

**KLONIERUNG, EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG  
DER CYTOCHROM P450-MONOOXYGENASE CYP102A3  
AUS *BACILLUS SUBTILIS* SOWIE VERÄNDERUNG IHRER  
REGIOSELEKTIVITÄT DURCH GERICHTETE EVOLUTION**

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

VORGELEGT VON  
**OLIVER LENTZ**  
AUS STUTTGART

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

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 29. SEPTEMBER 2004

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Stuttgart, den 13.07.2004

**ALLES IN DER WELT KOMMT  
AUF EINEN GESCHEITEN EINFALL  
UND EINEN FESTEN ENTSCHLUSS AN**

(Johann Wolfgang von Goethe)

**IHR, IHR DORT AUßEN IN DER WELT,  
DIE NASEN EINGESPANNT,  
SO MANCHEN MANN, SO MANCHEN HELD,  
IM FRIEDEN GUT UND STARK IM FELD,  
GEBAR DAS SCHWABENLAND**

(Friedrich Schiller)

## Danksagung

Prof. Dr. Rolf D. Schmid danke ich für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, das mir eine umfassende Einarbeitung in aktuelle Fragestellungen der Biotechnologie ermöglichte und seine stetige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Vlada Urlacher für ihren persönlichen Einsatz und die vielen guten Ratschläge, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Projektpartnern Europäische Union und BASF danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich Dr. Habicher, Dr. Breuer und Herrn Henninger für die mir gewährte Unterstützung während meines BASF-Aufenthaltes danken.

Ganz herzlich danke ich Dr. Markus Baumann, Dr. Eckart Bonacker, Dipl.-Biol. Daniel Appel, Dipl.-Chem. Sascha Schuster und Dipl.-Chem. Markus Fischer für die gute Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen, auch außerhalb des Arbeitsplatzes. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Isabelle Kauffmann für die vielen interessanten Gespräche, Diskussionen und die Gelegenheit, eine besondere Persönlichkeit kennen zu lernen.

Ich danke den Dipl.-Chem. Stefan Tatzel und Markus Fischer für die Erstellung diverser Abbildungen des Enzyms P450 CYP102A3.

Ich danke darüber hinaus Volker Nödinger für die geduldige Einweisung in viele Geräte und die Geheimnisse des sterilen Arbeitens mit Mikroorganismen.

Mein Dank gilt auch Dr. Cornelius Bessler und Dipl.-Biol. Monika Rusnak für die Sequenzierungsarbeiten und der Messabteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Stuttgart für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie der Elementar- und GC/MS-Analysen.

Allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für das sehr gute Arbeitsklima.

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VII</b>
<b>Summary .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Allgemeiner Teil .....</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Industrielle Biotransformation .....	2
1.3 Die Enzymklasse der Cytochrom P450-Monooxygenasen .....	3
1.3.1 Die P450-Superfamilie - eine der größten bekannten Enzymfamilien .....	4
1.3.2 Struktur und Aufbau von P450-Systemen .....	6
1.3.3 Katalysemechanismus .....	8
1.3.4 Katalysierte Reaktionen der P450-Enzyme .....	11
1.3.5 Charakteristika von P450-Monooxygenasen .....	14
1.3.6 Das Monooxygenasesystem der P450-Familie CYP102 .....	19
1.4 Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses .....	23
1.4.1 Auswahl des Biokatalysators .....	24
1.4.2 Optimierung der biokatalytischen Reaktion .....	25
1.4.3 Modifikation des Enzyms durch molekularbiologische Methoden .....	27
1.5 Hochdurchsatztestsysteeme zur Identifizierung verbesserter Enzymvarianten .....	34
1.5.1 Selektion .....	36
1.5.2 Screening .....	36
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>39</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1 Klonierung und Expression von CYP102A2 und CYP102A3 .....	42
3.2 Proteinaufreinigungen mit Anionenaustauschern .....	44
3.3 Biochemische Charakterisierung von P450 CYP102A3 .....	47
3.3.1 Katalytische Aktivität von P450 CYP102A3 gegenüber pNCA-Substraten .....	47
3.3.2 Lösungsmittelstabilität .....	48
3.3.3 Einfluss verwendeter Puffersalze auf die Aktivität von P450 CYP102A3 .....	50
3.3.4 Temperaturstabilität .....	51
3.3.5 pH-Stabilität .....	53
3.3.6 Substratspezifität und Regioselektivität von CYP102A3 .....	54
3.4 Erweiterung der Substratspezifität von P450 CYP102A3 durch Rationales Design .....	56
3.4.1 Substratspezifität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym .....	57
3.4.2 Weitere Eigenschaften von F88V S189Q im Vergleich zum Wildtyp-Enzym .....	61

## Inhaltsverzeichnis

---

3.5	Entwicklung eines Hochdurchsatzassays zur Identifizierung verbesserter Enzymvarianten...	61
3.5.1	Entwicklung des <i>pNA</i> -Assays .....	61
3.5.2	Entwicklung des ADH-Assays .....	63
3.5.3	Evaluierung des Testformats .....	66
3.6	Gerichtete Evolution von P450 CYP102A3 aus <i>B. subtilis</i> .....	70
3.6.1	Erzeugung einer Mutantenbibliothek .....	70
3.6.2	Durchmusterung der Mutantenbibliothek.....	71
3.6.3	Verifikation der Screening-Ergebnisse .....	73
3.6.4	Erstellung zweier neuer Mutanten auf Basis der Sequenzierung von 91F9 .....	74
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
4.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung von CYP102A3 .....	77
4.2	Biochemische Charakterisierung von CYP102A3 .....	79
4.3	Entwicklung des <i>pNA</i> - und des ADH-Assays.....	81
4.4	Evolutive Veränderung von P450 CYP102A3 .....	83
4.5	Ausblick .....	86
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>88</b>
5.1	Geräte und Verbrauchsmittel .....	88
5.1.1	Biotransformation und chemische Synthesen .....	88
5.1.2	Mikrobiologie, Molekulargenetik und Proteinaufreinigung .....	89
5.1.3	Chemikalien und Enzyme .....	92
5.2	Verwendete Mikroorganismen und Plasmide.....	94
5.3	Synthetische Oligonukleotide .....	94
5.3.1	Primer für Amplifizierungsreaktionen .....	94
5.3.2	Primer für die Sequenzierung .....	95
5.3.3	Primer für die QuickChange-PCR .....	95
5.4	Lösungen, Medien und Puffer .....	95
5.4.1	Kulturmedien.....	96
5.4.2	Lösungen für die Kultivierung und Expression .....	97
5.4.3	Puffer und Lösungen für Mini-Plasmid-Präparation (Schnelltest) .....	97
5.4.4	Puffer und Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese.....	98
5.4.5	Puffer und Lösungen für DNA-Sequenzierung.....	98
5.4.6	Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese.....	99
5.4.7	Lösungen für Anionenaustauschchromatografie und Dialyse.....	100
5.4.8	Reaktionslösungen für Aktivitätstests und Hydroxylierungsreaktion.....	100
5.4.9	Lösungen für die Transformation in <i>E. coli</i> .....	101
5.4.10	Lösungen für die <i>error-prone</i> -PCR .....	102
5.4.11	Lösungen für die <i>Quick-Change</i> -PCR.....	102

5.4.12	Puffer und Lösungen für weitere Anwendungen .....	102
5.5	Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden .....	103
5.5.1	Stammhaltung und Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> .....	103
5.5.2	Stammhaltung und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	104
5.5.3	Stammhaltung und Kultivierung in Mikrotiterplatten .....	105
5.5.4	Isolierung und Präzipitation genomischer DNA aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	105
5.5.5	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) .....	105
5.5.6	DNA-Präzipitation .....	109
5.5.7	Restriktionsspaltung der DNA .....	110
5.5.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	111
5.5.9	Ligation von DNA mit T4-Ligase .....	112
5.5.10	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> .....	113
5.5.11	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> .....	114
5.5.12	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	116
5.5.13	DNA-Sequenzierung .....	116
5.6	Expression, Reinigung und Charakterisierung von Proteinen .....	119
5.6.1	Expression des Zielproteins im Schüttelkolben .....	119
5.6.2	Expression des Zielproteins in Mikrotiterplatten .....	119
5.6.3	Zellaufschluss .....	120
5.6.4	SDS-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	120
5.6.5	Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Nachweis .....	122
5.6.6	Bestimmung der P450-Konzentration .....	122
5.6.7	Chromatografische P450-Reinigung mittels Anionenaustauscher .....	123
5.6.8	Enzym-Dialyse .....	125
5.7	Chemische Synthesen .....	125
5.7.1	<i>p</i> -Nitrophenoxycarbonsäuren ( <i>p</i> NCA) .....	125
5.7.2	<i>p</i> -Nitrophenoxyalkane ( <i>p</i> NA) .....	125
5.8	Analytische Methoden .....	127
5.8.1	Aktivitätsbestimmung mit dem <i>p</i> NCA-Assay .....	127
5.8.2	Aktivitätsbestimmung mit dem <i>p</i> NA-Assay .....	130
5.8.3	Aktivitätsbestimmung über den NADPH-Verbrauch .....	130
5.8.4	ADH-Aktivitätstests .....	131
5.8.5	Präparativer Ansatz zur Produktanalyse .....	131
5.8.6	Gaschromatographische Analyse .....	132
5.9	High-Throughput-Screening .....	134
5.9.1	Aktivitätsbestimmung in Mikrotiterplatten .....	134
5.9.2	Screening mit dem ADH-Assay .....	134
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>160</b>

## Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr(e)
ADH	Alkoholdehydrogenase/Alcohol Dehydrogenase
$A_f$	Asymmetriefaktor
ALA	Aminolävulinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
BCA	Bicinchoninsäure
BM	Bacillus megaterium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
c	Konzentration
C	Celsius
CYP	Cytochrom P450
D	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsDNA	doppelsträngige DNA
E.C.	Enzyme Commission
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ep</i>	error-prone
ESR	Elektronenspinresonanz
EXAFS	Weitreichende Röntgenabsorptionsspektroskopie
FAD	Flavinadenindinucleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinadeninmononucleotid
GC/GLC	Gaschromatografie/Gas Liquid Chromatography
Glc	Glucose
h	Stunde(n)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HTS	Hochdurchsatzscreening/High Throughput Screening
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid
kB	Kilobase (1000 Basenpaare)
$k_{cat}$	Wechselzahl
kDa	Kilo-Dalton
$K_M$	Michaelis-Konstante
KOAc	Kaliumacetat



KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat-Puffer mit unterschiedlichem Verhältnis von Kaliumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani (Komplexmedium)
LB-Amp	Ampicillinhaltiges LB-Medium
min	Minute(n)
M	Mol pro Liter
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
mM	Millimol pro Liter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MSHFBA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramid
MTP	Mikrotiterplatte
(m/v)	Masse / Volumen
m.w.N.	mit weiteren Nachweisen
NAD	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert), Dinatriumsalz
NADP	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, Dinatriumsalz
NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert), Tetra-natriumsalz
NaOAc	Natriumacetat
NMR	Kernspin-Resonanz
OD <sub>xxx</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
P450	Pigment, das bei 450 nm absorbiert
P450 <sub>cam</sub>	Campherhydroxylase CYP101 aus <i>Pseudomonas putida</i>
P450 <sub>eryF</sub>	Monooxygenase CYP107A1 aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
P450 <sub>nor</sub>	NO-Reduktase (CYP55A1) aus <i>Fusarium oxysporum</i>
P450 <sub>terp</sub>	α-Terpineolhydroxylase (CYP108) aus <i>Pseudomonas sp.</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pNA	p-Nitrophenoxyalkan
pNCA	p-Nitrophenoxy-carbonsäure
RNA	Ribonucleinsäure
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
t	Tonne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobium brockii</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA

## Abkürzungsverzeichnis

---

TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TfB	Transformation Buffer
THF	Tetrahydrofuran
Tp/m	Anzahl an theoretischen Böden pro Meter
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformation storage solution
U	Unit (Stoffmengenumsatz in $\mu\text{mol}$ pro Minute)
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
(v/v)	Volumen / Volumen
WT	Wildtyp
$\mu\text{M}$	Mikromol pro Liter

## Zusammenfassung

Cytochrom P450-Monooxygenasen sind in der Natur weit verbreitet und besitzen Schlüsselfunktionen im Metabolismus exogener und endogener Verbindungen. Funktionell ist allen P450-Enzymen gemeinsam, Sauerstoffatome auf nicht aktivierte aliphatische oder aromatische C-H, N-H oder S-H-Bindungen zu übertragen. Die funktionelle Vielfalt der durch P450-Systeme katalysierten Monooxygenierungen von auf chemischem Wege häufig nur schwer zugänglichen Verbindungen bietet ein enormes biotechnologisches und pharmakologisches Potential. Eine wichtige Voraussetzung zur Nutzung dieser Potentiale ist die Entwicklung geeigneter Expressions-, Reinigungs- und Aktivitätsnachweissysteme, die erlauben P450-Systeme zu charakterisieren und Enzymvarianten mit verbesserten Eigenschaften aufzufinden.

Es existieren bereits zahlreiche Untersuchungen zur bakteriellen Fettsäurehydroxylase CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*, die viel versprechende Eigenschaften in Bezug auf Aktivität und Stabilität im Vergleich zu eukaryontischen Systemen aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere bakterielle Monooxygenase der P450-Familie CYP102 kloniert und in *E. coli* funktionell exprimiert. Bei der Charakterisierung der P450-Monooxygenase CYP102A3 aus *Bacillus subtilis* wurde entdeckt, dass sie höhere Stabilität bei Raumtemperatur und in Lösungsvermittlern aufweist als CYP102A1 und damit für technische Anwendungen geeigneter erscheint. Durch Mutagenese wurde die Substratspezifität stark erweitert und auf Alkane und Arene ausgedehnt. Um die Regioselektivität der *n*-Octan-Hydroxylierung durch Mutagenese von rein subterminaler zu terminaler Hydroxylierung zu ändern, wurde ein Hochdurchsatzassay entwickelt, der selektiv für terminale Hydroxylierungen an aliphatischen Verbindungen ist. Er beruht auf der Oxidation des entstandenen primären Alkohols zum Aldehyd durch eine Hefe-Alkoholdehydrogenase.

Mit Hilfe des Assays und der Methode der gerichteten Evolution konnte aus 6500 Mutanten eine terminal hydroxylierende Variante identifiziert werden, deren Sequenzinformationen die Erstellung einer stabilen Doppelmutante auf der Basis von CYP102A3 ermöglichte, welche bei der Hydroxylierung von *n*-Octan einen Produktanteil von 48% 1-Octanol liefert.

## Summary

P450 monooxygenases play a key role in primary and secondary metabolic pathways and in drug detoxification. Cytochromes P450 are heme-thiolate proteins which are widely distributed in animals, plants and microorganisms (Nelson et al., 1996). Their unique hydroxylation capacity provides the opportunity to use these biocatalysts for the synthesis of fine chemicals (Juchau, 1990; Guengerich et al., 1996), as they even act on non-activated carbon-hydrogen bonds and hydroxylate such compounds as alkanes, fatty acids, terpenes and steroids, often exhibiting high regio- and stereoselectivity.

P450 CYP102A1 from *Bacillus megaterium*, a natural fusion protein between a heme and a reductase domain, hydroxylates substrates (fatty acids) 100-1000 times faster than eukaryotic P450 systems (Boddupalli et al., 1990). Thus, it was obvious to investigate other *Bacillus* P450s. The *Bacillus subtilis* genome sequencing project revealed six cytochrome P450 enzymes (*biol*, *cypA*, *cypC*, *cypX*, *yetO* and *yrhJ*), whose biological function is only partially known. *CypC* (formerly known as *ybdT*) is a 48 kDa protein which hydroxylates myristic acid in  $\alpha$ - and  $\beta$ -position in the presence of  $H_2O_2$  (Matsunaga et al., 1999). *Biol* is a 45 kDa protein involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis* (Stok, De Voss, 2000). There is no data or publication about *cypA* and *cypX* at the moment. The proteins coded by *yetO* and *yrhJ* were recently classified as P450 CYP102A2 and P450 CYP102A3 and are involved in the fatty acid metabolism of *B. subtilis* (Gustafsson et al., 2001; Lee et al., 2001). Like CYP102A1 from *B. megaterium*, they are water-soluble fusion proteins ( $M_r$  119 kDa), which contain a heme and a FAD-/FMN-dependent reductase domain within the same polypeptide chain. In terms of the electron transfer from NADPH to the heme iron, P450 CYP102A2 and P450 CYP102A3 can thus be regarded as self-sufficient. The similarity on protein level of 76% (CYP102A2) and 77% (CYP102A3) to P450 CYP102A1 makes the comparison of substrate preferences and specificity of these enzymes of some interest.

Cytochrome P450 BM-3 (CYP102A1) from *Bacillus megaterium*, an enzyme which is among the most studied prokaryotic P450 monooxygenases, catalyzes the subterminal hydroxylation of fatty acids with a chain length of  $C_{12}$  to  $C_{22}$ . It preferentially hy-

droxylates in the ( $\omega$ -1/2/3) positions with high enantioselectivity in the  $\omega$ -1 and  $\omega$ -2 positions (98% R, 2% S) (Truan et al., 1999). By introduction of mutations into this enzyme's binding site, the substrate spectrum was increased significantly. CYP102A1 mutant A74G F87V L188Q was able to convert octane, ionones and naphthalene. The hydroxylation of octane resulted in a mixture of 2-, 3- and 4-octanol with a conversion rate of 93% (Appel et al., 2001).

As mentioned above, P450 monooxygenases are very interesting candidates for industrial biotransformations. Enzymes or their genetically improved variants with special properties leading to the conversion of single synthesis steps or the whole process from chemical to biotechnological production are of special interest. The synthesis of 1-octanol using *n*-octane as an educt should be the model production process examined in this work. Using P450 catalysis, there is only one reaction step necessary in contrast to chemical methods starting from educts like fats, oxo-aldehydes or olefins (Weissermel/Arpe, 1997). The necessary reaction steps often require harsh conditions like high temperature and pressure. One mutant of P450 CYP102A1 showed interesting results hydroxylating octane in mild conditions although only secondary alcohols were observed as products. From these facts three main tasks emerged: First, cloning, expression and characterization of P450 CYP102A2 and A3 to compare their properties to P450 CYP102A1 and selection of the enzyme most suitable for the model production process. Second, development of a HTS-assay to discriminate between terminal and subterminal hydroxylating enzyme variants and third, identification of enzyme variants with the desired property by screening a mutant library using the assay system.

### Cloning, expression, purification and characterization of CYP102A3

The genes coding for CYP102A2 and A3 were cloned into the pET20b(+)-vector under control of the IPTG-inducible T7 promoter. CYP102A3 can be actively expressed with this vector using *E. coli* BL21(DE3) cells in shaking flasks (500 ml LB medium) up to an enzyme concentration of 50 – 55 nmols P450 per liter expression medium. CYP102A2 in contrast, could not be actively expressed in this system and further examination was cancelled.

The CYP102A3 crude extract solution was purified in a similar manner as described for CYP102A1 (Schwaneberg et al., 1999a) using DEAE 650M and SuperQ650M as anion exchanger materials in three steps with different NaCl concentrations. The purity reached up to 68% compared to 93% with CYP102A1, but was good enough for the characterization experiments using the *p*NCA-assay (for details, see Schwaneberg et al., 1999b).

pH, co-solvent, temperature and buffer salt stability values of CYP102A3 were compared to the CYP102A1 values previously described (Schwaneberg, 1999). There were only minor differences in temperature and pH stability between the two enzymes. For CYP102A1, 30 min incubation at 36°C lead to an increase in activity of up to 60%; no such effect was observed for CYP102A3. The residual activity of CYP102A3 at ambient temperature, measured over a period of 7 days, was higher than that of the *B. megaterium* enzyme. CYP102A3 was not as stable as CYP102A1 when kept in saline solutions. P450 CYP102A1 retains 80% of its activity in solutions with 400 mM NaCl whereas CYP102A3 activity fell below this level when the NaCl concentrations were above 150 mM. The greatest difference between CYP102A1 and CYP102A3 relates to their activity when different amounts of co-solvent are present in the reaction mixture. Co-solvents are often used to solubilize hydrophobic substrates in aqueous reaction mixtures. It could be shown that the *B. subtilis* enzyme was more active when up to 25% (v/v) DMSO was present in the reaction mixture. The residual activity of CYP102A1, however, already dropped to 11% at 10% (v/v) DMSO. The reason for this is not known at the moment. Substrate specificity towards the *p*NCA-substrates indicated that CYP102A3 was better suited to hydroxylate shorter-chain substrates than CYP102A1. Wild-type CYP102A1 did not show any activity towards 8-*p*NCA; CYP102A3 revealed at least some activity.

The wild-type enzyme CYP102A3 catalyzes the conversion of medium and long-chain fatty acids. According to published data (Lentz et al., 2001), CYP102A3 was expected to be able to catalyze the conversion of capric acid (C10:0) and lauric acid (C12:0) since it shows activity towards the similar-sized 8- and 10-*p*NCA. Indeed, GLC analysis identified 7-, 8-, 9-hydroxycapric acid and 9-, 10-, 11-hydroxylauric acid as products with conversion rates of 28% and 93%, respectively. Lauric (C12:0) acid was hydroxylated by CYP102A3 with a higher conversion rate compared to

CYP102A1 of *B. megaterium* (93% vs. 40%; Lentz et al., 2001). Alkanes were not accepted as substrates by the CYP102A3 wild-type.

### Development of an assay system for mutant screening

Primary and secondary octanols, the products of *n*-octane hydroxylation catalyzed by CYP102 mutants, are difficult to differentiate from each other. For a HTS assay GLC analysis is too slow to be used; instead a photometrically detectable reaction should be chosen. The assay system developed and named ADH-assay is based on the different oxidation speeds of the hydroxylation products 1-octanol and 2-/3-/4-octanol to the respective aldehyde and ketones by yeast alcohol dehydrogenase (E.C. 1.1.1.1). The amount of 1-octanol oxidized is 10 times as high as that of secondary alcohols. Yeast ADH requires NAD as cofactor, which is reduced to NADH absorbing at 340 nm, during the assay reaction and can be monitored photometrically (Fig. 1). The linearity of the assay was tested in a concentration range from 250 to 500  $\mu$ M in cuvettes and microtiterplates.

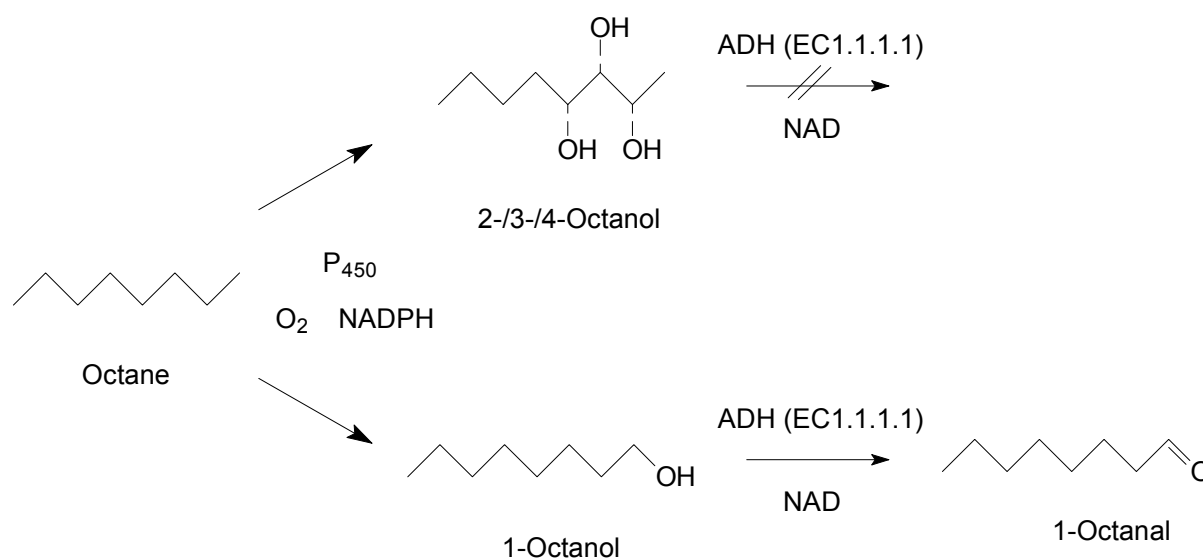


Figure 1: Principle of the ADH-assay. Only 1-octanol-containing reaction mixtures show a significant increase in NADH concentration which is measurable by UV-VIS spectroscopy.

### Modification of substrate specificity and regioselectivity of CYP102A3

The mutations A74G, F87V and L188Q proved useful in CYP102A1 with regard to broadening its substrate spectrum (Appel et al., 2001). The corresponding mutations were also introduced in CYP102A3 that already contains a glycine residue at position 75 (corresponding to A74G of CYP102A1). In contrast to the wild-type enzyme, the double mutant F88V S189Q is also able to convert medium-chain alkanes and aromatic compounds like octane and naphthalene. Octane was converted by the CYP102A3 mutant with a ratio of 49%. The products detected after the reaction catalyzed by the F88V S189Q mutant were 3- and 4-octanol. The absence of 2-octanol was not expected, since the wider reaction pocket, created by the mutations, should also lead to hydroxylation in this position. 1-Octanol was not produced by any mutant. Octane is oxidized at a similar rate as lauric acid, although the overall conversion rate is significantly lower (49% vs. 82%).

As none of the mutants of CYP102A1 or A3 is able to produce 1-octanol, *error-prone* PCR was chosen as a method to create a mutant library. The *CYP102A3 F88V S189Q* gene was selected as starting point, because of the higher stability and activity of the protein in DMSO which proved useful as a co-solvent for the model production process. A library of around 6,500 mutants was constructed and screened for activity towards octane. 17% of the mutants proved active and were screened further with the ADH-assay on terminal hydroxylation capabilities. Six mutants showed promising results and were expressed in shaking flasks. Only one mutant (91F9) could be actively expressed, giving only small amounts of active P450 enzyme which loses its activity rapidly. To produce more stable mutants, the sequencing information of 91F9, which showed four new mutations in the monooxygenase domain (Q314F, N321G, A330V, L410P), was used. Two additional mutants (CYP102A3 F88V S189Q A330V and S189Q A330V) were created that are stable under the expression and reaction conditions used with the wild-type enzyme, although octane conversion rates were low, 7 and 5% respectively. Mutant F88V S189Q A330V showed a product mixture of 7% 4-octanol, 40% 3-octanol, 42% 2-octanol and 11% 1-octanol, mutant S189Q A330V produced 16% 3-octanol, 36% 2-octanol and 48% 1-octanol (Fig. 2).



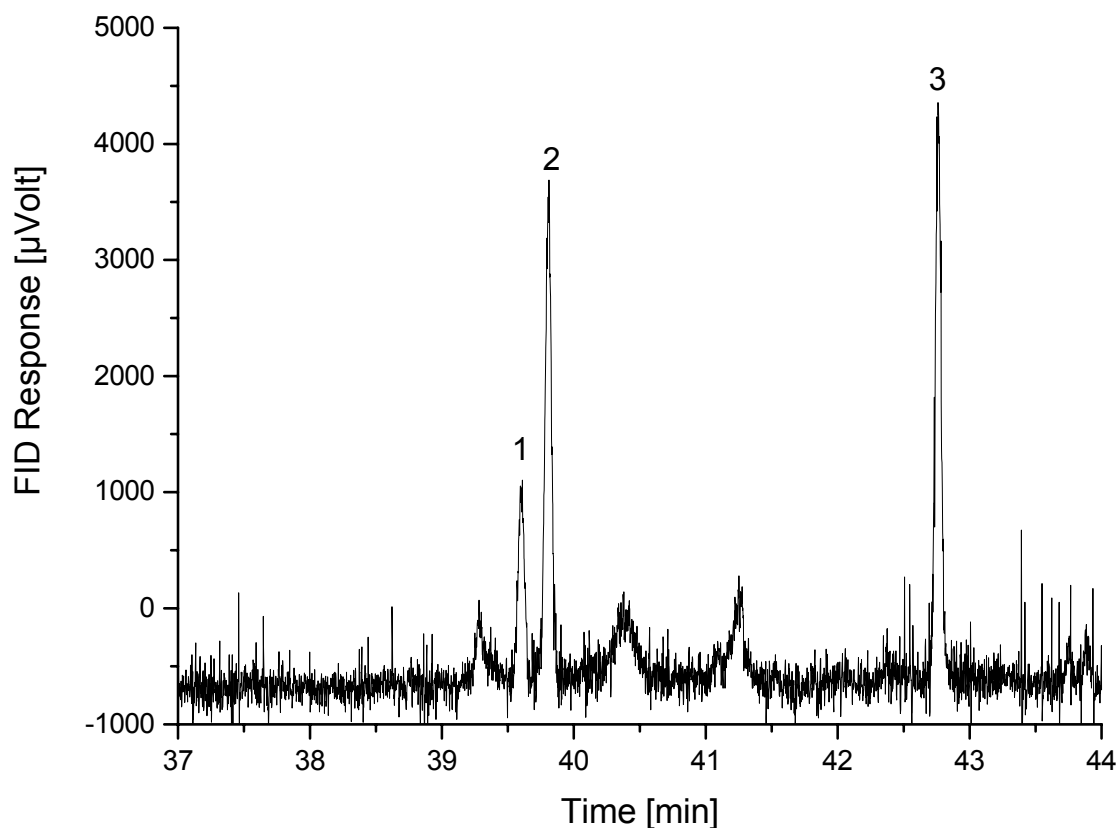


Figure 2: GLC analysis of the reaction mixture after CYP102A3 S189Q A330V catalysis. The mixture consists of the educt (not shown), 3-octanol (Peak 1, 39.6 min), 2-octanol (Peak 2, 39.8 min) and 1-octanol (Peak 3, 42.8 min).

As a conclusion, the cloning and expression of CYP102A3 was successful. A HTS-assay was developed that was used to screen a self-created library of mutants and it was possible to create a CYP102 monooxygenase mutant that is able to produce 1-octanol, although not as a sole but as the main product of *n*-octane hydroxylation.

# 1 Allgemeiner Teil

## 1.1 Einleitung

Biokatalytische Prozesse werden von Menschen seit alters her zur Produktion fermentierter Nahrungs- und Genussmittel eingesetzt. Die Konservierung von Lebensmitteln oder die Weinherstellung beruhen auch heute noch auf denselben Prinzipien wie früher, obwohl sie sich durch einsetzende Kommerzialisierung und behördliche Reglementierung verändert haben. Das Wissen über die Wirkungsweise von Mikroorganismen und Enzymen wird dazu genutzt, die Haltbarkeit zu verbessern (Pasteurisation, Sterilisation) und die Herstellung zu optimieren (Teigherstellung, Wurst- und Fleischproduktion).

Ein weiteres klassisches Anwendungsgebiet biokatalytischer Prozesse ist die Waschmittelindustrie, wo die erste Nutzung proteolytischer Enzyme bereits 1913 beschrieben ist. Moderne Waschmittel enthalten heute Amylasen, Proteasen und Lipasen, um eine effektive Entfernung von Polysaccharid-, Protein- und Fettverschmutzungen zu gewährleisten.

Biokatalytische Prozesse finden weiterhin Anwendung in der Textil- und Papierindustrie sowie in der Medizin- und Umweltanalytik (Schmid, 2002). In den letzten Jahren finden Enzyme auch Eingang in Bereiche, die bislang der synthetischen Chemie vorbehalten waren: die Darstellung von Feinchemikalien und Synthonen. Enzyme zeichnen sich durch hohe Regio- und Stereoselektivitäten aus. Dadurch ist es auch möglich, chemisch schwer zugängliche Verbindungen durch biotechnologische Verfahren herzustellen. Biotransformationen werden üblicherweise unter milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, Luftdruck) und in wässrigen Lösungen durchgeführt, so dass im Vergleich zu konventionellen chemischen Verfahren sehr viel weniger Energie benötigt wird. Gleichzeitig werden toxische Nebenprodukte (Schwermetalle etc.) vermieden, was sich günstig auf die Abfallbilanz auswirken kann.

Fortschritte auf den Gebieten der Mikrobiologie und Gentechnik (rekombinante Produktion von Enzymen in mikrobiellen Expressionssystemen) erlauben eine fortlaufende Gewinnung des Biokatalysators aus nachwachsenden Rohstoffen und forcieren den Einsatz der zunehmend konkurrenzfähigen biotechnologischen Verfahren.

## 1.2 Industrielle Biotransformation

Der zunehmende Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen im Bereich der organischen Synthese spiegelt sich in der steigenden Zahl von Patenten und wissenschaftlichen Veröffentlichungen wider und ist in der Literatur dokumentiert (Bornscheuer/Kazlauskas, 1999; Faber, 2000; Liese et al., 2000). Den Trend zur Umstellung auf biokatalytische Prozesse erkennt man auch an den Bestrebungen, fehlendes Know-how durch Kooperationen (outsourcing), eigene Entwicklung und Fusionen bzw. Übernahmen zu erwerben (Ernst & Young, 2003). Bei Produkten, die einen Verkaufspreis von über 20-30 US-\$/kg erzielen, ist eine Umstellung auf biotechnologische Verfahren laut Industrie rentabel. Liegt der Marktwert unter dieser Schwelle, so muss eine jährliche Produktion von über 1000 t angestrebt werden (Schmid et al., 2001).

Während zu Beginn der 80er Jahre nur sehr komplexe Produkte wie Antibiotika und Insulin durch biotechnologische Verfahren hergestellt wurden, ist mittlerweile auch die Produktion „einfacher“ Verbindungen kostengünstig möglich. Als Beispiel ist hier die Produktion von Ethanol durch Fermentation von Cellulose oder Getreide (ca. 5,7 Mrd. Liter pro Jahr in den USA im Jahr 2001) zu nennen. Wurden traditionell Fermentationsprozesse mit ganzen Zellen durchgeführt, so gewinnen isolierte Enzyme immer mehr an Bedeutung, da sie sich wie konventionelle Katalysatoren behandeln lassen. Hier besteht die Möglichkeit der Aufreinigung und Immobilisierung, um so auch in kontinuierlichen Prozessen höhere Leistungen zu erzielen. Beispiele sind die Produktion von Acrylamid aus Acetonitril (*Rhodococcus rhodochrous* J1; Nitto Chemical, Japan; >30.000 t/a; Bornscheuer/Kazlauskas, 1999) und die Darstellung von L-Asparaginsäure durch Addition von Ammoniak an Fumarsäure (DSM, Niederlande; >1.000 t/a; Schmid et al., 2001).

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Enzymklassen, die in der Lage sind Reaktionen zu katalysieren, die rein chemisch nur in mehrstufigen Prozessen oder unter Anwendung extremer Bedingungen (hoher Druck und/oder hohe Temperatur) zu realisieren sind. Kann bei Einsatz eines Enzyms auf solche Bedingungen verzichtet werden, ist die Umstellung des Prozesses von chemischen auf biotechnologische Verfahren möglicherweise rentabel. Die Übertragung von Sauerstoff-Atomen auf nicht aktivierte Kohlenwasserstoff-Verbindungen kann durch

Cytochrom P450-Monooxygenasen bei Raumtemperatur in einem einzigen Reaktionsschritt bewerkstelligt werden, was diese Enzymklasse für industrielle Biotransformationen potentiell interessant erscheinen lässt.

### 1.3 Die Enzymklasse der Cytochrom P450-Monooxygenasen

Cytochrom P450-Enzyme gehören zur Klasse der Monooxygenasen (E.C.1.14.-.-). Sie sind in der Natur weit verbreitet und besitzen Schlüsselfunktionen im Metabolismus exogener und endogener Verbindungen. Strukturell enthalten alle P450-Enzyme ein Häm-System im katalytischen Zentrum, das als Besonderheit zu anderen Häm-Enzymen ein Cysteinat als fünften Liganden am Porphyrinsystem enthält. Dieser Aufbau ist verantwortlich für die charakteristischen spektralen Eigenschaften von P450-Enzymen wie beispielsweise die Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 450 nm in Kohlenmonoxid-Differenzspektren, die P450-Systemen ihren Namen gab.

Funktionell ist allen P450-Enzymen gemeinsam, Sauerstoff-Atome auf aktivierte und nicht aktivierte aliphatische oder aromatische X-H ( $X = -C, -N, -S$ ) Bindungen zu übertragen. Darüber hinaus vermögen P450-Enzyme  $-C=C-$  Doppelbindung zu epoxidieren. Für diese Oxygenierungsreaktionen benötigen die meisten P450-Systeme Cofaktoren wie NADPH oder NADH als Elektronenquelle. Entsprechend der Realisierung dieses Elektronentransfersystems (Reduktasesystems) unterteilt man P450-Systeme in vier Klassen. Klasse I P450-Enzyme erhalten Elektronenäquivalente über eine FAD-Reduktase und ein weiteres Fe-S-Protein (zumeist mitochondriale und bakterielle P450-Enzyme). Klasse II P450-Enzyme benötigen eine FAD/FMN-Reduktase (mikrosomale P450) zum Elektronentransfer. Klasse III P450-Enzyme benötigen keine weiteren Reduktionsäquivalente, sie setzen peroxygenierte Substrate um, die den Sauerstoff bereits enthalten. Das einzige P450-Enzym der Klasse IV (P450<sub>nor</sub> bzw. CYP55A1) erhält seine Elektronen direkt ohne Transfersystem von NADH (Nakahara et al., 1994).

Die funktionelle Vielfalt der durch P450-Systeme katalysierten Monooxygenierungen von auf chemischem Wege häufig nur schwer zugänglichen Verbindungen bietet ein enormes biotechnologisches, pharmakologisches und toxikologisches Potential. Eine wichtige Voraussetzung zur *in vitro* Nutzung dieser Potentiale ist die Entwicklung ge-

eigneter Expressions-, Reinigungs- und vor allem Aktivitätsnachweissysteme, die erlauben, P450-Systeme zu charakterisieren und Enzymvarianten mit „verbesserten“ Eigenschaften aufzufinden.

### 1.3.1 Die P450-Superfamilie - eine der größten bekannten Enzymfamilien

#### a) *Entdeckung und Namensgebung*

Entdeckt wurde Cytochrom P450 1955 an der University of Pennsylvania von M. Klingenberg und G. R. Williams (Klingenberg, 1958), die in Rattenleber-Mikrosomen ein CO-bindendes Pigment fanden. Bei diesem Häm-Protein erscheint das Absorptionsmaximum der Soret-Bande des Eisen(II)-CO-Derivats nicht wie gewöhnlich bei 420 nm, sondern bei 450 nm, was die Entdecker dazu veranlasste, diese Enzyme Cytochrom P450 zu nennen. „P“ steht für Pigment, 450 entspricht der Wellenlänge des Absorptionsmaximums, und Cytochrom bedeutet frei übersetzt soviel wie Zellfarbstoff.

#### b) *Verbreitung und Evolution*

Die P450-Superfamilie ist mit etwas über 3000 bekannten Gensequenzen eine der größten und ältesten heute bekannten Genfamilien. Sie entwickelte sich vermutlich aus einem ca. 3,5 Milliarden Jahre alten Urgen (Nelson et al., 1993). Ihre ursprüngliche Funktion in thermophilen (McLean et al., 1998), anaeroben und autotrophen Prokaryonten könnte in der Entgiftung von atmosphärischem Sauerstoff bestanden haben, der durch das aufkommende Photosystem II in frühen Cyanobakterien allmählich gebildet wurde und eine Anpassung an aerobe Umweltbedingungen erforderte (Nebert et al., 1989). In Adaption an weitere veränderte Umweltbedingungen und durch Entwicklung von komplexen Nahrungsketten bildeten sich in den letzten 400 Millionen Jahren durch Genduplikationen und anschließende divergente Entwicklungen sprunghaft multiple P450-Formen mit einem einzigartig breiten Spektrum von Substratspezifitäten aus (Gonzalez/Nebert, 1990).

Basierend auf der zuletzt publizierten Liste bekannter P450-Gene (Nelson, <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), sind zur Zeit 3043 P450-Gene in 368 Genfamilien bekannt. Von diesen Genfamilien kommen 18 in allen Säugern vor. Die Zahl bekannter P450-Gene steigt in jüngster Vergangenheit dramatisch, so fand man bislang allein im Genomsequenzierungsprojekt der Pflanze *Arabidopsis thaliana* 273 und in der Reispflanze *Oryza sativa* 458 P450-Gensequenzen.

Die von Nebert (Nebert/Gonzalez, 1987) vorgeschlagene Klassifizierung basiert auf P450-Primärsequenz-Homologien. Hierbei wird die Superfamilie in einzelne Familien und Subfamilien aufgeteilt. Zu einer Genfamilie werden P450-Gene mit einer Protein-Sequenzhomologie von über 40 % und Subfamilien mit einer Protein-Sequenzhomologie von mehr als 55 % zusammengefasst. Die Gene werden mit dem Stamm *CYP* (Ausnahme: Mausgene mit *Cyp*), Proteine und mRNA mit dem Stamm CYP oder P450 bezeichnet. Die Familie oder Subfamilie wird mit nachfolgenden Buchstaben oder Zahlen angegeben, gefolgt von der jeweiligen Nummer des jeweiligen P450. So lautet die Bezeichnung der Fettsäurehydroxylase von *Bacillus megaterium* für das Gen *CYP102A1*, für mRNA und Protein CYP102A1 oder trivial P450 BM-3. Ein Ausschnitt aus einem von Nebert erstellten Stammbaum mit ausgewählten Subfamilien ist in Abbildung 1 gezeigt. Stammbäume dieser Art stellen ein Maß für die strukturelle Ähnlichkeit, phylogenetische Beziehungen (Gonzalez/Nebert, 1990; Nelson/Strobel, 1987) und eine partielle funktionelle Ähnlichkeit der P450-Formen untereinander dar.

Aus den in Abbildung 1 gekennzeichneten Stammbaubereichen kann man erkennen, dass die bakterielle Fettsäurehydroxylasefamilie CYP102 den Fettsäurehydroxylasen aus Säugern (Familie CYP4) evolutionsgeschichtlich näher steht als denen aus Hefen (Familie CYP52).

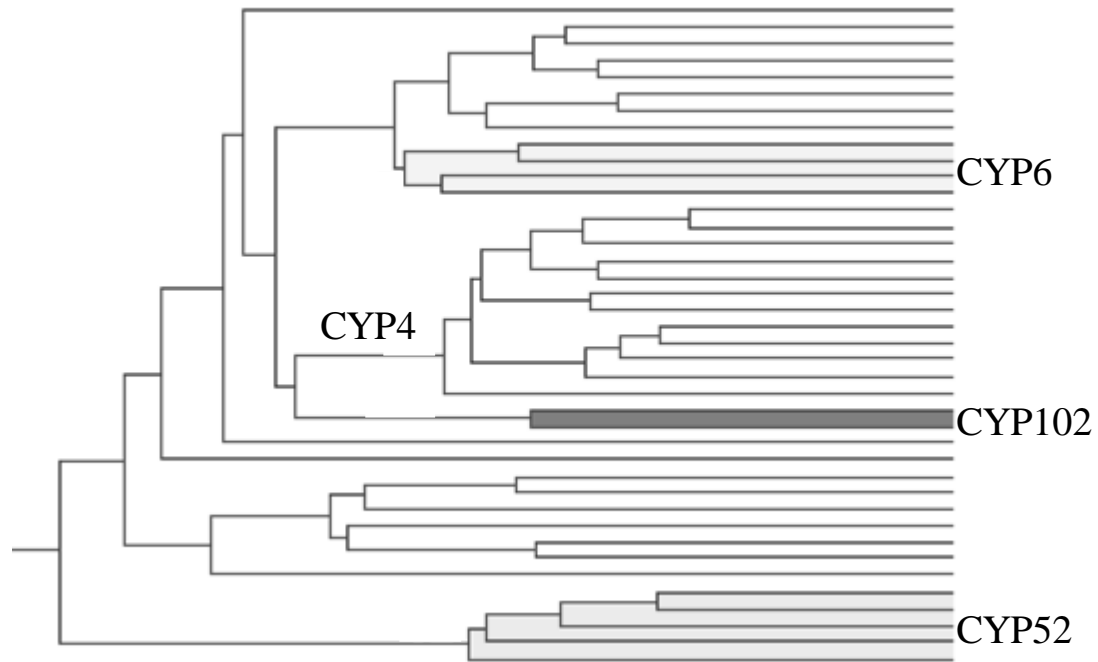


Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Stammbaum der P450-Supergenfamilie ohne Subfamilie. Ausschnitt erstellt auf der Basis eines Stammbaumes von Nebert und Gonzalez (Nebert/Gonzalez, 1987).

### 1.3.2 Struktur und Aufbau von P450-Systemen

Die Zahl der strukturell charakterisierten P450-Enzyme hat sich in den letzten Jahren stark erhöht. Hierbei ist P450<sub>cam</sub> (CYP101) aus *Pseudomonas putida* (Poulos et al., 1987), eine Campher-5-exo-Hydroxylase, mit 20 Kristallstrukturen das am besten untersuchte System. Für P450 BM-3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* sind vier Strukturen bekannt (Ravichandran et al., 1993; Sevrioukova et al., 1999), wobei eine mit Palmitoleinsäure komplexiert vorliegt (Li/Poulos, 1997), eine weitere mit N-palmitoylglycin (Haines et al., 2001). Drei Kristallstrukturen sind von CYP119 aus *Sulfolobus sulfataricus* (Park et al., 2000; Yano et al., 2000) bekannt. Zwei Kristallstrukturen existieren von P450 BS $\beta$  (CYP152A1) aus *Bacillus subtilis* (Lee et al., 2002) und CYP51 aus *Mycobacterium tuberculosis* (Podust et al., 2001). Je eine Kristallstruktur liegt für P450<sub>terp</sub> (CYP108) aus *Pseudomonas* sp. (Hasemann et al., 1994), P450<sub>eryF</sub> (CYP107A1) aus *Saccharopolyspora erythraea* (Cupp-Vickery/Poulos, 1995), P450<sub>nor</sub> (CYP55A1) aus *Fusarium oxysporum* (Park et al., 1997), CYP154C1 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Podust et al., 2003) und CYP175A1 aus *Thermus thermophilus* (Yano et al., 2003) vor. Eine Vielzahl von

P450-Enzymen wurde gereinigt, nach langjährigen intensiven Bemühungen gelang es nun auch, mit CYP2C5 ein membrangebundenes eukaryontisches P450-Enzym, das aus Kaninchenleberzellen isoliert wurde, zu kristallisieren (Williams et al., 2000). Mittlerweile wurden von kommerzieller Seite auch zwei menschliche P450-Enzyme (CYP2C9 und CYP3A4) kristallisiert und 3D-Strukturen erstellt ([www.astex-technology.co.uk](http://www.astex-technology.co.uk)).

Obwohl die Primärsequenzhomologien verschiedener P450-Enzyme häufig sehr gering sind und sich die Bindungstaschen der P450-Enzyme grundlegend voneinander unterscheiden müssen, um solch eine Vielzahl von Substraten unterschiedlicher Größe, Form und elektrostatischen Eigenschaften mit hoher Regio- und Stereoselektivität gezielt umzusetzen, sind strukturell etliche Bereiche hoch konserviert. P450-Enzyme enthalten im Allgemeinen 13  $\alpha$ -Helices und 4 bis 5  $\beta$ -Faltblätter. Das konservierte strukturelle Grundgerüst besteht aus einem Vier-Helix-Bündel (D, E, I, L), Helix J, Helix K und zwei  $\beta$ -Faltblattmotiven ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 2) (Peterson, 1998). Helix I enthält ein hochkonserviertes Threonin, das sich direkt über dem Pyrrolring B des aktiven Zentrums befindet. Helix K enthält ein völlig konserviertes Glu-X-X-Arg-Motiv mit bisher ungeklärter Funktion. Helix L bildet einen Teil der Häm-Bindungsregion. Die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 sind an der Bildung des hydrophoben Substratkanals beteiligt. Darüber hinaus existiert auf der proximalen Seite im Motiv FXXGX $\beta$ CXG (X = beliebige Aminosäure, Y = Arg oder His) des Häm-Zentrums ein in allen P450-Systemen konservierter Cysteinrest, der als fünfter Ligand an das Eisenatom im katalytischen Zentrum bindet. Ein kurzer Bereich mit Zufallsknäuel-Struktur, genannt „Meander“-Region, der ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk bildet und zur Bindung des Häms beiträgt (Zheng et al., 2003), befindet sich ebenfalls auf der proximalen Seite. Die F-G-Schleifenregion und die Faltblätter 1 und 2 des  $\beta$ 1-Bündels bilden den hydrophoben Substrateingangskanal, der das Substratprofil von P450-Enzymen entscheidend beeinflusst.

Zusammenfassend zeigt sich, dass alle Vertreter der P450-Superfamilie eine Reihe gleichartiger Strukturelemente besitzen, die sich in einigen wenigen beschriebenen Bereichen in Anordnung, Länge und Ladung unterscheiden. Diese Unterschiede bilden die molekulare Grundlage für die vielfältigen Substratspezifitäten der Vertreter der P450-Superfamilie. Abbildung 2 zeigt ein dreidimensionales Modell der



Monooxygenase-Domäne von P450 CYP102A1 als typisches Beispiel für P450-Enzyme.

