

**Engineering von Enzymtunneln: Experimentelle Studie,
in silico Modellierung und Simulation der
Monooxygenase CYP153A_{M.aq}**

**Engineering enzyme tunnels: Experimental study, *in silico* modeling and
simulation of the monooxygenase CYP153A_{M.aq}**

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

Vorgelegt von

Lea Ramona Rapp

aus Göppingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof. Dr. Ralf Takors
Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Nußberger

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2022

Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart

Erklärung der Eigenständigkeit der Dissertation

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Engineering von Enzymtunneln: Experimentelle Studie, *in silico* Modellierung und Simulation der Monooxygenase CYP153A_{M.aq}“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle aus fremden Quellen entnommenen Passagen und Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby declare that the present dissertation entitled “Engineering enzyme tunnels: Experimental study, *in silico* modeling and simulation of the monooxygenase CYP153A_{M.aq}” is the entire result of my own work except where otherwise indicated. All passages and thoughts taken from external sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 02.06.2021

Lea Ramona Rapp

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Leuten bedanken, die mich durch eine gemeinsame Zeit am ITB begleitet haben und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die Möglichkeit an spannenden und herausfordernden Projekten zu Arbeiten und der meine Promotion in jeglicher Weise unterstützt hat. Für die wertvollen Gespräche und Ratschläge, sowie all die Freiheiten, die meine Arbeit zu dem gemacht hat wie sie hier vorliegt, möchte ich mich herzlich bedanken.

Für die freundliche Übernahme der Position des Mitberichters bin ich Herrn Prof. Dr. Ralf Takors sehr dankbar und auch Herrn Prof. Stephan Nußberger für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein besonderer Dank gilt Dr. habil. Bettina Nestl dafür, dass du immer ein offenes Ohr hattest und mir bei Bedarf stets zur Seite standest, um über meine Arbeit zu sprechen. Du warst maßgebend daran beteiligt, dass ich meinen Weg durch ein anfängliches Labyrinth fand. Aber auch der Spaß durfte nie fehlen und ich werde unsere gemeinsame Woche in Brno nie vergessen – vielen Dank für den Schlafplatz als meiner verloren geglaubt war 😊

Auch Dr. Bernd Nebel möchte ich an dieser Stelle besonders danken. Mit keinem macht die Analytik mehr Spaß als mit dir. Dein Wissen und deine Ratschläge, sowie dein Humor waren für „Goofy“ stets eine Bereicherung. Ohne dich und Bettina fehlt definitiv ein großer Part.

Meinen Studenten, die ich im Zuge dieser Arbeit oder auf anderen nicht-projektbezogenen Studien betreuen durfte, gilt ein großer Dank. Danke Benjamin Baumert, Raphael Jost, Luca Kögl, Steffen Bulach, Luisa Merz, Sabrina Adam, Bakiye Bugdayci und Tom Ott. Durch unsere Zusammenarbeit habe ich selbst viel Neues gelernt und durfte oft lang Vergessenes wieder ausgraben. Für eure weitere Karriere wünsche ich euch viel Erfolg!

Ich danke außerdem allen aktuellen und ehemaligen Kollegen für die tolle Arbeitsatmosphäre und den freundschaftlichen Umgang. Vielen Dank Benni, Henrique, Jan, Jenny, Jens, Jule, JLU, Jona, Jonathan, JWizz, Lars, Lisa, Ludwig, Maike, Matúš, Melanie, Natalie, Nico, Niels, Matthias, Pascal, Philip, Rebecca, Sabrina, Sara, Sebastian G. & L., Stephan, Svenja, Dr. Thes, Trauzi & Wendy. Ich denke gerne an die Filme-, Grillabende und wissenschaftlichen Ausflüge mit euch zurück!

Auch Prof. Dr. Gideon Grogan und seinem Team Mahima Sharma, Erna Zukic und Benjamin Rowlinson möchte ich für die Kristallisation des Enzyms CYP153A_{p.sp} und den freundlichen und spannenden Diskussionen danken

Ich möchte mich herzlich bei der „European Molecular Biology Organization“ EMBO für die Förderung im Rahmen des „Scientific Exchange Grants“ bedanken, die meinen Aufenthalt an der Masaryk Universität in Brunn, Tschechien, gefördert hat.

Very special thanks go to my lovely cooperation partners in Brno. I want to sincerely thank Prof. Dr. Jiří Damborský for inviting me to LL to gain more experience in computational chemistry than I ever thought I would, and for always keeping fingers crossed and supporting my applications and our manuscripts. I want to especially thank Dr. Sérgio Marques for introducing me to the computational world of biochemistry and for your consistent help in troubleshooting even across countries, your exceptional support and encouragement and for making a new friend. Special thanks also go to Gaspar Pinto, David Bednář, Stanislav Mazurenko, Joan Planas, Honza Štourač, Miloš Musil, Ondřa Vavra, Honza Mičan, Andrea Schenk Mayerova and Jiří Filipovič for introducing me to their academic field of expertise and for the warmest welcome I could have asked for. This was a very special time and you made it even more special – I hope to see you again – thank you!

Von ganzen Herzen möchte ich meinen Kollegen und guten Freunden Andreas Hunold, Andreas Schneider, Kristina Schell, Leonie Weinmann, Max-Philipp Fischer, Peter Heinemann und Sven Richter danken, die mich als Allerbeste-Spezial-Lieblings-Kollegen von Anfang an am Institut begleitet haben. Danke für

Danksagung

die hilfreichen Diskussionen, schönsten Laboralltage, Grillabende, Feiereien, Getränke-Experimente, Essen-Teilen, Tauch-Eskapaden, Bergkirchweihen, sämtliche Insider, und einfach dass ihr immer für mich da wart und seid! Krischdl “nein-du-bist-die-geilste“ kleine Makrophage, Gremlin, die jeden Tag mit ihrer Anwesenheit (diverser Persönlichkeiten) aufwertet. Und ganz besonders Peter, der als bester Labor-Buddy auch außerhalb des Instituts immer für mich da war, immer zugehört hat und mir beiseite stand. Der für jeden Spaß bereit war und mit dem ich auch an den harten Tagen bis 23 Uhr gern am ITB war. Egal ob durch Kritik oder Heinemann-Glück, du hast mich unterstützt und bist maßgeblich an meinem Erfolg beteiligt – ich danke dir dafür!

Den Größten Dank möchte ich meiner Familie, Mama, Papa, Onkel & Tante ausdrücken, ohne deren Unterstützung ich nicht so weit gekommen wäre. Ganz besonders meiner Mutter, die mich immer bekräftigt und von Anfang an an mich geglaubt hat. Durch deine Hartnäckigkeit stehe ich heute dort, wo ich bin und dafür danke ich dir! Der letzte Dank gebührt meinem Freund und „Partner in Crime“ Sven, der mich gerade in der finalen Phase meiner Arbeit durchweg unterstützt, meine Launen erträgt und mich zum Lachen bringt – Danke für alles!

*» Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less. «*

Marie Skłodowska Curie (1867 – 1934)

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Biochemie und Technische Biochemie in der Abteilung Technische Biochemie an der Universität Stuttgart. Die experimentellen Arbeiten erfolgten im Zeitraum von April 2017 bis März 2021 in Stuttgart. Die bioinformatischen Arbeiten erfolgten zwischen Oktober 2019 und Mai 2021 in den Loschmidt Laboratories der Masaryk University in Brünn in Tschechien und in Stuttgart. Teile dieser Arbeit wurden in den Publikationen “Substrate anchoring and flexibility reduction in CYP153A_{M.aq} leads to highly improved efficiency toward octanoic acid” und “Engineering CYP153A_{M.aq} to oxyfunctionalize its inhibitor dodecylamine using a LC/MS based rapid flow analysis screening” veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form wissenschaftlicher Artikel veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

I ***“Unlocked Potential of Dynamic Elements in Protein Structures: Channels and Loops”***

Rapp, L. R.[‡]; Kreß, N.[‡]; Halder, J. M.[‡]; Hauer, B. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 47, 109–116 (2018). DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.09.010.

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

II ***“Loops und Tunnel: unterschätzte Elemente in Enzymen”***

Rapp, L. R.[‡]; Heinemann P. M.[‡]; Hauer, B. *BIOspektrum*, 26, 434-436 (2020). DOI: 10.1007/s12268-020-1394-2

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

III ***“Substrate anchoring and flexibility reduction in CYP153A_{M,aaq} leads to highly improved efficiency toward octanoic acid”***

Rapp, L. R.; Marques S. M.; Zukic, E.; Rowlinson, B.; Sharma, M.; Grogan, G.; Damborsky, J.; Hauer, B. *ACS Catal.*, 11, 3182-3189 (2021). DOI: 10.1021/acscatal.0c05193

IV ***“Engineering CYP153A_{M,aaq} to oxyfunctionalize its inhibitor dodecylamine using a LC/MS based rapid flow analysis screening”***

Rapp, L. R.; Marques S. M.; Nebel, B., Damborsky, J.; Hauer, B. *ChemCatChem*, e202101648 (2022). DOI: 10.1002/cctc.202101648

Folgende Publikation ist im Zeitraum der Dissertation entstanden, aber nicht Teil dieser Arbeit:

V ***“Expression and characterization of the benzoic acid hydroxylase CYP199A25 from *Arthrobacter* sp.”***

Klenk J.M.; Ertl, J.; Rapp, L. R.; Fischer, M.-P.; Hauer, B. *Mol. Catal.*, 484, (2020) DOI: 10.1016/j.mcat.2019.110739

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG DER EIGENSTÄNDIGKEIT DER DISSERTATION	II
DANKSAGUNG	III
PUBLIKATIONSLISTE	VIII
INHALTSVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
ABSTRACT	XV
ZUSAMMENFASSUNG	XVIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 VIER GENERATIONEN DER BIOKATALYSE	2
1.2 ENZYM ENGINEERING	3
1.3 DER ZUGANG ZUR AKTIVEN TASCHE VON ENZYMEN	5
1.3.1 <i>Flexible Strukturelemente als Engineering Strategie</i>	7
1.4 CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASEN.....	9
1.4.1 <i>Katalytischer Mechanismus und Reaktionsspektrum</i>	10
1.4.2 <i>Klassifizierung des Multikomponentensystems</i>	13
1.4.3 <i>Allgemeine Struktur von P450s</i>	14
1.4.4 <i>Molekulare Tunnel in P450s</i>	16
1.4.5 <i>Die Subfamilie der CYP153A Enzyme</i>	17
1.4.6 <i>P450 Screeningsysteme</i>	18
1.5 Ω -HYDROXYLIERTE ALIPHATISCHE VERBINDUNGEN	21
1.6 ZIELSETZUNG	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 MATERIALIEN.....	25
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	25
2.1.2 <i>Enzyme und molekularbiologische Kits</i>	25
2.1.3 <i>Verwendete Escherichia coli Stämme</i>	26
2.1.4 <i>Plasmide und Oligonukleotide</i>	27
2.1.5 <i>Nährmedien und Puffer</i>	27
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
2.2.1 <i>Isolierung von Plasmid-DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	30
2.2.2 <i>DNA-Sequenzierung</i>	30
2.2.3 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	31
2.2.4 <i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	31

2.2.5	<i>DNA-Reinigung</i>	31
2.2.6	<i>Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange®</i>	31
2.2.7	<i>Sättigungsmutagenese durch overlap extension PCR und 22c-Trick</i>	33
2.2.8	<i>Gibson Assembly®</i>	34
2.2.9	<i>Kolonie-PCR</i>	34
2.2.10	<i>Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen</i>	35
2.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	35
2.3.1	<i>Kultivierung und Stammhaltung</i>	35
2.3.2	<i>Herstellung chemisch kompetenter E. coli Zellen</i>	35
2.3.3	<i>Heterologe Proteinexpression in Schüttelkolben</i>	36
2.3.4	<i>Heterologe Proteinexpression in 96 Deepwell Platten</i>	37
2.3.5	<i>Zellaufschluss</i>	38
2.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
2.4.1	<i>Proteinreinigung</i>	38
2.4.2	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	39
2.4.3	<i>Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels BCA</i>	40
2.4.4	<i>Bestimmung der P450 Konzentration (CO-Assay)</i>	40
2.4.5	<i>Bestimmung der Konzentration der Redoxpartner CamA und CamB</i>	42
2.4.6	<i>Spin-state Spektren (Bindungsaffinität)</i>	42
2.4.7	<i>NADPH-Assay und Bestimmung der Kopplungseffizienz</i>	43
2.5	BIOTRANSFORMATIONEN.....	44
2.5.1	<i>In vitro Biotransformationen</i>	44
2.5.2	<i>Bestimmung von kinetischen Konstanten</i>	44
2.5.3	<i>In vivo Biotransformation in 96 Deepwell Platten</i>	45
2.5.4	<i>Produktion von ω-Hydroxyoctansäure in wachsenden Zellen</i>	46
2.6	CHEMISCH-ANALYTISCHE METHODEN	46
2.6.1	<i>Colorimetrischer ABTS Assay</i>	46
2.6.2	<i>GC-FID Analytik</i>	47
2.6.3	<i>LC/MS basierte Analytik</i>	49
2.7	KRISTALLISATION UND DATENSAMMLUNG	50
2.8	BIOINFORMATISCHE METHODEN.....	50
2.8.1	<i>3DM Sequenzalignment</i>	50
2.8.2	<i>In silico Mutagenese zur Erstellung von Homologiemodellen</i>	51
2.8.3	<i>Vorbereitung der Liganden</i>	51
2.8.4	<i>Vorbereitung der Rezeptoren</i>	51
2.8.5	<i>Tunnel Berechnungen</i>	52
2.8.6	<i>Molekulares Docking in der aktiven Tasche</i>	52
2.8.7	<i>Molekulares Docking entlang der Tunnel</i>	52
2.8.8	<i>Vorbereitung und Equilibrierung des Systems der MD Simulationen</i>	53

Inhaltsverzeichnis

2.8.9	Analyse der MD Simulationen	54
3	ERGEBNISSE.....	56
3.1	UNTERSUCHUNG DER LAGERSTABILITÄT.....	56
3.2	UNTERSUCHUNGEN DES CYP153A _{M.aq} -SYSTEMS IM HINBLICK AUF DIE IM ENZYMKRISTALL VORHANDENEN TUNNELSTRUKTUREN	58
3.2.1	Verfügbare Enzymtunnel der CYP153A _{M.aq} Kristallstruktur	58
3.2.2	Untersuchungen von strukturbildenden Aminosäureresten der Enzymtunnel in Bezug auf das Substratspektrum	60
3.3	SCREENING MIT FREIEN REDUKTASEN UND FUSIONS-KONSTRUKT.....	66
3.4	ERWEITERUNG DES CYP153A _{M.aq} -SYSTEMS AUF KÜRZERKETTIGE FETTSÄUREN AM BEISPIEL VON OCTANSÄURE: ENGINEERING UND BIOINFORMATISCHE ANALYSE.....	67
3.4.1	Rationales Design von CYP153A _{M.aq} mittels Datenbank- und Subfamilien-Analyse	68
3.4.2	Semi-Rationales Design durch Sättigungsmutagenese und anschließende Kombination der Einzelvarianten	70
3.4.3	Vergleich der starren Enzymstrukturen liefern erste Einblicke in unterschiedliche Substratpositionierung und Tunnelarchitektur.....	73
3.4.4	Molekulardynamische Simulationen liefern detaillierte Hinweise auf die Funktion der substituierten Aminosäuren	76
3.4.5	Schrittweise Änderung der Substratspezifität	80
3.4.6	Anwendung der Variante M.aqRLT für die de novo Produktion von ω -Hydroxyoctansäure	81
3.5	GEZIELTE MUTAGENESE VON CYP153A _{M.aq} ZUR TERMINALEN HYDROXYLIERUNG DES INHIBITORS DODECYLAMIN.....	83
3.5.1	Charakterisierung der initialen Dodecylamin-hydroxylierenden Variante M.aqAA	84
3.5.2	Molekulardynamische Simulationen liefern Hinweise auf den Einfluss der Flexibilität auf die Inhibition.....	85
3.5.3	Etablierung und Anwendung eines LC/MS basierten Hochdurchsatz-Screenings ohne chromatographische Separation der Analyten	88
3.5.4	Molekulares Docking liefert Hinweise auf die Unterschiede der Umsetzungen mit Dodecylamin und Dodecansäure.....	90
3.5.5	Koordination der Aminogruppe in der aktiven Tasche erklärt aktive bzw. inaktive Konformation des Dodecylamins	92
3.5.6	Molekulardynamische Simulationen liefern erste Hinweise auf den Einfluss der Flexibilität auf die Umsetzung des Dodecylamins	93
4	DISKUSSION.....	95
4.1	UNTERSUCHUNGEN DES CYP153A _{M.aq} -SYSTEMS IM HINBLICK AUF DIE IM ENZYMKRISTALL VORHANDENEN TUNNELSTRUKTUREN	96
4.2	ERWEITERUNG DES CYP153A _{M.aq} -SYSTEMS AUF KÜRZERKETTIGE FETTSÄUREN AM BEISPIEL VON OCTANSÄURE: ENGINEERING UND BIOINFORMATISCHE ANALYSE.....	102
4.2.1	Engineering von CYP153A _{M.aq} hinsichtlich terminaler Hydroxylierung von Octansäure.....	102

4.2.2	<i>Modellierung und Simulationen liefern detaillierte Hinweise auf die Funktion der substituierten Aminosäuren</i>	106
4.2.3	<i>Änderung der Substratspezifität</i>	111
4.2.4	<i>Anwendung der Variante M.aqRLT für die de novo Produktion von ω-Hydroxyoctansäure</i>	112
4.3	GEZIELTE MUTAGENESE VON CYP153A _{M.aq} ZUR TERMINALEN HYDROXYLIERUNG DES INHIBITORS DODECYLAMIN	113
4.3.1	<i>Einfluss der Flexibilität auf die Inhibition</i>	113
4.3.2	<i>Vom Inhibitor zum Substrat und vice versa</i>	115
4.3.3	<i>Koordination der Aminogruppe in der aktiven Tasche erklärt aktive bzw. inaktive Konformation des Dodecylamins</i>	116
4.3.4	<i>MD Simulationen liefern erste Hinweise auf den Einfluss der Flexibilität auf die Umsetzung des Dodecylamins</i>	116
5	RESÜMEE	118
6	ANHANG	121
7	LITERATURVERZEICHNIS	152

Abkürzungsverzeichnis

5-Ala	5-Aminolävulinsäure
96-DWP	96 <i>Deepwell</i> Platte
Å	Ångström (10^{-10} Meter)
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonsäure)
Amp	Ampicillin
A	Ampere
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i>)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
°C	Grad Celsius
CamA	Ferredoxin Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>
CamB	Ferredoxin aus <i>Pseudomonas putida</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoOx	Cholinoxidase
CYP	Cytochrom P450
CYP153A _{M.aq}	CYP153A Monooxygenase aus <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 DSM 11845
CYP153A _{P.sp}	CYP153A Monooxygenase aus <i>Polaromonas</i> sp. JS666
CV	Variationskoeffizient
cww	Zellnassmasse (engl. <i>cell wet weight</i>)
DAD	Diodenarray-Detektor
dH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DpnI	Restriktionsendonuklease aus <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
fadL	Long-chain fatty acid transport Protein aus <i>E. coli</i>
FA	Fettsäure (engl. <i>fatty acid</i>)
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FeS	Eisen-Schwefel Cluster
FMN	Flavinmononukleotid
fwd	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
GC	Gaschromatographie
FID	Flammenionisationsdetektor
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KPi-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
L	Liter
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LV	Leervektor
M	Molar (Mol/L)
m	Milli
MD	Molekulardynamik
min	Minute
mL	Milliliter
MPG	Monopropylenglycol
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl-tert-butylether
MTP	Multititerplatte
MWCO	Molekulargewicht Grenze (engl. <i>Molecular Weight Cut Off</i>)
n	Nano
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (engl. <i>origin of replication</i>)
ω -FAOH	ω -Hydroxyfettsäure
P450	Cytochrom P450 Monooxygenase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
pdb	Proteindatenbank
PFOR	Reduktase Domäne der Phtalat Familie (engl. <i>Phtalate Family Oxygenase Reductase</i>)
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate - polyacrylamid gel electrophoresis</i>)
SIM-Modus	<i>selected ion monitoring</i> -Modus
TB-Medium	<i>Terrific broth</i> Medium
TMCS	Trimethylchlorosilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
ÜN-Kultur	Übernachtkultur
μ	Mikro
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp

Abstract

Nowadays, enzymes are considered as flexible and highly dynamic macromolecules rather than static structures. Therefore, the classical lock-and-key model postulated by Emil Fischer in 1894 is now obsolete. In more recent reflections, the flexibility and also the ligand-induced dynamics of enzymes are additionally taken into account. It has been shown that targeted changes in the flexible elements of enzymes affect the dominant conformations of the protein, which can sometimes be beneficial for more efficient catalysis. However, the influence of targeted changes by mutations of the dynamic domains, especially of enzyme tunnels, is usually difficult to predict due to the low conservation of residues, and rational approaches for this reason have been a minority. Therefore, for simplification, the static crystal structures of proteins are still often used for (semi-)rational enzyme engineering. In addition, many enzymes do not present their catalytic center unprotected near the surface, but hide it deep in the protein core to exclude non-specific catalytic reactions and to protect the active site. In this case, the "keyhole" is added to the former model that regulates the access of the "key" to the "lock". Earlier (semi-)rational engineering approaches have focused mainly on the active pocket or its affecting amino acids in the second shell of the catalytic center or the crystallized ligand. However, there is increasing interest within biocatalysis in exploring and modifying more distant and highly flexible structural elements such as loop regions and molecular tunnels instead of the active site. Current research on surface loops shows that these flexible loop regions partly determine the entrance of important substrate tunnels. Therefore, this dissertation investigated the potential of tunnel engineering using the P450 monooxygenase CYP153A_{M.aq} from the organism *Marinobacter aquaeolei* VT8. The principle of tunnel engineering to improve or implement new enzymatic functions is well recognized, but is still very little used experimentally, although predictive simulations and retrospective elucidations exist.

At the beginning of this work, the CYP153A_{M.aq} system was studied with respect to the tunnels present in the crystal structure and an extended analysis was

performed using the *in silico* tool CAVER. Three enzyme tunnels were identified: Two putative substrate tunnels 2c and 2e and one solvent tunnel S. In an initial mutagenesis study, the tunnels were investigated separately by single substitutions of the tunnel-lining amino acids regarding the conversion of different substrates. Based on the previous studies of the enzyme, these variants were evaluated for specificity towards fatty acids with different chain lengths (C8, C12, and C16). Since shorter chains (C8) were among the molecules of interest for this work, *n*-octane from the class of alkanes and additionally the alkene *trans*-2-octene were tested. The results demonstrated that mutations in tunnels 2c and 2e affect the conversion and specificity with respect to different substrates. Three positions stood out in particular: depending on the mutation, M228 showed influence on substrate conversion depending on the chain length of the substrates, Q129 and V141 mainly influenced the conversion of shorter-chain substrates. When these amino acid residues are observed in the crystal structure, it is noticeable that they form a triangle around tunnel 2c and partially line the tunnel 2e. Octanoic acid was chosen as the target substrate for the subsequent mutagenesis study on the above amino acids. Aforementioned residues were modified by saturation mutagenesis and a variant library was generated. To identify variants with altered product spectra, a P450 whole-cell screen was adapted based on indirect product detection using hydrogen peroxide / HRP-mediated oxidation of the dye ABTS. Three different semi-rational mutagenesis approaches based on structural sequence alignments of the 3DM database and crystal structures of CYP153A_{M.aq} and the homologous CYP153A_{P.sp} were used to achieve moderate effects on product formation. Subsequent combination of the best hits generated a double (M.aqRT) and finally a triple variant (M.aqRLT), allowing efficient ω -hydroxylation of octanoic acid. M.aqRLT showed 151-fold improved catalytic efficiency and greatly increased substrate binding (25-fold decreased K_m compared to wild type). Molecular dynamics simulations were used to gain new insights into the dynamics of the enzyme and to elucidate modifications of the tunnel structure resulting from the mutations. A strongly reduced flexibility and a new bottleneck of tunnel 2c turned out to be the main features of the generated variants, which are responsible

for the stabilization of the enzyme-substrate complex and the increase of the catalytic efficiency. The interaction of the arginine described by S. Hoffmann as a fatty acid anchor, Q129R, with the carboxylate of octanoic acid leads to its stabilization in the reactive conformation, greatly increasing the activity of the variant M.aqRLT toward octanoic acid. By generating an artificial fusion construct M.aqRLT-PFOR and in vivo upstreaming of a thioesterase that produces increased octanoic acid, de novo production of $129 \pm 5 \mu\text{M}$ ω -hydroxyoctanoic acid was demonstrated as an application example.

In the final part of the work, targeted engineering within the tunnels was used to change the substrate preference of CYP153A_{M.aq} to dodecylamine, an inhibitory fatty amine. To measure the variant library directly from 96-deepwell plates, an LC/MS-based screening method was established and applied. By omitting a chromatographic separation of the analytes, the measurement time could be considerably reduced, from 5.5 minutes to 36 seconds per sample. While the used dodecylamine acts as an inhibitor on the wild type ($\text{IC}_{50} = 0.9 \mu\text{M}$), targeted mutagenesis at the hotspots identified in this work generated a variant, M.aqESE, that accepts the previous inhibitor as a new substrate (10 TON h^{-1}). By introducing two glutamic acids, the amino group was held in the tunnel and prevented from coordinating to the catalytically active iron, causing the inhibitory effect. It was found that the generated variants were less inhibited by the amine and at the same time had less affinity for the acid, as the acid group was repelled by the glutamic acid residues. In the course of this work, it was clearly shown which tremendous effects can be generated by enzyme engineering on tunnel structures and the potential that lies in the combination of experimental studies and computational modeling and simulation for a deeper understanding of enzymes and enzyme catalysis.

Zusammenfassung

Enzyme werden heutzutage als flexible und hochdynamische Makromoleküle und nicht mehr als statische Strukturen betrachtet. Daher ist das klassische Schlüssel-Schloss-Modell, das 1894 von Emil Fischer postuliert wurde, mittlerweile überholt. In neueren Betrachtungen wird die Flexibilität und auch die von Liganden induzierte Dynamik der Enzyme zusätzlich berücksichtigt. Es wurde gezeigt, dass gezielte Veränderungen der flexiblen Elemente von Enzymen die dominanten Konformationen des Proteins beeinflussen, was mitunter für eine effizientere Katalyse von Vorteil sein kann. Jedoch ist der Einfluss von gezielten Veränderungen durch Mutationen der dynamischen Bereiche, besonders von Enzymtunneln, aufgrund der geringen Konservierung von Aminosäuren meist schwierig vorherzusagen und rationale Ansätze aus diesem Grund bisher eine Seltenheit. Zur Vereinfachung wird daher immer noch oftmals mit den statischen Kristallstrukturen von Proteinen für das (semi-)rationale Enzym Engineering gearbeitet. Hinzu kommt, dass viele Enzyme ihr katalytisches Zentrum nicht nahe der Oberfläche ungeschützt präsentieren, sondern tief in der Proteinstruktur verbergen, um unspezifische katalytische Reaktionen auszuschließen und das aktive Zentrum zu schützen. In diesem Fall wird das „Schlüsselloch“ dem alten Modell hinzugefügt, das den Zugang des „Schlüssels“ zum „Schloss“ reguliert. Frühere (semi-)rationale Engineering Ansätze fokussierten sich hauptsächlich auf die aktive Tasche oder deren beeinflussende Aminosäuren in einer bestimmten Nähe zum katalytischen Zentrum oder des kristallisierten Liganden. Immer mehr an Interesse gewinnt innerhalb der Biokatalyse jedoch die Erforschung und Veränderung von weiter entfernten hochflexiblen Strukturelementen wie Loopregionen und molekulare Tunnel anstelle des aktiven Zentrums. Aktuelle Forschungen an Oberflächenloops zeigen, dass diese flexiblen Loopregionen zum Teil den Eingang wichtiger Substrattunnel bestimmen. Daher wurde im Zuge dieser Dissertation das Potenzial des Tunnel Engineerings am Beispiel der P450 Monooxygenase CYP153A_{M.aq} aus dem Organismus *Marinobacter aquaeolei* VT8 untersucht. Das Prinzip des Tunnel Engineerings zur Verbesserung oder

Umsetzung neuer enzymatischer Funktionen ist anerkannt, wird aber experimentell noch sehr wenig genutzt, obwohl prognostische Simulationen und retrospektive Aufklärungen existieren.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das CYP153A_{M.aq} System im Hinblick auf die in der Kristallstruktur vorhandenen Tunnel untersucht und eine erweiterte Analyse mit dem *in silico* Werkzeug CAVER durchgeführt. Dabei wurden drei Enzymtunnel identifiziert: Zwei putative Substrattunnel 2c und 2e und ein Solvent Tunnel S. In einer anfänglichen Mutagenesestudie wurden die Tunnel separat durch einzelne Substitutionen der strukturbildenden Aminosäuren hinsichtlich der Umsetzung verschiedener Substrate untersucht. Basierend auf den vorherigen Studien des Enzyms wurden diese Varianten auf die Spezifität hinsichtlich Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen (C8, C12 und C16) evaluiert. Da für diese Arbeit unter Anderem kürzerkettige Moleküle (C8) von Interesse waren, wurden aus der Klasse der Alkane *n*-Octan und zusätzlich das Alken *trans*-2-Octen getestet. Die Ergebnisse demonstrieren, dass Mutationen in den Tunneln 2c und 2e die Umsetzung und die Spezifität hinsichtlich verschiedener Substrate beeinflussen. Drei Positionen stachen dabei besonders hervor: M228 zeigte je nach Mutation Einfluss auf den Substratumsatz in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Substrate, Q129 und V141 beeinflussten vor allem die Umsetzung kürzerkettiger Substrate. Werden diese Aminosäurereste in der Kristallstruktur betrachtet, fällt auf, dass sie ein Dreieck um den Tunnel 2c bilden und teilweise den Tunnel 2e begrenzen. Für die nachfolgende Mutagenesestudie an den oben genannten Aminosäuren wurde die Octansäure als Zielsubstrat gewählt. Besagte Reste wurden mittels Sättigungsmutagenese verändert und eine Variantenbibliothek erstellt. Um Varianten mit verändertem Produktspektrum zu identifizieren, wurde ein P450-Ganzzell-Screening auf Basis der indirekten Produktdetektion mittels Wasserstoffperoxid / HRP-vermittelter Oxidation des Farbstoffs ABTS angepasst. Mit drei unterschiedlichen semi-rationalen Mutagenese Ansätzen, die auf Struktur-Sequenz-Alignments der 3DM-Datenbank und Kristallstrukturen von CYP153A_{M.aq} und dem homologen CYP153A_{P.sp} basieren, wurden moderate Auswirkungen auf die Produktbildung erzielt. Durch die anschließende Kombination der besten Hits

konnte eine Zweifach- (M.aqRT) und schließlich eine Dreifachvariante (M.aqRLT) generiert werden, die die effiziente ω -Hydroxylierung von Octansäure ermöglichen. M.aqRLT zeigte eine 151-fach verbesserte katalytische Effizienz und eine stark erhöhte Substratbindung (25-fach verringerter K_m im Vergleich zum Wildtyp). Mithilfe von molekulardynamischen Simulationen konnten neue Erkenntnisse über die Dynamik des Enzyms gewonnen und aus den Mutationen resultierende Modifikationen der Tunnelstruktur verdeutlicht werden. Eine stark reduzierte Flexibilität und ein neuer *Bottleneck* des Tunnels 2c stellten sich als Hauptmerkmale der generierten Varianten heraus, die für die Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes und die Steigerung der katalytischen Effizienz verantwortlich sind. Die Interaktion des von S. Hoffmann beschriebenen Arginins als Fettsäureanker, Q129R, mit dem Carboxylat der Octansäure führt zu deren Stabilisierung in der reaktiven Konformation, wodurch die Aktivität der Variante M.aqRLT gegenüber Octansäure stark gesteigert wird. Durch die Generierung eines artifiziellen Fusionskonstrukts M.aqRLT-PFOR und der *in vivo* Vorausschaltung einer Thioesterase, die vermehrt Octansäure bildet, wurde die *de novo* Produktion von $129 \pm 5 \mu\text{M}$ ω -Hydroxyoctansäure als Anwendungsbeispiel gezeigt.

Im finalen Teil der Arbeit wurde durch gezieltes Engineering innerhalb der Tunnel die Substratpräferenz von CYP153A_{M.aq} zu Dodecylamin, einem inhibierend wirkenden Fettamin, verändert. Um die Variantenbibliothek direkt aus 96-Deepwell Platten zu messen, wurde eine auf LC/MS-basierende Screeningmethode etabliert und angewendet. Durch die Umgehung einer chromatographischen Trennung der Analyten konnte die Messzeit erheblich, von 5,5 Minuten auf 36 Sekunden je Probe herabgesetzt werden. Während das verwendete Dodecylamin auf den Wildtypen als Inhibitor wirkt ($\text{IC}_{50} = 0,9 \mu\text{M}$) konnte durch gezielte Mutagenese an den in dieser Arbeit identifizierten Hotspots eine Variante, M.aqESE, generiert werden, die den bisherigen Inhibitor als ein neues Substrat akzeptiert (10 TON h^{-1}). Durch das Einbringen von zwei Glutaminsäuren wurde die Aminogruppe im Tunnel fixiert und daran gehindert an das katalytisch aktive Eisen zu koordinieren, was den inhibierenden Effekt auslöst. Es zeigte sich, dass die generierten Varianten weniger durch das Amin gehemmt werden und gleichzeitig

weniger affin zur Säure sind, da die Säuregruppe von den Glutaminsäureresten abgestoßen wurde. Im Verlauf dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, welche enormen Effekte durch Enzym Engineering an Tunnelstrukturen generiert werden können und welches Potenzial in der Kombination von experimentellen Versuchen und der computergestützten Modellierung und Simulation zum tiefergehenden Verständnis von Enzymen und Enzymkatalyse liegt.

1 Einleitung

Enzyme werden seit mehr als einem Jahrhundert bewusst als Biokatalysatoren für chemische Transformationen eingesetzt. Durch die Verwendung von Zellen, z.B. Mikroorganismen oder Enzymen kann eine nachhaltige Produktion von Rohstoffen, Fein-, aber auch Bulkchemikalien aus erneuerbaren Ressourcen ermöglicht werden.^{1,2} Darunter fallen z. B. Biokraftstoff, organische Lösemittel, Polymer-Bausteine, enantiomerenreine Verbindungen für die pharmazeutische Industrie, Antibiotika, Agrochemikalien, Duftstoffe und Nahrungszusätze, wie Vitamine, Aromen und Süßstoffe.³⁻⁶ Der Einsatz von Enzymen als Katalysatoren in industriellen Prozessen ermöglicht oftmals eine exzellente chemo-, regio- und stereoselektive Synthese komplexer Verbindungen aus einem umfangreichen Spektrum von Substraten.^{4,7} Die Enzyme können dabei isoliert (gereinigt, in Zellysaten oder immobilisiert) oder auch im Ganzzellsystem (als ruhende oder wachsende Zellen) eingesetzt werden.⁸ Als Lyophilisate können Enzyme oder Lysate über einen längeren Zeitraum schonend gelagert und deren Aktivität in Lösung wiederhergestellt werden. Da enzymatische Reaktionen in der Regel unter milden Reaktionsbedingungen in wässrigen Lösungen ablaufen ist das Ausmaß an Abfall- und Nebenprodukten deutlich reduziert, wodurch die Enzymkatalyse in den Bereich der grünen Chemie fällt.^{8,9} Ein entscheidender zusätzlicher Vorteil von Enzymen im Vergleich zu vielen synthetischen Katalysatoren ist ihre natürliche Kompatibilität zueinander. Somit können Enzyme meist bei physiologischen Bedingungen kombiniert werden, um mehrere Reaktionen in einem einzelnen *One-Pot*-Prozess durchzuführen, wodurch multienzymatische Kaskaden für die Synthese komplexer Verbindungen entstehen.¹⁰ Eine herausragende Arbeit wurde 2019 von Huffmann *et al.* am Beispiel der Synthese des HIV-Therapeutikum Islatravir durch eine dreistufige Kaskade von neun Enzymen gezeigt.¹¹ Solche Kaskaden reduzieren die für die Synthese benötigte Zeit und verringern gleichzeitig die Produktion von Abfallprodukten erheblich, da Reinigungsschritte von Zwischenprodukten entfallen und das Gleichgewicht weg von instabilen oder gar hemmenden Intermediaten verlagert wird.^{2,10}

1.1 Vier Generationen der Biokatalyse

Bis zum heutzutage genutzten breiten enzymatischen Substrat- und Reaktionsspektrum wurden mehrere Generationen der Biokatalyse durchlaufen (Abbildung 1). In der ersten Generation wurden Enzyme für industriell nützliche, jedoch in der Natur rare Reaktionen herangezogen, wie die Synthese von (*R*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Cyanwasserstoff mithilfe eines Pflanzenextrakts.¹² Neuere Beispiele sind z. B. die Verwendung von Proteasen in Waschmittel, oder die Umwandlung von Glukose in Süßstoffe durch Isomerasen.^{13,14} Das Hauptproblem dieser Anwendungen kam mit der niedrigen Stabilität der Enzyme auf, was zur zweiten Generation der Biokatalyse führte. Anfängliches Protein Engineering wurde genutzt, um primär Stabilitäten zu erhöhen und das Substratspektrum von Enzymen zu erweitern. Dieser Wandel führte zur Erweiterung der Biokatalyse auf die Herstellung von pharmazeutischen Produkten und Feinchemikalien. Ein Beispiel hierfür ist die Nitril-Hydratase-katalysierte Hydratisierung von Acrylsäure zu Acrylamid als Ausgangsstoff für Polymere.¹⁵

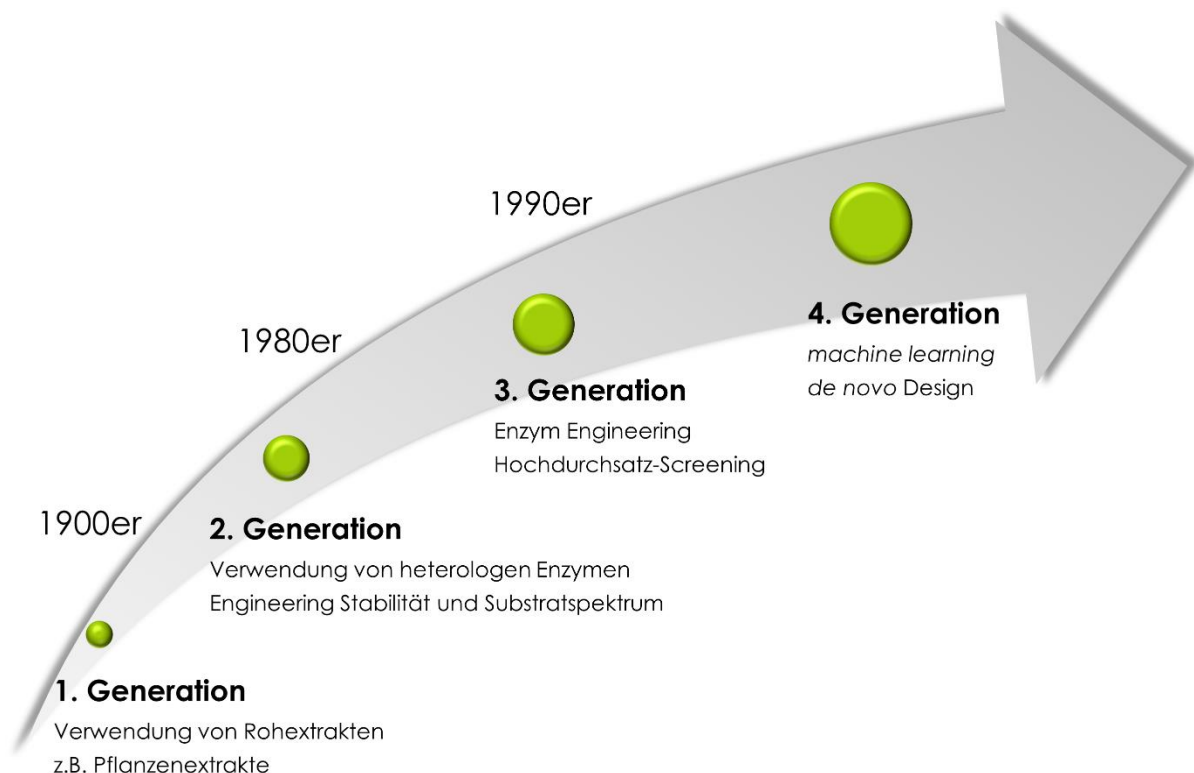


Abbildung 1: Darstellung der vier Generationen der Biokatalyse.

Viele Enzyme besitzen jedoch nur ein eingeschränktes Substratspektrum und weisen geringe Stereo- und Regioselektivitäten hinsichtlich nicht-natürlicher Substrate auf. Zudem werden viele natürlich im Organismus vorkommende Enzyme durch ihre eigenen Substrate und auch Produkte aufgrund Stoffwechselregulationen inhibiert.¹⁶⁻¹⁸ Für viele gewünschte Reaktionen existieren außerdem bisher keine bekannten Biokatalysatoren oder diese können nicht funktional und rekombinant hergestellt werden.¹⁹ Die dritte Generation, die hauptsächlich von Frances Arnold und Manfred Reetz durch gerichtete Evolution und Hochdurchsatz-Screenings eingeleitet wurde, stellt sich diesen Herausforderungen.²⁰ Bereits im Jahr 2017 begann Uwe Bornscheuer über die vierte Generation der Biokatalyse zu mutmaßen.²¹ Als übergeordnete Herausforderung wird hierbei das Voraussagen von entstehenden Effekten angesehen. Da noch immer weniger als 0,1 % aller bekannten Proteinsequenzen als dreidimensionale Strukturen gelöst sind, stellt es eine Schwierigkeit dar, die Funktion von neuen Enzymen und geeignete Mutationen für deren Engineering oder gar dem *de novo* Design zu prognostizieren. Einen ersten Schritt in diese Richtung zeigt die Gruppe um David Baker mit der Formulierung von Grundsätzen, um die Proteinfaltung vorherzusagen.²² Ein weiterer Schwerpunkt wird vermutlich in der Kombination von Enzymen, in Kaskaden oder dem *Metabolic Engineering*, liegen. All dies wird in Zukunft durch computergesteuertes Design und Ultrahochdurchsatz-Methoden zum Screening neuer Enzyme erleichtert werden. Doch bisher sind hierfür erst die Grundsteine gelegt und es bedarf der Kombination aus experimentellem Enzym Engineering mit bioinformatischer Aufklärung der generierten Effekte, um dieser Vision näherzukommen.

1.2 Enzym Engineering

Grundsätzlich gibt es, neben dem *de novo* Design, drei Herangehensweisen an Enzym Engineering: (i) Die gerichtete Evolution, bei der Mutationen z. B. über *error prone* PCR zufällig eingebaut oder Gene und dadurch die entstehenden Proteine über *DNA-Shuffling* neu zusammengesetzt werden, (ii) das semi-rationale Design, bei dem ausgewählte Positionen oder Abschnitte mittels Sättigungsmutagenese

verändert werden und (iii) das rationale Proteindesign, bei dem die DNA gezielt durch ortsspezifische Mutagenese verändert wird.^{17,23-25}

Für die gerichtete Evolution ist durch die nicht-rationale Herangehensweise keine strukturelle Information über die Enzyme notwendig, jedoch ist die Grundlage der Analyse ein geeignetes Hochdurchsatz-Screening zur Selektion von Varianten mit den gewünschten Verbesserungen. Beim rationalen und semi-rationalen Design werden bestimmte Positionen basierend auf den starren Kristallstrukturen oder Homologiemodellen identifiziert. Die Kombination dieser Methoden ermöglicht es, kleinere und intelligentere Bibliotheken zu erstellen.²⁶ Statt Kulturen aus unterschiedlichen Habitaten zu erfassen, rückt das Screening in Datenbanken zur Identifizierung neuer Enzyme oder solcher mit gewünschten Eigenschaften in den Vordergrund.²⁷ Das computergestützte, von Grund auf neue, *de novo* Design von Enzymen befindet sich gerade noch am Anfang der Forschung.^{20,24} Außerdem wird das Engineering auch immer mehr dazu verwendet Enzyme besser zu verstehen, vorteilhafte Mutationen vorherzusagen und somit im Idealfall später gezielt z. B. über *machine learning* einzubringen.^{28,29}

Rationale und semi-rationale Ansätzen konzentrieren sich oft auf die aktive Tasche von Enzymen, um Übergangszustände direkt zu beeinflussen. Gerichtete Evolutionsstudien hingegen führen oft zu Variationen weit entfernt vom aktiven Zentrum.³⁰ Hierbei stellt sich die Frage was die Mutationen bewirken, wenn diese nicht direkt an der Katalyse oder der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt sind. Zum Beispiel können Mutationen an der Oberfläche des Enzyms die Faltung oder auch die Stabilität hinsichtlich Lösemittel und Temperatur beeinflussen.^{31,32} Oft werden aber auch Mutationen entfernt vom aktiven Zentrum und der Oberfläche beobachtet, die deutliche Verbesserungen hinsichtlich Aktivität und auch Selektivität zeigen. Meist befinden sich diese Mutationen an dynamischen Elementen, wie Loops, oder an Sekundärstrukturen, die Tunnelstrukturen bilden. Diese Mutationen können z. B. die Flexibilität von Enzymen, sowie den Eintritt von Substraten oder Austritt von Produkten beeinflussen.^{33,34}

1.3 Der Zugang zur aktiven Tasche von Enzymen

Zu Beginn der Enzymkatalyse wurde das Schlüssel-Schloss-Prinzip von Emil Fischer, mit dem Enzym als Schloss und dem Substrat als Schlüssel als traditionelles Enzymmodell angesehen.³⁵ So wurde verdeutlicht, dass die Größe und Form des Substrats zum Enzym passen muss, um einen aktiven Enzym-Substrat-Komplex für die erfolgreiche Katalyse zu bilden. Über 60 Jahre später wurde dem starren Modell durch David Koshland eine gewisse Flexibilität zugewiesen. Dieser beschreibt den sogenannten *induced-fit* Mechanismus, bei dem das Binden des Liganden eine Konformations-änderung des Enzyms bewirkt.³⁶ Diese Modelle beschreiben jedoch lediglich Enzyme mit weit geöffneten oder an der Oberfläche präsentierten aktiven Taschen. Was dabei jedoch nicht berücksichtigt wird ist der Zugang zu katalytischen Zentren, die tief in der Proteinstruktur verborgen sind. Von Prokop und Kollegen wurde daher eine Erweiterung der klassischen Modelle vorgeschlagen: Das Schlüssel-Schlüsseloch-Schloss-Modell.³⁷ Hinzu kommt hier das Schlüsseloch, das den Pfad zwischen aktivem Zentrum und Enzymoberfläche repräsentiert und auch reguliert. Dieses Modell spiegelt die Bedeutung des Substrateingangs und des Produktaustritts für die Aktivität, Spezifität und Selektivität des Enzyms wider. Größe, Form, physikalisch-chemische Eigenschaften und Dynamik dieser Proteintunnel unterscheiden zwischen den Liganden und können Kinetik und Gleichgewichte des Substrateingangs und Produktaustritts bestimmen.^{34,37-39} Verschiedene Aminosäureseitenketten sind an der Kontrolle des Transports durch diese Tunnel beteiligt und können als *Gatekeeper* wirken. Sogenannte *Gates* sind dynamische Strukturmerkmale die durch Konformationsänderungen reversibel zwischen offenen und geschlossenen Zuständen wechseln und somit den Durchgang von Molekülen steuern können.⁴⁰ An unterschiedlichen *Gating*-Mechanismen wirken zwischen ein bis vier Aminosäuren mit und tragen auf diese Weise zu einer Filterfunktion für die Selektivität der Enzyme bei.⁴¹

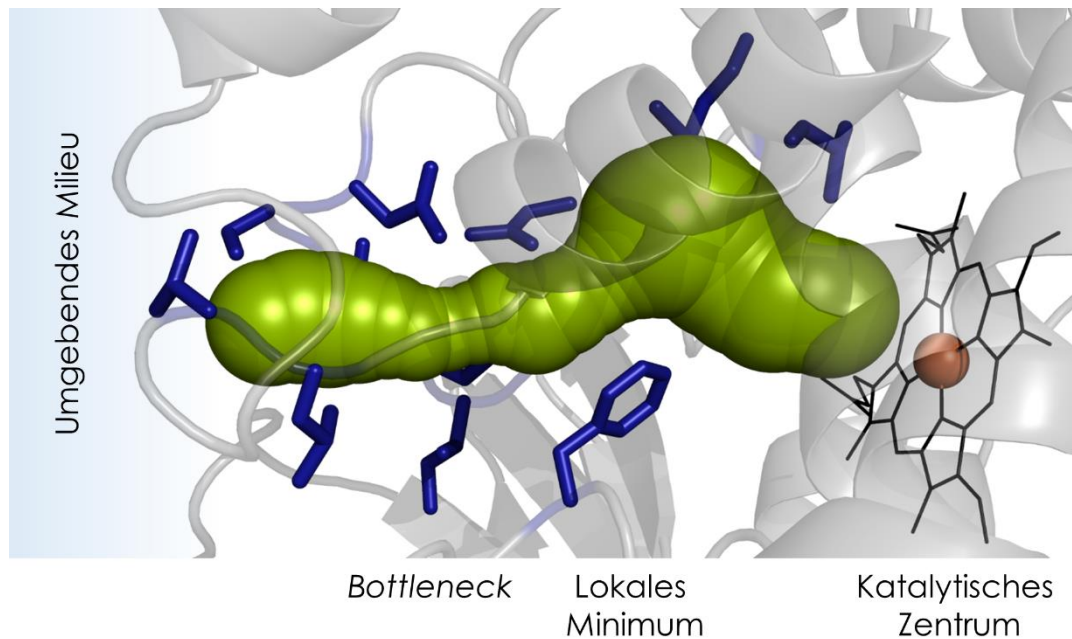


Abbildung 2: Beispiel eines Enzymtunnels der mit CAVER identifiziert wurde. Der abgebildete Tunnel aus CYP153A_{p.sp.} (PDB ID 7A07) führt vom katalytischen Zentrum aus dem Enzym hinaus in das umgebende Milieu. Tunnel-säumende Aminosäurereste (blaue *sticks*) bilden ein lokales Minimum und den *Bottleneck*. Das Häm ist als schwarze *sticks* und das katalytisch aktive Eisen als eine orangefarbene Kugel dargestellt.

In einer Studie von Pravda *et al.* in 2014 wurden 4306 Enzyme hinsichtlich vorhandener Tunnelstrukturen untersucht und kategorisiert.⁴² Mit verschiedenen Software Tools (z. B. MOLE und CAVER) können Tunnel in Proteinen identifiziert, visualisiert und untersucht werden (Abbildung 2).^{43,44} Dabei werden von einem gewählten Startpunkt in der aktiven Tasche die Hohlräume, die die Tunnel bilden, mit einem bestimmten Probenradius aus dem Enzym heraus erfasst. Mehr als 64 % der untersuchten Enzyme wiesen dabei lange Tunnel von mindestens 15 Å zwischen aktivem Zentrum und Oberfläche auf.⁴² In Ribosomen müssen beispielsweise neu synthetisierte Peptide das Protein durchqueren, während die Kette stetig verlängert wird, und Transmembranproteine ermöglichen den spezifischen Durchgang von Molekülen durch die Membran.^{45,46} In vielen Enzymen hingegen ist das katalytisch aktive Zentrum von dem umgebenden Medium und vor Verbindungen geschützt, um ungewünschte Reaktionen zu verhindern und diese zu steuern.

1.3.1 Flexible Strukturelemente als Engineering Strategie

Durch gezieltes Engineering innerhalb der aktiven Tasche können enzymatische Katalysemechanismen aufgeklärt, neue mechanistische Details eingebracht oder Selektivitäten gänzlich verändert werden.⁴⁷⁻⁴⁹ Indem die Bindetasche vergrößert oder verkleinert wird, kann zudem das Substratspektrum deutlich ausgeweitet werden.⁵⁰⁻⁵² In gerichteten Evolutionsstudien und mittels enzymatischer „Ahnenforschung“ werden häufig vorteilhafte Mutationen entdeckt, die weit entfernt von der aktiven Tasche sind. Sind die Positionen an flexiblen, dynamischen Elementen gelegen, beeinflussen diese oftmals die Erkennung, Orientierung und den Eintritt von Substraten. Daher rückt das gezielte Engineering von Bereichen abseits der aktiven Tasche, wie entfernte Loops und molekulare Tunnel, immer weiter in den Vordergrund.^{37,49,53} In einer aktuellen Studie zeigen Hunold *et al.* auffällige Unterschiede bei Loopstrukturen an der Oberfläche von Dioxygenasen verschiedener Organismen, die vermutlich den Eingang des Substrattunnels formen.^{54,55} Heinemann und Kollegen haben Oberflächenloops in der Cumol Dioxygenase systematisch mutiert und konnten Änderungen in der Aktivität, sowie die Bildung neuer Produkte und Enantiomere zeigen.⁵⁶ Eine Analyse mit CAVER deutet darauf hin, dass durch die Bewegung der Loops neue Tunnel entstehen. Während mehrere Beispiele für Loop-Engineering für verschiedene Enzymklassen berichtet wurden, ist das Potenzial der Enzymtunnel noch wenig experimentell erforscht.^{33,34} Diese Elemente stehen jedoch in einem wechselseitigen Zusammenhang, da Tunnel oft von flexiblen Loops gebildet werden.

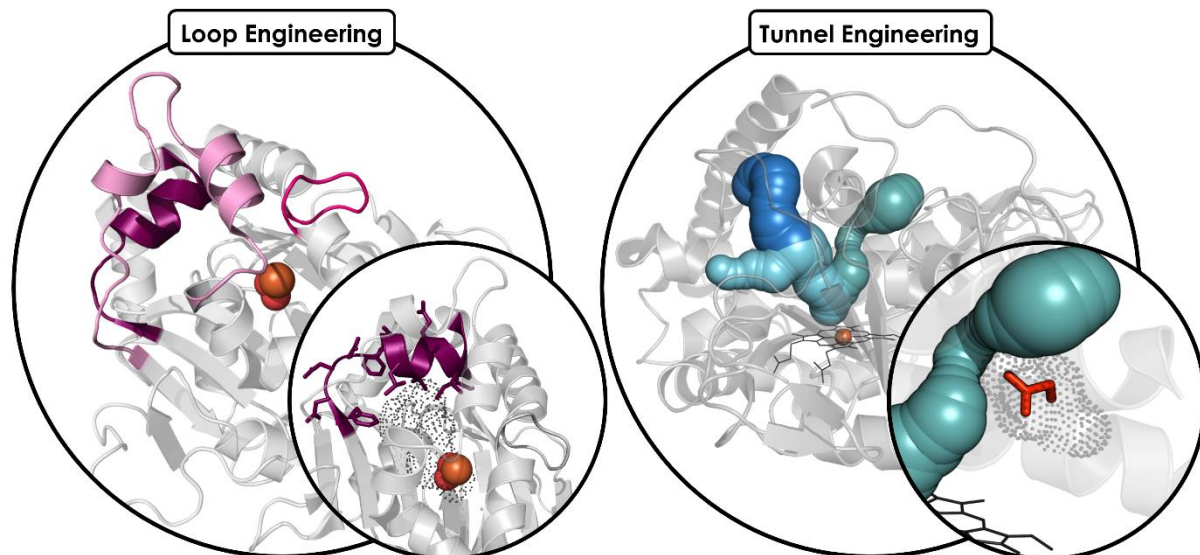


Abbildung 3: Beispielhafte Betrachtung der flexiblen Strukturelemente: Loop und Tunnel Engineering. (A) Oberflächenloops der Cumendioxigenase (PDB ID 1WQL) in verschiedenen Violetttönen dargestellt. Die aktive Tasche mit dem zentralen Eisen (orange) und zwei Sauerstoffmolekülen (rot) ist mit Punkten angedeutet. (B) Enzymtunnel der CYP153A_{M.aq} (PDB ID 5FYF) in verschiedenen Blautönen dargestellt. Die Van-der-Waals-Radien der Atome der Aminosäure, die einen *Bottleneck* bildet sind durch Punkte angedeutet.

In Abbildung 3 sind beispielhaft Loops und Tunnel gezeigt, die durch Engineering der beteiligten Aminosäuren verändert werden können. Da ein rationales Design dieser Elemente aufgrund deren Flexibilität eine große Herausforderung darstellt, ist es wichtig experimentelle Studien mit computergestützten Analysen zu verknüpfen, um wiederkehrende Muster mit dieser Engineering Strategie zukünftig besser vorhersagbar zu gestalten.⁵⁷ In einer gerichteten Evolutionsstudie demonstrieren Li und Kollegen eine kombinatorische Mutationsstrategie von Aminosäureresten im Eingangstunnel und im aktiven Zentrum mittels iterativer Sättigungsmutagenese, basierend auf der Analyse von Tunneln in einem Homologiemodell der Monoaminoxidase MAO-N.⁵⁸ Mit dieser Strategie konnte die Gruppe die Wechselzahl gegenüber sterisch anspruchsvollen Substraten auf bis zu 46 min⁻¹ steigern und die Stereoselektivität des Enzyms verändern. Eine beeindruckende Studie von Brezovsky *et al.* zeigt, dass es noch größeres Potenzial birgt, wenn bioinformatische und experimentelle Arbeiten in Einklang gebracht werden: Die Gruppe generierte die bisher aktivste bekannte Halogenalkan Dehalogenase, indem der zentrale Eingangstunnel geschlossen und ein *de novo* Tunnel in die Proteinstruktur eingeführt wurde. *Bottleneck*-Reste eines

sehr engen Tunnels wurden durch Sättigungsmutagenese modifiziert, um den Tunnel für Substrate zugänglich zu machen. Die Verbreiterung wurde in MD-Simulationen bestätigt und nachfolgend die Produktfreisetzung und Substrathemmung experimentell weiter verbessert.⁵⁹

In den letzten Jahren bezog sich die Forschung häufig auf die Tunnel von P450 Monooxygenasen, da das katalytische Zentrum dieser Enzyme tief in der Proteinstruktur verborgen liegt. Einige Studien haben sich dabei hauptsächlich mit computergestützten Methoden auseinandergesetzt, oder bereits bestehende experimentelle Daten unterstützt. Magistrato und Kollegen haben mithilfe von MD Simulationen herausgefunden, dass zwei von drei Tunneln in CYP19A1 potenzielle Wege für das Substrat als auch den Inhibitor sind, obwohl diese sich in Größe, Form und Hydrophobizität unterscheiden.⁶⁰ Ebert *et al.* zeigten, dass zwei bereits experimentell nachgewiesene Hotspots an der Substratbindung in CYP102A1 beteiligt sind und sagten durch ihre Simulationen eine weitere Ankerposition voraus, die experimentell verifiziert wurde.⁶¹ Ein neues Beispiel von Meng und Kollegen präsentiert ein Tunnel-Engineering in CYP152A1 in dem die Substratspezifität durch die Substitution zweier Phenylalanin Seitenketten zu einem Alanin und einem Valin hin zu langkettigen Fettsäuren verändert wird.⁶² Aufgrund der Vielzahl und Länge der Tunnel in P450 Monooxygenasen, stellen sich diese Enzyme als hervorragende Modellobjekte für Tunnel-spezifisches Engineering dar.

1.4 Cytochrom P450 Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen (P450s) bilden eine der größten und auch ältesten Superfamilien von Enzymen, die in allen biologischen Reichen vertreten sind. Bisher sind mehr als 52 000 Gensequenzen dieser Häm-Thiolat Enzyme bekannt, jedoch nur ein Bruchteil charakterisiert (CYPED-Datenbank, Stand 26.05.2021).⁶³ Die gebräuchliche Nomenklatur basiert auf einem Nummerierungsschema von Nelson, das hauptsächlich auf der prozentualen Aminosäuresequenzidentität beruht.^{64,65} Dabei wird die P450 Superfamilie (CYP) in Familien (> 40 % Sequenzidentität; CYP1, CYP2,...) und Subfamilien (> 55 %

Sequenzidentität; CYP1A, CYP1B,...) eingeteilt. Eine nachfolgende Nummer repräsentiert abschließend das individuelle Gen innerhalb einer Subfamilie.

P450 Monooxygenasen sind NAD(P)H abhängige Oxidoreduktasen, die als prosthetische Gruppe ein Eisenatom in einem Porphyrinring als katalytisches Zentrum tragen. Ihren Namen erhielten die P450s historisch aufgrund der besonderen spektralen Eigenschaften. Geht das reduzierte Häm-Eisen im Enzym einen Komplex mit Kohlenstoffmonoxid (CO) ein, verschiebt sich die Soret-Bande von 420 nm nach 450 nm.⁶⁶ Ein Absorptionsmaximum bei 420 nm resultiert aus einer Störung bzw. Abschwächung der Thiolatbindung des Cystein-Restes, der den fünften Liganden des Häm-gebundenen Eisens darstellt.⁶⁷ Hierbei unterscheiden sich zwei Spin-Zustände des Eisens: Die oxidierte Form des Häm-Eisens (Fe(III)) befindet sich im Low-Spin Zustand mit einem Soret-Maximum bei 420 nm und kann durch die Bindung eines Liganden in den High-Spin Zustand angeregt werden. Diese besondere Eigenschaft kann genutzt werden, um über Differenzspektren sowohl die P450-Konzentration zu ermitteln, als auch die Bindung von Liganden in Lösung zu untersuchen. Verdrängt ein potenzielles Substrat das Wasser im aktiven Zentrum, verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf ca. 390 nm (Typ I). Anhand der Differenz zwischen High- und Low-Spin kann die Dissoziationskonstante eines Enzym-Substrat-Komplexes in Abhängigkeit der Substratkonzentration bestimmt werden. Anhand der Verschiebung des Soret-Maximums kann zwischen Substrat und Inhibitor unterschieden werden. Durch die Bindung eines Inhibitors verschiebt sich das Absorptionsmaximum in die entgegengesetzte Richtung (Typ II). Für Thiolate auf 450 – 460 nm, bei Cyaniden auf 440 – 450 nm und für Stickstoffverbindungen auf 422 – 435 nm.^{68,69}

1.4.1 Katalytischer Mechanismus und Reaktionsspektrum

Der Mechanismus von P450 Enzymen beruht auf einem komplexen, mehrstufigen katalytischen Zyklus, unter der Beteiligung mehrerer Intermediatzustände und möglichen Abbruchreaktionen. Dabei wird die katalytische Oxidation hauptsächlich von Kohlenstoffverbindungen vermittelt, wobei zunächst das Substrat in der aktiven Tasche in der Häm-Domäne bindet. Dies führt zur

Verdrängung eines Wassermoleküls und zum Start des katalytischen Zyklus (Abbildung 4).

