

**Oxidationsreaktionen mittels der
Cytochrom P450-Monooxygenase
CYP102A1 in Enzymreaktoren**

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

VORGELEGT VON
STEFFEN CHRISTIAN MAURER
GEBOREN IN ESSLINGEN A. N.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juli 2006

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART

2006

Eidesstattliche Erklärung

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

Stuttgart, den 08.03.2006

(Steffen C. Maurer)

Wer nur Chemie versteht, versteht auch die nicht recht.

Georg Christoph Lichtenberg (1742 bis 1799)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart unter Leitung von Prof. Dr. Rolf D. Schmid angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung des interessanten Themas sowie für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit. Er sorgte stets für hervorragende Arbeitsbedingungen und hatte für berufliche aber auch private Probleme ein offenes Ohr.

Ebenso herzlich danke ich Dr. Vlada Urlacher, der Leiterin der Biokatalysegruppe am ITB, für ihren unermüdlichen Einsatz sowie viele fruchtbare Diskussionen und Ratschläge. Von ihr konnte ich sowohl auf dem Gebiet der Molekularbiologie als auch beim Schreiben von wissenschaftlichen Publikationen viel lernen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biokatalyse möchte ich für das äußerst angenehme Arbeitsklima danken. Die freundliche Art der Kollegen ließ so manchen Rückschlag schnell wieder vergessen. In diesem Zusammenhang danke ich Dr. Monika Rusnak, Dr. Kai Doderer, Michael Budde, Sabine Eiben, Daniel Appel, Matthias Dietrich, Sven Richter, Katja Kühnel und Michael Lienemann. Besonderer Dank gebührt Michael Budde für sein zupackendes und stets hilfsbereites Wesen.

Allen weiteren Mitarbeitern des ITB danke ich für gute und fruchtbare Arbeitsbedingungen und Unterstützung. Sven Richter danke ich zusätzlich für seine Hilfe bei der Durchführung der Fermentationsexperimente.

Besonders zum Gelingen dieser Arbeit hat meine Familie beigetragen. Meiner Frau Gisela und meiner Tochter Zora danke ich für die Geduld, die sie während der Anfertigung dieser Arbeit mit mir hatten. Meinen Schwiegereltern und insbesondere meinen Eltern danke ich für die Unterstützung, die sie mir zukommen ließen, wann immer es Probleme gab.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
I Zusammenfassung	1
II Summary	4
III Einleitung	9
III.1 P450-Monooxygenasen	9
III.1.1 Nomenklatur und Vorkommen	9
III.1.2 Struktur von P450-Monooxygenasen	10
III.1.3 Katalysierte Reaktionstypen	13
III.1.3.1 Oxidationen an Kohlenstoffatomen	13
III.1.3.2 Oxidationen an Stickstoff- und Schwefelatomen	15
III.1.3.3 Oxidative Dealkylierung	16
III.1.3.4 Oxidative Deaminierung	16
III.1.3.5 Oxidative Dehalogenierung	17
III.1.3.6 Thiophosphat-Desulfurylierung	17
III.1.4 Reaktionszyklus von P450-Monooxygenasen	18
III.1.5 Biologische Funktionen der P450-Monooxygenasen	22
III.1.6 Redoxpartner von P450-Monooxygenasen	23
III.1.7 CYP102A1	25
III.1.8 Weitere Fusionsproteine aus Reduktasesystem und P450-Monooxygenase	26
III.1.9 Substratspektrum von CYP102A1 und genetisch veränderten Varianten	27
III.2 Einsatz von P450-Monooxygenasen in technischen Prozessen	31
III.2.1 Produktionsprozesse unter Beteiligung von Oxygenasen	33
III.2.2 Probleme bei der zellfreien Biooxidation mit P450-Monooxygenasen	35
III.2.2.1 Kofaktorabhängigkeit	35
III.2.2.2 Geringe Aktivität	35
III.2.2.3 Geringe Stabilität	36
III.3 Ersatz / Regenerierung von NAD(P)H	36
III.3.1 Ersatz von NAD(P)H bei der Oxygenierung durch P450-Monooxygenasen	36
III.3.2 Regenerierung von NAD(P)H	39
III.3.2.1 Elektrochemische Regenerierung von NAD(P)H	40
III.3.2.2 Enzymatische Regenerierung von NAD(P)H	41
III.3.2.3 Formiatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101	42
III.3.3 Immobilisierung von Enzymen in der Biokatalyse	42
III.3.4 Erhöhung der Löslichkeit unpolarer Substrate in der wässrigen Phase	43

III.4 Stand der Forschung: Zellfreie Katalyse durch Cytochrom P450-Monooxygenasen	44
IV Zielsetzung	46
V Ergebnisse	47
V.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von CYP102A1	47
V.1.1 Subklonierung von CYP102A1 in den Expressionsvektor pET28a+	47
V.1.2 Expression von CYP102A1 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	49
V.1.3 Batch-Fermentation von CYP102A1 im 30 l-Maßstab	50
V.1.4 Aufreinigung von CYP102A1(His)6 über Amersham Ni-Sepharose HP	51
V.2 Ersatz / Regenerierung von NAD(P)H	52
V.2.1 Kovalente Modifikation mittels Riboflavin	52
V.2.2 Elektronenübertragung durch freies Riboflavin	52
V.2.3 Einschieben von Riboflavin in entfaltetes CYP102A1	54
V.2.3.1 Denaturieren der CYP102A1-Hämdomäne	55
V.2.3.2 Renaturieren der CYP102A1-Hämdomäne	55
V.2.3.3 Renaturieren in Gegenwart von Riboflavin	56
V.2.4 Verwendung von Wasserstoffperoxid zur Erzeugung der katalytisch aktiven Spezies	56
V.2.5 Regenerierung von NADP+ mittels Formiatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101	58
V.3 Untersuchung für CYP102A1 geeigneter Reaktionssysteme	61
V.3.1 Immobilisierung von CYP102A1 in einer Sol-Gel-Matrix	61
V.3.1.1 Vergleich der Immobilisierungseffizienz von Rohlysat und aufgereinigtem Protein	62
V.3.1.2 Lagerstabilität von CYP102A1 in Lösung und in Sol-Gel	63
V.3.1.3 Temperaturabhängigkeit der Aktivität	64
V.3.1.4 Stabilität gegen Lösungsmittel	65
V.3.2 Kopplung von Sol-Gel-Immobilisierung mit Ersatz / Regenerierung von NADPH	65
V.3.2.1 Kombination von Immobilisierung von CYP102A1 und Übertragung von Reduktionsäquivalenten durch Co-Sepulchrat / Zink	66
V.3.2.2 Koimmobilisierung von CYP102A1-Hämdomäne und Riboflavin	66
V.3.2.3 Kombination von sol-gel-immobilisierter FDH mit sol-gel-immobilisierter P450-Monooxygenase	67
V.3.2.4 Umsetzung von <i>n</i> -Oktan, Naphthalin und β -Jonon durch in Sol-Gel eingeschlossene CYP102A1-Varianten	68
V.3.2.5 Vergleich der Stabilität von immobilisiertem und gelöstem CYP102A1 unter Prozessbedingungen	69
V.3.3 Reaktionen in Zweiphasensystemen aus nicht mischbaren Flüssigkeiten	72

V.3.3.1	Hydroxylierung von Cyclohexan.....	72
V.3.3.1.1	Aktivität von CYP102A1-Varianten gegen Cyclohexan.....	72
V.3.3.1.2	Zweiphasensystem für die Hydroxylierung von Cyclohexan.....	73
V.3.3.1.3	Stabilität von FDH aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101 in Gegenwart von Cyclohexan.....	74
V.3.3.1.4	Vorversuche zur Hydroxylierung von Cyclohexan im Zweiphasensystem.....	74
V.3.3.1.5	Optimierung der Cyclohexanhydroxylierung im Zweiphasensystem.....	75
V.3.3.1.6	Kinetische Untersuchung der Cyclohexanhydroxylase CYP102A1 R47L /Y51F.....	76
V.3.3.1.7	Erhöhung der Umsatzrate durch Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Cyclohexan.....	79
V.3.3.1.8	Erhöhung der Stabilität des enzymatischen Oxidationssystems.....	79
V.3.3.1.9	Verwendung des Zweiphasensystems im gerührten Glaskolben.....	80
V.3.3.1.10	Verwendung des optimierten Zweiphasensystems im Schüttelkolben.....	82
V.3.3.1.11	Verwendung des optimierten Zweiphasensystems im Reaktor.....	82
V.3.3.2	Umsatz von <i>n</i> -Oktan.....	84
V.3.3.3	Epoxidierung von Styrol im Zweiphasensystem.....	86
V.3.3.3.1	Charakterisierung von CYP102A1-Varianten bezüglich der Epoxidierung von Styrol.....	86
V.3.3.3.2	Epoxidierung von Styrol im Flüssig-Flüssig-Zweiphasensystem.....	87
V.3.3.3.3	Epoxidierung von Styrol im 2 l-Maßstab.....	89
V.3.3.4	Umsetzung von Myristinsäure im Zweiphasensystem.....	92
V.3.4	Umsetzung von Myristinsäure in wässriger Lösung.....	93
VI Diskussion.....		95
VI.1	Expression von CYP102A1.....	95
VI.2	Ersatz / Regenerierung von NADPH.....	96
VI.3	Aktivität von CYP102A1-Varianten gegen Cyclohexan und Styrol.....	98
VI.4	Reaktionssysteme für CYP102A1.....	99
VI.5	Präparative Synthesen.....	102
VI.6	Ausblick.....	105
VII Materialien und Methoden.....		107
VII.1 Materialien.....		107
VII.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	107
VII.1.2	Chemikalien.....	107
VII.1.3	Geräte.....	108
VII.1.4	Enzyme.....	110
VII.1.5	Oligonukleotide.....	110

VII.1.6	Stämme	111
VII.1.7	Plasmide	111
VII.1.8	Verwendete "Kits"	112
VII.1.9	Kulturmedien	112
VII.1.10	Puffer und Lösungen	113
VII.1.11	Stammlösungen	116
VII.2	Methoden	118
VII.2.1	Molekularbiologische Methoden	118
VII.2.1.1	Isolierung und Reinigung von DNA	118
VII.2.1.2	Vervielfältigung, Sequenzierung und Manipulation von DNA	120
VII.2.2	Mikrobiologische Methoden	125
VII.2.2.1	Expression von CYP102A1 und genetisch veränderten Varianten	126
VII.2.3	Biochemische Methoden	127
VII.2.3.1	Zellaufschluss	127
VII.2.3.2	Charakterisierung von P450-Monooxygenasen	128
VII.2.3.3	Aufreinigung von CYP102A1	130
VII.2.3.4	Aktivitätstests und Enzymcharakterisierung	131
VII.2.4	Analyse der Prozessstabilität von CYP102A1	135
VII.2.5	Proteinchemische Methoden für die Elektronenübertragung durch Riboflavin	136
VII.2.6	Sol-Gel-Immobilisierung von CYP102A1-Varianten	138
VII.2.7	Umsatz von Substraten	139
VII.2.7.1	Umsatz von Oktan, Naphthalin, β -Jonon und 10-pNCA mit sol-gel-immobilisiertem CYP102A1	139
VII.2.7.2	Umsatz von Substraten im Zweiphasensystem	139
VII.2.7.3	Umsatz von Myristinsäure in homogener Lösung	141
VII.2.8	GC- und GC/MS-Analytik	142
VII.2.8.1	GC-Methoden	142
VII.2.8.2	GC/MS-Methoden	143
VIII	Literaturverzeichnis	145
	Lebenslauf	151

Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten werden im Folgenden nicht gesondert aufgeführt. Die Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur zur Abkürzung der Aminosäuren durch den Ein- und den Dreibuchstabencode wurden befolgt.

CYP	(Cytochrom) P450-Monooxygenase
CYP102A1	Cytochrom P450-Monooxygenase aus <i>Bacillus megaterium</i> ; in dieser Arbeit auch stellvertretend für genetisch veränderte Varianten dieses Proteins
ee	Enantiomerenüberschuss
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinadeninmononukleotid
*g	Angabe der Beschleunigung einer Zentrifuge in Vielfachen der Erdanziehungskraft
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Kopplung von Gaschromatograph an ein Massenspektrometer
IMAC	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kpi	Kaliumphosphatpuffer
NAD(P) ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
ttn	“ <i>total turnover number</i> ” d. h. Mol erhaltenes Produkt pro Mol eingesetztem Kofaktor oder Katalysator
10- <i>p</i> NCA	10- <i>para</i> -Nitrophenoxydecansäure
PAAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
10- <i>p</i> NCA	10- <i>para</i> -Nitrophenoxydecansäure
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEOS	Tetraethoxyorthosilikat

I Zusammenfassung

Biokatalytische Prozesse werden im Rahmen der Ausrichtung der chemischen Industrie hin zu nachhaltigen und ressourcenschonenden Produktionsverfahren zunehmend in die Praxis übertragen. Die enzymatische Darstellung chiraler Alkohole wird bisher vor allem durch die Reduktion prochiraler Ketone unter Verwendung von Alkoholdehydrogenasen bewerkstelligt. Einen alternativen Zugang zu chiralen Alkoholen und Epoxiden erlauben Oxygenasen. Deren häufigste Vertreter mit 4600 bekannten Sequenzen sind Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs), die in der Lage sind, Sauerstoff mit teilweise sehr hoher Regio- und Stereoselektivität in nicht aktivierte C-H-Bindungen einzuführen bzw. C-C-Doppelbindungen zu epoxidieren. CYPs werden zur Zeit industriell ausschließlich in Form von Ganzzelbiokatalysatoren eingesetzt. Die Verwendung isolierter CYPs in der organischen Synthese hingegen wurde bisher als nicht praktikabel erachtet, da für die enzymatische Aktivität in den meisten Fällen mehrere Elektronentransportproteine sowie der teure Kofaktor Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat) (NAD(P)H) benötigt werden.

Bei Verwendung von CYP102A1 kann das Problem der zusätzlich benötigten Elektronentransportsysteme umgangen werden, da es sich um ein NADPH-abhängiges natürliches Fusionsprotein, das eine P450-Monooxygenasedomäne und eine FAD und FMN enthaltende Reduktasedomäne in einer Polypeptidkette enthält, handelt. Gegen seine natürlichen Substrate – mittel- und langkettige Fettsäuren – zeigt dieses Enzym eine der höchsten je für ein CYP gemessenen Umsatzraten ($>1000 \text{ min}^{-1}$). Durch Mutagenese konnte das Substratspektrum erweitert werden, so dass neben Fettsäuren auch *n*-Alkane, Alkene, Aromaten und Terpene umgesetzt werden können.

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit des Einsatzes isolierter Varianten von CYP102A1 in der präparativen organischen Synthese untersucht werden. Grundvoraussetzung für den Einsatz eines Enzyms in der Biokatalyse ist seine effiziente und damit kostengünstige Produktion. Zur Steigerung der Ausbeute bei der rekombinanten Expression von CYP102A1 in *Escherichia coli* BL21 (DE3) wurde zunächst ein neuer Vektor (pET28a+CYP102A1) konstruiert. In diesem System konnten Expressionsausbeuten von 144 mg CYP102A1 pro Liter Kulturmedium erreicht werden. Durch die Expression als Fusionsprotein mit einer

Hexahistidinsequenz konnte eine zeitsparende einstufige Aufreinigungsmethode für CYP102A1 entwickelt werden.

Ein großes Problem bei der Etablierung zellfreier, durch P450-Monooxygenasen katalysierter Prozesse ist die Abhängigkeit der Enzymklasse vom Kofaktor NAD(P)H. Da der Ersatz des Kofaktors NADPH durch Wasserstoffperoxid oder der Einsatz von Riboflavin als Elektronenüberträger nicht die für präparative Anwendungen nötigen Umsatzraten lieferte, wurde die Regenerierung von NADPH mittels einer NADP⁺-abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) untersucht. Dieses Kofaktorregenerierungssystem erwies sich als geeignet, durch CYP102A1 katalysierte Reaktionen über Tage aufrechtzuerhalten.

Als Modellreaktionen für die weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden die Hydroxylierung von Cyclohexan, Oktan und Myristinsäure sowie die Epoxidierung von Styrol gewählt. Da noch keine Varianten von CYP102A1 bekannt waren, die die Substrate Cyclohexan und Styrol mit hoher Umsatzrate oxidieren, wurden Varianten von CYP102A1 hinsichtlich ihrer Aktivität in diesen Reaktionen charakterisiert. Herausragendes Ergebnis auf diesem Gebiet ist einerseits die annähernd stereospezifische Epoxidierung von Styrol zu *R*-Styroloxid (92% ee) durch CYP102A1 F87G. Andererseits konnte die Variante CYP102A1 R47L/Y51F identifiziert werden, die die mit einer Bindungsdissoziationsenergie von 90 kJ/mol äußerst stabile CH-Bindung in Cyclohexan spalten und durch eine Hydroxylgruppe ersetzen kann.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Reaktionssysteme für die durch CYP102A1-Varianten katalysierte Reaktion untersucht. Ein Ansatz war dabei die Erzeugung eines heterogenen Katalysatorsystems durch Einschluss von CYP102A1 und FDH in einer *in situ* gebildeten Sol-Gel-Matrix. Durch diese Immobilisierung des Biokatalysators konnte seine Lagerstabilität um eine Größenordnung erhöht werden. Alternativ wurde ein zweiphasiges Reaktionssystem entwickelt, welches an Hand der Hydroxylierung von Cyclohexan optimiert wurde. Unter Verwendung dieses Ansatzes konnte Cyclohexanol im Grammmaßstab synthetisiert werden. Um die allgemeine Anwendbarkeit des Zweiphasensystems für CYP-katalysierte Hydroxylierungsreaktionen zu demonstrieren, wurde die Umsetzung von *n*-Oktan und Myristinsäure untersucht. Auch in diesen beiden Fällen konnten präparative Mengen der hydroxylierten Produkte isoliert werden.

Weiterhin konnte in diesem zweiphasigen Reaktionssystem auch die Epoxidierung von Styrol durchgeführt werden, wobei 4.4 g reines Styroloxid isoliert werden konnten. Bei der Epoxidierung von Styrol erhöhte der Einsatz von statistisch methyliertem β -Cyclodextrin zur Erhöhung der Löslichkeit des organischen Substrats in der wässrigen Biokatalysatorphase die Ausbeuten.

Auch Myristinsäure kann durch Verwendung von statistisch methyliertem β -Cyclodextrin in einer Konzentration von 10 g l^{-1} in der Reaktionsmischung gelöst werden, was für eine Hydroxylierungsreaktion in homogener wässriger Lösung genutzt wurde. Dabei wurden für die eingesetzte CYP102A1-Variante maximale Zykluszahlen (ttn) von 50600 erreicht.

II Summary

The main objective of the investigations described in this thesis was the development of a process for *in vitro* use of cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) in organic synthesis.

CYPs represent one of the largest gene superfamilies with currently more than 4600 members known. The active centre of these enzymes consists of a heme system with the heme iron ligated to a cysteinate. They catalyse reductive activation of dioxygen with one atom of oxygen being reduced to water, while the other atom of oxygen is introduced into the organic substrate giving rise to hydroxylated or epoxidised compounds. In these reactions many CYPs display outstanding regio- and stereoselectivity. Regio- and stereoselective functionalisation of non-activated carbons is a task still not satisfyingly solved by traditional organic chemistry. Therefore CYPs came into the focus of biotechnologists. Currently the potential of CYPs for production of value-added chemicals is exclusively exploited by means of whole-cell biocatalysis. *In vitro* hydroxylation and epoxidation of organic compounds by CYPs is hampered by the stoichiometric requirement of the expensive cofactor NADPH and by the need of additional proteins for transfer of reduction equivalents from NADPH to the CYP heme iron. Moreover many CYPs are neither very stable nor very active.

The properties of CYP102A1 (P450 BM-3) from *Bacillus megaterium* render this enzyme a promising candidate for development of cell-free hydroxylation and epoxidation reactions: The activity of this natural fusion protein comprising a CYP heme domain and an FAD- and FMN-containing oxidoreductase domain does not depend on additional electron transfer proteins. Due to this domain organisation electron transfer to the heme iron is fast, enabling high hydroxylation rates ($>1000 \text{ min}^{-1}$) for the fatty acid substrates. Many mutants of CYP102A1 showing high activity even towards non-natural substrates (alkanes, aromatics, alkenes etc.) have been derived by enzyme engineering techniques.

Application of enzymes in biocatalysis depends on an efficient and cost-effective system for heterologous enzyme production. This problem was targeted by construction of the vector pET28a+CYP102A1, allowing for heterologous expression of CYP102A1 in *E. coli* BL21 (DE3) cells. As a result expression levels of 144 mg CYP102A1 per litre could be obtained. The enzyme was expressed as a fusion

protein comprising an N-terminal His₆-tag which allows one-step purification using immobilised metal chelate affinity chromatography (IMAC). Further purified protein samples were used for biochemical characterisation of CYP102A1 mutants.

In the next step, methods for replacement or regeneration of the cofactor NADPH were investigated. Replacement of NADPH by hydrogen peroxide, directly leading to the catalytically active iron-oxo species in the CYP catalytic cycle gave poor turnover rates amounting only 3 % of the turnover rate obtained with the natural cofactor. Moreover CYP102A1 was inactivated within only 20 minutes in presence of 50 mM hydrogen peroxide. Riboflavin, which can be reduced by electrochemical, photochemical or chemical means, could be shown capable of transferring electrons to the CYP102A1 heme domain. However turnover rates were even lower than with hydrogen peroxide, amounting roughly 1 % of the rates obtained when using the cofactor NADPH. The use of genetically engineered formate dehydrogenase (FDH) from *Pseudomonas* sp. 101 (EC 1.2.1.2), which is capable of oxidising formate to carbon dioxide and in turn reduces NADP⁺ to NADPH, is most promising. This reaction can be efficiently coupled to the NADPH-dependent oxidation activity of CYP102A1 (figure II-1).

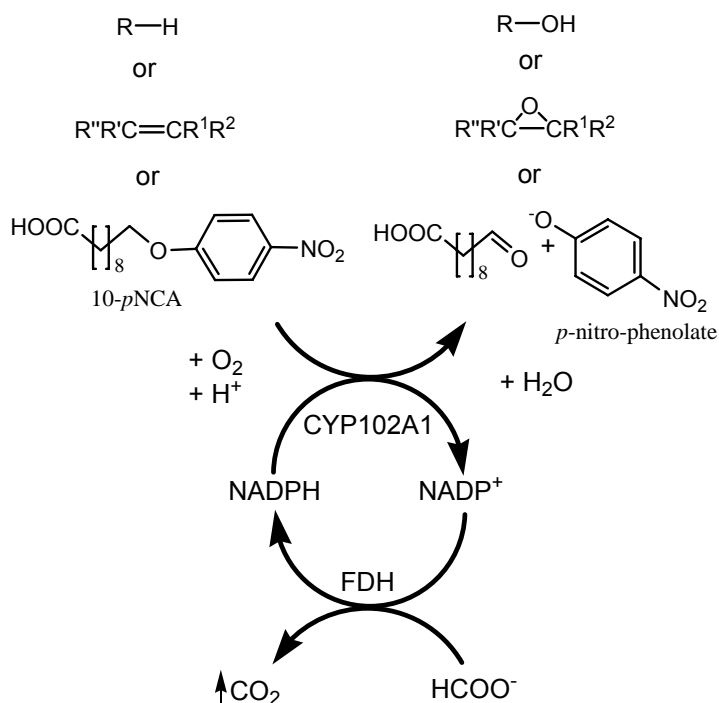


Figure II-1: Reaction scheme for the CYP102A1-catalysed oxidation of organic compounds (hydroxylation of alkanes, epoxidation of alkenes or dealkylation of the surrogate substrate 10-pNCA) coupled to cofactor regeneration by genetically engineered formate dehydrogenase (FDH) from *Pseudomonas* sp. 101.

After this efficient regeneration method for the reduced cofactor NADPH was found, different reaction systems were compared. Immobilisation of CYP102A1 in a sol-gel matrix derived from tetraethoxyorthosilicate (TEOS) tremendously improved the enzyme's storage stability (half-life of 29 days at 25°C in sol-gel-matrix compared to only 2 days in potassium phosphate buffer). The sol-gel-immobilised enzyme was used for the hydroxylation of octane, naphthalene and β -ionone on analytical scale. Despite the improvement in storage stability, the operational stability of the immobilised enzyme was lower than that of the enzyme in solution. Highest operational stability was found when CYP102A1 was applied directly as *E. coli* cell extract.

Therefore other reaction systems were assayed, resulting in development and optimisation of a biphasic system for hydroxylation of cyclohexane and octane and for epoxidation of styrene. Myristic acid was most efficiently hydroxylated in a homogeneous solution applying randomly methylated β -cyclodextrine for solubilisation of the substrate.

For hydroxylation of cyclohexane a CYP102A1 mutant catalysing this reaction had to be found. A screening of several mutants revealed that CYP102A1 R47L/Y51F hydroxylates cyclohexane at a rate of 14 min^{-1} . Compared to the wildtype, this is a 20-fold improvement in activity. Using this mutant the hydroxylation of cyclohexane coupled to cofactor regeneration by FDH in a biphasic reaction system (cyclohexane / aqueous biocatalyst system) was optimised. Finally the reaction was performed in a reactor applying constant aeration, online pH- and oxygen partial pressure (pO_2) measurement (figure II-2).

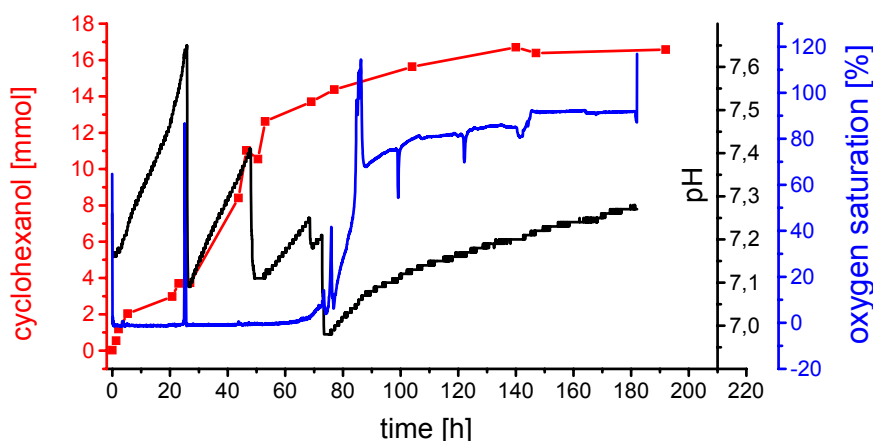


Figure II-2: Hydroxylation of cyclohexane in a biphasic system with pH- and pO₂ online measurement. The red line shows the course of product development, the blue line oxygen saturation and the black line the pH-value. All three measurements indicate that CYP102A1 stays active for more than 100 h in this reaction system.

Product concentration in this setup increased for almost 140 h. Oxygen saturation stayed low for the first 80 h while the system is highly active. Then this value starts increasing, indicating loss of activity resulting in decreased oxygen consumption in the hydroxylation reaction. The course of the pH-value confirms this observation: During the reaction, protons are consumed stoichiometrically. Therefore the pH-value increases. The pH was readjusted during the reaction (see figure II-2). Just as concluded from product development and oxygen saturation, the pH-measurement indicates gradual inactivation of the bienzymatic reaction system after 80 to 100 h reaction time. At this time the increase in pH is getting slower. Extraction of the reaction product revealed a total turnover number (ttn) of 12800 in this system.

Epoxidation of styrene was performed using CYP102A1 F87G. In a mutant screening this variant displayed a epoxidation rate of 34 min⁻¹ and an enantiomeric excess of 92% *R* for the reaction product styrene oxide. The reaction in a biphasic styrene / aqueous buffer system was optimised. A ttn of up to 18000 for CYP102A1 F87G could be reached using 35 mM randomly methylated β -cyclodextrine for substrate solubilisation. However upon upscaling to 2 l-scale the ttn decreased to 6700. Still 4.4 g of >90 % pure styrene oxide could be distilled from the reaction mixture.

Further experiments showed that an aqueous solution containing 20 mM randomly methylated β -cyclodextrine can dissolve myristic acid at 10 g l⁻¹. This finding was used for hydroxylation of myristic acid in homogeneous aqueous solution. In this

reaction the triple mutant CYP102A1 A74G/F87V/L188Q (hydroxylating myristic acid with a turnover rate of $> 1000 \text{ min}^{-1}$) was applied in combination with FDH. In this system the ttn finally reached 50600.

III Einleitung

Im Folgenden werden die Grundlagen dieser Arbeit beschrieben. Dabei wird ein Schwerpunkt auf den P450-Monooxygenasen, im Besonderen auf der Unterfamilie CYP102A, liegen. Die biologischen Funktionen der Enzymklasse werden nur knapp zusammengefasst, die Betonung liegt auf den „chemischen“ Eigenschaften wie Reaktionsmechanismus, Art der katalysierten Reaktionen und Substratspektrum. Einen weiteren Schwerpunkt bildet die Beschreibung des aktuellen Standes bei der Nutzung von P450-Monooxygenasen in der Synthese. Da sich die vorliegende Arbeit mit der synthetischen Nutzung zellfreier P450-Systeme beschäftigt, wird im letzten Teil der Einleitung auf die verschiedenen - bisher hauptsächlich für die Kombination mit Alkoholdehydrogenasen entwickelten - Methoden zur Regenerierung des Kofaktors NADP⁺ während der Reaktion eingegangen.

III.1 P450-Monooxygenasen

III.1.1 Nomenklatur und Vorkommen

Mit Cytochrom P450-Monooxygenasen (P450-Monooxygenasen oder CYPs) wird eine Enzymfamilie bezeichnet, die zur Klasse der Monooxygenasen (EC 1.14.x.y) gehört. Ihren Namen erhielt diese Proteinfamilie auf Grund des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 450 nm im reduzierten kohlenmonoxidgebundenen Zustand. CYPs kommen in Bakterien, Pflanzen, niederen und höheren Eukaryoten vor. Heute sind bereits über 4000 für CYPs kodierende Gene bekannt (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Beispielsweise führte alleine die Entschlüsselung des Genoms der Reispflanze^[1, 2] zur Entdeckung von 528 neuen P450-Sequenzen^[3]. Allerdings wurde erst ein Bruchteil der von den P450-Gensequenzen kodierten Proteine hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert.

Die Nomenklatur der P450-Enzyme erfolgt anhand der Sequenzhomologie auf Aminosäureebene. Gene mit einer Sequenzhomologie > 40 % gehören zur selben P450-Familie, diejenigen mit > 50 % Sequenzhomologie zur selben Unterfamilie. Um ein für eine Cytochrom P450-Monooxygenase kodierendes Gen zu beschreiben, wird

die kursive Abkürzung *CYP* benutzt. Eine besondere Konvention gilt für die Bezeichnung der für P450-Monooxygenasen aus Maus und Mensch kodierenden Gene. Diese werden durch ein kursives *cyp* in Kleinbuchstaben symbolisiert. Der CYP-Abkürzung (nicht kursiv für die korrespondierenden Proteine) wird eine Zahl, die die Familie bezeichnet, sowie ein Großbuchstabe, der die Unterfamilie bezeichnet, nachgestellt. Beispielsweise bezeichnet die Abkürzung CYP102A1 das erste Gen, das in der Unterfamilie A der P450-Familie 102 entdeckt wurde.

III.1.2 Struktur von P450-Monooxygenasen

Trotz der geringen Sequenzhomologie von teilweise unter 20 % auf Aminosäureebene zwischen den Mitgliedern verschiedener P450-Familien besitzen alle CYPs, deren Strukturen bisher aufgeklärt wurden, eine hoch konservierte dreidimensionale Struktur^[4]. Nachdem lange Zeit nur Röntgenstrukturen von P450-Monooxygenasen aus Bakterien und Pilzen^[5-14] bekannt waren, wurden in den letzten Jahren große Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrukturanalyse von P450-Monooxygenasen aus Säugern erzielt^[15-22]. Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente ist annähernd identisch und auch die Ausrichtung der Sekundärstrukturelemente zueinander (Tertiärstruktur) zeigt nur eine geringe Variabilität. Den Kern der Strukturen bilden grundsätzlich vier aneinandergelagerte α -Helices, die in Abbildung III-1 mit D, L, I und E bezeichnet sind. Um dieses Strukturmotiv sind die Helices J und K, zwei β -Faltblattstrukturen β 1 und β 2 sowie eine im nicht substratgebundenen Zustand recht unstrukturierte Schleife, in der Literatur häufig als „meander“ bezeichnet, angeordnet.^[23] Dieser hochkonservierte Kern deutet auf einen gemeinsamen Ursprung der Proteine sowie einen konservierten Mechanismus der Sauerstoffaktivierung hin.

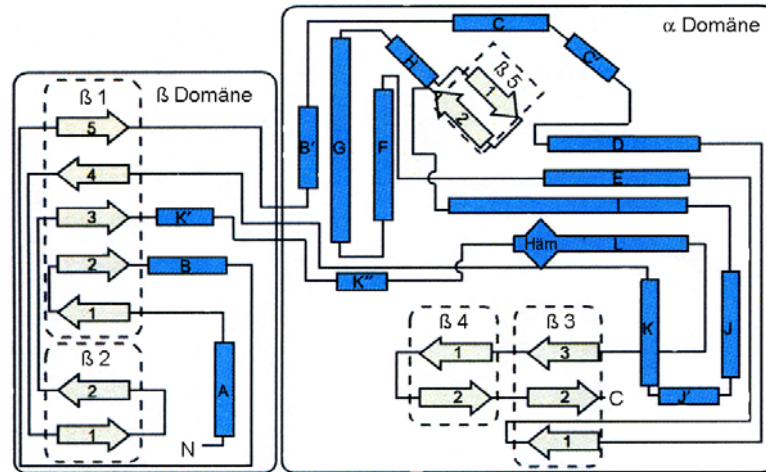


Abbildung III-1: Schematische Darstellung der konservierten Sekundärstrukturelemente von P450-Monooxygenasen nach Werck-Reichhart^[23] Die blauen Rechtecke symbolisieren α -Helices, die Pfeile β -Faltblattstrukturen.

Das prosthetische Protoporphyrin IX („Häm“) befindet sich zwischen der distalen Helix I und der proximalen Helix L (Abbildungen III-1 und III-2). Der proximale, absolut konservierte Cysteinatligand des Hämeisens befindet sich in der benachbarten Cysteinat-Häm-Ligandenschleife. In diesem Bereich findet man ein in der gesamten P450-Superfamilie konserviertes Sequenzmotiv, die P450-Signatur FxxGx(H/R)xCxG. X steht dabei für jede beliebige Aminosäure, C symbolisiert das das Hämeisen komplexierende Cysteinat. Dieser Cysteinatligand führt – im Gegensatz zu Hämproteinen mit anderen proximalen Liganden (z. B. Histidin in Hämoglobinen oder Peroxidasen) - zur Ausbildung des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 450 nm im reduzierten CO-gebundenen Zustand.

Die Helix I bildet einen Teil der Begrenzung des Substratzugangskanals. In dieser Helix befindet sich eine weitere konservierte Aminosäuresequenz, die ein absolut konserviertes Threonin enthält, das am Protonentransfer zum aktiven Zentrum beteiligt ist. Ersatz dieser Seitenkette durch hydrophobe Aminosäuren führt zu Enzymvarianten, die größere Mengen Wasserstoffperoxid bilden, also nicht mehr zur Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung in der Lage sind.

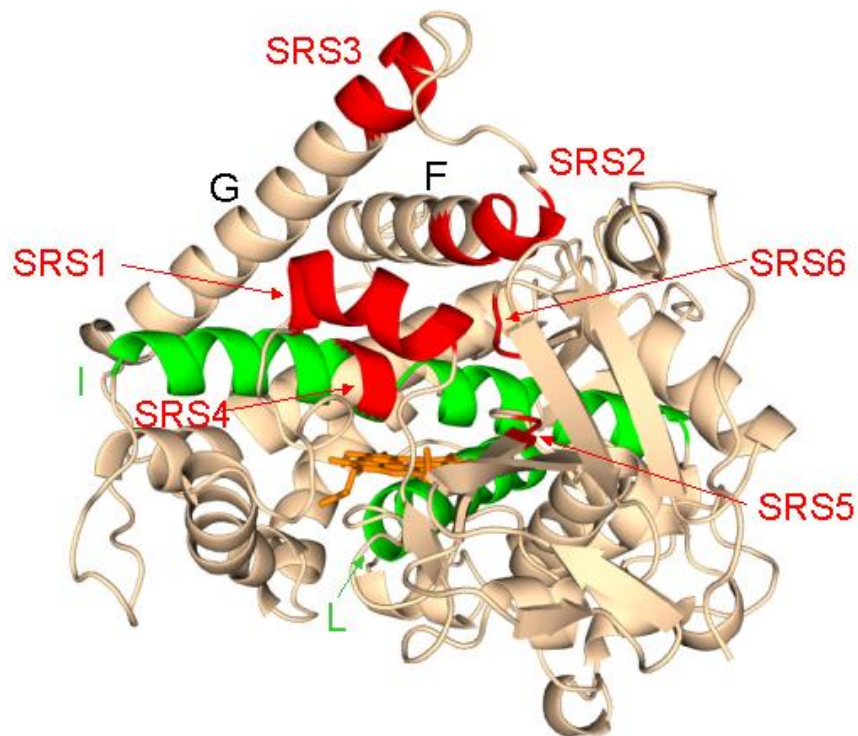


Abbildung III-2: Modell der hochkonservierten Tertiärstruktur von P450-Monooxygenasen. Die Abbildung wurde mittels des Programms PyMol (<http://www.pymol.org>) aus den unter der Zugangsnummer 1j pz^[24] bei der Protein Data Bank abgelegten Strukturkoordinaten der CYP102A1 Hämdomäne erzeugt. Die im Vordergrund sichtbaren Sekundärstrukturelemente sind entsprechend der in Abbildung III-1 verwendeten Konvention mit Großbuchstaben, die rot gefärbten Substratbindungsbereiche sind mit SRS1 bis SRS6 bezeichnet. Das prosthetische Protoporphyrin IX ist orange, die das Protoporphyrin IX hauptsächlich koordinierenden Helices I und L sind grün eingefärbt.