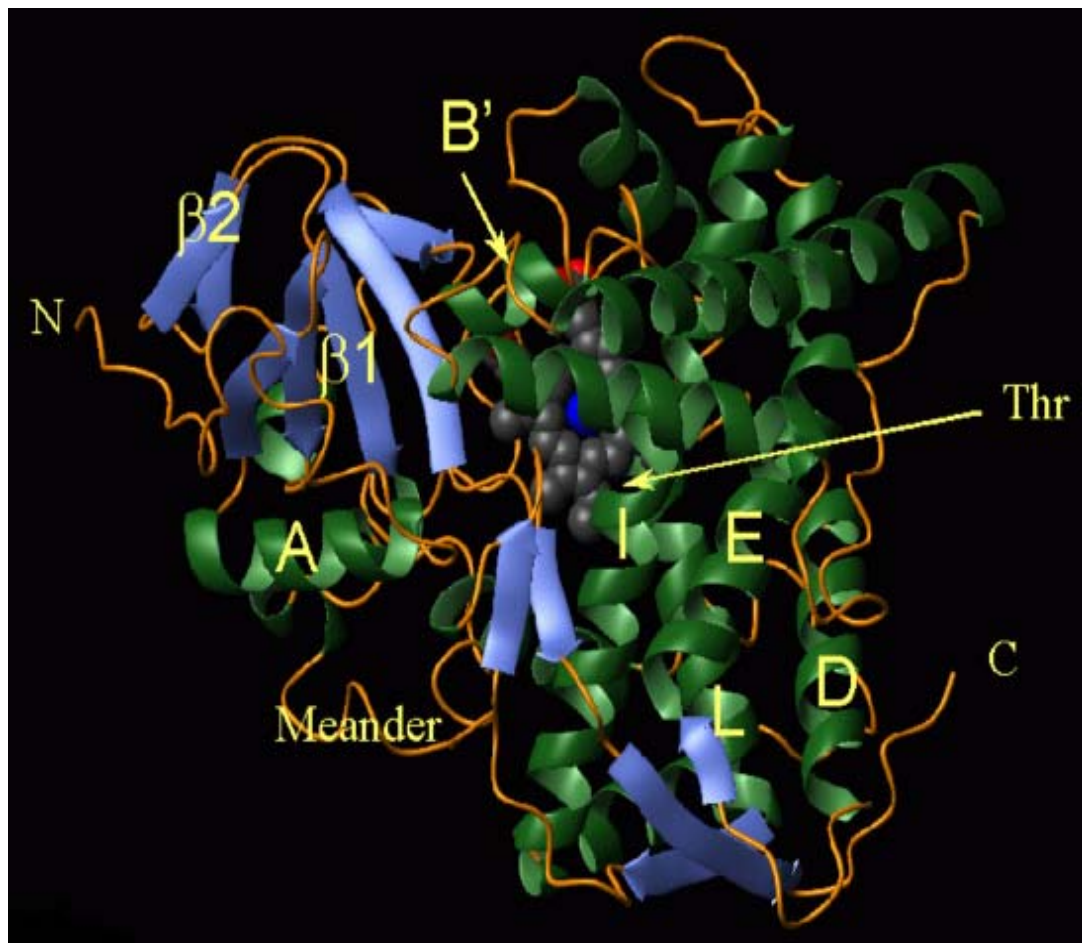


Abbildung 2: Modell der Häm-Domäne von P450 BM-3 mit sekundären Strukturelementen. Ferner repräsentiert C den C-Terminus und N den N-Terminus des Proteins. Das Häm-Zentrum ist grau, das Eisenatom dunkelblau dargestellt. Weitere Großbuchstaben kennzeichnen sekundäre Strukturelemente wie im Text beschrieben (Abbildung aus Schwaneberg, 1999).

### 1.3.3 Katalysemechanismus

Ausgehend von Kristallstrukturen (mit und ohne Substrat), EXAFS-Messungen zur näheren Untersuchung der ersten Koordinationssphäre des Metalls, ESR-Messungen, Mössbauer-Spektroskopie, Schwingungsspektroskopie (unterschiedliche Schwingungsfrequenzen von Disauerstoff, Superoxid, Peroxid), Sauerstoffmarkierungsexperimenten mit  $^{18}\text{O}$  und UV-VIS-Studien, wurde folgender, heute allgemein akzeptierter Katalysezyklus abgeleitet (Abbildung 3), (Kaim/Schwederski, 1995; Lippard/Berg, 1995) und durch weitere Untersuchungen in den letzten Jahren



Shunt der hochoxydierte Komplex **6a** erhalten werden. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt zunächst eine Einelektronenreduktion unter Bildung eines high-spin Fe(II)-Enzyms **3**. Dieses ist aufgrund seiner vier ungepaarten Elektronen ( $S=2$ ) und seiner out-of-plane Situation bestens vorbereitet, Triplett-Sauerstoff zu binden. Die nach der Bindung entstandene Oxy-low-spin Form **4** wurde isoliert, charakterisiert und enthält mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Fe(III)-Superoxid mit in-plane Koordination. Der nächste Reaktionsschritt, eine weitere Einelektronenreduktion zu einem sehr labilen Peroxo-Eisen(II)-Komplex **5**, konnte bei P450<sub>cam</sub> durch Kristallisation direkt beobachtet werden (Schlichting et al., 2000). Dieser aktivierte Komplex geht durch Aufnahme von Protonen in den reaktiven Eisen-Peroxo-Komplex **6a** und nach Abspaltung von Wasser in den Eisen-Oxo-Komplex **6b** über (Hata et al., 2001). Die Natur der kurzlebigen, aktivierten Komplexe blieb lange unklar, neuere Untersuchungen (Newcomb/Toy, 2000; Schlichting et al., 2000) stützen jedoch die These, dass ein Gemisch der beiden elektrophilen Formen **6a** und **6b** vorliegt. Die Eisen-Peroxo-Form **6a** führt zur Insertion von  $\text{OH}^\ddagger$ . Die entstehenden protonierten Alkohole reagieren durch kationische Umlagerungen weiter. Der reaktive Komplex **6b** geht durch einen Rebound-Mechanismus (Abbildung 4) in den Ausgangskomplex über und setzt dabei das Produkt frei. Für den Komplex **6b** mit formal fünfwertigem Eisen  $\text{Fe}^{+V}=\text{O}^{\text{II}}$  wird neben der radikalischen Formulierung in Analogie zu Carbenen eine Oxenoid-Variante mit den formalen Oxidationsstufen null für Sauerstoff und plus drei für Eisen postuliert. Für letztere sprechen röntgenabsorptionsspektroskopische (Sawyer, 1987) und reaktionsmechanistische (Champion, 1989) Untersuchungen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass das  $\pi$ -System des Porphyrinrings oxidiert wird (Elektronenpufferfähigkeit), so dass ein Oxy-ferryl(IV)-Fragment mit vierwertigem Eisen  $[(\text{Por}^{\circ-})\text{Fe}^{+IV}=\text{O}]$  entsteht. Die Geschwindigkeit der radikalischen Sauerstoffübertragung schätzt man bei dem in Abbildung 4 gezeigten Rebound-Mechanismus (Kaim/Schwederski, 1995) auf etwa  $10^9 \text{ s}^{-1}$ . Eine Heterolyse oder eine Addition von R-H an **6b** ist jedoch nicht ausgeschlossen.

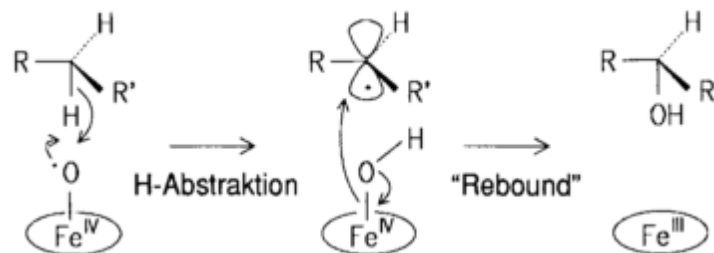


Abbildung 4: Cytochrom P450 – "Rebound"-Mechanismus

Der entstandene Alkohol ist vor seiner Abdissoziation über das Sauerstoffatom noch kurzzeitig an das  $\text{Fe}(\text{III})$ -Porphyrin-System koordiniert. Diese Blockierung der sechsten Koordinationsstelle in Verbindung mit Überlegungen zu Redoxpotentialen ist es zuzuschreiben, dass aus Alkanen keine Diole gebildet werden.

### 1.3.4 Katalysierte Reaktionen der P450-Enzyme

In Organismen dienen Cytochrom P450-Enzyme unter anderem der Ergosterol-Synthese (Berg et al., 1988), der Biosynthese von Insekten- und Phytohormonen (Durst/O'Keefe, 1995; Feyereisen, 1999), der Ausbildung von Fruchtreife, Geruch und Farbe bei Pflanzen (Holton, 1995), der Biosynthese von Gluko- und Mineral-kortikoiden, der Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen (Simpson, 1997; Zhao et al., 1997), dem Metabolismus von Retinoiden zur Regulation von epithelialem Wachstum/Differenzierung sowie dem Arachidonsäurestoffwechsel zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen (Kupfer/Holm, 1989; Simpson, 1997) und der Bildung vasoaktiver Produkte. Darüber hinaus dienen sie zur Aktivierung und Detoxifizierung xenobiotischer Stoffe.

P450-Enzyme gehören zu den sogenannten Phase I Enzymen, die mittels Oxygenierungen wasserunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen zur weiteren Metabolisierung vorbereiten. Dazu dienen Phase II Enzyme wie Glutathion-Transferasen, N-Acetyltransferase oder Sulfotransferase, die eine polare Gruppe an jene hydroxylierten oder epoxidierten Verbindungen addieren. Dadurch werden diese Metabolite wasserlöslich und somit bioverfügbar (Goldstein/Faletto, 1993). Die Vielfalt von Reak-

tionen, die durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert werden, ist im Folgenden zusammengefasst und hinsichtlich ihrer wirtschaftlichen und funktionellen Bedeutung diskutiert. Eine Übersicht, aufgeschlüsselt anhand ausgewählter Familien, findet sich in Tabelle 1.

P450-Familie	Reaktionen von P450-Enzymen
<b>CYP1-3</b>	Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; CYP1: PCB, Dioxine, Aflatoxine; CYP2: Pflanzentoxine, Pestizide; CYP3: Cyclosporine, Erythromycin, ferner beteiligt am Steroidmetabolismus
<b>CYP4, CYP52, CYP102</b>	CYP4, 52, 102: terminale und/oder subterminale Oxidation von Fettsäuren CYP4: Oxidation von Eicosanoiden (Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen)
<b>CYP11, CYP17, CYP21</b>	Biosynthese von Gluko- und Mineralcorticoiden; CYP11: 11- $\beta$ -Hydroxylasen, Hydroxylierung von Deoxycorticosteron oder Deoxycortisol; CYP17: Steroid-17 $\alpha$ -hydroxylase; CYP21: Steroid-21-hydroxylase
<b>CYP19</b>	Umsetzung von Steroiden zu Östrogenen; Aromatase
<b>CYP27</b>	Cholesterin-27-hydroxylase

Tabelle 1: Katalysierte Reaktionen ausgewählter P450-Enzymfamilien (zusammengestellt aus Gonzalez, 1992; Juchau, 1990)

Abbildung 5 zeigt einen Überblick der auftretenden oxidativen Reaktionen, die die C-, S-, N-Oxidation, Epoxidierung, Dealkylierung und Dehalogenierung umfassen.

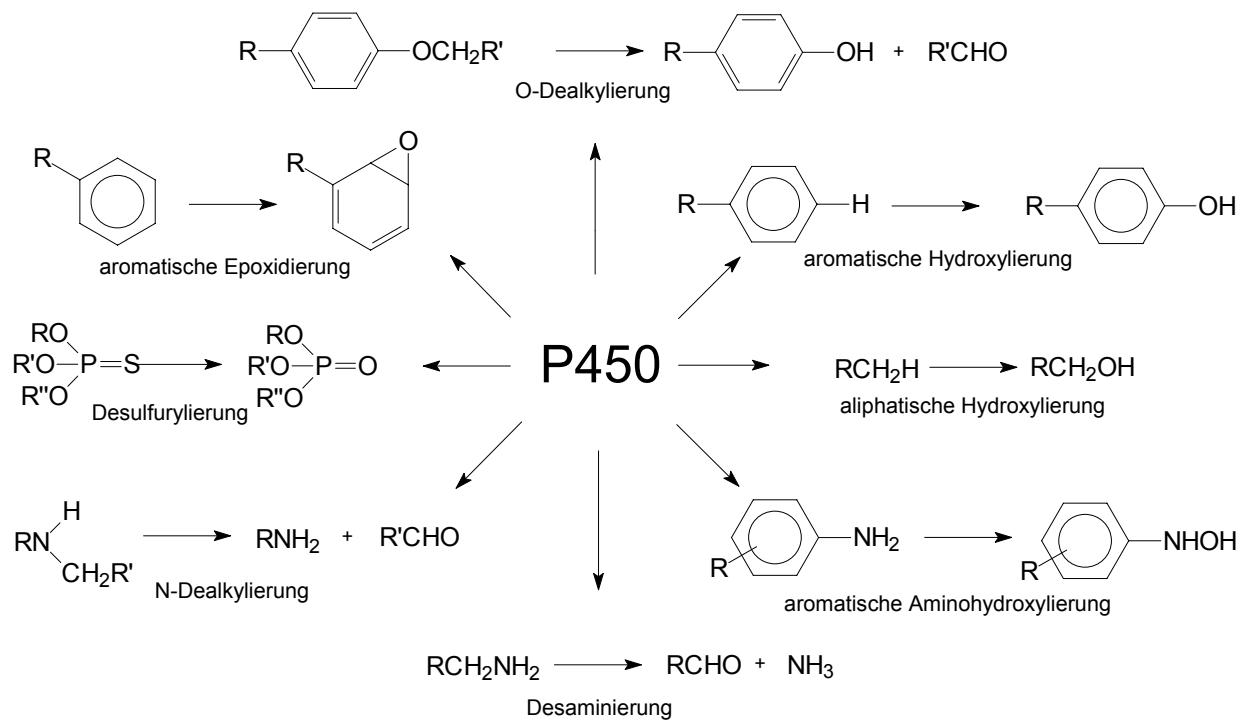


Abbildung 5: Skizze der von P450-Monooxygenasen katalysierten Reaktionen

P450-Enzyme hydroxylieren oder epoxidieren nichtaktivierte C-H-Bindungen und/oder C=C-Doppelbindungen in aliphatischen und aromatischen Systemen. Die gebildeten Metabolite sind häufig toxisch (Gonzalez, 1992) wie das Nervengift 2,5-Hexandion oder karzinogen wie DNA-alkylierende Epoxide (z. B. Styroloxid). Ferner wirken durch P450-Enzyme oxidierte Nitrosamine und Benzpyrene karzinogen (Gonzalez, 1992). Arzneimittel wie Barbiturate und Phenobarbitale werden ebenfalls durch P450-Enzyme in ihre Wirkform überführt.

Die Hydroxylierung nicht aktivierter -C-H Bindungen ist wegen der seltenen Konkurrenz durch chemische Verfahren (Barton et al., 1989; Fossey et al., 1985) eine der nützlichsten Biotransformationsreaktionen (Mansuy/Battioni, 1989). Im Gegensatz zu Radikalreaktionen zeigen Bio-Hydroxylierungsreaktionen an C-Atomen folgende Aktivitätsreihe: sekundär > tertiär > primär (Faber, 2000). Bekannte industriell durchgeführte Verfahren sind die Progesteron-Hydroxylierung an 11 $\beta$ -Position mittels *Aspergillus niger* (Sallam et al., 1977), die etwa die Hälfte der 37 konventionellen Schritte erübrigte, und die 7 $\beta$ -Hydroxylierung von 3 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholsäure durch *Fusarium equiseti* (Kulprecha et al., 1985). Das Produkt Ursodesoxycholsäure vermag Choles-

terin aufzulösen und wird in der Behandlung von Gallensteinen eingesetzt. In der asymmetrischen Synthese werden Biotransformationen unter anderem zur Synthese von  $\beta$ -Hydroxybuttersäure, einem Ausgangsmaterial für Vitaminsynthesen ( $\alpha$ -Tocopherol), von Geschmacksstoffen, von Antibiotika wie Calcimycin (Evans et al., 1979) und von chiralen verzweigten epoxidierten Alkenen (Weijers et al., 1988) wie Fosfomycin (White et al., 1971) verwendet. Weiterhin kennt man die Herstellung von Dicarbonsäuren aus Alkanen mit Hilfe eines modifizierten industriellen Hefestamms aus *Candida tropicalis* (Picataggio et al., 1992), die Hydroxylierung von 2-Phenylpropionsäure zu 2-(4'-Hydroxyphenyl)propionsäure durch den Pilzstamm *Beauveria bassiana* Lu 700 (Dingler et al., 1996; Ladner et al., 1995) und die Synthese von Pregnolon aus Ergosterol durch rekombinante *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, die eine Reihe fremder Gene wie P450, Adrenodoxin und Adrenodoxin-Reduktase aus Rind enthalten (Duport et al., 1998).

Auf die weiteren, oben genannten Reaktionstypen wird aufgrund der für diese Arbeit geringen Relevanz hier nicht näher eingegangen. Eine mechanistische Beschreibung der vorgestellten P450-Reaktionstypen und weiterer ungewöhnlicher Reaktionen findet sich z.B. im Übersichtsartikel von Guengerich (Guengerich, 2001).

### 1.3.5 Charakteristika von P450-Monooxygenasen

Die Verwendung von P450-Monooxygenasesystemen zur *in vitro* Chemikaliensynthese ist bislang noch nicht bekannt. Es müssen zur Verwendung von P450-Monooxygenasen als Katalysator Expressionssysteme vorhanden sein, die es erlauben, funktionell aktives P450 über Artgrenzen hinweg in hohen Ausbeuten zu exprimieren. Darüber hinaus muss das ausgewählte Enzym über eine ausreichend hohe Aktivität und Stabilität (Temperatur-, Lösungsmittel- und Oxidationsstabilität) verfügen. Die Metabolite sollten weder toxisch für den Expressionsstamm sein noch inhibitorisch auf das Enzym wirken. Für Klasse I und Klasse II-Enzyme sollte außerdem ein Cofaktor-Recyclingsystem vorhanden sein, da die Cofaktoren einen erheblichen Kostenfaktor darstellen.

a) *P450-Expressionssysteme*

Für P450-Monooxygenasen existieren ausgezeichnete *E. coli*- und Hefe-Expressionssysteme, in denen funktionell aktive P450 Monooxygenasen in hohen Ausbeuten bis zu 1400 nmol P450 pro Liter Fermentationsbrühe (Cheng et al., 2004; Gonzalez/Korzekwa, 1995, m. w. N.) exprimiert werden können.

In *E. coli*-Expressionssystemen konnten neben einer Vielzahl prokaryontischer P450-Gene (Waterman, 1993) erfolgreich humane (Fisher et al., 1992; Gillam et al., 1993) und mitochondriale P450-Enzyme (Wada et al., 1991) exprimiert werden. Als Expressionsvektoren kommen häufig IPTG-induzierbare pET- oder pCWori(+)-Vektoren zum Einsatz (Gonzalez/Korzekwa, 1995, m. w. N.). Voraussetzung für eine heterologe Expression über Artgrenzen hinweg sind Modifikationen am N-Terminus des P450-Gens (Barnes et al., 1991; Li/Chiang, 1991). Vorteilhaft ist hierbei, dass P450-Proteine keine posttranslationalen Modifikationen benötigen, um aktiv zu funktionieren (Koch/Waxmann, 1991; Mendez et al., 1993). Probleme ergeben sich durch die notwendige Rekonstitution der Einzelsysteme (Häm-Domäne, Oxidoreduktase), was zur Entwicklung von künstlichen Fusionsproteinen geführt hat (Shiota et al., 1994; Yabusaki, 1995), um aufwendige mikrosomale Präparationen zu vermeiden. Die Herstellung von P450-Chimären beschränkt sich bisher fast ausschließlich auf Kombinationen von P450-Enzymen mit Reduktasen, z.B. der Rattenreduktase (Brock/Waterman, 2000; Parikh/Guengerich, 1997). Die Ratten-NADPH-P450-Reduktase enthält im Gegensatz zu anderen Säugetier-Reduktasen FAD und FMN, so dass der Elektronentransfer hier nicht über spezifische Proteinübertragungswege läuft (Wang et al., 1997). Die Ratten-NADPH-P450-Reduktase ist daher universell über Artgrenzen hinweg als Elektronenüberträger einsetzbar. Die Aktivitäten solcher Fusionsproteine liegen häufig über den Aktivitäten der rekonstituierten Einzelsysteme (Yabusaki, 1995). Beeinflusst wird die Aktivität von der Länge der Linker-Region, die P450-Domäne und Reduktase verbindet. Während die Sequenz des Linkers beim natürlichen Fusionsprotein P450 CYP102A1 keine Rolle spielt (Govindaraj/Poulos, 1995; Govindaraj/Poulos, 1996), zeigen Chimären mit Einzeldomänen der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthetase (ebenfalls ein Häm-Thiolat-Protein) und CYP102A1 das Gegenteil (Fuziwara et al., 2002). Neuere Untersuchungen widmen sich der Herstellung ganzer künstlicher Elektronentransfersysteme. So konnte ein System aus



CYP119, Putidaredoxin und Putidaredoxinreduktase konstruiert werden, bei dem der Elektronenfluss durch gerichtete Evolution der Monooxygenase noch verbessert wurde (Koo et al., 2002). Ein weiteres Beispiel ist die Schaffung einer künstlichen Redoxkette aus der Häm-Domäne von CYP102A1 und Flavodoxin aus *Desulfovibrio vulgaris*, die über eine natürlichen Schleife der CYP102A1-Reduktase miteinander verbunden sind (Gilardi et al., 2002).

Als Alternative zu *E. coli*-Expressionssystemen haben sich in den letzten Jahren Hefe-Expressionssysteme mit *Saccharomyces cerevisiae* als Wirt und einem *gal10*-Promoter bewährt (Nishihara et al., 1997; Ohkawa et al., 1990; Scheller et al., 1996). Diese erlauben die Expression eukaryontischer P450-Enzyme (Sakaki et al., 1989). Andere etablierte Expressionssysteme auf der Basis von *Pichia pastoris* (Gellissen/Hollenberg, 1997; Hollenberg/Gellissen, 1997), *Schwanniomyces occidentalis* und *Pichia stipitis* (Piontek et al., 1998) zeigen weitere Entwicklungspotentiale von Hefe-Expressionssystemen auf. Nachteilig sind bei eukaryontischen Systemen allerdings die höheren Kosten durch längere Expressionszeiten und stärkere Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen im Vergleich zu *E. coli*-Expressionssystemen.

### b) Aufreinigung von P450-Systemen

Für die Aufreinigung von P450-Systemen sind mehrere Methoden beschrieben. Ein mehrstufiger Aufreinigungstyp mit vier Schritten umfasst die Proteinfällung mit Ammoniumsulfat, gefolgt von Anionenaustauschchromatographie und Hydroxylapatit-Absorptionsreinigung sowie einen abschließenden Gelfiltrationsschritt (McLean et al., 2002; Miles et al., 1992; Munro et al., 1996). Eine einstufige Methode ist die Affinitätschromatographie mit 2',5'-Adenosindiphosphat-Sepharose (Black et al., 1994). Obwohl in neueren Ansätzen gezeigt wurde, dass durch Verwendung von 2',3'-Adenosinmonophosphat die hohen Kosten für diese sehr effektive Reinigungsmethode gedrückt werden können (Rock/Jones, 2001), ist sie für präparative Prozesse immer noch zu teuer. Eine Alternative für den Labormaßstab stellt die Metallionen-Affinitätschromatografie auf His<sub>6</sub>-Tag-Basis dar (Delcarte et al., 2003; Maurer et al., 2003). Zur Aufreinigung im Grammmaßstab existiert mittlerweile für CYP102A1 ein einstufiges Protokoll, das auf kommerziell erhältlichen Anionenaustauschern basiert

und von Zeitaufwand und Ausbeuten den Affinitätschromatografiemethoden vergleichbar ist (Schwaneberg et al., 1999a).

### c) Aktivität und Stabilität

P450-Systeme besitzen oft nur eine geringe Aktivität. Die meisten eukaryontischen P450 zeigen  $k_{cat}$ -Werte im Bereich von 0,01 – 50 pro Minute. Die wasserlösliche bakterielle P450 BM-3 Monooxygenase setzt Fettsäuren 100 – 1000-mal schneller um als vergleichbare Fettsäurehydroxylasen eukaryontischen Ursprungs (Boddupalli et al., 1990). Publikationen, die P450-Enzyme charakterisieren, existieren in großer Zahl. Viele dieser Berichte deuten eine geringe thermische Stabilität an. Die meisten Mitglieder der CYP2-Familie verlieren bereits während der Reinigung deutlich an Aktivität (Juchau, 1990) und selbst humane Lebermikrosomen, die eine Vielzahl verschiedener P450 enthalten, verlieren bei 25°C nach sechs Stunden 90 % ihres P450-Gehaltes und 80 % ihrer NADH-Eisencyanid- und NADPH-Cytochrom c Reduktaseaktivität (Yamazaki et al., 1997). Die thermische P450-Stabilität hängt in großem Maße von der intrazellulären Lokalisation der Monooxygenase ab, CYP17 z.B. verliert im endoplasmatischen Reticulum innerhalb von drei Stunden 57% seiner Aktivität, während es an mikrosomalen Membranen stabil ist (Kuhn-Velten, 1996). Es sind aber auch einige Monooxygenasen aus *Bacillus thermoglucosidasius* (Sideso et al., 1998), aus *Thermus thermophilus* (Yano et al., 2003) und *Sulfolobus solfataricus* (McLean et al., 1998) bekannt, die eine hohe Temperaturstabilität aufweisen. Tendenziell scheinen bakterielle und mitochondriale P450-Enzyme deutlich thermostabiler zu sein als eukaryontische. Untersuchungen zeigen, dass die CYP102A1 Mutante F87A bei 30°C mindestens sieben Stunden lang sehr thermostabil ist (Schwaneberg, 1999). Durch Immobilisierung in einer Sol-Gel-Matrix, bestehend aus Tetraethoxyorthosilikat (Gill, 2001), konnte die Stabilität des CYP102A1-Wildtyps sehr stark verbessert werden. Die Halbwertszeit beträgt bei 25°C 30 Tage (Maurer et al., 2003).

Zur Lösungsmittelstabilität von P450-Enzymen sind theoretische Arbeiten von Oprea und Loida bekannt (Loida/Sligar, 1993; Oprea et al., 1997), die einen Ausschluss organischer Lösungsmittel zur P450-Aktivität voraussetzen. Schwaneberg konnte mit Hilfe des  $pNCA$ -Assays zeigen, dass CYP102A1 Lösungsmittel in geringen Mengen

in der Reaktionslösung toleriert. Bei einem Anteil von 2 Volumenprozenten Aceton zeigt sich sogar eine Aktivitätssteigerung um 75 % (Schwaneberg, 1999).

Eine pH-Abhängigkeit der P450-Aktivität ist aufgrund des Reaktionsmechanismus (Protonierung von reduziertem Sauerstoff) und nach Arbeiten, die einen Wassercluster in der Nähe des aktiven Zentrums am fünften Cysteinat-Liganden postulieren, der mit der Oberfläche und mit dem aktiven Zentrum über eine Arginin-„Pforte“ kommuniziert, zu erwarten (Di Primo et al., 1995; Oprea et al., 1997). Aktivitätstests zeigen für CYP102A1 F87A die höchsten Aktivitäten im pH-Bereich zwischen 6,5 und 6,8. Bei pH-Werten unter 5,5 und über 10,0 ist das Enzym dagegen praktisch inaktiviert (Schwaneberg, 1999).

### d) P450 Cofaktor-Systeme

Ein entscheidender Kostenfaktor bei der Verwendung von P450-Systemen ist die Verwendung des sehr teuren Cofaktors NAD(P)H. Es wurden daher verschiedene Möglichkeiten untersucht, um dieses Problem zu beseitigen.

Mit einer FDH-Mutante von *Pseudomonas sp.* 101, die mit Hilfe der Reaktion von Formiat zu CO<sub>2</sub> NADP<sup>+</sup> wieder zu NADPH reduziert, kann hier jedoch Abhilfe geschaffen werden (Tishkov et al., 1999). Das entstehende CO<sub>2</sub> entweicht gasförmig aus der Reaktionsmischung, so dass keine Abtrennung vom eigentlichen Reaktionsprodukt notwendig wird. Dieses System konnte auch in Kombination mit CYP102A1 erfolgreich verwendet werden (Maurer et al., 2003). In HTS-Assaysystemen ist der Einsatz von Recyclingsystemen ebenfalls möglich (Schwaneberg et al., 2001).

Desweiteren ist auch die Nutzung des zuvor beschriebenen „shunt“-Reaktionsweges (s. Abschnitt 1.3.3) möglich. Mit Hilfe von starken Oxidationsmitteln wie Peroxid oder Periodat kann ein Sauerstoffatom direkt auf das Eisenatom im katalytischen Zentrum übertragen werden (Coon et al., 1996), wobei P450-Enzyme in dieser Umgebung jedoch in kurzer Zeit inaktiviert werden (Cirino/Arnold, 2002).

Eine weitere Möglichkeit stellt die elektrochemische Reduktion von P450-Enzymen dar. Mittels eines Co(III)sepulchrat-Mediatorsystems und Pt-Elektroden konnten bei

sechs verschiedenen P450-Enzymen Umsätze bestimmt werden (Estabrook et al., 1996a; Estabrook et al., 1996b; Estabrook et al., 1996c; Faulkner et al., 1995). Die Aktivitäten betragen nur ein Achtel der Aktivität mit NADPH, darüber hinaus wurden die Enzyme durch das in einer Nebenreaktion gebildete Wasserstoffperoxid nach einiger Zeit inaktiviert. Um die immer noch hohen Kosten bei Verwendung von Pt-Elektroden zu kompensieren, wurden weitere Experimente mit anderen Elektronenquellen durchgeführt. Viel versprechend erscheint hier das von Schwaneberg vorgestellte Zn-Co-sepulchrat-System, das bei einem Zehntausendstel der Kosten bei *p*NCA-Substraten nahezu dieselben Aktivitätsraten in Gegenwart von NADPH erreicht (Schwaneberg, 1999). Bei geschickter Wahl der Zink-, P450-, Substrat- und Mediatorkonzentration bei Katalase-Zugabe kann die Peroxid-Bildung und damit die rasche Inaktivierung weitgehend vermieden werden. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass Zink aufgrund seines Schwermetallcharakters nur begrenzt Anwendung finden kann (insbesondere bei Synthesen im pharmazeutischen Bereich). Statt der Regeneration des Enzyms kann NADPH auch elektrochemisch wiederhergestellt werden. Dabei auftretende Nebenreaktionen konnten durch Einsatz von Pentamethylcyclopentadienyl-Rhodium-Bipyridin-Komplexen verringert werden (Hollmann et al., 2002).

### 1.3.6 Das Monooxygenasesystem der P450-Familie CYP102

Die P450-Familie CYP102 besteht zur Zeit aus drei Monooxygenasen, von denen eine aus *Bacillus megaterium* (CYP102A1) und die anderen aus *Bacillus subtilis* (CYP102A2 und A3) stammen. P450 BM-3 (CYP102A1) wurde erstmals im Jahre 1986 als dritte P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* funktionell in *E. coli* exprimiert und charakterisiert (Narhi/Fulco, 1986; Narhi/Fulco, 1987). Mit einem Molekulargewicht von 119 kDa war P450 CYP102A1 das erste bekannte wasserlösliche natürliche Fusionsprotein, das alle drei Domänen (FAD, FMN, P450) in einer einzigen Polypeptidkette enthält. Im Jahre 1993 gelang es, die P450-Domäne ohne Substrate (Ravichandran et al., 1993) und im Jahre 1997 mit Substrat (Li/Poulos, 1997) zu kristallisieren. P450 CYP102A1 diente aufgrund seiner Sequenzhomologie zu eukaryontischen P450-Systemen und bis vor kurzem mangels eukaryontischer P450-Kristallstrukturen als bevorzugtes Strukturmodell für diese P450-Enzyme.

P450 CYP102A1 ist eine Fettsäurehydroxylase, die Carbonsäuren, Alkohole, Amide und Alkylammoniumverbindungen der Kettenlängen C12 bis C22 subterminal hydroxyliert. Die Regiospezifität der Hydroxylierung hängt, wie in Tabelle 2 gezeigt, stark von der Kettenlänge der Fettsäure ab.

Substrate	$\omega$ -Hydroxylierung [%]	$\omega$ -1- Hydroxylierung [%]	$\omega$ -2- Hydroxylierung [%]	$\omega$ -3- Hydroxylierung [%]
Laurinsäure (12:0)	-	38	28	34
Myristinsäure (14:0)	-	58	21	21
Palmitinsäure (16:0)	-	20	48	31

Tabelle 2: Produktzusammensetzung von P450 CYP102A1-katalysierten Hydroxylierungsreaktionen (Lentz et al., 2001; Schneider et al., 1998)

Die für die Substratspezifität von P450 CYP102A1 verantwortlichen Sequenzbereiche wurden ebenfalls intensiv untersucht (Cowart et al., 2001; Govindaraj/Poulos, 1996; Govindaraj/Poulos, 1997; Lewis, 1996; Noble et al., 1998; Oliver et al., 1997a). Die Fixierung der Substrate der Fettsäurehydroxylase CYP102A1 erfolgt, wie in Abbildung 6 skizziert, über Arginin 47 und Thyrosin 51 an der Carboxyfunktion der Fettsäure, wobei Untersuchungen zeigen, dass A47 signifikanter zur Stabilisierung beiträgt (Noble et al., 1998). Für Modulationen der regiospezifischen terminalen und subterminalen Hydroxylierung ist der sterische Anspruch der Aminosäure an Position 87 verantwortlich. Ein Austausch des Phenylalanins an dieser Position zu Alanin führt zu einer Erweiterung des Substratspektrums von subterminal hydroxylierter Laurin- und Myristinsäure durch Hydroxylierung auch in  $\omega$ -4 und  $\omega$ -5-Position. Die früher beobachtete Verschiebung zu nahezu ausschließlich terminal hydroxylierten Fettsäuren (Oliver et al., 1997b) konnte in späteren Experimenten nicht bestätigt werden (Cirino/Arnold, 2002). Über den Austausch von Arginin gegen Glutaminsäure an Position 47 gelang es, durch Umkehrung der Bindungsverhältnisse bei der Substratfixierung, N-Trimethylammoniumverbindungen umzusetzen (Oliver et al., 1997a).

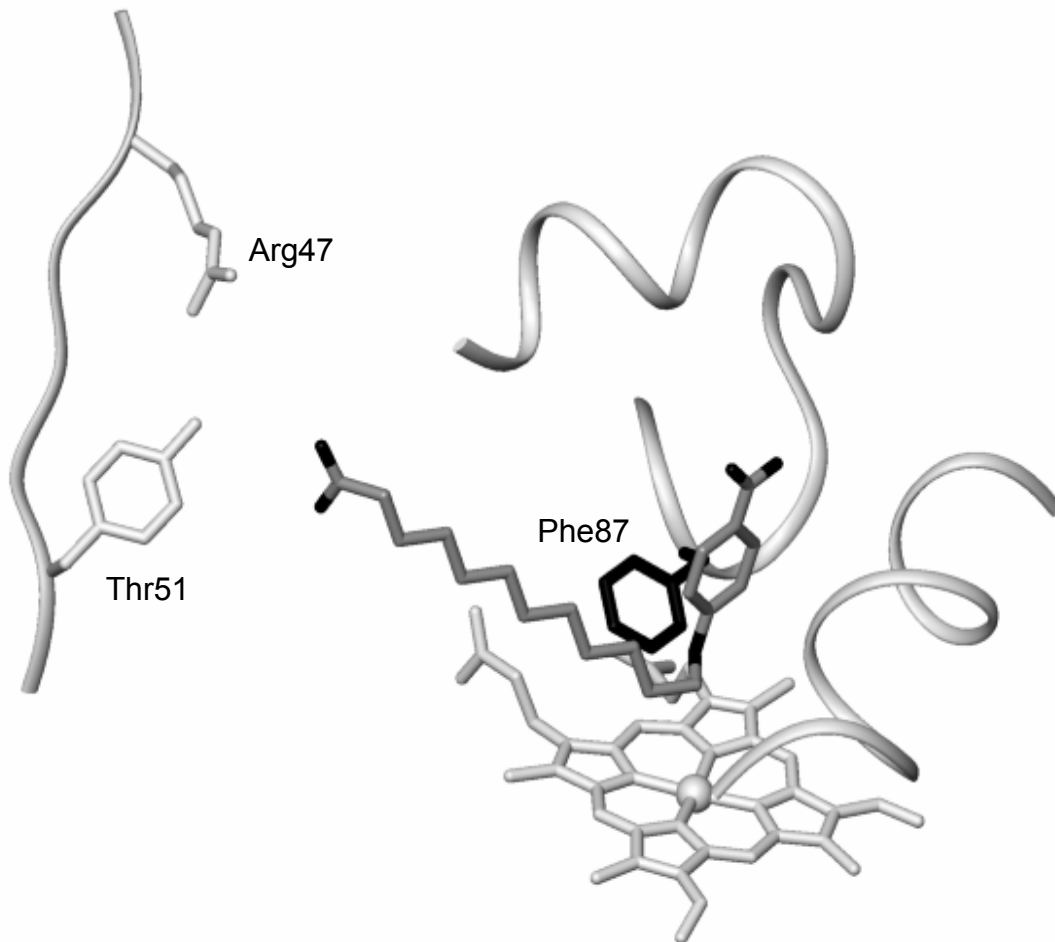


Abbildung 6: Modell der Häm-Domäne von P450 BM-3 mit fixiertem Substrat 12-pNCA und hervorgehobener für die Regiospezifität wichtiger Position 87

Das Sequenzierungsprojekt zur Entschlüsselung des *Bacillus subtilis*-Genoms (Kunst et al., 1997) zeigte das Vorhandensein von sechs P450-ähnlichen Genen (*biol*, *cypA*, *cypC*, *cypX*, *yetO* und *yrhJ*). *CypC* codiert für ein 48 kDa Protein (CYP152A1), das Myristinsäure in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position mit Hilfe von Wasserstoffperoxid als Reaktionspartner hydroxylieren kann (Matsunaga et al., 1999). *Biol* (CYP107H1) codiert für ein 45 kDa Protein der Biotinsynthese in *B. subtilis* (Stok/De Voss, 2000). Über *cypC* und *cypX* sind bis jetzt keine Einzelheiten bekannt. Die Proteine, die durch die Gene *yetO* und *yrhJ* codiert sind, wurden als P450 CYP102A2 und CYP102A3 klassifiziert und sind am Fettsäuremetabolismus von *B. subtilis* beteiligt (Gustafsson et al., 2001; Lee et al., 2001). Die Sequenzidentität auf Proteinebene zu CYP102A1 beträgt 76 % (102A2) bzw. 77% (102A3). Beide Monooxygenasen sind wasserlösliche Fusionsproteine, die wie P450 CYP102A1 (BM-3) Reduktase- und Monooxygenase-Domäne in

einer Polypeptidkette enthalten. Sie weisen damit ebenfalls den Vorteil leichter Handhabung auf, da keine coexprimierte Reduktase zur Aktivität benötigt wird und Klonierung sowie Expression vereinfacht werden. Von beiden Enzymen sind bisher weder Substratspezifitäten noch Aktivitätsdaten bekannt. Abbildung 7 zeigt ein Homologie-Modell von CYP102A3, das mit Hilfe der Kristallstrukturdaten von CYP102A1 erstellt wurde.

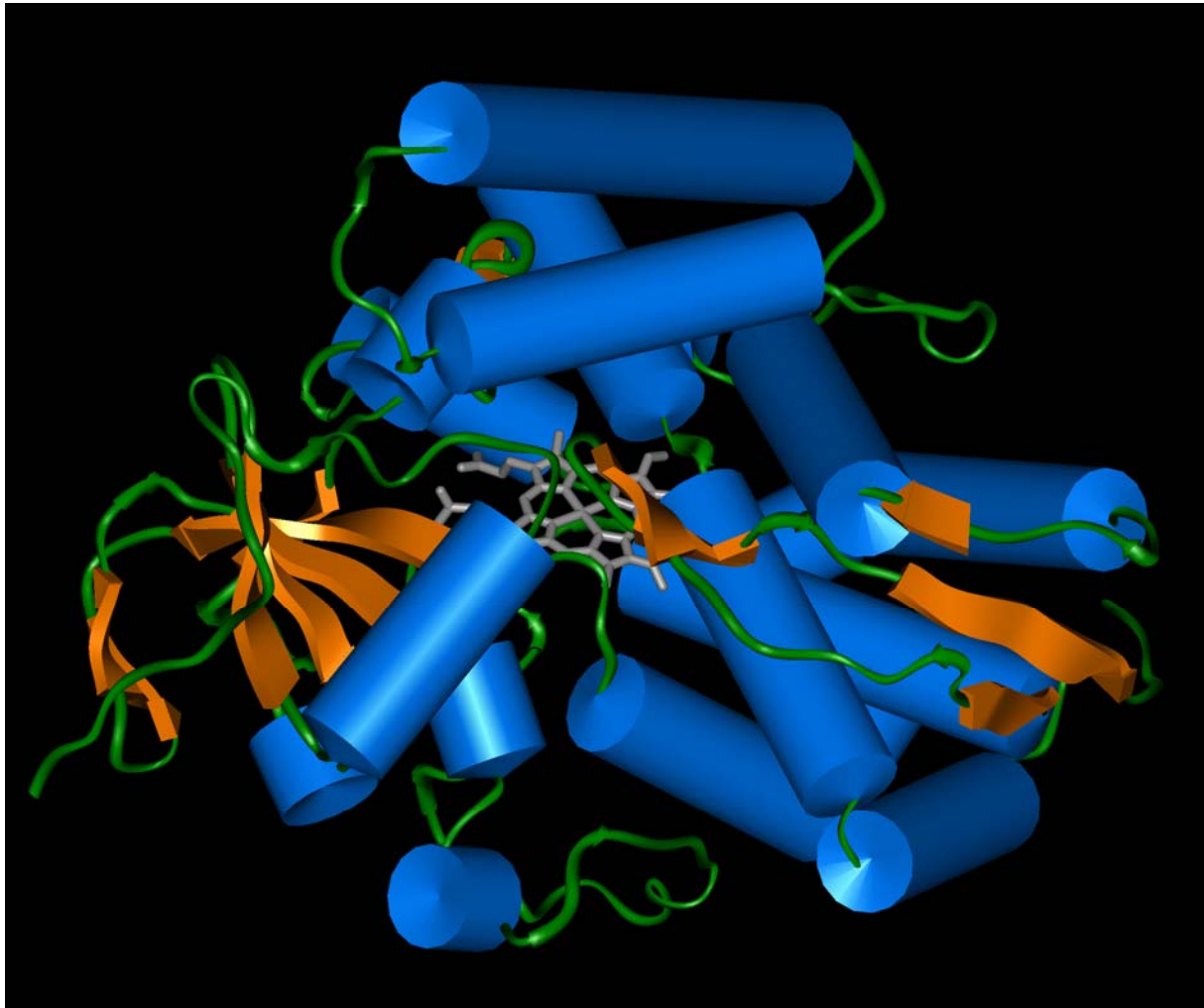


Abbildung 7: Homologie-Modell von P450 CYP102A3 aus *Bacillus subtilis*, erstellt mit Hilfe von Kristallstrukturdaten von P450 CYP102A1 (SWISS-MODELL).  $\alpha$ -Helices sind blau,  $\beta$ -Faltblattstrukturen orange und das Häm-Zentrum grau dargestellt.

Das Monooxygenasesystem der P450-Familie CYP102 stellt aufgrund seiner oben genannten Eigenschaften, insbesondere der durch Mutation zugänglichen Substratvielfalt und der einfachen Handhabung aufgrund des Fusionsproteincharakters einen sehr interessanten Kandidaten für die Entwicklung biokatalytischer Prozesse dar.

## 1.4 Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses

Im Vergleich zu konventionellen chemischen Syntheseverfahren müssen bei der Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses aufgrund der verwendeten Enzyme oder Mikroorganismen besondere Aspekte berücksichtigt werden. Hierbei handelt es sich insbesondere um die Proteinstabilität unter technischen Bedingungen und die Besonderheiten, die sich aus den ursprünglichen physiologischen Aufgaben in der lebenden Zelle ableiten, wie z.B. Wachstum, Induktion der Enzymexpression oder die Verwendung von Stoffwechselwegen für mehrstufige Reaktionen (Schmid et al., 2001). In Abbildung 8 ist die Vorgehensweise bei der Etablierung eines biokatalytischen Prozesses schematisch dargestellt. Bei der Planung eines solchen Verfahrens muss zuerst die Auswahl des Syntheseweges und der kostengünstigsten Substrate stehen. Im zweiten Schritt muss ein Biokatalysator gefunden werden, der die Ausgangsverbindung in das gewünschte Produkt umzusetzen vermag. Die Bedeutung dieses Punktes lässt sich daran erkennen, dass die Entdeckung eines geeigneten Biokatalysators oder eines neuen Reaktionsweges der Anlass für die Umstellung eines Verfahrens bzw. einzelner Syntheseschritte innerhalb eines konventionellen Herstellungsprozesses sein können (Shimizu et al., 1997).

Bei den meisten industriell interessanten Verbindungen handelt es sich nicht um die natürlichen Substrate der Enzyme, weshalb die Umsetzung nicht mit der gewünschten Regio- oder Stereoselektivität erfolgt. Weiterhin ist zu beachten, dass der identifizierte Biokatalysator im Hinblick auf die Temperatur- und Lösungsmittelstabilität unter den erforderlichen Reaktionsbedingungen eingesetzt werden kann. Ein weiterer wichtiger Punkt ist aufgrund der wirtschaftlichen Rentabilität eine hohe Standzeit unter den Produktionsbedingungen.



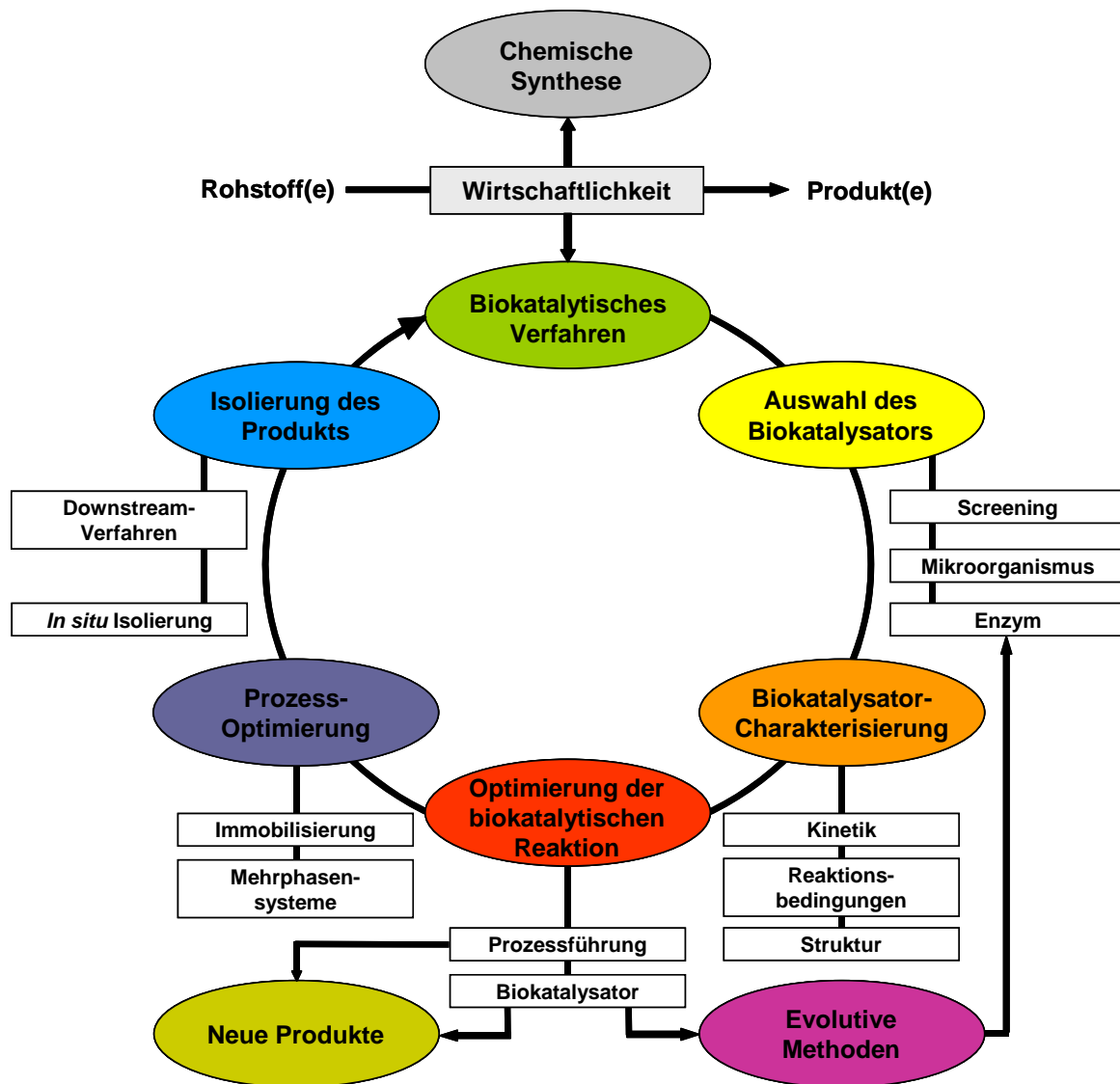


Abbildung 8: Schematische Darstellung der einzelnen Aspekte, die bei der Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses beachtet werden müssen (modifiziert nach Koeller/Wong, 2001; Schmid et al., 2001).

### 1.4.1 Auswahl des Biokatalysators

Bei der Auswahl des Biokatalysators stellt sich die Frage, ob für das Produktionsverfahren ein Mikroorganismus oder ein isoliertes Enzym geeignet ist. Beide Möglichkeiten haben dabei ihre spezifischen Vor- und Nachteile: Der Einsatz ganzer Zellen macht die Isolierung und Aufreinigung des Enzyms unnötig, problematisch ist jedoch häufig die Abtrennung des Produktes von der Reaktionsmischung. Isolierte Enzyme lassen sich eher wie konventionelle, heterogene Katalysatoren behandeln. Lässt sich zusätzlich eine Immobilisierung des Enzyms bewerkstelligen, ist nicht nur die Pro-

duktisolierung einfach, weitere Vorteile sind darüber hinaus höhere Enzymstabilität und mögliche Wiederverwendbarkeit. Stabilität, die erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeuten und die Verfügbarkeit in größerem Maßstab des Katalysators sind die drei entscheidenden Kriterien für einen rentablen Herstellungsprozess (Marrs et al., 1999). Da Gegenstand dieser Arbeit die Verwendung isolierter Enzyme war, wird im Folgenden nur hierauf verstärkt eingegangen.

