

Etablierung und Charakterisierung einer Cytochrom P450 Monooxygenase für die Bioelektrokatalyse in einem dreidimensionalen CNT-Solgel Elektrodensystem

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

vorgelegt von
Dominique Darimont
aus Saarburg

Hauptberichter: Prof.Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof.Dr. Andreas Schaller
Prüfungsvorsitz: Prof.Dr.-Ing Ralf Takors
Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2018

Institut für Biochemie und Technische Biochemie
Abteilung Technische Biochemie
Universität Stuttgart

0.1 Kurzzusammenfassung

Die Motivation dieser durch das BMBF finanzierten ElektroZym Projekts ist die Überwindung der Limitation einer geringen spezifischen Produktleistung der bisher etablierten elektrochemisch getriebenen Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP) Applikationen. Diese Applikationen wurden als Alternative zur meist unselektiven chemischen Metall-katalysierten Hydroxylierung entwickelt und stellen unterschiedliche hydroxylierte Produkte zur Verfügung. Dabei sind vor allem hydroxylierte Fettsäuren (OHFA) von Bedeutung, welche als Bausteine (building blocks) zur Synthese von z.B. Geruchs- und Geschmackstoffen verwendet werden. Momentan sind diese OHFAs aufgrund der hohen Herstellungskosten nicht kommerziell verfügbar.

Das Ziel des Projekts ist die Immobilisierung eines CYP Enzyms in einer dreidimensionalen, auf einer Solgel Matrix basierenden Elektrode. Die kovalente Immobilisierung von CYP Enzymen auf einer planaren Elektrodenoberfläche führt im Idealfall zu einer einfachen Oberflächenbedeckung (Monolayer) der Elektrode mit reduzierbarem Enzym. Die CYP Elektroden sind aufgrund der geringen Oberfläche in ihrer spezifischen Produktleistung stark limitiert.

Daher wurde ein optimiertes CYP Enzym für den Einsatz auf Kohlenstoffnanoröhren (CNT) basierten Elektroden etabliert. Als Enzym diente das von einer zusätzlichen Reduktase unabhängige (autarke) CYP 102A1 aus *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}).

Für eine *in situ* Aktivitätsbestimmung wurde das Enzym auf den Umsatz von Anilin zum elektroaktiven Aminophenol optimiert. Vier Enzymmutanten wurden zusätzlich mit einer C-terminal lokalisierten und CNT-affinen Petidsequenz (CNT-tag) modifiziert. Diese werden im Folgenden als Modell Proteinvarianten bezeichnet. Diese Sequenz erlaubt die eigenständige und orientierte Anlagerung des Enzyms an der CNT Oberfläche und erleichtert die elektrochemische Hämeisenreduktion des Enzyms entscheidend. Die Hämeisenreduktion dieses P450_{BM3} Konstruktes erlaubt die elektrochemisch getriebene enzymatische Hydroxylierung von Anilin. Diese elektrochemisch enzymatische Hydroxylierung erreichte 78 % der Aktivität, der Nicotinamid-abhängigen Substratumsetzung.

Das CNT-tag modifizierte Enzym wurde ebenfalls für die erfolgreiche „proof-of-concept“ Etablierung einer dreidimensionalen CNT-Solgel Matrix Elektrode verwen-

det und die spezifische Produktleistung erreichte das dreifache Niveau einer vergleichbaren planaren Elektrode.

Bereits zuvor wurde in der Literatur eine negative Korrelation der Produktbildung und der Ratenkonstante des Elektronentransfers beschrieben. Daher wurde der intramolekulare Elektronentransfer im P450_{BM3} System mit Hilfe eines Alanin-scanning Versuchs auf Grundlage der *in silico* Betrachtung von Elektronentransferwegen zwischen dem in der Reduktase lokalisierten FMN und dem Hämeisen des BM3 untersucht. Grundlage der erstellten Bibliotheken waren die drei aktivsten Modell Proteinvarianten.

Innerhalb dieser Bibliotheken wurde eine Variante mit 13-fach gesteigerter Nicotinamid-abhängigen Aktivität und einer 32-fach gesteigerten Couplingeffizienz identifiziert. Im Gegensatz dazu war die elektrochemisch getriebene Aktivität der Variante stark vermindert.

Die Reduktion mittels Nicotinamid und Elektrode stellen sich, in Abhängigkeit von der Ausgangssituation, als sehr unterschiedlich effizient dar. Im Zuge einer cylovoltammetrischen Untersuchung konnte eine gemäß der Literatur adäquat niedrige Ratenkonstante des Elektronentransfers für eine effiziente elektrochemische Aktivität der Modell Proteinvariante bestimmt werden.

Durch Implementierung eines Alaninrestes in einem Elektronentransferweg zwischen FMN und Hämeisen wurde diese Ratenkonstante stark vermindert, sodass keine effiziente elektrochemische Aktivität möglich war.

Die Reduktion mittels NADPH stellt eine Überversorgung mit Reduktionsäquivalenten dar, welche durch die Implementierung eines zusätzlichen Widerstands auf eine adäquate Versorgung gedrosselt/vermindert wurde. Die elektrochemische Reduktion hingegen stellt eine adäquate Elektronenmenge für den Substratumsatz der Modell Proteinvarianten zur Verfügung und wird durch einen zusätzlichen Widerstand unter eine kritische Elektronenmenge für eine effiziente Hydroxylierungsaktivität vermindert.

Durch Verwendung eines Fusionskonstruktes konnte eine effiziente CYP-Elektroden Applikation etabliert und dreidimensional erweitert werden. Die Untersuchung des Elektronentransfers konnte bestätigen, dass die negative Korrelation der Ratenkonstante des Elektronentransfers und der Produktformation gültig, aber auf einen minimalen Elektronentransfer beschränkt ist.

0.2 Abstract

Motivation for the ElektroZym project, funded by the federal ministry of education and research (BMBF), is to overcome the low space-time-yield of yet established electrochemically driven cytochrome P450 monooxygenase (CYP) applications. These applications were developed as an energy-efficient alternative to chemical, sparsely selective metal-catalysed hydroxylation. Various hydroxylated products are derived from these CYP applications. Especially hydroxylated fatty acids (OHFA) are of great interest as building blocks for the synthesis of fragrance compounds and flavours. At the moment these OHFAs are not commercially available.

The aim of the project is a multilayer immobilisation of CYP enzymes within a three-dimensional solgel based electrode. The covalent immobilisation of CYPs at a planar electrode, ideally results in a monolayer of reducible enzymes at the electrode surface. These CYP electrodes are limited to a low space-time-yield by their small surface area.

Therefore an optimised CYP enzyme was developed for the use with carbon nanotube (CNT) based electrodes. The self-sufficient CYP 102A1 from *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}) was chosen for this purpose. The enzyme was optimised for the turnover of anilin to the electroactive aminophenol for an *in situ* determination of enzymatic activity. Four enzyme mutants were modified with a C-terminal, CNT-affine peptide sequence (CNT-tag), which are referred to as model-protein-variants. This CNT-tag sequence facilitates oriented self-assembly of the enzyme at the CNT surface and electrochemical haem iron reduction.

Reduction of the haem iron of this P450_{BM3} CNT-tag construct results in the electrochemically driven enzymatic hydroxylation of aniline. Electrochemically driven enzymatic hydroxylation by the model-protein variants achieves up to 78 % of nicotinamide-dependent activity.

In a successful „proof-of-concept“ approach, a three-dimensional CNT-solgel electrode was established, using the CNT-tag modified enzyme. This application achieved triple the space-time-yield of a comparable planar electrode system.

Earlier a negative correlation of enzymatic product formation and the rate constant of electron transfer was described in literature. Therefore intramolecular electron

transfer within the P450_{BM3} system was investigated, using an alanine scanning approach. These experiments are based on *in silico* simulation of electron transfer, from the reductase-localised FMN to the haem iron of BM3. The alanine scanning mutant library was based on the three most active model-protein-variants.

Within this library, a mutant with 13-fold nicotinamide-dependent activity and 32-fold enhanced coupling efficiency was identified. In contrast, the electrochemically-driven enzymatic activity of this mutant was severely decreased

Depending on the starting situation, haem iron reduction by nicotinamide and electrode vary drastically. An appropriate and low rate constant of electron transfer for efficient electrochemically-driven activity of the model-protein-variant, was shown by cyclic voltammetry. By implementation of an alanine residue within an electron transfer pathway between FMN and the haem iron, the rate constant was decreased (resistance). Therefore no efficient activity was achieved.

Reduction by nicotinamide facilitates an oversupply of reduction equivalents, which is decreased by the implementation of an additional resistance to an appropriate amount. In contrast, electrochemical reduction supplies an appropriate amount of electrons for aniline hydroxylation by model-protein-variants. An additional resistance decreases electron supply below a critical amount for efficient hydroxylation activity.

In summary, an efficient CYP-electrode application was established and expanded into the third dimension by using a CNT-tag modified CYP fusion construct. Investigation of electron transfer proved a negative correlation of the rate constant of electron transfer and product formation. This correlation is limited to a minimal amount of electrons transferred.

0.3 Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Dr. Bernhard Hauer für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart danken. Ein besonderer Dank geht an Junior-Professor Dr. Martin J. Weissenborn und an Dr. Bernd A. Nebel für die ständige Unterstützung im Labor und während des Verfassens dieser Arbeit. Ihr wart mir eine unbezahlbare Hilfe.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Bettina Nestl für die Unterstützung in allen Fragen und Problemen im Labor und bei Schreiben und Verfassen von Vorträgen und Veröffentlichungen. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinen P450 Kollegen Dr. Sandra Notonier und Sara Hoffmann für gute fachliche Diskussionen und Anregungen, sowie bei allen anderen Doktoranden und Gruppenleitern des ITB, sowie bei Frau Klumpp-Klug für das tolle Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Ein Dank an die „Wellness Oase“ für lustige Raucherpausen und unzählige Male zum Netto und zurück.

Auch bei den Mitarbeitern des NMI in Reutlingen, Kai Fuchsberger, Dr. Ramona Samba, Dr. Martin Stelzle und Dr. Enrique Llaudet möchte ich mich für die Kooperation und für vier tolle Wochen am NMI bedanken.

Ein spezieller Dank geht an meine Eltern die mich stets unterstützt und ermuntert haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Subventionierung des ElektroZym Tandemprojekts am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, sowie am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen bedanken. (Projektnummern: 031A179 und 031B0112A).

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Etablierung und Charakterisierung einer Cytochrom P450 Monooxygenase für die Bioelektrokatalyse in einem dreidimensionalen CNT-Solgel Elektrodensystem“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled „Establishment and characterisation of a cytochrome P450 monooxygenase for bioelectrocatalysis in a three-dimensional CNT-solgel electrode system“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den

Inhaltsverzeichnis

0.1	Kurzzusammenfassung	i
0.2	Abstract	iii
0.3	Danksagung	v
	Abbildungsverzeichnis	xi
1	Einleitung	1
1.1	Hydroxylierte Produkte als „building blocks“ in der chemischen Industrie	2
1.2	Biokatalyse in der Chemie	3
1.3	Cytochrom P450 Monooxygenasen	3
1.3.1	Der P450 Zyklus	4
1.3.2	Reduktionspartner der CYPs	6
1.4	Der <i>intra</i> -molekulare Ladungstransport	8
1.5	Limitation der CYP Biokatalyse	11
1.6	Bioelektrochemie der Cytochrom P450 Monooxygenasen	13
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	25
3.1	Verbrauchsmaterialien	25
3.2	Plasmide und Konstrukte	26
3.3	Oligonukleotide	28
3.4	Molekularbiologische Methoden	31
3.4.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	31
3.4.2	Transformation von Plasmiden in chemisch kompetenten Zellen	32

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Zellen	33
3.4.4	Mutagenese mittels Überhang-PCR und QuikChange™	33
3.4.5	Klonierung von Plasmiden	34
3.4.6	Heterologe Proteinexpression in <i>E.coli</i> BL21(DE3)	35
3.4.7	Zellaufschluss von <i>E.coli</i>	36
3.4.8	Chromatographische Proteinreinigung	36
3.4.8.1	Affinitäts-Chromatographie	37
3.4.8.2	Ionenaustausch-Chromatographie	37
3.4.8.3	Gel-Permeations-Chromatographie	38
3.4.9	Anlagerungsreaktion mit N-(1-Pyren) Iodoacetamid	38
3.4.10	Modifikation mit einem CNT-bindenden Peptid (CNT-tag)	38
3.5	Analytische Methoden	38
3.5.1	Gaschromatographie	38
3.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	39
3.5.3	Photometrie	41
3.5.3.1	P450 Konzentrationsbestimmung	41
3.5.3.2	P450-Reduktase Aktivitätsbestimmung	42
3.5.3.3	NAD(P)H Verbrauchsbestimmung	42
3.5.3.4	Pyren Quantifizierung in wässriger Lösung	42
3.5.3.5	P450-abhängige 4-Nitroanisol Umsatzbestimmung	43
3.5.4	Elektrochemische Messmethoden	43
4	Ergebnisse	45
4.1	P450 _{BM3} Modifikation mit einem Anker-molekül	45
4.1.1	P450 _{BM3} Modifikation mit einem Cysteinrest	45
4.1.2	Pyren Anlagerungsreaktion	46
4.1.3	Vergleichende Charakterisierung des wildtypischen Enzyms und der Pyren modifizierten Varianten	48
4.1.4	Gentechnische Modifikation mit einem C-terminalen Kohlenstoffnanoröhren-bindenden Peptid	49
4.1.5	Vergleichende Charakterisierung der CNT-tag Variante mit dem nicht modifizierten P450 _{BM3}	49

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.6	Elektrochemischer Vergleich der Pyren- und CNT-tag modifizierten Varianten (NMI)	49
4.2	Etablierung einer Methode zur <i>in-situ</i> Aktivitätsbestimmung	50
4.2.1	Screening der Bibliothek auf Aktivität mit ausgesuchten Substraten	51
4.2.2	Validierung der elektrochemisch getriebenen Aktivität	54
4.3	Intramolekularer Elektronenübertragung im P450 _{BM3} System	60
4.3.1	Die Rolle der FAD- und NADPH-bindenden Domänen für die elektrochemische und Nicotinamid-abhängige Reduktion	60
4.3.2	Elektrochemische Charakterisierung der BM3 _{FMN+CNT-tag} Variante	63
4.3.3	Intramolekularer Elektronentransfer (FMN → Hämeisen)	64
4.3.4	Bestimmung der reduzierbaren Enzymstoffmenge	67
4.3.5	Bestimmung der Mittelpunktspotentiale E ₀	68
4.3.6	Bestimmung der Ratenkonstante des Elektronentransfers	69
4.3.7	Elektrochemische Bestimmung der elektrochemisch getriebenen Aktivitäten	71
4.3.8	Ausschluss der Wasserstoffperoxid getriebenen Peroxygenaseaktivität	71
5	Diskussion	75
5.1	Etablierung einer elektrochemisch getriebenen Cytochrome P450 Monooxygenase	76
5.1.1	Die Wahl des Enzyms	76
5.1.2	Die Wahl des Ankermoleküls	77
5.1.3	Die Wahl des Substrates	84
5.1.4	Validierung der oxidativen Detektion als gleichwertige Analyse- methode	91
5.1.5	Nachweis der erleichterten produktiven Hämeisen Reduktion durch Modifikation mit dem CNT-tag	91
5.1.6	Vergleich der Nicotinamid und elektrochemisch getriebenen Hydroxylierungsaktivität	93

INHALTSVERZEICHNIS

5.1.7	Elektrochemische Quantifizierung und Bestimmung der elektrochemischen, enzymatischen Aktivitäten	93
5.1.8	Ausschluss der Peroxygenase Aktivität von BM3 als treibende Kraft der beobachteten Substratumsätze	97
5.2	Untersuchung des intramolekularen Elektronentransfers	99
5.2.1	Notwendigkeit der Flavine zur Produktformation	101
5.2.2	Theoretische Elektronentransferwege an der Interaktionsstelle zwischen Reduktase und P450 Domäne	104
5.3	Validierung der elektrochemisch, enzymatischen Aktivitäten mittels qualitativer HPLC Analytik	111
5.4	Bewertung der dreidimensionalen ElektroZym Applikation	112
6	Zusammenfassung und Ausblick	115
7	Anhang	123
	Literatur	127

Abbildungsverzeichnis

1.1	Position der Hydroxygruppe am Beispiel der Hydroxydodekansäure.	2
1.2	Cytochrom P450 Reaktionszyklus	5
1.3	CYP Elektronentransportketten	7
1.4	Redox Zyklus der Flavine	9
1.5	Potentialkurven der Cyclovoltammetrie Methoden	17
1.6	Beispiel Cyclovoltammogramm	18
3.1	Temperaturprogramm einer PCR Reaktion.	34
3.2	Vektorkarte des pET-28a(+).	35
4.1	Erleichterte Hämeisenreduktion durch Ankermoleküle	51
4.2	Mutierte Aminosäurepositionen der fokussierten Bibliothek und Screening auf Anilinumsatz	54
4.3	Elektrochemisch getriebene Produktformation des CNT-tag modifizierten Enzyms	56
4.4	HPLC-gestützte Validierung der elektrochemisch getriebenen Produktformation	58
4.5	Einfluss der Solgel Immobilisierung auf die Substrat- und Produktdiffusion und Vergleich der elektrochemisch getriebenen und NADH-abhängigen Produktbildung	59
4.6	Nicotinamid-abhängige hBM3-katalysierte Dodekansäure Umsetzung in Abhängigkeit von der <i>ecFdR</i> / <i>Fld</i> Konzentration	62
4.7	Kombinierte Darstellung des FPLC-AEX Chromatogrammes und des SDS-PAGE Gels der gesammelten Fraktionen	63

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

4.8	GC-FID Chromatogramm der elektrochemisch getriebenen Dodekansäure Hydroxylierung durch BM3_{FMN} , P450_{BM3} und hBM3	65
4.9	Coupling Effizienz und Aktivität der Modell Proteinvarianten und ausgesuchter Elektronentransferweg Mutanten	66
4.10	Schaubild zum linearen Zusammenhang des Peak Strom und der Scanrate	67
4.11	Bestimmung der Oberflächen-gebundenen Stoffmenge BM3	68
4.12	Bestimmung der Mittelpunktspotentiale $E_{0\text{Häm}}$ und $E_{0\text{Flavin}}$ aus den CVs einer BM3 Konzentrationsreihe	69
4.13	Graph des Peakpotenzials über der Scanrate	70
4.14	Wasserstoffperoxid-abhängige und hBM3 -katalysierte Produktformation	72
5.1	Schema der von P450_{BM3} katalysierten, subterminalen Hydroxylierung am Beispiel der Dodekansäure.	76
5.2	Kombinierte Darstellung der Produktformation und der Ratenkonstanten des Elektronentransfers verschiedener CYP Konstrukte auf jeweils einer Glaskohlenstoff- (GK) und einer Gold Elektrode	78
5.3	Übersicht über die verwendeten Ankermoleküle	80
5.4	Übersicht über die Hydroxylierung ausgesuchter Substrate	85
5.5	Übersicht über die verwendeten Elektrodenaufbauten	90
5.6	Theoretische zeitliche Entwicklung der Aminophenol Konzentration mit zunehmendem Abstand von der Kathode und beispielhafte chronoamperometrische Aminophenol Detektion	92
5.7	Beispielvoltammogramm von $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$	94
5.8	Elektronenweitergabe im BM3 System	101
5.9	Schematische Darstellung der Elektronentransfer Mechanismen Tunneling und Hopping	106
6.1	Übersicht der erreichten Ziele zur Etablierung einer elektrochemisch getriebenen Cytochrom P450 Monooxygenase	117
6.2	Übersicht über die Aktivitäten und Coupling Effizienzen des wildtypischen BM3 , sowie der Modell Protein Variante BM3 LFVF und deren Elektronentransferweg Mutante F393A/M490A.	119
6.3	Oxidative Produktdetektion am Beispiel der Enzyme BM3 LFVF und deren Elektronentransferweg Mutante LFVF F393A	120

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

7.1	Basensequenz des CNT-tag modifizierten P450 _{BM3} Gens	124
7.2	ESI-MS Analyse eines Chymotrypsin Verdau der Pyren-modifizierten P450 BM3 Hämdomäne	125
7.3	Langzeit Inkubation einer CO P450 Koneztartionsbestimmung und Nachweis einer Reduktase Verunreinigung des isolierten hBM3. . . .	125
7.4	HPLC-DAD Chromatogramm der Produktstandards <i>p</i> - und <i>o</i> -Aminophenol, sowie des Substrats Anilin.	126
7.5	Absorptionspektren der Hydroxylierungsprodukte <i>p</i> - und <i>o</i> -Aminophenol sowie dem Substrat Anilin im Bereich von $\lambda = 210$ nm und $\lambda = 300$ nm	126

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1

Einleitung

Die Einführung einer Hydroxy- (OH-) Gruppe in eine Molekülstruktur wird als eine Hydroxylierungsreaktion bezeichnet und ist von entscheidender Bedeutung im Metabolismus der lebenden Zelle. Dazu gehören im aufbauenden Stoffwechsel (Anabolismus) z.B. die Biosynthese von Tyrosin aus Phenylalanin, die Aktivierung des Hormons 1, 25 Dihydroxycholecalciferol in der Leber und Niere, sowie die Biosynthese von Xanthopyllen in pflanzlichen Zellen.^(89, 130) Auch im abbauenden Metabolismus (Katabolismus) wie z.B. der Verstoffwechslung vieler Xenobiotika in der Leber spielt die Hydroxylierung eine entscheidende Rolle.⁽⁸⁹⁾ Die eingeführten Hydroxygruppen erlauben den weiteren Abbau und erleichtern dem Gesamtorganismus die Ausscheidung durch eine höhere Wasserlöslichkeit.

Ist die OH- Gruppe die charakteristische reaktive Gruppe eines Moleküls, spricht man von Alkoholen. Chemisch werden diese mittels Hydratisierung von Alkenen, Hydrolyse von Alkylhalogeniden, Hydrierung von Kohlenstoffmonoxid (CO) und Reduktion von Carbonyl-Verbindungen, unter Verwendung von metallischen Katalysatoren (CuO, ZnO und Cr₂O₃) dargestellt.⁽¹³⁷⁾ Die nicht katalysierte Einführung einer Hydroxygruppe in eine nicht aktivierte Kohlenstoffbindung (C-H, C-C) ist aufgrund der geringen Reaktivität schwierig.⁽⁶³⁾

1.1 Hydroxylierte Produkte als „building blocks“ in der chemischen Industrie

Alkohole können zu Ethern, Estern, Aldehyden und Ketonen weiter reagieren und finden Verwendung in der industriellen Synthese von organischen Lösungsmitteln, Geschmacks- und Geruchsstoffen, Konservierungsstoffen und Farbstoffen.^(40, 113)

Auch Fettsäuren können mit Hydroxygruppen zu Hydroxy-Fettsäuren (OHFA) funktionalisiert werden und dienen als Grundbausteine für die Synthese von Schmiermitteln, Kosmetika, Pharmazeutika und Biokunststoffen.^(8, 21, 41, 57, 73) Eine Hydroxy-Funktionalisierung kann an unterschiedlichen Positionen der Fettsäure erfolgen. Dabei unterscheidet man grundsätzlich die terminale (ω) und die subterminale (ω -n) Hydroxylierung (Abbildung 1.1). Je nach Position zeigen die Hydroxygruppen die Reaktivität von primären (ω) oder sekundären Alkoholen (ω -n). Damit entscheidet die Position der Hydroxylierung über den jeweiligen Verwendungszweck.

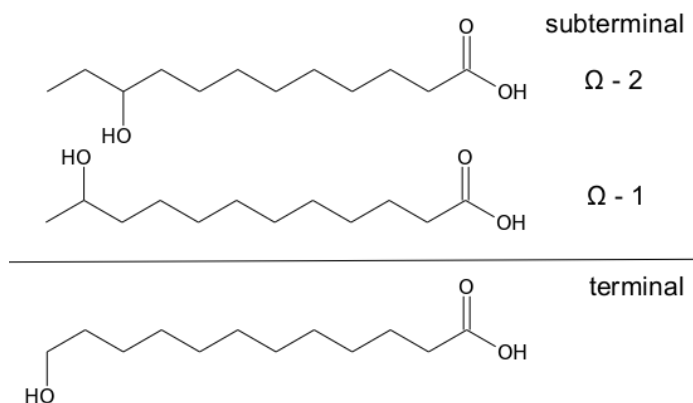


Abbildung 1.1: Position der Hydroxygruppe am Beispiel der Hydroxydodekansäure.

Nachteile der chemischen OHFA Synthese sind die geringe Regioselektivität der verwendeten Reaktionen, die energieintensiven Reaktionsbedingungen und die Verwendung von schwermetallischen Katalysatoren. Jeder dieser Faktoren erhöht die Herstellungskosten der OHFAs, sodass diese momentan nicht kommerziell erhältlich sind.⁽⁸⁾

1.2 Biokatalyse in der Chemie

In vivo werden chemische Reaktionen wie die Hydroxylierung unter milden Bedingungen von Enzymen katalysiert. Die Verwendung von Enzymen zur Verarbeitung von Nahrungs- und Tierfuttermitteln hat eine jahrhunderte alte Tradition. Dementsprechend stellen die Nahrungsmittel-, Leder- und Papierindustrie noch heute die größten industriellen Einsatzgebiete für biokatalytische Prozesse dar.⁽¹¹⁹⁾

Das enge Substratspektrum, die hohe Chemo-, Stereo- und Regioselektivität, sowie die Fähigkeit zwischen Enantiomeren zu differenzieren, erlauben einen stark spezifizierten und auf die jeweilige Reaktion optimierten Einsatz eines Enzyms als Biokatalysator.^(114, 119) Im Gegensatz zu vielen chemischen Prozessen, werden für die biokatalytische Reaktivität keine harschen Reaktionsbedingungen benötigt.⁽¹⁴⁵⁾ Zusammengekommen erlauben diese Parameter eine ressourcenschonende und energieeffiziente Alternative zur Chemosynthese.⁽¹¹⁹⁾

Beispiele für die bereits heute eingesetzte Enzyme sind die Nitril-Hydratase (EC 4.2.1.84) katalysierte Ganzzell-Biotransformation von Nitril zu Acrylamid in *Rhodococcus rhodochrous* J1,⁽⁸⁶⁾ die R-selektive Transaminase (R-ATA, ATA-117) aus *Arthrobacter sp.* zur Sitagliptin Darstellung,⁽¹¹¹⁾ sowie die β -Galactosidase (Lactase) zur Herstellung Lactose-freier Produkte.^(104, 134)

1.3 Cytochrom P450 Monooxygenasen

Cytochrome P450 Enzyme (CYP) gehören zu den Hämoproteinen (Cytochrome) und bilden mit mehr als 12.000 Genen eine der größten Enzymsuperfamilien.⁽⁸⁸⁾ Diese Enzymfamilie kommt ubiquitär, von den Archaeen über Bakterien bis hin zu Pilzen und Pflanzen vor. Die CYPs unterscheiden sich von anderen Hämoproteinen durch ihre enzymatische Aktivität und das namensgebende Absorptionsmaximum der reduzierten, Kohlenstoffmonooxid (CO) gebundenen Form (Eisen-CO Komplex). Durch die Bindung eines CO Moleküls verschiebt sich das Absorptionsmaximum des reduzierten Enzyms von $\lambda = 420$ nm auf eine Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm.

1. EINLEITUNG

Ihre omnipräsente Rolle im zellulären Stoffwechsel zeigt sich vor allem im Reich der Pflanzen, wo CYPs sowohl am primären als auch sekundären Stoffwechsel beteiligt sind.⁽⁸²⁾ Im Zuge dieser Aktivitäten werden aromatische Verbindungen wie die Zimtsäure und ihre Derivate (CYP73A, CYP98A und CYP84A), unterschiedlich lange Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C10-C18 (CYP86), sowie Terpene wie die Kaurensäure (CYP88A, CYP716D) als Substrate akzeptiert.⁽⁸²⁾

Cytochrome P450 Monooxygenasen sind für den industriellen Einsatz besonders interessant, da diese Enzyme ein sehr breites Substratspektrum aufweisen. Auch einzelne Vertreter der Enzymfamilie akzeptieren mitunter ein ganzes Spektrum an Substraten (Promiskuität). Viele dieser promiskuitiven Enzyme wurden bereits erfolgreich auf den regio- und stereoselektiven Umsatz eines der möglichen Substrate optimiert. Beispiele sind der erhöhte CYP 2A6 katalysierte Umsatz von Indol und die Etablierung des Umsatzes mehrerer substituierter Indole durch CYP 1A2, sowie der CYP 102A1 katalysierte Umsatz verschiedener Terpene.^(109, 116, 146) Ebenso divers wie das Substratspektrum ist die Bandbreite der CYP-katalysierten Reaktionen; neben der hauptsächlich beobachteten Hydroxylierung gehören auch Deaminierung, Dehalogenierung, Epoxidierung sowie N-, S- und O-dealkylierung, sowie C-C Kupplungen zum beschriebenen Reaktivitätsspektrum dieser Enzymsuperfamilie.^(13, 95)

Trotz erheblicher Unterschiede in der Primärstruktur der einzelnen Enzyme, verbindet alle Vertreter der Superfamilie eine stark konservierte Faltung (Sekundär-/Tertiärstruktur).⁽⁹⁵⁾ Daher wird nach Nelson *et al.* die Sequenzähnlichkeit der einzelnen Enzyme zur Unterscheidung von Familien ($\geq 40\%$) und Unterfamilien ($\geq 55\%$) herangezogen.⁽⁸⁹⁾ Allen Vertretern der Superfamilie ist die Thiolbindung des Hämeisens an einen Cysteinrest gemein.⁽¹⁴²⁾

1.3.1 Der P450 Zyklus

Der Reaktionszyklus, in der Literatur als P450 Zyklus bekannt, ist bei fast allen Vertretern der Superfamilie identisch.^(16, 84) Das Hämeisen wird äquatorial von vier Stickstoffatomen des umgebenden Porphyrinrings und proximal von einem Cysteinrest koordiniert. Die sechste Koordination übernimmt im Ausgangszustand ein Wassermolekül.

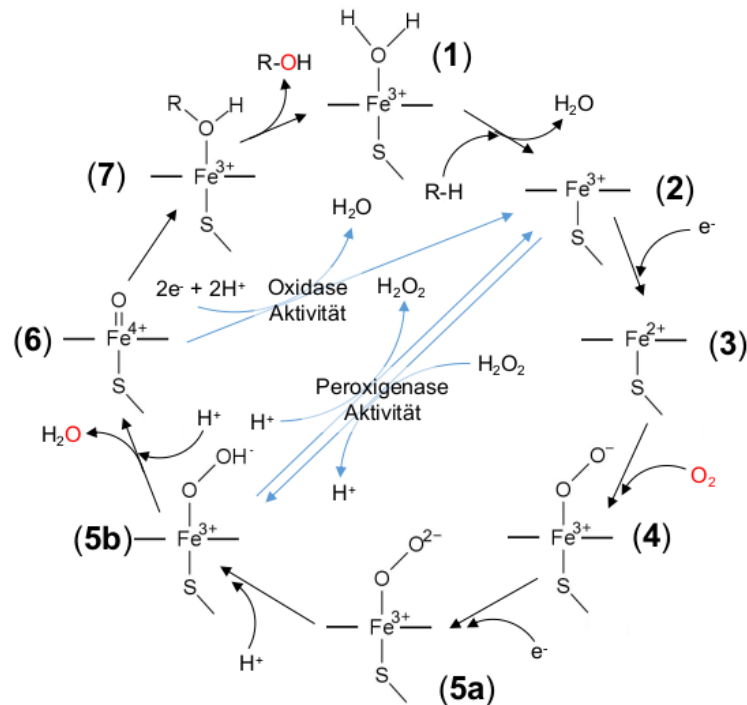


Abbildung 1.2: Cytochrom P450 Reaktionszyklus. Mögliche Nebenreaktionen (Peroxygenase- und Oxidaseaktivität) sind in blau dargestellt. Die Aufnahme und Abgabe von Sauerstoff wird in rot gezeigt. Dabei verlässt ein Atom des aufgenommenen molekularen Sauerstoffs (O_2) die Reaktion in Form eines Wassermoleküls. Lediglich ein Atom wird zur Hydroxylierung des Substrats verwendet (Monooxygenase). Die Darstellung ist angelehnt an die Arbeit von Denisov *et al.* aus dem Jahr 2005.⁽¹⁶⁾

Zu Beginn des in Abbildung 1.2 gezeigten Reaktionszyklus, wird das Wassermolekül von einem Substratmolekül (1) verdrängt. Diese Substitution bewirkt eine leichte Konformationsänderung des Hämoleküls, das Hämeisen verlässt die planare Porphyrinebene. Die verringerte Überlappung der d-Orbitale der Hämeisen Liganden resultiert in einer Änderung der Spin Konfiguration, vom Low Spin (LS) zum High Spin (HS) der Hämeisen Elektronen (Fe^{3+}).⁽¹²³⁾ Dieses HS Hämeisen (2) stellt einen besseren Elektronenakzeptor dar, sodass die Aufnahme eines ersten Elektrons (Fe^{2+}) wesentlich erleichtert wird.⁽¹²³⁾ Das einfach reduzierte Eisenatom (3) kann molekularen Sauerstoff (O_2) binden, sodass ein stabiler Oxy-Eisenkomplex (4) entsteht. Dieser stabile Komplex kann ein weiteres Elektron aufnehmen und wird zu einem instabilen Peroxo-

1. EINLEITUNG

Eisenkomplex (**5a**). Durch Protonierung entsteht der intermediäre Hydroperoxo-Eisenkomplex (**5b**), welcher durch weitere Protonierung, unter Abspaltung von Wasser, zu dem in der Literatur als Verbindung I bezeichneten Komplex (**6**) dissoziiert. Die Verbindung I überträgt den gebundenen Sauerstoff schließlich auf das Substratmolekül, das Hydroxylierungsprodukt wird aus der aktiven Tasche entlassen und wieder durch ein Wassermolekül (sechster Ligand) ersetzt (**1**). Dieser fein abgestimmte Reaktionszyklus kann durch die, als Peroxidase Shunt oder Uncoupling bekannte Nebenreaktion zwischen den Stadien (**2**) und (**5b**) kurzgeschlossen werden. Die Bindung von Wasserstoffperoxid führt direkt zur Formation des Hydroperoxo-Eisenkomplexes und kann zur Produktbildung beitragen. Diese Wasserstoffperoxid-abhängige Produktbildung ist als Peroxygenase Aktivität der CYPs bekannt.⁽⁴⁴⁾ Diese ist jedoch wenig effizient und führt nach wenigen Substratumsätzen zur Inaktivierung des Enzyms.⁽¹¹⁾ Eine weitere mögliche Nebenreaktion ist die vom Substratumsatz entkoppelte Formation von Wasser, bekannt als Oxidaseaktivität.⁽¹³²⁾ Diese tritt ausschließlich bei sehr hohen Elektronentransferraten auf.

1.3.2 Reduktionspartner der CYPs

Wie zuvor beschrieben sind CYPs natürlicherweise auf die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten (Elektronen) für den Substratumsatz angewiesen. *In vivo* werden Elektronen für CYPs hauptsächlich von Nikotinamiden in Form von Hydridionen (H^-) bereitgestellt.⁽³⁵⁾ Natürlich in der Zelle vorkommende Nicotinamide sind das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH) und das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH). Da das Hämeisen der CYPs diese Hydridionen nicht direkt akzeptieren kann, sind die Enzyme auf die Interaktion mit Reduktionspartnern angewiesen. Zusammen bilden diese und das CYP eine Elektronentransportkette. Diese Elektronentransportketten kommen in unterschiedlichen Ausprägungen vor und sind Gegenstand mehrerer Abhandlungen.^(35, 69)

Insgesamt sind 10 verschiedene Klassen dieser Elektronentransportketten in der Literatur beschrieben. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der beteiligten Enzyme, in

der Verwendung unterschiedlicher prosthetischer Gruppen, sowie der genutzten Elektronenquellen. Im Folgenden werden lediglich die am weitesten verbreiteten Variationen der CYP Elektronentransportkette vorgestellt. Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht der hier kurz besprochenen, natürlich vorkommenden CYP Elektronentransportketten.⁽³⁵⁾

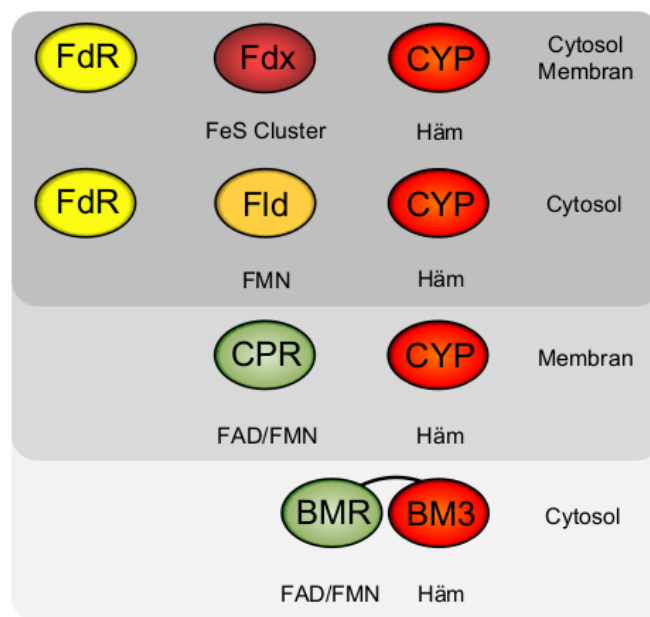


Abbildung 1.3: Übersicht der häufigsten CYP Elektronentransportketten. Angelehnt an die Arbeit von Bernhardt *et al.* aus dem Jahr 2006.⁽³⁵⁾

Diese Elektronentransportketten können zusätzlich zum CYP aus einer oder zwei weiteren Komponenten bestehen und bewerkstelligen den Transfer von Reduktionsäquivalenten. Die zwei Komponenten Systeme (dunkelgrau) bestehen aus einer Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) tragenden Ferredoxin Reduktase (FdR), sowie einem weiteren Elektronen transportierenden Enzym. Dieses kommt im Fall des Ferredoxins (Fdx) als Eisen-Schwefel-Cluster ([2Fe-2S]; [3Fe-4S]; [4Fe-4S]; [3Fe-4S]/[4Fe-4S]), sowie im Fall des Flavodoxin (Fld) als Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN) tragendes Enzym vor. Die Fdx Elektronentransportkette ist als cytosolische Variante in Bakterien und als teilweise membranständige Variation (FdR und CYP) in Mitochondrien zu finden. Die Fld Variante kommt ausschließlich in Form von löslichen Enzymen in Bakterien vor.

1. EINLEITUNG

Die Elektronentransportketten mit einer zusätzlichen Enzymkomponente (hellgrau) wird von einer FAD und FMN tragenden Reduktase vermittelt und stellt die unter Eukaryoten am weitesten verbreitete Variante dar. Sowohl die Cytochrom P450 Reduktase (CPR) als auch die CYPs kommen ausschließlich als membranständige Enzyme der mikrosomalen Zellfraktion vor. Hauptsächlich sind sie in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert.

Im unteren Bereich der Abbildung 1.3 ist beispielhaft das CYP 102A1 aus *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}) gezeigt. Dieses Enzym entspricht in seinem Aufbau einem natürlichen Fusionskonstrukt des eukaryotischen zwei Komponenten Systems. Es kommt jedoch als löslicher Enzymkomplex ausschließlich in Bakterien vor. Weitere Beispiele für diese Klasse sind die Enzyme CYP 102A2 und CYP 102A3 aus *Bacillus subtilis*.

1.4 Der *intra*-molekulare Ladungstransport

Die Reduktase (CPR) dient als Vermittler zwischen dem zwei Elektronen Donator (NAD(P)H) und dem ein Elektronen Akzeptor (Hämeisen). Der Redoxzyklus der Flavine ist in Abbildung 1.4 gezeigt. Zunächst wird in der initialen Reduktion (Abbildung 1.4 **A - D**) ein Hydridion auf das FAD übertragen und somit zum Hydrochinon FADH₂ (**B**) reduziert. Vom FAD wird ein Elektron auf das FMN übertragen. Beide Flavine liegen somit als Semichinone FADH und FMNH vor (**C**). Nach der Übertragung eines weiteren Elektrons auf das FMN zum FMNH₂ liegt das FAD wieder in seiner Ausgangsform vor und kann ein weiteres Hydridion akzeptieren (**D**), die Initialreaktion ist an dieser Stelle abgeschlossen. Dieses Stadium ist der Ausgangspunkt für den anschließenden Redoxzyklus der Flavine.

Im weiteren Verlauf sind zwei unterschiedliche Redoxzyklen theoretisch möglich. Im ersten möglichen Verlauf wird zunächst ein Elektron vom FMNH₂ an das Hämeisen des CYPs weitergegeben (**E**₁), bevor das vollständig oxidierte FAD ein weiteres Hydridion akzeptiert und erneut zum FADH₂ reduziert wird (**F**). Dieses gibt ein Elektron an das als Semichinon vorliegende FMNH ab und reduziert dieses zum FMNH₂ (**G**). Nach erneuter Abgabe eines Elektrons an das Hämeisen liegen beide Flavine wieder als Semichinone vor (**H**). Mit der Übertragung eines Elektrons vom FADH zum

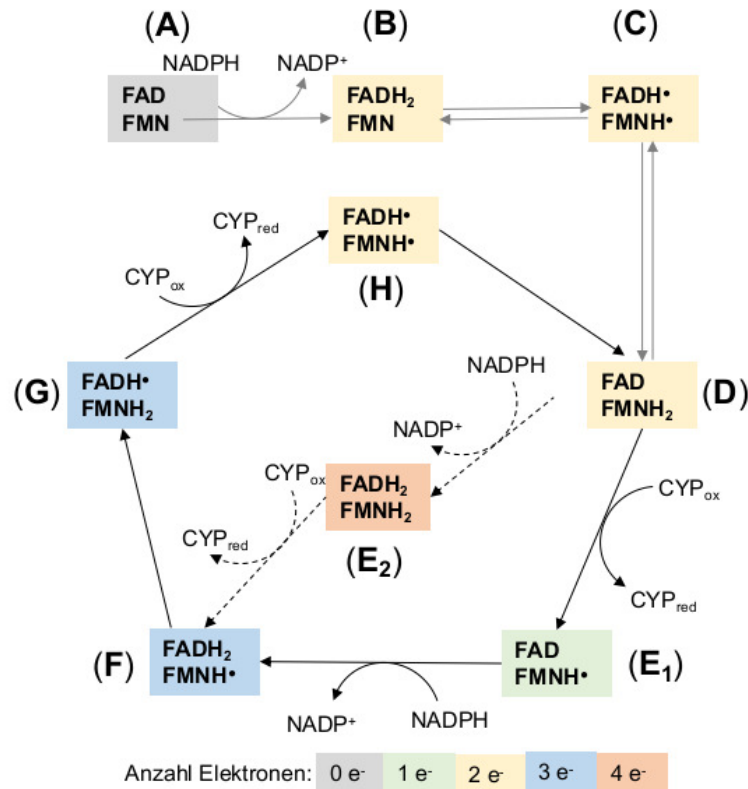


Abbildung 1.4: Redox Zyklus der Flavine. Die initiale Reduktion (A - D) ist in grau dargestellt. Zwischen den Stadien D und F sind zwei Routen möglich (E₁ oder E₂). Die Anzahl der aufgenommenen Elektronen ist farblich kodiert. Angelehnt an Ortiz de Montellano 2015.⁽⁹⁵⁾

FMNH kehrt der Zyklus wieder zum Ausgangspunkt (D) zurück. Im zweiten möglichen Verlauf nimmt das FAD ein weiteres Hydridion auf, bevor das FMN ein Elektron an das Hämeisen überträgt (E₂). Das System befindet sich kurzzeitig im vollständig reduzierten Zustand (4 e⁻). Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der 1-3-2-1 Zyklus (E₁) der bevorzugte, in der lebenden Zelle vorkommende Mechanismus ist.⁽⁹⁵⁾ Unabhängig vom Mechanismus gibt jeweils das FMNH₂ Hydrochinon ein einzelnes Elektron an das Hämeisen ab und wird erneut zum Semichinon oxidiert.

