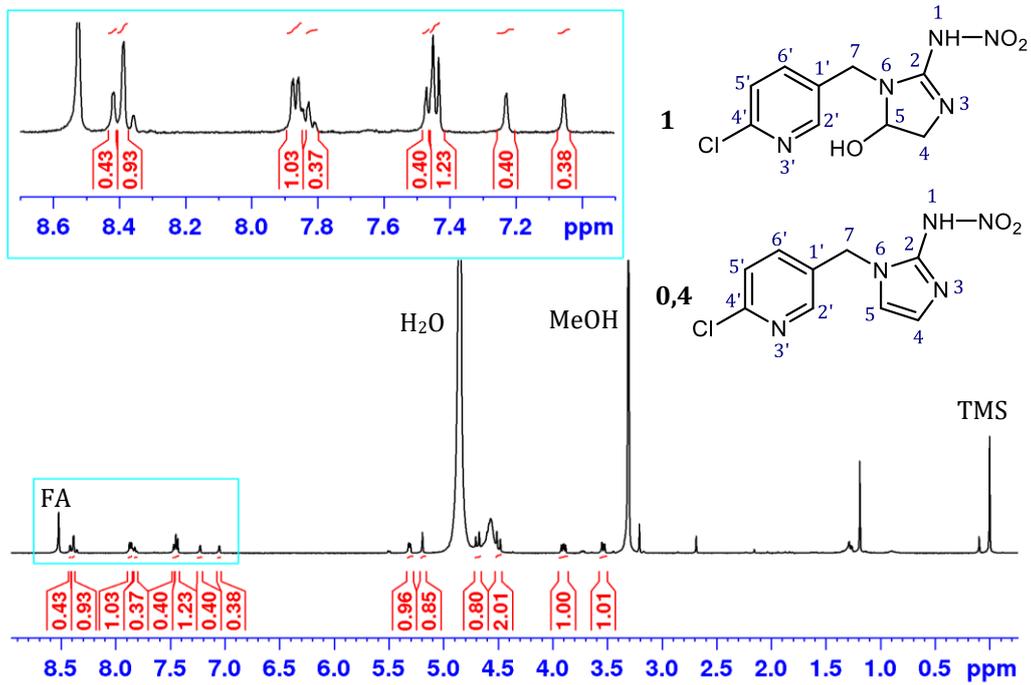


- 4'-Hydroxydiclofenac (**11**):

- 5-Hydroxydiclofenac (**9**):

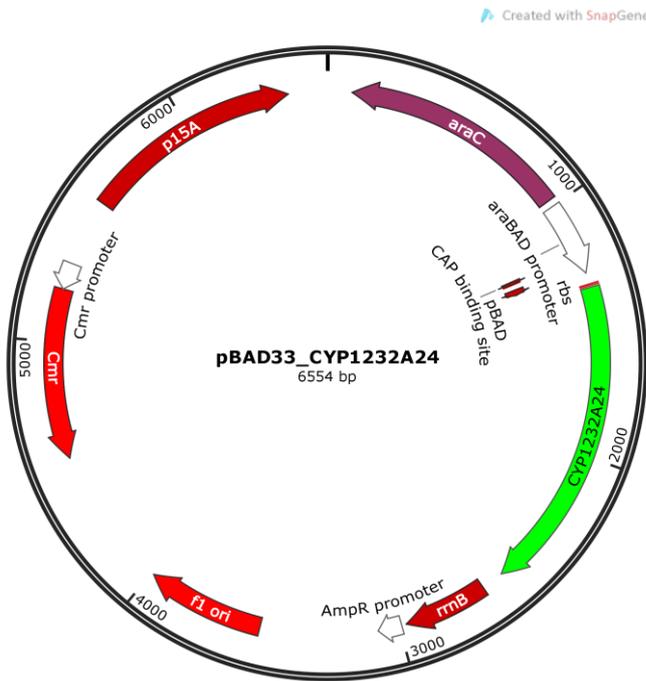
- 5-Hydroxyquinonimin (**10**):

- 5-Hydroxyimidacloprid und Olefin (**101** und **102**):