Obwohl die Faltung der P450-Monooxygenasen hochkonserviert ist, existiert in einigen Bereichen eine hohe Variabilität in Sequenz und auch Struktur. Die variablen Bereiche befinden sich in den die Substratbindung vermittelnden Regionen, so dass eine sehr große Zahl unterschiedlichster Substrate gebunden werden kann (z. B. von Ethanol im CYP2E1 bis zu großen Peptidantibiotika in CYP165B1 oder CYP165C2). Diese Bereiche befinden sich entlang des Substratzugangskanals, also auf der distalen, vom Cysteinat abgewandten Seite des Protoporphyrinsystems. Die Substratbindung und -erkennung wird in erster Näherung durch sechs Substratbindungsstellen (SRS) vermittelt, die die B'-Helix (SRS1), Teile der Helices F (SRS2), G (SRS3) und I (SRS4), der β 4-Haarnadelschleife (SRS5) und der β 2-

Schleife (SRS6) umfassen. Diese Bereiche sind in Abbildung III-2 rot hervorgehoben. Mutationen in diesen Bereichen haben große Auswirkungen auf die Substratspezifität von CYPs. Röntgenstrukturen mit gebundenem Substrat zeigen, dass die substratbindenden Regionen sehr flexibel sind und häufig strukturelle Umorganisation („induced fit“) die Bindung und damit die Umsetzung vieler Substanzen ermöglicht. So lässt sich verstehen, dass reine „docking“-Ansätze zur *in silico*-Modellierung von P450-Enzym-Substrat-Wechselwirkung bisher wenig erfolgreich verliefen.

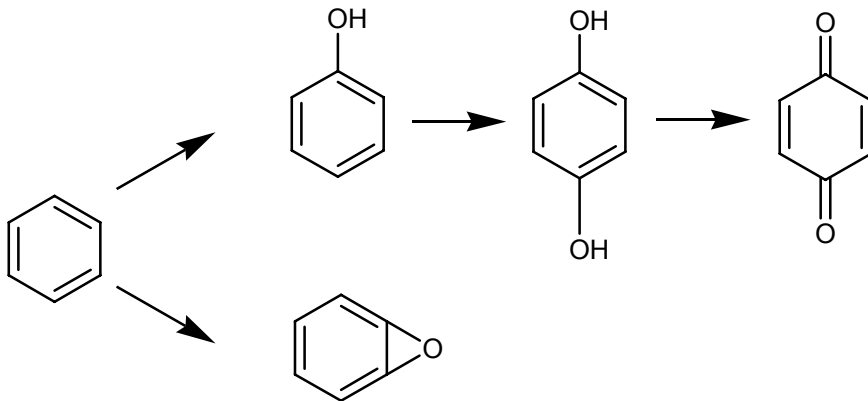
III.1.3 Katalysierte Reaktionstypen

Zwar sind Reaktionen von P450 Monooxygenasen mit peroxygenierten Substraten, Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden bekannt, ihre herausragende Funktion ist aber die Aktivierung von Luftsauerstoff und der Einbau eines Atoms des Sauerstoffs in das Substrat. Das zweite Atom des Luftsauerstoffs wird zu Wasser reduziert. Die von bakteriellen^[25] und eukaryotischen P450 katalysierten Reaktionstypen wurden kürzlich detailliert beschrieben^[26]. Neben der Hydroxylierung, Epoxidierung und Sonderfällen wie der Sulfoxidation kann dieser Sauerstoffeinbau zu instabilen Produkten (z. B. Halbacetale, vicinale Halogenhydrine) führen, die in Folgereaktionen zerfallen. So kommt es beispielsweise zur N- und O-Demethylierung sowie zur oxidativen Dehalogenierung.

III.1.3.1 Oxidationen an Kohlenstoffatomen

P450-Enzyme hydroxylieren oder epoxidieren nichtaktivierte C-H-Bindungen und/oder C=C-Doppelbindungen in aliphatischen und aromatischen Systemen (siehe Abbildung III-3).

Aromatische Systeme:



Aliphatische Systeme:

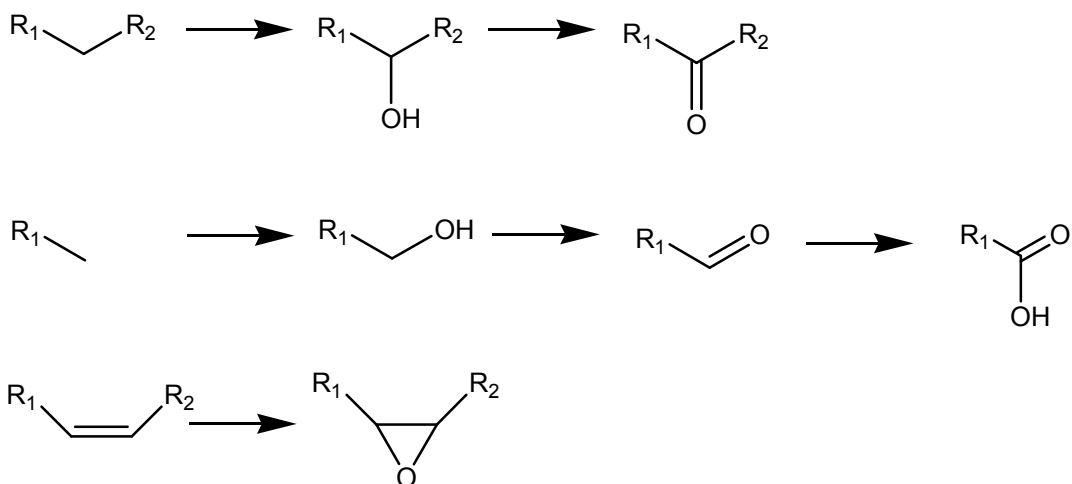


Abbildung III-3: Durch P450-Monooxygenasen katalysierte Oxidationen an Kohlenstoffatomen

Manche P450-Monooxygenasen können die im ersten Schritt gebildeten Alkohole zu Ketonen (sekundäre Alkohole) oder zu Aldehyden und sogar Carbonsäuren (primäre Alkohole) oxidieren.

Im Stoffwechsel sind die gebildeten Metabolite teilweise toxisch wie das Nervengift 2,5-Hexandion oder karzinogen wie DNA-alkylierende Epoxide (z. B. Styroloxid).^[27] Ferner wirken durch P450-Enzyme C-oxidierte Nitrosamine und Benzpyrene karzinogen. Arzneimittel wie Barbiturate und Phenobarbitale werden durch P450-Enzyme in ihre Wirkform überführt.^[28] Neben diesen unspezifischen Abbaureaktionen mit sehr breitem Substratspektrum existieren beispielsweise im Stoffwechsel der

Säuger hochselektive P450-Monooxygenasen, die an der Steroid- und Gallensäuresynthese beteiligt sind. In Pflanzen wird eine große Zahl an Sekundärmetaboliten unter Beteiligung von P450-Monooxygenasen synthetisiert.^[29] Diese Reaktionstypen sind – da chemisch oft kaum möglich und doch synthetisch häufig sehr wünschenswert – für die Biokatalyse von besonderem Interesse. Dies wird von der großen Zahl an Publikationen, die sich mit der möglichst selektiven Aktivierung aliphatischer Kohlenwasserstoffe befassen, wiedergespiegelt.^[30-39]

III.1.3.2 Oxidationen an Stickstoff- und Schwefelatomen

P450-Enzyme oxidieren Aryl- und Acetylamine wie Benzidin, 4-Biphenylamin und 2-Acetaminofluoren am N-Atom zu den korrespondierenden N-Hydroxiden, die häufig weiter zu Nitreniumionen reagieren (siehe Abbildung III-4).^[40]

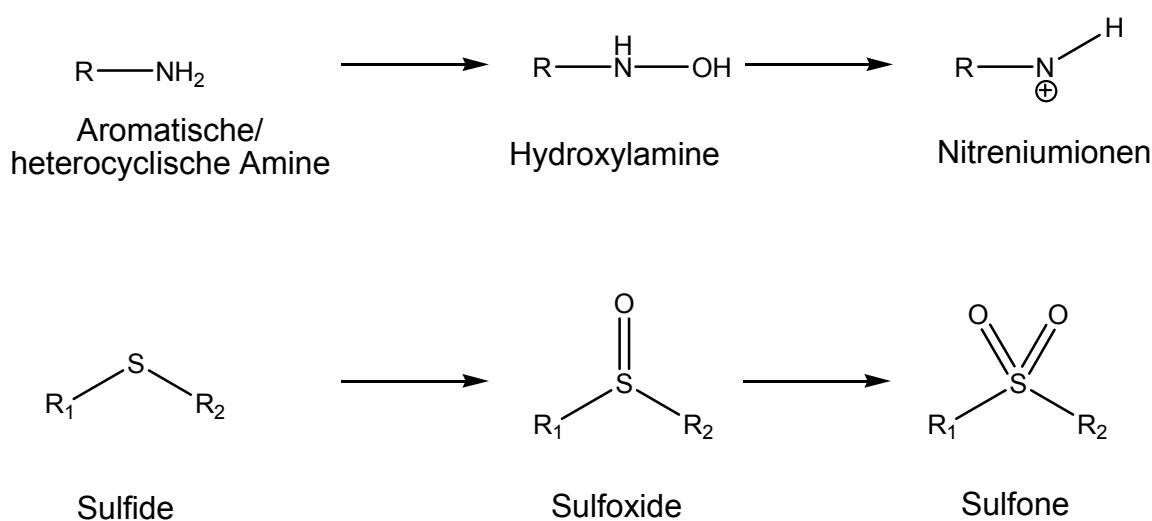


Abbildung III-4: Durch P450-Monooxygenasen vermittelte Oxidationen an Stickstoff- und Schwefelatomen

Aryl- und Alkylthioether werden durch P450-Monooxygenasen direkt am S-Atom zu Sulfoxiden oxidiert.^[40] Die Oxidation bleibt jedoch häufig nicht auf der Stufe des Sulfoxids stehen; viele Sulfoxide werden zu den entsprechenden Sulfonverbindungen weiteroxidiert, die häufig cytotoxisch wirken.

Aus synthetischer Sicht handelt es sich hier ebenfalls um eine äußerst interessante Reaktion. Dies gilt vor allem für die selektive Sulfoxidation in Gegenwart weiterer funktioneller Gruppen. Neben P450-Monooxygenasen werden auch Peroxidasen,^[41]

^{42]} Chlorperoxidasen^[43, 44] und Baeyer-Villiger-Monooxygenasen^[45] im Hinblick auf diese Anwendung untersucht.

III.1.3.3 Oxidative Dealkylierung

Wie in Abbildung III-5 gezeigt, katalysieren P450-Enzyme die oxidative O-, N- und S-Dealkylierung. Dabei entstehen zunächst instabile Halbacetale (bzw. die anlogen stickstoff- oder schwefelenthaltenden Verbindungen), die in den zugrundeliegenden Alkohol (bzw. Amin oder Thiol) und einen Aldehyd zerfallen. Beispiele sind die O-Dealkylierung von Codein, Mescaline, Phenacetin, die N-Dealkylierung von Ephedrin, Methamphetamin, Aminopurin und die S-Dealkylierung von 6-Methylthiopurin zu 6-Methylpurin. Für P450-Aktivitätstests werden häufig Verbindungen wie Alkylresorufine oder -coumarine benutzt, da diese Verbindungen starke Fluoreszenz nach Dealkylierung zeigen.

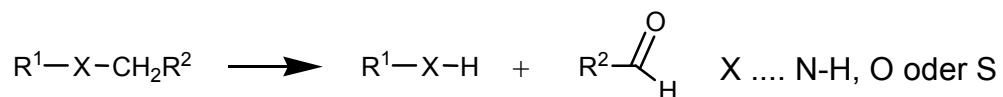


Abbildung III-5: Durch P450-Monooxygenasen katalysierte oxidative Dealkylierung von sekundären Aminen, Ethern und Thioethern

Neben der Dealkylierung an Heteroatomen ist auch die Demethylierung direkt an Kohlenstoffatomen beschrieben worden. So katalysieren die Sterol-14 α -demethylasen der Familie CYP51 die oxidative Entfernung einer an ein quartäres Kohlenstoffatom gebundenen Methylgruppe. Bei dieser physiologisch wichtigen Reaktion handelt es sich um den ersten Schritt der Umwandlung von Lanosterol zu Cholesterol.^[46]

III.1.3.4 Oxidative Deaminierung

Abbildung III-6 zeigt das allgemeine Reaktionsschema der oxidativen Deaminierung von Aminen. Histamin, Noradrenalin und Mescaline können unter anderem auf diese Weise deaminiert werden.

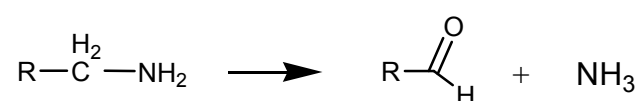


Abbildung III-6: Durch P450-Monooxygenasen katalysierte oxidative Deaminierung primärer Amine

Dabei kommt es zur intermediären Bildung eines geminalen Hydroxyamins, das unter Ammoniakabspaltung zum korrespondierenden Aldehyd zerfällt.

III.1.3.5 Oxidative Dehalogenierung

Viele halogenierte Alkane und Alkene bilden nach Hydroxylierung an einer C-H-Bindung ein instabiles vicinales Halogenhydrin, das in einen Aldehyd oder Keton und die entsprechende Halogenwasserstoffsäure dissoziiert. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung III-7 für Halogenalkane skizziert. Beispiele sind die Oxidation von Ethendibromid zu 2-Bromacetaldehyd und die Oxidation von Chloroform zu Phosgen.^[40]

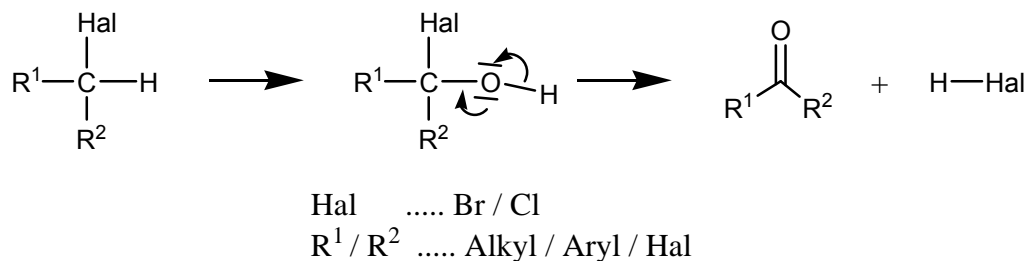


Abbildung III-7: Dehalogenierung halogener Kohlenwasserstoffe über P450-katalysierte Bildung eines intermediären geminalen Halogenhydrins.

III.1.3.6 Thiophosphat-Desulfurylierung

Organische Thiophosphorsäurederivate, beispielsweise Parathion werden durch P450-Enzyme desulfuryliert, so dass die entsprechenden Organophosphate entstehen (siehe Abbildung III-8). Im Falle von Parathion wurde die Bildung von Paraxon sowohl durch humane, als auch durch bakterielle P450-Monooxygenasen beschrieben.^[40, 47]

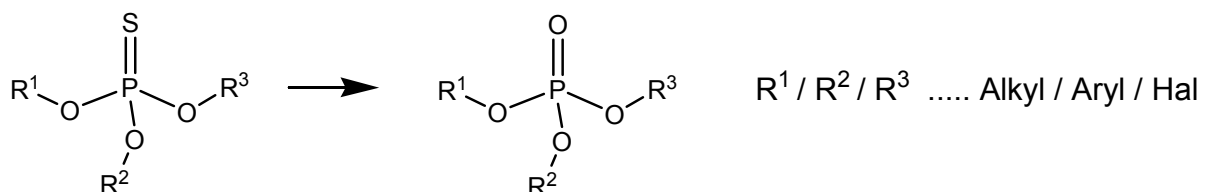


Abbildung III-8: CYP-katalysierte Desulfurylierung von Thiophosphorsäurederivaten

III.1.4 Reaktionszyklus von P450-Monooxygenasen

Ausgehend von Kristallstrukturen (mit und ohne Substrat), EXAFS-Messungen zur näheren Untersuchung der ersten Koordinationssphäre des Metalls, ESR- und NMR-Messungen, Mössbauer-Spektroskopie, Schwingungsspektroskopie (unterschiedliche Schwingungsfrequenzen von Disauerstoff, Superoxid, Peroxid), Sauerstoffmarkierungsexperimenten mit ^{18}O und UV-VIS-Studien, wurde der Katalysezyklus der P450-Monooxygenasen abgeleitet. Mit Ausnahme des äußerst reaktiven und deshalb nur schwer charakterisierbaren ultimativen Oxidans wird dieser Reaktionszyklus heute allgemein akzeptiert.^[48] Der seit seiner ersten Formulierung im Jahre 1968 immer weiter verfeinerte Katalysezyklus ist in seiner aktuellsten Version^[4] in Abbildung III-9 dargestellt.

Im inaktiven, substratfreien Zustand liegt ein low-spin Fe^{III} (d^5 , $S=1/2$)-System **1** mit sechsfach koordiniertem Metall vor. Die vier äquatorialen Positionen des verzerrt oktaedrischen Eisenkomplexes sind dabei durch die Stickstoffatome des Protoporphyrin IX besetzt, während die axialen Positionen ein Cysteinat und ein Wassermolekül binden. Das Wasser ist auf der zum Substrateingangskanal weisenden Seite des katalytisch aktiven Eisenions positioniert und wird bei Substratbindung verdrängt. Die hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufene Substratbindung bewirkt dadurch einen Übergang zum high-spin $\text{Fe}(\text{III})$ -Komplex **2** mit unbesetzter Koordinationsstelle, wobei das Fe-Atom weit vom gewölbten Porphyrinring entfernt ist (ausgeprägte „out-of-plane“ Struktur). Beim Campher-Addukt von P450cam aus *Pseudomonas putida* zeigen Röntgenstrukturanalysen, dass das Substrat an einen hydrophoben Bereich des Proteins in der Nähe des Häm-Eisenzentrums gebunden wird und alle in der substratbindenden Tasche vorhandenen Wassermoleküle verdrängt.^[24] Während einige Aminosäureseitenketten im Bereich der Substratbindungsstelle deutliche Konformationsänderungen erfahren, bewirkt die Substratbindung nur eine geringe Umordnung der Atome des Proteinrückgrats.^[24] Bedeutender als die strukturellen Umordnungen ist die Änderung des Redoxpotentials, das von ca. -300 auf -170 mV erhöht wird, so dass das aktive Zentrum leichter reduzierbar wird. Dies ist eine Folge des Übergangs vom annähernd oktaedrischen Ligandenfeld zur verzerrt quadratisch-planaren Koordination, die mit einem Übergang zum high-spin (d^5 , $S = 3/2$) Eisen(II) einhergeht. Dadurch wird die Entkopplung der NADPH-getriebenen

Sauerstoffreduktion von der Oxidation des Substrats vermieden: Nur nach Substratbindung kann die Elektronenübertragung entlang des Potentialgradienten von NAD(P)H über die Elektronentransportkette auf das Hämeisen erfolgen. Ist diese Voraussetzung erfüllt, so erfolgt zunächst eine Einelektronenreduktion unter Bildung des high-spin Fe(II)-Komplexes **3**. Dieser ist auf Grund seiner vier ungepaarten Elektronen ($S = 2$) und seiner out-of-plane-Struktur bestens zur hochaffinen Bindung von Triplett-Sauerstoff geeignet. Die nach Sauerstoffbindung entstehende low-spin Form **4** wurde isoliert, charakterisiert und enthält mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Fe(III)-Superoxid mit „in-plane“-Koordination. Hierbei handelt es sich um die letzte, zumindest bei tiefen Temperaturen stabile und deshalb untersuchbare Zwischenstufe des Reaktionszyklus. Der nächste Reaktionsschritt, ist eine weitere Einelektronenreduktion zu einem sehr labilen Peroxo-Eisen(III)-Komplex **5**, der noch bei keinem Cytochrom-P450-Enzym direkt beobachtet werden konnte. Diese letzten Intermediate des Reaktionszyklus sind auf Grund ihrer hohen Reaktivität schlecht charakterisierbar; als gesichert kann jedoch gelten, dass nach Aufnahme zweier Protonen die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung gespalten und Wasser freigesetzt wird. Es entsteht ein reaktiver Komplex **6**, in der Literatur häufig als „compound I“ bezeichnet, der höchstwahrscheinlich über einen Rebound-Mechanismus (Abbildung III-10) in den Ausgangskomplex übergeht und das Produkt dabei freisetzt. Ob für den Komplex **6** eher formal fünfwertiges Eisen $\text{Fe}^{+V}=\text{O}^{\text{II}}$, oder wie in Abbildung III-9 ein als Radikalkation vorliegender Porphyrinring mit dann nur vierwertigem Eisenzentrum $[(\text{Por}^{\text{o}+})\text{Fe}^{+IV}=\text{O}]$ oder aber in Analogie zu Carbenen eine Oxenoid-Variante mit den formalen Oxidationsstufen null für Sauerstoff und plus drei für Eisen vorliegt, wurde bisher nicht eindeutig geklärt.

Abgesehen vom besprochenen Katalysezyklus existieren mindestens drei Wege auf denen es zur Abdissoziation der aktivierten Sauerstoffspezies vom katalytisch aktiven Hämeisen kommen kann (siehe Abbildung III-9). Diese Reaktionen werden im Englischen mit dem Begriff „*shunt pathways*“ bezeichnet, was sich frei mit „Konkurrenzreaktionen“ übersetzen lässt.

Die am besten untersuchte Reaktion ist dabei der sogenannte „*peroxide shunt*“. Dabei wird in Gegenwart starker Oxidationsmittel wie Periodaten, organischen Peroxiden oder Wasserstoffperoxid der Peroxokomplex **6** direkt aus dem substratgebundenen high-spin-Komplex **2** erhalten. Diese Reaktion besitzt eine

gewisse Relevanz für synthetische Prozesse, da sie ohne Einsatz des Kofaktors NAD(P)H zu den Reaktionsprodukten führt.

Die Rückreaktion führt unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid von Intermediat **6** zu **2**. Diese Abdissoziation von Peroxospezies vom aktiven Zentrum ist eine der drei Reaktionen, die zur Entkopplung der Substratoxidation von der NADPH-Oxidation führen können.

Die beiden anderen Reaktionen sind einerseits der sogenannte Autoxidations-„*shunt*“, bei dem von Komplex **4** durch Abdissoziation von Superoxid Komplex **2** entsteht. Andererseits kann Komplex **2** durch den sogenannten Oxidase-„*shunt*“ aus **6** gebildet werden. Dabei wird Sauerstoff unter Verbrauch zweier Moleküle NAD(P)H komplett zu Wasser reduziert.

Diese drei Reaktionstypen werden häufig als sogenannte Entkopplungsreaktionen zusammengefasst, da sie alle aus Sicht der Substratoxidation unproduktiv sind, aber trotzdem den Kofaktor NAD(P)H verbrauchen.

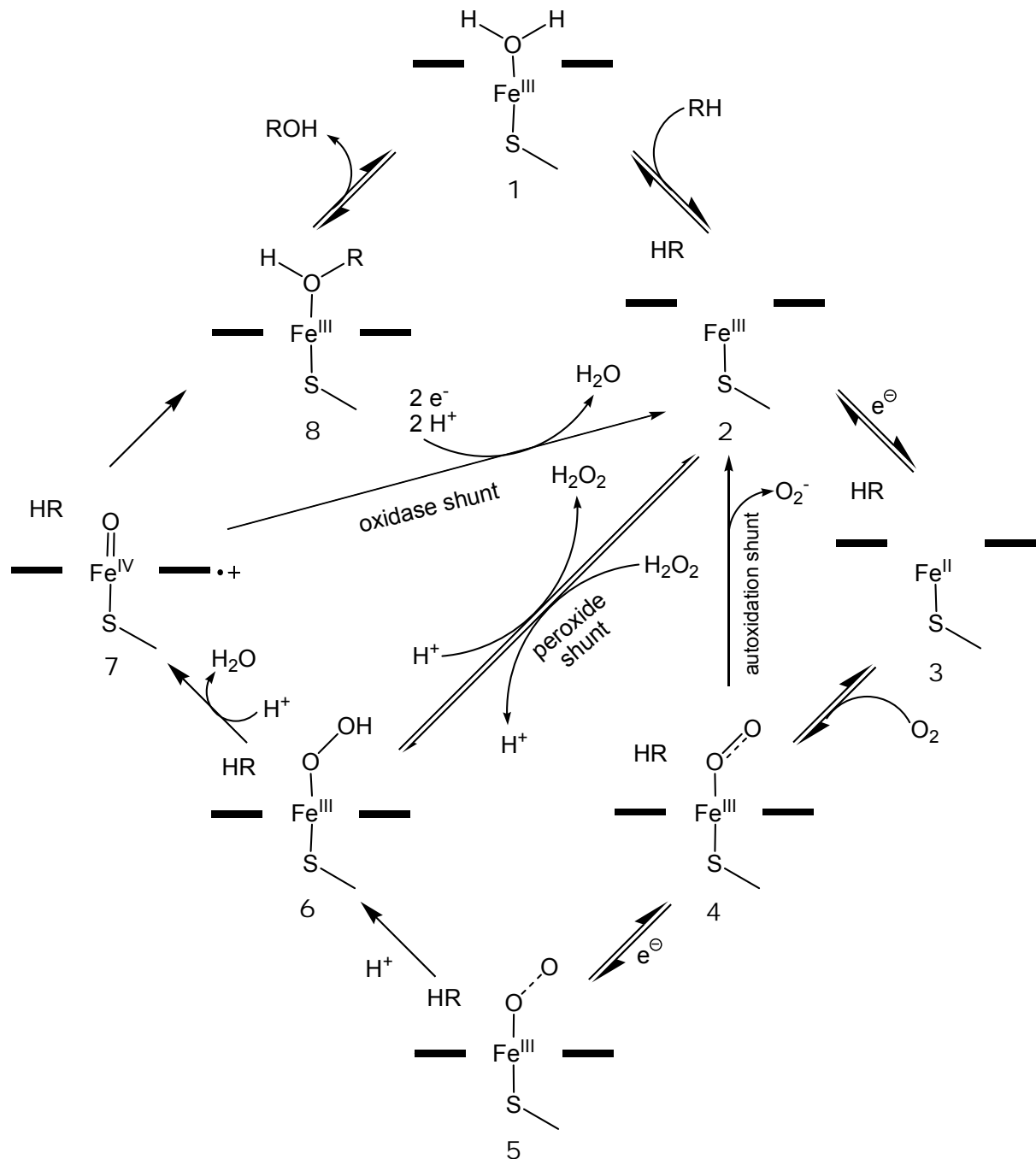


Abbildung III-9: Katalysezyklus von P450-Monooxygenasen. Die beiden in jedem Intermediat auftretenden fetten Balken symbolisieren das annähernd planare Porphyrinringsystem. Neben dem zu den Produkten führenden Katalysezyklus sind die prinzipiell zur Entkopplung von Substrat- und NADPH-Oxidation führenden Entkopplungsreaktionen („*shunt pathways*“) dargestellt.

Die eigentliche Sauerstoffübertragungsreaktion, also die Reaktion des Oxokomplexes **7** mit dem Substrat zu **8**, wird im Allgemeinen als radikalische Reaktion formuliert. Allerdings werden auch Carbokationen als Zwischenstufen oder aber eine direkte Addition des Substrats an **7** unter Insertion des Sauerstoffs in eine C-H-Bindung

diskutiert. Neben dem in Abbildung III-10 gezeigten Rebound-Mechanismus wird auch eine Heterolyse oder eine Addition von R-H an **6** nicht völlig ausgeschlossen.

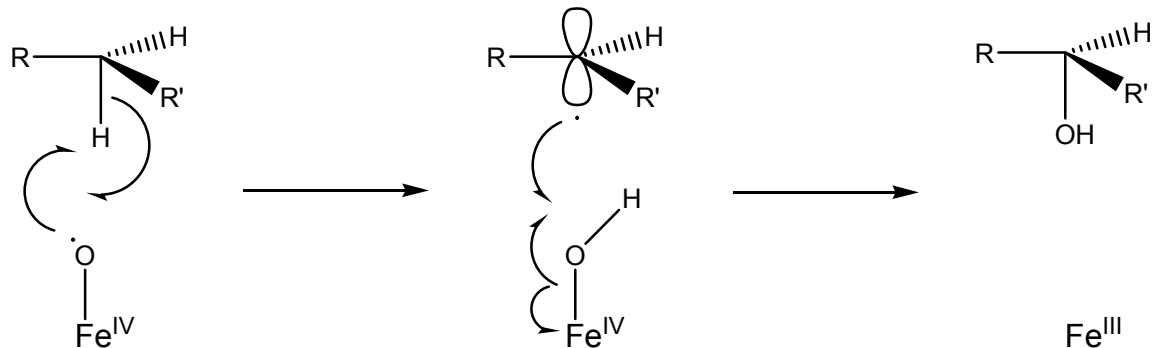


Abbildung III-10: „Rebound“-Mechanismus bei der durch P450-Monooxygenasen katalysierten Hydroxylierungsreaktion

Das intermediäre kohlenstoffzentrierte Radikal sollte unter Verlust der stereochemischen Information durch die Bindungsebene schwingen. Nur eine sehr schnelle Rekombination der Radikale kann die teilweise sehr hohe Enantioselektivität P450-vermittelter Oxidationen mit dem vermuteten radikalischen Reaktionsmechanismus in Einklang bringen.

Wahrscheinlich ist der entstandene Alkohol, wie in Abbildung III-9 dargestellt, vor seiner Abdissoziation noch kurzzeitig über das Sauerstoffatom an das Fe(III)-Porphyrin-System koordiniert.

III.1.5 Biologische Funktionen der P450-Monooxygenasen

P450-Monooxygenasen kommen, wie oben beschrieben, in fast allen Bereichen der belebten Natur vor. Ebenso divers wie ihr Vorkommen sind ihre Funktionen im Stoffwechsel der einzelnen Spezies. Neben der wenig selektiven Oxidation von hydrophoben Verbindungen (z. B. in der humanen Leber) wurde auch eine große Zahl hochselektiver Reaktionen zur Synthese von Hormonen, Signalüberträgern und anderen biologisch aktiven Sekundärmetaboliten beschrieben. Beispielsweise sind Cytochrom P450-Enzyme an der Ergosterol-Synthese^[49], der Biosynthese von Insekten- und Phytohormonen^[50, 51] der Ausbildung von Fruchtreife, Geruch und

Farbe bei Pflanzen^[52], der Biosynthese von Steroiden^[53, 54], dem Metabolismus von Retinoiden zur Regulation von epithelalem Wachstum/Differenzierung, sowie dem Arachidonsäurestoffwechsel zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen^[55] beteiligt. Daneben spielen hochselektive P450-Enzyme auch bei der wirtschaftlich interessanten Biosynthese sowohl von Makrolid- als auch von Peptidantibiotika eine Rolle. {Hezari, 1997 #188}^[56, 57]

Darüber hinaus dienen sie vor allem in Säugern, aber auch in Bakterien und Hefen zur Aktivierung oder Detoxifizierung von hydrophoben Verbindungen. P450-Enzyme gehören zu den sogenannten Phase I Enzymen, die mittels Oxygenierungen wasserunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen zur weiteren Metabolisierung vorbereiten. Dabei werden einige pharmazeutische Wirkstoffe wie beispielsweise die Oxazaphosphorine Cyclophosphamid und Ifosfamid in ihre therapeutisch aktive Form überführt.^[58] Der eigentliche Zweck der Hydroxylierung, Epoxidierung oder Dealkylierung hydrophober Giftstoffe liegt in der Vorbereitung auf die weitere Erhöhung der Hydrophilie durch Phase II Enzyme wie Glutathion-Transferasen, N-Acetyltransferasen oder Sulfotransferasen, die polare Gruppen übertragen. Die nun wasserlöslichen Verbindungen sind bioverfügbar beziehungsweise mit dem Urin ausscheidbar.^[59]

Bei der durch P450-Monooxygenasen vermittelten Aktivierung von Benzol, Chloroform und anderen hydrophoben natürlichen und xenobiotischen Verbindungen kommt es zur Bildung reaktiver Epoxid- oder Aldehydverbindungen, die hauptsächlich mit Aminogruppen von Proteinen, DNA oder anderen Zellbestandteilen reagieren und so toxisch und mutagen wirken.^[27] Insbesondere bei der Entwicklung von Pharmazeutika wäre es deshalb wünschenswert, den oxidativen Metabolismus vorhersagen zu können und so mögliche Gesundheitsgefahren noch vor der langwierigen und kostspieligen Testphase zu erkennen.

III.1.6 Redoxpartner von P450-Monooxygenasen

Bei der Diskussion des P450-Katalysezyklus (Kap. 2.1.3) wurde deutlich, dass die sequentielle Übertragung zweier Elektronen auf das Hämeisen für die Sauerstoffaktivierung unerlässlich ist. Zur Elektronenübertragung zum richtigen Zeitpunkt im Reaktionszyklus dient ein fein abgestimmtes System von

Oxidoreduktasen. Es wurde eine große Zahl jeweils für bestimmte P450-Monooxygenasen spezifischer Elektronentransfersysteme beschrieben. Gemeinsam ist all diesen Reduktasesystemen, dass die Reduktion des Hämeisens durch die Übertragung eines Elektronenpaars (Hydridions) von NAD(P)H auf eine NAD(P)H-Oxidoreduktase eingeleitet wird (Abbildung III-11). Von dort fließen die Elektronen auf ein Elektronentransferprotein, das die Reduktion des Hämeisens der P450-Monooxygenase durch Einelektronenübertragungen katalysiert.

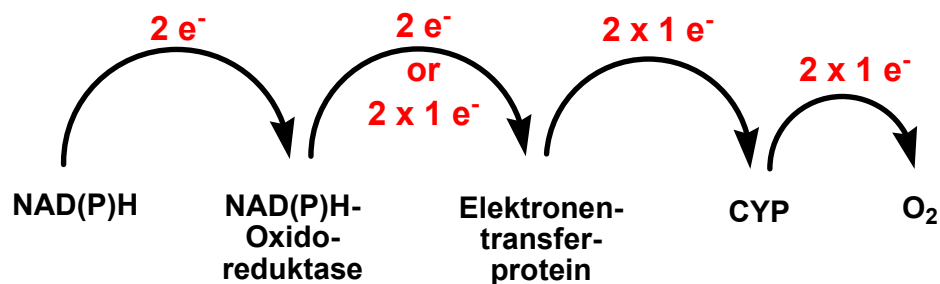


Abbildung III-11: Schematische Darstellung des Elektronenflusses in P450-Systemen.

Die häufigsten vier Klassen von Elektronentransportsystemen sind in Abbildung III-12 schematisch dargestellt.

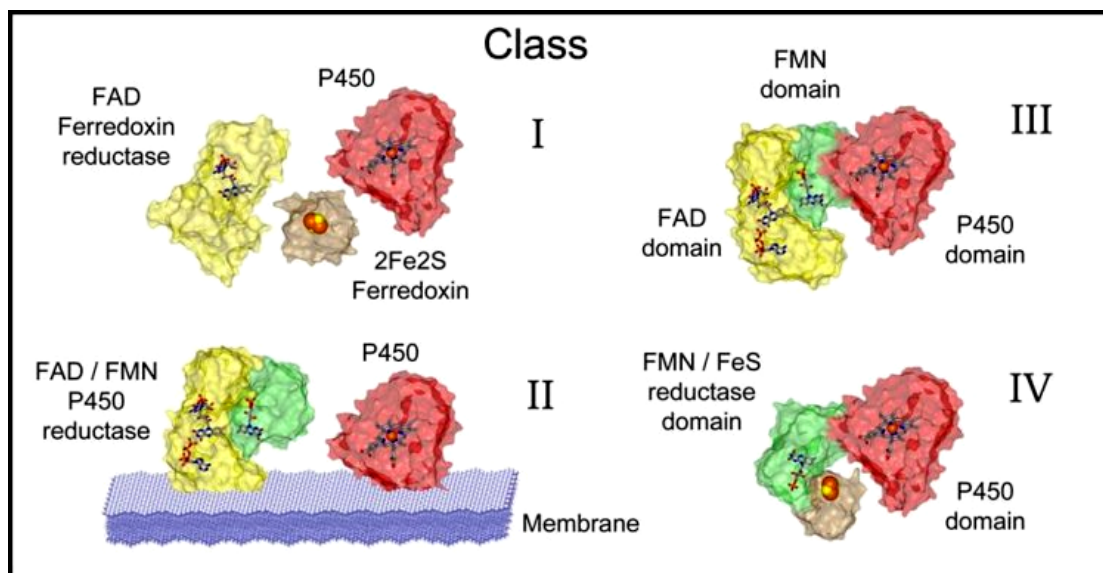


Abbildung III-12: Häufigste Elektronentransportsysteme von P450-Monooxygenasen nach S. K. Chapman (<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html>)

Die Redoxpartner der P450-Monooxygenasen der Klasse I sind eine FAD-enhaltende NAD(P)H-Oxidase und ein Eisen-Schwefel-Ferredoxin (v. a. in Pflanzen, aber auch P450cam aus *Pseudomonas putida*), diejenigen der Klasse II eine FAD-

und FMN enthaltende membrangebundene Reduktase (z. B. humane P450-Monooxygenasen), diejenigen der Klasse III eine mit der P450-Domäne fusionierte FAD/FMN-Reduktase (z. B. CYP102A1) und diejenige der Klasse IV eine über eine FMN-Domäne an die P450-Domäne fusionierte Eisen-Schwefel-NAD(P)H-Oxidase. Kürzlich erschien eine ausführliche Zusammenfassung des aktuellen Standes bei der Erforschung von P450-Redoxsystemen.^[60] In diesem Übersichtsartikel wird deutlich, dass außer den vier bekannten Klassen von P450-Redoxsystemen weitere Wege des Elektronentransfers auf P450-Monooxygenasen existieren.