Aus kristallographischen Untersuchungen verschiedener CYP Reduktasen ist bekannt, dass diese aus mehreren Domänen und Linkerregionen „zusammengesetzt“

1. EINLEITUNG

sind.^(49, 54, 81, 138) Dieser Aufbau verleiht den CPRs eine hohe konformationelle Flexibilität. Im Ausgangszustand liegt das Enzym in einem ausgewogenen Gleichgewicht (ca. 50:50 %) einer offenen und einer geschlossenen Konformation vor.⁽²³⁾ Wird ein Nicotinamid gebunden, verschiebt sich dieses Gleichgewicht in Richtung der geschlossenen Konformation.^(66, 100) In dieser Konformation befinden sich die Isoalloxazinringe der beiden Flavine in unmittelbarer Nachbarschaft von ungefähr 4 Å Entfernung zueinander.⁽³⁶⁾ Die zusammenfassende Betrachtung vieler Studien zum Elektronentransport in Proteinen zeigt, dass eine Distanz von ≤ 14 Å von Elektronen direkt überbrückt werden kann.⁽⁹⁷⁾ Daher wird von einer direkten Elektronenübertragung zwischen den Flavinen ausgegangen. Nach der Oxidation des Nicotinamides nimmt das Enzym vorrangig die offene Konformation ein, welche die Elektronenweitergabe an das Hämeisen des CYP ermöglicht.⁽³⁷⁾ In vielen Fällen kann auch zwischen dem FMN und dem Häm von einer direkten Elektronenübertragung ausgegangen werden, da sich beide Moleküle bis auf ca. 6 - 12 Å annähern.^(34, 128) Dieser Abstand variiert zwischen den Spezies und wurde in den eben zitierten Arbeiten für eine Aminosäuredeletionsmutante der Ratten Cytochrom P450 Reduktase (Δ TGEE), mit konstant offener Konformation, sowie der Cytochrom P450 Reduktase aus Rinderleber bestimmt. In anderen CYP Elektronentransportketten wie z.B. P450_{BM3} aus *Bacillus megaterium* ist der minimale Abstand von FMN und Häm mit 18 Å deutlich größer. Der genaue Mechanismus in diesem System ist bis heute nicht genau bekannt.⁽¹¹⁷⁾

Mehrere Arbeiten beschäftigen sich mit der Erklärung des stattfindenden Elektronentransfers in P450_{BM3}. Diskutiert werden u.a. eine Konformationsänderung mit einer Drehung der FMN-Domäne entlang der Linkerregion zwischen FMN- und FAD-Domäne, welche zu einem theoretischen Abstand von ca. 8 Å führt, sowie die Elektronenweitergabe unter Beteiligung mehrerer Aminosäuren als Stationen der Elektronenweiterleitung (bridge).^(85, 135) Im zweiten Fall überlagern die π -Orbitale der beteiligten Aminosäurereste und ermöglichen das Tunneln der Elektronen über einen größeren Abstand.^(12, 118)

1.5 Limitation der CYP Biokatalyse

Ungeachtet der zuvor beschriebenen Vorteile der enzymatisch katalysierten Reaktionen, ist die Anzahl der bereits industriell etablierten biokatalytischen Prozesse zum heutigen Zeitpunkt vergleichsweise gering.^(9, 102) Grund dafür sind einige grundlegende Limitationen der Verwendung von Enzymen, die für einen effizienten Einsatz zunächst überwunden werden müssen.

Im Folgenden wird auf die Hürden im Umgang mit Cytochrom P450 Monooxygenasen eingegangen; viele davon gelten ebenfalls für den Umgang mit Enzymen im Allgemeinen:

Die Anzahl der verfügbaren Enzyme ist begrenzt, sodass nicht für jede gewünschte Reaktion ein passendes Enzym zur Verfügung steht. Eine Übersicht der bereits etablierten Reaktionen bieten diverse Veröffentlichungen, u.a. die Arbeit von Nestl *et al.* aus dem Jahr 2011.^(9, 90, 102, 103) Zudem ist das Substratspektrum der verfügbaren Enzyme meist limitiert. Nicht alle industriell genutzten Reaktionen können momentan biokatalytisch bewerkstelligt werden.⁽⁹⁴⁾

Einen Ausweg aus dem begrenzten Substratspektrum bietet das sogenannte Protein-Engineering. Enzyme werden rational oder evolutiv modifiziert (Mutagenese), bis sie das gewünschte Substrat akzeptieren und umsetzen können. Ist ein passendes Enzym für den Umsatz eines Substrates gefunden, kann eine Biotransformation in lebenden Zellen (*in vivo*), oder außerhalb von lebenden Zellen mit Hilfe des Zellysats oder des isolierten Enzyms (*in vitro*) durchgeführt werden.

Zu den Einschränkungen einer *in vivo* CYP-katalysierten Biotransformation gehören niedrige CYP Expressionsraten, die Notwendigkeit passende Reduktionspartner zu ko-exprimieren, sowie die Formierung des cytotoxischen Wasserstoffperoxides in der Uncoupling Nebenreaktion der CYPs. Diese Hürden können durch optimierte Anzuchtbedingungen, Verwendung anderer Vektorsysteme oder den Wechsel des Wirtsorganismus überwunden werden.⁽⁷⁶⁾ Die unerwünschte Formation des cytotoxischen Wasserstoffperoxides durch Uncoupling kann *in vivo* durch die Wahl der Reduktionspartner positiv beeinflusst werden.

1. EINLEITUNG

In vivo kommen der In- und Efflux des Substrates, bzw. des formierten Produktes über die Zellmembran als wichtige Faktoren hinzu.⁽⁹⁴⁾ Dieser Membrantransport kann durch zusätzlich exprimierte Carrier Proteine oder die Erhöhung der Membranpermeabilität erreicht werden.^(76, 77) Eine weitere häufige Limitation der Biotransformation stellt die Hemmung der katalytischen Aktivität durch das Substrat oder das Produkt dar.⁽⁷⁶⁾ Speziell *in vivo* müssen der Influx des Substrates und der Efflux des Produktes auf diese Problematik abgestimmt sein.⁽⁷⁷⁾

Einige dieser Hürden können durch die *in vitro* Verwendung von CYPs umgangen werden, es kommen dann aber andere Faktoren zum tragen. Dazu zählen vor allem die geringe Stabilität der meisten CYPs nach der Zellyse, sodass diese aus dem Lysat isoliert und anschließend in ein geeignetes Medium überführt und/oder immobilisiert werden müssen.^(94, 133)

Isolierte Enzyme sind meist toleranter gegenüber organischen Lösungsmitteln als lebende Zellen. Allerdings kann die enzymatische Aktivität durch die Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln vermindert sein.^(94, 107) Die Bereitstellung lipophiler Substrate wie Fettsäuren, setzt jedoch erhöhte Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) voraus. In diesem Fall kann auch die Lösungsmitteltoleranz durch gerichtete Evolution verbessert werden.⁽⁶¹⁾

Nicht alle P450 Enzyme können gleichermaßen einfach isoliert werden. Speziell eukaryotische CYPs lassen sich aufgrund ihres membranständigen Charakters nur schwer isolieren und *in vitro* einsetzen. Daher werden für diese Applikationen vorrangig lösliche prokaryotische CYPs verwendet.⁽³¹⁾ Diese werden mittels Protein-Engineering als Alternative zu eukaryotischen CYPs für die jeweilige Anwendung optimiert.

Ebenfalls aus lebenden Zelle isolierte CYPs benötigen geeignete Reduktionspartner und Elektronen für den *in vitro* Substratumsatz. Dabei ist es wichtig, sowohl eine adäquate Konzentration an Reduktionspartnern, als auch eine effektive Elektronenübertragung zu gewährleisten, da übertragene Elektronen auch zur Formierung des cytotoxischen Wasserstoffperoxids (H_2O_2) beitragen können. H_2O_2 kann in der aktiven Tasche der CYPs binden und durch Formation der Verbindung I (vgl. Stadium 6 in Abbildung 1.2) zur Produktformation beitragen. Dieser Vorgang wird in der Literatur als die Peroxygenaseaktivität der CYPs beschrieben, diese ist allerdings wenig effizient und führt

bereits nach wenigen Umsätzen zur Inaktivierung des Enzyms.^(10, 11)

Nicotinamide stellen die natürliche Quelle der benötigten Elektronen in der Zelle dar. Viele CYPs zeigen eine eindeutige Präferenz für NADPH über NADH. Die äquimolare Zugabe von NADPH ist aufgrund des hohen Marktpreises (ca. 1612 € mmol⁻¹; Sigma-Aldrich) und der geringen Stabilität in wässrigen Lösungen unwirtschaftlich. Daher wird NADPH meist in geringer Konzentration zugegeben und *in situ* regeneriert. Im Labormassstab geschieht dies zumeist mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase welche Glucose-6-Phosphat, unter Reduktion von NADP⁺, zu 6-Phospho-D-Glucono-1,5-Lactone umsetzt.⁽¹⁴¹⁾ Auch andere potenziell nutzbare Regenartionssysteme sind in der Literatur beschrieben.^(74, 125, 149)

1.6 Bioelektrochemie der Cytochrom P450 Monooxygenasen

In der Literatur ist ebenfalls eine elektrochemische Nicotinamid Regeneration an einer Zinn(IV)-oxid Elektrode, als Alternative zur enzymatischen Regeneration beschrieben.⁽⁵⁸⁾ Die Möglichkeit das Nicotinamid elektrochemisch regenerieren zu können, wirft die Frage nach der Notwendigkeit des Kofaktors auf. Im oben beschriebenen Mechanismus werden zunächst Reduktionsäquivalente in Form von Hydridionen von den Cytochrom P450 Reduktasen aufgenommen, doch ist der Cytochrom P450 Reaktionszyklus ausschließlich auf die Bereitsellung von Elektronen angewiesen. Die Herkunft dieser Elektronen spielt dabei keine entscheidende Rolle. Diese können theoretisch auch mittels einer technischen Elektronenquelle in Form einer Elektrode bereitgestellt werden. Tatsächlich finden sich zahlreiche Arbeiten zur CYP Bioelektrochemie in der Literatur der letzten 30 Jahre. Aus diesen Studien geht hervor, dass die direkte Hämeisen Reduktion bei gelöstem Enzym kaum möglich ist.⁽¹⁰⁶⁾ Die elektrische Interaktion zwischen der Elektrodenoberfläche und dem Hämeisen ist äußerst ineffektiv. Dies kann u.a. der Denaturierung der Enzyme an metallischen Elektrodenoberflächen und dem daraus resultierenden Elektroden „Fouling“, sowie der stark abgeschirmten Position des Häms

1. EINLEITUNG

im Inneren des CYP geschuldet sein.⁽²⁹⁾ Daher wurde mit verschiedenen Methoden zur CYP Immobilisierung an der Elektrodenoberfläche experimentiert.^(29, 106)

Biosensoren

Einen technischen Meßsensor mit einer immobilisierten aktiven biologischen Komponente bezeichnet man als Biosensor.⁽⁵⁾ Wird ein aktives Cytochrom P450 Enzym auf einer Elektrode immobilisiert, sodass die enzymatische Aktivität mittels der Elektrode gemessen werden kann, erfüllt diese Applikation die Voraussetzung eines Biosensors. Dies kann durch elektrochemische Oxidation/Reduktion des enzymatisch gebildeten Produkts oder der direkten Messung des Elektronenverbrauchs im P450 Zyklus erfolgen. Diese Applikationen können sowohl in der Medizin-, als auch Nahrungsmittel- und Umweltanalytik eingesetzt werden. Dort werden sie zur Detektion von Abbau- und Nebenprodukten im Metabolismus von Medikamenten, sowie toxischer Substanzen in Nahrungsmitteln, Boden- und Wasserproben genutzt.⁽⁶¹⁾

Wie bereits zuvor beschrieben, muss das Enzym für eine effektive Elektronenübertragung, in seiner aktiven Konformation zunächst auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert werden. Dies kann mittels unterschiedlicher Methoden erreicht werden.

Hill *et al.* zeigten in ihrer Arbeit die Möglichkeit CYP 101 reversibel mit Hilfe einer „edge-plain“ Graphit Elektrode zu reduzieren.⁽⁵⁶⁾ Die selbständige Anlagerung des Enzyms geht mutmaßlich auf die positiv geladenen, exponierten Aminosäurereste zurück. Zwar geben die Autoren an, eine Produktformation beobachtet zu haben, doch wurden keine genaueren Angaben publiziert. Weitere Arbeiten ohne Modifikation der Elektrode wurden von Fleming *et al.* und Johnson *et al.* durchgeführt.^(29, 30, 51) In allen Versuchen wurden hohe Ratenkonstanten des Elektronentransfers (k_s) von $k_s = 550 \text{ s}^{-1}$ (CYP 199A2), $k_s = 164 \text{ s}^{-1}$ (CYP 17) und $k_s = 138 \text{ s}^{-1}$ (CYP 102A1), ohne eine resultierende Produktformation bestimmt.

Eine weitere Möglichkeit der Enzym Immobilisierung ist die Copolymerisation der Enzyme, in einer der Elektrode aufgelagerten „Matrix“. Die Verwendung von Tensiden (im weitesten Sinne) wie z.B. Didodecyldimethylammoniumbromide (DDAB) erlaubte Bernhard und Mitarbeitern die Immobilisierung verschiedener CYPs aus der

humanen CYP 2C Unterfamilie.⁽¹²⁰⁾ Auch die Arbeitsgruppe um Johnson konnte CYP 2C9 mittels DDAB erfolgreich auf einer Graphit Elektrode immobilisieren und charakterisieren.⁽⁵²⁾ Dabei erreichte das immobilisierte Enzym einen k_s Wert von 150 s^{-1} , es konnten allerdings keine Produktformation beobachten. Auch das lösliche CYP 101 konnte mittels DDAB erfolgreich von Iwuoha *et al.* immobilisiert und elektrochemisch angesprochen werden, setzte aber kein Substrat um.⁽⁴⁸⁾ Ein entscheidender Nachteil von DDAB ist die Stabilisierung der inaktiven P420 Form einiger CYPs wie z.B. CYP 102A1 (P450_{BM3}).⁽¹³¹⁾ Diese kann zwar reduziert werden, jedoch kein Kohlenstoffmonooxid oder molekularen Sauerstoff binden und ist somit nicht katalytisch aktiv.

Leitende Polymere wie Poly-Diallyldimethyl-Ammoniumchlorid (PDDA), Polyethylenimin (PEI) und Poly-Natrium-4-Styrenesulfonat (PSS) erlauben ebenfalls die Immobilisierung von CYPs und tragen gleichzeitig zur erleichterten Elektronenübertragung auf das Enzym bei.^(18, 24, 25, 53, 83, 112) Für die Polymerisation auf einer Elektrodenoberfläche bietet sich die Elektropolymerisation an. Dabei werden durch Applikation eines passenden Potentials die Monomere zu radikalischen Kationen oxidiert. Diese reagieren mit anderen Kationen oder ungeladenen Monomeren zu Dimeren, welche anschließend oxidiert werden.⁽¹¹⁰⁾ Diese Kettenreaktion führt zur Ausbildung langer Polymerketten auf der Elektrodenoberfläche. Da diese Reaktion nur für die Dauer der Potentialapplikation andauert, kann die Schichtdicke des Polymerfilms genau bestimmt werden.

Das mittels PDDA immobilisierte CYP 2E1 konnte nicht nur charakterisiert werden, sondern setzte im Gegensatz zum mit DDAB immobilisierten Enzym sogar Substrat um.⁽²⁵⁾ Dabei wurde ein k_s Wert von $2,0 \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Durch den leitenden Charakter der verwendeten Tenside und Polymere ist eine verbesserte Elektronenübertragung auf alle Enzymmoleküle in einem Poly- oder Multilayer theoretisch möglich. Die vorgestellten Immobilisierungstechniken führen zur Bildung eines Oligo- oder Polylayer auf der Elektrodenoberfläche. Innerhalb dieser Layer ist aber keine Kontrolle über die Orientierung der Enzymmoleküle möglich.

Auch Scheller und Mitarbeiter berichten von einer reversiblen Reduktion von CYP 101 mit Hilfe einer Natrium-Montmorillonit modifizierten Glaskohlenstoff Elektrode.⁽⁶⁷⁾ Trotz einer hohen Ratenkonstante von $k_s = 152 \text{ s}^{-1}$ konnte keine Produktformation beobachtet werden.

1. EINLEITUNG

Tabelle 1.1: Übersicht über ausgesuchte Beispiele immobilisierter CYPs.

CYP	Elektrode, Immobilisierung	k_s [s^{-1}]	Produkt	Quelle
199A2	pyrolytisches Graphit, -	550	Nein	(29)
17	„edge-plain“ Graphit, -	164	Nein	(51)
102A1	„edge-plain“ Graphit, -	138	Nein	(30)
101	Glaskohlenstoff, Na-Mont.	152	Nein	(67)
2C9	„edge-plain“ Graphit, DDAB	150	Nein	(120)
2E1	Glaskohlenstoff, PDDA	2	Ja	(25)
2E1	Gold, Cystamin-Maleimid	10	Ja	„
2C9	Gold, 11-MUA/Mercaptan-C8	6 - 31	Ja	(147)
3A4	Gold, Cystamin-Maleimid	3,7	Ja	(18)
3A4-BMR	Gold, Cystamin-Maleimid	1,0	Ja	„
3A4-FLD	Gold, Cystamin-Maleimid	0,6	Ja	„

Natrium Montmorillonit (Na-Mont.)

11-Mercaptoundecansäure/Octanethiol (11-MUA/Mercaptan-C8)

Ein alternativer Ansatz ist die kovalente Bindung der Enzyme auf einer modifizierten Elektrode. Dieser Ansatz wurde von Mak *et al.* verfolgt, um das humane CYP 2E1 auf einer modifizierten Gold Elektrode zu immobilisieren. Das Enzym besitzt mehrere an der Oberfläche exponierte Cysteinreste, welche als mögliche Ankerpunkte zur Verfügung stehen.⁽⁷⁹⁾ Die Oberfläche dieser Elektrode ist vollständig von einem Maleimid Monolayer abgeschirmt, sodass das Enzym nicht mit der Metalloberfläche in Kontakt tritt. Die kovalente Bindung erfolgt thiol-spezifisch an den exponierten Cysteinresten der Enzymoberfläche. Das humane CYP 2E1 konnte mit Hilfe dieser Methode reversibel reduziert werden.

Elektrochemische Charakterisierung

Mit Hilfe eines CYP Biosensors können die Enzyme charakterisiert werden. Die am weitesten verbreitete Methode zur Charakterisierung von CYPs ist die Cyclovoltamme-

trie. Zu diesem Zweck wird ein an der Elektrode immobilisiertes Enzym einer wechselnden Spannung ausgesetzt und der resultierende Strom aufgezeichnet. Neben der „linear sweep“ Methode (vgl. Abbildung 1.5 A) wird auch die „square wave“ Methode (vgl. Abbildung 1.5 B) standardmäßig genutzt. Die Methoden unterscheiden sich in der applizierten Spannungsänderung, der das Enzym ausgesetzt wird.

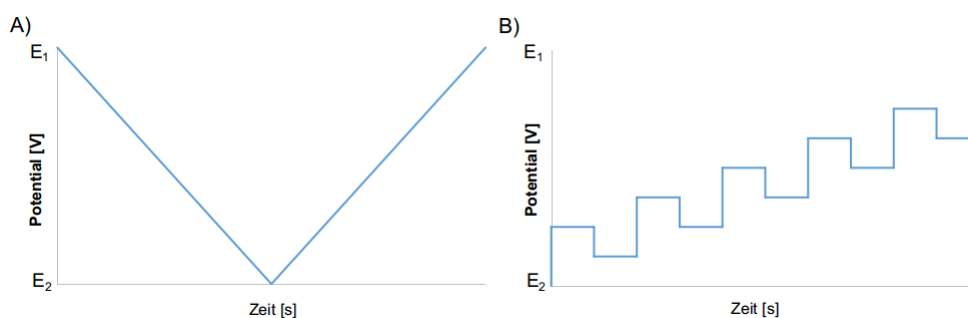


Abbildung 1.5: Potentialkurven der Cyclovoltammetrie Methoden. A) Potentialkurve der linear sweep Methode. Das Potential wird linear zwischen den Punkten E_1 und E_2 variiert. B) Potentialkurve der square wave Methode. Das Potential wird in einer Kaskaden zwischen E_1 und E_2 variiert.

Im Detail wird im Folgenden lediglich auf die „linear sweep“ Methode eingegangen. Eine Übersicht über die Möglichkeiten der Cyclovoltammetrie geben die Arbeiten von Mabbott *et al.* und Kissinger *et al.* jeweils aus dem Jahr 1983, sowie die Arbeit von Eckermann *et al.* aus dem Jahr 2010.^(22, 59, 78) Wie in Abbildung 1.5 gezeigt, wird die Spannung linear zwischen zwei Werten E_1 und E_2 alterniert. Da CYPs unter Elektronenverbrauch ein Sauerstoffmolekül nutzen um ein Substratmolekül zu hydroxylieren oder alternativ zu Wasserstoffperoxid reduzieren, wird die Cyclovoltammetrie unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt. Somit wird ein „Verlust“ von Elektronen im Substratumsatz oder Uncoupling vermieden. Der aufgezeichnete resultierende Strom wird in einem Cyclovoltammogramm über die angelegte Spannung aufgetragen. Diesem Cyclovoltammogramm können Informationen über die elektrische Anbindung des Enzyms, der reduzierbaren Stoffmenge, die Reversibilität der Reduktion sowie die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung entnommen werden:

Ist das CYP elektrisch an die Elektrode angebunden, werden bei einem passenden Potential Elektronen auf das Hämeisen des Enzyms übertragen (Reduktion) oder dem

1. EINLEITUNG

Enzym entzogen (Oxidation). Die Reduktion und Oxidation ist im Voltammogramm als Peak sichtbar (Abbildung 1.6; I_{pk}). Die Peakfläche des Reduktionspeak lässt Rückschlüsse auf die reduzierbare Stoffmenge an Enzym auf der Elektrodenoberfläche zu. Der Vergleich des Reduktions- und des Oxidationspeak gibt Aufschluss über die Reversibilität der Elektronenübertragung auf das Enzym. Theoretisch treten Reduktion und

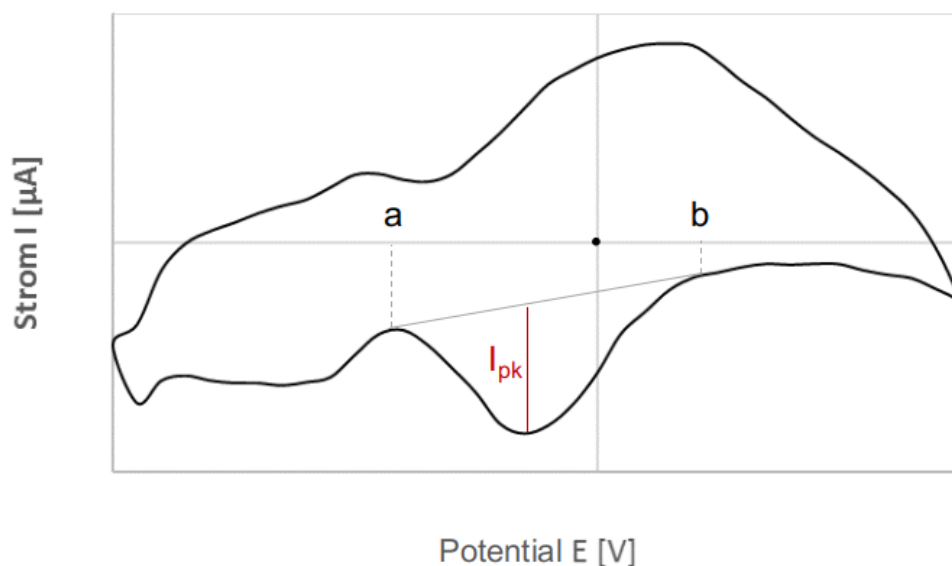


Abbildung 1.6: Beispiel Cyclovoltammogramm. Gezeigt ist ein reduktiver Peak zwischen den Punkten a und b.

Oxidation beim Mittelpunktpotential (E_{mid}) der jeweiligen Redoxspezies auf. Praktisch tritt die Reduktion bei einem negativeren, die Oxidation bei einem positiveren Potential als E_{mid} auf. Diese Abweichung wird als Überpotential bezeichnet und kann letztlich zur Berechnung der Ratenkonstante des Elektronentransfers (Geschwindigkeit) genutzt werden.

Wird während der anaeroben Cyclovoltammetrie dem CYP ein Substrat zugesetzt, kann die Bindung des Substrats in der aktiven Tasche als positive Potentialänderung beobachtet werden (vgl. Spinshift in Abbildung 1.2). Diese Beobachtung lässt jedoch keinen Rückschluss auf den tatsächlichen enzymatischen Umsatz des Substrats unter aeroben Bedingungen zu. Auch in einem aeroben System kann durch den Potentialshift nicht mit Sicherheit auf eine enzymatische Aktivität geschlossen werden (vgl. Uncoupling).

Elektrochemisch getriebener enzymatischer Substratumsatz

Tatsächlich ist ein elektrochemisch getriebener enzymatischer Substratumsatz deutlich schwieriger zu realisieren als die reine elektrochemische Charakterisierung eines CYP Enzyms. Wie bereits oben skizziert, sind hohe Ratenkonstanten des Elektronentransfers nicht gleichbedeutend mit katalytischer Aktivität.

In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2010 zeigen Gilardi *et al.* den Vorteil einer determinierten Orientierung der CYPs auf der Elektrode für eine effiziente Elektronenübertragung.⁽⁷⁹⁾ Es wurden zwei Mutanten, mit jeweils nur einem verbleibenden Cysteinrest (Cystein-Serine Austauschmutanten) und das wildtypische Enzym verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Mutanten mit einer determinierten Orientierung einen höheren elektrochemisch getriebenen Substratumsatz (durchschnittlich 2,3-fach) ermöglichen.⁽⁷⁹⁾ Bereits zuvor wurde die Rolle der Reduktionspartner für die enzymatische Aktivität der CYPs skizziert. Stellen die Reduktionspartner und das CYP keine effiziente Elektronentransportkette dar, führt der Elektronentransfer hauptsächlich zur Formation von Wasserstoffperoxid. Dieser Zusammenhang konnte auch für elektrochemisch getriebene CYPs gezeigt werden. In ihrer Veröffentlichung aus dem Jahr 2008 stellen Dodhia *et al.* artifizielle Fusionskonstrukte des humanen CYP 3A4 mit dem Flavodoxin (Fld) aus *Desulfovibrio vulgaris* und der P450_{BM3} Reduktase (BMR) aus *Bacillus megaterium* vor und zeigen, dass die Wahl des Reduktionspartners maßgeblich Einfluss auf das Couplingverhalten und die resultierende Produktformation nimmt.⁽¹⁸⁾ Für die elektrochemische Reduktion wurde wahlweise eine Glaskohlenstoff (GC) sowie eine Cystamine-Maleimid modifizierte Goldelektrode verwendet. Die Immobilisierung erfolgte mittels PDDA (GC Elektrode) und kovalenter Bindung (Goldelektrode). Allgemein konnte auf der Goldelektrode, unabhängig vom gewählten CYP Konstrukt, eine höhere Produktformation erreicht werden. Obwohl nur niedrige k_s Werte für die vorgestellten Mutanten und das wildtypische Enzym bestimmt werden konnten, zeigten alle Enzyme Produktformation.

Dabei konnte eine eindeutige positive Korrelation der Couplingeffizienz und der Produktformation nachgewiesen werden. Neben der Produktformation wurde auch die Ratenkonstante des Elektronentransfers ermittelt. Die ermittelten k_s Werte der Fusionskonstrukte waren deutlich vermindert. Die Beobachtung belegte einen eindeutig

1. EINLEITUNG

negativen Zusammenhang, sodass mit sinkendem k_s Wert die Produktformation stetig zunimmt.

Die in Tabelle 1.1 aufgeführten Beispiele zeigen, dass eine hohe Ratenkonstante des Elektronentransfers nicht zwingend im Substratumsatz resultiert. Obwohl die k_s Werte der kovalent immobilisierten Enzyme deutlich niedriger sind als anderweitig immobilisierte Enzyme, können diese tendenziell besser Substrat durch elektrochemische Reduktion umsetzen.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann auf eine häufige Überversorgung des Hämeisens mittels der elektrochemischen Reduktion geschlossen werden. Mit Blick auf den P450 Reaktionszyklus in Abbildung 1.2, muss für eine effiziente enzymatische Aktivität die Bereitstellung von Elektronen auf den Substratumsatz zeitlich abgestimmt (getaktet) sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für eine produktive, elektrochemische CYP Hämeisen Reduktion das Enzym in einer determinierten Orientierung auf einer Elektrodenoberfläche immobilisiert werden muss. Idealerweise sollte das Enzym in einem elektroaktiven Multilayer angeordnet sein. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Immobilisierung keinen negativen Einfluss auf die Konformation des Enzyms nimmt und eine adäquate Elektronenversorgung ohne Elektronenüberschuss gewährleistet wird.

2

Zielsetzung

Die Kombination des CYP mit einem adäquaten Reduktionspartner (Reduktase) in einem Fusionskonstrukt, erlaubt eine Drosselung der sonst übermäßigen elektrochemischen Elektronenversorgung.

Die hauptsächliche Ursache der geringen spezifischen Produktleistung (space-time-yield) früherer Arbeiten, ist im planaren Aufbau der vorgestellten Applikation zu finden. Dies gilt insbesondere für die kovalente Immobilisierung der CYP Enzyme auf einer Elektrodenoberfläche. Obgleich die kovalente Immobilisierung von Cytochrom P450 Monooxygenasen eine produktive Reduktion des Hämeisens erlaubt, bleibt diese Methode stets durch die geringe Oberflächenkonzentration des reduzierbaren Enzyms limitiert.

Die Überwindung der im Idealfall einfachen Oberflächenbedeckung, stellt die Motivation für das Tandemprojekt „Carbon Nanotube (CNT) Elektroden für den direkten Elektronentransfer auf optimierte P450 Protein Systeme: Enzymeengineering und Screening in elektrochemischem Mikrotiterplattensystem“ im Rahmen des „Biotechnologie 2020+“ Programms dar.

Im Zuge dieses Projektes soll eine Elektrode mit dreidimensionalem Aufbau durch Copolymerisierung des Enzyms und einer umgebenden Matrix etabliert werden. Gleichzeitig soll eine determinierte Orientierung der Enzyme gewährleistet werden. Das im Folgenden vorgestellte Konzept basiert auf einer, mit Kohlenstoffnanoröhren (CNT) und dem leitenden Polymer Poly-3,4-ethylendioxythiophen (PEDOT) copolymerisierten Solgel Matrix auf einer Gold Elektrode (CNT-Solgelelektrode). Die Elektrodenoberfläche soll mittels der CNTs bei gleichbleibender Grundfläche vergrößert werden.

2. ZIELSETZUNG

Innerhalb der Matrix soll eine modifizierte Cytochrom P450 Monooxygenase einen elektroaktiven Komplex mit den CNTs bilden. Die orientierte Bindung in diesem Komplex soll durch ein am Enzym lokalisiertes Ankermolekül vermittelt werden. Der Komplex soll mittels des PEDOT Polymers elektrisch an die Elektrodenoberfläche angeschlossen sein. Die immobilisierende Matrix darf die enzymatische Aktivität nicht beeinflussen und stabilisiert im Idealfall das Enzym in seiner aktiven Konformation. Als Referenz dient eine planare kommerziell erhältliche Siebdruck CNT-Elektroden auf Graphit Basis der Firma DropSens (Llanera, Spanien).

Ziel dieser Dissertation ist die Etablierung einer Cytochrom P450 Monooxygenase für den Einsatz auf einer solchen CNT-basierten Elektrode, speziell im CNT/Solgel-Elektrodesystem. Für diesen Einsatz soll die etablierte Monooxygenase verschiedene Voraussetzungen erfüllen:

Wie zuvor erläutert, zeigen Fusionskonstrukte eine erhöhte elektrochemisch getriebene Produktformation, daher soll ein CYP-CPR Fusionskonstrukt verwendet werden.

Die Polymerisation der Solgel Matrix verlangt eine vorherige selbständige und stabile Anlagerung der CYPs an die CNT Oberfläche. Idealerweise sollte diese Anlagerung ohne vorherige (posttranslationale) Modifikation des Enzyms verlaufen. Zu diesem Zweck soll das Enzym mit einem CNT-affinen Ankermolekül modifiziert werden. Dieses Ankermolekül soll einerseits die Anlagerung ermöglichen, andererseits den elektrischen Anschluss des Enzyms an die CNTs vermitteln. Zudem wird durch die Position des Ankermoleküls die Orientierung des CYP zur CNT Oberfläche bestimmt.

Ein schnelles und einfaches Screening der elektrochemisch getriebenen CYP Aktivität erfordert ein direktes *in situ* Messverfahren der Produktformation. Idealerweise setzt das CYP, bei Applikation der Arbeitsspannung, ein Substrat in ein elektrochemisch quantifizierbares Produkt um. Verschiedene Substrate sollen auf enzymatische Hydroxylierung zu elektroaktiven Produkten getestet werden.

Die weitere Optimierung des Systems verlangt ein eingehendes Verständnis des intramolekularen Elektronentransfers der verwendeten Monooxygenase. Daher soll der Einfluss verschiedener, gemäß der Literatur ausgesuchter Elektronentransferwege an der Interaktionsstelle der Reduktase- und der P450-Domäne auf die enzymatische Aktivität untersucht werden.

2. ZIELSETZUNG

Zusammengenommen soll eine elektrochemisch getriebene und sich selbständig an CNT Elektroden anlagernde Cytochrom P450 Monooxygenase, deren Aktivität *in situ* bestimmt werden kann, etabliert werden. Diese soll für die Entwicklung eines dreidimensionalen CNT Solgel Matrix Elektrodensystems genutzt werden und somit die spezifische Produktleistung der Cytochrom P450 Elektroden Applikationen entscheidend erhöht werden.

2. ZIELSETZUNG

3

Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien

Alle für diese Arbeit benötigten Chemikalien, organische Lösungsmittel sowie Komponenten zum Ansatz von Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Sandhausen, D), VWR (Darmstadt, D) und Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Es wurden die hauseigenen *Escherichia coli* (*E.coli*) Stämme, DH5 α zur DNA Amplifikation, sowie BL21(DE3) zur heterologen Protein Expression verwendet. Zur Präparation von Plasmid DNA aus Zellen das ZyppyTM Plasmid Miniprep Kit verwendet. Zur Isolierung von DNA aus PCR Ansätzen sowie aus Agarosegelen wurde das DNA Clean & Concentrator Kit, jeweils von Zymo Research (Irvine, CA, USA) genutzt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.2 Plasmide und Konstrukte

Tabelle 3.1: Verwendete Plasmide zur Expression von P450_{BM3} basierten Konstrukten.

Index	Enzym	Ankerpos.	Anker	Mut.
pITB1647	hBM3	Q387C	-	-
-	hBM3	Q387C	Py	-
pITB1648	hBM3	C-term.GGSC	-	-
-	hBM3	C-term.GGSC	Py	-
-	hBM3	-	CNT-tag	-
pITB619	BMR	-	-	-
pITB583	BM3	-	-	-
-	BM3	C-term.GGSC	-	-
-	BM3	-	CNT-tag	-
pITB935	BM3	-	-	F87A
Seifert	BM3	-	-	F87G
pITB950	BM3	-	-	F87V
Seifert	BM3	-	-	A328V
pITB931	BM3	-	-	A328F
Seifert	BM3	-	-	A328G
Seifert	BM3	-	-	A328S
pITB959	BM3	-	-	R47L/Y51F
pITB953	BM3	-	-	F87A/A328G
pITB936	BM3	-	-	F87A/A328L
pITB946	BM3	-	-	F87L/A328F
Seifert	BM3	-	-	A328L/L437F
Seifert	BM3	-	-	A328V/L437A
Seifert	BM3	-	-	A74G/F87V/L188Q
pITB957	BM3	-	-	F87V/A328L/L437I
pITB958	BM3	-	-	F87V/A328L/L437V
pITB962	BM3	-	-	R47L/Y51F/F87V/A328F
pITB963	BM3	-	-	R47L/Y51F/F87V/A328I
pITB964	BM3	-	-	R47L/Y51F/F87V/A328L
pITB965	BM3	-	-	R47L/Y51F/F87V/A328V
Seifert	BM3	-	-	V78L/F87V/A328F/L437I

3. MATERIAL UND METHODEN

Index	Enzym	Ankerpos.	Anker	Mut.
pITB1651	BM3	-	CNT-tag	F87L/A328F
pITB1652	BM3	-	CNT-tag	A328V
pITB1653	BM3	-	CNT-tag	A328V/L437A
pITB1654	BM3	-	CNT-tag	R47L/Y51F/F87V/A328F
pITB1655	BM3	-	CNT-tag	R47L/Y51F/F87V/A328V
pITB1656	BM3 _{FMN}	-	-	664STOP
pITB1657	BM3 _{FMN}	-	CNT-tag	664CNT-tag
pITB1658	BM3 LFVF a	-	CNT-tag	F390A
pITB1659	BM3 LFVF b	-	CNT-tag	K391A
pITB1660	BM3 LFVF d	-	CNT-tag	F390AK/K391A
pITB1661	BM3 LFVF e	-	CNT-tag	F390A/P392A
pITB1662	BM3 LFVF g	-	CNT-tag	F390A/K391A/P392A
pITB1663	BM3 LFVF h	-	CNT-tag	F393A
pITB1664	BM3 LFVF i	-	CNT-tag	F393A/M490A
pITB1665	BM3 LFVF j	-	CNT-tag	Q403A
pITB1666	BM3 LFVF k	-	CNT-tag	Q403A/M490A
pITB1667	BM3 LFVF l	-	CNT-tag	M490A
pITB1668	BM3 328V b	-	CNT-tag	K391A
pITB1669	BM3 328V c	-	CNT-tag	P392A
pITB1670	BM3 328V e	-	CNT-tag	F390A/P392A
pITB1671	BM3 328V f	-	CNT-tag	F391A/P392A
pITB1672	BM3 328V g	-	CNT-tag	F390A/K391A/P392A
pITB1673	BM3 328V h	-	CNT-tag	F393A
pITB1674	BM3 328V i	-	CNT-tag	F393A/M490A
pITB1675	BM3 328V j	-	CNT-tag	Q403A
pITB1676	BM3 328V k	-	CNT-tag	Q403A/M490A
pITB1677	BM3 328V l	-	CNT-tag	M490A
pITB1678	BM3 328VA a	-	CNT-tag	F390A
pITB1679	BM3 328VA b	-	CNT-tag	K391A
pITB1680	BM3 328VA c	-	CNT-tag	P392A
pITB1681	BM3 328VA d	-	CNT-tag	F390A/K391A
pITB1682	BM3 328VA g	-	CNT-tag	F390A/K391A/P392A
pITB1683	BM3 328VA j	-	CNT-tag	Q403A
pITB1684	BM3 328VA l	-	CNT-tag	M490A

Index: Nummerierung der ITB Stammsammlung; Seifert: Lagerung in Mitarbeiter Box von A. Seifert

3. MATERIAL UND METHODEN

3.3 Oligonukleotide

Alle in Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der SnapGene Software entworfen und in lyophilisierter Form bestellt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in Wasser gelöst und auf eine Arbeitskonzentration von 10 μM verdünnt.

Tabelle 3.2: Oligonukleotide für die Implementierung einer künstlichen Ankerposition (Cystein) mittels Aminosäureaustausch.

Nr	Variante	Primer	Sequenz	Protokoll
1	Ü-PCR _{pET28}	F	CCCCTCTAGAAATAATTTTG TTTAAC	Ü-PCR
2	hBM3 387C	F	CCAAGTGCATTCCG TGCCA TGC GTTTAAACCG	QC
3		R	CGGTTTAAACGCATG GCA CG GAATCGCACTTGG	
4	hBM3 C-term. GGS-C	R	CCGGAATTCTTAG GCAGCTGC CGCC CGCTACTTTTTTAGCA GACTGTTC	Ü-PCR
5	BM3 674C	F	GCAAAGAACTTCAAT GT TCCA GGCAGTGCACG	QC
6		R	CGTGCACTGCCTGG ACA TTG AAGTTCTTTGC	
7	BM3 C-term. GGS-C	R	CCGGAATTCTTAG GCAGCTGC CGCC CCCAGCCCACACGTCT TTTGCG	Ü-PCR

Überhang PCR (Ü-PCR)

QuikChange (QC)

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.3: Oligonukleotide für die CNT-tag Modifikation an der Hämdomäne (hBM3) und der Reduktase des Gesamtkonstruktes (BM3).

Nr	Variante	Primer	Sequenz	Protokoll
8	hBM3 C-term. CNT-tag	R	CCGGAATTCTTAAGAAAAAT AGGTGCCCCAAGACAGACGA AAAATGCTGCCGCCGCGTAC TTTTTTAGCAGACTGTTC	Ü-PCR
9	BM3 C-term. CNT-tag	R	CCGGAATTCTTAAGAAAAAT AGGTGCCCCAAGACAGACGA AAAATGCTGCCGCCCCAGC CCACACGTCTTTTGCG	Ü-PCR

Überhang PCR (Ü-PCR)
QuikChange (QC)

Tabelle 3.4: Oligonukleotide für die Klonierung der CNT-tag modifizierten und nativen Varianten des BM3_{FMN} Konstruktes.

Nr	Variante	Primer	Sequenz	Protokoll
10	BM3FMN	F	GCACGGTGCGTTTTCAATAAA CGAACGTCGTAGCAAG	QC
11		R	CTTGCTACGACGTTCGTTTA TGAAAACGCACCGTGC	
12	BM3FMN C-term. CNT-tag	R	CCGGAATTCTTAAGAAAAAT AGGTGCCCCAAGACAGACGA AAAATGCTGCCGCCCTGAAAA CGCACCGTGCATTTTCGCAA GCGG	Ü-PCR

Überhang PCR (Ü-PCR)
QuikChange (QC)

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.5: Oligonukleotide für die Klonierung der P450_{BM3} Alaninscan Bibliothek.

Nr	Variante	Primer	Sequenz	Protokoll
13	BM3 390A	F	GCGATTCCGCAGCATGCGGC	QC
			GAAACCGTTTGGAAACGG	
14		R	CCGTTTCCAAACGGTTTCCG	
			CGCATGCTGCGGAATCGC	
15	BM3 391A	F	CCGCAGCATGCGTTTCCG	QC
			GTTTGGAAACGGTCAGC	
16		R	GCTGACCGTTTCCAAACGGC	
			GCAAACGCATGCTGCGG	
17	BM3 392A	F	CAGCATGCGTTTAAAGCGTT	QC
			TGGAAACGGTCAG	
18		R	CTGACCGTTTCCAAACCGTT	
			TAAACGCATGCTG	
19	BM3 393A	F	GCATGCGTTTAAACCGCGG	QC
			GAAACGGTCAGCGTGCG	
20		R	CGCACGCTGACCGTTTCCG	
			CCGGTTTAAACGCATGC	
21	BM3 403A	F	CGTGCGTGTATCGGTCCGCA	QC
			GTTTCGCTCTTCATGAAGC	
22		R	GCTTCATGAAGAGCGAACTG	
			CGCACCGATAACGCACG	
23	BM3 490A	F	GCTATACGGTTCAAATCCG	QC
			GAACAGCTGAAGGAACG	
24		R	CGTTCCTTCAGCTGTTCCG	
			CATTTGAACCGTATAGC	
25	BM3 390A/391A	F	GCGATTCCGCAGCATGCGGC	QC
			GGCGCCGTTTGGAAACGGTC	
			AGC	
26		R	GCTGACCGTTTCCAAACGGC	
			GCCGCCGCATGCTGCGGAAT	
			CGC	

3. MATERIAL UND METHODEN

Nr	Variante	Primer	Sequenz	Protokoll
27	BM3 390A/392A	F	GCGATTCCGCAGCATGCGGC GAAAGCGTTTGGAAACGGTC AGC	QC
28		R	GCTGACCGTTTCCAAACGCT TTCGCCGCATGCTGCGGAAT CGC	
29	BM3 391A/392A	F	CCGCAGCATGCGTTTGCGGC GTTTGGAAACGGTCAGC	QC
30		R	GCTGACCGTTTCCAAACGCC GCAAACGCATGCTGCGG	
31	BM3	F	GCGATTCCGCAGCATGCGGC GGCGGCGTTTGGAAACGG	QC
32	390A/391A/392A	R	CCGTTTCCAAACGCCGCCGC CGCATGCTGCGGAATCGC	

QuikChange (QC)

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Der gewünschte *E.coli* Stamm wurde zunächst in einer 5 mL Übernacht-Kultur angezogen. Am Folgetag wurden zwei Schüttelkolben, mit jeweils 100 mL LB Medium, mit 1 mL der Übernacht-Kulturen inokuliert. Die Kolben wurden bei 37°C im Wärmeschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 AU inkubiert. Die Kultur wurde im Anschluss in zwei 50 mL Zentrifugenbecher überführt und 20 min auf Eis gelagert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden bei 3000x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Die sedimentierten Zellen wurden in 15 mL Transformationspuffer (Tfb) I resuspendiert und für 20 min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 2 mL Tfb II aufgenommen. Dieser Ansatz von chemisch kompetenten (chem. komp.) Zellen wurde zu jeweils 50 µL aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C ge-

3. MATERIAL UND METHODEN

lagert. Die Zusammensetzung der Lösungen Tfb I und Tfb II sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Lösungen Tfb I & Tfb II zur Herstellung von chememisch kompetenten *E.coli* Zellen

Tfb I	
Komponente	Konzentration
KOAc	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Tfb II	
Komponente	Konzentration
MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Kalium Acetat (KOAc)

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)

3.4.2 Transformation von Plasmiden in chemisch kompetenten Zellen

Zur Transformation von Plasmid DNA wurden ungefähr 100 ng DNA (ca. 1 μ L DNA Lösung) zu einem 50 μ L Aliquot der gewünschten chem.komp. Zellen zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 45 sek auf 42°C erhitzt und erneut für 2 min auf Eis gelagert. Für die eineinhalbstündige Inkubation unter leichtem Schütteln bei 37°C, wurde den transformierten Zellen 400 μ L LB Medium zugegeben. Im Anschluß konnten die Zellen auf Antibiotika haltigem LB-Agar Medium ausplattiert werden.