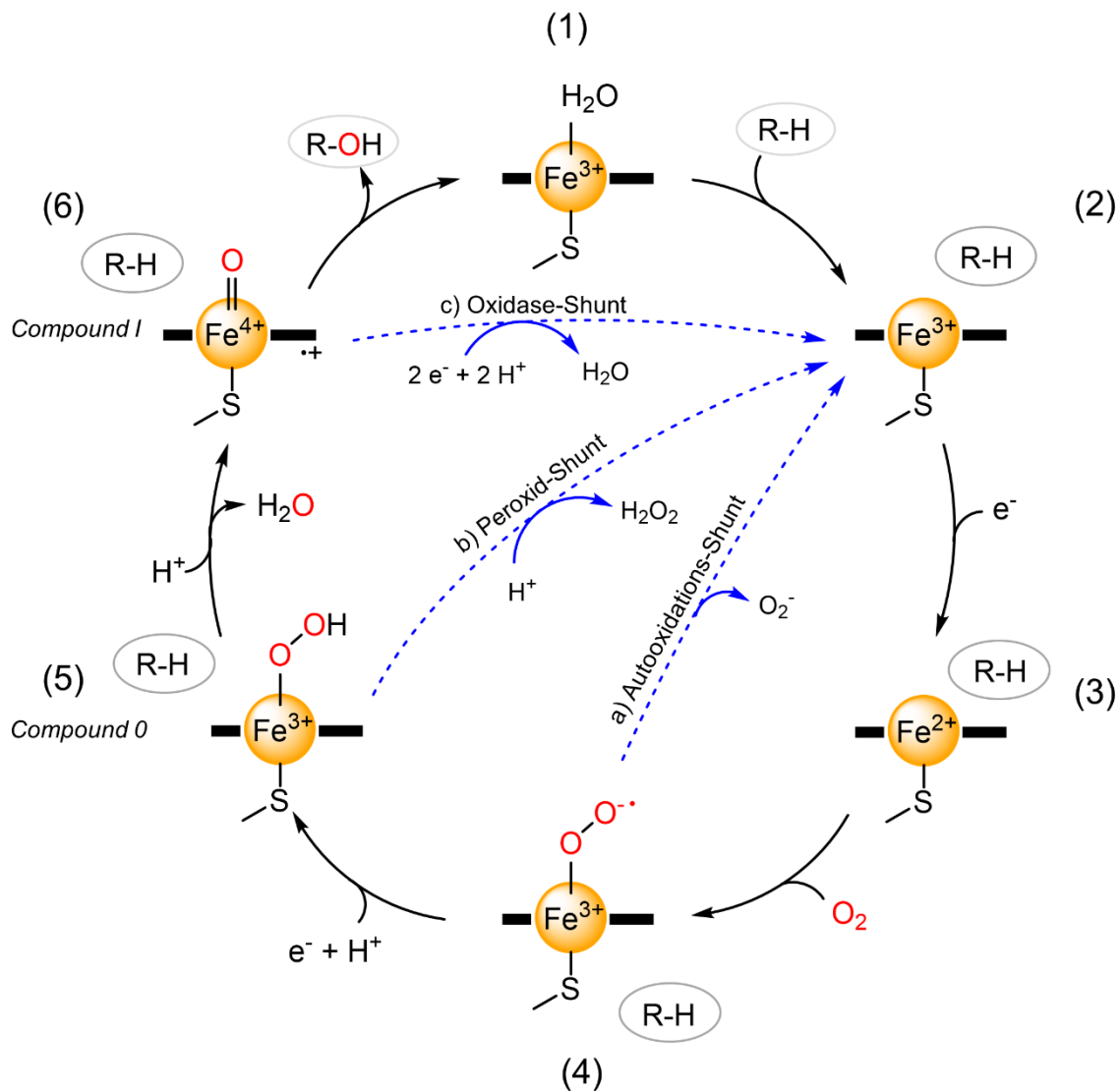


Abbildung 4: Der katalytische Zyklus von P450 Monooxygenasen. Der Einbau von einem Sauerstoffatom in ein Substrat (R-H) erfordert die sequentielle Übertragung von zwei Elektronen (e^-) und zwei Protonen (H^+), um *Compound I* zu bilden (1-6). Mögliche Nebenreaktionen (a-c) werden als *Uncoupling* bezeichnet. Angelehnt an Cook *et al.*⁷⁰

Durch die Bindung eines Substratmoleküls und der Verdrängung des Wasserliganden vom Eisen(III) (1 – 2) wird das Eisen in den High-Spin Zustand angeregt. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des Reduktionspotentials des Eisens, was gleichzeitig den Elektronentransfer vom Redoxpartner begünstigt und somit zu Eisen(II) reduziert wird (3). Nachfolgend bindet ein Sauerstoffmolekül kovalent an das reduzierte Eisen und bildet eine Eisen(II)-Oxy-Verbindung (4). Die Übertragung eines zweiten Elektrons führt zur Bildung des Eisen(III)-Peroxy-

Intermediats, das direkt zur Eisen(III)-Hydroperoxy-Spezies protoniert wird (*Compound 0*; 5). Die Protonierung führt zur Spaltung der Dioxygen-Bindung und Freisetzung eines Wassermoleküls, was in der Bildung der reaktiven Cytochrom P450 *Compound I* resultiert (6). Diese wiederum greift das nahe gelegene Substrat an, das Sauerstoffatom wird übertragen und das hydroxylierte Produkt freigesetzt. Sobald ein neues Wassermolekül am aktiven Zentrum bindet, ist der Ausgangszustand (1) wiederhergestellt und der Zyklus kann erneut beginnen.^{67,70-72} Zusätzlich zu diesen Schritten gibt es drei Nebenreaktionen: (a) der Autoxidations-Shunt, bei dem das Oxy-Eisen-Zwischenprodukt (4) unter Bildung eines Superoxidanions oxidiert wird, (b) der Peroxid-Shunt, bei dem das koordinierte Hydroperoxid-Anion (5) vom Eisen dissoziiert, was zur Wasserstoffperoxid-Bildung führt, und (c) dem Oxidase-Shunt, bei dem der aktivierte Sauerstoff aus *Compound I* (6) zu Wasser reduziert wird, anstatt zu einer Oxidation des Substrats zu führen. Diese drei Nebenreaktionen werden oft als *Uncoupling* bezeichnet, wobei der Peroxid-Shunt der Häufigste ist.⁷³

P450 Enzyme katalysieren die Übertragung eines Sauerstoffatoms aus molekularem Luftsauerstoff mithilfe einer Transferkette, die Elektronen von NAD(P)H vermittelt (Abbildung 5).

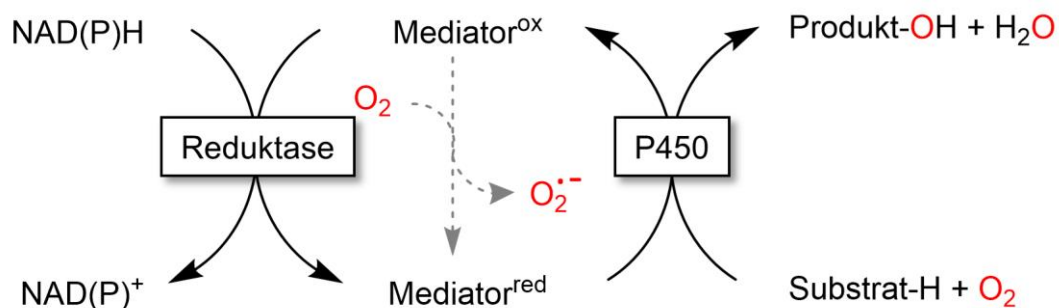


Abbildung 5: Allgemeines Reaktionsschema der P450-katalysierten Hydroxylierungsreaktion. Angelehnt an Dong *et al.*⁷⁴

Sie besitzen ein enormes Substratspektrum und sind in der Lage eine Vielzahl von Reaktionen zu katalysieren. Ein Sauerstoffatom wird dabei auf nicht-aktivierte aromatische oder aliphatische C – H, N – H oder S – H Bindungen übertragen, wobei auch Epoxidbildungen von C = C Doppelbindungen, sowie *N*- und *O*- Dealkylierungen bekannt sind.⁷⁴⁻⁷⁶ Im Labor von Frances Arnold wurden auch nicht-natürliche

Reaktionen wie ein Carben- und Nitren-Transfer gezeigt.^{77,78} Natürliche Reaktionen umfassen die Biosynthese von Lipide, Vitaminen und Steroiden und sind an biologischen Abbauprozessen, z.B. von Xenobiotika beteiligt.⁷⁹⁻⁸⁴

1.4.2 Klassifizierung des Multikomponentensystems

Für die katalytisch aktive Form benötigen P450s geeignete Redoxpartner, die den Elektronentransfer vom Cofaktor NAD(P)H zur Häm-Domäne steuern. Die Elektronentransferkette beginnt mit der Abgabe von zwei Elektronen von NAD(P)H an den bzw. die Redoxpartner, die sukzessive an das Häm-Eisen weitergegeben werden. Abhängig von den Häm- und Reduktasekomponenten werden P450s mittlerweile in bis zu 10 Klassen eingeteilt.⁸⁵ Die am weitesten verbreitete Klassifizierung umfasst vier Klassen (Abbildung 6).⁸⁶

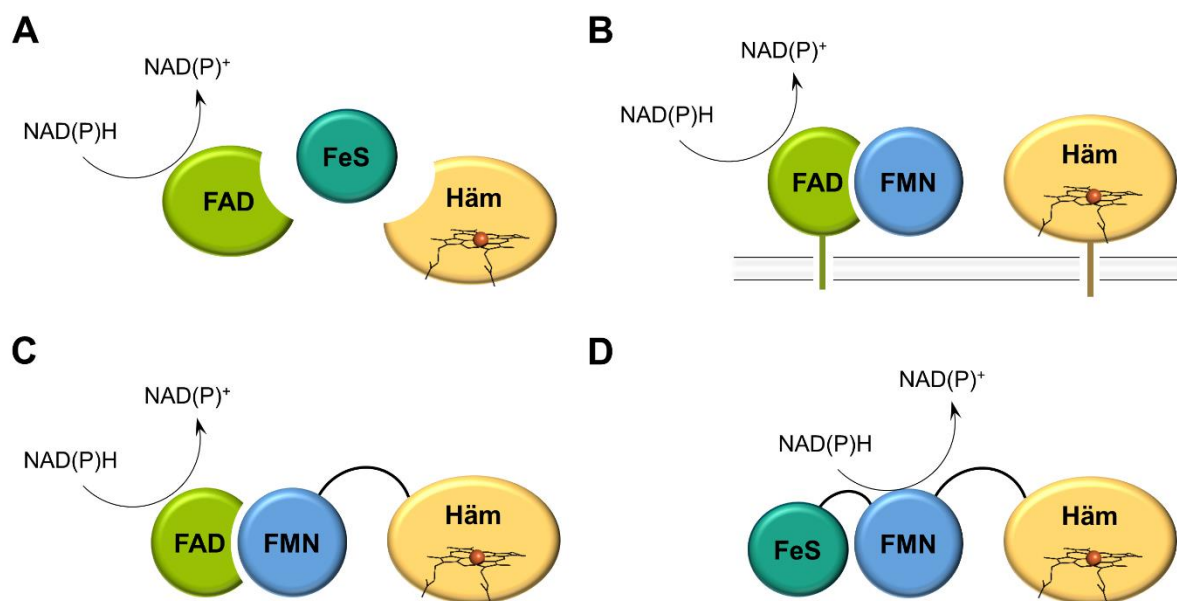


Abbildung 6: Einteilung der P450 Enzyme in vier Klassen entsprechend der Anordnung von Häm- und Elektronentransfer-Komponenten (FAD = Flavin Adenin Dinukleotid; FeS = Eisen-Schwefel Ferredoxin; FMN = Flavin Mononukleotid). Verändert nach O'Reilly *et al.*⁸⁶

Die meisten bakteriellen, sowie mitochondrialen P450 Monooxygenasen aus Eukaryoten gehören der Klasse I an (Abbildung 6A). In dem bakteriellen System gehören zur freien Häm-Domäne eine freie FAD-abhängige Reduktase, die die Elektronen auf ein zweites Protein, ein freies Ferredoxin mit meist einem [2Fe-2S] Eisen-Schwefel-Cluster, überträgt. Bei Eukaryoten liegt nur das Ferredoxin als lösliches Protein vor, die beiden anderen Komponenten sind mit der inneren

mitochondrialen Membran assoziiert.^{76,87} Eines der bekanntesten Systeme der Klasse I P450s ist das CYP101 aus *Pseudomonas putida* (P450cam) mit den natürlichen Redoxpartnern, der NADH-abhängigen Putidaredoxin Reduktase (CamA) und dem Ferredoxin Putidaredoxin (CamB), die im Labor in vielen Systemen Anwendung finden.^{88,89} Die Komponenten der Klasse II sind hingegen hauptsächlich in Eukaryoten vorzufinden und beinhalten zwei Membran-integrierte Proteine: die Häm-Domäne und eine NADPH-abhängige Cytochrom P450 Reduktase (CPR) (Abbildung 6B). Die CPR-Domäne enthält hierbei die prosthetischen Gruppen FAD und FMN. Die hier als Klasse III beschriebene Gruppe besteht aus der Häm-Domäne, die an eine CPR-Domäne fusioniert ist und daher als autarkes P450-System gilt. Der bekannteste und am besten erforschte Vertreter dieser Klasse ist die Fettsäurehydroxylase CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* (P450BM3).⁹⁰ Auch bei P450 Monooxygenasen der Klasse IV sind Häm- und Reduktase-Domäne fusioniert. Das erste beschriebene Enzym, CYP116B2 (P450RhF) aus *Rhodococcus* sp., besteht aus einer Reduktase der Phtalat Familie (PFOR) und ist über einen 16 Aminosäuren langen Linker mit der Häm-Domäne verknüpft.⁹¹ Die Reduktase PFOR besteht aus einer FMN-Bindedomäne und einem Ferredoxin des Typs [2Fe – 2S] und ist in der Lage sowohl Elektronen von NADH als auch NADPH zu übertragen.^{85,86} Da die Klassen III und IV als einzelne Peptidketten synthetisiert vorliegen und daher hocheffizient für die Ganzzellkatalyse sind, gelten solche Fusionskonstrukte als besonders interessant für industrielle Anwendungen.

1.4.3 Allgemeine Struktur von P450s

Mit P450cam und P450BM3 wurden die ersten Kristallstrukturen gelöst und auf diese Weise die räumliche Struktur dieser Enzyme aufgeklärt.^{92,93} Auch wenn die Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen den P450-Proteinen der verschiedenen Familien weniger als 20 % betragen kann, ist ihre allgemeine Topographie und strukturelle Faltung hoch konserviert.

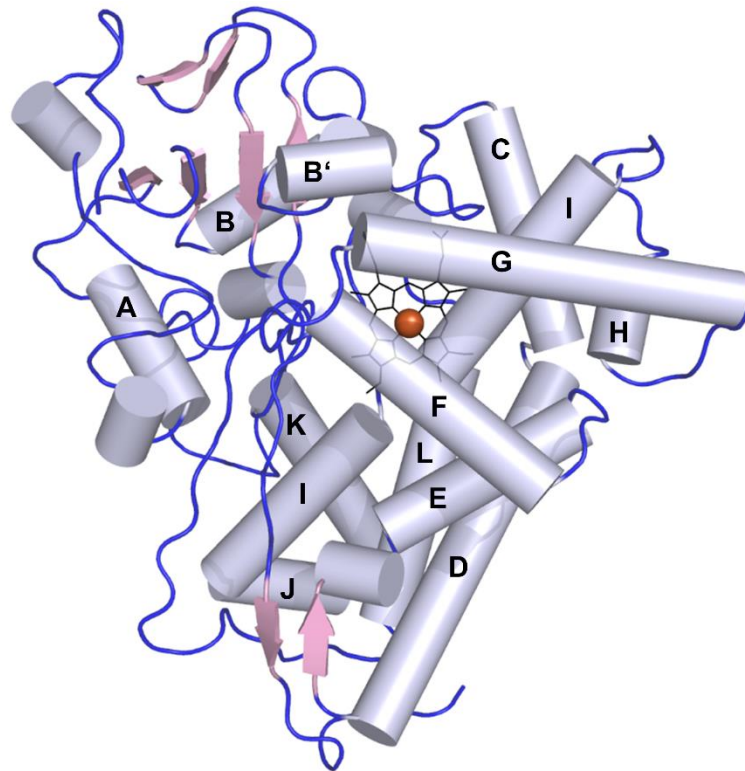


Abbildung 7: Allgemeiner Aufbau und strukturelle Faltung von P450s am Beispiel von P450cam (PDB ID 1AKD). α -Helices sind als silberne Zylinder (A-L) und β -Faltblätter als rosa Pfeile dargestellt, die durch blaue Loops verbunden sind. Das Häm ist als schwarze sticks und das Eisen als eine orangefarbene Kugel dargestellt. Nomenklatur nach Poulos *et al.* Abbildung angelehnt an Munro *et al.*^{71,94}

Die allgemeine Sekundärstruktur der Häm-Domäne besteht aus zwölf α -Helices (A bis L), fünf β -Faltblättern und einem Häm mit zentralem Eisenatom als prosthetische Gruppe (Abbildung 7).^{71,95} Die Helices bzw. β -Faltblätter sind durch flexible Loop Strukturen verbunden, von denen zwei besonders häufig beschrieben werden. Der BC-Loop wird in manchen Enzymen durch eine B'-Helix unterbrochen und dem FG-Loop wird in einigen Fällen die Substraterkennung zugeschrieben.⁹⁶

Im März 2006 wurden alle bisher verfügbaren P450 Kristallstrukturen systematisch analysiert und beobachtet, dass durch veränderte Positionierung der F-G-Helix-Loop-Helix und des BC-Loops unterschiedliche Tunnelstrukturen die Enzyme durchziehen können.^{97,98} Die hohe Diversität dieser Enzyme zeigt sich unter anderem darin, dass erst im Jahr 2020 die erste Kristallstruktur eines kompletten Fusionskonstruktes publiziert wurde.⁹⁹ Durch die vielen unterschiedlichen Kristallstrukturen wird auch deutlich, dass P450s sehr dynamische Enzyme mit flexiblen Bereichen sind.

1.4.4 Molekulare Tunnel in P450s

Das aktive Zentrum mit dem reaktiven Häm-Eisen liegt in allen P450 Monooxygenasen tief in der Proteinstruktur verborgen, um von den umgebenden Substanzen abgeschirmt zu sein und ungewünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Von allen Enzymklassen wurden in Oxidoreduktasen prozentual die meisten langen Tunnel ($> 15 \text{ \AA}$) gefunden, zu dieser Klasse gehören auch die Monooxygenasen.⁴² In der P450 Superfamilie wurden diverse Substrat-, aber auch putative Wasser- (W) und Lösemittel- (S) Tunnel gefunden, jedoch nicht all diese in jedem einzelnen Enzym.

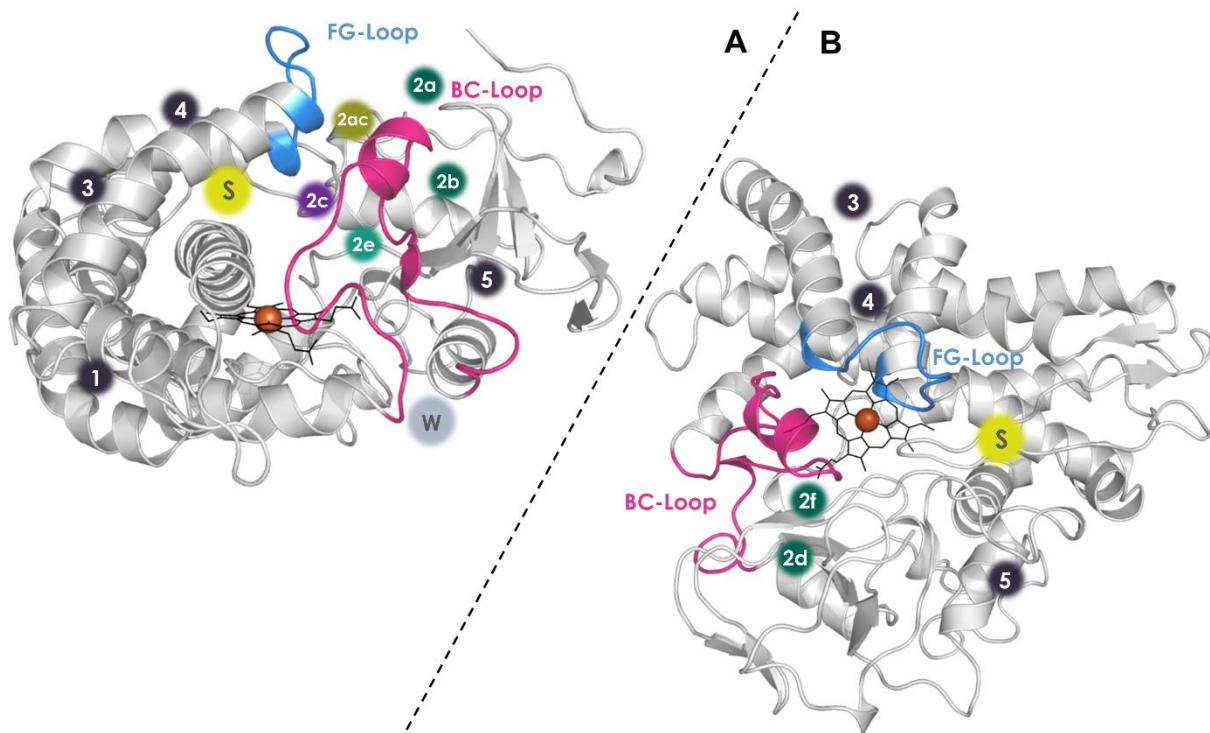


Abbildung 8: Molekulare Tunnel in P450s am Beispiel von P450cam (PDB ID 1AKD). Die Tunneleingänge sind mit ihrer jeweiligen Bezeichnung als Kreise dargestellt: Tunnel 1 und 3 bis 5 in schwarz, Tunnel 2 ist in seine Subklassen 2a – 2f in unterschiedlichen Farben dargestellt. Der Solvent Tunnel S ist in gelb und der Wasser Tunnel W in grau dargestellt. Die Haupt-Loops sind farbig hervorheben: Der BC-Loop in pink und der FG-Loop in blau. Das Häm ist als schwarze Sticks und das Eisen als eine orangefarbene Kugel dargestellt. (A) Seitenansicht in die I-Helix; (B) Draufsicht auf das Häm durch den BC- und FG-Loop. Verändert nach Cojocar *et al.*⁹⁷

In einer Studie von Cojocar, Winn und Wade wurden molekulare Tunnel identifiziert und auf Basis ihres räumlichen Verlaufs ursprünglich in Tunnel 1, 2 und 3 unterteilt. MD Simulationen von P450cam ergaben, dass Substrate und Produkte die jeweiligen Tunnel passieren könnten, wobei Tunnel 2 energetisch

favorisiert wurde.^{100,101} Eine Analyse der MD Simulationen von mehreren P450s ergab, dass die Eingänge des Tunnel 2 in Subklassen gruppiert werden können. Diese werden als 2a, 2b, 2c usw. der Sekundärstrukturen entsprechend bezeichnet, die den Weg aus dem Protein weisen.⁹⁷ In den untersuchten Kristallstrukturen sind die Tunnel 2a, 2c, 2ac und 2f die am häufigsten vorkommenden, deren Gemeinsamkeit die Bildung durch die Strukturelemente F-G-Helix-Loop-Helix ist. Tunnel 2b, 2e und 2d werden als sekundäre Tunnel beschrieben, die in weniger P450s vorkommen. Der Zusammenhang zwischen Substrattunneln und der Spezifität bzw. der Aktivität der Enzyme ist jedoch bisher kaum erforscht.

1.4.5 Die Subfamilie der CYP153A Enzyme

Die Enzyme der CYP153A Subfamilie gehören zur Klasse I der P450s, deren Elektronen innerhalb der Elektronentransportkette über eine freie Reduktase auf ein Ferredoxin und schließlich auf die Häm-Domäne übertragen wird. Natürliche Substrate stellen lineare Alkane mit Kettenlängen von C5 bis C12 dar, die zu den korrespondierenden Alkoholen hydroxyliert werden.¹⁰² Andere Arbeiten zeigten weitere akzeptierte Substrate der CYP153A Subfamilie, wie primäre Alkohole, Fettsäuren und Terpene.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Das erste rekombinant exprimierte und charakterisierte Mitglied dieser Subfamilie ist CYP153A1 aus *Acinetobacter* sp. EB104.¹⁰⁶ Ein weiteres Mitglied, CYP153A6 aus *Mycobacterium* sp. HXN-1500, wurde u.a. zum Umsatz von *n*-Octan, 1-Octen und Limonen eingesetzt, sowie zur Hydroxylierung und Epoxidierung von Cyclohexan, Styrol und Cumol.^{107,108} In einer Mutagenesestudie konnte das Substratspektrum dieses Enzyms auf kürzerkettige Alkane ausgeweitet werden.¹⁰⁹

Innerhalb der CYP153-Subfamilie wurden CYP153A16 aus *Mycobacterium marinum* und CYP153A aus *Marinobacter aquaeolei* (CYP153A_{M.aq}) als Fettsäure- ω -Hydroxylasen beschrieben, während CYP153A aus *Polaromonas* sp. (CYP153A_{P.sp}) als eine Alkan- ω -Hydroxylase identifiziert wurde.¹⁰⁵ Studien über CYP153A_{M.aq} haben eine Präferenz dieses Enzyms für mittel- und langkettige Fettsäuren mit einer exzellenten Regioselektivität zum terminalen Kohlenstoff gezeigt.¹¹⁰ Des Weiteren wurde ein artifizielles Fusionskonstrukt entwickelt, um

einen autarken Biokatalysator zu generieren. Dieser besteht aus der CYP153A_{M.aq} Häm-Domäne die mit der Reduktase-Domäne CPR von P450BM3 fusioniert ist.¹⁰⁴ Die Prozesse wurden hinsichtlich der Umsetzung von Dodecansäure verbessert und Limitierungen aufgezeigt.¹¹¹ Mithilfe der Thioesterase FatB2 konnte Octansäure in *E. coli*-Zellen im Batch Reaktor überproduziert werden. Mit der bislang aktivsten Variante G307A konnte dabei eine *de novo* Produktion von ω -Hydroxyoctansäure erzielt, indem die Octansäure als Substrat für CYP153A_{M.aq}(G307A)-CPR diente.¹¹² In späteren Studien wurde das Fusionskonstrukt weiterentwickelt und mit der PFOR-Domäne aus CYP116B3 fusioniert, sowie der Fusionslinker optimiert, um das System für die Ganzzellkatalyse anzupassen.¹¹³

1.4.6 P450 Screeningsysteme

Je nach Mutagenese-strategie ist ein dafür zugeschnittenes Screeningsystem notwendig. Während für rationales Design nur wenige Proben analysiert werden müssen, steigt die Probenanzahl und der Screeningaufwand bei der gerichteten Evolution massiv an. Dieser Screeningaufwand kann durch semi-rationales Design in Kombination mit bioinformatischen Analysen auf die Erstellung von kleinen, intelligenten Bibliotheken begrenzt und somit variiert werden.²⁶

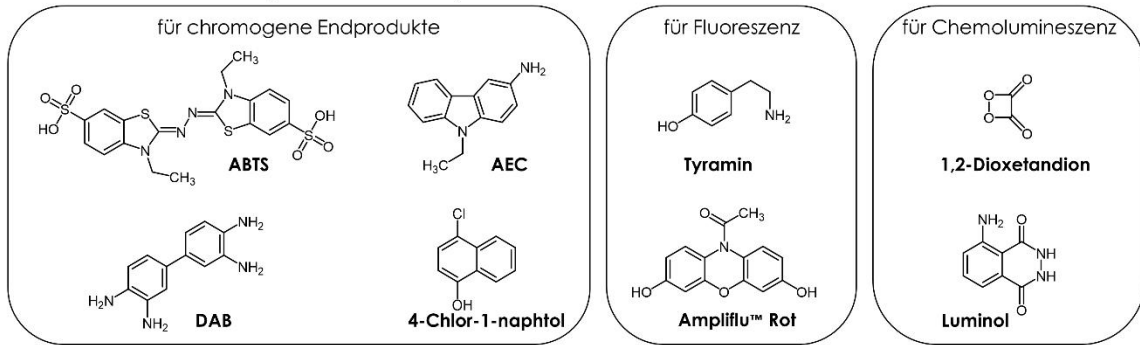
Bei einer genetischen Selektion wird das zu evolvierende Enzym direkt mit einem überlebenswichtigen Merkmal gekoppelt und daher durch das Wachstum des Mikroorganismus selektioniert.¹¹⁴ Auf diese Weise kann z. B. das Substrat als einzige Kohlenstoffquelle oder auch als Inhibitor eingesetzt werden.¹¹⁵ Im Gegensatz zur klassischen Selektion kann bei einem Screening die Aktivität, Selektivität oder Spezifität der Varianten untereinander direkt verglichen werden. Eine verbreitete Art von Enzymscreenings ist die Detektion von chromogenen oder fluorogenen Molekülen, die meist Derivate des Zielsubstrats sind. Viele dieser Substrate können direkt oder indirekt umgesetzt und damit die Biokatalyse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden. Für P450 Monooxygenasen sind verschiedene Strategien publiziert, um Variantenbibliotheken zu screenen. Viele Assays beruhen dabei auf der direkten oder indirekten Messung des NAD(P)H

Verbrauchs, da dieser schnell und einfach photometrisch zu bestimmen ist.^{116,117} Durch die in P450s bekannten *Uncoupling*-Mechanismen (siehe 1.4.1) kann dies jedoch dazu führen, dass vermeintliche „Hits“ aus Varianten bestehen, die eine höhere *Uncoupling*-Rate haben, jedoch nur wenig Produkt bilden. Daher wird in anderen Arbeiten der NAD(P)H-Verbrauch mit weiteren Systemen, wie colorimetrischen Assays oder Kaskaden, kombiniert.¹¹⁸⁻¹²¹ Weitere Methoden sind die Verwendung von Substratanaloga, die durch die katalysierte Reaktion detektiert werden können oder das gebildete Produkt in Kombination eines Reagenz einen Farbumschlag bewirkt.¹²²⁻¹²⁴ Durch einen Farbumschlag, der qualitativ betrachtet ohne Spektrometrie ausgewertet werden kann, ist es möglich, ein Festphasenscreening zu etablieren, mithilfe dessen eine Vielzahl an Varianten gleichzeitig einem Vorscreening unterzogen werden können.

Die eleganteste Methode besteht jedoch darin, gezielt die gewünschten Produkte (direkt oder indirekt) zu ermitteln. Nach dem von Frances Arnold und Claudia Schmidt-Dannert etablierten Gesetz „*You get what you screen for*“ ist der wichtigste Teil der experimentellen Studie ein geeignetes Screening.¹²⁵ Demnach können Messungen des Cofaktor-Verbrauchs oder das Screening nach leicht detektierbaren Derivaten zu Enzymvarianten führen, die auf diese Analoga spezialisiert sind. Im Falle von P450s kann ein erhöhter Cofaktor-Verbrauch mit gesteigertem *Uncoupling* des Zyklus einhergehen, aber nicht unbedingt mit dem besten Katalysator für die gewünschte Reaktion. Der direkte Nachweis von Produkten geschieht meist über chromatographische Analysen wie Gas- oder Flüssigchromatographie. Dabei ist oft die Analytik der zeitlich limitierende Faktor, der nur einen bestimmten Durchsatz an Proben pro Tag erlaubt.¹²⁶ Einen indirekten Nachweis erlauben beispielsweise enzymatische Kaskaden. Das zu ermittelnde Produkt wird in einer weiteren Reaktion unter Bildung eines detektierbaren Analyten oder Nebenproduktes umgesetzt. Häufig verwendete Systeme für P450 Monooxygenasen sind weitere Oxidationen unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid das wiederum über Peroxidasen, wie die kommerziell erhältliche Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*), gemessen werden kann (Abbildung 9A).

1 Einleitung

A Substrate für Meerettichperoxidase-katalysierte Reaktionen



B

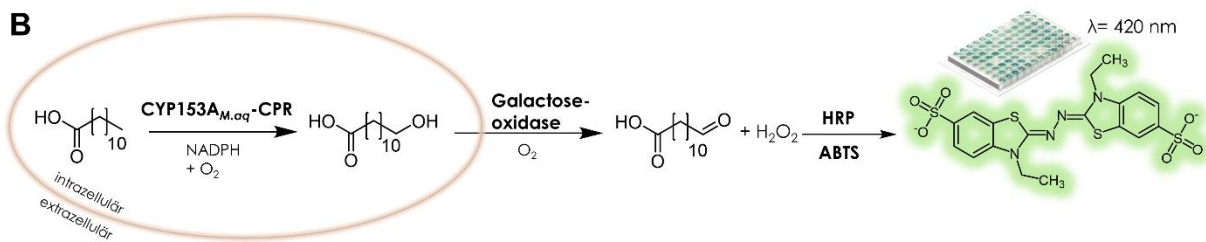


Abbildung 9: (A) Eine Auswahl an Substraten, die für Meerettichperoxidase Assays verwendet werden. Es wird unterschieden zwischen Substraten für chromogene (ABTS = 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), AEC = 3-Amino-9-ethylcarbazol, DAB = 3,3'-Diaminobenzidin), fluoreszierende und chemolumineszierende Endprodukte. (B) P450 Screening: Die CYP153A_{M.aq}-CPR katalysierte Reaktion von Dodecansäure zu ω-Hydroxydodecansäure findet intrazellulär statt. Das entstandene Produkt gelangt aus den Zellen und wird mittels einer Galactoseoxidase unter Abspaltung von H₂O₂ weiter oxidiert. Das H₂O₂ kann mittels Meerettichperoxidase (HRP)-ABTS Assay im Photometer bei λ=420 nm detektiert werden.

Hierbei werden meist chromogene, aber auch fluoreszierende oder lumineszierende Vorläufermoleküle mittels Wasserstoffperoxid über eine HRP-vermittelte Reaktion zu dem jeweiligen farbigen (fluoreszierenden oder lumineszierenden) Produkt oxidiert (Abbildung 9A).^{127,128} Von Weissenborn *et al.* wurde die Reaktion von Dodecansäure zu ω-Hydroxydodecansäure mit einer Kaskade aus CYP153A_{M.aq}-CPR, Galactoseoxidase und HRP in einem Mikrotiterplattenscreening gezeigt (Abbildung 9B).¹²⁶ Zuerst wurde die Fettsäure durch das P450 Enzym *in vivo* terminal hydroxyliert und das ω-hydroxylierte Produkt danach mit einer Galactoseoxidase *ex vivo* unter Bildung von Wasserstoffperoxid weiter zum Aldehyd oxidiert. Die Detektion geschah mittels Photometer über eine HRP-vermittelte Oxidation von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) zum korrespondierenden farbigen Produkt.

1.5 ω -hydroxylierte aliphatische Verbindungen

Besonders spannend für die industrielle Biokatalyse sind selektive Oxyfunktionalisierungen. Dabei ist die Hydroxylierung von aliphatischen Verbindungen insbesondere an Positionen, wie zum Beispiel nicht aktivierte C-H-Bindungen aufgrund der Bindungsstärke chemisch besonders herausfordernd. Eine Besonderheit der Hydroxylierung aliphatischer Verbindungen, wie z. B. Alkane, Alkene, Fettsäuren und weitere Kohlenstoffketten mit funktionellen Kopfgruppen nimmt die terminale (ω -) Hydroxylierung ein. Grund hierfür liegt in der Dissoziationsenergie von tertiären und sekundären C-H-Bindungen, die mehr als 100 kcal/mol beträgt, während der primäre Kohlenstoff nochmals eine deutlich höhere Bindungsenergie aufweist.¹²⁹

Gleich mehrere Herausforderungen entstehen bei der Hydroxylierung von linearen Alkanen: Sowohl deren generell niedrige Reaktivität, als auch die Regio- und Chemoselektivität zeigen Limitierungen auf.¹³⁰ Durch Hydroxylierung oder oxidative Dehydrierung können Alkane jedoch zu hochwertigeren primären Alkoholen oder zu Alkenen umgewandelt werden (Abbildung 10). Chemisch werden diese Reaktionen unselektiv und unter harschen Bedingungen durchgeführt oder es werden große Mengen an CO₂ erzeugt.^{131,132} Bioinspirierte chemische Katalysatoren, wie Metallporphyrine und Nicht-Häm-Eisenkomplexe, zeigten sich in der Vergangenheit entweder regio- oder chemoselektiv – die Kombination konnte mit einem einzelnen Katalysator noch nicht erreicht werden.¹³¹

Lipide und freie Fettsäuren existieren in der Natur in großen Mengen und zählen zu den am häufigsten vorkommenden Ressourcen der erneuerbaren Energien. Die Hydroxylierung der Fettsäuren zu Hydroxyfettsäuren (Abbildung 10) gestaltet sich industriell, durch die günstigen Ausgangsstoffe, als sehr wertvoll, jedoch nicht unter einem „grünen“ Ansatz aufgrund der hohen Bindungsstärken der Hydrocarbone.¹³³ Selektiv ω -hydroxylierte Fettsäuren (ω -FAOHs) sind aufgrund ihrer breit gefächerten Einsatzmöglichkeiten in den Bereichen der Feinchemie, Kosmetik-, sowie Duftindustrie von großem Interesse.^{134,135} Sie dienen außerdem

1 Einleitung

als Monomere für Poly- ω -Hydroxyfettsäuren, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen wie Polyethylen und auch Biokunststoffe.^{136,137} Je nach Kettenlänge werden ω -FAOHs zudem als wichtige Vorstufen für Kleb- und Schmierstoffe, sowie antikanzerogene Wirkstoffe eingesetzt.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Durch weitere Oxidation können u.a. α,ω -Dicarbonsäuren entstehen, die wiederum in Polymeren und Polyketidantibiotika Verwendung finden.^{141,142}

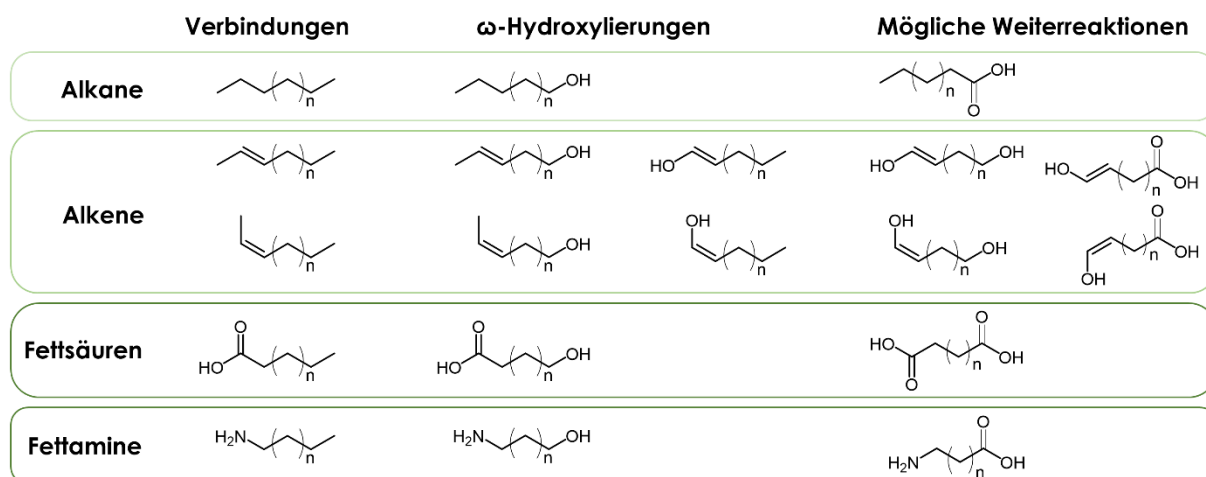


Abbildung 10: Auswahl an aliphatischen Verbindungen als Vorläufer zu ω -hydroxylierten Verbindungen und eine Auswahl an möglichen Weiterreaktionen. Zu den Beispielen zählen Alkane, Alkene, Fettsäuren und Fettamine.

Ausgehend von natürlich vorkommenden Fetten und Ölen können durch Hydrierung mit Fettnitril-Intermediaten Fettamine generiert werden.¹⁴³ Kommerziell werden diese Alkylamine z. B. in Kosmetika, Farben und Lacke, als oberflächenaktive und antimikrobielle Verbindungen eingesetzt.^{144,145} Hydroxylierte Fettamine und Alkylamine (Abbildung 10) repräsentieren eine wichtige Klasse an synthetischen Bausteinen, wobei die α -Position des Kohlenstoffs am Stickstoff die vorherrschende Position der chemischen Funktionalisierung darstellt.¹⁴⁶ Interessant sind jedoch entferntere Oxyfunktionalisierungen z. B. von Pyrrolidinen und Piperidinen als wichtiges Strukturmerkmal in vielen Pharmazeutika.^{147,148} Besonders wertvolle Ausgangsstoffe sind wiederum terminal hydroxylierte Fettamine. Diese Aminoalkohole dienen als Vorstufen für die Herstellung pharmazeutischer Substanzen, wie verschiedene β -Blocker, oder auch Biopolymere, wie Polyamide, die von ω -Aminoalkoholen abgeleitet werden können.^{7,149,150}

Biologisch werden diese Oxyfunktionalisierungsreaktionen von der Enzymklasse der Oxygenasen katalysiert, die aktivierte Sauerstoffspezies wie Peroxide oder aktive Metall-Komplexe verwenden, um Sauerstoff direkt in ein Substrat einzubauen.⁷⁴ Dabei werden von Dioxygenasen beide Sauerstoffmoleküle übertragen, während von Monooxygenasen nur eines in das Substrat eingebaut und das andere zu Wasser reduziert wird (1.4.1).

1.6 Zielsetzung

Bislang galt die Aufmerksamkeit im Bereich des rationalen und semi-rationalen Enzym Engineerings hauptsächlich der aktiven Tasche und dem katalytischen Zentrum von Enzymen. Durch den Einsatz von gerichtete Evolutionsstrategien hingegen tauchten auch Hotspots für Aktivität und Spezifität auf weit vom aktiven Zentrum entfernten Strukturelementen auf. Mittlerweile ist das Schlüssel-Schlüsselloch-Schloss-Prinzip als Erweiterung des Schlüssel-Schloss-Modells anerkannt und Strukturen wie Oberflächenloops und molekulare Tunnel werden in Enzym Engineering Studien miteinbezogen. Für rationale Herangehensweisen ist dieses Feld jedoch noch zu wenig erforscht. Die Schwierigkeit besteht mitunter darin, dass Aminosäuresubstitutionen an Loops und Tunnelstrukturen die Enzymflexibilität stark verändern können und diese kaum vorhergesagt werden kann. Um diese Lücke zu schließen bedarf es einem engen Zusammenspiel zwischen experimentellen Daten und bioinformatischen Analysen, um zukünftig bessere Voraussagen für weitere Experimente zu treffen.

Diese Fusion zwischen experimentellem Enzym Engineering der Enzymtunnel und molekulardynamischen Simulationen sollte in dieser Arbeit exemplarisch an der P450 Monooxygenase CYP153A_{M.aq} untersucht werden. Hierfür sollten die Enzymtunnel von CYP153A_{M.aq} untersucht werden und mittels Tunnel-Engineering auf den Umsatz unterschiedliche Substrate angepasst werden. Hierbei sollte zunächst ein ähnliches Substrat wie die bisher beschriebenen verwendet werden und im weiteren Verlauf der Arbeit ein Inhibitor als neues Substrat durch Tunnel-Engineering zugänglich gemacht werden. Die jeweils besten generierten Varianten sollten anschließend *in silico* modelliert und für ein tiefergehendes Verständnis molekulardynamisch simuliert und analysiert werden. Die Kombination aus experimentellen Daten und bioinformatischer Evaluation sollte Aufschluss über die Funktion der eingeführten Veränderungen und der Enzym-Spezifität geben und als Vorbild für zukünftiges Enzymdesign dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, im höchsten Reinheitsgrad von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Acros Organics (Geel, Belgien), VWR (Darmstadt, Deutschland) oder Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zusätzlich verwendete Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien unter Angabe der Hersteller.

Verwendung	Reagenz	Hersteller
DNA-Farbstoff	Midori Green Advance	NIPPON Genetics Europe, Düren, DE
Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese	6x DNA-Ladepuffer, violett	New England BioLabs® GmbH Ipswich, Massachusetts, US
Größenstandard für Agarosegelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Größenstandard für SDS- PAGE Gelanalyse	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE

2.1.2 Enzyme und molekularbiologische Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erworbenen Enzyme und molekularbiologische Kits sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Kits unter Angabe der Hersteller.

Enzym/Kit	Hersteller
KOD HotStart DNA-Polymerase aus <i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Enzym/Kit	Hersteller
Peroxidase from horseradish	AppliChem, Darmstadt, DE
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (1000 U/mL)	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit DNA Clean and Concentrator™ Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, USA
<i>DpnI</i> (20 000 U/ml) aus <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41	New England BioLabs® GmbH Ipswich, Massachusetts, USA
T5-Exonuklease aus Enterobakteriophage T5 <i>Taq</i> -DNA-Ligase aus <i>Thermus thermophilus</i> HB8 Phusion HF DNA Polymerase	
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

2.1.3 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Die verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 3 aufgeführt. *E. coli* XL-1 Blue diente als Klonierungsstamm für molekularbiologischen Arbeiten und zur Plasmidproduktion, *E. coli* BL21(DE3) als Expressionsstamm für Gene im pET-28a(+) Vektor, *E. coli* BW25113 als Expressionsstamm für für Gene in pBAD-Vektoren und *E. coli* BW25113ΔfadD für Ganzzell-Biotransformationen.

Tabelle 3: Verwendete *E. coli* Stämme unter Angabe des Genotyps und derr Herkunft.

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL-1 Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ZΔM15 Tn10</i> (Tetr ^r)]	Stratagene; Agilent, St. Clara, USA
BL21(DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)</i> λ(<i>DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]</i>)	Novagen®, Darmstadt, DE

Stamm	Genotyp	Herkunft
BW25113	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787::rrnB-3}$, λ - <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaDrhaB})568$, <i>hsdR514</i> ,	National Institute of Genetics, Mishima, JPN
BW25113 Δ fadD	F-, $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787::rrnB-3}$, λ - <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaDrhaB})568$, <i>hsdR514</i> , Δ <i>fadD</i>	

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

Zur heterologen Proteinexpression von CYP153A_{M,aaq} und CYP153A_{P,sp} Varianten, den Redoxpartnern CamA und CamB und Cholinoxidase wurde der pET-28a(+) Vektor (Novagen Inc., Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Für die Synthese der artifiziellen Fusionskonstrukte der CYP153A_{M,aaq}-PFOR Varianten und dem Fettsäuretransporter FadL der pBAD33 bzw. pBAD18 Vektor (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA). Thioesterase FatB2 wurde im pJem1-Vektor¹⁵¹ verwendet. Eine vollständige Auflistung aller in dieser Arbeit konstruierten und verwendeten Plasmide mit zusätzlichen enthaltenen Genen befindet sich im Anhang (Tabelle 17).

Für die in dieser Arbeit hergestellten Enzymvarianten wurden synthetische Oligonukleotide (Primer) designt. Diese Primer wurden von Metabion International AG (Martinsried, DE) synthetisiert und mit sterilem Milli-Q® Wasser in einer Endkonzentration von 0,1 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$ gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.1.5 Nährmedien und Puffer

Alle Nährmedien und Pufferlösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit dH₂O auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und bei 121°C und 100 kPa für 25 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare, hitzesensitiven Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,2 μm). Ab einer Temperatur der Medien von unter 55 °C wurde, sofern zur Selektion erforderlich, Vektor-spezifisches Antibiotikum hinzugegeben. Für die Anzucht von Bakterienkulturen wurden Vorkulturen in Reagenzgläsern mit 5 mM LB-Medium inokuliert und Hauptkulturen in Erlenmeyerkolben mit 20 % ihres Gesamtvolumens befüllt.

2 Material und Methoden

2.1.5.1 Nährmedien

<u>Lysogeny broth (LB) Medium</u>	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
<hr/>		
Für Agarplatten:	Agar	15 g/L
<hr/>		
<u>Terrific broth (TB) Medium</u>		
<u>Komplexmedium:</u>	Trypton	12 g/L
	Hefeextrakt	24 g/L
	Glycerin	4 mL/L
<hr/>		
TB-Salze (10x)	KH ₂ PO ₄	23,1 g/L
	K ₂ HPO ₄	125,4 g/L

TB-Salze und TB-Medium wurden separat autoklaviert und vor der Verwendung 1:10 gemischt.

2.1.5.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

<u>Kaliumphosphat-Puffer (KPi)</u> (100 mM, pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	19,8 mM
	K ₂ HPO ₄	80,2 mM
<u>Puffer für die Proteinreinigung</u>	KPi	100 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	5 – 500 mM

Der pH wurde nach Zugabe des Imidazols mit HCl auf pH 7,4 angepasst.

<u>TAE-Puffer (10x)</u>	Tris-Acetat (pH 8)	400 mM
	EDTA	10 mM

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

<u>6x SDS-PAGE Ladepuffer</u>	Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	350 mM
	Dithiothreitol (DTT)	600 mM
	Glycerin	30 % (v/v)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,12 % (w/v)

<u>10x Elektrophorese-Puffer</u>	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 % (w/v)
	dH ₂ O	ad 1000 mL
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	dH ₂ O	60 % (v/v)
	Coomassie-Brilliantblau	0,1 % (w/v)
<u>Coomassie-Entfärbelösung</u>	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	dH ₂ O	60 % (v/v)
<u>Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen</u>		
<u>Tfbl-Puffer (pH 5,8)</u>	Kaliumacetat	30 mM
	RbCl	100 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mM
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	50 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt	
<u>TfbII-Puffer</u>	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	pH 6,5 mit KOH _{aq} eingestellt	
<u>Gibson Assembly Lösungen</u>		
<u>ISO reaction buffer (5x)</u>	PEG-8000	25 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	50 mM
	DTT	50 mM
	dNTPs	je 1 mM
	NAD ⁺	5 mM
<u>Gibson Assembly® Mastermix</u>	ISO reaction buffer (5x)	26,67 % (v/v)
	T5-Exonuklease	0,53 U/μL
	Phusion® HF DNA Polymerase	3,33 U/μL
	Taq-DNA-Ligase	533,3 U/μL

2.1.5.3 Antibiotika und weitere Stammlösungen

Die verwendeten Stammlösungen wurden in 1 mL Aliquote bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika und weitere Stammlösungen.

	Stammlösung	Endkonzentration	Lösemittel
Ampicillin (Amp)	50 mg/mL	50 µg/mL	dH ₂ O
Chloramphenicol (Cmp)	34 mg/mL	34 µg/mL	EtOH
Kanamycin (Kan)	30 mg/mL	30 µg/mL	dH ₂ O
IPTG	1 M	0,1 mM	dH ₂ O
L-Arabinose	20 % (w/v)	0,02 %	dH ₂ O
5-Aminolävulinsäure (5-Ala)	1 M	0,5 mM	dH ₂ O
FeCl ₃	1 M	0,1 mM	dH ₂ O

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration

Für die Isolierung der Plasmide aus *E. coli* wurde das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmide wurden mit 40 µL Milli-Q® H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde mittels eines NanoDrop-Photometers (NanoDrop 2000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) bei 260 nm bestimmt. Dabei entsprach das Probenvolumen 1 µL und als Referenz wurde Milli-Q® H₂O verwendet.

2.2.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von den Firmen GATC Biotech AG (Konstanz, DE) bzw. Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen, DE) durchgeführt. Dabei wurden entsprechend der Vorgaben der Firma 20 µL der Proben mit einer DNA-Konzentration von 50-100 ng/µL eingesetzt und mit Hilfe der im Anhang (Tabelle 15) aufgelisteten Oligonukleotide sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mittels SnapGene Software (GSL Biotech LLC, San Diego, US, Version 3.1.4) verifiziert und Mutationen ausgewertet.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle analytisch oder präparativ auf Basis ihrer Größe und Form auftrennen und durch einen Vergleich zu einem Größenstandard analysieren. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die aufgrund der Phosphatgruppe negativ geladenen DNA durch die vernetzte Agarose-Matrix zur positiven Anode. Kleinere DNA-Fragmente wandern hierbei schneller durch die Matrix und befinden sich im Gel weiter unten. Für die Herstellung eines Agarosegels wurden 50 mL 0,7 % Agarose in 1 x TAE-Puffer (2.1.5.2) unter Erhitzen gelöst. Für die Detektion wurde 5 µL DNA-Farbstoff Midori Green Advance hinzugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer vermischt und in die Probenkammern gegeben. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V im elektrischen Feld und die Detektion anschließend unter UV-Licht (366 nm). Zur Analyse der DNA wurde der Größenstandard GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder verwendet.

2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Bande und anschließender Reinigung und Konzentrierung der DNA mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit nach den Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 12 µL Milli-Q® H₂O eluiert.

2.2.5 DNA-Reinigung

Eine Reinigung der DNA war nach der Behandlung mit Restriktionsenzymen oder vor der Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen oftmals notwendig, um die eingesetzten Enzyme und Puffer aus der Probe zu entfernen. Die Proben wurden dafür mit dem DNA Clean and Concentrator™ Kit den Herstellerangaben entsprechend behandelt. Gereinigte DNA wurde mit 12 µL Milli-Q® H₂O eluiert.

2.2.6 Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange®

Die ortsgerichtete Mutagenese für rationales Proteindesign in CYP153A_{M,aq} und CYP153A_{P,sp} erfolgte durch das QuikChange® Site-directed Mutagenesis Protokoll. Dabei wird eine Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR)

-Protokoll unter Einsatz von zueinander komplementären Primer-Paaren, die die einzuführende Mutation beinhalten, durchgeführt. Dabei wird die DNA jedoch nicht exponentiell amplifiziert wie bei einer klassischen PCR. Anschließend erfolgt ein spezifischer Verdau der parentalen, methylierten DNA mittels der Endonuklease *DpnI*. Das *in vitro* DNA-Produkt liegt nicht methyliert vor und wird daher nicht abgebaut. Das gewonnene doppelsträngige DNA-Produkt mit Einzelstrangbruch wurde nachfolgend in den Klonierungsorganismus *E. coli* XL-1 Blue transformiert, welcher die Einzelstrangbrüche ligiert und das Plasmid vervielfältigt. Das Design der Oligonukleotide wie auch die PCR-Bedingungen wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls gewählt. Der QuikChange® Ansatz ist in Tabelle 5 aufgeführt und die verwendeten Primer finden sich im Anhang (Tabelle 15).

Tabelle 5: Ansatz für die ortsgerichtete Mutagenese mittels QuikChange®.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
10x KOD-Puffer	2,5 µL	1x
MgSO ₄ (25 mM)	1,5 µL	1,5 mM
dNTPs (jeweils 2 mM)	2,5 µL	0,2 mM
Primer <i>fwd</i> (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Primer <i>rev</i> (10 µM)	0,5 µL	0,2 µM
Templat-DNA (20 ng/µL)	1 µL	20 ng
DMSO	1 µL	
KOD-HotStart DNA Polymerase (1 U/µL)	0,5 µL	0,02 U
dH ₂ O	15 µL	

Das verwendete Temperaturprogramm für das PCR-Protokoll ist in Tabelle 6 dargestellt. Die *Annealing*-Temperatur wurde dabei abhängig von der Primer Schmelztemperatur eingestellt.

Tabelle 6: Temperaturprogramm für die ortsgerichtete Mutagenese mittels QuikChange®-Protokoll. Die Primer-Schmelztemperatur $T_{m(\text{Primer})}$ wurde mittels SnapGene Software berechnet.

Schritt	Dauer	Temperatur	
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	
Primer- <i>Annealing</i>	10 s	$T_{m(\text{Primer})} - 10$ °C	20 Zyklen
Elongation	25 s/kb	72 °C	
Finale Elongation	Elongationszeit x2	72 °C	

Nach der Reaktion wurden die Ansätze mit je 1 μL *DpnI* (10 U/ μL) versetzt und bei 37 °C für mindestens 2 h inkubiert und anschließend in *E. coli* XL-1 Blue transformiert.

2.2.7 Sättigungsmutagenese durch *overlap extension* PCR und 22c-Trick

Die *overlap extension* PCR ist eine weitere Möglichkeit, ortsspezifische Mutationen in Plasmid-DNA einzuführen. In dieser Arbeit wurden Sättigungsmutagenesen mittels 22c-Trick¹⁵² durchgeführt. Bei dieser Methode werden vier partiell komplementäre Oligonukleotide, drei mutagene Primer *fwd* und einen nicht-mutagener Primer *rev* verwendet. Die Oligonukleotide werden so gewählt, dass sie einen komplementären Überhang (*overlap*) am 5'-Ende besitzen, der mindestens 20 bp lang ist und eine Schmelztemperatur von ca. 60 °C besitzt. Die nicht-komplementären 3'-Enden werden so gewählt, dass ihre Schmelztemperatur ca. 60 °C beträgt. Die zu mutierende Stelle befindet sich in den Primern *fwd* direkt nach dem *overlap*. Dabei werden zwei degenerierte Codons verwendet: NDT (N = A/T/C/G, D = kein C), VHG (V = kein T, H = kein G) und ein nicht degeneriertes Codon TGG (W). Die Primer wurden hierbei in einem Verhältnis 12:9:1 (NDT:VHG:TGG) eingesetzt. Auf diese Weise werden die 64 natürlicherweise vorkommenden Codons auf 22 reduziert und der Screening-Aufwand verringert sich erheblich. Eine *overlap extension* PCR führt zu einer exponentiellen Amplifizierung der DNA und somit einer Öffnung des Vektors. Für die *overlap*

extension PCR wurde der in Kapitel 2.2.6 beschriebene Ansatz unter Verwendung der mutagenen *fwd* und des nicht-mutagenen Primer *rev* verwendet. Im Temperaturprogramm (Tabelle 6) wurde die *Annealing*-Temperatur auf 60 °C festgesetzt, und 30 anstatt 20 Zyklen durchgeführt. Nach erfolgter PCR und Restriktionsverdau mittels *DpnI* wurde durch ein präparatives Agarosegel das Amplifikat überprüft (siehe 2.2.3), gereinigt und mithilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit isoliert (siehe 2.2.4).

2.2.8 Gibson Assembly®

Die *Gibson Assembly*® Methode ermöglicht die Klonierung von zwei oder mehr DNA-Fragmenten und somit auch die Ligation von Fragmenten, die durch *overlap extension* PCR synthetisiert wurden.¹⁵³ Nach Reinigung der PCR-Fragmente wurden 15 µL *Gibson Assembly* Mastermix mit 5 µL der gereinigten DNA versetzt und bei 50 °C für 1 h inkubiert. Die im Mastermix enthaltene T5-Exonuklease generiert am 3'-Ende der DNA-Fragmente Einzelstrangenden (*sticky ends*), wodurch das *Annealing* der unterschiedlichen Fragmente durch komplementäre Enden ermöglicht wird. Die Phusion HF DNA-Polymerase füllt die Lücken zwischen den angelagerten Fragmenten auf, bevor die *Taq*-DNA-Ligase die Einzelstrangbrüche zu einem geschlossenen, doppelsträngigen Plasmid ligiert. 3 µL des *Gibson Assembly*-Produkts wurde zur Amplifizierung und Methylierung in *E. coli* XL-1 Blue transformiert und die Mutationsstellen nach erfolgreicher Kolonie-PCR durch Sequenzieren verifiziert.

2.2.9 Kolonie-PCR

Um einen schnellen Nachweis eines erfolgreichen *Gibson Assembly*s zu erhalten, wurde die Kolonie-PCR gewählt, bevor die DNA sequenziert wurde. Mit einer sterilen Pipettenspitze wird etwas Zellmaterial von einer Einzelkolonie abgenommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Für die Kolonie-PCR wurde der Ansatz und das Temperaturprofil aus Kapitel 2.2.6 verwendet. Statt Templat wurde 1 µL dH₂O verwendet und als Primer wurden Sequenzierungsprimer verwendet, die vor bzw. nach dem betreffenden Gen binden (Tabelle 16). Der

initiale Denaturierungsschritt wurde auf 10 min verlängert, um einen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten.

2.2.10 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (2.3.2) wurde die Hitzeschock-Methode herangezogen. Dafür wurden die auf Eis aufgetauten Zellen mit 1 µL DNA versetzt, sofern nicht anders vermerkt, und 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42 °C für 45 s. Nachdem die Zellen für maximal 2 min auf Eis abgekühlt wurden, wurde 500 µL steriles LB-Medium hinzugegeben und bei 37 °C und 180 rpm für 60 min regeneriert. Jeweils 50 µL der Zellsuspension wurden anschließend auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Für die Sättigungsmutagenese wurde nach dem *Gibson Assembly* der gesamte Ansatz der transformierten Zellen direkt in mit Antibiotika versetzte 5 mL ÜN-Kulturen überführt, da hier die Gesamtheit der mutierten Gene vorhanden sein sollte.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* wurde, sofern nicht anders vermerkt, auf LB-Agarplatten zur Selektion und Vereinzeln der Zellen über Nacht bei 37 °C durchgeführt. In der Regel wurde eine Einzelkolonie zum Inokulieren der Vorkultur (ÜN-Kultur) in 5 mL LB-Medium verwendet und diese bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Für die Stammhaltung wurden 700 µL der ÜN-Kultur mit 300 µL sterilem 99 % Glycerin in einem sterilen Kryo-Gefäß vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die nicht-natürlich kompetenten *E. coli* wurden mittels Rubidiumchlorid-Methode chemisch kompetent gemacht. Das eingesetzte Rubidiumchlorid trägt dazu bei,

dass sich die Fremd-DNA im Umgebungsmedium vermehrt an die Zellmembran anlagern kann und somit durch den nachfolgenden Hitzeschock (siehe 2.2.10) vermehrt in die Zellen aufgenommen wird. Dafür wurden 100 mL LB-Medium mit 250 μ L ÜN-Kultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 x g und 4 °C. Das Zellpellet wurde in 30 mL eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert, 90 min auf Eis inkubiert, und anschließend zur Ernte wieder zentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren der Zellen in 4 mL eiskaltem TfbII-Puffer und einer Inkubation für 15 min auf Eis, wurde die Zellsuspension in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, DE) zu 25 μ L oder 50 μ L aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

2.3.3 Heterologe Proteinexpression in Schüttelkolben

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die heterologe Proteinexpression in den jeweiligen *E. coli*-Stämmen in 50 mL oder 400 mL TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Das Medium wurde mit 0,5 % der jeweiligen Vorkultur von frisch transformierten Zellen inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,1 (P450s) oder einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 (CamA, CamB, Cholinoxidase) inkubiert. Anschließend wurde die Genexpression entsprechend der unterschiedlichen Plasmide und Enzyme induziert (siehe Tabelle 7). Zur Unterstützung der P450 Proteinbiosynthese wurde zusätzlich 0,5 mM 5-Aminolävulinsäure (5-Ala) als Häm-Vorstufe und 0,1 mM Eisen(III)-chlorid (FeCl₃) als Eisen-Donor supplementiert. Die Thioesterase FatB2 wurde in Kombination mit P450-Fusionskonstrukt durch Coexpression nach P450 Standards biosynthetisiert. Die Kulturen wurden bei 25 °C und 180 rpm für 17 – 20 h inkubiert und nachfolgend durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g (50 mL Kulturen) oder 20 min bei 7500 x g (400 mL Kulturen) geerntet.