Die Suche nach neuen Biokatalysatoren konzentriert sich nahezu ausschließlich auf noch unbekannte Mikroorganismen (Marrs et al., 1999), um deren noch nicht charakterisierten Enzyme zu nutzen. Zu deren Identifikation werden zur Zeit zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Einerseits wird durch umfangreiche Testserien unter Anwendung spezieller Protokolle für die Isolierung und Anreicherung versucht, bislang unbekannte Mikroorganismen zu isolieren und zu charakterisieren (Clausen, 1997). Andererseits ist man in den letzten Jahren dazu übergegangen, die nach der Lyse der Mikroorganismen in einer Umweltprobe enthaltene DNA ohne Anreicherung zu extrahieren und diese nach Informationen neuer Enzyme zu untersuchen. Durch diese Vorgehensweise bleibt die natürliche biologische Vielfalt auf DNA-Ebene erhalten, da kein Verlust an genetischer Information wie bei einer Kultivierung auftritt, weil sich mit bekannten Methoden nur etwa 1% aller Mikroorganismen kultivieren lassen. (Rondon et al., 1999; Short, 1997).

#### **1.4.2 Optimierung der biokatalytischen Reaktion**

Die Charakterisierung eines geeigneten Enzyms, das durch Testverfahren identifiziert wurde, führt häufig zu dem Ergebnis, dass die Eigenschaften für den gewünschten biokatalytischen Prozess unzureichend sind. Häufig besitzt das Enzym nicht die gewünschte Regioselektivität, weist eine zu geringe Stabilität auf oder die Umsatzraten sind zu gering, um den Prozess rentabel zu machen. Es stehen jedoch verschiedene Wege offen, um diese Nachteile zu umgehen: Neben den klassischen Ansätzen zur Variation des Substrats (Substrat-Engineering) oder der Reaktionsbedingungen (Medien-Engineering) sowie der Modifikation des Biokatalysators (Immobilisierung, Derivatisierung) kommen auch die Methoden der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns in Frage, um dadurch die Eigenschaften des Enzyms den Notwendigkeiten anzupassen.

### *a) Substrat-Engineering*

Die Veränderung der Substrat-Eigenschaften zur Optimierung der biokatalytischen Reaktion wirkt sich hauptsächlich auf die Stereoselektivität der Umsetzung aus. Die Variation der Substratstruktur, am einfachsten bewerkstelligt durch Addition und Entfernung einer Schutzgruppe, bewirkt eine andere Konformation im aktiven Zentrum des Enzyms und damit eine veränderte Selektivität (Faber, 2000). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Alkan-Substraten bietet sich naturgemäß keine Möglichkeit des Substrat-Engineerings.

### *b) Medien-Engineering*

Enzymaktivität und –selektivität werden stark durch Faktoren beeinflusst, die an das Reaktionsmedium gekoppelt sind. Die technologische Nützlichkeit von Enzymen erhöht sich wesentlich, wenn die katalysierte Reaktion nicht in wässriger Lösung, sondern in einem organischen Solvens durchgeführt wird (Klibanov, 2001). So werden Reaktionen möglich, deren chemisches Gleichgewicht in wässrigen Lösungen ungünstig liegt, wenn Wasser in der Hauptreaktion oder in Nebenreaktionen eine Rolle spielt. Weitere Vorteile für die Prozessführung liegen in der verbesserten Löslichkeit hydrophober Substrate, der verringerten mikrobiellen Kontamination und der vereinfachten Isolation der Reaktionsprodukte (Carrea/Riva, 2000). Enzyme denaturieren jedoch häufig in rein organischen Lösungsmitteln, weshalb eine Immobilisierung zur Erhaltung der Aktivität notwendig wird. Alternativ ist der Einsatz eines Wasser- / Lösungsmittel-Gemisches möglich, wobei sich für P450 CYP102A1 Aceton- oder DMSO-Wassergemische bewährt haben (Appel et al., 2001; Lentz et al., 2001; Schwaneberg, 1999). Auch der pH-Wert des Mediums spielt häufig für die Reaktionsführung eine Rolle, so z.B. bei NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H-abhängigen Reaktionen, da hier Protonen entstehen oder verbraucht werden.

### 1.4.3 Modifikation des Enzyms durch molekularbiologische Methoden

Die Modifikation durch molekularbiologische Methoden kann auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden, um maßgeschneiderte Biokatalysatoren zu erhalten. Abbildung 9 zeigt eine schematische Übersicht der im folgenden Text erklärten Vorgehensweisen.

#### a) Rationales Proteindesign

Beim rationalen Design wird mit Hilfe bioinformatischer Methoden (*molecular modeling*) versucht, eine Vorhersage über die notwendigen Veränderungen der Proteinstruktur zu machen, um die Eigenschaften des Enzyms in die erwünschte Richtung zu lenken. Dazu sind neben der Kenntnis der Aminosäure-Sequenz und der damit verbundenen Proteinstruktur genaue Informationen über mechanistische und dynamische Vorgänge während der Katalyse notwendig. Die Komplexität dieser Methode zeigt sich daran, dass Proteine meist am Rand der Instabilität stehen. Der räumliche Aufbau des aktiven Enzyms ist das Ergebnis der intramolekularen Wechselwirkungen, wobei bereits die Änderung einzelner Wasserstoffbrücken zum Konformationswechsel und damit zum Aktivitätsverlust führen kann. Der gezielte Austausch von einzelnen Aminosäuren, der zu verbesserten oder neuen Eigenschaften unter Erhalt der Aktivität führt, erfordert eine Fülle von Informationen, die nur für wenige Enzyme zur Verfügung steht. Außerdem ist es nach der Änderung eines Merkmals (z.B. der Aktivität), sehr schwierig, Aussagen über die Wirkung auf andere Eigenschaften (z.B. der Stabilität) zu machen. Trotz des hohen Zeitaufwandes durch wechselseitiges Vorhersagen und Überprüfen im Labor, bietet dieser Ansatz, insbesondere kombiniert mit evolutiven Methoden, eine aussichtsreiche Perspektive für die Zukunft (Bornscheuer/Pohl, 2001). Unterstützung findet dieser Anspruch durch neuere Erkenntnisse, die zeigen, dass die derzeit bekannten Enzyme von wenigen gemeinsamen Vorläufern abstammen und deshalb die unterschiedlichen Aktivitäten und Spezifitäten auf geringe Modifikationen in den Strukturen der aktiven Zentren beruhen (Arnold, 2001). Darüber hinaus weisen einige Biokatalysatoren, vergleichbar mit

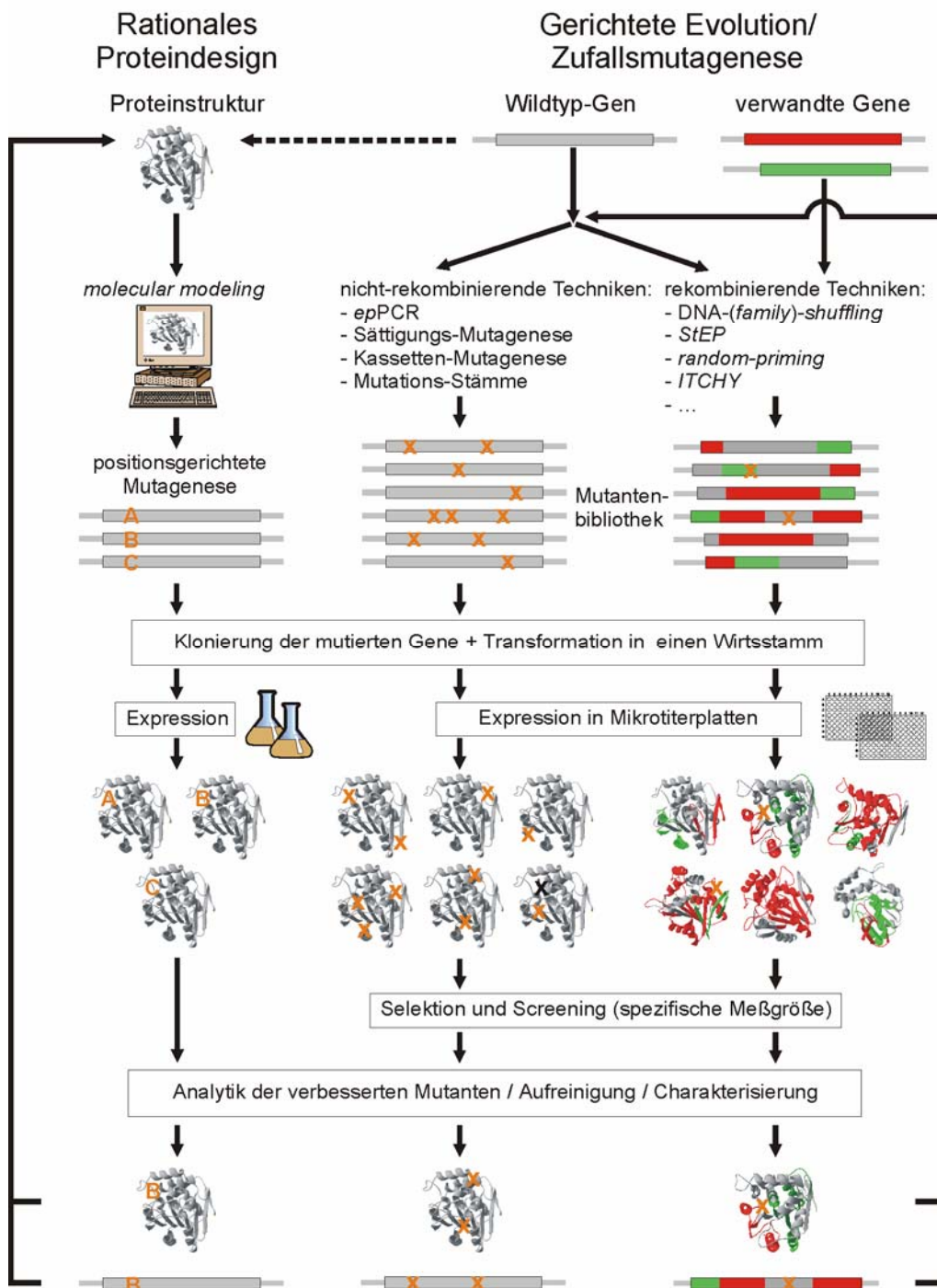


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ablaufs beim rationalen Proteindesign (A, B, C: gezielt ausgetauschte Aminosäure) und der gerichteten Evolution (X: Punktmutation durch Zufallsmutagenese). Die schrittweise Verbesserung des Enzyms kann iterativ erfolgen, wobei im Idealfall beide Methoden zum Einsatz kommen sollen. Die rekombinierenden Techniken ermöglichen es, Chimären aus mehreren parentalen Genen (verwandte DNA-Sequenzen aus unterschiedlichen Organismen) zu erzeugen.

anderen makromolekularen Systemen der Biologie (z.B. bei der ribosomalen Protein-Biosynthese), einen modularen Aufbau auf, so dass durch rationales Proteindesign schnell geeignete Enzyme zugänglich sein sollten (Khosla/Harbury, 2001).

### *b) Gerichtete Evolution*

Die natürlich vorkommenden Sequenzen entwickelten sich nach einem einzigen Mechanismus, der natürlichen Evolution. Sie führt weder in eine definierte Richtung noch wird ein bestimmtes Ziel angestrebt (ungerichteter Charakter der Mutation), sondern dient allein der Adaption an veränderte Lebensbedingungen (Schlegel, 1992). Die zugrunde liegenden Vorgänge der Rekombination und Mutation treten spontan ein, d.h. ohne auf eine bestimmte Sequenz der zugrunde liegenden Gene zurück zu greifen, wobei nur positive Veränderungen ein Überleben der natürlichen Selektion ermöglichen (Arnold, 1998). Dieser Vorgang spielt insbesondere bei Mikroorganismen aufgrund der kurzen Generationszeit eine besondere Rolle.

Nach dem Prinzip der Zufallsmutagenese wird seit längerer Zeit versucht, Mikroorganismen zu erzeugen, die beim Einsatz in fermentativen Prozessen bessere Ausbeuten an den gewünschten Metaboliten ergeben. Die evolutiven Vorgänge zur Veränderung ganzer Stoffwechselwege beschleunigt man dabei durch mutagene Bedingungen (chemische Reagenzien, UV-Licht, Transposone; Schlegel, 1992). Durch die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) haben sich hier mittlerweile neue Möglichkeiten ergeben. Seit Mitte der 1990er Jahre wird mit Hilfe von PCR-Techniken versucht, durch Zufallsmutagenese Enzyme mit neuen oder verbesserten Eigenschaften zu erzeugen (*error-prone PCR*). Im Gegensatz zur natürlichen Adaption an veränderte Umweltbedingungen besitzt diese gerichtete Evolution ein definiertes Ziel, wobei die Selektion der verbesserten Enzymvarianten nach der Expression durch ein geeignetes Testsystem erfolgt (s. Kapitel 1.5 dieser Arbeit und Arnold, 1998). Bis auf das Gen, das sich in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimieren lassen muss, sind im Gegensatz zum rationalen Design keine Kenntnisse über die Proteinstruktur bzw. den räumlichen Aufbau und den Katalysemechanismus erforderlich. Damit die gerichtete Evolution erfolgreich sein kann, muss die gewünschte Eigenschaft aber prinzipiell möglich und durch Zufallsmutagenese zugänglich sein.

Praktisch betrachtet bedeutet dies, dass ein evolutiver Weg vom Wildtyp-Enzym über verbesserte Varianten bis hin zur gewünschten Eigenschaft existieren muss. Entscheidend ist darüber hinaus, dass eine ausreichend große Anzahl an Varianten ( $>10^3$ ) erzeugt werden kann, da positive Mutationen nur selten auftreten. Die Methode steht und fällt mit dem zu entwickelnden Testsystem, mit dessen Hilfe die Mutantenbibliothek auf neue oder verbesserte Eigenschaften untersucht werden soll (*Screening*). Wie bei der klassischen Züchtung lässt sich im Anschluss die DNA-Sequenz der besten Variante als Ausgangsmaterial für die weitere Mutagenese einsetzen (rekursives Verfahren), um so immer weiter verbesserte Enzymvarianten zu generieren. Die Vorgehensweise ist in der Literatur umfassend erörtert (Arnold/Moore, 1997; Arnold, 1998; Arnold/Volkov, 1999; Bornscheuer, 1998; Bornscheuer, 2000; Bornscheuer, 2001; Bornscheuer/Pohl, 2001; Burton et al., 2002; Farinas et al., 2001a; Jaeger et al., 2001; Powell et al., 2001; Reetz, 2000; Schmidt-Dannert, 2001; Zhao et al., 2002; Zocher et al., 2001).

Die klassische Methode der gerichteten Evolution ist die sogenannte *error-prone* PCR (*epPCR*), wobei die Fehlerrate der Polymerase durch Variation der Reaktionsbedingungen (Nukleotid-Verhältnis,  $Mg^{2+}$ -Konzentration,  $Mn^{2+}$ -Zusatz) auf das Tausendfache (1% statt 0,001%) erhöht wird (Cadwell/Joyce, 1992; Leung et al., 1989; Spee et al., 1993; Vartanian et al., 1996). Bei der Vervielfältigung des Gens tritt dabei hauptsächlich der Austausch einzelner Nukleotide auf. Wegen des ungerichteten Charakters der Mutationen und des degenerierten genetischen Codes sind durch den Austausch einer einzigen Base statistisch nur 5,7 der 20 Aminosäuren für die Substitution in Betracht zu ziehen (Bornscheuer, 2001). Ein hinsichtlich der Fehlerrate ähnliches Verfahren basiert auf der Verwendung von Wirtsstämmen mit Defekten im DNA-Reparaturmechanismus (Mutationsstämme wie z.B. *Epicurian coli* XL1 RED). In die transformierten Plasmide werden dann bei der Plasmid-Replikation stochastisch Fehler eingebaut, wodurch sich sehr große Mutantenbibliotheken erzeugen lassen. Bei diesem Verfahren werden neben dem Austausch von Basen auch Insertionen, Deletionen und *frame-shifts* beobachtet (Bornscheuer et al., 1998; Henke/Bornscheuer, 1999).

Beim sogenannten DNA-*shuffling* werden die natürlichen Evolutionsvorgänge nachgeahmt, da hier ähnliche DNA-Sequenzen durch wiederholte Zyklen der Rekombina-

tion und Selektion miteinander vermischt werden (sexuelle Evolution). Nach zufälliger Fragmentierung eines Pools homologer DNA-Sequenzen mit einer unspezifischen Endonuklease (DNase I) werden die Bruchstücke im Rahmen einer PCR-Reaktion, bei der die Fragmente selbst als Transkriptionsprimer dienen, wieder zu vollständigen Genen zusammengefügt (*molecular breeding*) (Arnold, 2001; Giver/Arnold, 1998; Powell et al., 2001; Sutherland, 2000).

Die Entwicklung des *DNA-shufflings* im Jahre 1994 (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b) hatte großen Einfluss auf das Gebiet der gerichteten Evolution, so dass in dessen Folge weitere rekombinierende Techniken entwickelt wurden. Beispielhaft sind hier der *staggered extension process (StEP)* (Giver/Arnold, 1998; Zhao et al., 1998) und das *random-priming* (Shao et al., 1998). Beim *StEP* wird mit einem Pool von Genen eine PCR mit sehr kurzen Anlagerungs- und Extensionszeiten durchgeführt, wodurch kurze DNA-Stücke entstehen. Beim nächsten Denaturierungsschritt werden diese Fragmente von ihrer DNA-Matrize abgelöst und können im darauf folgenden Anlagerungsschritt an eine neue Matrize binden, so dass mehrere Matrizenwechsel stattfinden können. Durch wiederholten Zyklendurchlauf entstehen Gene, die die Informationen verschiedener Parental-Gene tragen. Beim *random-priming* wird eine variable Anzahl von Primern genutzt, um kurze DNA-Fragmente zu erzeugen, die komplementär zu Teilbereichen einer oder mehrerer Parental-DNA-Matrizen sind. Die eingesetzten Primer können dabei auch eine geringe Zahl an Punktmutationen tragen (gezielt oder degeneriert). Die erzeugten DNA-Fragmente können dann mit Hilfe von DNA-Polymerase wieder zu vollständigen Genen rekombiniert werden. Dadurch können im Vergleich zum *StEP* auch an verschiedenen Punkten gezielte Mutationen eingeführt werden.

In jüngster Zeit sind auch, bedingt durch Fortschritte auf dem Gebiet der Laborautomation, weitere Techniken entwickelt worden, die die Vermischung nichthomologer DNA-Sequenzen erlauben (z.B. *incremental truncation for the creation of hybrid enzymes – ITCHY*; Ostermeier et al., 1999).



### *c) Verbesserung von P450-Monooxygenasen durch verschiedene Strategien*

Auffällig beim Vergleich von erfolgreich mutierten Proteinen ist, dass die Lage der eingeführten Mutationen mit der angewendeten Methode korreliert. Beim rationalen Proteindesign werden gezielt Aminosäuren ausgetauscht, die nach den Daten der Computersimulationen „sinnvoll“ erscheinen. Üblicherweise liegen diese Aminosäuren im aktiven Zentrum bzw. der Bindungstasche des Enzyms und somit sind der Einfluss auf Enzymstruktur, Substratbindung und Aktivität relativ gut vorhersagbar. Bei der gerichteten Evolution werden die Mutationen, wie es einem evolutiven Prozess entspricht, über die gesamte Sequenz verteilt und liegen somit räumlich häufig außerhalb des aktiven Zentrums. Diese Mutationen erzeugen eine andere Proteinfaltung und bewirken damit auch im Enzymbereich, wo die Katalysereaktion stattfindet, eine Änderung der räumlichen Struktur des Proteins. Solche indirekten Veränderungen sind durch rationale Überlegungen nicht zugänglich, so dass der allgemein anwendbaren gerichteten Evolution ein größeres Potential bei der Erzeugung verbesserter Enzymvarianten zukommt (Tobin et al., 2000).

Bei der Identifizierung einer Position oder Region, die wichtig für die Verbesserung der gewünschten Eigenschaft ist, sollten rationales Design und gerichtete Evolution zur weiteren Verbesserung in Folgegenerationen kombiniert werden. Dabei kommen die Methoden der Sättigungs- und Kassetten-Mutagenese zur Anwendung. Bei der Sättigungs-Mutagenese werden so genannte degenerierte Primer benutzt, die an bestimmten Stellen ihrer Sequenz jede der vier Nucleobasen besitzen können. Da immer drei Basen für eine Aminosäure codieren, kann die ursprünglich vorhandene Aminosäure durch jede andere natürliche Aminosäure ersetzt werden. Man erhält so 19 verschiedene Mutanten, die auf verbesserte Eigenschaften gescreent werden können ("Rational evolution", z.B. Li et al., 2000). Bei der Kassetten-Mutagenese wird eine gezielte Mutation des entscheidenden Sequenzbereichs vorgenommen (z.B. Reetz et al., 2001a).

Detaillierte Studien wurden zur Verbesserung von CYP101 (P450<sub>cam</sub>) unternommen. Durch gezieltes Ersetzen der Aminosäure Y96 im aktiven Zentrum durch Aminosäuren mit hydrophoben Resten konnte die Aktivität gegenüber hydrophoben Substraten wie Styrol (Nickerson et al., 1997; Stevenson et al., 1996), Naphtalin (England et al.,

1998; Joo et al., 1999) und Pyren (England et al., 1998; Harford-Cross et al., 2000), die sich in ihrer Größe signifikant vom eigentlichen Substrat Kampher unterscheiden, stark verbessert werden. Noch stärker modifizierte Mutanten wie F87W Y96F T101L V247L können sogar völlig unterschiedliche Substrate wie z.B. Butan hydroxylieren (Bell et al., 2002). Durch rechnergestütztes rationales Design konnte so auch die Enantioselektivität gegenüber dem Substrat (+)- $\alpha$ -Pinen zur Duftstoffsynthese gesteigert werden (Bell et al., 2003). Ein weiteres Beispiel für verbesserte Enantioselektivität ist die Hydroxylierung von 2-Ethylhexanol zu 2-Ethylhexansäure. Dabei wird unter Wildtyp-Katalyse das (R)-Enantiomer dreieinhalb mal schneller gebildet als das (S)-Enantiomer. Die Mutante F87W Y96W führt dagegen nahezu ausschließlich zur (R)-2-Ethylhexansäure (French et al., 2002).

Auch CYP102A1 (P450 BM-3) wurde in zahlreichen Mutationsexperimenten verbessert. So konnte die Substratspezifität auch auf kurzkettige Fettsäuren ausgedehnt werden. Die Vierfachmutante R47F F87V A74G L188K kann auch die Hydroxylierung von Decansäure katalysieren (Lentz et al., 2001). Durch Einführung einer weiteren Fettsäurebindungsstelle näher am aktiven Zentrum (L75T L181K) konnten sogar Butan- und Hexansäure umgesetzt werden (Ost et al., 2000). Durch Vergrößerung des aktiven Zentrums (A74G/F87V/L188Q) konnte die Substratspezifität auf Substanzen wie Naphtalin und *n*-Octan ausgedehnt werden, die sich von den eigentlichen Substraten stark unterscheiden (Appel et al., 2001). Die Dreifachmutante R47L Y51F A264G zeigt gegenüber polyaromatischen Kohlenwasserstoffen wie Phenanthren, Fluoranthren und Pyren im Vergleich zum Wildtyp die 200-fache Aktivität (Carmichael/Wong, 2001). Durch gerichtete Evolution gelang nach mehreren Generationen die Steigerung der Aktivität gegenüber *n*-Octan (Farinas et al., 2001b), die Erweiterung des Substratspektrums auf gasförmige Alkane wie Propan (Glieder et al., 2002) und Verbesserungen bei Regio- und Stereoselektivität (Peters et al., 2003).

Enzym	Ziel	Methode	Ergebnis
CYP101	Erhöhung der Aktivität gegen Styrol	SM	Aktivitätserhöhung auf das 25-fache <sup>1</sup>
CYP101	Erhöhung der Aktivität gegen Naphtalin	epPCR/StEP	Aktivitätserhöhung auf das 20-fache <sup>2</sup>
CYP101	Erhöhung der Aktivität gegen Propan/Butan	RD	Aktivitätserhöhung auf das 1400-/1900-fache <sup>3</sup>
CYP102A1	Erweiterung der Aktivität auf kurzkettige Fettsäuren	SM	Aktivität gegen Caprinsäure (C10:0) <sup>4</sup>
CYP102A1	Erhöhung der Aktivität gegen PAHs	RD	Aktivitätserhöhung auf das 200-fache <sup>5</sup>
CYP102A1	Erweiterung der Aktivität auf kurzkettige Alkane	epPCR/SH	Aktivität gegen Propan/Butan <sup>6</sup>
CYP102A1	Erhöhung der Lösungsmittelstabilität	epPCR	Aktivitätserhöhung auf das 10-fache in THF <sup>7</sup>

Tabelle 3: Einige Beispiele für die Optimierung von P450-Enzymen durch genetische Methoden (epPCR: error-prone PCR; RD: Rationales Design; SM: Sättigungsmutagenese; StEP: staggered extension process; SH: DNA-shuffling; 1 Nickerson et al., 1997; 2 Joo et al., 1999; 3 Bell et al., 2002; 4 Lenz et al., 2001; 5 Carmichael/Wong, 2001; 6 Glieder et al., 2002; 7 Wong et al., 2004)

## 1.5 Hochdurchsatztestsysteeme zur Identifizierung verbesserter Enzymvarianten

Die Suche nach einem geeigneten Enzym bzw. einer evolutiv verbesserten Enzymvariante hängt entscheidend vom eingesetzten Testsystem ab. Die Durchmusterung einer Mutantenbibliothek (siehe Abschnitt 1.4.3) mit  $10^3 - 10^6$  Kandidaten erfordert Verfahren, die einen hohen Durchsatz ermöglichen (Hochdurchsatztestsysteeme; HTS-Systeme). Klassische Methoden zur Produktanalyse enzym-katalysierter Reaktionen wie flüssig- oder gaschromatografische Nachweisverfahren sind in diesen Dimensionen nicht mehr verwendbar, sie kommen allenfalls zur nachträglichen Verifikation des Auswahlverfahrens in Frage. Eine Ausnahme stellt hier lediglich eine von Reetz et al. entwickelte GC-basierte Methode dar, mit der 700 Enantioselektivitätsbestimmungen pro Tag möglich sind (Reetz et al., 2001b). Bereits frühzeitig wurde

erkannt, dass Standard-Testsysteme nicht immer das wahre Potential eines Biokatalysators aufzeigen und deshalb spezielle an das aktuelle Problem angepasste Systeme entwickelt werden sollten (Vorderwülbecke et al., 1992). Die Entwicklung von HTS-Systemen ist eng an Fortschritte im Bereich der Laborautomation gebunden. Robotergesteuerte Analysen erhöhen die Reproduzierbarkeit und Auswertungsgeschwindigkeit des Testsystems enorm. Eine sehr wichtige Rolle spielt hierbei auch die daraus entstehende Möglichkeit, die Mengen der benötigten Testkomponenten (Biokatalysator, Substrat, Cofaktoren, Lösungen) drastisch reduzieren zu können. Dies erlaubt die Durchführung einer größeren Anzahl an Reaktionen unter identischen Bedingungen (Battersby/Trau, 2002).

Der erste Schritt in einem modernen HTS-System besteht in der Ausplattierung der Zellen auf einem Festmedium. So können die unterschiedlichen Klone vereinzelt und später in Mikrotiterplatten getrennt untersucht werden. Dabei kann die Untersuchung mit lebenden, ganzen Zellen durchgeführt bzw. die nach einem Zellaufschluss freigesetzten Enzyme über eine spezifische Messgröße charakterisiert werden. Bei einer hierarchischen Vorgehensweise wird im qualitativen ersten Schritt (Selektion) die Anzahl der zu testenden Varianten schnell und einfach reduziert. Dadurch werden die Klone eliminiert, die nur eine geringe oder keine Aktivität hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft aufweisen. In die zeitaufwendigeren quantitativen Untersuchungen (spezifische Messgröße, Screening) werden dann nur die selektierten Varianten einbezogen (Saha/Demirjian, 2001; Sutherland, 2000).

Das Screening-Verfahren zur Identifizierung eines neuen oder verbesserten Enzyms sollte im Idealfall auf dem aktuellen Substrat basieren. Oft werden jedoch Modellverbindungen, wie z.B. ein chromophorer Alkohol an Stelle von Hydroxylresten verwendet, um absorptions- oder fluoreszenzspektrometrische Verfahren einsetzen zu können, die sich durch hohe Geschwindigkeit und einfache Miniaturisierbarkeit auszeichnen. Diese Modellverbindungen müssen dem eigentlichen Zielsubstrat sehr ähnlich sein, um ein erfolgreiches Testsystem zu gewährleisten ("you get what you screen for", You/Arnold, 1996). Ein Verfahren mit abgewandelten, nur mittelbar ähnlichen Testsubstanzen führt dagegen häufig in eine „falsche“ Richtung (Saha/Demirjian, 2001).

### 1.5.1 Selektion

Selektive Testsysteme dienen zur schnellen Kontrolle von Klonierungsexperimenten, z.B. durch Anreicherung von Mikroorganismen, die eine bestimmte Resistenz aufweisen. Für die gezielte Suche nach neuen oder verbesserten Biokatalysatoren werden ebenfalls selektive Systeme eingesetzt, die qualitative Unterscheidung beruht hierbei z.B. auf Hofbildung (Tributyrim-agar bei Lipasen) oder einer Indikatorreaktion (pH-Indikator, Farbreaktion). Auch die Kopplung der gewünschten Enzymaktivität an eine zusätzliche Nahrungsquelle bei Verwendung von Minimalmedien kann zur Selektion verwendet werden, wobei positive Klone größere Kolonien bilden (Bornscheuer et al., 1998; Bornscheuer et al., 1999). Problematisch bei dieser Vorgehensweise ist allerdings, dass sich Mikroorganismen sehr schnell an drastische Änderungen der Umgebung anpassen können. Dies führt oft zu weiteren Mutationen, die nicht mit der gewünschten enzymatischen Eigenschaft korrelieren. So kann z.B. eine höhere Expressionsrate eines eigentlich ungeeigneten Enzyms einen verbesserten Biokatalysator vortäuschen (Olsen et al., 2000).

In den letzten Jahren wurden neue Selektionsverfahren entwickelt, die nicht mehr auf dem Substratverbrauch oder der Produktbildung zur Identifizierung verbesserter Varianten aufbauen und damit einen noch höheren Durchsatz erlauben. Als Beispiel seien hier die FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*) mit bis zu  $10^9$  Tests pro Stunde und molekularbiologisch-molekulargenetische Verfahren (Markerproteine, wie z.B. *green fluorescent protein* oder  $\beta$ -Galactosidase) genannt (Olsen et al., 2000; Waldo et al., 1999; Wigley et al., 2001).

### 1.5.2 Screening

Screening-Verfahren liegt die quantitative Bestimmung einer spezifischen Messgröße zugrunde, wobei die Individuen einzeln analysiert werden und die Identifizierung verbesserter Varianten über den Vergleich der Messwerte erfolgt (Olsen et al., 2000). Diese Verfahren sind insbesondere zur Durchmusterung von Mutantenbibliotheken geeignet, die durch gerichtete Evolution (siehe Abschnitt 1.4.3) erzeugt wurden, da alle Varianten die gleichen Fähigkeiten aufweisen, so dass eine Unterscheidung nur durch verschiedene Ausprägungen der gewünschten spezifischen Eigenschaft mög-

lich ist. Auch bei der Suche nach neuen Biokatalysatoren kann die Zahl der im ersten Schritt selektierten Enzyme durch Bestimmung einer spezifischen Messgröße weiter reduziert werden (hierarchische Vorgehensweise).

Ein häufig unterschätzter Punkt ist hierbei die geringe Anzahl an spektrometrischen und fluorimetrischen P450-Aktivitätsnachweissystemen, die automatisierbar sind und die Identifizierung verbesserter Enzymvarianten ermöglichen. Die wenigen beschriebenen optischen Aktivitätsnachweise beruhen auf der Umsetzung von 7-Ethoxyresorufin (Klotz et al., 1984), 7-Ethoxycoumarin (Aitio, 1978), 7-Methoxyquinolin (Mayer et al., 1989) und Derivaten dieser Verbindungen (DeLuca et al., 1988; Sone et al., 1989). Ferner sind Deethyl- und Demethylierung von *p*-Nitroanisol (Burgschat/Netter, 1977; Kamataki et al., 1979) oder *p*-Nitrophenetol (Kuwahara/Omura, 1980; Shigematsu et al., 1976) beschrieben. Weitere häufig eingesetzte HPLC- (Amet et al., 1996), GC- (Capdevila et al., 1996; Li et al., 2001) und auf radioaktiv markierten Substraten basierende Methoden (Mauersberger et al., 1981; Miura/Fulco, 1975) sind arbeitsintensiv, zeitaufwendig und nur schwer automatisierbar.

Erst mit der Entwicklung des *p*NCA-Assays (Schwaneberg et al., 1999b) stand eine Methode zur Verfügung, die die oben genannten Forderungen an Automatisierbarkeit und Hochdurchsatzscreening zur Auffindung genetisch verbesserter Enzymvarianten erfüllte. Dieser P450-Nachweis beruht auf der Spaltung von *p*-Nitrophenoxycarbonsäuren, wobei spektroskopisch nachweisbares *p*-Nitrophenolat gebildet wird. Die speziell für die Umsetzung dargestellten *p*-Nitrophenoxy-fettsäuren werden durch P450 CYP102A1-Enzymkatalyse mit Hilfe von Luftsauerstoff terminal hydroxyliert. Dabei entsteht ein instabiles Halbacetal, aus dem *p*-Nitrophenol abgespalten wird, das bei einem pH-Wert von 8,0 zu 90% als gelbes *p*-Nitrophenolat vorliegt und spektroskopisch nachgewiesen werden kann.

Mit dem *p*NCA-Assay steht ein Testsystem zur Verfügung, das die Bestimmung der Aktivität exprimierter P450-Monooxygenasen in kurzer Zeit ermöglicht. Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ergebnisse, die auf den „künstlichen“ *p*NCA-Substraten basieren, recht gut mit denen der natürlichen Substrate, den Fettsäuren, korrelieren (Lentz et al., 2001). Der Assay erlaubt jedoch nicht die Bestim-

mung des gesamten Substratspektrums eines neu exprimierten Enzyms. Hier muss auf Assay-Systeme zurückgegriffen werden, die auf dem Verbrauch des Cofaktors NADH/NADPH basieren (Boddupalli et al., 1990). NADH/NADPH absorbiert im Gegensatz zum oxidierten Reaktionsprodukt  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  bei 340 nm. Die Reaktion kann so mit einem UV-VIS-Spektrometer problemlos verfolgt werden. Tsotsou hat gezeigt, dass dieses System auch im Mikrotiterplatten-Maßstab einsetzbar ist (Tsotsou et al., 2002).

## 2 Zielsetzung

Wie bereits im Allgemeinen Teil erwähnt, stellen Cytochrom P450-Monooxygenasen eine für industrielle Biotransformationen potentiell interessante Enzymklasse dar (s. Kapitel 1.2). Von speziellem Interesse sind hierbei die Enzyme bzw. ihre genetisch verbesserten Varianten, die mit einzigartigen Eigenschaften den Anlass für die Umstellung eines Verfahrens oder einzelner Syntheseschritte innerhalb eines Herstellungsprozesses sein können (s. Abschnitt 1.4.1). Hierbei spielt eine besondere Rolle, inwieweit die Eigenschaften einer speziellen P450-Monooxygenase durch genetische Methoden modifiziert werden können, sei es im Bereich der Regioselektivität der katalysierten Hydroxylierung, im Bereich der Enzymstabilität oder der Hydroxylierungsgeschwindigkeit. Erkenntnisse in diesem Bereich erweitern auch die Möglichkeiten des *molecular modelling* der Bioinformatik, die aufgrund der „realen“ Forschungsergebnisse aus dem Labor immer bessere Modelle des Enzyms und des Katalysevorgangs entwerfen kann und damit selbst wieder zur schnelleren Generierung von Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften durch Identifizierung interessanter Mutationsziele beiträgt.

Als Modell-Herstellungprozess sollte in dieser Arbeit die Synthese von 1-Octanol aus *n*-Octan betrachtet werden. Die Synthese von Alkoholen aus Alkanen ist per P450-Katalyse in einem Reaktionsschritt zugänglich, während rein chemische Synthesen mehrere Schritte aus zum Teil komplexeren Edukten umfassen (Weissermel/Arpe, 1997). Es existieren vier unterschiedliche Routen für die Produktion der sogenannten Weichmacheralkohole ( $C_6 - C_{11}$ ):

1. Die Hydrierung von Fettsäuren aus Fetten und Ölen oder von Fettsäuren, die durch katalytische Oxidation von *n*-Paraffinen zu erhalten sind, führt zu linearen primären Alkoholen (1-Octanol insbesondere aus Kokosöl). Die Synthese läuft hier zweistufig ab. Zunächst werden die Triglyceride von Fetten und Ölen katalytisch (ZnO) verseift oder eine Methanolyse durchgeführt, im zweiten Schritt erfolgt dann bei etwa 200 bar und 250-350°C an Cu-Cr-Oxid-Katalysatoren die Hydrierung zu Alkoholen (und H<sub>2</sub>O bzw. CH<sub>3</sub>OH).



2. Die Hydroformylierung mit nachfolgender Hydrierung liefert Gemische geradkettiger und verzweigter primärer Alkohole. Hier lassen sich zwei prinzipielle Verfahrenswege unterscheiden: Einerseits werden Olefine nach Hydroformylierung und Hydrierung in Alkohole überführt, die um ein Kohlenstoffatom reicher als die Einsatzolefine sind (Einsatz von Katalysatoren auf Co- oder Rh-Basis), andererseits besteht die Möglichkeit der Aldolkondensation von Oxo-Aldehyden mit anschließender Hydrierung zu einem Alkohol der doppelten Kohlenstoffatomzahl (Katalysatoren auf Cu- oder Ni-Basis).
3. Die partielle Oxidation von *n*-Paraffinen ergibt lineare sekundäre Alkohole. Die Reaktion beruht auf der „Bashkirov-Oxidation“ unter Metaborsäure-Katalyse und liefert sekundäre Alkohole mit einer statistischen Verteilung der OH-Gruppen.
4. Der Alfol-Prozess (Ziegler-Aufbaureaktion in Gegenwart von Triethylaluminium) liefert lineare, geradzahlige primäre Alkohole. Er verläuft dreistufig, wobei zunächst Triethylaluminium stark exotherm bei 120°C und einem Ethen-Druck von 100 – 140 bar in einer Einschleppreaktion umgesetzt wird. Die dabei entstehenden Trialkylaluminiumverbindungen (Kohlenstoffkettenlänge abhängig von der eingesetzten Menge Ethen) werden anschließend bei 50-100°C und sehr stark getrockneter Luft zu Alkoxiden oxidiert. In der letzten Stufe werden die Aluminiumalkoxide mit verdünnter Schwefelsäure oder mit Wasser zu den Alkoholen und einer reinen Aluminiumsulfat-Lösung bzw. zu hochreinem Aluminiumhydroxid verseift, das als Katalysatorträger verwendet werden kann. Die Auftrennung von Wasser und Alkoholen geschieht durch Phasentrennung und fraktionierte Destillation der organischen Phase.

Die P450-Monooxygenase CYP102A1 aus *B. megaterium* zeigte bereits interessante Eigenschaften in Bezug auf eine Umsetzung von *n*-Octan, da durch genetische Modifikationen das Substratspektrum auch auf Alkane erweitert werden konnte (s. Abschnitt 1.4.3). Probleme ergeben sich allerdings aus der Tatsache, dass einerseits die Regioselektivität unspezifisch ist und kein 1-Octanol, sondern nur ein Gemisch sekundärer Alkohole aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden kann und andererseits die Stabilität des Enzyms für einen biokatalytischen Herstellungsprozess trotz

großer Vorteile gegenüber anderen prokaryontischen und vor allem eukaryontischen Monooxygenasen nicht ausreichend ist (s. Abschnitt 1.3.5). Insbesondere die Stabilität gegenüber Lösungsmittelvermittlern ist hier von besonderer Bedeutung, da *n*-Octan nicht wasserlöslich und CYP102A1 in organischen Lösungsmitteln nicht aktiv ist. Ebenso wünschenswert wäre eine höhere Langzeitstabilität des Biokatalysators. Von besonderem Interesse waren daher im Rahmen dieser Arbeit die anderen Enzyme der Familie CYP102, CYP102A2 und CYP102A3 aus *B. subtilis*. Beide Enzyme sind ebenfalls Fusionsproteine mit den bereits erwähnten Vorteilen bezüglich einer aktiven Expression (s. Abschnitt 1.3.6). Die Sequenzhomologie von 76 bzw. 77% auf Proteinebene ist hoch genug, um ähnliche Eigenschaften bezüglich Substratspezifität, Aktivität und genetischer Modifizierbarkeit erwarten zu lassen, eröffnet aber auch die Chance auf bessere Eignung mit Blick auf den Modell-Herstellungprozess. Die notwendige Änderung der Regioselektivität zu terminaler Hydroxylierung erfordert die Mutierung der Monooxygenasen mit Hilfe der beschriebenen Methoden (s. Abschnitt 1.4.3), was außerdem die Entwicklung eines Hochdurchsatztestsystems erforderlich macht.

Im Einzelnen ergaben sich dadurch folgende Aufgaben:

Erstens: Die P450-Monooxygenasen CYP102A2 und A3 sollten in ein geeignetes Expressionssystem kloniert, funktionell exprimiert und charakterisiert werden, um das Wissen über diese Enzymfamilie zu erweitern und einen geeigneten Kandidaten als Biokatalysator für den Modell-Herstellungprozess zu finden.

Zweitens: Es sollte ein hochdurchsatzfähiges Testsystem im Mikotiterplattenformat entwickelt werden, das es erlaubt, terminal hydroxylierende von subterminal hydroxylierenden Enzymvarianten zu unterscheiden.

Drittens: Darüber hinaus sollte der entwickelte Hochdurchsatzassay verwendet werden, um aus einer selbst erzeugten Mutantenbibliothek Enzymvarianten mit der gewünschten Eigenschaft, der terminalen Hydroxylierung von *n*-Octan, zu identifizieren.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung und Expression von CYP102A2 und CYP102A3

Die codierenden Gene für CYP102A2 und CYP102A3 wurden mittels PCR aus der genomischen DNA von *Bacillus subtilis* isoliert und wie in Abbildung 10 gezeigt, in den IPTG-induzierbaren Expressionsvektor pET20b(+) unter Kontrolle des T7-Promotors kloniert (s. Kapitel 5.5). Zur Überprüfung der korrekten Insertion der Gene wurden die Sequenzierprimer yetO 1-6 und yrhJ 1-6 (s. Abschnitt 5.3.2) verwendet. Die Sequenzanalyse ergab keine Abweichungen.

Bei den Expressionsversuchen (s. Kapitel 5.6) wurde zunächst die optimale IPTG-Konzentration bestimmt, um die maximale Ausbeute an löslichem Protein zu erhalten. Dabei wurde festgestellt, dass eine aktive Expression nur zu erzielen ist, wenn die Umdrehungsgeschwindigkeit des Schüttelinkubators 150 Upm nicht überschreitet. Höhere Geschwindigkeiten führen im pET-Expressionssystem offensichtlich zu einer Inaktivierung des Enzyms durch zu hohen Sauerstoffeintrag. Die optimale IPTG-Konzentration wurde zu 0,5 mM bestimmt; damit ließen sich regelmäßig Ausbeuten von 50 - 55 nmol P450 pro Liter Expressionsmedium erzielen (Bestimmung mit der CO-Differenzspektroskopiemethode nach dem Zellaufschluss, Abschnitt 5.6.6). Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse einer 2-Liter-Schüttelkolbenexpression nach 0, 1, 2 und 3 Stunden Expression bei 30°C. Man erkennt bereits nach einer Stunde eine neu auftretende Bande im Bereich 120 kDa, die dem neu exprimierten P450-Enzym entspricht. Längere Expressionszeiten als drei Stunden führten bei dieser Ansatzgröße zu keiner höheren Proteinausbeute (ohne Abbildung).

CYP102A2 ließ sich mit Hilfe von pET20b(+) nicht aktiv exprimieren und wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

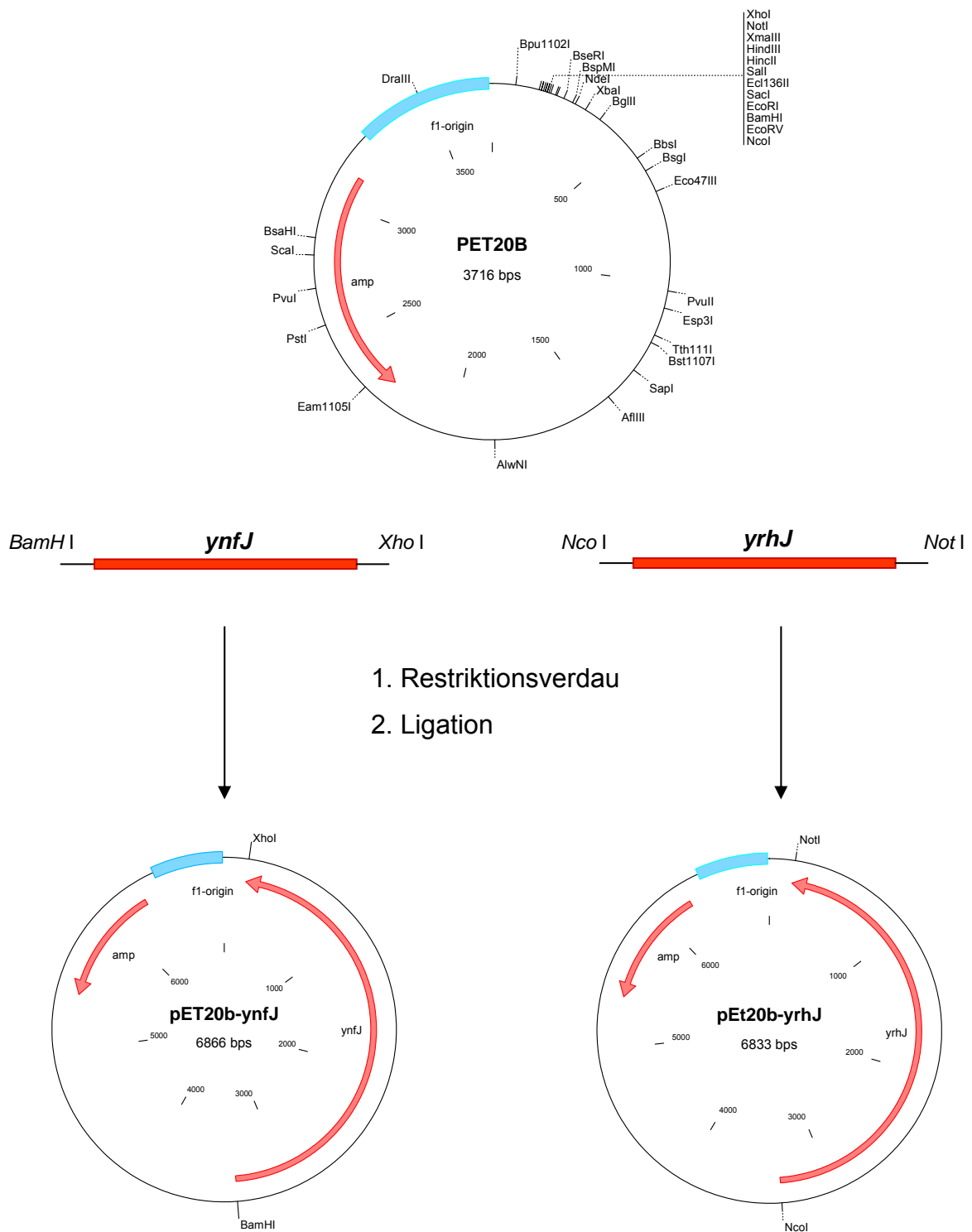


Abbildung 10: Klonierungsschema für die Geninsertion in pEt20b(+)

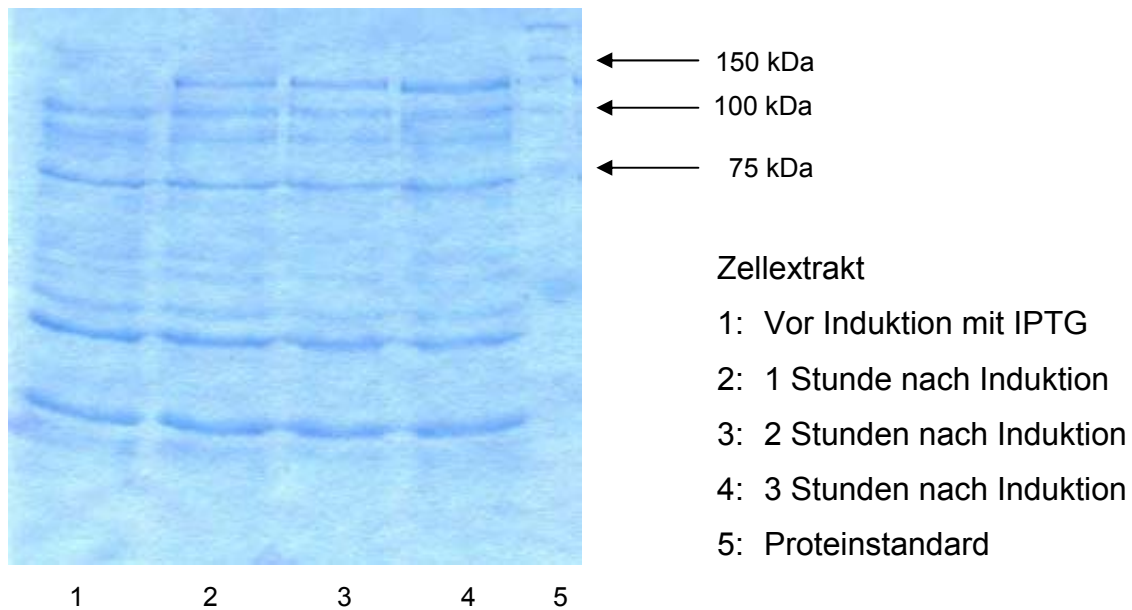


Abbildung 11: SDS-Gel (12,5%iges Trenngel) der Expression von CYP102A3 ( $M_r = 119$  kDa) in BL21(DE3) / pET20b(+).