III.1.7 CYP102A1

CYP102A1 (P450 BM-3) wurde als in *Bacillus megaterium* ATC 14581 durch Barbiturate induzierbares Fusionsprotein aus P450-Monooxygenase und Reduktase erstmals 1986 beschrieben.^[61] Dieselbe Arbeitsgruppe entdeckte, dass auch andere Stämme von *Bacillus megaterium* ähnliche, ebenfalls durch Barbiturate induzierbare Fettsäurehydroxylasen besitzen.^[62] Allerdings wurde inzwischen berichtet, dass die Expression des Proteins auch durch Fettsäuren wie Palmitinsäure induziert werden kann.^[63] Im Jahre 1990 wurde CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* ATC14581 kloniert und in *E. coli* überexprimiert.^[64] Mit einem Molekulargewicht von 119 kDa war CYP102A1 das erste bekannte wasserlösliche natürliche Fusionsprotein, das alle drei Domänen (FAD-, FMN- und Häm-domäne) in einer einzigen Polypeptidkette enthält.

Im Vergleich zu P450-Fettsäurehydroxylasen eukaryotischen Ursprungs ist CYP102A1 um einen Faktor 100 bis 1000 aktiver. Im Jahre 1993 gelang es, die P450-Domäne ohne Substrate^[5] und im Jahre 1996 mit Substrat^[65] zu kristallisieren. Sevrioukova et al. gelang es 1999 den Komplex aus FMN- und Monooxygenasedomäne röntgenkristallographisch zu charakterisieren.^[6] Allerdings fehlt in diesem Komplex die beide Domänen verbindende Linkerregion. Bis jetzt ist es nicht gelungen das gesamte Protein zu kristallisieren. Allerdings wurde die Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) der Ratte, die ebenfalls FAD- und FMN enthält, strukturell charakterisiert. Auf Grund der hohen Homologie beider Reduktasen lässt sich annehmen, dass die Strukturen und damit auch der katalytische Mechanismus beider Enzyme äußerst ähnlich sind. Tatsächlich ließ sich im Rahmen einer

Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart (ITB) zeigen, dass das strukturelle Wissen über die CPR genutzt werden kann, um durch ortsgerichtete Mutagenese die Kofaktorspezifität von CYP102A1 von NADPH auf das billigere NADH umzustellen.^[66, 67]

III.1.8 Weitere Fusionsproteine aus Reduktasesystem und P450-Monooxygenase

Die Entschlüsselung des Genoms des Bodenbakteriums *Bacillus subtilis*^[68] führte zur Entdeckung von sechs Gensequenzen mit Homologie zu P450-Monooxygenasen. Zwei dieser Gene zeigen ca. 60 % Homologie auf Aminosäureebene zu CYP102A1 und gehören demnach zur P450-Unterfamilie CYP102A. Auch bei diesen beiden P450-Monooxygenasen handelt es sich um Fusionsproteine aus P450- und Reduktasedomäne. Die beiden Gene *CYP102A2*^[69] und *CYP102A3*^[70] wurden kloniert, exprimiert und die Genprodukte charakterisiert. Es handelt sich um Fettsäurehydroxylasen mit zu CYP102A1 analoger Domänenorganisation.^[71, 72] Auf Grund von Unterschieden in Substratspektrum, Selektivität und Stabilität ergänzen sich die drei P450-Monooxygenasen der Unterfamilie CYP102A zu einem vielseitig einsetzbaren Katalysatorsystem.^[71, 72]

Erweitert wird dieses Arsenal an verwandten P450-Monooxygenasen durch das kürzlich aus *Bacillus licheniformis* klonierte *CYP102A4*.^[73]

Alle charakterisierten Mitglieder der P450-Unterfamilie CYP102A zeichnen sich durch sehr hohe Umsatzraten von 1000 bis 10000 min⁻¹ mit den natürlichen Substraten aus. Dies wird mit ihrer Domänenarchitektur in Verbindung gebracht: Der Elektronentransport innerhalb einer einzelnen Polypeptidkette kann viel schneller ablaufen als bei Beteiligung von zwei oder gar drei individuellen Proteinen.

Eine weitere Klasse von Fusionsproteinen besteht aus einer FAD-Domäne (NADPH-Oxidase), einer Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Domäne (Elektronentransferprotein) und der Häm-domäne.^[74] Es handelt sich also um Fusionsproteine der in Abbildung III-12 als Klasse I bezeichneten P450-Monooxygenasen.

Kürzlich wurde ein Fusionsproteinen (*CYP505*) beschrieben, das aus dem Pilz *Fusarium oxysporum* kloniert wurde.^[75, 76] Abgesehen von einer Substrathemmung

besitzt dieses Protein katalytische Eigenschaften, die denen der P450-Familie CYP102A sehr ähneln.

Für *in vitro*-Anwendungen sind Fusionsproteine besonders geeignet, da im Gegensatz zu anderen CYPs keine zusätzlichen Reduktase- und Elektronentransferkomponenten zugegeben werden müssen und – wie oben bereits angemerkt – die Reaktionsgeschwindigkeiten oft deutlich höher sind als bei ausgetrennten Komponenten bestehenden P450-Systemen. Deshalb wurden wiederholt Versuche unternommen, die hohe katalytische Effizienz und die Stabilität von Fusionsproteinen mit dem Substratspektrum anderer P450-Monooxygenasen zu koppeln. Hierzu werden Sequenzbereiche ausgetauscht, die hauptsächlich für die Substratspezifität wichtig sind.^[77, 78]

III.1.9 Substratspektrum von CYP102A1 und genetisch veränderten Varianten

CYP102A1 ist eine Fettsäurehydroxylase, die Carbonsäuren, Alkohole und Amide mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen subterminal hydroxyliert. Die Regiospezifität der Hydroxylierung hängt, wie in Tabelle III-1 gezeigt, stark von der Kettenlänge der Fettsäure ab.

Tabelle III-1: Produkte durch CYP102A1 katalysierter Fettsäurehydroxylierungsreaktionen^[64]

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

Die für die Substratspezifität von CYP102A1 besonders wichtigen Aminosäurepositionen wurden sowohl durch Kristallstrukturanalyse,^[10, 65] *in silicio*-Modellierung (basierend auf den Kristallstrukturen)^[79] als auch durch ortsgerichtete

Mutagenese^[31, 35-37, 80-82] und NMR-spektroskopische Messungen^[77, 83-85] identifiziert und untersucht. Die Fixierung der Fettsäuren an CYP102A1 erfolgt, wie in Abbildung III-13 dargestellt, über Arginin 47 und Tyrosin 51 an der Carboxyfunktion der Fettsäure.

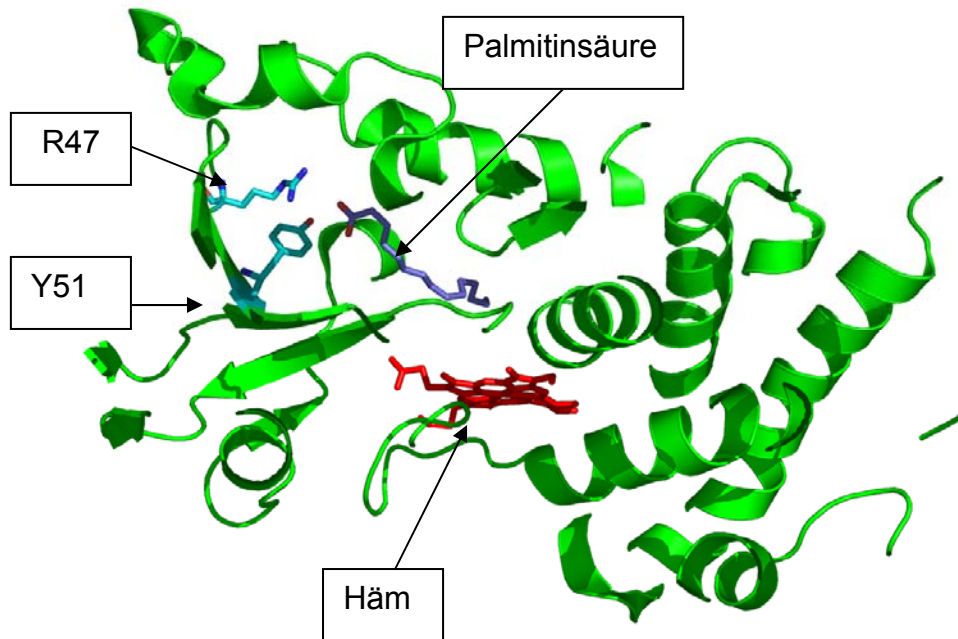


Abbildung III-13: Schnitt durch eine Ribbon-Darstellung des Komplexes aus Palmitinsäure und der CYP102A1-Häm- und Aminosäure-R47/Y51-Domäne. Die Abbildung wurde aus den unter dem Zugangscode 1smj^[10] bei der Protein Data Bank abgelegten Strukturkoordinaten mittels des Programmes PyMol (<http://www.pymol.org>) erzeugt. Hellblau sind die Aminosäuren 47 und 51, rot das Häm-System und lila das gebundene Substrat Palmitinsäure dargestellt. Im Substrat und den dargestellten Aminosäuren sind Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome dunkelblau gefärbt. Deutlich ist die Fixierung des Carboxylats über Arginin 47 und Tyrosin 51 zu erkennen.

Interessanterweise kann dies nicht der Komplex sein, aus dem die Reaktion erfolgt, da der Abstand zwischen ω -Kohlenstoffatom der Fettsäure und dem aktivierten Sauerstoffatom noch ca. 800 pm beträgt. Dieses Resultat aus NMR-Experimenten^[86] konnte durch die Kristallstruktur von CYP102A1 komplexiert mit Palmitinsäure^[10] bestätigt werden. Über den Austausch von Arginin gegen Glutaminsäure an Position 47 gelang es, durch Umkehrung der elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Substratfixierung positiv geladene N-Trimethylammoniumverbindungen umzusetzen.^[80]

Für die Substratspezifität sowie die Regio- und Enantioselektivität ist die Aminosäure an Position 87 äußerst wichtig. Diese Aminosäure, im Wildtypprotein ein Phenylalanin, liegt direkt auf der distalen Seite des Hämeisens und schirmt dieses vom Substratzugangskanal her ab. Ein Austausch dieses Phenylalanins 87 zu Alanin oder Valin führt zu einer deutlichen Verschiebung und Erweiterung des Substratspektrums.^[81, 87, 88] Außerdem besitzt die Mutante F87A eine bedeutend erhöhte Aktivität in der durch Wasserstoffperoxid getriebenen Reaktion.^[89]

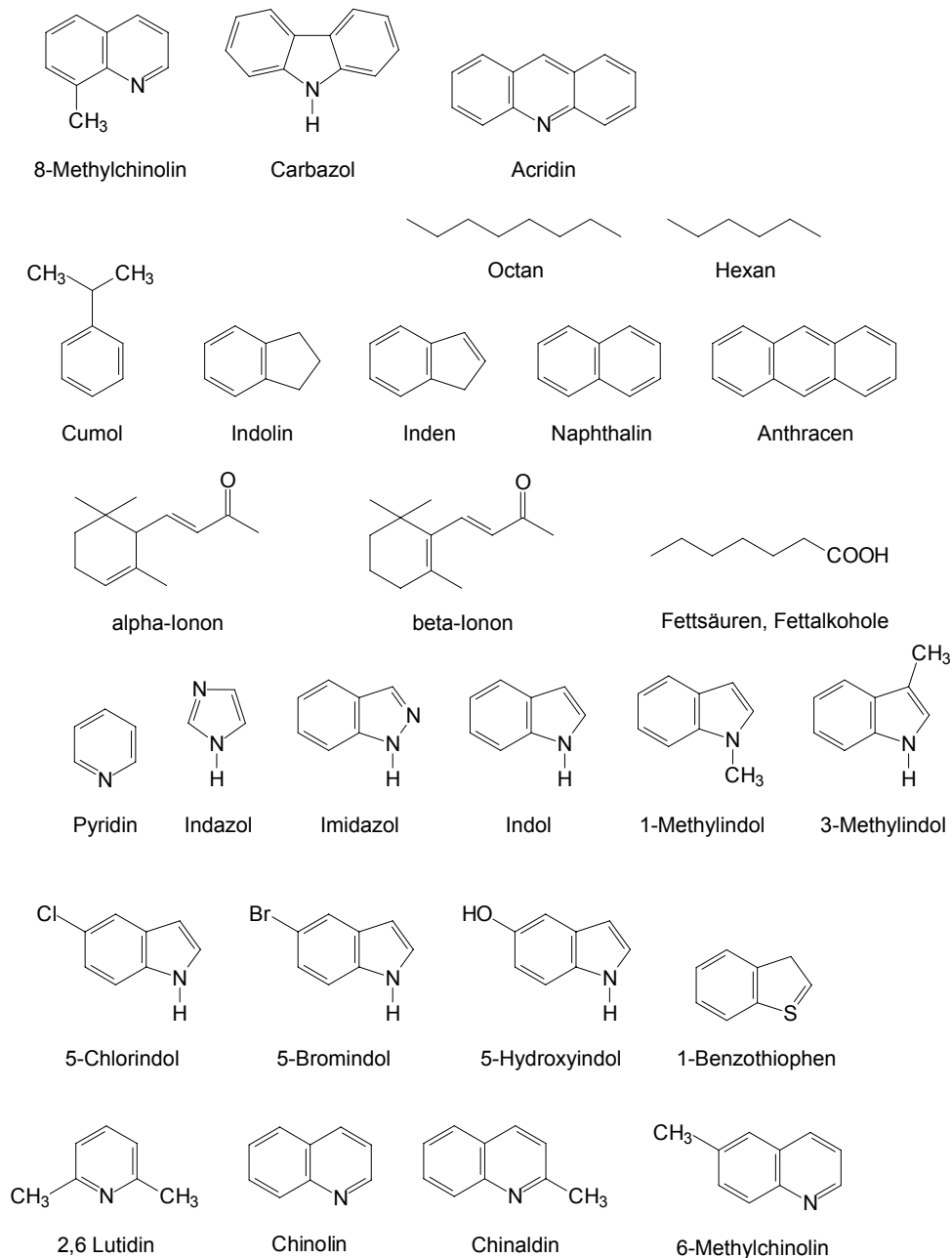


Abbildung III-14: Substratspektrum der CYP102A1-Variante A74G/F87V/L188Q nach Appel et al.^[31] Inzwischen wurde die Aktivität dieser Variante gegen weitere Verbindungen untersucht, was zur Entdeckung zusätzlicher Substrate führte.

Ausgehend von den Einzelmutanten an der Position 87 wurden Serien weiterer CYP102A1-Varianten mit deutlich verändertem Substratspektrum geschaffen.^[31, 90, 91] In diesen Arbeiten wurde auf Grund rationaler Überlegungen mutagenisiert. Dies bedeutet, dass ausgehend von der bekannten Kristallstruktur potentiell an der Substratbindung beteiligte Aminosäuren identifiziert wurden und diese nachfolgend entweder gegen definierte Aminosäuren (ortsgerichtete Mutagenese) oder aber durch Sättigungsmutagenese gegen alle 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht wurden. Die erzeugten CYP102A1-Varianten wurden auf Aktivität gegen eine Vielzahl von möglichen Substraten getestet. Um das breite Substratspektrum verschiedener CYP102A1-Varianten zu verdeutlichen, ist das aus der Originalpublikation von Appel et al. entnommenem Substratspektrum der Variante A74G/F87V/L188Q in Abbildung III-14 dargestellt.^[31]

Auffallend ist, dass unterschiedlichste Substanzklassen – von Alkanen über Fettsäuren und Terpene bis zu Aromaten und Heteroaromaten – oxidiert werden.

Interessanterweise werden noch immer weitere Verbindungen, die von dieser CYP102A1-Variante mit hoher Aktivität umgesetzt werden, entdeckt.^[36, 71, 82, 89]

Nachdem die offensichtlich zur Substratbindung und -Erkennung beitragenden Aminosäuren, also die den Substratzugangskanal direkt flankierenden Seitenketten untersucht waren, konnten weitere Änderungen im Substratspektrum hauptsächlich durch gerichtete Evolution erzielt werden. Bei dieser Methode werden – ähnlich wie in der natürlich stattfindenden Evolution – Mutationen an zufälligen Positionen eingeführt und verbesserte Varianten selektiert. In der Natur erfolgt diese Selektion auf Grund von Überlebensvorteilen des entsprechenden Organismus, in der Technik wird ein Testsystem benötigt, mit dem auf die entsprechende Eigenschaft optimiert werden kann. Der typische Ablauf der gerichteten Evolution oder “directed evolution” sieht wie folgt aus: Zunächst wird mit Hilfe einer geeigneten Mutationsstrategie eine Mutanten-Bibliothek des entsprechenden Gens angelegt. Je nach gewählter Technik („error prone PCR“, „DNA-Shuffling“, „Casting“ etc.) werden die Mutationen unterschiedlich verteilt sein. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit, eine Aminosäure durch eine bestimmte andere Aminosäure zu substituieren je nach Technik unterschiedlich groß. Eine umfassende Übersicht zum Thema gerichtete Evolution, wurde von Arnold und Georgiou in der Reihe „Methods in Molecular Biology“ (Bände 230 und 231) herausgegeben.^[92, 93]

Nach Expression der in der Bibliothek kodierten Proteine werden Proteinvarianten, die hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft verbessert sind, durch „Screening“, also durch ein Aktivitätstestsystem, identifiziert. Dieses Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass auch rational noch nicht erklärbare langreichweitige Effekte von Aminosäuresubstitutionen zur Enzymverbesserung genutzt werden können. Außerdem können evolutive Methoden der Enzymverbesserung auch eingesetzt werden, wenn die Struktur des Proteins nicht bekannt ist.

Weitere Verbesserungen können durch Wiederholung dieses Zyklus aus Mutagenese und Aktivitätstest erzielt werden. Entscheidend ist die Wahl des Aktivitätstestsystems, da es einerseits nahe an dem real zu lösenden Problem liegen sollte und andererseits einen sehr hohen Probendurchsatz ermöglichen muss.

Von CYP102A1 wurden auf dem Wege der gerichteten Evolution Varianten erhalten, die hohe Umsatzraten mit Wasserstoffperoxid als Oxidans,^[89] hohe Aktivität gegen Alkane^[33, 39, 94] und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe,^[90] hohe Aktivität und Enantioselektivität in der Epoxidierung von Alkenen,^[95] hohe Stabilität gegen organische Lösungsmittel^[96] sowie hohe Aktivität und Regioselektivität bei der Oxidation von Terpenen wie β -Jonon^[97] oder Valencen^[98] aufweisen.

III.2 Einsatz von P450-Monooxygenasen in technischen Prozessen

Die selektive Hydroxylierung und Epoxidierung (z. B. Sharpless-Reaktion zur stereoselektiven Epoxidierung von Allylalkoholen) organischer Substanzen basierend auf chiralen Katalysatoren ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Dabei wurden große Erfolge erzielt. Allerdings können diese Reaktionen auf Grund der Katalysatorkosten, der komplexen Reaktionsführung und der häufig noch nicht optimalen Ökobilanz nur teilweise in die industrielle Praxis übertragen werden. Eine Alternative bietet die Verwendung von Biokatalysatoren. Im Falle von Hydroxylierungs- und Epoxidierungsreaktionen können neben anderen Oxygenasen P450-Monooxygenasen eingesetzt werden. Die hohe Diversität des Substratspektrums der CYPs lässt hoffen, dass für eine große Zahl von Reaktionen eine selektive P450-Monooxygenase gefunden werden kann. Beispielsweise lassen sich die wirtschaftlich interessanten Steroide an jeder Position des Kohlenstoffgrundgerüsts selektiv durch Monooxygenasen hydroxylieren.^[99]

Bisher werden CYPs nur in Form von Ganzzellbiokatalysatoren für die Synthese eingesetzt.

Vorteile der Ganzzellbiokatalyse unter Verwendung intakter, wachsender Zellen gegenüber dem Einsatz isolierter Enzyme liegen in der „automatischen“ Regeneration von Kofaktoren durch den Zellstoffwechsel, der kontinuierlichen Proteinbiosynthese, die zum Ersatz inaktivierter Enzyme führt, sowie in der einfachen Herstellung des Katalysators. Häufig werden Produktionsstämme eingesetzt, die schon als Wildtypstamm die gewünschte Aktivität zeigten. Um deren Produktivität zu erhöhen, können mittels molekularbiologischer Methoden die P450-Enzyme genetisch verändert - und / oder in den Stoffwechsel der entsprechenden Zelllinie eingegriffen werden („metabolic engineering“). Durch die Veränderung des Stoffwechsels (z. B. durch Ausschalten einzelner Gene) gelingt es häufig, den Abbau des gewünschten Produkts durch den zelleigenen Metabolismus zu verhindern. So konnte aus dem Hefestamm *Candida tropicalis* unter anderem durch Ausschalten der β -Oxidation von Fettsäuren ein hocheffizienter Produzent von α,ω -Dicarbonsäuren aus Fettsäuren oder Alkanen entwickelt werden.^[100] Die ω -Oxidation der Substrate erfolgt hierbei über P450-Monooxygenasen der Familie CYP52.

Neben dem Ausschalten einzelner zur Produktdegradation führender Gene ist auch das Einfügen zusätzlicher Gene gängige Praxis. Zum Beispiel werden zur Bereitstellung ausreichender Mengen an Kofaktoren Gene (z. B. Glucose- oder Formiatdehydrogenasen zur Reduktion der Kofaktoren NAD(P)^+) in Produktionsstämme eingebracht. Die Degussa AG produziert mittels solcher rekombinanter, durch Einbringen mehrerer heterologer Gene zum Recycling von NAD(P)H (z. B. Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp.) und dessen effizienter Nutzung (z. B. durch Alkoholdehydrogenasen oder Aminosäureoxidasen) fähiger *E. coli*-Stämme seit 2005 chirale Alkohole und Aminosäuren (http://www.degussa.de/de/innovationen/f_e_awards/innovationspreis/designerzellen.html). Allerdings werden dabei bisher keine P450-Monooxygenasen eingesetzt.

Die Produktdegradation in Kombination mit weiteren Nachteilen der Ganzzellbiokatalyse, wie beispielsweise dem wenig effizienten Transport vieler Substrate über die Zellmembran und der komplizierten Aufreinigung der Produkte aus komplexen Fermentationsgemischen, führte zu wachsendem Interesse an der Entwicklung zellfreier Prozesse. Das größte Problem, das für die Realisierung solcher *in vitro*-Prozesse gelöst werden müsste, ist die Regenerierung bzw. der

Ersatz des stöchiometrisch benötigten Kofaktors NAD(P)H. Der hohe Preis dieses Kofaktors verbietet seinen stöchiometrischen Einsatz unter ökonomischen Gesichtspunkten. Ein weiteres Problem stellt die geringe Stabilität der meisten CYPs dar.

Generell gilt für die *in vivo*- wie für die *in vitro*-Anwendung von Monooxygenasen, dass die Substrate im Allgemeinen sehr hydrophob und damit nur in sehr geringem Maße wasserlöslich sind. Auf das Lösungsmittel Wasser kann aber sowohl bei Verwendung ganzer Zellen (wässriges Kulturmedium) als auch bei Einsatz isolierter Enzyme (NAD(P)H ist kaum in organischen Lösungsmitteln löslich) nicht verzichtet werden. Deshalb werden die zur Zeit angewendeten Ganzzellverfahren zur Biooxidation meist in Zweiphasensystemen durchgeführt. Dabei dient die organische Phase (in vielen Fällen das Substrat) sowohl als Substratreservoir als auch zur Akkumulation der Reaktionsprodukte.

III.2.1 Produktionsprozesse unter Beteiligung von Oxygenasen

Einige der augenblicklich unter Beteiligung von Oxygenasen industriell durchgeführten Ganzzellbiotransformationen sind in Tabelle III-2 exemplarisch aufgeführt.

Tabelle III-2: Industrielle Anwendungen von Oxygenasen in Ganzzellbiotransformationen nach van Beilen et al.^[99]

Produktionsprozess	Details	Unternehmen
Benzoessäure zu <i>cis-cis</i> -Muconsäure	Raum-Zeit-Ausbeute: 70 g l ⁻¹ d	Mitsubishi Medical Inc. (Ibaraki, Japan)
Glukose zu <i>trans</i> -4-hydroxy-L-Prolin	Produktkonzentration: 25 g l ⁻¹	Kyowa Hakko Kogoy Co. (Tokio, Japan)
Compactin zu Pravastatin	Produktkonzentration: 5 g l ⁻¹ Marktwert 3.6 Mrd, US\$ a ⁻¹	Sankyo Pharma (Parsippany, NJ, USA)
Glukose zu Indigo	Produktkonzentration: 18 g l ⁻¹	Genencor International (Palo Alto, CA, USA)
Hydroxylierung von Pyridinderivaten und Heteroarenen	Produktkonzentration: 24 g l ⁻¹ ; Umsatz 99 %	Lonza (Visp, Schweiz)
Hydroxylierung von Phenoxypropionsäure <i>para</i> -Position	<i>R</i> -2-an Produktkonzentration: 7 g l ⁻¹ <i>Bauveria bassiana</i>	BASF AG (Ludwigshafen)
11 β -Hydroxylierung von Desoxycortisol-17-acetat ^[101]	<i>Curvularia lunata</i>	Schering AG (Berlin)

Diese Anwendungsbeispiele belegen, dass die Biooxidation ein großes Potential in der industriellen Synthese besitzt. Allerdings verlaufen nur drei der in Tabelle III-2 genannten Prozesse – die Umsetzung von Compactin zu Pravastatin (Sankyo Pharma), die *para*-Hydroxylierung von *R*-2-Phenoxypropionsäure (BASF AG) sowie die 11 β -Hydroxylierung von Desoxycortisol-17-acetat (Schering AG) – unter Beteiligung von P450-Monooxygenasen.

Zusätzlich zu diesen großtechnischen Prozessen existieren zahllose industrielle Anwendungen im kleinen Maßstab. Beispielsweise ist es gängige Praxis in der Pharmaindustrie, Zwischenprodukte des Metabolismus von Pharmazeutika durch humane Hydroxylasen oder ihre Analoga aus Pilzen oder Bakterien zu synthetisieren. Diese Verbindungen werden benötigt, um ihre pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften schon in einer frühen Phase der Medikamentenentwicklung untersuchen zu können.

III.2.2 Probleme bei der zellfreien Biooxidation mit P450-Monooxygenasen

III.2.2.1 Kofaktorabhängigkeit

Die *in vitro*-Anwendung von Monooxygenasen wurde lange Zeit für unmöglich gehalten, da der stöchiometrische Verbrauch des Kofaktors NAD(P)H zu Kosten führt, die solche Prozesse ökonomisch nicht rentabel erscheinen lassen. Abhilfe kann hier die enzymatische, elektrochemische oder chemische Regenerierung von NADPH liefern. Auch die kathodische Reduktion (direkt oder über Mediatoren) von Monooxygenasen sowie der Ersatz des NADPH durch künstliche Elektronenüberträger ist untersucht worden. Der aktuelle Stand der Forschung auf diesen Gebieten wird in den folgenden Unterkapiteln 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben.

III.2.2.2 Geringe Aktivität

Zusätzlich zu den durch die Kofaktorabhängigkeit verursachten Schwierigkeiten wurden die Umsatzraten von P450-Monooxygenasen für zu gering für den Einsatz in effizienten technischen Prozessen gehalten. Im Vergleich zu den in der industriellen Biokatalyse eingesetzten Hydrolasen ist dies durchaus der Fall. Beispielsweise besitzt die humane Cytochrom P450-Monooxygenase CYP3A4 für eines ihrer Substrate, den Dopamin D₂-Rezeptor-Antagonisten Domperidon, ein Benzimidazolderivat, eine Hydroxylierungsrate von 4.3 min⁻¹.^[102] Dies ist für eukaryotische, zum Abbau von Xenobiotika dienende Monooxygenasen durchaus ein typischer Wert. Diese Aktivität ist sicher zu niedrig für den Einsatz als Biokatalysator. Im Gegensatz dazu besitzen die P450-Monooxygenasen der Familie CYP102A mit Umsatzraten von bis zu 16800 min⁻¹ (regio- und stereoselektive Epoxidierung von Arachidonsäure) bedeutend höhere Aktivität.^[34] Für die Oxidation von Fettsäuren steht damit ein zumindest ausreichend aktiver Biokatalysator zur Verfügung. Daraus folgt, dass das Problem geringer Aktivität nicht für die P450-Monooxygenasen spezifisch ist. Der Katalysezyklus kann prinzipiell auch mit Frequenzen von >10000 min⁻¹ durchlaufen werden. Es sollte demnach möglich sein, durch Proteindesign die Umsatzraten auch für andere Substrate deutlich zu erhöhen.

Prinzipiell können geringe Umsatzraten durch den Einsatz größerer Mengen des Katalysators ausgeglichen werden. Produktion großer Mengen an Biokatalysatoren

zu günstigen Preisen setzt deren effiziente Überexpression voraus. Dies ist im Falle von CYP102A1 möglich, wie in der vorliegenden Arbeit sowie in der Diplomarbeit von Pflug gezeigt werden konnte.^[103] Die effiziente Überexpression in Kombination mit der hohen Aktivität lässt die zellfreie Anwendung von CYP102A1 untersuchenswert erscheinen.

III.2.2.3 Geringe Stabilität

Bei den meisten eukaryotischen P450-Monooxygenasen handelt es sich um Enzyme, die ihre Aktivität in isolierter Form sehr schnell verlieren.

Im Gegensatz dazu ist CYP102A1 sehr stabil (siehe zum Beispiel Abbildung V-19 in dieser Arbeit). Dies ist für die Entwicklung zellfreier Prozesse von großem Vorteil.

Durch sehr hohe Stabilität zeichnen sich P450-Monooxygenasen aus thermophilen Organismen aus.^[60, 104-106] Allerdings wird ihre Verwendung durch Probleme wie geringe Umsatzraten und noch nicht vollständig charakterisierte Redoxsysteme erschwert.

III.3 Ersatz / Regenerierung von NAD(P)H

III.3.1 Ersatz von NAD(P)H bei der Oxygenierung durch P450-Monooxygenasen

NAD(P)H kann im Reaktionszyklus von P450-Monooxygenasen durch verschiedene Reagenzien ersetzt werden. Dabei muss zwischen Oxidationsmitteln wie Peroxiden und Reduktionsmitteln, die den natürlichen, auf der Spaltung von Luftsauerstoff beruhenden Katalysemechanismus unterhalten können, unterschieden werden. Zusätzlich existieren Verfahren, bei denen die Reduktionsäquivalente durch lichtinduzierte Reaktionen erzeugt werden.^[107, 108]

Die peroxidvermittelte Reaktion läuft nach dem so genannten *shunt-pathway* ab. Diese Abkürzung im Reaktionszyklus führt direkt zum Peroxoisenkomplex **6** in Abbildung III-9, aus dem durch Wasserabspaltung das reaktive Oxidans **7** hervorgeht, das die Sauerstoffübertragung auf das Substrat hervorruft. Dieses Sauerstoffatom stammt bei der peroxidvermittelten Reaktion nicht aus dem

Luftsauerstoff, sondern wie in peroxidasekatalysierten Reaktionen direkt aus dem zugegebenen Peroxid. Dabei kann es sich um Wasserstoffperoxid oder um organische Peroxide wie beispielsweise t-Butyl-hydroperoxid handeln. Nachteile dieses Verfahrens sind, dass bisher generell nur sehr geringe Umsatzraten erreicht wurden und Peroxide negative Auswirkungen auf die Stabilität von Enzymen besitzen.^[109]

Eine weitere Möglichkeit, durch P450-Monooxygenasen vermittelte Oxidationen unter Verwendung einer stöchiometrisch eingesetzten anorganischen Verbindung durchzuführen, besteht in der Zugabe von Natriumdithionit. Durch Natriumdithionit wird das aktive Zentrum von P450-Monooxygenasen zum Eisen(II) reduziert. Dies wird standardmäßig für die Aufnahme der für die Enzymklasse charakteristischen reduzierten CO-Differenzspektren ausgenutzt. Allerdings ist diese Reduktion weit weniger geeignet den Katalysezyklus anzutreiben als die Verwendung des natürlichen Reduktionsmittels NAD(P)H. Die durch Dithionit getriebene Reaktion kommt bereits nach wenigen Katalysezyklen zum Erliegen.^[110]

Eine alternative Möglichkeit, das aktive Zentrum von P450-Monooxygenasen zu reduzieren, besteht im Einsatz von Mediatoren. Diese Mediatoren wechseln dabei als katalytisch wirksame Spezies zwischen reduzierter und oxidiert Form. Damit ist ihre Funktion vergleichbar mit der des NAD(P)(H) in der Zelle. Auch dort liegt der Kofaktor nur in geringen Konzentrationen vor und wechselt wiederholt zwischen reduziertem und oxidiertem Zustand. Neben Stabilität im Reaktionsmedium in reduzierter und oxidiert Form müssen synthetische Mediatoren ein negativeres Standardreduktionspotential als der Elektronenakzeptor aufweisen. Im Fusionsprotein CYP102A1 ist dieser Akzeptor FAD mit einem Reduktionspotential von -289 mV (siehe Tabelle III-3).

Estabrook et al.^[111] benutzten Kobaltsepulchrat (1 in Abbildung III-15) als Mediator, das elektrochemisch reduziert werden kann. Schwaneberg et al. reduzierten den Mediator Kobaltsepulchrat durch Zugabe von Zinkstaub in wässriger Lösung.^[112] Die Ausbeuten erreichen dabei in beiden Fällen maximal 20 % der mit NADPH erreichbaren Werte.

Auch die Verwendung von elektrochemisch reduzierbaren Rhodium-Komplexen zur Reduktion des aktiven Zentrums von Oxidoreduktasen wurde kürzlich intensiv untersucht.^[113-115] Die reduzierte Form dieser Komplexe ist sowohl zur Reduktion von

NAD(P)⁺ als auch zur direkten Reduktion von enzymgebundenen Flavinen in der Lage. Interessanterweise kann der Mediator sowohl kathodisch als auch durch Zugabe von Formiat reduziert werden. Formiat wird dabei zu Kohlendioxid oxidiert. Damit zeigen Komplexe wie **2** in Abbildung III-15, zumindest wenn nur die Nettoreaktion betrachtet wird, starke Analogie zu den unter Kap. 2.3.2.3 beschriebenen Formiatdehydrogenasen.

Auch die kovalente Anknüpfung von Riboflavin (Vitamin B2, **3** in Abbildung III-15) an Enzyme wurde zur Reduktion des aktiven Zentrums von CYPs genutzt. Riboflavin kann sowohl elektrochemisch als auch chemisch oder durch sichtbares Licht reduziert werden. Kovalent an –NH₂-Gruppen des Enzyms gebundenes Riboflavin kann als universell reduzierbarer Ersatz für die natürlichen Reduktionssysteme dienen.^[107, 116] Allerdings gilt auch hier, dass die erzielbaren Wechselzahlen für die P450-Biokatalysatoren noch gering sind.

Auch die elektrochemische Reduktion von P450-Monooxygenasen an Elektroden, entweder über den natürlichen Redoxpartner^[117] oder direkt wurde beschrieben.^[118, 119] Nur in wenigen Fällen konnten dabei Reaktionsprodukte nachgewiesen werden.^[117, 118] Besonderes Potential für die Bioelektrokatalyse besitzt die Immobilisierung von P450-Monooxygenasen direkt auf Elektroden. Erste Erfolge wurden kürzlich von Shumyantseva et al. beschrieben.^[120] Für viele der elektrochemischen Studien gilt, dass selbst wenn der Nachweis von Produkten gelang, häufig nicht eindeutig zu klären ist, ob sie auf dem normalen Katalysezyklus oder durch elektrochemisch entstandenes Wasserstoffperoxid auf dem „*shunt-pathway*“ gebildet wurden. Das Standardreduktionspotential der Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid liegt bei 295 mV, während die Reduktion des Hämeisens je nach untersuchter P450-Monooxygenase ein Potential von ca. -250 mV aufweist (Tabelle III-3). Häufig wird ein Elektrodenpotential von ca. -400 bis -600 mV zur elektrochemischen Reduktion von P450-Monooxygenasen eingestellt. Bei diesem Potential ist die Bildung von Wasserstoffperoxid nicht auszuschließen.