Tabelle 7: Induktoren und Supplemente der in dieser Arbeit eingesetzten Konstrukte und Expressionsstämme.

Konstrukt	Expressionsstamm	Induktor und Supplemente
pET-28a(+)_P450 Varianten	BL21(DE3)	0,1 mM IPTG, 5-Ala und FeCl ₃
pBAD33_P450 Varianten	BW25113 oder BW25113ΔfadD	0,02 % L-Arabinose, 5-Ala und FeCl ₃
pJeM1-FatB2	BW25113ΔfadD	0,1 % Rhamnose
pBAD18_CamA+B	BW25113ΔfadD	0,02 % L-Arabinose
pET-28a(+)_CamA		
pET-28a(+)_CamB	BL21(DE3)	1 mM IPTG
pET-28a(+)_CoOx		

2.3.4 Heterologe Proteinexpression in 96 *Deepwell* Platten

Für die Proteinbiosynthese und anschließende Biotransformation in 96 *Deepwell* Platten (DWPs) wurde die Genexpression im Unterschied zur Expression in Schüttelkolben variiert. Für die Vorkulturen wurden die Wells der DWPs mit je 500 µL LB-Medium und jeweiligem Antibiotikum befüllt. 88 frisch transformierte Klone der Sättigungs-mutagenese wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt, um die Wells zu inokulieren. Als Kontrollen wurden jeweils 4 Wells mit einer Positiv-Kontrolle und 3 Wells mit einer Negativ-Kontrolle inokuliert. Ein Well blieb als Kontaminations-Kontrolle stets leer. Die DWPs wurden mit einer luftdurchlässigen Membran *Breath Easier Sealing Membrane* (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) verschlossen und bei 37 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Für die Hauptkulturen wurden die Wells der DWPs mit 650 µL TB-Medium und jeweiligem Antibiotikum befüllt, mit je 50 µL der Vorkulturen inokuliert und mit der *Breath Easier Sealing Membrane* verschlossen. Nach 4 h bei 25 °C und 250 rpm wurde die Genexpression induziert. Dafür wurden die DWPs auf Eis abgekühlt und je 0,02 %

L-Arabinose, 0,5 mM 5-Ala und 0,1 mM FeCl₃ hinzugefügt und für weitere 17 – 20 h bei 25 °C und 250 rpm inkubiert.

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g und Raumtemperatur. Das Medium wurde verworfen und die Pellets für die direkt folgende Biotransformation mit ruhenden Zellen auf Eis gelagert (siehe 2.5.3). Die Vorkultur wurde ebenfalls geerntet und die Zellpellets in den DWPs bei -20 °C gelagert.

2.3.5 Zellaufschluss

Nach der Expression und Ernte (2.3.3) der Zellen wurden die Zellpellets für die Zellyse in 3 mL KPi-Puffer oder Puffer für die Proteinreinigung (2.1.5.2) pro 1 g Zellen resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschall (Branson Sonifier 250 mit Mikrotip 1/8“ Durchmesser, Danbury, Connecticut, USA) unter ständiger Kühlung im Eisbad für 5 min (*duty cycle* 30 %). Der Output wurde je nach Probenvolumen zwischen 3 – 5 variiert. Für die Trennung des zellfreien Rohextrakts (Lysats) von den Zelltrümmern wurden die Proben für 45 min bei 4 °C und 20 000 x g zentrifugiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lysate bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinreinigung

Die P450 Redoxpartner CamA und CamB, sowie Cholinoxidase wurden mittels *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography* (IMAC) von den restlichen Bestandteilen des Lysats getrennt. Über die Affinität von Histidin zu Metallionen, wie z. B Cobalt, können über die IMAC Methode Proteine mit Polyhistidin-tag (6 Histidine am C- oder N-terminus des Proteins) schnell und effizient in hoher Reinheit aus dem Lysat gewonnen werden. Dafür wurde das Zellpellet vor dem Aufschluss (2.3.5) in Puffer für die Proteinreinigung mit 5 mM Imidazol (2.1.5.2) resuspendiert und das erhaltene Lysat durch einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die Reinigung über His GraviTrap Talon Säulen (GE Healthcare, Freiburg,

DE), die mit Cobalt beladen waren, fand durchgängig im Kühlraum bei 4 °C statt. Zu Beginn wurden die Säulen mit fünf Säulenvolumen Puffer für die Proteinreinigung mit 5 mM Imidazol äquilibriert und anschließend das filtrierte Lysat aufgetragen. Die nicht gebundenen Proteine und anderen Bestandteile des Lysats wurden mit fünf Säulenvolumen Puffer mit 10 mM Imidazol von der Säule gewaschen und das Zielprotein schließlich mit drei Säulenvolumen Puffer mit 100 mM Imidazol eluiert und gesammelt. Zum Reinigen der Säule wurde diese mit zehn Säulenvolumen Puffer mit 500 mM Imidazol und danach mit ebenso viel dH₂O gewaschen, um verbliebenes Imidazol von der Säule zu spülen. Die Lagerung erfolgte mit zehn Säulenvolumen 20 % EtOH bei 4 °C. Imidazol konkurriert mit Histidin um die Bindung an den Metallionen und wird daher in steigender Konzentration zum Waschen und Eluieren des Zielproteins verwendet. Da Imidazol jedoch die Aktivität und Stabilität von Proteinen, insbesondere P450 Enzymen beeinflussen kann, wird dieses nachfolgend durch Umpuffern entfernt.^{154,155} Mithilfe von Ultrafiltrationseinheiten Vivaspin 20 (Sartorius AG, Göttingen, DE) mit einem *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) von 10 000 Dalton wurde der Puffer durch wiederholtes Konzentrieren und wieder Auffüllen der Proben mit KPi-Puffer (2.1.5.2) ausgetauscht. Hierfür wurde die Proteinlösung insgesamt drei Mal für 45 min und 8000 x g bei 4 °C zentrifugiert und nach jedem Schritt mit KPi-Puffer auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

CamA und CamB wurde im Anschluss eine Endkonzentration von 5 % Glycerin hinzugegeben, zu 100 – 500 µL aliquotiert und bei – 20 °C bis zur Verwendung gelagert. Cholinoxidase wurde ohne Zusatz von Glycerin bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert.

2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die qualitative Analyse der Proteinbiosynthese und der Reinigung der Proteine erfolgte durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).¹⁵⁶ Die Trennleistung dieser Methode hängt hierbei von der Konzentration der Gel-Matrix ab und wird durch die Wanderung des denaturierten Proteins im elektrischen Feld

erreicht. Die Proben wurden dafür mit 6x SDS PAGE Ladepuffer (2.1.5.2) versetzt, der das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält, das an Aminosäuren bindet und die Proteine somit denaturiert und ihnen proportional zur Größe der Peptidkette eine negative Ladung verleiht. Durch Dithiothreitol im Puffer werden zusätzlich vorhandene Disulfidbrücken reduziert und gebrochen, um das Protein vollständig zu Linearisieren.

Für die SDS-PAGE wurden 25 µL der Proben mit 5 µL des 6x SDS PAGE Ladepuffer versetzt, bei 95 °C für 10 min inkubiert 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend bei 10 000 x g für 30 s zentrifugiert. Ein RunBlue 12 % Bis-Tris Gel von Expedeon (Abcam, Berlin, DE) wurde in eine Gelapparatur eingespannt und diese mit 1 x Elektrophorese-Puffer (2.1.5.2) befüllt. Je Geltasche wurden 20 µL der Proteinproben aufgetragen und zusätzlich eine Tasche mit 5 µL PageRuler™ Prestained Protein Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) als Proteinmarker beladen.

Die Auftrennung erfolgte mit einer konstanten Stromstärke von 30 mA für 60 min. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele in einer Coomassie-Färbelösung (2.1.5.2) für mindestens 1 h in einem Kippschüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurde unspezifisch gebundenes Coomassie entfernt, indem das Gel in Coomassie-Entfärbelösung auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur bis zum gewünschten Grad entfärbt wurde.

2.4.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels BCA

Der Proteingehalt der gereinigten Cholinoxidase Proben (2.4.1) wurde mithilfe des Pierce™ BCA-Kits ermittelt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde in Multititerplatten (MTPs) nach Herstellerangaben durchgeführt und mit einem Plattenlesegerät (POLARstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, DE) gemessen.

2.4.4 Bestimmung der P450 Konzentration (CO-Assay)

Zur Bestimmung der P450 Konzentration wurde die CO-Differenzspektroskopie nach Omura und Sato angewandt.⁶⁶ Hierfür wird die Eigenschaft von P450s ausgenutzt, in ihrer reduzierten Kohlenstoffmonoxid (CO) -gebundenen Form ein

charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm aufzuweisen. Für die Reduktion des Häm-Eisens wurden 35 g L⁻¹ Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) in KPi-Puffer (2.1.5.2) gelöst und die Hälfte davon für 5 min mit CO begast. In geeigneter Verdünnung wurde das P450-Lysat mit der CO-begasteten Na₂S₂O₄-Lösung gemischt und 15 min bis zur vollständigen Reduktion inkubiert. Als Referenz diente das jeweilige P450-Lysat mit unbegasteter Na₂S₂O₄-Lösung. Das CO-Differenzspektrum wurde im Wellenlängenbereich zwischen 400 – 500 nm in einem Spektralphotometer (Ultraspec 3100, Amersham Biosciences, Uppsala, SWE) aufgezeichnet und die Extinktionen bei 450 nm und 490 nm zur Berechnung des P450-Gehaltes auch in einem Proteingemisch (z. B. im Lysat) herangezogen. Anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Konzentration spezifisch für P450s ermittelt werden:

$$c_{P450} [\mu M] = \frac{\Delta A(450 - 490)}{\varepsilon * d} * V * 1000$$

c_{P450}	Cytochrom P450 Konzentration [μM]
$\Delta A(450-490)$	Differenz der Extinktionswerte bei 420 nm und 450 nm
ε	Extinktionskoeffizient (91 mM ⁻¹ cm ⁻¹)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
V	Verdünnungsfaktor

Eine korrekt gefaltete und somit vermutlich aktives P450 Häm-Domäne weist ein Absorptionsmaximum bei 450 nm auf. Ein prominentes Absorptionsmaximum bei 420 nm deutet auf nicht korrekt inkooperiertes Häm (Fehlfaltung der Häm-Domäne) hin und wird als inaktiv angesehen.¹⁵⁷

Für die Untersuchung von Fusionskonstrukten (P450-PFOR) wurde eine veränderte Methode angewandt, um das gesamte Konstrukt und nicht nur die Häm-Domäne zu ermitteln. Hierbei diente der natürliche Cofaktor NADPH als Reduktionsmittel, der über die Reduktase-Domäne (hier: PFOR) bei Anwesenheit von einem geeigneten Substrat das Eisen der Häm-Domäne reduziert, ähnlich dem natürlichen System.^{113,158} Für die Messung wurde P450-Lysat mit je 1 mM NADPH

und Substrat mit CO-begastem KPi-Puffer gemischt und wie beschrieben gemessen und ausgewertet. Als Referenz dienten die jeweiligen Proben mit unbegastem Puffer. Die ermittelte P450-Konzentration wurde mit der Konzentration der $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduzierten Proben verglichen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Fusionskonstrukte auf die ermittelte Konzentration mit NADPH reduziert, normiert.

2.4.5 Bestimmung der Konzentration der Redoxpartner CamA und CamB

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Redoxpartner wurden die gereinigten und konzentrierten Proteinlösungen CamA und CamB im Wellenlängenbereich zwischen 350 – 500 nm gemessen. Die Konzentration wurde mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes mit den gemessenen Absorptionsmaxima und den spezifischen Extinktionskoeffizienten (Tabelle 8) ermittelt.

Tabelle 8: Spektrale Eigenschaften der Redoxpartner CamA und CamB.^{88,159}

Redoxpartner	Absorptionsmaxima	Extinktionskoeffizienten
Putidaredoxin	378 nm	9,7 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Reduktase (CamA)	454 nm 480 nm	10,0 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 8,5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Putidaredoxin (CamB)	415 nm 455 nm	11,1 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 10,4 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

2.4.6 Spin-state Spektren (Bindungsaffinität)

Die Bindung von Liganden an das Häm-Eisen in Cytochrom P450 Monooxygenasen kann mittels eines Differenzspektrums untersucht werden. Hierbei unterscheiden sich die Spektren, je nachdem, ob ein Substrat bindet (Typ I) oder ein stark assoziierter Ligand, wie viele Arzneistoffe und Inhibitoren (Typ II).^{69,160,161} Wenn das axial am Eisen gebundene Wassermolekül durch ein Substrat verdrängt wird, kommt es zu einer Typ-I-Verschiebung des Soret-Maximums von 420 nm (Low-Spin) auf 385 – 390 nm (High-Spin) und einem Minimum bei 420 nm. Bei einer

Typ-II-Verschiebung wird das Soret-Maximum hingegen auf 425 – 435 nm verschoben und das Minimum befindet sich bei 390 – 405 nm.^{69,160} In dieser Arbeit wurden Spin-State Spektren zur Analyse der Bindung des Inhibitors Dodecylamin herangezogen. Die Spektren wurden in Mikrotiter-Platten in einem Plattenlesegerät (POLARstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, DE) gemessen. In 200 μ L einer 3 μ M P450-Lösung in KPi-Puffer wurde schrittweise Dodecylamin hinzugefügt und ein Spektrum zwischen 320 – 480 nm bei 30 °C in Triplikaten aufgenommen.¹⁶² Als Referenz diente P450-Lösung mit Ethanol anstatt Dodecylamin, um die Absorbance-Verschiebung (ΔA) zu ermitteln. Für die Berechnung der Bindungskonstanten K_d wurde die Differenz $\Delta A_{435} - \Delta A_{415}$ über die Substratkonzentration aufgetragen und mithilfe des Excel Solver Plugins gefittet.

2.4.7 NADPH-Assay und Bestimmung der Kopplungseffizienz

Indem die Abnahme des Cofaktors NADPH photometrisch bei 340 nm verfolgt wird, kann indirekt die Aktivität eines NADPH-verbrauchenden Enzyms bestimmt werden. Bei P450 Monooxygenasen wird diese Methode nur als Vorscreening angewandt, da durch Entkopplungsreaktionen (*Uncoupling*) während des katalytischen Zyklus NADPH verbraucht wird, jedoch bei der Reaktion kein Produkt gebildet wird. Wird jedoch der NADPH-Verbrauch ermittelt und die Produktbildung derselben Probe bestimmt, kann aus der Differenz die Kopplungseffizienz bestimmt werden. Bei einer Kopplungseffizienz von 100 % würden stöchiometrische Mengen an NADPH verbraucht und Produkt gebildet werden. Der NADPH-Assay wurde in MTPs in einem Gesamtvolumen von 200 μ L in KPi-Puffer mit einer Endkonzentration von 0,1 – 0,5 μ M P450 (M.aq-PFOR Fusionskonstrukt) angesetzt. Standardmäßig war 1 mM Substrat und damit 2 % DMSO im Ansatz enthalten. Um die Reaktion zu starten wurde eine Endkonzentration von 300 μ M NADPH hinzugegeben und sofort die Abnahme in einem Plattenlesegerät (POLARstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, DE) bei 340 nm verfolgt. Die Reaktionen wurden in Triplikaten gemessen und als Referenz dienten Proben ohne Substrat (Zugabe von reinem DMSO). Bevor der Cofaktor NADPH vollständig verbraucht war, wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30

μL 30 % HCl abgestoppt und bis zur Analyse mittels GC/FID bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um den Verbrauch an NADPH zuquantifizieren, wurde stets eine NADPH-Konzentrationsreihe mit bekannten Konzentrationen gemessen.

2.5 Biotransformationen

2.5.1 *In vitro* Biotransformationen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die *in vitro* Biotransformationen in einem Gesamtvolumen von $170\text{ }\mu\text{L}$ oder $340\text{ }\mu\text{L}$ in $1,5\text{ mL}$ Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE) durchgeführt. Für Standardreaktionen wurde $1\text{ }\mu\text{M}$ P450 (in Lysat, siehe 2.3.5), $5\text{ }\mu\text{M}$ CamA und $10\text{ }\mu\text{M}$ CamB (gereinigt, siehe 2.4.1) oder $1\text{ }\mu\text{M}$ P450-Fusionskonstrukt in 100 mM KPi-Puffer, pH 7,4 eingesetzt. Für das Fusionskonstrukt wurde die Enzymkonzentration gewählt, die die aktive Fusion widerspiegelt, also mittels CO-Assay mit NADPH als Reduktionsmittel, bestimmt (siehe 2.4.4). Je nach System (freie Redoxpartner oder Fusionskonstrukt) wurde 1 mM NADH bzw. NADPH eingesetzt und als Cofaktor-Regenerationssystem das Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-System (1 mM MgCl_2 , 5 mM G6P, 12 U mL^{-1} G6PDH) verwendet. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 mM des jeweiligen Substrats (50 mM Stocklösung in DMSO oder Ethanol) gestartet und bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 550 rpm in einem Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE) inkubiert. Alle Reaktionen wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt und als Kontrolle diente Lysat des exprimierten Leervektors, sowie P450 Lysat ohne Substrat. Reaktionen wurden nach 1 h oder 4 h durch Zugabe von $30\text{ }\mu\text{L}$ 30 % HCl sauer (Fettsäuren, Alkane, Alkene) oder $30\text{ }\mu\text{L}$ 5 M NaOH basisch (Amine) gestoppt und bis zur Extraktion bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.2 Bestimmung von kinetischen Konstanten

Die kinetischen Konstanten K_m und k_{cat} wurden mithilfe der Michaelis-Menten Gleichung bestimmt. Hierfür wurden in Vorversuchen mehrere Substratkonzentrationen für unterschiedliche Enzymkonzentrationen und

Reaktionszeiten getestet, um abschätzen zu können welche Parameter verwendet werden müssen, sodass der kritische Umsatz von 10 % nicht überschritten wird. Gleichzeitig sollten die Reaktionen im Fließgleichgewicht (*steady-state*) der Produktbildung abgestoppt werden. Die Reaktionen wurden wie in 2.5.1 beschrieben durchgeführt, wobei P450, CamA und CamB im Verhältnis 1:5:10 eingesetzt wurden. Die Substratkonzentrationen wurden aufgrund ihrer maximalen Löslichkeit in Wasser zwischen 0,01 – 5 mM für Octansäure und 0,01 – 1 mM für Dodecansäure variiert. Zum Fitten der kinetischen Parameter wurden die Michaelis-Menten-Gleichung ($v = v_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S])$) und das Excel Solver Plugin verwendet. Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die Masse von CYP153A_{M.aq} mit 54 kDa verwendet.

2.5.3 *In vivo* Biotransformation in 96 *Deepwell* Platten

Nach der Proteinexpression in 96 *Deepwell* Platten (siehe 2.3.4) wurden für die *in vivo* Biotransformationen ruhende Zellen hergestellt. Das P450 Ganzzell-Screening mit Dodecansäure wurde in der Masterarbeit von Lea Rapp etabliert und in der Masterarbeit von Benjamin Baumert auf Octansäure angepasst und ausgeweitet. Für Biotransformationen mit Fettsäuren wurden die Zellpellets mit je 700 μL KPi-Puffer gewaschen, für 15 min bei 4000 x g geerntet und in 500 μL KPi-Puffer resuspendiert, um eine Zellkonzentration von ca. 50 $\text{g}_{\text{cww}} \text{L}^{-1}$ zu erhalten. Davon wurden je 190 μL in eine MTP transferiert und 10 μL 40 mM Fettsäure hinzugegeben (Endkonzentration: 2 mM Fettsäure, 5 % DMSO). Die MTPs wurden bei 20 °C für 4 h bei 550 rpm in einem Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE) inkubiert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g) vom Überstand getrennt. 100 μL des Überstandes, in dem nachfolgend das Produkt detektiert wurde, wurden in eine neue MTB überführt und bis zur Detektion bei -20 °C gelagert.

Für Biotransformationen mit Dodecylamin wurden die Zellpellets in 490 μL KPi-Puffer mit 1 % Glycerin und 0,5 mM Glucose resuspendiert und 10 μL 50 mM Dodecylamin hinzugegeben (Endkonzentration: 1 mM Dodecylamin, 2 % EtOH). Die DWPs wurden für 4 h bei 30 °C und 250 rpm in einem Inkubationsschüttler

Infors HT Minitron (Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert und anschließend 90 μL 5 M NaOH hinzugegeben und für weitere 15 min und 250 rpm inkubiert. Dies diente dem Abstoppen der Reaktion, sowie der nachfolgenden basischen Extraktion und der Phasentrennung von Acetonitril und der wässrigen Phase durch die hohe Salzkonzentration.

2.5.4 Produktion von ω -Hydroxyoctansäure in wachsenden Zellen

Für die Produktion von ω -Hydroxyoctansäure in wachsenden Zellen ohne externe Zugabe von Octansäure als Substrat wurde die Thioesterase FatB2 mit dem P450 Fusionskonstrukt co-transformiert. Dazu wurden die Zellen auf LB-Agar mit Chloramphenicol und Kanamycin selektioniert und die Hauptkultur in 50 mL TB-Medium aus der Vorkultur mit 250 μL inokuliert. Bei einer OD_{600} zwischen 1,2 und 1,4 wurde die Genexpression induziert (siehe 2.3.3). Proben von 170 μL wurden zwischen 0 – 50 h nach der Induktion abgenommen, mit 30 μL 30 % HCl abgestoppt und bis zur Extraktion bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Als Kontrollen dienten Zellen mit P450-Fusionskonstrukt ohne Thioesterase.

2.6 Chemisch-analytische Methoden

2.6.1 Colorimetrischer ABTS Assay

Ein colorimetrischer Assay auf Basis der 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), deren Radikal photometrisch detektierbar ist, wurde als Vorscreening von P450-Varianten der Sättigungsmutagenese verwendet. Hierfür wurden 100 μL des Überstandes (siehe 2.5.3) mit 100 μL eines Gemisches aus 1,66 U Meerrettichperoxidase (HRP), 10 mM ABTS und 1 mg/mL gereinigter Cholinoxidase in KPi-Puffer versetzt. Nach der Inkubation für 3 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Absorption in einem Plattenlesegerät (POLARstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) bei 420 nm gemessen.

2.6.2 GC-FID Analytik

Analytik von Fettsäuren und den gebildeten Produkten

Die Fettsäuren sowie die gebildeten Produkte wurden mit 0,2 mL Methyl-*tert*-butylether (MTBE) mit 0,1 mM internem Standard sauer (siehe 2.5.1) extrahiert (30 sec vortexen). Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, eingedampft und anschließend in 50 µL einer 1:2 Mischung aus MTBE und *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid mit 1 % Trimethylchlorsilan gelöst. Die Proben wurden in ein GC-Vial mit Inlet überführt und bei 70 °C für mindestens 30 min inkubiert, um eine vollständige Derivatisierung zu gewährleisten. Die Substrate und Produkte wurden mittels GC-FID in einem Shimadzu GC-2010 GC-System mit FID-Detektor, ausgestattet mit einer DB-5-Säule (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent, Santa Clara, USA), analysiert und mit Kalibriergeraden zwischen 0,01 – 1 mM der entsprechenden ω-Hydroxysäure-Standards (98 % Reinheit) quantifiziert. Als Trägergas wurde Wasserstoff mit einer linearen Geschwindigkeit von 41 cm/sec verwendet. Die Injektor- und Detektortemperaturen wurden auf 260 °C bzw. 325 °C eingestellt. Probenvolumen von 1 µL wurden bei einem Split von 1:5 oder 1:10 injiziert. Die Methodenprogramme sind in Tabelle 9 zu finden.

Analytik von Alkanen, Alkenen und den gebildeten Produkten

Die Alkane, Alkene sowie die gebildeten Produkte wurden mit 0,2 mL MTBE mit 0,1 mM internem Standard extrahiert (30 sec vortexen). Die organische Phase wurde in ein GC-Vial mit Inlet überführt und mittels GC-FID, ausgestattet mit einer DB-WAX Säule (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent, Santa Clara, USA) analysiert und mit Kalibriergeraden zwischen 0,01 – 1 mM der entsprechenden terminal hydroxylierten Standards quantifiziert. Als Trägergas wurde Helium mit einer linearen Geschwindigkeit von 33 cm/sec verwendet. Die Injektor- und Detektortemperaturen wurden auf 200 °C bzw. 260 °C eingestellt. Probenvolumen von 1 µL wurden im Split-Modus bei einem Split von 1:5 injiziert. Die Methodenprogramme sind in Tabelle 9 zu finden.

Analytik von Aminen und den gebildeten Produkten

Dodecylamin sowie die gebildeten Produkte wurden mit 0,2 mL MTBE mit 0,1 mM Undecylamin als internem Standard basisch (siehe 2.5.1) extrahiert (2 min vortexen). Zusätzlich war 5 % Essigsäureanhydrid für die gleichzeitige Derivatisierung im Extraktionsmittel enthalten. Die organische Phase wurde in ein GC-Vial mit Inlet überführt und mittels GC-FID, ausgestattet mit einer CP-Sil8 CB Säule (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Agilent, Santa Clara, USA), analysiert und mit Kalibriergeraden zwischen 0,01 – 1 mM 12-Amino-1-dodecanol-Standards (> 98 % Reinheit) quantifiziert. Als Trägergas wurde Helium mit einer linearen Geschwindigkeit von 40 cm/sec verwendet. Die Injektor- und Detektor-temperaturen wurden auf 280 °C bzw. 325 °C eingestellt. Probenvolumen von 1 µL wurden im Split-Modus bei einem Split von 1:10 injiziert. Das Methodenprogramm ist nachfolgend in Tabelle 9 zu finden.

Tabelle 9: Verwendete Temperaturprogramme zur Analytik mittels GC-FID.

Substrat	Interner Standard	Heizrate	Temperatur	Dauer
FA: C6, C7	C8 FAOH	20 °C min ⁻¹ 55 °C min ⁻¹	80 °C	
			175 °C	
			320 °C	
FA: C8, C9, C10	C9 FAOH C8 FAOH	20 °C min ⁻¹ 55 °C min ⁻¹	110 °C	
			175 °C	
			320 °C	
FA: C12	C15 FA	30 °C min ⁻¹ 15 °C min ⁻¹ 45 °C min ⁻¹	140 °C	
			180 °C	
			210 °C	
FA: C16	C15 FA	15 °C min ⁻¹	320 °C	1 min
			200 °C	
<i>n</i> -Octan	1-Decanol	40 °C min ⁻¹	100 °C	
			170 °C	
<i>trans</i> -2-Octen	1-Undecanol	30 °C min ⁻¹	235 °C	3 min
			200 °C	
Dodecylamin	Undecylamin	20 °C min ⁻¹ 33 °C min ⁻¹	250 °C	1 min
			310 °C	

FA: Fettsäure, verschiedene Kettenlängen; FAOH: Hydroxyfettsäure, verschiedene Kettenlängen

2.6.3 LC/MS basierte Analytik

In dieser Arbeit wurde statt der klassischen LC/MS Analytik mit Auftrennung der Analyten über eine Säule ein neues Protokoll für eine Massenspektrometrie-basierende „Rapid-Flow-Analyse“ der Produktpeaks entwickelt. Die MS-basierte Rapid-Flow-Analyse wurde etabliert, um eine schnelle und zuverlässige qualitative Detektion der Hydroxylierung von Dodecylamin zu erhalten. Da nur die Gesamtmolekülmassen verfolgt wurden, diente diese Analyse als extrem schnelles und präzises (keine falsch-Positiven) Vorscreening ohne genaue Quantifizierung der Analyten oder Unterscheidung der Position der Hydroxylierung. Für die Quantifizierung der Hits wurde auf die GC-FID Analytik (siehe 2.6.2) zurückgegriffen.

Zur Extraktion der Analyten wurden die Reaktionen (siehe 2.5.3) mit je 500 μL Acetonitril durch mehrfaches hoch und runter pipettieren gemischt. Durch anschließendes Zentrifugieren für 10 min bei 4000 x g wurde die Phasentrennung der organischen und wässrigen Phase erreicht. Für die Rapid-Flow-Analyse wurde ein LC-ESI/MS-System bestehend aus einer binären Pumpe und einem ESI-Single-Quadrupol-MS-Detektor (Agilent 6130) verwendet. In der Methode wurden FIA-Serien aktiviert, um die Rapid-Flow-Analyse in einem einzigen Chromatogramm zu erfassen. Das System wurde bei 30 °C ohne eine chromatographische Säule zur Trennung der Analyten betrieben bei der jede 36 s 0,5 μL Probe bei einer konstanten Flussrate von 0,45 mL/min der mobilen Phase (25 % ddH₂O mit 0,1 % Ameisensäure und 75 % Acetonitril) injiziert wurden; die Druckobergrenze wurde auf 80 bar eingestellt. Vor jeder Probe wurde die Nadel und das Ventil für 5 s gespült, um eine Kreuzkontamination der Analyten zu vermeiden. Um eine direkte Probenahme aus der organischen Phase in den 96-*Deepwell* Platten zu gewährleisten, wurde die Position der Nadel auf 16 mm gestellt. Die Detektion wurde mit einem ESI/MS-Detektor durchgeführt. Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt: *Drying gas temperature* 350 °C, Fluss 10 L min⁻¹; *Nebulizer pressure* 30 psig; Kapillarspannung + 4000 V, *Single-Ion-Mode* (SIM) Dodecylamin: *m/z* 186 und hydroxyliertes Produkt: *m/z* 202.

2.7 Kristallisation und Datensammlung

Die Kristallisation und Datensammlung des Enzyms CYP153A_{P.sp} erfolgte durch den Kooperationspartner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gideon Grogan, University of York. Die Struktur wurde mittels Röntgenkristallographie in zwei Formen bestimmt. Die erste, im Komplex mit Häm und einer Auflösung von 1,52 Å, zeigt zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit (PDB ID 7ANT). Die zweite Form, ein Komplex mit Häm und dem Hydroxylierungsprodukt Octan-1-ol, mit einer Auflösung von 2,55 Å, wurde nach dem *soaking* von Kristallen mit Octan-1-ol erhalten und weist sechs Moleküle in der asymmetrischen Einheit auf (PDB ID 7A07). Die exakte Durchführung ist der Veröffentlichung Rapp et al. „Substrate Anchoring and Flexibility Reduction in CYP153A_{M.aq} Leads to Highly Improved Efficiency toward Octanoic Acid.“ *ACS Catal.* **2021**, *11* (5), 3182–3189. zu entnehmen.

2.8 Bioinformatische Methoden

Die Modellierungen und MD Simulationen der Enzyme erfolgten in Kooperation mit Dr. Sérgio Marques in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jiri Damborsky und wurden an der Masaryk University in Brünn, Tschechien und an der Universität Stuttgart durchgeführt und ausgewertet. Die Rechenressourcen und Netzinfrastruktur wurde von MetaCentrum, CESNET in Tschechien bereitgestellt.

2.8.1 3DM Sequenzalignment

Das in dieser Arbeit durchgeführte Sequenz-Struktur-Alignment wurde mithilfe der 3DM Datenbank von Bio-Product (<https://3dm.bio-product.com/>) erstellt und damit die Konsensussequenz sowie die vorherrschenden Aminosäureverteilungen in verwandten P450s untersucht. Innerhalb der 3DM Datenbank werden Aminosäurereste von Enzymen mittels einer Sequenz-Struktur-Analyse von Aminosäuren, die sich im dreidimensionalen Raum an der gleichen Position befinden, einer eigenen 3DM-Nummer zugeteilt. Auf diese Weise können vergleichbare Aminosäurepositionen auffindig gemacht werden und innerhalb ausgewählten Subsets verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 312

P450s mit einer Sequenzidentität zu CYP153A_{M.aq} von mindestens 55 % ausgewählt und verglichen.

2.8.2 *In silico* Mutagenese zur Erstellung von Homologiemodellen

Die Homologiemodelle ausgewählter P450-Varianten wurden mittels *in silico* Mutagenese konstruiert, die mit SWISS-MODEL¹⁶³ durchgeführt wurde. Die Zielsequenzen mit den entsprechenden substituierten Aminosäuren wurden im FASTA-Format eingefügt und die Template-Suche wurde verwendet, um das Modell auf der Kristallstruktur des Wildtyp-Enzyms CYP153A_{M.aq} aufzubauen, die aus der RCSB Protein Data Bank (PDB-Eintrag 5FYG) stammt.^{164,165}

2.8.3 Vorbereitung der Liganden

Vorbereitung für molekulare Dockings

Die Strukturen von Dodecylamin und der deprotonierten Form der Octansäure wurden mit Avogadro¹⁶⁶ konstruiert und minimiert. Der Minimierungsschritt wurde mit dem Auto-Optimierungs-Tool von Avogadro mittels des MMFF94-Kraftfelds¹⁶⁷ mit dem *steepest descent* Algorithmus durchgeführt und anschließend als PDB-Datei gespeichert.

Vorbereitung für MD Simulationen

Die resultierenden Strukturen wurden einer weiteren Optimierung und Berechnung ihrer partiellen Atomladungen unter Verwendung von Gaussian 09¹⁶⁸ mit der Hartree-Fock-Methode und dem 6-31G(d)-Basissatz im Vakuum unterzogen. Diese Einstellungen waren ähnlich denen, die zuvor für die Parametrisierung anderer organischer Liganden verwendet wurden.¹⁶⁹ Das Antechamber-Modul von AmberTools 14¹⁷⁰ wurde verwendet, um die RESP-Ladungen aus den Gaussian-Ausgabedateien zu extrahieren, die kompiliert und als MOL2-Dateien gespeichert wurden, um in den dynamischen Simulationen verwendet zu werden.

2.8.4 Vorbereitung der Rezeptoren

Das Lösungsmittel, die Kristallisationsmoleküle, die Wasserstoffatome und das Häm wurden aus den CYP153A_{M.aq}-Strukturen entfernt und mit Hilfe des H++

Servers (Version 3.2)¹⁷¹ korrekt berechnet hinzugefügt. Die Berechnungen erfolgten in implizitem Lösungsmittel bei pH 7,4, 0,1 M Salzgehalt, mit einer internen dielektrischen Konstante von 10 und einer externen von 80. Die Wassermoleküle und das Häm aus der ursprünglichen Kristallstruktur von CYP153A_{M.aq} wurden zu diesen Strukturen anschließend wieder hinzugefügt. Der Aminosäurerest His152, nahe des Häms, wurde manuell protoniert.

2.8.5 Tunnel Berechnungen

Das PyMOL-Plugin CAVER 3.0.3⁴³ wurde verwendet, um Tunnel im Wildtyp CYP153A_{M.aq} und in den generierten Homologiemodellen zu identifizieren und zu visualisieren. Die Tunnel wurden mit den Standardeinstellungen und einem Probenradius von 1,0 Å berechnet. Das Eisenatom im Häm-Molekül wurde als Startpunkt für die Tunnelberechnungen definiert.

2.8.6 Molekulares Docking in der aktiven Tasche

Die Input Dateien der Rezeptoren und der jeweiligen Liganden im pdb-Format wurden mit MGLTools¹⁷² in das AutoDock Vina-kompatible pdbqt-Format konvertiert, das die jeweiligen Partialladungen der Atome beinhaltet. Die Ladung des Eisenatoms in den Rezeptoren wurde anschließend, wie in der Literatur beschrieben, auf 0,25 festgelegt.¹⁷³ Für das Docking, das mit AutoDock Vina¹⁷⁴ durchgeführt wurde, wurde als die gewünschte Region das aktive Zentrum von CYP153A_{M.aq} Wildtyp und den Varianten ausgewählt. Diese Region wurde durch eine Box von 15 × 16,88 × 15 Å dargestellt, die sich oberhalb des Häms befindet und so definiert wurde, dass sie die Tunnel 2c und 2e miteinschließt. Für die Berechnungen wurde eine *exhaustiveness* von 50 verwendet.

2.8.7 Molekulares Docking entlang der Tunnel

Die mit CAVER 3.0.3 identifizierten Tunnel wurden für das Docking mit CaverDock¹⁷⁵ verwendet. Die pdb-Dateien der Tunnel wurden in *Discs* mit einem Abstand von 0,3 Å diskretisiert und anschließend um 2 Å nach außen hin erweitert. Das Docking von Außen nach Innen hin zum aktiven Zentrum des Enzyms konnte durch Invertieren der Tunnel-pdb-Dateien erreicht werden. Die Liganden wurden

von dem Massenschwerpunkt (Standardeinstellung) sowie den beiden terminalen Enden zum Häm-Eisen hingezogen. Die Trajektorien und Energieprofile wurden für alle drei Tunnel in den drei Enzymen mit den gewünschten Liganden für *upper* und *lower bound* Energien berechnet und analysiert.

2.8.8 Vorbereitung und Equilibrierung des Systems der MD Simulationen

Nach der Vorbereitung der Rezeptoren (siehe 2.8.4) wurden die aus dem molekularen Docking gewonnenen Liganden in der aktiven Tasche (siehe 2.8.6) zu den Enzymstrukturen hinzugefügt, um molekulardynamische (MD) Simulationen durchzuführen. Je nach Substrat und Variante wurden verschiedene Ligandenkonformationen als Ausgangspunkte gewählt. Für die Octansäure wurde beim Wildtyp CYP153A_{M.aq} (M.aq) und der M.aqRLT-Mutante nur die aktive Konformation (mit dem terminalen Kohlenstoff, der zum Eisenatom im Häm zeigt) verwendet. Für Dodecylamin wurden zwei Konformationen (terminaler Kohlenstoff zum Eisen hin als "aktiv" und mit dem terminalen Stickstoff zum Eisen hin als "inaktiv" bezeichnet) mit dem Wildtyp und der M.aqAA-Mutante (V141A/M228A) ausgewählt.

Die verschiedenen freien Proteine ohne gebundenen Liganden und Protein-Ligand-Komplexe wurden mit dem Wasser aus der Kristallstruktur des Wildtyps CYP153A_{M.aq} (PDB-Eintrag 5FYG) hydriert. Jegliche Wassermoleküle, die sich mit den Protein- oder Ligandenatomen überlagerten, wurden entfernt. Das tLEaP-Programm von AmberTools 14¹⁷⁰ wurde verwendet, um die *topology* und *trajectory* Dateien für die Durchführung der Simulation vorzubereiten. Dazu wurde das ff14SB-Kraftfeld¹⁷⁶ spezifiziert, und die Teilladungen und Parameter für die Liganden wurden aus den entsprechenden MOL2-Dateien hinzugefügt. Die Parameter für das Häm und den Häm-gebundenen Cysteinrest in den Enzymen wurden hinzugefügt, wie für den pentakoordinierten Eisen *high-spin* Sextett-Zustand (IC6) beschrieben.¹⁷³ Die Na⁺-Ionen, die für die Neutralisierung des Systems erforderlich sind, wurden hinzugefügt, ebenso wie eine achteckige Box aus OPC3-Wassermolekülen¹⁷⁷, deren Kanten 10 Å vom ursprünglichen System entfernt sind.

Die exakte Durchführung und die verwendeten Parameter der MD Simulationen sind der Veröffentlichung [Rapp et al.](#) „Substrate Anchoring and Flexibility Reduction in CYP153A_{M.aq} Leads to Highly Improved Efficiency toward Octanoic Acid.“ *ACS Catal.* **2021**, *11* (5), 3182–3189. zu entnehmen.

Die Produktions-MDs wurden für je 200 ns mit den gleichen Einstellungen wie im letzten Äquilibrierungsschritt in Triplikaten für die ungebundenen Enzyme und in Quadruplikaten für die Enzym-Ligand-Komplexe durchgeführt. Anschließend wurden die Trajektorien zentriert, von allen Wassermolekülen und Ionen befreit und an den jeweiligen Ausgangsstrukturen ausgerichtet, indem die *root-mean-square deviation* (RMSD) der *backbone* Atome mit dem *cpptraj*¹⁷⁸ ref-Modul von AmberTools 14 minimiert wurde. Die Visualisierung wurde mit PyMOL 2.0¹⁷⁹ und VMD 1.9.1¹⁸⁰ ermöglicht.

2.8.9 Analyse der MD Simulationen

Jede Simulation von 200 ns wurde in 20 000 Einzelbilder, sogenannte *frames*, unterteilt. Die Analyse der MD Simulationen wurde mit dem *cpptraj*-Modul von AmberTools 14 durchgeführt, wie z. B. die Berechnung von RMSD-Werten, B-Faktoren und Abständen zwischen Atomen der Liganden und der Proteine. Es wurden die jeweiligen Abstände zwischen i) dem terminalen Kohlenstoff und dem Häm-Eisen für Octansäure und ii) dem terminalen Kohlenstoff oder dem Stickstoff des Dodecylamin-Liganden und dem Häm-Eisen des Enzyms berechnet.

Tunnel Berechnungen der simulierten Enzyme

CAVER 3.2 wurde als Standalone-Version verwendet, um die Proteintunnel in den MD Simulationen des Wildtyps CYP153A_{M.aq} und der Varianten M.aqRLT und M.aqAA zu identifizieren. Die Tunnel jedes *frames* wurden mit den Standardeinstellungen und einem Probenradius von 0,9 Å, einem Schalenradius von 3 Å und einer Schalentiefe von 4 Å berechnet. Das Eisenatom im Häm-Molekül wurde als Startpunkt für die Tunnelberechnungen definiert. Das *Clustering* wurde mit dem hierarchischen Murtagh-Algorithmus mit durchschnittlicher Verknüpfung und mit einem *Clustering-threshold* von 3,5 Å durchgeführt. Das ungefähre *Clustering* wurde mit 20 Trainingsclustern durchgeführt, insofern die

Gesamtzahl der Tunnel höher als 20 000 war. Die jeweils 5 besten Cluster, die in jeder Simulation gefunden wurden, wurden zusammengestellt und analysiert. Zusätzlich wurde ein Tunnel als „offen“ betrachtet, wenn er einen *Bottleneck*radius von mindestens 1,4 Å aufweist.

Freie Bindungsenergie der simulierten Enzyme mit Liganden

Molekulare Mechanik/Generalisierte Born-Surface Area (MM/GBSA)^{181,182} Berechnungen wurden auf Basis der MD Simulationen mit Liganden ausgeführt, um die freie Energie der Bindung des Liganden mit den Enzymen, ΔG_{bind} , und die jeweiligen Aminossäurereste-Ligand-Wechselwirkungen zu berechnen. Das Modul *cpptraj* wurde verwendet, um alle Ionen und Wassermoleküle aus den MD-Trajektorien zu entfernen. Das Modul *Ante-MMPBSA.py* von AmberTools 14 wurde verwendet, um das Lösungsmittel und die Ionen aus der ursprünglichen Topologie der Systeme zu entfernen und die Born-Radien als *mbondi3* zu definieren und die entsprechenden Topologie-Dateien für den Komplex, den Rezeptor und den Liganden zu generieren, die in den MM/GBSA-Berechnungen verwendet wurden. Die verallgemeinerte Born-Methode wurde (*&gb namelist*) mit implizitem verallgemeinertem Born-Lösungsmittelmodell (*igb=8*) verwendet. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche wurde mit einem LCPO-Algorithmus¹⁸³ berechnet. Die Zerlegung der paarweisen Wechselwirkungen (*&decomp namelist*) wurde mit Unterscheidung aller Arten von Energiebeiträgen (*idecomp=4*) für den gesamten Rest (*dec_verbose=0*) generiert. Das Modul *MMPBSA.py.MPI* von AmberTools 14 wurde verwendet, um parallel die freie Bindungsenergie für jeden 10 ps-abgestuften Snapshot der MD-Simulationen zu berechnen.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die im Zuge dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse in drei wesentliche Abschnitte gegliedert. Zuerst wurde die Lagerstabilität des gewählten CYP153A_{M.aq} Systems geprüft und Untersuchungen zu den im Proteinkristall vorhandenen Tunnelstrukturen beschrieben, sowie eine Screeningmethode ausgeweitet. Im zweiten Abschnitt wird die Erweiterung des Substratspektrums der CYP153A_{M.aq} Monooxygenase auf kürzerkettige Fettsäuren beschrieben. Am Beispiel der Octansäure wurde mittels Protein Engineering eine hocheffiziente Enzymvariante generiert und die Effekte nachfolgend bioinformatisch analysiert. Anhand eines abschließenden Beispiels wird die Anwendung der Variante in einer Kaskade im Ganzzellsystem beschrieben. Der dritte Abschnitt befasst sich mit der Erweiterung des Substratspektrums hinsichtlich nicht-natürlicher Substrate. Durch ein gezieltes Engineering wurde die terminale Hydroxylierung des Wildtyp-Inhibitors Dodecylamin ermöglicht. Hierfür wurde ein spezielles Hochdurchsatz-Screeningsystem entwickelt, mit dem auf Basis von Massenspektrometrie ohne chromatographische Separation der Analyten spezifisch und rapide Hits mit höherer Produktbildung selektiert werden konnten. Abschließend wurden die Enzymvarianten bioinformatisch hinsichtlich der veränderten Tunnelarchitektur untersucht und evaluiert.

3.1 Untersuchung der Lagerstabilität

In verschiedenen Vorversuchen mit CYP153A_{M.aq} wurde gezeigt, dass die Lagerung von Zellpellets bei -20 °C und der anschließenden Lyse zur Gewinnung des Lysats mit einer Abnahme der Produktbildung verbunden ist und nicht mit den Daten aus frischem Lysat verglichen werden kann. Um dies zu verdeutlichen, wurden der Wildtyp und zwei literaturbekannte Varianten (A231G und Q129R)^{164,184} exprimiert und in Standard-Biotransformationen mit frischem Lysat und Dodecansäure zu ω -Hydroxydodecansäure umgesetzt (2.5.1). Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen geerntet und die Zellpellets, sowie ein Teil des frischen Lysats bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden jeweils in Aliquoten eingefroren und für 1, 5 und 10 Tage gelagert, bevor sie auf Eis aufgetaut und Biotransformationen mit

Dodecansäure durchgeführt wurden. Das Aliquot, das frisch verwendet wurde, wurde nach 1 Tag und 5 Tagen aufgetaut, also ein Mal nach dem Auftauen wieder eingefroren. Für 10 Tage Lagerung wurde ein Aliquot verwendet, das noch nicht zuvor aufgetaut war. Nach 24 h wurden die Pellets gelöst, lysiert und zusammen mit dem bei -20 °C gelagerten Lysat in Standard-Biotransformationen eingesetzt, analog zu frischem Lysat. Zusätzlich wurde die Auswirkung der Zugabe verschiedener Additive hinsichtlich der Lagerstabilität von CYP153A_{M.aq} getestet. Es wurden die Additive Glycerin 10 % (v/v), Monopropylenglykol (MPG) 10 % (v/v), und Sorbit 2 % (w/v) ausgewählt, die in KPi-Puffer gelöst wurden. Als Kontrolle diente Lysat ohne Additive.

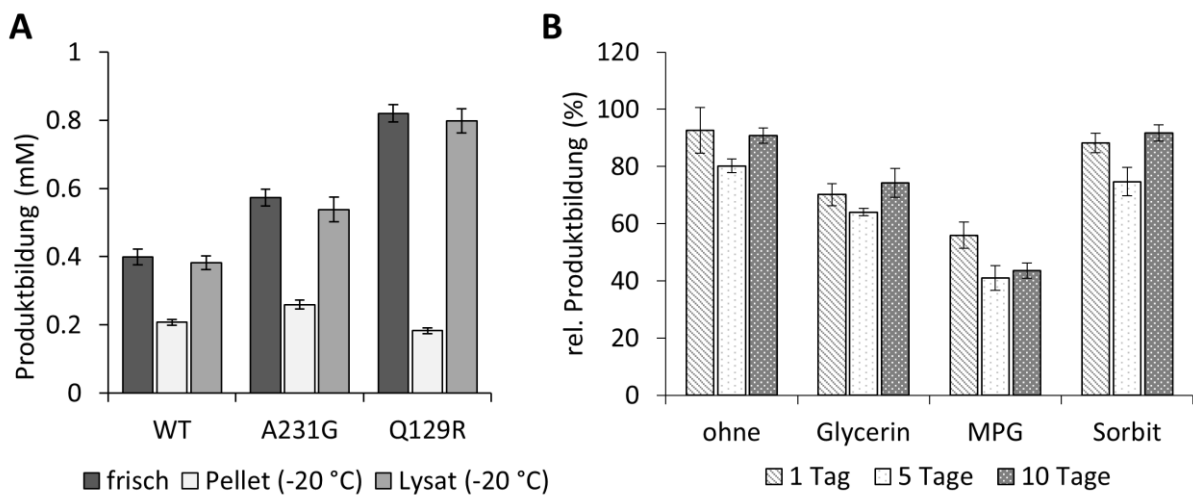


Abbildung 11: Lagerungsstabilität der Enzyme bei -20 °C. (A) Produktbildung von ω -Hydroxydodecansäure von drei Varianten (WT, A231G und Q129R) mit frischem Lysat, Lysat aus gelagerten Pellets und gelagertem Lysat. (B) Relative Produktbildung des Wildtyps nach der Lagerung bei -20 °C ohne Additive, mit 10 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) MPG und 2 % (w/v) Sorbit für 1 Tag, 5 und 10 Tage. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung bei Standard-Biotransformationen (2.5.1) mit frischem Lysat für den WT bei $0,4 \pm 0,02$ mM ω -Hydroxydodecansäure liegt. Die Variante A231G bildete unter denselben Bedingungen $0,57 \pm 0,03$ mM und die Variante Q129R $0,82 \pm 0,03$ mM ω -Hydroxydodecansäure, was mit Literaturdaten übereinstimmt.¹⁸⁴ Durch die Lagerung der Zellpellets bei -20 °C und die anschließende Lyse und Biotransformation verringerte sich die Produktbildung deutlich auf höchstens 50 % im Vergleich zu frischem Lysat (Abbildung 11A). Außerdem zeigte hierbei die

Variante Q129R mit nur noch 22 % Produktbildung den geringsten Umsatz der drei Varianten, obwohl diese in frischem Lysat die höchste Produktbildung aufwies. Die Lagerung von Lysat bei -20 °C und einem langsamen Auftauvorgang auf Eis zeigte nur eine geringfügige Änderung der Produktbildung, die sich innerhalb der Abweichung der Messung mit frischem Lysat befindet. Daher wurde im Folgenden auf die Lagerung von Zellpellets verzichtet und ausschließlich Lysat bei -20 °C eingefroren. Des Weiteren wurde getestet, ob eine Zugabe von Additiven die Lagerstabilität erhöht. Ohne Additive war die Produktbildung nach einmaligem Auftauen (1 Tag und 10 Tage) unverändert und minimal geringer als mit frischem Lysat. Zweimaliges Auftauen (5 Tage) zeigte jedoch eine Verringerung der Produktbildung auf 80 ± 2 %. Die Additive Glycerin und MPG führten zu deutlichen Einbußen in der relativen Produktbildung und Sorbit war vergleichbar zu den Daten ohne Zusätze. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit frischem oder gefrorenem Lysat gearbeitet, das ohne Additive verwendet und höchstens ein Mal aufgetaut wurde.

3.2 Untersuchungen des CYP153A_{M.aq} Systems im Hinblick auf die im Enzymkristall vorhandenen Tunnelstrukturen

3.2.1 Verfügbare Enzymtunnel der CYP153A_{M.aq} Kristallstruktur

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Enzymtunnel in der CYP153A_{M.aq} Kristallstruktur bereits bekannt, jedoch waren die potenziellen Eingänge nur teilweise untersucht. Eine erweiterte Analyse des *in silico* protonierten Enzyms mit CAVER 3.0.3 zeigte eine deutliche Verlängerung eines Substrattunnels als es bisher angenommen wurde, weshalb für diese Arbeit diese erweiterte CAVER-Analyse herangezogen wurde. Wie bereits beschrieben wurden in der Enzymstruktur drei Tunnel identifiziert, die nach Cojocarú *et al.* auf Basis ihrer Austritts- bzw. Eingangsposition im Enzym benannt wurden.^{97,184} Nach dieser Nomenklatur handelt es sich um einen putativen Solvent-(Lösemittel-) Tunnel S (gelb) und zwei Substrattunnel der Kategorie 2 (Abbildung 12). Dabei sind letztere wiederum eingeordnet in Tunnel 2c (violett), der zwischen dem BC-Loop (pink) und dem FG-

Loop (blau) bzw. der G-Helix austritt und Tunnel 2e (grün), ein sekundärer Enzymtunnel, der durch die Schlaufe austritt, die der BC-Loop ausbildet.

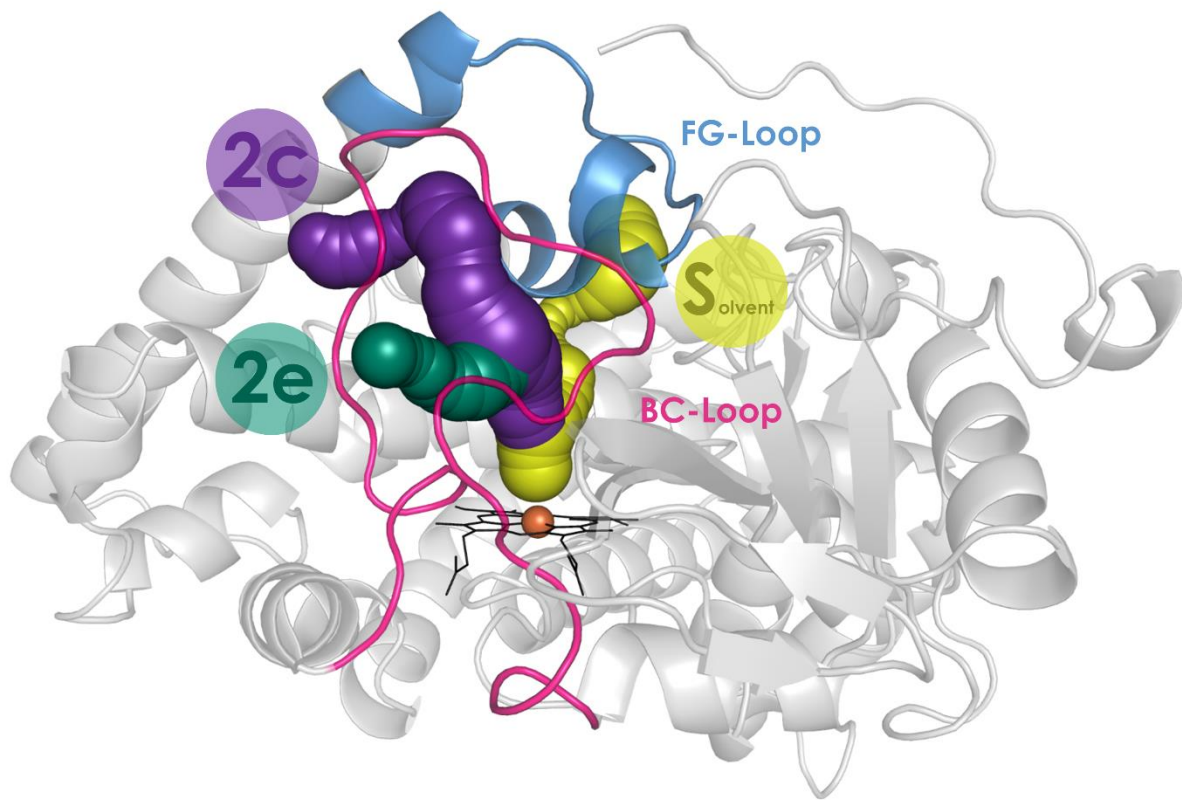


Abbildung 12: Tunnelarchitektur der CYP153A_{M.aq} Kristallstruktur. Der Solvent (S)-Tunnel (gelb) und die Substrattunnel 2c (violett) und 2e (grün), die maßgeblich durch den BC-Loop (pink) und FG-Loop (blau) gebildet werden. Das Häm ist als schwarze *sticks* und das Eisen als eine orangefarbene Kugel dargestellt. Tunnel wurden mit der Software CAVER 3.0.3 berechnet.

Die berechneten Tunnel besitzen unterschiedliche Charakteristika bezüglich ihrer Längen und der kleinsten Radien (Bottleneckradien) des Gesamttunnels. Der Tunnel S weist dabei den geringsten Bottleneckradius von 1,0 Å und eine mittlere Länge von 19,1 Å auf. Während der 2c Tunnel mit 24,7 Å der am deutlich längste Tunnel ist, hat dieser einen mittleren Bottleneckradius von 1,3 Å und der 2e Tunnel den größten Bottleneckradius von 1,4 Å und einer Länge von 18 Å. Weitere Tunnel mit Bottleneckradien von mindestens 1 Å wurden nicht identifiziert.

3.2.2 Untersuchungen von strukturbildenden Aminosäureresten der Enzymtunnel in Bezug auf das Substratspektrum

Im Zuge dieser Arbeit sollte CYP153A_{M.aq} durch eine Mutagenesestudie der tunnelbildenden Aminosäuren auf die Eigenschaft der Substratpromiskuitivität untersucht werden. Hierfür sollten die maßgeblich an der Tunnelstruktur beteiligten Aminosäuren sukzessive ausgetauscht und generierte Enzymvarianten mit dem Wildtyp Enzym verglichen werden. Basierend auf der beschriebenen Substratpräferenz des Wildtyps hinsichtlich Fettsäuren¹¹⁰ wurden aus der Substratkategorie der Fettsäuren eine kürzere (Octansäure) eine mittellange (Dodecansäure) und längere Fettsäure (Hexadecansäure) ausgewählt, um die Varianten hinsichtlich der Kettenlängen-Präferenz zu untersuchen. Da für diese Arbeit unter anderem kürzerkettige Moleküle (C8) von Interesse waren, wurden aus der Klasse der Alkane *n*-Octan und aus der Klasse der Alkene *trans*-2-Octen getestet. Für die *in vitro* Biotransformationen wurde standardmäßig 1 mM Substrat eingesetzt und die Produktbildung mittels GC/FID anhand Produktstandards ermittelt. Die jeweiligen Produktbildungen der eingesetzten Substrate können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Produktbildung des Wildtyps CYP153A_{M.aq} hinsichtlich der Biotransformation von Octan-, Dodecan- und Hexadecansäure, *n*-Octan und *trans*-2-Octen. Es wurden jeweils nur die terminal hydroxylierten Produkte detektiert. Für *n*-Octan konnte sowohl 1-Octanol als auch 1,8-Octandiol als Produkt identifiziert werden.^a

Substrat	Produkt	Produktbildung
Octansäure	ω-Hydroxyoctansäure	0,018 ± 0,002 mM
Dodecansäure	ω-Hydroxydodecansäure	0,39 ± 0,02 mM
Hexadecansäure	ω-Hydroxyhexadecansäure	0,19 ± 0,02 mM
<i>n</i> -Octan	1-Octanol	1,4 ± 0,3 μM
	1,8-Octandiol	40,3 ± 1,2 μM
<i>Trans</i> -2-Octen	<i>trans</i> -2-Octen-1-ol	3,9 ± 0,1 μM

^a1 μM P450 (Fettsäuren) bzw. 2 μM P450 (Alkan, Alken), Redoxpartner im Verhältnis 1:5:10 (P450:CamA:CamB), 1 mM Substrat, 2 % DMSO, 1 mM NADH und Cofaktor Regenerierung, 100 mM Kalium-Phosphat Puffer pH 7,4, 550 rpm, 1 h, 30 °C. Die Fehler repräsentieren Standardabweichungen aus Triplikaten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Aminosäuren ausgewählt, die an der Bildung der drei unterschiedlichen Enzymtunnel 2c, 2e und S beteiligt sind. Für jeden Tunnel wurden diejenigen Aminosäuren ausgewählt, die lediglich an der

Bildung dieses Tunnels beteiligt sind und mehr als 3 Å von den anderen Tunneln entfernt liegen, sowie vier Aminosäuren (V141, M143, M228, T302), die an der Bildung von Tunnel 2c und 2e beteiligt sind (Abbildung 13).

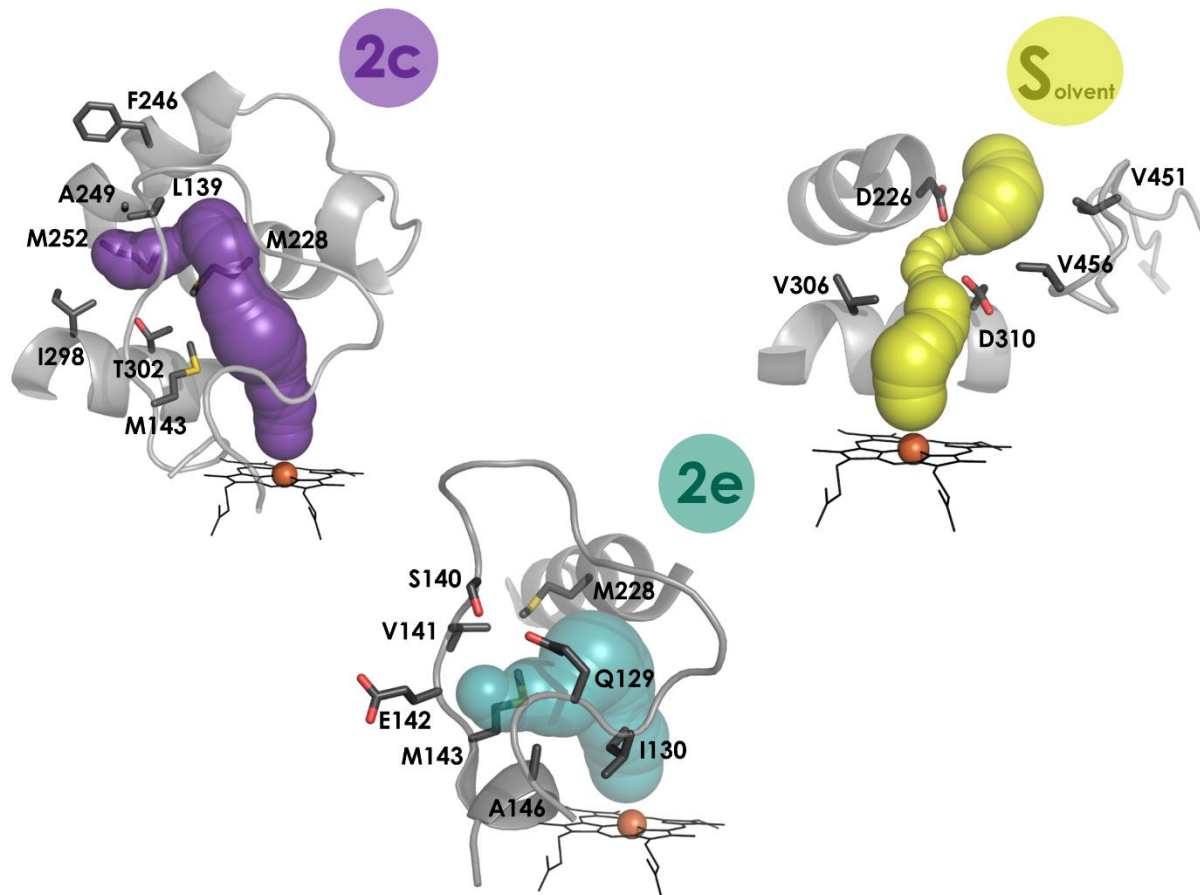


Abbildung 13: Für die Mutagenesestudie ausgewählte Aminosäurereste und deren Position entlang der Tunnel. Untersuchte Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt und die Tunnel 2c (violett), S (gelb) und 2e (grün) als Kugeln mit berechneten Radien. Das Häm ist als schwarze *sticks* und das Eisen als eine orangefarbene Kugel dargestellt. Die Tunnel wurden mit der Software CAVER 3.0.3 berechnet.