3.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen

Die Isolierung von Plasmid DNA aus jeweils 2 mL einer *E.coli* Übernachts-Kultur wurde mit dem ZyppyTM Plasmid Miniprep Kit der Firma Zymo Research (Irvine, USA) gem. des Hersteller Protokolls durchgeführt. Die isolierte in Wasser gelöste Plasmid DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Sequenzierung aller hergestellten Genkonstrukte wurden 20 µL der gelösten Plasmid DNA an die Firma GATC Biotech (Konstanz, D) gesendet und vor Ort mittels der Didesoxymethode nach Sanger analysiert.⁽¹⁰⁸⁾ Die Primer wurden, sofern nicht bei GATC vorrätig, zusammen mit den Proben versandt.

3.4.4 Mutagenese mittels Überhang-PCR und QuikChangeTM

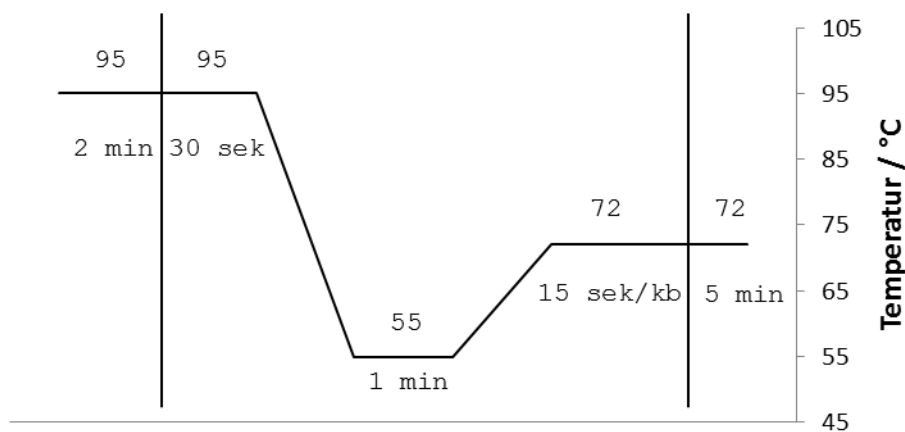
Für die zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren wurde das QuikChange[®] II Protokoll gemäß den Angaben des Herstellers Agilent Technologies (Santa Clara, USA) verwendet. Die im Abschnitt 3.3 vorgestellten QuikChange[®] (QC) Primer kodieren eine oder mehrere Punktmutation(en), welche bei der DNA Elongation in das Zielgen eingebaut werden. Die parentale, methylierte DNA wird im Anschluss durch eine einstündige Inkubation bei 37°C mit 2 µL des Restriktionsenzym DpnI verdaut. Der standardmäßige QC Reaktionsansatz und das Temperaturprogramm des PCR Blocks sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die mutierte DNA wurde mit Hilfe des ZymocleanTM Concentrator Kits gereinigt und in *E.coli* DH5α transformiert.

Tabelle 3.7: Puffer und Reaktionsbedingungen einer PCR Reaktion.

Komponente	Volumen
10x <i>PfuUltra</i> II Reaktionspuffer	5,0 µL
dNTP Mix (25 mM jeweils)	0,5 µL
DNA Templat (100 ng/µL)	1,0 µL
Primer #1 (10 µM)	1,0 µL
Primer #2 (10 µM)	1,0 µL
<i>PfuUltra</i> II fusion HS DNA Polymerase	1,0 µL
destilliertes Wasser	40,5 µL
Gesamtvolumen	50 µL

3. MATERIAL UND METHODEN

Abbildung 3.1: Temperaturprogramm einer PCR Reaktion.



Die genetische Modifikation einzelner BM3 Varianten mit einem Kohlenstoff-Nanoröhren bindenden Peptid (CNT-tag) wurde mittels einer Überhang-PCR (Ü-PCR) durchgeführt. Die dazu verwendeten, in Abschnitt 3.3 vorgestellten Primer zeichnen sich durch einen, nicht am Zielgen bindenden Überhang aus, welcher für die Sequenz des CNT-tag kodiert. Das generierte PCR Produkt trägt die zusätzliche Sequenz und kann erneut in den Vektor pET-28a(+) kloniert werden. Das Reaktionsschema ist identisch zum QC Protokoll, lediglich die Annealing Temperatur muss dem Schmelzpunkt (T_m) der verwendeten Primer angepasst werden.

3.4.5 Klonierung von Plasmiden

Das Genkonstrukt für wildtypisches P450_{BM3} und alle mittels Quikchange generierten Genkonstrukte befinden sich im pET-28a(+) Vektor. Genkonstrukte die mittels Ü-PCR generiert wurden, kodieren 5' für eine XbaI und 3' für eine EcoRI Restriktionsschnittstelle mit Hilfe derer die Konstrukte wieder in pET-28a(+) kloniert wurden. Die Expression des Zielgens im pET-28a(+) Vektor erfolgt mittels des T7-Expressionssystems. Der lacI Repressor bindet an den lacI Promotor und verhindert die *E.coli* RNA-Polymerase-abhängige Expression der T7 RNA-Polymerase. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird der Repressor vom lacI Promotor gelöst und die T7 RNA-Polymerase wird exprimiert. Die T7 RNA-Polymerase transkribiert anschließend das unter Kontrolle des T7 Promotors stehende Zielgen. Die T7 RNA-Polymerase

3. MATERIAL UND METHODEN

wird jedoch durch unvollständige Repression stetig basal exprimiert, wodurch auch das Zielgen basal transkribiert wird. Diese basale Expression wird auch als „leaky expression“ bezeichnet. Durch die ebenfalls auf dem pET-28a(+) kodierte Kanamycin Resistenz kann während der Expression durch Kanamycin Zugabe gezielt auf transformierte Zellen selektiert werden. Da pET-28a(+) jeweils 5' und 3' der Multiple-Cloning-Site für eine 6x Histidin Sequenz (His-tag) kodiert, kann das Zielprotein wahlweise *N*- und/oder *C*-terminal mit einem His-tag exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aus dem Lysat isoliert werden. Alle hier vorgestellten Genkonstrukte wurden mit einem STOP-Codon vor der 3' lokalisierten His₆ Sequenz in pET-28a(+) kloniert, sodaß das Zielprotein mit einem *N*-terminalen His₆-tag exprimiert wurden.

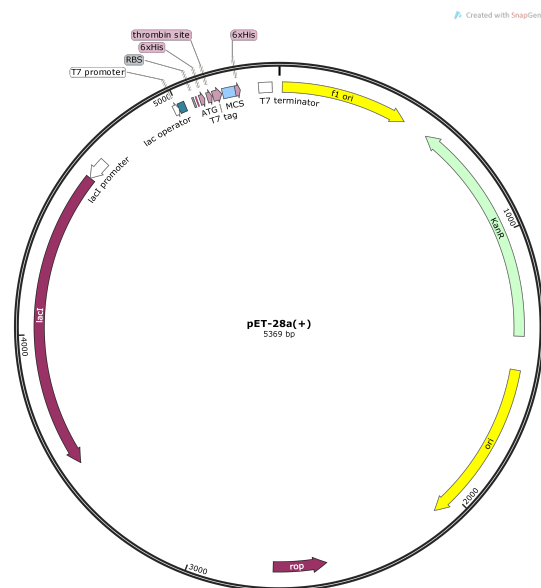


Abbildung 3.2: Vektorkarte des pET-28a(+).

3.4.6 Heterologe Proteinexpression in *E.coli* BL21(DE3)

Die heterologe Expression aller vorgestellten BM3 Konstrukte erfolgte in *E.coli* BL21 (DE3) Zellen. Das Plasmid mit dem gewünschten Zielgen wurde zunächst wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben transformiert. Die transformierten Zellen wurden über Nacht in einer 5 mL LB Medium Kultur mit Kanamycin (30 µg/L) bei 37°C angezogen. Aus dieser Vorkultur wurden am Folgetag drei Kulturen (300 mL) in 1 L Schüttelkolben

3. MATERIAL UND METHODEN

mit jeweils 500 μL inokuliert. Abweichend vom Standardprotokoll für die T7 RNA-Polymerase abhängige Expression unter Kontrolle des Lactose-Operons (*lacI*), wurde die Expression nicht mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei einer OD_{600} von ca. 0,6 AU induziert. Für die Expression für P450_{BM3} hat sich die Inkubation der Expressionskulturen bei 25°C für 38 h und 180 rpm ohne Zugabe von IPTG bewährt.

3.4.7 Zellaufschluss von *E.coli*

Nach einer 38 stündigen Inkubation wurden die Expressionskulturen in Zentrifugenbecher überführt und die Zellen bei 3.300x g sedimentiert. Der Niederschlag wurden in 3 mL/g *Zellmasse* Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase versetzt. Die Zellsuspension wurde in einen EmulsiFlex-C5 Homogenisator der Marke Avestin Inc. (Ottawa, CA) überführt. Der Zellaufschluss erfolgt in diesem Gerät durch Aufbau eines Drucks von ca. 700 bar und schlagartiger Entspannung auf Normaldruck. Die dabei entstehenden Scherkräfte lysieren die Zellen und stellen eine für Proteine schonende Art der Lyse dar. Zur Abtrennung von verbleibenden Zelltrümmern wurde die Suspension bei 35.000x g für 30 min zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand (Lysat) abgenommen. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.8 Chromatographische Proteinreinigung

Zur Isolation der Zielproteine aus dem Lysat wurden ein ÄKTA „fast protein liquid chromatography“ System (FPLC) der Firma GE Healthcare (Little Chalfont, GB) in Kombination mit verschiedenen chromatographischen Trennmethode verwendet. In 3.4.8.1 wird zunächst die standardmäßige Isolationsmethode für His-tag modifizierte Proteine aus dem Lysat vorgestellt, in 3.4.8.2 und 3.4.8.3 werden zusätzlich verwendete Methoden für weitere Reinigungsschritte besprochen. Als Standard-Laufmittel während der Proteinauftragung wurde ein 50 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7,4 verwendet. Das Lysat wurde mittels einer 50 mL Probenschleife auf die jeweilige Säule maschinell appliziert.

3.4.8.1 Affinitäts-Chromatographie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die „Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie“ (IMAC) verwendet. Dazu wurden mit Chelating Sepharose™ gepackte 5 mL HiTrap™ Säulen der Firma GE Healthcare verwendet. Diese Säulen können mit verschiedenen, für die jeweilige Anwendung ausgesuchten Metallionen beladen werden. Für die Isolation von His-tag modifiziertem P450_{BM3} erzielte die Verwendung von Co²⁺ beladenen Säulen die gewünschte Trennleistung. Die Chelating Sepharose Säulen wurden vor der ersten Verwendung gemäß des Herstellerprotokolls mit 2,5 mL einer 100 mM CoCl₂ Salzlösung beladen. Nach dem Waschen mit dreifachem Säulenvolumen an destilliertem Wasser, konnten die Co²⁺ beladenen Säulen für die Reinigung von His-tag modifiziertem Protein genutzt werden.

Vor Verwendung wurden die beladenen Säulen mit Laufmittel äquilibriert und anschließend Protein mit einem Fluss von 2 mL min⁻¹ auf die Säule aufgetragen. Der erste Waschschrift erfolgte bei gleichbleibender Flussrate des Laufmittels für mindestens 3 Säulenvolumen. Im zweiten Waschschrift wurden unspezifisch gebundene Proteine mit 5 SV 30 mM Imidazol-haltigem Kaliumphosphatpuffer und einer Flussrate von 5 mL min⁻¹ ausgewaschen. Die Elution der mittels His-tag gebundenen Proteine erfolgte mit 250 mM Imidazol-haltigem Kaliumphosphatpuffer und gleichbleibender Flussrate. Im Anschluss an die Reinigung wurde die Imidazol-haltige Elution in eine Dialysemembran überführt und in ein 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 Dialysebad gegeben. Die imidazolfreie Proteinlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.8.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Für die zusätzliche Proteinreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie wurde eine XK16/20 Säule (GE Healthcare) mit dem schwachen Anionenaustausch (AEX) Medium Toyopearl 650M (Tosoh Bioscience; Griesheim, D) verwendet. Die aus der IMAC Reinigung stammende Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 2 mL min⁻¹ auf die AEX Säule appliziert und mit 2 SV Laufmittel gewaschen. Der verwendete Elutionspuffer besteht aus dem Standard-Laufmittel mit zugesetztem Natriumchlorid. Die Elution des Zielproteins erfolgte bei einer Flussrate von 5 mL min⁻¹ und eines Natriumchlorid Gradienten von 25 mM mL⁻¹, bei ca. 300 mM NaCl.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.4.8.3 Gel-Permeations-Chromatographie

Ein dritter Reinigungsschritt wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) in einer Sephacryl S-100 Gel-Permeations Medium befüllten XK16/70 Säule (beides GE Healthcare) durchgeführt. Die bereits zweifach gereinigte und konzentrierte Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ des Standard-Laufmittels auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt isokratisch unter gleichbleibender Flussrate nach ca. 21 mL.

3.4.9 Anlagerungsreaktion mit N-(1-Pyren) Iodoacetamid

Lyophilisiertes und zuvor mittels IMAC gereinigtes P450_{BM3} wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 bei Raumtemperatur gelöst. Im Anschluss wurde mit einem 10-fach molarem Überschuss an Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert um Disulfidbrückenbindungen zu lösen. Die Lösung wurde für die weitere Verwendung auf 4°C gekühlt. Die Konjugationsreagenz N-(1-Pyren) Iodoacetamid wurde nach der Reduktion, ebenfalls in 10-fach molarem Überschuss, tropfenweise unter ständigen Rühren der Lösung zugegeben und über Nacht gerührt. Der Überschuss an Konjugationsreagenz wurde durch Dialyse in 2 x 3 L 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 über Nacht entfernt.

3.4.10 Modifikation mit einem CNT-bindenden Peptid (CNT-tag)

Die Modifikation mit einem CNT-bindenden Peptid wurde gemäß Abschnitt 3.4.4 mit CNT-tag Überhangprimern für die jeweiligen Konstrukte durchgeführt. Das PCR Produkt wurde isoliert und erneut in den pET-28a(+) Vector kloniert. Die DNA Amplifikation und Proteinexpression erfolgte gemäß den Protokollen für wildtypische Enzyme.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Gaschromatographie

Gaschromatographische Messungen wurden auf einem Shimadzu GC-2010-System (Kyoto, JP) in Kombination mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) oder einem

Quadrupol Massenspektrometer (GCMS-QP2010) durchgeführt. Für die Auftrennung der Analyten wurden die (5%-Phenyl-)methyl- 95%-dimethylpolysiloxane Säulen DB-5 (FID) der Firma Agilent Technologies und ZB-5 (MS) der Firma Phenomenex (Torrence, USA) mit identischen Spezifikationen von 30 m Länge, 0,25 mm Durchmesser und einem Film von 0,25 μm Dicke verwendet. Als Trägergase dienten Wasserstoff (FID) und Helium (MS) mit einer Flussgeschwindigkeit von jeweils 30,1 cm s^{-1} . Die Injektion von 1 μL Probe erfolgte standardmäßig mit einem Split-Verhältnis von 1:10 und einer Injektiortemperatur von 250°C. Der FID Detektor wurde bei einer konstanten Temperatur von 310°C gehalten. Das Temperaturprogramm wurde auf die jeweiligen Analyten angepasst (Basislinientrennung) und in beiden Analyseverfahren gleich gehandhabt. Eine Übersicht über die Versuchsparameter ist in Tabelle 3.8

Die Extraktion einer Biotransformation für die gaschromatographische Analyse erfolgte standardmäßig mit einfachem Reaktionsvolumen Methyl-tert-butylether (MTBE). Für eine quantitative Analyse wurde dem Extraktionsmittel ein interner Standard (ISTD) zugegeben. Für die Analyse von Anilin Biotransformationen wurde *m*-Aminophenol, für Biotransformation mit Dodekansäure wurde Dekansäure als ISTD zugesetzt. Im Fall der Fettsäuren wurde der Extrakt vollständig in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, die Analyten wurden in 60 μL N,O-Bis(trimethylsilyl)-Trifluoroacetamid (BSTFA) resuspendiert und 30 min bei 70°C für die Derivatisierung der Hydroxygruppen der Fettsäuren mit einer Trimethylsilylgruppe inkubiert.

3.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Proben für die HPLC Analyse wurden standardmäßig mit einem einfachen Volumen *m*-Aminophenol-haltigem (ISTD) MTBE extrahiert. Jeweils 1 μL des Extraktes wurde anschließend maschinell in das HPLC System zur Analyse injiziert. Zur Analyse wurde eine HPLC Anlage der Serie 1200 von Agilent™ verwendet. Für die Detektion der Analyten wurden ein Diodenarray Detektor (DAD, G1315D), sowie eine Fluoreszenz Detektor (FLD, G1321B) eingesetzt. Die Auftrennung der Analyten erfolgte über eine konstant auf 25°C temperierte Exclipse XD8-C18 4,6 mm ID x 250 mm (5 μm) Säule des selben Herstellers. Das Laufmittel bestehend aus einem 75:25 Gemisch aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 und Methanol und wurde isokratisch

3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.8: Bedingungen der gaschromatographischen Analysemethoden mit FID und MS Detektoren.

GC-1			
Säule	DB-5/ZB-5		
Inj.Temp [°C]	250		
Inj.Vol. [μL]	1		
Split Verh.	1:10		
Druck [kPa]	52,1		
Fluss [mL min^{-1}]	11,9		
FID Temp. [°C]	310		
Säulen Temp. [°C]			
	Rate [°C min^{-1}]	Temp. [°C]	Dauer [min]
		140	-
	10	230	1
	65	300	2
ges.Zeit [min]	13,8		
GC-2			
Säule	DB-5		
Inj.Temp [°C]	250		
Inj.Vol. [μL]	1		
Split Verh.	1:5		
Druck [kPa]	47,5		
Fluss [mL min^{-1}]	8,4		
FID Temp. [°C]	330		
Säulen Temp. [°C]			
	Rate [°C min^{-1}]	Temp. [°C]	Dauer [min]
		90	1
	6	127	-
	15	132	0,5
	15	150	-
	65	300	1
ges.Zeit [min]	12,51		

3. MATERIAL UND METHODEN

mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} appliziert. Durch Vergleich der relativen Peakflächen ($A_{\text{relativ}} = A_{\text{Analyt}}/A_{\text{ISTD}}$) von *p*- und *o*-Aminophenol bei einer Wellenlänge von $\lambda = 232 \text{ nm}$, mit einer zuvor gemessenen Standardgerade konnte die in der Biotransformation gebildete Konzentration an Hydroxylierungsprodukten quantifiziert werden.

Tabelle 3.9: Bedingungen der HPLC gestützten Analysemethoden.

Faktor	Methode	
	HPLC-1	HPLC-2
Flussrate [mL min^{-1}]	1	1
Laufmittel A/B	KPi/MeOH (85:15)	KPi/MeOH (75:25)
Injektion [μL]	1	1
DAD; Ref [nm]	285; 360	232; 360
FLD; Ex.; Em. [nm]	-	343; 233
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	25	25
Säule	XDB-C18	XDB-C18

3.5.3 Photometrie

Alle photometrischen Messungen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit flachem Boden der Firma Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D) durchgeführt. Für die Messungen wurde ein POLARstar OmegaTM Plattenleser der BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, D) verwendet, die genutzten Wellenlängen und Inkubationsprogramme werden in den jeweiligen Unterpunkten erläutert.

3.5.3.1 P450 Konzentrationsbestimmung

Die Enzymkonzentration von P450_{BM3} wurde nach Omura und Sato^(92, 93) in einem Mikrotiterplattenformat bestimmt. Dazu wurden $10 \mu\text{L}$ einer Enzymlösung in jeweils $190 \mu\text{L}$ einer unbehandelten (nb) und einer CO-begasteten (CO) 1,5 %-igen Natriumdithionitlösung verdünnt. Für beide Proben wurde ein Spektrum (S) von $\lambda = 400 \text{ nm}$ bis $\lambda = 500 \text{ nm}$ in 2 nm Schritten aufgezeichnet und diese zu einem Differenzspektrum

3. MATERIAL UND METHODEN

($S_{\text{Diff}} = S_{\text{CO}} - S_{\text{nb}}$) verrechnet. Aus der Differenz der Absorptionen bei $\lambda_{\text{Diff}} = 448 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Diff}} = 490 \text{ nm}$ (Basislinienkorrektur) kann mittels des molaren Extinktionskoeffizienten von $E = 91.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, unter Berücksichtigung der Verdünnung im ersten Schritt, die Enzymkonzentration bestimmt werden.

3.5.3.2 P450-Reduktase Aktivitätsbestimmung

Die Reduktaseaktivität wurde anhand der Reduktionsrate von Cytochrom C (CytC) nach Masters *et al.* bestimmt.⁽⁸⁰⁾ Es wurde ein Reaktionsansatz mit $40 \mu\text{M CytC}_{\text{ox}}$ und 100 mM NADPH in $300 \text{ mM Kaliumphosphatpuffer pH } 7,6$ vorbereitet und ca. $5 \text{ nM P450}_{\text{BM3}}$ zugegeben, sodass eine lineare CytC Reduktion über 10 min aufgezeichnet werden konnte. Vor jeder Messung wurde der Ansatz zur Homogenisierung 2 s geschüttelt. Die Reduktionsrate wurde anhand des Extinktionskoeffizienten ϵ von CytC_{red} . $\epsilon_{\text{CytC}} = 21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ bestimmt.

3.5.3.3 NAD(P)H Verbrauchsbestimmung

Alle Nikotinamid-abhängigen enzymatischen Reaktionen wurden zur Bestimmung der Verbrauchsraten in $50 \text{ mM Kaliumphosphatpuffer pH } 7,4$ mit maximal $250 \mu\text{M NAD(P)H}$ angesetzt und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ verfolgt. Vor jeder Messung wurde der Ansatz zur Homogenisierung 2 s geschüttelt. Die aufgezeichneten Absorptionen wurden mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zu den entsprechenden Konzentrationen verrechnet.⁽⁴³⁾

3.5.3.4 Pyren Quantifizierung in wässriger Lösung

Das mit Pyren konjugierte und mittels Dialyse gereinigte Enzym wurde in Lösung photometrisch untersucht. Die Quantifizierung der Pyrenkonzentration (N_{Py}) erfolgte nach Siu *et al.* bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Pyren}} = 26.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁽¹²²⁾ Für eine ungefähre Abschätzung der Konzentration an konjugiertem Enzym ($N_{\text{P450+Py}}$) wurde die zuvor beschriebene Messung mit der CO abhängigen P450 Konzentrationsbestimmung verglichen.

3.5.3.5 P450-abhängige 4-Nitroanisol Umsatzbestimmung

Für die Bestimmung der Hydroxylierungsrate von 4-Nitroanisol, wurde eine Biotransformation in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 photometrisch verfolgt. Gemessen wurde dabei die Formation des Produktes 4-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Die Bestimmung der Produktkonzentration erfolgt durch Verrechnung der gemessenen Absorptionswerten mit dem molaren Extinktionskoeffizienten für 4-Nitrophenol von $\epsilon = 18,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.4 Elektrochemische Messmethoden

Alle elektrochemischen Messungen am ITB wurden mit einem MultiEmStat 8 Kanal Potentiostat und der zugehörigen MultiTrace Software der Firma PalmSens (Houten; NL) durchgeführt. Standardmäßig wurden mehrwandige Siebdruck (screen-printed) Kohlenstoff Nanoröhren (MWCNT) Elektroden der Firma Dropsens (Llanera, ES) verwendet. Alle Messungen wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt. Vergleichbare Messungen am NMI wurden mit einem VSP Potentiostat der Firma Princeton Applied Research (Oak Rich; USA) in 150 mM Natriumchlorid haltigen PBS Puffer durchgeführt.

Cyclovoltammetrie

Voltammogramme wurden grundsätzlich in Stickstoff (N_2) gesättigtem Puffern (entgast) und unter N_2 Atmosphäre aufgezeichnet. Enzymlösungen wurden immer mit lyophilisiertem Enzym frisch in entgastem Puffer pH 7,4 angesetzt.

Die Aufzeichnung erfolgte mit der zugehörigen MultiTrace Software. Vor jeder Messung wurde die Elektrode standardmäßig 3 min in der Enzymlösung inkubiert. In dieser Zeit sollte dem Enzym die Möglichkeit der selbständigen Assemblierung an der Elektrodenoberfläche gegeben werden. Vor jeder voltammetrischen Messung wurde das Enzym für 2 Sekunden bei einer Spannung von $E = +1 \text{ V}$ gehalten. In einem Vorversuch wurde für $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$ der lineare Bereich der Scanrate ($0,1 - 2,5 \text{ Vs}^{-1}$) bestimmt. Im Folgenden wurde standardmäßig mit einer Scanrate von $1,5 \text{ Vs}^{-1}$ verfahren. Die Scansensitivität wurde auf $1 \mu\text{A} - 1 \text{ mA}$ gesetzt und die Spannung zwischen $E = +1 \text{ V}$ bis -1 V , in einem Intervall von $0,05 \text{ V}$ alterniert.

3. MATERIAL UND METHODEN

Chronoamperometrie

Alle chronoamperometrischen Messungen der enzymatischen Aktivität wurden in nicht entgastem Puffer durchgeführt. Zur Reduktion wurde ebenfalls eine Siebdruck MW-CNT Elektrode verwendet und entsprechend der zuvor beschriebenen Vorgaben vorbereitet. Die Reduktion erfolgte bei -700 mV und wurde mit einer Samplingrate von 0,5 s aufgezeichnet. Für die Aminophenol Detektion wurde eine Glaskohlenstoff Elektrode (3 mm Durchmesser; Nr.: 002012) der Firma ALS Co. Ltd (Tokyo JP) verwendet. Diese wurde auf eine Spannung von $E = +150$ mV polarisiert und der resultierende Detektionsstrom mit einer Sensitivität von 1 nA - 100 nA und einer Samplingrate von 0,5 s aufgezeichnet.

4

Ergebnisse

Im Folgenden wird gezeigt, wie das P450_{BM3} zunächst mit einem passenden Ankermolekül für die selbständige Anlagerung an eine Kohlenstoffnanoröhren (CNT) basierte Elektrode modifiziert wurde. Das wildtypische P450_{BM3} wurde für die Hydroxylierung ausgesuchter Substrate zu elektroaktiven Produkten, mittels dem Rational Design Ansatz optimiert und anschließend mit einem Ankermolekül modifiziert. Diese Aktivität sollte die *in situ* Aktivitätsbestimmung ermöglichen. Diese optimierte und modifizierte Variante wurde genutzt, um die Möglichkeit der elektrochemischen Hämeisen Reduktion in einem CNT basierten System zu untersuchen und gegebenenfalls zu zeigen, dass diese zur enzymatischen Produktformation beitragen kann. Weiterführend sollte eine dreidimensional erweiterte P450-Elektroden Applikation etabliert werden. Mittels einer erhöhten Stoffmenge an reduzierbarem Enzym bei gleichbleibender Elektroden-Grundfläche sollte die Limitation der spezifischen Produktleistung (space-time-yield) elektrochemischer P450-Applikationen überwunden werden. Vertiefend wurde der intramolekulare Elektronentransfer im P450_{BM3} System als Grundlage für weitere Optimierungen der elektrochemisch getriebenen P450 Katalyse genauer beleuchtet.

4.1 P450_{BM3} Modifikation mit einem Ankermolekül

4.1.1 P450_{BM3} Modifikation mit einem Cysteinrest

Für eine positionsspezifische Anlagerung eines N-(1-Pyren)-Acetamid (Pyren) Ankermoleküls musste zunächst ein artifizierender, exponierter Cysteinrest als Ankerposition

4. ERGEBNISSE

an der Enzymoberfläche eingeführt werden. Es wurden mehrere Varianten der P450-Domäne (hBM3), als auch des vollständigen Fusionskonstruktes (BM3) mit einem artifiziellen Cystein generiert. Ausgehend vom hBM3 Genkonstrukt wurden die bereits von Udit *et al.* verwendete Variante mit einem artifiziellen Cystein an Position 387 (hBM3_{Q387C}), sowie eine Variante mit einem C-terminalen Cystein (hBM3_{term.C}) in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Primerpaaren 2 + 3 und 1 + 4 generiert. Einem C-terminalen Cystein wurde stets eine flexible Glycin-Glycin-Serin (GGS) Sequenz vorangestellt, sodass die Ankerposition stärker exponiert und flexibler in ihrer relativen Konformation ist. Varianten mit dieser GGS-C Sequenz werden als _{term.C} benannt. Für das BM3 Gesamtkonstrukt wurde eine Variante mit C-terminalem GGS-C an der Reduktase Domäne (BM3_{term.C}) mittels PCR (Primer: 1 + 7) generiert. Für einen einzelnen Aminosäureaustausch wurde eine QuikChange[®] (QC) Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die Einführung der C-terminalen GGS-C Sequenz erfolgte mit einer Überhang-PCR (Ü-PCR). Die genaue Vorgehensweise ist im Abschnitt 3.4.4 beschrieben. Alle Konstrukte wurden, wie in Abschnitt 3.4.5 erläutert, in einen pET-28a(+) Vektor kloniert und nach positiver Sequenzierung in *E.coli* BL21(DE3) (TB-Kanamycin; 25°C; 180 Umin⁻¹; 36 h) exprimiert. Die Isolation der N-terminal mit einer 6-fach Histidin Sequenz (His₆-tag) versehenen Zielproteine aus dem Lysat, erfolgte gemäß der Beschreibung in Abschnitt 3.4.8.1 mittels Immobilisierter-Metallionen-Austausch-Chromatographie (IMAC).

4.1.2 Pyren Anlagerungsreaktion

Die zuvor generierten Cystein Varianten des P450_{BM3} können für die in Abschnitt 3.4.9 beschriebene Anlagerungsreaktion verwendet werden. In dieser Reaktion wird ausgehend von einem N-(1-Pyren)-Iodocateamid, ein Pyrenrest (Py) thiol-spezifisch an die zuvor eingebrachten Cysteinreste angelagert. Der Erfolg der Anlagerungsreaktion wurde exemplarisch, mittels ESI-MS Analyse eines Chymotrypsin Verdau der Variante hBM3_{term.C}, getestet. Das artifizielle C-terminale Cystein wurde während der Reaktion erfolgreich mit dem gewünschten Pyren (Py) modifiziert. Ebenfalls das Hämeisen-koordinierende Cystein an Position 400 (C400) wurde mit einem Pyren konjugiert. Die durch eine Sulfidbrücke verbundenen Positionen C62 und C156 blieben unverändert.

4. ERGEBNISSE

Eine genaue Auflistung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide ist in Abbildung 7.2 dargestellt.

Für eine ungefähre Abschätzung der aktiven und gleichzeitig mit Pyren modifizierten Enzymkonzentration ($N_{P450+Py}$), wurde für alle Proben, wie im Abschnitt 3.5.3 beschrieben, die Enzymkonzentrationen vor ($N_{P450\ v.M.}$) und nach der Modifikationsreaktion ($N_{P450\ n.M.}$), sowie die Pyrenkonzentrationen (N_{Py}) ermittelt. Der Berechnung wird die vollständige Konjugation (C-terminal und am C400) aller gleichzeitig konjugierten und inaktiven Enzymmoleküle vorausgesetzt. Damit ergibt sich die gesuchte Konzentration $N_{P450+Py}$ aus der Gleichung 4.1:

$$N_{P450+Py} = N_{Py} - 2(N_{P450\ v.M.} - N_{P450\ n.M.}) \quad (4.1)$$

Die ermittelten Konzentrationen sind der Spalte 4 in Tabelle 4.1 zu entnehmen. Die maximale, erfolgreich in aktiver Konformation konjugierte Enzymkonzentration, erreichte im Fall des $BM3_{term.C}$, 83 % der ursprünglich eingesetzten Konzentration. Die beiden anderen Enzyme blieben mit 48 % ($hBM3_{Q387C}$) und 45 % ($hBM3_{term.C}$) deutlich darunter. Eine Änderung des Verhältnisses Pyren zu Enzym, konnte keine Verbesserung bewirken.

Tabelle 4.1: Bestimmung ungefähren Konzentration an aktivem und mit Pyren modifiziertem P450 Enzym ($N_{P450+Py}$; μM) und der daraus resultierenden relativen Konjugation (rel. Konj.; %)

Variante	$N_{P450n.M.}$	N_{Py}	$N_{P450v.M.}$	$N_{P450+Py}$	rel. Konj.
$hBM3_{Q387C}$	57,6	83,4	80,0	38,6	67,0
$hBM3_{term.C}$	77,7	89,2	100,0	44,6	57,4
$BM3_{term.C}$	32,7	47,8	43,0	27,2	83,2

4. ERGEBNISSE

4.1.3 Vergleichende Charakterisierung des wildtypischen Enzyms und der Pyren modifizierten Varianten

Für die Bewertung der in dieser Arbeit angestrebten elektrochemisch getriebenen enzymatischen Aktivitäten, müssen die Nicotinamid-abhängigen Aktivitäten der etablierten Enzyme ebenfalls bestimmt werden. Da eine C-terminale Modifikation des Enzyms eine sterische Hinderung für den Zugang des Nikotinamids in die spezifische Bindetasche darstellen könnte, wurden die Varianten mit artifiziellem Cystein jeweils vor und nach ihrer Modifikation untersucht und mit dem wildtypischen P450_{BM3} verglichen. Die vorgestellten P450_{BM3} Varianten wurden mittels gaschromatographischer Analyse (GC-FID) einer Biotransformation (Tabelle 4.2; Methode: GC-FID-1) untersucht. Dabei wurde die NADPH-abhängige Dodekansäure Hydroxylierungsaktivität bestimmt. Im Folgenden werden alle, in Tabellen aufgeführten Aktivitäten, als k_{cat} (min^{-1}) angegeben. Dazu wurden Proben nach jeweils 1 min, 5 min und 15 min entnommen und analysiert. Das wildtypische P450_{BM3} setzte Dodekansäure mit einer initialen Rate von $k_{\text{cat}} = 152 \text{ min}^{-1}$ um. Die Variante BM3_{term.C} setzte die Dodekansäure, verglichen zum wildtypischen Enzym, mit $k_{\text{cat}} = 19 \text{ min}^{-1}$ (12,5 %) deutlich langsamer um. Die Konjugation mit einem Pyren (BM3_{term.C}+Py) senkte die Aktivität nochmals auf $k_{\text{cat}} = 13 \text{ min}^{-1}$ (8,5 %).

Tabelle 4.2: Einfluss der artifiziiellen C-terminalen GGS-C Sequenz, sowie deren Pyrenmodifikation auf die Rate der enzymatischen NADPH-abhängigen Dodekansäure Hydroxylierung.

Variante	Anker	k_{cat} (min^{-1})
BM3 wt	-	152(initial)
BM3 _{term.C}	-	19
BM3 _{term.C}	Pyren	13

4.1.4 Gentechnische Modifikation mit einem C-terminalen Kohlenstoffnanoröhren-bindenden Peptid

Alternativ zur chemischen Modifikation des P450_{BM3} mit einem Py Ankermolekül, wurde ein rein molekularbiologischer Ansatz verfolgt. Die Genkonstrukte für hBM3 und BM3 wurden in diesem Ansatz am 3' Ende des jeweiligen Gens modifiziert (siehe Abschnitt 3.4.10; Abbildung 7.1), sodass die Proteine ohne weitere Behandlung mit einem C-terminalen Kohlenstoffnanoröhren-bindendem Peptid (CNT-tag) exprimiert werden. Die Sequenz dieses Peptides (IFRLSWGTYFS) ist der Arbeit von Li *et al.* aus dem Jahr 2013 entnommen.⁽⁷²⁾ Für die gentechnische Modifikation mit einem CNT-tag, wurde eine Überhang-PCR mit den Primern 1 und 8 für hBM3, sowie den Primern 1 und 9 für das BM3 Gesamtkonstrukt verwendet. Die PCR Produkte wurden erneut in pET-28a(+) kloniert und sequenziert. Für die Expression (TB-Kanamycin; 25°C; 180 Umin⁻¹; 36 h) wurden die Konstrukte in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der Zell Lyse wurden die Zielproteine hBM3_{CNT-tag} und BM3_{CNT-tag} mit Hilfe des N-terminalen His₆-tag aus dem Lysat isoliert (IMAC).

4.1.5 Vergleichende Charakterisierung der CNT-tag Variante mit dem nicht modifizierten P450_{BM3}

Die CNT-tag modifizierte BM3 Variante wurde ebenfalls charakterisiert und mit P450_{BM3} verglichen (Tabelle 4.3; Methode: GC-FID-1). Erneut wurde eine Reaktionszeit von 15 min gewählt und eine drei Punktbestimmung durchgeführt. Die initiale Aktivität der CNT-tag Variante wurde auf $k_{\text{cat}} = 128 \text{ min}^{-1}$ bestimmt und lag somit nur ca. 15 % unter der Hydroxylierungsrate des nicht modifizierten P450_{BM3}.

4.1.6 Elektrochemischer Vergleich der Pyren- und CNT-tag modifizierten Varianten (NMI)

Am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) wurde mittels Square Wave Voltammetrie die Eignung der beiden vorgestellten Ankermoleküle überprüft, das P450_{BM3} ebenfalls elektrisch leitfähig an eine CNT-basierte Elektrode zu binden. Die zuvor am Institut für Technische Biochemie der Uni-

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4.3: Einfluss der artifiziellen C-terminalen GGS-IFRLSWGTYFS Sequenz (CNT-tag) auf die Umsatzrate k_{cat} [min^{-1}] der enzymatischen NADPH-abhängigen Dodekansäure Hydroxylierung.

Variante	k_{cat} (min^{-1})
BM3 wt	152 (initial)
BM3 _{CNT-tag}	128

versität Stuttgart (ITB) exprimierten Enzyme, wurden in lyophilisierter Form ($5 \mu\text{mol}$ Aliquot) an das NMI weitergegeben und vor Ort in PBS Puffer (140 mM NaCl) resuspendiert. Für die nicht modifizierte P450_{BM3} Reduktase (BMR), das wildtypische P450_{BM3} sowie die modifizierten Varianten P450_{CNT-tag} und BM3_{term.C}+Py wurden die Amplitudenhöhen der Reduktionspeaks (I_{pk} ; μA) gemessen und gegenübergestellt (Abbildung 4.1). Dabei zeigten die nicht modifizierte Reduktase, sowie das wt P450_{BM3} eine Reduktionspeakhöhe von $I_{\text{pk}} = 10,8 \mu\text{A}$ (BMR; Flavin) und $I_{\text{pk}} = 13,5 \mu\text{A}$ (BM3; Häm). Diese Werte dienten als Vergleichswerte für die nachfolgenden Messungen. Für die CNT-tag modifizierte Variante P450_{CNT-tag}, wurde eine um 48 % gesteigerte Amplitude des Reduktionspeaks gegenüber dem wt BM3 bestimmt. Den höchsten Wert erreichte die mit Py modifizierte Variante BM3_{term.Cys}+Py mit einer um 112 % gesteigerten Amplitude. Beide Ankermoleküle bewirkten eine deutlich erhöhte Elektronenübertragung auf das Hämeisen des Enzyms.

4.2 Etablierung einer Methode zur *in-situ* Aktivitätsbestimmung

Um die elektrochemisch getriebene Aktivität einer mit Anker modifizierten P450_{BM3} Variante *in situ* verfolgen zu können, muss ein in Echtzeit detektierbares Produkt enzymatisch formiert werden. Im Zuge dessen wurden Substrate getestet deren Hydroxylierungsprodukte photometrisch und/oder elektrochemisch nachweisbar sind.

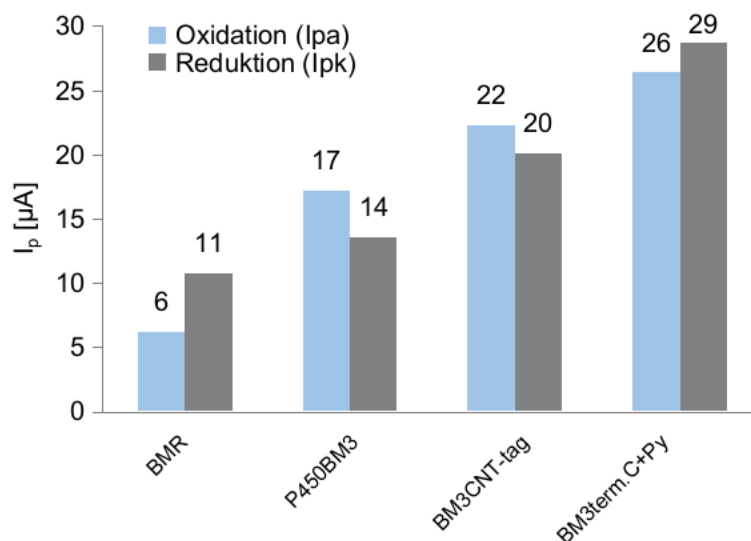


Abbildung 4.1: Bewertung der mittels Ankermolekül erleichterten P450 Hämeisenreduktion. Verglichen wurden die im Square Wave Voltammogramm erreichten reduktiven (I_{pk}) und oxidativen (I_{pa}) Peak Amplituden. Dargestellt sind die BM3 Reduktase (BMR), das wildtypische BM3, sowie die Varianten mit einem CNT-tag und einem konjugierten Pyren. Die Abbildung ist mit freundlicher Erlaubnis von ChemBioChem der Veröffentlichung von Llaudet *et al.* 2016 entnommen.⁽⁷⁵⁾

4.2.1 Screening der Bibliothek auf Aktivität mit ausgesuchten Substraten

Die Mutanten einer hauseigenen, rational entworfenen P450_{BM3} Biobibliothek wurden mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer (GC-MS) Analyse einer 24-stündigen Biotransformationen gescreent.⁽¹⁴⁰⁾ Diese zeichnet sich durch eine erweiterte Aktive Tasche für eine verbesserte Bindung aromatischer Substrate aus. Als potenzielle Substrate wurden *p*-Nitro-anisol (**5**) und Anilin (**7**) getestet (Abbildung 5.4). Die Zuordnung der Substrat- und erwarteten Produkt-Peaks erfolgte durch Abgleich des Verhältnisses Masse zu Ladung (m/z).

4. ERGEBNISSE

p-Nitroanisol

In einer qualitativen GC-MS Analyse einer DMSO extrahierten 24-stündigen Biotransformation wurden sieben Mutanten der Bibliothek erfolgreich auf Umsetzung von (5) zu *p*-Nitro-phenolat (6) getestet (vgl. Abbildung 5.4). Das erwartete Produkt wurde bei einer Retentionszeit (R_t) von $R_t = 6,15 \text{ min}$ identifiziert (Methode GC2). Eine 10 minütige Biotransformation dieser Mutanten wurde ebenfalls photometrisch beobachtet (Tabelle 4.4). Die photometrische Aktivitätsbestimmung des *p*-Nitroanisol Umsatzes beruht auf der Absorption des formierten *p*-Nitrophenolat bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ und wird mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 18.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.⁽¹⁰⁴⁾ Während der photometrischen Messung konnte lediglich die Mutante 87A/328F *p*-Nitrophenolat in detektierbarer Konzentration formieren ($k_{\text{cat}} = 0,55 \text{ min}^{-1}$). Die Modifikation dieser Variante mit einem CNT-tag zu BM3 87A/328F_{CNT-tag}, ging mit einem Aktivitätsverlust von *ca.* 38 % einher ($k_{\text{cat}} = 0,34 \text{ min}^{-1}$).

Tabelle 4.4: Qualitative GC-MS und quantitative photometrische Analyse des *p*-Nitroanisol Umsatzes. Der erfolgreiche massenspektrometrische Nachweis des Substrat Umsatzes nach 24 Stunden wird durch einen Haken (✓) gezeigt. Die photometrische Bestimmung der initialen Aktivität (k_{cat}) erfolgte bei $\lambda = 405 \text{ nm}$.