Tabelle III-3: Standardreduktionspotentiale bei der Reduktion von CYP102A1 nach Daff et al.^[121]

NADP ⁺ + 2 e ⁻ + H ⁺ / NADPH	CYP102A1 FAD-Domäne	CYP102A1 FMN-Domäne	CYP102A1 Häm-Domäne	CYP102A1 Häm-Domäne, substrat-gebunden
-320 mV	-289 mV	-236 mV	-368 mV	-230 / -260 mV je nach Substrat

Die häufig unerwünschte elektrochemische Bildung von H_2O_2 könnte – wenn sie geschickt ausgenutzt wird - eine Verfahrensalternative bei der Biokatalyse durch P450-Monooxygenasen darstellen. Vorteil gegenüber der direkten Zugabe von H_2O_2 ist dabei, dass sehr geringe Mengen des Oxidans gezielt (und damit schonend) zur Verfügung gestellt werden können. Allerdings konnten bisher keine präparativ bedeutsamen Produktmengen hergestellt werden.^[122, 123]

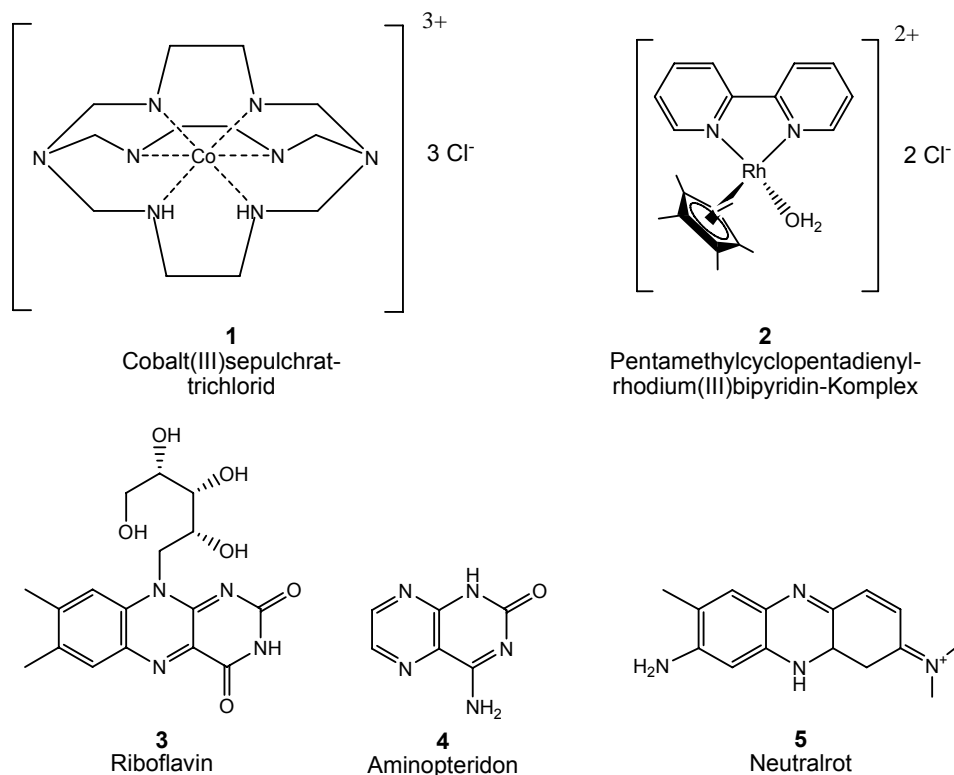


Abbildung III-15: Mediatoren zur Reduktion der aktiven Zentren sauerstoffaktivierender Enzyme (1 bis 3) bzw. zur Regeneration von NAD(P)H (4 und 5).

III.3.2 Regenerierung von NAD(P)H

Die Regenerierung von NAD(P)H kann prinzipiell auf elektrochemischem (mittels löslicher Mediatoren bzw. direkt an der Elektrodenoberfläche), auf enzymatischem, auf chemischem sowie auf photobiologischem Wege erfolgen. Auf die beiden ersteren Möglichkeiten wird im Folgenden detailliert eingegangen. Das

photobiologische Verfahren benutzt isolierte Chloroplasten zur Regenerierung von NAD(P)H.^[124]

III.3.2.1 Elektrochemische Regenerierung von NAD(P)H

Prinzipiell ist die elektrochemische Regenerierung der reduzierten Form der Nikotinamidadenindinukleotidkofaktoren mit jedem Elektroden- bzw. Mediatorpotential, das unterhalb des Potentials des $\text{NAD(P)}^+ + 2 e^- + \text{H}^+ / \text{NAD(P)H}$ – Redoxpaars liegt, möglich.

Auf Grund dieser relativ geringen Voraussetzungen verwundert es nicht, dass mehrere elektrochemische Mediatoren literaturbekannt sind.^[125] Besondere Bedeutung kommt dabei den oben bereits erwähnten Rhodium-Bipyridin-komplexen und verwandten Verbindungen zu.^[126] Neben diesen durchweg auf Rhodiumzentrationen basierenden Mediatoren, sind auch rein organische Verbindungen in der Lage, Hydridionen auf NAD(P)^+ zu übertragen. Diese Verbindungen – beispielsweise Aminopteridon oder Neutralrot (**4** und **5** in Abbildung III-15) – sind strukturell mit den Flavinen verwandt.

Die direkte elektrochemische Reduktion von NAD(P)^+ wurde mittels verschiedener Elektroden untersucht, ist allerdings in Beziehung auf Effizienz und erreichbare Wechselzahlen den Verfahren unter Benutzung von Mediatoren unterlegen.^[125] obn bard

Allgemein ist die elektrochemische Reduktion von NAD(P)^+ auf Grund der geringen Effizienz noch nicht für Anwendung in der präparativen Synthese geeignet. Außerdem resultiert die bei der enzymatischen Reduktion immer vollständig enantio- und regioselektive formale Übertragung eines Hydridions bei direkter elektrochemischer Reduktion häufig in einem Gemisch von Regio- und Stereoisomeren, das nur teilweise zur weiteren Elektronenübertragung genutzt werden kann.^[125] Einelektronenreduktion von NAD(P)H führt zu radikalische Intermediaten, die zur Dimerisierung neigen und so einer weiteren Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die in vielen Systemen beobachtete Entstehung von Wasserstoffperoxid (Reduktion von Luftsauerstoff) unter aeroben Bedingungen lässt am ehesten die elektrochemische Regenerierung von NAD(P)H in einem vom Oxygenierungsprozess getrennten, sauerstofffreien Kompartiment möglich erscheinen.

III.3.2.2 Enzymatische Regenerierung von NAD(P)H

Es ist eine große Zahl an NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen bekannt. Diese Enzyme oxidieren ein organisches Substrat – meist einen Alkohol – und reduzieren im Gegenzug NAD^+ zu NADH . Neben Glucose- und Lactatdehydrogenasen^[127] kommen dabei vor allem Formiatdehydrogenasen zum Einsatz. Im Falle der enantioselektiven Reduktion von Ketonen durch Alkoholdehydrogenasen kann häufig dasselbe Enzym sowohl zur Reduktion des Substrats als auch zur Oxidation eines „Hilfsalkohols“ (häufig Isopropanol) eingesetzt werden.^[128]

Für die Regenerierung von NADPH stehen weit weniger Enzyme zur Verfügung. Mehrere dieser Enzyme sind instabil gegen Sauerstoff^[129, 130]. Da Sauerstoff in den hier betrachteten Reaktionen aber einer der Reaktionspartner ist, kommen neben der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*^[131] vor allem die Glucosedehydrogenasen aus *Bacillus cereus*^[132] und *Bacillus megaterium*^[133, 134] in Betracht. Da Glucose-6-phosphat teuer ist, scheidet seine Verwendung für großtechnische Synthesen aus. Damit stehen vor allem Glucosedehydrogenasen aus *Bacillus sp.* zur Regenerierung von NADPH zur Verfügung.

Zusätzlich wurde aus der NAD^+ -abhängige Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas sp.* 101 mittels ortsspezifischer Mutagenese ein NADP^+ -abhängiges Enzym konstruiert.^[135] Dieses Enzym besitzt eine sehr hohe Stabilität sowohl gegen organische Lösungsmittel als auch gegen erhöhten Temperaturen. Es ist bei 4°C praktisch unbegrenzt haltbar und besitzt bei einer Michaelis-Konstante $K_M(\text{NADP}^+) = 0.32 \text{ mM}$ und einer spezifischen Aktivität von 1.5 U mg^{-1} eine für diese Enzymklasse hohe katalytische Effizienz.

Der Vorteil von Formiatdehydrogenasen gegenüber den oben diskutierten Alkoholdehydrogenasen liegt in der Entstehung von CO_2 als Nebenprodukt. Dieses Nebenprodukt entweicht aus dem Reaktionsgemisch und stellt bei der Aufarbeitung kein Problem dar. Dadurch liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite der Produkte und die Reaktion ist praktisch irreversibel.

Die Verwendung von Hydrogenasen, die NAD(P)^+ mittels molekularem Wasserstoff zu NADPH reduzieren, wurde beschrieben. Allerdings ist auch dieses System noch nicht auf einem Stand, der seinen Einsatz in der Synthese ermöglichen würde.^[128]

Ein weiteres Enzym wurde kürzlich durch gerichtete Evolution für die NAD(P)H -Regenerierung optimiert: Die Stabilität der Phosphitdehydrogenase aus

Pseudomonas stutzeri konnte 7000-fach erhöht werden. Dieses Protein oxidiert Phosphit zu Phosphat und reduziert im Gegenzug NAD(P)^+ zu NAD(P)H .^[136]

III.3.2.3 Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101

Zur Zeit wird die Regenerierung von NAD(P)H im präparativen Maßstab hauptsächlich mittels Glucose- und Formiatdehydrogenasen durchgeführt.^[128]

Besonders die Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 und ihre durch Mutagenese erzeugten Varianten nehmen dabei eine herausragende Stellung ein.

Diese Formiatdehydrogenase besteht aus 400 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa. Das korrespondierende Gen wurde im Jahre 1991 von einer russischen Arbeitsgruppe kloniert und in *E. coli* überexprimiert.^[137, 138] In

Lösung liegt das Enzym als Dimer aus zwei identischen FDH-Monomeren vor. Die Kristallstruktur zeigte, dass das individuelle Proteinmolekül aus zwei Domänen bestehen. In der Furche zwischen beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum mit der Bindungsstelle für NAD^+ .^[139] Eine der Enzymuntereinheiten besteht im wesentlichen aus zwei Rossmann-Faltungseinheiten. Rossmann-Faltungsmotive werden regelmäßig in mononucleotidbindenden Domänen gefunden. Kristallstrukturen in Gegenwart von Substraten zeigten, dass die Bindung von NAD^+ zur Entstehung einer zusätzlichen α -Helix am zuvor ungeordneten C-Terminus des Enzyms führt.^[140]

Basierend auf der Kristallstruktur konnte durch ortsgerichtete Mutagenese sowohl eine Stabilisierung^[141] als auch eine Veränderung der Kofaktorpräferenz hin zu NADP^+ erreicht werden.^[142] Die Entwicklung eines hocheffektiven und einfachen Fermentations- und Aufreinigungsprotokolls für das Enzym und seine genetisch veränderten Varianten bereitete den Weg für seine kommerzielle Anwendung. Die Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 (sowohl NAD^+ - als auch NADP^+ -abhängig) kann heute bei verschiedenen Anbietern käuflich erworben werden.

III.3.3 Immobilisierung von Enzymen in der Biokatalyse

Immobilisierte Enzyme werden neben Anwendungen in der Bioanalytik (z. B. Glukosesensor) und Pharmazie (kontrollierte Abgabe von therapeutischen Proteinen) häufig auch in der Biokatalyse eingesetzt.

Die Immobilisierung von Enzymen bietet Vorteile für deren Einsatz. Diese Verbesserungen können sich in verschiedenster Form äußern: Von verbesserter katalytischer Aktivität, erhöhter Stabilität (Temperatur-, Lösungsmittel- und Prozessstabilität), erleichterter Katalysatorpräparation (Aufreinigungseffekt durch Binden an Träger, Qualitätskontrolle einfacher) und neuen Möglichkeiten in der Reaktionsführung (Abtrennung des Katalysators, wasserfreies Arbeiten, Reaktordesign) wurde berichtet. Im industriellen Umfeld zählen vor allem die Prozesskosten, an denen die ökologischen Folgekosten einen stetig steigenden Anteil besitzen. Aus den zuvor aufgeführten Vorteilen der Enzymimmobilisierung lässt sich ihr großes Potential zur Verminderung von Produktionskosten ableiten: Angefangen bei der Präparation des Katalysators über dessen Lagerung (höhere Stabilität, geringeres Volumen), die angesprochenen Verbesserungen in der Reaktionsführung (resultierend in höheren Raum-Zeit-Ausbeuten und geringerem Anteil an Nebenprodukten), bedeutende Vereinfachungen in der Katalysatorabtrennung und Produktaufarbeitung bis hin zur Wiederverwendbarkeit des Katalysators kann die Immobilisierung helfen, Kosten zu verringern.^[143]

Zur Immobilisierung von Enzymen wird neben Adsorptionstechniken (beruhend auf elektrostatischen Interaktionen, hydrophoben Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen) auch die kovalente Anbindung (z. B. über Epoxygruppen, die Aminogruppen der Proteine binden oder über bifunktionelle Linker wie Glutardialdehyd), der Einschluss in *in situ* gebildete Polymere (z. B. Sol-Gel oder Alginat) sowie die Quervernetzung der Proteine mit Diisocyanaten oder Glutardialdehyd eingesetzt.^[101]

Die Schwierigkeit bei der Immobilisierung von Enzymen liegt nicht darin, eine effektive Immobilisierungsmethode zu etablieren, sondern darin, die optimale Enzympräparation für eine gewünschte Anwendung zu finden.^[143]

III.3.4 Erhöhung der Löslichkeit unpolarer Substrate in der wässrigen Phase

Wie oben geschildert ist die Löslichkeit organischer Substrate in wässrigem Medium häufig derart gering, dass die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen nicht ihren maximalen Wert erreichen kann. Aus diesem Grund werden Cosolventien zur

wässrigen Phase gegeben, um das Lösungsvermögen für das jeweilige Substrat zu erhöhen. Gängige Lösungsmittel hierfür sind Ethanol, Aceton, Isopropanol oder DMSO.

Bei Verwendung von Zweiphasensystemen kann die nicht wassermischbare zweite Phase als Substratreservoir dienen, aus dem Substrat in die wässrige Phase nachgeliefert werden kann. Gleichzeitig kann - bei entsprechender Wahl des als organische Phase dienenden Lösungsmittels – das Produkt wiederum in die organische Phase extrahiert werden. Insbesondere bei Hemmung des Biokatalysators durch das Reaktionsprodukt kann es vorteilhaft sein, wenn die Produktkonzentration in der wässrigen Phase niedrig gehalten werden kann. Um den Effekt zu verstärken, kann das Produkt durch Standardseparationstechniken (Destillation, Adsorption, Kristallisation, Extraktion ...) kontinuierlich aus der Reaktionsmischung entfernt werden. Als zweite Phase kann auch ein organisches Adsorberharz mit großer Oberfläche dienen (häufig poröse Polystyrol- oder Polypropylenmatrices), wobei je nach technischer Realisierung entweder die Zudosierung der Edukte oder die Extraktion der Produkte bzw. beide Schritte gleichzeitig über den festen Adsorber erfolgen können.^[144] Auch Membranverfahren wie die Pervaporation können zur kontinuierlichen Produktabtrennung genutzt werden.^[145]

III.4 Stand der Forschung: Zellfreie Katalyse durch Cytochrom P450-Monooxygenasen

Eine große Zahl von Arbeiten beschäftigt sich mit der Umsetzung von organischen Substraten durch P450-Monooxygenasen. Ziel dieser Untersuchungen ist im Allgemeinen, Substrate und Produkte von P450-Enzymen zu charakterisieren, um den entsprechenden Enzymen eine physiologische Funktion zuordnen zu können. Um Nebenreaktionen zu verhindern, werden dabei meist zellfreie P450-Extrakte verwendet. Produkte werden in diesen biochemischen Studien nur im analytischen Maßstab isoliert.

Bisher existieren nur zwei Publikationen, die die präparative, durch isolierte P450-Monooxygenasen katalysierte Synthese beschreiben. In beiden Fällen kam CYP102A1 in Kombination mit Glucose-6-phosphatdehydrogenase zum Einsatz. Als Substrat wurden ungesättigte Fettsäuren eingesetzt. Falck et al.^[146] benutzten die CYP102A1-Variante F87V zur stereo- und regioselektiven Synthese von 14*S*,15*R*-Epoxyeicosatriensäure aus Arachidonsäure. Um die geringe Löslichkeit des Substrats in wässrigem Puffer auszugleichen, wurde ein großes Flüssigkeitsvolumen (4 l) und eine geringe Substratmenge (500 mg) verwendet. Mit diesem Ansatz konnten 249 mg 14*S*,15*R*-Epoxyeicosatriensäure erhalten werden.

In einem sehr ähnlichen Reaktionssystem konnten Celik et al. ausgehend von 0.25 mmol Linolensäure (70 mg) in ca. 400 ml Volumen 29 mg reine 15*R*,16*S*-Epoxyoctadeca-9,12-diensäure (60 % ee) synthetisieren.

IV Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Verwendung der isolierten Cytochrom P450-Monooxygenase CYP102A1 als Hydroxylierungs- und Epoxidierungskatalysator in der präparativen Synthese untersucht werden. Als Modellsubstrate wurden neben den natürlichen Substraten von CYP102A1 – Fettsäuren und deren Derivaten – Cyclohexan, Styrol und Oktan verwendet.

P450-Monooxygenasen werden bisher ausschließlich in Form von Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt. Im Falle der P450-Monooxygenasen besitzt die Ganzzellbiokatalyse Vorteile, da in wachsenden Zellen die geringe Stabilität der Enzyme und deren Abhängigkeit vom Kofaktor NAD(P)H weniger ins Gewicht fallen. Nachteile der Verwendung von ganzen Zellen in biokatalytischen Prozessen liegen in der komplizierten Aufreinigung der Produkte aus komplexen Fermentationsgemischen, der Toxizität von Substrat und / oder Produkt für die Zellen, dem langsamen bzw. ungenügenden Transport von Substrat oder Produkt über die Zellmembran sowie im Abbau des Produkts durch den zelleigenen Stoffwechsel liegen. Diese mit Ganzzellbiokatalysatoren assoziierten Probleme lassen den Einsatz isolierter P450-Monooxygenasen in der Synthese attraktiv erscheinen.

Um zu klären, ob die Katalyse durch isolierte P450-Monooxygenasen in der präparativen organischen Synthese möglich ist, sollten folgende Experimente durchgeführt werden: Nach vorbereitenden Arbeiten wie der Umklonierung von CYP102A1 zur Steigerung der Expressionsausbeute sollten Methoden zum Ersatz bzw. zur Regenerierung des Kofaktors NAD(P)H untersucht und miteinander verglichen werden. Im nächsten Schritt sollte ein geeignetes Reaktionssystem gesucht werden. In diesem Zusammenhang wurden Reaktionen mit immobilisierter Monooxygenase (Sol-Gel-Immobilisierung), mit Enzym-Membran-Reaktoren, in zweiphasigen Emulsionen sowie in homogener wässriger Phase unter Zusatz von Löslichkeitsvermittlern zur Solubilisierung der Substrate untersucht. Daraufhin sollten durch molekularbiologische Methoden erzeugte Varianten von CYP102A1 identifiziert werden, die die Modellsubstrate Cyclohexan und Styrol mit möglichst hoher Aktivität und Selektivität oxidieren. Unter Einsatz der zuvor entwickelten Konzepte sollte abschließend die präparative Hydroxylierung von Cyclohexan, Oktan und Myristinsäure sowie die Epoxidierung von Styrol durchgeführt werden.

V Ergebnisse

V.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von CYP102A1

Voraussetzung für die Verwendung eines Enzyms in der Biokatalyse ist seine einfache und billige Produktion. Aus diesem Grund wurde zunächst ein System zur heterologen Überexpression von aktivem CYP102A1 in hohen Ausbeuten entwickelt. Die biochemische Charakterisierung eines Proteins und seiner durch genetische Veränderung entstandenen Varianten muss mit aufgereinigten Proben durchgeführt werden, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Verunreinigungen (sonstige Zellproteine sowie mit dem Zielprotein interagierende niedermolekulare Verbindungen) auszuschließen. Deshalb wurde eine einstufige, zeitsparende Aufreinigungsmethode für CYP102A1 entwickelt.

V.1.1 Subklonierung von CYP102A1 in den Expressionsvektor pET28a+

Zur Konstruktion eines effizienten Expressionssystem wurde der Vektor pET28a+, der die Expression von Genen unter der Kontrolle des starken T7-Promoters zulässt, genutzt.

Das für die Dreifachmutante A74G/F87V/L188Q von CYP102A1 (im Folgenden mit CYP102A1m3 bezeichnet) kodierende Gen wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) vom Vektor pT-USC1BM3^[147] amplifiziert. Dazu wurden die Primer sma1 (Monooxygenase f) und sma2 (Reduktase r) verwendet. Diese weisen zusätzlich zu einem ca. 15 Nucleotide langen, zum Gen komplementären Abschnitt jeweils einen nicht an die Templatsequenz bindenden Überhang auf, der die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI (sma1) bzw. *Eco*RI am 5'-Ende (sma2) trägt.

Das PCR-Produkt wies die erwartete Größe von ca. 3200 bp im präparativen Agarosegel auf und wurde aus diesem extrahiert.

Nach Behandlung der extrahierten DNA und des Vektors pET28a+ mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI wurde CYP102A1 mit dem mittels alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor ligiert.

Der korrekte Einbau des *CYP102A1*-Gens wurde mittels eines Restriktionsansatzes mit *EcoRI* und *BamHI* verifiziert. Dabei wurden zwei DNA-Fragmente mit den zu erwartenden Längen von ungefähr 3200 bp für *CYP102A1* und ungefähr 5400 bp für den linearisierten Vektor pET28a+ erhalten (Abbildung V-1).

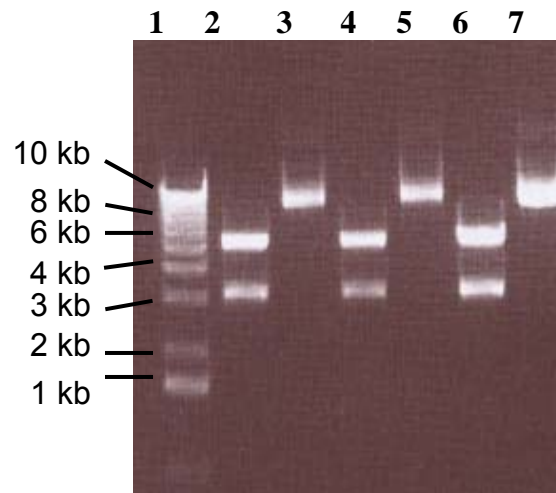


Abbildung V-1: Plasmid-DNA aus drei mit dem Konstrukt pET28a+CYP102A1 transformierten *E. coli*-Kolonien. Spur 1 zeigt den DNA-Marker, Spuren 3, 5 und 7 das extrahierte Plasmid, Spuren 2, 4 und 6 zeigen die in Spuren 3, 5 bzw. 7 aufgetragenen Plasmide nach Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *EcoRI*.

Die exakte Übereinstimmung der Sequenz des in den Vektor pET28a+ einklonierten Gens mit der publizierten *CYP102A1*-Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung unter Verwendung der von Schwaneberg^[147] vorgeschlagenen Sequenzierprimer sowie des T7-Promotor- und des T7-Terminator-Primers nachgewiesen.

Das Expressionsplasmid pET28a+CYP102A1 ist mit seinen Charakteristika in Abbildung V-2 dargestellt.

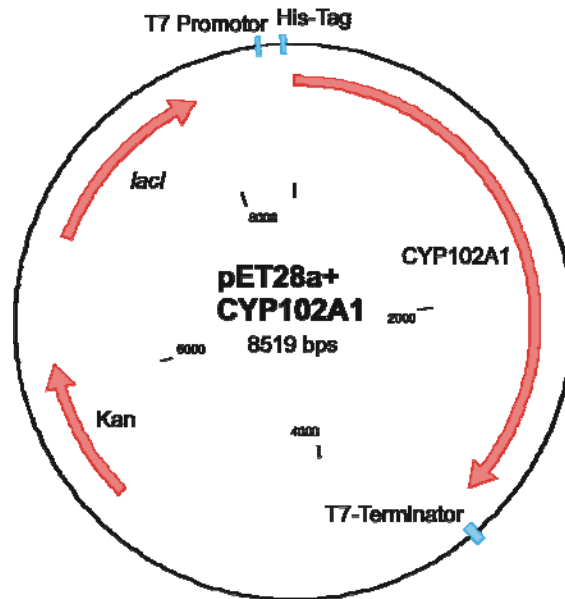


Abbildung V-2: Plasmidkarte des zur Expression von CYP102A1 konstruierten Plasmids pET28a+CYP102A1. Die mit bestimmten Eigenschaften des Plasmids verknüpften Sequenzbereiche sind markiert. Kan bezeichnet das zur Selektion transformierter Zellen verwendete, Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin vermittelnde, für die Aminoglycosid-3'-phosphotransferase kodierende Gen.

Der Vektor pET28a+ besitzt den starken T7-Promotor und eignet sich daher zur heterologen Proteinexpression in *E. coli*-Stämmen, die eine Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase besitzen. Meist steht dieses Gen unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. Der lacUV5-Promotor benötigt zusätzlich den Repressor lacI, um die Proteinexpression vor der Induktion zu verhindern. Im Falle des Systems pET28a+ / *E. coli* BL21 (DE3) befindet sich das für lacI kodierende Gen auf dem Vektor. Bei Induktion der Expression durch IPTG löst sich der Repressor lacI vom lacUV5-Promotor, die T7-RNA-Polymerase wird exprimiert und transkribiert daraufhin das strangabwärts vom T7-Promotor auf dem Plasmid codierte CYP102A1. Das exprimierte CYP102A1 ist N-terminal mit einer Hexahistidinsequenz versehen. Diese Sequenz ermöglicht die Aufreinigung über Metallchelataffinitätschromatographie.

V.1.2 Expression von CYP102A1 in *E. coli* BL21 (DE3)

Der Vektor pET28a+CYP102A1 wurde konstruiert, um die Expressionsausbeute an aktivem und löslichem CYP102A1 zu erhöhen. Unter den vom Hersteller zur

Proteinexpression mittels pET28a+ angegebenen Standardbedingungen wurde zunächst zu >90 % unlösliches Protein in Einschlusskörpern gebildet. Erst die Variation der Expressionsbedingungen resultierte in einem für die Expression von CYP102A1 im Wirtsorganismus *E. coli* BL21 (DE3) optimierten Protokoll. Hierfür wurden 5 ml LB_{Kan}-Medium durch frisch mit pET28a+ transformierte *E. coli* BL21 (DE3) inokuliert und vier Stunden bei 37°C, 180 U min⁻¹ kultiviert. Diese Kultur wurde benutzt, um 400 ml TB_{Kan}-Medium anzupfen. Nach vier Stunden bei 37°C und 180 U min⁻¹ wurde die Temperatur auf 25°C, die Schüttelfrequenz auf 150 U min⁻¹ erniedrigt. Nach weiteren 30 min wurde die Expression von CYP102A1 durch Zugabe von 0.5 mM (Endkonzentration) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und bis zur Zellernte weitere 16 h kultiviert.

Dieses Expressionsprotokoll ergab ca. 4 bis 8 g l⁻¹ Biofeuchtmasse und CYP102A1-Ausbeuten von bis zu 1.2 μmol (144 mg) pro Liter TB-Medium und ist bisher beschriebenen Methoden damit um ein Vielfaches überlegen.^[147]

V.1.3 Batch-Fermentation von CYP102A1 im 30 l-Maßstab

Da der im System pET28a+ / *E. coli* BL21 (DE3) verwendete Induktor IPTG teuer ist, könnte zur Expression von CYP102A1 im großen Maßstab der Vektor pT-USC1BM3^[147] benutzt werden. Der Vorteil dieses Expressionssystems gegenüber pET28a+ liegt im hitzeinduzierbaren λP_{RL}-Promotor, der die Zugabe eines chemischen Induktors überflüssig macht.

Die Expression von CYP102A1 mittels des in den Stamm *E. coli* DH5α transformierten Vektors pT-USC1BM3 in Schüttelkolben resultierte allerdings in geringen CYP102A1-Ausbeuten von unter 100 nmol (12 mg) pro Liter TB-Medium.

Aus diesem Grund musste die Expression von CYP102A1 im Fermenter optimiert werden. Nach dem unter Kap VII.2.2.1 beschriebenen Verfahren konnten 10 bis 12 g Biofeuchtmasse pro Liter TB-Medium gewonnen werden. Die CYP102A1-Ausbeute betrug 80 bis 100 mg l⁻¹ Fermentervolumen. Damit ist die Ausbeute an heterolog exprimiertem Protein fast drei Mal höher als mit dem Vektor pT-USC1BM3 bisher berichtet.^[147] Im Folgenden wurde zur Expression von CYP102A1-Varianten für biochemische Untersuchungen und Umsetzungen im Milligrammmaßstab das System pET28a+CYP102A1 / *E. coli* BL21 (DE3) benutzt, während größere Mengen

an CYP102A1 durch Expression von CYP102A1 im System pT-USC1BM3 / *E. coli* DH5 α hergestellt wurden.

IV.1.4 Aufreinigung von CYP102A1(His)₆ über Amersham Ni-Sepharose HP

Zur Aufreinigung von mit Hexahistidinsequenz exprimiertem CYP102A1 wurde die immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie verwendet. Nach der in Kapitel VII.2.3.3 angegebenen Vorschrift wurde zu >90 % reines Protein (densitometrisch bestimmt) erhalten. Ein SDS-Polyacrylamidgel, auf dem Rohlysat, Waschlösung und Eluat aufgetragen und in ihre Einzelbestandteile getrennt wurden, ist in Abbildung V-3 dargestellt.

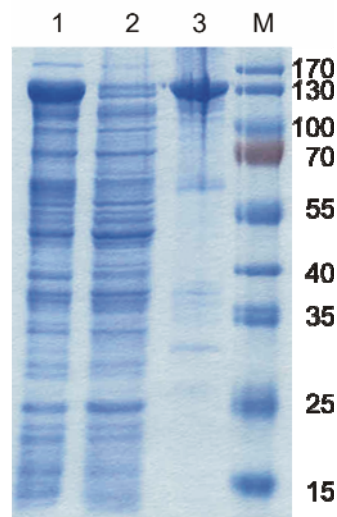


Abbildung V-3: SDS-Polyacrylamidgel verschiedener während der Aufreinigung von CYP102A1 erhaltener Fraktionen. In Spur 1 wurde das Rohlysat, in Spur 2 ungebundenes Protein (Durchfluss), in Spur 3 das aufgereinigte CYP102A1 aufgetragen. M bezeichnet den Proteinmarker. Deutlich ist bei ca. 120 kDa die durch CYP102A1 hervorgerufene Bande zu erkennen.

Aus Abbildung V-3 geht hervor, dass CYP102A1 sehr selektiv an die Matrix bindet. Im Durchfluss ist die CYP102A1 entsprechende Bande nicht zu erkennen, während das Eluat fast ausschließlich dieses Protein enthält.

Die gelb bis rotbraun gefärbten, CYP102A1 enthaltenden Fraktionen wurden gegen 50 mM KPi dialysiert und so von Imidazol befreit. Imidazol ist ein kompetitiver Ligand

des Hämeisens und inhibiert die Monooxygenaseaktivität. Durch zweimalige Dialyse konnte das Imidazol vollständig entfernt werden.

V.2 Elektronenübertragung auf die CYP102A1-Hämdomäne

V.2.1 Kovalente Modifikation mittels Riboflavin

Die von Shumyantseva et al. entwickelte Methode zur kovalenten Verknüpfung von Riboflavin und P450-Monooxygenasen wurde auf die CYP102A1-Hämdomäne angewendet. Es handelt sich um eine Kopplung von Riboflavin über das bifunktionale Reagenz Carbonyldiimidazol an Aminogruppen des Enzyms (siehe Kapitel III.3.1 und VII.2.5).

Diese Methode der kovalenten Modifikation führte zur vollständigen Inaktivierung von CYP102A1. Es konnte – selbst bei Reduktion des Hämeisens durch Natriumdithionit – kein CO-Differenzspektrum mehr erhalten werden. Nach Zugabe von auf Riboflavin übertragbaren Reduktionsäquivalenten in Form von NADH konnten keine Reaktionsprodukte nachgewiesen werden.

Ebenfalls ergebnislos verlief der Versuch Riboflavin über Glutardialdehyd kovalent an CYP102A1 zu binden.

V.2.2 Elektronenübertragung durch freies Riboflavin

Nachdem die kovalente Modifikation mittels Riboflavin keine verwertbaren Ergebnisse geliefert hatte, wurde die Elektronenübertragung durch im wässrigen Puffer gelöstes Riboflavin untersucht. Bei 10-fachem Überschuss von Riboflavin zur CYP102A1-Hämdomäne war es möglich, in sauerstofffreier Lösung unter Zugabe von NADH und dem Substrat Myristinsäure das in Abbildung V-4 dargestellte CO-Bindungsspektrum zu erhalten.

Da in Abwesenheit von Riboflavin kein Peak bei 450 nm beobachtet wurde, ist die Elektronenübertragung von NADPH auf die CYP102A1-Hämdomäne eindeutig auf die Wirkung von Riboflavin zurückzuführen. Auch in Abwesenheit von Myristinsäure

konnte kein CO-Bindungsspektrum aufgenommen werden. Dies lässt sich durch die mit der Substratbindung einhergehende Erhöhung des Hämopotentials erklären: Erst nach der Substratbindung können Elektronen vom durch NADPH reduzierten Riboflavin auf die Hämdomäne übertragen werden. Nur in Abwesenheit von Sauerstoff resultiert diese Elektronenübertragung in einem stabilen Eisen-(II)-Komplex, da ansonsten der Katalysezyklus unter Verbrauch der Reduktionsäquivalente durchlaufen würde. Nur ein Häm Eisen der Oxidationsstufe II kann durch Begasen mit Kohlenmonoxid abgefangen und so die Elektronenübertragung nachgewiesen werden (Abbildung V-4)

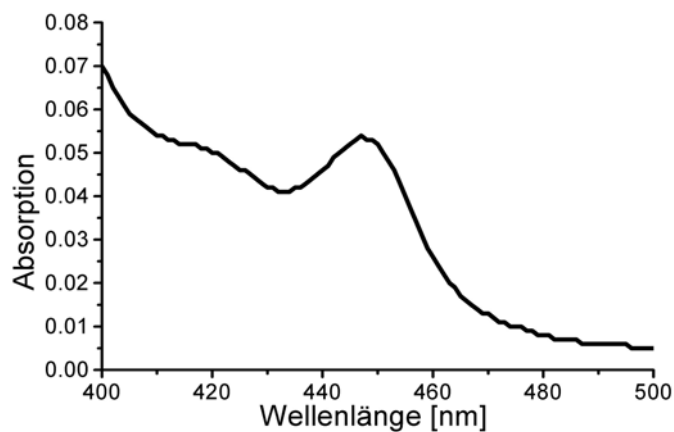


Abbildung V-4: CO-Differenzspektrum der mittels Riboflavin reduzierten CYP102A1-Hämdomäne. Die Reduktion wurde in einer sauerstofffreien Mischung von 10 μM CYP102A1-Hämdomäne, 100 μM Riboflavin, 100 μM Myristinsäure und 1 mM NADH durchgeführt, die Probe in zwei Küvetten aufgeteilt, eine der Proben mit Kohlenmonoxid begast und ein Differenzspektrum aufgenommen. Das erhaltene Spektrum weist nach, dass eine riboflavinvermittelte Übertragung von Elektronen auf die CYP102A1-Hämdomäne möglich ist.

Das in Abbildung V-4 gezeigte CO-Differenzspektrum besitzt im Vergleich zu einem nach der Standardmethode (Reduktion durch Natriumdithionit^[148]) erzeugten CO-Differenzspektrum nur 5 % der Intensität, die bei der eingesetzten Enzymkonzentration (1 μM) zu erwarten wäre. Allerdings beweist diese Messung, dass reduziertes Riboflavin zur Elektronenübertragung auf die isolierte CYP102A1 Hämdomäne verwendet werden kann.

Um die Möglichkeit des Einsatzes von Riboflavin in der Synthese abschätzen zu können, wurde der Umsatz von 10-*p*NCA mittels der CYP102A1-Hämdomäne in Gegenwart von Riboflavin und NADPH untersucht. Das entstehende *p*-Nitrophenolat kann photometrisch nachgewiesen werden. Wie in Abbildung V-5 zu erkennen ist, führte dieser Ansatz zur Produktbildung.