Die adressierten Aminosäuren wurden nachfolgend zu jeweils Alanin und Tryptophan mutiert, um Positionen für weitere Mutagenesestrategien zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Produktbildung haben. Ein klassischer Alanin-Scan ist zwar für die Identifikation von katalytisch aktiven Positionen zielführend, meist jedoch nicht ausreichend, um Hotspot Positionen an Enzymtunneln zu identifizieren. Daher wurde zusätzlich der Austausch zu der sperrigen Aminosäure Tryptophan herangezogen, die in der Literatur als *Gatekeeper* in Tunneln beschrieben und schon zuvor als Blockade eines Substrateingangstunnels verwendet wurde.^{59,185} Für einen Überblick wurden

Varianten mit einem Alanin- und einem Tryptophan-Scan erstellt und mit unterschiedlichen Substraten gescreent.

Analyse der strukturbildenden Aminosäuren des Tunnels 2c

Insgesamt wurden sieben Aminosäuren ausgewählt, die die Topologie des Tunnels 2c bilden (Abbildung 13). Position 228 ist dabei zusätzlich an der Bildung des Tunnels 2e beteiligt. Die anderen Aminosäuren säumen alleinig Tunnel 2c. Die Aminosäuresubstitutionen und erste Versuche entstanden in der Bachelorarbeit von Steffen Bulach (Studie des 2c-Substratkanals der P450 Monooxygenase CYP153A_{M.aq}).¹⁸⁶ Die hier gezeigten Produktbildungen der Varianten wurden in der vorliegenden Arbeit ermittelt.

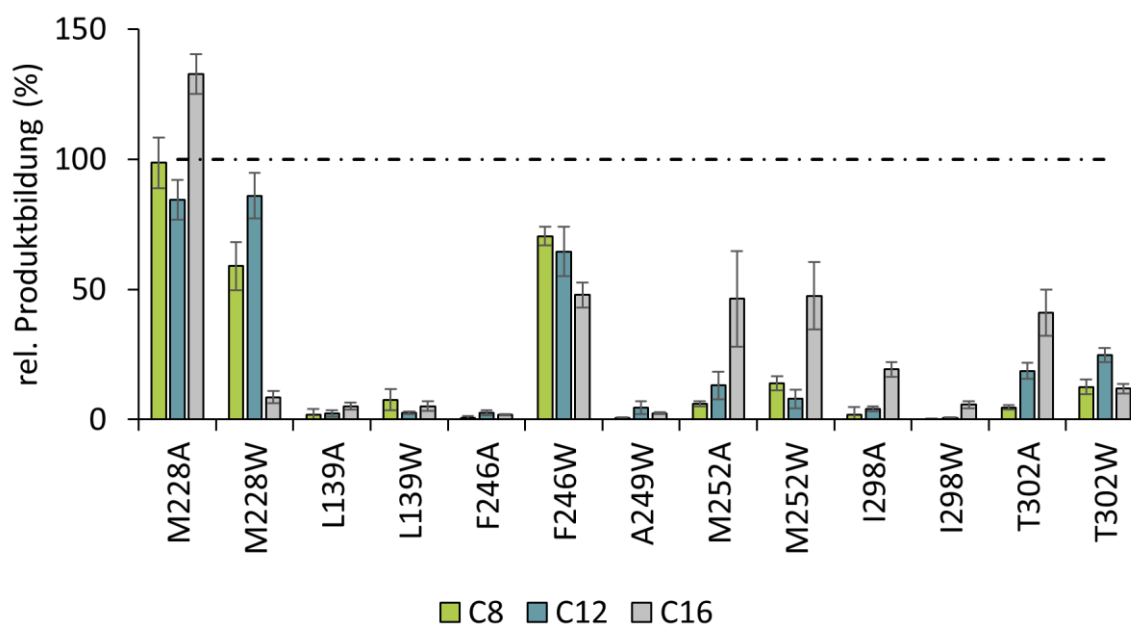


Abbildung 14: Produktbildung der Varianten des Tunnels 2c im Vergleich zum WT hinsichtlich Octansäure (C8), Dodecansäure (C12) und Hexadecansäure (C16). Die gestrichelte Linie gibt die Produktbildung des Wildtyps an (Anzeigewert 100 %). Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Durch das Entfernen der Seitenkette des Methionins an Position 228 (M228A) blieb die Produktbildung relativ zum Wildtyp mit der kurzkettigen Fettsäure (C8) unverändert (99 ± 10 %) während mit der C12 Fettsäure weniger Produkt entstand (84 ± 8 %). Mit der längsten der getesteten Fettsäuren, C16, wurde die Produktbildung dagegen gesteigert (133 ± 8 %). Durch das Einführen der großen,

sperrigen Aminosäure Tryptophan verringerte sich hingegen die Produktbildung unter Einsatz der C16 Fettsäure drastisch zu $9 \pm 2 \%$. Mit dem C8 Substrat konnten $59 \pm 9 \%$ Produkt gebildet werden und mit dem C12 Substrat $86 \pm 9 \%$. Die Mutationen an den Positionen 252, 298 und 302 führten zu deutlichen Verringerungen der Bildung aller Produkte, jedoch wurde mit der C16 Fettsäure am meisten Produkt gebildet. Für die anderen Mutationen innerhalb des 2c Tunnels wurde für alle Fettsäure-Substrate auf einem ähnlichen Level sehr wenig Produkt gebildet (meist $> 10 \%$) (Abbildung 14). Die absoluten Werte der Biotransformationen sind dem Anhang (Tabelle 18) zu entnehmen.

Analyse der strukturbildenden Aminosäuren des Tunnels 2e

Mithilfe der CAVER Analyse wurden für den Tunnel 2e sieben Aminosäuren für eine Substitution zu Alanin und Tryptophan ermittelt. Dabei sind die Reste V141 und M143 an der Ausbildung der Tunnel 2e und 2c beteiligt.

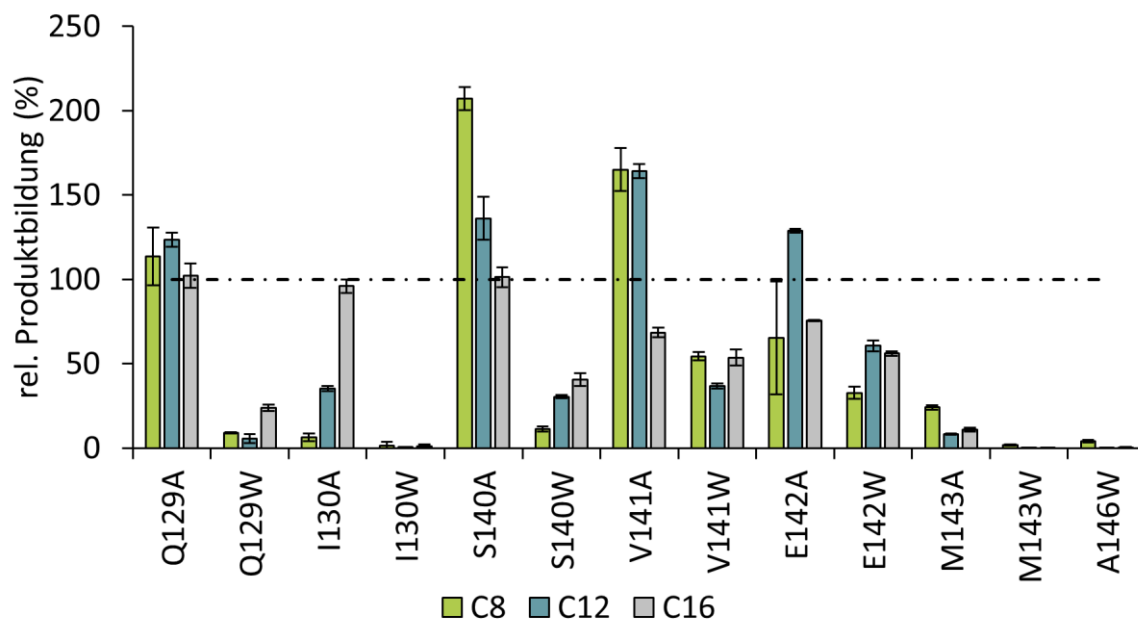


Abbildung 15: Produktbildung der Varianten des Tunnels 2e im Vergleich zum WT hinsichtlich Octansäure (C8), Dodecansäure (C12) und Hexadecansäure (C16). Die gestrichelte Linie gibt die Produktbildung des Wildtyps an (Anzeigewert 100 %). Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Die Position 129 ist schon in früheren Studien zu diesem Enzym untersucht worden und zeigte je nach Substitution einen deutlichen Einfluss auf die Spezifität.¹⁸⁴ In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Entfernen der

Glutamin-Seitenkette die Produktbildung mit Dodecansäure als Substrat erhöht wurde (123 ± 4 %), dies aber keinen Einfluss auf die kurz- und langkettigen Substrate hatte. Das Entfernen der Seitenkette von S140 und V141 zeigte eine deutlich erhöhte ω -Hydroxyoctansäure Produktion (207 ± 7 % und 165 ± 13 %, respektive). Auch der Dodecansäure Umsatz wurde gesteigert (136 ± 13 % und 164 ± 4 %), während dies auf den Umsatz mit der Hexadecansäure keinen bzw. einen negativen Einfluss zeigte (101 ± 6 % und 68 ± 3 %). Der fehlende Rest an Position 142 führte lediglich zu einem erhöhten Umsatz mit Dodecansäure (129 ± 1 %). Alle Substitutionen zu Tryptophan resultierten in einer starken Abnahme der Produktbildung für alle Substrate. Die absoluten Werte der Biotransformationen sind dem Anhang (Tabelle 18) zu entnehmen.

Analyse der strukturbildenden Aminosäuren des Tunnels S

Für die Untersuchung des putativen Solvent-Tunnels wurden fünf Aminosäuren adressiert, die einzig an der Strukturbildung dieses Tunnels beteiligt sind. In fast allen Fällen führten die Substitutionen zu Umsatzeinbußen und relativen Produktbildungen von maximal 10 % im Vergleich zum WT. Nur die Mutationen V451A/W und V456A, die sich am Tunneleingang befinden, führten zu weniger drastischen Verringerungen auf 60 – 90 % Produktbildung relativ zum Wildtyp. Lediglich mit der Variante V451W konnte eine leicht erhöhte Produktbildung von 117 ± 13 % ω -Hydroxyhexadecansäure verzeichnet werden. Die absoluten Werte sind dem Anhang (Tabelle 18) zu entnehmen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse die Bedeutung des Solvent-Tunnels für die Katalyse. Dieser Tunnel wurde nicht in weitere Mutations-Strategien miteinbezogen, da sich diese Arbeit mit der Untersuchung der Substrattunnel hinsichtlich neuer Aktivität und Spezifität befasst.

Analyse der Substrattunnel 2c und 2e hinsichtlich weiterer Substrate

Zwei weitere Substratklassen kürzerkettiger (C8) aliphatischer Verbindungen wurden im Zuge dieser Arbeit getestet. Für die Klasse der Alkane wurde *n*-Octan gewählt und aus der Klasse der Alkene das *trans*-2-Octen. Unter Verwendung von *n*-Octan konnten zwei Produkte in unterschiedlichem Verhältnis detektiert

werden. Zum Einen konnte das monohydroxylierte 1-Octanol und zum Anderen das dihydroxylierte Produkt 1,8-Octandiol mittels GC-FID Analyse nachgewiesen werden. Die Biotransformationen mit *trans*-2-Octen führten lediglich zur Bildung von *trans*-2-Octen-1-ol, bzw. es konnte kein weiteres Produkt detektiert werden (vgl. Abbildung 10).

Tunnel 2c		1-Octanol	1,8-Octandiol	<i>trans</i> -2-Octen-1-ol	Tunnel 2e		1-Octanol	1,8-Octandiol	<i>trans</i> -2-Octen-1-ol
M228	A	grün	grün	weiß	Q129	A	grau	grün	weiß
	W	grün	weiß	grau		W	grün	weiß	grau
L139	A	grün	weiß	weiß	I130	A	grün	weiß	grün
	W	grün	weiß	weiß		W	grün	weiß	weiß
F246	A	grün	weiß	weiß	S140	A	weiß	weiß	weiß
	W	weiß	grau	weiß		W	grün	weiß	grün
A249	W	grün	weiß	weiß	V141	A	grün	grün	weiß
M252	A	grün	weiß	weiß	E142	A	weiß	weiß	weiß
	W	grün	weiß	weiß		W	grün	weiß	grau
I298	A	grün	weiß	weiß	M143	A	weiß	grau	weiß
	W	weiß	weiß	weiß		W	weiß	weiß	weiß
T302	A	grün	weiß	weiß	A146	W	weiß	weiß	weiß
	W	grün	weiß	weiß					

Abbildung 16: Darstellung der relativen Produktbildung der Tunnelvarianten von CYP153A_{M.aq} hinsichtlich der Substrate *n*-Octan und *trans*-2-Octen. Weiß: <90 %, grau: 90 – 110 % und grün: >110 % relativ zum Wildtyp.

Die Ergebnisse zeigen, dass das C8-Alkan *n*-Octan mit den generierten Varianten umgesetzt werden kann, jedoch in den meisten Fällen war eine Gesamtproduktbildung (1-Octanol und 1,8-Octandiol) von unter 90 % relativ zum Wildtyp zu erkennen (Tabelle 19 im Anhang). Jedoch stieg für fast alle Varianten der Umsatz von *n*-Octan zum monohydroxylierten Produkt 1-Octanol an, während dieses vom Wildtyp nur in sehr geringer Konzentration gebildet wurde. Die Bildung hin zum dihydroxylierten Produkt wurde jedoch nur in wenigen Fällen, wie bei Q129A, V141A und M228A gesteigert. Die Bildung von *trans*-2-Octen-1-ol konnte mit zwei Varianten gesteigert werden (I130A und S140A). Die absoluten Werte der Biotransformationen sind dem Anhang (Tabelle 19) zu entnehmen.

3.3 Screening mit freien Reduktasen und Fusionskonstrukt

Für eine nachfolgende Sättigungsmutagenese sollte ein Screening Verfahren etabliert werden, mit dem schnell und einfach die Produktbildung einer Vielzahl von generierten Varianten erfasst werden kann. Hierfür wurde ein ABTS-Screening verwendet, das auf der Basis der Masterarbeit von Lea Rapp („Etablierung eines auf ganzen Zellen basierenden P450 Hochdurchsatz Screenings“) generiert wurde. Dieses Flüssigphasen-Screening wurde für Dodecansäure etabliert und in der Masterarbeit von Benjamin Baumert („Mutagenesestudie der P450 Monooxygenase CYP153A aus *Polaromonas* sp.“) auf Octansäure ausgeweitet und angepasst.¹⁸⁷

Zuerst wurde ein Ganzzellsystem untersucht, in dem die Hämdomäne und die Redoxpartner von zwei unterschiedlichen Plasmiden (pBAD33_CYP153A_{M.aq} und pBAD18_CamA/B) zusammen im *E. coli* Stamm BW25113ΔfadD exprimiert wurden. Dies sollte der Vergleichbarkeit dienen, da die Tunnelvarianten der CYP153A_{M.aq}-Hämdomäne mit den freien Redoxpartnern CamA und CamB getestet wurden. Jedoch war der Variations-koeffizient (CV) der Ergebnisse dieses Systems mit bis zu 40 % deutlich zu hoch für ein verlässliches Screening. Zur Vorselektion von Varianten sollte ein Screening einen CV-Wert von 10 % bis maximal 20 % aufweisen.

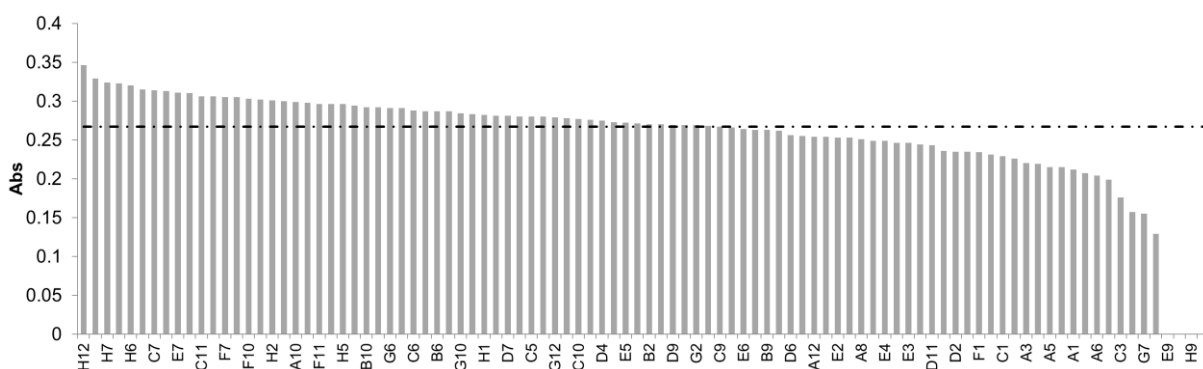


Abbildung 17: Evaluation des ABTS-Screenings mit CV = 8 % mit dem Wildtyp und Substrat Dodecansäure. Die Extinktion bei $\lambda=420$ nm der einzelnen Wells ist gegen die Position der Wells absteigend geordnet. In den letzten vier Wells befinden sich die Negativkontrollen. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert der Platte an.

Bei einem CV = 10 % kann eine Verdopplung der der Produktbildung ohne falsch Positive angenommen werden. Daher wurde die Sättigungsmutagenese in einem

artifiziellen Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR mit einem um zwei Aminosäuren verkürzten Linkerpeptid (L2) durchgeführt, das in dieser Arbeitsgruppe erzeugt wurde.¹¹³ Das ABTS-Screening, das im Zuge dieser Arbeit verwendet wurde, wurde mit dem Wildtyp Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR evaluiert (Abbildung 17). Insgesamt konnte ein CV-Wert von 8 % erreicht werden mit dem das Screening-System im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzt werden konnte.

3.4 Erweiterung des CYP153A_{M.aq} -Systems auf kürzerkettige Fettsäuren am Beispiel von Octansäure: Engineering und bioinformatische Analyse

Während P450 Enzyme aus zahlreichen Subfamilien die regioselektive Oxyfunktionalisierung von Fettsäuren zu Hydroxyfettsäuren an subterminalen Positionen katalysieren, wird die terminale (ω -) Position nur von wenigen Vertretern und dann meist von C12- und längeren gesättigten Fettsäuresubstraten hydroxyliert.¹⁸⁸ Auf Basis der vorhergehenden Analysen der strukturbildenden Aminosäuren der verschiedenen Tunnel wurde die Auswahl der in diesem Teil zu untersuchenden Aminosäuren auf drei Positionen begrenzt. Die erste Position, Q129, wurde bereits als Fettsäureanker für Dodecansäure (C12) beschrieben, wenn sie durch ein Arginin ausgetauscht ist.¹⁶⁴ Die zweite Position, M228, verleiht eine veränderte Spezifität gegenüber Fettsäurekettenlängen in Abhängigkeit von der Aminosäure-substitution. Die dritte Aminosäure, V141, liegt mit den beiden anderen in einer horizontalen Ebene über dem Häm. Gemeinsam bilden diese Positionen ein Dreieck um den Tunnel 2c und sind mitverantwortlich für die Krümmung des Tunnels 2e (Abbildung 49 im Anhang). Da die drei Reste in der Kristallstruktur um die Carboxygruppe des mitkristallisierten Modellprodukts ω -Hydroxydodecansäure angeordnet sind, legt die Hypothese nahe, dass sich diese Reste gegenseitig beeinflussen. Um kürzerkettige Substrate umzusetzen, wurden für diesen Teil der Arbeit drei verschiedene Engineeringansätze gewählt. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind Teil der Publikation *“Substrate anchoring and flexibility reduction in CYP153A_{M.aq} leads to highly improved efficiency toward octanoic acid”*.¹⁸⁹

3.4.1 Rationales Design von CYP153A_{M.aq} mittels Datenbank- und Subfamilien-Analyse

Ein erster rationaler Ansatz wurde durch eine Struktur-Sequenz-Analyse in der 3DM Datenbank ermöglicht. In der Datenbank werden Kristallstrukturen von Protein-Subfamilien strukturell verglichen und die jeweiligen Positionen im dreidimensionalen Raum einer 3DM-Nummer zugeordnet. Vergleichbare Aminosäuren können so identifiziert und innerhalb des gewählten Subset verglichen werden. Für diese Arbeit wurde ein Subsets aus insgesamt 312 P450s aus zwei Subfamilien ausgewählt, die eine Sequenzidentität von mindestens 55 % zum Wildtyp CYP153A_{M.aq} aufwiesen. Interessanterweise konnte nur für zwei der drei ausgewählten Positionen eine 3DM-Nummer zugeordnet werden. Die Position 129 wurde nicht als übereinstimmende Position gefunden und daher an dieser Stelle nicht berücksichtigt. Die Position 141 wurde im Alignment als 3DM-Nummer 53 bestimmt und Position 228 als 3DM-Nummer 139 (Abbildung 46 im Anhang). Die Aminosäureverteilung an Position 53 war zu gleichen Teilen je 36 % Valin, wie in der Wildtyp CYP153A_{M.aq}-Sequenz oder Isoleucin. In 13 % der Strukturen wurde Leucin gefunden während andere Aminosäuren deutlich unter 5 % vertreten waren. Die Verteilung an Position 139 hingegen war zu 40 % Alanin und zu 38 % Leucin. Das Methionin, wie es in CYP153A_{M.aq} zu finden ist, kommt mit 7 % an dritter Stelle. Die restlichen Aminosäuren waren meist unter 5 % vertreten und wurden daher in dieser Studie nicht miteinbezogen (Abbildung 46 im Anhang).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gideon Grogan, (Institut für Structural and Applied Enzymology, Universität York, England) wurde ein Enzym der Subfamilie CYP153 aus dem Organismus *Polaromonas* sp. mit dem Modellprodukt 1-Octanol co-kristallisiert (CYP153A_{P.sp}). Dieses weist eine Sequenzidentität von 56 % zu CYP153A_{M.aq} auf und wurde bereits im Jahr 2011 von Scheps *et al.* als Alkanhydroxylase mit einer deutlichen Substratpräferenz zu *n*-Octan identifiziert.¹⁰⁵ Vorliegende Rahmenbedingungen machten dieses Enzym zu einem Referenzmodell für ein rationales Design von CYP153A_{M.aq} hin zu einem effizienteren Katalysator für Octansäure. Daher wurden die korrespondierenden

Aminosäuren im Zielenzym CYP153A_{M.aq} wie folgt ausgetauscht: Q129N, V141L, M228A. Zuerst wurden in beiden Ansätzen Einzelmutationen erzeugt, um deren Effekt zu erfassen und anschließend wurden die Mutationen kombiniert.

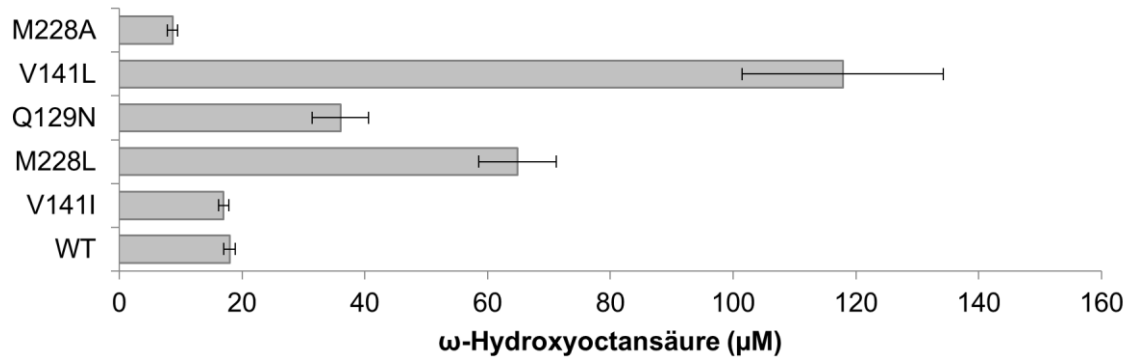


Abbildung 18: Produktbildung des Wildtyps CYP153A_{M.aq} (WT) und der erzeugten Varianten des rationalen Designs mittels Datenbank- und Subfamilien-Analyse. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Nach 1 h Biotransformation wies der Wildtyp (WT) die Bildung von $18 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ω -Hydroxyoctansäure auf (Abbildung 18). Die Varianten des ersten Ansatzes, V141I und M228L, sowie M228A gingen aus dem Struktur-Sequenz-Alignment aus der 3DM-Datenbank hervor. Sowohl V141I also auch M228A führten nicht zu einer gewünschten Umsatzsteigerung. Nur die Variante M228L brachte eine 4-fache Steigerung auf $64,9 \pm 6,3 \mu\text{M}$ ω -Hydroxyoctansäure. Die Substitutionen der entsprechenden Reste des zweiten Ansatzes, aus CYP153A_{P.sp}, waren Q129N, V141L und, analog zum Ergebnis der Datenbankanalyse M228A. Der Austausch zu Asparagin an der Position 129 führte zu einer 2-fachen Erhöhung der Produktbildung auf $36,0 \pm 4,6 \mu\text{M}$. Die Variante V141L zeigte die höchste Produktbildung der Einzelvarianten des rationalen Designs von $117,9 \pm 16,4 \mu\text{M}$ ω -Hydroxyoctansäure, eine 7-fache Steigerung im Vergleich zum Wildtyp. Der Umsatz sollte im weiteren Verlauf durch ein semi-rationales Design nochmals gesteigert werden.

3.4.2 Semi-Rationales Design durch Sättigungsmutagenese und anschließende Kombination der Einzelvarianten

Mithilfe des Flüssigphasen-Screenings, das in dieser Arbeit etabliert und in der Masterarbeit von Benjamin Baumert („Mutagenesestudie der P450 Monooxygenase CYP153A aus *Polaromonas* sp.“) auf Octansäure angepasst wurde, konnte erstmals eine Sättigungsmutagenese von CYP153A_{M.aq} erfolgen.¹⁸⁷ Für diesen Ansatz wurde das artifizielle Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR mit einem optimierten Linker L2 verwendet und mit Octansäure als Substrat gescreent. Die Hits wurden in Standardbiotransformationen bestätigt und zusätzlich mit der freien Häm-Domäne und den freien Redoxpartnern mit den Varianten des rationalen Designs verglichen und verifiziert. Nachfolgend sind die Werte der Varianten des freien Systems CYP153A_{M.aq} mit CamA und CamB gezeigt.

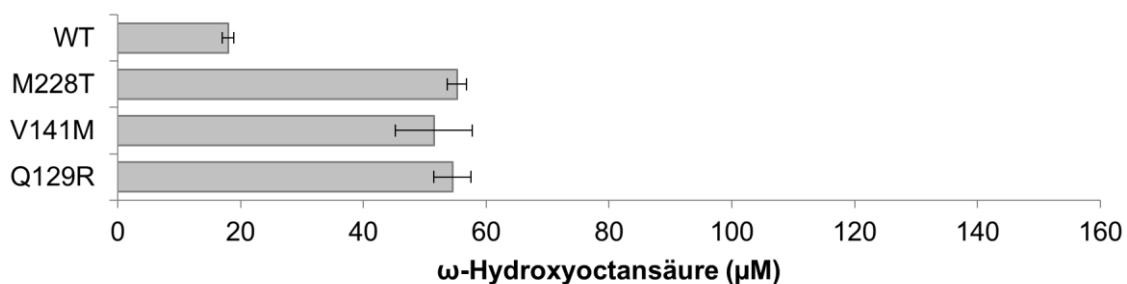


Abbildung 19: Produktbildung der erzeugten Varianten des semi-rationalen Designs mittels Sättigungsmutagenese. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Das Screening der Sättigungsmutagenese ergab drei separate Einzelvarianten (Q129R, V141M und M228T) im Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L2. Unter normierten Bedingungen, mit jeweils 1 μM Enzym und dem Redoxpartner-Überschuss wiesen die drei resultierenden Varianten jeweils eine 3-fach gesteigerte Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 19). Um die Produktbildung weiter zu steigern, wurden im Folgenden die Einzelvarianten zu Doppel- und Dreifachvarianten kombiniert.

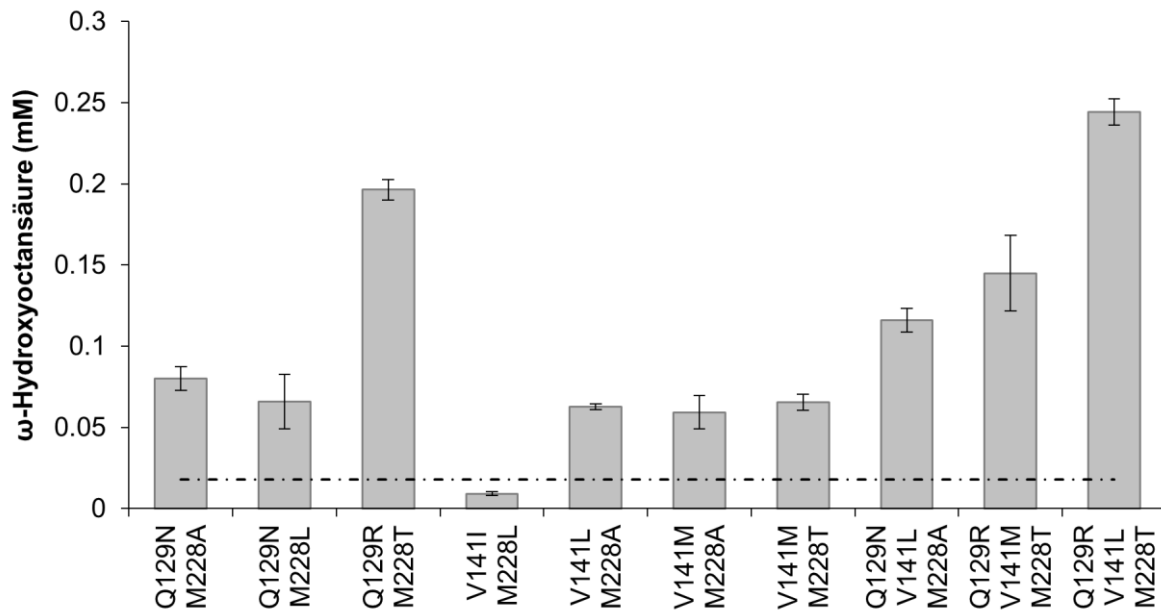


Abbildung 20: Produktbildung der erzeugten Doppel- und Dreifachvarianten des rationalen und semi-rationalen Designs. Die gestrichelte Linie gibt die Produktbildung des Wildtyps an. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Es wurden jeweils die Position 129 oder 141 mit der gegenüberliegenden Position 228 kombiniert. Sämtliche Kombinationen zwischen 129 und 141 führten entweder zu einem Verlust der Enzymaktivität gegenüber Octansäure oder resultierten in nicht korrekt gefaltetem Enzym, das durch einen hohen Peak bei 420 nm und einem Verlust des Peaks bei 450 nm im CO-Spektrum indiziert wurde.

Bis auf die Kombination V141I/M228L wiesen alle erfolgreichen Kombinationen eine mindestens 3-fach gesteigerte Produktbildung auf (Abbildung 20). Die Doppelvariante Q129R/M228T (M.aqRT) zeigte sogar einen 10-fach gesteigerten Umsatz im Vergleich zum Wildtyp (M.aqWT). Für die Dreifachvarianten wurden wiederum die besten Doppelvarianten miteinander kombiniert. Interessanterweise war die Produktbildung der Dreifachvariante Q129R/V141M/M228T im Vergleich zu der Doppelvariante Q129R/M228T (M.aqRT) herabgesetzt. Daher wurde die beste Doppelvariante M.aqRT mit der besten Einfachvariante (V141L) kombiniert, bei der die höchste Produktbildung ermittelt wurde. Somit wurde durch einfache Kombination der vielversprechendsten Varianten eines rationalen und eines semi-rationalen Designs die bisher beste Variante Q129R/V141L/M228T (M.aqRLT) zum Umsatz von Octansäure generiert.

Diese Dreivachvariante M.aqRLT wies nach 1 h Standardbiotransformation eine Produktbildung von $0,244 \pm 0,008$ mM ω -Hydroxyoctansäure auf, was einer 14-fachen Steigerung im Vergleich zum Wildtyp entspricht. Da in den bisher gezeigten Umsätzen jedoch nur ein Zeitpunkt der Biotransformationen erfasst wurde, um die Produktbildung der Varianten nach einer Stunde miteinander zu vergleichen, sollte im weiteren Verlauf die spezifische Aktivität der Varianten untersucht werden, um diese kinetisch miteinander zu vergleichen.

Gesteigerte Aktivität und Effizienz der generierten Varianten

Zur weiteren Charakterisierung des Wildtyps und der aus der besten Variante ausgehenden Einfach-(M.aqR (Q129R)), Doppel- (M.aqRT) und schließlich der Dreifachvariante (M.aqRLT) wurden die jeweiligen kinetischen Parameter mit Octansäure als Substrat bestimmt, um Veränderung der Substrataffinität und Verbesserungen der katalytischen Effizienz zu zeigen.

Tabelle 11: Kinetische Parameter des CYP153A_{M.aq} WT und den Varianten M.aqR, M.aqRT und M.aqRLT gegenüber Octansäure.

	K_m (mM) ^a	k_{cat} (min ⁻¹) ^a	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)	Steigerung der Effizienz
M.aqWT	7,5	0,14	0,018	
M.aqR	4,1	1,25	0,31	17-fach
M.aqRT	0,68	1,38	2,02	112-fach
M.aqRLT	0,3	0,81	2,72	151-fach

^adurch Michaelis-Menten Gleichung ermittelt.

Für alle Varianten war die Wechselzahl, k_{cat} , im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht, für M.aqR und M.aqRT jedoch 1,5- bzw. 1,7-fach höher als für M.aqRLT (Tabelle 11). Für den Wildtyp ist K_m als apparent angegeben, da der berechnete Wert oberhalb der Löslichkeitsgrenze von Octansäure liegt. Wie erwartet, war die Affinitätskonstante K_m absteigend begonnen vom Wildtyp (7,5 mM) auf die Einfach- (4,1 mM), die Doppel- (0,68 mM) und die Dreifach- (0,3 mM) Variante deutlich reduziert. Dabei erwies sich die katalytische Effizienz für M.aqRLT mit einer 151-fachen Verbesserung als die höchste, trotz des niedrigeren k_{cat} im Vergleich zu M.aqR und M.aqRT. Aufgrund der erheblichen Senkung des K_m für

M.aqRLT und der höchsten katalytischen Effizienz wurde diese Enzymvariante für folgende bioinformatische Analysen und Vergleiche mit M.aqWT ausgewählt.

3.4.3 Vergleich der starren Enzymstrukturen liefern erste Einblicke in unterschiedliche Substratpositionierung und Tunnelarchitektur

Um die im Labor experimentell generierten Daten zu verifizieren und zu interpretieren wurden der Wildtyp und die Variante M.aqRLT bioinformatisch modelliert und molekulardynamische Simulationen durchgeführt. Auf diese Weise sollte auch ein besseres Verständnis der Interaktion des Enzyms mit dem Liganden, der Octansäure, erlangt werden.

Modellierung von M.aqRLT zur Erleuterung der erhöhten Aktivität

Die Variante M.aqRLT wurde auf Basis der Wildtyp-Kristallstruktur (PDB ID 5FYG) konstruiert, wobei die entsprechenden Mutationen mittels Swiss-Model eingeführt wurden. Anschließend wurde die Octansäure durch molekulares Docking in die aktive Tasche des M.aqWT und der Variante M.aqRLT gedockt.

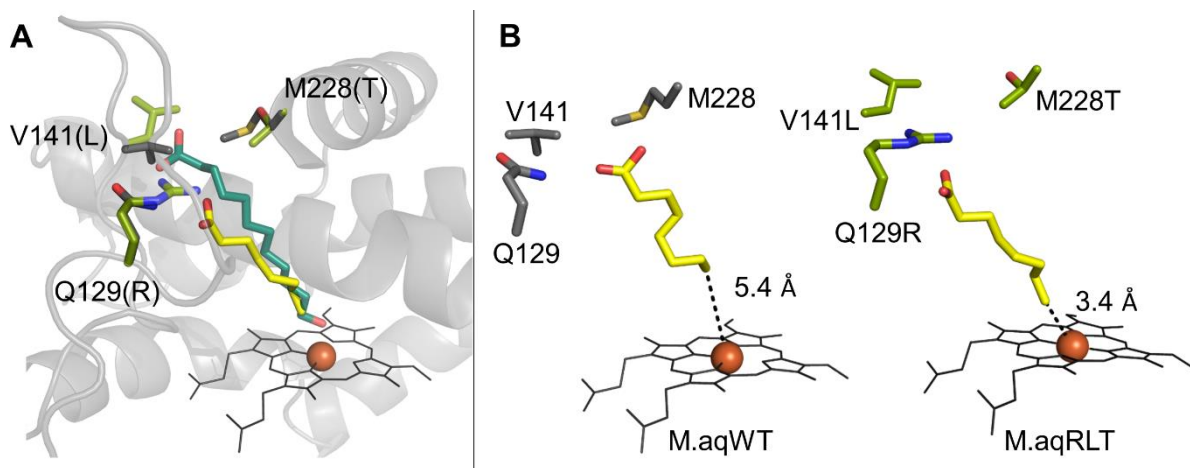


Abbildung 21: (A) Darstellung der substituierten Reste Q129R, V141L und M228T (grün) der Variante M.aqRLT mit gedockter Octansäure (gelb) und die Kristallstruktur der Wildtyp-Reste (grau) mit der co-kristallisierten ω -Hydroxydodecansäure (dunkelgrün). (B) M.aqWT und M.aqRLT mit gedockter Octansäure. Dargestellt sind die Abstände zwischen dem terminalen Kohlenstoff und dem Eisen. Das Häm ist als schwarze sticks und das Eisen als orangefarbene Kugel dargestellt.

Anhand des molekularen Dockings der Octansäure in die zwei Enzymvarianten (Abbildung 21) konnte gezeigt werden, dass die Carboxylgruppe des Substrats mit dem substituierten Arginin an Position 129 interagiert. Die Carboxylgruppe der

Dodecansäure befindet sich im Wildtyp leicht oberhalb dieser Dreiecksebene (Q129, V141 und M228) (Abbildung 21A). Im Gegensatz dazu befindet sich die Carboxylgruppe der Octansäure (C8) leicht unterhalb der substituierten Aminosäuren (Q129R, V141L und M228T). Ein zusätzliches Docking der Octansäure in die Kristallstruktur des Wildtyps zeigte wichtige Unterschiede im Vergleich zu M.aqRLT (Abbildung 21B). In beiden Enzymvarianten zeigt die Carboxylgruppe in Richtung der drei adressierten Aminosäuren, jedoch ist das terminale Kohlenstoffatom im Wildtyp 2 Å weiter vom katalytischen Eisen entfernt. Die verschiedenen Docking-Modi wiesen beim Wildtyp eine stärkere Verteilung innerhalb der aktiven Tasche auf als bei der M.aqRLT-Variante (Abbildung 47 im Anhang). Die Hinweise einer besseren Positionierung des Substrats in der aktiven Tasche wurden im weiteren Verlauf mit größerem rechnerischen Aufwand tiefergehend untersucht.

Modifikation der molekularen Tunnel

Durch die Berechnung der molekularen Tunnel lassen sich diese in Wildtyp und Variante hinsichtlich ihrer geometrischen Eigenschaften und räumlichen Anordnung vergleichen.

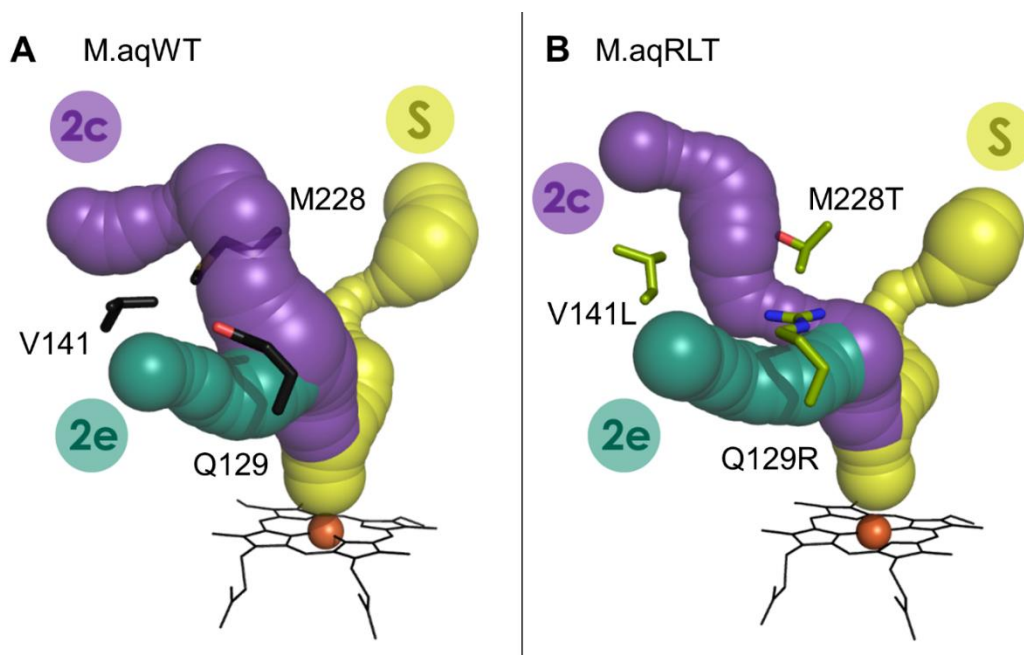


Abbildung 22: Topologie der Enzymtunnel der Kristallstruktur M.aqWT (A) und der modellierten Variante M.aqRLT. Die adressierten Aminosäuren sind als Sticks dargestellt und die Tunnel 2c (violett), S (gelb) und 2e (grün) als Kugeln mit jeweiligem Radius. Das Häm ist als schwarze Sticks

und das Eisen als eine orangefarbene Kugel dargestellt. Die Tunnel wurden mit der Software CAVER 3.0.3 berechnet.

Im Vergleich zum Wildtyp weist der Tunnel 2c in der Variante M.aqRLT eine neue Biegung näher am aktiven Zentrum auf, der hauptsächlich durch die Rotation der Seitenkette des eingeführten Threonin an Position 228 in den ursprünglichen Tunnel hinein gebildet wurde (Abbildung 22). Dadurch wird in der statischen Struktur die aktive Tasche deutlich verkleinert, was die Stabilisierung des kleineren Substrates begünstigen könnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die neue Architektur aufgrund der geänderten Aminosäuren an dieser Stelle des Tunnels 2c ein neuer Bottleneck eingeführt wurde (Abbildung 22).

Um den Einfluss der Tunnelmodifikation auf den Substratumsatz mit Octansäure zu untersuchen, wurde mithilfe der Software CaverDock der Ligand Octansäure entlang der Trajektorien der unterschiedlichen Enzymtunnel gedocked. Dafür wurde jede 0,3 Å von Außen ins Innere des Enzyms ein Docking berechnet, um den Eintritt des Substrates in die aktive Tasche nachzuahmen. Die Differenz zwischen der maximalen Energie und der Bindungsenergie am Tunneleingang wird als Energiebarriere ΔE ($E_{\max} - E_{\text{Eingang}}$) beschrieben und der Tunnel mit der niedrigsten Energiebarriere als favorisierter Eingangstunnel für einen Liganden angesehen.

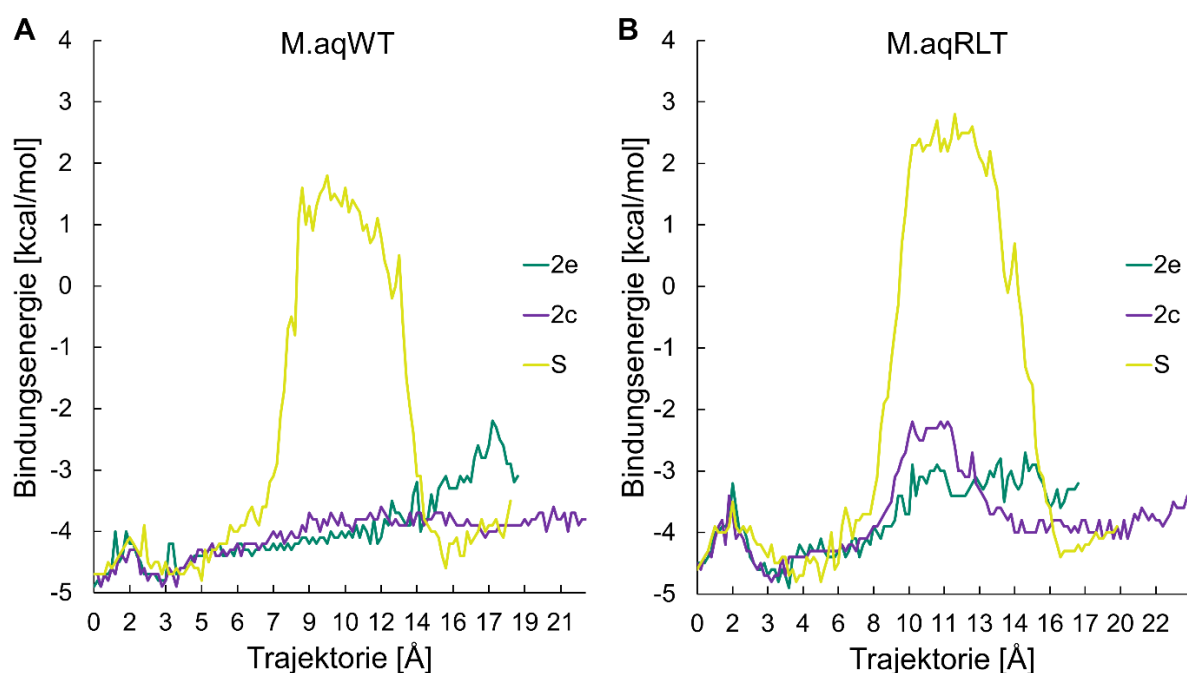


Abbildung 23: Bindungsenergien für die Migration der Octansäure zum aktiven Zentrum von M.aqWT (A) und M.aqRLT (B). Dargestellt sind die Bindungsenergien in kcal/mol für die *lower*

bound Energien durch die verschiedenen Tunnel (2e: grün, 2c: violett, S: gelb), vom aktiven Zentrum (0 Å) bis zur Oberfläche des Proteins. Das Docking wurde mit CaverDock durchgeführt und für alle 0,3 Å entlang der Tunnel berechnet.

Sowohl im Wildtyp als auch der Variante M.aqRLT wurde der putative Solvent Tunnel S beschrieben. Docking der Octansäure entlang dieses Tunnels wies in beiden Fällen eine sehr hohe Energiebarriere von 5,3 kcal/mol (WT) und 6,7 kcal/mol (RLT) auf (Abbildung 23). In den Energiebarrieren der identifizierten Substrattunnel 2c und 2e zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Enzymvarianten. Während im Wildtyp der Tunnel 2c als energetisch favorisierter Eingang für Octansäure diente ($\Delta E = 0,2$ kcal/mol), war Tunnel 2e ein möglicher Eingang, jedoch mit $\Delta E = 0,9$ kcal/mol energetisch nicht vorteilhaft. Im Gegensatz dazu wies in der Variante M.aqRLT der Tunnel 2c eine Energiebarriere von 1,2 kcal/mol auf, während Tunnel 2e mit $\Delta E = 0,4$ kcal/mol der für Octansäure energetisch favorisierte Eingang zur aktiven Tasche war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Octansäure in den beiden Varianten durch unterschiedliche Zugänge zum aktiven Zentrum gelangt.

3.4.4 Molekulardynamische Simulationen liefern detaillierte Hinweise auf die Funktion der substituierten Aminosäuren

Um die Proteinflexibilität und ihren Einfluss auf die Funktion zu beurteilen, wurden Molekulardynamik (MD)-Simulationen durchgeführt und die jeweiligen Unterschiede analysiert. Dabei wurde differenziert, ob Octansäure als Ligand in der aktiven Tasche gebunden vorlag oder nicht. Hauptsächlich unterschied sich die Flexibilität (bewertet durch die B-Faktoren) zwischen den untersuchten Enzymvarianten in zwei Bereichen. Dabei handelt es sich um zwei Loops, die teilweise die Substratbindetasche bilden, jedoch hauptsächlich als Strukturelemente für die Substrattunnel der Enzyme dienen. Diese Loops werden als BC-Loop und FG-Loop bezeichnet, die die jeweiligen Helices verbinden (siehe Abbildung 12).

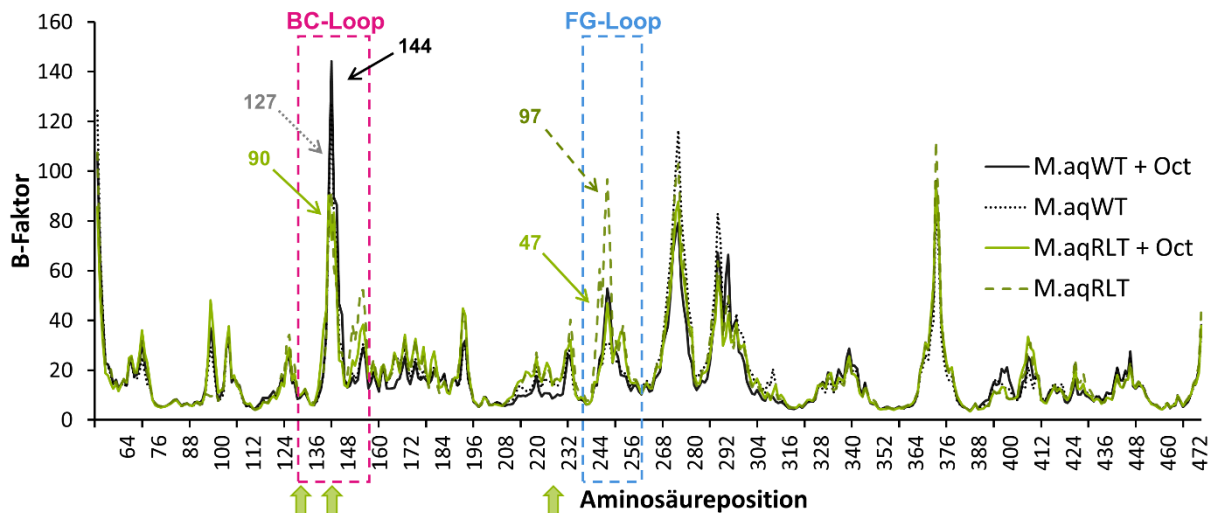


Abbildung 24: Proteindynamik des M.aqWT und der Variante M.aqRLT. Gezeigt sind die B-Faktoren der Aminosäurereste mit und ohne dem Octansäure-Liganden (Oct). M.aqWT + Oct (schwarz), M.aqRLT + Oct (grün) und jeweils M.aqWT (grau gestrichelt) und M.aqRLT ohne Ligand (grün gestrichelt). Die B-Faktoren wurden jeweils als Mittelwert aus vier einzelnen MD-Simulationen berechnet. Die Position der Mutationen ist durch die grünen Pfeile gekennzeichnet. Die Bereiche des BC-Loops (pink) und FG-Loops (blau) wurden hervorgehoben.

Die B-Faktoren der *Backbone*-Atome deuten darauf hin, dass der BC-Loop in M.aqWT mit einem B-Faktor von 127 hochflexibel ist und in der Gegenwart von Octansäure noch höher ist (B-Faktor = 144). M.aqRLT hingegen zeigte in diesem Bereich deutlich niedrigere B-Faktoren (um mehr als 30 %). Interessanterweise wurden mehr als 2-fach höhere B-Faktoren im FG-Loop der Variante M.aqRLT ermittelt, verglichen zum Wildtyp. Dieser Unterschied wurde im freien Enzym, aber nicht in Gegenwart des Liganden beobachtet (Abbildung 24 und Tabelle 21).

An dieser Position des FG-Loops könnte in der Variante M.aqRLT ein weiterer, als 2ac bezeichneter Tunnel (Abbildung 48 und Tabelle 21 im Anhang) entstehen. Dieser sekundäre Tunnel ist in der Kristallstruktur der Alkanhydroxylase CYP153A_{P.sp} vorhanden (Abbildung 48 im Anhang), die kürzere Kettenlängen als CYP153A_{M.aq} favorisiert. Während der Tunnel 2c in M.aqRLT mit Octansäure in den Simulationen öfter vorhanden war (18 % im geöffneten Zustand) im Vergleich zu M.aqWT mit Octansäure (4,4 % geöffnet), wies der Wildtyp 1,6-fach höhere B-Faktoren am BC-Loop auf (Tabelle 21). Allerdings führte die erhöhte Flexibilität des FG-Loops im freien M.aqRLT zu höheren Öffnungsraten des 2c-Tunnels im Vergleich zum Wildtyp (19 % vs. 1,1 %).

Stabilisierung der Octansäure in der aktiven Tasche

In den MD Simulationen der mit Substrat gebundenen Enzyme befand sich die Octansäure zunächst in der aktiven Tasche, wo die Tunnel 2c und 2e zusammenführen. Um die genaue Distanz der Octansäure während der MD Simulationen zu verfolgen, wurde der Abstand zwischen dem terminalen Kohlenstoff, der während der Katalyse hydroxyliert wird, und dem katalytisch aktiven Eisen ermittelt.

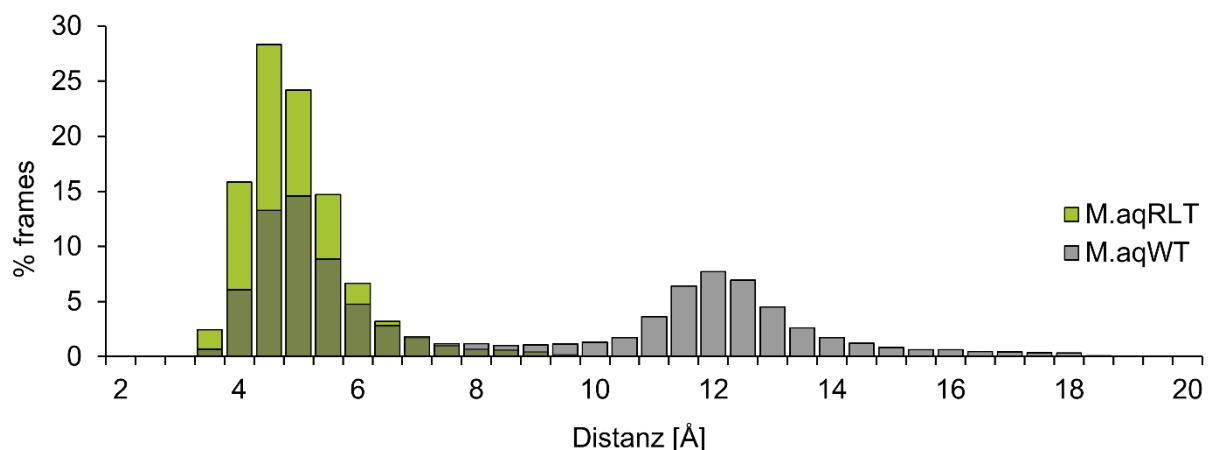


Abbildung 25: Histogramm der Octansäureposition, das die Verteilung der Distanz zwischen dem terminalen Kohlenstoff des Liganden und dem katalytisch aktiven Eisen zeigt. Erfasst sind alle 80 000 *frames* der MD Simulationen mit M.aqWT (grau) und M.aqRLT (grün).

Für die Variante M.aqRLT wurde ein einzelnes Maximum für Abstände um 4 - 5 Å zum Eisen ermittelt (Abbildung 25). In diesem Maximum sind 70 % der MD-*frames* enthalten. Im Wildtyp hingegen wurden zwei Maxima ermittelt. Das erste Maximum entspricht einem ähnlichen Abstand wie in der Variante M.aqRLT, aber nur für 35 % aller *frames* sind hierbei abgedeckt. Das zusätzliche Maximum wurde in 30 % der Fälle beobachtet, wobei der Kohlenstoff 11-13 Å vom Eisen entfernt liegt. Daher befand sich der Ligand im Großteil der Simulationen des Wildtyps in einer weit entfernten, nicht-reaktiven Position.

Um Interaktionen einzelner Aminosäuren mit dem Liganden zu erfassen, wurde die freie Bindungsenergie ΔG_{bind} der Octansäure mit dem Wildtyp und M.aqRLT über die vier replizierten MD-Simulationen berechnet und gemittelt.

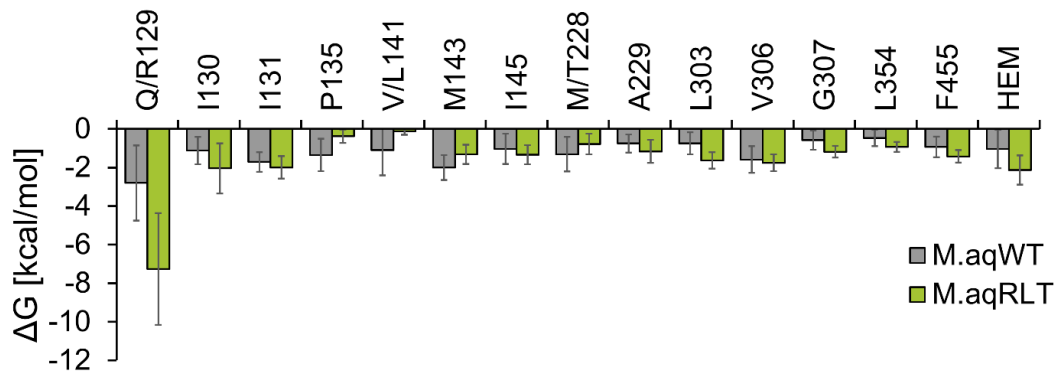


Abbildung 26: Wechselwirkungsenergie ΔG_{bind} der Octansäure mit M.aqWT und M.aqRLT, gemittelt über alle MDs. Mit Ausnahme von L141 sind nur Reste mit $\Delta G \geq 0,5$ kcal/mol dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen von den Mittelwerten dar.

Zwischen dem Wildtyp und M.aqRLT wurden zwei interessante Hauptunterschiede beobachtet, die die effizientere Katalyse durch die Variante erklären könnten. In M.aqRLT war ΔG_{bind} des Substrats und des Häm-Eisens (HEM) doppelt so hoch wie im Wildtyp (ΔG_{bind} von -2,12 bzw. -1,04 kcal/mol), was auf eine stärkere Wechselwirkung mit dem katalytischen Zentrum hinweist. Der auffälligste Unterschied in den Ligandeninteraktionen war jedoch an Position 129, die in M.aqRLT variiert wurde. Während ΔG_{bind} für Q129 im M.aqWT -2,8 kcal/mol betrug, verringerte die Mutation zu einem Arginin in der Variante M.aqRLT (Q129R) ΔG_{bind} auf -7,3 kcal/mol. Interessanterweise zeigt die Mutation M228T einen geringen Unterschied zum Wildtyp, und sogar erhöhten ΔG_{bind} für V141L von -0,11 kcal/mol.

3.4.5 Schrittweise Änderung der Substratspezifität

Um den möglichen Unterschied in der Fettsäuresubstratspezifität zwischen M.aqWT und M.aqRLT weiter zu demonstrieren, wurde die ω -Hydroxylierung von gesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C6 (Hexansäure) und C16 (Hexadecansäure) ermittelt.

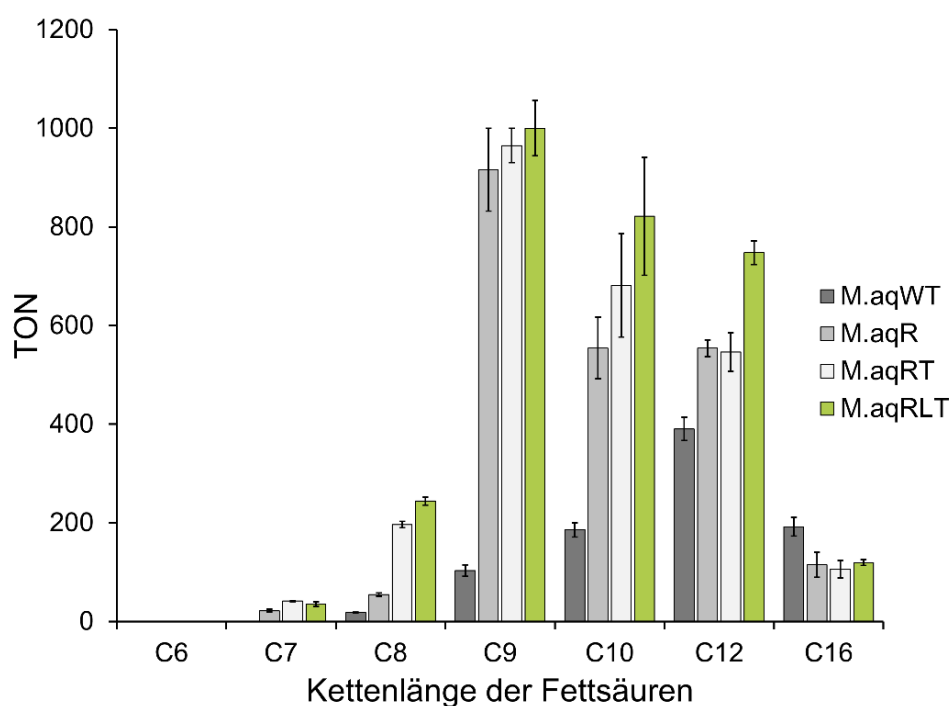


Abbildung 27: Fettsäurespezifität des Wildtyps M.aqWT (dunkelgrau) und den Varianten M.aqR (hellgrau), M.aqRT (weiß) und M.aqRLT (grün). Substrate wurden mit Kettenlängen zwischen C6 bis C16 gewählt. Für jedes Substrat ist die *Turnover*-Nummer TON ($n_{\text{Produkt}}/n_{\text{P450}}$ nach 1 h Biotransformation) angegeben. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Mit den Varianten wurden allgemein verbesserte Biokatalysatoren für die terminale Hydroxylierung von mittel- bis längerkettigen Fettsäuren generiert. Erwähnenswert ist, dass die stärkste Zunahme der Produktbildung für die Octansäure (C8) mit einer 14-fachen Erhöhung im Vergleich zum Wildtyp detektiert wurde. Die höchste Produktbildung wurde mit dem Substrat Nonansäure (C9) gezeigt. Eine leichte Abnahme der Produktbildung unter Verwendung von Decansäure (C10) und Dodecansäure (C12) als Substrate wurde beobachtet. Die 10-fach erhöhte Produktbildung von M.aqRLT mit dem C9 Substrat gegenüber dem WT verringerte sich mit der Länge der Substrate auf 4-fach (C10) und 2-fach (C12) und betrug für die langkettige Fettsäure C16 nur noch 62 %

relativ zum WT (Abbildung 27). Mit der Variante M.aqRLT und dem entsprechenden C7-Substrat konnte nach 1 h Reaktionszeit 35 μM ω -Hydroxyheptansäure gebildet werden, während der Wildtyp unter diesen Bedingungen keine Produktbildung aufwies. Für die kürzeste in dieser Studie verwendete Fettsäure (C6), konnte mit keiner der Varianten eine Produktbildung nachgewiesen werden.