### 3.2 Proteinaufreinigungen mit Anionenaustauschern

Um eine Charakterisierung des Proteins durchzuführen, war eine Aufreinigung der Proteinlösung notwendig. Da bei P450 BM-3 (CYP102A1) mit Anionenaustauschern, insbesondere den Materialien SuperQ 650M und DEAE 650M (Porengröße jeweils 65  $\mu\text{m}$ ) sehr gute Erfahrungen gemacht wurden (Schwaneberg et al., 1999a), fanden sie aufgrund der hohen Proteinsequenzidentität von 77% auch bei der Aufreinigung von CYP102A3 Verwendung. Zur Schonung des ÄKTAexplorer-Systems wurden in einem ersten Schritt Zelltrümmer und Fette mit Hilfe von 0,22  $\mu\text{m}$ -Sterivex-GP-Filtern entfernt. Der verbleibende Reinextrakt (zur Definition des Begriffs s. Abschnitt 5.6.3) war klar und wies eine für P450-Fusionsprotein-Lösungen charakteristische bräunliche Färbung auf.

Die Aufreinigung wurde mit Hilfe von gestuften NaCl-Salzgradienten durchgeführt. Dabei war die Fähigkeit des ÄKTAexplorer-Systems hilfreich, Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm (Gesamtprotein) bzw. 417 nm (Häm-Zentrum) synchron aufzuzeichnen. Die Stufengradienten waren vom Säulenmaterial abhängig: Abbildung 12 zeigt einen optimierten dreistufigen Salzgradienten für das Anionenaustauschermaterial SuperQ 650M. Die Elution des P450-Enzyms beginnt bei einer Erhöhung der

NaCl-Konzentration von 150 mM auf 350 mM. Bei DEAE 650M genügt eine zweite Stufe von 250 mM NaCl zur Elution des Proteins, führt aber gleichzeitig zu einer leichten Verbreiterung des Elutionspeaks im Vergleich zu SuperQ 650M.

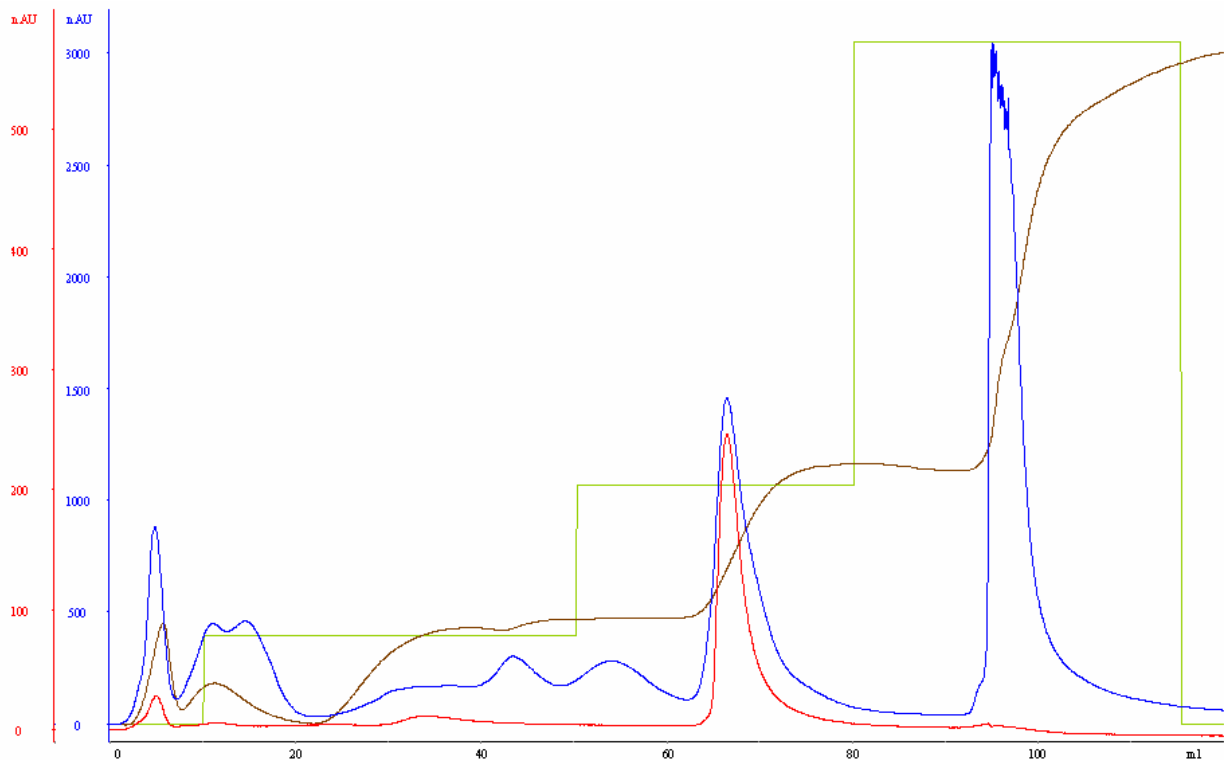


Abbildung 12: Gestufte NaCl-Gradienten zur Reinigung von P450 CYP102A3 aus Reinextrakt mit Toyopearl SuperQ 650M (erste Stufe 150 mM, zweite Stufe 350 mM). Die Beladung beträgt 3 – 5 mg P450 pro 20 ml Matrix. Die grüne Linie zeigt die eingestellten Gradientenstufen, die braune Linie die tatsächlich gemessene Leitfähigkeit.

Bei allen Aufreinigungen wurde zunächst festgestellt, dass sowohl das Peakflächenverhältnis 280 nm (Gesamtprotein) zu 417 nm (P450) des Elutionspeaks, als auch der Proteinquotient aus Gesamteinkonzentration (BCA-Methode) und P450-Konzentration (CO-Differenzspektroskopie-Methode) Werte zwischen 7,7:1 und 10,1:1 aufweist. Da das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten 2,7:1 beträgt, lässt sich daraus schließen, dass bestenfalls nur 35% der gebildeten Proteine tatsächlich auch ein aktives Häm-Zentrum tragen. Durch Zugabe einer eisenhaltigen Spurenelement-Lösung und der Häm-Vorstufe 5-Aminolävulinsäure vor der Expression konnte dieses Verhältnis auf Werte von bis zu 4,1:1 verbessert werden. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Reinigungsergebnisse mit beiden Materialien. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Aufreinigung mit Hilfe des Chromatografiematerials DEAE 650M.

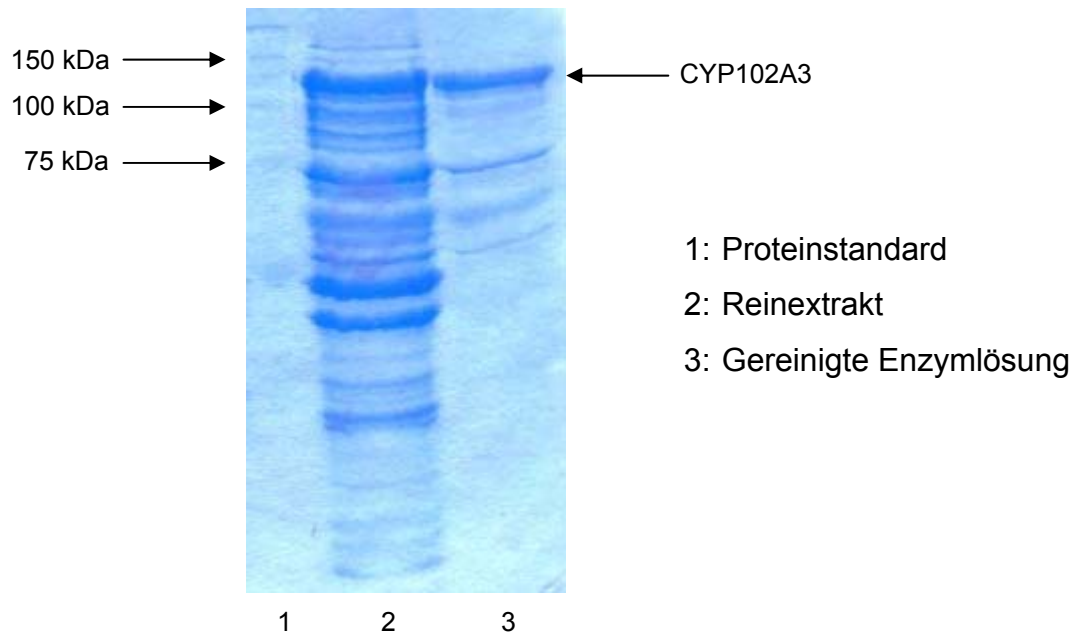


Abbildung 13: SDS-Gel (12,5%iges Trenngel) von Reinextrakt und aufgereinigter Enzymlösung. Beide Fraktionen besitzen dieselbe P450-Konzentration (bestimmt durch CO-Differenzspektroskopie)

Anionenaustauschmatrix	NaCl 1. Stufe / 2. Stufe	Ausbeute an Enzym [%]	Proteinquotient P450 / Gesamtprotein	Peakflächenverhältnis 280 nm / 417 nm
DEAE 650M	150 mM / 250mM	92	0,65	4,1
SuperQ 650M	150 mM / 350 mM	87	0,68	4,0

Tabelle 4: Zusammenfassung der Aufreinigungsergebnisse mit gestuften NaCl-Gradienten

Aufreinigungen mit Tris-Puffer erbrachten geringfügig bessere Auflösungen als solche mit Kaliumphosphat-Puffern, was so auch bei CYP102A1 beobachtet wurde (Schwaneberg, 1999). In den Aufreinigungsexperimenten wurden durchgängig maximal 20 ml Chromatografiematrix mit einer Enzymbeladung von 3 – 5 mg CYP102A3 verwendet. Durch größere Mengen (bis zu 100 ml Matrix) lassen sich noch bessere Reinigungsergebnisse bezüglich des Proteinquotienten erreichen (siehe hierzu z.B. Schwaneberg, 1999; der durchgängig solche Mengen an Matrix verwendet). Die erzielte Reinheit von 65 bzw. 68% war jedoch für die weiteren Experimente im Rahmen dieser Arbeit ausreichend.

### 3.3 Biochemische Charakterisierung von P450 CYP102A3

Sämtliche Charakterisierungsexperimente zur Bestimmung von Lösungsmittelstabilität, Puffersalzeinfluss, Temperatur- und pH-Stabilität wurden mit Hilfe des *p*NCA-Assays durchgeführt. Der schnelle Aktivitätsnachweis über die Bildung des Chromophors *p*-Nitrophenolat ermöglicht eine rasche Vergleichbarkeit einzelner Enzym-Eigenschaften mit dem bereits charakterisierten Vertreter dieser Monooxygenasen-Familie, P450 CYP102A1. Alle Daten zu diesem Enzym sind der Arbeit von Schwaneberg entnommen (Schwaneberg, 1999). Die exakte Durchführung der Charakterisierungsexperimente inklusive statistischer Auswertung ist in Kapitel 5.8 beschrieben. Auf Fehlerbalken wurde in den Abbildungen dieses Kapitels aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet.

#### 3.3.1 Katalytische Aktivität von P450 CYP102A3 gegenüber *p*NCA-Substraten

Die mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Plots ermittelten Werte  $k_{\text{cat}}$  (Wechselzahl) und  $K_M$  (Michaelis-Konstante) zeigen, dass CYP102A3 besser als CYP102A1 geeignet erscheint, die Umsetzung von Substraten mit kürzerer Kettenlänge als C10 zu katalysieren. Während bei CYP102A1 gegenüber dem kurzkettigen Substrat 8-*p*NCA überhaupt keine messbare Produktbildung stattfindet, zeigt CYP102A3 zumindest geringe Aktivität. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der relevanten Daten. CYP102A3 zeigt gegenüber 12-*p*NCA eine höhere katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}} / K_M$ . Obwohl die Substratbindung, erkennbar am höheren  $K_M$ -Wert, schlechter ist, kann CYP102A3 das Substrat wesentlich besser umsetzen, wie man an der höheren Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  sieht. Für das Substrat 10-*p*NCA gilt praktisch dasselbe, nur dass in diesem Fall CYP102A1 die bessere katalytische Effizienz besitzt.

Da die katalytische Effizienz von CYP102A3 gegenüber 12-*p*NCA am höchsten ist, wurde es als Substrat für die Charakterisierungsexperimente verwendet.



## Ergebnisse

	P450	12-pNCA	10-pNCA	8-pNCA
$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	CYP102A1	$7,2 \pm 1,5$	$42,0 \pm 12,3$	-
	CYP102A3	$10,4 \pm 3,4$	$24,5 \pm 2,1$	$63,6 \pm 10,8$
$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	CYP102A1	$1,7 \pm 0,1$	$9,7 \pm 2,0$	-
	CYP102A3	$5,2 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,01$
$k_{\text{cat}} / K_M$ [ $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ ]	CYP102A1	$2,31 \cdot 10^5 \pm 3,2 \cdot 10^4$	$2,31 \cdot 10^5 \pm 1,9 \cdot 10^4$	-
	CYP102A3	$4,96 \cdot 10^5 \pm 5,4 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4 \pm 4 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3 \pm 1 \cdot 10^3$

Tabelle 5: Vergleich kinetischer Parameter der Monooxygenasen CYP102A1 und CYP102A3. Die katalytische Aktivität  $k_{\text{cat}} / K_M$  wurde mit den exakten Werten berechnet, nicht mit den gerundeten, in der Tabelle dargestellten Größen. Einige Werte für CYP102A1 wurden noch einmal neu bestimmt, daher ergeben sich geringfügige Abweichungen gegenüber früher publizierten Daten (Lentz et al., 2001).

### 3.3.2 Lösungsmittelstabilität

Der Einfluss von Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität ist von entscheidender Bedeutung. Viele potentielle Substrate wie langkettige Carbonsäuren, Aromaten und Heteroaromaten sowie Alkane, sind nur eingeschränkt oder überhaupt nicht wasserlöslich. Um eine katalysierte Umsetzung zu bewerkstelligen, muss daher mit wassermischbaren Lösungsvermittlern gearbeitet werden. Den Einfluss von Aceton, Ethanol, Dioxan, THF und DMSO zeigt Abbildung 14. Ein Wert von 100% entspricht dabei der Aktivität direkt nach dem Zellaufschluss mit einem DMSO-Anteil von 0,5%, wie unter Abschnitt 5.8.1 beschrieben.

Auffallend ist vor allem der positive Einfluss von DMSO auf die Aktivität von P450 CYP102A3. Weitergehende Messungen haben gezeigt, dass DMSO bis zu einem Anteil von 25% am Reaktionsgemisch zugegeben werden kann, ohne dass die Aktivität unter den ermittelten Ausgangswert fällt. Nur Ethanol zeigt ebenso einen, wenn

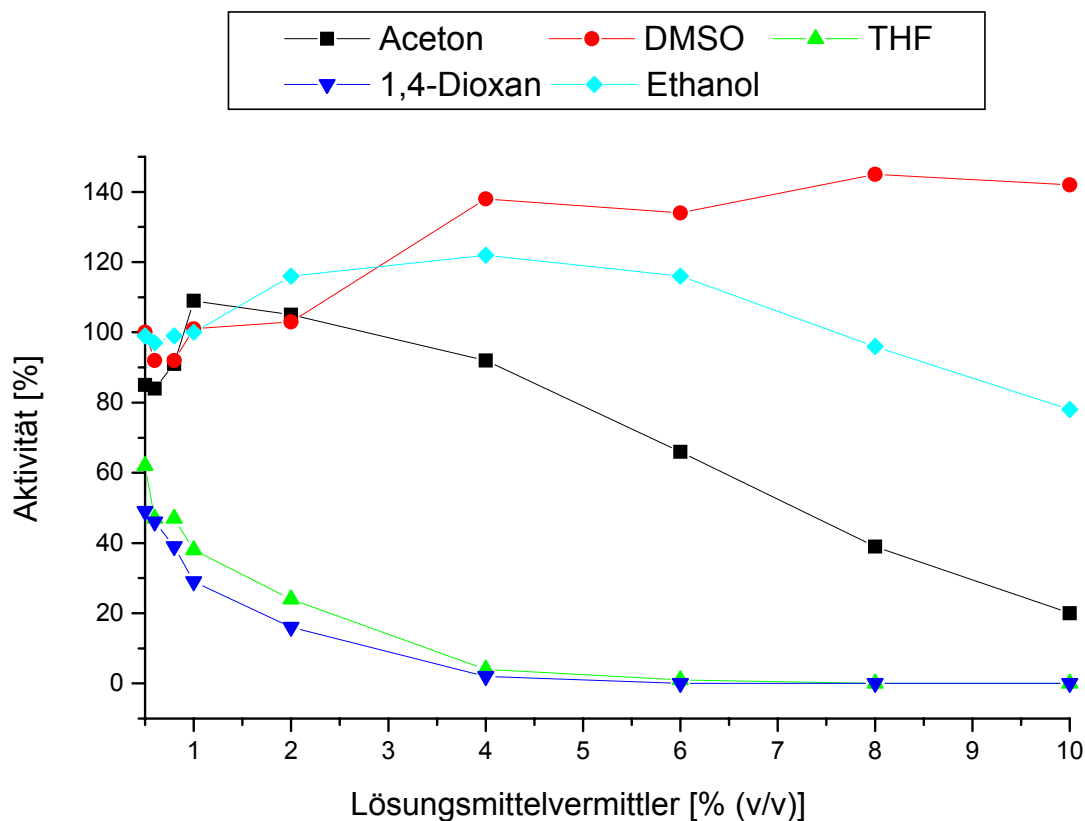


Abbildung 14: Stabilität von P450 CYP102A3 in wassermischbaren Lösungsmitteln in Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5).

auch geringeren, positiven Einfluss, der aber die Werte von DMSO nicht erreicht. Aceton, Dioxan und THF zeigen dagegen keine oder aber stark negative Effekte. Bereits bei Anteilen von nur 4 Volumenprozent Dioxan oder THF ist CYP102A3 vollständig inaktiviert. Im Vergleich zu CYP102A1 fällt auf, dass CYP102A3 Lösungsmittel besser toleriert. CYP102A1 ist bereits bei Anteilen von 2 Volumenprozent Dioxan und THF vollständig inaktiviert, nur mit Aceton zeigen sich Aktivitätssteigerungen gegenüber dem Ausgangswert (bis zu 70% bei 2 Volumenprozent). Der maximale Anteil an Lösungsmitteln beträgt 10%, darüber ist bei P450 CYP102A1 keine Aktivität mehr nachzuweisen. Ein Vergleich der Aktivität beider Enzyme mit unterschiedlichen DMSO-Anteilen in der Reaktionsmischung zeigt Abbildung 15. Hier erkennt man deutlich, dass die Aktivität von CYP102A1 schon ab 4 Volumenprozent DMSO stark zu sinken beginnt und bei mehr als 10% keine Produktbildung mehr auftritt. Bei CYP102A3 ist selbst bei einem Anteil von 30% DMSO noch eine geringe Restaktivität nachweisbar.

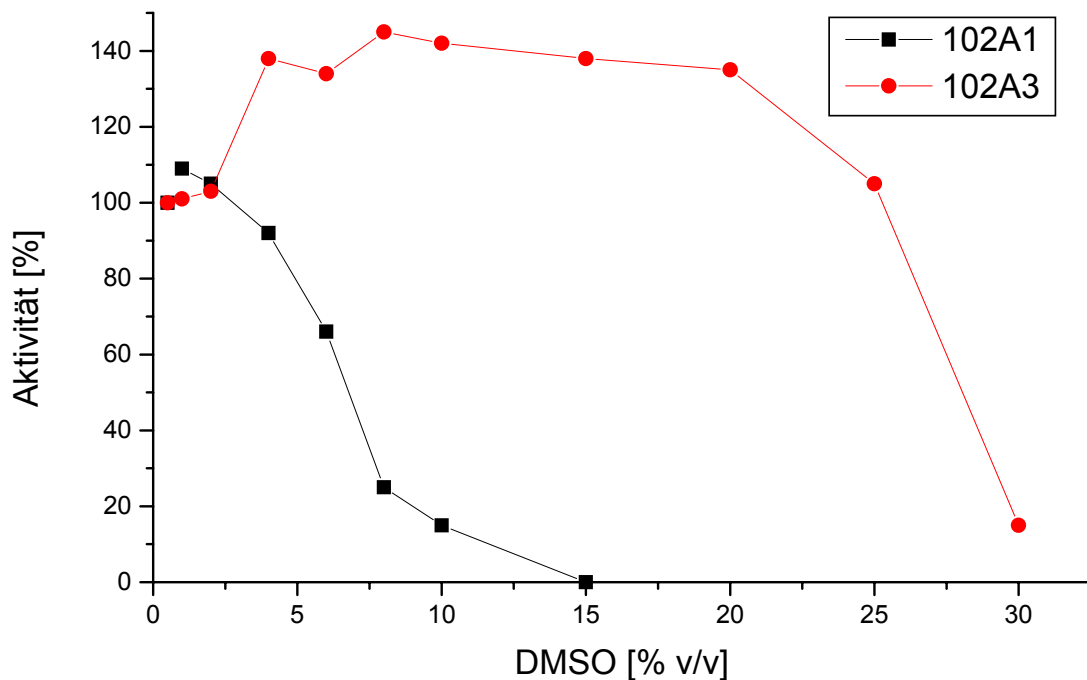


Abbildung 15: Vergleich der Stabilität der P450-Monooxygenasen CYP102A1 und CYP102A3 bei steigendem Anteil des Lösungsvermittlers DMSO in der Reaktionsmischung.

### 3.3.3 Einfluss verwendeter Puffersalze auf die Aktivität von P450 CYP102A3

Abbildung 16 zeigt den Einfluss verwendeter Puffersalze und des Elutionssalzes NaCl auf die Enzymaktivität. Insbesondere Tris/HCl-Puffer wird gut toleriert, es zeigte sich bis zu einer Konzentration von 250 mM kein negativer Einfluss. Na- und K-Ionen dagegen führen schnell zu einem Nachlassen der Enzymaktivität, sobald die Konzentration 150 mM überschreitet. Diese Tatsache wirkt sich besonders auf die Aufreinigung mittels Anionenaustauschern aus (vgl. Kapitel 3.2). Die Elution erfordert Konzentrationen von 250 mM (DEAE 650M) bzw. 350 mM (SuperQ 650M) NaCl. Vergleicht man die katalytische Effizienz nach einer vierstündigen Dialyse zur NaCl-Entfernung mit derjenigen vor der Aufreinigung, so erkennt man, dass ein irreversibler Aktivitätsverlust (65% Restaktivität bei DEAE 650M bzw. 35% bei SuperQ 650M) aufgetreten ist. Der Aktivitätsverlust ist irreversibel, weil nach der Entfernung des Elutionssalzes keine Rückkehr zur ursprünglichen Aktivität eintritt. Da der Aktivitätsunterschied zwischen P450-Reinextrakt und aufgereinigter P450-Lösung quantitativ exakt der Inaktivierungsrate durch NaCl entspricht, zeigt dies, dass bereits im Rein-

extrakt kein störender Einfluss mehr auf die Reaktionskatalyse auftritt, der im Rohextrakt durch Verunreinigungen noch vorhanden ist. Diese Tatsache konnte durch mehrmalige vergleichende Aktivitätsmessungen ( $p$ NCA- und NADPH-Tests) bestätigt werden.

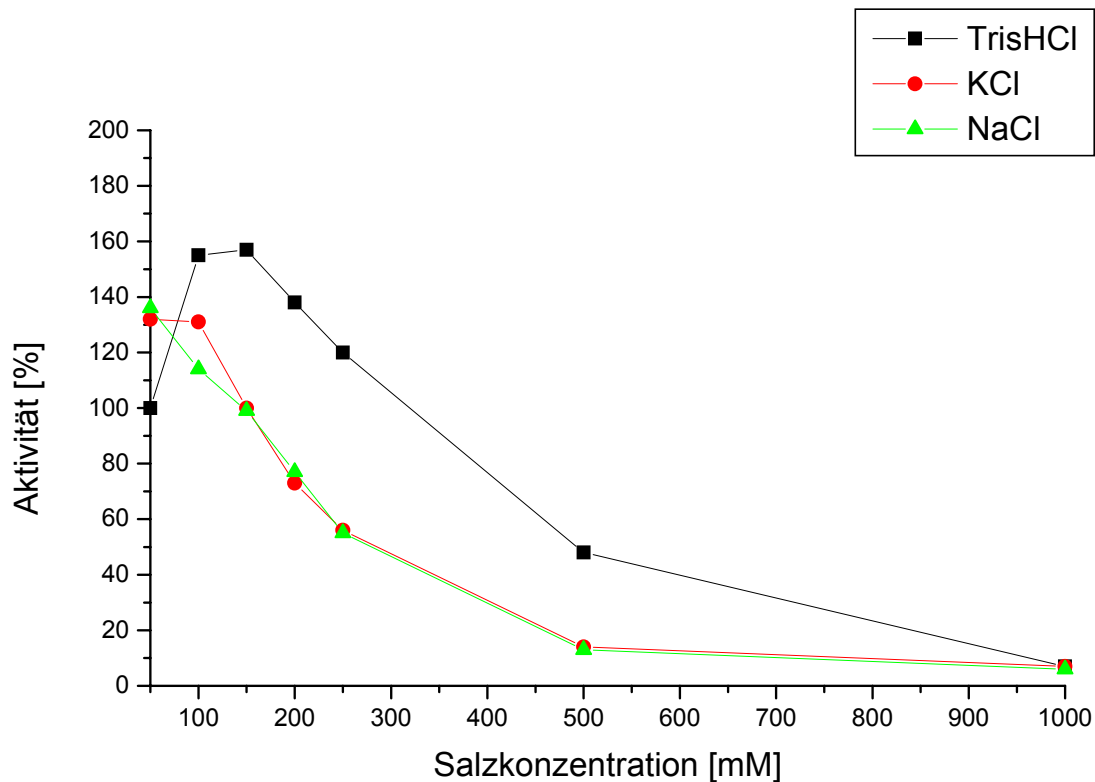


Abbildung 16: Einfluss der Tris/HCl- (pH 8,0), NaCl- und KCl-Konzentration auf die Aktivität von P450 CYP102A3. Der Wert 100% entspricht hier der Aktivität in einem 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0 (siehe auch Tabelle 5), wie er für alle Standard-Aktivitätsmessungen benutzt wurde.

### 3.3.4 Temperaturstabilität

Die Kurzzeit-Temperaturstabilität (Inkubation des Enzyms bis zu sechs Stunden bei diversen Temperaturen) ist in Abbildung 17 dargestellt. Bei Raumtemperatur (25°C) ist P450 CYP102A3 über sechs Stunden sehr thermostabil (Aktivitätsverlust ~10%). Bereits bei Temperaturen über 38°C wird der inaktivierende Einfluss jedoch merklich messbar, hier beträgt die Restaktivität nur noch 60% des Ausgangswertes. Eine bei CYP102A1 beobachtete Steigerung der Aktivität um bis zu 60% nach einer halb-

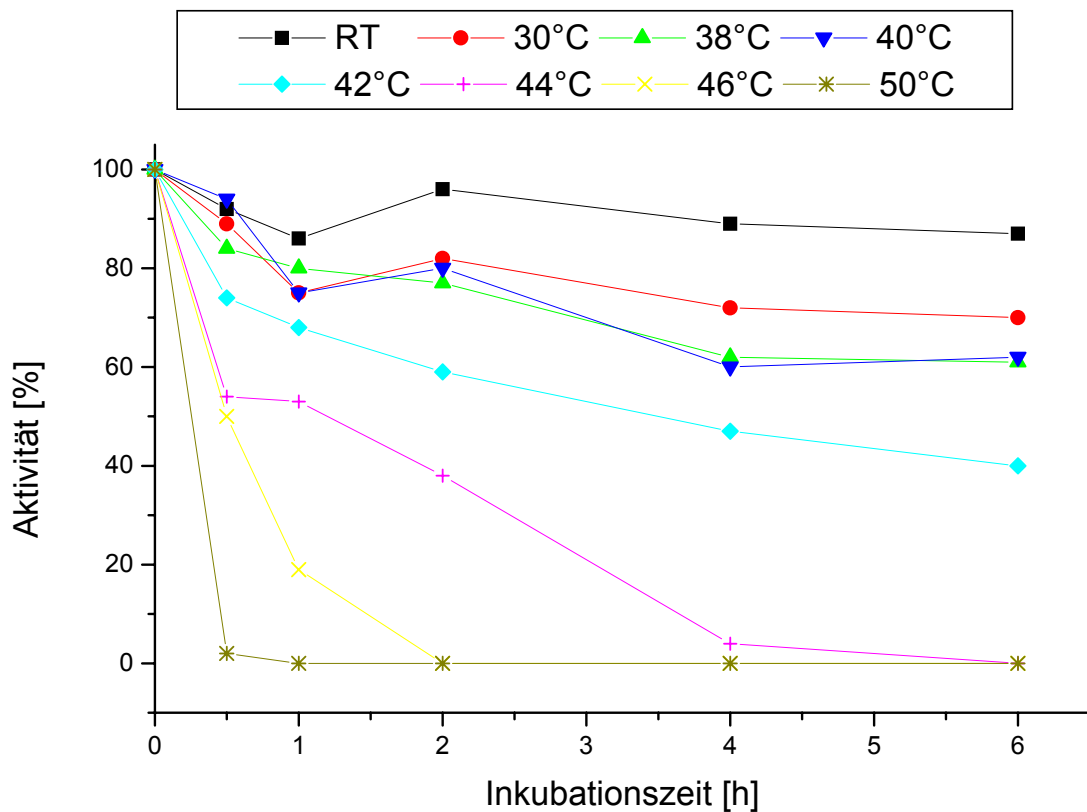


Abbildung 17: Stabilität von P450 CYP102A3 bis zu sechs Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen

stündigen Inkubation bei Temperaturen zwischen 35 und 39°C kann mit CYP102A3 nicht beobachtet werden. Aufschluss über die Langzeitstabilität (bis zu einer Woche) beider Enzyme gibt Abbildung 18. CYP102A3 ist 72 Stunden lang stabiler als CYP102A1, danach nähern sich die Restaktivitäten wieder an, nach sieben Tagen verbleibt eine Restaktivität von 38 bzw. 20%. Die thermische Inaktivierung lässt sich darauf zurückführen, dass in Lösungen bei sehr niedrigen Enzymkonzentrationen oder Temperaturen über 25°C eine merkliche Diffusion von FAD und FMN aus der Reduktase-Domäne des Enzyms heraus beginnt, wodurch das Häm-Zentrum im Verlauf des Reaktionsmechanismus nicht mehr durch die von FAD und FMN übertragenen Elektronen reduziert werden kann (Ortiz de Montellano, 1995).

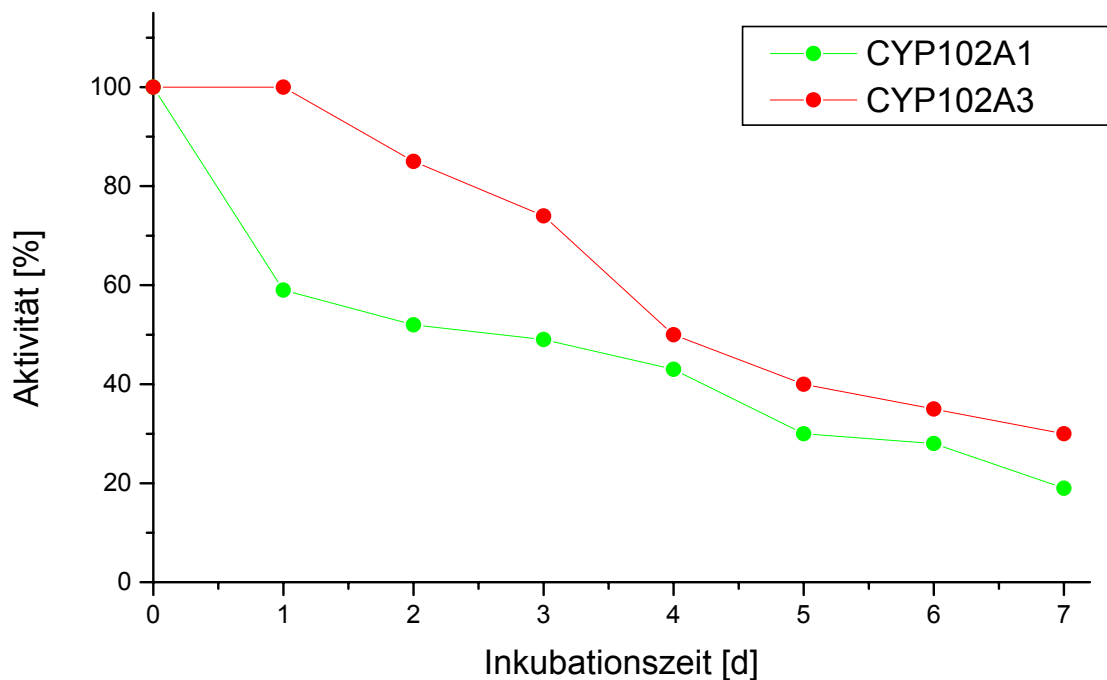


Abbildung 18: Temperaturstabilität von CYP102A1 und CYP102A3 im Vergleich. Die Lagerungstemperatur beträgt 25°C.

### 3.3.5 pH-Stabilität

Die pH-Stabilität und pH-Aktivität sind für die Wahl der Reaktionsbedingungen bei enzymkatalysierten Umsetzungen von Bedeutung. Die gemessenen Werte wurden um die Temperaturinaktivierungsrate (siehe Abschnitt 3.3.4) korrigiert, um vergleichbare Werte zu erhalten. CYP102A3 zeigt eine gute Toleranz gegenüber pH-Werten bis 9,0. Selbst nach sechsstündiger Inkubation bei pH 9,0 verbleibt noch eine Restaktivität von 80%. Wie Abbildung 19 zeigt, sind pH-Werte zwischen 6,5 und 8,5 geeignet für chemische Umsetzungen. Wie bei CYP102A1 zeigt sich die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 6,5. CYP102A3 zeigt insgesamt gesehen eine höhere Toleranz gegenüber dem sauren und alkalischen Bereich als CYP102A1, dass nach sechs Stunden bei pH 9,0 und pH 5,5 nur noch Restaktivitäten von 25 bzw. 5% besitzt.

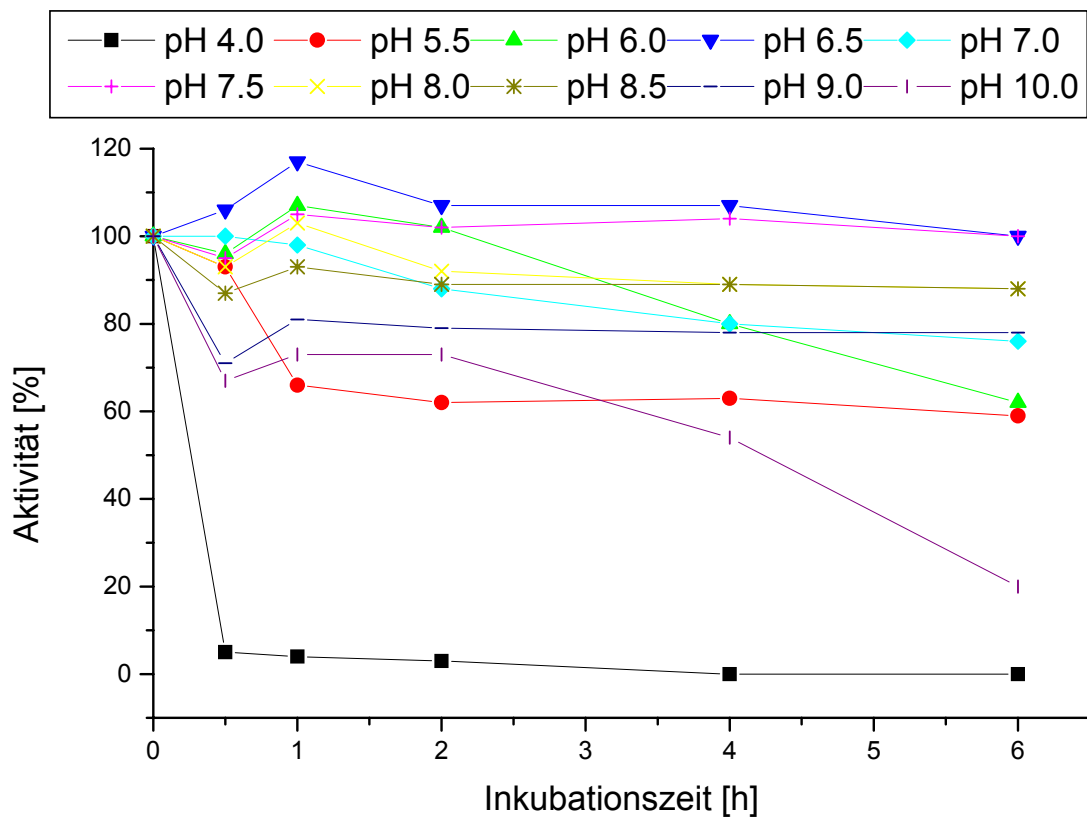


Abbildung 19: Stabilität von P450 CYP102A3 bei 25°C und verschiedenen pH-Werten

### 3.3.6 Substratspezifität und Regioselektivität von CYP102A3

Da Fettsäuren der Länge C12 – C16 gute Substrate für CYP102A1 sind, wurden sie auch als potentielle Substrate für CYP102A3 getestet. Um die Substratspezifität zu bewerten, wurde zum einen die Anfangsgeschwindigkeit des NADPH-Verbrauchs photometrisch bestimmt, zum anderen mit Hilfe von GC-Analysen der Gesamtumsatz nachgewiesen. Die Anfangsgeschwindigkeit des NADPH-Verbrauchs (bestimmt über die negative Kurvensteigung in der ersten Minute der Reaktion) stellt ein Maß für die Enzymaktivität während der Hydroxylierung dar und wird hier als Aktivitätsrate bezeichnet. NADPH wird als Elektronendonator zur Reduktion benötigt. Die Reduktionsäquivalente werden durch die Reduktasedomäne des Fusionsproteins übertragen, wobei theoretisch pro Mol Substrat ein Mol NADPH benötigt wird (s. Kapitel 1.3). Ein erheblicher Teil des eingesetzten NADPH kann jedoch durch Abbruchreaktionen, die zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Wasser führen, verloren gehen ("Uncoupling", zur Problematik und zum Mechanismus der Abbruchreaktion, siehe Guengerich, 2001). Auf-

schluss über die tatsächliche Produktbildung gibt dann die GC-Analyse. Die so ermittelte Produktausbeute (Gesamtumsatz) beim Einsatz der stöchiometrischen Menge an NADPH ist dann identisch mit der sogenannten Kopplungsrate der Reaktion.

Die mit Hilfe der NADPH-Verbrauchskurven bestimmten Aktivitätsraten zeigten für Laurinsäure (C12:0) fast identische Werte für beide Enzyme (560 Mol pro Minute pro Mol CYP102A1 bzw. 583 Mol pro Minute pro Mol CYP102A3). Umsatz und Regioselektivität beider Enzyme unterscheiden sich bei den angewendeten Reaktionsbedingungen erheblich: Trotz fast identischer Aktivitätsraten beträgt die Produktausbeute an Hydroxylaurinsäure bei CYP102A1 nur 40% im Gegensatz zu einer fast vollständigen Umsetzung unter CYP102A3-Katalyse. Dieses Ergebnis stützt den Befund, dass CYP102A3 besser geeignet ist, Substrate kürzerer Kettenlänge zu akzeptieren. Bei CYP102A1 gehen 60% der eingesetzten NADPH-Menge durch Abbruchreaktionen verloren. Die Regioselektivität beider Enzyme zeigt eine Beschränkung auf die Positionen  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3 in der Kette, wobei CYP102A1 keine Präferenz erkennen lässt, bei CYP102A3 ist dagegen  $\omega$ -3 mit einem Anteil von 57% bevorzugt.

Caprinsäure (C10:0) wird unter CYP102A3-Katalyse in ganz geringem Maße umgesetzt (50 Mol pro Minute pro Mol Enzym). Eine geringe Aktivität gegenüber Caprinsäure war nach den *p*NCA-Tests erwartet worden, da auch geringe Umsätze mit dem Modellsubstrat ähnlicher Größe, 8-*p*NCA, ermittelt wurden (s. Abschnitt 3.3.1; zur Vergleichbarkeit von Modell- und wahren Substrat siehe Lentz et al., 2001). Die geringe Umsatzrate von 28% deutet ebenfalls auf eine schlechte Substratumsetzung und Abbruchreaktionen hin. Die Regioselektivität zeigt ebenfalls eine Präferenz für die Position  $\omega$ -3 mit einem Anteil von 66%.

Für Caprylsäure (C8:0) konnte keine Hydroxylierungsaktivität festgestellt werden. Tabelle 6 zeigt alle Ergebnisse im Überblick.

An Substraten wurden außer Fettsäuren auch *n*-Octan als Vertreter der Alkane, Naphtalin als Aromat und  $\beta$ -Ionon als Terpen getestet. Bei keinem Substrat konnte dabei eine Produktbildung per GC-Analyse nachgewiesen werden.



Substrat	P450	Umsatz	Produktverteilung		
			$\omega$ -3	$\omega$ -2	$\omega$ -1
Laurinsäure	CYP102A1	40	34	28	38
	CYP102A3	93	57	35	8
Caprinsäure	CYP102A1	-	-	-	-
	CYP102A3	28	66	6	28

Tabelle 6: Vergleich der Umsatzraten und Regioselektivität bei der Hydroxylierung unterschiedlicher Fettsäuren. Alle Zahlenangaben in %.

### 3.4 Erweiterung der Substratspezifität von P450 CYP102A3 durch Rationales Design

Die Charakterisierung von CYP102A3 zeigte keine Aktivität gegenüber dem Zielsubstrat *n*-Octan, weist aber dennoch interessante Eigenschaften bezüglich Lösungsmittel- und Temperaturstabilität auf. Insbesondere aber die bessere Kopplung bei der Hydroxylierung von kurzkettigeren Substraten im Vergleich zu CYP102A1, lässt CYP102A3 als Biokatalysator für die Modellreaktion dieser Arbeit interessanter erscheinen.

Bei CYP102A1 konnte durch die Mutationen A74G, F87V und L188Q das Substratspektrum stark erweitert werden (Appel et al., 2001). Die genannten Positionen liegen im Bereich des Substrat-Eingangskanals bzw. des aktiven Zentrums des Enzyms. Diese Mutationen führen zu einer räumlichen Vergrößerung des aktiven Zentrums, so dass selbst sterisch anspruchsvolle Substrate wie Naphtalin und Indol akzeptiert werden. Für diese Arbeit interessant ist aber vielmehr, dass durch diese Mutationen auch die Octan-Hydroxylierung möglich wird. Aufgrund der Homologie der beiden Enzyme auf Proteinebene erschien die Einführung derselben Mutationen vielversprechend. Die entsprechenden Positionen bei CYP102A3 sind G75, F88 und S189. Weil CYP102A3 an der Position 75 bereits ein Glycin aufweist, konnte auf die

entsprechende Mutation verzichtet werden. Per QuickChange wurden die Mutationen F88V und S189Q eingeführt und die Einfachmutanten CYP102A3 F88V und CYP102A3 S189Q sowie die Zweifachmutante CYP102A3 F88V S189Q auf ihre Substratspezifitäten und Eigenschaften hin untersucht.

### 3.4.1 Substratspezifität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym

Die Mutante CYP102A1 F88V zeigt in Substratspezifität und –aktivität kaum Unterschiede zum Wildtyp-Enzym, wie aus Tabelle 7 ersichtlich. Bei der Mutante CYP102A3 S189Q dagegen zeigt sich bereits eine weiter erhöhte Präferenz für Substrate kürzerer Kettenlänge, außerdem wird auch *n*-Octan als Substrat hydroxyliert. Erst die Kombination beider Mutationen in der Mutante CYP102A3 F88V S189Q führt aber zu der gewünschten Substratvielfalt. Die Aktivitätsrate für *n*-Octan erreicht dabei

Substrat	Wildtyp	F88V	S189Q	F88V S189Q
Palmitinsäure	521 ± 25	599 ± 26	414 ± 20	787 ± 31
Laurinsäure	586 ± 28	556 ± 24	538 ± 26	767 ± 32
Caprinsäure	50 ± 3	26 ± 1	149 ± 6	2120 ± 80
Caprylsäure	-	-	-	41 ± 2
β-Ionon	-	-	-	286 ± 13
Naphtalin	-	-	-	143 ± 7
<i>n</i> -Octan	-	-	52 ± 3	722 ± 35

Tabelle 7: Aktivitätsraten des Wildtyp-Enzyms CYP102A3 und diverser Mutanten gegenüber verschiedenen Substraten. Alle Werte wurden mit Hilfe der Initialsteigung aus NADPH-Verbrauchskurven berechnet und sind in Mol Substrat pro Minute pro Mol P450 angegeben.

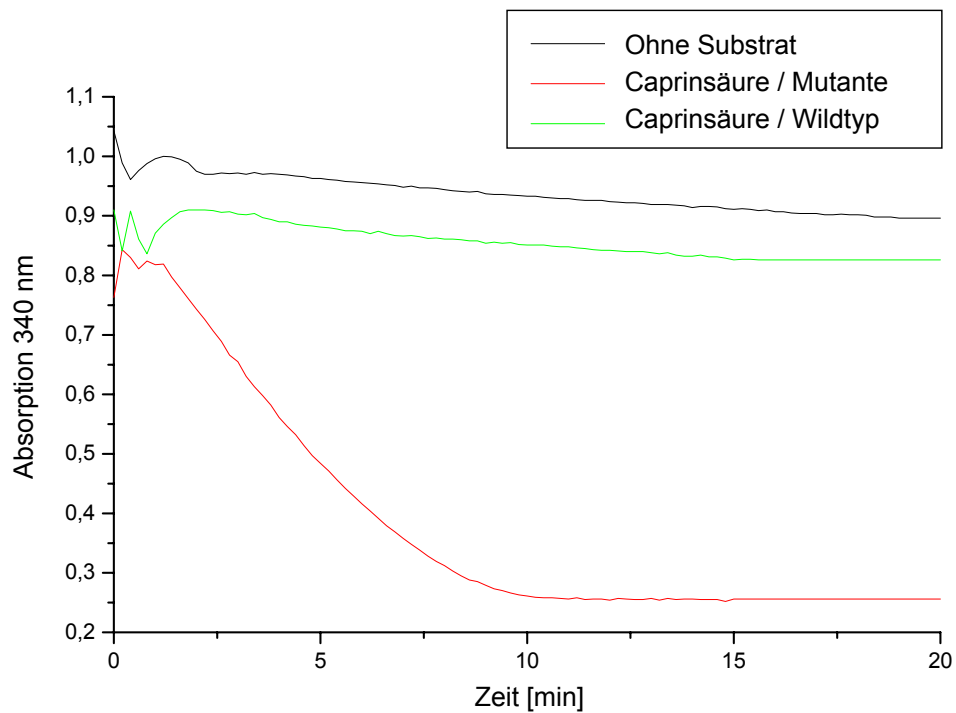


Abbildung 20: *In-situ* Reaktionskinetiken basierend auf der photometrisch bestimmten Oxidation des Cofaktors NADPH. Der Verbrauch unter Wildtyp-Katalyse entspricht dem natürlichen Abbau durch Oxidation mit Luftsauerstoff, wie aus den Kinetiken ersichtlich; mithin findet keine Hydroxylierung statt. Ein Wert von 0,2 entspricht der Grundabsorption durch andere Lösungsbestandteile.

eine Größenordnung wie bei den Substraten Palmitin- (C16:0) und Laurinsäure (C12:0). Die Abbildungen 20 und 21 zeigen die NADPH-Verbrauchskurven für Zweifachmutante und Wildtyp mit Caprinsäure und Octan als Substraten.

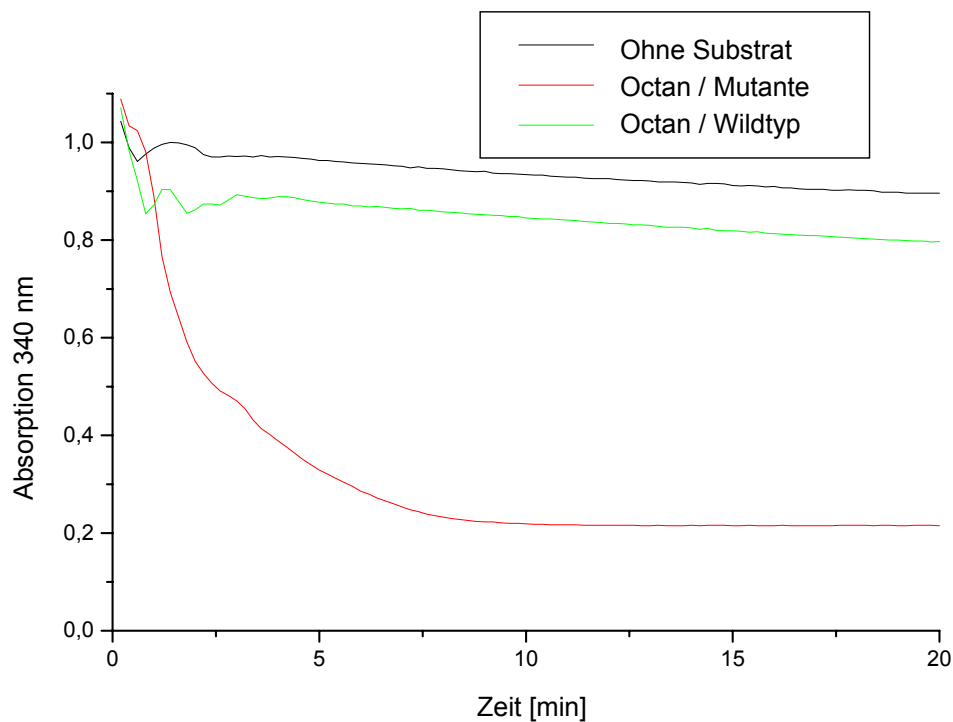


Abbildung 21: *In-situ* Reaktionskinetiken mit *n*-Octan als Substrat. Im diesem Fall wurde die doppelte Enzymmenge zur Katalyse eingesetzt, weshalb die Reaktion schneller fortschreitet als in Abbildung 20 mit dem Substrat Caprinsäure.