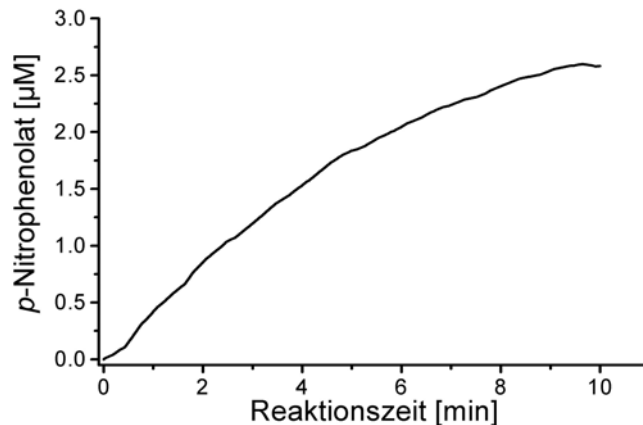


Abbildung V-5: Umsatz von 10-*p*NCA (100 µM) in Gegenwart der CYP102A1 Hämdomäne (10 µM), Riboflavin (100 µM) und NADPH (1 mM). Die Produktbildung wurde photometrisch verfolgt und an Hand des Extinktionskoeffizienten $E_{\text{Nitrophenolat}} = 14.2 \text{ mM cm}^{-1}$ in Produktkonzentrationen umgerechnet.

Die Umsatzrate betrug $k = 2.16 \text{ eq(Produkt) eq(P450)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und damit nur 0.8 % des mit dem CYP102A1-Fusionsprotein erreichbaren Werts von 260 min^{-1} . Die Verwendung von gelöstem Riboflavin zur Elektronenübertragung auf die CYP102A1 Hämdomäne ist damit für die präparative, P450-vermittelte Synthese uninteressant.

V.2.3 Einschleiben von Riboflavin in entfaltetes CYP102A1

Für Glucoseoxidase konnte gezeigt werden, dass Denaturieren des Proteins und nachträgliches Renaturieren in Gegenwart von Mediatoren wie Ferrocen in einem funktionellen, dauerhaft mit den entsprechenden Mediatoren beladenen Enzym resultiert.^[149] Nachdem die Möglichkeit der Elektronenübertragung von Riboflavin auf die CYP102A1-Hämdomäne nachgewiesen worden war, wurde versucht, Riboflavin in ähnlicher Weise in die Monooxygenasedomäne von CYP102A1 einzubringen.

Hierfür musste zunächst eine Methode zum Denaturieren und nachträglichen Renaturieren der CYP102A1-Hämdomäne entwickelt werden.

V.2.3.1 Denaturieren der CYP102A1-Hämdomäne

Zur vollständigen Denaturierung der CYP102A1-Hämdomäne ist eine hohe Konzentration an chaotropen Reagenzien nötig. Abbildung V-6 zeigt den zeitlichen Verlauf der Denaturierung in 8 M Harnstoff. Dargestellt ist das Verschwinden des Absorptionsmaximums bei 450 nm (nativer Zustand) und die gleichzeitige Entstehung des durch die denaturierte Hämdomäne hervorgerufenen Absorptionsmaximums bei 420 nm.

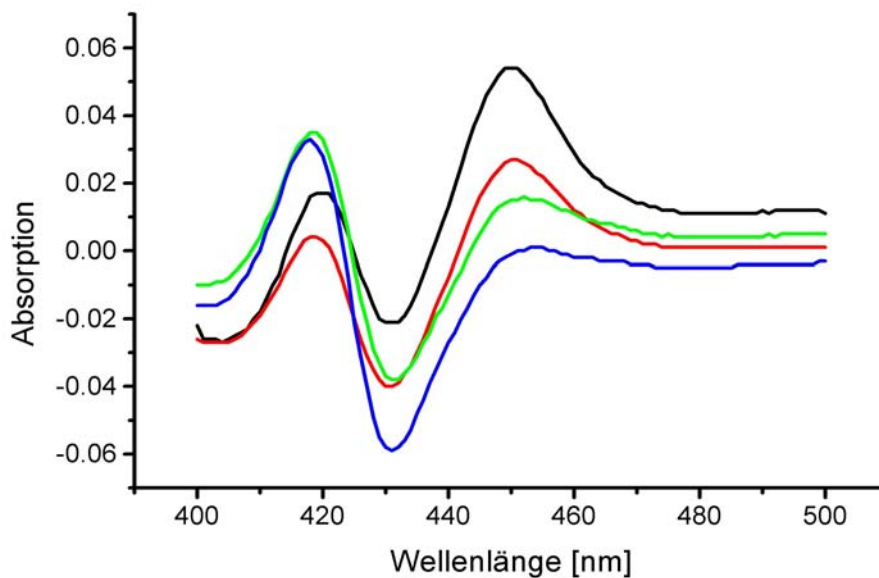


Abbildung V-6: Denaturierung der CYP102A1-Hämdomäne in 8 M Harnstoff. Es wurden zu bestimmten Zeitpunkten (15 min (schwarz), 75 min (rot), 3 h (grün) und 16 h (blau) nach Zugabe von Harnstoff) Proben genommen. Die CO-Differenzspektren der Proben zeigen den Fortgang des Verlusts der Sekundärstruktur: Das für die native Hämdomäne charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm nimmt ab, während das für die denaturierte Hämdomäne charakteristische Maximum bei 420 nm an Intensität gewinnt.

V.2.3.2 Renaturieren der CYP102A1-Hämdomäne

Die Renaturierung der CYP102A1-Hämdomäne ist in einem Puffersystem, das 100 mM Histidin, 20 mM DTT, 2 μ M Hemin und 20 % Glycerin bei pH 8.0 enthält, möglich.

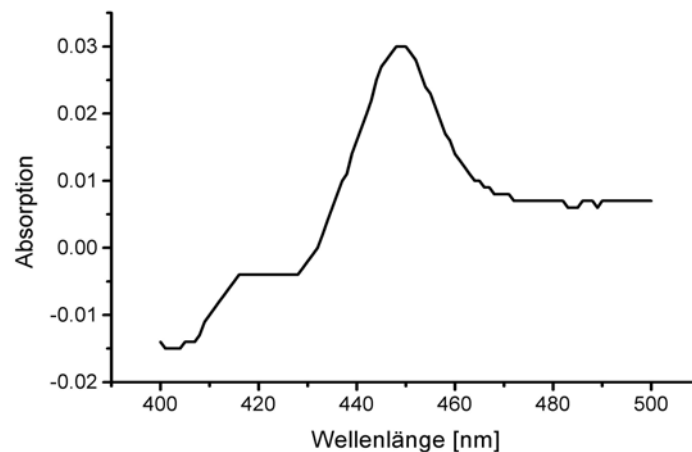


Abbildung V-7: CO-Differenzspektrum der renaturierten CYP102A1-Hämdomäne. Das Absorptionsmaximum bei 450 nm weist die korrekte Faltung des zuvor renaturierten Proteins nach.

Die Gesamtausbeute des Zyklus aus Denaturierung und Renaturierung betrug 25 % bezogen auf die zur Denaturierung eingesetzte Enzymmenge, wie an Hand des CO-Differenzspektrums (Abbildung V-7) berechnet werden kann.

V.2.3.3 Renaturieren in Gegenwart von Riboflavin

Das Einbringen von Riboflavin in CYP102A1 während des Renaturierungsvorgangs verlief erfolglos. Zwar konnte entfaltetes CYP102A1 – mit geringerer Ausbeute als in Abwesenheit von Riboflavin - renaturiert werden, allerdings unterschieden sich die UV/vis-Spektren nicht von denen der nativen Hämdomäne. Auch konnte in Gegenwart von NADH bzw. von sichtbarem Licht weder eine Reduktion des Hämeisens noch katalytische Aktivität beobachtet werden.

V.2.4 Verwendung von Wasserstoffperoxid zur Erzeugung der katalytisch aktiven Spezies

Unter Ausnutzung des sogenannten „peroxide shunt“ kann der katalytisch aktive Eisensauerstoffkomplex **7** in Abbildung III-9 durch Zugabe von Wasserstoffperoxid erzeugt werden.^[48] Um das Potential dieser Reaktion hinsichtlich der Anwendung in der Synthese zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Varianten von

CYP102A1 auf ihre Aktivität gegen das Pseudosubstrat 10-pNCA in Gegenwart von 10 mM Wasserstoffperoxid untersucht.

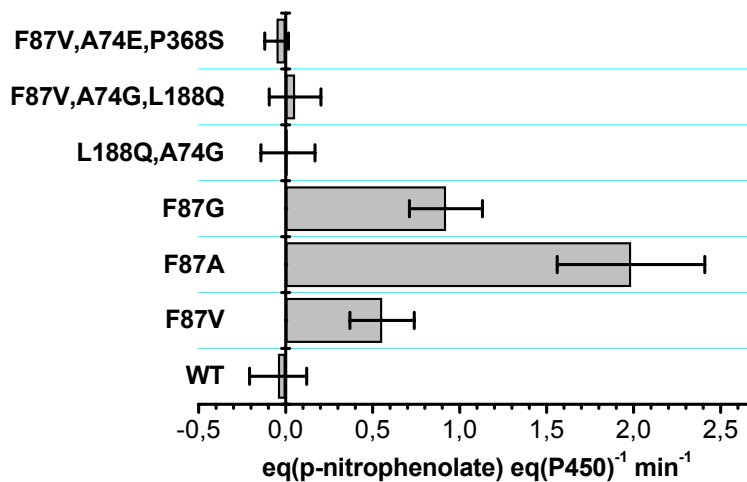


Abbildung V-8: Aktivität von CYP102A1-Varianten gegen 10-pNCA (0.1 mM) in Gegenwart von 10 mM Wasserstoffperoxid

Es zeigte sich, dass die Aktivität in Gegenwart von Wasserstoffperoxid stark durch die Aminosäure an Position 87 beeinflusst wird. Die höchste Aktivität wird erreicht, wenn das das Hämeisen abschirmende Phenylalanin an Position 87 durch Alanin ersetzt wird. Für diese Variante wurde untersucht, bei welcher Konzentration an Peroxid die enzymatische Aktivität maximal ist. Es stellte sich heraus, dass in Gegenwart von 50 mM Wasserstoffperoxid die maximale Umsatzrate von 8 min⁻¹ erreicht wird.

Daraufhin wurde untersucht, wie lange CYP102A1 F87A unter diesen Bedingungen seine Aktivität behält. Dabei wurde herausgefunden, dass bereits 20-minütige Inkubation in 50 mM H₂O₂ zur vollständigen Inaktivierung führt.

V.2.5 Regenerierung von NADP^+ mittels Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101

Nachdem die oben beschriebenen Verfahren zum Ersatz von NADPH keine zur präparativen Synthese nutzbaren Resultate brachten, wurde die enzymatische Regenerierung des Kofaktors NADPH untersucht.

Die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Pseudomonas* sp. 101 katalysiert in Gegenwart von Formiat dessen Oxidation zu Kohlendioxid und im Gegenzug die Reduktion von NAD^+ zu NADH. Eine genetisch veränderte Variante dieser FDH ist in der Lage, auch NADP^+ zu NADPH zu reduzieren. Aus Abbildung V-9 geht hervor, dass dies auch im für CYP102A1-katalysierte Reaktionen optimalen Kaliumphosphatpuffer^[147] im pH-Bereich zwischen pH 7 und pH 8 möglich ist.

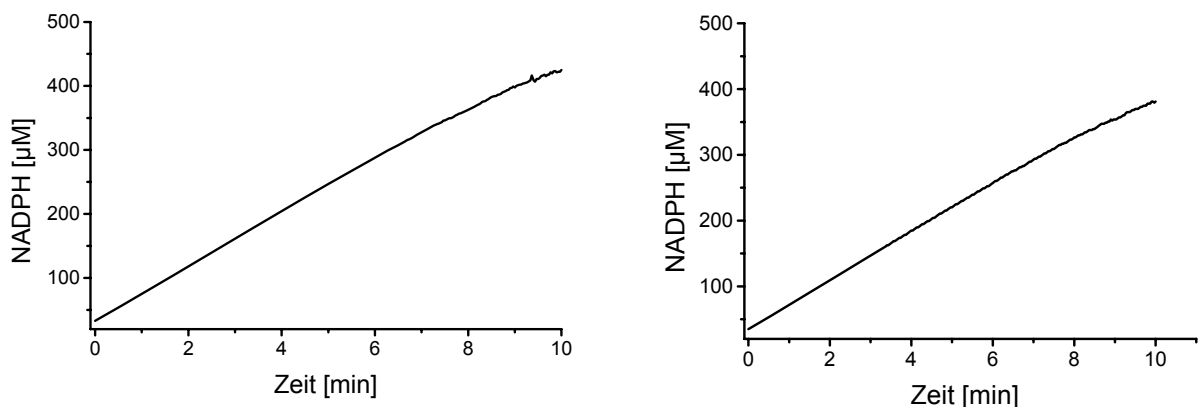


Abbildung V-9: Bildung von NADPH in einer Lösung, die 0.5 mM NADP^+ , 0.02 U ml^{-1} FDH und $300 \text{ mM Natriumformiat}$ in 50 mM KPi bei pH 8 (links) und bei pH 7 (rechts) enthält.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist mit $43 \mu\text{M min}^{-1}$ bei pH 8 etwas höher als bei pH 7 mit $38 \mu\text{M min}^{-1}$. Neben höherer Aktivität des Enzyms könnte der Grund für die höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 8 in der höheren Stabilität von NADPH im basischen Milieu liegen.

Die in Abbildung V-10 schematisch dargestellte Kopplung der CYP102A1-katalysierten oxidativen Dealkylierung von 10- ρ NCA in ω -Oxodecansäure und ρ -Nitrophenolat an die NADP^+ -Regenerierung durch die NADP^+ -abhängige Variante der Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 sollte demnach möglich sein.

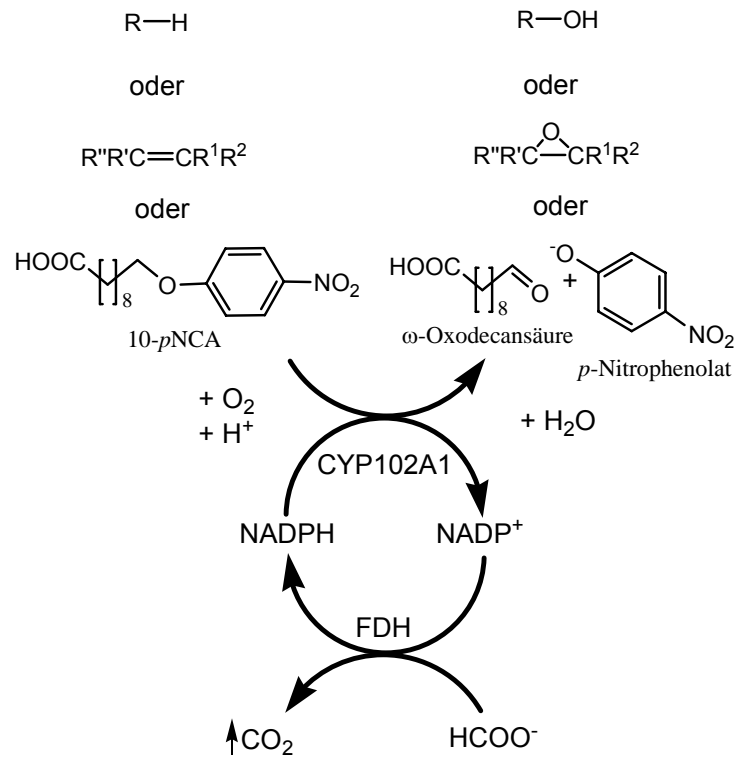


Abbildung V-10: Reaktionsschema für die Kopplung der CYP102A1-abhängigen Substratoxidation (Hydroxylierung von Alkanen, Epoxidierung von Olefinen oder Dealkylierung des Pseudosubstrats 10-*p*NCA) an die Kofaktorregenerierung durch FDH.

In Abbildung V-11 ist die Entstehung von *p*-Nitrophenolat in Abhängigkeit von der eingesetzten NADP⁺-Menge dargestellt.

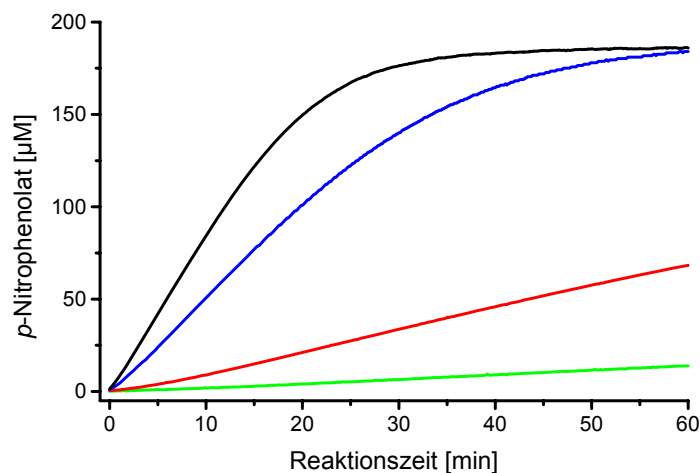


Abbildung V-11: Umsetzung des Modells substrats 10-*p*NCA. Es wurde 0.05 µM CYP102A1, 0.02 U/ml FDH, 0.25 mM 10-*p*NCA und 300 mM Natriumformiat in 50 mM KPi (pH 7.5) eingesetzt. Die Konzentration an NADP⁺ wurde von 2.5 µM (grün) über 5 µM (rot) und 25 µM (blau) auf 100 µM (schwarz) gesteigert.

In Abbildung V-11 ist insbesondere für geringe NADP⁺-Konzentrationen (2.5 und 5 μM , grüne und rote Linie) zu erkennen, dass die Reaktion zunächst mit geringerer Geschwindigkeit verläuft als nach ca. 10 min. Dies liegt daran, dass sich zunächst eine quasistationäre NADPH-Konzentration aufbauen muss, um die Reaktion mit konstanter Geschwindigkeit zu unterhalten. Die Geschwindigkeiten der CYP102A1-katalysierten Reaktionen (im linearen Bereich) unter diesen Bedingungen sind in Tabelle V-1 in Abhängigkeit von der Kofaktorkonzentration zusammengestellt.

Tabelle V-1: Geschwindigkeit der *p*-Nitrophenolatbildung in Gegenwart von 0.05 μM CYP102A1, 0.02 U/ml FDH, 0.25 mM 10-*p*NCA und 300 mM Natriumformiat in 50 mM KPi (pH 7.5). Die NADP⁺-Konzentration wurde variiert.

NADP ⁺ [μM]	2.5	5	25	100	200
<i>p</i> -Nitrophenolatbildung [$\mu\text{M min}^{-1}$]	0.15 \pm 0.01	1.2 \pm 0.03	5.3 \pm 0.3	8.5 \pm 0.4	9.1 \pm 0.4

Während eine Verdopplung der NADP⁺-Konzentration von 2.5 auf 5 μM annähernd eine Verachtfachung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt, bewirkt eine Verdopplung der NADP⁺-Konzentration von 100 auf 200 μM nur eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um das 1.1-fache. Tabelle V-1 zeigt, dass eine weitere Steigerung der NADP⁺-Konzentration über 100 μM hinaus kaum noch effektiv ist. Die Kosten für den Kofaktor wiegen die weitere Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr auf.

Es wurde für alle weiteren Experimente FDH kombiniert mit einer NADP⁺-Konzentration von 0.1 mM eingesetzt.

V.3 Untersuchung für CYP102A1 geeigneter Reaktionssysteme

Im vorangehenden Abschnitt wurde mit NADP⁺-abhängiger FDH ein für die Kofaktorregenerierung im präparativen Maßstab geeignetes Enzym gefunden. Im Folgenden wurde ein für die bienzymatische Reaktion geeignetes Reaktionssystem gesucht.

V.3.1 Immobilisierung von CYP102A1 in einer Sol-Gel-Matrix

Zur Schaffung eines heterogenen Katalysatorsystems wurde die Immobilisierung von CYP102A1 untersucht. Bisher wurde die Adsorption an Anionenaustauscher wie DEAE 650 als einzige Möglichkeit zur funktionellen Immobilisierung von CYP102A1 beschrieben.^[147] Nachteil dabei ist die Destabilisierung der Wechselwirkung zwischen fester Matrix und Enzym bei hohem Salzgehalt (> 200 mM) der umgebenden Lösung (Prinzip der Anionenaustauschchromatographie). Hohe Salzkonzentrationen sind aber bei der enzymatischen Kofaktorregenerierung durch FDH unumgänglich, da für optimale Aktivität der FDH 250 bis 300 mM Formiat zusätzlich zum 50 mM Kaliumphosphatpuffer vorliegen sollten.

Als alternative Immobilisierungstechnik wurde der Einschluss des Enzyms in eine *in situ* gebildete Sol-Gel-Matrix untersucht. Als Methode wurde die fluoridkatalysierte Bildung eines Sol-Gels aus Tetraethoxysilan gewählt. Dabei kann die Porengröße des entstehenden Silikatnetzwerks durch Variation der Konzentration an Zusätzen wie Polyethylenglykol während des Immobilisierungsvorgangs bestimmt werden.

Der Sol-Gel-Prozess lieferte ein gelb-weißes, pulvriges Xerogel. Dieser Feststoff wurde fünf Mal mit 50 mM KPi gewaschen. Dabei konnte nur in den ersten beiden Waschlösungen herausgewaschenes CYP102A1 nachgewiesen werden. Nach dem Lyophilisieren des Immobilisats konnte durch Zugabe von Substraten und dem Kofaktor NADPH Monooxygenaseaktivität nachgewiesen werden.

V.3.1.1 Vergleich der Immobilisierungseffizienz von Rohlysate und aufgereinigtem Protein

Die Verwendung von aufgereinigtem CYP102A1 zur Sol-Gel-Immobilisierung resultierte in einer - verglichen mit der Verwendung des Rohlysats – deutlich höheren Immobilisierungseffizienz. Die Aktivität des auf dem Rohlysate basierenden Immobilisats gegen das Pseudosubstrat 10-*p*NCA betrug nur 20 % des Wertes, der bei Immobilisierung des aufgereinigten Enzyms erreicht wird. Dies lässt sich mit der relativ geringen Beladungskapazität des Sol-Gel-Materials begründen. Liegt ausschließlich CYP102A1 während des Sol-Gel-Prozesses vor, so besetzt dieses alle geeigneten Poren. Im Rohlysate stellt CYP102A1 nur ca. 20 % des Gesamtproteins dar, demnach wird ein großer Teil des zur Verfügung stehenden Porenvolumens durch sonstige *E. coli*-Proteine besetzt.

Bei Verwendung von aufgereinigtem CYP102A1 konnten bis zu 60 nmol (7.2 mg) CYP102A1 pro Gramm Sol-Gel immobilisiert werden. Eine Erhöhung der Konzentration der zur Immobilisierung eingesetzten CYP102A1-Lösung über 12 μ M hinaus ergab keine weitere Erhöhung der Beladung des Sol-Gels. Beim Waschen des Sol-Gels wurde ca. 50 % der ursprünglich eingesetzten Stoffmenge an CYP102A1 entfernt und spektroskopisch bei 420 bzw. 450 nm nachgewiesen. Die Aktivität des immobilisierten CYP102A1 betrug ca. 50 % der Aktivität des freien Enzyms. Dies geht aus Abbildung V-12 hervor, in der der zeitliche Verlauf der Oxidation von 10-*p*NCA durch gelöstes und in der Sol-Gel-Matrix eingeschlossenes CYP102A1 dargestellt ist.

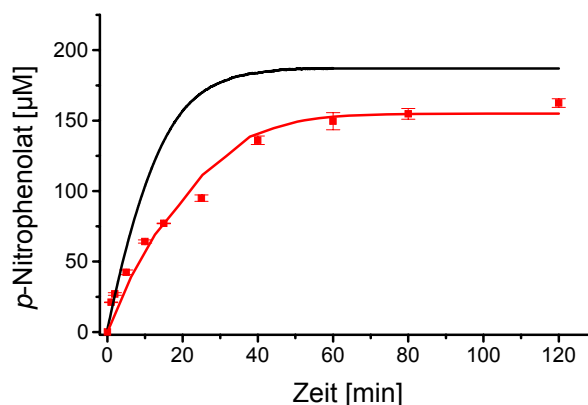


Abbildung V-12: Zeitlicher Verlauf der Oxidation von 0.25 mM 10-*p*NCA durch 0.06 nmol ml⁻¹ gelöstes CYP102A1 sowie durch 0.06 nmol ml⁻¹ in der Sol-Gel-Matrix immobilisiertes CYP102A1. Die Reaktion in homogener Lösung wurde direkt in der Küvette durchgeführt und entstehendes *p*-Nitrophenolat photometrisch bei 410 nm detektiert. Die heterogen durch das

Sol-Gel-Immobilisat katalysierte Reaktion wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt und die Reaktion zu den jeweiligen Zeitpunkten durch Abtrennen des festen Katalysators gestoppt. Der *p*-Nitrophenolatgehalt der klaren Überstände wurde gegen eine gleich behandelte Referenz ohne 10-*p*NCA bestimmt.

Aus den in Abbildung V-12 präsentierten kinetischen Daten geht hervor, dass die spezifische Aktivität des gelösten Enzyms um 91 % (1.7 U mg^{-1}) über der des sol-gel-immobilisierten Enzyms (0.89 U mg^{-1}) liegt. Daraus resultieren unter diesen Bedingungen Umsatzraten für das Substrat 10-*p*NCA von 204 min^{-1} für das Enzym in Lösung und von 107 min^{-1} für CYP102A1 in der Sol-Gel-Matrix.

V.3.1.2 Lagerstabilität von CYP102A1 in Lösung und in Sol-Gel

Die Lagerstabilität von in der Sol-Gel-Matrix immobilisiertem CYP102A1 wurde bei verschiedenen Temperaturen mit derjenigen des freien Enzyms verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung V-13 zusammengestellt.

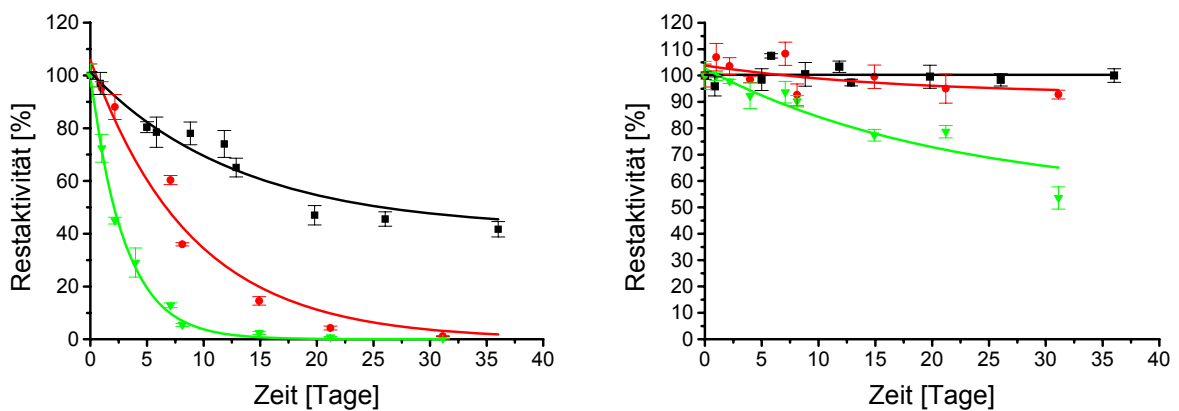


Abbildung V-13: Lagerstabilität von CYP102A1 in der Sol-Gel-Matrix (schwarz), in 50 mM KPi, pH 7.5 (grün) bzw. in 50 mM KPi, pH 7.5 mit Zusatz von 50 % Glycerin (rot). Links ist die Lagerstabilität bei 25°C, rechts bei 4°C dargestellt. Die Aktivität wurde durch Umsetzung des Modellsubstrats 10-*p*NCA bestimmt.

Bei beiden untersuchten Temperaturen war das immobilisierte Enzym stabiler als die lösliche Enzympräparation. In 50 % Glycerin gelöstes CYP102A1 zeigte eine höhere Stabilität als die in reinem 50 mM KPi gelöste Probe. Für in der Sol-Gel-Matrix immobilisiertes CYP102A1 konnte während 36 Tagen bei 4°C keinerlei Aktivitätsverlust gemessen werden. Dagegen zeigte das in 50 mM KPi gelöste

Enzym unter diesen Bedingungen eine Halbwertszeit von nur 26 Tagen, wenn von einer Inaktivierungskinetik erster Ordnung ausgegangen wird.

Bei 25°C wurden Halbwertszeiten von 29 Tagen für das immobilisierte Enzym, von 5 Tagen für das in 50 % Glycerin gelagerte und 2 Tagen für das in 50 mM KPi gelagerte Enzym gemessen.

V.3.1.3 Temperaturabhängigkeit der Aktivität

Die Aktivität von gelöstem und immobilisiertem CYP102A1 wurde bei verschiedenen Temperaturen verglichen (Abbildung V-14).

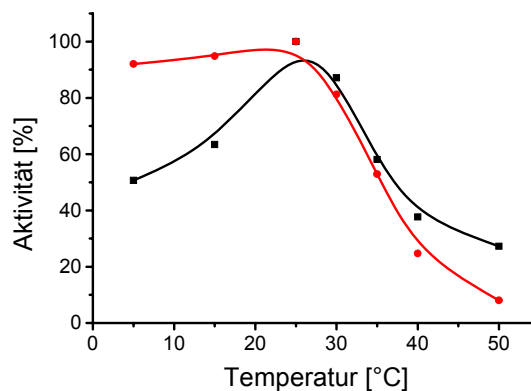


Abbildung V-14: Temperaturprofil der Aktivität von gelöstem (rot) und immobilisiertem (schwarz) CYP102A1 gegen 10-pNCA.

Wie aus Abbildung V-14 hervorgeht, liegt das Temperaturoptimum sowohl für gelöstes als auch für immobilisiertes CYP102A1 bei 25 °C. Bei tieferen Temperaturen zeigt das gelöste Enzym höhere Aktivität als das in der Sol-Gel-Matrix eingeschlossene Enzym. Dies könnte mit der verminderten Diffusion bei tieferen Temperaturen zusammenhängen: Während dieser Effekt in Lösung kaum Auswirkungen hat, kommt es im porösen Silikatnetzwerk zur Limitierung des Stofftransports. Bei hohen Temperaturen ist im Gegensatz dazu das immobilisierte Enzym aktiver. Dies könnte wiederum mit der geringeren Stabilität des gelösten Enzyms zusammenhängen.

V.3.1.4 Stabilität gegen Lösungsmittel

Zur Erhöhung der Löslichkeit der durchweg hydrophoben Substrate von CYP102A1 werden häufig wassermischbare organische Lösungsmittel eingesetzt. Dies führt insbesondere bei hohen Konzentrationen zur einer Verringerung der Stabilität und Aktivität des Enzyms.^[147] Die Aktivität von immobilisiertem und gelöstem CYP102A1 in Gegenwart von DMSO bzw. Aceton wurde verglichen.

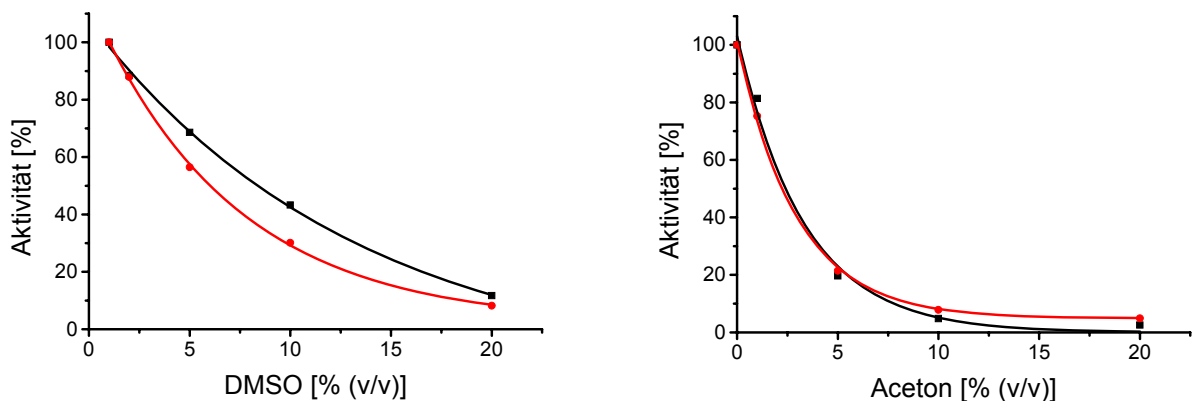


Abbildung V-15: Aktivität von gelöstem und immobilisiertem CYP102A1 in Gegenwart von DMSO (links) und Aceton (rechts). Es wurde jeweils die Aktivität des gelösten Enzyms (rot) mit derjenigen des immobilisierten Enzyms verglichen.

Aus Abbildung V-15 geht hervor, dass die Sol-Gel-Immobilisierung von CYP102A1 dessen Stabilität gegen DMSO und Aceton kaum erhöht. Zusätzlich fällt auf, dass Aceton die Aktivität von CYP102A1 in stärkerem Maße verringert als DMSO. Während in Gegenwart von 10 % DMSO noch ca. 50 % Restaktivität gemessen wurde, geht die Aktivität in Gegenwart von 10 % Aceton bereits gegen Null. DMSO ist damit als Kosolvens besser geeignet als Aceton.

V.3.2 Kopplung von Sol-Gel-Immobilisierung mit Ersatz / Regenerierung von NADPH

Erst die Kopplung der Immobilisierung von CYP102A1 mit einem Verfahren zum Ersatz bzw. zur Regenerierung des Kofaktors NADPH ermöglicht den Einsatz des Immobilisats in der Synthese. Zum Ersatz des Kofaktors wurden Versuche mit Cobaltsephulchrat / Zink und mit Riboflavin durchgeführt. Zur Kofaktorregenerierung

wurde wie für CYP102A1 in Lösung die NADPH-abhängige Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 verwendet.

V.3.2.1 Kombination von Immobilisierung von CYP102A1 und Übertragung von Reduktionsäquivalenten durch Co-Sepulchrat / Zink

Cobaltsepulchrat zur Elektronenübertragung auf P450-Monooxygenasen wurde erstmals von Estabrook et al. beschrieben.^[111] Schwaneberg berichtete erstmals von der Verwendung von Zinkstaub als Reduktionsmittel für Cobaltsepulchrat.^[112] Dieses System in Kombination mit CYP102A1 liefert in Lösung Produktausbeuten, die bei ca. 20 % der mit dem natürlichen Kofaktor erzielbaren Werte liegen.

Die Kombination von in der Sol-Gel Matrix immobilisiertem CYP102A1 mit Cobaltsepulchrat und Zink lieferte keinerlei Produkt. Das Enzym scheint für Cobaltsepulchrat nicht zugänglich zu sein. Der Mechanismus des Elektronentransfers von Cobaltsepulchrat ist nicht bekannt. Deshalb kann nicht geklärt werden, ob die Elektronenübertragung an der mangelnden Zugänglichkeit des porösen Silikats oder an der in der Matrix verringerten Zugänglichkeit des Proteins liegt.

V.3.2.2 Koimmobilisierung von CYP102A1-Hämdomäne und Riboflavin

Wie oben beschrieben ist reduziertes Riboflavin zur Übertragung von Elektronen auf CYP102A1 in der Lage. Bei Reduktion des Riboflavins durch NADH muss die isolierte und aufgereinigte CYP102A1-Hämdomäne verwendet werden, um eine direkte Übertragung der Elektronen von NADH auf die Reduktasedomäne auszuschließen. Um zu untersuchen, ob Riboflavin zur Elektronenübertragung auf in einer Sol-Gel-Matrix eingeschlossenes CYP102A1 verwendet werden kann, wurde zunächst die aufgereinigte CYP102A1-Hämdomäne in der Sol-Gel-Matrix immobilisiert. Die Zugabe von Riboflavin und NADH resultierte nicht in Produktbildung. Dies galt sowohl für Ansätze bei denen Riboflavin direkt mit CYP102A1 koimmobilisiert wurde, als auch für Ansätze bei denen Riboflavin erst nachträglich zum Reaktionsgemisch gegeben wurde.

V.3.2.3 Kombination von sol-gel-immobilisierter FDH mit sol-gel-immobilisierter P450-Monooxygenase

NADPH-abhängige FDH aus *Pseudomonas* sp. 101 stellt die effektivste der untersuchten Methoden zur Vermeidung des stöchiometrischen Einsatzes von NADPH in CYP102A1-katalysierten Reaktionen dar. Zur Konstruktion eines heterogenen Biooxidationskatalysators wurde deshalb die Immobilisierung von FDH in der auch für die Immobilisierung von CYP102A1 benutzten Sol-Gel-Matrix untersucht. Zunächst wurde versucht, beide Enzyme gleichzeitig zu immobilisieren. Dieser Ansatz ergab Sol-Gel-Immobilisate mit geringer Aktivität (Abbildung V-16). Alternativ zur Koimmobilisierung von CYP102A1 und NADP⁺-abhängiger FDH wurden beide Enzyme getrennt immobilisiert. Es zeigte sich, dass FDH und CYP102A1 getrennt weitaus effektiver immobilisiert werden können. Dies geht aus Abbildung V-16 hervor, in der der *p*NCA-Umsatz nach einer Stunde Reaktionszeit bei Einsatz des Koimmobilisats mit dem Umsatz bei Verwendung der getrennt immobilisierten und nachträglich im selben Verhältnis gemischten Enzyme verglichen wird.