3.4.6 Anwendung der Variante M.aqRLT für die *de novo* Produktion von ω -Hydroxyoctansäure

Da mit der Variante M.aqRLT ein effizienter Katalysator für den Umsatz mit Octansäure generiert wurde, wurde diese nachfolgend für ein Anwendungsbeispiel der *de novo* Produktion von ω -Hydroxyoctansäure im Ganzzellkatalysator verwendet. Da das Fusionskonstrukt M.aq-PFOR in ganzen Zellen im Gegensatz zum Einsatz der freien Proteine (P450, CamA und CamB) reproduzierbare Ergebnisse lieferte (siehe 3.3) wurde erstgenanntes für diesen Versuch eingesetzt. Für die Anwendung sollten zuerst die Fusionskonstrukte des Wildtyps und der VarianteRLT *in vitro* unter Normbedingungen untersucht und die Kopplungseffizienz bestimmt werden.

Tabelle 12: Produktbildung und Kopplungseffizienz der Fusionskonstrukte CYP153A_{M.aq}-PFOR Wildtyp (M.aqWT-PFOR) und der Variante CYP153A_{M.aq}RLT –PFOR (M.aqRLT-PFOR) gegenüber Octansäure.^a

	ω -Hydroxyoctansäure	Kopplungseffizienz
M.aqWT-PFOR	14,7 $\mu\text{M} \pm 1,5 \mu\text{M}$	11 %
M.aqRLT-PFOR	119,1 $\mu\text{M} \pm 6,6 \mu\text{M}$	20 %

^a1 μM P450-PFOR, 1 mM Substrat, 2 % DMSO, 1 mM NADPH und Cofaktor Regenerierung, 100 mM Kalium-Phosphat Puffer pH 7,4, 550 rpm, 1 h, 30 °C. Die Fehler repräsentieren Standardabweichungen aus Triplikaten.

Die Fusionskonstrukte M.aqWT-PFOR und M.aqRLT-PFOR wiesen eine ähnliche Tendenz auf wie die M.aq-Hämndomäne mit freien Redoxpartnern. Die Variante RLT als Fusionsprotein zeigte *in vitro* eine 8-fache Steigerung gegenüber dem Wildtyp (Tabelle 12), während es im freien System eine 14-fache Steigerung war. Die Kopplungseffizienz, also das Verhältnis des NADPH Verbrauchs zur Produktbildung, war in M.aqRLT-PFOR 1,8-fach erhöht (Tabelle 12).

3 Ergebnisse

Die deutliche Steigerung der Produktbildung, sowie die Erhöhung der Kopplungseffizienz, sollten in einem Anwendungsbeispiel dazu beitragen *de novo* ω -Hydroxyoctansäure herzustellen. In der Dissertation von Dr. Marko Kirtz (Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart) wurde eine pflanzliche Thioesterase FatB2 aus *Cuphea hookeriana* verwendet, um in einem β -Oxidation defizienten *E. coli*-Stamm (BW25113 Δ fadD) die *in vivo* Octansäureproduktion enorm zu steigern. Im Gegensatz zu Zellen, in denen das *fatB2*-Gen nicht exprimiert wurde (5,1 μ M) konnte im Schüttelkolben mithilfe der Thioesterase FatB2 die 13-fache Bildung an Octansäure erzielt werden (63 μ M).¹¹² Dies wurde ausgenutzt, um die in dieser Arbeit generierte Variante M.aqRLT-PFOR für die Produktion von ω -Hydroxyoctansäure in diesem System zu testen.

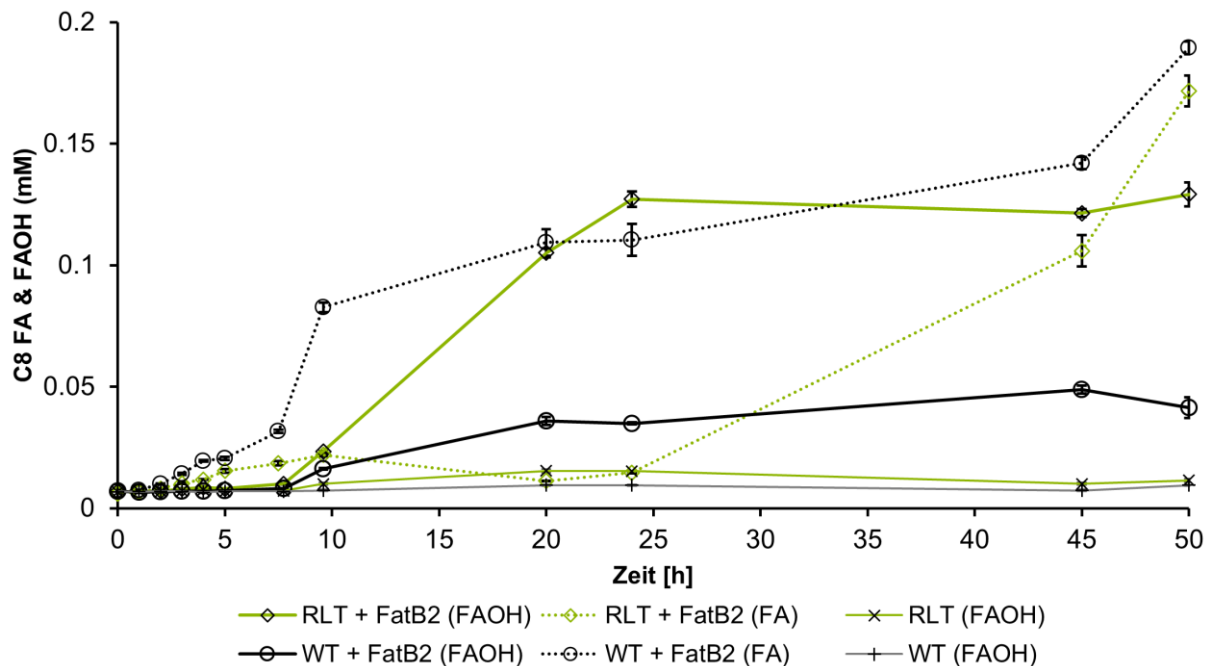


Abbildung 28: Octansäurebildung durch die Thioesterase FatB2 und die sukzessive Hydroxylierung zu ω -Hydroxyoctansäure durch M.aq-PFOR Wildtyp (schwarz) und Variante RLT (grün) im zeitlichen Verlauf. ω -Hydroxyoctansäurebildung durch M.aq-PFOR mit FatB2 (FAOH, durchgezogene Linien, Raute und Kreis), Octansäurebildung (FA, gestrichelte Linien, Raute und Kreis), Kontrollen ohne FatB2 (FAOH, durchgezogene Linien, Kreuz und Plus). Die Datenpunkte stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Durch diesen Versuch konnten zwei wesentliche Aspekte festgestellt werden. Im Ansatz mit der Variante M.aqRLT-PFOR wurde nach 50 h dreifach so viel ω -Hydroxyoctansäure ($129 \pm 5 \mu\text{M}$) gebildet als mit dem Wildtyp ($41 \pm 4 \mu\text{M}$) (Abbildung 28). Die Octansäureproduktion steigt jedoch im Ansatz mit M.aqWT

nach ca. 8 h deutlich an und steigt weiter bis zum Versuchsende nach 50 h auf $190 \pm 3 \mu\text{M}$. Im Ansatz mit der Variante M.aqRLT wurde zunächst weniger Octansäure gebildet. Die Konzentration nimmt nach 10 h wieder ab und steigt erst nach 24 h wieder an, bis nach 50 h ein ähnliches Level wie beim Wildtyp erreicht ist ($172 \pm 6 \mu\text{M}$). Die Kontrollen, in denen FatB2 fehlte, lagen während der 50 h Versuchszeit sowohl für die Octansäure- als auch ω -Hydroxyoctansäure-Bildung konstant auf einem basalen Niveau.

3.5 Gezielte Mutagenese von CYP153A_{M.aq} zur terminalen Hydroxylierung des Inhibitors Dodecylamin

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind Teil der Publikation „*Engineering CYP153A_{M.aq} to Oxyfunctionalize ist Inhibitor Dodecylamine Using a LC/MS Based Rapid Flow Analysis Screening*“.

Das in CYP153A_{M.aq} co-kristallisierte Modellprodukt, ω -Hydroxydodecansäure, unterscheidet sich von dem terminal hydroxyliertem Dodecylamin nur in der funktionellen Gruppe. Dodecylamin wirkt jedoch als Inhibitor für das in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Enzym. Durch geeignetes *Engineering* der Häm-Domäne sollte ein Biokatalysator gefunden werden, der nicht nur nicht mehr dadurch inhibiert wird, sondern in der Lage ist Dodecylamin terminal zu hydroxylieren. Dadurch kann das Substratspektrum der P450s massiv um bisher inhibierend wirkende Verbindungen erweitert werden. Für diesen Teil der Studie wurde zu Beginn eine Bibliothek von 44 CYP153A_{M.aq} Einzel- und Doppelvarianten mit Alanin- und Tryptophan-Substitutionen entlang der Substrattunnel untersucht (siehe 3.2.2). Diese Varianten wurden auf eine initiale terminale Hydroxylierung von Dodecylamin mittels GC/FID gescreent und schließlich eine Doppelvariante V141A/M228A (M.aqAA) identifiziert, die erstmals Spuren des Produktes 12-Amino-1-dodecanol bildete. Die beiden Aminosäuren V141 und M228 zeigten auch schon in der Studie (siehe 3.4) in Kombination mit Q129 einen bedeutenden Einfluss auf die Substratspezifität und wurden daher im weiteren Verlauf dieser Studie für eine iterative Sättigungsmutagenese ausgewählt. Um tiefere Einblicke in

die Aktivität und Inhibierung der initiale Variante im Vergleich zum Wildtyp zu erlangen, wurden diese mithilfe kinetischer Experimente untersucht.

3.5.1 Charakterisierung der initialen Dodecylamin-hydroxylierenden Variante M.aqAA

Um einen Einblick in die katalytischen Eigenschaften der Variante M.aqAA zu erhalten, wurden kinetische Parameter ermittelt und mit dem Wildtyp verglichen. Zuerst wurden die spezifischen Aktivitäten beider Enzymvarianten hinsichtlich des Modellsubstrates Dodecansäure bestimmt (Tabelle 13 und Abbildung 29) und anschließend die Inhibitorkonzentration ermittelt, bei der die Enzyme noch 50 % Aktivität aufweisen (IC_{50}).

Tabelle 13: Kinetische Parameter des CYP153A_{M.aq} Wildtyps (WT) und der Variante M.aqAA (AA) gegenüber dem Modellsubstrat Dodecansäure. Die Daten wurden mit und ohne Dodecylamin als Inhibitor bei der jeweiligen IC_{50} erhoben.

	K_m (mM) ^a	v_{max} (mU) ^a	k_{cat} (min ⁻¹) ^a	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)	IC_{50} (1 μ M P450)
WT	0,12	0,08	4,63	38,0	0,9 μ M
AA	0,12	0,05	2,72	22,8	2,5 μ M
WT (IC_{50})	0,66	0,04	0,42	0,64	
AA (IC_{50})	0,39	0,06	0,63	1,62	

^adurch Michaelis-Menten Gleichung ermittelt.

Die Substrataffinität K_m von Dodecansäure war interessanterweise für beide Enzyme identisch (0,12 mM). Jedoch war bei der Variante M.aqAA eine deutliche Substratinhibierung zu verfolgen (Abbildung 29A). Die katalytische Effizienz war daher für den Wildtyp um das 1,7-fache höher. Um den IC_{50} zu bestimmen wurde die Substratkonzentration (Dodecansäure) konstant auf der Konzentration des ermittelten K_m gehalten, während die Dodecylaminkonzentration zwischen 0,08 μ M und 1 mM variiert wurde. Während die Affinität der Enzyme zu Dodecansäure gleich war, unterschied sich der IC_{50} jedoch deutlich voneinander. Der Wildtyp zeigte schon bei einer Dodecylaminkonzentration von 0,9 μ M einen 50 %-igen Verlust der Aktivität wobei die Variante M.aqAA erst bei 2,5 μ M Dodecylamin eine Restaktivität von 50 % aufwies.

Die Auswirkung der Inhibierung wurde weiter untersucht, indem weitere kinetische Daten gesammelt wurden. Die InhibitorKonzentration wurde konstant am jeweiligen IC_{50} gehalten, während die Dodecansäurekonzentration variiert wurde.

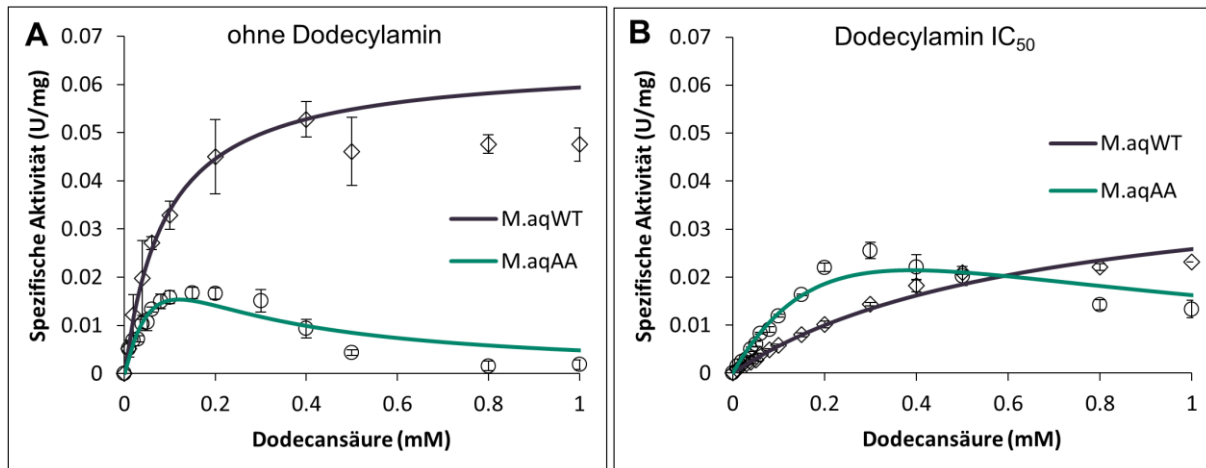


Abbildung 29: Michaelis-Menten-Fit der Daten aus kinetischen Messungen von M.aqWT und der Variante M.aqAA mit Dodecansäure als Substrat. Die Daten wurden ohne (A) und mit Dodecylamin als Inhibitor (B) bei der jeweiligen IC_{50} erhoben. Das Excel-Solver-Plugin wurde verwendet, um die Daten ohne (M.aqWT) und mit Substratüberschussinhibierung (M.aqAA) anzupassen. Die Datenpunkte stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Durch die Anwesenheit des Inhibitors wurde die katalytische Effizienz des Wildtyps um das 59-fache verringert, während die der Variante lediglich um das 14-fache verringert wurde (Tabelle 13). Der rechnerische, scheinbare K_m des Wildtyps war durch den Einfluss des Inhibitors deutlich (0,66 mM) und der der Variante etwas weniger erhöht (0,39 mM). Obwohl die eingesetzte Inhibitor-Konzentration für M.aqAA 2,5-fach höher war, war die Variante interessanterweise deutlich weniger inhibiert als der Wildtyp. Dies sollte im weiteren Verlauf der Arbeit bioinformatisch untersucht werden.

3.5.2 Molekulardynamische Simulationen liefern Hinweise auf den Einfluss der Flexibilität auf die Inhibition

In Docking-Ergebnissen von Dodecylamin, sowie der daraus korrespondierenden Nitroso-Verbindung in der aktiven Tasche der Enzymvarianten konnten keine relevanten Unterschiede ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt).

3 Ergebnisse

Die Proteinflexibilität wurde, wie in Kapitel 3.4.4 für die Octansäure beschrieben, auch in diesem Teil der Arbeit über MD-Simulationen des Wildtyps und der M.aqAA-Variante analysiert. Es wurden jeweils die B-Faktoren aus vier Systemen untersucht: Der Wildtyp und die Variante jeweils ohne Ligand und mit gebundenem Dodecylamin. Letzteres wurde in zwei Konformationen untersucht: Die "aktive" Konformation mit dem terminalen Kohlenstoff Richtung Eisen positioniert (C - Fe) und in der "inhibierenden" Konformation, in der die Aminogruppe zum katalytischen Eisen zeigt (N - Fe).

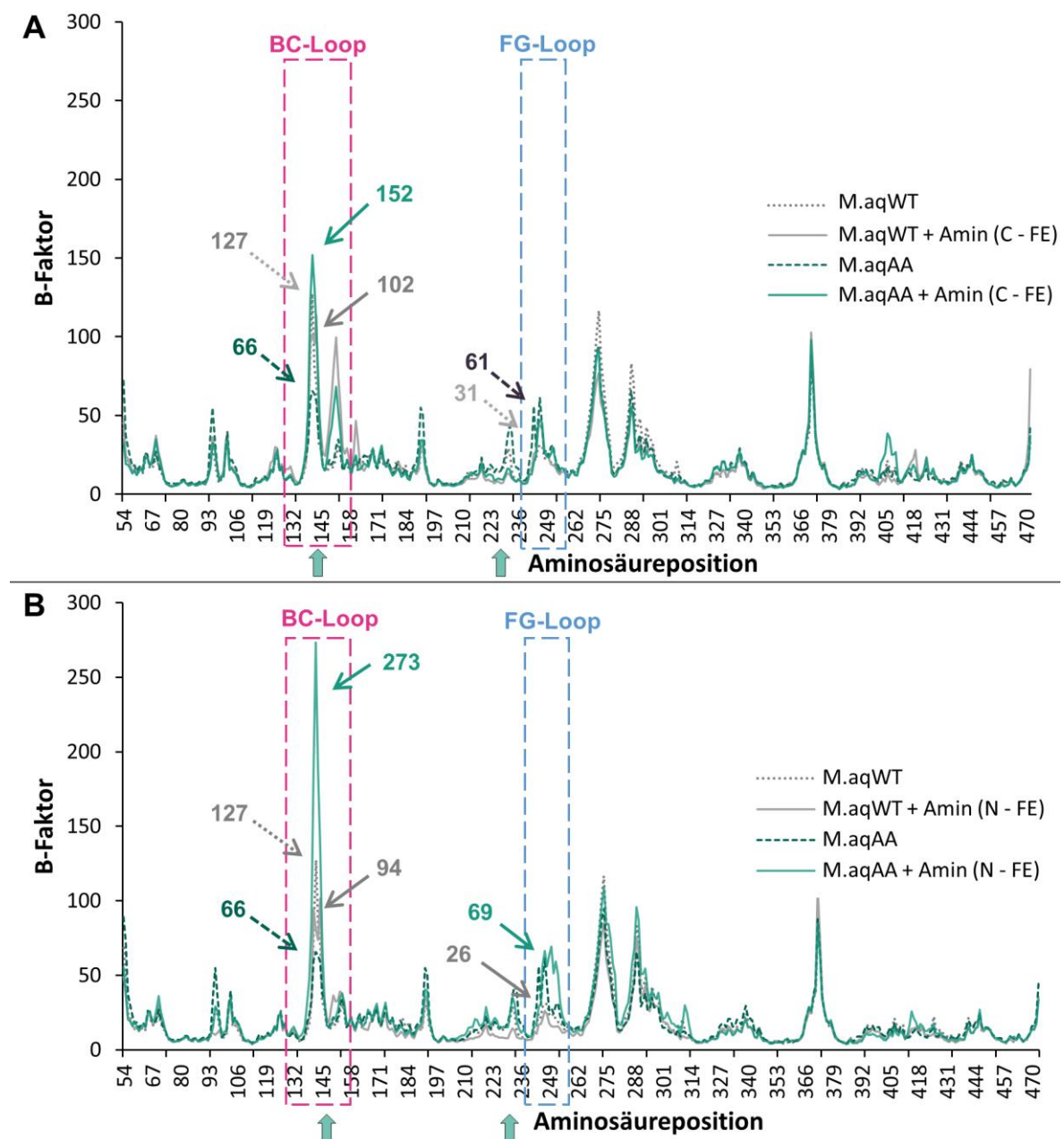


Abbildung 30: Proteindynamik des Wildtyps M.aqWT und der Variante M.aqAA. Gezeigt sind die B-Faktoren der Aminosäurereste mit und ohne den Dodecylamin-Liganden (Amin). M.aqWT ohne

(grau gestrichelt) und mit (graue Linie) gebundenem Dodecylamin, die Variante M.aqAA ohne (grün gestrichelt) und mit (grüne Linie) gebundenem Dodecylamin. (A) Das Dodecylamin zeigt mit dem terminalen Kohlenstoff zum Eisen (C-Fe: aktive Konformation). (B) Das Dodecylamin zeigt mit der Aminogruppe in Richtung des Eisens (N-Fe: inhibierende Konformation). Die B-Faktoren wurden jeweils als Mittelwert aus vier einzelnen MD-Simulationen berechnet. Die Position der Mutationen ist durch die lila Pfeile gekennzeichnet. Die Bereiche des BC-Loops (pink) und FG-Loops (blau) wurden hervorgehoben.

Ein deutlicher Unterschied der ermittelten B-Faktoren des *Backbones* ist an den Aminosäurepositionen in der Region des BC-Loops auszumachen (Abbildung 30). Interessanterweise war dies abhängig von den unterschiedlichen Orientierungen des Liganden Dodecylamin im aktiven Zentrum.

Bemerkenswert war, dass der B-Faktor-Peak des BC-Loops von M.aqAA stark erhöht war, wenn Dodecylamin gebunden vorlag. Der B-Faktor in der inhibierenden Konformation (N – Fe) war mit einem Wert von 273 außergewöhnlich hoch (allerdings mit einer hohen Standardabweichung unter den verschiedenen MDs), im Vergleich zu einem Wert von 66 für die ungebundene Variante. Dies steht auch im Kontrast zum Wildtyp, bei dem für die gleiche Ligandenkonformation der B-Faktor-Peak des BC-Loops 94 beträgt. Ohne den gebundenen Liganden liegt ein B-Faktor von 66 vor, für das Dodecylamin in inhibierender Konformation ist der B-Faktor jedoch um mehr als das 4-fache erhöht. Der FG-Loop war in der Variante M.aqAA (N – Fe) mit einem B-Faktor-Wert von 69 deutlich flexibler als der FG-Loop in M.aqWT (N – Fe) in dieser Region einen niedrigeren B-Faktor von 26 aufwies (Abbildung 30B).

In einer Tunnelanalyse der MD Simulationen konnte gezeigt werden, dass der 2c Tunnel der Variante deutlich breiter und kürzer als der des Wildtyps ist (Abbildung 49 und Tabelle 22 im Anhang). Für den Wildtyp ist der Tunnel 2c in 72 % der Simulationen mit dem Dodecylamin in "N – Fe"-Konformation vorhanden und in 7,9 % geöffnet, während dieser Tunnel in 90 % der Simulationen von M.aqAA gefunden wurde und in 33,2 % der *Frames* geöffnet vorlag.

3.5.3 Etablierung und Anwendung eines LC/MS basierten Hochdurchsatz-Screenings ohne chromatographische Separation der Analyten

Die MS-basierte Rapid-flow Analyse von Produkt-Peaks (RAPP) wurde etabliert, um einen schnellen und zuverlässigen qualitativen Nachweis der Hydroxylierung von Dodecylamin zu erhalten. Da nur die Gesamtmolekülmassen verfolgt wurden, diente diese Analyse als extrem schnelles und präzises (keine falsch-Positiven) Vorscreening ohne genaue Quantifizierung der Analyten oder Unterscheidung der Position der Hydroxylierung. Anschließend wurden Bio-transformationen mit normierter P450-Konzentration durchgeführt, um die Varianten zu vergleichen und das ω -hydroxylierte Produkt zu quantifizieren.

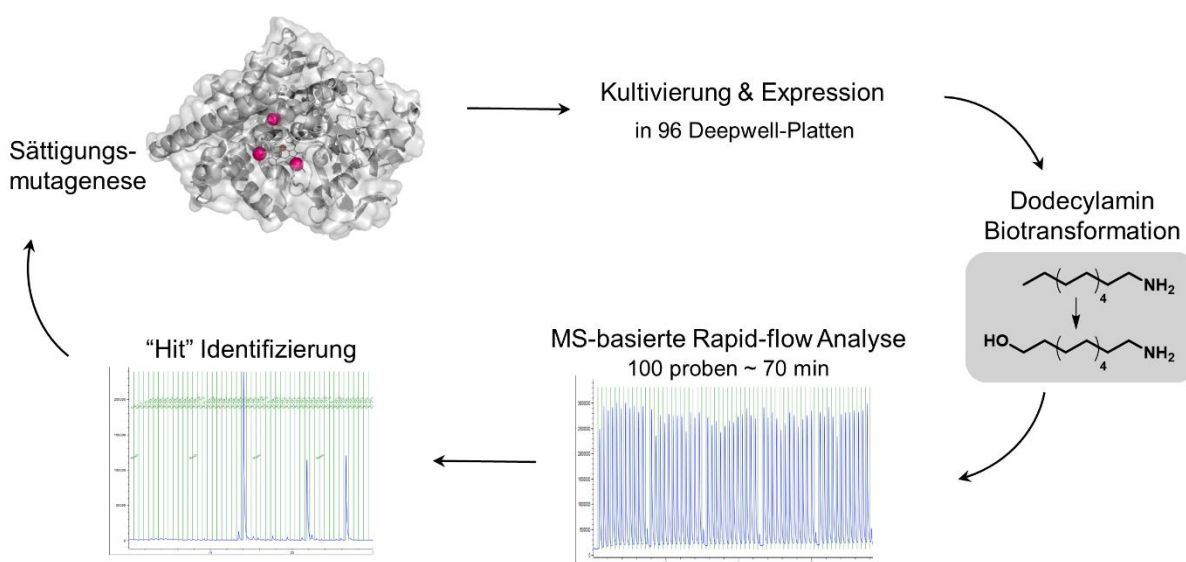


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Rapid-flow Analyse von Produkt-Peaks (RAPP).

Die generierten Enzym-Bibliotheken umfassen Sättigungen der drei Positionen 129, 141 und 228 und wurden anschließend durch iterative Sättigung aufeinander aufgebaut. Um die Bibliotheken zu screenen, wurden Zellen, die das mutierte Plasmid enthielten, kultiviert, in 96-Deepwell-Platten (DWPs) exprimiert und anschließend Biotransformationen mit 1 mM Dodecylamin mit ruhenden Zellen durchgeführt (Abbildung 31). Der anschließende Extraktions- und Phasentrennungsschritt ermöglichte die direkte Injektion der organischen Phase in das LC/MS-System unter Verwendung von RAPP, um Verbesserungen der Produktbildung zu erkennen. Hits wurden unmittelbar durch Analyse des resultierenden Einzelchromatogramms identifiziert (Abbildung 61ff im Anhang).

Die ermittelten Hits wurden hinsichtlich der terminalen Hydroxylierung für jede Runde verifiziert und quantifiziert (Abbildung 64 im Anhang). Die Variante mit der höchsten Produktbildung diente als neuer Parent für die nächste Runde der Sättigungsmutagenese.

Die Einzelvariante Q129E zeigte einen eindeutigen Peak im Massenspektrum, aber die Umsetzung war zu gering, um sie zu quantifizieren (Abbildung 64 im Anhang). Dennoch diente diese Variante als Parent für die nächste Runde, da aus der Sättigung der anderen Positionen (V141 und M228) keine Treffer vorhanden waren.

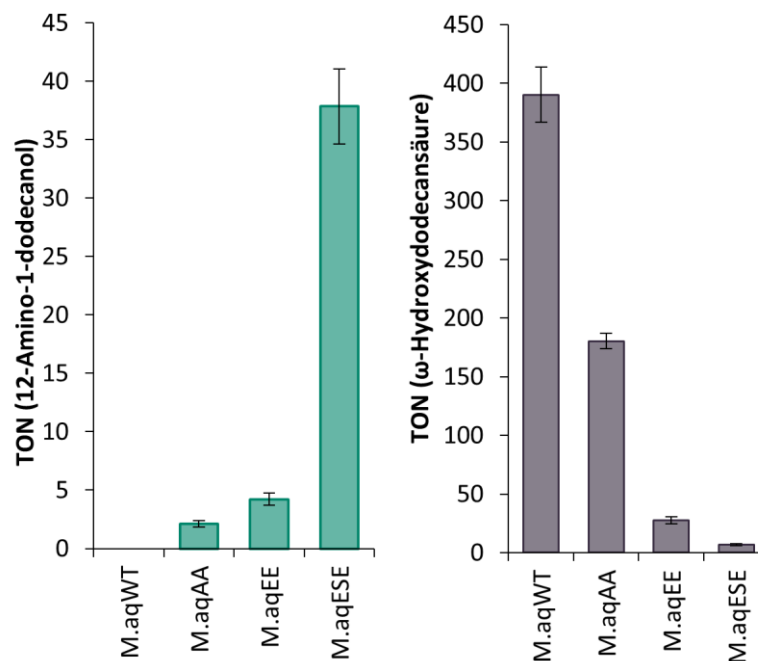


Abbildung 32: Produktbildung der Biotransformationen mit Dodecylamin und Dodecansäure mit dem M.aqWT und den generierten Varianten M.aqAA, M.aqEE und M.aqESE. Dargestellt ist die TON ($n_{\text{Produkt}}/n_{\text{P450}}$) nach 1 h für Dodecansäure (grau) bzw. 4 h für Dodecylamin (grün) der Umsetzung für die jeweiligen Substrate. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Mit dem Wildtyp konnte unter keinen der getesteten Versuchsbedingungen eine Produktbildung nachgewiesen werden. Die initiale Variante M.aqAA (V141A/M228A) hingegen zeigte erstmals Spuren von 12-Amino-1-dodecanol und es konnte 1 Turnover je 2 h nachgewiesen werden. Varianten, die auf M.aqAA als Parent basierten, zeigten keine Produktsteigerung, weshalb die Positionen ausgehend von M.aqWT gesättigt wurden. Nach der zweiten Sättigungsrunde mit

der Variante Q129E (M.aqE) als Parent wurde die Doppelvariante Q129E/M228E (M.aqEE), mit der höchsten Produktbildung identifiziert. M.aqEE zeigte in der Verifizierung 1 Turnover pro Stunde, also eine Verdopplung im Vergleich zur Ausgangsvariante M.aqAA. In dieser Studie führte der dritte Aminosäureaustausch, V141S, zur Dreifach-Variante Q129E/V141S/M228E (M.aqESE), mit der 10 Turnover pro Stunde detektiert wurden, was eine 18-fache Steigerung im Vergleich zu M.aqAA bedeutet (Abbildung 32). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der neuen Variante M.aqESE, die entsprechende Fettsäure umzusetzen, um das 58-fache abnimmt, von 390 auf 6,7 Umsätze pro Stunde, während die Umsetzung des Amins von 0 auf 38 Umsätze in 4 h steigt (Abbildung 32).

3.5.4 Molekulares Docking liefert Hinweise auf die Unterschiede der Umsetzungen mit Dodecylamin und Dodecansäure

Nachfolgend wurden die beschriebenen experimentellen Ergebnisse in molekularen Dockings untersucht, die die Hypothesen nochmals unterstützten. Es wurden zwei Systeme getrennt voneinander betrachtet. Die Dodecylamin hydroxylierende Variante M.aqESE wurde zunächst *in silico* modelliert und im ersten System das neue Substrat, Dodecylamin, in die aktive Tasche gedockt. Das zweite System sollte Unterschiede der Positionierung der Dodecansäure im Wildtyp und der Variante M.aqESE zeigen, da die beiden Enzymvarianten dieses Molekül unterschiedlich favorisiert als Substrat akzeptierten.

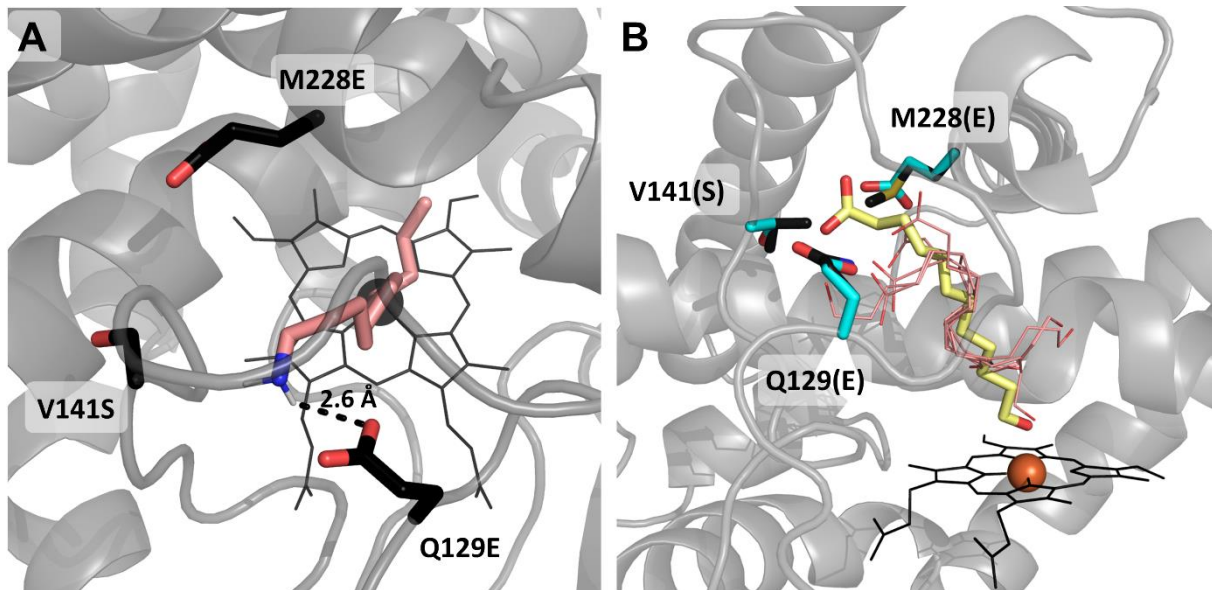


Abbildung 33: Dockings von Dodecylamin und Dodecansäure in den Wildtyp und M.aqESE. (A) M.aqESE mit gedocktem Dodecylamin (lachsfarben). (B) Seitenketten des M.aqWT (schwarz) mit co-kristallisierter ω -Hydroxydodecansäure (gelb) und der Variante M.aqESE (cyan) mit gedockter ω -Hydroxydodecansäure (rosa). Das Häm ist als schwarze sticks und das Eisen als orangefarbene Kugel dargestellt.

Die Docking-Konformation des Dodecylamins in M.aqESE zeigt die aktive Positionierung mit der Aminogruppe zwischen den drei substituierten Aminosäuren. Dabei ist der Abstand der Aminogruppe zur eingeführten Glutaminsäure Q129E am geringsten (Abbildung 33A). Die mögliche N-H - O-Wasserstoffbrückenbindung ist mit einem Abstand von 2,6 Å und einer Bindungsenergie von -4,9 kcal/mol angegeben. In der Kristallstruktur M.aqWT mit co-kristallisierter ω -Hydroxydodecansäure liegt diese in katalytisch aktiver Konformation mit der Säuregruppe zwischen den drei adressierten Aminosäuren (Abbildung 33B). Im Falle der Docking-Berechnungen der Dodecansäure in das Homologiemodell M.aqESE war die Carboxygruppe in allen Modi deutlich unter den substituierten Aminosäuren, näher am Häm, positioniert und daher in der aktiven Tasche gekrümmt während der terminale Kohlenstoff zeigte nicht mehr zum Eisen (Abbildung 33B). Die fünf energetisch favorisierten Docking-Modi für M.aqESE sind dargestellt, um die Abstoßung der Säuregruppe durch die eingeführten Glutamat-Seitenketten zu demonstrieren.

3.5.5 Koordination der Aminogruppe in der aktiven Tasche erklärt aktive bzw. inaktive Konformation des Dodecylamins

Um die Koordination der Aminogruppe des Substrats gegenüber dem katalytisch aktiven Eisen experimentell zu beurteilen, wurden die Spin-Zustände ermittelt. Die High-Spin-Zustände unterscheiden sich je nachdem, ob ein Substrat (Typ I) oder ein starker Ligand wie ein Inhibitor gebunden ist (Typ II). Im Falle des Typ I wird eine Verschiebung der Soret-Bande von 420 nm nach 390 nm beobachtet. Bei einer Typ II-Bindung hingegen verschiebt sich das Maximum auf 422 – 435 nm, wenn eine Stickstoffverbindung an das Eisen koordiniert.

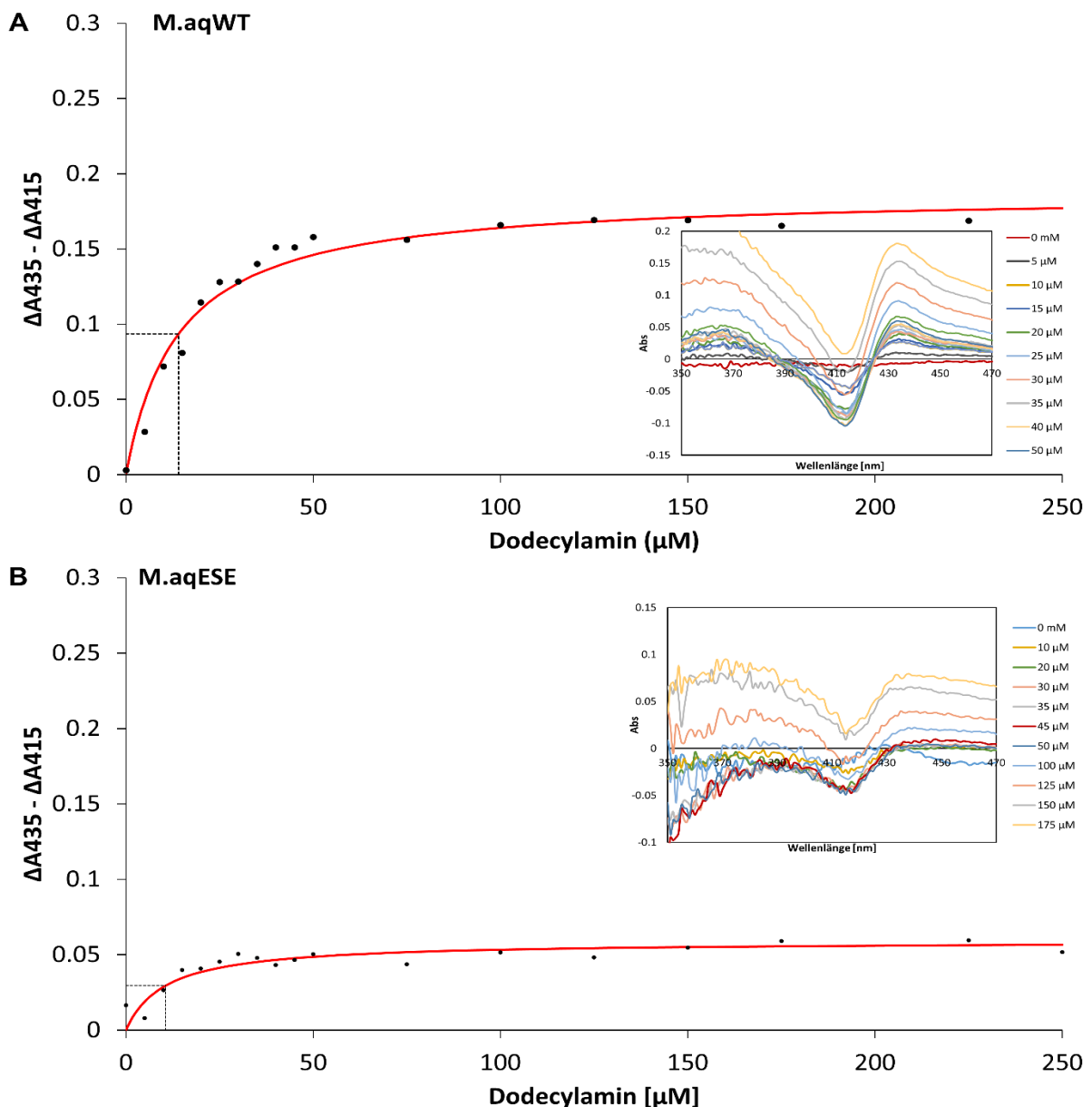


Abbildung 34: Spindifferenzspektren von M.aqWT (A) und M.aqRLT (B) unter Verwendung von Dodecylamin als Ligand. Die Spinverschiebung ΔA wurde durch Subtraktion der Referenzprobe (P450 ohne Dodecylamin) berechnet.

Obwohl die Bindungsaffinitäten ähnlich zu sein scheinen, wurde ein erheblicher Unterschied in den Absorptionsspektren der Varianten beobachtet (Abbildung 34, Abbildung 65 und Abbildung 66 im Anhang). M.aqEE und M.aqESE zeigten stark reduzierte Absorptionsmaxima im Vergleich zum Wildtyp und M.aqAA, die beide von Dodecylamin inhibiert werden.

Tabelle 14: Absorptionsmaxima und Dissoziationskonstanten des Wildtyps und der Varianten M.aqAA, M.aqEE und M.aqESE.

	M.aqWT	M.aqAA	M.aqEE	M.aqESE
A_{\max}	0,19	0,23	0,06	0,06
K_d^a	14,1	12,32	13,8	10,6

^aZur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d wurde ΔA gegen die Substratkonzentration aufgetragen und mit dem Excel Solver Plugin mit einer hyperbolischen Kurve gefittet.

Für den Wildtyp und die Doppelvarianten konnte eine vergleichbare spektrale Dissoziationskonstante (K_d) nachgewiesen werden (Tabelle 14), was auf ähnliche Affinitäten zum Liganden schließen lässt. M.aqWT weist ein deutlich höheres Absorptionsmaximum auf, was für dessen Inhibierung durch Dodecylamin spricht. Das niedrige Absorptionsmaximum von M.aqESE stimmt hingegen damit überein, dass die Variante das Dodecylamin als neues Substrat akzeptiert und nicht mehr gehemmt wird.

3.5.6 Molekulardynamische Simulationen liefern erste Hinweise auf den Einfluss der Flexibilität auf die Umsetzung des Dodecylamins

Mit Hilfe von MD Simulationen wurde gezeigt, dass die Flexibilität der Varianten im Vergleich zum Wildtyp nicht wesentlich verändert war (Abbildung 50). Im Gegensatz dazu war der Substrattunnel 2c bei den modellierten und simulierten Varianten M.aqAA und M.aqESE deutlich verbreitert und häufiger geöffnet als bei M.aqWT.

3 Ergebnisse

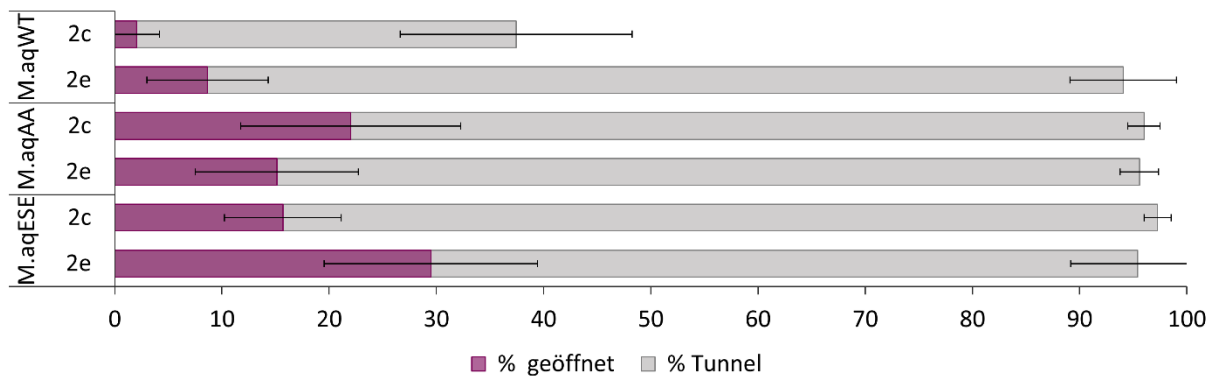


Abbildung 35: Öffnungsrate (% geöffnet) und Verfügbarkeit (% Tunnel) der Substrattunnel 2c und 2e in M.aqWT und den Varianten M.aqAA und M.aqESE. Die Balken stellen die jeweiligen Mittelwerte dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Die Tunnelverfügbarkeit wurde als die Rate der Snapshots über die gesamten MDs definiert, in denen die jeweiligen Tunnel (für einen Radius von mindestens $0,9 \text{ \AA}$) erkannt wurden. Die Tunnelöffnung wurde als die Rate der Snapshots definiert, die die jeweiligen Tunnel mit minimalen Radien von $1,4 \text{ \AA}$ zeigen. Es konnte deutlich dargestellt werden, dass der Tunnel 2c in den beiden Varianten in $\geq 95 \%$ der Simulationen vorhanden war, während dieser im Wildtyp nur in 37% der gesamten Simulation verfügbar war (Abbildung 35). Die Tunnel 2e waren in allen untersuchten Varianten vergleichbar häufig vorhanden, jedoch in den Varianten M.aqAA und M.aqESE deutlich häufiger geöffnet (1,7-fach bzw. 3,4-fach).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten tiefere Einblicke auf den Einfluss von flexiblen Tunnelstrukturen in P450 Monooxygenasen, am Beispiel von CYP153A_{M.aq} aus *Marinobacter aquaeolei*, gewonnen werden. Interessant war dabei die terminale Hydroxylierung aliphatischer Kohlenstoffverbindungen, die chemisch gesehen die herausforderndste Position für selektive Oxyfunktionalisierungen darstellt. Eine zentrale Rolle für die ω -Selektivität der Enzyme spielt hierbei die Position der aktiven Tasche über dem katalytisch aktiven Häm-Eisen und der Zugang über sogenannte Enzymtunnel, die im weiteren Verlauf diskutiert werden sollen.

Evaluation geeigneter Lagerbedingungen der Enzymvarianten

Zu Beginn wurde die Lagerstabilität untersucht, um die für diese Arbeit geeignete Lagerbedingung der Enzymvarianten in Lysat oder Zellpellets zu evaluieren. Interessanterweise zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis der Produktivität der Varianten A231G und Q129R wenn diese im Zellpellet bei -20 °C gelagert wurden im Vergleich zu der Lagerung als klare Lysate (Abbildung 11A). Durch das langsame Einfrieren der Zellen können sich intrazellulär hohe Konzentrationen an löslichen Verbindungen, wie z. B Salze, anreichern, da die Zellen aufgrund osmotischem Stress dehydrieren.¹⁹⁰ Ein hoher Salzgehalt und Änderungen im pH können schließlich die Enzymstabilität und -aktivität beeinträchtigen. Auch im Lysat frieren die Enzyme unter Ausbildung von Konzentrationsgradienten ein, da zunächst das reine Wasser gefriert und in der restlichen Flüssigkeit Enzyme und Salz aufkonzentriert wird. Da die Enzyme in gefrorenen Lysaten ohne Zusätze auch über mehrere Tage keinen nennenswerten Produktivitätsverlust aufwiesen, wurde die Lagerung in Lysat bei -20 °C als Standard-Lagerbedingung für diese Arbeit gewählt. Weshalb die Zusätze Glycerin und MPG, die für andere Enzyme die Lagerstabilität positiv beeinflussten, in dieser Arbeit negativen Einfluss ausübten, ist unklar.^{191,192}

4.1 Untersuchungen des CYP153A_{M.aq}-Systems im Hinblick auf die im Enzymkristall vorhandenen Tunnelstrukturen

Das traditionelle „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ der Enzymkatalyse, das 1894 erstmals beschrieben wurde, entspricht in vielen Fällen einer veralteten Darstellung.³⁵ Mittlerweile werden Enzyme nicht mehr als starre Konstrukte angesehen und das traditionelle Modell um den Zusatz „induced-fit“, bzw. „selected-fit“ erweitert.^{36,193} Da die Mehrzahl der Enzymstrukturen ihr aktives Zentrum nicht nahe der Oberfläche präsentieren, sondern tiefer im Enzyminneren verborgen, wurde für diese Enzyme ein neues Modell beschrieben, das „Schlüssel-Schlüsseloch-Schloss“ Modell.^{37,42} Dem klassischen Prinzip kommt also noch das Schlüsseloch hinzu, das den Zugang zum „Schloss“, also der aktiven Tasche, beschreibt. Dieses Schlüsseloch demonstriert Tunnel und Kanäle, die durch die Enzymstruktur verlaufen.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Enzymtunnel in der CYP153A_{M.aq} Kristallstruktur bereits bekannt und wurden im Laufe der hier vorliegenden Arbeit tiefergehend untersucht. Die zwei Substrattunnel 2c und 2e, die zwischen BC-Loop und FG-Loop/G-Helix (2c) bzw. durch den BC-Loop (2e) austreten, sind als sekundäre Enzymtunnel beschrieben.⁹⁷ In der Kristallstruktur bilden diese bis zum Abknicken des 2e Tunnels einen Teil der aktiven Tasche, die orthogonal auf das Häm gerichtet ist (vgl. Abbildung 12). Diese strukturelle Eigenschaft wird als Hauptgrund für die ω -Selektivität von CYP153A_{M.aq} angesehen. Die bisher am intensivsten untersuchte Fettsäurehydroxylase, CYP102A1 (BM3) aus *Bacillus megaterium*, weist hingegen eine starke Präferenz zu den subterminalen Positionen hin.¹⁹⁴ Untersuchungen der Wildtyp Kristallstrukturen ergab, dass die aktive Tasche von BM3 im Vergleich zu CYP153A_{M.aq} waagrecht über dem Häm liegt und durch einen Substrattunnel 2b erreicht wird.^{97,194} In einer Engineering-Studie von Brühlmann *et al.* wurde die Selektivität von BM3 hinsichtlich der terminalen Position verändert.¹⁹⁵ Eine Variante mit elf Mutationen führte jedoch lediglich zu einer ω -Selektivität von 74 %. Ein weiteres Beispiel liefert Hammerer *et al.*, in dem Varianten von CYP152A1 erstellt wurden, um die Selektivität von Fettsäuren

hinsichtlich der α - und β -Position zu kontrollieren.¹⁹⁶ In diesem Enzym ist das Substrat Hexadecansäure im Zugangstunnel 2a kristallisiert (PDB ID 1IZO), der ähnlich zu dem Tunnel 2b von der Seite des Enzyms eintritt und waagrecht über dem Häm endet. Enzyme der Unterfamilie CYP153A besitzen Enzymtunnel, die senkrecht auf dem Häm enden und weisen daher eine sehr starke ω -Selektivität auf.^{110,197} Für CYP153A_{M.aq} wurde die Selektivität für die terminale Position von mittel- bis langkettigen Fettsäuren mit >95 % beschrieben.¹¹⁰ Bisher wurden hauptsächlich lineare gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren, sowie gesättigte Alkane als Substrate getestet.^{110,184}

Untersuchungen von strukturbildenden Aminosäureresten der Enzymtunnel hinsichtlich verschiedener Substrate

Um den Einfluss der strukturbildenden Aminosäuren der Enzymtunnel hinsichtlich dem Umsatz unterschiedlicher Substrate genauer zu untersuchen, wurden an den Tunnel-bildenden Aminosäureresten gezielt Substitutionen vorgenommen. Für jeden Enzymtunnel, 2c, 2e und S, wurden diejenigen Reste gewählt, die nur an der Bildung eines Tunnels beteiligt sind und mehr als 3 Å von den anderen Tunneln entfernt liegen (vgl. Abbildung 13). Somit wurde sichergestellt, dass Positionen in der aktiven Tasche nicht mit in die Mutagenesestudie aufgenommen wurden. Außerdem waren vier der adressierten Aminosäurereste (V141, M143, M228, T302) gleichermaßen an der Bildung der Tunnel 2c und 2e beteiligt.

Standardmäßig werden Alanin-Scans für die Identifizierung von katalytisch aktiven Positionen und Protein-Protein Interaktionen eingesetzt. Hierbei wird die Seitenkette der Aminosäure verkleinert, wie auch die Eigenschaften der funktionellen Gruppen der Seitenketten entfernt. Gleichzeitig entsteht (außer durch den Austausch eines Glycins zu Alanin) mehr Platz an dieser Position, was in dieser Arbeit ausgenutzt wurde, um die Tunnelradien zu vergrößern. Zusätzlich wurden alle adressierten Aminosäuren auch zu Tryptophan, einer sperrigen, unpolaren Aminosäure ausgetauscht. In anderen Arbeiten wurden Tryptophan-Austausche verwendet, um die Eigenschaften eines Protonenkanals aufzuklären,

Positionen der Substratspezifität einer P450 Monooxygenase zu identifizieren und einen Enzymtunnel in einer Dehalogenase zu schließen.^{59,198,199} Außerdem sind Tryptophanreste als *gatekeeping* Positionen bekannt, die zum Beispiel als sogenanntes Flügeltor wirken können und somit Tunnel durch die Rotation der Seitenkette öffnen bzw. verschließen können. Ein Beispiel dafür zeigt eine α -Amylase aus *Thermococcus kodakaraensis* mit vier Tryptophanresten, die als *Gatekeeper* fungieren.²⁰⁰ Durch den Austausch strukturbildender Aminosäuren der erwähnten Tunnel sollte untersucht werden, welche Aminosäuren einen Einfluss auf die Substratpräferenz zeigen. Werden die Ergebnisse der Mutagenese am Tunnel 2c betrachtet, fällt besonders auf, dass die Position M228 einen großen Einfluss auf das langkettige Substrat Hexadecansäure hat und den geringsten Einfluss auf die mittelkettige Fettsäure Dodecansäure. Da diese Position hauptsächlich die Biegung und *Bottleneck* des 2c Tunnels bildet (vgl. Abbildung 22), könnte das Entfernen der Seitenkette die Positionierung der Hexadecansäure begünstigen, während das Vergrößern der Seitenkette die langkettige Fettsäure nicht mehr für die Katalyse förderlich positioniert. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass die kürzerkettigen Fettsäuren durch die Substitutionen nicht so drastisch beeinflusst werden. Zusätzlich fällt auf, dass alle anderen Aminosäuresubstitutionen innerhalb dieses Tunnels zu einer erheblichen Verringerung der Produktivität führen, es jedoch keinen deutlichen Unterschied zwischen Alanin- und Tryptophan-Austausch gibt, außer bei F246. Diese Position befindet sich an der Oberfläche am Tunneleingang weit entfernt vom aktiven Zentrum. Der Austausch eines Phenylalanins zu einem Tryptophan bewirkt lediglich eine geringe Größenänderung. Sowohl die Polarität als auch die aromatischen Eigenschaften werden beibehalten und beide Seitenketten könnten den Tunnel als *Gatekeeper* gegen unerwünschten Zugang abschirmen.²⁰¹ Die Substitution zu einem Alanin hingegen führt zum Verlust mehrerer Eigenschaften: (i) der *Gatekeeper*-Funktion, (ii) der enormen Größe und (iii) der Aromatizität. Die generierten Effekte an dieser Position waren daher nicht überraschend. Die Analyse des Tunnels 2e zeigte hingegen andere Ergebnisse. Die Variation der Seitenketten von Q129, S140 und V141, die den Tunnel von oben begrenzen,

wiesen einen interessanten gemeinsamen Effekt auf. Durch das Verkleinern der genannten Seitenketten erhöht sich in allen Fällen die Produktivität des Enzyms hinsichtlich der kürzerkettigen (Octansäure) und der mittelkettigen Fettsäure (Dodecansäure). Die langkettige Fettsäure (Hexadecansäure) wurde von Q129A und S140A nicht beeinflusst. Durch den Austausch zu Tryptophan sank die Produktbildung aller Substrate drastisch. Hierbei kann nur spekuliert werden, ob die Substitutionen zu Alanin eine Änderung der Flexibilität bewirken oder eine Veränderung der Tunneltopologie und damit einhergehend eine förderliche Positionierung und Katalyse ermöglichen. Der Solvent-Tunnel S wurde analysiert, da dieser als putativ beschrieben ist und daher zu Beginn der Arbeit historisch bedingt als Solvent-Tunnel angesehen wurde. Die Aminosäuresubstitutionen und die daraus resultierenden Umsatzeinbußen legten jedoch nahe, dass das Enzym keine strukturellen Veränderungen dieses Tunnels toleriert. Der Tunnel wird durch einige hydrophobe Valin-Seitenketten gesäumt, die vermutlich den Eintritt von Wasser erschweren, jedoch ist ein Großteil des Tunnels sehr eng und begünstigt somit nicht den Zugang von größeren Molekülen, wie Substraten. Der Tunnel S wurde daher nicht für weitere Mutagenesestudien in Betracht gezogen, aber in den bioinformatischen Analysen mitberücksichtigt.

Die generierten Einzelvarianten der Tunnel 2c und 2e wurden des Weiteren hinsichtlich weiterer aliphatischer Substrate, *n*-Octan und *trans*-2-Octen untersucht. Wie die Octansäure, die für die ausführlichen Analysen und ein Engineering in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzen die beiden Moleküle eine Kettenlänge von acht Kohlenstoffen. Interessanterweise konnte für fast alle Einzelvarianten der Tunnel 2c und 2e eine erhöhte Produktbildung von 1-Octanol gezeigt werden, während in fast allen Varianten die Bildung des korrespondierenden Diols (1,8-Octandiol) abnahm. Die Bildung des Diols resultiert aus einer Weiterverwendung des 1-Octanol-Produkts als Substrat für die Katalyse und nicht aus einer dihydroxylierenden Aktivität des Enzyms. Vermutlich wurde mit den dargestellten Varianten die Spezifität für *n*-Octan erhöht. Möglicherweise kann auch das 1-Octanol nicht genügend stabilisiert werden. Dies wurde auch mit zwei weiteren Vertretern der CYP153A Subfamilie CYP153A16

und CYP153A_{P.sp} für Alkane unterschiedlicher Kettenlängen gezeigt.¹⁰⁵ Das in dieser Arbeit verwendete Alken zeigte lediglich für die Positionen Q129, I130, S140 und M228 eine positive Änderung der Produktivität anstatt drastische Einbußen. Eine mögliche Epoxidierung konnte hierbei nicht beobachtet werden, da die Bildung vermutlich unter der Detektionsgrenze liegt.

Screening mit freien Reduktasen versus Fusionskonstrukt

Eine Sättigungsmutagenese an ausgewählten Positionen des Enzyms sollte erfolgen, wenn ein geeignetes Screening für die Bildung von ω -Hydroxyoctansäure etabliert war. In einer Masterarbeit wurde im Vorfeld ein Ganzzell-Screening mit einem artifiziellen Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR mit verändertem Fusionslinker für Dodecansäure als Substrat entwickelt.²⁰² Mit Parametern aus erwähnter Arbeit wurde zunächst versucht, wie in Standardbiotransformationen mit Lysat die Biosynthese der CYP153A_{M.aq} Häm-Domäne in ganzen Zellen mit den freien Redoxpartnern CamA und CamB zu gewährleisten (Abbildung 36). Im Expressionssystem pBAD18/33 war dies möglich und führte auch im ABTS-Ganzzellscreening zum gewünschten Farbumschlag und folglich der Detektion des Produkts. Jedoch war der Variationskoeffizient (CV) innerhalb dieses Systems mit bis zu 40 % für ein verlässliches Screening zur Vorselektion von Hits deutlich zu hoch. Durch Änderung der Schüttelgeschwindigkeit während der Genexpression und Biotransformation konnte der CV zwar gesenkt werden, jedoch nicht konstant zwischen 10 – 20 %. Es wird davon ausgegangen, dass das Verhältnis von Häm-Domäne zu den nicht-natürlichen Redoxpartnern essentiell für reproduzierbare Ergebnisse ist. In einer Studie von Scheps *et al.* wurden unterschiedliche Verhältnisse der Redoxpartner untersucht.¹⁰⁵ Es wurde gezeigt, dass das optimale Verhältnis zwischen P450:CamA:CamB bei 1:5:10 liegt, was durch gereinigtes Enzym, jedoch nicht in ganzen Zellen realisiert werden kann. Da die Gene *camA* und *camB* hintereinander, jeweils mit dem gleichen Promotor im pBAD18 Vektor integriert vorliegen, kann davon ausgegangen werden, dass diese in größeren Mengen vorliegen als CYP153A_{M.aq}. Dem liegt zugrunde, dass das Plasmid pBAD18 in höherer Kopienzahl in der Zelle vorliegt als pBAD33. Ersteres besitzt den

Replikationsursprung „*origin of replication*“ (ori) des pBR322, durch den das Plasmid mit ca. 20 Kopien pro Zelle vorliegt, während pBAD33 den pACYC184 ori trägt, durch den das Plasmid mit ca. 15 Kopien pro Zelle vorliegt.^{203–205} Da der Unterschied in der Kopienzahl keineswegs das optimale Verhältnis zwischen P450 und Redoxpartner widerspiegelt, könnte dies ein Grund für die inkonsistenten Produktbildungen innerhalb der verschiedenen Wells sein.

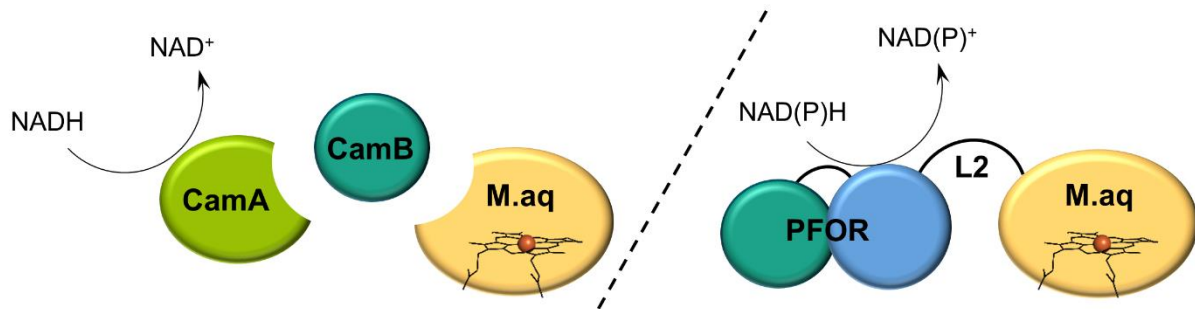


Abbildung 36: CYP153A_{M.aq} Häm-Domäne mit den freien Redoxpartnern CamA und CamB und artifizielles Fusionskonstrukt mit Linker L2 CYP153A_{M.aq}-PFOR L2.