Tabelle 8 zeigt die Regioselektivitäten für einzelne Positionen bei der Hydroxylierung der Substrate Palmitin-, Laurin-, Caprinsäure und *n*-Octan. Die Einfachmutante S189Q unterscheidet sich dabei nur wenig vom Wildtyp-Enzym in Bezug auf die Regioselektivität der Fettsäurehydroxylierung. Bei der Rate der Produktbildung (Umsatzrate) zeigt sich eine Verschlechterung gegenüber langkettigen und eine Verbesserung gegenüber kurzkettigen Substraten (82% Umsatzrate bei Caprinsäure im Vergleich zu 28% des Wildtyps). Die Doppelmutante F88V S189Q zeigt nicht nur bei der Substratspezifität, sondern auch in der Regioselektivität eine sehr viel größere Vielfalt. Insbesondere bei der kurzkettigen Caprinsäure ist eine Verschiebung der Hydroxylierung zu terminalen Positionen erkennbar (60% 1- und 2-Hydroxylierung). Genauso wie bei Laurinsäure sind Hydroxylgruppen an vier Positionen identifizierbar, ein Anzeichen für eine vergrößerte Beweglichkeit des Substrats in der Bindungstasche des Enzyms. Der geringe Anteil an 10-Hydroxycaprinsäure beweist auch die Möglichkeit der  $\omega$ -Hydroxylierung.

## Ergebnisse

Substrat	P450	Umsatz	Produktverteilung				
			$\omega$ -4	$\omega$ -3	$\omega$ -2	$\omega$ -1	$\omega$
Palmitinsäure	Wildtyp	92	-	32	33	35	-
	S189Q	89	-	34	48	18	-
	F88V S189Q	66	-	63	34	3	-
Laurinsäure	Wildtyp	93	-	57	35	8	-
	S189Q	80	-	57	35	8	-
	F88V S189Q	82	10	42	37	11	-
Caprinsäure	Wildtyp	28	-	66	6	28	-
	S189Q	82	-	62	7	31	-
	F88V S189Q	80	-	20	20	56	4
Octan	Wildtyp	-	-	-	-	-	-
	S189Q	43	-	46	41	13	-
	F88V S189Q	49	-	32	68	-	-

Tabelle 8: Vergleich der Umsatzraten und der Regioselektivität des Wildtyp-Enzyms CYP102A3 und diverser Mutanten bei der Hydroxylierung verschiedener Substrate. Die Umsatzrate bezeichnet den Anteil an gebildetem Produkt im Vergleich zur Menge an eingesetztem Substrat nach Abschluss der Reaktion, erkennbar an der vollständigen Oxidation des Cofaktors NADPH. Alle Zahlenangaben in %.

### 3.4.2 Weitere Eigenschaften von F88V S189Q im Vergleich zum Wildtyp-Enzym

Die Doppelmutante F88V S189Q zeigt im Vergleich zum Wildtyp etwas verbesserte Aktivitätsraten gegen 10- und 8-*p*NCA ( $20,3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  zu  $6,4 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  und  $11 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  zu  $6 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) und verschlechterte gegen 12-*p*NCA ( $2,00 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  zu  $2,98 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). Eine Charakterisierung zeigt eine schlechtere Stabilität der Mutante bei Temperaturen über 40°C, so sind nach sechs Stunden noch 40% Aktivität festzustellen, beim Wildtyp-Enzym dagegen 60%. Auch der Einfluss der Puffersalze wirkt sich stärker aus, bei einer Na- oder K-Konzentration von 250 mM ist nur eine Restaktivität von 15% messbar, im Vergleich zu 65% beim Wildtyp. Im Hinblick auf Lösungsmittel- und pH-Stabilität waren keine bedeutenden Unterschiede feststellbar.

## 3.5 Entwicklung eines Hochdurchsatzassays zur Identifizierung verbesserter Enzymvarianten

Durch gezielte Mutationen konnte weder bei CYP102A1 (vgl. Appel et al., 2001) noch CYP102A3 eine Verschiebung der Regioselektivität zur terminalen Hydroxylierung erzielt werden. In Konsequenz musste also zur Methode der *ep*PCR übergegangen werden, um ungezielt Mutationen in das Monooxygenase-Gen einzufügen und so die gewünschte Eigenschaft zu gewinnen. Der Vorteil dieser Methode ist darin begründet, dass keine Kenntnisse über die Proteinstruktur bzw. den räumlichen Aufbau des aktiven Zentrums erforderlich sind, um die gewünschte Eigenschaft zu erzeugen. Das erforderliche System zur schnellen Durchmusterung tausender von Mutanten musste dazu erst entwickelt werden. Die Anforderungen der einfachen Automatisierung und Messung ließen ein auf spektrophotometrischen Methoden basierendes System ratsam erscheinen.

### 3.5.1 Entwicklung des *p*NA-Assays

Das erste entwickelte Testsystem basierte vom Prinzip her auf einer Abwandlung des bekannten *p*NCA-Assays (s. Abschnitt 1.5.2 und Abbildung 22). Es wurden statt der *p*-Nitrophenoxycarbonsäuren die von der Länge dem Zielsubstrat ähnlichen Substanzen *p*-Nitrophenoxyoctan (8-*p*NA) und *p*-Nitrophenoxyhexan (6-*p*NA)



ten besteht im Gegensatz zu den *p*NCA-Substraten eine viel größere Tendenz zur Hydroxylierung an anderen als dem gewünschten Kohlenstoffatom, das dem Sauerstoffatom der Ethergruppe am nächsten liegt. Dies betrifft insbesondere die Kohlenstoffatome 2, 5 und 6 des Moleküls, da hier keine Acetalbildung und damit detektierbare Reaktion auftritt, also nur ein verhältnismäßig geringer Reaktivitätsanteil gemessen werden kann und die Genauigkeit des Assays somit leidet. Zum zweiten besteht die bereits angesprochene allgemeine Problematik, dass nur mittelbar ähnliche Substrate bei aufeinander folgenden Generationen in eine falsche Richtung führen und das vermeintlich „verbesserte“ Enzym nur das Modellsubstrat gut umsetzt (s. Kapitel 1.5). Somit ist also keinesfalls sicher, dass eine Hydroxylierung an der Position 1 des Modellsubstrats *p*-Nitrophenoxyalkan auch zu einer Enzymvariante führt, die *n*-Octan terminal hydroxyliert. Aus diesen Gründen wurde auf eine weitere Evaluierung dieses Assays verzichtet.

### 3.5.2 Entwicklung des ADH-Assays

Zur Umgehung der genannten Probleme musste ein Assay entwickelt werden, der auf dem „wahren“ Substrat *n*-Octan beruht. Problematisch erscheint dabei zunächst die Unterscheidung der Reaktionsprodukte. Primäre und sekundäre Alkohole unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Eigenschaften. Besser lassen sich ihre Oxidationsprodukte, die Aldehyde bzw. Ketone, unterscheiden. Hier existieren einige Nachweisreaktionen, die photometrisch messbar sind und spezifisch für Aldehyde bzw. Ketone sind (z.B. Schiffs Reagenz, für weitere Beispiele vgl. Kakác/Vejdelek, 1974; Kakác/Vejdelek, 1977; Kakác/Vejdelek, 1983). Um eine sanfte Oxidation zu gewährleisten, wurden enzymatische Oxidationsmittel in Betracht gezogen, wobei Tests mit der Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae* (EC 1.1.1.1) und den primären und sekundären Octanolen zeigten, dass 1-Octanol um ein Vielfaches schneller oxidiert wird als die sekundären Octanole. Der Fortschritt der Reaktion lässt sich bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgen, da die verwendete ADH während der Reaktion den Cofaktor  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert und somit ein Absorptionsanstieg beobachtbar ist. Abbildung 23 zeigt den Anstieg der NADH-Konzentration bei der enzymkatalysierten Oxidation von 1- und 2-Octanol im Vergleich. Auf eine spezifische Aldehyd-Nachweisreaktion kann daher vollständig verzichtet werden. Hefe-ADH ist kom-



merziell erhältlich und vergleichsweise günstig (~2 € pro 1000 U, Fluka-Katalog 2003/2004).

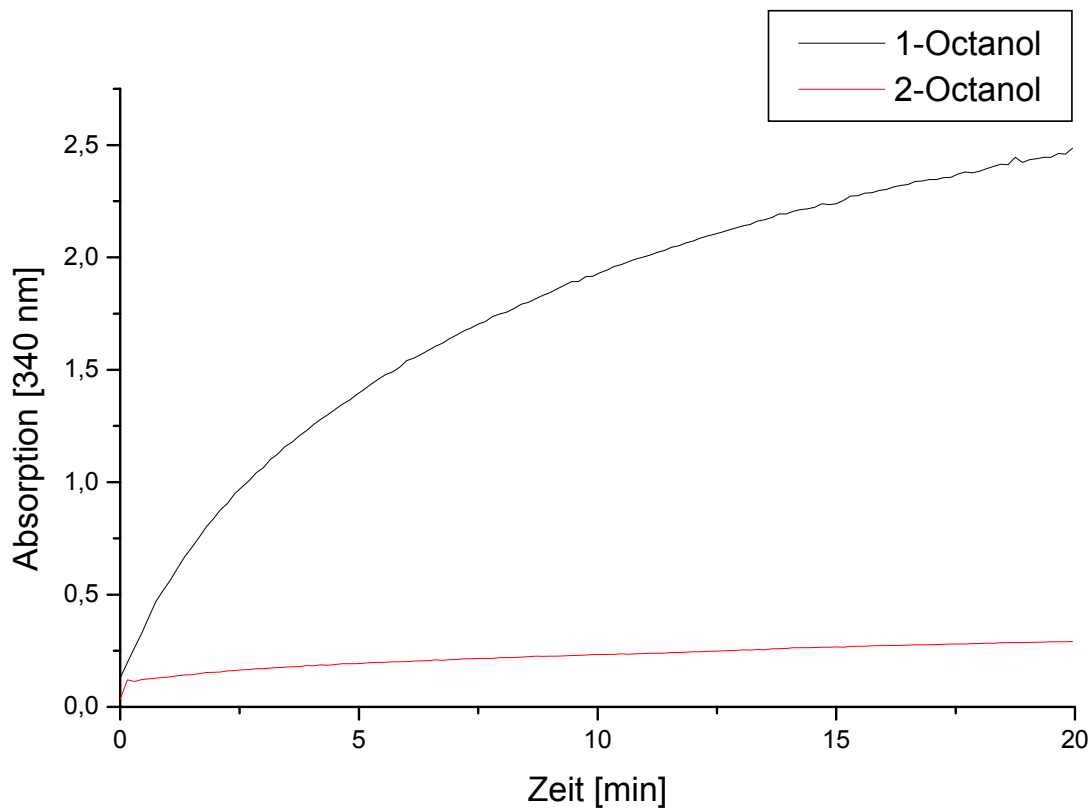


Abbildung 23: *In-situ* NADH-Produktion während der Oxidation von 1- und 2-Octanol (Konzentration 0,5 mM), katalysiert durch Hefe-ADH (EC 1.1.1.1).

### a) Prinzip des Assays

Das Prinzip des ADH-Assays ist in Abbildung 24 gezeigt. Der Assay basiert auf einer hierarchischen Vorgehensweise. Im ersten Schritt werden die Enzymvarianten auf ihre Aktivität gegenüber dem Substrat mittels NADPH-Verbrauch untersucht, die aktiven Varianten selektiert und aus automatisierungstechnischen Gründen wieder in neuen Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Anzucht der aktiven Mutanten und anschließendem Zellaufschluss in der Mikrotiterplatte wird die Biotransformation von Octan zu den entsprechenden Alkoholen durch Zugabe von NADPH durchgeführt. Das eigentliche Screening erfolgt erst danach durch Zugabe des ADH-Assaypuffers mit dem Cofaktor  $\text{NAD}^+$ . Der Anstieg der Absorption bei 340 nm durch Bildung von NADH zeigt die positiven Varianten an. Ein Vorteil des ADH-Assays ist seine Variabilität. Er

ist praktisch für jedes Substrat einsetzbar, dessen Hydroxylierungsprodukt von der eingesetzten ADH zur Oxidation akzeptiert wird. Natürlich muss für jedes Substrat geprüft werden, ob der Unterschied in der Oxidationsgeschwindigkeit von primärem und sekundärem Alkohol signifikant genug ist, um eine deutliche Unterscheidung zu ermöglichen. Hefe-ADH akzeptiert z.B. auch 8-Hydroxyoctan- oder 12-Hydroxydodecansäure als Substrat, was ebenfalls im Rahmen der Validierung getestet wurde.

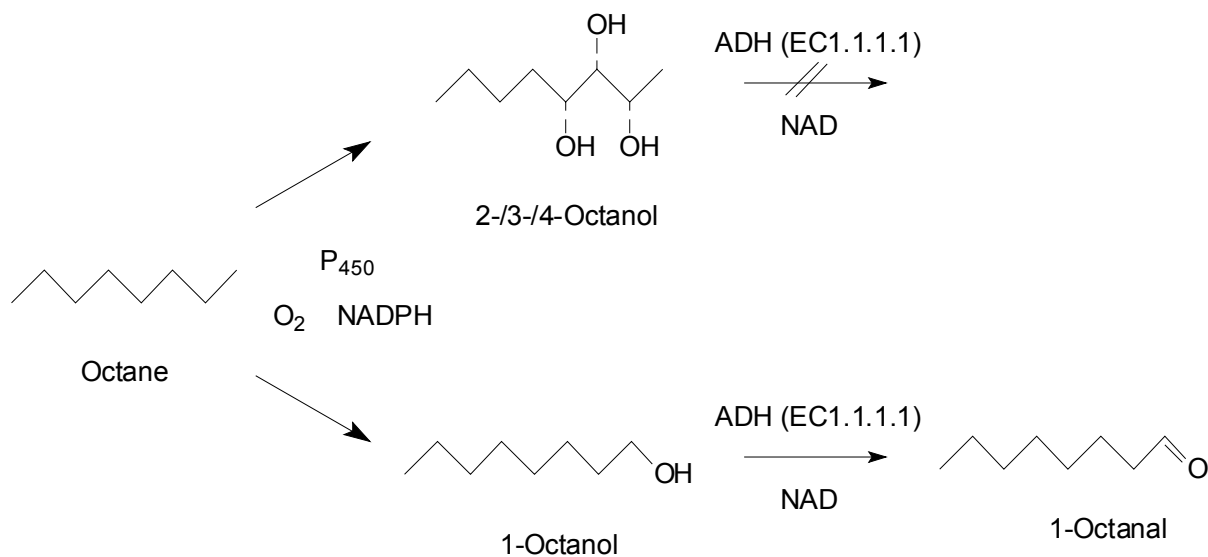


Abbildung 24: Prinzip des ADH-Assays. In der Hydroxylierungsreaktion wird unter P<sub>450</sub>-Katalyse ein Gemisch aus primären und sekundären Octanolen gebildet. Nach der vollständigen Abreaktion des NADPH erfolgt durch Zugabe des ADH-Assaypuffers das eigentliche Screening. Nur Reaktionsgemische, die 1-Octanol enthalten, zeigen einen signifikanten Anstieg der Absorption bei 340 nm durch Bildung von NADH.

### b) Wahl der Reaktionsbedingungen

Von entscheidender Bedeutung ist in der ersten Stufe des Assays die vollständige Oxidation des Cofaktors NADPH, der für die monooxygenase-katalysierte Reaktion benötigt wird. Da sowohl NADPH als auch NADH, das in der zweiten Stufe des Assays zum Einsatz kommt bei der gleichen Wellenlänge absorbieren, würde eine unvollständige Oxidation die zweite Assaystufe stören, weshalb ein geringer NADPH-Unterschuss im Vergleich zur Substratkonzentration gewählt wurde (0,96:1). Ansonsten kamen die bewährten Reaktionsbedingungen des qualitativen Schnelltests zum

Einsatz (s. Abschnitt 5.8.3). Die zweite Stufe des Assays erfordert eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts. Prinzipiell ist auch die Katalyse der Rückreaktion durch die ADH möglich und thermodynamisch bevorzugt. Der entstehende Aldehyd bzw. das Keton müssen also aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden, was durch Zugabe von Semicarbazid zum Reaktionspuffer möglich ist. Es entstehen so Semicarbazone, die nicht mehr der Rückreaktion unterliegen. Die Pufferzusammensetzung und Reaktionsbedingungen wurden dabei an eine Arbeit zur Bestimmung des Blutalkoholgehalts angelehnt (Bernt/Gutmann, 1974). Der pH-Wert von 8,8 dient zum Abfangen entstehender Protonen, um so ebenfalls ein günstiges Reaktionsgleichgewicht zu erreichen.

### 3.5.3 Evaluierung des Testformats

#### *a) Durchführung in Küvetten*

Der ADH-Assay wurde zunächst in 1-ml-Plastikküvetten getestet (s. Abschnitt 5.8.4). Das zum Lösen des Substrats *n*-Octan eingesetzte Cosolvens DMSO verringert die Aktivität der ADH, wie Tests gezeigt haben, lediglich um 5% und stellt somit kein Problem dar. Beim Einsatz des Rohextrakts ergab sich eine Störung der anschließenden ADH-Assayreaktion, weil das gebildete NADH zwischenzeitlich wieder verbraucht wurde. Diese Nebenreaktion konnte durch Verwendung des Reinextrakts vermieden werden. Die ADH-Konzentration wurde so gewählt, dass die vorhandene Menge an 1-Octanol im Falle einer vollständigen Hydroxylierung innerhalb von 20 Minuten vollständig abreagiert. Abbildung 25 zeigt den zeitlichen Verlauf der ADH-katalysierten Reaktion bei vier Ansätzen mit unterschiedlicher 1-Octanol-Konzentration. Man sieht, dass je nach Konzentration unterschiedliche Endpunktergebnisse bezüglich der Absorption bei 340 nm auftreten. Die Linearität des Assays ist ebenfalls ersichtlich, wobei hier anzumerken ist, dass die experimentell gemessenen Werte unterhalb der theoretisch berechneten liegen. Aufgrund des Extinktionskoeffizienten von NADH ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) sollte bei einer vollständigen Oxidation eine Absorption von 3,11 zu messen sein. Jede Reaktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

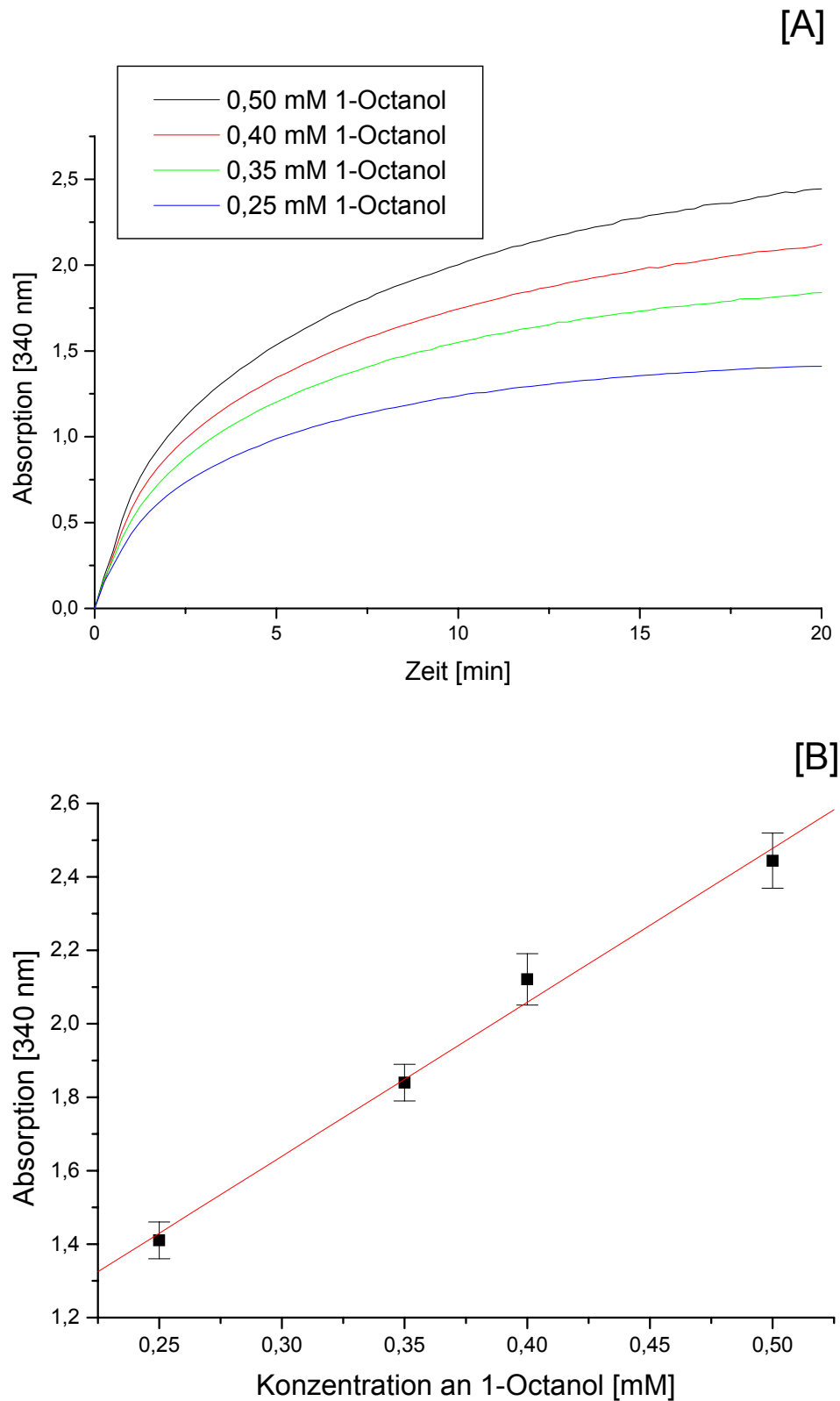


Abbildung 25: Reaktionsverlauf der Oxidation von 1-Octanol unter ADH-Katalyse [A]. Der Reaktionsansatz enthält neben den Reagenzien für den ADH-Assay auch den P450-Reinextrakt (Enzymkonzentration 0,25  $\mu$ M wie bei den Aktivitätstests). Die Auftragung der Substratkonzentration gegen die ermittelte NADH-Absorption nach Ende der Reaktion zeigt die Linearität des Assays im Bereich bis zu einer Substratkonzentration von 0,5 mM [B].

### b) Durchführung in Mikrotiterplatten

Zur Evaluation des Testformats im Mikrotiterplattenformat wurden zunächst verschiedene Tests mit unterschiedlichen Expressionsvolumina (750, 500 und 200  $\mu\text{l}$  Expressionsmedium, s. Abschnitt 5.6.2) und unterschiedlichen Zellaufschlussmethoden getestet (s. Abschnitt 5.6.3). Da die Durchführung des CO-Differenzspektroskopie-Tests in der Mikrotiterplatte sehr aufwendig ist, wurde die Effektivität der Aufschlussmethoden bzw. der unterschiedlichen Expressionsvolumina mit Hilfe von Aktivitätsmessungen bestimmt. Als Testsubstrat wurde 12-*p*NCA verwendet, wobei die durchschnittliche Aktivität in Tabelle 9 den gemittelten Wert des gebildeten *p*-Nitrophenolats über den Zeitraum von einer Stunde angibt. Die Zellen wurden nach der Expression abzentrifugiert, das Medium verworfen und danach wie in Tabelle 9 beschrieben verfahren.

Methode	Zeitansatz	Durchschnittliche Aktivität
1) Zugabe des Lysepuffers		
30 min Inkubation bei RT		
60 min Inkubation bei $-80^{\circ}\text{C}$	2,75 Stunden	-
Auftauen und Zentrifugation		
2) 60 min Inkubation bei $-80^{\circ}\text{C}$		
Zugabe des Lysepuffers		
45 min Inkubation bei $37^{\circ}\text{C}$	2,25 Stunden	$1,3 \pm 0,2 \mu\text{M min}^{-1}$
Auftauen und Zentrifugation		
3) Zugabe des Lysepuffers		
45 min Inkubation bei $37^{\circ}\text{C}$	1,25 Stunden	$0,3 \pm 0,05 \mu\text{M min}^{-1}$
Zentrifugation		

Tabelle 9: Ansätze zur Optimierung der Aufschlussbedingungen nach der Expression (200  $\mu\text{l}$  Medium) von CYP102A3 in der Mikrotiterplatte. Als Lysepuffer fand der Aufschlusspuffer II (s. Abschnitt 5.4.12) Verwendung. Die geringere Schichtdicke wurde bei der Messung berücksichtigt. Die durchschnittliche Aktivität zeigt den Konzentrationsanstieg an *p*-Nitrophenolat pro Minute.

Methode 2 erwies sich dabei am effektivsten. Dieses Ergebnis war erwartet worden, da sich bei pET-Systemen eine mindestens einstündige Inkubation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder  $-20^{\circ}\text{C}$  positiv auf die Ausbeute an Proteinen mit einem Molekulargewicht von über 100 kDa auswirkt (pET System Manual, Novagen Inc.). Darüber hinaus erwies sich eine Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  als notwendig, da sich bei Raumtemperatur das Lysozym nicht effektiv genug zeigte. Dies war bei Methode 1 ersichtlich, da die Zellen nur unvollständig aufgeschlossen wurden. Während der Überstand keine durch *p*-Nitrophenolat verursachte Gelbfärbung zeigte, konnte sie an den offensichtlich nur teillysierten Zellpellets beobachtet werden.

Die gewünschte Automatisierung des Screenings erforderte den Einsatz von Standardmikrotiterplatten (Fassungsvermögen 200  $\mu\text{l}$ ), da die verfügbaren Robotersysteme Platten mit großen Vertiefungen (Fassungsvermögen 2 ml) nicht verwenden können. Tabelle 10 zeigt das Ergebnis der Aktivitätsuntersuchungen bei unterschiedlichen Expressionsvolumina. Die durchschnittliche Aktivität in der Standardmikrotiterplatte ist für die Durchführung des Screenings hoch genug, obwohl der Aktivitätsrückgang bei Verringerung des Volumens überproportional ist. Die Dauer der Hydroxylierungsreaktion verlängert sich ebenfalls, wodurch weniger Mutanten pro Tag vermessen werden können.

Expressionsvolumen	Durchschnittliche Aktivität
750 $\mu\text{l}$	$6,4 \pm 0,7 \mu\text{M min}^{-1}$
500 $\mu\text{l}$	$3,1 \pm 0,5 \mu\text{M min}^{-1}$
200 $\mu\text{l}$	$1,3 \pm 0,2 \mu\text{M min}^{-1}$

Tabelle 10: Ansätze zur Expressionsoptimierung der Mikrotiterplattenexpression von CYP102A3

Die bei Verwendung des Rohextrakts im Küvettenmaßstab auftretende Nebenreaktion, die einen zwischenzeitlichen Rückgang des NADH bewirkte, trat bei den Mikrotiterplattentests nicht auf. Diese Tatsache vereinfacht das HTS-Verfahren sehr stark, da direkt die Zelllysate eingesetzt werden können und nicht mit Hilfe von Filterplatten

vorgereinigt werden muss. Lysozym beeinträchtigt weder die Aktivität der Monooxygenase noch der ADH, sofern die entsprechenden Reaktionsschritte nacheinander ohne Verzögerung durchgeführt werden. Wurde die Assayreaktion dagegen erst nach sechzehn Stunden durchgeführt, ergaben sich Absorptionswerte, die weit über den theoretisch möglichen lagen, Zeichen für eine nicht näher untersuchte Nebenreaktion des Lysozyms.

Die Konzentrationsansätze für Substrat und Cofaktor wurden so gewählt, dass ein geringer Überschuss an NADPH in der Lösung vorliegt (384  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu 400  $\mu\text{M}$  Substrat), um ein vollständiges Absinken der Absorption auf die Nulllinie bei vollständiger Reaktion von Octan zu Octanol zu gewährleisten. Bei diesem Konzentrationsansatz lag die Maximalabsorption zu Beginn der Reaktion zwischen 0,92 und 0,95. Tests ergaben, dass nach einer Stunde Reaktionszeit aktive von inaktiven Mutanten zweifelsfrei unterschieden werden können. Eine vollständige Reaktion (Testmutante F88V S189Q) benötigte aufgrund der geringen Enzymkonzentration in der Mikrotiterplatte dann insgesamt fast fünf Stunden. Ein über die ganze Mikrotiterplatte mit Hilfe eines Robotersystems durchgeführter Test des ADH-Assays mit einer 1-Octanol-Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  ergab eine Standardabweichung von 2%. Die ADH-Konzentration wurde dabei so angepasst, dass die Nachweisreaktion nur noch zehn Minuten benötigt.

### **3.6 Gerichtete Evolution von P450 CYP102A3 aus *B. subtilis***

#### **3.6.1 Erzeugung einer Mutantenbibliothek**

Für die Erzeugung einer Enzybibliothek aus der Mutante F88V S189Q wurde die klassische Methode der gerichteten Evolution durch *ep*PCR gewählt. Die genauen Amplifikationsbedingungen und der Reaktionsansatz sind in Abschnitt 5.5.5 beschrieben. Zur Vervielfältigung des Gens wurden vier parallele Ansätze im 100  $\mu\text{l}$ -Maßstab durchgeführt, wobei ein Nucleotid deutlich im Überschuss (ein Fünftel der Konzentration der anderen Nucleotide) vorlag. Um eine Bibliothek mit einer großen Mutationsvariabilität zu erzeugen, wurden Ansätze mit 0 bis 0,5 mM  $\text{MnCl}_2$  verwendet. Nach der Isolierung der *ep*PCR-Produkte und dem Restriktionsverdau mit den Endonucleasen *Nco* I und *Not* I wurden die mutierten Gene wieder in das Plasmid

pET20b(+) ligiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Aus sämtlichen Kolonien einer Platte wurde dann das Gesamtplasmid isoliert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Dieser Zwischenschritt war notwendig, da der Expressionsstamm BL21(DE3) nur eine sehr schlechte Transformationseffizienz aufweist (10% der Effizienz von DH5 $\alpha$ ). Die einzelnen Kolonien wurden mit Hilfe eines Pick-Roboters in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) mit LB-DMSO-Glc-Medium zur Stammhaltung abgelegt. Insgesamt umfasste die erstellte Bibliothek etwa 6500 Mutanten.

### 3.6.2 Durchmusterung der Mutantenbibliothek

Für die Durchmusterung der Mutanten nach regioselektiven Enzymvarianten wurde zunächst auf neue Mikrotiterplatten mit Expressionsmedium überimpft. Nach Anzucht und Expression der P450-Monooxygenase (s. Abschnitt 5.6.2) wurden die Zellen abzentrifugiert und über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die darauffolgenden Schritte wurden automatisiert per Robotersystem durchgeführt. Nach dem Zellaufschluss mit Lysozym (s. Abschnitt 5.6.3) und der Zentrifugation wurden von den 75  $\mu\text{l}$  Überstand nur 50  $\mu\text{l}$  abgenommen, da sich nur so eine die weiteren Messungen massiv störende Kontamination mit Zellresten vermeiden ließ. Auf einen Filtrationsschritt mit entsprechenden Filterplatten wurde aus Kostengründen verzichtet. Die Reagenzien für die Biotransformation (Reaktionspuffer, NADPH, Octan) wurden vereinigt und in einem einzigen Pipettierschritt zugegeben (s. Abschnitt 5.9.1). Die Messung des NADPH-Verbrauchs nach einer Stunde ergab bei 1098 Vertiefungen eine Abnahme der Absorption um mindestens 0,1. Diese aktiven Mutanten (17% der Genbank) wurden als ausreichend effektiv angesehen und manuell in neue Mikrotiterplatten zur Stammhaltung und erneuten Expression abgelegt. Zur Assaykontrolle wurden bei jeder Mikrotiterplatte die Vertiefungen A1-D1 mit der Mutante F88V S189Q, die als Ausgangspunkt für die gerichtete Evolution diente, inokuliert. Nach der erneuten Expression und dem Zellaufschluss wurde die Biotransformation durchgeführt und die Reaktionszeit von einer auf vier (Platten 1-6), fünf (Platten 7-10) und sechs Stunden (Platten 11-12) ausgedehnt, um eine ausreichend hohe Menge an Reaktionsprodukt für das Screening zu erhalten. Das Nachweisreagenz wurde auch hier in einem Pipettierschritt zugegeben (s. Abschnitt 5.9.2) und nach 10 Minuten die Zunahme der Absorption gemessen. Die Absorptionzunahme, die in den Vertiefungen mit der Mutan-



te F88V S189Q bestimmt wurde, bildet den Grenzkontrollwert, da diese Mutante bekanntermaßen nur sekundäre Alkohole liefert. Alle darüber liegenden Werte zeigen somit eine positive Mutante an, die neben den sekundären auch primären Alkohol als Biotransformationsprodukt liefert. Bei den Platten 1-6 betrug dieser Wert zwischen 0,066 und 0,085; bei den Platten 7-10 0,131 – 0,138 und bei den Platten 11 und 12 0,195 – 0,205; bedingt durch die unterschiedliche Reaktionsdauer. Abbildung 26 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Platte 12. Man erkennt eine große Variabilität in der Aktivität (Abszisse), die Regioselektivität (Ordinate) unterscheidet sich aber nicht von der Ausgangsmutante F88V S189Q. Die Verteilung dieser Platte ist charakteristisch für die meisten Platten.

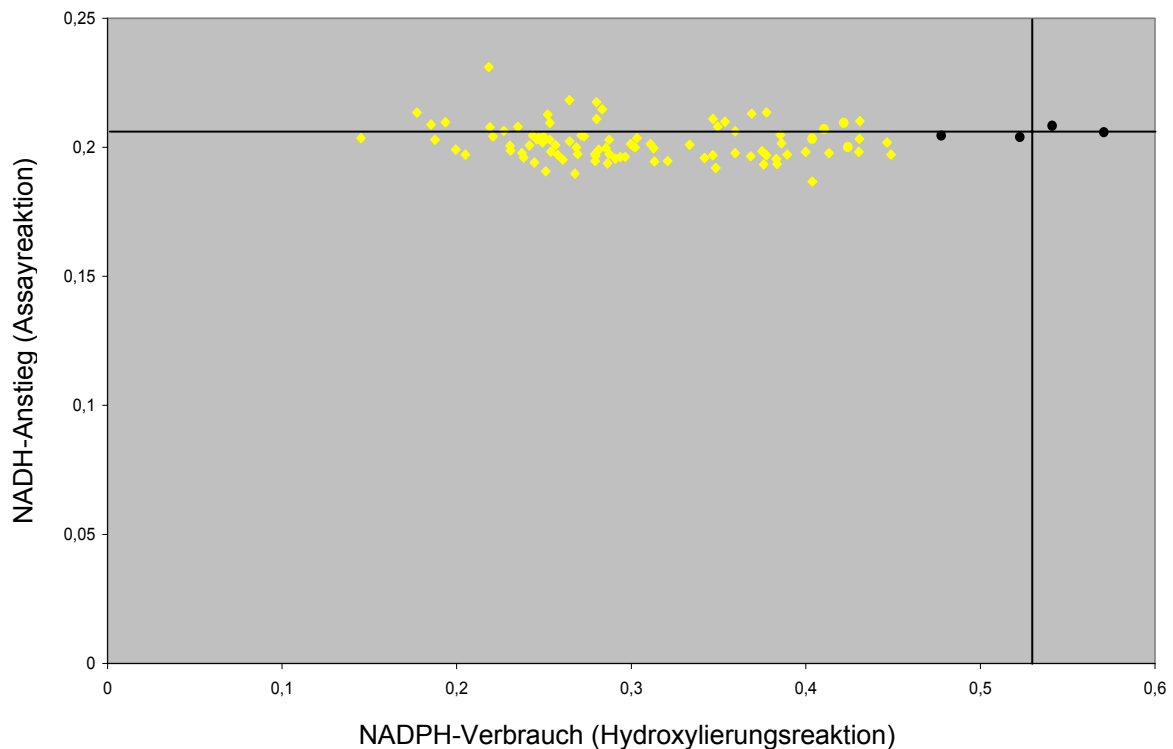


Abbildung 26: Screening-Ergebnis der Mikrotiterplatte 12. Die Abszisse zeigt die Werte der Hydroxylierungsreaktion, die Ordinate das Ergebnis der Assayreaktion. Die schwarzen Punkte stellen die Ergebnisse der Ausgangsmutante dar, wobei die waagerechte und senkrechte Linie den Durchschnitt der in vier unterschiedlichen Vertiefungen der Platte gemessenen Werte dieser Mutante darstellen. Die gelben Punkte stellen die Ergebniskombinationen der 92 restlichen *ep*-Mutanten dar.

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis der Platte 5. Hier sieht man viele Mutanten, die eine höhere Aktivität als die Ausgangsmutante aufweisen, sowie Mutanten, die aufgrund ihres signifikant höheren Ordinatenwertes auch eine veränderte Regioselektivität besitzen. Besonders hervorzuheben ist die Mutante 91F9, die bei geringerer Produktbildung (63% des NADPH-Verbrauchs der Ausgangsmutante) einen fast doppelt so hohen NADH-Anstieg in der ADH-Assayreaktion zeigt, was einen besonders hohen Anteil an 1-Octanol verspricht.

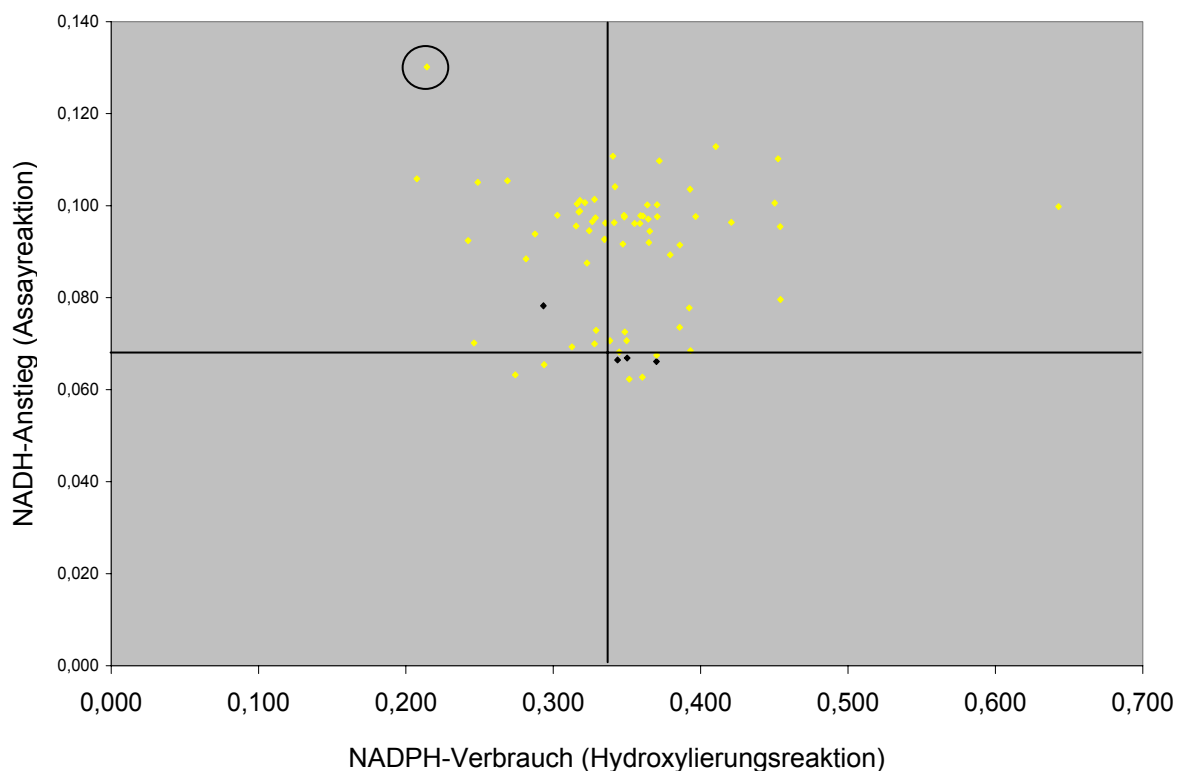


Abbildung 27: Screening-Ergebnis der Mikrotiterplatte 5 mit markierter Mutante 91F9. Die meisten anderen Mutanten erwiesen sich als zu instabil für eine reproduzierbare Expression.

### 3.6.3 Verifikation der Screening-Ergebnisse

Mit sechs Mutanten wurden Expressionsversuche in Zweiliterkolben durchgeführt und die Regioselektivität per GC-Analyse untersucht. Dabei wurde eine starke Instabilität der Monooxygenasen unter den bekannten Expressionsbedingungen festgestellt. Die CO-Differenzspektroskopie nach Zellaufschluss zeigte nur inaktives P450 (sichtbar durch einen Peak bei 420 nm), eine Substratumsetzung konnte ebenfalls

nicht festgestellt werden. Nur die Mutanten 77A12 und 91F9 konnten aktiv unter den bekannten Bedingungen (s. Abschnitt 5.6.1) exprimiert werden, nachdem die Umdrehungsgeschwindigkeiten der Inkubatoren auf nur noch 100 Upm reduziert wurde. Bei Mutante 77A12 konnte nur das Edukt, aber keine Produkte per GC nachgewiesen werden. Abbildung 28 zeigt die GC-Analyse der Produkte unter 91F9-Katalyse. Das Produkt 1-Octanol ist zweifelsfrei nachweisbar, jedoch beträgt die Kopplungsrate der Reaktion nur 4%. Der Großteil der NADPH-Reduktionsäquivalente geht also nicht in die Produktbildung. Die Mutante erwies sich ebenfalls nicht als anhaltend stabil, die Enzymaktivität kam nach 30 – 60 Minuten vollständig zum Erliegen.

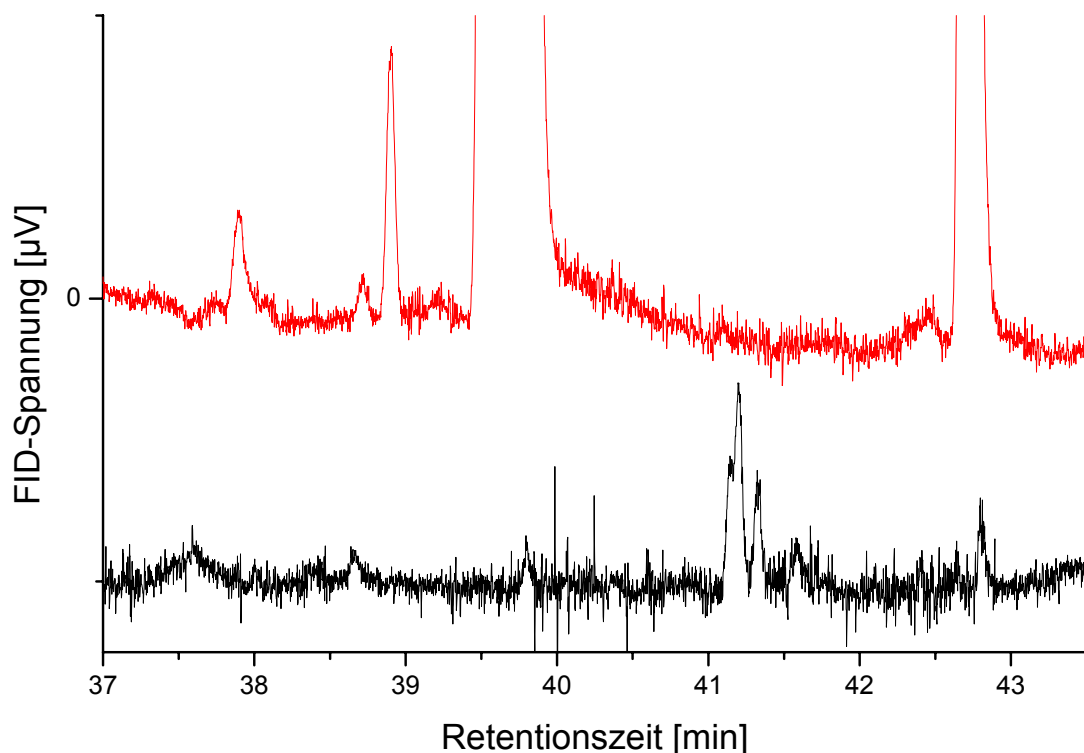


Abbildung 28: Ergebnis der GC-Analyse der Reaktionsprodukte unter Katalyse der Mutante 91F9. Die rote Linie stammt von einer Standardlösung mit jeweils 1 mg/ml 1-Octanol ( $R_t = 42,8$  min) und 2-Octanol ( $R_t = 39,8$  min).

### 3.6.4 Erstellung zweier neuer Mutanten auf Basis der Sequenzierung von 91F9

Die Sequenzierung der Mutante 91F9 ergab vier neue Mutationen in der Monooxygenase-Domäne (Q314F, N321G, A330V, L410P). Um Mutanten mit höherer Stabilität zu erzeugen, erschien es interessant, jede Mutation zunächst einzeln per Quick-

Change PCR in die Ausgangsmutante CYP102A3 F88V S189Q einzuführen. Zunächst wurde die Mutante F88V S189Q A330V erstellt. Die Verwendung der Mutation A330V geht dabei auf neuere Arbeiten zurück, die die Fokussierung der Regioselektivität von CYP102A1 auf eine einzige Position zum Ziel hatten (Peters et al., 2003). Bei der Untersuchung einer *ep*-Mutante mit vierzehn Mutationen, darunter Mutation A328V, konnte ein Anteil von 10% 1-Octanol an den Reaktionsprodukten identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst die Mutation A330V eingeführt, da sie in derselben räumlichen Nähe zum Häm-Zentrum von CYP102A3 liegt, wie die Position A328 bei CYP102A1. Die neue Dreifachmutante konnte reproduzierbar aktiv exprimiert werden. Abbildung 29 zeigt die GC-Analyse der Produkte unter Katalyse der Dreifachmutante. Bei einer Kopplungsrate von 7% betrug der Anteil von 1-Octanol an den Hydroxylierungsprodukten 11%.

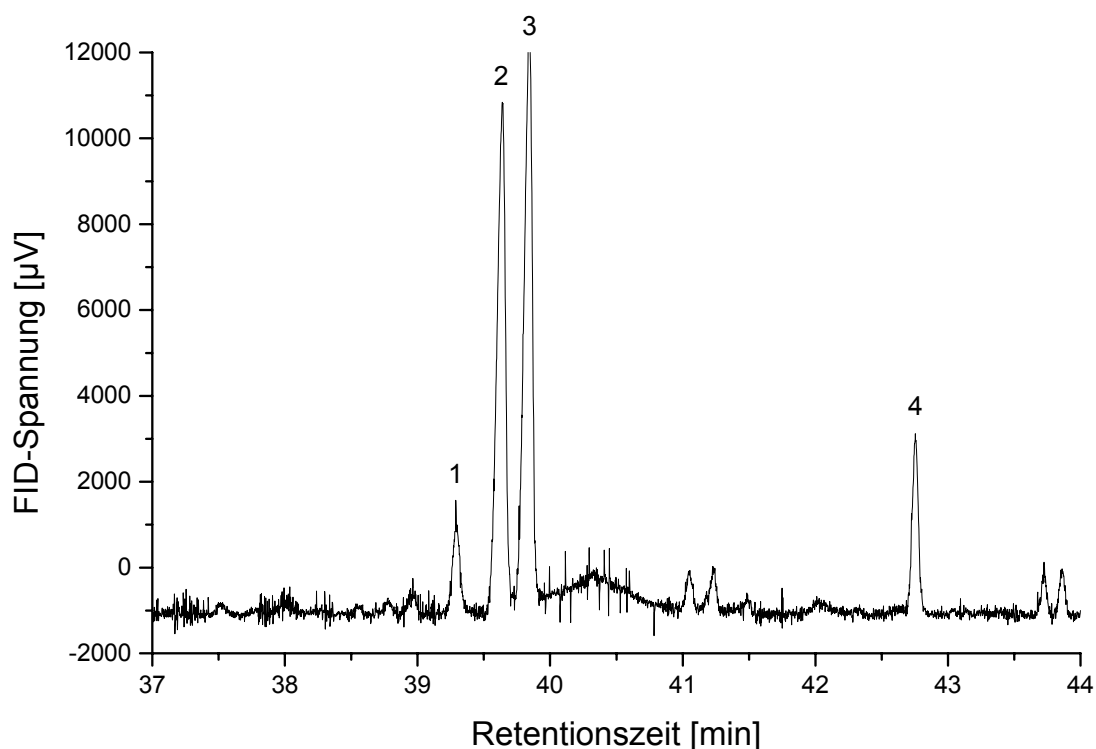


Abbildung 29: Ergebnis der GC-Analyse der Reaktionsprodukte unter Katalyse der Mutante F88V S189Q A330V. Der Anteil an 4-Octanol (Peak 1,  $R_t = 39,3$  min) beträgt 7%, der Anteil an 3-Octanol (Peak 2,  $R_t = 39,6$  min) 40%, der Anteil an 2-Octanol (Peak 3,  $R_t = 39,8$  min) 42% und der Anteil an 1-Octanol (Peak 4,  $R_t = 42,8$  min) 11%.