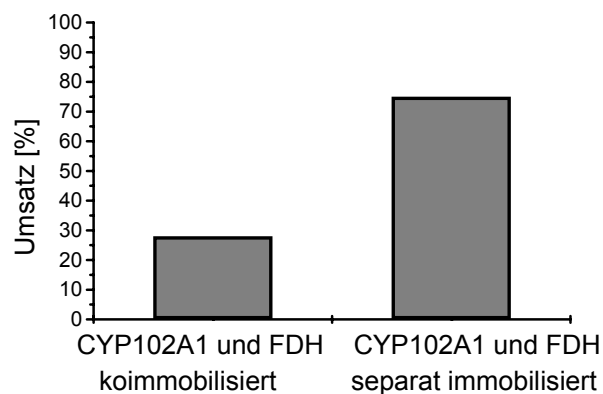


Abbildung V-16: Vergleich des Umsatzes von 0.2 mM 10-*p*NCA durch 10 mg koimmobilisierte FDH und CYP102A1 (links) und separat immobilisierte FDH und CYP102A1. Die NADP⁺-Konzentration lag in beiden Fällen bei 0.1 mM. Die Reaktion wurde nach einer Stunde abgebrochen und der Anteil an umgesetztem 10-*p*NCA bestimmt.

Die getrennte Immobilisierung ist demnach vorteilhaft und resultiert in annähernd dreifacher Aktivität verglichen mit der Koimmobilisierung.

V.3.2.4 Umsetzung von *n*-Oktan, Naphthalin und β -Jonon durch in Sol-Gel eingeschlossene CYP102A1-Varianten

Die Charakterisierung von sol-gel-immobilisiertem CYP102A1 wurde mit dem Pseudosubstrat 10-*p*NCA durchgeführt. Um zu untersuchen, ob der Sol-Gel-Ansatz auch zur Hydroxylierung wirtschaftlich interessanter Substrate genutzt werden kann, wurden einige Reaktionen mit geeigneten CYP102A1-Varianten durchgeführt. Dabei wurden Substrate aus verschiedenen Substanzklassen gewählt: Neben dem gesättigten *n*-Alkan *n*-Oktan wurde der Aromat Naphthalin und das zwei Doppelbindungen enthaltende Terpen β -Jonon umgesetzt.

Tabelle V-2: Gaschromatographisch bestimmter Substratumsatz nach 2-stündiger Reaktion (10 ml Volumen) von 100 mg immobilisiertem CYP102A1 (35 nmol pro Gramm Sol-Gel) mit 0.2 mM des jeweiligen Substrats und 0.6 mM NADPH.

Substrat	<i>n</i> -Oktan	Naphthalin	β -Jonon
Eingesetzte CYP102A1-Variante	A74G/F87V/L188Q	A74G/F87V/L188Q	A74E/F87V/P386S ^[97]
Umsatz [%]	79	77	83

Der Umsatz der Substrate zu den Produkten lag, wie in Tabelle V-2 zusammengestellt, für alle drei Reaktionen bei ungefähr 80 %. Die Sol-Gel-immobilisierten Enzyme konnten für zwei weitere Reaktionszyklen verwendet werden, allerdings sank der Umsatz dabei über ca. 60 auf nur noch 25 bis 35 %.

In den untersuchten Reaktionen wurden die in Abbildung V-17 dargestellten Produkte erhalten. Die prozentualen Anteile regioisomerer Produkte wurden aus dem FID-Signal des Gaschromatographen berechnet.

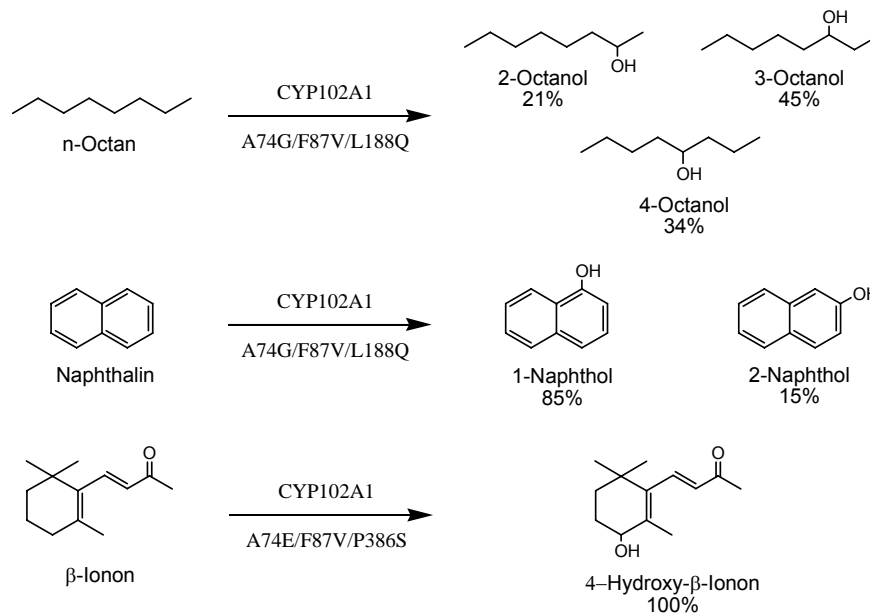


Abbildung V-17: Mit immobilisierten CYP102A1-Varianten durchgeführte Hydroxylierungsreaktionen. Die Prozentzahlen geben den Anteil des jeweiligen Regioisomeren an der Gesamtproduktausbeute an.

Diese Beispielreaktionen beweisen, dass der Umsatz von Substraten mittels immobilisierter CYP102A1-Monooxygenase möglich ist. Die Sol-Gel-Immobilisierung verändert weder die Substratspezifität noch die Regioselektivität von CYP102A1 wesentlich. Der Einschluss in eine *in situ* erzeugte Sol-Gel-Matrix unter Erhalt der Aktivität scheint für alle Varianten von CYP102A1 möglich zu sein. Die Regioselektivität der CYP102A1-Varianten in der Sol-Gel-Matrix ist identisch wie für das Enzym in Lösung.^[31, 97]

V.3.2.5 Vergleich der Stabilität von immobilisiertem und gelöstem CYP102A1 unter Prozessbedingungen

Der Einschluss von CYP102A1 in einer Sol-Gel-Matrix ist, wie aus den präsentierten Daten hervorgeht, in Beziehung auf Lager- und Temperaturstabilität vorteilhaft.

Für die praktische Anwendung ist allerdings zu berücksichtigen, dass trotz des verwendeten Kofaktorrecyclingsystems der Kofaktor weiterhin in Lösung befindlich ist, und damit in einem typischen Reaktor mit dem Produktstrom entfernt würde. Des Weiteren resultiert die Immobilisierung von CYP102A1 in einem Verlust von 75 % der Aktivität (ca. 50 % Immobilisierungseffizienz und ca. 50 % Aktivitätsverlust des immobilisierten CYP102A1). In Kombination mit dem für die Immobilisierung

benötigten Arbeitsaufwand lässt dieser Aktivitätsverlust die Verwendung der immobilisierten Monooxygenase sehr aufwändig und kostenintensiv erscheinen. Es müsste für die Verwendung große Vorteile geben. Ein solcher Vorteil bestünde in erhöhter Stabilität unter Prozessbedingungen. Die Stabilität unter Prozessbedingungen wurde für gelöstes CYP102A1 (in Form von Rohlysat und in aufgereinigter Form) mittels eines Enzym-Membranreaktors (Abbildung V-18) ermittelt. Für immobilisiertes CYP102A1 wurde ein einfacher Festbettreaktor verwendet (siehe Abbildung V-18).

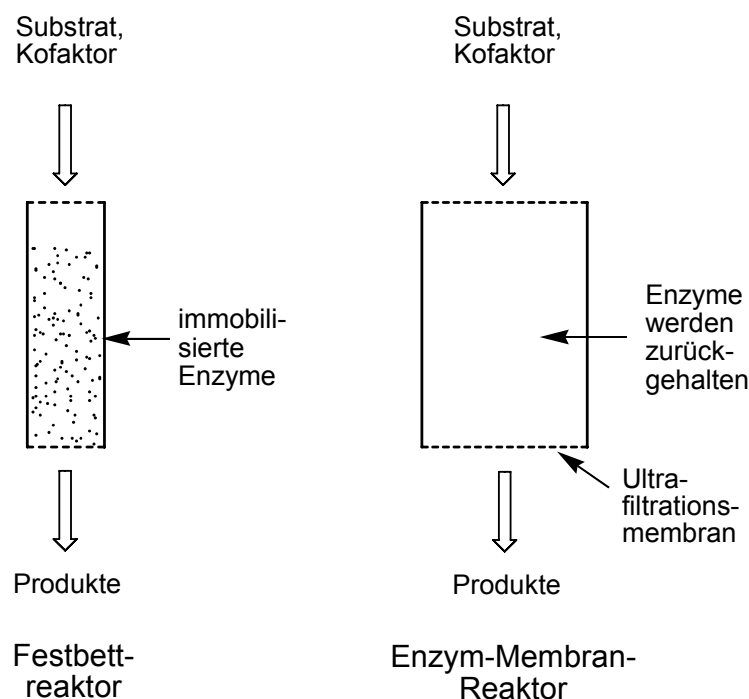


Abbildung V-18: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten einfachen Festbettreaktors für immobilisiertes CYP102A1 und des Enzym-Membran-Reaktors (Amicon Ultrafiltrationsapparatur). Außerdem wurden Reaktionen in zweiphasigen, gerührten Emulsionen aus wässrigem Katalysatorsystem und organischem Lösungsmittel sowie Reaktionen in homogener wässriger Lösung unter Einsatz von Löslichkeitsvermittlern durchgeführt.

In den untersuchten Reaktionssystemen wurden nach jeweils 20 Minuten Proben genommen, um den Umsatz des Substrats 10-pNCA im Produktstrom zu bestimmen. Der Substratumsatz nimmt mit zunehmender Inaktivierung von CYP102A1 ab. Der Umsatz bei der ersten Messung wurde jeweils als 100 % Aktivität des untersuchten Biokatalysators definiert. Die zu späteren Zeitpunkten ermittelten Werte für den

Substratumsatz wurden relativ zu dieser Ausgangsaktivität in Abbildung V-19 aufgetragen.

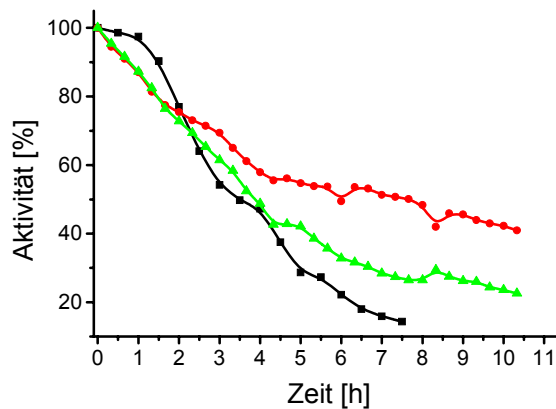


Abbildung V-19: Prozessstabilität von CYP102A1. Die Aktivitätsabnahme des CYP102A1-Rohlysats in Lösung zeigt die rote Kurve, diejenige des aufgereinigten CYP102A1 die grüne Kurve und diejenige des aufgereinigten Enzyms in der Sol-Gel-Matrix die schwarze Kurve.

Aus Abbildung V-19 geht hervor, dass durch Aufreinigung von CYP102A1 die Prozessstabilität sinkt. Es müssen im *E. coli*-Lysat Bestandteile vorhanden sein, die CYP102A1 stabilisieren. Noch schneller als Rohextrakt und aufgereinigtes CYP102A1 verliert das Enzym in der Sol-Gel-Matrix an Aktivität. Nach sieben Stunden Reaktionszeit beträgt die Aktivität des Immobilisats 16 %, die des aufgereinigten Enzyms 27 % und die des Rohlysats noch 51 % der Ausgangsaktivität. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den unter V.3.1.2 beschriebenen Lagerstabilitäten. Die Unterschiede können nur durch verschiedene Mechanismen der Inaktivierung je nach Bedingungen (Substratumsatz oder reine Lagerung) hervorgerufen werden. Beispielsweise könnten bei Umsatz von Substraten durch Entkopplungsreaktionen (s. Kap III.1.4) reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die die Enzyme schädigen könnten.

V.3.3 Reaktionen in Zweiphasensystemen aus nicht mischbaren Flüssigkeiten

V.3.3.1 Hydroxylierung von Cyclohexan

V.3.3.1.1 Aktivität von CYP102A1-Varianten gegen Cyclohexan

Es handelt sich bei Cyclohexan um ein Substrat, das kaum Ähnlichkeit mit den natürlichen Substraten (Fettsäuren) von CYP102A1 besitzt. Cyclohexan – ein typischer schwer aktivierbarer Kohlenwasserstoff – wurde als Testfall für präparative Hydroxylierungsreaktionen nicht natürlicher Substrate untersucht. Zunächst mussten dazu Varianten von CYP102A1 gefunden werden, die zur Hydroxylierung von Cyclohexan in der Lage sind.

Die Aktivität am Institut vorhandener sowie selbst hergestellter CYP102A1-Varianten gegen das Modellsubstrat Cyclohexan wurde getestet. Dazu wurde zunächst die NADPH-Oxidationsrate der einzelnen Varianten bestimmt (Abbildung V-20).

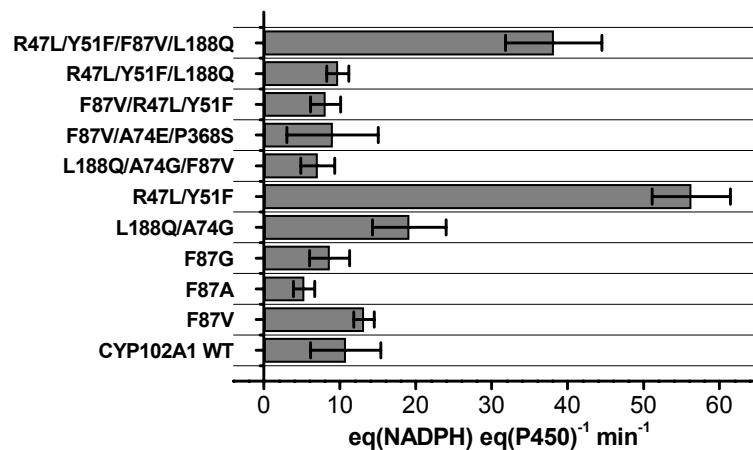


Abbildung V-20: NADPH-Oxidationsrate ($\text{eq(NADPH) eq(P450)}^{-1} \text{ min}^{-1}$) verschiedener CYP102A1-Varianten in Gegenwart von 0.5 mM Cyclohexan.

Für die drei aktivsten Varianten und das Wildtypenzym wurden die Reaktionsprodukte analysiert sowie das Kopplungsverhältnis zwischen NADPH- und Substratoxidation bestimmt (Tabelle V-3). Alle untersuchten Enzymvarianten hydroxylieren Cyclohexan zu Cyclohexanol. Als Nebenprodukt entstanden Spuren von Cyclohexanon. Der Cyclohexanonanteil im Reaktionsprodukt überstieg aber in keinem Fall 2 %.

Tabelle V-3: NADPH-Verbrauchsrate, Kopplungsverhältnis von NADPH-Oxidation zur Produktbildung und daraus berechnete Hydroxylierungsrate für einige CYP102A1-Varianten

	CYP102A1	CYP102A1 L188Q/A74G	CYP102A1 R47L/Y51F/ F87V/L188Q	CYP102A1 R47L/Y51F
NADPH-Oxidationsrate $\frac{\text{eq}(\text{NADPH})}{\text{eq}(\text{CYP102A1})^{-1} \text{ min}^{-1}}$	11 ± 4	19 ± 5	38 ± 6	56 ± 5
Kopplungsverhältnis [$\frac{\text{eq}(\text{Cyclohexanol})}{\text{eq}(\text{NADPH})}^{-1} * 100 \%$]	6 ± 1	16 ± 3	19 ± 2	25 ± 3
Hydroxylierungsrate [$\frac{\text{eq}(\text{Cyclohexanol})}{\text{eq}(\text{CYP102A1})^{-1} \text{ min}^{-1}}$]	0.7 ± 0.2	3 ± 1	7 ± 1	14 ± 2

Für das Substrat Cyclohexan stellte sich heraus, dass die CYP102A1-Variante R47L/Y51F sowohl die höchste NADPH-Verbrauchsrate (56 min^{-1}) als auch das höchste Kopplungsverhältnis (25 %) und damit die höchste Hydroxylierungsaktivität zeigte. Die beiden Aminosäuren, die in diesem Enzym ausgetauscht wurden, bilden im Wildtypprotein das carboxylatbindende Motiv. Dessen Substitution durch hydrophobe Aminosäuren führt zur bevorzugten Umsetzung hydrophober Substanzen. Gleichzeitig sinkt die Aktivität gegen Fettsäurederivate: 10-*p*NCA, das von den meisten CYP102A1-Varianten umgesetzt wird, stellt kein Substrat der Variante R47L/Y51F dar.

Für die spätere Verwendung von CYP102A1 R47L/Y51F im präparativen Maßstab ist die Entstehung nur eines einzigen Hauptprodukts von großem Vorteil.

V.3.3.1.2 Zweiphasensystem für die Hydroxylierung von Cyclohexan

Cyclohexan ist nur in geringem Maße wasserlöslich: Die Sättigungskonzentration in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5) beträgt, wie durch wiederholte Extraktion mit Oktan bestimmt wurde, 0.59 mM. Überdies ist Cyclohexan mit einem Siedepunkt von 80.7 °C und einem Dampfdruck von 12.7 kPa bei 25°C leicht flüchtig. Für die Versorgung von CYP102A1 mit Sauerstoff muss aber in einem offenen System mit Luftzutritt gearbeitet werden. Diese Bedingungen führen unweigerlich zum Verlust von Cyclohexan durch Verdunstung. Um trotzdem die Substratkonzentration in der wässrigen Phase konstant zu halten, wurde in einem zweiphasigen Gemisch mit hohem Überschuss an Cyclohexan gearbeitet. Die aus Cyclohexan bestehende organische Phase dient dabei sowohl als Substratreservoir als auch zur Extraktion des Reaktionsprodukts Cyclohexanol.

V.3.3.1.3 Stabilität von FDH aus *Pseudomonas* sp. 101 in Gegenwart von Cyclohexan

Um zu entscheiden, ob ein bienzymatisches Oxidationssystem aus FDH und CYP102A1 in einem Zweiphasensystem realisierbar ist, wurde zunächst die Stabilität der FDH untersucht. Hierzu wurde FDH in einem Zweiphasensystem aus wässrigem Puffer und Cyclohexan gerührt und in regelmäßigen Abständen die FDH-Aktivität bestimmt (Abbildung V-21).

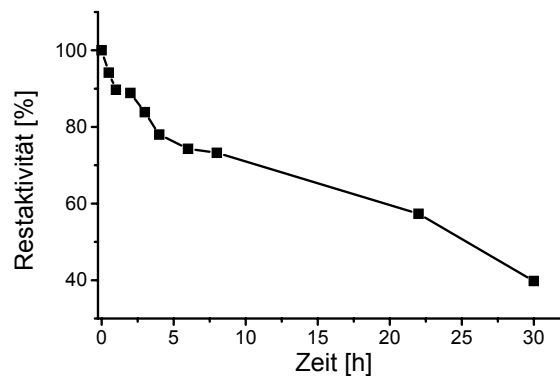


Abbildung V-21: Stabilität der FDH aus *Pseudomonas* sp. 101 in einer zweiphasigen, bei 800 U min^{-1} gerührten Emulsion aus gleichen Volumina Cyclohexan und 50 mM KPi. Zur Messung der FDH-Aktivität wurde die NADPH-Entwicklung in Gegenwart von 0.1 mM NADP^+ und 300 mM Formiat gemessen.

Die Halbwertszeit von NADP^+ -abhängiger FDH in einem zweiphasigem Gemisch aus Cyclohexan und wässrigem Puffer beträgt ca. 25 h, wie Abbildung V-21 zu entnehmen ist. Damit ist die Stabilität für die Umsetzung im Zweiphasensystem ausreichend.

V.3.3.1.4 Vorversuche zur Hydroxylierung von Cyclohexan im Zweiphasensystem

Die Hydroxylierung von Cyclohexan im wässrig-organischen Zweiphasensystem wurde zunächst im 5 ml Maßstab untersucht. Der zeitliche Verlauf der Cyclohexanolkonzentration ist in Abbildung V-22 dargestellt. Um den Einfluss der verwendeten CYP102A1-Variante zu untersuchen, wurde in drei parallelen Reaktionsansätzen jeweils unterschiedliche CYP102A1-Varianten (WT, A74G/L188Q, R47L/Y51F) eingesetzt.

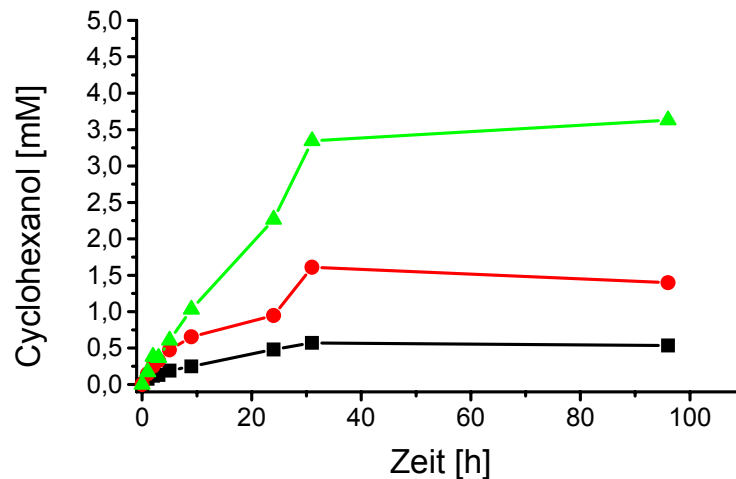


Abbildung V-22: Hydroxylierung von Cyclohexan durch CYP102A1 (schwarz) sowie durch die Varianten A74G/L188Q (rot) und R47L/Y51F (grün). Es wurden folgende Bedingungen in der wässrigen Phase (2.5 ml) verwendet: 2 μM der jeweiligen CYP102A1-Variante, 250 mM Formiat, 0.1 mM NADP⁺, 50 mM KPi, pH 7.5. Dazu wurden 2.5 ml destilliertes Cyclohexan gegeben und bei 500 rpm gerührt.

Aus Abbildung V-22 geht hervor, dass die nach der Aktivitätsmessung über wenige Minuten zu erwartende Reihenfolge der Aktivität der drei untersuchten Varianten auch für Reaktionen über viele Stunden bestehen bleibt. Dies spricht dafür, dass die Reaktionsgeschwindigkeit im Zweiphasensystem nicht vom Stofftransport über die Phasengrenze, sondern durch die jeweils eingesetzte CYP102A1-Variante bestimmt wird. Außerdem ist die Stabilität der drei eingesetzten Varianten ähnlich. Nach ca. einem Tag ist die Hydroxylierungsaktivität stark gefallen bzw. vollständig zerstört. Ein Molekül der produktivsten Variante CYP102A1 R47L/Y51F katalysierte in diesem System die Hydroxylierung von 1750 Molekülen Cyclohexan. Im Vergleich dazu liegt diese Zykluszahl für den ebenfalls untersuchten Wildtyp bei ca. 250.

V.3.3.1.5 Optimierung der Cyclohexanhydroxylierung im Zweiphasensystem

Nachdem erste Experimente (Abbildung V-22) ergeben hatten, dass die Hydroxylierungsreaktion im Zweiphasensystem einen ganzen Tag lang unterhalten werden kann, wurde die Optimierung des Systems in Angriff genommen.

Hierzu wurde zunächst das kinetische Verhalten der in Beziehung auf die Cyclohexanhydroxylierung aktivsten Variante CYP102A1 R47L/Y51F untersucht.

V.3.3.1.6 Kinetische Untersuchung der Cyclohexanhydroxylase CYP102A1 R47L/Y51F

Zunächst wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der von aufgereinigtem CYP102A1 R47L/Y51F katalysierten Hydroxylierung von Cyclohexan in Abhängigkeit von der Cyclohexankonzentration bestimmt (Abbildung V-23).

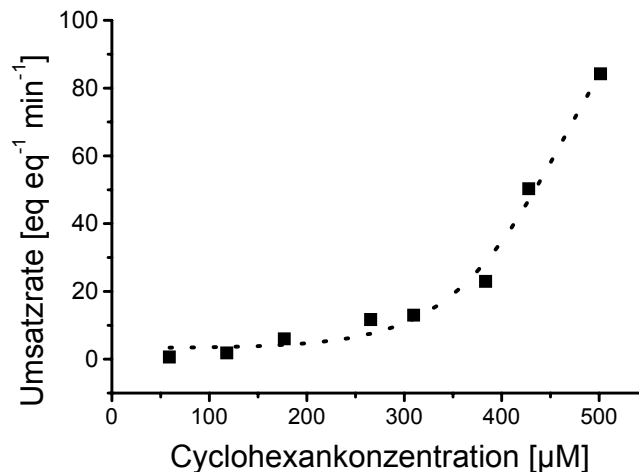


Abbildung V-23: Anfangsgeschwindigkeit des NADPH-Verbrauchs von CYP102A1 R47L/Y51F bei Variation der Cyclohexankonzentration im durch die Löslichkeit begrenzten Konzentrationsbereich. Die Umsatzrate zeigt eine sigmoide Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Im Gegensatz zu den bisher für CYP102A1 publizierten kinetischen Daten zeigt CYP102A1 R47L/Y51F für das Substrat Cyclohexan sigmoide Abhängigkeit der Umsatzrate von der Substratkonzentration. Während die in den meisten Fällen beobachtete Abhängigkeit der Umsatzrate mit dem Michaelis-Menten-Modell der Enzymkinetik in Einklang zu bringen ist, liegt bei sigmoidaler Abhängigkeit dem Hill-Modell gehorchendes kinetisches Verhalten vor. Dieses kinetische Modell geht von mindestens zwei kooperativen Bindungsstellen des Substrats aus. Maximale Aktivität kann nur bei gleichzeitiger Sättigung der Bindungsstellen erreicht werden.

Um das beobachtete ungewöhnliche kinetische Verhalten in der untersuchten Reaktion durch unabhängige Messungen zu verifizieren, wurden Bindungsdifferenzspektren von CYP102A1 R47L/Y51F mit Cyclohexan aufgenommen (Abbildung V-24). Dabei macht man sich zu Nutze, dass bei der Bindung von Substraten an das aktive Zentrum von P450-Monooxygenasen ein Übergang zum high-spin Eisen(III) erfolgt. Dieser Komplex zeigt im Unterschied zum

nicht substratgebundenen Zustand eine Absorptionzunahme bei 390 nm und gleichzeitig eine Abnahme der Absorption bei 417 nm. Die Titration von P450-Monooxygenasen mit Substraten kann demnach sehr genaue Aussagen über das Substratbindungsverhalten liefern, wenn nach den Titrationsschritten jeweils Spektren gegen eine identische, aber substratfreie Probe gemessen werden.

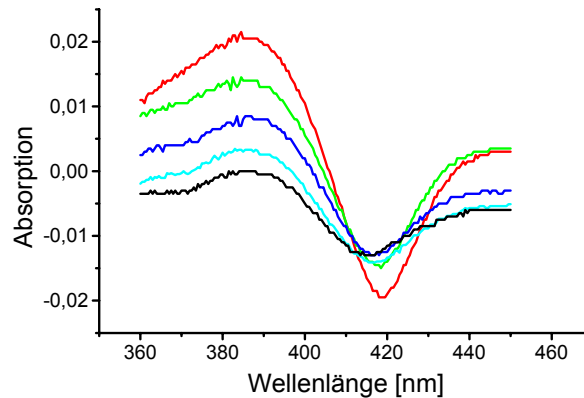


Abbildung V-24: Bindungsspektren für die Bindung von Cyclohexan an 8.6 μM CYP102A1 R47L/Y51F. Es wurde jeweils ein Spektrum einer CYP102A1-Probe der angegebenen Cyclohexankonzentration gegen eine identische, aber substratfreie Probe gemessen.

Das Ausmaß der Spinänderung bei einer bestimmten Cyclohexanolkonzentration ist sowohl zur aus den Bindungsdifferenzspektren erhältlichen Absorptionsdifferenz zwischen 387 nm und 417 nm, als auch zur Zahl substratgebundener CYP102A1-Moleküle proportional. In Abbildung V-25 wurden die aus Abbildung V-24 erhältlichen Absorptionsdifferenzen gegen die jeweilige Cyclohexankonzentration aufgetragen.

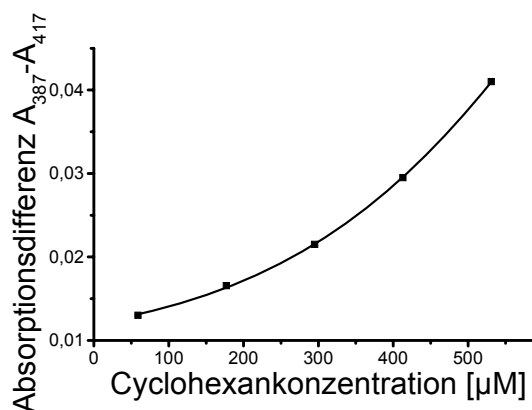


Abbildung V-25: Auftragung der aus den Bindungsdifferenzspektren für Cyclohexan berechneten Absorptionsdifferenzen zwischen 387 nm und 417 nm gegen die jeweilige Cyclohexankonzentration. Wie die Umsatzraten ist auch die Bindung von Cyclohexan an CYP102A1 R47L/Y51F sigmoidal abhängig von der Konzentration des Substrats.

Abbildung V-25 belegt, dass – wie schon für die Hydroxylierung von Cyclohexan durch CYP102A1 R47L/Y51F gefunden – auch die Bindung dieses Substrats durch kooperative Effekte beeinflusst wird. Diese Ergebnisse bestätigen sich also gegenseitig: Eine sigmoidale Abhängigkeit der Substratbindung von der Substratkonzentration führt zwangsläufig zu einer sigmoidalen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, da die Bindung des Substrats die Voraussetzung für jede enzymatische Reaktion darstellt. Bemerkenswert ist, dass innerhalb des durch die geringe Löslichkeit von Cyclohexan vorgegebenen Konzentrationsbereichs keine Sättigung des aktiven Zentrums mit dem Substrat erreicht werden konnte. Sowohl Umsatzrate als auch der Grad der Komplexierung des aktiven Zentrums mit dem Substrat steigen innerhalb des für Messungen zugänglichen Konzentrationsbereichs exponentiell an. Dies legt nahe, dass selbst eine geringfügige Erhöhung der Substratkonzentration über diesen Konzentrationsbereich hinaus zu einer deutlichen Steigerung der Umsatzrate führen sollte.

Deshalb wurde die Erhöhung der Substratlöslichkeit durch Zusätze als erste Möglichkeit zur Optimierung des zweiphasigen Reaktionssystems untersucht.

Als zweiter Ansatz zur Erhöhung der Produktivität der Reaktion wurde die Stabilisierung der eingesetzten Enzyme verfolgt.

V.3.3.1.7 Erhöhung der Umsatzrate durch Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Cyclohexan

Die Erhöhung der Löslichkeit von Cyclohexan durch Zugabe von Additiven kann nur dann positive Effekte zeigen, wenn die zur Löslichkeitserhöhung verwendeten Substanzen keinen negativen Einfluss auf Aktivität und Stabilität von CYP102A1 zeigen. Zur Suche nach Löslichkeitsvermittlern wurde jeweils eine gesättigte Lösung von Cyclohexan in wässrigem Phosphatpuffer mit dem entsprechenden Additiv durch Rühren über Nacht hergestellt. Dann wurde die NADPH-Oxidationsrate von CYP102A1 R47L/Y51F in der jeweiligen Lösung gemessen. An Additiven wurden

jeweils ein- und zwei Volumenprozent der Lösungsmittel DMSO, Ethanol, Methanol, Aceton, THF, *t*-Butanol und Acetonitril sowie jeweils 0.5 und 1 % der Detergenzien Tween 20, Tween 80, Cholsäure und CHAPS sowie α - und β -Cyclodextrin (auch als statistisch methylierte Derivate) eingesetzt. Nur in drei Fällen wurden erhöhte NADPH-Oxidationsraten detektiert: Tween 20 und Acetonitril führten zu einer ca. 50 %-igen, Tween 80 zu einer 80 %-igen Erhöhung der Aktivität. Bei Tween 20 und 80 handelt es sich um Ester, die aus einer hydrophilen Zuckereinheit und hydrophoben Fettsäureseitenketten bestehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der NADPH-Oxidationsrate in Gegenwart dieser Substanzen auf deren direkter Interaktion mit dem aktiven Zentrum der P450-Monooxygenase beruht. Selbst bei kurzer Reaktionszeit von 20 Minuten konnte keine erhöhte Cyclohexanolproduktion gegenüber einer Referenz ohne Tween gemessen werden.

Im Falle von Acetonitril war zwar neben der NADPH-Oxidationsrate auch die Produktbildung während der ersten 20 Minuten erhöht. Allerdings verliert CYP102A1 in Gegenwart von Acetonitril beschleunigt an Aktivität. Bereits nach zwei Stunden Reaktionszeit im Zweiphasensystem war die Cyclohexanolkonzentration in einem Ansatz ohne Acetonitril höher als in demjenigen mit Zusatz dieses Löslichkeitsvermittlers.

V.3.3.1.8 Erhöhung der Stabilität des enzymatischen Oxidationssystems

Nachdem die Erhöhung der Cyclohexankonzentration in der wässrigen Phase durch Zugabe von Additiven keine positiven Auswirkungen auf die Cyclohexanolbildung ergeben hatte, wurde versucht, die Reaktion durch Stabilisierung der eingesetzten Biokatalysatoren zu optimieren.

Es wurden Reaktionsansätze im zweiphasigen System unter Zugabe verschiedener Proteinstabilisatoren getestet. Eine Aktivitätsverlust von CYP102A1 und FDH verhindernde Wirkung der Zusätze führt zu erhöhter Cyclohexanolproduktion. Im Vergleich zu einem Ansatz ohne stabilisierende Zusätze wurden in Gegenwart von BSA und Katalase erhöhte Produktkonzentrationen gemessen. Die Zugabe von Sucrose oder Glycerin indes hatte inhibierende Wirkung auf die Cyclohexanolbildung.

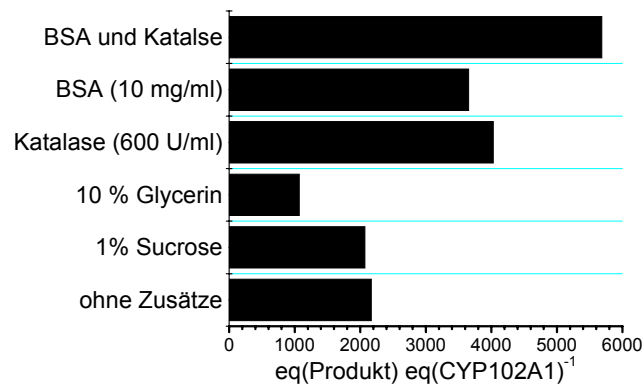


Abbildung V-26: Effekt stabilisierender Komponenten auf die Reaktion im zweiphasigen Gemisch aus wässrigem Katalysatorsystem und Cyclohexan. Aufgetragen ist die Anzahl der im jeweiligen Reaktionsansatz nach 30 h erzielten Katalysezyklen pro Molekül CYP102A1.

In Gegenwart von BSA und Katalase wurde annähernd eine Verdreifachung der pro Molekül CYP102A1 katalysierten Reaktionszyklen beobachtet.

BSA wird häufig zur Stabilisierung von Proteinen – insbesondere an Phasengrenzen – verwendet. Katalase katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser. Wasserstoffperoxid entsteht durch die Abdissoziation von Peroxospezies vom Hämeisen während des Katalysezyklus. Da Wasserstoffperoxid ein starkes Oxidans mit enzyschädigender Wirkung ist, führt seine sofortige Zerstörung durch Katalase zu einer Stabilisierung der eingesetzten Enzyme.

V.3.3.1.9 Verwendung des Zweiphasensystems im gerührten Glaskolben

85 nmol CYP102A1 in 5 ml wässrigem Reaktionssystem (10 mg ml⁻¹ BSA, 600 U ml⁻¹ Katalase, 250 mM Natriumformiat, 0.1 mM NADP⁺, 50 mM KPi, pH 7.5) wurde mit 60 U FDH versetzt, 5 ml destilliertes Cyclohexan zugegeben und bei 100 - 800 U min⁻¹ gerührt. Die besten Ergebnisse (dargestellt in Abbildung V-27) wurden bei 200 U min⁻¹, der Geschwindigkeit, bei der das Zweiphasensystem gerade in eine Emulsion übergeht, erzielt. Um durch Messung der Cyclohexanolkonzentration in der organischen Phase (durch Kalibrierung des Gaschromatographen mittels Standards bekannter Konzentration) die insgesamt produzierte Stoffmenge an Cyclohexanol abschätzen zu können, wurde die Verteilung von Cyclohexanol zwischen Cyclohexan und dem oben beschriebenen wässrigen Katalysatorsystem (ohne NADP⁺) untersucht. Für den Konzentrationsbereich bis 10 g l⁻¹ Cyclohexanol existiert ein

linearer Zusammenhang zwischen der Cyclohexanolkonzentration in der organischen Phase und der Cyclohexanolkonzentration in der wässrigen Phase:

$$[\text{Cyclohexanol}]_{\text{aq}} = (0.936 \pm 0.011) [\text{Cyclohexanol}]_{\text{org}}$$

Damit ist im untersuchten Konzentrationsbereich die Cyclohexanolkonzentration in der wässrigen Phase annähernd gleich groß wie diejenige in der organischen Phase. Mittels dieser Beziehung wurde die oben beschriebene Reaktion für die Varianten R47L/Y51F und A74G/F87V/L188Q ausgewertet. Der zeitliche Verlauf der Cyclohexanolkonzentration (berechnet aus der gemessenen Konzentration in der Cyclohexanphase) ist in Abbildung V-27 dargestellt.