BM3 Mutante	Anker	(24 h)	k_{cat} (min^{-1})
328V	-	✓	-
87A/328F	-	✓	0,55
74G/87V/188Q	-	✓	0,00
47L/51F/87V/328F	-	✓	0,00
47L/51F/87V/328I	-	✓	0,00
47L/51F/87V/328L	-	✓	0,00
78L/87V/328F/437I	-	✓	0,00
87A/328F	CNT-tag	n.d.	0,34

Anilin

Eine erste Umsatzbestimmung der P450_{BM3} katalysierten Anilin Hydroxylierung erfolgte mittels GC-MS Analyse. Anders als in den zuvor vorgestellten Biotransformationen wurde den Anilin Umsatzreaktionen standarmäßig Katalase 3.000 U mL⁻¹ zugegeben. Die Analyse dieser Reaktionen zeigte für mehrere Mutanten die Bildung von zwei Aminophenol Isomeren. Die GC-MS gestützte Analyse (Methode: GC-2) lieferte keine sauberen und zuverlässig reproduzierbaren Chromatogramme der Analyten Anilin und Aminophenol. Deshalb wurde die Aktivität der Mutanten Bibliothek und des wildtypischen BM3 erneut mittels HPLC-DAD untersucht (Methode: HPLC-1). Die Identifikation der formierten *p*- und *o*-Aminophenol Isomere erfolgte wie zuvor, mittels Vergleich der Retentionszeiten (R_t) mit Produktstandards. Die Retentionszeit des *p*- Isomers wurden mit $R_t(p-) = 2,2 \text{ min}$, die des *o*- Isomers mit $R_t(o-) = 5,5 \text{ min}$ bestimmt.

Für alle Varianten konnte die Formation von Aminophenol (AP) Isomeren nach 24-stündiger Inkubation nachgewiesen werden (Tabelle 7.1). Die Chromatogramme der vier aktivsten Mutanten, welche für die Modifikation mit einem CNT-tag weiter verwendet wurden, sind in Abbildung 4.2 gezeigt. Die Mutanten wiesen eine zwischen 1,7-fach (BM3 328V; 770 μM AP) und bis zu 2,8-fach (BM3 47L/51F/87V/328F; 1250 μM AP) gesteigerten Umsatz von Anilin, verglichen mit dem wt P450_{BM3} (440 μM AP) auf.

Die Genkonstrukte BM3 328VA (328V/437A), BM3 328V (328V), BM3 LFFV (47L/51F/87V/328V) und BM3 LFFV (47L/51F/87V/328F) wurden, gentechnisch mit einem CNT-tag modifiziert und in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der Expression (TB Medium, 25°C, 180 rpm für 36 h) wurden die Zellen lysiert und die Zielproteine mittels IMAC aus dem Lysat isoliert. Diese modifizierten CNT-tag Varianten wurden mit einer für niedrige Analytkonzentrationen optimierten und verkürzten HPLC-DAD Analytik charakterisiert ($R_t(p-) = 2,0 \text{ min}$ und $R_t(o-) = 3,1 \text{ min}$; HPLC-2). Daher konnte die Reaktionszeit von einer Übernacht Inkubation auf 15 min verkürzt werden und wie zuvor eine drei Punktbestimmung (1 min, 5 min und 15 min) durchgeführt werden (Abbildung 7.4).

In der Tabelle 4.5 sind in Spalte 1 die NADPH-abhängigen Umsatzraten (k_{cat} ; min⁻¹), sowie die relativen Aktivitäten (%) des wildtypischen P450_{BM3} und der CNT-tag modifizierten Varianten dargestellt. Die initialen Umsatzraten einer 15-minütigen Reakti-

4. ERGEBNISSE

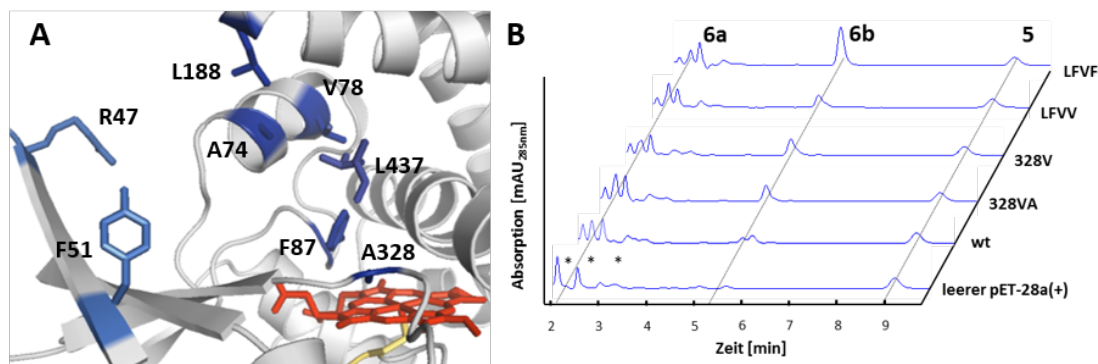


Abbildung 4.2: A) Übersicht über die mutierten Aminosäurepositionen der fokussierten Bibliothek: Positionen 47 und 51 befinden sich am Eingang der aktiven Tasche (hellblau), während die restlichen Positionen in der aktiven Tasche lokalisiert sind (dunkelblau). B) HPLC-DAD Chromatogramme der für die CNT-tag Modifikation ausgesuchten Mutanten. Die mit * markierten Peaks wurden nicht näher identifiziert. Gezeigt sind die Mutanten BM3 328VA (328V/437A), BM3 328V (328V), BM3 LFVV (47L/51F/87V/328V) und BM3 LFVF (47L/51F/87V/328F). Als Negativkontrolle diente eine Expression des leeren pET-28a(+) Vektors. Die Abbildung ist der Veröffentlichung von Llaudet *et al.* 2016 entnommen.⁽⁷⁵⁾

on der Mutanten sind verglichen mit dem wt P450_{BM3} (0,0005 s⁻¹) zwischen 2,4-fach (BM3 LFVV; 0,0014 s⁻¹) und 5,5-fach (BM3 LFVF und BM3 328V; 0,0031 s⁻¹) erhöht. Zudem ergibt sich eine klare Tendenz der Varianten: BM3 LFVF/BM3 328V < BM3 328VA < BM3 LFVV.

4.2.2 Validierung der elektrochemisch getriebenen Aktivität

Elektrochemische Aminophenol Detektion

Für die elektrochemische Bestimmung der NADPH-abhängigen Aktivitäten am NMI, wurden diese CNT-tag modifizierten Varianten zu jeweils 5 μ mol aliquotiert und lyophilisiert. Dort wurden die Enzyme in PBS Puffer resuspendiert und analog zu dem eben beschriebenen Experiment, mittels oxidativer Aminophenoldetektion (DED; direct electrochemical detection) an einer auf E = +150 mV polarisierten Glaskohlenstoff (GC) Elektrode untersucht.

Die gemessenen Detektionsströme der GC Elektrode dienten als Berechnungsgrundlage der relativen Aktivitäten der Enzyme untereinander (Spalte 2 in Tabelle 4.5). Unabhängig von der Detektionsmethode wurden die Mutanten BM3 328V (100 %) und BM3 LFVF (86 %) als die aktivsten Enzyme identifiziert und die tendenzielle Einordnung der Mutanten untereinander bestätigt. Die elektrochemische, oxidative Aktivitätsbestimmung (DED) mit Hilfe einer GC Elektrode konnte mit diesem Ergebnis als vergleichbare Analytik verifiziert werden.

Nachweis der elektrochemisch getriebenen, von einem CNT-tag modifizierten CYP katalysierten Produktformation

In folgenden Versuchen wurde gezeigt, dass der eingebrachte CNT-tag die Elektronenübertragung erleichtert und zur elektrochemischen, in der Produktformation resultierenden (produktiv) Hämeisen Reduktion beiträgt. Die reduktive Elektrode wurde auf $E = -700$ mV polarisiert und die Produktbildung mit Hilfe der oxidativen GC Elektrode verfolgt (Abbildung 4.3). Für das CNT-tag modifizierte Enzym wurde ein unmittelbarer Anstieg des Detektionsstromes gemessen, während die Detektionsströme der Negativkontrolle und des nicht modifizierten Enzyms auf einem basalen Niveau blieben. Eine CNT Elektrode kann in Kombination mit einem CNT-tag modifizierten CYP, als Alternative zum Nicotinamid für die Hämeisen Reduktion genutzt werden.

Im Anschluss wurden die vier Mutanten auf ihre elektrochemisch getriebene (DET-abhängige; direct electron transfer) Aktivität untersucht. Die resultierenden Detektionsströme wurden mangels fehlender Kenntnis der elektrodenständigen P450 Stoffmenge in relative Aktivitäten umgerechnet (Spalte 3 in Tabelle 4.5; beste Variante = 100 %). Eine Methode zur Bestimmung der reduzierbaren Stoffmenge wurde erst im Anschluss etabliert.

Die zuvor beobachtete tendenzielle Einordnung der NADPH-abhängigen Aktivität konnte für die DET-abhängigen Aktivitäten nur teilweise bestätigt werden (BM3 LFVF 100 %; BM3 328V 32 %).

4. ERGEBNISSE

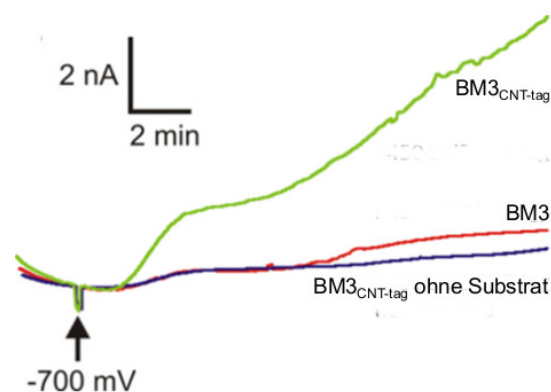


Abbildung 4.3: Untersuchung der elektrochemisch getriebenen Aktivität eines CNT-tag modifizierten CYP am NMI mittels DED. Gezeigt ist die Aktivität des CNT-tag modifizierten BM3_{328V} (grün), des nicht modifizierten BM3_{328V} (rot), sowie eine Kontrollreaktion ohne Substrat (blau). Die Abbildung ist mit freundlicher Erlaubnis von ChemBioChem der Veröffentlichung von Llaudet *et al.* 2016 entnommen.⁽⁷⁵⁾

Präparative HPLC-DAD/FLD gestützter Nachweis der elektrochemisch getriebenen Aktivität

Unter Berücksichtigung des geschätzten Enzymdurchmessers von ca. 4 μm (PyMol) finden nur wenige pmol Enzym auf der Elektrodenoberfläche (12,56 mm^2) Platz. Eine direkte HPLC-DAD gestützte Analyse der Produktformation nach wenigen Minuten Reaktionszeit, ist bei einer maximalen Umsatzrate von 0,0031 s^{-1} aufgrund der nanomolaren Detektionsgrenze ausgeschlossen. In Folge dessen wurde für eine qualitative HPLC Analyse der DET-abhängigen Aminophenol Formation, eine Reaktionszeit von 6 h gewählt und die DAD Detektion mit einer für aromatische Verbindungen sensitiven Fluoreszenzdetektion (FLD) kombiniert (Abbildung 4.4; Methode HPLC-1). Exemplarisch wurde die CNT-tag modifizierte Variante BM3 328VA auf Produktformation untersucht. Die übereinstimmenden Retentionszeiten der Fluoreszenzsignale und der zuvor gemessenen DAD Signale authentischer Produktstandards erbrachte den direkten Nachweis der DET-abhängigen Produktbildung durch CNT-tag modifiziertes BM3 328VA.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4.5: Relative Aktivitäten^a der BM3 Varianten mit NADPH (HPLC-DAD) und NADH (DED), sowie mit elektrochemischer Reduktion mittels CNT Elektrode (DED). Messungen der Arbeitsgruppe am NMI sind in Blau dargestellt. Die dargestellten Aktivitäten wurden bereits von Llaudet *et al.* 2016 veröffentlicht.⁽⁷⁵⁾

Enzym ^[b]	HPLC (DAD)	NADPH	DED	
	k_{cat} (min ⁻¹)	rel. Akt. (%)	NADH (CNT Elektrode, nicht polarisiert)	DET (CNT Elektrode, polarisiert)
wt P450 _{BM3}	0,0005	18	[c]	[c]
BM3 328V	0,186	99	100	32
BM3 328VA	0,102	55	48	73
BM3 LFVF	0,186	100	86	100
BM3 LFVV	0,084	44	57	64

a) Produktformation wurde mit HPLC-DAD und DED Analytik verfolgt. Aktivität der besten Variante innerhalb einer Detektionsmethode wurde auf 100 % festgelegt. b) Mutanten: BM3 LFVF (47L/51F/87V/328F), BM3 LFVV (47L/51F/87V/328V), BM3V (328V), BM3 VA (328V/437A). c) Das für die HPLC Analyse genutzte wt P450_{BM3} war nicht mit einem CNT-tag modifiziert und konnte nicht für die DET genutzt werden.

Vorraussetzungen für eine dreidimensionale Erweiterung mittels Solgel Immobilisierung

Letztlich sollte die planare CNT Elektrode zu einem dreidimensionalen, CNT-Solgelmatrix Elektrodensystem erweitert werden. Zunächst wurde überprüft, ob die Substrat- und Produktmoleküle ungehindert durch die Matrix diffundieren können. Ein Teil der gelösten Enzyme wurde so in der dreidimensionalen Solgelmatrix immobilisiert. Die restliche Lösung wurde entfernt und durch einen P450-freien, Katalase- und Anilin-haltigen PBS Puffer ersetzt. Die NADH induzierte Aktivität wurde mittels Detektionselektrode detektiert (Abbildung 4.5A). Weder die Diffusion von NADH, Anilin oder den Hydroxylierungsprodukten (Abbildung 4.5A) wurde durch die Solgel Matrix behindert. Der gemessene Detektionsstrom übertraf die Kontrollreaktion (freies Enzym in Lösung) um ca. 40 %.

4. ERGEBNISSE

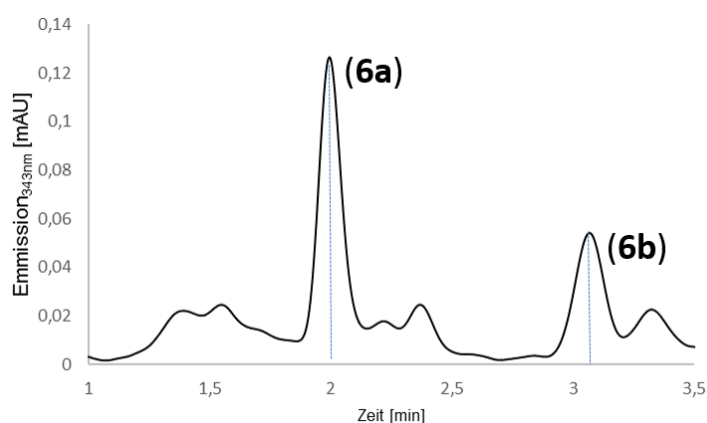


Abbildung 4.4: Ausschnitt aus dem Fluoreszenz Chromatogramm der elektrochemisch getriebenen BM3 LFVF Aminophenol Formation. Die Produkte (**4**; $R_t = 2 \text{ min}$) und (**5**; $R_t = 3,1 \text{ min}$) konnten anhand ihrer Retentionszeiten eindeutig zugeordnet werden

Für die Interpretation dieser Ergebnisse ist es von besonderer Bedeutung zu erwähnen, dass im Falle des immobilisierten Enzyms nur im Solgel selbst Produkt formiert wird. Von dieser lokal begrenzten Zone der Produktbildung in der Solgel Matrix kann das Produkt in alle Richtungen diffundieren. Daher wird lediglich ein Teil der gesamten formierten Stoffmenge des Produktes an der Detektionselektrode oxidiert. Die tatsächliche Produktformation übersteigt daher, die anhand des Detektionsstroms bestimmte Formationsrate. In der Kontrollreaktion wird hingegen in der gesamten Lösung gleichmäßig Produkt formiert, sodass die Diffusion der Produktmoleküle keinen nennenswerten Einfluss nimmt.

Im nächsten Schritt wurde auf einer, mit $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$ versetzten planaren CNT Elektrode, eine Solgel Matrix formiert und geprüft ob die Polymerisationsreaktion Einfluss auf die Bindung des Enzyms an der CNT Oberfläche nimmt. Wie zuvor wurde nach der Polymerisation die restliche Enzymlösung gegen den oben beschriebenen Reaktionspuffer ersetzt. Durch Polarisation der CNT Elektrode auf $E = -700 \text{ mV}$ konnte das *via* CNT-tag gebundene und zusätzlich in einer Solgel Matrix immobilisierte Enzym produktiv reduziert werden (Abbildung 4.5 B; ca. 7 nA). Dabei erreichte die elektrochemisch getriebene Aktivität ca. 60 % der Nicotinamid-abhängigen (NADH) Kontrollreaktion.

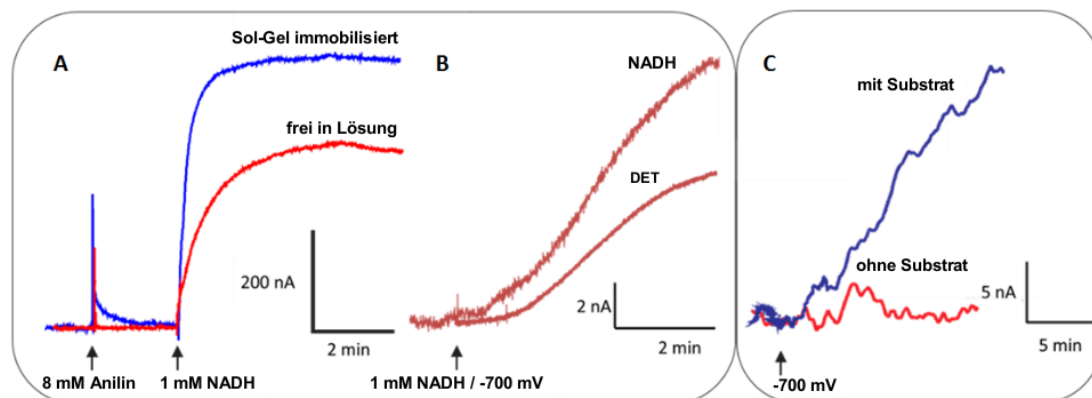


Abbildung 4.5: A) Elektrochemische Bestimmung der Nicotinamid-abhängigen Produktformation durch in Lösung befindliches (rot) und mittels Solgel immobilisiertes (blau) BM3 LFVF. B) Elektrochemischer Vergleich der Nicotinamid-abhängigen (NADH) und elektrochemisch getriebenen (DET) Produktformation mittels BM3 LFVF. C) Elektrochemische Bestimmung der elektrochemisch getriebenen Produktformation durch in einer CNT-PEDOT:PSS-Solgelmatrix immobilisiertes BM3 LFVF. Die Abbildung ist mit freundlicher Erlaubnis von ChemBioChem der Veröffentlichung von Llaudet *et al.* 2016 entnommen.⁽⁷⁵⁾

Dreidimensionale Erweiterung einer Goldelektrode durch CNT-PEDOT:PSS-Solgelmatrix

Ausgangspunkt für eine dreidimensionale Elektrodenapplikation ist eine nicht modifizierte Goldelektrode. Für die Etablierung eines dreidimensionalen Elektrodensystems, wurde das BM3_{CNT-tag} zunächst mit CNTs in wässriger Lösung inkubiert. Dieses Gemisch wurde anschließend mit der Solgel Matrix auf der Elektrodenoberfläche copolymerisiert. Dabei wurde dieselbe Enzymkonzentration wie zuvor für den planaren Solgelaufbau verwendet. Nach der Copolymerisation sind die Enzym-CNT Komplexe in der Matrix verteilt, aber noch nicht elektrisch mit der Goldelektrode verbunden. Für diese Anbindung wurden 3,4-Ethylenedioxythiophen:Polystyren Sulfonat (EDOT:PSS) Monomere zugegeben und zur Diffusion in die poröse Solgel Matrix kurzzeitig inkubiert. Durch Applikation eines Potentials von $E = +900$ mV wurden diese Monomere zum leitenden Poly-3,4-Ethylenedioxythiophen (PEDOT) polymerisiert. Idealerweise

4. ERGEBNISSE

werden auf diese Weise alle in der Matrix befindlichen Enzymmoleküle elektrisch verbunden. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen sind die CNT-Enzym Komplexe in diesem Aufbau, sofern nicht direkt an der Goldoberfläche befindlich, ausschließlich durch diese leitende Polymer elektrisch verbunden. Die elektrochemisch getriebene Produktformation der dreidimensional immobilisierten BM3 Enzyme übertraf die zuvor im planaren Solgel System beobachtete Rate. Der gemessene Detektionsstrom von ca. 22 nA legt nahe, dass auf diese Weise mehr als dreimal so viele Enzymmoleküle produktiv reduziert werden können (Abbildung 4.5 C).

4.3 Intramolekularer Elektronenübertragung im P450_{BM3} System

Für die Optimierung des zuvor etablierten elektrochemisch getriebenen, enzymatischen Umsatzes von Anilin zu Aminophenol, ist ein tieferes Verständnis der internen Elektronenübertragung des P450_{BM3} Systems von großem Interesse.

4.3.1 Die Rolle der FAD- und NADPH-bindenden Domänen für die elektrochemische und Nicotinamid-abhängige Reduktion

Für diese Untersuchung wurde ein Enzym nach den Vorgaben von Hazzard *et al.* mit verkürzter Reduktasedomäne (BM3-FMN), ähnlich der aufgelösten Kristallstruktur von P450_{BM3} (PDB 2HPD⁽¹⁰¹⁾) entworfen.⁽³⁶⁾

Das BM3 Genkonstrukt wurde in einer QC mit den Primern 10 und 11 so verändert (STOPP Kodon), dass die Aminosäuresequenz nach der Position 664 endet. Der Reduktase (BMR) fehlen somit die NADPH-Bindestelle sowie die FAD-Domäne. Eine identische mit CNT-tag modifizierte Variante wurde mittels Ü-PCR und den Primern 1 und 12 generiert (BM3_{FMN CNT-tag}).

Beide Genkonstrukte wurden in den Vektor pET-28a(+) kloniert und für die Expression in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Nach der Expression (TB-Kanamycin; 25°C; 180 rpm; 36 h) wurden die Proteine mittels IMAC isoliert. Die gelelektrophoretische Untersuchung des isolierten Enzym zeigte, dass das Enzym in zwei Ausprägungen

vorlag (vergl. SDS-PAGE in Abbildung 4.7; Original nicht gezeigt). Die Elutionsfraktion der IMAC beinhaltete das Zielprotein (BM3_{FMN}) sowie eine verkürzte Proteinvariante. Durch eine Abspaltungsreaktion während der Expression wurde in der Elution ebenfalls die reine Häm-domäne (hBM3) aufgefunden. Die hBM3 wird aufgrund des N-terminalen His₆-tag während der IMAC ebenfalls angereichert. Im Zuge der P450 Konzentrationsbestimmung (CO-Assay) kann nicht zwischen BM3_{FMN} und hBM3 unterschieden werden, sodass eine Bestimmung der aktiven BM3_{FMN} Konzentration in der IMAC nicht möglich ist.

Die Beobachtung von BM3_{FMN} setzt zudem voraus, dass die bestimmten Aktivitäten nicht durch die Anwesenheit von hBM3 verfälscht sein könnten. Der direkte Elektronentransfer von NADPH in Form von Hydridionen auf das Hämeisen ist mangels eines fehlenden Akzeptors im hBM3 ausgeschlossen. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass die *E. coli* eigenen Enzyme Flavodoxin (*ecFld*) und NADPH-Flavodoxin (Ferredoxin) Reduktase (*ecFdR*) P450 Enzyme (z.B. CYP C17) reduzieren können.⁽⁵⁰⁾ Die Arbeit von Fatuzzi *et al.* zeigt, dass hBM3 vom Flavodoxin aus *Desulfovibrio vulgaris* reduziert werden kann.⁽²⁶⁾ Abbildung 7.3 A zeigt, dass bereits geringste Konzentrationen an *ecFdR/ecFld* in der IMAC Elution, hBM3 über einen längeren Zeitraum von 150 min reduzieren können. Diese reduktive Aktivität bewirkt, wie in Abbildung 7.3 B dargestellt, eine basale Hydroxylierungsaktivität von hBM3. Eine Formalkinetik der hBM3 Biotransformation von Fettsäure, mit steigenden Konzentrationen an *ecFdR/ecFld*, belegt eindeutig die Interaktion von hBM3 mit den *E. coli* Enzymen (Abbildung 4.6). Die gezeigte drei Punkte Bestimmung erlaubt lediglich eine qualitative Aussage über die Abhängigkeit der gemessenen hBM3 Aktivität mit den *E. coli* Enzymen.

Diese hBM3/*ecFdR/ecFld*-abhängige Nebenreaktion könnte die Beobachtung der erwarteten BM3_{FMN} Aktivität empfindlich stören. Für eine genaue Betrachtung muss sowohl die Nebenreaktivität, als auch eine Verfälschung der Zielproteinkonzentration ausgeschlossen werden.

Die Verunreinigung mit hBM3 konnte mittels einer Anionenaustausch Chromatographie (AEX) wie in Abbildung 4.7 gezeigt aus der Proteinlösung entfernt werden. Dargestellt ist eine Überlagerung des FPLC Chromatogrammes mit dem SDS-PAGE Gel der aufgefangenen Elutionsfraktionen. Während die erste Fraktion (50 mM

4. ERGEBNISSE

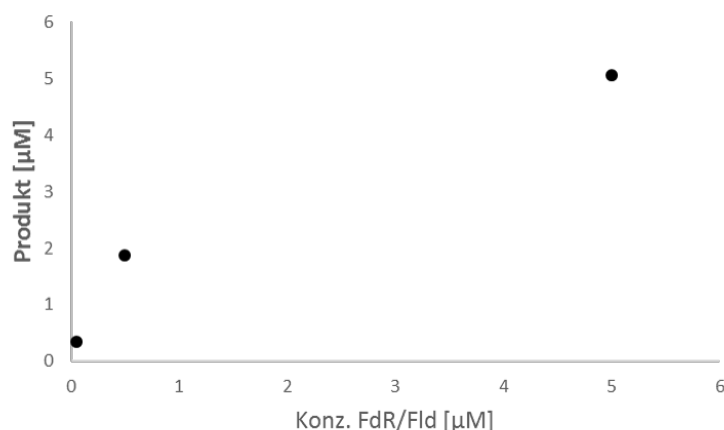


Abbildung 4.6: Nicotinamid-abhängige hBM3-katalysierte Dodekansäure Umsetzung in Abhängigkeit von der *ecFdR/Fld* Konzentration. Zur qualitativen Validierung einer *ecFdR/Fld*-abhängigen Aktivität wurden lediglich 3 Punkte bestimmt.

bis 200 mM NaCl) ausschließlich hBM3 beinhaltet und die zweite Fraktion ein Gemisch beider Proteine darstellt, befindet sich das isolierte Zielprotein der Molekülmasse 74,6 kDa in der dritten Fraktion (250 mM bis 400 mM NaCl). Die vollständige Entfernung von *ecFld* (20 kDa) und *ecFdR* (29 kDa) aus der BM3_{FMN} IMAC Reinigung wurde durch eine Gelfiltration sicher gestellt. Ohne die Verunreinigung durch hBM3 war die standardmäßige Bestimmung der aktiven BM3_{FMN} Konzentration, mittels CO-Assay wieder problemlos möglich.

Die NADPH-abhängige Aktivität der verkürzten Reduktase wurde mittels Cytochrom C (CytC) Assays⁽¹³⁶⁾, wie in Tabelle 4.6 gezeigt, auf $k_{\text{cat}} = 0,560 \text{ min}^{-1}$ bestimmt und lag somit deutlich (rel. Aktivität = 0,232 %) unter der Aktivität des wildtypischen Enzyms (241 min^{-1}). Die CytC Reduktion nach Zugabe von NADH als Reduktionsäquivalent wurde mit $0,169 \text{ min}^{-1}$ gemessen und liegt mit 30,2 %, verglichen mit der NADPH-abhängigen Aktivität, höher als beim wt BM3 (NADPH: 241 min^{-1} vs. NADH: $11,5 \text{ min}^{-1}$).

Die GC-FID Analyse einer $50 \mu\text{M}$ BM3_{FMN} -katalysierten Biotransformation mit Dodekansäure ergab eine Konzentration von $818 \mu\text{M}$ formiertes Produkt nach 150 min. Aus der Formation innerhalb der beschriebenen Reaktionsdauer ergibt sich eine theoretische Aktivität von $k_{\text{cat}} = 0,109 \text{ min}^{-1}$. Dies entspricht einer relativen Aktivität von

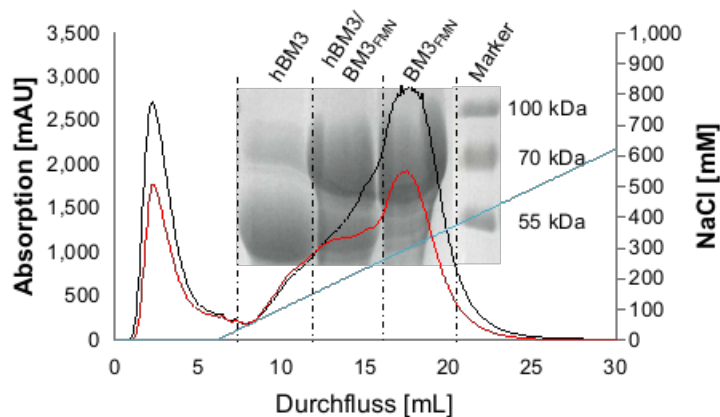


Abbildung 4.7: Kombinierte Darstellung des FPLC-AEX Chromatogrammes und des SDS-PAGE Gels der gesammelten Fraktionen. Die Absorption des Gesamtproteins (280 nm; schwarz) und des Hämeeisens (418 nm; Rot) sind auf der linken vertikalen Achse, die Konzentration des Elutionsmittels Natriumchlorid (Blau) ist auf der rechten vertikale Achse aufgetragen.

0,24 % verglichen mit der gemessenen $P450_{BM3}$ Aktivität von $k_{cat} = 45 \text{ min}^{-1}$.

4.3.2 Elektrochemische Charakterisierung der $BM3_{FMN+CNT-tag}$ Variante

Um die elektrochemisch getriebene Fettsäurehydroxylierung der $BM3_{FMN+CNT-tag}$ Variante bewerten zu können, wurde das Enzym mit den CNT-tag modifizierte Varianten $BM3_{CNT-tag}$ und $hBM3_{CNT-tag}$ verglichen. Ausgehend vom $P450_{BM3}$ Genkonstrukt wurde mit den Primern 1 und 7 eine CNT-tag modifizierte Variante $BM3_{CNT-tag}$ erstellt, in pET-28a(+) kloniert und in BL21(DE) Zellen transformiert. Nach der Expression (TB Medium, 25°C, 180 rpm für 36 h) wurde das $BM3_{CNT-tag}$ mittels IMAC isoliert.

Die elektrochemisch getriebene Fettsäurehydroxylierung der CNT-tag modifizierten Varianten $BM3_{FMN+CNT-tag}$, $BM3_{CNT-tag}$ und $hBM3_{CNT-tag}$ wurde nach 6-stündiger Inkubation (20 μM Enzym; RT; MWCNT Elektrode bei $E = -700 \text{ mV}$) extrahiert und mit Hilfe der GC-FID analysiert (Abbildung 4.8; GC-1). Aufgrund der geringen Stoffmenge

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4.6: Vergleich der Reduktase- und der P450 Aktivitäten (k_{cat}) des wildtypischen BM3 und des BM3_{FMN} unter Verwendung unterschiedlicher Nicotinamide. Die Reduktase Aktivität wurde anhand des Cytochrome C Umsatzes (CytC), die P450 Aktivität anhand des Dodekansäure Umsatzes bestimmt (FS). In Klammern sind die mittels NADH erreichten relativen Aktivitäten (vergl. mit NADPH) angegeben.

Nicotinamid	Test	BM3 _{FMN} (min ⁻¹)	P450 _{BM3} (min ⁻¹)
NADPH	CytC	0,560	241
	FS	0,109*	45
NADH	CytC	0,169 (30,2 %)	11,5 (4,8 %)
	FS	0,04* (36,7 %)	16 (35,6 %)

an reduzierbarem Enzym auf der Elektrodenoberfläche, war von geringen Produktkonzentrationen nahe am Detektionslimit der FID Analytik auszugehen, weshalb während der Extraktion der Reaktionsansätze auf einen internen Standard (Dekansäure; 1 mM) verzichtet wurde. Die qualitative Analyse der Produktformation belegte eine vergleichbare von BM3_{FMN+CNT-tag} und BM3_{CNT-tag} katalysierte und elektrochemisch getriebene Aktivität. Die elektrochemisch, enzymatische Produktformation der Negativkontrolle (hBM3_{CNT-tag}) liegt deutlich darunter.

4.3.3 Intramolekularer Elektronentransfer (FMN → Hämeisen)

In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2014 betrachten Verma, Schwaneberg und Roccatano die Elektronenübertragung (FMN→Häm) im P450_{BM3} System, unter Beteiligung verschiedener Aminosäuren (*in silico*).⁽¹³⁵⁾ Die Autoren beschreiben sieben theoretische Elektronentransferwege (ETW) vom FMN zum Hämeisen.

Mit einem Alaninscan wurden die drei theoretisch effektivsten Elektronentransferwege (ETW1: F390/K391/P392; ETW2: M490/F393 und ETW3: M490/Q403) experimentell überprüft. Als Modell Proteinvarianten (MPV) zur Erstellung der Biobibliotheken dienten die drei besten Anilin hydroxylierenden CNT-tag Varianten BM3 LFVF (1), BM3 328V (2) und BM3 328VA (3). Die Bibliothek wurden mit Hilfe einer QC

4. ERGEBNISSE

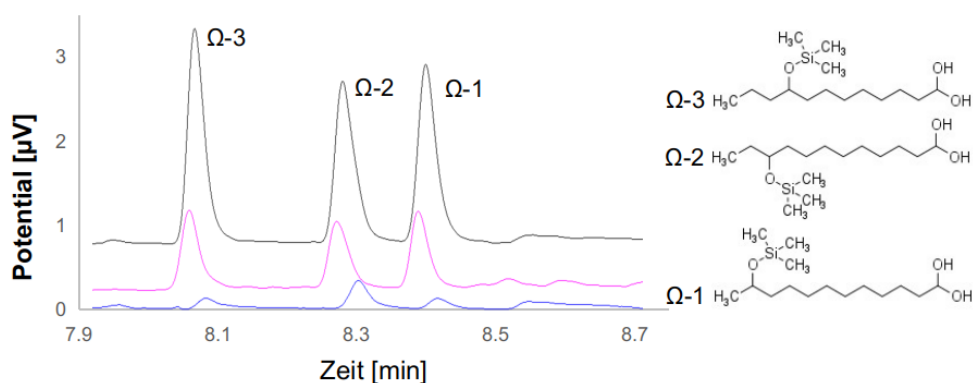


Abbildung 4.8: GC-FID Chromatogramm (GC-1) der elektrochemisch getriebenen Dodekansäure Hydroxylierung durch BM3_{FMN} (schwarz), P450_{BM3} (lila) und hBM3 (blau). Jeweils 20 µM Enzym in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 3000 U mL⁻¹ Katalase und 1,5 µM Laurinsäure. Die MWCNT Elektrode wurde für 6 Stunden auf E = -700 mV polarisiert. Nebenstehend sind die drei mit Trimethyl-Silan derivatisierten OHFA Produkte der Reaktion gezeigt.

und den Primern aus Tabelle 3.5 auf Grundlage der MPVs generiert. Alle QC Produkte wurden in pET-28a(+) kloniert und in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Die erfolgreich exprimierten (TB-Kanamycin; 25°C; 180 rpm; 36h) und mittels IMAC isolierten Elektronentransferweg Mutanten sind in Tabelle 4.7 gelistet.

Um die NADPH-abhängigen Aktivitäten und zugehörigen Couplingraten (%) der Mutanten in einen Kontext stellen zu können, wurden zunächst die Couplingraten der Varianten (1), (2) und (3) bestimmt und mit dem wildtypischen Enzym verglichen. Dazu jeweils eine 15-minütige Reaktion angesetzt und Proben nach 1 min, 5 min und 15 min Reaktionszeit analysiert. Die Modell Proteinvarianten konnten Anilin deutlich schneller umsetzen als das wildtypische P450_{BM3} (Abbildung 4.9; rechts in Blau). Gleichzeitig stiegen die NADPH Verbrauchswerte von (1) [7,83 min⁻¹], (2) [4,26 min⁻¹] und (3) [4,23 min⁻¹] proportional mit der Aktivität. Die Couplingraten der MPVs waren auf vergleichbarem Niveau mit dem wildtypischen Enzym (Abbildung 4.9; links in Rot).

Alle Mutanten wurden mittels HPLC-DAD Analyse auf ihre Aktivität und in einer unabhängigen Biotransformation photometrisch auf ihre NADPH Verbrauchswerte

4. ERGEBNISSE

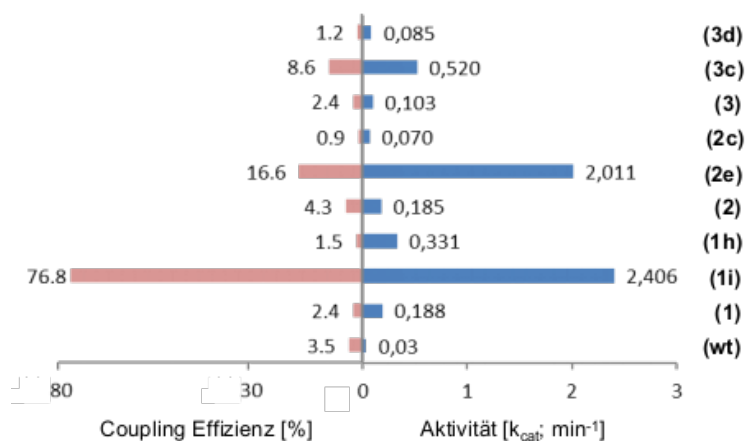


Abbildung 4.9: Coupling Effizienz und Aktivität der Modell Proteinvarianten und ausgesuchter Elektronentransferweg Mutanten. Die Abbildung ist mit freundlicher Erlaubnis von Bioelectrochemistry der Veröffentlichung von Darimont *et al.* 2017 entnommen.⁽¹⁴⁾

untersucht. Aus diesen Ergebnissen wurden die zugehörigen Couplingraten bestimmt. Die Werte aller Mutanten sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Im Detail werden hier die Mutanten P450_{BM3} LFVF 393A/490A (**1i**), P450_{BM3} 328V 390A/392A (**2e**) und P450_{BM3} 328VA 392A (**3c**) mit dem stärksten, sowie die Mutanten P450_{BM3} LFVF 393A (**1h**), P450_{BM3} 328V 392A (**2c**) und P450_{BM3} 328VA 390A/391A (**3d**) mit dem geringsten Effekt auf die Aktivität und die Couplingrate innerhalb der jeweiligen Bibliothek in Abbildung 4.9 erläutert. Die erhöhten NADPH-abhängigen Aktivitäten der Mutanten (**1i**), (**2e**) und (**3c**) gingen mit ebenfalls stark erhöhten Couplingraten einher. Die Mutationen der Varianten (**1h**), (**2c**) und (**3d**) zeigten nur einen geringen Effekt auf die Nikotinamid-abhängige Aktivität und die zugehörigen Couplingraten des Enzyms. Mit Ausnahme von Mutante (**1h**) korreliert die Änderung der Aktivität mit der Couplingrate. Aus den vorliegenden Ergebnissen ist allerdings keine eindeutige Signifikanz eines Elektronentransferwegs für die Elektronenweitergabe zu erkennen. Dies trifft sowohl auf den Vergleich zwischen den Elektronentransferwegen einer Bibliothek, als auch auf den Vergleich eines bestimmten Elektronentransferwegs in unterschiedlichen Bibliotheken zu.

4.3.4 Bestimmung der reduzierbaren Enzymstoffmenge

Für eine Bestimmung der elektrochemisch, enzymatischen Aktivitäten (k_{cat} ; min^{-1}) muss die an der Elektrodenoberfläche befindliche, reduzierbare Stoffmenge an P450 Enzym bekannt sein. Zur Bestimmung der reduzierbaren Stoffmenge, bei gegebener Enzymkonzentration in Lösung, wurde eine zyklische Voltammetrie (CV) mit einer mehrwandigen Kohlenstoff Nanoröhren (MWCNT) Elektrode, unter Ausschluss von Sauerstoff, durchgeführt. In einem Vorversuch wurde die für dieses Enzym passende Scanrate (ν) ermittelt (Abbildung 4.10). Dazu wurden mehrere Voltammogramme mit steigender Scanrate aufgezeichnet. Das Verhältnis des kathodischen Peak Stroms (I_{pk}) zur Scanrate (Abbildung 4.10; orangene Kurve) blieb während des gesamten Versuches linear, sodass für den folgenden Versuch eine Scanrate von $1,5 \text{ V s}^{-1}$ gewählt wurde.

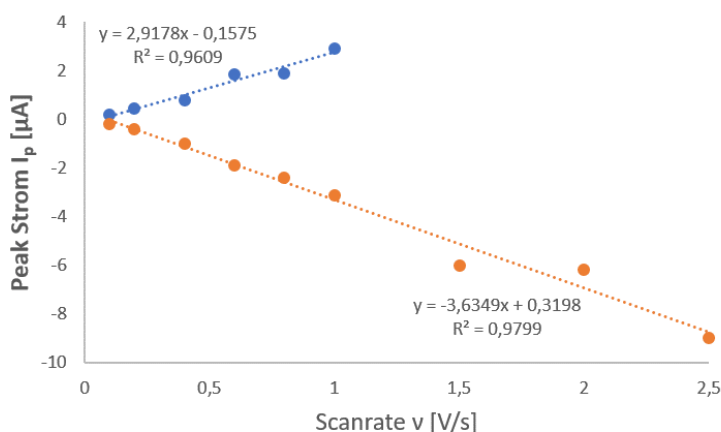


Abbildung 4.10: Schaubild zum linearen Zusammenhang des Peak Strom und der Scanrate. Gezeigt sind sowohl der kathodische (orange) als auch der anodische (blau) Strom.

Während der quantifizierenden CV wurde die Enzymkonzentration schrittweise erhöht und jeweils die reduzierbare Stoffmenge (N) gemäß der Gleichung 4.2 bestimmt.

$$N = \frac{\int_a^b I(V)dV}{\nu nF} \quad (4.2)$$

4. ERGEBNISSE

Es wurde nachgewiesen, dass die reduzierbare Stoffmenge auf der Elektrodenoberfläche mit steigender Konzentration linear ansteigt und ab einer Konzentration von ca. $2 \mu\text{M}$ in Lösung zunehmend eine Sättigung erreicht (Abbildung 4.11). Bei einer Konzentration zwischen $7,7 \mu\text{M}$ und $12,3 \mu\text{M}$ stellt sich eine Sättigung der Oberflächen-gebundenen Stoffmenge ein. Dieser Verlauf konnte in mehreren unabhängigen Versuchen zuverlässig reproduziert werden. Daher wurde im Folgenden standardmäßig mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ P450_{BM3} gearbeitet.

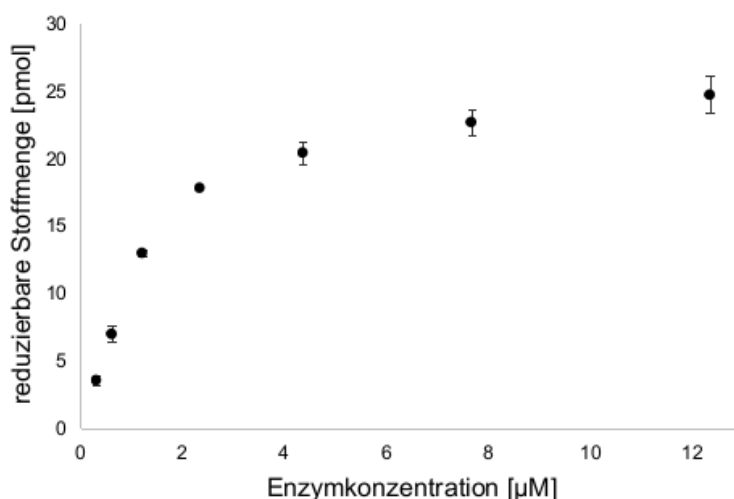


Abbildung 4.11: Bestimmung der Oberflächen-gebundenen Stoffmenge BM3, in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration in Lösung (dreifach Bestimmung mit Standardabweichungen). Der angegebene Wert wurde bereits von Darimont *et al.* 2017 veröffentlicht.⁽¹⁴⁾

4.3.5 Bestimmung der Mittelpunktspotentiale E_0

Für die P450_{BM3} Variante BM3 LFVF wurde aus den zuvor aufgezeichneten CVs mit steigender Enzymkonzentration das Mittelpunkt Potential des Hämeisens und der Flavine bestimmt (Abbildung 4.12). Deutlich sichtbar verschiebt sich das Mittelpunktpotential mit steigender Konzentration zu höheren Spannungswerten.