Unveröffentlichte Daten von Feenstra (Feenstra et al., 2002), die auf Computersimulationen des aktiven Zentrums basieren, deuten eine höhere Chance für eine termi-

nale Hydroxylierung bei Beibehaltung der Aminosäure Phenylalanin an der Position 88 an, weshalb per QuickChange PCR auch die Zweifachmutante CYP102A3 S189Q A330V erstellt wurde. Abbildung 30 zeigt die GC-Analyse der Produkte unter Katalyse dieser Zweifachmutante. Bei einer Kopplungsrate von 5% beträgt der Anteil von 1-Octanol an den Hydroxylierungsprodukten 48% und stellt damit das Hauptprodukt dar, wenn man von den ungekoppelten Nebenreaktionen absieht. Alle Daten wurden anhand von genau eingewogenen Standards erstellt, der 1-Octanol-Peak zusätzlich per GC/MS-Analyse eindeutig identifiziert.

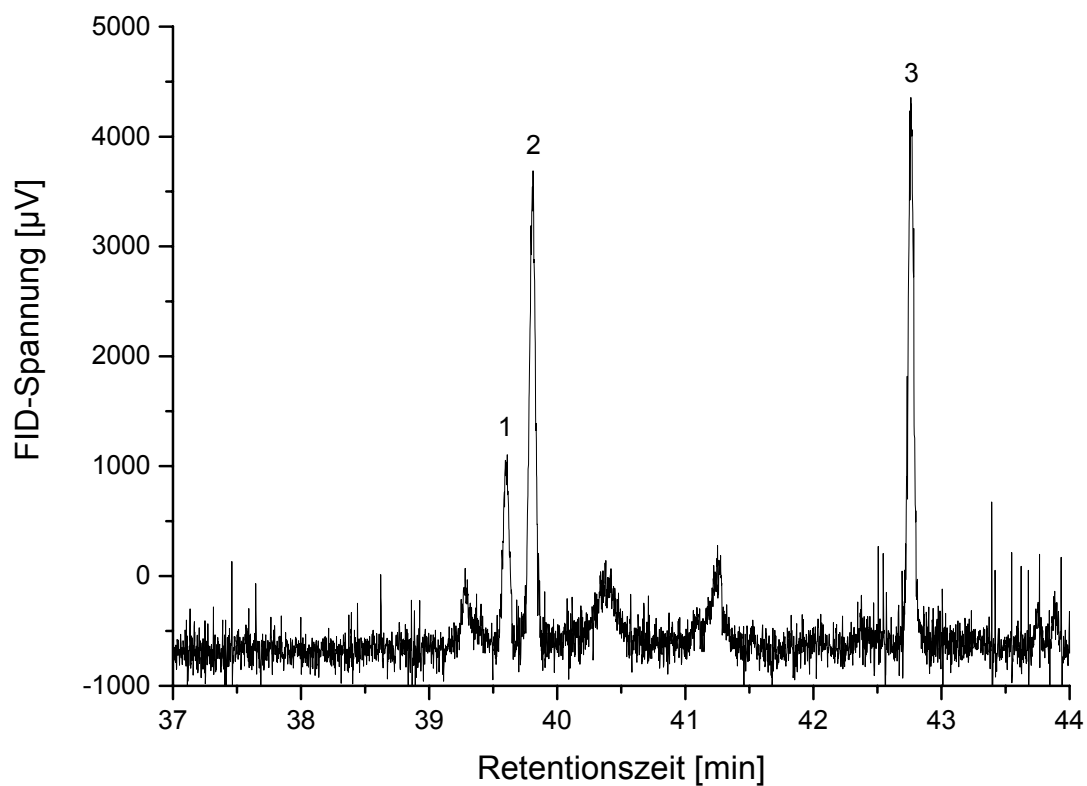


Abbildung 30: Ergebnis der GC-Analyse der Reaktionsprodukte unter Katalyse der Mutante S189Q A330V. Der Anteil an 3-Octanol (Peak 1,  $R_t = 39,6$  min) beträgt 16%, der Anteil an 2-Octanol (Peak 2,  $R_t = 39,8$  min) 36% und der Anteil an 1-Octanol (Peak 3,  $R_t = 42,8$  min) 48%.

## 4 Diskussion

Ziel war es zunächst, das Wissen über die P450-Familie CYP102 zu erweitern, indem nach CYP102A1 auch CYP102A2 und CYP102A3 aktiv in einem geeigneten Expressionssystem exprimiert und charakterisiert werden. Danach sollte das am besten geeignete der drei Enzyme als Biokatalysator für den gewünschten Modell-Herstellungprozess der terminalen Hydroxylierung von *n*-Octan zu 1-Octanol ausgewählt werden und wenn nötig, unzureichende Eigenschaften durch evolutive Methoden korrigiert werden. Die Verwendung der beiden anderen Enzyme der Familie bietet aufgrund ihrer Ähnlichkeit darüber hinaus die Möglichkeit, verbesserte Computermodelle zu erstellen, um über rationales Design zu verbesserten Varianten zu kommen. Außerdem besteht die Möglichkeit durch die hohe Sequenzhomologie über DNA-Shuffling weitere Enzymvarianten zu entwickeln.

### 4.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von CYP102A3

Für die Expression wurde ein pET-System gewählt, da Vorversuche mit pCYTEXP1 nur zu sehr geringen und für weitere Untersuchungen ungenügenden Expressionsraten führten. Mit dem IPTG-induzierbaren Vektor pET20b(+) lassen sich CYP102A3-Expressionsraten realisieren, die mit den CYP102A1-Werten bei temperatur-induzierter Expression in pCYTEXP1 vergleichbar sind oder höher liegen (im Schüttelkolben-Maßstab). Entscheidend für die aktive Expression ist ein nicht zu hoher Sauerstoffeintrag in das Wachstumsmedium nach der Expression, weshalb nur geringe Inkubator-Umdrehungsgeschwindigkeiten gewählt wurden. Im Laufe der Experimente zeigte sich der Nachteil des starken T7-Promotors des Expressionssystems, da nichtideale Expressionsbedingungen sofort zu ausschließlich inaktiv exprimiertem Enzym führten, erkennbar am CO-Differenzspektrum.

Ein weiteres Problem ist der unvollständige Einbau des Häm-Systems in das Enzymgerüst. Durch Zusatz von Häm-Vorstufen wie beispielsweise 5-Aminolävulinsäure kann dieser Mangel korrigiert, aber nicht vollständig behoben werden. In neuesten Arbeiten, in denen CYP102A2 und A3 mit Hilfe des pET21(+)-Vektors exprimiert

wurden, trat dieses Problem nur noch bei CYP102A2, nicht aber bei CYP102A3 auf. Eine Erklärung dafür wurde jedoch nicht gegeben (Gustafsson et al., 2004).

Weiterhin wurden verschiedene Ansätze getestet, um CYP102A3 auch im Mikrotiterplattenmaßstab zu exprimieren. Veröffentlichungen von Schwaneberg (Schwaneberg et al., 2001) und Tsotsou (Tsotsou et al., 2002) zeigen, dass CYP102A1 in Ansätzen mit 500 µl und 200 µl Medium aktiv exprimierbar ist. Die Expression von CYP102A3 gelang in dieser Arbeit in Ansätzen mit 750 µl, 500 µl und 200 µl Expressionsmedium, wobei höhere Volumina zu überproportional höherer Expression führen. Verschiedene Zellaufschlussmethoden wurden ebenfalls geprüft, wobei ein Lysozym-Aufschluss bei 37°C die besten Ergebnisse zeigte. Diese Methode hat vor allem den Vorteil, dass sich, wie bei Frier-Tau-Zyklen oft beobachtet, kein Temperaturgradient von den Rändern bis zur Mitte der Platte einstellt und zu unterschiedlich langen Auftauzeiten führt.

Für die Aufreinigung von CYP102A3 wurde eine Strategie verfolgt, die schon bei CYP102A1 erfolgreich war. Hier gelang mit Hilfe verschiedener Anionenaustauschermaterialien die Reinigung in einer Stufe mit großer Reinheit (Schwaneberg et al., 1999a). Mit Hilfe des Anionenaustauschermaterials DEAE 650M gelang es, mit CYP102A3 eine Reinheit von 65% zu erreichen. P450-Enzyme der Familie CYP102 blockieren wahrscheinlich aufgrund ihrer Größe (118 – 119 kDa) teilweise Bindungsstellen der Anionenaustauschermatrix und hindern andere Proteine dadurch an der Elution in der ersten Salzstufe. Größere Mengen an Chromatografiematerial können hier Abhilfe schaffen, führen aber zu einer noch stärkeren Verdünnung der Enzymlösung, die anschließend durch zeitraubende Aufkonzentration über Membranen wieder behoben werden muss. Als problematisch erweist sich die höhere Empfindlichkeit von CYP102A3 gegenüber Puffersalzen. Das zur Elution eingesetzte Natriumchlorid bewirkt in der notwendigen Konzentration eine irreversible Aktivitätsreduktion um 35%.

Insgesamt gesehen, konnte somit CYP102A3 in ein geeignetes Expressionssystem kloniert werden, dass neben der Expression in Schüttelkolben auch die aktive Expression in Mikrotiterplatten mit einem Volumen von nur 200 µl zulässt. Die Aufreinigungsexperimente als Voraussetzung für die Charakterisierung verliefen erfolgver-

sprechend, wenn auch nicht dieselben hohen Reinheiten wie bei CYP102A1 erreicht wurden.

## 4.2 Biochemische Charakterisierung von CYP102A3

Die Ermittlung von Substratspezifität, Regioselektivität, Temperatur-, Lösungsmittel-, Salz- und pH-Stabilität sowie vor allem die Enzymaktivität unter den gewählten Bedingungen sind von entscheidender Bedeutung für den Einsatz eines Enzyms als Biokatalysator in einem Herstellungsprozess. Diese Eigenschaften sind durch verschiedene evolutive Methoden nur bis zu einem gewissen Grad anpassungsfähig, deshalb sollte die Grundtendenz der Fähigkeiten des Enzyms bereits in die für den Prozess erforderliche Richtung weisen.

Um die Eigenschaften der Enzyme zu vergleichen, wurden Aktivitätsraten ermittelt (eine Ausnahme stellen die *p*NCA-Substrate dar, bei denen die katalytische Effizienz auf Basis der  $k_{\text{cat}}$ - und  $K_{\text{M}}$ -Werte ermittelt wurde). Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den ermittelten Aktivitätsraten, die aus der Initialsteigung der NADPH-Verbrauchskurven ermittelt wurden, nicht um  $k_{\text{cat}}$ -Werte handelt. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert kann durch Variation der Substratkonzentration in mehreren aufeinander folgenden Messungen mit Hilfe eines Lineweaver-Burke-Plots bestimmt werden und gibt als sogenannte Wechselzahl die pro Zeiteinheit maximal umsetzbare Anzahl an Substratmolekülen pro Enzymmolekül an. Sie ist ein theoretischer Wert, denn die messbare Reaktionsgeschwindigkeit, die hier als Aktivitätsrate bezeichnet wird, hängt nach der Michaelis-Menten-Gleichung außer von  $k_{\text{cat}}$  auch vom Verhältnis der Substrat-Konzentration zum  $K_{\text{M}}$ -Wert ab. Je höher  $K_{\text{M}}$  im Vergleich zur Substratkonzentration ist, desto niedriger ist die messbare Aktivitätsrate. Werden die Messungen der Aktivitätsrate aber immer unter den gleichen Bedingungen hinsichtlich Substratkonzentration, Pufferzusammensetzung und pH-Wert durchgeführt, so erhält man einen ersten Eindruck, wie effektiv Substrate überhaupt hydroxyliert werden können.

Bezogen auf Temperatur- und pH-Stabilität existieren nur geringfügige Unterschiede zwischen CYP102A1 und CYP102A3. Die bei CYP102A1 beobachtbare Aktivitätssteigerung um 60% nach einer halbstündigen Inkubation bei 36°C konnte bei



CYP102A3 nicht nachgewiesen werden. CYP102A3 zeigt dafür eine bessere Langzeitstabilität, wenn die Aktivität über einen Zeitraum von sieben Tagen verglichen wird. Einen signifikanten Unterschied stellt auch die verminderte Stabilität von CYP102A3 in salzhaltigen Lösungen dar. Während beispielsweise CYP102A1 selbst bei einer NaCl-Konzentration von 400 mM noch 80% seiner Aktivität zeigt, fällt sie bei CYP102A3 schon bei NaCl-Konzentrationen oberhalb von 150 mM unter dieses Niveau. Der größte Unterschied tritt in der Stabilität gegenüber Lösungsvermittlern auf. Es konnte gezeigt werden, dass CYP102A3 selbst bei einem DMSO-Anteil von 25% in der Reaktionsmischung noch seine ursprüngliche Aktivität besitzt. Die Restaktivität von CYP102A1 dagegen fällt bereits bei 10 Volumenprozent DMSO auf nur noch 11%. Die Möglichkeit, mit Hilfe eines hohen Anteils an Lösungsvermittler auch hohe Substratkonzentrationen in der Reaktionsmischung zu realisieren, stellt vor allem in Hinblick auf den Modell-Herstellungprozess eine sehr interessante Eigenschaft dar. Eine bei CYP102A1 beobachtbare Aktivitätssteigerung durch Zusatz von 2 Volumenprozent Aceton gelingt bei CYP102A3 nur durch Zusatz von DMSO. Der Grund für diesen Unterschied ist derzeit nicht bekannt. Möglicherweise führt das DMSO bei CYP102A3 zu einer verringerten Aggregation der Proteinmoleküle, so dass alle Zugänge zu aktiven Zentren frei liegen.

Die Substratspezifität von CYP102A3 ist derjenigen von CYP102A1 sehr ähnlich. Bei CYP102A3 ist gegen Substrate mit kurzer Kohlenstoffkette wie 8-*p*NCA oder Decansäure eine geringe Aktivität erkennbar, die bei CYP102A1 nicht vorhanden ist. Beide Enzyme sind wenig regioselektiv. Während CYP102A1 Dodekansäure an  $\omega$ -3,  $\omega$ -2 und  $\omega$ -1-Position fast gleich häufig hydroxyliert, zeigt CYP102A3 zumindest eine deutliche Präferenz für die  $\omega$ -3-Position.

Aufgrund der Tatsache, dass CYP102A3 eine höhere Präferenz für Substrate kürzerer Kettenlänge als CYP102A1 hat und weil es gegenüber hohen Mengen des Lösungsvermittlers DMSO eine sehr viel bessere Stabilität zeigt, wurde CYP102A3 als Biokatalysator für die Modellreaktion, die Hydroxylierung von *n*-Octan zu 1-Octanol, ausgewählt und anschließend mit evolutiven Methoden weiter verbessert.

### 4.3 Entwicklung des *p*NA- und des ADH-Assays

Zunächst wurde auf der Basis des bekannten *p*NCA-Assays der *p*NA-Assay entwickelt. Die Synthese der Substanzen gelang nach dem Prinzip der Williamson-Ethersynthese mit zufriedenstellenden Ausbeuten. Erste Tests zeigten auch Aktivität bei Einsatz des CYP102A3-Wildtyps. Die Gründe, von diesem Assay Abstand zu nehmen, wurden bereits in Abschnitt 3.5.1 dargelegt. Derselbe Assay wurde parallel von anderen Arbeitsgruppen entwickelt und entweder allein (als "8-*p*npane assay" bezeichnet, Farinas et al., 2001b) oder in Kombination mit einem NADPH-abhängigen Assay (Glieder et al., 2002) zum Hochdurchsatz-Screening mehrerer Generationen von *error prone*- und *shuffling*-Mutanten verwendet. Es konnte jedoch keine einzige Mutante gefunden werden, die in der Lage ist eine Hydroxylierung von *n*-Octan zu 1-Octanol zu katalysieren. Durch diese Publikationen wurde im nachhinein die getroffene Entscheidung zur Ablehnung des *p*NA-Assays und zur Entwicklung eines neuen Assays bestätigt.

Der ADH-Assay basiert auf der Kaskade zweier Enzyme. Da sich primäre und sekundäre Alkohole, im Gegensatz zu den Oxidationsprodukten Aldehyd und Keton, nicht durch photometrische Methoden unterscheiden lassen, übernimmt ein zweites Enzym diese Aufgabe. Auf die Möglichkeit eines gekoppelten Assays, d.h. die Verwendung der NADPH-abhängigen Monooxygenase mit einer NADP<sup>+</sup>-abhängigen Alkoholdehydrogenase, die dann wieder NADPH für die Weiterführung der Hydroxylierung zur Verfügung stellt (Cofaktor-Recycling), und einem anschließenden Farbnachweis des Aldehyds musste trotz der Eleganz dieser Methode aus zwei Gründen verzichtet werden. Zum ersten scheiterte die Idee an einer NADP<sup>+</sup>-abhängigen ADH, die die Oxidation primärer Alkohole in ausreichendem Maße bzw. in ausreichender Geschwindigkeit katalysiert. Kommerziell erhältliche, NADP<sup>+</sup>-abhängige ADHs, wie TBADH aus *Thermoanaerobium brockii* sind meist spezifisch für sekundäre Alkohole. Zwei ADHs aus *Archaeoglobus fulgidus* und *Rhodococcus rhodochrous*, die spezifisch für primäre Alkohole sind und exprimiert wurden, benötigen unterschiedliche Reaktionsbedingungen wie P450 CYP102A3 oder sind nicht aktiv genug, um in einem gekoppelten System verwendet zu werden. Zum zweiten basieren die Farbreaktionen zum spezifischen Nachweis von Aldehyden auf pH-Werten niedriger (Schiffs Reagenz, Nachweis mit Fuchsin-schwefliger Säure) oder hoher (Tollens-Reagenz,

Fehling-Reaktion) Größenordnung, so dass die enzymatischen Reaktionen durch Enzymdenaturierung zum Erliegen kommen. Die Durchführung der Nachweisreaktion erst nach dem Ende der Biotransformation ist jedoch nicht möglich, da der nach der Oxidation entstandene Aldehyd aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden muss, was nur per Nachweisreaktion sinnvoll geschehen kann.

Aus diesem Grunde wurden Hydroxylierungs- und Assayreaktion getrennt nacheinander ausgeführt. Dies hat den Vorteil, die günstige und für primäre Alkohole sehr spezifische Hefe-ADH nutzen zu können. Auf eine spezielle Nachweisreaktion konnte ebenfalls verzichtet werden, weil die spektroskopische Messung des Anstiegs des ADH-Cofaktors NADH für das Screening vollkommen ausreichend ist. Diese Möglichkeit bestände in einem gekoppelten System nicht; dafür steigen bei der gewählten Lösung aufgrund des fehlenden Cofaktor-Recyclings die Kosten, weil stöchiometrische Mengen an NADPH für die Hydroxylierung im ersten Schritt benötigt werden. Da die Hydroxylierung bis zu fünf Stunden dauern kann, konnten keine Verlaufs- sondern nur Endpunktkinetiken zur Messung des NADPH-Verbrauchs aufgenommen werden. Andernfalls wäre eine Verschachtelung der robotergesteuerten Arbeitsgänge nicht möglich gewesen und die Zahl der pro Tag messbaren Mikrotiterplatten hätte sich auf ein Zehntel reduziert. Insgesamt können in der jetzigen Version in 24 Stunden fast 4000 Mutanten aufgeschlossen und vermessen werden.

Auf die Variabilität des Assays wurde bereits hingewiesen (s. Abschnitt 3.5.2). So ist es praktisch möglich, auch auf alle anderen Alkane zu testen, nachdem eine entsprechende Validierung der Reaktionsgeschwindigkeiten der ADH gegenüber den primären und sekundären Alkoholen erfolgt ist. Darüber hinaus kann die Hefe-ADH auch weitere Substrate wie z.B. hydroxylierte Fettsäuren umsetzen, so dass auch ein Screening durchgeführt werden kann, um P450-Varianten zu finden, die Fettsäuren terminal hydroxylieren.

Durch die effektive Durchführung des Screenings konnten noch weitere Erkenntnisse für die Verbesserung des Assays gewonnen werden. Die nach einer Hydroxylierungsdauer von fünf bis sechs Stunden mit dem ADH-Assay für die Ausgangsmutante bestimmten Werte zwischen 0,131 und 0,205 sind für eine ausschließlich sekundären Alkohol produzierende Mutante hoch; insbesondere da bei der Evaluation

bei einer mehr als doppelt so hohen 2-Octanolkonzentration (500  $\mu\text{M}$  gegenüber 213  $\mu\text{M}$  in der Mikrotiterplatte) nur ein Wert von 0,297 gemessen wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass bei Reaktionszeiten über vier Stunden die zuvor beschriebene Nebenreaktion (s. Abschnitt 3.5.3) bereits einsetzt und dadurch zu hohe Werte gemessen wurden. Die positiv getestete Mutante 91F9 entstammt dagegen einer Platte mit einer Hydroxylierungsdauer von nur vier Stunden, was somit für weitere Screening-Tests die zeitliche Obergrenze darstellen sollte. Die Standardabweichung der ADH-Assay-Messwerte für die Ausgangsmutante nach vierstündiger Hydroxylierung beträgt 0,017 Absorptionseinheiten. Bei einer vollständigen Umsetzung des Substrats *n*-Octan können somit noch Anteile von 4% 1-Octanol in einer Produktmischung aus primären und sekundären Alkoholen identifiziert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, ein hochdurchsatzfähiges Testsystem im Mikrotiterplattenformat zu entwickeln, das es erlaubt terminal hydroxylierende von subterminal hydroxylierenden Enzymvarianten zu unterscheiden. Das System ist aufgrund seiner Flexibilität auch für andere Substrate als *n*-Octan, insbesondere Alkane unterschiedlicher Kettenlänge verwendbar.

#### 4.4 Evolutive Veränderung von P450 CYP102A3

Mit der gezielten Einführung der Mutationen F88V und S189Q ließ sich die erhoffte Erweiterung der Substratspezifität, wie bereits bei CYP102A1 beobachtet, auch bei CYP102A3 erreichen. Die Tatsache, dass die jeweiligen Einzelmutanten CYP102A3 F88V und CYP102A3 S189Q kaum Unterschiede zur Substratspezifität des Wildtyp-Enzyms zeigen lässt den Schluss zu, dass die Vergrößerung des aktiven Zentrums, hervorgerufen durch die Kombination beider Mutationen, ursächlich für die Erweiterung des Substratspektrums ist. Der vergrößerte Raum im Substrateingangskanal und nahe am Häm-Zentrum erlaubt nicht nur die Aufnahme großer Substrate wie z.B. Naphtalin, sondern auch erweiterte Konformationsmöglichkeiten der Substrate. So wird die Caprinsäure außer an den bekannten Positionen  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3, sondern auch an der  $\omega$ -4 und zu einem ganz geringen Teil an der  $\omega$ -Position hydroxyliert. Das vergrößerte aktive Zentrum bewirkt jedoch gerade bei kleinen Substraten wie Octan auch eine geringere Kopplungsrate. Während die Aktivitätsrate von CYP102A3 F88V

S189Q gegenüber Octan und Laurinsäure fast identisch ist, liegt die Umsatzrate mit 49% weit unter derjenigen von Laurinsäure mit 82%.

Das Substrat *n*-Octan zeigte nach der Reaktion unter Katalyse der Doppelmutante CYP102A3 F88V S189Q ausschließlich an den Positionen  $\omega$ -3 und  $\omega$ -2 eine Hydroxylierung. Diese Produktverteilung erscheint ungewöhnlich, da bei CYP102A1 auch Hydroxylierungen an der  $\omega$ -1-Position auftreten. Die Bildung von 1-Octanol konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise spielen die während des „Rebound“-Mechanismus gebildeten Kohlenstoff-Radikale eine Rolle. Sekundäre Radikale sind stabiler als primäre, dies gilt ebenso für Bio-Hydroxylierungsreaktionen (Faber, 2000). Da aufgrund der Größe des aktiven Zentrums jede Position des Substrats für eine Hydroxylierung in der richtigen Distanz zum Häm-Zentrum liegt, sind Reaktionen mit den stabileren Radikalen bevorzugt.

Die mit dem ADH-Assay getesteten, aktiven *ep*-Mutanten wiesen bis auf einige Ausnahmen schlechtere Aktivitätsraten gegenüber *n*-Octan auf als die Ausgangsmutante, wobei auch die von Vertiefung zu Vertiefung etwas unterschiedlichen Zellwachstumsraten eine Rolle spielen. Erkennbar war dies daran, dass trotz langer Reaktionsdauer nicht sämtliches NADPH verbraucht wurde. Besonders interessant sind solche Mutanten dann, wenn sie trotz dieser geringeren Aktivitätsraten ein ähnlich hohes oder noch höheres NADH-Niveau in der Assayreaktion erreichen. Dies bedeutet nämlich, dass ein umso größerer Anteil des Produkts aus 1-Octanol bestehen muss. Allerdings konnte nur bei zwei der sechs ausgewählten Mutanten unter weiter reduziertem Sauerstoffeintrag überhaupt eine aktive Expression bewerkstelligt werden. Diese Problematik tritt bei *ep*-Mutanten von P450-Monooxygenasen häufig auf. Mutanten mit höherer Aktivität bewirken gleichzeitig eine höhere Toxizität für die exprimierenden Zellen (Glieder et al., 2002; möglicherweise durch Lipidhydroxylierung). Die daraus resultierende Inaktivierung bzw. fehlerhafte Faltung des P450-Enzyms war anhand der CO-Differenzspektroskopie erkennbar. Um dieses Problem zu umgehen, wurden auf Basis der Mutation A330V zwei neue Mutanten per Quick-Change-PCR erzeugt. Obwohl die Mutante CYP102A3 S189Q A330V nur zwei Mutationen trägt, beträgt der Anteil an 1-Octanol an den Reaktionsprodukten 48% und damit fast das Fünffache wie bei der von Peters erzeugten Mutante CYP102A1 9-10A-A328V (Peters et al., 2003). Die Kopplungsraten beider Mutanten sind mit 5

bzw. 4% ähnlich schlecht. Ein Grund stellt möglicherweise die Verengung des Raumes über dem Häm durch die Mutation A330V dar. A330 befindet sich, wie aus Abbildung 31 ersichtlich, direkt neben der Häm-Gruppe. Der Zugang zum Häm wird dadurch erschwert, so dass sich das Substrat *n*-Octan lange im Substrateingangskanal aufhält und in dieser Zeit die ungekoppelten Nebenreaktionen ablaufen. Gleichzeitig trägt diese Raumverengung des aktiven Zentrums dazu bei, dass überhaupt 1-Octanol gebildet werden kann. Das Substrat ist lange genug in einer Entfernung zum Häm fixiert, in der nur am Ende der Kohlenstoffkette hydroxyliert werden kann.

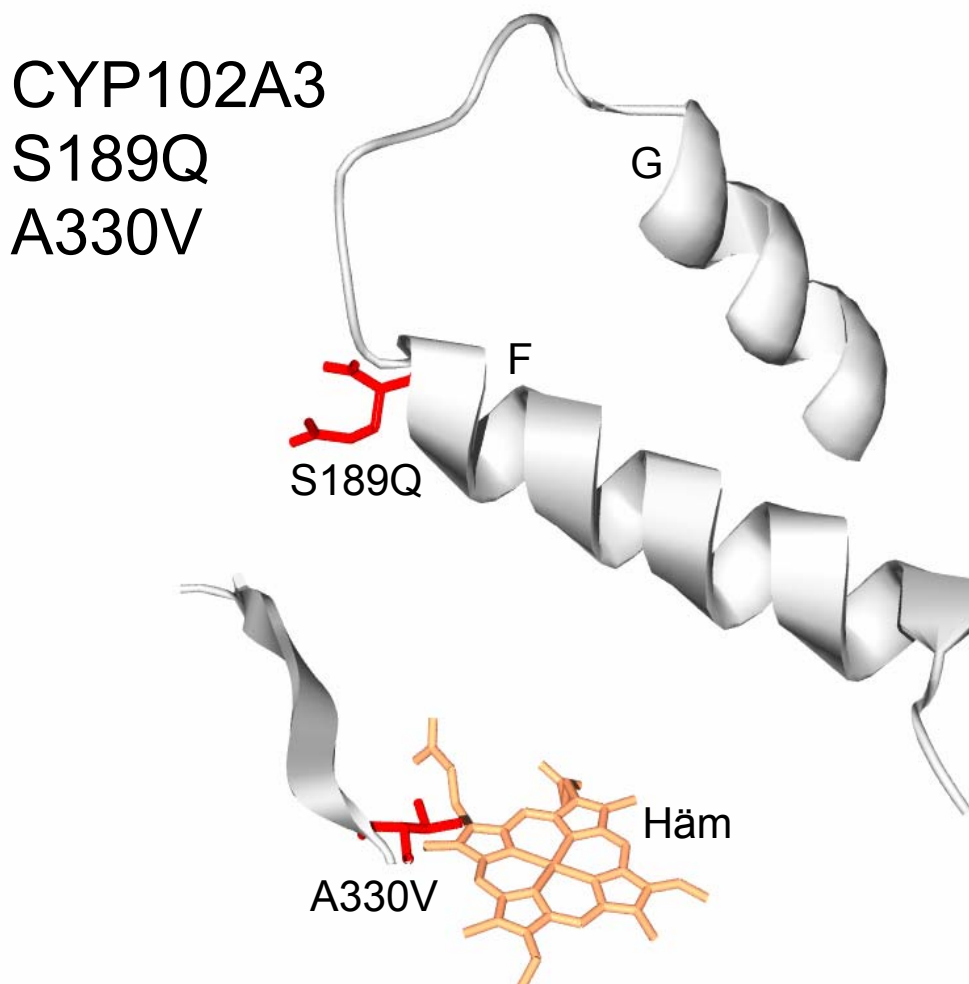


Abbildung 31: Aktives Zentrum der Monooxygenase CYP102A3 mit den Mutationen S189Q A330V. Man erkennt den verringerten Raum in der Nähe des Häms. Durch die veränderte räumliche Anordnung wird das Substrat so fixiert, dass hauptsächlich die  $\omega$ -Position für eine Hydroxylierung in der richtigen Entfernung zum Häm liegt.

Wird der Raum über dem Häm noch weiter verengt, wie in der Doppelmutante CYP102A3 S189Q A330V durch Rückmutierung und Wiedereinführung des räumlich anspruchsvollen Phenylalanins an der Position 88, steigt der Anteil an nachweisbarem 1-Octanol noch einmal beträchtlich, während die Kopplungsrate weiter von 7% auf 5% zurückgeht. Fraglich ist, ob durch Mutationen an anderen Positionen ein schnellerer Zugang durch den Substrateingangskanal möglich wird und damit die Kopplung verbessert werden kann oder ob die für die  $\omega$ -Hydroxylierung unverzichtbare Mutation A330V auch ursächlich für die schlechte Kopplungsrate ist.

Mit Hilfe des entwickelten Hochdurchsatzassay ist es abschließend gelungen, mit einer selbst erzeugten Mutantenbibliothek Enzymvarianten mit der gewünschten Eigenschaft zur terminalen Hydroxylierung von *n*-Octan, zu identifizieren. Mit den Sequenzinformationen, die aus diesen Mutanten gewonnen wurden, war es möglich eine stabile Enzymvariante zu erzeugen, deren Hauptprodukt 1-Octanol ist. Die äußerst geringe Kopplungsrate dieser Mutante verhindert jedoch bislang noch den Einsatz zur Biokatalyse. Mögliche Auswege sind die Erhöhung der Substratkonzentration in der Reaktionslösung oder die Einführung weiterer Mutationen, um so höhere Kopplungsraten zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung eines Cofaktor-Recyclingsystems dar, dass bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts betrieben werden kann, ohne zu hohe NADPH-Verbrauchskosten zu verursachen.

## 4.5 Ausblick

Die Cytochrom P450-Familie CYP102 stellt sich insgesamt gesehen als eine Gruppe von sehr weitläufig zu verändernden Biokatalysatoren dar. Die mit Hilfe von gerichteter Evolution, rationalem Design und DNA-shuffling erstellten Varianten zeigen eine Vielzahl veränderter und verbesserter Eigenschaften, wie z.B. verbesserte Stabilität gegenüber  $H_2O_2$  in der Fettsäurehydroxylierung (Cirino/Arnold, 2002; Cirino/Arnold, 2003), Erweiterung der Spezifität auf nicht-natürliche Substrate (Appel et al., 2001; Li et al., 2001), Verbesserung der Aktivität in organischen Lösungsmitteln (Wong et al., 2004) und erhöhte Thermostabilität (Salazar et al., 2003). Die Fokussierung der Regioselektivität auf bestimmte Positionen, die Verbesserung der Enantioselektivität (Peters et al., 2003) sowie die hier vorgestellte Veränderung der Regioselektivität

zeigen die funktionelle Flexibilität der Enzyme der P450-Familie CYP102 auf. Insgesamt gesehen stellen sie damit eine sehr interessante Quelle für industriell nutzbare Biokatalysatoren dar. Probleme, die einer großtechnischen Anwendung noch entgegenstehen, liegen im Bereich der Langzeitstabilität und der Cofaktorregenerierung bzw. im Ersatz des Cofaktors mit Hilfe elektrochemischer Methoden. In diesen Bereichen sollten in Zukunft weitere Anstrengungen unternommen werden, um das große Potential dieser interessanten Enzymklasse zur Synthese chemischer Verbindungen weiter zu erschließen.



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, sind die jeweiligen Hersteller bzw. Vertriebsniederlassungen in Deutschland ansässig. Neben den hier aufgeführten Arbeitsmitteln und Geräten wurden gängige Laborgegenstände (Glasgeräte, Pipetten, Magnetrührer usw.) verwendet.

#### 5.1.1 Biotransformation und chemische Synthesen

Dünnschichtchromatographie	HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (Merck, Darmstadt)
Elementaranalyse	Durchgeführt als Auftragsanalysen bei der maßanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart
Gaschromatographie	HRGC 8000 Series mit Detektor FID EL 980 und Chrom-Card für Windows 1.21 (Carlo Erba, Mailand, Italien)
GC-Trennsäule	Optima 5 (25 m x 0,25 mm; Filmdicke 0,25 µm; Macherey & Nagel, Düren), ZB-1 (60 m x 0,32 mm; Filmdicke 1 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Küvetten	1 ml-Plastikküvetten (Greiner, Frickenhausen), 1 ml-Glasküvetten (Hellma Optik, Jena)

NMR-Spektroskopie ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ )	ARX 500 (Bruker, Karlsruhe) mit 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) bzw. 126 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) Nominalfrequenz.  Durchgeführt als Auftragsanalysen bei der maßanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart
pH-Meter	Digital pH-Meter 525 (WTW, Weilheim), pH-Meter 620 (Metrohm, Herisau, Schweiz)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134 , Wasserbad B-480 und Vacuum System B-172 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Thermomixer	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg), Schutron Thermoshaker (Neolab, Heidelberg)
Waagen	MC1 Research RC210D (Sartorius, Göttingen), HF2000G (A&D Engineering, Milpitas, USA)

### 5.1.2 Mikrobiologie, Molekulargenetik und Proteinaufreinigung

Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell, Mini DNA Sub Cell (BioRad, München), Video Copy Processor P66E (Mitsubishi, Cambridge, Großbritannien), BWM9X Monitor (Javelin Electronics, Schaumburg, USA), UV-Leuchttisch (MWG-Biotech, Ebersberg)
---------------------------	---

## Material und Methoden

---

Autoklav	PACS 2000 (Getinge AB, Schweden)
Brutschränke	WTE (Binder, Tuttlingen), UM500 (Mermert, Schwabach)
Dialyse	Spectra/Por-Dialyseschläuche (Spectrum Medical Industries), PD10-Chromatographiesäulen (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
DNA-Sequenzierung	ABI Prism 377 DNA Sequencer mit Auswertungssoftware ABI Prism 377 Version 3.2 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)
Inkubatoren	Mutitron HT Schüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz)
Mikrotiterplatten	Flachbodenmikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Greiner, Frickenhausen), Deep Well-Mikrotiterplatten (2 ml, Ritter GmbH, Schwabmünchen) mit AirPore Tape sheets (Qiagen, Hilden)
PCR-Geräte	Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Photometer	Für Küvetten (1 cm): UV/VIS-Spektrometer Ultrospec3000 und BioChrom4060 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)  Für Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen): FLUOstar (BMG LabTechnologies, Offen-

	burg), Spectramax 340PC (Molecular Devices, Ismaning)
	Zur Bestimmung der DNA-Konzentration: BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) inkl. UVette-Küvetten 220-1600 nm
Pick-Roboter	BioPick (BioRobotics, Cambridge, Großbritannien), QPix (Genetix, New Milton, Großbritannien)
Proteinaufreinigung	Äkta Explorer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), 0,22 µm Sterivex-GP filter (Milipore, Eschborn)
SDS-PAGE	Minigel-Twin G42 (Biometra, Göttingen), Model 583 Gel Dryer (Biorad Laboratories, München), Wipptisch ROCKY (Labortechnik Fröbel, Lindau)
SpeedVac	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA)
Vortexer	VF2 (IKA Labortechnik, Staufen), IKA Minishaker MS1 (IKA Labortechnik, Staufen)
Zentrifugen	Centrifuge 5416, 5417C, 5417R und 5810R mit Einsätzen für Kunststoffgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; 15 ml; 50 ml) und Mikrotiterplatten (Eppendorf, Hamburg), Sorvall RC-5B und RC-5C Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont Instru-

ments, Leipzig) mit Rotoren SLA3000, SA600 und SS34

### 5.1.3 Chemikalien und Enzyme

BioRad Laboratories (München)	SDS-PAGE Standard (Broad Range), 1kB-DNA-Längen-standard
DIFCO-Laboratories (Detroit, USA)	Trypton, Hefeextrakt
Eppendorf (Hamburg)	DNA- <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl) incl. 10x <i>Taq</i> -Puffer und MgCl <sub>2</sub> -Lösung
Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)	Aceton, ADH (EC1.1.1.1) aus Hefe (300 U/mg), Agar, Caprylsäure, Coomassie Brilliant Blue R-250, Dextran Blau, Dichlormethan, Dioxan, DMSO, Ethanol, Ethidiumbromid-Lösung (1% in Wasser), Glycerol, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz., HCl konz., Hefe-Extrakt, KCl, Lysozym (aus Hühner-eiweiss), MSHFBA, NaCl, NaOH, NaOAc, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Natriumpyrophosphat, p-Nitrophenol, <i>n</i> -Octan, 1-Octanol, 2-Octanol, 3-Octanol, SDS, Semicarbazidhydrochlorid, Tetrahydrofuran, Triethylamin
Gibco BRL (Eggenstein)	dNTPs, Agarose
Henkel KGaA (Düsseldorf)	Caprinsäure, Laurinsäure
Life Technologies GmbH (Karlsruhe)	10xTBE-Puffer

MBI Fermentas (St. Leon-Roth)	Restriktionsendonukleasen, T4 DNA-Ligase inkl. 10xPuffer
Perkin Elmer (Weiterstadt)	BigDye Terminator Ready Reaction Kit für DNA-Sequenzierung
Pierce (St. Augustin)	BCA-Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration
Qiagen GmbH (Hilden)	QIAprep spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen Plasmid Midi Kit
Roth GmbH (Karlsruhe)	Ampicillin, Rotiphorese NF-10xTBE-Puffer, Rotiphorese NF-Harnstoff, Rotiphorese NF-Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40%, Acrylamid-Lösung für SDS-PAGE, Phenol / Chloroform - Lösung, Trypton, Hefeextrakt
Riedel-de-Haen (Seelze)	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Serva Feinbiochemika GmbH (Heidelberg)	Agarose
Sigma-ARK GmbH (Darmstadt)	DNA-Oligonukleotide
Sigma Aldrich (Deisenhofen)	10-Hydroxycaprinsäure, 12-Hydroxylaurinsäure
TosoHaas GmbH (Stuttgart)	Anionenaustauscher: SuperQ 650M, DEAE 650M

## 5.2 Verwendete Mikroorganismen und Plasmide

Der *B. subtilis*-Stamm 168 wurde von der DSMZ erhalten und zur Isolierung der genomischen DNA verwendet, die als Matrize für die PCR-Amplifikation diente. Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (*supE44*, *lacU169* (80*lacZ* M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) wurde bei Clontech (Heidelberg) erworben und für Klonierungsarbeiten verwendet. Der Stamm BL21(DE3) ( $F^-$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal* *dcm* (DE3)) wurde bei Novagen (Bad Soden) erworben und für die Proteinexpression eingesetzt. Als Vektor fand pET20b(+) mit dem durch IPTG induzierbaren T7-Promotor Verwendung. Die im Rahmen dieser Arbeit zur heterologen Expression von P450 CYP102A2 und CYP102A3 verwendeten Plasmide sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Plasmid	Selektionsmarker	Eingeführte Mutationen
pET20b-ynfJ		Wildtyp
pET20b-yrhJ		Wildtyp
pET20b-yrhJ-F88V	Ampicillin-Resistenz	S189Q
pET20b-yrhJ-F88V S189Q		F88V S189Q
pET20b-yrhJ-S189Q A330V		S189Q A330V
pET20b-yrhJ-F88V S189Q A330V		F88V S189Q A330V

Tabelle 11: Verwendete Plasmide

## 5.3 Synthetische Oligonukleotide

### 5.3.1 Primer für Amplifizierungsreaktionen

ynfJF	5'-GCATCCATGGCCATGAAACAGGCAAGCGCAATAC-3'
yrhJR	5'-GCATGCCGCGGCCGCCATTCTGTCCAAACGTC-3'
ynfJF	5'-GCGGATCCCATGAAGGAAACAAGCCCGATTCTC-3'
ynfJR	5'-GCCTCGAGTATCCCTGCCAGACATCCTTAGCG-3'

### 5.3.2 Primer für die Sequenzierung

T7-Promoter	5'-TTAATACGACTCACTATAGG-3'
yrhJ 1	5'-CTATCATTCTATGATGCTG-3'
yrhJ 2	5'-CTTACACATCCGGAAAAAC-3'
yrhJ 3	5'-CTGTGAAACCGCGAAAAAC-3'
yrhJ 4	5'-GCGAGTCTTGGGAAAACC-3'
yrhJ 5	5'-GCTGGAACAGCTCGTTTC-3'
yrhJ 6	5'-GAGAAGAGCTGGATCAAG-3'
yetO 1	5'-GAGAAAATGGTCGATATC-3'
yetO 2	5'-GAAGCATCCTGACAACTG-3'
yetO 3	5'-CAAAGCCGTCATCAGGAAG-3'
yetO 4	5'-GATTTTGAAGGGCAGCTTG-3'
yetO 5	5'-GCGCGAATTAGAAGAACTG-3'
yetO 6	5'-CGATCGGGATTTTATTTAC-3'

### 5.3.3 Primer für die QuickChange-PCR

F88V For	5'-GGGGGAGATGGCTTAGTTACAAGCTGGACGCACG-3'
F88V Rev	5'-CGTGCGTCCAGCTTGTAAGCCATCTCCCCC-3'
S189Q For	5'-GGCGATGAATCAACAAAAAAGACTGGGCCTGC-3'
S189Q Rev	5'-GCAGGCCAGTCTTTTTTGTGATTCATCGCC-3'
A330V For	5'-CAGACTGTATCCAACAGTTCCGGCTTTTTTCTC-3'
A330V Rev	5'-GAGAAAAAGCCGGAAGTGTGGATACAGTCTG-3'

## 5.4 Lösungen, Medien und Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, können alle Medien, Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur gelagert werden.



### 5.4.1 Kulturmedien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien 30 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 15 g/l Agar versetzt. Das zur Selektion benötigte Ampicillin wurde nach Abkühlen der Nährlösungen auf ca. 45°C zugegeben, bei Flüssigkulturen erst kurz vor der eigentlichen Anzucht (Endkonzentration 100 µg/ml). Die Glucose wird als 20%ige Lösung separat autoklaviert und direkt vor der Inokulation zugegeben.

<i>B. subtilis</i> -Medium:	Bacto-Pepton	3 g
	Fleischextrakt	5 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
LB-Medium (low salt):	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
	pH-Wert	7,5
LB-MTP-Medium:	LB-Medium	
	Thiamin-Lösung	0,5 µl/ml
	Spurenelemente-Lösung	0,25 µl/ml
LB-Glucose-Medium:	LB-Medium	
	Glucose	1% (v/v)
LB-DMSO-Glucose-Medium:	LB-Medium	
	DMSO	5% (v/v)
	Glucose	1% (v/v)

### 5.4.2 Lösungen für die Kultivierung und Expression

Thiamin-Lösung: (Lagerung im Dunkeln bei 6°C)	Thiamin-hydrochlorid	1% (m/v)
IPTG-Lösung I: (Lagerung bei -20°C)	IPTG	1 M
IPTG-Lösung II: (Lagerung bei -20°C)	IPTG	10 mM
5-ALA-Lösung: (Lagerung bei -20°C)	5-Aminolävulinsäure	20 mM
Spurenelemente-Lösung:	MgCl <sub>2</sub>	0,5 g
	FeCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	30 g
	ZnCl <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1,0 g
	CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
	NaMoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	1,0 g
	CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,5 g
	CuCl <sub>2</sub>	1,0 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,2 g

Die Salze werden in 1 Liter 10%-HCl gelöst.

### 5.4.3 Puffer und Lösungen für Mini-Plasmid-Präparation (Schnelltest)

Resuspendierungspuffer: (Lsg.I)	Tris-HCl; pH 7,5	100 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse I	400 µg/ml
Lysispuffer: (Lsg.II)	NaOH	1 M
	SDS	5,3%(m/v)

Neutralisationspuffer:	MgCl <sub>2</sub>	3 M
(Lsg.III)	NaOAc	5 M

Lsg. I wird autoklaviert, die RNase erst direkt vor der Benutzung zugegeben.

### 5.4.4 Puffer und Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x):	Tris	242 g
	Eisessig (99,8 %)	57 ml
	0,5 M EDTA; pH 8,0	100 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

6x-DNA-Probenpuffer:	Glycerin	30%(m/v)
	Bromphenolblau	0,2%(m/v)
	EDTA; pH 7,5	25 mM

Agarose-Gel (1%):	Agarose	4 g
(Lagerung bei 80°C)	TAE-Puffer	400 ml

### 5.4.5 Puffer und Lösungen für DNA-Sequenzierung

10%-APS-Lösung:	Ammoniumpersulfat	1 g
(Lagerung bei -20°C)	ddH <sub>2</sub> O	10 ml

5,25%-Page-Plus-Gel:	Harnstoff	18 g
	TBE-Puffer (10x)	5 ml
	40%-Page-Plus-Lösung	6,6 ml
	TEMED	25 µl
	10%-APS-Lösung	250 µl
	ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

TBE-Puffer (10x):	Tris	108 g
-------------------	------	-------

Borsäure	55 g
EDTA	7,4 g

#### 5.4.6 Puffer und Lösungen für SDS-Gelelektrophorese

Lower Tris (4x): (Lagerung bei 6°C)	Tris	36,4 g
	SDS	0,8 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 200 ml
	pH-Wert	8,8

Upper Tris (4x): (Lagerung bei 6°C)	Tris	12,11 g
	SDS	0,8 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 200 ml
	pH-Wert	6,8

10%-APS-Lösung: s.o.

SDS-Probenpuffer:	Glycerin	10 ml
	2-Mercaptoethanol	5 ml
	SDS	3 g
	0,05%-Bromphenolblau-Lsg.	2,5 ml
	Upper Tris (4x)	12,5 ml
	dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

Elektrodenpuffer:	Tris	3 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1 g
	dH <sub>2</sub> O	ad 1l
	pH-Wert	8,4

Coomassie-Färbelösung: Coomassie-Brilliant-Blue 1g

	Essigsäure	100 ml
	Methanol	300 ml
	dH <sub>2</sub> O	600 ml
Entfärbelösung:	Essigsäure	100 ml
	Methanol	300 ml
	dH <sub>2</sub> O	600 ml
Proteinstandard: (Lagerung bei -20°C)	Rekombinante Proteine mit den Größen 10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa	

### 5.4.7 Lösungen für Anionenaustauschchromatografie und Dialyse

Reinigungspuffer:	Tris-HCl	25 mM
	pH-Wert	7,5
Elutionspuffer:	Tris-HCl	25 mM
	NaCl	1 M
	pH-Wert	7,5

### 5.4.8 Reaktionslösungen für Aktivitätstests und Hydroxylierungsreaktion

ADH-Puffer:	Natriumpyrophosphat	75 mM
	Semicarbazid-hydrochlorid	75 mM
	Glycin	21 mM
	pH-Wert	8,8
Aktivitätstestpuffer I:	Tris-HCl	50 mM
	pH-Wert	8,0
Aktivitätstestpuffer II:	KP <sub>i</sub>	50 mM

	pH-Wert	8,0
Britton-Robinson-Puffer:	Phosphorsäure	25 mM
	Essigsäure	25 mM
	Borsäure	25 mM

Das Einstellen des pH-Werts über den Pufferbereich (pH 3 – 10) erfolgt mit 0,1 molarer Natronlauge.

#### 5.4.9 Lösungen für die Transformation in *E. coli*

TSS-Medium: (Lagerung bei 6°C)	LB-Medium	
	PEG6000	10% (m/v)
	DMSO	5% (v/v)
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM

Lösung TfB I:	KOAc	30 mM
	RbCl <sub>2</sub>	100 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH-Wert	5,8

Das Einstellen des pH-Werts erfolgt mit verdünnter Essigsäure.