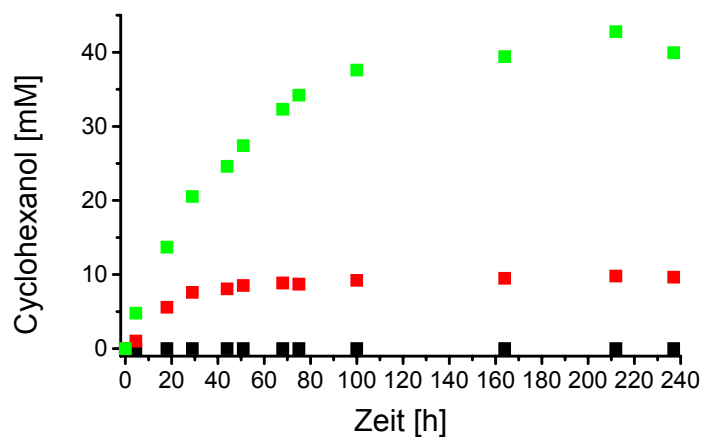


Abbildung V-27: Umsetzung von Cyclohexanol im Glaskolben. Es wurden 5 ml Cyclohexan und 5 ml wässriges Katalysatorsystem (10 mg ml⁻¹ BSA, 600 U ml⁻¹ Katalase, 250 mM Natriumformiat, 17 µM CYP102A1 R47L/Y51F (grüne Quadrate) bzw. A74G/F87V/L188Q (rote Quadrate), 8 U ml⁻¹ FDH, 0.1 mM NADP⁺, 50 mM KPi, pH 7.5) eingesetzt. Die schwarzen Quadrate stellen eine Negativkontrolle dar: Statt CYP102A1 wurde *E. coli* BL21 Zellysate ohne exprimierte P450-Monooxygenase eingesetzt.

Aus Abbildung V-27 geht hervor, dass unter diesen Bedingungen nicht der Phasentransfer des Substrats der die Reaktionsrate limitierende Faktor ist. Dies folgt aus der Beobachtung, dass für die aktivere Variante (siehe Kapitel V.3.3.1.1) CYP102A1 R47L/Y51F höhere Produktkonzentrationen als für die nur geringe Aktivität gegen Cyclohexan zeigende Variante A74G/F87V/L188Q gemessen wurde. Wäre der Transfer von Cyclohexan aus der organischen in die wässrige Phase geschwindigkeitsbestimmend, so müsste unabhängig von der Aktivität der eingesetzten CYP102A1-Variante dieselbe Reaktionsgeschwindigkeit resultieren. Die Zahl der Katalysezyklen pro CYP102A1 betrug in diesem System 9620, die Zahl der

Katalysezyklen pro Molekül NADP⁺ 1270. Die Raum-Zeit-Ausbeute liegt bei 63.5 mg l⁻¹ h⁻¹.

V.3.3.1.10 Verwendung des optimierten Zweiphasensystems im Schüttelkolben

Variation der Rührgeschwindigkeit hat großen Einfluss auf die Cyclohexanolbildung im beschriebenen Zweiphasensystem. Deshalb wurden auch Experimente im 40 ml-Maßstab in geschüttelten Erlenmeyerkolben durchgeführt. Unter Verwendung von 20 ml wässriger Phase (180 nmol CYP102A1 R47L/Y51F, 90 U FDH, ansonsten wie oben für das gerührte System) und 20 ml Cyclohexan konnten 1.85 mmol Cyclohexanol erhalten werden. Dies entspricht einer Zykluszahl von ca. 10300 für CYP102A1, von 925 für den Kofaktor und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 46.3 mg ml⁻¹ h⁻¹.

V.3.3.1.11 Verwendung des optimierten Zweiphasensystems im Reaktor

Um die Hydroxylierung von Cyclohexan im zweiphasigen Reaktionssystem im vergrößerten Maßstab zu untersuchen, wurde die Reaktion in einem Labfors 3 l Fermenter (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt.

So konnten während der im Zweiphasensystem ablaufenden Hydroxylierungsreaktion kontinuierlich pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck gemessen werden. Gleichzeitig ist der Sauerstoffeintrag in diesem System bedeutend höher als in den bisher untersuchten Reaktionsgefäßen. Die Ergebnisse der Messung von pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Produktkonzentration sind in Abbildung V-28 zusammengestellt.

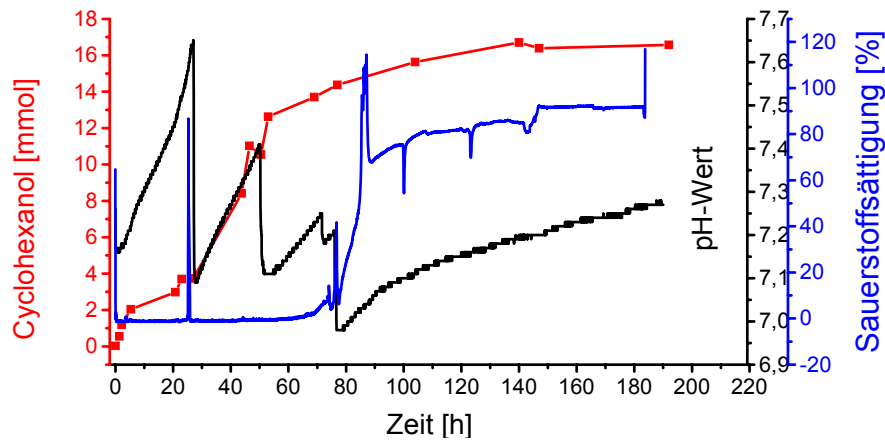


Abbildung V-28: Hydroxylierung von Cyclohexan im Labfors 3 I Fermenter. Rot ist der Verlauf der Cyclohexanolkonzentration, schwarz der Verlauf des pH-Werts und blau der Verlauf der Sauerstoffsättigung während der Reaktion. Das Reaktionsvolumen betrug 1.2 l, zusammengesetzt aus 1 l wässrigem Katalysatorsystem mit stabilisierenden Zusätzen und 200 ml Cyclohexan. Während der Reaktion wurde mit 0.5 l min^{-1} belüftet, mit 350 U min^{-1} gerührt und die Temperatur konstant bei 20°C gehalten. Der pH-Wert wurde mit 1 M KPi, 400 mM Na^+HCOO^- , pH 6 regelmäßig auf pH 7.0 bis 7.2 eingestellt. Zur Verhinderung von starker Schaumbildung wurden 100 μl Antischaum (Siliconöl) zugegeben. Die Abluft wurde durch zwei mit Trockeneis / Aceton befüllte Kühlfallen geleitet, um Verlust von Substrat und Produkt zu vermeiden.

Aus Abbildung V-28 geht hervor, dass das wässrige Katalysatorsystem unter diesen Bedingungen mindestens 100 Stunden aktiv blieb. Neben dem Konzentrationsverlauf von Cyclohexanol kann dies auch aus dem Verlauf des pH-Werts und der Sauerstoffsättigung geschlossen werden. Der pH-Wert steigt, solange das Enzymsystem aktiv ist, da pro Katalysezyklus ein Proton verbraucht wird. Der in Abbildung V-28 drei Mal zu beobachtende drastische Rückgang des pH-Werts tritt auf, wenn der pH-Wert durch Zugabe von 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0) wieder auf 7.0 bis 7.2 eingestellt wurde. Die Steigung des pH-Anstiegs nimmt mit zunehmendem Aktivitätsverlust der Enzyme ab. Nach ca. 100 Stunden ist der Anstieg im Vergleich zur Ausgangssteigung nur noch sehr gering. Ebenso lässt sich der schleichende Aktivitätsverlust am zeitlichen Verlauf der Sauerstoffsättigung ablesen. Diese bleibt niedrig, so lange durch den Hydroxylierungsprozess Sauerstoff verbraucht wird. Nach 70 Stunden Reaktionszeit beginnt die Sauerstoffkonzentration langsam zu steigen. Nach ca. 150 Stunden ist die Reaktionsmischung annähernd mit

Sauerstoff gesättigt, der Messwert bleibt konstant. Zu diesem Zeitpunkt ist die maximale Produktkonzentration erreicht. Insgesamt wurden durch 1.3 μmol CYP102A1 16.7 mmol (1.67 g) Cyclohexanol produziert. Daraus folgt, dass jedes Molekül CYP102A1 durchschnittlich 12850 Katalysezyklen durchführte. Die Raum-Zeit-Ausbeute betrug $16.7 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

V.3.3.2 Umsatz von *n*-Oktan

Nachdem die Hydroxylierung von Cyclohexan optimiert wurde, wurde versucht, die erzielten Ergebnisse auf die Hydroxylierung von *n*-Oktan zu übertragen.

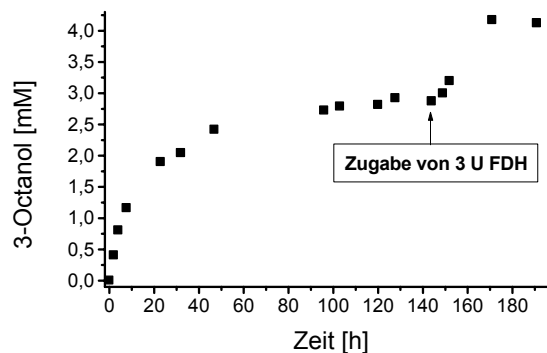


Abbildung V-29: Umsetzung von *n*-Oktan durch CYP102A1 A74G/F87V/L188Q. Dargestellt ist der Reaktionsfortschritt an Hand der Konzentration des Reaktionsprodukts 3-Octanol in der organischen Phase. Die Produktverteilung ist in Abbildung V-30 dargestellt. Es wurden 3.5 ml wässriges Katalysatorsystem (58 nmol CYP102A1, 4 U FDH, 10 mg ml⁻¹ BSA, 600 U ml⁻¹ Katalase, 300 mM Na⁺ HCOO⁻, 50 mM KPi, 0.1 mM NADP⁺) und 3.5 ml *n*-Oktan eingesetzt. Nach 140 h Reaktionszeit war die FDH-Aktivität im Ansatz auf Null gefallen und es wurden nochmals 3 U FDH zugegeben.

n-Oktan besitzt nur eine sehr geringe Wasserlöslichkeit von ca. 0.1 mM. Deshalb verläuft die Hydroxylierungsreaktion trotz der hohen Umsatzrate von CYP102A1 A74G/F87V/L188Q für *n*-Oktan von $250 \text{ min}^{-1}(\text{NADPH-Verbrauch})^{[31]}$ recht langsam. Aus diesem Grund bleibt die Monooxygenaseaktivität sehr lange Zeit bestehen (mindestens 170 Stunden): Der Aktivitätsverlust von CYP102A1 bei Umsatz von Substraten scheint von der Zahl der durchgeführten Katalysezyklen beeinflusst zu werden. Mittels Proben aus der Reaktionslösung wurden wiederholt FDH-Aktivitätstests durchgeführt. Als die Aktivität nach ca. 140 Stunden auf Null gefallen

war, wurden nochmals 3 U FDH zugegeben, was in einem nochmaligen Anstieg der Produktkonzentration resultierte.

3-Oktanol ist nicht das einzige Reaktionsprodukt. Daneben entstehen auch 2- und 4-Oktanol sowie die korrespondierenden Ketone. Der prozentuale Anteil der einzelnen Reaktionsprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten ist in Abbildung V-30 dargestellt.

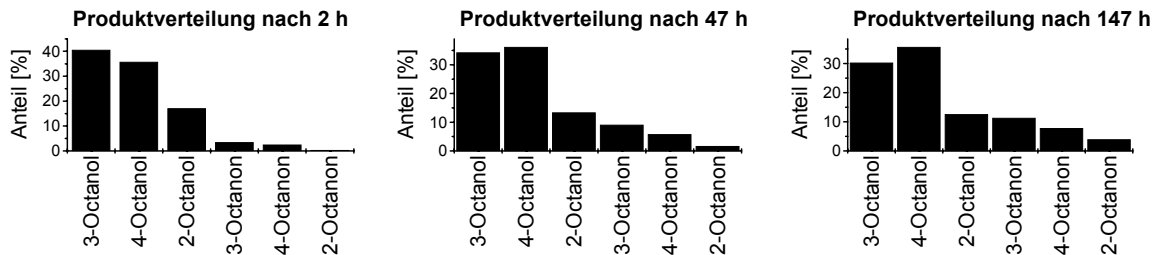


Abbildung V-30: Prozentualer Anteil der verschiedenen Oxidationsprodukte bei der Umsetzung von *n*-Oktan im Zweiphasensystem zu verschiedenen Zeitpunkten.

Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der drei regioisomeren Ketone mit der Zeit zunimmt. Während die Ketone nach 2 Stunden ca. 5 % der gesamten Produkte ausmachten, stieg ihr Anteil innerhalb der nächsten 145 Stunden auf fast 22 %. Diese Verbindungen sind demnach Folgeprodukte, die durch Wasserabspaltung von intermediär bei der „Hydroxylierung“ der Alkohole entstehenden geminalen Diolen („Erlenmeyer-Regel“) entstehen. Mit zunehmender Konzentration der korrespondierenden Alkohole steigt die Wahrscheinlichkeit für deren Oxidation. Diese Reaktionswahrscheinlichkeit wird durch den Fakt, dass die Oktanole weit höhere Löslichkeit in wässrigem Medium besitzen als Oktan selbst, weiter erhöht. Eine direkte doppelte Oxidation des am aktiven Zentrum positionierten Oktans kann als Quelle der Ketone auf Grund dieser Überlegungen ausgeschlossen werden. Würde der Alkohol das aktive Zentrum zwischen den beiden Oxidationsschritten nicht verlassen, so müsste das Verhältnis der einzelnen Produkte zueinander konstant bleiben.

Die Gesamtzahl der pro CYP102A1 Molekül durchgeführten Katalysezyklen betrug für das Substrat Oktan 2200. Die Raum-Zeit-Ausbeute betrug $19 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Damit blieben die Resultate weit unter den für Cyclohexan erreichten Werten.

V.3.3.3 Epoxidierung von Styrol im Zweiphasensystem

V.3.3.3.1 Charakterisierung von CYP102A1-Varianten bezüglich der Epoxidierung von Styrol

Styrol wurde – wie Cyclohexan für die Hydroxylierungsreaktion – als Testfall für die Epoxidierung eines nicht natürlichen Substrats untersucht. Im Gegensatz zur Hydroxylierung von Cyclohexan entsteht bei Epoxidierung von Styrol eine chirale Verbindung. Da einem hohen Enantiomerenüberschuss unter Anwendungsgesichtspunkten ebenso hoher Wert wie hoher Aktivität zukommt, wurde neben der Aktivität auch die Enantioselektivität verschiedener CYP102A1-Varianten in der Epoxidierung von Styrol untersucht. Der Enantiomerenüberschuss der extrahierten Reaktionsprodukte wurde gaschromatographisch analysiert. Im nächsten Schritt wurden Umsatzraten und Kopplungsverhältnis enantioselektiver Varianten bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle V-4 zusammengestellt.

Tabelle V-4: Enantiomerenüberschuss des Reaktionsprodukts, NADPH-Oxidationsrate, Kopplungsverhältnis von NADPH-Oxidation zur Styrolepoxidierung und daraus berechnete Epoxidierungsrate bei der von verschiedenen CYP102A1-Varianten katalysierten Epoxidierung von Styrol.

CYP102A1-Variante	WT	F87V	F87A	F87G	A74G/ L188Q	A74G/ F87V/ L188Q	A74E/ F87V/ P386S
Enantiomerenüberschuss [% ee <i>R/S</i>]	25 ± 2 <i>R</i>	48 ± 2 <i>S</i>	49 ± 3 <i>R</i>	92 ± 4 <i>R</i>	21 ± 3 <i>R</i>	65 ± 2 <i>R</i>	58 ± 3 <i>S</i>
NADPH-Oxidationsrate eq(NADPH) eq(CYP102A1) ⁻¹ min ⁻¹	27 ± 2	84 ± 3	26 ± 4	110 ± 7	55 ± 6	102 ± 8	50 ± 4
Kopplungsverhältnis [eq(Styroloxid) eq(NADPH) ⁻¹ * 100 %]	6 ± 0.2	10 ± 1	1 ± 0.1	31 ± 2	18 ± 2	38 ± 3	22 ± 3
Epoxidierungsrate [eq(Styroloxid) eq(CYP102A1) ⁻¹ min ⁻¹]	2 ± 0.1	8 ± 0.9	0.3 ± 0.1	34 ± 3.1	9.9 ± 1.5	39 ± 10	11 ± 1.7

Das interessanteste der in Tabelle V-4 zusammengestellten Ergebnisse stellt die beobachtete Inversion der Enantioselektivität dar. Das entstandene Styroloxid wies je nach eingesetzter CYP102A1-Variante einen Enantiomerenüberschuss zwischen 58% ee (*S*) und 92% ee (*R*) auf. Entscheidend für die Enantioselektivität von

CYP102A1 in der Reaktion mit Styrol ist unter anderem die Aminosäure an Position 87.

R-Styroloxid wurde durch die CYP102A1-Variante F87G mit einem Enantiomerenüberschuss von 92 % produziert. Gleichzeitig wies diese Variante die höchste NADPH-Oxidationsrate unter den untersuchten Varianten auf. Allerdings war das Kopplungsverhältnis von NADPH-Oxidation zur Produktbildung mit 31 % geringer als bei der Variante A74G/F87V/L188Q (39%). Diese Variante besaß auf Grund des höheren Kopplungsverhältnisses die höchste Epoxidierungsrate unter den getesteten Varianten, allerdings wird dies durch den Nachteil geringerer Enantioselektivität erkauft. Das Reaktionsprodukt besitzt einen Enantiomerenüberschuss von vergleichsweise niedrigen 65 % des *R*-Enantiomers.

V.3.3.3.2 Epoxidierung von Styrol im Flüssig-Flüssig-Zweiphasensystem

Um das Konzept der CYP102A1-katalysierten Reaktionen im Zweiphasensystem auf einen weiteren Reaktionstyp auszudehnen, wurde die Epoxidierung von Styrol untersucht (Abbildung V-31). Eingesetzt wurde die zu einem Überschuss an *R*-Styroloxid führende Variante CYP102A1 F87G. Die für die Reaktionen mit Cyclohexan und Oktan eingesetzten Stabilisatoren BSA und Katalase wurden auch für die Epoxidierung von Styrol verwendet.

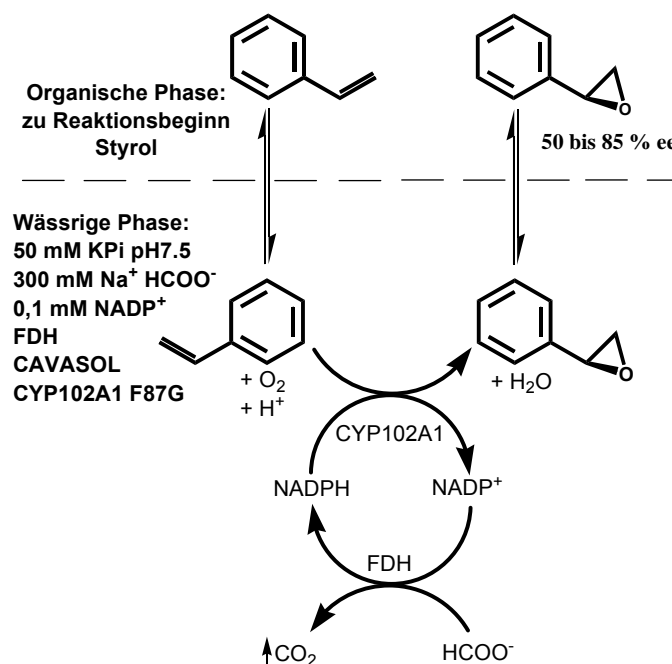


Abbildung V-31: Für die Epoxidierung von Styrol benutztes Reaktionssystem

Auch für Styrol liegt die Wasserlöslichkeit sehr niedrig. Deshalb wurde auch für die Epoxidierung von Styrol versucht, durch die bereits für die Cyclohexanhydroxylierung untersuchten Löslichkeit vermittelnden Zusätze erhöhte Produktbildung zu erreichen. Abgesehen von einem Zusatz von 20 mM des statistisch methylierten Cyclodextrins CAVASOL W7M Pharma, der zu einer Erhöhung der Produktkonzentration um 40 % führte, konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Um zu klären, welche Konzentration an statistisch methyliertem Cyclodextrin zu den besten Ergebnissen führt, wurde dessen Konzentration bei ansonsten identischen Bedingungen zwischen 0 und 100 mM variiert. Die durch Messung der Produktkonzentration ermittelte Gesamtzahl an Katalysezyklen für CYP102A1 in Abhängigkeit von der Konzentration an statistisch methyliertem Cyclodextrin ist in Abbildung V-32 dargestellt.

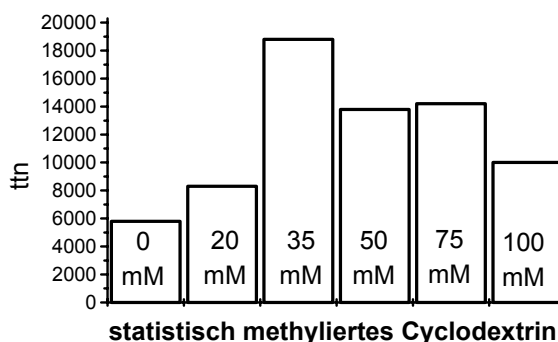


Abbildung V-32: Innerhalb von 48 Stunden erzielte Zahl an katalytischen Zyklen (ttn) bei Zugabe verschiedener Mengen an statistisch methyliertem β -Cyclodextrin CAVASOL W7M Pharma. Abgesehen von der Cyclodextrinkonzentration enthielten alle sechs Ansätze in 10 ml Gesamtvolumen 5 ml wässriges Biokatalysatorsystem ($2.4 \mu\text{M}$ CYP102A1 F87G, 3 U ml^{-1} FDH, 10 mg ml^{-1} BSA, 600 U ml^{-1} Katalase, 0.1 mM NADP^+ , 50 mM Kpi , pH 7.5) und 5 ml Styrol. Die Reaktionsansätze wurden nach 48 h extrahiert und die Produktkonzentration sowie der Enantiomerenüberschuss gaschromatographisch bestimmt.

Die Verwendung von 35 mM Cyclodextrin stellte sich als optimal heraus. Unter diesen Bedingungen konnte eine Gesamtzahl an katalytischen Zyklen für CYP102A1 von über 18000 erreicht werden.

Allerdings lag nach 48 h Reaktionszeit in der Styrolphase nur ca. 50 % des *R*-Enantiomers vor. Dies galt für alle untersuchten Reaktionsansätze, war also nicht mit dem Einsatz des methylierten β -Cyclodextrins in Zusammenhang zu bringen. Im Gegensatz dazu war im vorangegangenen Vergleich der Enantioselektivität

verschiedener CYP102A1-Varianten nach ca. 15 Minuten Reaktion 92 % ee gemessen worden. Eine Diskussion der hierfür möglicherweise verantwortlichen Faktoren findet sich im direkt anschließenden Unterkapitel.

V.3.3.3.3 Epoxidierung von Styrol im 2 l-Maßstab

Nachdem die Epoxidierung von Styrol im kleinen Maßstab in Produktkonzentrationen von bis zu 50 mM in der Styrolphase resultierte, wurde versucht, die Reaktion vergrößerten Maßstab durchzuführen, um ausreichende Produktmengen für dessen präparative Aufreinigung zu erhalten.

Diese Reaktion wurde im 2 l Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 600 ml durch Hochdruckhomogenisation aufgeschlossenes Zelllysate einer Fermentation von DH5 α pCYTEXBM-3F87G (8.2 μ M CYP102A1 F87G, gesamt 4.9 μ mol), 250 mM Na-Formiat pH 7.5, 0.10 mM NADP⁺, 0.2 mg ml⁻¹ Katalase, 35 mM Cavasol W7M Pharma (statistisch methyliertes β -Cyclodextrin, Wacker) in 50 mM KPi pH 7.5, 500 U FDH und 150 ml Styrol zusammengegeben. Nach 22 h Reaktionszeit wurden nochmals 250 U FDH und 200 ml 2.5 M Na-Formiat pH 7.5 zugegeben, da die Aktivität der FDH bereits auf unter 20 % der Ausgangsaktivität gefallen war.

Das zweiphasige Gemisch wurde in einem 4 l Reaktor mit Strömungsbrechern und auf 0°C gekühltem Rückflusskühler bei 105 U/min gerührt, wobei eine Emulsion entstand, die sich innerhalb von 50 h Reaktionszeit von rotbraun nach weiß verfärbte.

Zur Verfolgung des Reaktionsfortschritts wurde einerseits der pH-Wert kontinuierlich gemessen und durch Titration mit 0.1 N HCl bei pH 7.5 konstant gehalten, andererseits wurden Proben genommen, um die Produktkonzentration zu bestimmen. Proben wurden zur Phasentrennung zentrifugiert und die organische Phase nach Trocknen über Na₂SO₄ gaschromatographisch auf einer permethylierten β -Cyclodextrinsäule (Hydrodex PM) analysiert.

Durch Messung von Standards bekannter *R*-Styroloxidkonzentration wurde der folgende Verlauf von Enantiomerenüberschuss und Produktkonzentration in der Styrol-Phase erhalten (Abbildung V-33):

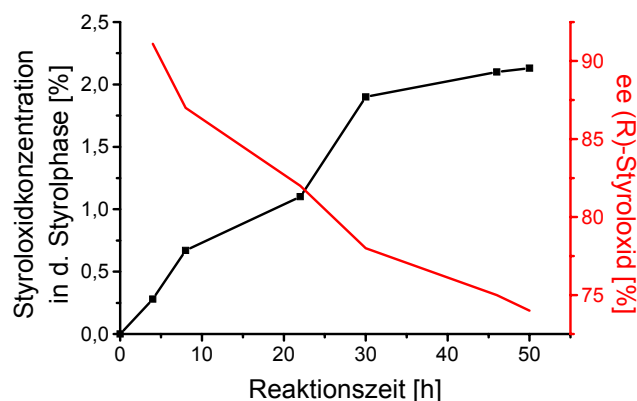


Abbildung V-33: Verlauf von Styroxidkonzentration und Enantiomerenüberschuss in der Styrolphase während der 50-stündigen Reaktion

Der in Abbildung V-33 dargestellte Verlauf des Enantiomerenüberschusses, während der Reaktion durch Probennahme aus der organischen Phase bestimmt, zeigt an, dass die Enantioselektivität entgegen der Erwartungen während der Reaktion zurückgeht. Hierfür lassen sich verschiedene Erklärungen vorschlagen: Entweder CYP102A1 selbst wird durch Styroxid alkyliert und dadurch in seiner Enantioselektivität beeinflusst, oder *R*-Styroxid reagiert bevorzugt mit Bestandteilen der Reaktionsmischung, wodurch der Anteil des *R*-Produkts sinkt. Eine alternative Erklärung wäre die bevorzugte Komplexbildung von *R*-Styroxid durch statistisch methyliertes β -Cyclodextrin.

Nach 50 h wurde die Reaktion, da praktisch kein Anstieg des pH-Werts mehr gemessen wurde, abgebrochen.

Nach Zugabe von 30 g Silicagel zur Adsorption und Fällung von DNA und Proteinen wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. 54 ml organische Phase (75.2 % ee *R*-Styroxid) konnten abgetrennt werden. Die milchige wässrige Phase (2.4 l) wurde mit 1.5 l MTBE extrahiert. Nach der Phasentrennung (über Nacht) konnten 1.8 l wässrige Phase abgetrennt werden. Die restlichen 2.1 l gelartige (auf Grund hohen Wasser- und Proteingehalts) Mischphase wurden mit 50 g NaCl und 100 g NaSO₄ versetzt und erneut zentrifugiert. Es wurden 1.5 l organische Phase erhalten. Nach erneutem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das MTBE am Rotationsverdampfer abgezogen. Zurück blieben 23 ml höhersiedender Rückstand. Dieser Rückstand enthielt laut GC 8.3 % Styroxid (87.2 % ee).

Dieser Rückstand wurde mit dem zu Beginn der Aufarbeitung abgetrennten Rest der Styrolphase vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet, mit 20 ml Hexadecan versetzt und über eine 20 cm-Vigreuxkolonne mit Kolonnenkopf im Vakuum destilliert:

Es konnten 4.4 g Styroloxid mit einer Reinheit von $> 90\%$ und einem Enantiomerenüberschuss von $> 80\%$ isoliert werden. Daraus ergeben sich die folgenden Kennzahlen für den Prozess:

Isolierte Ausbeute (reines Styroloxid): 3.96 g \approx 33 mmol

Eingesetzte Stoffmenge CYP102A1: 4.92 μmol

Wechselzahl für CYP102A1 F87G: ttn = 6700

Wechselzahl für den Kofaktor NADPH: 165

Raum-Zeit-Ausbeute: 38 mg $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$

Die Wechselzahl und damit die Ausbeute blieb um das ca. 6-fache unter den in kleinen Ansätzen (10 bis 20 ml im magnetisch gerührten Kolben) gaschromatographisch ermittelten Werten. Dies ist einerseits damit zu erklären, dass maximal die Hälfte des entstandenen Styroloxids isoliert werden konnte, da das Reaktionsgemisch einerseits nur sehr schwer zu extrahieren war und andererseits bei einer Destillation bereits durch das Volumen der verwendeten Apparatur immer Verlust auftritt. Dies kann aber nicht der alleinige Grund für die schlechtere Ausbeute sein: Beim Vergrößern des Ansatzes scheint es zu Problemen gekommen zu sein. Dies könnte unter anderem an folgenden Parametern liegen: Geometrie und Drehzahl des Rührers, Unterschiede in der Belüftung oder an einer Produkthemmung. In den kleinen Ansätzen wurden Volumenverhältnisse von wässrigem Katalysatorsystem zu Styrol von 1:1 bzw. 2:1 benutzt, während im 2 l Reaktor – um die einzusetzende Menge des Gefahrstoffs Styrol zu minimieren - ein Verhältnis von 13.3 : 1 gewählt wurde. Damit steigt die Styroloxidkonzentration schneller auf Werte, die möglicherweise Proteine alkylieren und inaktivieren oder zur Produkthemmung führen.

V.3.3.4 Umsetzung von Myristinsäure im Zweiphasensystem

Fettsäuren stellen die natürlichen Substrate von CYP102A1 dar. Gegen Myristinsäure zeigt die auch für die Hydroxylierung von Oktan benutzte Variante CYP102A1 A74G/F87V/L188Q sehr hohe Aktivität von 1500 min^{-1} . Hauptprodukte sind 9-, 10-, 11-, 12- und 13-Hydroxymyristinsäure. Als Nebenprodukte wurden auch an den Positionen 7- und 8- hydroxylierte Myristinsäurederivate detektiert (wie in Abbildung V-34).

Die präparative Hydroxylierung wurde zunächst mit fester Myristinsäure als zweiter Phase untersucht. Dabei konnten aber nur Spuren der Hydroxyderivate detektiert werden. Deshalb wurde versucht, die Reaktion analog zu den oben beschriebenen Reaktionen mit Cyclohexan, Oktan und Styrol in einem Zweiphasensystem zweier nicht mischbarer flüssiger Phasen durchzuführen. Hierzu wird ein organisches Lösungsmittel, in dem Myristinsäure in hoher Konzentration löslich ist, benötigt. Gleichzeitig darf dieses Lösungsmittel kein Substrat von CYP102A1 A74G/F87V/L188Q sein und sollte möglichst ungiftig und enzymverträglich sein. Das *n*-Alkan Dodecan erfüllt alle diese Voraussetzungen.

Die Hydroxylierung von Myristinsäure wurde im 8 ml-Maßstab mit 4 ml wässrigem Biokatalysatorsystem (5 nmol CYP102A1 A74G/F87V/L188Q) und 4 ml 100 mM Myristinsäure (91 mg) in Dodecan durchgeführt. Nach 48 h wurde angesäuert und mit Diethylether extrahiert. GC/MS-Analyse des Extrakts ergab, dass die eingesetzte Myristinsäure zu 55 % umgesetzt wurde. Beim Abdestillieren des Diethylethers fiel ein weißer Feststoff aus der nunmehr hauptsächlich aus Dodecan bestehenden organischen Phase aus. Durch GC/MS-Analyse beider Fraktionen konnte erkannt werden, dass in der Dodecanphase hauptsächlich Myristinsäure gelöst blieb, während der ausgefallene Feststoff zu über 90 % aus Oxidationsprodukten bestand. Im Gegensatz zu der im folgenden Unterkapitel für die Hydroxylierung von Myristinsäure in homogener wässriger Lösung gefundenen Produktverteilung, wurden im Zweiphasensystem neben der in Positionen 8 bis 13 hydroxylierten Myristinsäure auch Dihydroxymyristinsäure und Ketone gebildet. Damit wurde ein Gemisch von mindestens 25 Produkten mit Masse der Myristinsäure + 16 bzw. + 32 erhalten.

Die Zykluszahl für CYP102A1 in dieser Reaktion betrug 44000. Dies spricht dafür, dass die erreichte Zykluszahl mit der Umsatzrate von CYP102A1 für das jeweilige Substrat zusammenhängt: Die Aktivität gegen Fettsäuren ist hoch, es wird eine hohe Zykluszahl erreicht.

3.8 Umsetzung von Myristinsäure in wässriger Lösung unter Verwendung von CAVASOL W7M Pharma zur Löslichkeitsvermittlung

Das statistisch methylierte β -Cyclodextrin CAVASOL W7M Pharma (Wacker) in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt kann Fettsäuren wie Dodecansäure in einem wässrigen Reaktionssystem bei einer Konzentration von mindestens 10 g l⁻¹ in Lösung bringen.^[150]

Dieser Ansatz wurde genutzt, um die durch 15 μ mol CYP102A1 A74G/F87V/L188Q katalysierte Hydroxylierung von 1 mmol (228 mg) Myristinsäure in 23 ml wässriger Lösung durchzuführen. Im Unterschied zu den Reaktionen im Zweiphasensystem wurde auf den Zusatz von BSA verzichtet. GC/MS-Messungen während der Reaktion zeigten, dass diese nach ca. 30 Stunden zum Erliegen kam. Im Unterschied zur Hydroxylierung von Myristinsäure im Zweiphasensystem wurden im einphasigen System nur die an den Positionen 7 bis 13 hydroxylierten Monohydroxyprodukte detektiert (Abbildung V-34). Der Umsatz zu den Produkten betrug am Reaktionsende 76 %. Daraus ergibt sich für die Hydroxylierung von Myristinsäure unter Löslichkeitsvermittlung durch CAVASOL W7M Pharma eine Gesamtzahl von 50600 Reaktionszyklen pro Molekül CYP102A1.

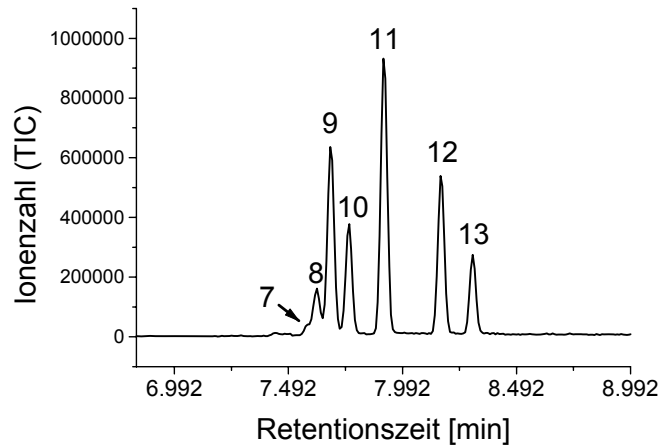


Abbildung V-34: GC/MS-Analyse des aufgereinigten (96 % Hydroxymyristinsäure) und trimethylsilylierten Produktgemischs aus der Hydroxylierung von Myristinsäure in homogener Phase. Die Zahlen über den Signalen geben die Position der Hydroxygruppe im jeweiligen Regioisomeren an. Die Zuordnung der Regioisomere erfolgte anhand charakteristischer Massenfragmente (Abbildung V-35).