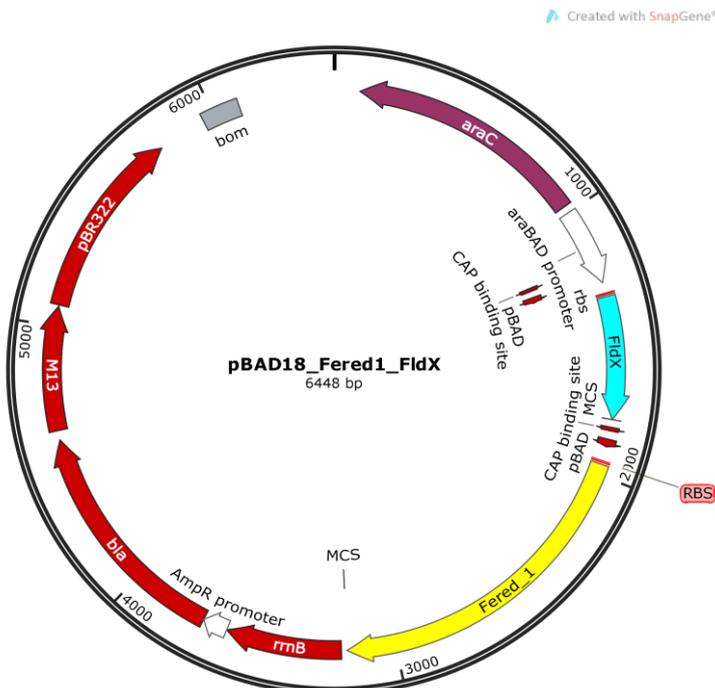


7.9 Vektorkarten

Für die Dual-Vektor Experimente wurden unter anderem die kompatiblen Plasmide pBAD33 (pACYC184 ori, Chloramphenicol-Resistenz, arabinoseinduzierbar) und pBAD18 (pBR322 ori, Ampicillin-Resistenz, arabinoseinduzierbar) verwendet.⁴⁰⁸ In letzteres Plasmid wurden zusätzlich eine CAP binding site, ein pBAD-Promoter sowie eine Ribosomenbindestelle vor das zweite Gen kloniert. Die Plasmidkarten der Vektoren sind unten beispielhaft an dem Dual-Vektor-System CYP1232A24 mit FldX und Fered_1 dargestellt.



Vektorkarte von pBAD33



Vektorkarte von pBAD18

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spektrale Charakteristika von P450s in Abhängigkeit vom Zustand des Häms.	3
Abbildung 2: P450-katalysierte Hydroxylierung (<i>Rebound</i> -Mechanismus).	4
Abbildung 3: Beispiele P450-katalysierter Reaktionen.	5
Abbildung 4: Aufbau der konservierten Sekundärstrukturelemente am Beispiel von P450cam (aus Munro <i>et al.</i> ⁴⁶).....	7
Abbildung 5: Auswahl unterschiedlicher Cytochrom P450 Systeme nach Hannemann und Kollegen (2007). ⁵⁴	8
Abbildung 6: Isoprenoid-Syntheseweg und generierte potenzielle Terpene nach Chang und Kollegen. ¹⁴⁹	13
Abbildung 7: Beispiele hydroxylierter β -Ionon Produkte.	14
Abbildung 8: Synthese des Nootkatons aus dem Sesquiterpen Valencen.	15
Abbildung 9: Oberflächendarstellung der aktiven Tasche von P450 BM3. ²²⁹	19
Abbildung 10: Herausforderungen bei der Charakterisierung neuer Cytochrom P450 Monooxygenasen. .	22
Abbildung 11: Norisoprenoide, Terpene und Diclofenac, deren Oxyfunktionalisierung in dieser Arbeit untersucht werden sollte.	24
Abbildung 12: IEX-Aufreinigung von CYP109Q5.....	46
Abbildung 13: HPLC-SemiPrep-Aufreinigung der CYP109Q5 A280V/T229L präparativen Biotransformation mit β -Ionon (1).	60
Abbildung 14: HPLC-Chromatogramm der <i>in vivo</i> Biotransformation von Diclofenac (8) mit P450 RhF im analytischen Maßstab (1 mL).....	74
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf über die P450 RhF katalysierte Reaktion von Diclofenac (8 , DCF) zu 5-Hydroxydiclofenac (9 , 5-OH-DCF) und Bildung des Quinonimins (10 , QI) mit A) wachsenden Zellen und B) ruhenden Zellen.....	77
Abbildung 17: Diclofenac (8) Biotransformationen mit den filamentösen Pilzen <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Clitocybe nebularis</i> sowie <i>Mucor hiemalis</i>	81
Abbildung 18: Übersicht über die NSAID Biotransformationen katalysiert durch <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Clitocybe nebularis</i> und <i>Mucor hiemalis</i>	83
Abbildung 19: Vergleich der Substratkanäle von CYP116B3 und P450 BM3.	85
Abbildung 20: Vergleich der F-G-Loops bekannter P450 Monooxygenasen.	86
Abbildung 21: Substratspektrum von CYP116B3 aus <i>Rhodococcus ruber</i>	88
Abbildung 22: Übersicht der von <i>Arthrobacter</i> sp. metabolisierten und von <i>Beauveria bassiana</i> hydroxylierten Verbindungen.....	90
Abbildung 21: SDS-Polyacrylamidgel der auf unterschiedlichen C-Quellen gewachsenen <i>Arthrobacter</i> sp. Kulturen.	92
Abbildung 22: Potenzielles Cluster auf dem Genom (Scaffold 2) von <i>Arthrobacter</i> sp.....	93
Abbildung 23: Proteinaufreinigungen der P450s und physiologischen Redoxpartner aus <i>Arthrobacter</i> sp.	96
Abbildung 24: Charakterisierung der neuartigen P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp. mittels CO-Differenzspektren.	97
Abbildung 25: SDS-Polyacrylamidgel der in dieser Arbeit eingesetzten, aufgereinigten heterologen Redoxpartner.....	98