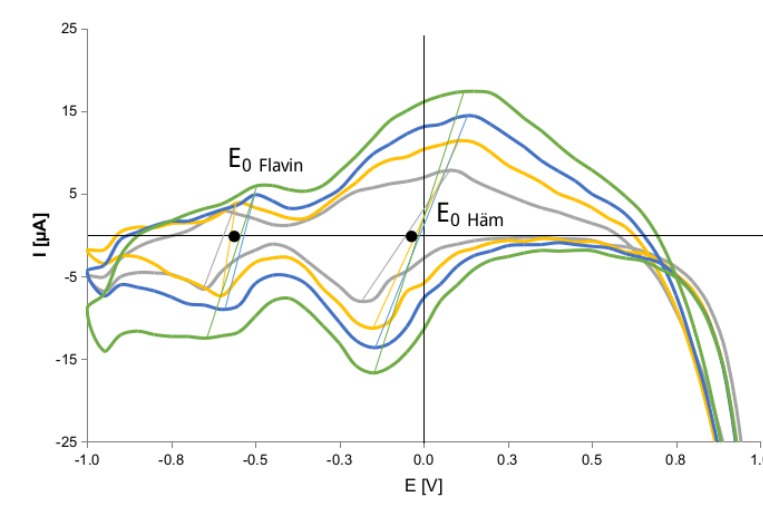


Abbildung 4.12: Bestimmung der Mittelpunktspotentiale $E_{0\text{ Häm}}$ und $E_{0\text{ Flavin}}$ aus den CVs einer BM3 Konzentrationsreihe (Grau: $1,22\ \mu\text{M}$, Gelb: $2,34\ \mu\text{M}$, Blau: $4,36\ \mu\text{M}$ und Grün: $7,66\ \mu\text{M}$; dreifach Bestimmung).

Die bestimmten Werte aller Enzymkonzentrationen wurden gemittelt, sodass sich ein Mittelpunktspotential von $E_{0\text{ Häm}} = -44 \pm 24\ \text{mV}$ für das Hämeisen, sowie ein Mittelpunktspotential von $E_{0\text{ Flavin}} = -584 \pm 38\ \text{mV}$ ergab.

4.3.6 Bestimmung der Ratenkonstante des Elektronentransfers

Exemplarisch wurde die allgemeingültige Ratenkonstante (k_{ET}) des Elektronentransfers, der Mutante (**3a**) sowie deren zugehörige Modell Proteinvariante (**3**), nach Laviron bestimmt.⁽⁶⁵⁾ Für jedes Enzym wurden CVs mit steigenden Scanraten aufgezeichnet und die Scanraten-abhängigen Peak Potentiale ($E_p(v)$) in Abbildung 4.13 gegen die logarithmierte Scanrate aufgetragen.

Aus den Steigungen der kathodischen (m_k) und anodischen (m_a) Kurven wurden die Transfer Koeffizienten (α ; kathodisch), sowie ($1 - \alpha$; anodisch) mittels Auflösung der Gleichungen 4.3 und 4.4 errechnet:

$$m_k = \frac{-2,3RT}{\alpha nF} \quad (4.3)$$

4. ERGEBNISSE

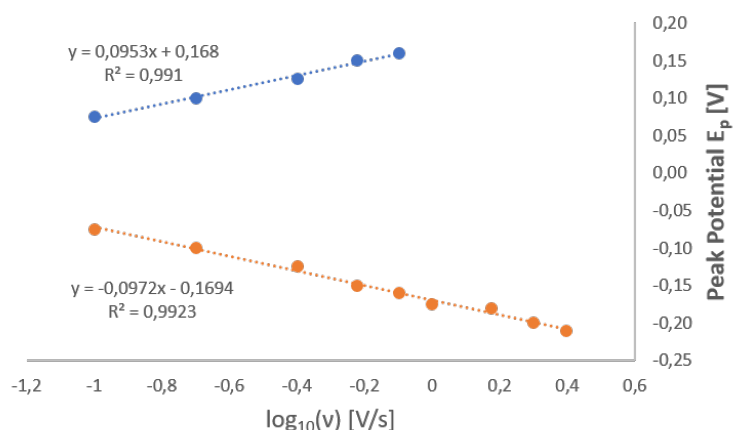


Abbildung 4.13: Graph des Peakpotentials über der Scanrate. Kathodische (orange) und anodische Halbreaktion (blau).

$$m_a = \frac{2,3RT}{(1 - \alpha)nF} \quad (4.4)$$

Die Schnittpunkte der Kurven mit der x-Achse erlauben die Bestimmung der kathodischen und anodischen Scanraten (v_k) und (v_a) bei den theoretischen Mittelpunkt Potentialen E_{0k} und E_{0a} . Unter Verwendung der ermittelten Werte für die Scanrate sowie der Transferkoeffizienten wurde k_{ET} mit Hilfe der Gleichung 4.5 bestimmt:

$$k_{ET} = \frac{\alpha n F v_k}{RT} = (1 - \alpha) \frac{n F v_a}{RT} \quad (4.5)$$

Im Zuge dieser Rechnung wurde ein k_{ET} Wert von $0,42 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ für **(3)** und einen Wert von $0,006 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$ für **(3a)** bestimmt.⁽¹⁴⁾ Der Aminosäureaustausch einer einzelnen Position konnte die unabhängige Ratenkonstante des Elektronentransfers um drei Größenordnungen verringern.

4.3.7 Elektrochemische Bestimmung der elektrochemisch getriebenen Aktivitäten

Die bereits vorgestellten Elektronentransferweg Bibliotheken wurden auf ihre elektrochemisch getriebene Aktivität untersucht. Für eine direkte Vergleichbarkeit der Messungen unter identischen Reaktionsbedingungen (3000 U mL⁻¹ Katalase und 10 μM P450 Enzym) wurden die zuvor am NMI getesteten MPVs (1), (2) und (3) erneut vermessen. Unter Berücksichtigung der CV-gestützten Quantifizierung wird von einer elektrodenständigen P450 Stoffmenge von 23,7 pmol für die Aktivitätsbestimmung ausgegangen. Im Gegensatz zu den deutlich gesteigerten NADPH-abhängigen Aktivitäten einzelner Mutanten, führte der Aminosäureaustausch zu Alanin, unabhängig von der Position, zu einem beinahe vollständigen Verlust der Aktivität (Tabelle 4.7). Die Mutante (3a) zeigte die höchste elektrochemisch getriebene Aktivität von $k_{\text{cat}} = 0,017 \text{ min}^{-1}$ (17 %) verglichen mit der zugehörigen MPV (3; $0,081 \text{ min}^{-1}$).

4.3.8 Ausschluss der Wasserstoffperoxid getriebenen Peroxygenaseaktivität

Viele CYPs u.a. auch P450_{BM3} zeigen eine Wasserstoffperoxid abhängige Peroxygenase Aktivität.⁽⁴⁴⁾ Wasserstoffperoxid kann im aktiven Zentrum des Enzyms binden und ohne vorherige Reduktion des Hämeisens zur Produktformation beitragen. Diese Aktivität ist sehr ineffizient, kann allerdings zu falsch positiven Ergebnissen während der elektrochemischen, produktiven Hämeisen Reduktion führen.

Für die Untersuchung wurde die nicht mittels NADPH reduzierbare Hämdomäne von P450_{BM3} (hBM3) gewählt. Zu einer hBM3 katalysierten Dodekansäure Biotransformation wurde schrittweise alle 15 min Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zugegeben (Abbildung 4.14). Die Konzentration wurde mit jeder Zugabe verdoppelt (31,25 μM, 62,5 μM, 125 μM, 250 μM, 500 μM und 1000 μM). Diese Vorgehensweise wurde aufgrund des toxischen Charakters des H₂O₂ gegenüber dem Enzym gewählt. Vor jeder H₂O₂ Zugabe wurde eine Probe entnommen und die Produktkonzentration mittels GC-FID gestützter

4. ERGEBNISSE

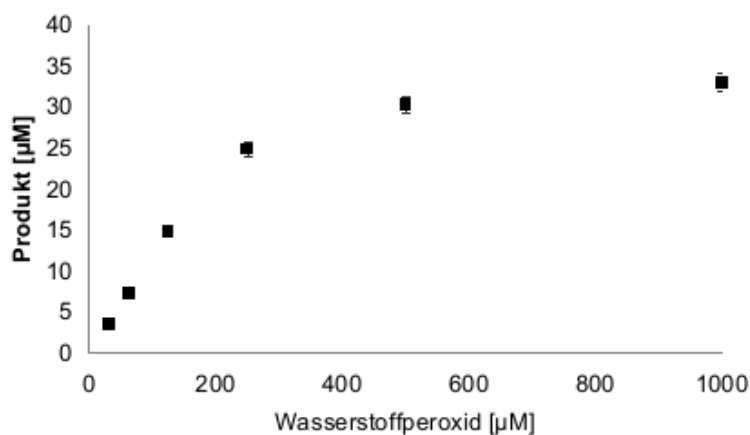


Abbildung 4.14: Wasserstoffperoxid-abhängige und hBM3-katalysierte Produktformation. Zu einer Biotransformation von Dodekansäure wurde schrittweise H_2O_2 titriert (dreifach Bestimmung mit Standardabweichungen). Vor jeder H_2O_2 Zugabe wurde eine Probe zur GC-FID gestützten Analyse entnommen.

Analyse (GC-1) bestimmt. Innerhalb der ersten vier Titrationsschritte (60 min) erreichte die enzymatische Aktivität eine konstante Umsatzrate von $k_{\text{cat}} = 0,005 \text{ min}^{-1}$. Mit steigender Konzentration wird das Enzym inaktiviert und die Produktformation nimmt deutlich ab. Vergleicht man die erreichte Peroxygenase Aktivität des hBM3 mit der NADPH abhängigen Aktivität des wt BM3 (45 min^{-1} ; vgl. Tabelle 4.5) erreichte diese $\approx 0,01 \%$. Durch Zugabe von Katalase 3000 U mL^{-1} konnte die Peroxygenaseaktivität von hBM3 vollständig unterdrückt werden.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4.7: NADPH-abhängige Aktivitäten und Coupling Effizienzen, sowie elektrochemisch getriebene Aktivitäten aller Elektronentransferweg Mutanten auf Basis der Modell Proteinvarianten P450_{BM3} LFVF (R47L/Y51F/F87V/A328F), P450_{BM3} 328V (A328V) und P450_{BM3} VA (A328V/L437A). Die angegebenen Aktivitäten wurden bereits von Darimont *at al.* 2017 veröffentlicht.⁽¹⁴⁾ Alle elektrochemischen Messungen wurden lediglich als Duplikate durchgeführt.

Mutante	Index	Modell Proteinvariante (MPV)		
		NADPH-abhängige Aktivität (k_{cat}) ^a ; Couplingeffizienz (%) ^b ; elektrochemisch getriebene Aktivität (k_{cat}) ^c		
		BM3 LFVF (1)	BM3 328V (2)	BM3 VA (3)
MPV	-	0,188 ^a ; 2,4 ^b ; 0,105 ^c	0,185 ^a ; 4,3 ^b ; 0,117 ^c	0,103 ^a ; 2,4 ^b ; 0,081 ^c
390A	(a)	0,680; 3,4; 0,005	n.e.	0,165; 3,3; 0,014
391A	(b)	0,925; 8,9; -	0,189; 9,1; 0,005	0,147; 5,5; 0,007
392A	(c)	n.e.	0,070; 0,9; 0,004	0,520; 8,6; -
390A/391A	(d)	0,602; 2,8; 0,016	n.e.	0,085; 1,2; 0,007
390A/392A	(e)	0,892; 4,5; 0,017	2,011; 16,6; -	n.e.
391A/392A	(f)	n.e.	0,344; 6,2; 0,008	n.e.
390A/391A/392A	(g)	0,640; 5,6; -	0,317; 4,4; 0,005	0,125; 0,9; 0,005
393A	(h)	0,331; 1,5; 0,007	0,272; 1,5; 0,001	n.e.
393A/490A	(i)	2,406; 76,8; 0,002	0,181; 0,2; 0,012	n.e.
403A	(j)	0,509; 6,4; 0,0098	0,199; 1,6; -	0,271; 6,2; 0,06
403A/490A	(k)	1,040; 10,3; 0,012	0,212; 3,4; -	n.e.
490A	(l)	0,625; 0,4; 0,003	0,095; 1,5; 0,006	0,125; 1,8; 0,13

n.e.: nicht exprimiert

- : keine Aktivität

4. ERGEBNISSE

5

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine elektrochemisch getriebene Cytochrome P450 Monooxygenase (CYP) zur Anwendung auf einer Kohlenstoffnanoröhren (CNT) basierten Elektrode entwickelt. Etabliert und charakterisiert wurde dieses P450 mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Siebdruck CNT Elektrode der Firma DropSens. Im Folgenden wurde dieses elektrochemisch getriebene Cytochrome P450 zur Entwicklung einer neuen dreidimensionalen CNT-Solgel-Elektrode am kooperierenden Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) verwendet. Dieses neuartige dreidimensionale System soll die bisherige Limitation einer begrenzten Oberflächenkonzentration des elektroaktiven Enzyms überwinden.

Die nachfolgenden Faktoren müssen für eine erfolgreiche Umsetzung realisiert werden: A) für eine gezielte Einspeisung von Elektronen in das P450 System, muss sich das Enzym selbständig und orientiert an die Elektrodenoberfläche anlagern, B) die Aktivität eines potentiell elektrochemisch getriebenen Enzyms muss während der Reaktion und innerhalb des Reaktionsraumes einer Elektrozelle, *in situ* gemessen werden können und C) die Enzyme sollten für das Screening ganzer Mutantenbibliotheken, idealerweise ohne weitere Reinigung oder Modifikation verwendet werden können. Eine weiterführende Optimierung einer solchen Applikation setzt das tiefere Verständnis des intramolekularen Elektronentransfers voraus. Deshalb sollte ausgehend von theoretischen *in silico* Untersuchungen eine experimentelle Überprüfung der vorgeschlagenen Elektronentransferwege und deren Einfluss auf das Coupling Verhalten und die enzymatische Aktivität untersucht werden. Auch in diesem Ansatz sollten die Nicotinamid abhängige

5. DISKUSSION

und die elektrochemisch getriebene Hämeisen Reduktion miteinander verglichen werden.

5.1 Etablierung einer elektrochemisch getriebenen Cytochrome P450 Monooxygenase

5.1.1 Die Wahl des Enzyms

Die Monooxygenase CYP 102A1 (P450_{BM3}) aus *Bacillus megaterium* katalysiert vorrangig die Hydroxylierung von mittel- bis langkettigen Fettsäuren an den Positionen $\omega - 1$, $\omega - 2$ und $\omega - 3$ (Abbildung 5.1).⁽¹⁴³⁾

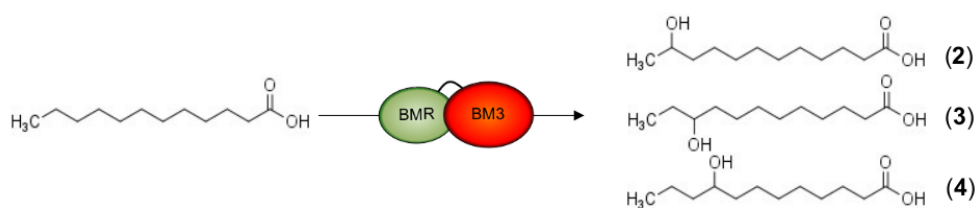


Abbildung 5.1: Schema der von P450_{BM3} katalysierten, subterminalen Hydroxylierung am Beispiel der Dodekansäure.

Zuvor wurde bereits das industrielle Interesse an hydroxylierten Verbindungen als Ausgangsstoffe für die Synthese verschiedener Produkte und speziell an Hydroxy-Fettsäuren (OHFA) erläutert. Die von P450_{BM3} katalysierte subterminale Hydroxylierung ist keine industriell relevante Reaktion, dennoch soll im Folgenden dargelegt werden warum P450_{BM3} das ideale Enzym zur Etablierung einer elektrochemisch getriebenen P450 Applikation darstellt.

Die bisherige Forschungen zur elektrochemischen Reduktion des P450 Hämeisens konnte eindeutig belegen, dass unter Verwendung einer geeigneten Immobilisationsmethode, polarisierte Elektroden als technische Elektronenquelle eingesetzt werden können. In voltammetrischen Versuchen können immobilisierte P450 Enzyme reversibel reduziert und elektrochemisch charakterisiert werden.^(4, 29, 121) Diese Reduktion

resultiert jedoch nicht zwangsläufig im Umsatz von Substrat, sondern führt häufig zur Reduktion von molekularem Sauerstoff (O_2) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese Nebenreaktion ist in der Literatur als Uncoupling bekannt. Uncoupling tritt sowohl bei der Nicotinamid-abhängigen als auch der elektrochemischen Hämeisen Reduktion, vor allem beim Umsatz von nicht nativen Substraten, sowie der Interaktion nicht natürlicher Reduktionspartner auf (Reduktase \rightarrow P450).

Wie zuvor beschrieben, kommen unterschiedliche CYP Elektronentransportketten in der Natur vor (vgl. Abbildung 1.3). Meistens besteht diese Elektronentransportkette aus zwei bis drei interagierenden Enzymen (Reduktase-Ferredoxin/Flavodoxin-CYP). Im Gegensatz dazu ist P450_{BM3} ein natürliches Fusionskonstrukt dieser Reaktionspartner, welches die von NADPH bezogenen Elektronen während des Umsatzes von Dodekansäure (**1**) mit einer 96 %-igen Effizienz nutzen kann.⁽¹⁴³⁾ Bereits zuvor wurde von Sadeghi *et al.* gezeigt dass die elektrochemisch getriebene Produktformation durch Verwendung von artifiziellen Fusionskonstrukten deutlich gesteigert werden kann.^(19, 27) In einer späteren Arbeit postulierten Sadeghi *et al.* eine negative Korrelation der Ratekonstante des Elektronentransfers (k_{ET}) und der zur Produktformation beitragenden (produktiven), elektrochemischen Hämeisenreduktion.⁽¹⁰⁶⁾ Die dieser Hypothese zugrunde liegenden Daten sind in Abbildung 5.2 zusammengefasst.

Weitere Vorteile der Verwendung von P450_{BM3} ist die Löslichkeit, die eine problemlose Isolierung des Enzyms aus dem Lysat ermöglicht.⁽⁸⁷⁾ Das Enzym kann heterolog in *Escherichia coli* in hohen Konzentrationen exprimiert werden und bleibt auch *in vitro* lange Zeit stabil.

Zusammenfassend bietet BM3 die Vorteile einer bestens charakterisierten Monooxygenase, welche als natürliches Fusionskonstrukt sehr gute Elektronentransfereigenschaften aufweist und deren Reduktasedomäne, aufgrund ihrer Struktur mit diversen tierischen CYPs in artifiziellen Fusionskonstrukten kombiniert werden kann.^(29, 143)

5.1.2 Die Wahl des Ankermoleküls

Für eine effektive Elektronenübertragung von der Elektrode zum katalytischen Hämeisen muss BM3 in unmittelbarer Nähe der Elektrodenoberfläche elektroaktiv koordiniert

5. DISKUSSION

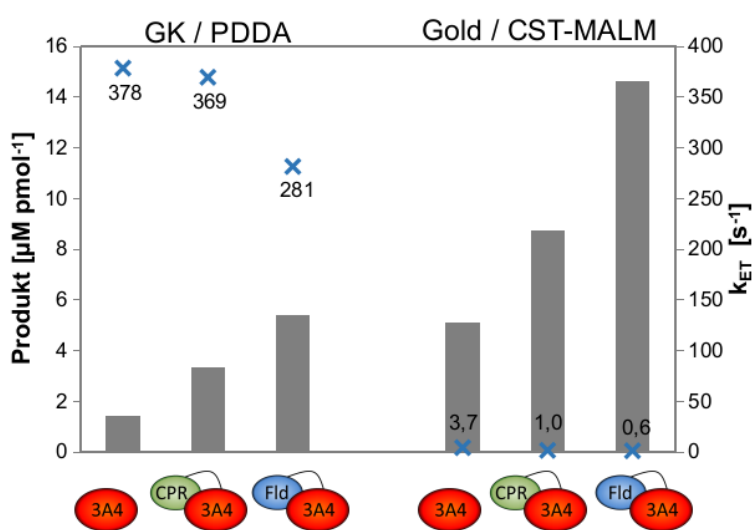


Abbildung 5.2: Kombinierte Darstellung der Produktformation (Balken) und der Ratenkonstanten des Elektronentransfers (Kreuz) verschiedener CYP Konstrukte (unten) auf jeweils einer Glaskohlenstoff- (GK) und einer Goldelektrode. Mit sinkender Ratenkonstante k_{ET} steigt die Produktformation der Enzyme. Diese negative Korrelation zeigt sich sowohl im Vergleich der Enzymkonstrukte als auch in der Gegenüberstellung der beiden Elektrodenmaterialien. Die Abbildung fasst die Daten aus der Arbeit von Sadeghi *et al.* aus dem Jahr 2010 zusammen.⁽¹⁰⁶⁾

und idealerweise immobilisiert werden. Es wurden zwei grundsätzlich verschiedene Modifikationen mit einem Anker-molekül zur elektroaktiven Bindung des Enzyms getestet.

Das ideale Anker-molekül weist eine hohe Affinität, sowie Spezifität für die gewählte Elektrodenoberfläche auf und kann ohne Beeinträchtigung der Enzymaktivität in das System eingeführt werden. Für eine selbständige Anlagerung des P450 Enzyms an eine CNT Elektrode wurden zwei unterschiedliche Ansätze getestet. Zum einen die bereits zuvor etablierte Konjugation des Enzyms mit einem Pyren Molekül, zum anderen eine neue gentechnische Modifikation mit einer C-terminal befindlichen, artifiziellen CNT-bindenden Peptidsequenz (CNT-tag).

Chemische Modifikation mit einem Pyren Molekül

In einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2004 beschreiben Udit *et al.* die thiol-spezifische Konjugation eines N-(1-Pyren)Iodoacetamid unter Abspaltung von Iodwasserstoff (Abbildung 5.3 A) an einen exponierten, gentechnisch eingebrachten Cysteinreste der P450_{BM3} Hämdomäne (hBM3) an der Position N381C.⁽¹³²⁾ Der Pyrenrest erlaubte die Anlagerung des Pyren-Enzym Komplexes an eine Graphitoberfläche.

Diese nicht kovalente Bindung ermöglicht durch Überlagerung der π Orbitale (π -stacking), sowohl eine selbständige als auch elektrisch leitfähige Anlagerung des Enzyms an eine Graphit-oberfläche.⁽⁵⁵⁾ Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine hervorragende elektrische Anbindung des Enzyms nachgewiesen werden, welche in der bisher höchsten für BM3 bestimmten Ratenkonstante der Elektronenübertragung resultierte. Das Pyren ist somit in der Theorie bestens als Anker-molekül geeignet. Die ähnliche hexagonalen Oberflächenstruktur des Graphits (planar) und der CNTs (gewölbt), legt die erfolgreiche Übertragung der Selbstassemblierung von Pyren modifizierten Enzymen auf CNTs nahe.

Zunächst wurde hBM3 an den Positionen Q387 (hBM3_{387C}) und am C-terminalen Ende (hBM3_{term.C}) mit einem Cystein modifiziert, kloniert und exprimiert. Für die C-terminale Modifikation wurde eine Glycin-Glycin-Serin-Cystein (GGSC) Sequenz gewählt. Durch den zusätzlichen Linker (GGS) sollte eine verbesserte Zugänglichkeit des

5. DISKUSSION

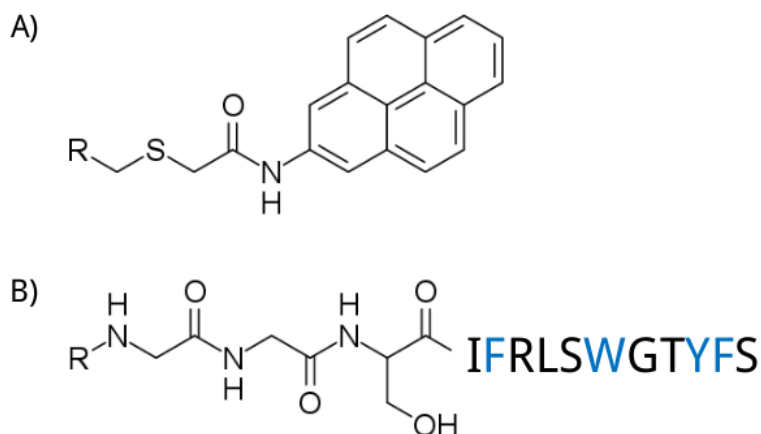


Abbildung 5.3: Übersicht über die verwendeten Anker-moleküle. A) Pyren B) CNT- bindendes Peptid (CNT-tag). In beiden Fällen steht R für das Enzymmolekül. Die Sequenz des CNT-tag nach der GGS Sequenz ist zur besseren Übersicht in Buchstaben angegeben. Aromatische Aminosäuren sind in blau gekennzeichnet. Beide Anker-moleküle vermitteln die Bindung mittels Überlappung der π Orbitale (π -stacking) der aromatischen Reste und der CNT Oberfläche.

Cysteinrestes und eine erhöhte Flexibilität des später konjugierten Pyrens gewährleistet werden. Nach der Konjugationsreaktion mit N-(1-Pyren)Iodoacetamid wurde eine exemplarische Probe eines Pyren modifizierten Enzyms ($\text{hBM3}_{\text{term.C}}+\text{Py}$) in der Core Facility der Universität Hohenheim massenspektrometrisch untersucht und die thiol-spezifische Pyren Konjugation verifiziert (Abbildung 7.2). Parallel wurde mittels photometrischer Messung der CO Differenzspektren und der Pyren Absorption die Konzentration an aktivem Enzym vor und nach der Konjugationsreaktion, sowie die Konzentration an gebundenem Pyren ermittelt.

Die Konjugationsreaktion ging mit einer Inaktivierung von bis zu 28 % der eingesetzten Enzymkonzentration einher. Die massenspektrometrische Untersuchung belegte eine zusätzliche Konjugation mit einem Pyren, am Hämeisen koordinierenden Cystein an Position 400 (C400). Diese resultiert in einer vollständigen und irreversiblen Inaktivierung des Enzyms.⁽¹⁴⁸⁾ Die tatsächliche Konzentration an aktivem und gleichzeitig erfolgreich konjugiertem Enzym ($\text{N}_{\text{P450+Py}}$) konnte daher lediglich anhand der photometrischen Messungen geschätzt werden.

Um diese Inaktivierung zu vermeiden, wurde in weiteren Reaktionen auf eine Re-

duktion des Enzyms mittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (Reduktion von Thiolbrücken) zur erleichterten Konjugation verzichtet. Durch diese Massnahme konnte die Inaktivierung des Enzyms während der Konjugationsreaktion nicht entscheidend verringert werden und eine genaue Konzentrationsbestimmung war weiterhin nicht möglich.

Gentechnische Modifikation mit einem CNT bindenden Peptid

Alternativ wurde ein molekularbiologischer Ansatz zur Modifikation des BM3 mit einem CNT-affinen Peptid verfolgt (Abbildung 5.3 B). Das vollständige Genkonstrukt von BM3 wurde mittels einer Überhang-PCR am 3' Ende des kodierenden Stranges mit einer zusätzlichen Sequenz verlängert. Die neu eingebrachte DNA Sequenz kodiert einen C-terminalen, flexiblen GGS Linker und einer anschließenden Peptidsequenz, welche für die Bindung an Kohlenstoffnanoröhren optimiert wurde (CNT-tag). Diese Aminosäuresequenz wurde zuvor mit Hilfe des Ribosomen-Display Verfahrens von Ito *et al.* bestimmt.⁽⁷²⁾ Das modifizierte Genkonstrukt für BM3_{CNT-tag} konnte analog zum wildtypischen Enzym in *E.coli* exprimiert und im Anschluss mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Der entscheidende Vorteil dieser Strategie ist die direkte Verwendungsmöglichkeit des exprimierten Enzyms, da dieses keiner weiteren Modifikation bedarf. Theoretisch ist die direkte Verwendung des Lysates möglich, das Enzym kann aber ebenfalls mittels des N-terminalen His₆-tag chromatographisch isoliert werden. Die Konzentration des BM3_{CNT-tag} erfolgt standardmäßig anhand des CO-Differenz Spektrums.

Einfluss der Modifikationen auf die enzymatische Aktivität

Bei näherer Betrachtung der Kristallstruktur der BM3 Reduktase (BMR; PDB ID Code 4DQK) fällt auf, dass der C-Terminus direkt am Eingang der NADPH Bindestelle lokalisiert ist.⁽⁵⁴⁾ Wird das Enzym mit Hilfe eines am C-Terminus lokalisierten Ankers an einer Elektrodenoberfläche gebunden, wird die Reduktase in Richtung der Elektrode ausgerichtet. Eine determinierte Orientierung des Enzyms wurde bereits zuvor, als positiver Einflussfaktor für die zur Produktformation beitragende (produktive) elektrochemische Hämeisen Reduktion identifiziert.^(28, 79)

5. DISKUSSION

Eine C-terminale Modifikation mit einem Ankermolekül kann unter Umständen eine sterische Hinderung und somit eine empfindliche Störung der NADPH Aufnahme und der resultierenden P450 Aktivität darstellen. Während der elektrochemischen Reduktion kann dies zwar außer Acht gelassen werden, doch würde eine solche sterische Hinderung für eine Nicotinamid-abhängige Charakterisierung ein Problem darstellen. Der objektive Vergleich der beiden Reduktionsmethoden würde dabei verfälscht werden.

Als Referenz für alle Charakterisierungen diene das wildtypische P450_{BM3}. Typischerweise ist die BM3-katalysierte Substratumsetzung in zwei Phasen, eine schnelle anfängliche (initial) und eine anschließende langsamere Phase unterteilt. In allen Versuchen wurde immer die initiale Aktivität der jeweiligen Reaktion berücksichtigt. Die initiale Dodekansäure Umsatzrate wurde für das wildtypische Enzym auf $k_{\text{cat}} = 152 \text{ min}^{-1}$ (Tabelle 4.2) bestimmt und blieb in unseren Experimenten somit deutlich unter dem von Noble *et al.* veröffentlichten k_{cat} Wert von 1200 min^{-1} .⁽⁹¹⁾ Aufgrund der Reproduzierbarkeit dieses Messwertes, sowie der konsistenten NADPH Verbrauchswerte wurde dieses Ergebnis jedoch im Folgenden weiterhin als Referenz für weiterführende Experimente verwendet.

Die initialen Dodekansäure Umsatzzraten der mit einem Anker modifizierten Varianten wurden analog zum wildtypischen Enzym bestimmt. Bereits die C-terminale GGSC Sequenz der Variante (BM3_{term.C}) verringerte die gemessene Hydroxylierungsrate um $\Delta = -87,5 \%$ (12,5%; Restaktivität) und stellt offensichtlich eine sterische Hinderung für die effiziente Aufnahme von NADPH dar. Die Konjugation dieser Variante mit einem Pyren zu BM3_{term.C+Py} verschlechterte die NADPH Aufnahme zusätzlich, sodass die Aktivität des Enzyms um weitere $\Delta = -4 \%$ (8,5 %; Restaktivität), verglichen zum wildtypischen Enzym, verringert war.

Obwohl der gentechnisch eingeführte Anker (CNT-tag) ebenfalls am C-Terminus lokalisiert ist, zeigte dieser einen deutlich geringeren Einfluss auf die Nicotinamid-abhängige Aktivität. Die Variante BM3_{CNT-tag} zeigte eine um lediglich $\Delta = -15,8 \%$ niedrigere Aktivität (84,2 %; Restaktivität) als das wildtypische Enzym.

Im Anschluss wurde am NMI die Elektronenleitfähigkeit der beiden Ankervarianten mittels Cyclovoltammetrie überprüft. Im Zuge dieses Experiments wurden die

Amplituden (Peakstrom) der Oxidations- (I_{pa}) und der Reduktionspeaks (I_{pk}) bestimmt. Unter Annahme eines konstanten Überpotenzials (η) und einer konstanten übertragenen Ladung (Q) pro Enzymmolekül, korrelieren die Amplituden direkt mit der Ratenkonstante des Elektronentransfers ($k_s(\eta)$). Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Gleichung 5.1:

$$k_s(\eta) = \frac{I_p}{Q} \quad (5.1)$$

Die gemessenen Peakamplituden beider Pyren Varianten (BM3_{term.C+Py} und BM3_{674C+Py}) übertrafen sowohl die für das nicht modifizierte wildtypische Enzym bestimmten Peakstrom als auch den der CNT-tag Variante deutlich. Dies bestätigt die zuvor von Udit *et al.* beschriebene hohe Leitfähigkeit des Pyrens. Ebenfalls die CNT-tag Variante erreichte einen um 30 % erhöhten Peakstrom und erleichtert somit die elektrische Anbindung des Enzyms. Die Leitfähigkeit des Pyrenankers wurde mit Hilfe des CNT-tag nicht erreicht.

Zusammengenommen erlaubte die Pyrenmodifikation eine sehr gute elektrische Anbindung zur Reduktion und Oxidation des Hämeisens, konnte aber nur unter starker Inaktivierung des Enzyms an die entsprechende Ankerposition konjugiert werden. Zudem war eine genaue, einfache Bestimmung der aktiven und gleichzeitig modifizierten Enzymkonzentration nicht möglich. Vor dem Hintergrund einer negativen Korrelation der Ratenkonstante des Elektronentransfers und der Produktformation, sollten die hohen k_s Werte der Pyren modifizierten Variante kritisch hinterfragt werden. Dennoch ist die elektrische Anbindung des Enzyms mit einer erleichterten Elektronenübertragung grundsätzlich zur Etablierung einer elektrochemisch getriebenen CYP Applikation notwendig.

Die gentechnische Modifikation mit einem CNT-tag erlaubte die direkte Expression und Isolation des modifizierten Enzyms sowie die einfache und zuverlässige Konzentrationsbestimmung des aktiven Enzyms. Darüber hinaus konnte mit Hilfe des CNT-tag

5. DISKUSSION

die Elektronenübertragung von der Elektrode zum Hämeisen deutlich verbessert werden und das Anker-molekül beeinträchtigt die NADPH Aufnahme und die resultierende Nicotinamid abhängige Aktivität im geringeren Maß. Zusammenfassend überwiegen die Vorteile der gentechnischen Modifikation, sodass die weitere Verwendung dieser Anker Variante für die Bindung von P450_{BM3} auf CNT basierten Elektrode nahe liegt.

5.1.3 Die Wahl des Substrates

Die bisher etablierte CNT-tag Variante des P450_{BM3} katalysiert noch immer die subterminale Hydroxylierung von Fettsäuren. Langfristig ist die elektrochemisch getriebene, terminale Hydroxylierung von Fettsäuren Ziel des ElektroZym Projektes. Ein rationaler oder evolutiver Mutagenese Ansatz könnte genutzt werden um BM3 in Richtung einer terminalen Hydroxylierung zu optimieren. Fettsäuren und die daraus resultierenden Hydroxyfettsäuren eignen sich aber nur bedingt zur Etablierung eines elektrochemisch aktiven P450 Enzyms. Die formierten Hydroxyfettsäuren müssen aus der Reaktion extrahiert und anschließend quantitativ mit Hilfe einer gaschromatographisch (GC) gestützten Analyse bestimmt werden.^(42, 113, 114) Diese Art der Analyse erlaubt keinen hohen Durchsatz und keine *in situ* Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Daher wäre die Formierung eines direkt detektierbaren Produktes von Vorteil.

Eine Alternative stellt die Verwendung von *p*-Nitro-Phenoxy-carboxylsäuren (pNCAs) mit der Aminosäureaustauschmutante BM3_{87A} dar, welche das pNCA zu einem instabilen Halbacetal hydroxyliert.⁽¹¹⁵⁾ Beim spontanen Zerfall des Halbacetals wird photometrisch und elektrochemisch detektierbares *p*-Nitrophenolat freigesetzt. Allerdings sind pNCAs nur bei erhöhten pH Werten (\geq pH 9,6) stabil, während das Enzym ein neutrales Milieu (pH 7,4) bevorzugt. Weitere Beispiele sind photometrische Assay Systeme zur Detektion von enzymatisch freigesetzten Phenolen und primären Alkoholen.^(68, 96, 144) Viele dieser Assay Systeme setzen ungünstige Reaktionsbedingungen wie hohe pH Werte, den Einsatz bestimmter BM3 Mutanten oder die Verwendung zusätzlicher Reaktionskomponenten voraus, welche Einfluss auf die elektrochemische Reduktion des P450_{BM3} haben können.

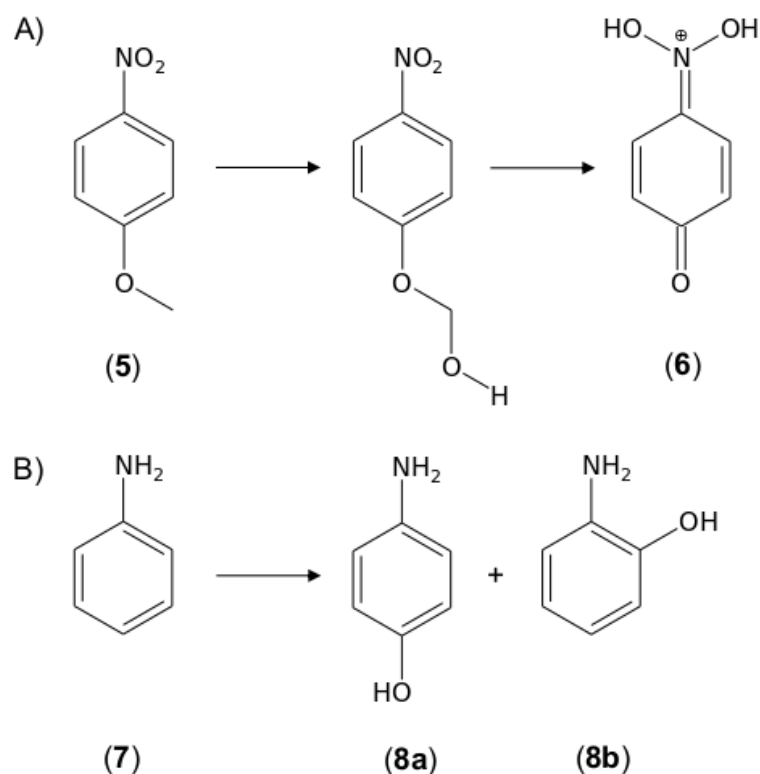


Abbildung 5.4: Übersicht über die Hydroxylierung ausgesuchter Substrate zu photometrisch und elektrochemisch detektierbaren Produkten. A) *p*-Nitroanisol (**5**) wird von P450_{BM3} an der Methoxygruppe zu einem instabilen Halbacetal hydroxyliert und zerfällt spontan zum elektroaktiven *p*-Nitrophenolat (**6**). B) Die BM3-katalysierte Anilin (**7**) Hydroxylierung führt zu den elektroaktiven Substraten *p*-Aminophenol (**8a**) und *o*-Aminophenol (**8b**).

Die dreidimensionale CNT-Solgel Elektrode soll in einem Multititerplatten kompartiblen Aufbau zu jeweils 4 parallelen Elektroden (24 Wells; 4 x 6) etabliert werden. Unter Verwendung von Multititerplatten liegt eine photometrische und/oder elektrochemische Detektionsmethode zur *in situ* Aktivitätsbestimmung nahe. Im Rahmen einer solchen Aktivitätsbestimmung, muss eindeutig zwischen Substrat und dem enzymatisch formierten Produkt differenziert werden können.

5. DISKUSSION

Als Substrate wurden die in Abbildung 5.4 vorgestellten aromatischen Verbindungen *p*-Nitroanisol (**5**) und Anilin (**7**) ausgesucht. Durch Hydroxylierung von (**5**) am Kohlenstoffatom der Methoxy- (-OCH₃) Gruppe entsteht, wie zuvor beim pNCA, ein instabiles Halbacetal, sodass *p*-Nitrophenolat (**6**) freigesetzt wird. Das *p*-Nitrophenolat kann anhand seiner gelben Färbung eindeutig vom farblosen Substrat unterschieden und photometrisch quantifiziert werden. Im Gegensatz zum pNCA ist das Substrat (**5**) auch bei neutralem pH Wert stabil.⁽¹¹⁵⁾ Darüber hinaus kann die Verbindung (**6**) ebenfalls elektrochemisch detektiert werden. Das zweite vorgestellte Substrat Anilin (**7**) wird durch Hydroxylierung zu den elektroaktiven *p*- und *o*- Isomeren des Aminophenols umgesetzt. Diese können oxidativ an einer Detektionselektrode quantifiziert werden. Alle Aminophenol Isomere, das *m*- Isomer eingeschlossen (verwendet als interner Standard in der Extraktion), sind photometrisch nachweisbar und können anhand der Absorptionsspektren eindeutig zugeordnet und vom Substrat unterschieden werden.⁽²⁰⁾

In ersten Versuchen (10 min Reaktionszeit) konnte das wildtypische BM3, weder Anilin noch *p*-Nitroanisol umsetzen. Speziell für Anilin war dieses Ergebnis unerwartet, da in der Literatur der Umsatz bereits beschrieben wurde.⁽¹⁷⁾ Daher wurde eine hauseigene fokussierte P450_{BM3} Mutantenbibliothek auf potenziellen Umsatz der gewünschten Substrate untersucht. Diese Bibliothek wurde zuvor von Weber *et al.* für eine verbesserte Hydroxylierung von zyklischen und azyklischen Alkanen entworfen.⁽¹⁴⁰⁾ Die Bibliothek zeichnet sich durch eine veränderte aktive Tasche aus. Die Positionen F87 und A328, sowie die am Substrateingang lokalisierten Positionen R47 und Y51 wurden durch hydrophobe Aminosäuren substituiert (Abbildung 4.2 A). Hydrophoberen Substraten wie z.B. Aromaten soll somit der Zugang und die Bindung in der aktiven Tasche des Enzyms erleichtert werden.

Screening auf *p*-Nitroanisol Umsatz

Alle Mutante der hauseigenen Bibliothek wurden in einer 24-stündigen Biotransformation mit *p*-Nitroanisol als Substrat getestet. Die Reaktionen wurden im Anschluss extrahiert und mittels massenspektrometrischer GC Analyse auf Produktformation un-

tersucht. Für sieben der getesteten Mutanten konnte die enzymatische Bildung des erwarteten *p*-Nitrophenolat qualitativ nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurde die initiale (10 min) NADPH getriebenen enzymatische Aktivität photometrisch ($\lambda = 405 \text{ nm}$) bestimmt. Nur die Variante (BM3 87A/328F) zeigte eine messbare initiale Aktivität. Diese Variante wurde ebenfalls mit einem CNT-tag modifiziert. Die Modifikation des BM3 87A/328F ging ebenfalls mit einem Aktivitätsverlust von $\Delta = -38 \%$ (62 % Restaktivität) einher.

Das formierte Produkt (**6**) ist zusätzlich elektrochemisch aktiv und kann oxidativ quantifiziert werden.⁽⁶⁾ Die elektrochemische Quantifizierung von (**6**) ist durch die anodische Polymerisation von Oxidationsprodukten und die daraus resultierende Inaktivierung der Detektionselektrode stark limitiert.^(7, 99) Mittels veränderter Potentialbedingungen oder Zugabe von Ozon (O_3) kann der Polymerisation entgegen gewirkt werden. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen für BM3 kann diese Polymerisation nicht verringert werden.^(3, 99) Bedingt durch die Polymerisation der Oxidationsprodukte schwächt der Detektionsstrom ab, sodass eine zuverlässige Untersuchung einer Biotransformation mittels einer Detektionselektrode nicht möglich ist. Eine GC gestützte Analyse ist aufgrund der hohen Siedetemperatur (T_{Sdp}) des Produktes von $T_{\text{Sdp}} = 279^\circ\text{C}$ und des einsetzenden Zerfalls nicht zuverlässig und nicht reproduzierbar.^{www.ChemSpider.com} Die photometrische Untersuchung erlaubt aufgrund des mikromolaren Detektionslimits, sowie der geringen Stoffmenge an reduzierbarem Enzym, keine Bestimmung der initialen Aktivität.

Screening auf Anilin Umsatz

Alternativ wurde Anilin als Substrat untersucht, welches laut Di Nardo *et al.* von wildtypischem P450_{BM3} zu *p*-Aminophenol umgesetzt wird.⁽¹⁷⁾ Die Autoren identifizierten die Analyten (Substrat und Produkt) mittels der Retentionszeiten und des charakteristischen UV Spektrums. Anhand der verminderten Substratkonzentration nach 30 min wurde die Umsatzrate auf $k_{\text{cat}} = 9,3 \text{ min}^{-1}$ bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst keine initiale Produktformation durch P450_{BM3} (15 min) beobachtet werden, sodass in einem längerfristigen Versuch erneut die vollständige, fokussierte Mutantenbibliothek gescreent wurde. Für alle getesteten

5. DISKUSSION

Mutanten, einschließlich des wildtypischen BM3 konnte nach 24-stündiger Biotransformation das erwartete Hydroxylierungsprodukt (**8a**) identifiziert werden. Zusätzlich wurde ein weiterer Produktpeak gemessen und als *o*-Aminophenol (**8b**) identifiziert.