Um die Reproduktionsprobleme zu umgehen wurde auf das bereits erwähnte artifizielle Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR L2 zurückgegriffen. Hierbei liegt pro Häm-Domäne eine einzelne Reduktase-Domäne (PFOR) vor, die über einen konstruierten Peptidlinker L2 verbunden ist (Abbildung 36).¹¹³ Dieses Konstrukt wurde gewählt, da es im Vergleich zu den anderen getesteten Linkervarianten das beste Verhältnis zwischen Expression, aktivem Fusionskonstrukt und Kopplungseffizienz aufweist. Obwohl andere Varianten *in vitro* eine vorteilhaftere Fusion und höhere Kopplungsraten versprochen, war das Konstrukt mit Linker L2 *in vivo* aus zuvor genannten Gründen das vielversprechendste. Dies spiegelt auch die Evaluation des Screenings wider, in dem mit dem Wildtypenzym ein CV von 8 % bestimmt wurde. Bei einem CV von ≤ 10 % kann eine Verdopplung der Aktivität (bzw. Produktbildung) ohne falsch Positive angenommen werden.²³ Daher wurde vorliegender Enzymassay für das quantitative Screening der Sättigungs-Varianten verwendet, die Hits nachfolgend mittels Standardbiotransformationen *in vitro* evaluiert und die Produktbildung quantifiziert.

4.2 Erweiterung des CYP153A_{M.aq}-Systems auf kürzerkettige Fettsäuren am Beispiel von Octansäure: Engineering und bioinformatische Analyse

Es sind zahlreiche Vertreter in der P450 Superfamilie, aber auch andere Enzyme wie Hydratasen, Hydroxylasen und Lipoxygenasen bekannt, die Fettsäuren regio- aber auch stereoselektiv monohydroxylieren.¹⁸⁸ P450s sind jedoch mitunter die bekanntesten der Fettsäurehydroxylasen, deren Vertreter selektiv z. B. subterminale Kohlenstoffe hydroxylieren, einschließlich der Vertreter der CYP102A Familie.²⁰⁶ Auch die selektive Hydroxylierung der α - und β -Positionen, durch Vertreter der CYP152 Familie, wurde beschrieben.^{196,207} Es wird angenommen, dass hauptsächlich sterische Hinderungen zur ω -Hydroxylierung in CYP153A Enzymen führen. Damit wird die primäre C-H Bindung funktionalisiert, obwohl diese thermodynamisch am ungünstigsten angesehen ist.^{105,107,208} Bekannte P450 ω -Hydroxylasen wiederum wurden überwiegend dazu verwendet, um C12 und längerkettige Fettsäuren umzusetzen. Für kürzerkettige Substrate, wie die Octansäure sind wenige Beispiele bekannt, und beziehen sich mehr auf Anwendungsbeispiele als Engineering-Beispiele.^{112,188} In diesem Teil der Arbeit ging es um die Erweiterung des Substratspektrums von CYP153A_{M.aq} auf kürzerkettige Fettsäuren am Beispiel von Octansäure.

4.2.1 Engineering von CYP153A_{M.aq} hinsichtlich terminaler Hydroxylierung von Octansäure

Es wurden mehrere Engineering Ansätze untersucht CYP153A_{M.aq} dahingehend zu verändern, Octansäure als Substrat zu akzeptieren und dieses effizient zu hydroxylieren. Dabei lag der Fokus auf drei speziell ausgewählten Aminosäuren: Q129, V141 und M228. Q129 wurde gewählt, da diese je nach Substitution einen positiven oder negativen Effekt auf die Umsetzung unterschiedlicher Substrate aufwies und zudem schon in früheren Studien als Hotspot Position für Aktivität identifiziert wurde.¹⁶⁴ Die Austausche an Position 228 zeigten klare Präferenzen auf die Kettenlänge der Substrate, weshalb diese Position ausgewählt wurde. Da die beiden Positionen über den Tunnel 2c gegenüber voneinander liegen, sollte

eine dritte Aminosäure gewählt werden, die mit Q129 und M228 ein Dreieck ausbilden und somit den Tunnel 2c umspannen kann. Dafür kamen S140 und V141 infrage, jedoch zeigten initiale Kombinationen von Einzelvarianten mit S140A bzw S140W eine deutliche Verringerung der Produktivität des Enzyms, obwohl S140A als Einzelvariante die höchsten Produktbildungen aufwies. Bei näherer Betrachtung der Kristallstruktur wird deutlich, dass die Kombination mit einer Position weiter richtung Häm im BC-Loop, V141, ein planares Dreieck um den Tunnel herum bildet. Zusätzlich waren V141 Einzelvarianten vielversprechend für die terminale Hydroxylierung von Octansäure, weshalb diese Aminosäureposition für das geplante Engineering gewählt wurde. Dafür wurden zwei rationale Ansätze und ein semi-rationaler Ansatz getestet. Final wurden die Einzelvarianten kombiniert und nochmals deutliche Steigerungen der Produktivität erreicht.

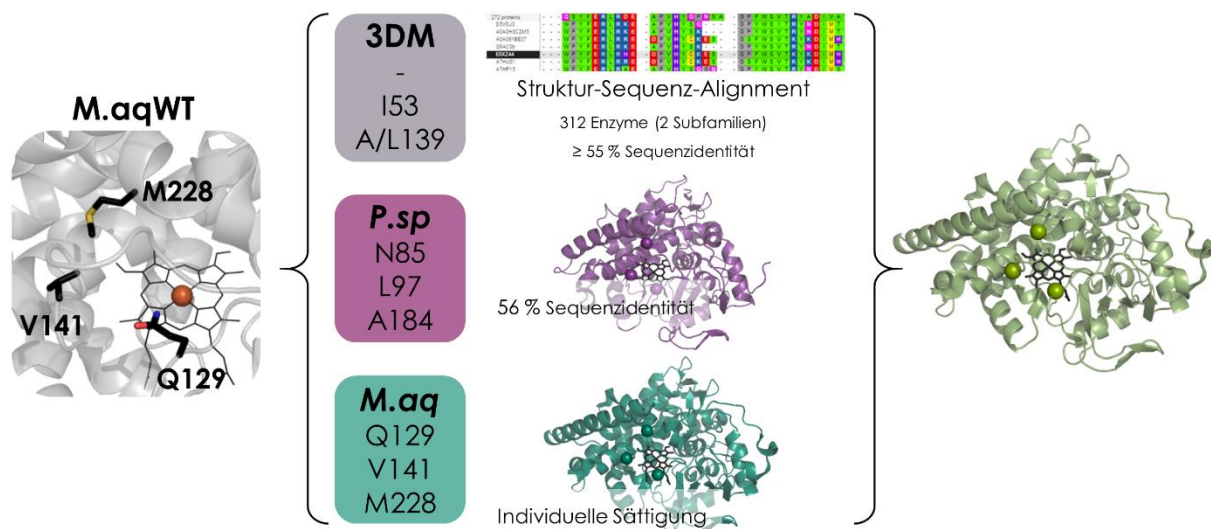


Abbildung 37: Darstellung der substituierten Aminosäuren der drei Engineering Ansätze. 3DM = 3DM Datenbankanalyse (grau), *P.sp* = Subfamilienanalyse mit CYP153A_{*P.sp*} (violett), *M.aq* = Sättigungsmutagenese (dunkelgrün). Die besten Hits wurden zur effizientesten Variante *M.aqRLT* (grün) für die Octansäure-Hydroxylierung kombiniert.

3DM Datenbank Analyse

In einem rationalen Ansatz wurde innerhalb der 3DM Datenbank ein Struktur-Sequenz-Vergleich von CYP153A_{*M.aq*} und 312 homologen P450s aus zwei Subfamilien generiert. Die Enzyme wiesen dabei eine Sequenzidentität von ≤ 55 % auf. Innerhalb der Datenbank werden die Positionen im dreidimensionalen Raum sequenzbasiert verglichen und einer fortlaufenden 3DM-Nummer zugeordnet.

Anhand dieser Nummer werden eingepflegte Strukturen bzw. deren Sequenzen abgestimmt. Die in diesem Teil der Arbeit untersuchten Aminosäuren waren V141 (3DM: 53) und M228 (3DM: 139) (Abbildung 37). Interessanterweise konnte Q129 keiner 3DM-Nummer zugeordnet werden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sich diese Aminosäure auf einem flexiblen Loop befindet, dessen Sequenz nicht stark konserviert ist. An den 3DM Positionen 53 und 139 war die Tendenz im gewählten Subset mit $\geq 36\%$ von jeweils zwei Aminosäuren (V/I, bzw. I/L) eindeutig (vgl. Abbildung 46). Die korrespondierenden Substitutionen führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der Austausch des Valins 141 zu Isoleucin zeigte keinen Effekt. Da diese beiden Aminosäuren gleich stark konserviert sind und sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht wesentlich unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass auch der Größenunterschied der Seitenkette in diesem Fall nicht relevant ist. Der Austausch des Methionins 228 zu Alanin, das an dieser Position die stärkste Konservierung aufweist, führte zu Einbußen in der Produktbildung. Hierbei kann nur spekuliert werden, ob der Wegfall der Seitenkette dazu führt, dass sich weitere Seitenketten re-orientieren oder der geschaffene Platz nachteilig für die Positionierung des Substrats in der aktiven Tasche ist. Durch eine größere Distanz können auch Wasserstoff-Brückenbindungen abgeschwächt und nebenliegende Seitenketten umorientiert werden, was die Flexibilität beeinflusst. Der Austausch zu einem Leucin führte zu einer deutlich gesteigerten Produktbildung. Vermutlich, da hier der sterische Unterschied nicht so gravierend ist. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Seitenketten wurden durch keine der Substitutionen wesentlich verändert. Möglicherweise hätten mehrere inkludierte Aminosäuresubstitutionen in diesem Ansatz zu einem größeren Erfolg in einer höheren Produktbildung beigetragen. Grobe und Kollegen zeigten einen ähnlichen Ansatz an CYP107D1 (OleP) mit fünf Positionen und dem Austausch dieser zu den vier am häufigsten auftretenden Aminosäuren in der 3DM Datenbanksuche.¹²¹ Mit am Ende drei Substitutionen konnte die Gruppe eine nahezu perfekt selektive Variante generieren, die eine 10-fach gesteigerte Bildung von Lithocholsäure zu Ursodeoxycholsäure aufwies.

Subfamilien Analyse mit CYP153A_{P.sp}

Ein weiteres Enzym der Subfamilie CYP153A aus *Polaromonas* sp. wurde in das rationale Engineering miteinbezogen (Abbildung 37). Dieses Enzym wurde 2011 das erste Mal beschrieben und als Alkanhydroxylase mit einer Präferenz zum C8-Alkan *n*-Octan identifiziert.¹⁰⁵ Im Zuge dieser Arbeit entstand die Kristallstruktur mit dem Modellprodukt 1-Octanol, die verwendet wurde, um die korrespondierenden Aminosäuren zu bestimmen. Q129 wurde durch Asparagin ausgetauscht, also lediglich die Kettenlänge um einen Kohlenstoff reduziert, und V141 wurde zu Leucin substituiert – auch hier nur die Veränderung der Kettenlänge mit einem zusätzlichen Kohlenstoff. Zwei der drei Substitutionen in CYP153A_{M.aq} verzeichneten deutliche Steigerungen in der Produktbildung von ω -Hydroxyoctansäure. Im Fall der Vergrößerung der Seitenkette (V141L) wurde die Produktbildung 7-fach gesteigert. Unter allen generierten Einzelvarianten war dies die höchste Steigerung, die möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die aktive Tasche etwas verkleinert wurde. Durch die Verkleinerung wurde eine vorteilhaftere Positionierung des kleineren Substrats ermöglicht, wie es auch bei CYP153A_{P.sp} notwendig ist, um das kurz-kettige Alkan zu stabilisieren.

Sättigungsmutagenese

Die Sättigungsmutagenese ergab drei Einzelvarianten (Q129R, V141 und M228T), die jeweils eine 3-fache Steigerung der Produktbildung aufwiesen. Interessanterweise wurden die besten Einzelvarianten aus den rationalen Designs (V141L und M228L) in der Sättigung nicht als Hit identifiziert. Dies könnte daran liegen, dass für die Sättigungsmutagenese ein anderes System, das Fusionskonstrukt, verwendet wurde. In Arbeiten mit CYP153A und BM3 konnte gezeigt werden, dass sich Coupling bzw. Uncoupling vom System mit freien Redoxpartnern, sowie eingeführten Mutationen, erheblich unterscheiden kann.^{113,209} Auch die Expression verschiedener Varianten, auch Einzelvarianten, kann sich erheblich voneinander unterscheiden. In Standardbiotransformationen dieser Arbeit wurde immer auf die P450-Konzentration normiert. Bei dem hier verwendeten Screening wurden ganze Zellen eingesetzt und auf die Zellmasse

normiert. Zudem weist die Codonverteilung und das Oversampling nur eine statistische Abdeckung von > 95 % auf.¹⁵² Daher kann nicht garantiert werden, dass alle Aminosäuren in der Sättigung vorhanden waren bzw. gescreent wurden. Um eine vollständige Abdeckung aller Aminosäuren zu garantieren, müssen die einzelnen Varianten separat durch jeweilige Mutationen des Codons generiert werden.

Kombination der Einzelvarianten

Die generierten Einzelvarianten aus rationalem und semi-rationalem Design (Abbildung 37) wurden in einem finalen Schritt zu Doppel- und schließlich Dreifachvarianten kombiniert. Dabei fiel auf, dass die Kombination von Q129 und V141 Varianten, vermutlich aufgrund antagonistischer Effekte, hauptsächlich in nicht aktivem oder falsch gefaltetem Enzym resultierte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich die Kombinationen innerhalb des flexiblen BC-Loops nachteilig auf die Flexibilität des gesamten Grundgerüsts auswirken könnten. Interessanterweise führten fast alle anderen Kombinationen zu mindestens 3-fach gesteigerten Produktbildungen, was stark dafürspricht, dass Aminosäuresubstitutionen von nah verwandten Enzymen in aktivem und korrekt gefalteten Enzymvarianten resultieren. Auch die Dreifachvarianten zeigten synergistische Effekte und wiesen, außer im Fall von Q129R/V141M/M228T, eine gesteigerte Produktbildung auf. Grobe *et al.* zeigten am Beispiel der P450 Monooxygenase OleP, dass durch einfache Kombinationen der besten Hits nochmals erhebliche Steigerungen der Produktbildung möglich sind.¹²¹

4.2.2 Modellierung und Simulationen liefern detaillierte Hinweise auf die Funktion der substituierten Aminosäuren

Durch kinetische Analysen wurde die Steigerung der Effizienz der Varianten verdeutlicht. Die ermittelten K_m -Werte zeigen, dass die Affinität zur Octansäure von der Einzel- über die Doppel- bis hin zur Dreifachvariante stark ansteigt. Wie die Substitutionen diese Affinität genau beeinflussen, wurde bioinformatisch untersucht.

Substratpositionierung und Tunnelarchitektur in den starren Strukturen

Eine Dockingstudie liefere erste Hinweise auf die Substratpositionierung in der aktiven Tasche (vgl. Abbildung 21). Während die Octansäure im Wildtyp deutlich weiter vom Häm entfernt ist, ist diese in M.aqRLT 2 Å näher am katalytisch aktiven Eisen. Diese tiefere Positionierung des terminalen Kohlenstoffs und damit die größere Nähe zum Häm-Eisen bestätigt die experimentell ermittelte effizientere Katalyse in der Variante M.aqRLT. Zudem scheint die Carboxylgruppe der Octansäure im Docking mit dem eingeführten Arginin an Position 129 zu interagieren. Dies deutet darauf hin, dass die Octansäure besser in der katalytisch aktiven Konformation verankert ist, um terminal hydroxyliert zu werden. Ankerpositionen für Carboxylate in Form von Argininen wurden bereits in mehreren Studien identifiziert oder speziell eingefügt, um Fettsäuren zu stabilisieren. Cowart *et al.* beschreiben die Seitenkette R47 am Tunneleingang in CYP102A1 als Fettsäureanker für die ω -Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren. Ebert und Kollegen erweiterten diese Hypothese durch MD Simulationen und vermuten eine lokale Konzentrationserhöhung von Fettsäuren an der Enzymoberfläche im Bereich des Tunnels mit dem Arginin 47 als wegweisendes Element, das den Substrateintritt in den Tunnel erleichtert.²¹⁰ Hammerer und Kollegen hingegen versuchten ein Arginin in der aktiven Tasche von CYP152A1 umzupositionieren, um die Regioselektivität des Enzyms von der α - zur β -Position zu ändern.¹⁹⁶

Die Enzymtunnel in Wildtyp und Variante können durch Berechnungen der molekularen Tunnel hinsichtlich ihrer geometrischen Eigenschaften und Topologien verglichen werden. Eine eingeführte Biegung des Tunnels und daher die Verkürzung der aktiven Tasche (vgl. Abbildung 22) unterstützen die Annahme, dass das Substrat im aktiven Zentrum besser positioniert wird. Ähnliches wurde auch in einer Arbeit der Gruppen von David Baker und Dan Tawfik am Beispiel einer *in silico* designten Kemp Eliminase gezeigt.²¹¹ Die stärkere Bindung des Substrats durch eine Umformung der aktiven Tasche wurde durch stark verringerte K_m -Werte verdeutlicht. Zusätzlich wurde im Tunnel 2c der Variante

M.aqRLT ein neuer *Bottleneck* geschaffen, was auch dazu führen kann, dass das kleinere Substrat besser umgesetzt wird. Demming *et al.* zeigten erstmalig den Umsatz eines aliphatischen C10 Alkens mit einer Oleathydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica*.²¹² In der Arbeit von Demming und Kollegen wurde ein Fettsäure-Dummymolekül eingesetzt, um die aktive Tasche zu verkleinern und das kleinere Substrat zu binden. Die Gruppe von Rudi Fasan zeigten in ähnlicher Weise zu vorliegender Arbeit einen neu eingeführten *Bottleneck* durch die Evolution von BM3 von einer langkettigen Fettsäure-Hydroxylase zu einer Propan-Monooxygenase, bei der sogar das aktive Zentrum vom Substrattunnel getrennt wurde.²¹³ Darüber hinaus werden enge Tunnel als sterisch eingeschränkte Zugangswege beschrieben. Aufgrund der anspruchsvollen Sterik sind die Freiheitsgrade der Substrate limitiert und Position von Substraten können selektiv für die Funktionsalisierung adressiert werden.²⁰⁸

Analysen mit CaverDock ergaben, dass der Tunnel 2e mit der Mutation Q129R an seinem Eingang der energetisch bevorzugte Zugangsweg für Octansäure in M.aqRLT ist (vgl. Abbildung 23). Dies unterstützt die Hypothese einer besseren Stabilisierung des Substrats im aktiven Zentrum und auch der Hinderung dessen vorzeitigen Austritts. Vermutlich ist der limitierende Schritt für die Umsetzung von Octansäure nicht die Migration des Substrats in das aktive Zentrum, da die Modellsubstrate des Wildtyp-Enzyms ebenfalls Fettsäuren sind, wenn auch mit längeren Kohlenstoffketten (C9-C20). Die Limitierung wird vielmehr durch die Positionierung und Stabilisierung des Substrats in der aktiven Tasche bestimmt. Diese Hypothese wird durch Kopplungsdaten unterstützt, da eine effizientere Elektronenübertragung eine bessere Substratbindung impliziert. Während der Wildtyp eine Kopplungseffizienz von nur $10,5 \pm 1,5\%$ zeigte, zeigte die Variante M.aqRLT eine 2-fach verbesserte *Coupling* von $19,6 \pm 0,5\%$.

Einfluss auf die Dynamik des Enzyms – Hinweise der MD Simulationen

Für die Beurteilung der Proteinflexibilität und um die Unterschiede der experimentell untersuchten Systeme bioinformatisch zu analysieren, wurden MD Simulationen durchgeführt und B-Faktoren des *Backbones* aller Aminosäuren

bestimmt. Je höher die B-Faktoren sind, desto flexibler werden diese Abschnitte angenommen. Die B-Faktoren deuten darauf hin, dass der BC-Loop im Wildtyp eine hochflexible Struktur ist, die durch die Bindung des Liganden Octansäure noch flexibler wird (vgl. Abbildung 24). M.aqRLT hingegen zeigte in diesem Bereich deutlich niedrigere B-Faktoren, was auf eine erhöhte Stabilisierung und stärkere Wechselwirkungen mit dem gebundenen Substrat schließen lässt. Die höheren B-Faktoren im FG-Loop der Variante ohne gebundene Octansäure könnten darauf hindeuten, dass die von diesem Loop gebildeten Zugangstunnel anpassungsfähiger sind - und damit den Eintritt des Substrats erleichtern -, aber stabil bleiben, nachdem das Substrat gebunden ist.

Da die Variante M.aqRLT im Vergleich zum Wildtyp ein effizienterer Biokatalysator für die kurzkettige Octansäure ist, könnte die Öffnung eines 2ac-Tunnels (vgl. Abbildung 48) ein Vorteil für die Umsetzung der kürzeren Fettsäure sein. Das homologe Enzym CYP153A_{P.sp} bevorzugt *n*-Octan als Substrat, also die gleiche Kettenlänge wie die hier untersuchte Octansäure, und weist in der Kristallstruktur einen Tunnel 2ac auf. Diese Hypothese wurde durch die Analyse der Tunnel mit CAVER unterstützt, bei der eine leichte Erhöhung der Öffnungsraten des besagten 2ac-Tunnels in M.aqRLT gezeigt wurde (vgl. Tabelle 21). Dennoch war er in den MD-Simulationen von Wildtyp und Variante nahezu gleichermaßen vorhanden. Daher kann über eine mögliche Rolle in der Enzymaktivität nur spekuliert werden. Da die 2c- und 2ac-Tunnel durch den BC- und FG-Loop (und den Beginn der G-Helix) begrenzt werden, hängen diese Tunnel von der Bewegung der beiden Loops als Gegenspieler ab, und es war kein expliziter Zusammenhang zu beobachten. Die erhöhte Flexibilität des FG-Loops und damit höhere Öffnungsraten des 2c-Tunnels im ungebundenen M.aqRLT (vgl. Tabelle 21) könnte einen Einfluss auf die Raten der Substratbindung haben. Unerwarteterweise wurde beobachtet, dass die Anwesenheit von Octansäure die *Bottlenecks* in keinem der beiden Enzyme im Vergleich zu den jeweiligen ungebundenen Systemen dramatisch erhöhte, wie dies von Marques und Kollegen in einer Haloalkan Dehalogenase beobachtet wurde.¹⁶⁹ Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die engsten Stellen sowohl der 2e- als

auch der 2c-Tunnel meist nahe an dem Tunneleingang liegen, wohin der Ligand während der MDs selten gelangte.

Stabilisierung der Octansäure in der aktiven Tasche

Um die Stabilisierung der Octansäure in der aktiven Tasche über einen zeitlichen Verlauf zu verfolgen, wurde die Distanz zwischen terminalem Kohlenstoff des Liganden und dem Häm-Eisen ermittelt.

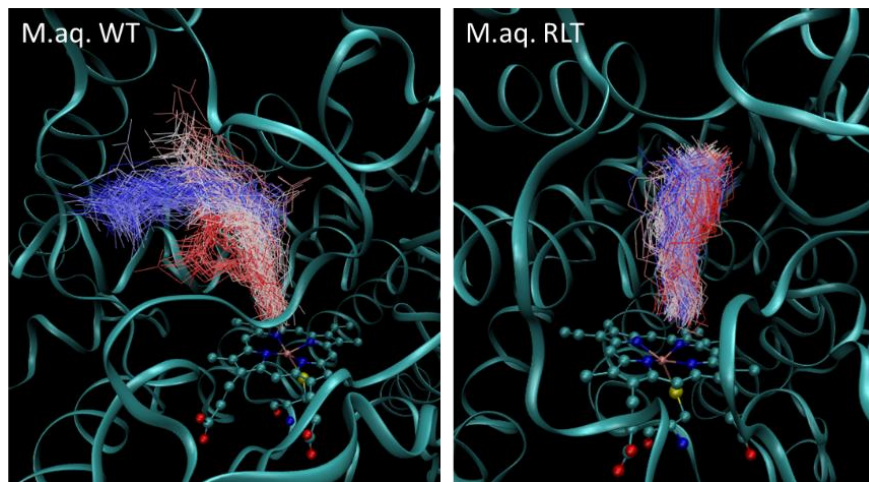


Abbildung 38: Octansäure während der MD-Simulation in der aktiven Tasche von M.aqWT (links) und M.aqRLT (rechts). Die verschiedenen Farben geben die zeitliche Position der Octansäure an. Rot: zu Beginn der Simulation (erstes Drittel), weiß: im mittleren Teil der Simulation (zweites Drittel) und blau: am Ende der Simulation (letztes Drittel). Gezeigt sind beispielhaft die Snapshots aus einem Unikat. Das Enzym-*Backbone* ist als petrolfarbenes Band und das Häm als Kugeln und *sticks* dargestellt. Für die grafische Repräsentation wurde die Software VMD gewählt.

Während die Octansäure in den Simulationen in der Variante M.aqRLT konstant nahe des Häms lokalisiert wurde, bewegte sie sich im Wildtyp in Richtung der Ausgänge der beiden Tunnel 2c und 2e (Abbildung 38). Der Ligand befand sich somit in den meisten Simulationen im Wildtyp in einer nicht-produktiven Position, was die experimentellen Daten unterstützt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Substrat in der aktiven Tasche der Variante M.aqRLT besser stabilisiert ist als im Wildtyp, was sich in erhöhten Wahrscheinlichkeiten für das Erreichen einer reaktiven Konformation niederschlägt. Möglicherweise spiegelt das erste Maximum der Abstandsmessung lediglich den Beginn der Simulationen (Abbildung 38A, rot) wider, da diese mit dem Liganden in der aktiven Tasche beginnen.

Zusätzlich wurde die freie Bindungsenergie berechnet, um Interaktionen einzelner Aminosäuren mit der Octansäure zu erfassen (vgl. Abbildung 26). Die Mutation Q129R bewirkte eine drastische Änderung von ΔG_{bind} um 4,5 kcal/mol. Ein Arginin an dieser Position wurde zuvor als Anker für Fettsäuren wie Dodecansäure beschrieben und könnte dafür verantwortlich sein, dass die Octansäure in der reaktiven Position gehalten wird, bis die Reaktion abgeschlossen ist.¹⁶⁴ Wie in dieser Studie werden auch in anderen Fettsäure hydroxylierenden P450s Arginine als mögliche Bindungsstellen für Carboxylgruppen beschrieben.²⁰⁸ Auf diese Position als Ankerstelle weist auch das Asparagin an der Position 129 hin. Diese Variante (Q129N) weist eine geringfügig niedrigere Produktbildung auf wie mit einem Arginin an derselben Position, das auch durch die Aminogruppe als Elektronendonator fungieren kann, jedoch eine kürzere Seitenkette hat. Die Reste an den Positionen 141 und 228 weisen nur sehr geringe Unterschiede in ΔG_{bind} zum Wildtyp auf, daher wird spekuliert, dass diese in der gebundenen Konformation wenig mit dem Liganden interagieren. Sie könnten aber für die Verringerung der Flexibilität des BC-Loops und der Stabilisierung des gesamten Konstrukts eine entscheidende Rolle spielen.

4.2.3 Änderung der Substratspezifität

Insgesamt zeigte die Variante M.aqRLT eine höhere Produktbildung für C8 bis C12 Fettsäuren im Vergleich zu allen anderen in dieser Studie verwendeten Varianten, was zeigt, dass nicht nur die Verankerung, sondern auch die beiden weiteren Mutationen einen Einfluss auf die Flexibilität haben. Fasan und Kollegen konnten die Evolution eines P450s hin zu einer C3-Alkanhydroxylase nachweisen, die ähnliche Substrattendenzen hinsichtlich der Kettenlänge zeigt.²¹³ Zur besseren Stabilisierung kürzerkettiger Substrate könnten außerdem Aminosäuren an Positionen im Tunnel, die näher am aktiven Zentrum liegen, mit den gleichen Mutageneseansätzen adressiert werden. Mutationen hinsichtlich Verankerungs-Ansätzen wurden zuvor von Gruppen wie Urlacher und Munro tiefer in den Tunnel von BM3 eingeführt, um rationale Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arg/Tyr-Resten und dem Carboxylat kürzerer Fettsäuren zu bilden.^{214,215}

4.2.4 Anwendung der Variante M.aqRLT für die *de novo* Produktion von ω -Hydroxyoctansäure

Im Arbeitskreis der Abteilung für Technischen Biochemie an der Universität Stuttgart wurde von Dr. Marko Kirtz bereits im Jahr 2016 ein verändertes artifizielles Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}(G307A)-CPR_{BM3} beschrieben. Damit konnte aus Octansäure, die von der pflanzlichen Thioesterase FatB2 in *E. coli* produziert wurde, insgesamt 234 μM ω -Hydroxyoctansäure hergestellt werden.¹¹² Hier wurde der beschriebene Ansatz gewählt, um das in dieser Arbeit generierte Enzym M.aqRLT-PFOR für die Anwendung in der *de novo* Produktion von ω -Hydroxyoctansäure zu evaluieren. Mit dem Einsatz der Variante konnte im Schüttelkolben bis zum Versuchsende nach 50 h über drei Mal so viel ω -Hydroxyoctansäure ($129 \pm 5 \mu\text{M}$) produziert werden wie mit dem Wildtyp (vgl. Abbildung 28). Bis zum Erreichen dieser Endkonzentration nach 24 h war keine überschüssige Octansäure im Ansatz vorhanden. Dies legt nahe, dass das P450 Fusionskonstrukt für ca. 24 h aktiv war und die gebildete Octansäure umsetzte, danach jedoch nicht mehr bzw. kaum noch katalytisch aktiv war. Da ab diesem Zeitpunkt die Octansäurekonzentration weiter anstieg, war zu vermuten, dass FatB2 im Gegensatz zu M.aqRLT-PFOR weiterhin aktiv war. Ähnliches wurde auch für den Wildtyp beobachtet, mit dem Unterschied, dass nur wenig ω -Hydroxyoctansäure gebildet wurde und ab den ersten Stunden des Versuchs Octansäure in der Kultur nachgewiesen wurde, deren Konzentration stetig anstieg. Vorliegende Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bildung von Octansäure hier der limitierende Faktor war und daher mit der Variante M.aqRLT-PFOR nicht mehr Produkt gebildet werden konnte, als theoretisch möglich wäre. Kirtz *et al.* konnten am Ende des *Fed-Batch* Ansatzes im 1 L Reaktor 234 μM ω -Hydroxyoctansäure detektieren, während in diesem Versuch im kleineren Maßstab im Schüttelkolben 127 μM gebildet wurden. Die beiden Ansätze sind kritisch zu vergleichen, da die Konditionen im Reaktor vorteilhafter sind und mehr Zellmasse vorhanden ist. Im Schüttelkolben konnten Kirtz *et al.* lediglich 63 μM Octansäure herstellen und mit optimierten Bedingungen im Reaktor 2,32 mM.¹¹² Somit konnte nur ca. 10 % der gebildeten Octansäure umgesetzt werden, während in der hier vorliegenden

Arbeit > 99 % der Octansäure umgesetzt wurden. Die Kopplungseffizienz spielt auch hier eine wesentliche Rolle, auch wenn eine erhöhte Kopplungseffizienz nicht direkt mit einer verbesserten Aktivität einhergeht.²¹⁶ Es wurde gezeigt, dass die Kopplungseffizienz in der Variante verdoppelt wurde, was für eine stabilere Elektronenübertragung durch eine verbesserte Stabilisierung des Liganden während der Katalyse spricht. Daher wird vermutet, dass die Enzymvariante M.aqRLT-PFOR zu deutlich höherer Produktivität in der Lage wäre, diese aber durch die langsame Octansäureproduktion der Thioesterase nicht ausgeschöpft werden konnte.

4.3 Gezielte Mutagenese von CYP153A_{M.aq} zur terminalen Hydroxylierung des Inhibitors Dodecylamin

Das in CYP153A_{M.aq} co-kristallisierte Modellprodukt, ω -Hydroxydodecansäure, unterscheidet sich von dem terminal hydroxyliertem Dodecylamin nur in der funktionellen Gruppe (vgl. Abbildung 10). Daher wurde letzteres in vorliegender Arbeit als Vertreter für Alkylamine untersucht. Andere Alkylamine neben dem Dodecylamin, welches das in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Enzym inhibiert, wurden bereits zuvor als P450 Inhibitoren beschrieben.^{217,218} Durch geeignetes Engineering der Häm-Domäne sollte ein Biokatalysator generiert werden, der in der Lage ist, Dodecylamin terminal zu hydroxylieren und daher die inhibitorische Wirkung auf das Enzym aufzuheben bzw. zu mildern.

4.3.1 Einfluss der Flexibilität auf die Inhibition

Die experimentellen Ergebnisse der spezifischen Aktivität mit dem Modells substrat Dodecansäure für den Wildtyp und die initiale Variante M.aqAA zeigen deutliche Unterschiede. Interessanterweise ist die Substrataffinität für beide Enzyme sehr ähnlich, jedoch weist M.aqAA schon bei geringen Konzentrationen eine starke Substratinhibition hinsichtlich Dodecansäure auf. Inhibition bei hohen Substratkonzentrationen treten bei ca. 20 % aller Enzyme auf und hat unterschiedliche biologische Funktionen, wie z.B. die Regulation im Metabolismus.¹⁶

Die hier untersuchte Variante besitzt einen deutlich verbreiterten Tunnel 2c (vgl. Abbildung 49), der vermutlich keine Filterfunktion mehr einnimmt und mehrere Substratmoleküle in diesen eindringen und ihn somit blockieren können. Ähnliches zeigten auch Kokkonen und Kollegen am Beispiel der Haloalkan Dehalogenase LinB.³⁹ Experimentelle Daten in Kombination mit MD Simulationen legen in dieser Studie nahe, dass die Inhibition durch ein weiteres Substratmolekül verursacht wird, das an den Enzym-Produkt Komplex bindet.

Um den Einfluss der Flexibilität auf die Inhibition zu untersuchen wurden MD-Simulationen hinsichtlich der *Backbone* B-Faktoren analysiert. Der Wildtyp und die Variante wurden jeweils ohne und mit dem Liganden Dodecylamin in zwei unterschiedlichen Konformationen simuliert.

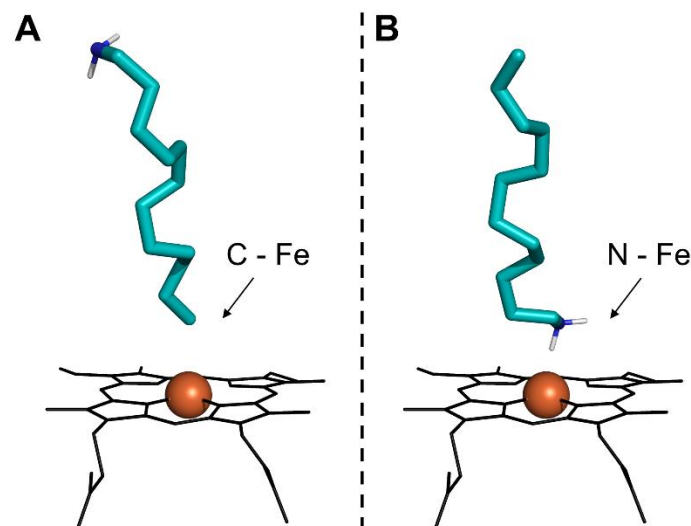


Abbildung 39: Orientierung des Dodecylamins in den MD-Simulationen. (A) Aktive Konformation mit terminalem Kohlenstoff zum Eisen gerichtet (C – Fe). (B) Inhibierende Konformation mit Aminogruppe zum Eisen hin gerichtet (N – Fe). Dodecylamin ist als petrolfarbene, das Häm als schwarze sticks und das Eisen als orangefarbene Kugel dargestellt.

Eine "aktive" Konformation mit dem terminalen Kohlenstoff Richtung Eisen gerichtet (C – Fe, Abbildung 39A) und die "inhibierende" Konformation, mit der Aminogruppe nahe dem katalytischen Eisen (N – Fe, Abbildung 39B). Die kleineren B-Faktoren des Wildtyps in inhibierender Konformation deuten auf eine weniger flexible Struktur hin, was darauf hindeutet, dass das Dodecylamin fester bindet und daher stärker inhibierend wirkt. Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit der weniger stark gehemmten Variante M.aqAA, die an der Stelle des BC-Loops

eine stark erhöhte Flexibilität aufweist (vgl. Abbildung 30). Da die B-Faktoren hier sogar mehr als 4-fach höher sind als in der Simulation ohne Ligand, scheint diese Flexibilität ligandeninduziert zu sein. Zudem ist die Flexibilität an dieser Stelle über doppelt so hoch wie im Wildtyp mit gebundenem (N – Fe) Dodecylamin, was mit den experimentellen Daten zu der stärkeren Inhibierung des Wildtyps übereinstimmt. Dass der hochflexible Teil des BC-Loops vermutlich mit einer erhöhten Öffnung des 2c-Tunnels korreliert, wurde mit der CAVER-Analyse erfolgreich gezeigt (vgl. Abbildung 35). Es wird vermutet, dass ein breiterer Tunnel 2c zusammen mit der vermehrten Bewegung des BC-Loops den Austritt eines potentiellen Inhibitors erleichtern könnte, wenn dieser nicht ausreichend in der Bindetasche stabilisiert wird.

4.3.2 Vom Inhibitor zum Substrat und *vice versa*

Die Einführung zweier Glutaminsäurereste, einer davon an der Stelle einer zuvor beschriebenen Verankerungsposition für mittelkettige Fettsäuren (Q129), legt nahe, dass die Aminogruppe des Dodecylamins Wasserstoffbrückenbindungen zu mindestens einem der eingeführten Carboxylate bildet. Diese Hypothese wurde durch molekulare Docking-Berechnungen unterstützt (vgl. Abbildung 33A). Demnach reicht die Alkylkette in Richtung des Häm-Eisens (vgl. Abbildung 39A), wo das terminale Kohlenstoffatom hydroxyliert werden würde, wie von Hoffmann *et al.* gezeigt wurde.¹⁶⁴ Ein weiterer Hinweis für diese Koordinationshypothese wurde durch den Umsatz von Dodecansäure erbracht, die als Modellsubstrat für M.aqWT mit 390 *Turnover* pro Stunde dient. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Potential der neuen Variante (M.aqESE) die Fettsäure umzusetzen um das 58-fache abnimmt (vgl. Abbildung 32). Docking-Berechnungen des Dodecylamins in die Variante M.aqESE zeigen die katalytisch aktive Konformation dieses Substrats, während Dockings der Dodecansäure darauf hindeuten, dass die zwischen den drei adressierten Aminosäuren liegende deprotonierte Säuregruppe, von den Glutamatresten abgestoßen wird und daher in Biotransformationen nicht mehr als geeignetes Substrat akzeptiert wird (vgl. Abbildung 33B).

4.3.3 Koordination der Aminogruppe in der aktiven Tasche erklärt aktive bzw. inaktive Konformation des Dodecylamins

Für die experimentelle Beurteilung der Ausrichtung der Aminogruppe des Dodecylamins zu dem katalytisch aktiven Eisen wurden die Spin-Zustände des Wildtyps und ausgesuchter Varianten ermittelt. Während das Soret-Maximum bei Typ I-Spektren von 420 nm auf 385 - 390 nm verschoben wird, ist es bei Typ II-Spektren auf 425 - 435 nm verschoben.^{68,69} Auch Klenk *et al.* zeigten klare Unterschiede in Typ I-Spektren, die die Dissoziationskonstanten für experimentell bestimmte, verschieden gut akzeptierte Substrate widerspiegelten.¹⁶² Die in dieser Arbeit stark reduzierten Absorptionsmaxima von M.aqEE und M.aqESE deuten darauf hin, dass das Dodecylamin möglicherweise nur selten mit dem Fe(II) koordiniert. Die Aminogruppe wird vermutlich in die entgegengesetzte Richtung - in Richtung der mutierten Reste und damit in eine produktive Orientierung - ausgerichtet (vgl. Abbildung 39A). Die Ergebnisse der Spin-Experimente deuten darauf hin, dass die Varianten M.aqEE und M.aqESE weniger gehemmt sind als M.aqAA und der Wildtyp und darüber hinaus vermutlich besser in der Lage sind das Dodecylamin am terminalen Kohlenstoff zu hydroxylieren. Eine eindeutige Aussage zur „aktiven“ Positionierung des Dodecylamins in M.aqEE und M.aqESE kann in diesem Fall nicht getroffen werden. Da vermutlich sowohl die inhibierende als auch die produktive Ausrichtung vorliegt, überlagern sich die Kurven der Typ-II- und Typ-I-Differenzspektren und löschen sich damit teilweise gegenseitig aus.

4.3.4 MD Simulationen liefern erste Hinweise auf den Einfluss der Flexibilität auf die Umsetzung des Dodecylamins

MD Simulationen ergaben, dass die Flexibilität in den Varianten und dem Wildtyp ohne gebundenes Dodecylamin keine wesentlichen Unterschiede aufwies, wie es für M.aqAA mit gebundenem Dodecylamin beobachtet wurde (vgl. Abbildung 30 und Abbildung 50). Jedoch war eine deutliche Öffnung des Tunnels 2c der Varianten, sowohl bei den modellierten Strukturen als auch bei den Simulationen erkennbar. Daher kann über einen möglichen Einfluss der für den Tunnel 2c beobachteten höheren Öffnungsraten auf die Verringerung der hemmenden

Wirkung von Dodecylamin in den neuen Varianten spekuliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Gesamteffekt, der zur Akzeptanz des Dodecylamins als Substrat führt, auf eine günstige Kombination aus einer höheren Zugänglichkeit des aktiven Zentrums zur Bindung des Substrats aufgrund der höheren Öffnungsraten der molekularen Tunnel und dem Verankerungseffekt der Mutationen zurückzuführen sein könnte. Die Aminogruppe wird potenziell im Tunnel verankert und auf diese Weise verhindert, dass diese tiefer in das aktive Zentrum wandert, um mit dem Häm zu koordinieren und den MIC zu erzeugen.

5 Resümee

Der immense Einfluss des Zugangs zur aktiven Tasche von Enzymen wurde in der Biokatalyse lange nicht beachtet. Auch das bekannte Schlüssel-Schloss-Prinzip beschreibt nur das Substrat und die aktive Tasche eines starren Enzymmodells, jedoch nicht den flexiblen Substratzugang in das katalytische Zentrum. Erst über 100 Jahre nach der erstmaligen Formulierung dieses Postulats wurde jenes Prinzip zum Schlüssel-Schlüsseloch-Schloss Modell ausgeweitet, das den Weg des Substrats von der Enzymoberfläche zum katalytisch aktiven Zentrum beschreibt. Darauf basierend wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Mutationen an Enzymtunneln, also den Schlüssellochern, des Enzyms CYP153A_{M.aq} aus *Marinobacter aquaeolei*, und weiteren einflussreichen Faktoren wie der Flexibilität, untersucht.

Die Studien an CYP153A_{M.aq} befassten sich mit dem Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in Enzymtunneln auf die Substratspezifität des Enzyms, sowie der Untersuchung gezielter Varianten auf deren veränderte Tunnelarchitektur und Flexibilität. Dabei wurde zunächst die freie Häm-Domäne im Lysat analysiert und für Ganzzellumsätze ein artifizielles Fusionskonstrukt CYP153A_{M.aq}-PFOR verwendet.

Die Grundvoraussetzungen zur Verbesserung der Aktivität gegenüber Octansäure wurden in dieser Arbeit anhand der bisher besten Variante M.aqRLT aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits geringfügige Modifikationen in den molekularen Tunneln zu veränderten Aktivitäten führen können. Außerdem wurde beschrieben, dass die Flexibilität der BC- und FG-Loops sowie der entsprechenden Tunnel von großer Bedeutung ist und dass diese Elemente in P450s allgemein als vielversprechende Ziele für das Engineering der Enzymaktivität verwendet werden können. Eine Synergie verschiedener Faktoren, wie die Substratverankerung im aktiven Zentrum, die Umformung der aktiven Tasche durch Veränderung der Tunnelgeometrie und die partielle Verringerung der Flexibilität des Enzyms wurden aufgeklärt und können die stark verbesserte katalytische Effizienz der generierten Variante erklären. Eine tiefere

Positionierung und stärkere Fixierung des Substrats innerhalb der aktiven Tasche von M.aqRLT wurde durch MD-Simulationen nachgewiesen, wie es zuvor für Kemp-Eliminasen gezeigt wurde. Die Mutation Q129R fungiert als Fettsäureanker und fixiert die Octansäure in der produktiven Orientierung, bis die Hydroxylierungsreaktion abgeschlossen ist. Solche Fettsäureanker in Form von Argininen wurden bereits in anderen Fettsäure-hydroxylierenden P450s beschrieben. Zudem ist bekannt, dass die katalytische Effizienz von Enzymen von der genauen Positionierung und der geeigneten elektrostatischen Umgebung in der aktiven Tasche abhängt. Weitere in dieser Studie präsentierte Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Flexibilität der beiden Loops, die die möglichen Substratzugangs- und -ausgangstunnel bilden, in M.aqRLT im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert ist. Dadurch wird das Substrat im Michaelis-Komplex besser stabilisiert und der terminale Kohlenstoff interagiert häufiger mit dem katalytisch aktiven Eisen, was somit zu einer effizienteren Katalyse führt.

In einem weiteren Teil der Studie wurde der katalytische Raum der CYP153A_{M.aq} von einer ω -Fettsäurehydroxylase zu einem Enzym erweitert, das in der Lage ist, die ω -Hydroxylierung von Dodecylamin zu katalysieren. Das Fettamin Dodecylamin ist gleichzeitig ein potenter Inhibitor für das Wildtyp-Enzym. Für die Analyse von Sättigungsbibliotheken wurde die Screening-Methode Rapid-flow Analysis of Product Peaks (RAPP) etabliert und angewendet, um direkt von einer 96-Deepwell Platte in 36 Sekunden je Probe zu messen. Es wurde dargestellt, dass die generierten Varianten jeder Mutageneserunde weniger durch das Amin gehemmt werden, und gleichzeitig eine geringere Affinität zur Säure aufweisen. Dem zugrunde lagen zwei Glutaminsäurereste an den Positionen 129 und 228, die in der Dreifachvariante M.aqESE, analog zum Argininrest als Carboxyl-Anker, eine fixierende Funktion für Aminogruppen darstellen. Dies erklärt zudem die geringere Affinität zur Dodecansäure, deren funktionelle Gruppe zwischen zwei Glutaminsäureresten nicht ausreichend positioniert werden kann, bzw. im protonierten Zustand eher abgestoßen wird. Zudem konnte experimentell gezeigt werden, dass das Dodecylamin mit der Aminogruppe an das katalytisch aktive Eisen im Wildtyp koordiniert, während die Aminogruppe in M.aqESE vermehrt im

Substrattunnel zwischen den Mutationen platziert ist. Molekulare Modellierung und molekulardynamische Simulationen zeigten auch hier deutliche Auswirkungen der Mutationen auf die Architektur des Tunnels 2c. Durch das Einbringen von drei Mutationen an denselben Positionen wie in der vorangegangenen Studie wurde in diesem Teil der Arbeit der Tunnel deutlich verbreitert und ein *Bottleneck* nahe des Tunneleingangs eingeführt. In der Dodecylamin-gebundenen „inhibierenden“ Konformation der initialen Dodecylamin-hydroxylierenden Variante konnte zudem eine stark erhöhte Flexibilität des BC-Loops gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde in der Octansäure-hydroxylierenden Variante M.aqRLT sowohl der Tunnel 2c verengt und ein *Bottleneck* nahe der aktiven Tasche eingeführt was zu einem deutlich rigideren BC-Loop führte. Die resultierende M.aqESE-Variante könnte als Parent für weitere Runden der Mutagenese dienen und zu einer hocheffizienten Hydroxylase für aliphatische Amine mit verminderter Hemmung durch das Substrat entwickelt werden. Das beschriebene modifizierte Enzym M.aqESE öffnet den katalytischen Raum dieser Enzymunterfamilie für eine neue Gruppe von Molekülen, die bisher als Inhibitoren galten.

Diese Arbeit hat erfolgreich gezeigt, wie wichtig es ist, Positionen außerhalb der aktiven Tasche für Enzym Engineering in Betracht zu ziehen, um Moleküle umzusetzen, die zuvor nicht akzeptiert wurden oder sogar die Reaktion inhibierten. Mit tieferen Einblicken in die dynamischen Eigenschaften von Enzymen könnten in Zukunft Aktivitäts-Hotspots gezielter und vorhersehbarer identifiziert und angesteuert werden. Nicht nur höhere Aktivitäten oder breiter gefächerte Substratspezifitäten könnten und sollten angestrebt werden, sondern neue Moleküle sollten miteinbezogen werden, die bisher nicht als Substrate akzeptiert wurden.

6 Anhang

Verwendete Gene und Stämme

CYP153A_{M.aq} aus *Marinobacter aquaeolei* VT8 DSM 11845

ATGCCAACACTGCCCAGAACATTTGACGACATTCAGTCCCGACTGATTAACGCCACCTCCAGG
GTGGTGCCGATGCAGAGGCAAATTCAGGGACTGAAATTCTTAATGAGCGCCAAGAGGAAGAC
CTTCGGCCCACGCCGACCGATGCCCGAATTCGTTGAAACACCCATCCCGGACGTTAACACGCT
GGCCCTTGAGGACATCGATGTCAGCAATCCGTTTTTATACCGGCAGGGTCAGTGGCGCGCCTA
TTTCAAACGGTTGCGTGATGAGGCGCCGGTCCATTACCAGAAGAACAGCCCTTTCGGCCCCTT
CTGGTCGGTAACTCGGTTTGAAGACATCCTGTTTCGTGGATAAGAGTCACGACCTGTTTTCCGC
CGAGCCGCAAATCATTCTCGGTGACCCTCCGGAGGGGCTGTCGGTGGAAATGTTTCATAGCGAT
GGATCCGCCGAAACACGATGTGCAGCGCAGCTCGGTGCAGGGAGTAGTGGCACCAGAAAACT
GAAGGAGATGGAGGGGCTGATCCGATCACGCACCGGCGATGTGCTTGACAGCCTGCCTACAGA
CAAACCCTTTAACTGGGTACCTGCTGTTTTCCAAGGAACTCACAGGCCGCATGCTGGCGACGCT
TCTGGATTTTCCTTACGAGGAACGCCACAAGCTGGTTGAGTGGTCCGACAGAATGGCAGGTGC
AGCATCGGCCACCGGCGGGGAGTTTGCCGATGAAAATGCCATGTTTGACGACGCGGCAGACAT
GGCCCGGTCTTTCTCCAGGCTTTGGCGGGACAAGGAGGCGCGCCGCGCAGCAGGCGAGGAGCC
CGGTTTTCGATTTGATCAGCCTGTTGCAGAGCAACAAAGAAACGAAAGACCTGATCAATCGGCC
GATGGAGTTTATCGGTAATTTGACGCTGCTCATAAGTCCGGCGCAACGATACGACGCGCAACTC
GATGAGTGGTGGCCTGGTGGCCATGAACGAATTCACCAGGGAATTTGAAAAATTGAAGGCAA
AACCGGAGTTGATTCCGAACATGGTGTCCGAAATCATCCGCTGGCAAACGCCGCTGGCCTATA
TGCGCCGAATCGCCAAGCAGGATGTGCAACTGGGCGGCCAGACCATCAAGAAGGGTGATCGAG
TTGTCATGTGGTACGCGTCGGGTAACCGGGACGAGCGCAAATTTGACAACCCCGATCAGTTCA
TCATTGATCGCAAGGACGCACGAAACCACATGTCGTTCCGGCTATGGGGTTCACCGTTGCATGG
GCAACCGTCTGGCTGAACTGCAACTGCGCATCCTCTGGGAAGAAATACTCAAGCGTTTTGACA
ACATCGAAGTCGTCGAAGAGCCCGAGCGGGTGCAGTCCAACTTCGTGCGGGGCTATTCCAGGT
TGATGGTCAAACCTGACACCGAACAGTTA

Putidaredoxin reductase (CamA) from *Pseudomonas putida*

GTGAACGCAAACGACAGCGGCTGGGAAGGCAATATCCGGTTGGTGGGGGATGCGACGGTAAT
TCCCATCACCTACCACCGCTATCCAAAGCTTACTTGGCCGGCAAAGCCACAGCGGAAAGCCT
GTACCTGAGAACCCAGATGCCTATGCAGCGCAGAACATCCAACACTCGGAGGCACACAGGT
AACGGCTATCAACCGCGACCGACAGCAAGTAATCCTATCGGATGGCCGGGCACTGGATTACGA
CCGGCTGGTATTGGCTACCGGAGGGCGTCCAAGACCCCTACCGGTGGCCAGTGGCGCAGTTGG
AAAGGCGAACAACCTTTCGATACCTGCGCACACTCGAGGACGCCGAGTGCATTCGCCGGCAGCT
GATTGCGGATAACCGTCTGGTGGTGGTGGTGGCGGCTACATTGGCCTTGAAGTGGCTGCCAC
CGCCATCAAGGCGAACATGCACGTCACCCTGCTTGATACGGCAGCCCGGGTTCTGGAGCGGGT
TACCGCCCCGCCGGTATCGGCCTTTTACGAGCACCTACACCGCGAAGCCGGCGTTGACATACG
AACCGGCACGCAGGTGTGCGGGTTCGAGATGTCGACCGACCAACAGAAGGTTACTGCCGTCTT
CTGCGAGGACGGCACAAGGCTGCCAGCGGATCTGGTAATCGCCGGGATTGGCCTGATACCAA
CTGCGAGTTGGCCAGTGGGCGCCGGCCTGCAGGTTGATAACGGCATCGTGATCAACGAACACAT
GCAGACCTCTGATCCCTTGATCATGGCCGTCGGCGACTGTGCCCGATTTACAGTCAGCTCTA
TGACCGCTGGGTGCGTATCGAATCGGTGCCAATGCCTTGGAGCAGGCACGAAAGATCGCCGC
CATCCTCTGTGGCAAGGTGCCACGCGATGAGGCGGCGCCCTGGTTCTGGTCCGATCAGTATGA
GATCGGATTGAAGATGGTCGGACTGTCCGAAGGGTACGACCGGATCATTGTCCGCGGCTCTTT
GGCGCAACCCGACTTCAGCGTTTTCTACCTGCAGGGAGACCGGGTATTGGCGGTTCGATACAGT
GAACCGTCCAGTGGAGTTCAACCAGTCAAAACAAATAATCACGGATCGTTTGCCGGTTGAACC
AAACCTACTCGGTGACGAAAGCGTGCCGTTAAAGGAAATCATCGCCGCCGCCAAAGCTGAACT
GAGTAGTGCCTGA

Putidaredoxin (CamB) from *Pseudomonas putida*

ATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTCACATGATGGAACGCGTCGCGAACTGGATGTGGCGGATGG
CGTCAGCCTGATGCAGGCTGCAGTCTCCAATGGTATCTACGATATTGTCGGTGATTGTGGCGG
CAGCGCCAGCTGTGCCACCTGCCATGTCTATGTGAACGAAGCGTTCACGGACAAGGTGCCCCG
CGCCAACGAGCGGGAAATCGGCATGCTGGAGTGCGTACGGCCGAACTGAAGCCGAACAGCAG
GCTCTGCTGCCAGATCATCATGACGCCCCGAGCTGGATGGCATCGTGGTTCGATGTTCCCGATAG
GCAATGGTAA

Codonoptimiert Pfor116B3 aus *Rhodococcus ruber* DSM 44319

GTTCTGCAGCGTCAGCATCCGGTTACCATTGGTGAACCGAGCACCCGTAGCGTTAGCCGTACC
 GTTACCGTTGAACGTCTGGATCGTATTGTTGATGATGTTCTGCGTGTGTTCTGCGTGCACCG
 GCAGGTAATGCACTGCCTGCATGGACACCGGGTGCACATATTGATGTTGATCTGGGTGCACTG
 AGCCGTCAGTATAGCCTGTGTGGTGCACCTGATGCACCGACCTATGAAATTGCAGTTCTGCTG
 GATCCGGAAAGCCGTGGTGGTAGCCGTTATGTTTCATGAACAGCTGCGTGTGGTGGTAGCCTG
 CGTATTCGTGGTCCGCGTAATCATTTTGCACCTGGATCCGGATGCAGAACATTATGTTTTTGT
 GCCGGTGGTATTGGTATTACACCGGTGCTGGCAATGGCAGATCATGCACGTGCTCGTGGTTGG
 AGCTATGAACTGCATTATTGTGGTTCGTAATCGTAGCGGTATGGCATATCTGGAACGTGTTGC
 AGGTCATGGTGATCGTGCAGCTCTGCATGTTAGTGCCGAAGGCACCCGTGTTGATCTGGCAGC
 ACTGCTGGCAACACCGGTGAGCGGCACCCAGATTTATGCATGTGGTCCGGGTCGTCTGCTGGC
 AGGTCTGGAAGATGCAAGCCGTCATTGGCCTGATGGTGCACCTGCATGTTGAACATTTTACCAG
 CAGCCTGACCGCACTGGATCCTGACGTTGAACATGCATTTGATCTGGATCTGCGTGATAGTGG
 TCTGACCGTTCGTGTTGAACCGACCCAGACCGTTCTGGATGCACTGCGTGCAAATAATATTGA
 TGTCCGAGCGATTGCGAAGAGGGTCTGTGTGGTAGCTGTGAAGTTACCGTGCTGGAAGGTG
 AAGTTGATCATCGTGATACCGTTCTGACCAAAGCAGAACGTGCAGCAAATCGTCAGATGATG
 ACCTGTTGTAGCCGTGCATGTGGTGATCGTCTGACCCTGCGTCTGTAA

CoOx L7 (Cholinoxidase Variante L7) aus *Arthrobacter chlorophenicus*

ATGCACATCGATAACATCGAAAATCTGAGCGATCGCGGTTTTGATTATGTTGTTATTGGTGG
 TGGTAGTGCCGGTGCAGCAGTTGCAGCACGTCTGAGCGAAGATCCGGATGTTAGCGTTGCACT
 GGTTGAAGCAGGTCCGGATGATCGTAATATCCGGAAATTCTGCAGCTGGATCGTTGGATGG
 AACTGCTGGAAGCGGTTATGATTGGGATTATCCGATTGAACCGCAAGAAAATGGCAATAGC
 TTTATGCGTCATGCACGTGCCAAAGTTATGGGTGGTTGTAGCAGCCATAATAGCTGTATTGCA
 TTTTGGGCACCGCGTGAAGATCTGGATGAATGGGAAAGCAAATATGGTGCCACCGGTTGGAA
 TGCAGCAAATGCATGGCCTCTGTATAAACGTCTGGAAACCAATCAGGATGCAGGTCCTGATGC
 ACCGCATCATGGTGATAGCGGTCCGGTTCATCTGATGAATGTTCCGCCTGCAGATCCGAGCGG
 TGTTGCACTGCTGGATGCATGTGAAGAGGCAGGTATCCGCGTGCACGTTTTAATACCGGCAC
 CACCGTTGTTAATGGTGCAAACTTTTTTCAGATTAACCGTCGTGGTGATGGCACCCGTAGCAG
 CAGCAGCGTTAGCTATATTCATCCGATTATTGAACCGGATAACTTTACCCTGCTGACCGGTCT
 GCGTGCCCGTCAGCTGGTTTTTGTATGCAGATAAACGTTGTACCGGTGTTGAAGTTGTGGATGG
 TGCATTTGGTTCGTACCCATCGTCTGACCGCACGTCATGAAGTTATTCTGAGTACCGGTGCAAT

TGATAGCCCGAAACTGCTGATGCTGAGCGGTATTGGTCCGGCAGAACATCTGGCACAGCATGG
TATTGAAGTTCTGGTTGATAGTCCGGGTGTTGGTGAAAATCTGCAGGATCATCCTGAAGGTG
TTGTTCAGTTTGAAGCAAAACAGCCGATGGTTCAGACCAGCACCCAGTGGTGGGAAATTGGT
ATTTTTACCCCGACCGAAGATGGTCTGGATCGTCCGGATCTGATGATGCATTATGGTAGCGTT
CCGTTTGATATGAATACCCTGCGTCATGGTTATCCGACCACCGAAAATGGTTTTAGCCTGACC
CCGAATGTTACCCATGCACGTAGCCGTGGCACCGTTCGTCTGCGTAGTCGTGATTTTCGTGAT
AAACCGATGGTTGATCCGCGTTATTTTACCGATCCGGAAGGTCATGATATGCGTGTTATGGTT
GCGGGTATTTCGTAAAGCACGTGAAATTGCAGCACAGCCTGCAATGAGCGCATGGACCGGTCGT
GAACTGTCACCGGGTGTGGGTGCACAGACCGATGAAGAACTGCAGGATTATATTCGCAAAAC
CCATAACACCGTTTATCATCCGGTTGGTACAGTTCGTATGGGTGCAGATGATGATGGTATGAG
TCCGCTGGATGCCCGTCTGCGTGTTAAAGGTGTTACAGGTCTGCGCGTTGCAGATGCAAGCGT
TATGCCGGAACATGTTACCGTTAATCCGAACATTACCGTGATGATGATTGGTGAACGTTGTGC
CGATCTGATTAAGCAGATTATGCCGGTGCCGATGCACTGGAAGAAAAAGAACTGACCACCA
GTTTTGCCTAA

CYP153A_{P.sp.} aus *Polaromonas* sp. Stamm JS666 ATCC BAA-500

ATGCATCATCATCATCATAGTGAAGCGATTGTGGTAAACAACCAAAACGACCAAAGCAG
GGCATAACGCGATCCCCTTGAGGACATTGATGTAAGCAATCCGGAGCTGTTTCGCGACAATAC
GATGTGGGGTTATTTTGAAGCGTCTGCGCCGCGAAGACCCCGTGCATTACTGTAAGGACAGCTT
GTTTGGTCCGTAAGTGGTCCGTTCAAGGACATCATGCAGGTGGAGACCCATCCGGA
GATATTTTCATCCGAGGGCAATATCACCATCATGGAGTCCAATGCGGCGGTAACCCTGCCGAT
GTTTCATTGCGATGGATCCGCCAAGCACGACGTGCAGCGCATGGCGGTCAGTCCGATCGTGGC
GCCGGAGAACCTCGCCAAGCTCGAAGGTCTGATCCGCGAGCGTACCGGTCGTGCGCTGGATGG
CCTGCCGATCAACGAGACCTTTGACTGGGTCAAGCTCGTTTCGATCAACCTGACGACGCAGAT
GCTGGCGACGCTGTTTGATTTCCCTTGGAAGACCGTGCCAAGCTGACGCGCTGGTCCGATGT
CGCGACGGCGCTGGTCCGCACGGGCATTATTGATTCGGAAGAGCAGCGCATGGAGGAGCTCAA
GGGGTGCGTGCAATACATGACCCGGCTGTGGAACGAGCGCGTCAATGTGCCACCGGGCAATGA
TCTGATATCGATGATGGCGCACACCGAGTCCATGCGCAACATGACGCCGGAAGAGTTTCTGGG
CAACCTCATTTTGCTGATCGTCCGCGGCAATGACACGACCCGCAACTCGATGACCGGCGGCGT
GCTGGCGCTCAACGAAAATCCGGACGAATACCGCAAGCTGTGCGCCAACCCGGCGCTGATCGC
CTCCATGGTGCCGGAGATCGTTCGTTGGCAGACACCGCTGGCGCACATGCGGCGTACCGCGCT
GCAGGACACCGAGCTCGGCGGCAAGTCCATTGCAAGGGTGACAAGGTCATCATGTGGTATGT
CTCCGGCAACCGTGATCCCGAAGCGATTGAAAATCCGGACGCGTTCATCATTGATCGCGCCAA

GCCGCGCCATCACCTCTCGTTCGGTTTCGGCATTACACCGCTGCGTGGGCAACCGTCTCGCCGAG
TTGCAGCTGCGCATCGTTTGGGAGGAGTTGCTCAAGCGCTGGCCCAATCCAGGTCAGATCGAG
GTCGTTGGCGCGCCCGAGCGCGTGCTGTGCCCTTTGTGAAGGGCTATGAGTCGCTGCCCGTC
CGCATCAACGCTTGA

FadL (Fettsäuretransporter) aus *Escherichia coli*

ATGGTCATGAGCCAGAAAACCTGTTTACAAAGTCTGCTCTCGCAGTCGCAGTGGCACTTATC
TCCACCCAGGCCTGGTTCGGCAGGCTTTCAGTTAAACGAATTTTCTTCTCTGGCCTGGGCCGG
GCTTATTCAGGGGAAGGCGCAATTGCCGATGATGCAGGTAACGTCAGCCGTAACCCCGCATTG
ATTACTATGTTTGACCGCCCGACATTTTCTGCGGGTGCGGTTTATATTGACCCGGATGTAAAT
ATCAGCGGAACGTCTCCATCTGGTCGTAGCCTGAAAGCCGATAACATCGCGCCTACGGCATGG
GTTCCGAACATGCACTTTGTTGCACCGATTAACGACCAATTTGGTTGGGGCGCTTCTATTACC
TCTAACTATGGTCTGGCTACAGAGTTTAAACGATACTTATGCAGGCGGCTCTGTCCGGGGTACA
ACCGACCTTGAAACCATGAACCTGAACTTAAGCGGTGCGTATCGCTTAAATAATGCATGGAGC
TTTGGTCTTGGTTTCAACGCCGTCTACGCTCGCGCGAAAATTGAACGTTTCGCAGGCGATCTG
GGCAGTTGGTTGCTGGCCAAATTATGCAATCTCCTGCTGGCCAAACTCAGCAAGGGCAAGCA
TTGGCAGCTACCGCCAACGGTATTGACAGTAATAACAAAATCGCTCATCTGAACGGTAACCAG
TGGGGCTTTGGCTGGAACGCCGGAATCCTGTATGAACTGGATAAAAATAACCGCTATGCACTG
ACCTACCGTTCTGAAGTGAAAATTGACTTCAAAGGTAACCTACAGCAGCGATCTTAATCGTGCG
TTTAATAACTACGGTTTGCCAATTCCTACCGCGACAGGTGGCGCAACGCAATCGGGTTATCTG
ACGCTGAACCTGCCTGAAATGTGGGAAGTGTGAGGTTATAACCGTGTTGATCCACAGTGGGCG
ATTCACTATAGCCTGGCTTACACCAGCTGGAGTCAGTTCCAGCAGCTGAAAGCGACCTCAACC
AGTGGCGACACGCTGTTCCAGAAACATGAAGGCTTTAAAGATGCTTACCGCATCGCGTTGGGT
ACCACTTATTACTACGATGATAACTGGACCTTCCGTACCGGTATCGCCTTTGATGACAGCCCA
GTTTCTGCACAGAATCGTTCTATCTCCATTCGGACCAGGACCGTTTCTGGCTGAGTGCAGGT
ACGACTTACGCATTTAATAAAGATGCTTCAGTCGACGTTGGTGTTTCTTATATGCACGGTCAG
AGCGTGAAAATTAACGAAGGCCCATACCAGTTCGAGTCTGAAGGTAAAGCCTGGCTGTTCCG
TACTAACTTTAACTACGGGTTCTGA

Verwendete Oligonukleotide und Plasmide**Tabelle 15:** Oligonukleotide für die ortsspezifische und Sättigungs- Mutagenese.