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Ausgewählte Substrate für die <i>in vitro</i> Biotransformation mit CYP199A25.	102
Abbildung 27: Zusammenfassung der CYP199A25-katalysierten Reaktionen.	103
Abbildung 28: Substratspektrum von CYP1232F1.	104
Abbildung 29: Substratspektrum von CYP1232A24.	105
Abbildung 30: <i>Spin-State</i> -Spektren von CYP199A25.	107
Abbildung 31: <i>Spin-State</i> -Spektrum von CYP1232F1.	108
Abbildung 32: <i>Spin-State</i> -Spektren von CYP1232A24.	110
Abbildung 33: Determinierung der kinetischen Konstanten der <i>Arthrobacter</i> sp. P450s.	114
Abbildung 34: Zusammenfassung der <i>in vitro</i> Biotransformationen mit 17 lyophilisierten natürlichen Fusionsproteinen bakteriellen Ursprungs mit den Terpenen 1 – 7	117
Abbildung 35: 3DM-Homologiemodell von ITB1693 (aus <i>Ralstonia metallidurans</i>).	119
Abbildung 36: <i>In vivo</i> Biotransformationen der ITB1693 Varianten mit β -Ionon (1) als Substrat.	120
Abbildung 37: <i>In vivo</i> Produktion des Oxyfunktionalisierten α -Humulens (3) in <i>E. coli</i>	120
Abbildung 38: Substratspektren von CYP109Q5 und CYP125E3 aus <i>C. apiculatus</i>	124
Abbildung 39: Strategie des rationalen Enzymdesigns von CYP109Q5.	125
Abbildung 40: <i>In vitro</i> Biotransformationen mit den Zielterpenen 1 – 7	136
Abbildung 41: Steigerung der Aktivität der CYP109Q5 <i>in vivo</i> Biotransformationen gegenüber den Sesquiterpenen durch 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (2-H β C).	139
Abbildung 42: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 V80A/A280I und Premnaspirodien (5).	140
Abbildung 43: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 V80A/A280I und Longifolen (6).	140
Abbildung 44: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 V80A/A280I und Diclofenac (8).	141
Abbildung 45: Identifikation der Produkte aus der präparativen Biotransformation mit CYP109Q5 A280V/T229L und β -Ionon (1).	142
Abbildung 46: Übersicht über die P450 RhF-katalysierten Reaktionen von Diclofenac (8) und Imidacloprid (36).	144
Abbildung 47: Vergleich der Kristallstruktur von CYP199A4 (verändert nach Coleman <i>et al.</i> , 2016) ³⁹² mit dem Homologiemodell von CYP199A25 aus <i>Arthrobacter</i> sp.	156
Abbildung 48: Tendenz der <i>in vitro</i> Aktivitäten mit CYP199A25.	157
Abbildung 49: Vergleich der <i>in vitro</i> Produktbildung sowie Bindungsaffinität von CYP1232F1 und CYP1232A24 zu den unterschiedlichen Phenyllessigsäurederivaten.	159
Abbildung 50: Beteiligung von CYP1232F1 und CYP1232A24 am Papaverin (35)-Abbauweg in <i>Arthrobacter</i> sp.	160
Abbildung 51: Implementierung von ITB1693 F95A in einen α -Humulen (3) produzierenden <i>E. coli</i> Stamm.	166
Abbildung 52: CYP109Q5 basierte Biokatalyse der Zielterpene 1 – 7	168
Abbildung 53: Fokussierte Mutantenbibliothek von CYP109Q5.	169
Abbildung 54: CYP109Q5-katalysierte Oxyfunktionalisierung von β -Ionon (1).	171
Abbildung 55: Vergleich der aktiven Taschen von CYP101C1 und CYP109Q5.	172
Abbildung 56: <i>In vitro</i> Biotransformationen ausgewählter CYP109Q5 Varianten mit Longifolen (6) für 2 h.	175