Zur Analyse einer Biotransformation wurde zunächst ebenfalls eine GC gestützte Analyse, ähnlich der Fettsäure Analytik, verwendet. Anders als zuvor können die organischen Extrakte aufgrund der hohen Flüchtigkeit der Analyten nicht eingedampft (konzentriert) werden. Die Detektion geringer Konzentrationen ist somit deutlich limitiert. Alternativ wurde Ethylacetat als Extraktionsmittel eingesetzt. Die Aminophenol Isomere zeigten eine höhere Löslichkeit als im standardmäßig zur Fettsäure Analytik verwendeten Methyl-tert-butylether (MTBE). Durch Extraktion mit Ethylacetat konnte bei gleichbleibendem Probenvolumen eine höhere Konzentration der Produkte im Gaschromatographen analysiert werden. Die Detektion der Analyten war grundsätzlich möglich, aber die Quantifizierung war aufgrund der stark asymmetrischen Peakform (Tailing) ungenau und wenig reproduzierbar. Eine Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid resultierte in multiplen nicht identifizierten Peaks (bis zu 9 Peaks; nicht gezeigt). Ein solches Ergebnis ist von einer Derivatisierung der beiden Produkte (*p*- und *o*-Aminophenol) und des internen Standards (*m*-Aminophenol) mit unterschiedlichem Grad (n_{sub}) der Substitution ($n_{\text{sub}} = 0; 1; 2$) zu erwarten. Aus den genannten Gründen wurde im Folgenden von einer GC gestützten Analyse abgesehen.

Die Etablierung einer HPLC gestützten Analytik mit einem Dioden Array Detektor (DAD) konnte diese Hürden überwinden. Der Ethylacetat Extrakte einer Biotransformation konnte ohne weitere Behandlung zuverlässig und reproduzierbar analysiert werden.

Eine 24-stündige Biotransformation der gesamten Mutanten Bibliothek wurde erneut mittels HPLC-DAD Analytik untersucht. Die Formierung der *p*- und *o*-Aminophenol Isomere konnte bestätigt werden. Die vier aktivsten Mutanten BM3 47L/51F/87V/328F, BM3 47L/51F/87V/328V (LFVV), BM3 328V und BM3 328V/437A wurden für die Modifikation mit einem CNT-tag ausgesucht. Diese erfolgte wie zuvor beschrieben mittels einer Überhang PCR auf Grundlage der Gesamtkonstruktes für BM3

LFVF, BM3 328V und BM3 328VA. Nach erfolgreicher Expression und „immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie“ (IMAC) gestützter Reinigung dieser CNT-tag Varianten, wurden die Enzyme zunächst biochemisch charakterisiert. Zur Vereinfachung werden die CNT-tag modifizierten Varianten im Folgenden mit BM3 LFVF ($\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}^{47\text{L}/51\text{F}/87\text{V}/328\text{F}}$), BM3 LFVV ($\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}^{47\text{L}/51\text{F}/87\text{V}/328\text{V}}$), BM3 328V ($\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}^{328\text{V}}$) und BM3 328VA ($\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}^{328\text{V}/437\text{A}}$) abgekürzt.

Die HPLC-DAD gestützte Analyse einer 15-minütiger Biotransformationen der CNT-tag modifizierten Varianten zeigte eindeutige und reproduzierbare Hydroxylierungsaktivitäten. Die Varianten unterscheiden sich sowohl in ihrer Umsatzrate, als auch in der Verteilung der formierten Produktisomere. Für beide Produktisomere wurde eine Standardgerade bei $\lambda = 232 \text{ nm}$ bestimmt, die gemessenen Raten wurden zu einer Gesamtformationsrate summiert. Die Produktformation aller Varianten konnte unabhängig von der Isomerenverteilung quantifiziert und verglichen werden. Keine der $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$ Mutanten erreichte die von Di Nardo *et al.* beschriebene Aktivität.⁽¹⁷⁾ Im Gegensatz zur zitierten Arbeit, wurde im Rahmen dieser Experimente erstmals das photometrisch quantifizierte Hydroxylierungsprodukt (Aminophenol) zur Berechnung der enzymatischen Aktivität herangezogen. In Tabelle 4.5 Spalte 2 sind die gemessenen Nicotinamid-abhängigen Umsatzraten der CNT-tag modifizierten BM3 Varianten aufgelistet.

Beide Aminophenolisomere können gleichwertig unter Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül ($n = 2$) oxidativ bei einem Potential von $E = +150 \text{ mV}$ quantifiziert werden (Abbildung 5.5 A). Im Folgenden wird deshalb ausschließlich auf Aminophenol im Allgemeinen als Hydroxylierungsprodukt eingegangen. Die elektrochemische Detektion des Aminophenol unterliegt keiner Limitation durch Elektrodeninaktivierung und das elektroaktive Produkt kann vom elektroinaktiven Substrat differenziert werden. Die photometrische Detektion ist im mikromolaren Bereich nicht limitiert. Die Produkte können durch Verwendung eines Fluoreszenzdetektors bis in den nanomolaren Bereich gemessen werden. Aufgrund der notwendigen, vorherigen Extraktion der Reaktion zur chromatographisch-photometrischen Analyse, ist die Bestimmung der initialen elektrochemisch getriebenen Aktivität nicht möglich.

5. DISKUSSION

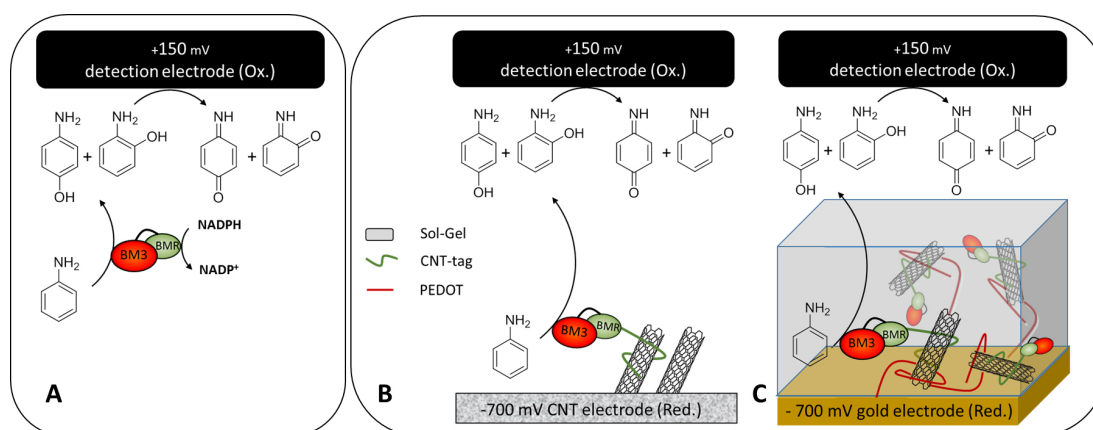


Abbildung 5.5: Übersicht über die verwendeten Elektrodenaufbauten A) Reaktionsschema der oxidativen Quantifizierung an einer Glaskohlenstoff (GK) Elektrode B) Aufbau der kommerziellen MWCNT Elektrode unter Verwendung der GK Detektionselektrode. Das angelagerte Enzym setzt Anilin zu Aminophenol um, welches an der GK Elektrode quantifiziert wird. C) Schema der 3D Solgel Matrix Elektrode unter Verwendung der GK Detektionselektrode. Die CNT/Enzym Komplexe sind willkürlich im Solgel verteilt und werden durch das leitende PEDOT Polymer elektrisch an die Goldelektrode angeschlossen. Die Abbildung ist mit freundlicher Erlaubnis von ChemBioChem der Veröffentlichung von Llaudet *et al.* 2016 entnommen.⁽⁷⁵⁾

Obwohl P450_{BM3} auf den Umsatz von *p*-Nitroanisol optimiert werden konnte, und das resultierende Produkt theoretisch sowohl photometrisch als auch elektrochemisch detektiert werden kann, muss dieses Substrat als ungeeignet zur Etablierung einer elektrochemischen P450 Applikation bewertet werden. Für die Verwendung von Anilin als Substrat konnten vier unterschiedliche Enzymvarianten etabliert werden, die elektrochemische Detektion ist uneingeschränkt möglich und die HPLC-DAD gestützte Analyse ist für die NADPH abhängige Aktivität zuverlässig und reproduzierbar. Aus diesen genannten Gründen wurde nachfolgend Anilin als das Substrat der Wahl verwendet und ausschließlich die Anilin hydroxylierenden Varianten weiter untersucht. Für weiterführende Untersuchungen wurden die drei aktivsten Varianten BM3 LFVF, BM3 328V und BM3 328VA als Modell Proteinvarianten ausgesucht und Mutantenbibliotheken auf Grundlage dieser Enzyme generiert.

5.1.4 Validierung der oxidativen Detektion als gleichwertige Analyse-methode

Am Naturwissenschaftlich und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) wurde eine NADPH getriebene, von BM3 328V_{CNT-tag} katalysierte Biotransformation in einer Elektro-zelle chronoamperometrisch verfolgt. Der Versuchsaufbau entsprach dem in Abbildung 5.5 A gezeigten Schema. Dazu wurde das Hydroxylierungsprodukt an einer Glaskohlenstoff (GK) Elektrode oxidiert und der resultierende Detektionsstrom aufgezeichnet.

Für die Experimente am NMI wurde das nicht spezifisch in der Reduktasedomäne (BMR) bindende NADH als Nikotinamid verwendet. Das System sollte so besser mit der späteren elektrochemischen Reduktion vergleichbar sein. Anhand der gemessenen maximalen Detektionströme wurden relative Aktivitäten berechnet (Tabelle 4.5 Spalte 3), welche sich mit denen der vorangegangenen HPLC-DAD analysierten Biotransformation (Tabelle 4.5 Spalte 1) decken. Auf Grundlage dieser Ergebnisse stehen eine direkte *ex situ* (HPLC), als auch eine indirekte *in situ* (DED; direct electrochemical detection) Messmethode zur Verfügung.

5.1.5 Nachweis der erleichterten produktiven Hämeisen Reduktion durch Modifikation mit dem CNT-tag

In früheren Arbeiten lag der Fokus auf einer maximierten Elektronenübertragung auf das P450 Hämeisen, doch nur in wenigen Fällen resultierte daraus eine produktive Reduktion des Enzyms.^(15, 18, 47) Somit ist die zuvor demonstrierte elektrische Anbindung des P450_{BM3} mit Hilfe von Anker-molekülen notwendig, aber nicht hinreichend für die Produktformation. Zur Überprüfung wurde am NMI ein CNT-tag modifiziertes BM3 auf eine kommerziell erhältliche CNT Elektrode appliziert und mit Hilfe der DED Analytik auf produktive Reduktion untersucht. Wie in Abbildung 5.5 B gezeigt dient die CNT Elektrode der Hämeisen Reduktion, während die GK Elektrode für die oxidative Quantifizierung des enzymatisch formierten Aminophenols dient. Nach Reaktionsstart durch Applikation eines reduktiven Potentials von $E = -700$ mV, ist nach ca. 60 Sekunden ein Anstieg des Produkt-abhängigen Detektionsstroms an der GK Elektrode zu

5. DISKUSSION

erkennen (Abbildung 4.3). Das Ausbleiben eines Anstiegs des Detektionsstroms in den Kontrollreaktionen belegt die erleichterte produktive Hämeisen Reduktion unter Verwendung eines CNT-tag modifizierten Enzyms. Gleichzeitig belegen diese Ergebnisse, dass chronoamperometrisch eindeutig zwischen dem Substrat und dem Hydroxylierungsprodukt unterschieden werden kann.

Nach dem Reaktionstart durch Polarisation der Kathode, steigt der Detektionstrom langsam an. Diese Phase ist durch die Diffusion des an der Kathode enzymatisch formierten Produktes zur detektierenden GK Elektrode bestimmt. Die Steigung des Detektionsstroms resultiert aus der Diffusionsstrecke s_{Diff} , sowie der Diffusionsgeschwindigkeit v_{Diff} der Produktmoleküle. Werden über einen Zeitraum ($t = 1, 2, \dots, z$) konstante Stoffmenge enzymatisch an der Kathode formiert ($k_{\text{cat}} = \text{konst.}$), stellt sich zum Zeitpunkt $t = z$ eine Gleichgewichtskonzentration zwischen den Elektroden ein (Abbildung 5.6 B). Ab diesem Zeitpunkt $t = z$ entspricht der oxidative Verbrauch an der Detektionselektrode, der enzymatischen Aktivität an der Kathode, sodass der Detektionsstrom einen Plateauwert (I_{max}) erreicht. Da die in Abbildung 4.3 gezeigte Messung vor dem Erreichen von I_{max} vorzeitig beendet wurde, ist in Abbildung 5.6 A eine beispielhafte oxidative Detektion der enzymatischen Aktivität gezeigt.

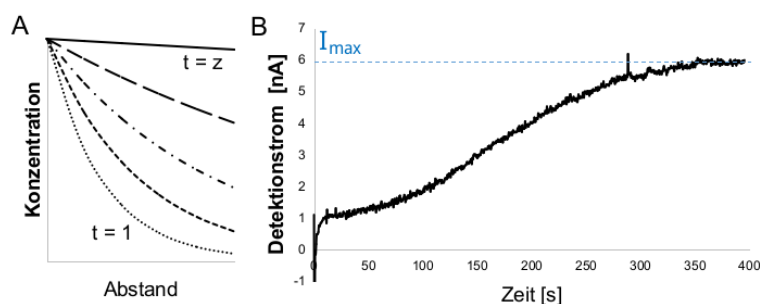


Abbildung 5.6: A) Theoretische zeitliche Entwicklung der Aminophenol Konzentration mit zunehmendem Abstand von der Kathode. Zu Beginn der Biotransformation $t = 1$ ist die Aminophenol Konzentration an der Kathode hoch und an der Detektionselektrode niedrig. Mit der Zeit stellt sich zum Zeitpunkt $t = z$ eine Gleichgewichtskonzentration zwischen den Elektroden ein. B) Beispielhafte chronoamperometrische Aminophenol Detektion einer von $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$ katalysierten elektrochemisch getriebenen Biotransformation.

5.1.6 Vergleich der Nicotinamid und elektrochemisch getriebenen Hydroxylierungsaktivität

In einer ersten chronoamperometrischen Bestimmung am NMI wurden alle CNT-tag Varianten auf ihre elektrochemisch getriebene Aktivität untersucht. Aus den ermittelten Detektionströmen wurde eine Rangordnung (relative Aktivitäten; Tabelle 4.5 Spalte 5) der einzelnen CNT-tag Varianten aufgestellt und mit den Ergebnissen der vorherigen Nicotinamid-abhängigen Ergebnisse verglichen (Tabelle 4.5 Spalte 2). Die elektrochemische Reduktion konnte zunächst die NAD(P)H abhängige Rangordnung nicht vollständig bestätigen.

Dennoch zeigte die Variante BM3 LFVF, wie in den beiden vorherigen Versuchen, erneut die höchste Aktivität. Die Aktivitäten der weiteren Mutanten BM3 LFVV, BM3 328V und BM3 328VA ergaben eine abweichende Rangordnung als zuvor. Es wurden zunächst unterschiedliche, vom Reduktionsmechanismus abhängige, intramolekulare Elektronentransfermechanismen vermutet.

5.1.7 Elektrochemische Quantifizierung und Bestimmung der elektrochemischen, enzymatischen Aktivitäten

Ein direkter Vergleich der Nicotinamid-abhängigen und elektrochemisch getriebenen Aktivitäten setzt die Kenntnis der Oberflächenkonzentration (mol cm^{-2}) der reduzierbaren Enzyme an der Elektrode voraus. Der konventionelle Kohlenstoffmonoxid (CO) Bindungs Assay nach Omura und Sato⁽⁹³⁾ findet aufgrund der geringen Schichtdicke und Oberflächenkonzentration in diesem Fall keine Anwendung. Alternativ kann jedoch mit Hilfe einer Cyclovoltammetrie, unter Berücksichtigung der Laviron Theorie, die Stoffmenge einer Redoxspezies bestimmt werden.⁽⁶⁵⁾

Während der Cyclovoltammetrie wird die Spannung mit konstanter Änderungsrate, auch Scanrate (v) genannt, in einem determinierten Spannungsbereich variiert (hier: von -1 V bis 1 V). Das P450 Hämeisen und die in der Reduktase lokalisierten Flavine nehmen bei Erreichen des jeweiligen Redoxpotentials (E_0) Elektronen auf (I_{pk}) und geben diese nach Umkehr der Spannungsänderung bei E_0 wieder ab (I_{pa}). Im Idealfall sind die bei E_0 aufgenommene und abgegebene Ladungen ($Q(I_{pa}) = Q(I_{pk})$) identisch.

5. DISKUSSION

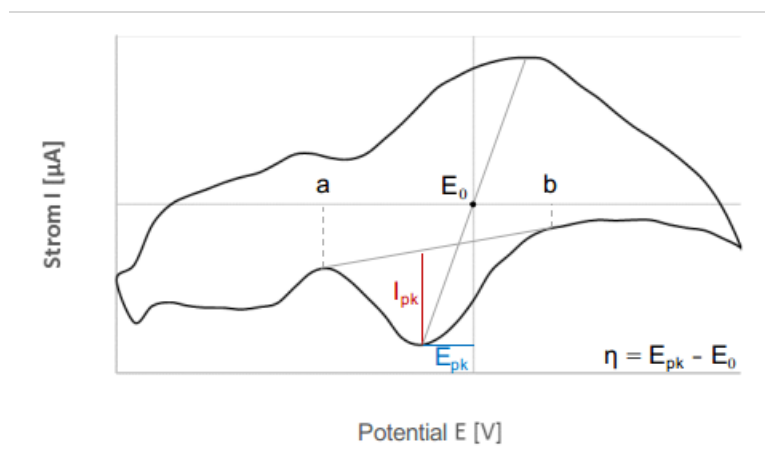


Abbildung 5.7: Beispielvoltammogramm von $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$. Dargestellt ist ein hintergrundbereinigtes (Differential-)Voltammogramm sowie die zur Berechnung der Stoffmenge und des Elektronentransferkoeffizienten K_{ET} benötigten Messgrößen, I_{pk} und E_{pk} .

In Abbildung 5.7 ist beispielhaft ein P450_{BM3} Cyclovoltammogramm gezeigt. In diesem Voltammogramm fällt auf, dass die Reduktion und Oxidation nicht beim gleichen Potential auftreten. Beim Hämeisen und den Flavinen handelt es sich nicht um ideale an der Oberfläche adsorbierte Redoxspezies; die Reduktion und Oxidation sind relativ zu E_0 verschoben sind. In diesem Zusammenhang spricht man von einem Überpotenzial ($\eta \neq 0$).

Standardmäßig wird aus der ermittelten Peak Stromstärke (I_p) anhand der Gleichung 5.2 die Oberflächenbedeckung der Redoxspezies (Γ_T ; mol cm^{-2}) errechnet:

$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} \nu A \Gamma \quad (5.2)$$

Da die elektrochemisch aktive Oberfläche der genutzten mehrwandigen CNT Elektroden (MWCNT) nicht bekannt ist, wurde ein eigenes, von der Oberflächenbedeckung der Redoxspezies (Γ_T) unabhängiges vereinfachtes Modell (vgl. Gleichung 5.3) für die Enzymquantifizierung genutzt:

$$N_{\text{P450}} = \frac{Q}{nF} \quad (5.3)$$

Aus der Menge an übertragenen Elementarladungen (Q) und der Menge an Elektronen die jedes Hämeisen aufnehmen kann ($n = 1$), lässt sich mit Hilfe der Faraday Konstante (F) die reduzierte Stoffmenge an P450 Enzym (N_{P450}) berechnen. Ein ähnliches Modell wurde bereits von Suroviec im Jahr 2012 genutzt.⁽¹²⁹⁾

Das genutzte Rechenmodell geht von einer maximal einfachen Oberflächenbedeckung $\Gamma_{\text{T}} \leq 1$ (Monolayer) der Elektrode aus. Für eine aussagekräftige Quantifizierung des Enzyms mittels Cyclovoltammetrie müssen die folgenden Nebenbedingungen erfüllt sein:

$$\frac{I_{\text{pk}}}{\nu} = m \quad (5.4)$$

und

$$m = \textit{konstant} \quad (5.5)$$

Mit steigender Scanrate (ν) steigt der gemessene Peakstrom der Reduktion (I_{pk}) an. Dabei bleibt die übertragene Ladung Q stets konstant. Eine Quantifizierung ist somit nur unter der Bedingung eines linearen Zusammenhangs (m) von I_{pk} und ν sinnvoll. Mit steigender Scanrate wird diese konstante Reaktionsgeschwindigkeit m , der Übergang der oxidierten zur reduzierten Spezies ($\Gamma_{\text{ox}} \rightarrow \Gamma_{\text{red}}$), überschritten. Es besteht kein linearer Zusammenhang m der Parameter I_{pk} und ν mehr. In diesem Fall ist die Berechnung der übertragenen Elementarladungen anhand der Fläche unter dem Reduktionspeak ($\int_a^b I(V)dV$; vgl. Abbildung 5.7) und der Scanrate (ν), mittels der Gleichung

5. DISKUSSION

5.6 nicht mehr aussagekräftig.

$$Q = \frac{\int_a^b I(V)dV}{v} \quad (5.6)$$

Mit einer Scanrate innerhalb des linearen Bereiches, wurde die durchschnittliche elektrisch reduzierbare BM3 Stoffmenge auf ca. 23,7 pmol, bei einer Enzymkonzentration von 10 μ M, bestimmt (aus der Messkurve Abb. 4.11 interpoliert). Dies entspricht einem reduzierbaren Anteil von ungefähr 0,9 % des in Lösung befindlichen Enzyms (ebenfalls extrapoliert).

Durch Einsetzen des chronoamperometrisch bestimmten Detektionsstroms I_{\max} einer Biotransformation in die Gleichung 5.7, wurde die formierte Stoffmenge an Aminophenol (N_{AP}) pro Sekunde berechnet:

$$N_{AP} = \frac{Q}{F * n} \quad (5.7)$$

Dabei gilt:

$$I = \frac{C}{s} \quad (5.8)$$

Mit Hilfe der Nebenbedingung 5.8 werden aus der gemessenen Stromstärke I_{\max} die übertragene Ladung Q (Coulomb; C) errechnet. In der Gleichung 5.7 ist die Faraday Konstante mit (F) und die Anzahl an übertragenen Elektronen pro Molekül Aminophenol mit (n) angegeben. Während der Oxidation eines Moleküls Aminophenol werden zwei Elektronen ($n = 2$) abgegeben.⁽¹²⁶⁾

Anhand der gemessenen reduzierbaren Stoffmenge an Enzym und der chronoamperometrisch bestimmten Produktformation pro Sekunde, konnten elektrochemisch getriebene Umsatzraten (k_{cat}) errechnet und den NADPH-abhängigen Werten direkt ge-

genübertestellt werden. Verglichen mit den Nikotinamid-abhängigen Aktivitäten der einzelnen Varianten konnten mit Hilfe der elektrochemischen Reduktion relative Aktivitäten von jeweils 56 % (1), 63 % (2) und 78 % (3) erzielt werden. Im Zuge dieser Versuche konnte die ursprünglich aufgestellte Rangfolge der Enzyme (Tabelle 4.5; Spalte 2) ebenfalls für die elektrochemisch getriebenen Aktivitäten bestätigt werden.

5.1.8 Ausschluss der Peroxygenase Aktivität von BM3 als treibende Kraft der beobachteten Substratumsätze

Die potentielle Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist eine oft wenig beachtete Problematik für die erfolgreiche Etablierung einer produktiven elektrochemischen Hämeisen Reduktion. Einerseits ist H_2O_2 in hohen Konzentrationen toxisch für das Enzym und führt zur Inaktivierung. Andererseits können viele Cytochrom P450 Monooxygenasen, wie z.B. P450_{BM3} Wasserstoffperoxid anstelle von molekularem Sauerstoff binden und ebenfalls zur Hydroxylierung ihres Substrates nutzen.⁽¹¹⁾ Man spricht in diesem Zusammenhang von der Peroxygenase Aktivität der CYPs.⁽⁴⁵⁾ Dieser Mechanismus führt somit zu falsch positiven Ergebnissen der elektrochemisch getriebenen und produktiven Hämeisen Reduktion. Die Peroxygenaseaktivität des P450_{BM3} ist verglichen zur O_2 -abhängigen Aktivität wenig effizient und führt bereits nach wenigen Substratumsätzen zur Inaktivierung des Enzyms.⁽¹¹⁾ Daher muss die Anwesenheit von H_2O_2 möglichst ausgeschlossen werden.

Während der CYP katalysierten (elektrochemischen) Biotransformation können zwei Mechanismen zur Formation von H_2O_2 beitragen. Für die Hydroxylierung von Substraten sind CYP Enzyme auf molekularem Sauerstoff in Lösung angewiesen. Diese Abhängigkeit besteht unabhängig von der Quelle der Reduktionsäquivalente. In einer Elektrolyse wird das Enzym durch Applikation einer negativen Spannung an der Arbeitselektrode (Kathode) reduziert. Im Zuge dieser Reduktion werden alle in Lösung befindlichen Redoxspezies, abhängig vom Standardpotential (E_0 bzw E_{pk}) der jeweiligen Spezies an der Kathode reduziert. Neben dem CYP, stellt auch der gelöste molekulare Sauerstoff eine Redoxspezies dar und kann unter Umständen reduziert werden.^(60, 64, 124) Das Produkt dieser elektrochemischen Sauerstoff Reduktion ist Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Neben der elektrochemischen Bildung, kann H_2O_2 ebenfalls durch Uncoupling, direkt

5. DISKUSSION

am Hämeisen selbst formiert werden.⁽⁴⁴⁾ Eine effiziente und langfristige Nutzung eines elektrochemisch getriebenen P450_{BM3} Systems setzt somit den Ausschluss von H₂O₂ voraus. Im Zuge dieser Arbeit sollen Elektronen über die Flavine der Reduktase zum Hämeisen transportiert werden. Daher wurde das reduktive Potential anhand des bestimmten Mittelpunktpotentials der Flavine ($E_{0 \text{ Flavine}}$) gewählt. Wie in Abbildung 4.12 gezeigt, wurde dieses auf einen Wert von $E_{0 \text{ Flavine}} = -583 \text{ mV}$ bestimmt, sodass standardmäßig ein Potential von $E = -700 \text{ mV}$ zur Reduktion des BM3 an einer CNT Elektrode genutzt wurde. Die kathodische Formation von H₂O₂ erfolgt, abhängig vom verwendeten Elektrodensystem, bereits bei weit positiverem Potential.⁽⁶⁴⁾ Unter Verwendung einer mehrwandigen CNT Elektrode, bereits bei einem Potential von ca. $E = -500 \text{ mV}$.⁽⁶⁰⁾ Diese Reduktion ist stark vom pH Wert der verwendeten Lösung abhängig, sodass die Formation von Wasserstoffperoxid an CNT Elektroden in einem Puffersystem mit niedrigerem pH Wert ($\leq \text{pH } 8$) nicht nachweisbar ist. Des Weiteren kann das kathodisch formierte H₂O₂ bei einem negativeren Potential von $\Delta E = -200 \text{ mV}$ direkt weiter zu Wasser reduziert werden.⁽⁶⁴⁾ Sollte dennoch H₂O₂ an der Kathode formiert werden, sollte das verwendete Potential von $E = -700 \text{ mV}$ ausreichen um dieses direkt weiter zu reduzieren. Die potentielle Formierung und Reduktion des H₂O₂ sollte simultan an der Kathode verlaufen.

Zusätzlich wird dem Reaktionspuffer Katalase in hohen Konzentrationen zugegeben. Die verwendete Konzentration von 3000 U mL^{-1} ist ausreichend um die potentielle und von kathodisch formiertem H₂O₂ abhängige Peroxygenase Aktivität des Enzyms auszuschließen (vergl. Abbildung 4.14).

Der zweite Mechanismus der H₂O₂ Formation ist weit schwieriger zu verhindern. Durch ineffiziente Nutzung von Elektronen am Hämeisen (Uncoupling) kann der gebundene Sauerstoff zu H₂O₂ reduziert werden. Dieser Mechanismus ist als Shunt Pathway in der Literatur bekannt.^(44, 95) Das freigesetzte Peroxid kann die aktive Tasche verlassen oder wieder an das Hämeisen binden. Durch diese Bindung wird ohne vorherige Reduktion des Hämeisens, die Verbindung I (vergl. Abbildung 1.2; Stadium 6) gebildet und kann zur Produktbildung beitragen.

An dieser Stelle muss klar hervorgehoben werden, dass mit Hilfe der zuvor beschriebenen Maßnahmen (pH, Potential und Katalase) potenziell direkt am Hämeisen

formiertes und erneut bindendes H_2O_2 nicht abgefangen werden kann. Die Toleranz gegenüber H_2O_2 und die Peroxygenaseaktivität können mittels Mutagenese optimiert werden.^(1, 10, 11, 70, 71) In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2002 stellten Cirino *et al.* eine BM3 Variante (BM3 F87A) mit einer maximalen initialen Peroxygenaseaktivität von $k_{\text{cat}} = 11 \text{ min}^{-1}$ (ca. 0,9 %; rel. Aktivität wt BM3) vor. Das wildtypische Enzym zeigte keine messbare initiale Aktivität und wurde nach ca. zwei bis drei Umsätzen (Turnover Number; TON) bereits vollständig inaktiviert. Nach weiteren fünf Runden der Mutagenese wurde auf Grundlage der Variante BM3 F87A eine Mutante mit einer Peroxygenaseaktivität von $k_{\text{cat}} = 50 \text{ min}^{-1}$ und gesteigerter Mindestmolekülumsetzung (TON) von $\text{TON} = 280$ etabliert. Dies entspricht einer 93-fachen Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid, verglichen mit dem wildtypischen Enzym.

Betrachtet man die gemessenen Umsatzraten der elektrochemisch getriebenen Biotransformationen der Varianten BM3 LFVF ($k_{\text{cat}} = 0,105 \text{ min}^{-1}$; $\approx 57 \%$), BM3 328V ($k_{\text{cat}} = 0,117 \text{ min}^{-1}$; $\approx 63 \%$) und BM3 328VA ($k_{\text{cat}} = 0,081 \text{ min}^{-1}$; $\approx 79 \%$) relativ zur NADPH-abhängigen Aktivität, lässt sich diese nicht durch eine Peroxygenaseaktivität der CYPs erklären. Zusätzlich wurde eine sechs stündige elektrochemisch getriebene Biotransformation mit den Varianten angesetzt und mittels HPLC gestützter Analyse untersucht. Über den gesamten Verlauf der Reaktion blieb das Enzym aktiv (reduktiver Strom konstant), sodass das Enzym bei gleichbleibender Aktivität $\approx \text{TON}_{6\text{h}} = 29$ (3), $\approx \text{TON}_{6\text{h}} = 38$ (1) und $\approx \text{TON}_{6\text{h}} = 42$ (2) Substratumsätze ($\text{TON}_{6\text{h}}$) katalysierte. Ohne eine wie zuvor beschriebene Optimierung der Enzymtoleranz gegenüber Wasserstoffperoxid mittels Mutagenese, ist die Peroxygenaseaktivität zur Erklärung der gemessenen Aktivitäten nicht hinreichend. Unter Verwendung der vorgestellten Reaktionsbedingungen ist die Peroxygenaseaktivität aufgrund von kathodisch und/oder enzymatisch am Hämeisen formiertem Wasserstoffperoxid auszuschließen.

5.2 Untersuchung des intramolekularen Elektronentransfers

Zuvor wurde bereits auf den positiven Effekt der Verwendung eines Fusionskonstruktes, bestehend aus einer P450 Reduktase und einer P450 Hämdomäne, für die produk-

5. DISKUSSION

tive elektrochemische Reduktion eingegangen.⁽¹⁰⁶⁾ Bis auf wenige Ausnahmen, sind CYPs auf eine adäquate Bereitstellung von Elektronen (Reduktionsäquivalent) für einen effizienten Substratumsatz angewiesen.^(35, 69, 139) Dabei ist sowohl die Menge an Elektronen als auch die zeitliche Bereitstellung (Takt) von großer Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen stellen meist Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADPH) und Nicotinamidadeninucleotid (NADH) Reduktionsäquivalente in Form von Hydridionen (H^- ; $2e^-$) zur Verfügung.⁽⁹⁵⁾ Cytochrome P450 Reduktasen vermitteln diese Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten, indem sie Hydridionen vom Nicotinamid aufnehmen und einzelne Elektronen an das P450 Hämeisen weitergeben. In ihrer Funktion erfüllen sie die Kriterien eines Akkumulators; Energie wird in chemischer Form (H^-) gespeichert und bei Bedarf als elektrische Energie (e^-) abgegeben (Bioakkumulator). Gleichzeitig legt die Beobachtung einer verringerten Ratenkonstante des Elektronentransfers (k_{ET}) verschiedener Fusionskonstrukte in elektrochemischen Applikationen, die Eigenschaften eines elektrischen Widerstandes der Reduktasen nahe.⁽¹⁸⁾

Die BM3 Reduktase (BMR) besitzt zwei Flavine als prosthetische Gruppen.⁽¹⁰⁵⁾ Ein Hydridion des Nicotinamides wird zunächst auf das Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und in einer direkten Interaktion auf das lediglich 4 Å entfernte Flavin-Adenin-Mononucleotid (FMN) übertragen.^(46, 138) Vom FMN aus werden einzelne Elektronen an das in der P450 Domäne lokalisierte Hämeisen weitergegeben. Der genaue Ablauf der Redoxzustände von FAD und FMN während der Ladungsweitergabe ($Ox \rightleftharpoons Red_{sq} \rightleftharpoons Red_{hq}$) kann zwischen den verschiedenen Reduktasen wie in Abbildung 1.4 gezeigt variieren und ist für die P450_{BM3} Reduktase (BMR) noch nicht abschließend geklärt.⁽⁹⁵⁾ Die beschriebene Elektronenweitergabe innerhalb des Enzyms kann als elektrischer Kreislauf verstanden und wie die Abbildung 5.8 gezeigt, als elektrischer Schaltkreis dargestellt werden.

Der unerwünschte Verlust von Elektronen im Uncoupling, konnte durch die Verwendung der Varianten (1), (2) und (3), wie in Abbildung 4.9 gezeigt, bisher nicht verringert werden. Der Verbrauch an NADPH stieg proportional mit der Anilin Umsetzung, so dass die Coupling Effizienz der Varianten (%) konstant niedrig blieb. Für die weitere Optimierung der Varianten ist ein tieferes Verständnis des intra- und intermolekularen Elektronentransfers wichtig.

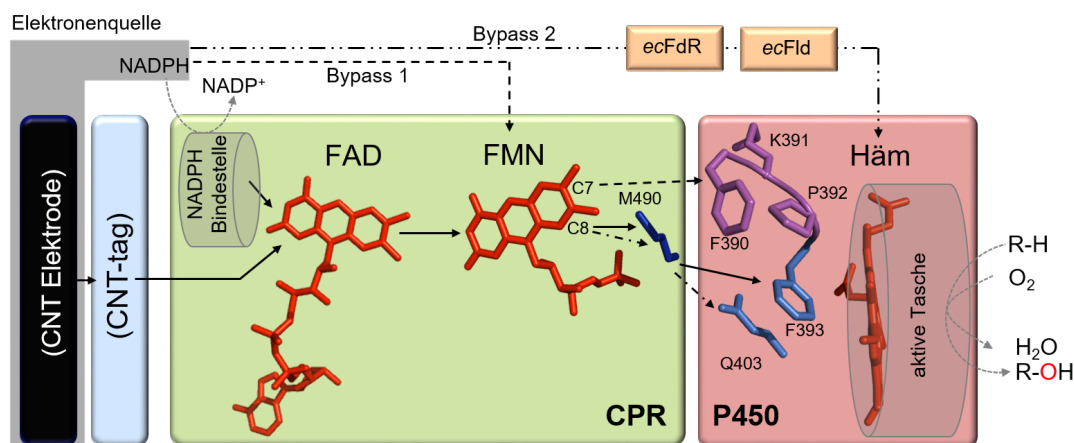


Abbildung 5.8: Elektronenweitergabe im BM3 System. Gezeigt sind die optionale Modifikation mit einem CNT-tag (hellblau) zur elektrochemischen Reduktion des Enzyms, sowie die Bindestelle für NADPH. Die Bypässe 1 und 2 stellen alternative Einspeisungswege für Elektronen dar. Bypass 2 ist von der Interaktion der *E.coli* Enzyme *ecFdR* und *ecFId* abhängig. An der Interaktionsstelle der Reduktase (grün) mit der CYP-Domäne (rot) sind die hier untersuchten theoretischen Elektronentransferwege nach Verma *et al.* zwischen FMN und Hämeisen gezeigt. Die Aminosäuren P392, F393 und Q403 vermitteln die direkte Übertragung von Elektronen auf das Hämeisen. Die Abbildung ist mit freundlicher Genehmigung von Bioelectrochemistry der Veröffentlichung von Darimont *et al.* 2017 entnommen.⁽¹⁴⁾

5.2.1 Notwendigkeit der Flavine zur Produktformation

Im Zuge der elektrochemischen Reduktion stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit beider Flavin, da hier lediglich die Eigenschaft als Widerstand von Bedeutung ist. Bei näherer Betrachtung des in Abbildung 5.8 dargestellten Schaltkreises, sind zwei alternative Punkte für die elektrochemische Einspeisung von Elektronen in das System zu erkennen. Elektronen können theoretisch direkt auf das FMN oder das Hämeisen übertragen werden. Diese Alternativen sind im Schaubild als Bypass 1 (FMN) und als Bypass 2 (Häm) dargestellt.

Die direkte Reduktion des Hämeisens (Bypass 2) mittels NADPH ist aufgrund des fehlenden Akzeptors für ein Hydridion ausgeschlossen. Dennoch wurde in eigenen Versuchen zur NADPH abhängigen Dodekansäure Hydroxylierung mittels hBM3, eine basale und reproduzierbare Produktformation nachgewiesen. Bei genauerer Untersuchung

5. DISKUSSION

konnte diese Aktivität auf die Wechselwirkung des hBM3 mit den *E.coli* eigenen Enzymen Flavodoxin (*ecFld*) und NADPH-Flavodoxin (Ferredoxin) Reduktase (*ecFdR*) zurückgeführt werden. Offensichtlich konnten diese *E.coli* Enzyme durch die IMAC gestützte Isolierung nicht vollständig aus der Lösung entfernt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den bereits beschriebenen Interaktionen anderer CYPs mit nicht natürlichen Reduktionspartnern.^(26, 50) Eine dreistufige Reinigung des hBM3 mittels IMAC, Anionen Austausch Chromatographie (AEX) und Gelfiltration (SEC) konnte die unerwünschten Enzyme vollständig entfernen, sodass keine NADPH abhängige Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte.

Bereits Udit *et al.* haben im Jahr 2004 gezeigt, dass die direkte Elektronenübertragung von einer Elektrode auf das Hämeisen eines mit Pyrenanker gebundenen hBM3 funktioniert. Im Rahmen dieses Experiments wurde die höchste bisher für CYPs gemessene Ratenkonstante des Elektronentransfers $k_{ET} = 650 \pm 50 \text{ s}^{-1}$ erreicht. Die Reduktion des Hämeisens resultierte ausschließlich in der Formation von Wasser und Wasserstoffperoxid.⁽¹³²⁾ In einer 6-stündigen, elektrochemisch getriebenen und von CNT-tag modifiziertem hBM3 (hBM3_{CNT-tag}) katalysierten Dodekansäure Biotransformation, konnte keine Produktformation nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Die experimentellen Ergebnisse decken sich vollständig mit den Literatur gestützten Erwartungen zur Nicotinamid abhängigen und elektrochemischen direkten Reduktion des Enzyms. Die Verwendung des hBM3 ist somit nicht zielführend für die Etablierung einer elektrochemisch getriebenen P450 Applikation.

Mit Hilfe einer verkürzten BM3 Variante wurde die direkte Reduktion des FMN untersucht. Die Reduktase Domäne dieser Variante beinhaltet ausschließlich die FMN bindende Domäne und endet nach dem Serin an Position 664 (S664). Diese Variante wurde bereits 1997 von Hazzard *et al.* elektrochemisch charakterisiert.⁽³⁶⁾ Bedingt durch die fehlende NADPH Bindestelle, ist von einer erschwerten Nicotinamid abhängigen Reduktion des Enzyms auszugehen. Dennoch sollte diese Variante ebenfalls Elektronen in Form von Hydridionen akzeptieren können.

Um eine wie bereits beim hBM3 beobachtete *ecFdR/ecFld* abhängige Aktivität auszuschließen, wurde das BM3_{FMN} ebenfalls mittels einer dreistufigen chromatographi-

schen Reinigung aus dem Lysat isoliert. Die Analyse der NADPH abhängigen Aktivität der Variante BM3_{FMN} , zeigte eine um $\Delta = -99,75 \%$ verminderte Aktivität ($k_{\text{cat}} = 0,109 \text{ min}^{-1}$) verglichen mit dem wildtypischen Enzym. Aufgrund der fehlenden NADPH Bindestelle, ist die Aktivität stark vermindert, die verkürzte Reduktase des BM3_{FMN} kann aber noch immer Hydridionen von NADPH akzeptieren. Das Redoxpotential der Nicotinamide NADPH und NADH unterscheidet sich nicht signifikant voneinander, sodass die starke Präferenz des wildtypischen BM3 Enzyms für NADPH ausschließlich auf die spezifische Bindestelle der Reduktase Domäne zurückzuführen ist.⁽⁹⁸⁾ Ohne diese Bindestelle sollten beide Nicotinamide gleichermaßen als Elektronenquelle für BM3_{FMN} genutzt werden können. Entgegen der Erwartung zeigte auch die Variante BM3_{FMN} eine Präferenz für NADPH, welche jedoch verglichen mit dem wildtypischen Enzym deutlich geringer ausgeprägt ist. In Tabelle 4.5 ist die deutlich schnellere NADH abhängige Reduktion von Cytochrom C ($\approx 30 \%$ von NADPH) gezeigt. Diese spricht für eine geringer ausgeprägte Präferenz, welche sich aber nicht positiv auf die NADH abhängige Dodekansäure Umsatzrate auswirkt. Mutmaßlich ist die Rate der Dodekansäure Hydroxylierung dieser Variante durch den unnatürlichen Redoxzyklus des Flavin-Mononukleotids ($\text{FMN} \rightarrow \text{FMNH}_2 \rightarrow \text{FMNH} \rightarrow \text{FMN}$; vgl. Abbildung 1.4) limitiert. Natürlicherweise wechselt das FMN während der Hämeisen Reduktion zwischen der Hydrochinon- (FMNH_2) und der Semiquinonform (FMNH). Dieser Mechanismus ist für BM3_{FMN} ausgeschlossen, da das FMN vollständig oxidiert werden muss, bevor es ein weiteres Hydridion vom Nicotinamid akzeptieren kann.

Ob das fehlende FAD auch während der elektrochemischen Reduktion eine Hürde darstellt, wurde mit Hilfe einer CNT-tag modifizierten Variante ($\text{BM3}_{\text{FMN}+\text{CNT-tag}}$) untersucht. In einer sechs stündigen elektrochemisch getriebenen und von $\text{BM3}_{\text{FMN}+\text{CNT-tag}}$ katalysierten Biotransformation, konnte die Hydroxylierung von Dodekansäure mittels einer GC-FID gestützten Analyse qualitativ nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Diese Produktbestimmung nach 6 Stunden (Endpunktbestimmung ohne ISTD; $10 \mu\text{L}$ Injektion) erlaubt keine quantitative Aussage über die genaue Umsatzrate der katalysierten Reaktion, doch lieferte die analoge Analyse einer von $\text{BM3}_{\text{CNT-tag}}$ katalysierten Reaktion, in ihrer Intensität vergleichbare Produktpeaks. Eine Negativkontrolle mit $\text{hBM3}_{\text{CNT-tag}}$ ergab erwartungsgemäß keine nennenswerte Produktformation. Die detaillierte Bewertung der elektrochemisch getriebenen Aktivität der Variante $\text{BM3}_{\text{FMN}+\text{CNT-tag}}$ bedarf weitere zukünftige Versuche.

5. DISKUSSION

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse lässt sich zusammenfassen: Die NADPH bindende Domäne ist für eine effiziente Aufnahme von Elektronen in Form von Hydridionen unerlässlich. Wie Girvan *et al.* gezeigt haben kann die Präferenz für NADPH über NADH durch Mutagenese deutlich verändert werden.^{Joyce2012} Für die Weiterleitung von Elektronen vom Nicotinamid ist das Zusammenspiel aus FAD und FMN als „Bioakkumulator“ ($H^- \rightarrow 2 \times 1 e^-$) von hoher Bedeutung, aber nicht zwingend erforderlich. Dies bestätigen ebenfalls erste präparative Versuche zur produktiven elektrochemischen Reduktion des $BM3_{FMN+CNT-tag}$. Tendenziell benötigt das Enzym keinen „Bioakkumulator“, lediglich einen Widerstand zur effizienten Hydroxylierungsaktivität in einer Elektrode. Ob die FMN Domäne einen solchen Widerstand darstellt muss in zukünftigen Versuchen zur Bestimmung der Ratenkonstante des Elektronenverkehrs (k_{ET}) untersucht werden.