Mutation		Sequenz (5'- nach 3'-Richtung)
L139A	fwd	CTCCGGAGGGGGCGTCCGGTGGAAATGTTTCATA
	rev	TATGAACATTTCCACCGACGCCCCCTCCGGA
L139W	fwd	GACCCTCCGGAGGGGTGGTCCGGTGGAAATGTTTC
	rev	GAACATTTCCACCGACCACCCCTCCGGAGGGTC
M252A	fwd	GACGACGCGGCAGACGCGGCCCGGTCTTTCTCCAG
	rev	CTGGAGAAAGACCGGGCCGCGTCTGCCGCGTCGTC
M252W	fwd	GACGACGCGGCAGACTGGGCCCGGTCTTTCTCCAG
	rev	CTGGAGAAAGACCGGGCCAGTCTGCCGCGTCGTC
F246A	fwd	CGATGAAAATGCCATGGCCGACGACGCGGCAGAC
	rev	GTCTGCCGCGTCGTCGGCCATGGCATTTTCATCG
F246W	fwd	CGATGAAAATGCCATGTGGGACGACGCGGCAGAC
	rev	GTCTGCCGCGTCGTCACATGGCATTTTCATCG
A249W	fwd	CATGTTTGACGACTGGGCAGACATGGCCCCGGTC
	rev	GACCGGGCCATGTCTGCCAGTCGTCAAACATG
I298A	fwd	CGGCCGATGGAGTTTGCCGGTAATTTGACGCTG
	rev	CAGCGTCAAATTACCGGCAAACCTCCATCGGCCG
I298W	fwd	CGGCCGATGGAGTTTGGGGTAATTTGACGCTG
	rev	CAGCGTCAAATTACCCAAAACCTCCATCGGCCG
T302A	fwd	GTTTATCGGTAATTTGGCGCTGCTCATAGTCGGC
	rev	GCCGACTATGAGCAGCGCCAAATTACCGATAAAC
T302W	fwd	GTTTATCGGTAATTTGTGGCTGCTCATAGTCGGC
	rev	GCCGACTATGAGCAGCCACAAATTACCGATAAAC
M143A	fwd	GGCTGTCGGTGGAAGCGTTCATAGCGATGGATC
	rev	GATCCATCGCTATGAACGCTTCCACCGACAGCC
M143W	fwd	GCTGTCGGTGGAATGGTTCATAGCGATGG
	rev	CCATCGCTATGAACCATTCCACCGACAGC
A146W	fwd	CGGTGGAATGTTTCATATGGATGGATCCGCCGA
	rev	TCCGCGGATCCATCCATATGAACATTTCCACCG
M228A	fwd	GAGTGGTCCGACAGAGCGGCAGGTGCAGCATCG
	rev	CGATGCTGCACCTGCCGCTCTGTCCGACCACTC
M228W	fwd	GAGTGGTCCGACAGATGGGCAGGTGCAGCATC
	rev	GATGCTGCACCTGCCATCTGTCCGACCACTC
Q129A	fwd	GTTTTCCGCCGAGCCGGCAATCATTCTCGGTG
	rev	CACCGAGAATGATTGCCGGCTCCGGCGAAAAC
Q129W	fwd	CCGCCGAGCCGTGGATCATTCTCGG
	rev	CCGAGAATGATCCACGGCTCGGCCG
S140A	fwd	TCCGGAGGGGCTGGCGGTGGAAATGTTTCAT
	rev	ATGAACATTTCCACCGCCAGCCCCCTCCGGA
S140W	fwd	CCGGAGGGGCTGTGGGTGGAAATGTTTC
	rev	GAACATTTCCACCCACAGCCCCCTCCGG

Mutation		Sequenz (5'- nach 3'-Richtung)
V141A	fwd	CCGAGGGGCTGTCGGCGGAAATGTTTCATAGC
	rev	GCTATGAACATTTCCGCCGACAGCCCCTCCGG
V141W	fwd	CGGAGGGGCTGTCGTGGGAAATGTTTCATAGC
	rev	GCTATGAACATTTCCCACGACAGCCCCTCCG
E142A	fwd	AGGGGCTGTCGGTGGCAATGTTTCATAGCGATGG
	rev	CCATCGCTATGAACATTGCCACCGACAGCCCCT
E142W	fwd	GAGGGGCTGTCGGTGTGGATGTTTCATAGCGATG
	rev	CATCGCTATGAACATCCACACCGACAGCCCCTC
I130A	fwd	CGCCGAGCCGCAAGCCATTCTCGGTGAC
	rev	GTCACCGAGAATGGCTTGGCGCTCGGCG
I130W	fwd	CGCCGAGCCGCAATGGATTCTCGGTGAC
	rev	GTCACCGAGAATCCATTGGCGCTCGGCG
D226A	fwd	CTGGTTGAGTGGTCGGCCAGAATGGCAGGTG
	rev	CACCTGCCATTCTGGCCGACCACTCAACCAG
D226W	fwd	CTGGTTGAGTGGTCGTGGAGAATGGCAGGTG
	rev	CACCTGCCATTCTCCACGACCACTCAACCAG
V306A	fwd	GACGCTGCTCATAGCCGGCGGCAACG
	rev	CGTTGCCGCCGCTATGAGCAGCGTC
V306W	fwd	GACGCTGCTCATATGGGGCGGCAACG
	rev	CGTTGCCGCCCCATATGAGCAGCGTC
D310A	fwd	GTCGGCGGCAACGCTACGACGCGCAACTC
	rev	GAGTTGCGCGTCGTAGCGTTGCCGCCGAC
D310W	fwd	GTCGGCGGCAACTGGACGACGCGCAACTC
	rev	GAGTTGCGCGTCGTCCAGTTGCCGCCGAC
V451A	fwd	GAGCCCGAGCGGGCGCAGTCCAACCTCGTG
	rev	CACGAAGTTGGACTGCGCCCCTCGGGCTC
V451W	fwd	GAGCCCGAGCGGTGGCAGTCCAACCTCGTG
	rev	CACGAAGTTGGACTGCCACCGCTCGGGCTC
V456A	fwd	CAGTCCAACCTTCGCGCGGGGCTATTCCAGG
	rev	CCTGGAATAGCCCCGCGGAAGTTGGACTG
V456W	fwd	CAGTCCAACCTTCTGGCGGGGCTATTCCAGG
	rev	CCTGGAATAGCCCCGCCAGAAGTTGGACTG
V141I	fwd	CGGAGGGGCTGTCGATCGAAATGTTTCATAG
	rev	CTATGAACATTTTCGATCGACAGCCCCTCCG
M228L	fwd	GTGGTCGGACAGACTGGCAGGTGCAGC
	rev	GCTGCACCTGCCAGTCTGTCCGACCAC
Q129N	fwd	CCGCCGAGCCGAACATCATTCTCGG
	rev	CCGAGAATGATGTTCCGGCTCGGCGG
Q129R	fwd	CTGTTTTCCGCCGAGCCGCTATCATTCTCGGTGAC
	rev	GTCACCGAGAATGATACGCGCTCGGCCGAAAACAG
M228T	fwd	GTGGTCGGACAGAACGGCAGGTGCAGCATC
	rev	GATGCTGCACCTGCCGTTCTGTCCGACCAC

Mutation		Sequenz (5'- nach 3'-Richtung)
V141L	fwd	CGGAGGGGCTGTCGCTGGAAATGTTTCATAG
	rev	CTATGAACATTTCCAGCGACAGCCCCCTCCG
M228A	fwd	GAGTGGTCGGACAGAGCGGCAGGTGCAGCATCG
	rev	CGATGCTGCACCTGCCGCTCTGTCCGACCACTC
Q129X (22c-trick)	fwd 1	CTGTTTTCCGCCGAGCCGndtATCATTCTCGGTGACCCTCCG
	fwd 2	CTGTTTTCCGCCGAGCCGvhgATCATTCTCGGTGACCCTCCG
	fwd 3	CTGTTTTCCGCCGAGCCGtggATCATTCTCGGTGACCCTCCG
	rev	CGGCTCGGCGGAAAACAGGTCGTGACTCTTATCCACGAACAGG
V141X (22c-trick)	fwd 1	CTCCGGAGGGGCTGTTCGndtGAAATGTTTCATAGCGATGGATCCG
	fwd 2	CTCCGGAGGGGCTGTTCGvhgGAAATGTTTCATAGCGATGGATCCG
	fwd 3	CTCCGGAGGGGCTGTTCGtggGAAATGTTTCATAGCGATGGATCCG
	rev	CGACAGCCCCCTCCGGAGGGTCACCGAGAATGATTTGCCGGC
M228X (22c-trick)	fwd 1	GCTGGTTGAGTGGTCGGACAGAndtGCAGGTGCAGCATCG
	fwd 2	GCTGGTTGAGTGGTCGGACAGAvhgGCAGGTGCAGCATCG
	fwd 3	GCTGGTTGAGTGGTCGGACAGAtggGCAGGTGCAGCATCG
	rev	TCTGTCCGACCACTCAACCAGCTTGTGGCGTTCCCTCGTAAGGAAAATC
V141M	fwd	CGGAGGGGCTGTCGATGGAAATGTTTCATAG
	rev	CTATGAACATTTCCATCGACAGCCCCCTCCG

Tabelle 16: Oligonukleotide für die Klonierung von CYP153A_{M,aa} in pBAD33 und Sequenzierungsprimer.

		Sequenz (5'- nach 3'-Richtung)
pBAD33_gibs	fwd	CCGTCCGCATCAACGCTTGAAGCTTGGCTGTTTTGGCG
	rev	ACCACAATCGCTTCACTCATTGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAGCT
Maq_gibs	fwd	TGGTACCAGGAGGATTACATATGCCAACACTGCCCAGAACATTTGACGA CATTCACTCC
	rev	TCCGCCAAAACAGCCAAGCTTCAACTGTTCCGGTGTGAGTTTACCATCA ACCTGGAATAGCCCCGC
pBAD-FP		ATGCCATAGCATTTTTATCC
T7minus1		AATACGACTCACTATAGGG
pET-RP		CTAGTTATTGCTCAGCGG
pTI2-1-2		GCGTTTCACTTCTGAGTTCG
pET-T7side		GGGAATTGTGAGCGGATAAC
T7term		TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
pBR3		TCCCCATCGGTGATGTC
M13-FP		CAGGAAACAGCTATGACC
pKK223 - 3 -for		GGCGTTTCACTTCTGAGTTC
pRSET-RP		ATGCTAGTTATTGCTCAGC

Tabelle 17: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

ITB Nr.	Plasmid	Relevante Inserts	Referenz
pITB897	pET28a(+)	-	Novagen, Madison, USA
pITB372	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq}	Daniel Scheps, Uni Stuttgart
pITB692	pET28a(+)	CamA	Marco Girhard, Uni Stuttgart
pITB691	pET28a(+)	CamB	Stuttgart
pITB1158	pJeM1	-	Marko Kirtz, Uni Stuttgart
pITB1159	pJeM1	FadB2	Stuttgart
pITB1281	pET28a(+)	CoOx L7	Sarah-Luise Lang, Uni Stuttgart
pITB1319	pBAD33	CYP153A _{M.aq} -PFOR L2	Sara Hoffmann, Uni Stuttgart
pITB1416	pBAD18	FadL	Stuttgart
pITB1776	pBAD18	CamA + CamB	Jan Klenk, Uni Stuttgart
pITB1405	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129R	Sara Hoffmann, Uni Stuttgart
pITB1408	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129A	Sara Hoffmann, Uni Stuttgart
pITB1415	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} A231G	Sara Hoffmann, Uni Stuttgart
pITB1557	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} S140A	Sara Hoffmann, Uni Stuttgart
pITB1560	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141A	Sara Hoffmann, Uni Stuttgart
pITB1563	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} E142A	
pITB1985	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} L139W	Betreute
pITB1991	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M252A	Bachelorarbeit Steffen
pITB1992	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M252W	Bulach, Uni Stuttgart
pITB1988	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} F246A	
pITB1989	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} F246W	

ITB Nr.	Plasmid	Relevante Inserts	Referenz
pITB1990	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} A249W	
pITB1993	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} I298A	
pITB1994	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} I298W	Betreute
pITB1995	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} T302A	Bachelorarbeit Steffen
pITB1996	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} T302W	Bulach, Uni Stuttgart
pITB1986	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M143W	
pITB1987	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M228W	
pITB5938	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} I130A	Diese Arbeit
pITB5939	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} L139A	Diese Arbeit
pITB5940	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} S140W	Diese Arbeit
pITB5941	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141W	Diese Arbeit
pITB5942	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M143A	Diese Arbeit
pITB5943	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} A146W	Diese Arbeit
pITB5944	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M228A	Diese Arbeit
pITB5945	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129W	Diese Arbeit
pITB5946	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} E142W	Diese Arbeit
pITB5947	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} I130W	Diese Arbeit
pITB5948	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} D226A	Diese Arbeit
pITB5949	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} D226W	Diese Arbeit
pITB5950	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V306A	Diese Arbeit
pITB5951	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V306W	Diese Arbeit
pITB5952	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} D310A	Diese Arbeit
pITB5953	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} D310W	Diese Arbeit
pITB5954	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V451A	Diese Arbeit
pITB5955	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V451W	Diese Arbeit
pITB5956	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V456A	Diese Arbeit
pITB5957	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V456W	Diese Arbeit
pITB5958	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141I	Diese Arbeit
pITB5959	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141L	Diese Arbeit
pITB5960	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141M	Diese Arbeit

ITB Nr.	Plasmid	Relevante Inserts	Referenz
pITB5961	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M228L	Diese Arbeit
pITB5962	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} M228T	Diese Arbeit
pITB5963	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129N	Diese Arbeit
pITB5964	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129N/M228A	Diese Arbeit
pITB5965	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129N/M228L	Diese Arbeit
pITB5966	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129R/M228T	Diese Arbeit
pITB5967	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141I/M228L	Diese Arbeit
pITB5968	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141L/M228A	Diese Arbeit
pITB5969	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141M/M228A	Diese Arbeit
pITB5970	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} V141M/M228T	Diese Arbeit
pITB5971	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129N/V141L/M228A	Diese Arbeit
pITB5972	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129R/V141M/M228T	Diese Arbeit
pITB5973	pET28a(+)	CYP153A _{M.aq} Q129R/V141L/M228T	Diese Arbeit
pITB5974	pBAD33	CYP153A _{M.aq}	Diese Arbeit
pITB5975	pBAD33	M.aqRLT-PFOR L2 Q129R/V141L/M228T	Diese Arbeit
pITB5976	pBAD33	M.aqAA-PFOR L2 V141A/M228A	Diese Arbeit
pITB5977	pBAD33	M.aqE-PFOR L2 Q129E	Diese Arbeit

ITB Nr.	Plasmid	Relevante Inserts	Referenz
pITB5978	pBAD33	M.aqEE-PFOR L2 Q129E/M228E	Diese Arbeit
pITB5979	pBAD33	M.aqESE-PFOR L2 Q129E/V141S/M228E	Diese Arbeit

Plasmidkarten der verwendeten Konstrukte

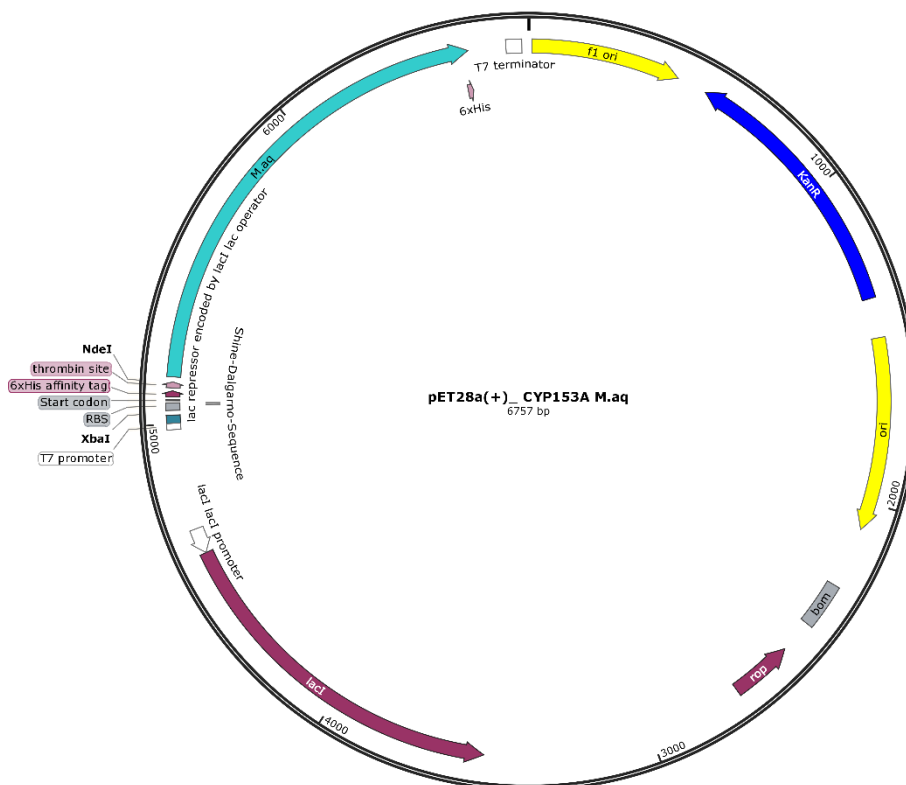


Abbildung 40: Plasmidkarte des Vektors pET28a(+) mit Gen-Insert CYP153A_{M.aq}.

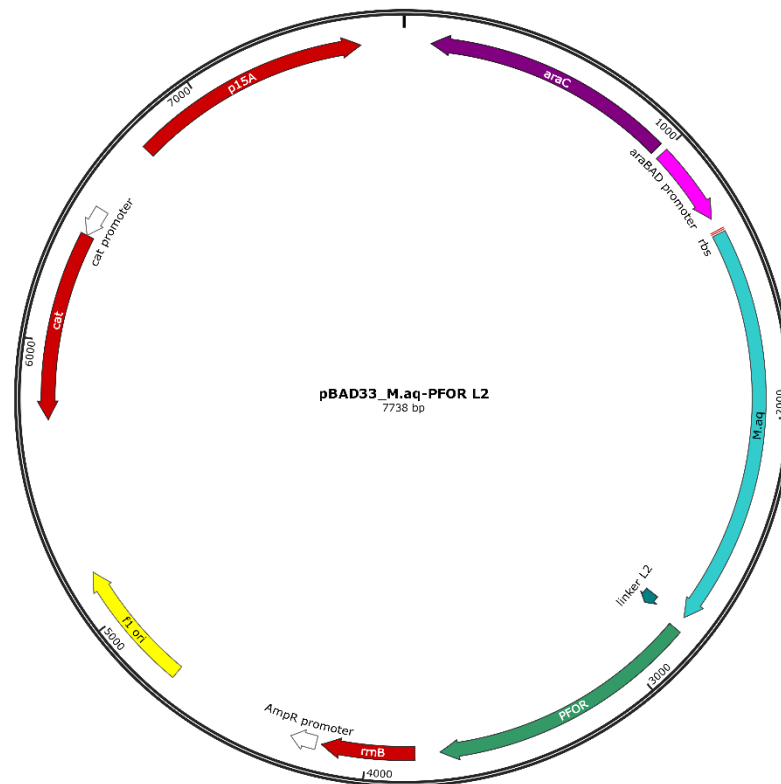


Abbildung 41: Plasmidkarte des Vektors pBAD33 mit Fusionskonstrukt Gen-Insert CYP153A_{M.aq}-PFOR L2.

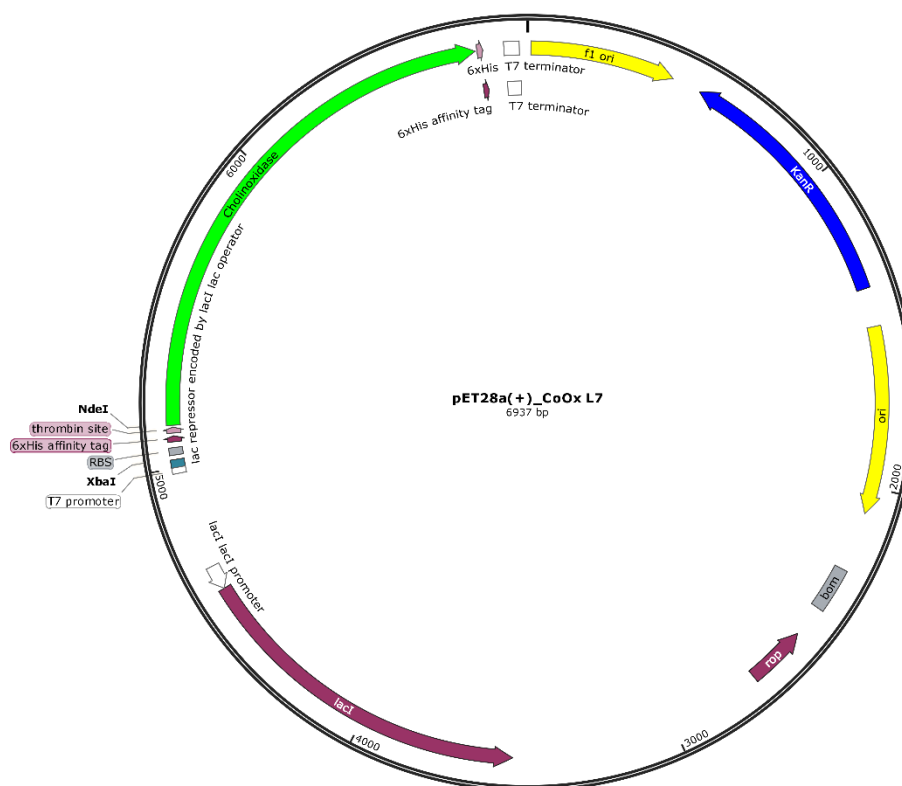


Abbildung 42: Plasmidkarte des Vektors pET28a(+) mit Gen-Insert CoOx L7.

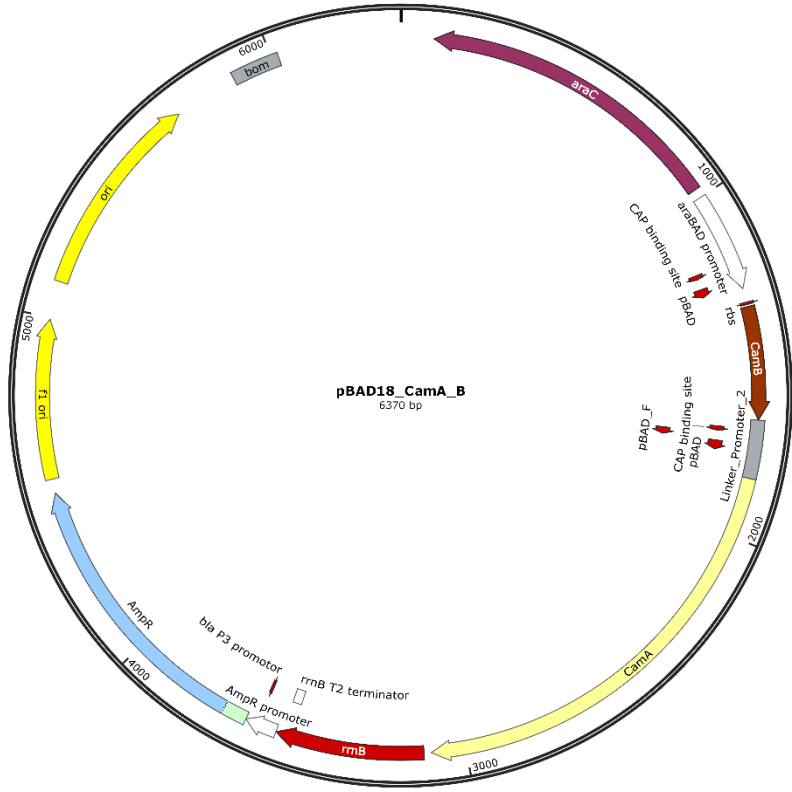


Abbildung 43: Plasmidkarte des Vektors pBAD18 mit Gen-Insert CamA und CamB.

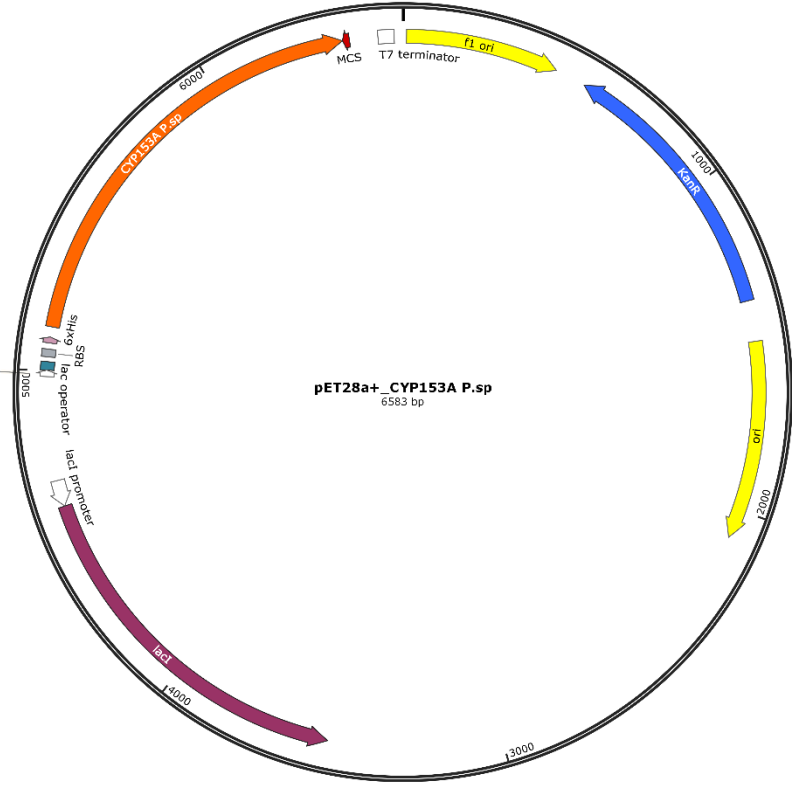


Abbildung 44: Plasmidkarte des Vektors pET28a(+) mit Gen-Insert CYP153A_{P.sp}.

Weitere Daten

Tabelle 18: Produktbildung der generierten Varianten hinsichtlich der Fettsäuren Octansäure, Dodecansäure und Hexadecansäure. Produktbildungen sind als die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten angegeben und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung. Nicht bestimmt (n.b.)

Variante	ω -Hydroxy- octansäure (μM)	ω -Hydroxy- dodecansäure (μM)	ω -Hydroxy- hexadecansäure (μM)
M228A	8,7 \pm 0,9	329,3 \pm 29,7	255,1 \pm 14,6
M228W	5,2 \pm 0,8	335,3 \pm 34,1	16,5 \pm 4,4
L139A	0,3 \pm 0,4	9,1 \pm 5,0	9,7 \pm 2,6
L139W	1,4 \pm 0,7	10,0 \pm 2,0	9,8 \pm 3,5
F246A	0,1 \pm 0,1	10,3 \pm 4,0	3,7 \pm 0,5
F246W	12,5 \pm 3,1	251,8 \pm 37,0	91,9 \pm 9,2
A249W	0,1 \pm 0,1	17,6 \pm 10,0	4,6 \pm 0,6
M252A	1,1 \pm 0,2	51,1 \pm 21,0	89,1 \pm 35,3
M252W	2,5 \pm 0,5	30,9 \pm 14,0	91,3 \pm 24,9
I298A	0,3 \pm 0,5	16,0 \pm 4,0	37,0 \pm 5,4
I298W	0,2 \pm 0,1	2,6 \pm 1,0	10,9 \pm 2,7
T302A	0,8 \pm 0,1	72,9 \pm 12,0	78,9 \pm 17,1
T302W	2,2 \pm 0,5	96,6 \pm 11,0	22,8 \pm 3,6
Q129A	20,2 \pm 5,7	481,7 \pm 65,8	196,4 \pm 16,9
Q129W	1,6 \pm 0,9	21,6 \pm 11,6	46,0 \pm 11,9
I130A	1,1 \pm 0,6	137,4 \pm 18,8	184,4 \pm 30,4
I130W	0,2 \pm 0,3	2,0 \pm 1,4	1,9 \pm 2,2
S140A	36,9 \pm 8,7	531,4 \pm 89,7	194,5 \pm 48,3
S140W	2,0 \pm 0,4	118,7 \pm 4,1	77,9 \pm 13,5
V141A	29,4 \pm 2,6	640,9 \pm 50,6	131,3 \pm 56,3
V141W	9,7 \pm 1,9	1437 \pm 9,1	103,0 \pm 12,2
E142A	11,6 \pm 4,4	503,0 \pm 4,2	145,0 \pm 44,2
E142W	5,8 \pm 1,1	236,2 \pm 12,3	107,7 \pm 25,7
M143A	4,3 \pm 0,6	31,7 \pm 6,3	20,7 \pm 1,5
M143W	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,0	0,5 \pm 0,3
A146W	0,7 \pm 0,4	0,8 \pm 0,3	0,4 \pm 0,4
D226A	4,0 \pm 0,6	41,3 \pm 5,9	26,7 \pm 7,0

Variante	ω -Hydroxy- octansäure (μM)	ω -Hydroxy- octansäure (μM)	ω -Hydroxy- octansäure (μM)
D226W	2,0 \pm 0,4	8,1 \pm 1,1	22,0 \pm 2,4
V306A	0,4 \pm 0,1	3,4 \pm 2,0	10,2 \pm 0,2
V306W	0,4 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2
D310A	1,7 \pm 0,2	4,8 \pm 1,6	1,9 \pm 0,1
D310W	1,6 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1
V451A	10,0 \pm 0,8	238,7 \pm 12,0	170,4 \pm 7,8
V451W	36,0 \pm 1,9	257,0 \pm 12,8	280,4 \pm 31,5
V456A	30,1 \pm 0,7	220,5 \pm 4,8	210,0 \pm 22,8
V456W	2,2 \pm 0,5	2,8 \pm 1,2	5,4 \pm 3,9
V141L	117,9 \pm 16,4	n.b.	n.b.
Q129N	36,0 \pm 4,6	n.b.	n.b.
M228L	64,9 \pm 6,3	n.b.	n.b.
V141I	17,0 \pm 0,8	n.b.	n.b.
M228T	55,2 \pm 1,6	n.b.	n.b.
V141M	51,5 \pm 6,2	n.b.	n.b.
Q129R	54,5 \pm 3,0	n.b.	n.b.
Q129N/M228A	79,9 \pm 7,2	n.b.	n.b.
Q129N/M228L	65,8 \pm 16,8	n.b.	n.b.
Q129R/M228T	196,3 \pm 6,4	n.b.	n.b.
V141I/M228L	9,1 \pm 1,3	n.b.	n.b.
V141L/M228A	62,7 \pm 1,8	n.b.	n.b.
V141M/M228A	59,2 \pm 10,2	n.b.	n.b.
V141M/M228T	65,4 \pm 4,8	n.b.	n.b.
Q129N/V141L /M228A	115,8 \pm 7,3	n.b.	n.b.
Q129R/V141M /M228T	144,9 \pm 23,3	n.b.	n.b.
Q129R/V141L /M228T	244,2 \pm 8,1	n.b.	n.b.

Tabelle 19: Produktbildung der generierten Varianten hinsichtlich der *n*-Octan (Produkte: 1-Octanol und 1,8-Octandiol) und *trans*-2-Octen (Produkt *trans*-2-Octen-1-ol). Produktbildungen sind als die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten angegeben und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

Variante	1-Octanol (μM)	1,8-Octandiol (μM)	<i>trans</i> -2-Octen-1-ol (μM)
M228A	15,2 \pm 5,2	63,2 \pm 5,0	0,6 \pm 0,2
M228W	2,8 \pm 0,3	23,4 \pm 2,8	3,6 \pm 0,6
L139A	8,3 \pm 2,4	<0,01 \pm <0,01	<0,01 \pm <0,01
L139W	4,9 \pm 1,9	2,7 \pm 0,8	<0,01 \pm <0,01
F246A	3,0 \pm 0,7	<0,01 \pm <0,01	<0,01 \pm <0,01
F246W	0,6 \pm 0,2	41,8 \pm 8,3	0,9 \pm 0,7
A249W	2,5 \pm 0,7	3,4 \pm 2,2	<0,01 \pm <0,01
M252A	4,6 \pm 1,1	3,6 \pm 0,9	1,1 \pm 0,1
M252W	3,6 \pm 1,9	12,3 \pm 1,5	1,8 \pm 1,0
I298A	3,1 \pm 0,9	<0,01 \pm <0,01	<0,01 \pm <0,01
I298W	0,6 \pm 0,1	<0,01 \pm <0,01	<0,01 \pm <0,01
T302A	13,1 \pm 7,0	8,6 \pm 2,1	3,5 \pm 0,2
T302W	1,9 \pm 0,2	18,6 \pm 2,6	1,4 \pm 0,7
Q129A	1,3 \pm 0,4	59,0 \pm 15,0	1,0 \pm 0,3
Q129W	2,0 \pm 1,0	8,5 \pm 2,5	4,2 \pm 0,0
I130A	5,7 \pm 3,5	3,8 \pm 3,8	4,9 \pm 0,1
I130W	2,3 \pm 0,1	<0,01 \pm <0,01	<0,01 \pm <0,01
S140A	0,5 \pm 0,4	29,4 \pm 2,9	1,1 \pm 0,9
S140W	2,7 \pm 0,4	2,7 \pm 1,3	6,8 \pm 1,4
V141A	2,3 \pm 1,2	42,6 \pm 8,6	3,4 \pm 0,9
V141W	0,6 \pm 0,0	27,3 \pm 9,1	0,6 \pm 0,1
E142A	0,6 \pm 0,4	26,0 \pm 4,0	1,8 \pm 0,8
E142W	3,3 \pm 1,4	13,2 \pm 3,2	4,1 \pm 1,9
M143A	0,4 \pm 0,2	39,3 \pm 9,3	<0,01 \pm <0,01
M143W	0,1 \pm 0,1	1,8 \pm 1,4	<0,01 \pm <0,01
A146W	0,6 \pm 0,2	<0,01 \pm <0,01	<0,01 \pm <0,01

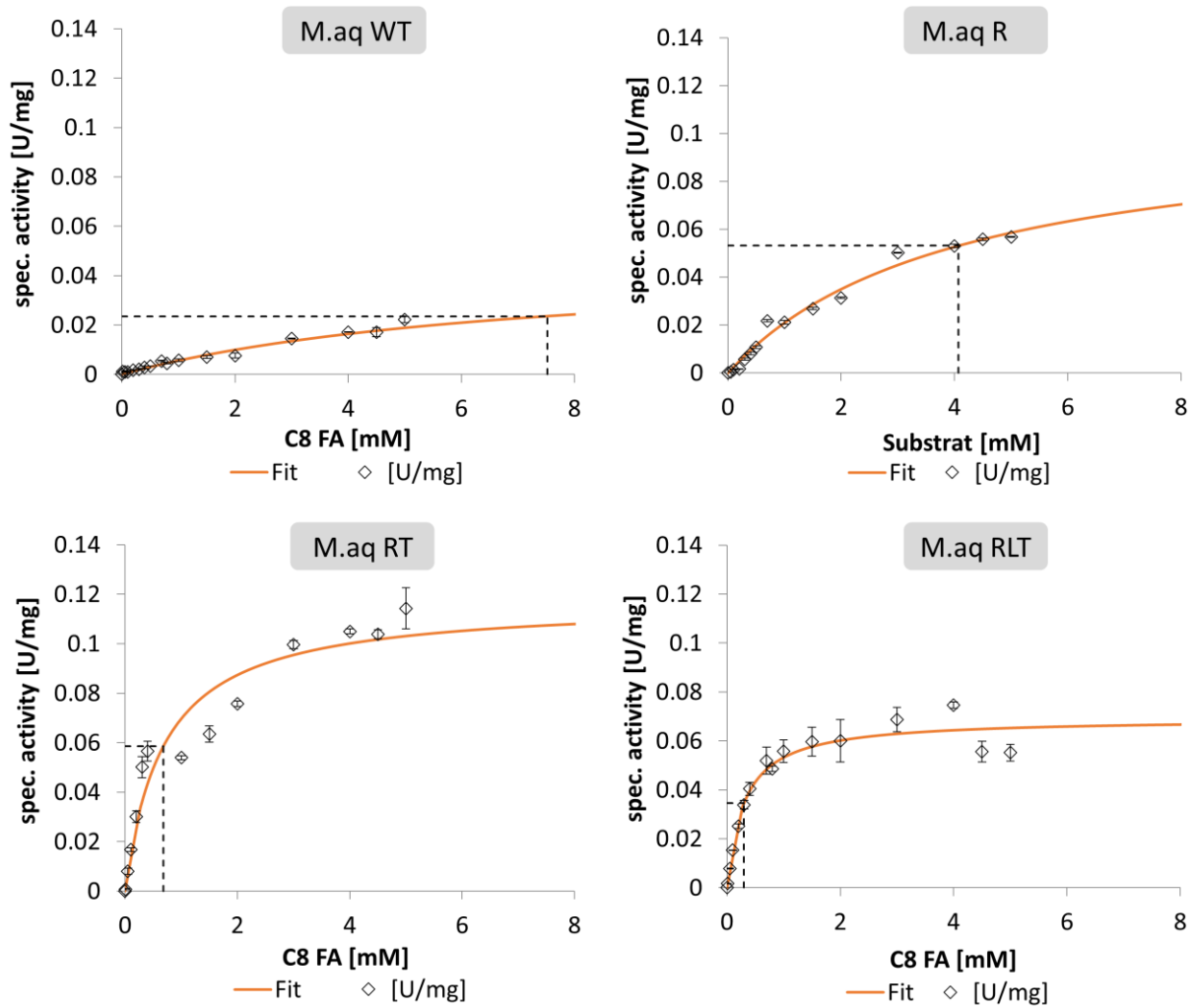


Abbildung 45: Michaelis-Menten-Fit an Daten aus kinetischen Messungen von M.aqWT und den Varianten M.aqRT und M.aqRLT unter Verwendung des Excel-Solver-Plugins. Die Datenpunkte stellen die jeweiligen Mittelwerte aus Triplikaten dar und die Fehlerbalken repräsentieren die daraus resultierende Standardabweichung.

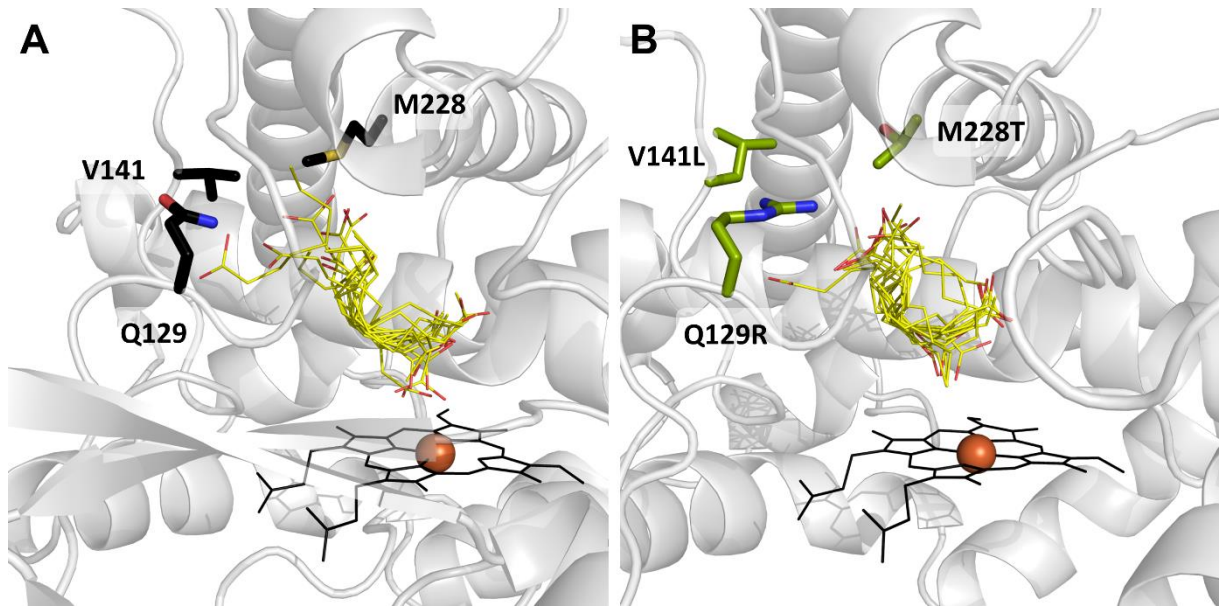


Abbildung 47: Docking-Analyse mit dem Liganden Octansäure in M.aqWT (A) und M.aqRLT (B). Die adressierten Seitenketten sind als *sticks* in M.aqWT (schwarz) und der Variante M.aqRLT (grün) dargestellt. Die jeweils 15 besten Docking-Modi der Octansäure (gelb) sind gezeigt. Das Häm ist als schwarze *sticks* und das Eisen als orangefarbene Kugel dargestellt.

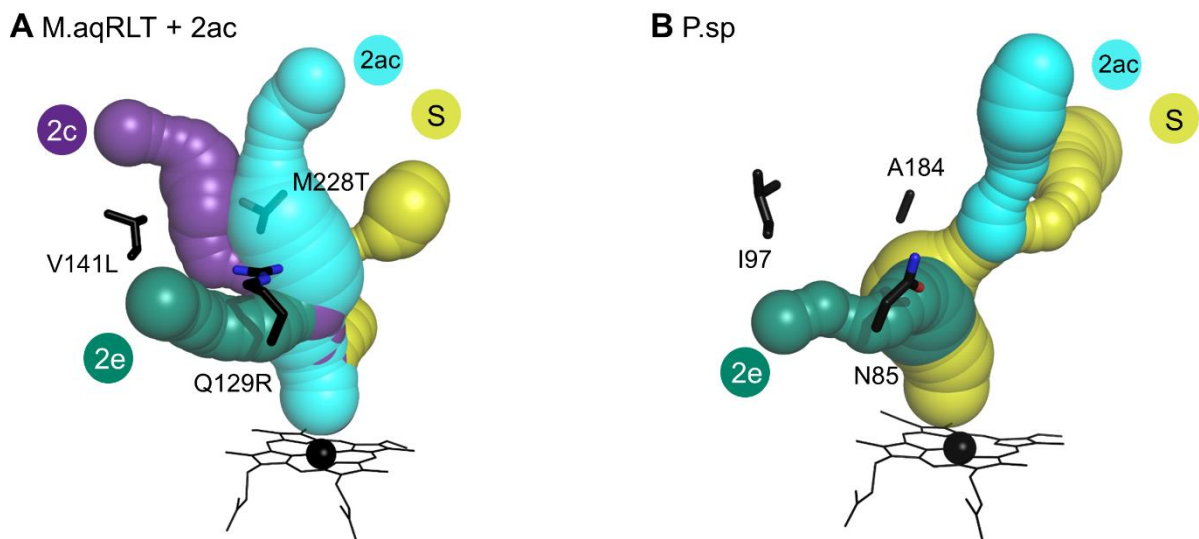


Abbildung 48: Tunneltopologien der Strukturen von M.aqRLT einschließlich Tunnel 2ac aus den MD-Simulationen (A) und CYP153A_{P.sp} (P.sp) (B). Substituierte Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt und die Tunnel 2c (violett), S (gelb), 2e (grün) und 2ac (cyan) als Kugeln mit berechneten Radien. Das Häm ist als schwarze *sticks* und das Eisen als eine Kugel dargestellt. Die Tunnel wurden mit der Software CAVER 3.0.3 berechnet.

Tabelle 21: Parameter der Tunnel und B-Faktoren der relevanten Loops gemittelt über 4 einzelne MD-Simulationen von M.aqWT und der Variante M.aqRLT mit und ohne die gebundene Octansäure. Die Fehler repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.

	M.aqWT			M.aqWT + Oct			M.aqRLT			M.aqRLT + Oct		
Mutation	-						Q129R, V141L, M228T					
Tunnel	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac
Tunnel [%]	33,8 ± 11	94,9 ± 4	23,8 ± 4	75,5 ± 6	98,0 ± 1	27,8 ± 3	85,0 ± 10	93,9 ± 4	26,1 ± 21	94,9 ± 2	85,4 ± 12	13,2 ± 8
Tunnel offen [%]	1,1 ± 0,7	8,7 ± 4,4	0,2 ± 0,1	4,4 ± 2,0	9,0 ± 1,7	0,1 ± 0,08	19 ± 11,4	12 ± 4,4	0,9 ± 0,7	18 ± 5,7	5,6 ± 2,8	0,1 ± 0,07
Bottleneck Radius [Å]	1,1 ± 0,14	1,2 ± 0,14	1,0 ± 0,11	1,1 ± 0,15	1,2 ± 0,14	1,0 ± 0,11	1,2 ± 0,17	1,2 ± 0,13	1,1 ± 0,14	1,3 ± 0,16	1,2 ± 0,14	1,0 ± 0,11
Länge [Å]	26,4 ± 3,4	19,1 ± 2,0	29,1 ± 2,2	25,4 ± 3,2	19,7 ± 2,0	29,1 ± 2,4	23,3 ± 2,6	21,8 ± 2,1	28,6 ± 3,0	23,6 ± 2,3	20,6 ± 2,0	28,3 ± 2,3
Loop	BC		FG		BC		FG		BC		FG	
B-Factor Peak	127,4 ± 47,8	31,1 ± 3,1	144,1 ± 109,6	52,8 ± 16,3	91,9 ± 20,4	96,8 ± 22,7	90,2 ± 29,4	47,0 ± 38,3				

Daten wurden als Mittelwerte aus 80 000 *Frames* für die mit einem Radius von 0,9 Å gefundenen Tunnel gesammelt. Tunnel mit einem *Bottleneck* $\geq 1,4$ Å Radius wurden als offen definiert.

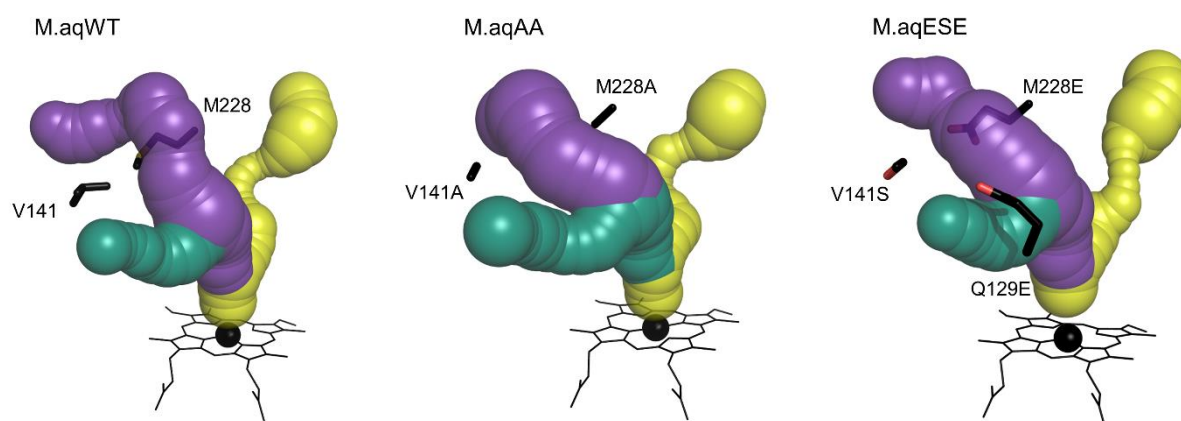


Abbildung 49: Tunneltopologien der Strukturen von M.aqWT, M.aqAA und M.aqESE im direkten Vergleich. Substituierte Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt und die Tunnel 2c (violett), S (gelb) und 2e (grün) als Kugeln mit berechneten Radien. Das Häm ist als schwarze *sticks* und das Eisen als eine Kugel dargestellt. Die Tunnel wurden mit der Software CAVER 3.0.3 berechnet.

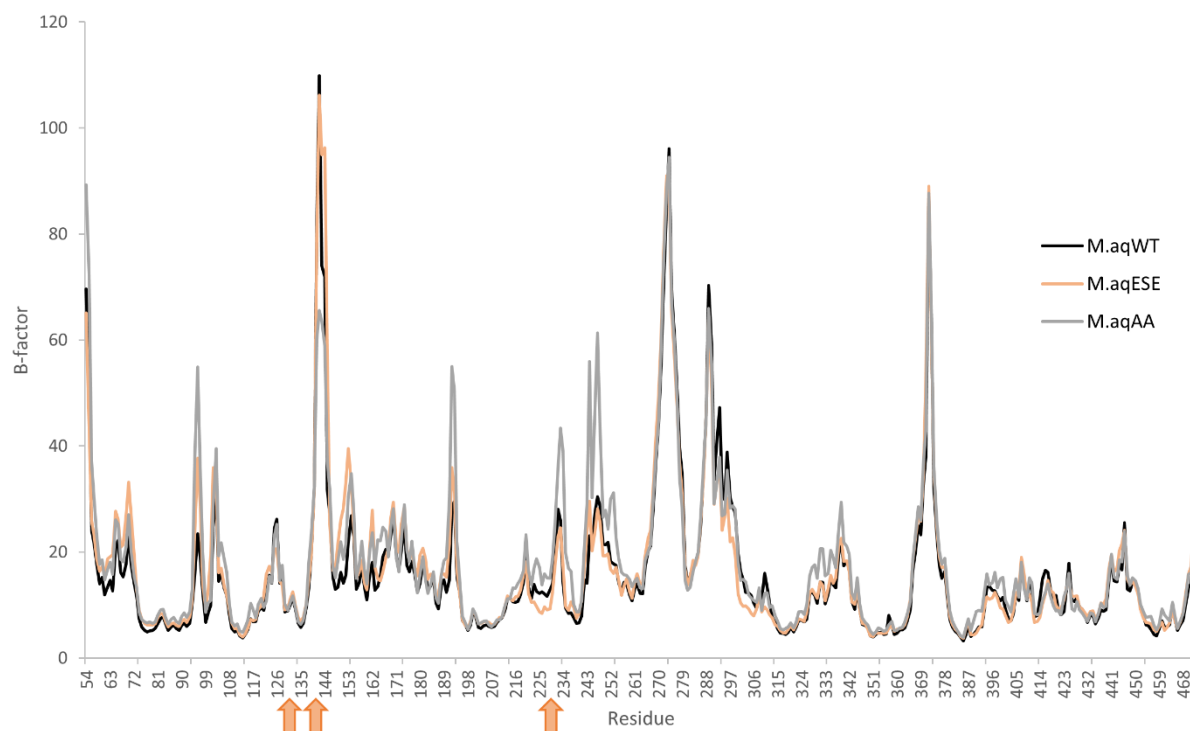


Abbildung 50: B-Faktoren der Enzymreste: Der Wildtyp M.aqWT (schwarz), die Variante M.aqAA (grau) und die Variante M.aqESE (orange). Die B-Faktoren wurden jeweils als Mittelwert aus den vier einzelnen MD-Simulationen berechnet. Die Position der Mutationen in M.aqESE sind durch die orangefarbenen Pfeile hervorgehoben.

Tabelle 22: Parameter der Tunnel und B-Faktoren der relevanten Loops gemittelt über 4 einzelne MD-Simulationen des M.aqWT und der Variante M.aqAA im Vergleich mit dem gebundenen Dodecylamin in den zwei Konformationen C – Fe (aktiv) und N – Fe (putativ hemmend). Die Fehler repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen.

	M.aqWT			M.aqWT + Amin C – Fe			M.aqWT + Amin N – Fe		
Mutation	-								
Tunnel	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac
Tunnel [%]	33.8 ± 10.9	94.9 ± 4.3	23.8 ± 3.6	75.5 ± 8.2	98.1 ± 22.8	30.4 ± 11.5	71.6 ± 12.8	95.0 ± 4.1	15.8 ± 2.6
Tunnel offen [%]	1.1 ± 0.7	8.7 ± 4.4	0.2 ± 0.1	4.2 ± 3.1	13.5 ± 1.5	0.6 ± 0.5	7.9 ± 6.0	14.1 ± 8.2	0.1 ± 0.1
Bottleneck Radius [Å]	1.08 ± 0.14	1.20 ± 0.14	1.04 ± 0.11	1.16 ± 0.16	1.24 ± 0.14	1.05 ± 0.13	1.17 ± 0.16	1.22 ± 0.15	1.02 ± 0.1
Länge [Å]	26.4 ± 3.4	19.1 ± 2.0	29.1 ± 2.2	25.3 ± 2.9	19.7 ± 2.1	29.2 ± 3.3	25.2 ± 2.7	20.1 ± 2.1	27.9 ± 2.8
Loop	BC		FG	BC		FG	BC		FG
B-Factor Peak	127.4 ± 47.8		31.1 ± 3.1	101.8 ± 23.7		43.7 ± 26.2	94.3 ± 7.4		26.1 ± 7.7
	M.aqAA			M.aqAA + Amin C – Fe			M.aqAA + Amin N – Fe		
Mutation	V141A, M228A								
Tunnel	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac	2c	2e	2ac
Tunnel [%]	96 ± 1.5	95.6 ± 1.8	13.7 ± 12.0	86.1 ± 23.1	75.4 ± 22.8	25.3 ± 6.5	90.0 ± 10.4	75.1 ± 14.8	22.1 ± 3.1
Tunnel offen [%]	22.0 ± 10.3	15.1 ± 7.6	0.5 ± 0.5	28.5 ± 12.6	17.6 ± 16.6	2.5 ± 2.0	33.2 ± 12.2	11.7 ± 3.1	0.23 ± 0.1

Bottleneck Radius [Å]	1.27 ± 0.15	1.23 ± 0.15	1.10 ± 0.15	1.31 ± 0.16	1.24 ± 0.16	1.13 ± 0.15	1.29 ± 0.17	1.19 ± 0.17	1.02 ± 0.11
Länge [Å]	24.0 ± 2.4	19.5 ± 2.0	28.4 ± 3.5	21.9 ± 2.8	20.9 ± 3.3	23.6 ± 2.7	23.7 ± 2.7	20.2 ± 2.5	28.6 ± 3.0
Loop	BC		FG		BC		BC		FG
B-Factor Peak	65.6 ± 3.4		61.3 ± 35.3		151.9 ± 112.7		273.1 ± 160.2		69.1 ± 39.8

Daten wurden als Mittelwerte aus 80 000 *Frames* für die mit einem Radius von 0,9 Å gefundenen Tunnel gesammelt. Tunnel mit einem *Bottleneck* $\geq 1,4$ Å Radius wurden als offen definiert.

SDS-Gel

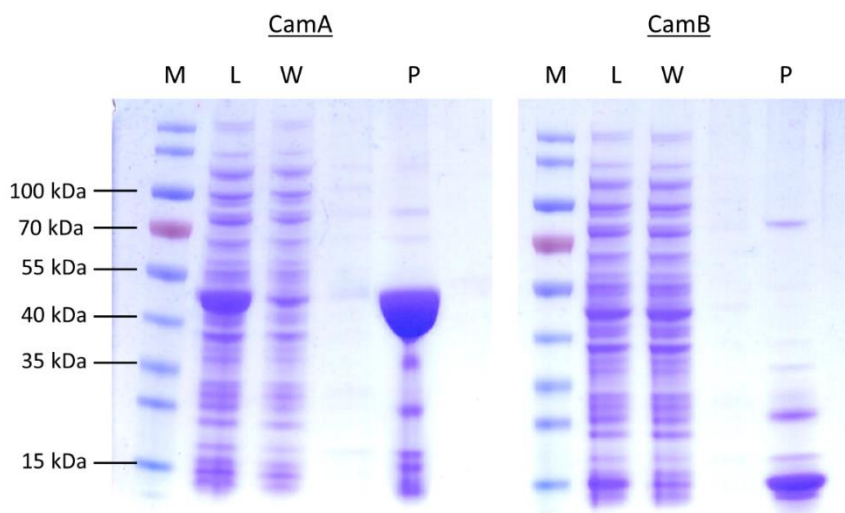


Abbildung 51: SDS-Gele der Reinigungs-Fractionen von CamA (45,6 kDa) und CamB (11,4 kDa). Aufgetragen sind jeweils der Proteinmarker (M), das Lysat (L), der Durchlauf des Waschschrittes (W) und das Eluat mit dem gewünschten Protein (P).