Abbildung 57: <i>In vitro</i> Biotransformationen ausgewählter CYP109Q5 Varianten mit Premnaspirodien (5) für 2 h.....	176
Abbildung 58: Vergleich des Substrateingangskanals und des aktiven Zentrums des CYP109Q5-Wildtyps und der Variante V80A/A280I.....	177
Abbildung 59: Tendenz der Aktivitäten mit CYP109Q5.....	179
Abbildung 60: Zusammenfassung der über NMR-Spektroskopie und GC-MS identifizierten Produkte aus <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Sesquiterpenbiotransformationen mit CYP109Q5 Varianten.....	180
Abbildung 61: Überblick über die in dieser Arbeit identifizierten P450s und Mikroorganismen für die Oxyfunktionalisierung des NSAIDs Diclofenac (8).....	182
Abbildung 62: Übersicht der in dieser Arbeit identifizierten Biokatalysatoren für die Oxyfunktionalisierung der Zielterpene 1 – 7.....	188
Abbildung S1: HPLC-Chromatogramm der beiden durch NMR-charakterisierten Diclofenacmetaboliten (9) und (10).....	216
Abbildung S2: Agarosegel der PCRs mit den LSU und ITS Primer.....	216
Abbildung S3: Unterschiedliche Wuchsformen der filamentösen Pilze unter dem Mikroskop und in KGM-Flüssigkultur.....	217
Abbildung S4: Wachstumsversuche auf unterschiedlichen C-Quellen mit <i>Arthrobacter</i> sp.....	217
Abbildung S5: Absorptionsspektren der physiologischen Redoxpartner FeRed_1 und FADOX aus <i>Arthrobacter</i> sp.....	218
Abbildung S6: NAD(P)H-Assay der P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.....	219
Abbildung S7: SDS-PAGE und CO-Differenzspektroskopie der <i>Arthrobacter</i> sp. <i>in vivo</i> Dual-Vektor Systeme.....	220
Abbildung S8: Untersuchung unterschiedlicher Bedingungen zur Expression und Biotransformation der Dual-Vektor-Systeme CYP109Q5 CamA/B und CYP1232A24 FeRed1/FldX.....	221
Abbildung S9: GC-Chromatogramm der ITB1693 <i>in vivo</i> Biotransformationen mit α -Humulen (3).....	224
Abbildung S10: GC-Chromatogramm der ITB1693 <i>in vivo</i> Biotransformationen mit Caryophyllenoxid (77).....	224
Abbildung S11: SDS-PAGE und CO-Spektren der aufgereinigten <i>C. apiculatus</i> P450s CYP109Q5 (A) und CYP125E3 (B).....	225
Abbildung S12: Initiales <i>Screening</i> der CYP109Q5 Varianten (Lysat) mit den Zielterpenen 1 – 7.....	234
Abbildung S13: <i>In vitro</i> <i>Screening</i> der aufgereinigten CYP109Q5 Varianten sowie CYP125E3 und/oder CYP109B1.....	238
Abbildung S14: GC-Chromatogramm der CYP109Q5 V80A/A280I <i>in vivo</i> Biotransformationen mit Premnaspirodien (5).....	239
Abbildung S15: GC-Chromatogramm der CYP109Q5 V80A/A280I <i>in vivo</i> Biotransformationen mit Longifolen (6).....	239