Lösung TfB II:	MOPS	10 mM
	RbCl <sub>2</sub>	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH-Wert	6,5

Das Einstellen des pH-Werts erfolgt mit verdünnter Natronlauge

#### 5.4.10 Lösungen für die *error-prone-PCR*

Primer-Lösungen: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	Oligonukleotid	100 $\mu\text{M}$
<i>ep</i> -dNTP-Mix: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	limitierendes dNTP nicht limitierende dNTPs	2 mM 10 mM
10xPCR-Reaktionspuffer: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	Tris $\text{MgCl}_2$ pH-Wert	100 mM 15 mM 8,3
Weitere Lösungen: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	$\text{MgCl}_2$ -Lsg. $\text{MnCl}_2$ -Lsg.	25 mM 5 mM

#### 5.4.11 Lösungen für die *Quick-Change-PCR*

Primer-Lösungen: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	Oligonukleotid	1 $\mu\text{M}$
dNTP-Mix: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	dNTPs, 100 mM $\text{dH}_2\text{O}$	je 2,5 $\mu\text{l}$ 90 $\mu\text{l}$
10xPCR-Reaktionspuffer: (Lagerung bei $-20^{\circ}\text{C}$ )	Tris $\text{MgCl}_2$ pH-Wert	100 mM 15 mM 8,3

#### 5.4.12 Puffer und Lösungen für weitere Anwendungen

TE-Puffer:	Tris/HCl EDTA pH-Wert	10 mM 1 mM 7,5 – 8,5
------------	-----------------------------	----------------------------

Aufschlusspuffer I:	Tris	30 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	50 mM
	Lysozym	1 mg/ml
	pH-Wert	8,0
Aufschlusspuffer II:	KP <sub>i</sub>	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Lysozym	1 mg/ml
	DNase I	0,1 µg/ml
	pH-Wert	8,0
DC-Tauchreagenz:	Echtblausalz RR	0,5 g
	dH <sub>2</sub> O	25 ml
	Methanol	ad 100 ml
Vorreinigungsgemisch:	Chloroform / Methanol	1:1
Fließmittelgemisch: (DC-Entwicklung)	Toluol / Triethylamin	3:1

## 5.5 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden

### 5.5.1 Stammhaltung und Kultivierung von *Bacillus subtilis*

Die von der DSMZ erhaltene *B. subtilis*-Kultur wurde 20 h bei 30°C und 200 Upm in *B. subtilis*-Medium kultiviert. 750 µl dieser Kultur wurden mit 750 µl Glycerin (87%, autoklaviert) gemischt und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.



### 5.5.2 Stammhaltung und Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von rekombinanten DH5 $\alpha$  wurden 2 – 5 ml LB-Medium mit Ampicillin versetzt und mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Amp-Agarplatte mittels sterilem Zahnstocher angeimpft. Die *E. coli*-Kultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert (200 Upm). Diese Art der Kultivierung wird im Folgenden als *ÜN-Kultur* bezeichnet. Für Mini-Plasmid-Präparationen sind 2 ml ÜN-Kultur ausreichend, für Midi-Plasmid-Präparationen wurden 50 ml LB-Amp-Medium in sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht (bis 16 h) bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Die frisch transformierten Stämme wurden außerdem auf festem Nährboden kultiviert. Die Kulturen wurden auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Verschließen der Petrischalen mit Parafilm und Lagern im Kühlraum (6°C) können die *E. coli*-Kulturen bis zur weiteren Benutzung gelagert werden (für etwa 4-6 Wochen).

Die Kultivierung von rekombinanten BL21(DE3) erfolgte wie bei DH5 $\alpha$ . Aufgrund der Stärke und unvollständigen Unterdrückung des lacUV5-Promotors im BL21(DE3)-Genom müssen Zellen, die pET20b(+)-Plasmide enthalten, mit LB-Amp-Glucose-Medium kultiviert werden. Die Glucose bewirkt eine Katabolit-Repression und verhindert so die Basalexpression des Zielenzym. Im Falle der P450-Expression erwies sich dieses Vorgehen als zwingend notwendig, da das Protein in höheren Konzentrationen toxisch für die Zellen ist.

Die Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen erfolgte durch Animpfen von 1 ml LB-Amp-Glucose-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte, Inkubation über Nacht und anschließender Verdünnung eines 500  $\mu$ l Aliquots dieser Kulturlösung mit 500  $\mu$ l Glycerin (87%, autoklaviert). Bei –80°C sind diese Glycerol-Stocks über Jahre haltbar (Sambrook/Russell, 2001).

### 5.5.3 Stammhaltung und Kultivierung in Mikrotiterplatten

Die Stammhaltung der Klone einer Mutanten-Bibliothek erfolgte in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. Hierzu wurden 200 µl LB-DMSO-Glucose-Medium mit Ampicillin pro Vertiefung vorgelegt, mit je einer einzelnen Kolonie (Klon) inokuliert, über Nacht inkubiert (37°C, 200 Upm) und anschließend bei –20°C eingefroren.

### 5.5.4 Isolierung und Präzipitation genomischer DNA aus *Bacillus subtilis*

Zur Isolation der genomischen DNA aus *Bacillus subtilis* mittels Phenol-Chloroformextraktion wurde das Zellpellet aus 200 ml einer ÜN-Kultur in 20 ml Aufschlusspuffer I resuspendiert und 30 min lang bei 200 Upm und 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml SDS-Lösung (10% m/v) wurde weitere 60 min bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde zweimal im Verhältnis 1:1 mit einer Phenol/Chloroform-Lösung versetzt und 30 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 0,1 Volumen Natriumacetat-Lösung (3 M; pH 4,8) und 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und die ausgefallene DNA 30 min bei 5000 Upm abzentrifugiert. Danach wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet (SpeedVac, 30°C, 10 min) und in 1,5 ml TE-Puffer aufgenommen.

### 5.5.5 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

#### a) Prinzip

Die PCR dient zur spezifischen Amplifikation einer Ausgangs-DNA (Matrize oder template), d.h. spezifische DNA-Sequenzen können *in vitro* in einem Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Dabei wird ein Zyklus von drei Reaktionsschritten bis zu dreißig Mal wiederholt. Der erste Schritt eines jeden Zyklus ist die Hitze-Denaturierung des Ausgangs-DNA-Doppelstrangs bei ca. 95°C. An die beiden entstandenen DNA-Einzelstränge lagert sich während des sogenannten Anlagerungsschritts (*Annealing*)

bei 45-65°C ein kurzes komplementäres DNA-Fragment (Primer) an, das als Startpunkt für die DNA-Replikation dient. Im letzten Schritt (*Elongation*) werden durch Verlängerung der Primer am 3'-Ende mittels thermostabiler Polymerasen (hier: *Taq*-Polymerase) bei 72°C zwei neue Stränge synthetisiert, die bei den folgenden Zyklen wieder als Vorlage zur Verfügung stehen. Letztendlich wird das sich zwischen den Primern befindliche DNA-Fragment exponentiell vermehrt, weswegen nur wenige DNA-Moleküle als Ausgangsmaterial notwendig sind. Für eine erfolgreiche Amplifikation ist es erforderlich, die Bedingungen so zu wählen, dass die Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide durch die Polymerase so niedrig wie möglich gehalten wird. Unter optimalen Bedingungen liegt die Fehlerrate bei 0,001 bis 0,02% (Cadwell/Joyce, 1992; Tindall/Kunkel, 1988). Die Fehler sind dabei über das ganze Produkt verteilt, wobei am häufigsten ein Austausch von Cytosin gegen Thymin auftritt. Deletionen oder Insertionen einer Base kommen nur äußerst selten (1 Mutation pro 50.000 Basen), komplexere Mutationen überhaupt nicht vor.

Die Polymerasekettenreaktion kann durch Abwandlungen auch zur Erzeugung von Mutanten genutzt werden. Hier unterscheidet man die fehlerhafte PCR (*error-prone PCR*) und die punktspezifische Mutagenese (*Quick-Change PCR*).

Durch gerichtete Mutagenese mittels fehlerhafter PCR (Cadwell/Joyce, 1992; Leung et al., 1989; Vartanian et al., 1996) ist die Parallelerzeugung vieler Mutanten und damit ein Protein-Engineering zur Untersuchung der Funktionalität von Proteindomänen in Bezug auf ihre Wirkung möglich geworden. Darüber hinaus lassen sich dadurch die Eigenschaften eines Genprodukts, d.h. eines Proteins bzw. eines Biokatalysators verändern. Eine Durchführung der PCR unter suboptimalen Bedingungen, die zu einer Erhöhung der Amplifikationsfehlertrate führt, bewirkt zufällige Mutationen im amplifizierten Gen. Durch Zusatz von Mangan(II)chlorid und dNTP-Mischungen, bei denen einzelne Basen signifikant im Überschuss enthalten sind, lässt sich die Fehlerrate der Amplifikation auf über 1% steigern.

Bei Punktmutationen wird nach dem Prinzip des Stratagene QuickChange Kits (Kunkel, 1985) verfahren. Dazu werden sogenannte Punktmutationsprimer eingesetzt, die die gewünschte Mutation in ihrer Nucleotidsequenz bereits enthalten. Nach der Denaturierung der Plasmid-DNA, die als Matrize dient, hybridisieren die Primer

mit den komplementären DNA-Strängen und die eingesetzte *Pfu*-Polymerase amplifiziert das gesamte Plasmid ausgehend von den eingesetzten Primern. Nach der PCR wird das Restriktionsenzym *Dpn* I zum Reaktionsgemisch gegeben. Im Gegensatz zur parentalen DNA ist die amplifizierte DNA nicht methyliert und wird daher von *Dpn* I nicht verdaut. Danach kann die amplifizierte DNA in kompetente Zellen transformiert werden. Die Punktmutation kann auch als Sättigungs-PCR mit sogenannten wobble-Primern durchgeführt werden. Hierbei wird ein Primergemisch verwendet, so dass an der zu mutierenden Stelle nicht eine ausgewählte, sondern alle 20 unterschiedlichen Aminosäuren auftreten können. Durch diese Methode können die Methoden rationales Design und gerichtete Evolution miteinander kombiniert werden.

b) *PCR-Reaktion zur Isolierung der P450-Gene yrhJ und ynfJ aus genomischer B. subtilis-DNA*

Standard-Ansatz (50 µl):	10xPuffer	5 µl
	MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	4 µl
	dNTP-Mix	4 µl
	Forward primer	1 µl
	Reverse primer	1 µl
	Ausgangs-DNA (2 µg/ml)	2,5 µl
	<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
	ddH <sub>2</sub> O	37 µl

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	7	1
Denaturierung	95	1	
Anlagerung	53 ( <i>ynfJ</i> ) / 60 ( <i>yrhJ</i> )	1,5	25
Elongation	72	2,75	
Synthese	72	7	1

Tabelle 12: PCR-Temperaturprogramm

c) *error-prone PCR-Reaktion zur Erzeugung einer Mutantenbibliothek*

Standard-Ansatz (100 µl):	10xPuffer	10 µl
	MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	23 µl
	ep-dNTP-Mix	40 µl
	Forward primer	1 µl
	Reverse primer	1 µl
	Ausgangs-DNA (Midi)	2 µl
	Taq-Polymerase	1 µl
	MnCl <sub>2</sub> -Lsg.	0 – 10 µl
	ddH <sub>2</sub> O	2 – 12 µl

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	1,5	
Anlagerung	53 ( <i>ynfJ</i> ) / 60 ( <i>yrhJ</i> )	1,5	25
Elongation	72	6	
Synthese	72	3	1

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die *error-prone* PCR

d) *Punktmutationen mittels QuickChange Kit*

Standard-Ansatz (50 µl):	10xPuffer	5 µl
	DMSO	5 µl
	dNTP-Mix	1 µl
	Forward primer	5 µl
	Reverse primer	5 µl
	Ausgangs-DNA (Midi)	2 µl
	Pfu-Polymerase	1 µl
	ddH <sub>2</sub> O	26 µl

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	1	
Anlagerung	55 (F88) / 58 (S189)	1	15
Elongation	68	10	
Synthese	68	10	1

Tabelle 14: Temperaturprogramm für die *Quick-Change* PCR

### 5.5.6 DNA-Präzipitation

Um DNA zu isolieren oder in höheren Konzentrationen zu erhalten, wurde sie mit Ethanol oder Isopropanol gefällt. Unter leicht alkalischen Bedingungen löst sich DNA am besten. Sie wird nach der Fällung daher gewöhnlich in TE-Puffer, pH 7,8 aufgenommen. Da bei manchen Experimenten EDTA störend ist, wurde die DNA gelegentlich auch in Tris-HCl gelöst (Verdau mit Restriktionsenzymen). Zur Sequenzierung vorgesehene DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst, da sich Puffersalze dabei störend auswirken.

#### a) Isopropanol-Fällung

Zu 1 Volumen DNA wurde das 0,7-fache Volumen an Isopropanol gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 10 – 15 min zentrifugiert (14000 Upm). Das durchsichtige, glasige Pellet wurde im Vakuum getrocknet. Um den Trocknungsvorgang zeitlich abzukürzen, ist es ratsam das Pellet noch mit 70%igem Ethanol zu waschen, das leichter flüchtig ist und ausgefallene Salze beseitigt. Nach nochmaliger zehninütiger Zentrifugation bei 14000 Upm wurde die DNA im Vakuum getrocknet (SpeedVac, 30°C, 10 min) und in 30 – 50 µl Wasser oder geeignetem Puffer gelöst.

### *b) Ethanol-Fällung*

Zu 1 Volumen DNA wurden ein Zehntel des Volumens an Natriumacetat-Lösung (3 M; pH 4,8) und das 2,5-fache Vol. an 99,8%igem kalten Ethanol gegeben. Die Probe wurde 20 Minuten in den Gefrierschrank (-80°C) gestellt und dann 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert (14000 rpm). Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das salzhaltige Pellet mit dem 2,5-fachen Volumen an 70%igem kalten Ethanol gewaschen. Die Probe wurde 10 min bei 4°C zentrifugiert (14000 rpm) und das Pellet nach Verwerfen des Überstands im Vakuum getrocknet (s. Isopropanolfällung). Danach wurde ebenfalls in 30 – 50 µl Wasser oder Puffer gelöst.

### **5.5.7 Restriktionsspaltung der DNA**

Restriktionsendonucleasen ermöglichen es, DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Man unterscheidet präparative und analytische Restriktionsspaltungen.

Die präparative Restriktionsspaltung dient dazu, einen Vektor und die mit Primern amplifizierte DNA mit definierten Restriktionsendonucleasen so zu spalten, dass nach einer Aufreinigung durch Gelextraktion eine Ligation der beiden linearen Fragmente an den kompatiblen Schnittstellen möglich ist.

Analytische Restriktionsspaltungen dienen zur Überprüfung. Nach der Auftrennung der unterschiedlichen Spaltungsfragmente mit Hilfe eines Agarosegels lässt sich anhand deren Größe schnell erkennen, ob die Ligation erfolgreich war.

#### *a) Präparative Restriktionsspaltung*

10 – 20 µg DNA (10 µl der Midi-Plasmid-Präparation bzw. 20 µl der amplifizierten und zuvor gefällten DNA) wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl verdaut. Es wurden 30 Units der Restriktionsendonucleasen in dem für das Enzym geeigneten Reaktionspuffer eingesetzt (nach Angaben des Herstellers). Die Proben wurden 2 h bei 37°C inkubiert und dann, mit Probenpuffer versetzt, für die Gelelektrophorese

verwendet. Beim Verdau amplifizierter DNA mit *Not I* wurde über Nacht verdaut, da die Effizienz dieses Enzyms bei linearer DNA geringer ist. Die Restriktionsendonucleasen wurden im Anschluss an die Reaktion durch zwanzigminütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

#### *b) Analytische Restriktionsspaltung*

2 – 3 µg DNA (2 µl der Midi-Plasmid-Präparation bzw. 3 µl der Mini-Plasmid-Präparation) wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl verdaut. Bei diesem kleineren Ansatz wurden 10 Units der Restriktionsendonucleasen verwendet und 1 – 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Versetzen mit Probenpuffer erfolgte die Gelelektrophorese.

### **5.5.8 Agarose-Gelelektrophorese**

#### *a) Theoretische Grundlagen*

DNA-Moleküle mit 1-20 kB können durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und sichtbar gemacht werden. Die Proben werden mit einem glycerinhaltigen Puffer versetzt, der sie in die Probentaschen des Gels hineinsinken lässt. Er enthält außerdem den Farbstoff Bromphenolblau, der ebenfalls im elektrischen Feld wandert und an dem man den Verlauf der Elektrophorese verfolgen kann. DNA-Moleküle sind als Säure im schwach Alkalischen (TAE-Puffer) negativ geladen und wandern im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Anzahl der Basenpaare ab. Zur Sichtbarmachung wird das Gel mit Ethidiumbromid versetzt, das nach Bindung an doppelsträngige DNA unter UV-Licht intensiv leuchtet. Probenmengen sind ab 50 ng zu erkennen.

Mit zunehmender Dauer der Elektrophorese vergrößert sich die Genauigkeit der Auftrennung, bei einer zu langen Laufdauer jedoch erreichen die kleineren DNA-Fragmente einen Bereich, der kein Ethidiumbromid mehr enthält, da es selbst entgegengesetzt zur DNA wandert. Die Länge von linearen doppelsträngigen DNA-



Molekülen kann durch Vergleich mit einem Längenstandard abgeschätzt werden (kB-Ladder).

Die Größe von zirkulären Plasmiden kann nicht mit dem Standard bestimmt werden, da sie mit einer anderen Geschwindigkeit als lineare (geschnittene) Plasmide wandern und außerdem in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Sie erzeugen unter Umständen auch mehrere Banden.

### *b) Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese*

Etwa 30 ml 1%ige Agarose-Lösung wurde mit 3 µl wässriger Ethidiumbromidlösung (1% m/v) vermischt und in einen Gelträger mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Nach etwa 20 min konnte der Kamm aus dem polymerisierten Gel entfernt werden. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer vermischt und in die Probenaschen gefüllt. Dabei wurden maximal 10 µl DNA-Lösung + Probenpuffer aufgetragen. Als interner Längenstandard wurden 10 µl 1 kB-DNA-Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V für etwa 30 min. Die DNA-Banden wurden im Gel auf einem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und fotografisch dokumentiert.

Bei der präparativen Gelelektrophorese wurden 30 – 50 µl DNA-Lösung mit Probenpuffer aufgetragen und eine 45-minütige Elektrophorese bei 100 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert und gereinigt.

### **5.5.9 Ligation von DNA mit T4-Ligase**

Durch T4-Ligase können Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden von DNA-Strängen geknüpft werden. Dies ermöglicht das Verbinden zweier linearer DNA-Moleküle oder die Zyklisierung eines linearen Moleküls. Die Grundlage der molekularen Klonierungstechnik liegt darin, einen Vektor (zuvor prä-

parierte Plasmid-DNA) mit einer Fremd-DNA (Gen, Insert) zu einem solchen zirkulären Molekül zu verbinden. Das neu gebildete zirkuläre Plasmid lässt sich wieder in Bakterien einschleusen (Transformation).

Für die Ligationsreaktion wurde eine Mischung von Insert- und Vektor-DNA im Verhältnis 3:1 vorgelegt und mit 2 µl 10xLigasepuffer, 2 µl T4-Ligase (2 Weiss-U) und ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung der Ligase durch zehnmütiges Inkubieren bei 65°C, weil dadurch laut Angaben des Herstellers die Effizienz der darauffolgenden Transformation entscheidend erhöht werden kann.

#### 5.5.10 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Unter Transformation versteht man Aufnahme freier, löslicher DNA aus dem Medium durch einen Rezipienten. Die natürliche Aufnahmebereitschaft für DNA (Kompetenz) ist für eine Vielzahl von Bakterien (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* u.a.) beschrieben worden (Schlegel, 1992). Bei *E. coli*, das hierfür kein System besitzt, können die Zellen durch eine geeignete Vorbehandlung ebenfalls transformationskompetent gemacht werden. Der Mechanismus des Plasmid-Transfers in die *E. coli*-Zelle ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht von einer passiven Aufnahme, induziert durch Hitzeschock (42°C) oder Elektroporation, aus.

##### a) Transformation nach der TSS-Methode (Chung et al., 1989)

Um vollständige Plasmide in *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) zu transformieren, wurde die TSS-Methode verwendet: Aus einer ÜN-Kultur ohne Selektionsantibiotikum wurden 50 ml LB-Medium 1:50 angeimpft und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,4 – 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (4000 Upm, 10 min), in 2 ml TSS resuspendiert, auf Eis inkubiert und schließlich in 200 µl-Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei –80°C gelagert. 200 µl der so kompetent gemachten Zellen wurden nach Vermischen mit 1 µl DNA 20 min auf Eis inkubiert, im Anschluss erfolgte der Hitzeschock, 45 s bei 42°C. Danach wur-

den 800 µl LB-Medium als Nährmedium hinzugegeben und 1 h bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Die Zellen wurden 3 min bei 3000 Upm abzentrifugiert, der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen, die Zellen resuspendiert und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf einer LB-Amp- oder LB-Amp-Glucose-Agar-Platte ausgestrichen. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht.

### *b) Transformation nach der Rubidiumchlorid-Methode*

Diese Methode wurde angewendet, um Zellen für die Aufnahme von Plasmiden aus Ligationsansätzen kompetent zu machen. Durch diese Methode erhöht sich die Transformationseffizienz gegenüber der TSS-Methode auf das Zehnfache.

100 ml LB-Medium wurden mit einer ÜN-Kultur 1:50 angeimpft und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,4 – 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden danach 15 min auf Eis gestellt, anschließend abzentrifugiert (4000 Upm, 10 min) und in 40 ml TfB I-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis (15 min) und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml TfB II-Puffer resuspendiert und danach in 200 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Transformation erfolgte entweder direkt nach 15 min Inkubation auf Eis oder die Zellen wurden zur weiteren Aufbewahrung durch Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Der Vorgang der eigentlichen Transformation wurde wie unter a) beschrieben durchgeführt.

### **5.5.11 Plasmid-Präparation aus *E. coli***

#### *a) Prinzip der Plasmid-Präparation*

Die Plasmid-Präparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Die Zellen werden dabei in Puffer mit RNase resuspendiert. Anschließend erfolgt die alkalische Lyse der Zellmembran durch SDS und damit verbunden die Denaturierung der Proteine sowie der DNA. Das darauffolgende Absenken des pH-

Wertes bewirkt eine Renaturierung der Plasmid-DNA, während die chromosomale DNA ein Netzwerk bildet, das zusammen mit den Proteinen ein Präzipitat bildet und sich durch Abzentrifugieren entfernen lässt. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann weiter gereinigt werden.

*b) Mini-Plasmid-Präparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit*

Für Anwendungen, die besonders reine Plasmid-DNA erfordern (PCR-Reaktionen, Sequenzierreaktionen) wurde die Mini-Plasmid-Präparationsmethode verwendet. Nach Abtrennung der Zellen einer 2-ml-ÜN-Kultur durch Zentrifugation (14000 Upm, 1 min) und Verwerfen des Kulturüberstandes erfolgte die weitere Plasmidreinigung nach Angaben des Herstellers Qiagen. Die DNA wurde danach in 30 – 50 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) gelöst.

*c) Midi-Plasmid-Präparation mit dem Plasmid Midi Kit*

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine 50-ml-ÜN-Kultur 10 min bei 5000 Upm (4°C) zentrifugiert. Die Plasmid-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers Qiagen, wobei die Volumenangaben auf das Doppelte erhöht wurden. Gelöst wurde die DNA danach in 250 µl TE-Puffer.

*d) Mini-Plasmid-Präparation (Schnelltest)*

Für Anwendungen, die weder viel noch hochreine DNA erfordern (analytische Restriktionsverdauungen zur Kontrolle von Plasmiden) diente diese Methode, die abgewandelt nach den Anweisungen des FlexiPrep-Kits (Pharmacia) durchgeführt wurde.

Zur Zellabtrennung wurden 1,5 ml ÜN-Kultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt, eine halbe Minute bei 14000 Upm zentrifugiert und das entstandene Zellpellet so weit wie möglich vom Überstand befreit. Nach Zugabe von 200 µl Lsg. I und Vortexen wurden

die nun resuspendierten Zellen durch Zugabe von 200 µl Lsg. II und vorsichtiges Schütteln lysiert. Die Zugabe der Lsg. III bewirkte unter vorsichtigem Schütteln das Ausflocken der Zellproteine und der genomischen DNA. Sie wurden durch Abzentrifugieren (14000 Upm, 5 min) entfernt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Isopropanol-Fällung präzipitiert und in 15 µl TE-Puffer resuspendiert.

### 5.5.12 Bestimmung der DNA-Konzentration (Mühlhardt, 2000)

#### a) Prinzip

Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Bei Verwendung von Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm lässt sich die Konzentration nach folgender Formel berechnen:

$$c(\text{dsDNA}) = \text{OD}_{260} \cdot 50 \text{ µg/ml}$$

Anhand der UV-Absorption kann auch die Reinheit einer DNA-Präparation überprüft werden. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

#### b) Durchführung

2 µl einer DNA-Präparation nach Abschnitt 5.5.4 oder 5.5.11 wurden mit 48 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die UV-Absorption gegen reines Wasser als Referenz gemessen.

### 5.5.13 DNA-Sequenzierung

#### a) Theoretische Grundlagen

DNA wird nach der fluoreszenzmarkierten Cycle Sequencing Methode, abgeleitet von der Sanger-Didesoxy-Methode, sequenziert (Sanger et al., 1977). In einer „Dye-

Terminator“-Sequenzierungsreaktion werden dabei DNA-Fragmente durch kontrollierten Abbruch der enzymatischen Replikation erzeugt. Thermostabile *Taq*-Polymerase wird verwendet, um eine bestimmte Sequenz einer einsträngigen DNA zu kopieren. Die Vervielfältigung wird durch ein kurzes komplementäres DNA-Fragment (Primer) gestartet. Zusätzlich zu den vier dNTPs enthält die Reaktionsmischung ihre 2,3-Dideoxy-Analoga. Ein Einbau dieser Analoga bewirkt den Abbruch der DNA-Replikation aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe, da der Aufbau einer Phosphodiesterbindung zu einem weiteren Nucleotid nicht mehr möglich ist. Es entstehen also Fragmente unterschiedlicher Länge, die am 3'-Ende ein Dideoxy-Analog enthalten. Die Dideoxy-Analoga sind mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert, die nach Laseranregung fluoreszieren – je nach Base mit einer anderen Wellenlänge (Ansorge et al., 1987; Freeman et al., 1990).

Mit dieser Mischung von DNA-Fragmenten wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die nach ihrer Größe getrennten Fragmente werden anhand der Fluoreszenz des endständigen Dideoxy-Analogs detektiert (Prober et al., 1987). Die Detektion bei dieser Vierfarbentechnik erfolgt durch zwei Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm. Das senkrecht emittierte Fluoreszenzlicht wird von Fotodioden hinter dem Gel gemessen und mit Hilfe eines angeschlossenen EDV-Systems ausgewertet.

Um lange DNA-Stränge zu sequenzieren, werden in verschiedenen Ansätzen mehrere Primer eingesetzt, die sich über den gesamten Strang verteilen. Die Genauigkeit der Sequenzierung wird erhöht, indem beide Stränge einer doppelsträngigen DNA sequenziert werden.

#### *b) Probenvorbereitung*

Sequenzierreaktion:

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden üblicherweise 4 µl Premix (BigDye Terminator Ready Reaction Kit) und 5 µl Primer (1 pmol/µl) zu 200 – 500 ng DNA (3 – 5 µl Mini-Plasmid-Präparation) gegeben.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Denaturierung	95	4	1
Denaturierung	95	0,7	
Anlagerung	55	0,5	25
Elongation	60	4	
Synthese	60	4	1

Tabelle 15: Temperaturprogramm für die Sequenzier-PCR

### Aufarbeitung:

Nach Durchführung einer Ethanol-fällung wurden die Proben jeweils in 3 µl Formamid / 25 mM EDTA, pH 8 (5:1) mit einer Spatelspitze Dextran Blau aufgelöst, 2 min bei 95°C denaturiert und nach dem Abkühlen auf RT direkt auf das Sequenziergel aufgetragen (1 µl bei halber; 0,5 µl bei voller Beladung des Sequenziergels).

### c) Gießen des Polyacrylamid-Gels und Durchführung

Beide Gelglasplatten wurden gründlich mit Alkanox<sup>®</sup> gewaschen und mit Wasser gespült. Danach wurde mit Isopropanol nachbehandelt und mit Druckluft getrocknet und ein Abstandshalter (Spacer) zwischen die Glasplatten gelegt. Für das 5,25%ige Page-Plus-Gel wurden der Harnstoff, TBE-Puffer, die 40%ige Page-Plus-Lösung und Wasser zusammengegeben. Der Harnstoff wurde gelöst, die Lösung anschließend filtriert (Millipore Filter GVWP 0,22 µm) und entgast. Durch Zugabe von TEMED und APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet, die Lösung zum Aushärten zwischen die Glasplatten gegossen und der Vorkamm eingesetzt. Das Gel konnte nach zwei Stunden in den DNA-Sequenzierer eingespannt werden, wobei der Vorkamm durch einen „Haifisch-Kamm“ zur Probenaufgabe ausgetauscht wird. Nach Kontrolle des Basissignals erfolgte ein einstündiger Vorlauf. Die eigentliche Elektrophorese dauerte 12 h (Sequenzierbedingungen: 2,4 kV / 50 mA / 200 W / 50°C / 40 mV Laser Power).

## 5.6 Expression, Reinigung und Charakterisierung von Proteinen

### 5.6.1 Expression des Zielproteins im Schüttelkolben

Ausgehend von einer Dauer- oder Einzelkultur wurden 5 ml LB-Amp-Glucose-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (s. Abschnitt 5.5.2). Die ÜN-Kultur wurde komplett zur Inokulation eines 500 ml Schüttelkolbens mit LB-Amp-Medium verwendet. Die weitere Kultivierung bis zur gewünschten Zelldichte wurde bei 37°C und 200 Upm im Inkubator durchgeführt. Durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm ( $OD_{578}$ ) lässt sich das Zellwachstum kontrollieren. Für *E. coli* gilt allgemein: Anzahl der Zellen pro ml ist gleich  $OD_{578} \cdot 5 \cdot 10^8$ . Bei Erreichen einer  $OD_{578}$  von 0,8 – 1,0 erfolgte die Induktion mit IPTG-Lösung I (Endkonzentration 0,5 mM). Danach wurde noch 3 Stunden bei 30°C und 150 Upm kultiviert. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (7000 Upm, 4°C, 15 min) und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

### 5.6.2 Expression des Zielproteins in Mikrotiterplatten

Für das Screening nach Mutanten mit verbesserten Eigenschaften wurde entweder direkt nach der Kultivierung über Nacht (s. Abschnitt 5.5.3) oder nach kurzzeitigem Auftauen bei Raumtemperatur von der Stammplatte auf neue Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (180 µl LB-MTP-Amp-Medium) überimpft. Nach Inkubation (37°C, 200 Upm; 4,5 h) bis zu einem Anstieg der  $OD_{590}$  um 0,3 – 0,35 (entspricht einer  $OD_{578}$  von 0,8 – 1,0 in 1 ml-Küvetten) lässt sich durch Zugabe von 10 µl IPTG-Lösung II pro Vertiefung die Expression der P450-Monooxygenase induzieren. Um die Expression zu unterstützen, wird mit 5-Aminolävulinsäure eine Vorstufe des Porphyringerüsts der Monooxygenase durch Zugabe von 10 µl 5-ALA-Lösung pro Vertiefung hinzugefügt. Die Expression (30°C, 180 Upm) wurde durch Zentrifugation (4°C, 3220 g, 10 min) nach 24 h gestoppt, die Überstände abdekantiert und die Zellpellets mindestens 1 h bei –20°C eingefroren.



### 5.6.3 Zellaufschluss

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 5 g *E. coli* BL21(DE3) wurden aufgetaut und in 5 – 7,5 ml Reinigungspuffer suspendiert. Mittels zweimal zweiminütiger Ultraschallbehandlung (Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 30 %) wurde die auf Eis gekühlte *E. coli*-Zellsuspension aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde daraufhin zur Entfernung der Zelltrümmer 30 min bei 32500 g zentrifugiert. Der trübe, das wasserlösliche Enzym enthaltende Überstand, wird im Folgenden als *Rohextrakt* bezeichnet. Der Rohextrakt wurde weiter über einen 0,22 µm Sterivex-GP-Filter gereinigt. Dabei können sämtliche Zelltrümmer und Fette entfernt werden. Die klare braune Lösung nach der Filtration wird weiterhin als *Reinextrakt* bezeichnet. Dieser kann außer zur weiteren Proteinaufreinigung auch zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden.

Die Zellpellets in Mikrotiterplatten wurden durch Zugabe von 75 µl Aufschlusspuffer II pro Vertiefung und 45-minütiger Inkubation (37°C, 200 Upm) aufgeschlossen. Danach wurde 30 min zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert (4°C, 3220 g) und 50 µl des Überstandes jeder Vertiefung für das Screening vorsichtig abgenommen.

### 5.6.4 SDS-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

#### a) Theoretische Grundlagen

Proteine werden bei der SDS-PAGE überwiegend nach ihrer Masse unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Lämmli, 1970). Ein Proteingemisch wird zunächst in einer Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) gelöst, einem anionischen Detergenz, das nichtkovalente Wechselwirkungen unter nativen Proteinen aufhebt. Außerdem wird Mercaptoethanol zur Disulfidbrückenreduktion zugegeben. Dodecylsulfat-Anionen binden an die Proteinkette und bilden mit dem denaturierten Protein einen Komplex, dessen negative Ladung ungefähr proportional zur Masse des Proteins ist. Die SDS-Proteinkomplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe (Molekulargewicht bzw. Stokes-Radius) und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Mit diesen Komplexen wird dann eine vertikale Poly-

acrylamid-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Ladung des SDS-Proteinkomplexes, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung ab. Schließlich werden die Proteine im Gel durch einen Farbstoff (Coomassie Blue) sichtbar gemacht.

### *b) Durchführung*

#### Gießen des Gels:

Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Dazu wurden 2 ml Lower Tris; 3,33 ml Acrylamid-Lösung (30%); 2,67 ml dH<sub>2</sub>O und 40 µl APS-Lösung zusammenpipettiert. Mit Zugabe von 4 µl TEMED wurde der Polymerisationsprozess gestartet und das Gel sofort bis etwa 2 cm unterhalb der oberen Gelbegrenzung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Geloberfläche zu erhalten. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Isopropanol abgegossen und Reste durch Spülen mit dH<sub>2</sub>O entfernt. Im Anschluß wurde das Sammelgel gegossen. Dazu wurden 1 ml Upper Tris; 0,52 ml Acrylamid-Lösung (30%); 2,47 ml dH<sub>2</sub>O und 40 µl APS-Lösung zusammenpipettiert. Mit Zugabe von 4 µl TEMED wurde der Polymerisationsprozess gestartet und das Gel sofort auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Danach wurde der Probenkamm luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gesetzt. Nach weiteren 30 min konnte der Probenkamm vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt und das Gel ebenfalls luftblasenfrei in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden.

#### Probenvorbereitung:

Bei Roh- oder Reinextrakten wurden je 10 µl der Proben 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt, für 10 min bei 95°C gekocht und nach dem Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Bei Zellpellets, die durch Abzentrifugieren von 2 ml Kulturmedium gewonnen wurden, erfolgte die Vorbereitung durch Aufschlännen des Pellets in 100 µl SDS-Probenpuffer und zehnminütigem Kochen bei 95°C.

#### Elektrophorese:

Die Elektrodenkammern wurden nach Einsetzen des Gels mit Elektrodenpuffer gefüllt und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 12 min lang mit einer

Stromstärke von 10 mA und anschließend etwa 60 min lang mit 25 mA, bis die Lauf-front das Ende des Gels erreichte. Als Proteinstandard wurden 10 µl eines Breit-bandstandards der Firma BIO-RAD aufgetragen.

Färben und Trocknen des Gels:

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese in der Coomassie-Lösung mindestens 1 h gefärbt. Danach wurde das Gel zwei Stunden in die Entfärbelösung gelegt, die nach einer halben Stunde gewechselt wurde. Zur Aufbewahrung wurde das Gel im Geltrockner zwischen einer Cellophan-Folie und einem Cellulose-Filterpapier (leichtes Vakuum, 80°C) 2 h getrocknet.

### **5.6.5 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Nachweis**

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA-Proteinnachweissystems spektrometrisch bei 562 nm nach Herstellerangaben entsprechend dem Standardprotokoll bestimmt. Kalibriergeraden wurden mit BSA-Verdünnungen aufgenommen.

### **5.6.6 Bestimmung der P450-Konzentration**

Cytochrom P450-Konzentrationen wurden mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode (Omura/Sato, 1964) über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt. Die Methode beruht auf der für P450-Enzyme charakteristischen Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 450 nm nach der irreversiblen Bindung von Kohlenmonoxid an das Häm-Eisen der Porphyrin-Gruppe. Dabei wird ein Differenzspektrum zwischen einem reduzierten P450-CO-Komplex und reduziertem P450 ohne Substrat aufgenommen.

$$c(P450) = \frac{\Delta A_{450 - 490} \cdot 1000 \cdot \text{Verdf}}{\varepsilon \cdot d}$$

- c(P450): Konzentration von P450 [nmol/ ml]  
 $\Delta A_{450-490}$ : Differenz der Absorptionen bei 450 nm und 490 nm  
 Verdf: Verdünnungsfaktor  
 d: Länge der durchstrahlten Küvette [cm]  
 $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient von P450 (91 mM<sup>-1</sup>\*cm<sup>-1</sup>)

Der P450 Roh- oder Reinextrakt (250 µl) wurde mit Aktivitätstestpuffer II bis zu einem Gesamtvolumen von 2,5 ml verdünnt (Verdünnungsfaktor 10). Danach erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit zur Reduktion des Häm-Eisens. Die Probe wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine der beiden Fraktionen wurde eine Minute lang mit CO begast, wobei Schaumbildung möglichst zu vermeiden ist, die andere diente als Referenz für die differenzspektroskopische Messung der Absorption.

### 5.6.7 Chromatografische P450-Reinigung mittels Anionenaustauscher

#### a) Theoretische Grundlagen

Auftrennungen mit Hilfe der Ionenaustauschchromatografie basieren auf der reversiblen Adsorption geladener Moleküle an einer immobilisierten Ionenaustauschergruppe gegensätzlicher Ladung. Die meisten Ionenaustauschauftrennungen laufen nach dem folgenden fünfteiligen Schema ab:

In der ersten Phase findet die Equilibrierung statt, wobei der Ionenaustauscher in den Zustand gebracht wird, um die gewünschten Moleküle (hier ein Enzym) binden zu können. Die Austauschgruppen der Säule binden dabei austauschbare Gegenionen, meistens einfache Anionen oder Kationen, wie z.B. Chlorid- oder Natrium-Ionen. In der zweiten Phase wird die zu reinigende Probe auf die Säule gebracht. Enzymmoleküle wie auch Verunreinigungen binden reversibel am Säulenmaterial und verdrän-

gen dabei die ursprünglich vorhandenen Gegenionen, die mit dem Reinigungspuffer von der Säule gewaschen werden.

In der dritten Phase werden Moleküle von der Säule entfernt, indem man Bedingungen herstellt, die für die Ionenbindung dieser Moleküle ungünstig sind. Dies geschieht entweder durch Erhöhung der Ionenstärke oder Änderung des pH-Wertes des Reinigungspuffers. Bei der angewendeten Methode wird die Ionenstärke durch Erhöhung der NaCl-Konzentration verändert. Die gebundenen Moleküle werden ihrer Bindungsstärke entsprechend von der Säule gewaschen, die am schwächsten gebundenen zuerst.

In der vierten Phase (sämtliches Enzym ist bereits entfernt) werden sämtliche noch gebundenen Moleküle von der Säule gewaschen, in der fünften Phase die Startbedingungen wieder hergestellt (durch Waschen mit Reinigungspuffer ohne Salzgradient).

### *b) Durchführung der Anionenaustauschchromatografie*

Zur Proteinreinigung wurde ein ÄKTAexplorer System mit einem Frac-900 Fraktionssammler verwendet, das die gleichzeitige Messung der Gesamtprotein-Elution bei 280 nm und der P450-Elution bei 417 nm erlaubt.

Alle analytischen P450-Proteinreinigungen mittels Anionenaustauscherchromatografie wurden bei einer Flussrate von 4 ml/min, Raumtemperatur und einer Beladung von 5 – 7,5 ml P450-Reinextrakt durchgeführt.

Zur P450-Reinigung wurden selbst gepackte XK16/20-Chromatographiesäulen (16 mm x 100 mm) verwendet, die Toyopearl SuperQ 650M, ( $A_f = 1,8$ ; 1840 Tp/m) und Toyopearl DEAE650M ( $A_f = 1,3$ ; 2540 Tp/m) mit einem Partikeldurchmesser von 65  $\mu\text{m}$  enthielten.

Als Laufmittel wurde ein Tris/HCl-Puffer gewählt (25 mM, pH 7,5), der sich in Bezug auf Bindungskapazität und Auflösungsvermögen bereits bei der Aufreinigung von P450 BM-3 bewährt hat (Schwaneberg, 1999).

### 5.6.8 Enzym-Dialyse

Die Lösung des gereinigten Enzyms enthält nach dem Reinigungsschritt noch das zur Elution nötige Natriumchlorid, das in einem Dialyseschritt aus der Enzymlösung entfernt werden muss. Bei größeren Volumina (>5 ml) wurde die Enzymlösung in einen Dialyseschlauch pipettiert und 4 h bei 4°C unter leichtem Rühren in 5 l Reinigungspuffer dialysiert. Bei kleineren Volumina als 5 ml wurden zur Entsalzung PD-10 Chromatografiesäulen eingesetzt. Hier können auf einmal 2,5 ml Lösung entsalzt werden. Bei der Entsalzung wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die von Salzen befreite Lösung wurde nach einer P450-Konzentrationsbestimmung direkt für Aktivitätstests verwendet.

## 5.7 Chemische Synthesen

### 5.7.1 *p*-Nitrophenoxycarbonsäuren (*p*NCA)

Die Darstellung der *p*-Nitrophenoxycarbonsäuren 8-*p*NCA, 10-*p*NCA und 12-*p*NCA erfolgte wie bereits veröffentlicht (Schwaneberg, 1999).

### 5.7.2 *p*-Nitrophenoxyalkane (*p*NA)

Abbildung 32 zeigt das Schema der Darstellung von *p*-Nitrophenoxyalkanen.

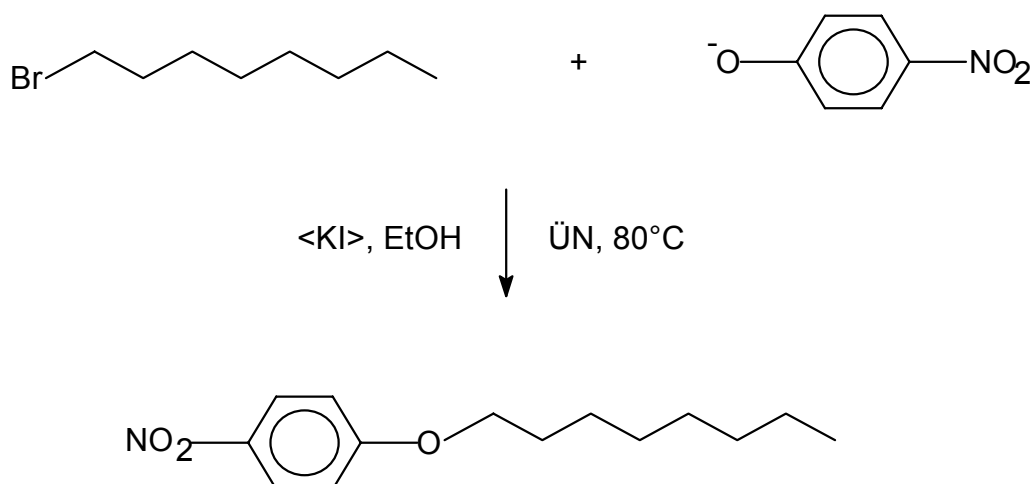


Abbildung 32: Darstellung von *p*-Nitrophenoxyoctan aus *p*-Nitrophenolat und 1-Bromooctan

#### a) Reaktionsvorschrift

Die Methode wurde zur Darstellung von *p*-Nitrophenoxyhexan und *p*-Nitrophenoxyoctan angewendet und beruht auf dem Prinzip der Williamson-Ethersynthese. 18,5 mmol des Natrium-*p*-nitrophenolats wurden in 50 ml absolutem Ethanol gelöst und danach 17 mmol des entsprechenden Bromalkans zugegeben. Als Katalysator fand eine Spatelspitze wasserfreies Kaliumiodid Verwendung. Danach wurde das Reaktionsgemisch 16 h unter Rückfluss und Feuchtigkeitsausschluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Alkohol aus dem Reaktionsgemisch mit Hilfe einer Vigreux-Kolonnen weitgehend abdestilliert und der erkaltete Destillationsrückstand in 15 ml 5%ige Natronlauge gegossen. Die organische Phase wurde anschließend mit Diethylether aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Calciumchlorid getrocknet und das Lösungsmittel vorsichtig abrotiert. Der verbliebene Rückstand wurde in eiskaltem Ethanol umkristallisiert. Es ist hierbei zu beachten, dass der Schmelzpunkt von *p*-Nitrophenoxyhexan nur 10°C beträgt.

*b) Charakterisierung*

p-Nitrophenoxyhexan (6-pNA, Ausbeute 55%):

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ : = 8,18 - 8,20 (d, 2 H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J = 9,3$  Hz); 6,93 - 6,95 (d, 2H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J = 9,3$  Hz); 4,03-4,06 (t, 2 H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-O- $\text{CH}_2$ -,  $J = 6,5$  Hz); 1,79 – 1,85 (m, 2 H, -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,44 – 1,50 (m, 2 H, -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,20 – 1,39 (m, 4 H, -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-); 0,90 – 0,93 (t, - $\text{CH}_3$ ,  $J = 7,0$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ : = 164,3 (C-1'); 141,3 (C-4'); 125,9 (C-3'); 114,4 (C-2'); 68,9 (-O- $\text{CH}_2$ -); 31,5; 28,9; 25,6; 22,6 (C-2 – C-5); 14,0 (C-6).

p-Nitrophenoxyoctan (8-pNA, Ausbeute 60%):

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$ : = 8,18 - 8,21 (d, 2 H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J = 9,3$  Hz); 6,92 - 6,96 (d, 2H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-,  $J = 9,3$  Hz); 4,02-4,07 (t, 2 H,  $\text{NO}_2$ -Phenyl-O- $\text{CH}_2$ -,  $J = 6,5$  Hz); 1,79 – 1,85 (m, 2 H, -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -); 1,29 – 1,50 (m, 8 H, -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>-); 0,86 – 0,92 (t, - $\text{CH}_3$ ,  $J = 6,9$  Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$ : = 164,3 (C-1'); 141,3 (C-4'); 125,9 (C-3'); 114,4 (C-2'); 68,9 (-O- $\text{CH}_2$ -); 31,8; 29,3; 29,2; 29,0; 25,9; 22,6 (C-2 – C-7); 14,1 (C-8).

## 5.8 Analytische Methoden

### 5.8.1 Aktivitätsbestimmung mit dem pNCA-Assay

Zur Messung kinetischer Konstanten, der pH- und Temperaturstabilität sowie der Stabilität in Lösungsmittel-Wassergemischen wurde der pNCA-Assay eingesetzt, bei dem durch die enzymatische Hydroxylierungsreaktion p-Nitrophenolat entsteht, das durch Absorptionsmessungen bei 410 nm nachgewiesen werden kann. Weitere Einzelheiten sind bei Schwaneberg beschrieben (Schwaneberg et al., 1999b). Der Vergleich der Stabilität wurde anhand der gemessenen Absorptionsanstiege (Absorptionseinheiten pro Minute) mit Hilfe von Steigungsgeraden durchgeführt und so die Aktivitäten mit der Ausgangsaktivität nach dem Zellaufschluss verglichen. Bei allen Aktivitätstests wurden mindestens Doppelbestimmungen, bei Abweichungen der beiden Messwerte um mehr als 10% auch Vierfachbestimmungen durchgeführt. Der entgeltige Wert ergibt sich dann aus dem arithmetischen Mittel der Messwerte.



Es gilt:

$$\text{Aktivität} \left[ \frac{\text{mol Substrat}}{\text{mol P450 min}} \right] = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot c \cdot d}$$

$\Delta A$ : Anstieg der Absorption bei 410 nm

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient von *p*-Nitrophenolat ( $13200 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei pH 8,0)

$c$ : Konzentration an P450 in der Assay-Lösung ( $\text{mol l}^{-1}$ )

$d$ : Schichtdicke der Messküvette (1 cm)

### *a) Allgemeiner Aktivitätstest*

Um feststellen zu können, ob Enzymlösungen von P450 CYP102A3 überhaupt Aktivität zeigen, wurden 50  $\mu\text{l}$  der Enzymlösung (Roh-, Reinextrakt oder gereinigtes Enzym) in einem Gesamtvolumen von 1 ml verwendet. Die Experimente wurden in 1 ml Einweg-Plastikküvetten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Es wurden dabei 5  $\mu\text{l}$  Substratlösung (8-*p*NCA, 10-*p*NCA, 12-*p*NCA, 15 mM in DMSO) verwendet. Nach Zugabe von 865  $\mu\text{l}$  Aktivitätstestpuffer I erfolgte die Zugabe der Enzymlösung. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  NADPH-Lösung (6 mM) gestartet.

Bei Aktivitätsexperimenten in Mikrotiterplatten wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes (s. Abschnitt 5.6.3) mit 2  $\mu\text{l}$  10-*p*NCA-Lösung (15 mM) und 128  $\mu\text{l}$  Aktivitätstestpuffer II versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  NADPH-Lösung (3 mM) gestartet.

### *b) Bestimmung kinetischer Konstanten*

Zur Messung der kinetischen Konstanten wurde Reinextrakt des Wildtyps und verschiedener P450 CYP102A3-Mutanten verwendet. Die Experimente wurden analog zu a) durchgeführt, es wurden dabei 3 – 8  $\mu\text{l}$  Substratlösung (8-*p*NCA, 10-*p*NCA, 12-*p*NCA) unterschiedlicher Konzentration eingesetzt (15 mM; 7,5 mM; 1,5 mM in DMSO) und dementsprechend Aktivitätstestpuffer I bis zu einem Gesamtvolumen

von 900 µl zugegeben. Die Reaktion wurde ebenfalls durch Zugabe von 100 µl NADPH-Lösung (6 mM) in Gang gesetzt.

*c) Bestimmung der Temperaturstabilität*

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurden 50 µl Reinextrakt 30 Minuten bei gleichbleibender Temperatur in einem Stratagene Robocycler (Modell Gradient 40) in dünnwandigen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Stratagene) inkubiert. Als Temperaturen wurden 25, 30, 36, 38, 40, 42, 44, 46 und 50°C gewählt. Die auf Raumtemperatur abgekühlten Proben wurden dann mit 845 µl Aktivitätstestpuffer I und 5 µl 10-pNCA-Lösung (15 mM in DMSO) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl NADPH-Lösung (6 mM) gestartet.