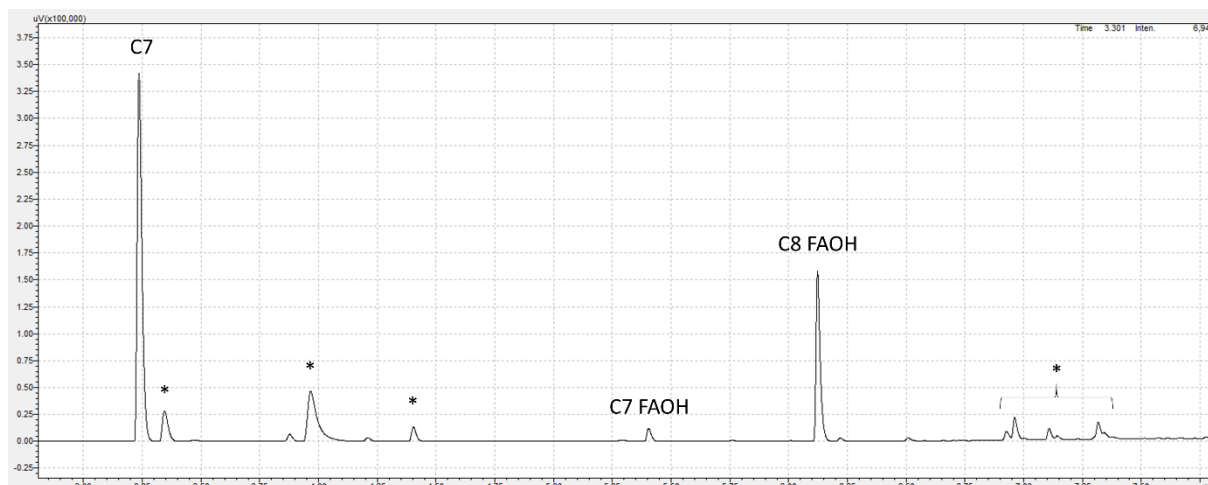
Chromatogramme

Abbildung 52: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqR) katalysierte Reaktion mit Heptansäure (C7). Mit dem Produkt ω -Hydroxyheptansäure (C7 FAOH) und dem internen Standard ω -Hydroxyoctansäure (C8 FAOH). Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

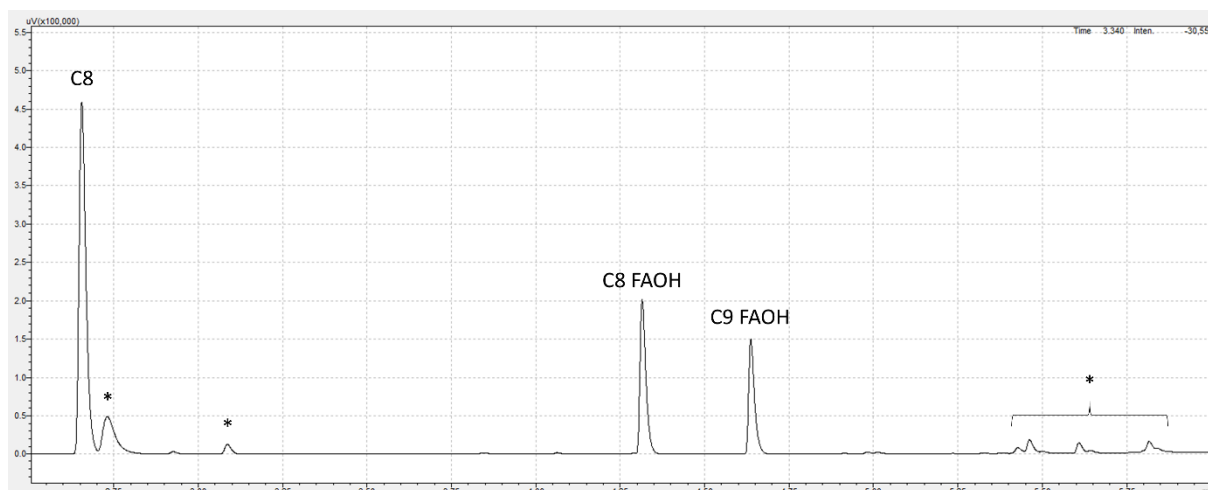


Abbildung 53: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqR) katalysierte Reaktion mit Octansäure (C8). Mit dem Produkt ω -Hydroxyoctansäure (C8 FAOH) und dem internen Standard ω -Hydroxynonansäure (C9 FAOH). Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

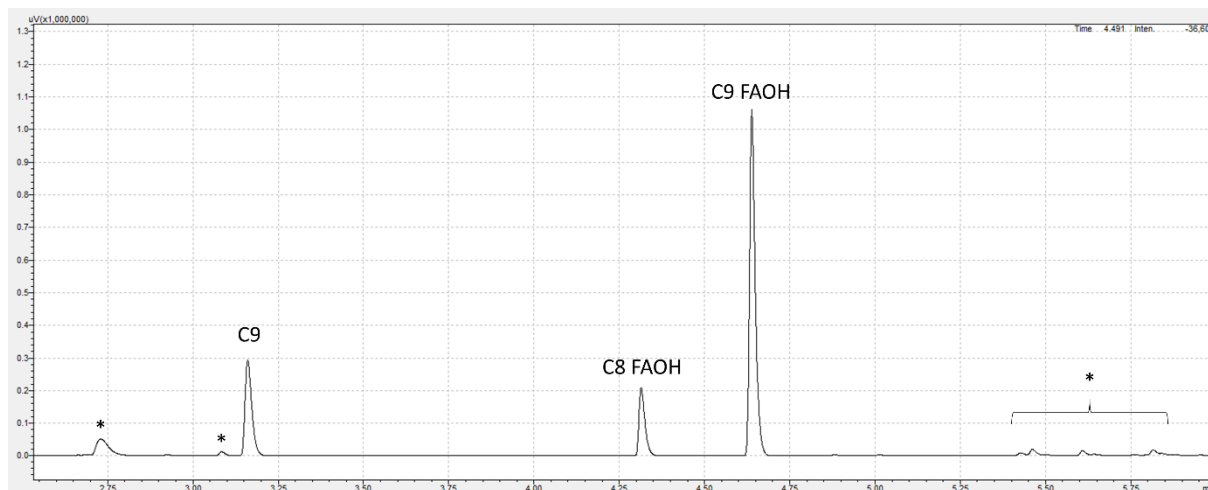


Abbildung 54: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqR) katalysierte Reaktion mit Nonansäure (C9). Mit dem Produkt ω -Hydroxynonansäure (C9 FAOH) und dem internen Standard ω -Hydroxyoctansäure (C8 FAOH). Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

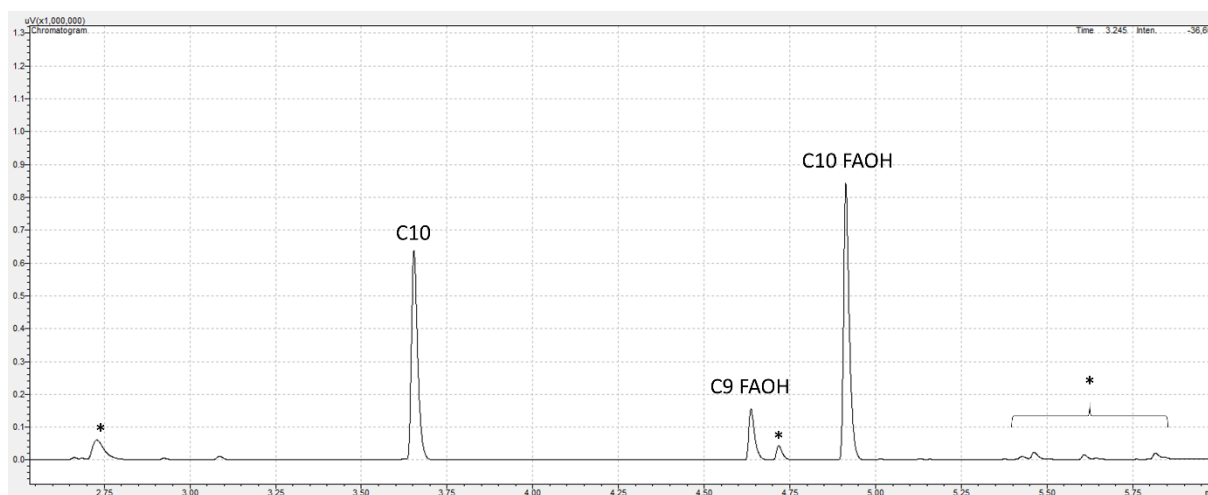


Abbildung 55: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqR) katalysierte Reaktion mit Decansäure (C10). Mit dem Produkt ω -Hydroxydecansäure (C10 FAOH) und dem internen Standard ω -Hydroxynonansäure (C9 FAOH). Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

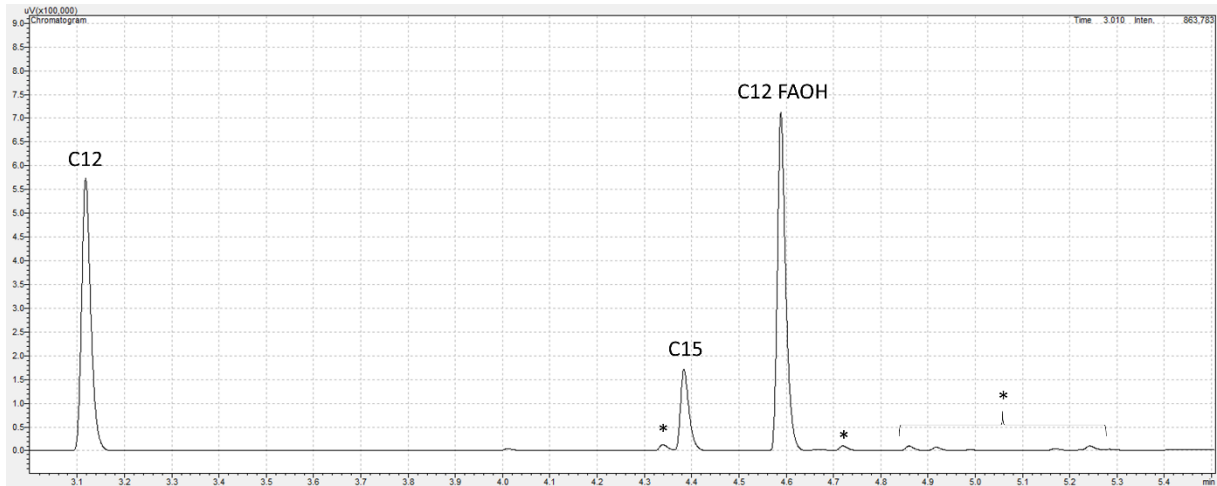


Abbildung 56: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqR) katalysierte Reaktion mit Dodecansäure (C12). Mit dem Produkt ω -Hydroxydodecansäure (C12 FAOH) und dem internen Standard Pentadecansäure (C15). Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.



Abbildung 57: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqR) katalysierte Reaktion mit Hexadecansäure (C16). Mit dem Produkt ω -Hydroxyhexadecansäure (C16 FAOH) und dem internen Standard Pentadecansäure (C15). Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

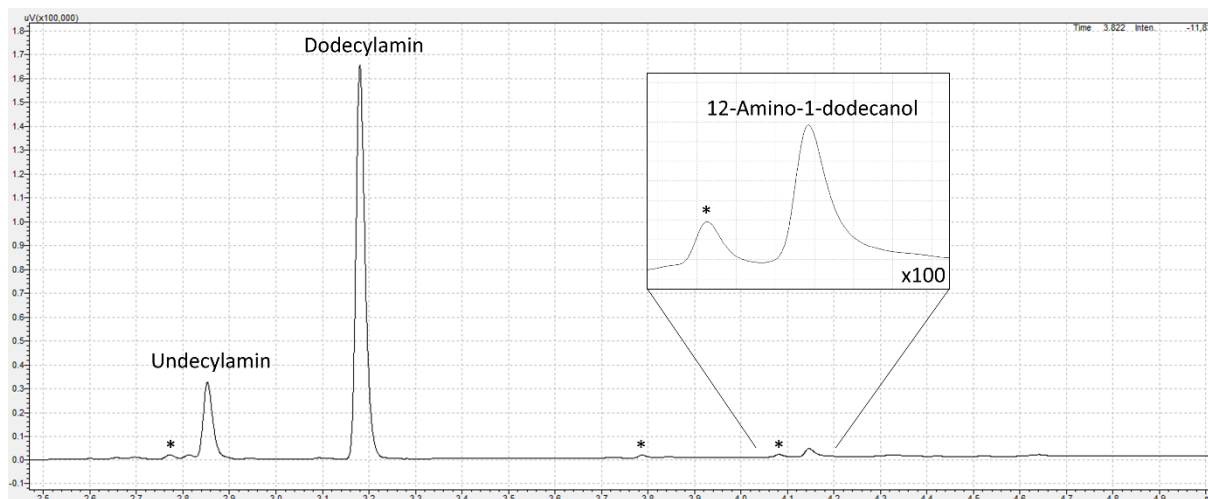


Abbildung 58: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} (Variante M.aqESE) katalysierte Reaktion mit Dodecylamin. Mit dem Produkt 12-Amino-1-dodecanol (100x vergrößert) und dem internen Standard Undecylamin. Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

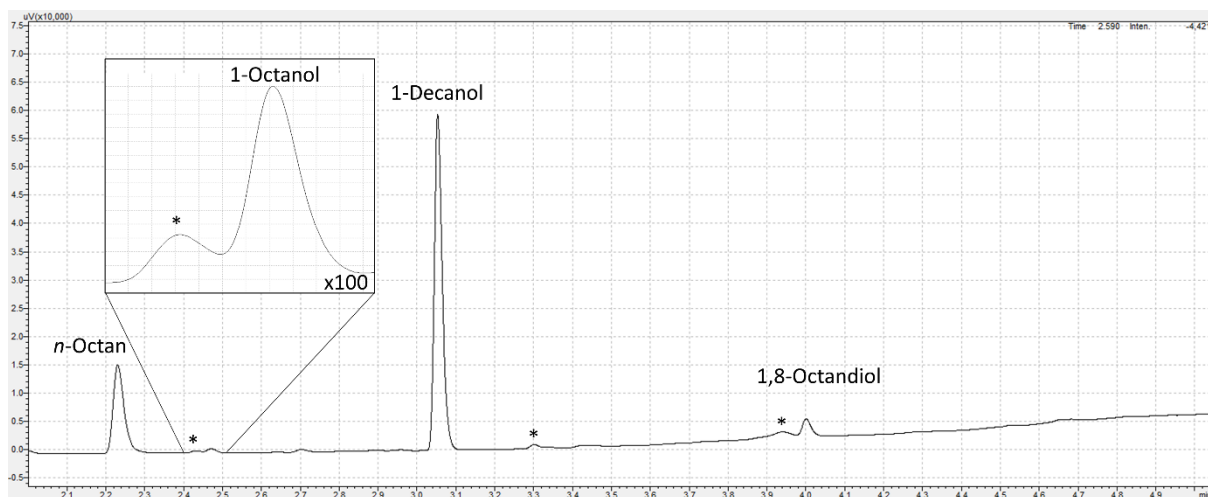


Abbildung 59: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} katalysierte Reaktion mit *n*-Octan. Mit dem monohydroxylierten Produkt 1-Octanol (100x vergrößert), dem dihydroxylierten Produkt 1,8-Octandiol und dem internen Standard 1-Decanol. Unreinheiten sind durch Sterne (*) markiert.

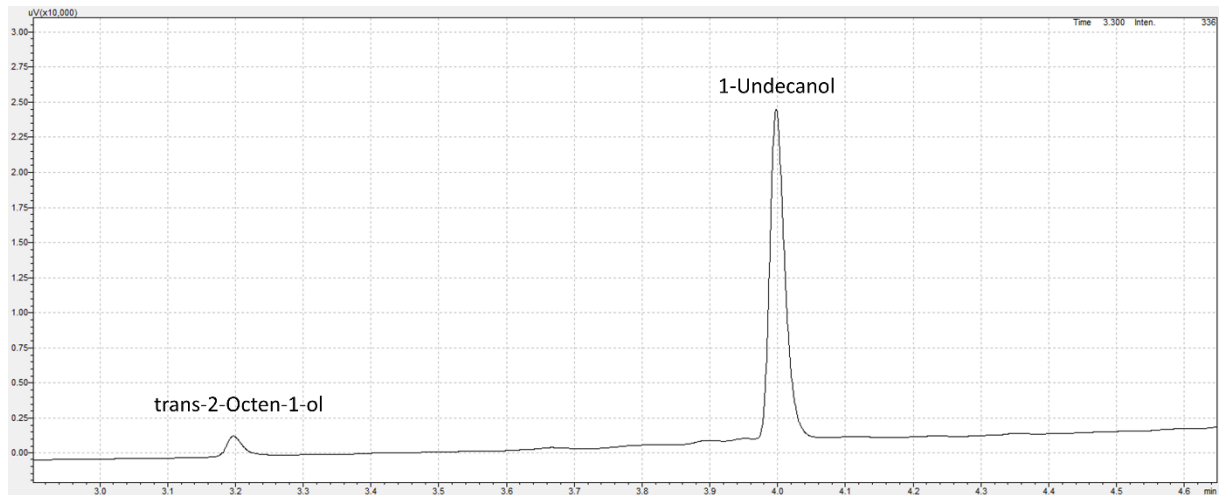


Abbildung 60: GC-Chromatogramm für die CYP153A_{M.aq} katalysierte Reaktion mit *trans*-2-Octen. Mit dem Produkt *trans*-2-Octen-1-ol und dem internen Standard 1-Undecanol.

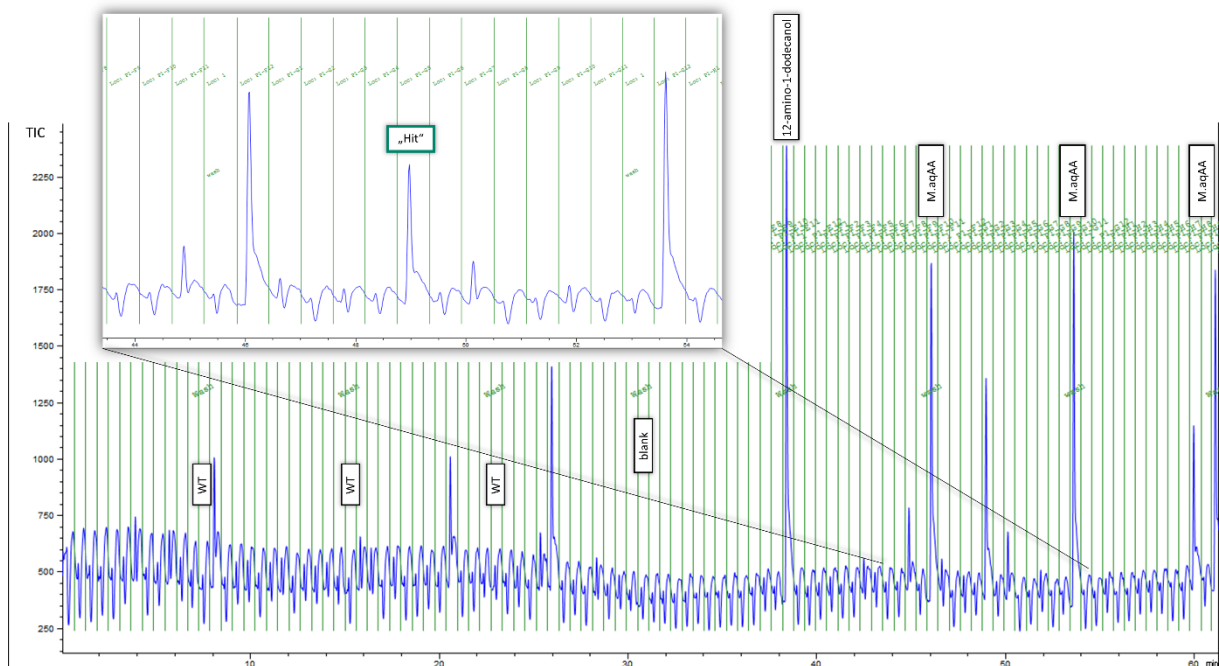


Abbildung 61: Chromatogramm eines einzelnen Laufs mit 96 injizierten Proben und 8 Waschstritten (64 min). Das Chromatogramm zeigt die Ergebnisse für die Sättigung der Aminosäure Q129 mit dem Wildtyp als Parent. Jede Probe ist durch eine grüne Linie getrennt. Nach jedem Waschvorgang wurde eine Kontrolle durchgeführt: Wildtyp Negativkontrolle (WT); Blank (keine Zellen); 12-Amino-1-dodecanol (Produktstandard); Positivkontrolle initiale Variante (M.aqAA). Dargestellt ist der „Total Ion Count“ (TIC) des hydroxylierten Dodecylaminprodukts (m/z 202). Der vergrößerte Ausschnitt zeigt ein Beispiel für einen "Hit", der für die Sequenzierung und Validierung ausgewählt wurde.

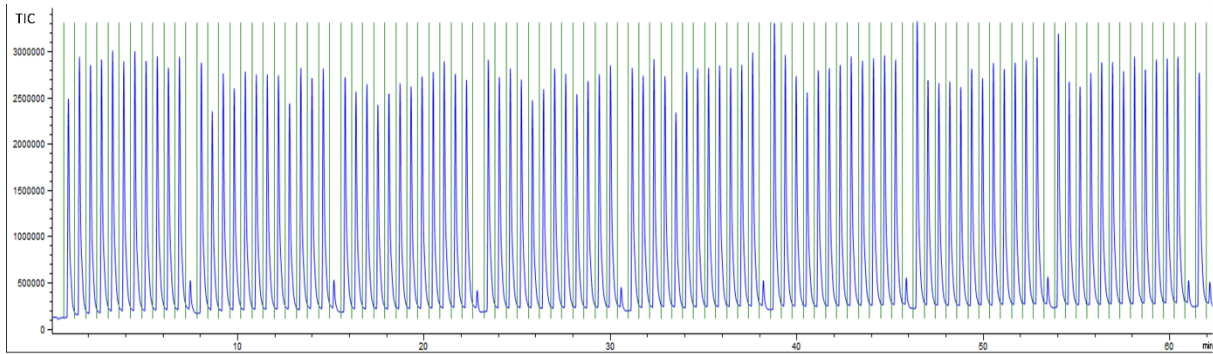


Abbildung 62: Chromatogramm eines einzelnen Laufs mit 96 injizierten Proben und 8 Waschsritten (64 min). Jede Probe ist durch eine grüne Linie getrennt. Eine Negativkontrolle wurde nach jeweils 11 Proben gemessen. Dargestellt ist der „Total Ion Count“ (TIC) des Dodecylamin-Substrats (m/z 186).

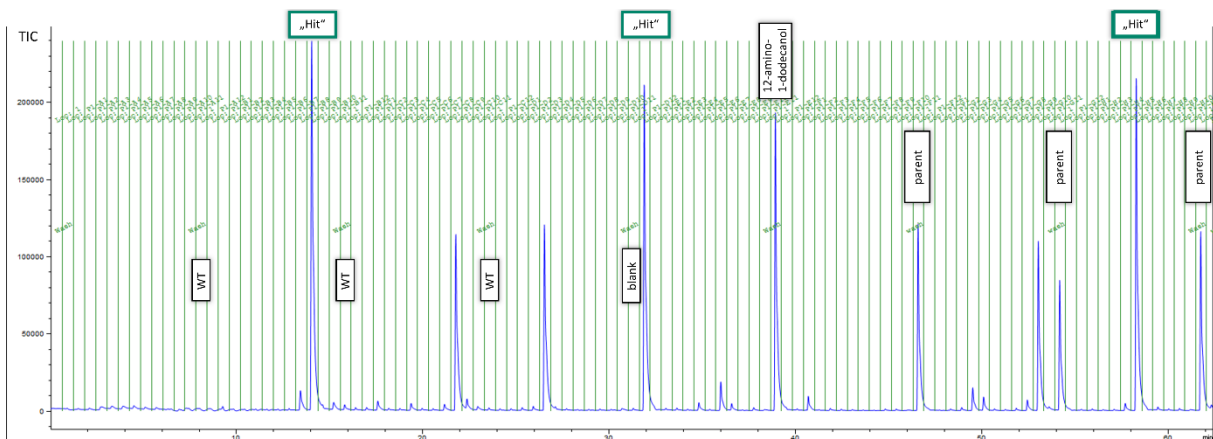


Abbildung 63: Chromatogramm eines einzelnen Laufs mit 96 injizierten Proben und 8 Waschsritten (64 min). Das Chromatogramm zeigt die Ergebnisse für die Sättigung der Aminosäure V141 mit M.aqEE als Parent. Jede Probe ist durch eine grüne Linie getrennt. Nach jedem Waschvorgang wurde eine Kontrolle durchgeführt: Wildtyp-Negativkontrolle (WT); Blank (keine Zellen); 12-Amino-1-dodecanol (Produktstandard); Parent (M.aqEE). Der „Total Ion Count“ (TIC) des hydroxylierten Dodecylamin-Produkts (m/z 202) ist gezeigt.

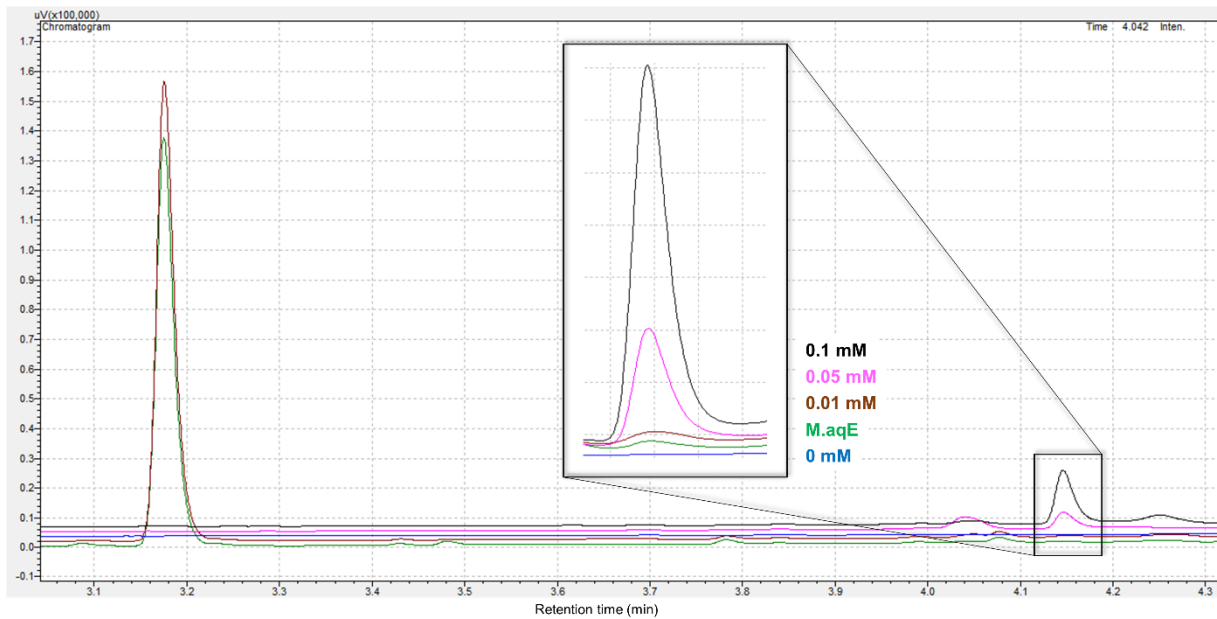


Abbildung 64: GC/FID-Chromatogramm der Produktstandards (12-Amino-1-dodecanol) und der Biotransformation von M.aqE. Peak bei 4,15 min: 12-Amino-1-dodecanol; 0,1 mM (schwarz), 0,05 mM (pink), 0,01 mM (braun), M.aqE (grün) und 0 mM (blau). Der Peak bei 3,18 min ist der Substratpeak (Dodecylamin) der Biotransformationen.

Differenzspektren

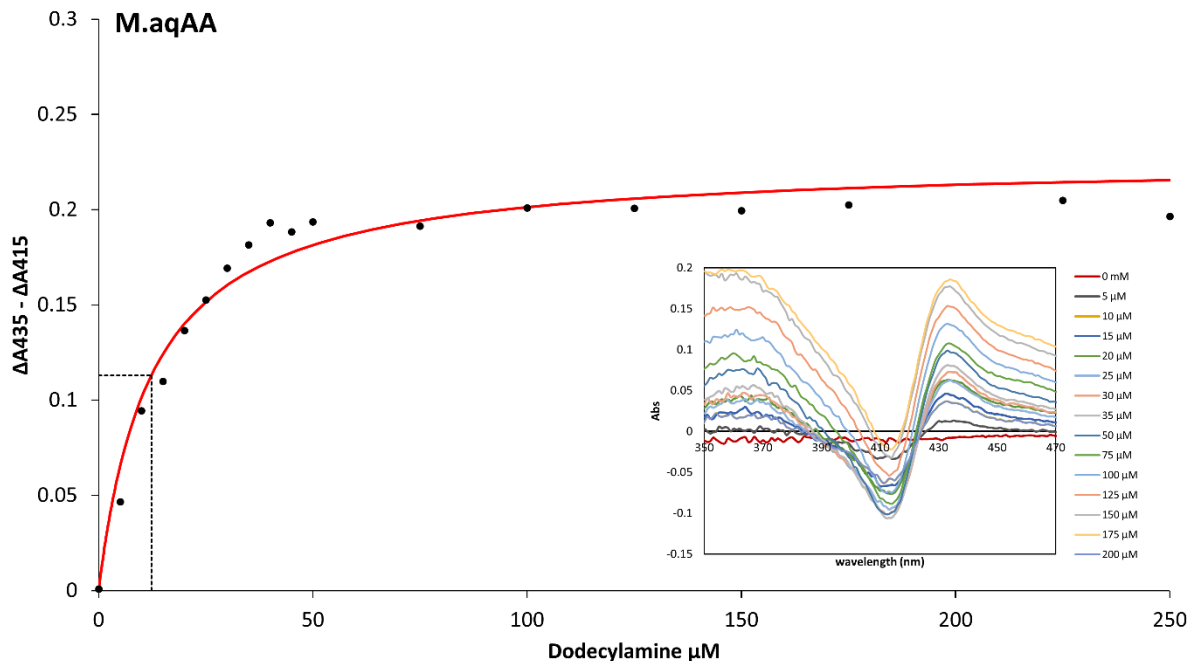


Abbildung 65: Spindifferenzspektren von M.aqAA unter Verwendung von Dodecylamin als Ligand. Die Spinverschiebung ΔA wurde durch Subtraktion der Referenzprobe (P450 ohne Dodecylamin) berechnet.

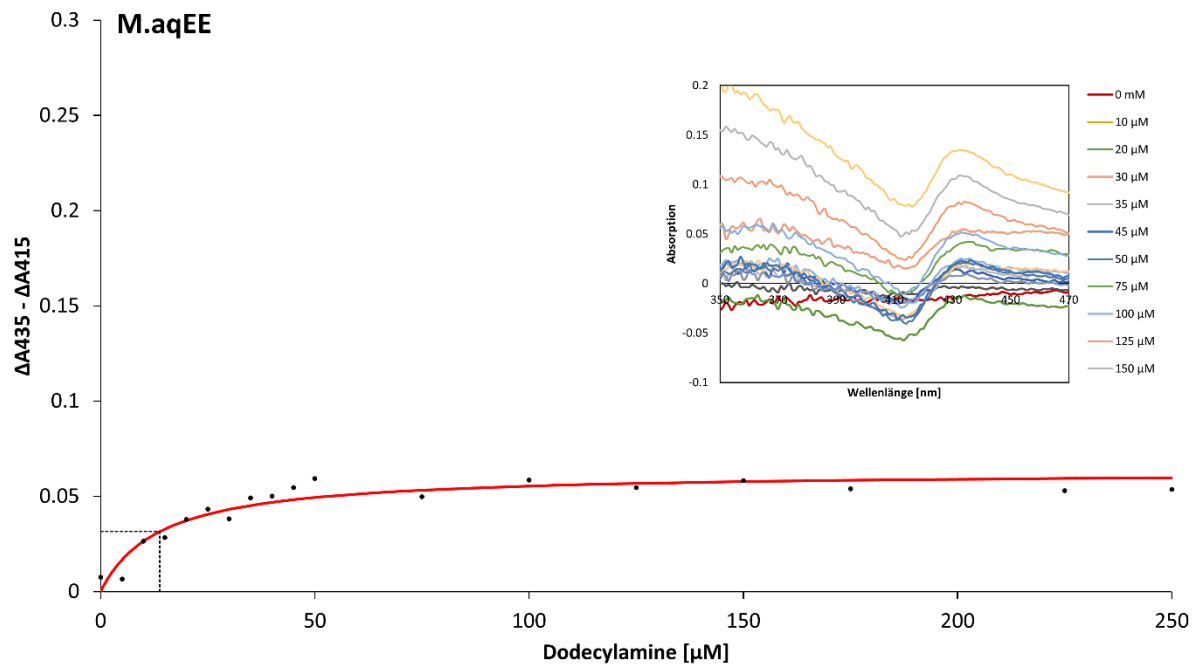


Abbildung 66: Spindifferenzspektren von M.aqEE unter Verwendung von Dodecylamin als Ligand. Die Spinverschiebung ΔA wurde durch Subtraktion der Referenzprobe (P450 ohne Dodecylamin) berechnet.

7 Literaturverzeichnis

1. Tang, W. L. & Zhao, H. Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnology Journal* vol. 4 (2009).
2. Choi, J. M., Han, S. S. & Kim, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances* vol. 33 (2015).
3. Schoemaker, H. E., Mink, D. L. & Wubbolts, M. G. Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial synthesis. *Science* vol. 299 (2003).
4. Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A. & Hauer, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, (2014).
5. Clouthier, C. M. & Pelletier, J. N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **41**, (2012).
6. Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K. & Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 60 (2021).
7. Breuer, M. *et al.* Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 788–824 (2004).
8. Sheldon, R. & Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **118**, 801–838 (2017).
9. Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Buehler, K., Schallmey, A. & Bühler, B. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem.* **13**, (2011).
10. Ricca, E., Brucher, B. & Schrittwieser, J. H. Multi-enzymatic cascade reactions: Overview and perspectives. *Advanced Synthesis and Catalysis* vol. 353 (2011).
11. Huffman, M. A. *et al.* Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. *Science (80-.).* **366**, (2019).
12. Rosenthaler, L. Enzyme effected asymmetrical synthesis. *Biochem. Z.* **14**, (1908).
13. Raveendran, S., Suprabha, G. N. & Sashidhar, S. Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. *African J. Microbiol. Res.* **3**, 515–522 (2009).
14. Jensen, V. J. & Rugh, S. Industrial-Scale Production and Application of Immobilized Glucose Isomerase. *Methods Enzymol.* **136**, (1987).
15. Nagasawa, T., Nakamura, T. & Yamada, H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, (1990).
16. Reed, M. C., Lieb, A. & Nijhout, H. F. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *BioEssays* vol. 32 (2010).
17. Reetz, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past,

- present, and future. *Journal of the American Chemical Society* vol. 135 12480–12496 (2013).
18. Bommarius, A. S. & Riebel, B. R. Biocatalysis, Fundamentals and Applications. *Synthesis* vol. 2005 338–338 (2005).
 19. Chen, K. & Arnold, F. H. Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nature Catalysis* vol. 3 (2020).
 20. Bornscheuer, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194 (2012).
 21. Bornscheuer, U. T. The fourth wave of biocatalysis is approaching. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* vol. 376 (2018).
 22. Koga, N. *et al.* Principles for designing ideal protein structures. *Nature* **491**, (2012).
 23. Arnold, F. H. & Georgiou, G. *Directed Enzyme Evolution*. *Directed Enzyme Evolution* (Humana Press, 2003). doi:10.1385/1592593968.
 24. Lutz, S. & Bornscheuer, U. T. *Protein Engineering Handbook*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008). doi:10.1002/9783527634026.fmatter.
 25. Bornscheuer, U. T., Hauer, B., Jaeger, K. E. & Schwaneberg, U. Directed Evolution Empowered Redesign of Natural Proteins for the Sustainable Production of Chemicals and Pharmaceuticals. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 58 (2019).
 26. Lutz, S. Beyond directed evolution-semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 21 (2010).
 27. Hon, J. *et al.* EnzymeMiner: Automated mining of soluble enzymes with diverse structures, catalytic properties and stabilities. *Nucleic Acids Res.* **48**, (2021).
 28. Mazurenko, S., Prokop, Z. & Damborsky, J. Machine Learning in Enzyme Engineering. *ACS Catalysis* vol. 10 (2020).
 29. Chowdhury, R. & Maranas, C. D. From directed evolution to computational enzyme engineering—A review. *AIChE J.* **66**, (2020).
 30. Reetz, M. T. *et al.* Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. *ChemBioChem* **8**, (2007).
 31. Mazurenko, S. Predicting protein stability and solubility changes upon mutations: data perspective. *ChemCatChem* vol. 12 (2020).
 32. Nisthal, A., Wang, C. Y., Ary, M. L. & Mayo, S. L. Protein stability engineering insights revealed by domain-wide comprehensive mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, (2019).
 33. Kreß, N., Halder, J. M., Rapp, L. R. & Hauer, B. Unlocked potential of dynamic elements in protein structures: channels and loops. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **47**,

- 109–116 (2018).
34. Kingsley, L. J. & Lill, M. A. Substrate tunnels in enzymes: Structure-function relationships and computational methodology. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* vol. 83 599–611 (2015).
 35. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **27**, (1894).
 36. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44**, (1958).
 37. Prokop, Z. *et al.* Engineering of Protein Tunnels : The Keyhole – Lock – Key Model for Catalysis by Enzymes with Buried Active Sites. *Protein Eng. Handb.* **3**, 421–464 (2012).
 38. Biedermannová, L. *et al.* A single mutation in a tunnel to the active site changes the mechanism and kinetics of product release in haloalkane dehalogenase LinB. *J. Biol. Chem.* **287**, 29062–29074 (2012).
 39. Kokkonen, P. *et al.* Substrate inhibition by the blockage of product release and its control by tunnel engineering. *RSC Chem. Biol.* **2**, (2021).
 40. Gora, A., Brezovsky, J. & Damborsky, J. Gates of enzymes. *Chemical Reviews* vol. 113 (2013).
 41. Brands, S. *et al.* Understanding substrate binding and the role of gatekeeping residues in PigC access tunnels. *Chemical Communications* vol. 57 (2021).
 42. Pravda, L. *et al.* Anatomy of enzyme channels. *BMC Bioinformatics* **15**, 379 (2014).
 43. Chovancova, E. *et al.* CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Comput. Biol.* **8**, (2012).
 44. Sehnal, D. *et al.* MOLE 2.0: Advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *J. Cheminform.* **5**, (2013).
 45. Voss, N. R., Gerstein, M., Steitz, T. A. & Moore, P. B. The Geometry of the Ribosomal Polypeptide Exit Tunnel. *J. Mol. Biol.* **360**, (2006).
 46. Lemoine, D. *et al.* Ligand-gated ion channels: New insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chemical Reviews* vol. 112 (2012).
 47. Milichovský, J. *et al.* Active site mutations as a suitable tool contributing to explain a mechanism of aristolochic acid I nitroreduction by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
 48. Obexer, R. *et al.* Emergence of a catalytic tetrad during evolution of a highly active artificial aldolase. *Nat. Chem.* **9**, (2017).
 49. Kress, N., Rapp, J. & Hauer, B. Enantioselective Reduction of Citral Isomers in NCR Ene Reductase: Analysis of an Active-Site Mutant Library. *ChemBioChem* **18**, (2017).
 50. Nobili, A. *et al.* Engineering the active site of the amine transaminase from *vibrio fluvialis* for the asymmetric synthesis of aryl-alkyl amines and amino

- alcohols. *ChemCatChem* **7**, (2015).
51. Seifert, A. *et al.* Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *ChemBioChem* **10**, (2009).
 52. Seifert, A., Antonovici, M., Hauer, B. & Pleiss, J. An Efficient Route to Selective Bio-oxidation Catalysts: an Iterative Approach Comprising Modeling, Diversification, and Screening, Based on CYP102A1. *ChemBioChem* **12**, (2011).
 53. Nestl, B. M. & Hauer, B. Engineering of flexible loops in enzymes. *ACS Catal.* **4**, 3201–3211 (2014).
 54. Hunold, A. *et al.* Assembly of a Rieske non-heme iron oxygenase multicomponent system from *Phenylobacterium immobile* E DSM 1986 enables pyrazon cis-dihydroxylation in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **105**, (2021).
 55. Hunold, A. On the Rieske non-heme iron oxygenases of *Phenylobacterium immobile* strain E. (Universität Stuttgart, 2019). doi:<http://dx.doi.org/10.18419/opus-10779>.
 56. Heinemann, P. M., Armbruster, D. & Hauer, B. Active-site loop variations adjust activity and selectivity of the cumene dioxygenase. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
 57. Osuna, S. The challenge of predicting distal active site mutations in computational enzyme design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* vol. 11 (2021).
 58. Li, G. *et al.* Simultaneous engineering of an enzyme's entrance tunnel and active site: the case of monoamine oxidase MAO-N. *Chem. Sci.* **8**, 4093–4099 (2017).
 59. Brezovsky, J. *et al.* Engineering a de novo transport tunnel. *ACS Catal.* **6**, 7597–7610 (2016).
 60. Magistrato, A., Sgrignani, J., Krause, R. & Cavalli, A. Single or Multiple Access Channels to the CYP450s Active Site? An Answer from Free Energy Simulations of the Human Aromatase Enzyme. *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 2036–2042 (2017).
 61. Ebert, M. C. C. J. C., Espinola, J. G., Lamoureux, G. & Pelletier, J. N. Substrate-Specific Screening for Mutational Hotspots Using Biased Molecular Dynamics Simulations. *ACS Catal.* **7**, 6786–6797 (2017).
 62. Meng, S. *et al.* Tunnel engineering for modulating the substrate preference in cytochrome P450Bs β HI. *Bioresour. Bioprocess.* **8**, (2021).
 63. Fischer, M. *et al.* The cytochrome P450 engineering database: A navigation and prediction tool for the cytochrome P450 protein family. *Bioinformatics* **23**, 2015–2017 (2007).
 64. Nelson, D. R. *et al.* The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene

- Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**, 1–51 (1993).
65. Nelson, D. R. The cytochrome P450 homepage. *Hum. Genomics* **4**, (2009).
66. OMURA, T. & SATO, R. THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. II. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379–2385 (1964).
67. De Montellano, P. R. O. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry: Third edition. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition* (Springer US, 2005).
68. Testa, B. & Jenner, P. Inhibitors of cytochrome p-450s and their mechanism of action. *Drug Metab. Rev.* **12**, 1–117 (1981).
69. Luthra, A., Denisov, I. G. & Sligar, S. G. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 507 (2011).
70. Cook, D. J., Finnigan, J. D., Cook, K., Black, G. W. & Charnock, S. J. *Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 105 (Elsevier Inc., 2016).
71. Munro, A. W., Girvan, H. M. & McLean, K. J. Variations on a (t)heme - Novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural Product Reports* vol. 24 585–609 (2007).
72. Isin, E. M. & Guengerich, F. P. Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* vol. 392 (2008).
73. Noble, M. A. *et al.* Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochem. J.* **339**, (1999).
74. Dong, J. J. *et al.* Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 57 (2018).
75. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. & Dawson, J. H. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2841–2887 (1996).
76. Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**, 128–145 (2006).
77. Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science (80-.)*. **339**, (2013).
78. Brandenberg, O. F., Fasan, R. & Arnold, F. H. Exploiting and engineering hemoproteins for abiological carbene and nitrene transfer reactions. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 47 102–111 (2017).
79. Nomura, T. & Bishop, G. J. Cytochrome P450s in plant steroid hormone synthesis and metabolism. *Phytochemistry Reviews* vol. 5 (2006).
80. Takeyama, K. I. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science (80-.)*. **277**, (1997).

81. Omdahl, J. L., Bobrovnikova, E. A., Choe, S., Dwivedi, P. P. & May, B. K. Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. in *Steroids* vol. 66 (2001).
82. Gibbons, G. F. The role of cytochrome P450 in the regulation of cholesterol biosynthesis. in *Lipids* vol. 37 (2003).
83. Anzai, Y. *et al.* Functional Analysis of MycCI and MycG, Cytochrome P450 Enzymes Involved in Biosynthesis of Mycinamicin Macrolide Antibiotics. *Chem. Biol.* **15**, (2008).
84. Taylor, M., Lamb, D. C., Cannell, R., Dawson, M. & Kelly, S. L. Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from *Streptomyces griseus*: Heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, (1999).
85. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. & Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* vol. 1770 330–344 (2007).
86. O'Reilly, E., Köhler, V. & Flitsch, S. L. Cytochromes P450 as useful biocatalysts: Addressing the limitations. *Chem. Commun.* **47**, 2490–2501 (2011).
87. Lambeth, J. D. & Stevens, V. L. Cytochrome p-450_{scc}: Enzymology, and the regulation of intramitochondrial cholesterol delivery to the enzyme. *Endocr. Res.* **10**, (1984).
88. Gunsalus, I. C. & Wagner, G. C. Bacterial P-450_{cam} methylene monooxygenase components: Cytochrome m, putidaredoxin, and putidaredoxin reductase. *Methods Enzymol.* **52**, 166–188 (1978).
89. Imai, M. *et al.* Uncoupling of the cytochrome P-450_{cam} monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 7823–7827 (1989).
90. Warman, A. J. *et al.* Flavocytochrome P450 BM3: An update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. in *Biochemical Society Transactions* vol. 33 (2005).
91. Roberts, G. A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S. L. & Turner, N. J. Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J. Bacteriol.* **184**, (2002).
92. Ravichandran, K. G., Boddupalli, S. S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A. & Deisenhofer, J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450_{BM-3}, a prototype for microsomal P450's. *Science (80-.)*. **261**, (1993).
93. Poulos, T. L., Finzel, B. C. & Gunsalus, I. C. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **260**, (1985).
94. Poulos, T. L., Finzel, B. C. & Howard, A. J. High-resolution crystal structure of cytochrome P450_{cam}. *J. Mol. Biol.* **195**, 687–700 (1987).
95. Poulos, T. L. & Johnson, E. F. Structures of cytochrome P450 enzymes. in

- Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition* 87–114 (Springer US, 2005). doi:10.1007/0-387-27447-2_3.
96. Dodani, S. C. *et al.* Discovery of a regioselectivity switch in nitrating P450s guided by molecular dynamics simulations and Markov models. *Nat. Chem.* **8**, 419–425 (2016).
 97. Cojocaru, V., Winn, P. J. & Wade, R. C. The ins and outs of cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1770**, 390–401 (2007).
 98. Wade, R. C., Winn, P. J., Schlichting, I. & Sudarko. A survey of active site access channels in cytochromes P450. in *Journal of Inorganic Biochemistry* vol. 98 1175–1182 (2004).
 99. Zhang, L. *et al.* Structural insight into the electron transfer pathway of a self-sufficient P450 monooxygenase. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
 100. Lüdemann, S. K., Lounnas, V. & Wade, R. C. How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms. *J. Mol. Biol.* **303**, 797–811 (2000).
 101. Lüdemann, S. K., Lounnas, V. & Wade, R. C. How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. *J. Mol. Biol.* **303**, (2000).
 102. Bordeaux, M. *et al.* High-cell-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*, purification and characterization of a self-sufficient biosynthetic octane ω -hydroxylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, (2014).
 103. Cornelissen, S. *et al.* Whole-cell-based CYP153A6-catalyzed (S)-limonene hydroxylation efficiency depends on host background and profits from monoterpene uptake via AlkL. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1282–1292 (2013).
 104. Scheps, D. *et al.* Synthesis of ω -hydroxy dodecanoic acid based on an engineered CYP153A fusion construct. *Microb. Biotechnol.* **6**, 694–707 (2013).
 105. Scheps, D., Honda Malca, S., Hoffmann, H., Nestl, B. M. & Hauer, B. Regioselective ω -hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 6727–6733 (2011).
 106. Maier, T., Förster, H. H., Asperger, O. & Hahn, U. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, (2001).
 107. Funhoff, E. G., Bauer, U., García-Rubio, I., Witholt, B. & Van Beilen, J. B. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J. Bacteriol.* **188**, 5220–5227 (2006).
 108. Funhoff, E. G., Salzmann, J., Bauer, U., Witholt, B. & van Beilen, J. B. Hydroxylation and epoxidation reactions catalyzed by CYP153 enzymes.

- Enzyme Microb. Technol.* **40**, (2007).
109. Koch, D. J., Chen, M. M., Van Beilen, J. B. & Arnold, F. H. In vivo evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, (2009).
 110. Honda Malca, S. *et al.* Bacterial CYP153A monooxygenases for the synthesis of omega-hydroxylated fatty acids. *Chem. Commun.* **48**, 5115–5117 (2012).
 111. Lundemo, M. T., Notonier, S., Striedner, G., Hauer, B. & Woodley, J. M. Process limitations of a whole-cell P450 catalyzed reaction using a CYP153A-CPR fusion construct expressed in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 1197–1208 (2016).
 112. Kirtz, M., Klebensberger, J., Otte, K. B., Richter, S. M. & Hauer, B. Production of ω -hydroxy octanoic acid with *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **230**, 30–33 (2016).
 113. Hoffmann, S. M. *et al.* The Impact of Linker Length on P450 Fusion Constructs: Activity, Stability and Coupling. *ChemCatChem* **8**, 1591–1597 (2016).
 114. Reymond, J. L. & Babiak, P. Screening systems. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 105 31–58 (2006).
 115. Wahler, D. & Reymond, J. L. High-throughput screening for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 12 535–544 (2001).
 116. Tsotsou, G. E., Cass, A. E. G. & Gilardi, G. High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 119–131 (2002).
 117. Ji, Y. *et al.* Directed OmniChange Evolution Converts P450 BM3 into an Alkyltrimethylammonium Hydroxylase. *Chem. - A Eur. J.* **24**, (2018).
 118. Morlock, L. K., Böttcher, D. & Bornscheuer, U. T. Simultaneous detection of NADPH consumption and H₂O₂ production using the Ampliflu™ Red assay for screening of P450 activities and uncoupling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, (2018).
 119. Alcalde, M., Farinas, E. T. & Arnold, F. H. Colorimetric high-throughput assay for alkene epoxidation catalyzed by cytochrome P450 BM-3 variant 139-3. *J. Biomol. Screen.* **9**, (2004).
 120. Lentz, O. *et al.* Altering the regioselectivity of cytochrome P450 CYP102A3 of *Bacillus subtilis* by using a new versatile assay system. *ChemBioChem* **7**, (2006).
 121. Grobe, S. *et al.* Engineering Regioselectivity of a P450 Monooxygenase Enables the Synthesis of Ursodeoxycholic Acid via 7 β -Hydroxylation of Lithocholic Acid. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **60**, (2021).
 122. Meinhold, P., Peters, M. W., Hartwick, A., Hernandez, A. R. & Arnold, F. H. Engineering Cytochrome P450 BM3 for Terminal Alkane Hydroxylation. *Adv. Synth. Catal.* **348**, 763–772 (2006).

123. Nakamura, K., Martin, M. V & Guengerich, F. P. Random mutagenesis of human cytochrome p450 2A6 and screening with indole oxidation products. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**, 25–31 (2001).
124. Li, Q. S., Schwaneberg, U., Fischer, P. & Schmid, R. D. Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry* **6**, 1531–1536 (2000).
125. Schmidt-Dannert, C. & Arnold, F. H. Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol.* **17**, 135–136 (1999).
126. Weissenborn, M. J. *et al.* Whole-cell microtiter plate screening assay for terminal hydroxylation of fatty acids by P450s. *Chem. Commun.* **52**, 6158–6161 (2016).
127. Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z. & Arnold, F. H. A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chem. Biol.* **6**, 699–706 (1999).
128. Joo, H., Lin, Z. & Arnold, F. H. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* **399**, 670–673 (1999).
129. Shilov, A. E. & Shul'pin, G. B. Activation of C-H bonds by metal complexes. *Chem. Rev.* **97**, (1997).
130. Crabtree, R. H. Alkane C-H activation and functionalization with homogeneous transition metal catalysts: A century of progress - A new millennium in prospect. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (2001) doi:10.1039/b103147n.
131. Bordeaux, M., Galarneau, A. & Drone, J. Catalytic, Mild, and Selective Oxyfunctionalization of Linear Alkanes: Current Challenges. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 10712–10723 (2012).
132. Labinger, J. A. & Bercaw, J. E. Understanding and exploiting C-H bond activation. *Nature* vol. 417 507–514 (2002).
133. Kim, S. K. & Park, Y. C. Biosynthesis of ω -hydroxy fatty acids and related chemicals from natural fatty acids by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 103 (2019).
134. Vandamme, E. J. & Soetaert, W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* vol. 77 (2002).
135. Metzger, J. O. & Bornscheuer, U. Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 71 (2006).
136. Liu, C. *et al.* Polymers from fatty acids: Poly(ω -hydroxyl tetradecanoic acid) synthesis and physico-mechanical studies. *Biomacromolecules* **12**, 3291–3298 (2011).
137. Lu, W. *et al.* Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. in *ACS Symposium Series* vol. 1105 77–90 (American Chemical Society, 2012).

138. Biermann, U., Bornscheuer, U., Meier, M. A. R., Metzger, J. O. & Sch??fer, H. J. Oils and fats as renewable raw materials in chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 50 3854–3871 (2011).
139. Abe, A. & Sugiyama, K. Growth inhibition and apoptosis induction of human melanoma cells by ω -hydroxy fatty acids. *Anticancer. Drugs* **16**, 543–549 (2005).
140. Yang, X. *et al.* Inhibition of cancer migration and invasion by knocking down delta-5-desaturase in COX-2 overexpressed cancer cells. *Redox Biol.* **11**, 653–662 (2017).
141. Huf, S., Krügener, S., Hirth, T., Rupp, S. & Zibek, S. Biotechnological synthesis of long-chain dicarboxylic acids as building blocks for polymers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113**, 548–561 (2011).
142. Lee, H. *et al.* Biotransformation of dicarboxylic acids from vegetable oil-derived sources: current methods and suggestions for improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 103 (2019).
143. Corma Canos, A., Iborra, S. & Velty, A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chemical Reviews* vol. 107 (2007).
144. Hayes, D. G. & Smith, G. A. Biobased Surfactants: Overview and Industrial State of the Art. in *Biobased Surfactants* (2019). doi:10.1016/b978-0-12-812705-6.00001-0.
145. Kitahara, T. *et al.* Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, (2004).
146. Legacy, C. J. & Emmert, M. H. C α -H Oxidations of Amines to Amides: Expanding Mechanistic Understanding and Amine Scope through Catalyst Development. *Synlett* **27**, (2016).
147. Roughley, S. D. & Jordan, A. M. The medicinal chemist's toolbox: An analysis of reactions used in the pursuit of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 54 (2011).
148. Vitaku, E., Smith, D. T. & Njardarson, J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **57**, (2014).
149. Dietrich Klingler, F. Asymmetric Hydrogenation of Prochiral Amino Ketones to Amino Alcohols for Pharmaceutical Use. *Acc. Chem. Res.* **40**, 1367–1376 (2007).
150. Sanui, K., Asahara, T. & Ogata, N. Room-temperature polycondensation of beta-amino acid derivatives. I. Polyamide from amino alcohols and acrylates. *J. Polym. Sci. A1.* **6**, (1968).
151. Jeske, M. & Altenbuchner, J. The *Escherichia coli* rhamnose promoter rhaPBAD is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, (2010).

152. Kille, S. *et al.* Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synth. Biol.* **2**, 83–92 (2013).
153. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
154. Franklin, M. R. & Constance, J. E. Comparative 1-substituted imidazole inhibition of cytochrome P450 isozyme-selective activities in human and mouse hepatic microsomes. *Drug Metab. Rev.* **39**, (2007).
155. Zhang, W. *et al.* Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab. Dispos.* **30**, (2002).
156. Laemmli, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 680–685 (1970).
157. Omura, T. & Sato, R. [90] Isolation of cytochromes P-450 and P-420. *Methods Enzymol.* **10**, (1967).
158. Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D. & Cheng, Q. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat. Protoc.* **4**, (2009).
159. Purdy, M. M., Koo, L. S., Ortiz De Montellano, P. R. & Klinman, J. P. Steady-State Kinetic Investigation of Cytochrome P450cam: Interaction with Redox Partners and Reaction with Molecular Oxygen. *Biochemistry* **43**, 271–281 (2004).
160. Schenkman, J. B., Sligar, S. G. & Cinti, D. L. Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.* **12**, (1981).
161. McLean, K. J., Dunford, A. J., Neeli, R., Driscoll, M. D. & Munro, A. W. Structure, function and drug targeting in Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 464 (2007).
162. Klenk, J. M., Ertl, J., Rapp, L., Fischer, M. P. & Hauer, B. Expression and characterization of the benzoic acid hydroxylase CYP199A25 from *Arthrobacter* sp. *Mol. Catal.* **484**, (2020).
163. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
164. Hoffmann, S. M. *et al.* Structure-Guided Redesign of CYP153AM.aq for the Improved Terminal Hydroxylation of Fatty Acids. *ChemCatChem* **8**, 3234–3239 (2016).
165. Rose, P. W. *et al.* The RCSB Protein Data Bank: New resources for research and education. *Nucleic Acids Res.* **41**, D475–D482 (2013).
166. Hanwell, M. D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **4**, (2012).
167. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **17**, 490–

- 519 (1996).
168. M. J. Frisch, G. *et al.* *Gaussian 09, Revision E. 01; Gaussian. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT* vol. 11 (2009).
 169. Marques, S. M. *et al.* Catalytic Cycle of Haloalkane Dehalogenases Toward Unnatural Substrates Explored by Computational Modeling. *J. Chem. Inf. Model.* **57**, (2017).
 170. Case, D. A. *et al.* AMBER14. *AMBER 14* (2014).
 171. Gordon, J. C. *et al.* H++: A server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res.* **33**, W368–W371 (2005).
 172. Sanner, M. F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57–61 (1999).
 173. Shahrokh, K., Orendt, A., Yost, G. S. & Cheatham, T. E. Quantum mechanically derived AMBER-compatible heme parameters for various states of the cytochrome P450 catalytic cycle. *J. Comput. Chem.* **33**, 119–133 (2012).
 174. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2009).
 175. Filipovic, J. *et al.* CaverDock: A Novel Method for the Fast Analysis of Ligand Transport. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma.* **5963**, 1–1 (2019).
 176. Nguyen, H., Maier, J., Huang, H., Perrone, V. & Simmerling, C. Folding simulations for proteins with diverse topologies are accessible in days with a physics-based force field and implicit solvent. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 13959–13962 (2014).
 177. Izadi, S. & Onufriev, A. V. Accuracy limit of rigid 3-point water models. *J. Chem. Phys.* **145**, (2016).
 178. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3084–3095 (2013).
 179. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. *Schrödinger LLC* <http://www.pymol.org> (2014) doi:10.1038/hr.2014.17.
 180. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
 181. Miller, B. R. *et al.* MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3314–3321 (2012).
 182. Genheden, S. & Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery* vol. 10 449–461 (2015).
 183. Weiser, J., Shenkin, P. S. & Still, W. C. Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). *J. Comput. Chem.* **20**, 217–230 (1999).

184. Hoffmann, S. M. Studien zur Optimierung der Katalyse mittels der Monooxygenase CYP153A M.aq. (2017). doi:<http://dx.doi.org/10.18419/opus-9932>.
185. Marques, S. M., Brezovsky, J. & Damborsky, J. Role of tunnels and gates in enzymatic catalysis. in *Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering and Analysis* (2016). doi:10.4032/9789814669337.
186. Bulach, S. Studie des 2c-Substratkanals der P450 Monooxygenase CYP153AM.aq. (2018).
187. Baumert, B. Mutagenesestudie der P450 Monooxygenase CYP153A aus *Polaromonas* sp. (2020).
188. Kim, K. R. & Oh, D. K. Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes. *Biotechnology Advances* vol. 31 1473–1485 (2013).
189. Rapp, L. *et al.* Substrate Anchoring and Flexibility Reduction in CYP153AM.aq Leads to Highly Improved Efficiency toward Octanoic Acid. *ACS Catal.* **11**, 3182–3189 (2021).
190. Mazur, P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **16**, (1984).
191. Bradbury, S. L. & Jakoby, W. B. Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, (1972).
192. Soliman, F. S. & Van Den Berg, L. Factors affecting freezing damage of lactic dehydrogenase. *Cryobiology* **8**, (1971).
193. Ma, B., Kumar, S., Tsai, C. J. & Nussinov, R. Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Eng.* **12**, (1999).
194. Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G. & Wong, L. L. P450BM3 (CYP102A1): Connecting the dots. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1218–1260 (2012).
195. Brühlmann, F. *et al.* Engineering cytochrome P450 BM3 of *Bacillus megaterium* for terminal oxidation of palmitic acid. *J. Biotechnol.* **184**, (2014).
196. Hammerer, L. *et al.* Controlling the Regioselectivity of Fatty Acid Hydroxylation (C10) at α - and β -Position by CYP152A1 (P450Bs β) Variants. *ChemCatChem* **11**, (2019).
197. Rapp, L. R. *et al.* Substrate Anchoring and Flexibility Reduction in CYP153A M.aq Leads to Highly Improved Efficiency toward Octanoic Acid. *ACS Catal.* **11**, 3182–3189 (2021).
198. Sharp, L. L., Zhou, J. & Blair, D. F. Features of MotA proton channel structure revealed by tryptophan-scanning mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, (1995).
199. Domanski, T. L. *et al.* Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effect on substrate oxidation and cooperativity. *Biochemistry* **40**, (2001).
200. Santos, C. R. *et al.* Structural basis for branching-enzyme activity of glycoside

- hydrolase family 57: Structure and stability studies of a novel branching enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus Kodakaraensis* KOD1. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, (2011).
201. Marques, S. M. *et al.* Enzyme Tunnels and Gates As Relevant Targets in Drug Design. *Medicinal Research Reviews* vol. 37 (2017).
 202. Rapp, L. R. Etablierung eines auf ganzen Zellen basierenden P450 Hochdurchsatz Screenings. (2017).
 203. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J. Bacteriol.* **177**, 4121–4130 (1995).
 204. Bolivar, F. *et al.* Construction and characterization of new cloning vehicle. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, (1977).
 205. Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, (1978).
 206. Porter, J. L. *et al.* Characterisation of CYP102A25 from *Bacillus marmarensis* and CYP102A26 from *Pontibacillus halophilus*: P450 Homologues of BM3 with Preference towards Hydroxylation of Medium-Chain Fatty Acids. *ChemBioChem* **19**, 513–520 (2018).
 207. Hammerer, L., Winkler, C. K. & Kroutil, W. Regioselective Biocatalytic Hydroxylation of Fatty Acids by Cytochrome P450s. *Catal. Letters* **148**, 787–812 (2018).
 208. Johnston, J. B., Ouellet, H., Podust, L. M. & Ortiz De Montellano, P. R. Structural control of cytochrome P450-catalyzed ω -hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **507**, 86–94 (2011).
 209. Gricman, Ł. *et al.* Redox Partner Interaction Sites in Cytochrome P450 Monooxygenases: In Silico Analysis and Experimental Validation. *ChemistrySelect* **1**, (2016).
 210. Ebert, M. C. C. J. C., Dürr, S. L., Houle, A. A., Lamoureux, G. & Pelletier, J. N. Evolution of P450 monooxygenases toward formation of transient channels and exclusion of nonproductive gases. *ACS Catal.* **6**, 7426–7437 (2016).
 211. Khersonsky, O. *et al.* Optimization of the in-silico-designed Kemp eliminase KE70 by computational design and directed evolution. *J. Mol. Biol.* **407**, 391–412 (2011).
 212. Demming, R. M., Otte, K. B., Nestl, B. M. & Hauer, B. Optimized Reaction Conditions Enable the Hydration of Non-natural Substrates by the Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *ChemCatChem* **9**, (2017).
 213. Fasan, R., Meharena, Y. T., Snow, C. D., Poulos, T. L. & Arnold, F. H. Evolutionary History of a Specialized P450 Propane Monooxygenase. *J. Mol. Biol.* **383**, 1069–1080 (2008).
 214. Dietrich, M., Do, T. A., Schmid, R. D., Pleiss, J. & Urlacher, V. B. Altering the

- regioselectivity of the subterminal fatty acid hydroxylase P450 BM-3 towards γ - and δ -positions. *J. Biotechnol.* **139**, 115–117 (2009).
215. Ost, T. W. B. *et al.* Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3. *FEBS Lett.* **486**, 173–177 (2000).
216. Ba, L., Li, P., Zhang, H., Duan, Y. & Lin, Z. Semi-rational engineering of cytochrome P450sca-2 in a hybrid system for enhanced catalytic activity: Insights into the important role of electron transfer. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, (2013).
217. Correia, M. A. & Ortiz De Montellano, P. R. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition* (2005). doi:10.1007/0-387-27447-2_7.
218. Correia, M. A. & Hollenberg, P. F. *Inhibition of cytochrome P450 enzymes. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Fourth Edition* (2015). doi:10.1007/978-3-319-12108-6_5.