5.2.2 Theoretische Elektronentransferwege an der Interaktionsstelle zwischen Reduktase und P450 Domäne

Wie in Abbildung 5.8 dargestellt, findet der Elektronentransfer zwischen FMN und dem Hämeisen an der Interaktionsstelle der beiden Reduktionspartner (Reduction Partner Interaction Site; RPIS) FMN- und P450 Domäne statt. Da viele CYPs auch mit nicht natürlichen Reduktionspartnern interagieren können liegt es nahe, dass diese RPISs ubiquitär in CYPs vorkommen.⁽³³⁾ Der Einfluss einer Modifikation dieser RPISs auf die Aktivität und die Coupling Effizienz ist bereits mehrfach in der Literatur belegt.^(2, 38, 62) Obwohl die Primärstruktur der CYPs stark variiert, finden sich RPISs meist in ähnlichen Regionen (sekundären Strukturen) der Enzyme. Hlavica *et al.* geben in ihrer Arbeit eine Übersicht vieler bereits mittels Mutagenese untersuchter Aminosäurepositionen und listen diese in einer Strukturüberlagerung mit $P450_{BM3}$ auf.⁽³⁸⁾

Bereits in der Veröffentlichung von Gricman *et al.* wurden sechs verschiedene RPISs des CYP153A ($P450_{M.aq.}$) *in silico* untersucht.⁽³³⁾ Der Einfluss einer Modifikation dieser Interaktionsstellen auf die enzymatische Aktivität und die Coupling Effizienz konnte experimentell nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels des zuvor beschriebenen Standard Numerierungssystem für Klasse II CYPs eine Strukturüberlagerung mit $P450_{BM3}$ gezeigt.^(32, 33, 135)

Im Jahr 2013 beschrieben Verma, Schwaneberg und Roccatano sieben theoretische Elektronentransportwege (ETW) zwischen dem FMN und dem Hämeisen der hBM3 Domäne. Diese Elektronentransferwege wurden *in silico* durch eine Molekulardynamik (MD)-Simulation charakterisiert und entsprechend ihrer ermittelten durchschnittlichen Ratenkonstante des Elektronentransfers (k_{ET}) aufgelistet.⁽¹³⁵⁾ Viele der bereits zuvor untersuchten RPISs Positionen (Strukturüberlagerung) sind ebenfalls Teil der theoretischen Elektronentransferwege von Verma *et al.* Auch die von Gricman *et al.* untersuchten RPIS 5 und RPSIS 6 überlagern teilweise mit den für P450_{BM3} simulierten Elektronentransferwegen.⁽³³⁾ Dies ist von besonderer Bedeutung da CYP153A mit der Reduktase des P450_{BM3} interagiert und bereits erfolgreich fusioniert und charakterisiert wurde.^(39, 42, 76)

Der Einfluss dieser RPISs lässt sich mit Hilfe des Zusammenhangs der Ratenkonstante des Elektronentransfers und der enzymatischen Aktivität erklären. Die Variation unterschiedlich effizienter Reduktionspartner (RPISs), nimmt Einfluss auf die Ratenkonstante des Elektronentransfers und die resultierende enzymatische Aktivität.^(15, 18) Im Rahmen dieser Arbeiten wurde eine negative Korrelation des k_{ET} Wertes und der elektrochemisch getriebenen Aktivität und Coupling Effizienz festgestellt. Gleichzeitig ist die enzymatische Aktivität auf die Elektronenübertragung angewiesen, sodass die Ratenkonstante k_{ET} limitierend für den Substratumsatz ist.⁽⁴⁷⁾ Werden Elektronen wie *in silico* simuliert, entlang dieser ETWs transportiert kann die Ratenkonstante k_{ET} durch gezielten Aminosäureaustausch reguliert werden. Im Fall der stark entkoppelten BM3-katalysierten Anilin Hydroxylierung ($\leq 5\%$), liegt eine Limitierung der Elektronenzufuhr zur Optimierung der Aktivität und Coupling Effizienz nahe.

Zu diesem Zweck wurden die drei effektivsten von Verma *et al.* beschriebenen ETWs (ETW1, ETW2 und ETW3), als Grundlage für eine ETW Knock-Out Bibliothek ausgesucht.⁽¹³⁵⁾ Der ETW1 beinhaltet die Positionen F390, K391 und P392, der ETW2 die Positionen M490 und F393 und der ETW3 die Positionen M490 und Q403 (Abbildung 5.8). Diese Bibliothek ist folgendermaßen konzipiert: Alle zu einem ETW gehörigen Positionen werden nacheinander, bis zur vollständigen Substitution eines ETW ausgetauscht; jeder ETW wird einzeln blockiert. Für jede Modell Proteinvariante (1), (2) und (3) wurde eine gesonderte Mutantenbibliothek erstellt.

5. DISKUSSION

Die Wahl einer adäquaten Aminosäure zur Substitution ist von größter Bedeutung. Der Elektronentransfer im BM3 System wurde von Verma *et al.* auf Grundlage des Tunnel-effektes berechnet, kann jedoch ebenfalls nach dem als "Hopping" bezeichneten Mechanismus erfolgen. Beim Tunneln von Elektronen spielt die Überlagerung von Orbitalen des Elektronendonors (D), der weiterleitenden Aminosäure (bridge) und des Akzeptors (A) eine entscheidende Rolle (Abbildung 5.9). Eine Übersicht über die Elektronentransfermechanismen in Peptiden und den Einfluss der Aminosäureseitenketten ist in den Veröffentlichungen von Shah *et al.* 2015 und Cordes *et al.* 2008 gegeben.^(12, 118) Die bridge Aminosäure wird während der Elektronenweiterleitung nicht reduziert, das Elektron tunnelt lediglich entlang der überlappenden Orbitale bis zum Akzeptor. Im Gegensatz dazu, werden beteiligte Aminosäurereste während des Hopping Mechanismus reduziert und stellen eine tatsächliche Zwischenstation für den Elektronentransport dar.

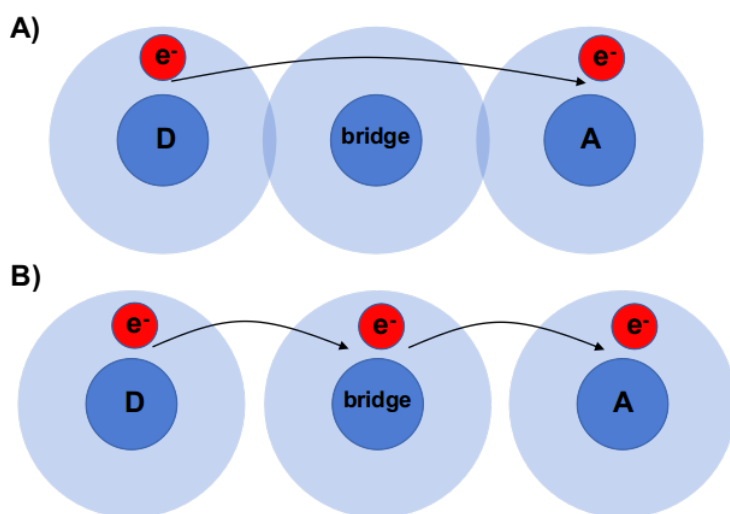


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung der Elektronentransfermechanismen Tunneling und Hopping. A) Während des Tunneln von Elektronen werden lediglich überlappende Orbitale zur Elektronenweiterleitung genutzt. B) Beim Hopping überlagern die Orbitale der beteiligten Aminosäurereste nicht und stellen einen tatsächlichen temporären Aufenthaltsort des Elektrons dar. Der Rest wird reduziert und anschließend oxidiert.

Mit steigender Entfernung ($\geq 20 \text{ \AA}$) von D und A nimmt der Einfluss des Hopping zu, die bridge stellt in diesem Fall eine tatsächliche Zwischenstation (relay) des Elektrons dar.^(12, 118) Für die Substitution der ETW Positionen wurde deshalb Alanin

ausgewählt. Alanin als kleinste Aminosäure verringert, die Wahrscheinlichkeit einer Orbitalüberlagerung von D, bridge und A und stellt durch sein verhältnismäßig schlechtes Redox-Verhalten (schwer zu oxidieren) ein schlechtes relay dar.^(12, 118) Ausgehend von diesen Eigenschaften wurde mit steigendem Substitutionsgrad eines ETW, mit einer verringerten K_{ET} gerechnet, welche sich positiv auf die Coupling Effizienz und auf die Aktivität auswirken sollte.

Nikotinamid-abhängige Charakterisierung der Bibliothek

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden alle erfolgreich exprimierte Mutanten auf ihre NADPH Verbrauchsraten und Substratumsatzraten untersucht und diese zu Couplingraten verrechnet. Tatsächlich konnten mehrere Mutanten mit signifikant erhöhten Coupling- und Umsatzzraten identifiziert werden. Wie zuvor vermutet konnte ein klarer positiver Zusammenhang zwischen der Coupling- und der Substratumsatzrate beobachtet werden.^(2, 38, 62) Die aktivsten Mutanten innerhalb einer Bibliothek zeigten die höchsten Couplingraten, während die am wenigsten aktiven Mutanten die verhältnismäßig niedrigsten Couplingraten aufwiesen.

Betrachtet man die Bibliothek der Variante (1), so ist der Effekt des vollständigen ETW2 Knock-Out besonders stark ausgeprägt. Wie zuvor vermutet wird der Effekt des Einzelpositions-austausches (393 oder 490) deutlich durch den vollständigen Knock-Out von ETW2 übertroffen. Diese Tendenz gilt ebenfalls für den Knock-Out von ETW3, der zusätzliche Effekt einer vollständigen Substitution ist verglichen mit ETW2 deutlich geringer.

Die Substitution einzelner Positionen des ETW1 zeigen einen größeren Einfluss auf die enzymatische Aktivität als dies für andere ETWs der Fall ist, eine eindeutige Tendenz oder Steigerung durch einen höheren Grad der Substitution ist nicht erkennbar. Bei den Elektronentransferwegen ETW2 und ETW3 handelt es sich um nicht benachbarte, unabhängige und somit in ihrem Abstand voneinander variable Aminosäuren, deren Interaktion im Elektronentransfer vom Minimalabstand determiniert ist. Dieser

5. DISKUSSION

Minimalabstand hängt von der Bewegung der Enzymdomänen, der einzelnen Motive sowie der Seitenkettengröße der Aminosäuren selbst ab. Dabei gilt: Mit steigender Größe der Seitenkette steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion der einzelnen ETW Positionen.

Die am ETW1 beteiligten Positionen sind direkt benachbart, sodass weitere Faktoren die Interaktion dieser Aminosäuren beeinflussen können. In Peptidketten ($n \geq 3$) tragen vor allem Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrates zur Elektronenweiterleitung bei, diese werden maßgeblich durch die Aminosäuresequenz bzw. durch die daraus resultierende Sekundärstruktur bestimmt.⁽¹¹⁸⁾ Somit könnten Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren das Erkennen einer Tendenz deutlich erschweren.

Zusammenfassend konnte die Aktivität durch Knock-out aller ETWs in Bibliothek (1) positiv beeinflusst werden, die deutlichste Steigerung erbrachte dabei die vollständige Substitution des ETW2. Ein ähnlich starker Effekt auf die Enzymaktivität konnte ebenfalls für die ETW1 Doppelaustausch Mutante (2e; BM3 328V F390A/P392A) aus Bibliothek (2) nachgewiesen werden. Wie von Verma und Mitarbeitern simuliert, findet der Elektronentransfer im BM3 System nicht ausschließlich über einen der vorgestellten ETWs statt. Durch Modifikation einzelner Wege kann der Elektronentransfer unterschiedlich stark beeinflusst werden. Aufgrund einer nicht eindeutig erkennbaren Tendenz der Bibliotheken (2) und (3), konnte im Rahmen dieser Arbeit keine experimentelle Einstufung der ETWs in ein Ranking erbracht werden.

Elektrochemische Charakterisierung der Bibliothek

Vor dem Hintergrund einer bis zu 13-fach gesteigerten NADPH-abhängigen Aktivität der ETW Mutanten, wurde die elektrochemisch getriebene Aktivität aller Mutanten bestimmt. Auch in diesem System zeigten die Substitutionen von ETW Positionen einen eindeutigen Effekt auf die enzymatische Aktivität. Im Gegensatz zu den vorherigen Beobachtungen, wurde die elektrochemisch getriebene, enzymatische Aktivität durch beliebige Mutationen einer ETW Position drastisch reduziert. Während die meisten Mutanten keine elektrochemisch getriebene Aktivität aufwiesen, erreichte die Mutante (3a; BM3 328VA F390A) der Bibliothek (3) die höchste restliche Aktivität

von 17 %. Im Vergleich zu den vorherigen NADPH-abhängigen Versuchen zeigte sich ein eindeutig negativer Zusammenhang: Mutanten mit stark gesteigerter Nikotinamid-abhängigen Aktivität zeigten keine elektrochemisch getriebene Aktivität, während die zuvor wenig beeinflussten Mutanten die höchsten elektrochemisch getriebenen Restaktivitäten aufwiesen. Um dieser Beobachtung auf den Grund gehen zu können wurde die Ratenkonstante des Elektronentransfers genauer untersucht.

Bestimmung der unabhängigen Ratenkonstante K_{ET}

Eine Interpretation der gegensätzlichen Beobachtungen der Nicotinamid abhängigen und elektrochemischen enzymatischen Aktivitäten erfordert den tieferen Einblick in die Auswirkungen der ETW Modifikation auf den Elektronentransfer innerhalb des BM3 Systems.

Für die Bewertung der Elektronenübertragung kann die Ratenkonstante der Elektronenübertragung (k_s) herangezogen werden. Diese ist abhängig vom jeweiligen Überpotenzial (η) einer Redoxspezies ($k_s(\eta)$) und errechnet sich wie in Gleichung 5.9 gezeigt aus dem Peakstrom (I_p) und der übertragenen Ladung (Q):⁽²²⁾

$$k_s(\eta) = \frac{I_p}{Q} \quad (5.9)$$

Mit steigender Scanrate nehmen sowohl I_p als auch η bei konstantem Q zu. Das beispielhafte P450_{BM3} Voltammogramm in Abbildung 5.7 zeigt ein eindeutiges Überpotenzial ($\eta = E_{pk} - E_0$), welches sich aus der diffusionsbeschränkten Übertragung der Elektronen auf das Hämeisen ergibt. Da diese Diffusionsbeschränkung für jedes Elektroden adsorbierte P450 System variiert, sind diese Ratenkonstanten ($k_s(\eta)$) nicht direkt vergleichbar.

Um dennoch verschiedene Systeme miteinander vergleichen zu können wird standardmäßig die unabhängige Ratenkonstante des Elektronentransfers K_{ET} (s^{-1}) herangezogen.⁽⁶⁵⁾

5. DISKUSSION

Diese ist definiert als:

$$k_{\text{ET}} = k_{\text{s}}(\eta = 0) \quad (5.10)$$

Da das Überpotenzial ($\eta(v)$) eine lineare, positive Funktion der Scanrate darstellt, wird aus diesem Zusammenhang eine theoretische Ratenkonstante in einem diffusionslosen System errechnet und zum Vergleich herangezogen.

Für die Bestimmung der K_{ET} wurden exemplarisch, die elektrochemisch relativ aktivste ETW Mutante (**3a**), sowie die zugehörige Modell Proteinvariante (**3**) untersucht. Durch Substitution einer ETW Position (F390A) verringerte sich K_{ET} auf ca. 1,5 % ($k_{\text{ET}} = 0,006 \text{ s}^{-1}$) des ursprünglichen Wertes ($k_{\text{ET}} = 0,42 \text{ s}^{-1}$). Der partielle Knock-out des ETW1 stellt offensichtlich einen signifikanten Widerstand für die Elektronenübertragung dar.

Zusammenfassend zeigten die ETW Mutanten eine verbesserte NADPH abhängige Aktivität und Coupling Effizienz, sowie eine stark reduzierte elektrochemisch getriebene Aktivität, bei gleichzeitig verringerten k_{ET} Werten. Anhand der niedrigeren k_{ET} Werte der getesteten Mutanten, kann auf einen zusätzlichen Widerstand für die Elektronenübertragung durch Mutation der ETWs geschlossen werden.

Diese Daten legen folgende Schlussfolgerung nahe: Unter Verwendung des Nicotinamids NADPH zur Hämeisen Reduktion der Modell Proteinvarianten und des wildtypischen Enzyms, kommt es zu einer Überversorgung mit Elektronen. Diese resultiert im Verlust vieler Elektronen in der Shunt Nebenreaktion. Der hohe Verlust ist als niedrige Coupling Effizienz der enzymatischen Reaktion sichtbar.

Wird durch Mutagenese der ETWs ein zusätzlicher Widerstand geschaffen und die Elektronenübertragung verlangsamt, können die übertragenen Elektronen effizienter für den Substratumsatz genutzt werden. Die Coupling Effizienz der ETW Mutanten ist daher im Vergleich zu den Modell Proteinvarianten erhöht.

Die niedrige Ratenkonstante der Elektronenübertragung der Modell Proteinvariante (**3**; $0,42 \text{ s}^{-1}$) während der elektrochemischen Reduktion, spricht für eine erschwerte

Elektronenübertragung, verglichen zu NADPH. In diesem System liegt keine Überversorgung mit Elektronen vor, sodass der Elektronentransport durch einen zusätzlichen Widerstand (ETW Mutation), unter einen für den Substratumsatz kritischen Wert gedrosselt wird. Die ETW Mutanten sind in ihrer Aktivität durch die niedrige Ratenkonstante ($k_{ET} = 0,006 \text{ s}^{-1}$) limitiert. Tatsächlich liegen diese k_{ET} Werte sogar unterhalb der von Sadeghi *et al.* veröffentlichten Ratenkonstanten des CYP3A4-CPR ($k_{ET} = 1$) und CYP3A4-Fld ($k_{ET} = 0,6$).⁽¹⁸⁾ Im Umkehrschluss legen die oben beschriebenen Ergebnisse eine Optimierung der elektrochemisch getriebenen CYP Aktivität durch eine marginale Erhöhung des Elektronentransports nahe. Wie bereits besprochen kann der Elektronentransport entlang der ETWs nicht gezielt durch eine einfache rationale Mutagenese der beteiligten Aminosäuren gesteuert werden. Allerdings führte die Implementierung von Alaninresten in allen Experimenten zu einer verringerten elektrochemisch, enzymatischen Aktivität, sodass die Auswahl der verwendeten Aminosäure ebenfalls maßgeblich zur Optimierung beitragen kann.

5.3 Validierung der elektrochemisch, enzymatischen Aktivitäten mittels qualitativer HPLC Analytik

Im bisherigen Verlauf konnte eindeutig die elektrochemisch getriebene, enzymatische Anilin Hydroxylierung mittels oxidativer Detektion gezeigt werden. Diese Hydroxylierungsaktivität erreichte ein maximales Aktivitätsniveau von 78 %, verglichen mit der Nikotinamid-abhängigen Reaktion der Modell Proteinvariante (3). Für eine zweifelsfreie Verifikation der elektrochemisch getriebenen Aktivität einer BM3_{CNT-tag} Variante, sollte diese ebenfalls mit einer unabhängigen Analysemethode bestätigt werden. Die Detektion mittels HPLC-DAD ist auf den getesteten Konzentrationsbereich von $\geq 5 \mu\text{M}$ limitiert, sodass die Analyse einer 6-stündigen elektrochemisch, enzymatischen Biotransformation unter der Annahmen in Gleichung 5.11 erwartungsgemäß ohne eindeutigen Nachweis blieb:

5. DISKUSSION

$$N_{AP} = N_{P450} K_{cat} t \quad (5.11)$$

$$N_{P450} = 23,7 \text{ pmol}$$

$$K_{cat} = 0,105 \text{ min}^{-1}$$

$$t = 360 \text{ min}$$

Unter den angegebenen Werten ergibt sich eine theoretische Stoffmenge von 896 pmol Aminophenol. In einem Reaktionsvolumen von 200 μL entspricht dies eine Konzentration von $\approx 1,8 \mu\text{M}$, welche sich zusätzlich auf die Produktisomere *p*- und *o*-Aminophenol verteilt.

Alternativ wurde die Messung mit einem für aromatische Verbindungen sensitiven Fluoreszenz Detektor (FLD) beobachtet.⁽¹²⁷⁾ Diese Methode weist eine niedrigere getestete Detektionsgrenze von $\geq 0,5 \mu\text{M}$. Das Substrat und die erwarteten Produktisomere sind die einzigen aromatischen Verbindungen im Reaktionsansatz, sodass die Identifizierung gegenüber der DAD Detektion erleichtert ist. Anhand der Retentionszeiten (Abbildung 7.5) konnte ein eindeutiger, qualitativer Nachweis der erwarteten Hydroxylierungsprodukte erbracht werden.

Die qualitative Analyse einer 6-stündigen elektrochemisch getriebenen Biotransformation konnte sowohl die produktive Reduktion des *via* CNT-tag gebundenen Enzyms auf einer CNT Elektrode als auch die positive oxidative Beobachtung der enzymatischen Aktivität bestätigen. Eine quantitative Validierung war aufgrund der geringen Stoffmenge an reduzierbarem Enzym und der geringen Elektrodenoberfläche bisher nicht möglich.

5.4 Bewertung der dreidimensionalen ElektroZym Applikation

Bereits mehrere Veröffentlichungen berichten von einer erfolgreich Etablierung der produktiven, elektrochemischen Reduktion diverser P450 Enzyme. Die meisten vorgestellten Systeme sind durch eine geringe Elektrodenfläche und die resultierende geringe

Oberflächenkonzentration an reduzierbarem Enzym limitiert. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer elektrochemisch aktiven P450_{BM3} Variante, welche sich selbständig an eine CNT-basierte Elektrode assembliert und *in situ* charakterisiert werden kann. Diese Variante wurde, wie zuvor beschrieben, zunächst mit Hilfe einer herkömmlichen planaren Siebdruck CNT Elektrode untersucht. Anschließend wurde im Rahmen des ElektroZym Projekts dieses Enzym für die Entwicklung einer dreidimensionalen CNT Elektrode am kooperierenden Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institutes an der Universität Tübingen (NMI) genutzt. Die planare Oberfläche einer Gold Elektrode wird, wie in Abbildung 5.5 C gezeigt, durch Polymerisation einer aufgelagerten, porösen Solgel Matrix dreidimensional erweitert. Die Schichtdicke der Matrix kann durch die Dauer der Polymerisationsreaktion bestimmt werden. Da die Matrix in einem CNT-Enzym-haltigen Puffer polymerisiert wird, sind die CNT-Enzym Komplexe gleichmäßig in der Matrix verteilt. Die CNTs werden durch ein nachträglich, innerhalb dieser Matrix, polymerisiertes Netzwerk aus Poly-3,4-ethylendioxythiophen (PEDOT) Nanodrähten elektrisch an die Gold Elektrode angeschlossen.

Als Vergleichssystem diente eine wie in Abbildung 5.5 B gezeigte planare Solgel Matrix mit einem Monolayer P450_{BM3} auf einer kommerziellen Siebdruck CNT Elektrode. Die CNT Elektrode wurde zunächst in Enzym-haltigem Puffer inkubiert. Während dieser Zeit kann das CNT-tag modifizierte Enzym sich an der Oberfläche assemblieren. Anschließend wurde wie bereits zuvor eine Solgel Matrix aufgelagert polymerisiert. Der Enzym Monolayer wird durch die Solgel Matrix auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert. Alle Enzymmoleküle die keinen direkten Kontakt zur Elektrodenoberfläche besitzen, sind nicht elektrisch angeschlossen und können folglich nicht reduziert werden.

Obwohl für beide Elektrodensysteme eine identische Konzentration an P450_{BM3} in Lösung verwendet wurde, unterscheiden sich beide Ansätze in der reduzierbaren Stoffmenge an Enzym. Geht man von einer identischen enzymatischen Umsatzrate in beiden Systemen aus, belegt der deutlich höhere Detektionstrom der dreidimensionalen Applikation ($I_{pk} \approx 22$ nA) verglichen zum „planaren“ Aufbau ($I_{pk} \approx 7$ nA) eine höhere reduzierbare Stoffmenge an CYP pro Flächeneinheit.

5. DISKUSSION

Das Enzym konnte in seiner aktiven Konformation in einer Solgel Matrix immobilisiert und durch Polymerisation des leitenden PEDOT Polymers *via* CNTs elektrisch an eine Gold Elektrode angeschlossen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass mittels dieser Technik größere Stoffmengen pro Flächeneinheit auf einer Elektrode immobilisiert und reduziert werden können. Die spezifische Produktleistung der Applikation konnte durch den dreidimensionalen Elektrodenaufbau verdreifacht werden.

6

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Limitation einer geringen spezifischen Produktleistung der bisher etablierten elektrochemisch getriebenen P450 Applikationen überwunden werden. Ziel war eine vielschichtige Immobilisierung des CYP in einem dreidimensionalen, auf einer Solgel Matrix basierten Elektrodenaufbau. Die kovalente Immobilisierung von CYP Enzymen auf einer planaren Elektrodenoberfläche führt im Idealfall zu einer einfachen Oberflächenbedeckung (Monolayer) der Elektrode mit reduzierbarem Enzym. Die Verwendung von leitenden Polymeren zur Immobilisierung kann eine höhere Oberflächenbedeckung erreichen (Multilayer), erlaubt aber weder eine determinierte Orientierung der Enzyme, noch eine vorgegebene Interaktionsstelle zwischen Enzym und Elektronenquelle.

Daher wurde ein optimiertes CYP Enzym für den Einsatz auf Kohlenstoff Nanoröhren (CNT) basierten Elektroden etabliert. Als Enzym diente das CYP 102A1 aus *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}). Die Wahl dieses Enzyms beruht auf den im Folgenden dargestellten Eigenschaften: Das P450_{BM3} (BM3) ist ein natürliches Fusionskonstrukt, bestehend aus einer NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase- (CPR) und einer P450-Domäne. Daher ist die Elektronenversorgung der P450 Domäne unabhängig (autark) von zusätzlichen Reduktasen. Die CPR des BM3 (BMR) wurde darüber hinaus bereits erfolgreich z.B. von Hoffmann *et al.* 2016 mit anderen P450 Domänen fusioniert.⁽³⁹⁾ Die gute Expressierbarkeit in *Escherichia coli*, sowie die hohe Stabilität des Enzyms *in vitro* erlauben die Aufbereitung großer Stoffmengen an gereinigtem Enzym.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Als Ausgangspunkt wurde eine „planare“ mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren (MWCNT) Siebdruck Elektrode verwendet. Das BM3 wurde mit einer zusätzlichen C-terminal lokalisierten und CNT affinen Peptidsequenz (CNT-tag) modifiziert. Diese ursprünglich von Li *et al.* vorgestellte Sequenz sollte die Solubilisierung von CNTs in wässrigen Lösungen verbessern ohne die Oberflächeneigenschaften zu verändern.⁽⁷²⁾ Diese erlaubt die eigenständige und orientierte Anlagerung des Enzyms an der Oberfläche von CNTs. Nach unserem Wissen wurde erstmals ein gentechnisch mit einem CNT-tag Anker-molekül modifiziertes Enzym für den Einsatz auf einer Elektrode konzipiert. Dieses Enzym benötigt keine weitere Aufarbeitung und kann direkt mit Hilfe einer unbehandelten CNT Elektrode elektrochemisch charakterisiert werden.

Aufgrund der geringen Elektrodenoberfläche und der resultierenden Oberflächenkonzentration an aktivem Enzym, ist die klassische gaschromatographische Analyse eines Extraktes der elektrochemisch getriebenen Biotransformation zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität nicht möglich. Alternativ zur Analyse eines Extraktes wurde eine direkte *in situ* Analyse der Aktivität angestrebt.

Als Substrat wurde Anilin ausgesucht, da das wildtypische P450_{BM3} Anilin zum elektrochemisch aktiven Aminophenol umsetzen kann.⁽¹⁷⁾ Da entgegen der Erwartung kein messbarer Umsatz von Anilin für BM3 mittels HPLC-gestützter Analyse einer 24-stündigen Biotransformation nachgewiesen werden konnte, wurde eine fokussierte BM3 Bibliothek auf den Umsatz von Anilin gescreent. Die vier aktivsten Mutanten wurden für die Modifikation mit einem CNT-tag ausgesucht und erfolgreich exprimiert und isoliert.

Die vier CNT-tag modifizierten Mutanten wurden im Folgenden sowohl mit Hilfe der Nicotin-amid-abhängigen als auch mit der elektrochemischen Reduktion charakterisiert. Der CNT-tag verminderte die Aktivität der ausgesuchten Enzyme nur marginal (ca. 15 %) und erlaubte eine eindeutige und reproduzierbare Bestimmung der Nicotinamid abhängigen Aktivität und Coupling Effizienz jedes Enzyms. Obwohl die Umsatzrate der Mutanten deutlich höher als die des wildtypischen Enzyms sind, ist die Coupling Effizienz der Mutanten vergleichbar gering.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mittels zyklischer Voltammetrie (CV) konnte eindeutig belegt werden, dass der CNT-tag zu einer verbesserten elektrischen Ansprechbarkeit des Enzyms gegenüber dem nicht modifizierten BM3 beiträgt. Während für das wildtypische Enzym auch *in situ* (oxidativ) keine initiale Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigte eine elektrochemisch getriebene Biotransformation mit einem CNT-tag modifizierten BM3 einen eindeutigen Anstieg des oxidativen Detektionsstroms an der Glaskohlenstoffelektrode. Die Enzyme erreichten eine elektrochemisch getriebene Aktivität von $0,105 \text{ min}^{-1}$ (1), $0,117 \text{ min}^{-1}$ (2) und $0,081 \text{ min}^{-1}$ (3). Dies entspricht einer jeweiligen relativen Aktivität von 57 %, 63 % und 78 % verglichen mit den Nicotinamid-abhängigen Werten (Abbildung 6.1; linke Seite).

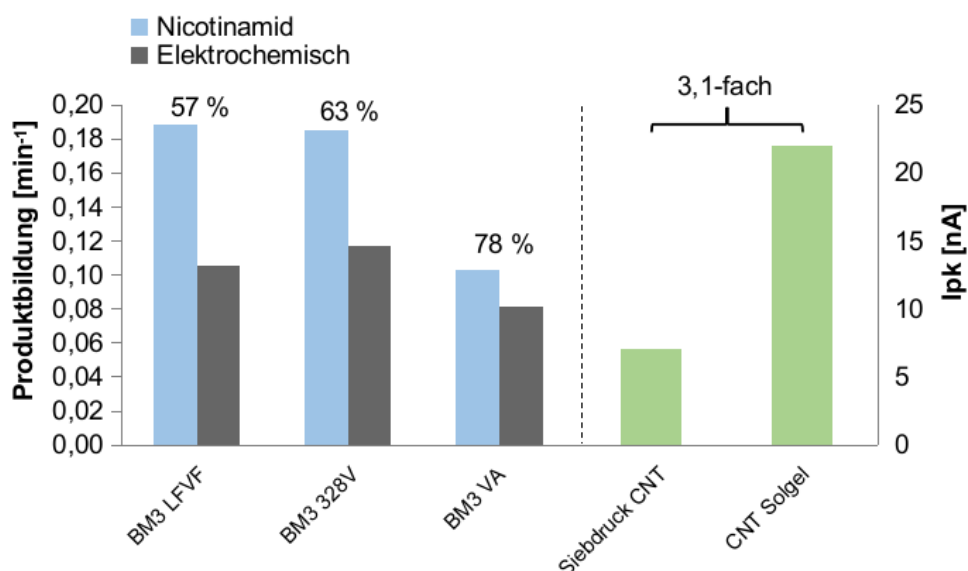


Abbildung 6.1: Übersicht der erreichten Ziele zur Etablierung einer elektrochemisch getriebenen Cytochrom P450 Monooxygenase. Links werden die Nicotinamid-abhängigen und elektrochemischen Aktivitäten der drei aktivsten CNT-tag Varianten gegenübergestellt. Rechts sind die Detektionsströme (I_{pk}) der planaren Siebdruck CNT Elektrode und der dreidimensionalen CNT-Solgelektrode mit der BM3 LFVF Variante gegenübergestellt.

Nach momentanem Wissensstand wurde erstmals ein P450 Enzym ohne post-expressionale Modifikation auf einer nicht modifizierten Elektrode, ohne Polymer- oder Detergenz- vermittelter Immobilisierung in determinierter Orientierung assembliert

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

und kann elektrochemisch produktiv reduziert werden.

Da die Enzyme auf molekularen Sauerstoff in Lösung angewiesen sind, konnte die Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid nicht vollständig ausgeschlossen werden. Diese Nebenreaktion ist unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ($\text{pH} \geq 8$) an CNT Elektroden zwar unwahrscheinlich, dennoch wurde dem Reaktionspuffer stets Katalase zugegeben. Diese fängt potenziell an der Kathode gebildetes Wasserstoffperoxid vollständig ab. Die Formierung von Wasserstoff am katalytisch aktiven Hämeisen der elektrochemisch getriebenen Enzyme durch Uncoupling kann nicht verhindert werden. Die Wasserstoffperoxid abhängige Peroxygenaseaktivität kann jedoch aufgrund der hohen elektrochemisch getriebenen Umsatzraten (bis zu 78 % vgl. NADPH-abhängige Reaktion) und der langen Lebensdauer ($\text{TON} = 42$) der Enzyme als treibende Kraft der Aktivität ausgeschlossen werden.

Die Immobilisierung der Enzyme auf der Siebdruck CNT Elektrode mittels Polymerisation einer Solgel Matrix hatte keinen Einfluss auf die CNT-tag vermittelte Anlagerung der Enzyme auf der CNT Oberfläche. Die Diffusion des Substrats und der katalytisch formierten Produkte wurde von der Solgel Matrix nicht beeinträchtigt. Es wurde gezeigt dass Enzym-CNT Komplexe innerhalb einer Solgel Matrix immobilisiert und mittels des leitfähigen PEDOT Polymers elektrisch an eine Elektrodenoberfläche angeschlossen werden können. Dieser Aufbau erreichte unter Verwendung der selben Enzymmenge wie zuvor mit der Siebdruck Elektrode eine ca. 3-fache Aktivität bei gleicher Elektrodenoberfläche (Abbildung 6.1; rechte Seite). Im Gegensatz zu vorherigen elektrochemischen P450 Applikationen, vereint die CNT Solgel Matrix Elektrode alle bereits beschriebenen Vorteile des CNT-tag modifizierten Enzyms mit einer höheren Oberflächenkonzentration des Enzyms auf der Elektrodenoberfläche. Des Weiteren wird das Enzym in einer amphiphilen Umgebung immobilisiert, welche sowohl den Zugang eines eher lipophilen Substrats wie Anilin gewährleistet und gleichzeitig das hydrophile Enzym stabilisiert. Mit der erhöhten Oberflächenkonzentration wird die spezifische Produktleistung der P450 Elektroden Applikation ohne weitere Optimierung der enzymatischen Aktivität auf ein 3-faches Niveau verbessert.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Optimierung der katalytischen Aktivität stellt eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der spezifischen Produktleistung dar. Eine solche Optimierung erfordert ein tieferes Verständnis des intra- und intermolekularen Elektronentransfers (FAD → FMN; FMN → Häm-eisen) innerhalb der P450_{BM3} Systems. Anhand einer Alaninscan Mutantenbibliothek konnte experimentell gezeigt werden dass drei zuvor *in silico* für P450_{BM3} simulierte Elektronentransferwege tatsächlich zum Elektronentransfer beitragen. Durch Aminosäureaustausch konnte die Ratenkonstante des Elektronentransfers entscheidend beeinflusst werden. Diese Veränderung bewirkte eine bis zu 13-fache Steigerung der Nicotinamid abhängigen, enzymatischen Umsatzrate mit Anilin und eine bis zu 32-fache erhöhte Coupling Effizienz (Abbildung 6.2).

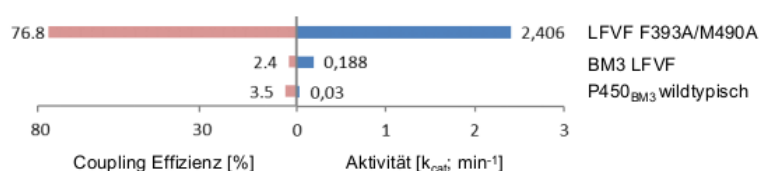


Abbildung 6.2: Übersicht über die Aktivitäten und Coupling Effizienzen des wildtypischen BM3, sowie der Modell Protein Variante BM3 LFVF und deren Elektronentransferweg Mutante F393A/M490A.

Gleichzeitig wurde eine beinahe vollständige Unterdrückung der elektrochemisch getriebenen Aktivität durch Mutation der Elektronentransferwege beobachtet. Es wurde experimentell gezeigt, dass durch Mutation der Elektronentransferwege die Ratekonstante des Elektronentransfers stark verringert wurde (Abbildung 6.3).

Auf Grundlage dieser gegensätzlichen Ergebnisse, je nach Reduktionsmechanismus, wird von einem Überangebot an Elektronen bei NADPH und einer gerade ausreichenden Versorgung durch die elektrochemisch Reduktion ausgegangen. Die Überversorgung mit Elektronen resultiert in einer niedrigen Coupling Effizienz, welche bei Verringerung der Ratenkonstante des Elektronentransfers durch Mutation der Elektronentransferwege positiv beeinflusst wird. Die verbesserte Coupling Effizienz spiegelt sich ebenfalls in einer deutlich erhöhten Nicotinamid-abhängigen Aktivität der mutierten Enzyme wider. Die elektrochemische Reduktion hingegen liefert bereits wenige Elektronen an das Hämeisen (vgl. K_s), sodass durch Mutation der Elektronentransferwege

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

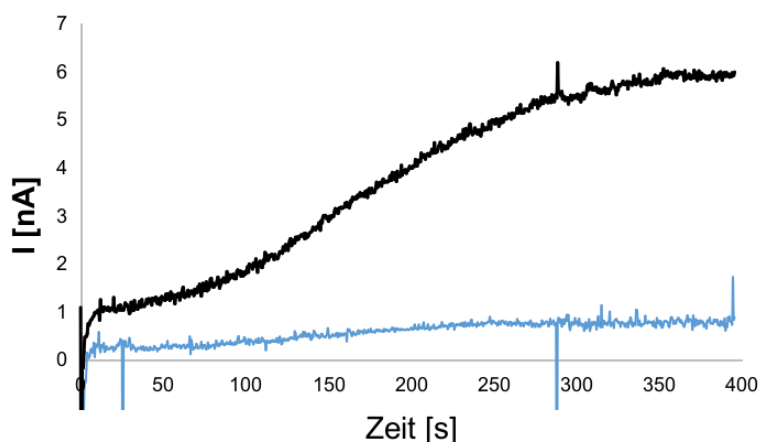


Abbildung 6.3: Oxidative Produktdetektion am Beispiel der Enzyme BM3 LFVF und deren Elektronentransferweg Mutante LFVF F393A. Die niedrige Ratenkonstante des Elektronentransfers der Elektronentransferweg Mutanten ist nicht ausreichend für die effiziente elektrochemisch getriebene Produktbildung.

nicht mehr ausreichend Elektronen zur Verfügung stehen. Eine weitere Verringerung der Ratenkonstante des Elektronentransfers ist für die Optimierung der elektrochemisch getriebenen Aktivität nicht zielführend.

Es wurde gezeigt dass eine vollständige (FAD-und FMN-Domänen) Reduktase für die Nicotinamid-abhängige Aktivität von höchster Bedeutung ist. Dies ist einerseits auf die NADPH Bindestelle zurück zu führen, welche die Bindung und die Übertragung eines Hydridions an das FAD begünstigt. Andererseits kann das FMN des BM3_{FMN} Enzyms ebenfalls Hydridionen aufnehmen und einzelne Elektronen an das Hämeisen übertragen. Die Aktivität scheint aber nicht ausschließlich durch die fehlende NADPH Bindestelle limitiert zu sein. Diese könnte ebenfalls durch einen nicht natürlichen Reduktionszyklus des FMN bedingt sein. Ohne das FAD, muss das FMN nach der Aufnahme einer Hydridions zunächst vollständig oxidiert werden bevor es wieder reduziert werden kann. Natürlicherweise wechselt das FMN im Gesamtkonstrukt der Reduktase, zwischen den Redoxstadien eines Hydro- und Semiquinons. Erste Versuche zur elektrochemischen Reduktion des BM3_{FMN} deuten auf einen adequaten Elektronentransfer für die enzymatische Aktivität hin.

Bezogen auf die Ziele des ElektroZym Projekts, konnte eine selbstassemblierende

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

P450 Variante etabliert werden, deren elektrochemisch getriebene Aktivität *in situ*, anhand der oxidativen Quantifizierung des Hydroxylierungsprodukts Aminophenol, verfolgt werden kann. Die reduzierbare Stoffmenge an Enzym auf der Oberfläche einer planaren MWCNT Elektrode konnte eindeutig und reproduzierbar quantifiziert werden. Mit diesem Faktor konnte die elektrochemisch getriebene Aktivität der vorgestellten Varianten bestimmt und mit den Nicotinamid-abhängigen Aktivitäten verglichen werden. Die Varianten wurde erfolgreich eingesetzt um in einem ersten „proof-of-concept“ Versuch eine dreidimensionale CNT-Solgelelektrode zu testen.

In weiterführenden Arbeiten sollte zunächst die Bestimmung der Ratenkonstante des Elektronentransfers aller Elektronentransferweg Mutanten eine detaillierte Übersicht über die k_{ET} Modulation durch einzelne Elektronentransferweg Positionen liefern. Des Weiteren könnte im Rahmen eines Phenylalanin-scanning untersucht werden, ob die Ratenkonstante des Elektronentransfers mittels aromatischer Reste schrittweise erhöht werden kann und welchen Einfluss dies auf die elektrochemisch getriebene enzymatische Aktivität nehmen kann. Diese Einsicht könnte in Kombination mit den Erkenntnissen aus der Arbeit von Gricman *et al.* einen Wechsel der P450 Domäne zu einem elektrochemisch getriebenen BMR-P450_{M.aq. CNT-tag} erleichtern.⁽³³⁾

Des Weiteren könnte der CNT-tag weiter auf eine stärkere Bindung an der CNT Oberfläche optimiert werden. Eine Verlängerung des CNT-tag könnte die Interaktion mit der CNT Oberfläche beständiger machen und gegebenenfalls die k_{ET} Werte positiv beeinflussen. Ähnliche Resultate sind durch eine weitere Optimierung des Sequenz zu erwarten.

Eine weitere Untersuchung der elektrochemischen enzymatischen Aktivität des BM3_{FMN} Konstruktes ist aufgrund der vergleichbaren Umsatzraten wie das wildtypische Enzym vielversprechend. Die Variante sollte zur besseren Vergleichbarkeit mit den entsprechenden Mutationen der aktiven Tasche auf den Umsatz von Anilin optimiert werden. Dies würde eine bessere Vergleichbarkeit mit dem BM3 Gesamtkonstrukt ermöglichen.

Abschließend konnte ein erster und entscheidender Schritt zu einer elektrochemisch getriebenen, enzymatischen Hydroxylierung von ausgesuchten Substraten unter physiologischen Reaktionsbedingungen *in vitro* erreicht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

7

Anhang

Tabelle 7.1: Liste der formierte Aminophenolkonzentrationen nach 24-stündiger Inkubation der Biotransformation. Alle Blau hinterlegten Mutanten bildeten mehr Aminophenol als das wildtypische Enzym.