Bei Raumtemperatur (25°C) wurden auch Langzeittests bis zu einer Woche durchgeführt. Alle 24 h wurden 50 µl Rohextrakt entnommen und die Enzymaktivität bestimmt.

*d) Bestimmung der pH-Stabilität*

Die Messung der pH-Stabilität wurde bei Raumtemperatur in 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Stratagene) durchgeführt. 50 µl Reinextrakt in 350 µl Britton-Robinson-Puffer (25 mM, pH 4-10) wurden bis zu 6 h inkubiert. Danach wurde die Enzymlösung in eine 1 ml Plastikkuvette überführt und mit 5 µl 10-pNCA-Lösung und 495 µl Aktivitätstestpuffer I versetzt. Gestartet wurde die Reaktion wie oben beschrieben.

*e) Bestimmung der Aktivität in Lösungsvermittlern*

Die Lösungsmittelstabilität wurde in Glasküvetten bestimmt, da vor allem Aceton die Plastikkuvetten angreift. Die Substrate wurden dabei in den getesteten Lösungsmitteln Aceton, Dioxan, DMSO und Tetrahydrofuran gelöst. Die Bestimmungen wurden

entsprechend der unter a) beschriebenen Vorschrift durchgeführt, im Unterschied dazu wurde jedoch der Anteil des Aktivitätstestpuffers entsprechend der verwendeten Lösungsvermittlermenge variiert.

### 5.8.2 Aktivitätsbestimmung mit dem pNA-Assay

Die Aktivitätsbestimmungen mit dem pNA-Assay wurden mit exakt denselben Ansatzgrößen durchgeführt, die beim pNCA-Assay Verwendung fanden.

### 5.8.3 Aktivitätsbestimmung über den NADPH-Verbrauch

P450-Enzyme benötigen zur Katalyse einer Hydroxylierungsreaktion einen Cofaktor, je nach Klasse des Enzyms NADPH oder NADH. Beide Cofaktoren absorbieren in ihrer reduzierten Form bei 340 nm, weshalb der Fortgang der katalysierten Reaktion durch Absorptionsmessungen verfolgt werden kann. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass nicht die Entstehung des Produkts, sondern der Verbrauch eines Edukts bestimmt wird und daher zwischen Haupt- und Nebenreaktionen ohne weitere Analysen nicht unterschieden werden kann. Die Methode hat sich jedoch als sehr brauchbar erwiesen, wenn neue Enzyme und deren Mutanten daraufhin untersucht werden sollen, ob sie die Umsetzung bestimmter Substrate katalysieren können oder nicht. Die Aktivität kann mit derselben Formel wie unter 5.8.1 bestimmt werden, der Extinktionskoeffizient für NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm beträgt  $6220 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Die qualitativen Schnelltests wurden in 1 ml-Glasküvetten oder 1 ml-UV-Plastiküvetten durchgeführt. 50  $\mu\text{l}$  Reinextrakt wurden mit 3  $\mu\text{l}$  Substrat-Lösung (50 mM in DMSO) und 917  $\mu\text{l}$  Aktivitätstestpuffer II 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion danach durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  NADPH-Lösung (6 mM) gestartet. Der Verbrauch an NADPH zeigt den Fortgang der Reaktion an. Die ermittelten Verbrauchswerte wurden im Anschluss um den Nullwert korrigiert, den man durch Vermessen eines Reaktionsansatzes ohne Substrat erhält. Er zeigt den oxidativen Abbau von NADPH durch Sauerstoff an.

#### 5.8.4 ADH-Aktivitätstests

Zur Überprüfung der ADH-Aktivität und zur Evaluierung des Assays wurden in 1 ml-UV-Plastikküvetten Aktivitätstests durchgeführt. Dazu wurden 50  $\mu$ l ADH-Lösung (300 U/ml), 5  $\mu$ l Substratlösung (100 mM 1- oder 2-Octanol in DMSO) und 895  $\mu$ l ADH-Puffer 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l NAD-Lösung (20 mM) gestartet. Das während der Reaktion gebildete NADH wird spektroskopisch bei 340 nm gemessen und per Bestimmung der Kurvensteigung die Aktivität der ADH ermittelt.

Zur Evaluierung des Assays wurden zusätzlich 50  $\mu$ l eines CYP102A3-Reinextraktes (Enzymkonzentration  $\sim$ 5  $\mu$ M) zugegeben, die Substratmengen (2,5  $\mu$ l; 3,5  $\mu$ l; 4  $\mu$ l; 5  $\mu$ l) variiert und die ADH-Puffermenge entsprechend auf ein Gesamtvolumen von 1 ml angepasst.

#### 5.8.5 Präparativer Ansatz zur Produktanalyse

Für die Hydroxylierung der Substrate in Anwesenheit von P450 CYP102A3 bzw. seiner Mutanten wurde folgender Ansatz gewählt:

P450 CYP102A3 (Reinextrakt, 5 $\mu$ M)	250 $\mu$ l
Aktivitätstestpuffer II	4660 $\mu$ l
Substrat (50 mM in DMSO)	15 $\mu$ l
NADPH (12 mM)	75 $\mu$ l

Für die Messung des NADPH-Verbrauchs wurde der Reaktionsansatz auf zwei 5 ml UV-Plastikküvetten aufgeteilt. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte die Zugabe der vorbereiteten NADPH-Lösung.

Bei der Umsetzung von Fettsäuren wurde die Lösung nach Beendigung der Reaktion mit Salzsäure (5 M) bis zu einem pH-Wert von 2 angesäuert. Die dabei ausfallenden Fettsäuren bzw. hydroxylierten Fettsäuren führen zu einer sichtbaren Trübung der Lösung. Danach wurde zweimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert und über Na-

triumsulfat getrocknet. Nach der Filtration über einen Faltenfilter erfolgte die Entfernung des Dichlormethans durch Eindampfen mit Stickstoff. Der verbliebene weiße Feststoff wurde dann wieder in 100 µl Dichlormethan aufgenommen und für die GC-Analyse verwendet.

Bei der Umsetzung von *n*-Octan wurde direkt nach Beendigung der Reaktion zweimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert, eingeengt und mit wenig Magnesiumsulfat getrocknet. Danach wurde mit Stickstoff bis auf etwa 100 µl eingedampft und die Lösung direkt zur GC-Analyse verwendet.

### 5.8.6 Gaschromatographische Analyse

#### *a) Theoretische Grundlagen*

Die Gaschromatographie ist ein Verfahren zur Trennung flüchtiger Verbindungen, die in einem Gasstrom durch die in einem langen, dünnen Rohr fixierte stationäre Phase strömen. Das Trägergas (z.B. Stickstoff, Helium, Wasserstoff oder Argon) übernimmt dabei den Transport der eingespritzten Mischung. Grundvoraussetzung für eine Trennung ist, dass die einzelnen Komponenten von der stationären Phase gelöst oder adsorbiert werden und die Phase abhängig von den chemischen Eigenschaften der Komponente als Löse- oder Adsorptionsmittel wirkt. Die verschiedenen Komponenten werden von der Phase somit mehr oder weniger stark zurückgehalten (retardiert) und erreichen den sich am Ende der Säule befindlichen Detektor dementsprechend nach kürzerer oder längerer Strömungszeit des Trägergases.

In der GC unterscheidet man zwischen stationären Phasen aus Feststoffen (adsorbierend) und nichtflüchtigen, viskosen Flüssigkeiten (solvatisierend) und weiterhin zwischen gepackten Säulen und Kapillarsäulen. Gepackte Säulen weisen dabei Innendurchmesser (ID) über 1 mm und Längen von 2 – 3 m auf, Kapillarsäulen solche von 0,2 – 0,3 mm ID bzw. 25 – 100 m Länge.

Durch Temperaturprogrammierung, d.h. die kontrollierte Veränderung der Säulentemperatur während der GC-Analyse, kann für jede einzelne Fraktion der optimale

Siedebereich erzielt werden, so dass für jede Komponente des Gemisches ausgeprägte, im Idealfall vollständig abgetrennte Peaks resultieren.

Ein sehr häufig eingesetzter Detektor ist der Flammenionisationsdetektor (FID). Dabei wird der durch die Ionisation der Moleküle in einer Wasserstoffflamme (Brenngas Wasserstoff und synthetische Luft) resultierende Ionenstrom gemessen, verstärkt und registriert. Der FID ist ein universeller, unspezifischer Detektor mit Eignung für quantitative Messungen, das Signal ist umso größer, je mehr Substanz pro Zeiteinheit in der Flamme ionisiert wird. Die quantitative Bestimmung erfolgt dabei über zuvor eingewogene Standards.

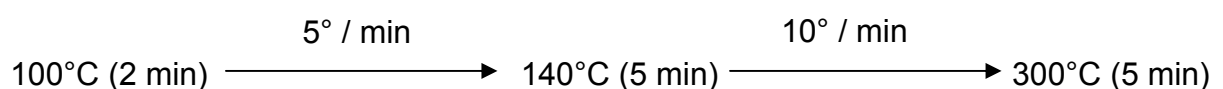
#### *b) Durchführung der GC-Analysen*

Zur Analyse wurden Edukte und Produkte der Fettsäurehydroxylierungsreaktionen mit MSHFBA silyliert. Dabei werden alle Hydroxyl- und Säuregruppen in die entsprechenden Trimethylsilylether bzw. -ester umgewandelt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probe wasserfrei ist, da es sonst zu Nebenreaktionen mit dem Silylierungsagens kommt. Zu 10 µl der hydroxyfettsäurehaltigen Dichlormethan-Lösung wurden 15 µl MSHFBA pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Eindampfen und Zugabe von 25 µl Dichlormethan erfolgte die GC-Analyse. Dazu wurde 1 µl der silylierten Proben in den Gaschromatographen eingespritzt. Injektor- und Detektortemperatur lagen bei 300°C. Folgende Temperaturprogramme wurden verwendet:

Edukt Caprylsäure



Edukt Caprinsäure



Edukt Laurinsäure

100°C (2 min)  $\xrightarrow{5^\circ / \text{min}}$  170°C (5 min)  $\xrightarrow{10^\circ / \text{min}}$  300°C (5 min)

Edukt Palmitinsäure

100°C (2 min)  $\xrightarrow{5^\circ / \text{min}}$  215°C (5 min)  $\xrightarrow{10^\circ / \text{min}}$  300°C (5 min)

Bei der Analyse von octan- und octanolhaltigen Lösungen kann auf die Silylierung verzichtet werden. 1  $\mu\text{l}$  der Dichlormethan-Lösung wurde direkt nach der Präparation in den Gaschromatographen eingespritzt.

Edukt *n*-Octan

45°C (5 min)  $\xrightarrow{2^\circ / \text{min}}$  100°C  $\xrightarrow{10^\circ / \text{min}}$  250°C (5 min)

## 5.9 High-Throughput-Screening

### 5.9.1 Aktivitätsbestimmung in Mikrotiterplatten

Vor dem eigentlichen Screening mit dem ADH-Assay wurden die aktiven P450-Enzymvarianten durch eine Aktivitätsbestimmung selektiert. 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes aus dem Zellaufschluss wurden mit 75  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung, bestehend aus 58  $\mu\text{l}$  Aktivitätstestpuffer II, 1  $\mu\text{l}$  *n*-Octan-Lösung (50 mM in DMSO) und 16  $\mu\text{l}$  NADPH-Lösung (3 mM), pro Vertiefung versetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Messung der Absorption bei 340 nm alle 60 min verfolgt.

### 5.9.2 Screening mit dem ADH-Assay

Das Screening kann direkt im Anschluss an die Biotransformation erfolgen, sobald die Absorption bei 340 nm durch Erreichen der Nulllinie das Ende der Reaktion anzeigt. Zu den 125  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung aus der Hydroxylierung wurde das Nachweis-

reagens, bestehend aus 90  $\mu\text{l}$  ADH-Puffer, 5  $\mu\text{l}$  ADH-Lösung (300 U/ml) und 5  $\mu\text{l}$  NAD-Lösung (20 mM), direkt zugegeben. Die Nachweisreaktion ist je nach Menge des in der vorangegangenen Biotransformation gebildeten 1-Octanols nach längstens 10 min beendet. Um die maximale Zunahme der  $\text{OD}_{340}$  bei Vorhandensein von 2-Octanol als unerwünschtem Nebenprodukt zu bestimmen, wurden vier Vertiefungen pro Platte mit einer 2-Octanol-produzierenden Enzymmutante versehen. Die Werte dieser Vertiefungen zeigen somit den Nullwert für die Nachweisreaktion an.



## 6 Literaturverzeichnis

- Aitio, A. (1978): A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal Biochem* 85, 488-91.
- Amet, Y., Berthou, F., Menez, J.F. (1996): Simultaneous radiometric and fluorimetric detection of lauric acid metabolites using high-performance liquid chromatography following esterification with 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin in human and rat liver microsomes. *J Chromatogr B Biomed Appl* 681, 233-9.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegeman, J.J., Schwager, C., Zenke, M. (1987): Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 15, 4593-4602.
- Appel, D., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schwaneberg, U., Schmid, R.D. (2001): A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *J Biotechnol* 88, 167-71.
- Arnold, F.H., Moore, J.C. (1997): Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58, 1-14.
- Arnold, F.H. (1998): Design by directed evolution. *Acc Chem Res* 31, 125-131.
- Arnold, F.H., Volkov, A.A. (1999): Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 3, 54-9.
- Arnold, F.H. (2001): Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409, 253-7.
- Barnes, H.J., Arlotto, M.P., Waterman, M.R. (1991): Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17  $\alpha$ -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5597-601.
- Barton, D.H.R., Kalley, F., Ozabolik, N., Young, E., Balavoine, G. (1989): Functionalization of Saturated Hydrocarbons. 14. Further Studies on the Mechanism of Gif-Type Systems. *J Am Chem Soc* 111, 7144-7149.

- Battersby, B.J., Trau, M. (2002): Novel miniaturized systems in high-throughput screening. *Trends Biotechnol* 20, 167-73.
- Bell, S.G., Stevenson, J.A., Boyd, H.D., Campbell, S., Riddle, A.D., Orton, E.L., Wong, L.L. (2002): Butane and propane oxidation by engineered cytochrome P450cam. *Chem Commun (Camb)* 490-1.
- Bell, S.G., Chen, X., Sowden, R.J., Xu, F., Williams, J.N., Wong, L.L., Rao, Z. (2003): Molecular recognition in (+)- $\alpha$ -pinene oxidation by cytochrome P450cam. *J Am Chem Soc* 125, 705-14.
- Berg, D., Plempel, M., Buchel, K.H., Holmwood, G., Stroech, K. (1988): Sterol biosynthesis inhibitors. Secondary effects and enhanced in vivo efficacy. *Ann N Y Acad Sci* 544, 338-47.
- Bernt, E., Gutmann, I. (1974): Äthanol - Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methoden der enzymatischen Analyse*; 3., neubearbeitete und erweiterte Auflage. VCH, Weinheim.
- Black, S.D., Linger, M.H., Freck, L.C., Kazemi, S., Galbraith, J.A. (1994): Affinity isolation and characterization of cytochrome P450 102 (BM-3) from barbiturate-induced *Bacillus megaterium*. *Arch Biochem Biophys* 310, 126-33.
- Boddupalli, S.S., Estabrook, R.W., Peterson, J.A. (1990): Fatty acid monooxygenation by cytochrome P-450BM-3. *J Biol Chem* 265, 4233-9.
- Bornscheuer, U.T. (1998): Directed evolution of enzymes. *Angewandte Chemie-International Edition* 37, 3105-3108.
- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., Meyer, H.H. (1998): Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones. *Biotechnol Bioeng* 58, 554-9.
- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., Meyer, H.H. (1999): Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg Med Chem* 7, 2169-73.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. (1999): *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim.

- Bornscheuer, U.T. (2000): Directed evolution of enzymes. *Chim Oggi / Chem Today* 18, 65-67.
- Bornscheuer, U.T. (2001): Directed evolution of enzymes for biocatalytic applications. *Biocatalysis and Biotransformation* 19, 85-97.
- Bornscheuer, U.T., Pohl, M. (2001): Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr Opin Chem Biol* 5, 137-43.
- Brock, B.J., Waterman, M.R. (2000): The use of random chimeragenesis to study structure/function properties of rat and human P450c17. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 401-408.
- Burgschat, H., Netter, K.J. (1977): Application of A. C.-polarography in a study of p-nitroanisole metabolism and its kinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 201, 482-9.
- Burton, S.G., Cowan, D.A., Woodley, J.M. (2002): The search for the ideal biocatalyst. *Nat Biotechnol* 20, 37-45.
- Cadwell, R.C., Joyce, G.F. (1992): Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* 2, 28-33.
- Capdevila, J.H., Wei, S., Helvig, C., Falck, J.R., Belosludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S.E., Peterson, J.A. (1996): The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3. *J Biol Chem* 271, 22663-71.
- Carmichael, A.B., Wong, L.L. (2001): Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur J Biochem* 268, 3117-25.
- Carrea, G., Riva, S. (2000): Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese. *Angew Chem* 112, 2312-2341.
- Champion, P.M. (1989): Elementary Electronic Excitations and the Mechanism of Cytochrome-P450. *Journal of the American Chemical Society* 111, 3433-3434.

- Cheng, D., Kelley, R.W., Cawley, G.F., Backes, W.L. (2004): High-level expression of recombinant rabbit cytochrome P450 2E1 in *Escherichia coli* C41 and its purification. *Protein Expr Purif* 33, 66-71.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-2175.
- Cirino, P.C., Arnold, F.H. (2002): Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant F87A in reactions driven by hydrogen peroxide. *Advanced Synthesis & Catalysis* 344, 932-937.
- Cirino, P.C., Arnold, F.H. (2003): A Self-Sufficient Peroxide-Driven Hydroxylation Biocatalyst. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 3299-3301.
- Clausen, I.G. (1997): Aspects in lipase screening. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 3, 139-146.
- Coon, M.J., Vaz, A.D., Bestervelt, L.L. (1996): Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *Faseb J.* 10, 428-434.
- Cowart, L.A., Falck, J.R., Capdevila, J.H. (2001): Structural determinants of active site binding affinity and metabolism by cytochrome P450 BM-3. *Arch Biochem Biophys* 387, 117-24.
- Cupp-Vickery, J.R., Poulos, T.L. (1995): Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. *Nat Struct Biol* 2, 144-53.
- Delcarte, J., Fauconnier, M.L., Jacques, P., Matsui, K., Thonart, P., Marlier, M. (2003): Optimisation of expression and immobilized metal ion affinity chromatographic purification of recombinant (His)(6)-tagged cytochrome P450 hydroperoxide lyase in *Escherichia coli*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 786, 229-36.
- DeLuca, J.G., Dysart, G.R., Rasnick, D., Bradley, M.O. (1988): A direct, highly sensitive assay for cytochrome P-450 catalyzed O-deethylation using a novel coumarin analog. *Biochem Pharmacol* 37, 1731-9.

- Di Primo, C., Deprez, E., Hoa, G.H., Douzou, P. (1995): Antagonistic effects of hydrostatic pressure and osmotic pressure on cytochrome P-450cam spin transition. *Biophys J* 68, 2056-61.
- Dingler, C., Ladner, W., Krei, G., Cooper, B., Hauer, B. (1996): Preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxypropionic acid by biotransformation. *Pestic Sci* 46, 33-35.
- Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., Pompon, D. (1998): Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol* 16, 186-9.
- Durst, F., O'Keefe, D.P. (1995): Plant cytochromes P450: an overview. *Drug Metabol Drug Interact* 12, 171-87.
- England, P.A., Harford-Cross, C.F., Stevenson, J.A., Rouch, D.A., Wong, L.L. (1998): The oxidation of naphthalene and pyrene by cytochrome P450cam. *FEBS Lett* 424, 271-4.
- Estabrook, R.W., Faulkner, K.M., Shet, M.S., Fisher, C.W. (1996a): Applications of electrochemistry for P450-catalyzed reactions. *Methods Enzymol* 272, 44-51.
- Estabrook, R.W., Shet, M.S., Faulkner, K.M., Fisher, C.W. (1996b): The use of electrochemistry for the synthesis of 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone by a fusion protein containing P450c17. *Endocr res* 22, 665-671.
- Estabrook, R.W., Shet, M.S., Fisher, C.W., Jenkins, C.M., Waterman, M.R. (1996c): The interaction of NADPH-P450 reductase with P450: an electrochemical study of the role of the flavin mononucleotide-binding domain. *Arch Biochem Biophys* 333, 308-315.
- Faber, K. (2000): Biotransformations in Organic Chemistry, 4. Aufl., Springer, Berlin.
- Farinas, E.T., Bulter, T., Arnold, F.H. (2001a): Directed enzyme evolution. *Curr Opin Biotechnol* 12, 545-51.
- Farinas, E.T., Schwaneberg, U., Glieder, A., Arnold, F.H. (2001b): Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. *Advanced synthesis and catalysis* 343(6+7), 601-606.

- Faulkner, K.M., Shet, M.S., Fisher, C.W., Estabrook, R.W. (1995): Electrocatalytically driven  $\omega$ -hydroxylation of fatty acids using cytochrome P450 4A1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7705-9.
- Feenstra, K.A., Starikow, J., Commandeur, J., Vermeulen, N.P. (2002): Rationalisation and prediction of substrate specificities and regio-selectivities of CYP102 and mutants. *Unveröffentlichte Daten*.
- Feyereisen, R. (1999): Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 44, 507-33.
- Fisher, C.W., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H., Watterman, M.R., Estabrook, R.W. (1992): High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*. *Faseb J* 6, 759-64.
- Fossey, J., Lefort, D., Massoudi, M., Nedelec, J.Y., Sorba, J. (1985): Regioselectivity and Stereoselectivity of Homolytic Hydroxylation of Hydrocarbons Using Benzoic Peracid. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 63, 678-680.
- Freeman, M., Baehler, C., Spotts, S. (1990): Automated laser-fluorescence sequencing. *Bio/Technology* 8, 147-148.
- French, K.J., Rock, D.A., Manchester, J.I., Goldstein, B.M., Jones, J.P. (2002): Active site mutations of cytochrome p450cam alter the binding, coupling, and oxidation of the foreign substrates (R)- and (S)-2-ethylhexanol. *Arch Biochem Biophys* 398, 188-97.
- Fuziwara, S., Sagami, I., Rozhkova, E., Craig, D., Noble, M.A., Munro, A.W., Chapman, S.K., Shimizu, T. (2002): Catalytically functional flavocytochrome chimeras of P450BM3 and nitric oxide synthase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91, 515-526.
- Gellissen, G., Hollenberg, C.P. (1997): Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review. *Gene* 190, 87-97.

- Gilardi, G., Meharena, Y.T., Tsotsou, G.E., Sadeghi, S.J., Fairhead, M., Giannini, S. (2002): Molecular Lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology. *Biosens Bioelectron* 17, 133-45.
- Gill, I. (2001): Bio-doped Nanocomposite Polymers: Sol-Gel Bioencapsulates. *Chem Mater* 13, 3404-3421.
- Gillam, E.M., Baba, T., Kim, B.R., Ohmori, S., Guengerich, F.P. (1993): Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 305, 123-31.
- Giver, L., Arnold, F.H. (1998): Combinatorial protein design by in vitro recombination. *Curr Opin Chem Biol* 2, 335-8.
- Glieder, A., Farinas, E.T., Arnold, F.H. (2002): Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol* 20, 1135-9.
- Goldstein, J.A., Faletto, M.B. (1993): Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 100, 169-76.
- Gonzalez, F.J., Nebert, D.W. (1990): Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6, 182-6.
- Gonzalez, F.J. (1992): Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 13, 346-52.
- Gonzalez, F.J., Korzekwa, K.R. (1995): Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 369-90.
- Govindaraj, S., Poulos, T.L. (1995): Role of the linker region connecting the reductase and heme domains in cytochrome P450BM-3. *Biochemistry* 34, 11221-6.
- Govindaraj, S., Poulos, T.L. (1996): Probing the structure of the linker connecting the reductase and heme domains of cytochrome P450BM-3 using site-directed mutagenesis. *Protein Sci* 5, 1389-93.
- Govindaraj, S., Poulos, T.L. (1997): The domain architecture of cytochrome P450BM-3. *J Biol Chem* 272, 7915-21.

- Guengerich, F.P. (2001): Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14, 611-650.
- Gustafsson, M.C., Palmer, C.N., Wolf, C.R., von Wachenfeldt, C. (2001): Fatty-acid-displaced transcriptional repressor, a conserved regulator of cytochrome P450 102 transcription in *Bacillus* species. *Arch Microbiol* 176, 459-64.
- Gustafsson, M.C., Roitel, O., Marshall, K.R., Noble, M.A., Chapman, S.K., Pesssegueiro, A., Fulco, A.J., Cheesman, M.R., von Wachenfeldt, C., Munro, A.W. (2004): Expression, purification, and characterization of *Bacillus subtilis* cytochromes P450 CYP102A2 and CYP102A3: flavocytochrome homologues of P450 BM3 from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 43, 5474-87.
- Haines, D.C., Tomchick, D.R., Machius, M., Peterson, J.A. (2001): Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry* 40, 13456-65.
- Harford-Cross, C.F., Carmichael, A.B., Allan, F.K., England, P.A., Rouch, D.A., Wong, L.-L. (2000): Protein engineering of cytochrome P450cam (CYP101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Prot. Eng.* 13, 121-128.
- Hasemann, C.A., Ravichandran, K.G., Peterson, J.A., Deisenhofer, J. (1994): Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 236, 1169-85.
- Hata, M., Hirano, Y., Hoshino, T., Tsuda, M. (2001): Monooxygenation mechanism by cytochrome p-450. *J Am Chem Soc* 123, 6410-6.
- Henke, E., Bornscheuer, U.T. (1999): Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol Chem* 380, 1029-33.
- Hollenberg, C.P., Gellissen, G. (1997): Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol* 8, 554-60.



- Hollmann, F., Witholt, B., Schmid, A. (2002):  $[\text{cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ : a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes. *J Mol Cat B* 791, 1-10.
- Holton, T.A. (1995): Modification of flower colour via manipulation of P450 gene expression in transgenic plants. *Drug Metabol Drug Interact* 12, 359-68.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A., Reetz, M.T. (2001): Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 519-30.
- Joo, H., Lin, Z., Arnold, F.H. (1999): Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature* 399, 670-3.
- Juchau, M.R. (1990): Substrate specificities and functions of the P450 cytochromes. *Life Sci* 47, 2385-94.
- Kaim, W., Schwederski, B. (1995): Bioanorganische Chemie, Teubner, Stuttgart.
- Kakác, B., Vejdelek, Z.J. (1974): Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen, Bd 1, VCH, Weinheim.
- Kakác, B., Vejdelek, Z.J. (1977): Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen, 1. Ergänzungsband, VCH, Weinheim, New York.
- Kakác, B., Vejdelek, Z.J. (1983): Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen, 2. Ergänzungsband, VCH, Weinheim, Deerfield Beach, Basel.
- Kamataki, T., Kitada, M., Shigematsu, H., Kitagawa, H. (1979): The involvement of cytochrome P-488 and P-450 in NADH-dependent O-demethylation of p-nitroanisole in rat liver microsomes. *Jpn J Pharmacol* 29, 191-201.
- Khosla, C., Harbury, P.B. (2001): Modular enzymes. *Nature* 409, 247-52.
- Klibanov, A.M. (2001): Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409, 241-246.
- Klingenberg, M. (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75, 376-386.

- Klotz, A.V., Stegeman, J.J., Walsh, C. (1984): An alternative 7-ethoxyresorufin O-deethylase activity assay: a continuous visible spectrophotometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Anal Biochem* 140, 138-45.
- Koch, J.A., Waxmann, D.J. (1991): P450 Phosphorylation in isolated hepatocytes and in vivo. *Methods Enzymol.* 206, 305-15.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2001): Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409, 232-240.
- Koo, L.S., Immoos, C.E., Cohen, M.S., Farmer, P.J., Ortiz De Montellano, P.R. (2002): Enhanced Electron Transfer and Lauric Acid Hydroxylation by Site-Directed Mutagenesis of CYP119. *J Am Chem Soc* 124, 5684-91.
- Kuhn-Velten, W.N. (1996): Rapid down-regulation of testicular androgen biosynthesis at increased environmental temperature is due to cytochrome P450c17 (CYP17) thermolability in Leydig cells, but not in endoplasmic reticulum membranes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104, 243-9.
- Kulprecha, S., Ueda, T., Nihira, T., Yoshida, T., Taguchi, H. (1985): Optimum conditions for ursodeoxycholic acid production from lithocholic acid by *Fusarium equiseti* M41. *Appl Environ Microbiol* 49, 338-44.
- Kunkel, T.A. (1985): Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 488-92.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoff, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B.,

- Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mael, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., et al. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Kupfer, D., Holm, K.A. (1989): Prostaglandin Metabolism by Hepatic Cytochrome-P-450. *Drug Metabolism Reviews* 20, 753-764.
- Kuwahara, S., Omura, T. (1980): Different requirement for cytochrome b5 in NADPH-supported O-deethylation of p-nitrophenetole catalyzed by two types of microsomal cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* 96, 1562-8.
- Ladner, W., Staudenmaier, H.R., Hauer, B., Müller, U., Pressler, U., Meyer, J., Siegel, H. (1995): Process for the hydroxylation of aromatic acids using strains of the fungus *Beauveria*, US Patent. BASF Aktiengesellschaft.
- Lämmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, D.S., Yamada, A., Matsunaga, I., Ichihara, K., Adachi, S., Park, S.Y., Shiro, Y. (2002): Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of fatty-acid hydroxylase cytochrome P450BS $\beta$  from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 687-9.
- Lee, T.R., Hsu, H.P., Shaw, G.C. (2001): Transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* bscR-CYP102A3 operon by the BscR repressor and differential induction of cytochrome CYP102A3 expression by oleic acid and palmitate. *J Biochem (Tokyo)* 130, 569-74.
- Lentz, O., Li, Q.-S., Schwaneberg, U., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schmid, R.D. (2001): Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450BM-3 from

- Bacillus megaterium* by directed evolution: a validated assay. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 15, 123-133.
- Leung, D.W., Chen, E., Goeddel, D.V. (1989): A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1, 11-15.
- Lewis, D.F.: Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism. In: Lewis, D.F. (Ed.), *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism*. Taylor and Francis Ltd., London, 1996, pp. 115-167.
- Li, H., Poulos, T.L. (1997): The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol* 4, 140-6.
- Li, Q.S., Ogawa, J., Schmid, R.D., Shimizu, S. (2001): Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 67, 5735-9.
- Li, Q.-S., Schwaneberg, U., Fischer, P., Schmid, R.D. (2000): Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chem. Eur. J.* 6, 1481-1486.
- Li, Y.C., Chiang, J.Y.L. (1991): The Expression of a Catalytically Active Cholesterol 7- $\alpha$ -Hydroxylase Cytochrome-P450 in *Escherichia-Coli*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 19186-19191.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2000): *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Lippard, S.J., Berg, J.M. (1995): *Bioanorganische Chemie*, Spektrum-Verlag, Heidelberg.
- Loida, P.J., Sligar, S.G. (1993): Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry* 32, 11530-8.
- Mansuy, D., Battioni, P. (1989): Alkane Functionalization by Cytochromes P-450 and by Model Systems Using O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in: Hill, C.L. (Ed.), *Activation and functionalization of alkanes*. Wiley, New York.

- Marrs, B., Delagrave, S., Murphy, D. (1999): Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2, 241-5.
- Matsunaga, I., Ueda, A., Fujiwara, N., Sumimoto, T., Ichihara, K. (1999): Characterization of the *ybdT* gene product of *Bacillus subtilis*: novel fatty acid  $\beta$ -hydroxylating cytochrome P450. *Lipids* 34, 841-6.
- Mauersberger, S., Schunck, W.H., Muller, H.H. (1981): The induction of cytochrome P-450 in *Lodderomyces elongisporus*. *Z Allg Mikrobiol* 21, 313-21.
- Maurer, S.C., Schulze, H., Schmid, R.D., Urlacher, V. (2003): Immobilisation of P450BM-3 and an NADP(+) cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* 345, 802-810.
- Mayer, R.T., Netter, K.J., Heubel, F., Buchheister, A., Burke, M.D. (1989): Fluorometric assay of hepatic microsomal monooxygenases by use of 7-methoxyquinoline. *Biochem Pharmacol* 38, 1364-8.
- McLean, K.J., Cheesman, M.R., Rivers, S.L., Richmond, A., Leys, D., Chapman, S.K., Reid, G.A., Price, N.C., Kelly, S.M., Clarkson, J., Smith, W.E., Munro, A.W. (2002): Expression, purification and spectroscopic characterization of the cytochrome P450 CYP121 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Inorg Biochem* 91, 527-41.
- McLean, M.A., Maves, S.A., Weiss, K.E., Krepich, S., Sligar, S.G. (1998): Characterization of a cytochrome P450 from the acidothermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 166-172.
- Mendez, J.F., Machu, T.K., Sony, B.J., Deitrich, R.A. (1993): Phosphorylation of cytochrome P450E1 (CYP2E1) by calmodulin-dependent protein kinase, protein kinase C, and cAMP dependent protein kinase. *Alcohol* 28, 445-51.
- Miles, J.S., Munro, A.W., Rospendowski, B.N., Smith, W.E., McKnight, J., Thomson, A.J. (1992): Domains of the catalytically self-sufficient cytochrome P-450 BM-3. Genetic construction, overexpression, purification and spectroscopic characterization. *Biochem J* 288 ( Pt 2), 503-9.

- Miura, Y., Fulco, A.J. (1975):  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim Biophys Acta* 388, 305-17.
- Mühlhardt, C. (2000): Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51, 263-273.
- Munro, A.W., Daff, S., Coggins, J.R., Lindsay, J.G., Chapman, S.K. (1996): Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains. *Eur J Biochem* 239, 403-9.
- Nakahara, K., Shoun, H., Adachi, S., Iizuka, T., Shiro, Y. (1994): Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of nitric oxide reductase cytochrome P450nor from *Fusarium oxysporum*. *J Mol Biol* 239, 158-9.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J. (1986): Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 261, 7160-9.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J. (1987): Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 262, 6683-90.
- Nebert, D.W., Gonzalez, F.J. (1987): P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56, 945-93.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Feyereisen, R. (1989): Evolution of the cytochrome P450 genes. *Xenobiotica* 19, 1149-60.
- Nelson, D.R., Strobel, H.W. (1987): Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Mol Biol Evol* 4, 572-93.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., et al.

- (1993): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12, 1-51.
- Newcomb, M., Toy, P.H. (2000): Hypersensitive radical probes and the mechanisms of cytochrome P450-catalyzed hydroxylation reactions. *Accounts of Chemical Research* 33, 449-455.
- Nickerson, D.P., Harford-Cross, C.F., Fulcher, S.R., Wong, L.L. (1997): The catalytic activity of cytochrome P450cam towards styrene oxidation is increased by site-specific mutagenesis. *FEBS Lett* 405, 153-6.
- Nishihara, H., Okamura, T., Schmid, R.D., Hauck, A., Reuss, M. (1997): Biotechnological potential of P450 monooxygenases high-level production of bovine cytochrome P450c17 monooxygenase during medium cell density culture of a recombinant yeast, *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18 (YEp-Toku1). *J Biotechnol* 56, 57-61.
- Noble, M.A., Quaroni, L., Chumanov, G.D., Turner, K.L., Chapman, S.K., Hanzlik, R.P., Munro, A.W. (1998): Imidazolyl carboxylic acids as mechanistic probes of flavocytochrome P-450 BM3. *Biochemistry* 37, 15799-807.
- Ohkawa, H., Yabusaki, Y., Sakaki, T., Murakami, H., Shibata, M. (1990): Hydroxylation reactions by recombinant yeast cells expressing P450 monooxygenases. *Ann N Y Acad Sci* 613, 37-43.
- Oliver, C.F., Modi, S., Primrose, W.U., Lian, L.Y., Roberts, G.C. (1997a): Engineering the substrate specificity of *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM3: hydroxylation of alkyl trimethylammonium compounds. *Biochem J* 327 ( Pt 2), 537-44.
- Oliver, C.F., Modi, S., Sutcliffe, M.J., Primrose, W.U., Lian, L.Y., Roberts, G.C. (1997b): A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regiospecificity of hydroxylation. *Biochemistry* 36, 1567-72.
- Olsen, M., Iverson, B., Georgiou, G. (2000): High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr Opin Biotechnol* 11, 331-7.

- Omura, T., Sato, R. (1964): The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 239, 2370-8.
- Oprea, T.I., Hummer, G., Garcia, A.E. (1997): Identification of a functional water channel in cytochrome P450 enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2133-8.
- Ortiz de Montellano, P.R.E. (1995): Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, in: Ortiz de Montellano, P.R.E. (Ed.). Plenum Press, New York.
- Ost, T.W., Miles, C.S., Murdoch, J., Cheung, Y., Reid, G.A., Chapman, S.K., Munro, A.W. (2000): Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3. *FEBS Lett* 486, 173-7.
- Ostermeier, M., Shim, J.H., Benkovic, S.J. (1999): A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat Biotechnol* 17, 1205-9.
- Parikh, A., Guengerich, F.P. (1997): Expression, purification, and characterization of a catalytically active human cytochrome P450 1A2:rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Protein Expr Purif* 9, 346-54.
- Park, S.Y., Shimizu, H., Adachi, S., Shiro, Y., Iizuka, T., Nakagawa, A., Tanaka, I., Shoun, H., Hori, H. (1997): Crystallization, preliminary diffraction and electron paramagnetic resonance studies of a single crystal of cytochrome P450nor. *Febs Letters* 412, 346-350.
- Park, S.Y., Yamane, K., Adachi, S., Shiro, Y., Weiss, K.E., Sligar, S.G. (2000): Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a cytochrome P450 (CYP119) from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56, 1173-5.
- Peters, M.W., Meinhold, P., Glieder, A., Arnold, F.H. (2003): Regio- and Enantioselective Alkane Hydroxylation with Engineered Cytochromes P450 BM-3. *J Am Chem Soc* 125, 13442-13450.
- Peterson, J.A., Graham, S. E. (1998): A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure* 6, 1079-85.



- Picataggio, S., Rohrer, T., Deanda, K., Lanning, D., Reynolds, R., Mielenz, J., Eirich, L.D. (1992): Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. *Biotechnology (N Y)* 10, 894-8.
- Piontek, M., Hagedorn, J., Hollenberg, C.P., Gellissen, G., Strasser, A.W. (1998): Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 331-8.
- Podust, L.M., Poulos, T.L., Waterman, M.R. (2001): Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3068-73.
- Podust, L.M., Kim, Y., Arase, M., Neely, B.A., Beck, B.J., Bach, H., Sherman, D.H., Lamb, D.C., Kelly, S.L., Waterman, M.R. (2003): The 1.92-Å-structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) CYP154C1. A new monooxygenase that functionalizes macrolide ring systems. *J Biol Chem* 278, 12214-21.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J. (1987): High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* 195, 687-700.
- Powell, K.A., Ramer, S.W., Del Cardayre, S.B., Stemmer, W.P., Tobin, M.B., Longchamp, P.F., Huisman, G.W. (2001): Directed Evolution and Biocatalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 3948-3959.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336-341.
- Ravichandran, K.G., Boddupalli, S.S., Hasermann, C.A., Peterson, J.A., Deisenhofer, J. (1993): Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* 261, 731-6.
- Reetz, M.T. (2000): Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis. *Sci Prog* 83, 157-172.

- Reetz, M.T., Wilensek, S., Zha, D., Jaeger, K.E. (2001a): Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 3589-3591.
- Reetz, M.T., Kuhling, K.M., Wilensek, S., Husmann, H., Hausig, U.W., Hermes, M. (2001b): A GC-based method for high-throughput screening of enantio selective catalysts. *Catalysis Today* 67, 389-396.
- Rock, D., Jones, J.P. (2001): Inexpensive purification of P450 reductase and other proteins using 2',5'-adenosine diphosphate agarose affinity columns. *Protein Expr Purif* 22, 82-3.
- Rondon, M.R., Goodman, R.M., Handelsman, J. (1999): The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol* 17, 403-9.
- Saha, B.C., Demirjian, D.C. (2001): Advances in enzyme development and applied industrial biocatalysis. *ACS Symp Ser* 776.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saiki, R., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakaki, T., Shibata, M., Yabusaki, Y., Murakami, H., Ohkawa, H. (1989): Expression of bovine cytochrome P450C17 cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* 8, 409-18.
- Salazar, O., Cirino, P.C., Arnold, F.H. (2003): Thermostabilization of a Cytochrome P450 Peroxygenase. *ChemBiochem* 4, 891-893.
- Sallam, L., Naim, N., Zeinel-Abdin Badr, A., El-Refai, A. (1977): Bioconversion of progesterone with cell preparations with *Aspergillus niger* 171. *Rev Latinoam Microbiol* 19, 151-3.
- Sambrook, J., Russell, D.W.: Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 703-708.
- Sawyer, D.T. (1987): The nature of the bonding and valency for oxygen in its metal compounds. *Comments Inorg Chem* 6, 103 -110.
- Scheller, U., Zimmer, T., Kargel, E., Schunck, W.H. (1996): Characterization of the n-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4. *Arch Biochem Biophys* 328, 245-54.
- Schlegel, H.G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie, 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., Sligar, S.G. (2000): The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* 287, 1615-22.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258-68.
- Schmid, R.D. (2002): Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, Wiley-VCH, Weinheim.
- Schmidt-Dannert, C. (2001): Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses. *Biochemistry* 40, 13125-36.
- Schneider, S., Wubbolts, M.G., Sanglard, D., Witholt, B. (1998): Biocatalyst engineering by assembly of fatty acid transport and oxidation activities for In vivo application of cytochrome P-450BM-3 monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 64, 3784-90.
- Schwaneberg, U. (1999): Entwicklung eines in vitro Cytochrom P450 CYP102 (BM-3) Enzym-Membran-Reaktors, GCA, Herdecke.
- Schwaneberg, U., Sprauer, A., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R.D. (1999a): P450 monooxygenase in biotechnology. I. Single-step, large-scale purification method for cytochrome P450 BM-3 by anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 848, 149-59.

- Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., Schmid, R.D. (1999b): A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Anal Biochem* 269, 359-66.
- Schwaneberg, U., Otey, C., Cirino, P.C., Farinas, E., Arnold, F.H. (2001): Cost-effective whole-cell assay for laboratory evolution of hydroxylases in *Escherichia coli*. *J Biomol Screen* 6, 111-7.
- Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A., Poulos, T.L. (1999): Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1863-8.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L., Arnold, F.H. (1998): Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res* 26, 681-3.
- Shigematsu, H., Yamano, S., Yoshimura, H. (1976): NADH-dependent O-deethylation of p-nitrophenetole with rabbit liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 173, 178-86.
- Shimizu, S., Ogawa, J., Kataoka, M., Kobayashi, M. (1997): Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58, 45-87.
- Shiota, N., Nagasawa, A., Sakaki, T., Yabusaki, Y., Ohkawa, H. (1994): Herbicide-Resistant Tobacco Plants Expressing the Fused Enzyme between Rat Cytochrome P4501A1 (Cyp1A1) and Yeast NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase. *Plant Physiology* 106, 17-23.
- Short, J.M. (1997): Recombinant approaches for accessing biodiversity. *Nat Biotechnol* 15, 1322-3.
- Sideso, O., Williams, R.A., Welch, S.G., Smith, K.E. (1998): Progesterone 6-hydroxylation is catalysed by cytochrome P-450 in the moderate thermophile *Bacillus thermoglucosidasius* strain 12060. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 67, 163-169.
- Simpson, A.E. (1997): The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol* 28, 351-9.

- Sone, T., Isobe, M., Takabatake, E., Ozawa, N., Watabe, T. (1989): 7-ethenyloxycoumarin as a new substrate for fluorophotometric assay of hepatic microsomal epoxidizing activities. *J Pharmacobiodyn* 12, 149-58.
- Spee, J.H., de Vos, W.M., Kuipers, O.P. (1993): Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res* 21, 777-8.
- Stemmer, W.P. (1994a): DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10747-51.
- Stemmer, W.P. (1994b): Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370, 389-91.
- Stevenson, J.-A., Westlake, A.C.G., Whittock, C., Wong, L.-L. (1996): The Catalytic Oxidation of Linear and Branched Alkanes by Cytochrome P450cam. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12846-12847.
- Stok, J.E., De Voss, J. (2000): Expression, purification, and characterization of Biol: a carbon-carbon bond cleaving cytochrome P450 involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Biochem Biophys* 384, 351-60.
- Sutherland, J.D. (2000): Evolutionary optimisation of enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 4, 263-9.
- Tindall, K.R., Kunkel, T.A. (1988): Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27, 6008-6013.
- Tishkov, V.I., Galkin, A.G., Fedorchuk, V.V., Savitsky, P.A., Rojkova, A.M., Gieren, H., Kula, M.R. (1999): Pilot scale production and isolation of recombinant NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-specific formate dehydrogenases. *Biotechnol Bioeng* 64, 187-93.
- Tobin, M.B., Gustafsson, C., Huisman, G.W. (2000): Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struct Biol* 10, 421-7.

- Tsotsou, G.E., Cass, A.E., Gilardi, G. (2002): High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens Bioelectron* 17, 119-31.
- Vartanian, J.P., Henry, M., Wain-Hobson, S. (1996): Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions. *Nucleic Acids Res* 24, 2627-31.
- Vorderwülbecke, T., Kieslich, K., Erdmann, H. (1992): Comparison of Lipases by Different Assays. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 631-639.
- Wada, A., Mathew, P.A., Barnes, H.J., Sanders, D., Estabrook, R.W., Waterman, M.R. (1991): Expression of functional bovine cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (P450<sub>scc</sub>) in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 290, 376-80.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., Terwilliger, T.C. (1999): Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17, 691-5.
- Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S.S., Kim, J.J.P. (1997): Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8411-8416.
- Waterman, M.R. (1993): Heterologous expression of cytochrome P450 in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 21, 1081-1085.
- Weijers, C.A., de Haan, A., de Bont, J.A. (1988): Microbial production and metabolism of epoxides. *Microbiol Sci* 5, 156-9.
- Weissermel, K., Arpe, H.-J. (1997): Industrielle Organische Chemie, 5., vollständig überarbeitete Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R. (2000): Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1.
- White, R.F., Birnbaum, J., Meyer, R.T., ten Broeke, J., Chemerda, J.M., Demain, A.L. (1971): Microbial epoxidation of cis-propenylphosphonic to (-)-cis-1,2-epoxypropylphosphonic acid. *Appl Microbiol* 22, 55-60.

- Wigley, W.C., Stidham, R.D., Smith, N.M., Hunt, J.F., Thomas, P.J. (2001): Protein solubility and folding monitored in vivo by structural complementation of a genetic marker protein. *Nat Biotechnol* 19, 131-6.
- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., McRee, D.E. (2000): Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* 81, 183-90.
- Wong, T.S., Arnold, F.H., Schwaneberg, U. (2004): Laboratory evolution of cytochrome P450BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnology and Bioengineering* 85, 351-358.
- Yabusaki, Y. (1995): Artificial P450/reductase fusion enzymes: what can we learn from their structures? *Biochimie* 77, 594-603.
- Yamazaki, H., Inoue, K., Turvy, C.G., Guengerich, F.P., Shimada, T. (1997): Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 25, 168-74.
- Yano, J.K., Koo, L.S., Schuller, D.J., Li, H., Ortiz De Montellano, P.R., Poulos, T.L. (2000): Crystal Structure of a Thermophilic Cytochrome P450 from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol Chem*.
- Yano, J.K., Blasco, F., Li, H., Schmid, R.D., Henne, A., Poulos, T.L. (2003): Preliminary characterization and crystal structure of a thermostable cytochrome P450 from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* 278, 608-16.
- You, L., Arnold, F.H. (1996): Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng* 9, 77-83.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., Arnold, F.H. (1998): Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat Biotechnol* 16, 258-61.
- Zhao, H., Chockalingam, K., Chen, Z. (2002): Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* 13, 104-10.

- Zhao, Y., Agarwal, V.R., Mendelson, C.R., Simpson, E.R. (1997): Transcriptional regulation of CYP19 gene (aromatase) expression in adipose stromal cells in primary culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 61, 203-210.
- Zheng, Y.M., Henne, K.R., Charmley, P., Kim, R.B., McCarver, D.G., Cabacungan, E.T., Hines, R.N., Rettie, A.E. (2003): Genotyping and site-directed mutagenesis of a cytochrome P450 meander Pro-X-Arg motif critical to CYP4B1 catalysis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186, 119-126.
- Zocher, F., Trauthwein, H., Riermeier, T.H., Dingerdissen, U. (2001): Neue Wege in der Biokatalyse. *Chemie in unserer Zeit* 35, 238-249.



## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Oliver Lentz  
Geburtsdatum: 10.11.1972  
Geburtsort: Stuttgart  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung

1979 – 1983 Grundschole Stuttgart-Stammheim  
1983 – 1992 Ferdinand-Porsche-Gymnasium Stuttgart-Zuffenhausen

### Wehrdienst

Juli 1992 – Okt 1993 Wehrdienst beim Panzerbataillon 284 in Dornstadt und Panzerbataillon 304 in Heidenheim a. H.

### Akademische Ausbildung

Okt 1993 – Dez 1999 Chemiestudium an der Universität Stuttgart  
Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart mit dem Titel: "Analyse der regioselektiven Fettsäure-Hydroxylierung von Varianten des Cytochrom P450 BM-3 aus *Bacillus megaterium*"

Okt 1997 – März 2004 Diplomstudiengang Wirtschaftswissenschaft für Naturwissenschaftler an der Fernuniversität Hagen  
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Bank- und Finanzwirtschaft mit dem Titel: "Due Diligence bei der Übernahme von Unternehmen der Biotechnologie-Branche"

Feb 2000 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie

### Außeruniversitäres Engagement

Jun 1999 – Juli 2003 Ausbildung zum Reserveoffizier der Bundeswehr, Abschluss mit dem Dienstgrad Leutnant der Reserve