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herausforderungen in einem P450-basierten Prozess.....	10
Tabelle 2: Auswahl interessanter Oxyfunktionalisierungen für die industrielle Biotechnologie.....	17
Tabelle 3: Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit in <i>E. coli</i> erfolgreich exprimierten Proteine.....	41
Tabelle 4: Analyse der Biotransformationsbedingungen mit ruhenden Zellen und Vergleich der 5-Hydroxydiclofenac (9) Produktion zwischen wachsenden und ruhenden Zellen.....	75
Tabelle 5: Ganzzellaktivitäten von P450 RhF als wachsende und ruhende Zellen. ^{a)}	76
Tabelle 6: Rational konstruierte Varianten des Substrateingangskanals und des F-G-Loops von CYP116B3.	87
Tabelle 7: Ergebnisse der Proteomanalyse der mit unterschiedlichen Substraten durchgeführten Biotransformationen mit <i>B. bassiana</i>	91
Tabelle 8: Ergebnisse der Proteomanalyse der auf unterschiedlichen C-Quellen gewachsenen <i>Arthrobacter</i> sp. Zellen.....	93
Tabelle 9: Expression der <i>Arthrobacter</i> sp. P450s.....	95
Tabelle 10: Aminosäuresequenzvergleiche der <i>Arthrobacter</i> sp. P450s.....	99
Tabelle 11: <i>In vitro</i> Produktbildung, NAD(P)H Assay und Kopplungseffizienzen der <i>Arthrobacter</i> sp. P450s.	112
Tabelle 12: Ganzzellbiotransformationen der <i>Arthrobacter</i> sp. P450s mittels Dual-Vektor-Systemen.....	116
Tabelle 13: Verwandtschaftsanalyse ausgewählter P450s aus <i>Chondromyces apiculatus</i> DSM436.....	122
Tabelle 14: Expressionsbedingungen der ausgewählten P450s aus <i>Chondromyces apiculatus</i> DSM436... 122	122
Tabelle 15: <i>Screening</i> der <i>Chondromyces apiculatus</i> P450s auf Aktivität gegenüber den Terpen-Zielsubstraten 1 – 7	123
Tabelle 16: Ergebnisse des rationalen Enzymdesigns von CYP109Q5.....	127
Tabelle 17: Zusammenfassung der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Ergebnisse der neuen P450s aus <i>Arthrobacter</i> sp.	162
Tabelle 18: Zusammenfassung der biotechnologischen Prozesse zur Herstellung von Diclofenacmetaboliten.....	183
Tabelle 19: Biokatalysatoren mit Aktivität gegenüber den Norisoprenoiden 1 und 2	185
Tabelle 20: Biokatalysatoren mit Aktivität gegenüber den Zielterpenen 3 bis 7	186
Tabelle S1: Analyse der P450 RhF Fusion Integrität durch CO-Differenzspektroskopie.....	215
Tabelle S2: CO-Differenzspektren der auf dem SDS-PAGE in Abbildung S8 aufgetragenen Expressionen.....	222
Tabelle S3: CO-Differenzspektren der Lysate von ITB1693 Varianten und des ITB1696 WT.....	223
Tabelle S4: <i>Screening</i> unterschiedlicher Redoxpartnerkombinationen mit CYP1232A24, CYP1232F1, CYP199A25 und CYP109Q5.....	226
Tabelle S5: Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Substrate und Übersicht der erzielten Ergebnisse, mit den weitergehend untersuchten CYP1232A24, CYP1232F1, CYP1005C4, CYP199A25, CYP125E3 sowie CYP109Q5.....	228