Variante	87A	87N	87V	328F	328S	328V	LF	87AL	87LF
Produkt[μ M]	195	348	216	437	216	769	299	133	376
Variante	328LF	328VA	GVQ	LFVF	LFVI	LFVL	LFVV	LVFI	wt
Produkt[μ M]	383	952	260	1248	853	704	776	286	439

7. ANHANG

ATGACAATTAAAGAAATGCCTCAGCCAAAACGTTTGGAGAGCTTAAAAATTTACCGTTATTAACACAGATAAAC
CGGTTCAAGCTTTGATGAAAATTCGGGATGAATTAGGAGAAATCTTAAATTCGAGGCGCCTGGTCGTAAACGG
CTACTTATCAAGTCAGCGTCTAATTAAGAAGCATGCGATGAATCAGCTTTGATAAAAACTTAAGTCAAGCGCTT
AAATTTGTACGTGATTTTCAGGAGACGGGTTATTTACAAGCTGGACGCATGAAAAAATTTGAAAAAGCGCATA
ATATCTTACTTCCAAGCTTCAGTCAGCAGCAATGAAAGGCTATCATGCGATGATGGTCGATATCGCCGTGCAGCT
TGTTCAAAGTGGGAGCGTCTAAATGAGATGAGCATATTGAAGTACCGAAGACATGACACGTTTAAACGCTTGAT
ACAATGGTCTTTGCGGCTTAACTATCGCTTAAACAGCTTTTACCAGATCAGCCATCCATTTATTACAAGTA
TGTCCTGCTGACTGGATGAAGCAATGAACAAGCTGCAGCGAGCAATCCAGACGCCAGCTTATGATGAAAAACA
GCGCCAGTTTCAAGAAGATATCAAGGTGATGAACGACCTAGTAGATAAAAATTTGAGATCGCAAAGCAAGCGGT
GAACAAGCGATGATTTTAAACGATATGCTAAACGAAAAGATCCAGAAACGGGTGAGCCGCTTGATGACGAGA
ACATTCGCTATCAAATTTATACATTCCTAATTCGCGGACACGAAACAAGTGGTCTTTTATCATTTGCGCTGTA
TTTCTTAGTAAAAATCCACATGTTATCAAAAAGCAGCAGAGAAGCAGCAGGTTCTAGTAGATCCCTGTTCCA
AGTACAACAAGTCAACACAGCTTAAATATGTCGGCATGGTCTTAAACGAAGCGCTGCGCTTATGGCCAACTGCTC
CTGCGTTTTCCCTATATGCAAAAAGAGATACGGTCTTGGAGAGAATATCCTTTAGAAAAAGGCGACGAACTAAT
GGTTCGATTCCTCAGCTTCACCGTGATAAAACAATTTGGGAGACGATGGAAGAGTTCGCTCCAGAGCGTTTT
GAAAATCCAAGTGCATTCGCGAGCATGCGTTTAAACCGTTTGGAAACGGTCAGCGTGCCTGATCGGTGAGCAGT
TCGCTCTTCAAGCAACGCTGTTACTTGGTATGATGCTAAAACACTTTGACTTTGAAGATACAAAACACGA
GCTGGATATTAAGAAAATTTAACGTTAAAACCTGAAGGCTTTTGGTAAAAGCAAAATCGAAAAAATTCGCTT
GGCGGTATTCCTTACCTAGCACTGACAGTCTGCTAAAAAGTACGCAAAAAGGCGAGAAAACGCTCATAATACGC
CGTGTCTGTGCTATACGGTTCAAATATGGGAACAGCTGAAGGAACGGCGCTGATTTAGCAGATATGCAATGAG
CAAAGGATTTGCAACCGAGGTGCAACGCTTATTCACACGCCGAAATCTTCCGCGCAAGGAGCTGATTAAT
GTAACGGCTCTTATAACGGTCAATCCGCTGATAACGCAAGCAATTTGTCGACTGGTTAGACCAAGCGTCTGCTG
ATGAAGTAAAAGGCGTTTCGCTACTCCGATTTGGATGCGCGGATAAAAACCTGGGCTACTACGTATCAAAAAGTGC
TGCTTTTATCGATGAAACGCTTGGCGTAAAGGGGAGAAAACATCGCTGACCGCGTGAAGCAGATGCAAGCGAC
GACTTTGAAGCAGATATGAAGAATGCGTGAACATATGTGGAGTACGCTAGCAGCCTACTTTAACCTCGACATG
AAAACAGTGAAGATAAATAAATCTACTCTTCACTTCAATTTGTCGACAGCGCGGATATGCGCTTGCAAAAAT
GCACGCTGCGTTTTCAACGAACGCTGATAGCAAGCAAGAACTTCAACAGCCAGGAGTGCACGAAGCAGCGACAT
CTTGAATTTGAACCTTCAAAAAGAGCTTCTTATCAAGAAGGAGATCATTTAGGTGTTATTCCTCGCAACTATGAAG
GAATAGTAAACCGTGAACAGCAAGTTTCGGCTAGATGCATCACAGCAATCCGCTGGAGCAGAGAAGAAAA
ATTAGCTCATTGCGCACTCGCTAAAACAGTATCCGTAGAAGGCTTCTGCAATACGTGGAGCTTCAAGATCCTGTT
ACGCGCACGAGCTTCGCGCAATGGCTGCTAAAACGGTCTGCCCGCGCATAAAGTAGAGCTTGAAGCCTTGCTTG
AAAAGCAAGCCTACAAGAACAAGTGCTGGCAAAACGTTTAAACAATGCTTGAACGCTTGAATAATACCCGGCGTG
TGAATGAAATTCAGCGAATTTATCGCCCTTCGCAAGCATACGCCCGCTTACTCGATTTCTTCACTCACCT
CGTGCATGAAAAACAAGCAAGCATACGGTCAGCGTTGCTCAGGAGAAGCGTGGAGCGGATATGGAGAATATA
AAGGAATTCGCTGAACTATCTTGGCGAGCTGCAAGAAGGAGATACGATTACGTGCTTTATTTCCACACCGCATC
AGAATTTACGCTGCCAAAAGACCTTGAACGCGCTTATCATGGTCGACCGGAAACAGGCGTGCAGCGCTTTAGA
GGCTTTGTGACGGCGCGCAACAGCTAAAAGAACAAGGACAGTCACTTGGAGAAGCACATTTATACTTCGGCTGCC
GTTACCTCATGAAGACTATCTGTATCAAGAAGGCTTGAACGCGCCAAAGCGAAGGCATATTACGCTTCATAC
CGTTTTTCTCGCATGCCAAATCAGCCGAAAAATACGTTTACGACGTAATGGAACAAGACGGCAAGAAATGATT
GAACTTCTTGATCAAGGAGCGCACTTCTATATTGCGGAGACGGAAGCCAAATGGCACCTGCGTTGAAGCAACGC
TTATGAAAAGTATGCTGACGTTACCAAGTGAAGTGAAGCAGACGCTCGCTTATGGCTGCAGCAGCTAGAAGAAAA
AGCGCATACGCAAAAAGCGTGTGGGCTGGGGCGGAGCATTTTTCGCTGCTTGGGGCACCTATTTTTCT

Abbildung 7.1: Basensequenz des CNT-tag (rot) modifizierten P450_{BM3} Gens. Die Lin-
kerregion zwischen der P450 Domäne und der BMR Domäne ist unterstrichen dargestellt.

```

1  MTIKEMPQPK  TFGELKNLPL  LNTDKPVQAL  MKIADELGEI  FKFEAPGRVT  RYLSSQRLIK
61  EACDESRFDK  NLSQALKFVR  DFAGDGLFTS  WTHEKNWKKA  HNILLPSFSQ  QAMKGYHAMM
121 VDIAVQLVQK  WERLNADEHI  EVPEDMTRLT  LDTIGLCGFN  YRFNSFYRDQ  PHPFITSMVR
181 ALDEAMNKLQ  RANPDDPAYD  ENKRQFQEDI  KVMNDLVDKI  IADRKASGEQ  SDDLTHMLN
241 GKDPETGEPL  DDENIRYQII  TFLIAGHETT  SGLLSFALYF  LVKNPHVLQK  AAEEAARVLV
301 DPVPSYQVK  QLKYVGMVLN  EALRLWPTAP  AFSLYAKEDT  VLGGEYPLEK  GDELMVLIPQ
361 LHRDKTIWGD  DVEEFRPERF  ENPSAIPQHA  FKPFGNGQRA  CIGQQFALHE  ATLVLGMMLK
421 HFDFEDHTNY  ELDIKETLTL  KPEGFVVKAK  SKKIPLGGIP  SPSTEQSAKK  VRGGSC

```

Abbildung 7.2: ESI-MS Analyse eines Chymotrypsin Verdau der Pyren-modifizierten P450 BM3 Hämdomäne mit artifizierlicher C-terminalen Glycin-Glycin-Serin-Cystein Sequenz (hBM3_{term.C}). Die identifizierten Peptide sind in Rot dargestellt. Das Pyren ist an den unterstrichenen Cysteinresten konjugiert.

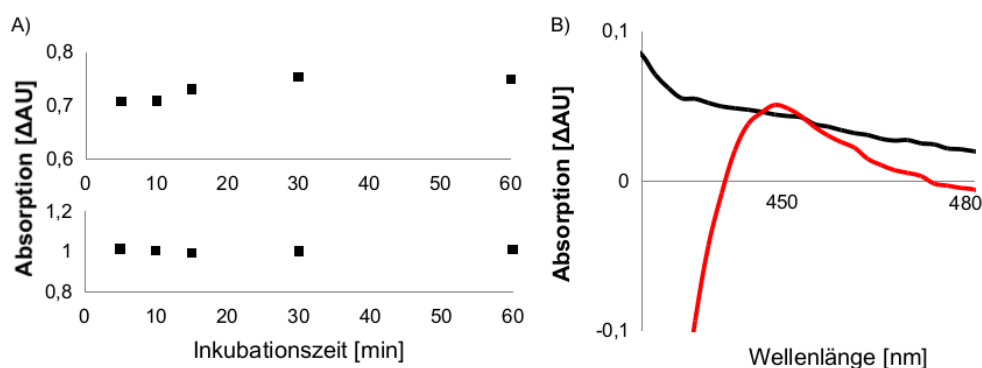


Abbildung 7.3: A) Vorversuche zur Langzeitinkubation einer Kohlenstoffmonoxid (CO) P450 Konzentrationsbestimmung mit 50 μM hBM3. Inkubation des reduzierten Enzyms vor der CO Zugabe (oben) und Inkubation des Enzyms in CO gesättigtem Puffer vor der Natriumdithionit Zugabe zur Reduktion (unten). Die Konzentrationsbestimmung ist auch nach einstündiger Inkubation präzise und reproduzierbar. B) Nachweis einer Reduktase Verunreinigung des isolierten hBM3. CO Konzentrationsbestimmung mit 60-minütiger Vorinkubation von hBM3 mit Dodekansäure und anschließender NADPH Reduktion (Rot). Die Kontrollreaktion wurde ohne Dodekansäure (Schwarz) inkubiert. Die Ergebnisse deuten auf die Anwesenheit einer minder effizienten Reduktase in Lösung hin (Verunreinigung). Diese Verunreinigung wurde als *Escherichia coli* eigene Enzyme *ecFdR* und *ecFld* identifiziert.

7. ANHANG

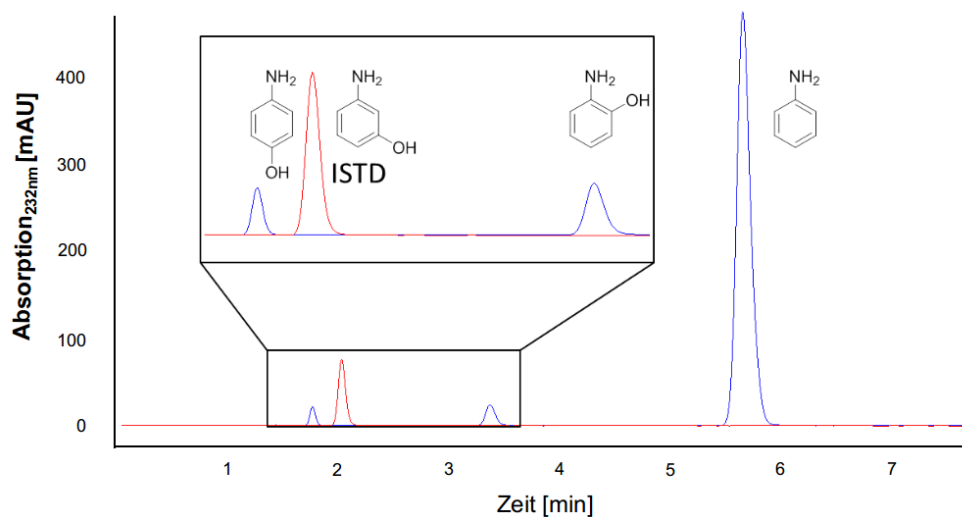


Abbildung 7.4: HPLC-DAD Chromatogramm der Produktstandards *p*- und *o*-Aminophenol, sowie des Substrats Anilin. Der verwendete interne Standard (ISTD) *m*-Aminophenol ist in Rot gezeigt.

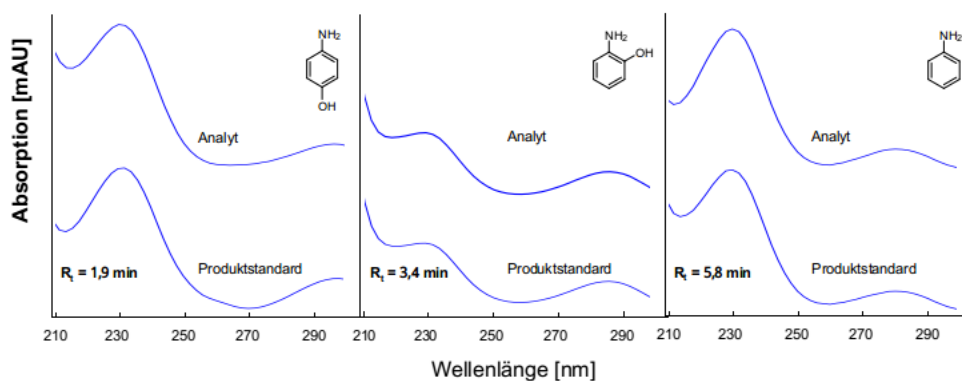


Abbildung 7.5: Absorptionsspektren der Hydroxylierungsprodukte *p*- und *o*-Aminophenol sowie dem Substrat Anilin im Bereich von $\lambda = 210$ nm und $\lambda = 300$ nm. Dargestellt sind die gemessenen Spektren, jeweils eines Produktstandards und des enzymatisch formierten Analyten.

Literatur

- [1] Frances H. Arnold, Hyun Joo, and Zhanglin Lin. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature*, 399(6737):670–673, jun 1999.
- [2] Lina Ba, Pan Li, Hui Zhang, Yan Duan, and Zhanglin Lin. Semi-rational engineering of cytochrome P450sca-2 in a hybrid system for enhanced catalytic activity: Insights into the important role of electron transfer. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(11):2815–2825, 2013.
- [3] Belal Bakheet, Cuicui Qiu, Shi Yuan, Yujue Wang, Gang Yu, Shubo Deng, Jun Huang, and Bin Wang. Inhibition of polymer formation in electrochemical degradation of p-nitrophenol by combining electrolysis with ozonation. *Chemical Engineering Journal*, 252:17–21, 2014.
- [4] Nikitas Bistolas, Ulla Wollenberger, Christiane Jung, and Frieder W. Scheller. Cytochrome P450 biosensors - A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12):2408–2423, 2005.
- [5] Florinel-Gabriel Bănică. *Chemical Sensors and Biosensors*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, sep 2012.
- [6] P. Cañizares, J. Lobato, R. Paz, M. A. Rodrigo, and C. Sáez. Electrochemical oxidation of phenolic wastes with boron-doped diamond anodes. *Water Research*, 39(12):2687–2703, 2005.
- [7] P Cañizares, C Sez, J Lobato, and Al. Electrochemical Treatment of 4-Nitrophenol Containing Aqueous Wastes Using Boron-Doped Diamond Anodes. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43(9):1944–1951, 2004.
- [8] Yujin Cao and Xiao Zhang. Production of long-chain hydroxy fatty acids by microbial conversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8):3323–3331, 2013.
- [9] Jung-Min Choi, Sang-Soo Han, and Hak-Sung Kim. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7):1443–1454, nov 2015.
- [10] Patrick C. Cirino and Frances H. Arnold. Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 344(9):932–937, 2002.
- [11] Patrick C. Cirino and Frances H. Arnold. A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angewandte Chemie - International Edition*, 42(28):3299–3301, 2003.
- [12] Meike Cordes, Angnieszka Kötting, Christian Jasper, Olivier Jacques, Hasen Boudebous, and Bernd Giese. Influence of Amino Acid Side Chains on Long-Distance Electron Transfer in Peptides: Electron Hopping via “Stepping Stones”. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(18):3461–3463, apr 2008.
- [13] Bentham P.B. Danielson. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Metabolism*, 3(6):561–597, 2002.
- [14] Dominique Darimont, Martin J. Weissenborn, Bernd A. Nebel, and Bernhard Hauer. Modulating proposed electron transfer pathways in P450BM3 led to improved activity and coupling efficiency. *Bioelectrochemistry*, sep 2017.
- [15] Danilo Degregorio, Sheila J. Sadeghi, Giovanna Di Nardo, Gianfranco Gilardi, and Sandro P. Solinas. Understanding uncoupling in the multiredox centre P450 3A4-BMR model system. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(1):109–116, 2011.
- [16] Ilia G. Denisov, Thomas M. Makris, Stephen G. Sligar, and Ilme Schlichting. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews*, 105(6):2253–2278, jun 2005.
- [17] Giovanna Di Nardo, Andrea Fantuzzi, Anastasia Sideri, Paola Panico, Carlo Sassone, Carlo Giunta, and Gianfranco Gilardi. Wild-type CYP102A1 as a biocatalyst: turnover of drugs usually metabolised by human liver enzymes. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 12(3):313–23, mar 2007.
- [18] Vikash R. Dodhia, Carlo Sassone, Andrea Fantuzzi, Giovanna Di Nardo, Sheila J. Sadeghi, and Gianfranco Gilardi. Modulating the coupling efficiency of human cytochrome P450 CYP3A4 at electrode surfaces through protein engineering. *Electrochemistry Communications*, 10(11):1744–1747, nov 2008.
- [19] Vikash Rajnikant Dodhia, Andrea Fantuzzi, and Gianfranco Gilardi. Engineering human cytochrome P450 enzymes into catalytically self-sufficient chimeras using molecular Lego. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 11(7):903–16, oct 2006.
- [20] Chris J. Dowle, Andrew P. Malyan, and Alasdair M. Matheson. Separation of the ortho, meta and para isomers of aminophenol by high-performance liquid chromatography. *The Analyst*, 115(1):105, jan 1990.
- [21] Hiroki Ebata, Kazunobu Toshima, and Shuichi Matsumura. Lipase-Catalyzed Synthesis and Properties of Poly[(12-hydroxydodecanoate)-co-(12-hydroxystearate)] Directed towards Novel Green and Sustainable Elastomers. *Macromolecular Bioscience*, 8(1):38–45, jan 2008.
- [22] Amanda L. Eckermann, Daniel J. Feld, Justine A. Shaw, and Thomas J. Meade. Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(15-16):1769–1802, aug 2010.
- [23] Jacqueline Ellis, Aldo Gutierrez, Igor L. Barsukov, Wei Cheng Huang, J. Günter Grossman, and Gordon C K Roberts. Domain motion in cytochrome P450 reductase. Conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52):36628–36637, 2009.
- [24] Carmelita Estavillo, Zhongqing Lu, Ingela Jansson, John B Schenkman, and James F Rusling. Epoxidation of styrene by human cyt P450 1A2 by thin film electrolysis and peroxide activation compared to solution reactions. *Biophysical chemistry*, 104(1):291–6, may 2003.
- [25] Andrea Fantuzzi, Michael Fairhead, and Gianfranco Gilardi. Direct Electrochemistry of Immobilized Human Cytochrome P450 2E1. *Journal of the American Chemical Society*, 126(16):5040–5041, apr 2004.
- [26] Andrea Fantuzzi, Yergalem T Meharena, Paul B Briscoe, Françoise Guerlesquin, Sheila J Sadeghi, and Gianfranco Gilardi. Characterisation of the electron transfer and complex formation between flavodoxin from *D. vulgaris* and the haem domain of cytochrome P450 BM3 from *B. megaterium*. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(4):234–41, apr 2009.

LITERATUR

- [27] Andrea Fantuzzi, Yergalem T Meharena, Paul B Briscoe, Carlo Sassone, Beatrice Borgia, and Gianfranco Gilardi. Improving catalytic properties of P450 BM3 haem domain electrodes by molecular Lego. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (12):1289–91, mar 2006.
- [28] Valentina E V Ferrero, Laura Andolfi, Giovanna Di Nardo, Sheila J Sadeghi, Andrea Fantuzzi, Salvatore Cannistraro, and Gianfranco Gilardi. Protein and electrode engineering for the covalent immobilization of P450 BMP on gold. *Analytical chemistry*, 80(22):8438–46, nov 2008.
- [29] Barry D Fleming, Daniel L Johnson, Alan M Bond, and Lisandra L Martin. Recent progress in cytochrome P450 enzyme electrochemistry. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(4):581–589, 2006.
- [30] Barry D. Fleming, Yanni Tian, Stephen G. Bell, Luet-Lok Wong, Vlada Urlacher, and H. Allen O. Hill. Redox properties of cytochromeP450 _{BM3} measured by direct methods. *European Journal of Biochemistry*, 270(20):4082–4088, oct 2003.
- [31] Elizabeth M J Gillam and Martin A Hayes. The evolution of cytochrome P450 enzymes as biocatalysts in drug discovery and development. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(18):2254–80, 2013.
- [32] Lukasz Gricman, Constantin Vogel, and Jürgen Pleiss. Conservation analysis of class-specific positions in cytochrome P450 monooxygenases: Functional and structural relevance. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 82(3):491–504, mar 2014.
- [33] Lukasz Gricman, Martin J. Weissenborn, Sara M. Hoffmann, Niels Borlinghaus, Bernhard Hauer, and Jürgen Pleiss. Redox Partner Interaction Sites in Cytochrome P450 Monooxygenases: <i>In Silico</i> Analysis and Experimental Validation. *ChemistrySelect*, 1(6):1243–1251, may 2016.
- [34] Djemel Hamdane, Chuanwu Xia, Sang Choul Im, Haoming Zhang, Jung Ja P Kim, and Lucy Waskell. Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17):11374–11384, 2009.
- [35] Frank Hannemann, Andreas Bichet, Kerstin M Ewen, and Rita Bernhardt. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et biophysica acta*, 1770(3):330–44, mar 2007.
- [36] James T. Hazzard, Shanthi Govindaraj, Thomas L. Poulos, and Gordon Tolling. Electron transfer between the FMN and heme domains of cytochrome P450BM-3: Effects of substrate and CO. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12):7922–7926, 1997.
- [37] Tobias M. Hedison, Sam Hay, and Nigel S. Scrutton. Real-time analysis of conformational control in electron transfer reactions of human cytochrome P450 reductase with cytochrome <i>c</i>. *FEBS Journal*, 282(22):4357–4375, nov 2015.
- [38] P. Hlavica, J. Schulze, and D. F V Lewis. Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: A critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96(2-3):279–297, 2003.
- [39] Sara M. Hoffmann, Martin J. Weissenborn, Łukasz Gricman, Sandra Notonier, Jürgen Pleiss, and Bernhard Hauer. The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling. *ChemCatChem*, 8(8):1591–1597, apr 2016.
- [40] Sumire Malca Honda. *Substrate characterization and protein engineering of bacterial cytochrome P450 monooxygenases for the bio-based synthesis of omega-hydroxylated aliphatic compounds*. PhD thesis, 2013.
- [41] Sumire Honda Malca. *Substrate characterization and protein engineering of bacterial cytochrome P450 monooxygenases for the bio-based synthesis of omega-hydroxylated aliphatic compounds*. PhD thesis, University of Stuttgart, 2013.
- [42] Sumire Honda Malca, Daniel Scheps, Lisa Kühnel, Elena Venegas-Venegas, Alexander Seifert, Bettina M. Nestl, Bernhard Hauer, M. Rothlisberger, Z. Li, and B. Witholt. Bacterial CYP153A monooxygenases for the synthesis of omega-hydroxylated fatty acids. *Chemical Communications*, 48(42):5115, apr 2012.
- [43] B L HORECKER and A KORNBERG. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *The Journal of biological chemistry*, 175(1):385–90, aug 1948.
- [44] Eugene G. Hrycay and Stelvio M. Bandiera. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. In *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, volume 74, pages 35–84. 2015.
- [45] Eugene G. Hrycay and Stelvio M. Bandiera. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes. pages 1–61. Springer, Cham, 2015.
- [46] Paul A. Hubbard, Anna L. Shen, Rosemary Paschke, Charles B. Kasper, and Jung Ja P Kim. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hydride and electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31):29163–29170, 2001.
- [47] Y Imai, R Sato, and T Iyanagi. Rate-limiting step in the reconstituted microsomal drug hydroxylase system. *Journal of biochemistry*, 82(5):1237–46, nov 1977.
- [48] E I Iwuoha, S Joseph, Z Zhang, M R Smyth, U Fuhr, and P R Ortiz de Montellano. Drug metabolism biosensors: electrochemical reactivities of cytochrome P450cam immobilised in synthetic vesicular systems. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17(6-7):1101–10, sep 1998.
- [49] Takashi Iyanagi. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1):520–528, 2005.
- [50] C M Jenkins and M R Waterman. Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *The Journal of biological chemistry*, 269(44):27401–8, nov 1994.
- [51] D L Johnson, A J Conley, and L L Martin. Direct electrochemistry of human, bovine and porcine cytochrome P450c17. *Journal of molecular endocrinology*, 36(2):349–59, apr 2006.
- [52] D.L. Johnson, B.C. Lewis, D.J. Elliot, J.O. Miners, and L.L. Martin. Electrochemical characterisation of the human cytochrome P450 CYP2C9. *Biochemical Pharmacology*, 69(10):1533–1541, may 2005.
- [53] Shiba Joseph, James F Rusling, Yuri M Lvov, Thomas Friedberg, and Uwe Fuhr. An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool. *Biochemical pharmacology*, 65(11):1817–26, jun 2003.
- [54] Michael G. Joyce, Idorenyin S. Ekanem, Olivier Roitel, Adrian J. Dunford, Rajasekhar Neeli, Hazel M. Girvan, George J. Baker, Robin A. Curtis, Andrew W. Munro, and David Leys. The crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of flavocytochrome P450 BM3. *FEBS Journal*, 279(9):1694–1706, 2012.
- [55] Eugenii Katz. Application of bifunctional reagents for immobilization of proteins on a carbon electrode surface: oriented immobilization of photosynthetic reaction centers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (365):157–164, 1994.

- [56] Jurate Kazlauskaitė, Andrew C. G. Westlake, Luet-Lok Wong, H. Allen O. Hill, T. Hara, Y. Sagara, and H. Beinert. Direct electrochemistry of cytochrome P450cam. *Chemical Communications*, 195(18):2189, jan 1996.
- [57] Byoungjin Kim, Hyegwon Park, Dokyun Na, and Sang Yup Lee. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of phenol from glucose. *Biotechnology Journal*, 9(5):621–629, 2014.
- [58] Yang Hee Kim and Young Je Yoo. Regeneration of the nicotinamide cofactor using a mediator-free electrochemical method with a tin oxide electrode. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(3):129–134, 2009.
- [59] Peter T. Kissinger and William R. Heineman. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60(9):702, sep 1983.
- [60] Ivar Kruusenberg, Nadezda Alexeyeva, and Kaido Tammeveski. The pH-dependence of oxygen reduction on multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrodes. *Carbon*, 47(3):651–658, 2009.
- [61] Santosh Kumar. Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(2):115–131, feb 2010.
- [62] Vadim Yu. Kuznetsov, Thomas L. Poulos, and Irina F. Sevioukova. Putidaredoxin-to-Cytochrome P450cam Electron Transfer: Differences between the Two Reductive Steps Required for Catalysis. *Biochemistry*, 45(39):11934–11944, oct 2006.
- [63] Jay A. Labinger. Selective alkane oxidation: hot and cold approaches to a hot problem. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 220(1):27–35, sep 2004.
- [64] M.E. Lai and A. Bergel. Electrochemical reduction of oxygen on glassy carbon: catalysis by catalase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 494(1):30–40, dec 2000.
- [65] E. Laviron. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 101(1):19–28, jul 1979.
- [66] Nicole G H Leferink, Christopher R. Pudney, Sibylle Brenner, Derren J. Heyes, Robert R. Eady, S. Samar Hasnain, Sam Hay, Stephen E J Rigby, and Nigel S. Scrutton. Gating mechanisms for biological electron transfer: Integrating structure with biophysics reveals the nature of redox control in cytochrome P450 reductase and copper-dependent nitrite reductase. *FEBS Letters*, 586(5):578–584, 2012.
- [67] Chenghong Lei, Ulla Wollenberger, Christiane Jung, and Frieder W. Scheller. Clay-Bridged Electron Transfer between Cytochrome P450cam and Electrode. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3):740–744, feb 2000.
- [68] Oliver Lentz, Anton Feenstra, Tilo Habicher, Bernhard Hauer, Rolf D. Schmid, and Vlada B. Urlacher. Altering the Regioselectivity of Cytochrome P450 CYP102A3 of *Bacillus subtilis* by Using a New Versatile Assay System. *ChemBioChem*, 7(2):345–350, feb 2006.
- [69] David F.V. Lewis and Peter Hlavica. Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1460(2-3):353–374, nov 2000.
- [70] Q S Li, J Ogawa, and S Shimizu. Critical role of the residue size at position 87 in H₂O₂-dependent substrate hydroxylation activity and H₂O₂ inactivation of cytochrome P450BM-3. *Biochemical and biophysical research communications*, 280(5):1258–61, feb 2001.
- [71] Qing-Shan Li, Jun Ogawa, Rolf D Schmid, and Sakayu Shimizu. Indole hydroxylation by bacterial cytochrome P450 BM-3 and modulation of activity by cumene hydroperoxide. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(2):293–300, 2005.
- [72] Zha Li, Takanori Uzawa, Takashi Tanaka, Akira Hida, Koji Ishibashi, Hiromichi Katakura, Eiry Kobatake, and Yoshihiro Ito. In vitro selection of peptide aptamers with affinity to single-wall carbon nanotubes using a ribosome display. *Biotechnology letters*, 35(1):39–45, jan 2013.
- [73] Chen Liu, Fei Liu, Jiali Cai, Wenchun Xie, Timothy E Long, S Richard Turner, Alan Lyons, and Richard A Gross. Polymers from fatty acids: poly(ω -hydroxyl tetradecanoic acid) synthesis and physico-mechanical studies. *Biomacromolecules*, 12(9):3291–8, sep 2011.
- [74] Wenfang Liu and Ping Wang. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 25(4):369–384, 2007.
- [75] Enrique C. Llaudet, Dominique Darimont, Ramona Samba, Ilona Matiyachyn, Martin Stelzle, Martin J. Weissenborn, and Bernhard Hauer. Expanding an Efficient, Electrically Driven and CNT-Tagged P450 System into the Third Dimension: A Nanowired CNT-Containing and Enzyme-Stabilising 3D Sol-Gel Electrode. *ChemBioChem*, 17(14):1367–1373, jul 2016.
- [76] M. T. Lundemo, S. Notonier, G. Striedner, B. Hauer, and J. M. Woodley. Process limitations of a whole-cell P450 catalyzed reaction using a CYP153A-CPR fusion construct expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pages 1197–1208, 2015.
- [77] M. T. Lundemo, S. Notonier, G. Striedner, B. Hauer, and J. M. Woodley. Process limitations of a whole-cell P450 catalyzed reaction using a CYP153A-CPR fusion construct expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3):1197–1208, 2016.
- [78] Gary A. Mabbott. An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 60(9):697, sep 1983.
- [79] Lok Hang Mak, Sheila J Sadeghi, Andrea Fantuzzi, and Gianfranco Gilaradi. Control of Human Cytochrome P450 2E1 Electrocatalytic Response as a Result of Unique Orientation on Gold Electrodes. 82(12):5357–5362, 2010.
- [80] Bettie Sue Siler Masters, Charles H. Williams, and Henry Kamin. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. *Methods in Enzymology*, 10:565–573, 1967.
- [81] J S Miles, A W Munro, B N Rospendowski, W E Smith, J McKnight, and A J Thomson. Domains of the catalytically self-sufficient cytochrome P-450 BM-3. Genetic construction, overexpression, purification and spectroscopic characterization. *The Biochemical journal*, 288 (Pt 2):503–9, dec 1992.
- [82] Masaharu Mizutani and Daisaku Ohta. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual review of plant biology*, 61:291–315, 2010.
- [83] Bernard Munge, Carmelita Estavillo, John B. Schenkman, and James F. Rusling. Optimization of Electrochemical and Peroxide-Driven Oxidation of Styrene with Ultrathin Polyion Films Containing Cytochrome P450cam and Myoglobin. *ChemBioChem*, 4(1):82–89, jan 2003.
- [84] Andrew W. Munro, Hazel M. Girvan, Amy E. Mason, Adrian J. Dunford, and Kirsty J. McLean. What makes a P450 tick? *Trends in Biochemical Sciences*, 38(3):140–150, mar 2013.

LITERATUR

- [85] Andrew W. Munro, David G. Leys, Kirsty J. McLean, Ker R. Marshall, Tobias W.B. Ost, Simon Daff, Caroline S. Miles, Stephen K. Chapman, Dominikus A. Lysek, Christopher C. Moser, Christopher C. Page, and P. Leslie Dutton. P450 BM3: The very model of a modern flavocytochrome. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(5):250–257, 2002.
- [86] Toru Nagasawa, Marco Wieser, Tetsuji Nakamura, Hitomi Iwahara, Toyokazu Yoshida, and Kunihiro Gekko. Rhodococcus rhodochrous. 144(November 1999):138–144, 2000.
- [87] L O Narhi and A J Fulco. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *The Journal of biological chemistry*, 261(16):7160–9, jun 1986.
- [88] Daniel W Nebert and David R Nelson. Cytochrome P450 (CYP) Gene Superfamily. *Encyclopedia of Life Sciences*, (January):1–9, 2011.
- [89] David L. Nelson, Michael M. Cox, and Albert L. Lehninger. *Lehninger Biochemie : mit 131 Tabellen*. Springer, 2009.
- [90] Bettina M Nestl, Bernd A Nebel, and Bernhard Hauer. Recent progress in industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2):187–193, apr 2011.
- [91] M A Noble, C S Miles, S K Chapman, D A Lysek, A C MacKay, G A Reid, R P Hanzlik, and A W Munro. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *The Biochemical journal*, 339(2):371–9, apr 1999.
- [92] T Omura and R Sato. A New Cytochrome in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, (April):1375–1377, 1962.
- [93] T Omura and R Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of biological chemistry*, 239:2370–8, jul 1964.
- [94] Elaine O'Reilly, Valentin Köhler, Sabine L. Flitsch, and Nicholas J. Turner. Cytochromes P450 as useful biocatalysts: addressing the limitations. *Chemical Communications*, 47(9):2490, 2011.
- [95] Paul R. Ortiz de Montellano. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Page 450. Springer Science & Business Media, 4 edition, 2015.
- [96] Christopher R. Otey and John M. Joern. High-Throughput Screen for Aromatic Hydroxylation. In *Directed Enzyme Evolution*, pages 141–148. Humana Press, New Jersey, 2003.
- [97] Christopher C. Page, Christopher C. Moser, and P. Leslie Dutton. Mechanism for electron transfer within and between proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5):551–556, 2003.
- [98] Caroline E. Paul, Isabel W C E Arends, and Frank Hollmann. Is simpler better? Synthetic nicotinamide cofactor analogues for redox chemistry. *ACS Catalysis*, 4(3):788–797, 2014.
- [99] M. Pontié, G. Thouand, F. DeNardi, I. Tapsoba, and S. Lherbette. Antipassivating electrochemical process of glassy carbon electrode (gce) dedicated to the oxidation of nitrophenol compounds. *Electroanalysis*, 23(7):1579–1584, 2011.
- [100] Christopher R. Pudney, Basile Khara, Linus O. Johannissen, and Nigel S. Scrutton. Coupled motions direct electrons along human microsomal P450 chains. *PLoS Biology*, 9(12), 2011.
- [101] K G Ravichandran, S S Boddupalli, C A Hasermann, J A Peterson, and J Deisenhofer. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5122):731–6, aug 1993.
- [102] Manfred T Reetz. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology : Past , Present and Future Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology : Past , Present and Future. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34):12480–12496, 2013.
- [103] Verena Resch, Joerg H Schrittwieser, Elina Siirola, and Wolfgang Kroutil. Novel carbon–carbon bond formations for biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6):793–799, dec 2011.
- [104] Barbara Rodriguez-Colinas, Miguel A. De Abreu, Lucia Fernandez-Arrojo, Roseri De Beer, Ana Poveda, Jesus Jimenez-Barbero, Dietmar Haltrich, Antonio O. Ballesteros Olmo, Maria Fernandez-Lobato, and Francisco J. Plou. Production of galacto-oligosaccharides by the β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19):10477–10484, 2011.
- [105] R T Ruettinger, L P Wen, and A J Fulco. Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. *The Journal of biological chemistry*, 264(19):10987–95, jul 1989.
- [106] Sheila J Sadeghi, Andrea Fantuzzi, and Gianfranco Gilardi. Breakthrough in P450 bioelectrochemistry and future perspectives. *Biochimica et biophysica acta*, 1814(1):237–48, jan 2010.
- [107] Gary J Salter and Douglas B Kell. Solvent selection for whole cell biotransformations in organic media. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 15(2):139–177, 1995.
- [108] F Sanger, S Nicklen, and A R Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463–7, dec 1977.
- [109] Stefaan Sansen, Jason K Yano, Rosamund L Reynald, Guillaume A Schoch, Keith J Griffin, C David Stout, and Eric F Johnson. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *The Journal of biological chemistry*, 282(19):14348–55, may 2007.
- [110] Audrey Sassolas, Loïc J. Blum, and Béatrice D. Leca-Bouvier. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3):489–511, may 2012.
- [111] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, and G. J. Hughes. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science*, 329(5989):305–309, 2010.
- [112] John B. Schenkman, Ingela Jansson, Yuri Lvov, James F. Rusling, Salah Boussaad, and Nongjian J. Tao. Charge-Dependent Sidedness of Cytochrome P450 Forms Studied by Quartz Crystal Microbalance and Atomic Force Microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1):78–87, jan 2001.
- [113] Daniel Scheps, Sumire Honda Malca, Sven M. Richter, Karoline Marisch, Bettina M. Nestl, and Bernhard Hauer. Synthesis of ω -hydroxy dodecanoic acid based on an engineered CYP153A fusion construct. *Microbial Biotechnology*, 6(6):694–707, aug 2013.
- [114] Daniel Scheps, Sumire Honda Malca, Helen Hoffmann, Bettina M Nestl, and Bernhard Hauer. Regioselective ω -hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666. *Organic & biomolecular chemistry*, 9(19):6727–33, oct 2011.

- [115] Ulrich Schwaneberg, Claudia Schmidt-Dannert, Jutta Schmitt, and Rolf Dieter Schmid. A Continuous Spectrophotometric Assay for P450 BM-3, a Fatty Acid Hydroxylating Enzyme, and Its Mutant F87A. *Analytical Biochemistry*, 269(2):359–366, may 1999.
- [116] Alexander Seifert, Sandra Vomund, Katrin Grohmann, Sebastian Kriening, Vlada B. Urlacher, Sabine Laschat, and Jürgen Pleiss. Rational Design of a Minimal and Highly Enriched CYP102A1 Mutant Library with Improved Regio-, Stereo- and Chemoselectivity. *ChemBioChem*, 10(5):853–861, mar 2009.
- [117] I F Sevrioukova, H Li, H Zhang, J A Peterson, and T L Poulos. Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5):1863–8, mar 1999.
- [118] Afzal Shah, Bimalendu Adhikari, Sanela Martić, Azeema Munir, Suniya Shahzad, Khurshid Ahmad, and Heinz-bernhard Kraatz. Electron transfer in peptides. *Chemical Society Reviews*, 44:1015–1027, 2015.
- [119] Roger A. Sheldon and Pedro C. Pereira. Biocatalysis engineering: the big picture. *Chem. Soc. Rev.*, 46(10):2678–2691, 2017.
- [120] Alka Shukla, Elizabeth M. Gillam, Deanne J. Mitchell, and Paul V. Bernhardt. Direct electrochemistry of enzymes from the cytochrome P450 2C family. *Electrochemistry Communications*, 7(4):437–442, apr 2005.
- [121] Victoria V. Shumyantseva, Tatiana Bulko, Evgeniya Shich, Anna Makhova, Alexey Kuzikov, and Alexander Archakov. Cytochrome P450 Enzymes and Electrochemistry: Crosstalk with Electrodes as Redox Partners and Electron Sources. In *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450*, pages 229–246. Springer, Cham, 2015.
- [122] Howard Siu and Jean Duhamel. Molar absorption coefficient of pyrene aggregates in water. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(48):15301–15312, 2008.
- [123] S G Sligar. Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry*, 15(24):5399–406, nov 1976.
- [124] B. Šljukić, C. E. Banks, and R. G. Compton. An overview of the electrochemical reduction of oxygen at carbon-based modified electrodes. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2(1):1–25, mar 2005.
- [125] Sebastiaan K. Spaans, Ruud A. Weusthuis, John van der Oost, and Servé W.M. Kengen. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL):1–27, 2015.
- [126] Larry A. Sternson and Jan Hes. Electrochemical method for the determination of aniline hydroxylation in liver. *Analytical Biochemistry*, 67(1):74–80, jul 1975.
- [127] K W Street, G H Schenk, E.G. Tomich, and S. Satomi. p-Aminophenol fluorescence and determination in the presence of acetaminophen. *Journal of pharmaceutical sciences*, 68(10):1306–9, oct 1979.
- [128] M. Sugishima, H. Sato, Y. Higashimoto, J. Harada, K. Wada, K. Fukuyama, and M. Noguchi. Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7):2524–2529, 2014.
- [129] Alice H Surovec. Determining surface coverage of self-assembled monolayers on gold electrodes. *Chemical Educator*, 17(12):83–85, 3 pp., 2012.
- [130] Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger. *Plant physiology*. Sinauer Associates, 2010.
- [131] Andrew K. Udit, Katharine D. Hagen, Peter J. Goldman, Andrew Star, James M. Gillan, Harry B. Gray, and Michael G. Hill. Spectroscopy and Electrochemistry of Cytochrome P450 BM3-Surfactant Film Assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, 128(31):10320–10325, aug 2006.
- [132] Andrew K Udit, Michael G Hill, V Garrett Bittner, Frances H Arnold, and Harry B Gray. Reduction of dioxygen catalyzed by pyrene-wired heme domain cytochrome P450 BM3 electrodes. *Journal of the American Chemical Society*, 126(33):10218–9, aug 2004.
- [133] Vlada Urlacher and Rolf D Schmid. Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases. *Current opinion in biotechnology*, 13(6):557–64, dec 2002.
- [134] Carlos Vera, Cecilia Guerrero, Raúl Conejeros, and Andrés Illanes. Synthesis of galacto-oligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(3):188–194, 2012.
- [135] Rajni Verma, Ulrich Schwaneberg, and Danilo Roccatano. Insight into the redox partner interaction mechanism in cytochrome P450BM-3 using molecular dynamics simulations. *Biopolymers*, 101(3):197–209, mar 2014.
- [136] J L Vermilion and M J Coon. Highly purified detergent-solubilized NADPH-cytochrome P-450 reductase from phenobarbital-induced rat liver microsomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 60(4):1315–22, oct 1974.
- [137] K. Peter C. Vollhardt and Neil E. Schore. *Organische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim, fifth edition, 2011.
- [138] M Wang, D L Roberts, R Paschke, T M Shea, B S Masters, and J J Kim. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16):8411–6, aug 1997.
- [139] Lucy Waskell and Jung Ja P. Kim. Electron transfer partners of cytochrome P450. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Fourth Edition*, pages 33–68. Springer International Publishing, Cham, 2015.
- [140] Evelyne Weber, Alexander Seifert, Mihaela Antonovici, Christopher Geinitz, Jürgen Pleiss, and Vlada B Urlacher. Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(3):944–6, jan 2011.
- [141] Andrea Weckbecker and Werner Hummel. Glucose Dehydrogenase for the Regeneration of NADPH and NADH. In *Microbial Enzymes and Biotransformations*, pages 225–238. Humana Press, Totowa, NJ, 2005.
- [142] D Werck-Reichhart and R Feyereisen. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*, 1(6):REVIEWS3003, jan 2000.
- [143] Christopher J. C. Whitehouse, Stephen G. Bell, and Luet-Lok Wong. P450 BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chem. Soc. Rev.*, 41(3):1218–1260, feb 2012.
- [144] T. S. Wong, N. Wu, D. Roccatano, M. Zacharias, and U. Schwaneberg. Sensitive Assay for Laboratory Evolution of Hydroxylases toward Aromatic and Heterocyclic Compounds. *Journal of Biomolecular Screening*, 10(3):246–252, apr 2005.
- [145] Li-Qun Wu and Gregory F Payne. Biofabrication: using biological materials and biocatalysts to construct nanostructured assemblies. *Trends in biotechnology*, 22(11):593–9, nov 2004.

LITERATUR

- [146] Zhong Liu Wu, Larissa M. Podust, and F. Peter Guengerich. Expansion of substrate specificity of cytochrome P450 2A6 by random and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49):41090–41100, 2005.
- [147] M. Yang, J. L. Kabulski, L. Wollenberg, X. Chen, M. Subramanian, T. S. Tracy, D. Lederman, P. M. Gannett, and N. Wu. Electrocatalytic Drug Metabolism by CYP2C9 Bonded to A Self-Assembled Monolayer-Modified Electrode. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(4):892–899, apr 2009.
- [148] Shiro Yoshioka, Satoshi Takahashi, Hiroshi Hori, Koichiro Ishimori, and Isao Morishima. Proximal cysteine residue is essential for the enzymatic activities of cytochrome P450 cam. *European Journal of Biochemistry*, 268(2):252–259, jan 2001.
- [149] Huimin Zhao and Wilfred A. Van Der Donk. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6):583–589, 2003.