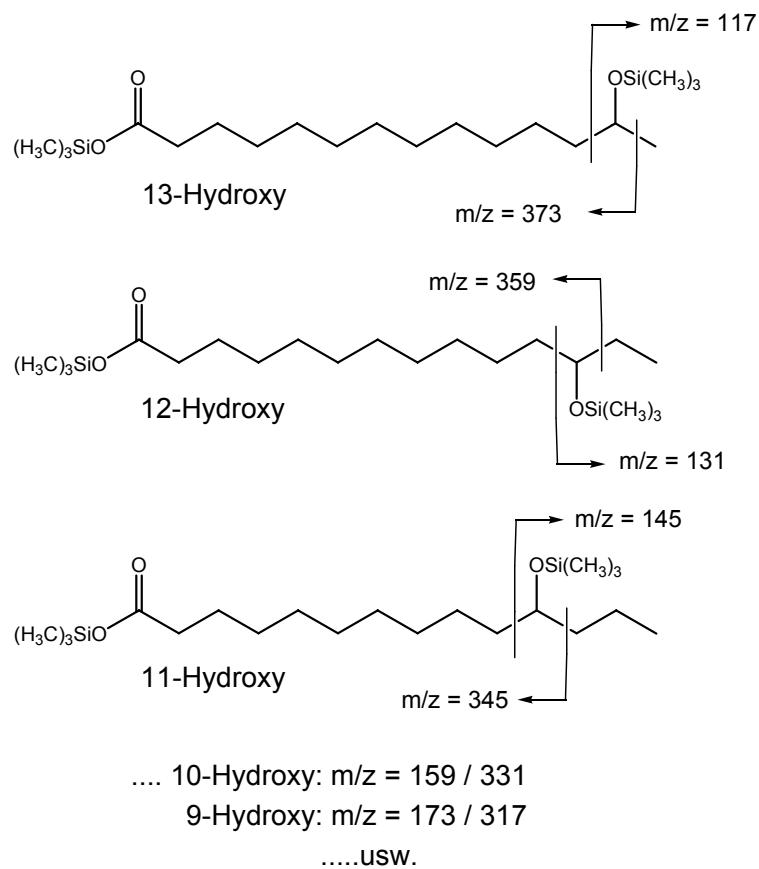


Abbildung V-35: Fragmente, die bei Elektronenstoßionisation von trimethylsilylierten Hydroxymyristinsäurederivaten entstehen und zur Identifizierung der Regioisomeren benutzt wurden.

VI Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Konzepte auszuarbeiten, die die Verwendung der P450-Monooxygenase CYP102A1 in der zellfreien Biokatalyse ermöglichen. Dazu wurden Untersuchungen auf den Gebieten, die über die Anwendbarkeit eines Biokatalysators entscheiden, durchgeführt. Hierzu zählt die effektive Produktion des Katalysators, die Anpassung seiner Substratspezifität an das untersuchte Problem, die Suche nach einer kostengünstigen Alternative zum natürlichen Kofaktor sowie die Verbesserung der Prozessführung mit dem Ziel der Erhöhung der Produktausbeute.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert, bewertet und wo möglich mit dem Stand der Forschung auf dem Gebiet der präparativen Biooxidation organischer Verbindungen in Zusammenhang gebracht.

VI.1 Expression von CYP102A1

Durch Verbesserung des Fermentationsverfahrens zur Herstellung von CYP102A1 in *E. coli* DH5 α konnte eine dreifache Erhöhung der Expressionsausbeute an CYP102A1 im Vergleich zu den bisher erzielten Werten^[147] erreicht werden. Damit können aus einem Ansatz im 30 l-Maßstab bis zu 3 g reines CYP102A1 erhalten werden.

Alternativ dazu wurde der Vektor pET28a+CYP102A1 konstruiert, der die Expression von CYP102A1 in *E. coli* BL21 (DE3) ermöglicht. CYP102A1 steht in diesem Konstrukt unter der Kontrolle des starken T7-Promotors. Dies führte auf Grund zu starker Überexpression zunächst zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate. Durch Verringern der Konzentration des Induktors IPTG und Herabsetzen der Temperatur während der Proteinexpression konnte dieses Problem behoben werden. So konnten bei der Expression in Erlenmeyerkolben 144 mg aktives CYP102A1 pro Liter Kulturmedium erhalten werden. Damit liefert die Expression von CYP102A1 im System pET28a+CYP102A1 / *E. coli* BL21 (DE3) schon im Schüttelkolben um 40 % höhere volumetrische Ausbeuten als das System pCYTEXP1 / *E. coli* DH5 α im Fermenter.

Dass das System pET28a+ / *E. coli* BL21 (DE3) zur effizienten Überexpression von CYP102A1 weitaus besser geeignet ist als pCYTEXP1 / *E. coli* DH5 α konnte in der Diplomarbeit von Pflug eindrucksvoll gezeigt werden: Nach Optimierung eines Fed-Batch-Prozesses im 5 l-Maßstab konnten in BL21 (DE3) CYP102A1-Ausbeuten von 1.5 g l⁻¹ erreicht werden.^[103] Bei derart effizienter Überexpression fallen die Kosten für den chemischen Induktor IPTG von ca. 5 € pro Liter Fermentervolumen nicht mehr ins Gewicht.

Das Ziel, CYP102A1 in für die Entwicklung eines Bioreaktors ausreichenden Mengen zu produzieren, wurde erreicht. Als Resultat der vorliegenden Arbeit stehen sowohl ein hocheffizientes System zur Überexpression von CYP102A1 im kleinen Maßstab (400 ml) als auch ein effizientes System zur Überexpression im 30 l-Maßstab zur Verfügung.

VI.2 Ersatz / Regenerierung von NADPH

Es wurden drei Methoden zum Ersatz bzw. zur Regenerierung von NADPH in durch CYP102A1 katalysierten Reaktionen untersucht:

Neben der Verwendung von Wasserstoffperoxid zur Erzeugung des katalytisch aktiven Oxoeisenkomplexes wurden verschiedene Ansätze zur Verwendung von Riboflavin als Elektronenmediator und die Verwendung der genetisch veränderten NADP⁺-abhängigen FDH aus *Pseudomonas* sp. 101 zur Regenerierung von NADPH untersucht.

Die Versuche unter Verwendung von Wasserstoffperoxid und Riboflavin brachten keine für synthetische Anwendungen nutzbaren Ergebnisse. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid wurden nur geringe Umsatzraten für CYP102A1 von maximal 8 min⁻¹ in der Dealkylierung des Modellsubstrats 10-pNCA gemessen. Im Vergleich dazu wird diese Reaktion von CYP102A1 bei Verwendung des natürlichen Kofaktors NADPH mit einer Umsatzrate von 260 min⁻¹ katalysiert. Überdies führt Wasserstoffperoxid zur Inaktivierung von CYP102A1.

Diese Probleme wurden von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls erkannt: Im Jahre 2002 erschien eine Arbeit, die ebenfalls F87A als aktivste Variante von CYP102A1 in der durch H₂O₂ getriebenen Reaktion beschreibt.^[151] Aus derselben Arbeitsgruppe stammen zwei weitere Veröffentlichungen in denen mittels gerichteter Evolution die

Peroxygenaseaktivität von CYP102A1 gegen das Pseudosubstrat 12-*p*NCA auf bis zu 460 min^{-1} erhöht wurde.^[89, 151] Weitere Verbesserungen der Stabilität von CYP102A1 in Gegenwart von Wasserstoffperoxid sind aber unerlässlich, um die Verwendung der H_2O_2 -getriebenen Reaktion in der Biokatalyse zuzulassen.

Riboflavin besitzt als Elektronenüberträger großes Anwendungspotential, da diese Verbindung sowohl elektrochemisch als auch chemisch oder durch sichtbares Licht reduziert werden kann.^[107, 116] Die literaturbekannte Elektronenübertragung durch kovalente Modifikation von P450-Monooxygenasen mit Riboflavin konnte für CYP102A1 nicht erreicht werden. Stattdessen konnte Elektronenübertragung von frei in Lösung befindlichem Riboflavin auf die isolierte CYP102A1-Hämdomäne nachgewiesen werden. Dies stellt eine neue, in der Literatur noch nicht beschriebene Möglichkeit zur Reduktion des aktiven Zentrums von P450-Monooxygenasen dar. Allerdings waren die erzielten Umsatzraten von maximal 2 min^{-1} (verglichen mit 260 min^{-1} für die NADPH-getriebene Reaktion) zu gering für den geplanten Einsatz in der präparativen Synthese, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Sehr erfolgreich war dagegen der Einsatz der genetisch veränderten FDH aus *Pseudomonas* sp. 101. Bei Einsatz eines Überschusses von FDH-Aktivität im Vergleich zur NADPH-oxidierenden CYP102A1-Aktivität wurden annähernd dieselben Umsatzraten wie bei direktem Einsatz des Kofaktors NADPH gemessen. Des Weiteren toleriert dieses Enzym hohe Konzentrationen organischer Lösungsmittel ohne Aktivitätsverlust.^[141] Dies gilt, wie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde, auch für den Einsatz in zweiphasigen Gemischen aus wässriger Phase und organischen Phasen wie Cyclohexan, Styrol, Oktan oder Dodekan. Ein weiterer Vorteil von FDHs liegt in der günstigen Gleichgewichtslage: Die Reaktion ist – im Gegensatz zu den durch Alkoholdehydrogenasen katalysierten Reaktionen – praktisch irreversibel, da als Produkt thermodynamisch extrem stabiles und überdies aus dem Reaktionsgefäß entweichendes Kohlendioxid entsteht. Aus diesen Gründen ist der Einsatz von FDH in reduktiven enzymatischen Prozessen, hauptsächlich bei der Synthese chiraler Alkohole und einiger Aminosäuren bereits etabliert. Die Kopplung mit P450-Monooxygenasen war bisher nicht bekannt.

Mit dem Einsatz von FDH wurde eine geeignete Methode zur Vermeidung des stöchiometrischen Einsatzes von NADPH gefunden.

Alternativ könnten zur Regenerierung von NADPH Glucosedehydrogenase und Glucose-6-phosphatdehydrogenase eingesetzt werden. Die von diesen Enzymen

katalysierte Reaktion ist im Gegensatz zur durch FDH katalysierten Reaktion reversibel, mit Annäherung an das thermodynamische Gleichgewicht sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit. Überdies verbietet sich der Einsatz des teuren Glucose-6-phosphat aus ökonomischen Gründen. Daher eignen sich diese Dehydrogenasen eher zur Kofaktorregenerierung in ganzen Zellen. In der lebenden Zelle werden die Reaktionsprodukte durch den Stoffwechsel abgebaut, Glucose-6-phosphat wird durch den Zellmetabolismus geliefert.

VI.3 Aktivität von CYP102A1-Varianten gegen Cyclohexan und Styrol

Bei der Untersuchung von Varianten von CYP102A1 auf Hydroxylierungsaktivität gegen Cyclohexan zeigte sich, dass die Variante R47L/Y51F Cyclohexan mit einer Umsatzrate von 14 min^{-1} hydroxyliert. Dies stellt gegenüber dem Wildtypenzym eine 20-fache Steigerung der Aktivität dar.

Die molekularen Ursachen für den Effekt dieser Mutation liegen auf der Hand: Die Aminosäuren Arginin 47 und Tyrosin 51 binden – wie aus der Kristallstruktur des Komplexes aus Palmitoleinsäure und CYP102A1 bekannt – die Carboxylatgruppe dieses Substrats.^[10] Gleichzeitig stellen diese Aminosäuren einen hydrophilen Bereich im ansonsten hydrophoben Substratzugangskanal dar. Werden diese beiden hydrophilen Aminosäuren gegen hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht, so steigt die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Cyclohexan.

Die Aktivität von CYP102A1 R47L/Y51F von 14 min^{-1} für die Hydroxylierung Cyclohexan ist gegenüber der Aktivität des Wildtyps gegen Fettsäuren ($>1000 \text{ min}^{-1}$) noch immer sehr gering. Allerdings stellt die gefundene Variante einen Ausgangspunkt für die weitere Erhöhung der Aktivität gegen Cyclohexan mittels gerichteter Evolution dar. Für *n*-Alkane wie *n*-Hexan konnte auf diese Weise eine Erhöhung der NADPH-Oxidationsrate auf bis zu 3800 min^{-1} erreicht werden. Gegenüber dem Wildtyp bedeutet dies eine 22-fache Aktivitätssteigerung. Leider liegen für die in diesen Arbeiten beschriebenen CYP102A1-Varianten weder Daten zum Kopplungsverhältnis von NADPH-Oxidation zur Produktbildung noch zur Stabilität der Enzyme vor. Dies erschwert eine Abschätzung des Anwendungspotentials. Trotzdem wird die Möglichkeit zur weiteren Erhöhung der

Aktivität der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Variante CYP102A1 R47L/Y51F gegen Cyclohexan durch gerichtete Evolution unterstrichen.

Da in der vorliegenden Arbeit nicht die Schaffung von Varianten mit erhöhter Aktivität, sondern deren Anwendung in der präparativen Biokatalyse im Vordergrund stand, wurde die identifizierte Variante CYP102A1 R47L/Y51F für die Hydroxylierung von Cyclohexan benutzt.

Für die bezüglich der Epoxidierung der Vinylgruppe prochirale Verbindung Styrol wurde zusätzlich zur Bestimmung der Epoxidierungsrate verschiedener CYP102A1-Varianten auch der Enantiomerenüberschuss des Reaktionsprodukts gemessen. Als herausragendste Variante wurde CYP102A1 F87G mit einer Epoxidierungsrate von 34 min^{-1} und einem Enantiomerenüberschuss von 92 % ee *R*-Styroloxid identifiziert. Während *S*-Styroloxid in enantiomerenreiner Form biokatalytisch zugänglich ist,^[152-154] ist die biokatalytische Darstellung von *R*-Styroloxid bisher nur durch Racematspaltung mittels Epoxidhydrolasen^[155] möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei Varianten von CYP102A1 identifiziert werden konnten, die je eine großtechnisch relevante Hydroxylierungs- bzw. Epoxidierungsreaktion katalysieren.

VI.4 Reaktionssysteme für CYP102A1

In der Literatur sind bisher nur zwei Beispiele einer *in vitro* Biotransformation im präparativen Maßstab unter Nutzung von P450-Monooxygenasen bekannt: Die CYP102A1F87V-katalysierte Synthese von 14,15-Epoxyarachidonsäure.^[146] und die Synthese von 15,16-Epoxyoctadeca-9,12-diensäure^[156]. Der Ansatz dabei war in beiden Fällen, das Substrat ohne Benutzung von Löslichkeitsvermittlern in einem großen Volumen des wässrigen Puffersystems zu lösen. NADPH wurde durch Glucose-6-phosphatdehydrogenase regeneriert. Die maximale Zykluszahl für CYP102A1 in diesen Reaktionen beträgt 1500 ^[146] beziehungsweise 6300 ^[156] (Tabelle VI-2).

Um ein verbessertes, auch für den industriellen Einsatz weiterentwickelbares Reaktionssystem für CYP102A1 zu konstruieren, müssen im Optimalfall folgenden Anforderungen erfüllt sein:

- Ersatz / Regenerierung des Kofaktors NADPH

- möglichst hohe Konzentration des hydrophoben Substrats in der wässrigen Phase
- ausreichender Sauerstoffeintrag
- hohe Stabilität des Enzyms unter den Reaktionsbedingungen
- einfache Handhabbarkeit
- kontinuierliche Produktabtrennung bei gleichzeitiger Retention von Kofaktor und Biokatalysatoren theoretisch möglich

Es wurden verschiedene Reaktionssysteme, sowohl in heterogener als auch in homogener Phase, verglichen. Allen diesen Reaktionssystemen ist gemeinsam, dass NADPH-abhängige CYP102A1-Varianten mit NADP⁺-abhängiger FDH zur Kofaktorregenerierung gekoppelt wurde. Untersucht wurden neben dem in einer Sol-Gel-Matrix immobilisierten Biokatalysatorsystem auch Reaktionen in homogener wässriger Lösung, die teilweise unter Verwendung eines Enzym-Membran-Reaktors durchgeführt wurden, sowie Reaktionen in flüssigen Zweiphasensystemen.

Diese Reaktionssysteme besitzen unter dem Gesichtspunkt einer potentiellen industriellen Anwendung die in Tabelle VI-1 aufgeführten Vor- und Nachteile.

Tabelle VI-1: Vor- und Nachteile der untersuchten Reaktionssysteme in Beziehung auf ihre technische Anwendung

Anforderung Reaktionssystem	Wiederverwendbarkeit / Retention der Enzyme	Wiederverwendbarkeit / Retention des Kofaktors	Kontinuierliche Produktabtrennung	Geringe Kosten	Hohe volumetrische Produktivität	Einfache Handhabung
Sol-Gel-immobilisierte Enzyme	ja	nein ^{a)}	kaum, da Kofaktor löslich	nein ^{c)}	kaum ^{d)}	nein
Flüssigflüssig Zweiphasensystem	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Enzym-Membran-Reaktor	ja	ja ^{b)}	ja	nein	ja	nein
Homogenes wässriges Gemisch	nein	nein	nein	ja	ja	ja

a) nur bei zusätzlicher Verwendung einer Membran zur Retention des Kofaktors

- b) bei Verwendung negativ geladener Membranen oder molekulargewichtsvergrößertem Kofaktor (z. B. gekoppelt an PEG)
- c) Enzyme müssen vor Immobilisierung aufgereinigt werden, Immobilisierung ist aufwändig und resultiert in Verlust von 75 % der enzymatischen Aktivität
- d) limitiert durch den Stofftransfer in der porösen Matrix

Mittels in der Sol-Gel-Matrix immobilisierter P450-Monooxygenase und FDH konnten die Substrate Naphthalin, β -Jonon und Oktan im analytischen Maßstab umgesetzt werden. Zwar konnte das Immobilisat für weitere Reaktionen wiederverwendet werden, allerdings unter deutlichem Aktivitätsverlust. Die Nachteile bei der Herstellung des immobilisierten Enzymsystems (Aufreinigung nötig, Verlust an Aktivität durch die Immobilisierung) überwiegen dessen Vorteile (erhöhte Lagerstabilität, einfache Abtrennung der Biokatalysatoren). Überdies besitzt die Verwendung immobilisierter P450-Monooxygenasen nur dann eindeutige Vorteile gegenüber anderen Reaktionssystemen, wenn kein löslicher Kofaktor benötigt wird. Dies wäre beispielsweise dann der Fall, wenn eine elektrisch leitende Immobilisierungsmatrix direkt Elektronen auf das Hämeisen übertragen könnte.

Enzym-Membran-Reaktoren besitzen den Vorteil, dass das gesamte Biokatalysatorsystem (Enzyme und Kofaktor) zurückgehalten werden kann. Experimente ergaben, dass die Prozessstabilität von CYP102A1 in Form von *E. coli*-Zelllysaten im Vergleich zum aufgereinigten Enzym deutlich höher ist. Bestandteile des Zelllysats scheinen CYP102A1 zu stabilisieren. Zelllysate neigen allerdings zur Aggregation und verstopfen die verwendeten Membranen. Des Weiteren hat die Verwendung von Enzym-Membran-Reaktoren trotz deren Attraktivität nie Eingang in die industrielle Praxis gefunden. Als Grund dafür gilt der hohe Preis der benötigten Membranen, der durch die Ersparnis bei den Kofaktorkosten nicht ausgeglichen wird. Nicht zuletzt spricht ein praktisches Argument gegen die Verwendung von Enzym-Membran-Reaktoren: Die hier verwendeten Modellsubstrate Cyclohexan, Styrol und Oktan sind leicht flüchtig. Um in diesen Systemen – die natürlich auch den Zutritt von Luftsauerstoff zulassen müssen – eine konstante Substratkonzentration in der wässrigen Phase zu erhalten, sind Zweiphasensysteme weitaus besser geeignet. In einem solchen Reaktionssystem steht die organische Phase zu jedem Zeitpunkt mit der wässrigen Biokatalysatorphase im Gleichgewicht und geringe Substratverluste durch Verdunstung fallen nicht ins Gewicht. Die untersuchten Zweiphasensysteme bieten den zusätzlichen Vorteil, dass die Abtrennung der Reaktionsprodukte

kontinuierlich erfolgen kann, ohne dass es dabei zu Verlusten an Enzym oder Kofaktor kommt. Nicht zuletzt zeigen die durchgeführten Experimente, dass das bienzymatische Reaktionssystem CYP102A1 / FDH im Zweiphasensystem über 100 Stunden aktiv bleibt.

Nur für das nichtflüchtige Substrat Myristinsäure wurde der Ansatz einer Reaktion in homogener wässriger Phase weiterverfolgt. Mit dem statistisch methylierten β -Cyclodextrin CAVASOL W7M Pharma wurde eine Möglichkeit gefunden, das Substrat Myristinsäure in Konzentrationen bis 10 g l^{-1} in der wässrigen Biokatalysatorphase zu lösen. Deshalb wurden für dieses Substrat Reaktionen in homogenem und zweiphasigem Gemisch verglichen.

VI.5 Präparative Synthesen

Der Vergleich der Reaktionssysteme zeigte, dass für die präparative Hydroxylierung und Epoxidierung insbesondere leicht flüchtiger Substrate das flüssig-flüssig Zweiphasensystem am geeignetsten ist. Für die präparative Hydroxylierung von Fettsäuren wurde alternativ die Reaktion in homogener Lösung untersucht.

In Tabelle VI-2 werden einige der in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen mit anderen durch Monooxygenasen katalysierten *in vitro*-Prozessen verglichen. Als Kofaktorregenerierungssysteme kamen dabei ebenfalls Alkohol-, Formiat- oder Glucose-6-phosphatdehydrogenasen zum Einsatz.

Tabelle VI-2 : Durch Monooxygenasen katalysierte *in vitro*-Biotransformationen. Einträge 1 bis 6 stammen aus der vorliegenden Arbeit. Die folgenden 5 Einträge sind der Literatur entnommen. Alle Reaktionen liefen in mit den in dieser Arbeit verwendeten Systemen vergleichbaren zweiphasigen oder homogenen Gemischen unter enzymatischer

Substrat	Bio-katalysator	Reaktionsvolumen	ttn ^{a, b} für Bio-katalysator	ttn ^{a, b} für Kofaktor NAD(P) ⁺	Raum-Zeit-Ausbeuten (mg l ⁻¹ h ⁻¹) ^b
Cyclohexan	CYP102A1 R47L/Y51F	10 (zweiphasig)	9620	1270	63.5
Cyclohexan	CYP102A1 R47L/Y51F	1000 (zweiphasig, Fermenter)	12850	334	16.7
Myristinsäure	CYP102A1 A74G/F87V/ L188Q	8 (zweiphasig)	44000	300	153
Myristinsäure	CYP102A1 A74G/F87V/ L188Q	23 (homogene Lösung)	50800	330	269
Styrol	CYP102A1 F87G	10 (zweiphasig)	18800	451	113
Styrol	CYP102A1 F87G	2000 (zweiphasig, Reaktor)	6700 ^c	37	44
Styrol ^[157]	Styrolmono-oxygenase (Sty A/B)	200 (zweiphasig)	2867	87	~ 1000
Arachidonsäure ^[146]	CYP102A1 F87V	4000 (homogene Lösung)	1500	46	31
Linolensäure ^[156]	CYP102A1	400 (homogene Lösung)	6300	6.5	145
2-Hydroxybiphenyl ^[158]	2-Hydroxybiphenyl Mono-oxygenase	25 (zweiphasig)	Keine Angabe	503	430
Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-on ^[159]	Immobilisierte Cyclohexanolmono-oxygenase	2 (zweiphasig)	Keine Angabe	>240	92

Kofaktorregenerierung ab.

^a maximale Zykluszahl der jeweiligen Oxygenase (mol(Produkt) mol(Biokatalysator bzw. NAD(P)⁺)

^b Raum-Zeit-Ausbeuten für in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reaktionen sind berechnet für die gesamte Reaktionszeit. Raum-Zeit-Ausbeuten für die aus der Literatur entnommenen Reaktionen sind häufig für kürzere Reaktionszeiten berechnet. Andererseits

sinken bei früherem Abbruch der Reaktion die max. Zykluszahlen für Oxygenase, Kofaktorregenerierungssystem und Kofaktor.

^c berechnet basierend auf der isolierten Ausbeute

Bei dem Vergleich in Tabelle VI-2 fällt zunächst auf, dass die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, was die erreichten Zykluszahlen für Monooxygenase und Kofaktor angeht, die bisher für andere Monooxygenasen publizierten Werte teilweise deutlich übertreffen. Dies zeigt, dass die P450-Monooxygenase CYP102A1 für den *in vitro* Einsatz durchaus geeignet ist. Beim direkten Vergleich mit den von Falck^[146] ebenfalls für CYP102A1 publizierten Werten zeigt sich, welches Potenzial in der Verbesserung der Reaktionsbedingungen liegt: Die maximalen Zykluszahlen konnten auf den über 25-fachen Wert gesteigert werden.

Von Celik et al.^[156] wurden zwar höhere Zykluszahlen für CYP102A1 von bis zu 6300 als von Falck et al. erreicht. Erkauft wurde dies aber durch einen extrem hohen Kofaktoreinsatz.

Die anderen zum Vergleich angeführten Arbeiten beschreiben ebenfalls optimierte Systeme. Das Styrolmonooxygenasesystem von Hofstetter et al.^[157] erreichte besonders hohe Raum-Zeit-Ausbeuten. Dabei kamen zwei Komponenten der Styrolmonooxygenase aus *Pseudomonas* sp. VLB120 (Flavin enthaltende Monooxygenase und zugehörige Reduktase) und NAD⁺-abhängige FDH in einem Zweiphasensystem zum Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit wurden für verschiedene Substrate sehr unterschiedliche Zykluszahlen und Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt. Sowohl im Zweiphasensystem als auch in wässriger Phase wurde die höchste Zahl an Katalysezyklen für die Hydroxylierung von Myristinsäure erhalten. Für diese Reaktion ist das homogene wässrige Reaktionssystem unter Löslichkeitsvermittlung durch statistisch methyliertes β -Cyclodextrin dem Zweiphasensystem vorzuziehen. Dies gilt sowohl in Bezug auf die Qualität des Produkts (in homogener Phase nur monohydroxyliert, im Zweiphasensystem ein Gemisch aus mono- und dihydroxylierten sowie Ketoprodukten) als auch in Bezug auf die erreichbare Zykluszahl. Myristinsäure wird unter den untersuchten Substraten von CYP102A1 mit der höchsten Umsatzrate ($>1000 \text{ min}^{-1}$) oxidiert.

Die Substrate Cyclohexan, Styrol und Oktan werden von CYP102A1 mit mindestens einer Größenordnung geringerer Aktivität umgesetzt. Derselbe Trend zeigt sich in den erreichten Zykluszahlen: Für Substrate, die nur mit geringer Umsatzrate oxidiert

werden, bleiben auch die maximalen Zykluszahlen relativ gering. Das zweiphasige Reaktionssystem kann kaum für die geringeren maximalen Zykluszahlen verantwortlich sein, da für das Substrat Myristinsäure auch bei Reaktion im Zweiphasensystem sehr hohe Werte für die maximale Zykluszahl von CYP102A1 von bis zu 44000 gemessen wurden.

Dies spricht dafür, dass die Entwicklung neuer aktiverer Varianten von CYP102A1 die Produktivität CYP102A1-katalysierter Reaktionen auch mit nicht-natürlichen Substraten wie Styrol oder Cyclohexan nochmals steigern könnte.

An den Reaktionen mit Styrol lässt sich deutlich erkennen, wie groß der Einfluss des Reaktionssystems ist: Schon die Maßstabsvergrößerung führt in Kombination mit dem Wechsel auf einen anderen Reaktortyp einer deutlichen Verschlechterung der Prozesskennzahlen. Es bleibt in dieser Hinsicht noch viel Raum für Verbesserungen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass P450-Monooxygenasen hinsichtlich ihres zellfreien Einsatzes durchaus mit anderen Monooxygenasesystemen konkurrieren können.

VI.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Varianten von CYP102A1 katalysierte zellfreie Reaktionen zur Synthese von hydroxylierten oder epoxidierten Verbindungen im Grammmaßstab genutzt werden können. Für die hier untersuchten Modellreaktionen ist eine solche Synthese unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten bestimmt nicht attraktiv. Anders ist die Lage bei Feinchemikalien. Ist die Wertschöpfung einer Reaktion sehr hoch und kann eine diese Reaktion sehr selektiv katalysierende Variante von CYP102A1 gefunden werden, so kann sich der Einsatz der entwickelten Konzepte auch finanziell lohnen. Solche Reaktionen sind beispielsweise die Hydroxylierung von Pinen ($\sim 1 \text{ € kg}^{-1}$) zu Verbenol (ein Aromastoff, $\sim 1000 \text{ € kg}^{-1}$) oder die Synthese ansonsten kaum zugänglicher Metaboliten von Pharmazeutika^[160].

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die im Umfeld dieser Arbeit entstandenen Diplomarbeiten: Neben der bereits erwähnten Arbeit von Pflug, in der ein Expressionsprotokoll zur Herstellung von bis zu 1.5 g l^{-1} aktivem CYP102A1 durch Fermentation des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *E. coli* BL21

(DE3)-Stamms erarbeitet wurde, konnte Kaiser die Kofaktorspezifität von CYP102A1 von NADPH auf NADH erweitern. Beide Ergebnisse senken die Kosten des *in vitro*-Einsatzes von CYP102A1 weiter: Höhere Expressionsausbeuten verringern die Kosten des Biokatalysators; NADH ist bei höherer Stabilität ca. 10 Mal billiger als NADPH. Gleichzeitig existieren mehr – und vor allem billigere NAD⁺-abhängige als NADP⁺-abhängige Dehydrogenasen.

In der Diplomarbeit von Kühnel^[150] wurden all diese Konzepte vereinigt: Es wurde NADH-abhängiges CYP102A1 und NAD⁺-abhängige FDH verwendet, um hochselektiv 400 mg eines Synthons (Tetramethyldecan-1,9-diol) für das Antibiotikum Borrelidin herzustellen. Diese Reaktion wurde in homogener Lösung (Einsatz von statistisch methyliertem Cyclodextrin), ähnlich dem hier für die Hydroxylierung von Myristinsäure verwendeten Verfahren, durchgeführt.

Diese Beispiele zeigen, dass weitere Verbesserungen bezüglich der Anwendung isolierter P450-Monooxygenasen in der organischen Synthese möglich und auch zu erwarten sind. Weitere Optimierung auf allen hier untersuchten Gebieten – von der Herstellung des Biokatalysators (nur noch geringes Verbesserungspotenzial) über die Suche nach aktiveren, selektiveren und stabileren CYP102A1-Varianten (großes Verbesserungspotenzial) bis hin zur weiteren Verbesserung der Prozessführung (großes Potenzial) – ist möglich. Ein mathematisches Modell des Reaktionssystems, das die Konzentrationen, Umsatzraten und Deaktivierungsraten aller beteiligten Reaktionspartner verknüpft, könnte bei der weiteren Optimierung sehr nützlich sein.

VII Materialien und Methoden

VII.1 Materialien

VII.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen, 15 + 50 ml Probengefäße, Petrischalen rund 9.4 cm Ø, Mikrotiterplatten 96 Kavitäten 200 µl – 2.5 ml	Greiner, Nürtingen
0.5, 1.5 und 2.0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Spritzenfilter (0.2 µm (Sterilfilter) und 0.45 µm Porengröße	Millipore, Molsheim, Frankreich
Ultrafiltrationsmembranen MWCO 10 bis 50 kDa	Millipore, Bedford, USA
UV-Küvetten QG	Hellma, Müllheim
1.5 ml Vis-Einwegküvetten	Multimed, Kirchheim u. T.
Dialysemembranen MWCO 12 kDa	Spectrum Medical Industries Inc., Laguna Hills, USA
GC-Rollrandflaschen, µ-Einsätze und PTFE-Septen	WICOM GmbH, Heppenheim

VII.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton, Acetonitril, Ethanol 98% für die Analyse, Natriumcarbonat, 2-Propanol, Schwefelsäure, Trichlormethan, Dichlormethan	Riedel-deHaën, Seelze
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30%, Bacto-Pepton, Pepton, Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe
Agar, Ammoniumhydroxid, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ammoniumsulfat, Ampicillin Natriumsalz, Bromphenolblau, Butylacetat, Calciumchlorid Dihydrat, Coomassie Brilliant Blue R250, Cyclohexan, Cyclohexanol, Cyclohexanon, Diethylether für die Analyse, Dimethylsulfoxid (DMSO), di- Kaliumhydrogenphosphat, di-Natriumhydrogenphosphat, Eisensulfat Heptahydrat, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), <i>D</i> -Glucose Monohydrat, Glycin, Hefeextrakt, Imidazol, Isopropyl-β- <i>D</i> -thiogalactopyranosid (IPTG), Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat Heptahydrat, Manganchlorid, β-Mercaptoethanol, 1-Methoxy-2-propanol, Myristinsäure, Naphthalin, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumhydroxid, Natriumdithionit, Nickelchlorid, N,N,N',N'-	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

Tetramethylethyldiamin (TEMED), Oktan, Oktan-1-ol, Oktan-2-ol, Oktan-3-ol, Oktan-4-ol, Orange-G, ortho-Phosphorsäure, Pentanon, Phenol, Rubidiumchlorid, Salzsäure 35 %, Styrol, Styroloxid, (<i>R</i>)-Styroloxid, (<i>S</i>)-Styroloxid, Wasser für die Molekularbiologie, Zinkchlorid	
Agarose, Harnstoff, 1 kb DNA Ladder	Gibco, Eggenstein
Antischaum, Triton-X-100, Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BioRad Proteinassay Kit, SDS-PAGE Proteinstandard (broad range)	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Glycerin, Methanol, Tris(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol), Tween 20, Tween 80	Roche, Mannheim
Trypton	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Mangansulfat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs, 10 mM)	Promega, Madison, USA
Ni-Sepharose HP	Amersham Bio-science, Freiburg
Ni-NTA	Qiagen, Hilden

VII.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophoreseapparaturen	
DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT, Power Pac 3000, Power Pac 300, Modell200/2.0 Power Supply	BioRad, Hercules, USA
Brutschränke	
WTE	Binder, Tuttlingen
UM500	Memmert, Schwabach
DNA-Sequenzier	
ABI Prism™ 377 DNA Sequencer Applied	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Evaporatoren	
Concentrator 5301 ("Speedvac")	Eppendorf, Hamburg
EZ-2 Plus	GeneVac Ltd., Suffolk, UK
Fermenter	
Labfors 5 I	Infors, Bottmingen, Schweiz
Bioengineering 30 I	Bioengineering, Wald, Schweiz
Gaschromatographen	
HRGC Mega 2 Series, GC 8000 Series	Fisons Instruments, Cherry Hill, USA
GC/MS QP2010	Shimadzu Deutschland, Duisburg

Gefriertrocknung	
Lyovak GT-2	Finnaqua, Päättäjän nimi, Finland
Inkubatoren	
Schüttelinkubator Multitron	Infors, Botmingen, Schweiz
SDS-PAAGE	
Modell583 Gel Dryer	BioRad, Hercules, USA
Minigel-Twin G42	Whatman Biometra, Göttingen
PCR	
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	
Digital pH Meter pH525	WTW, Weilheim
Schüttler	
Vibrax VXR für 1.5 / 2 ml Reaktionsgefäße	IKA, Staufen
MS1 Minishaker für Mikrotiterplatten	IKA, Staufen
Photometer	
Spectramax 340 PC für MTP	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec 3000	Amersham Bioscience, Freiburg
FPLC	
Äkta Explorer	Amersham Bioscience, Freiburg
Rotoren	
A-4-62	Eppendorf, Hamburg
SS-34, SLA-3000	Sorvall, Langenselbold
Thermomixer	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Waagen	
MC1 Research RC 210 D	Sartorius, Göttingen
Ultraschalldesintegrator	
Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Hochdruckhomogenisator	
APV Rannie Homogenizer	Invensys APV, Unna
Zentrifugen	
Eppendorf Zentrifuge 5417 C, Eppendorf Zentrifuge 5415 R, Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Universal 30 F	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
Concentrator 5301 ("Speedvac")	Eppendorf, Hamburg
Pipettierroboter	
Biomek 2000	Beckman Coulter, Fullerton, USA

VII.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Klonierungen	
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP), T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PCR-Anwendungen	
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Restriktionsendonukleasen	
<i>Bam</i> HI, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Weitere Enzyme und Proteine	
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Lysozym aus Hühnereiweiß, DNase, Katalase	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formiatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101, NADP ⁺ -abhängige Formiatdehydrogenase	Jülich Chiral Solutions, Jülich

VII.1.5 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden entsalzt von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Sequenzen sind jeweils von 5' nach 3' angegeben.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
sma1 (Monooxygenase f)	GACGGATCCATGACAATTAAAGAAATGCCT C	Amplifikation von CYP102A1 vom Vektor PT- USC1BM3
sma2 (Reduktase r)	GCGAATTCTTACCCAGCCCACACGTCTTTT GCG	„
F87G-f	ATGCGTCCAGCTTGTACCTAACCCGTCTCC TGCAA	Punktmutation F87G
F87G-r	TTTGCAGGAGACCGGGTTAGGTACAAGCTG GACGCAT	„
A74G-f	TTTGATAAAAACTTAAGTCAAGgGCTTAAAT TTGTAC	Punktmutation A74G
A74G-r	GTACAAATTTAAGCcCTTGACTTAAGTTTTTA TCAA	„
L188Q-f	AAGCAATGAACAAGCaGCAGCGAGCAAAT	Punktmutation L188Q
L188Q-r	ATTTGCTCGCTGctGCTTGTTcATTGCTT	“

VII.1.6 Stämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Anbieter
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	supE44, Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1relA1	Clontech, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	recA1, endA1, gyrA96, thi-lhsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac ^q Z Δ M15 Tn 10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>	NovaBlue (DE3)	F_mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Leek, Niederlande

VII.1.7 Plasmide

Plasmid	Referenz/Herkunft
pCYTEXP1	Belev <i>et al.</i> {Belev, 1991 #637}
pET28a+	EMD Biosciences (Novagen), San Diego, USA

Der Vektor pT-USC1BM3 wurde als Templat zur Amplifikation des *CYP102A1* Gens benutzt. pET28a+ wurde zur Subklonierung und nachfolgenden Expression des Gens verwendet.

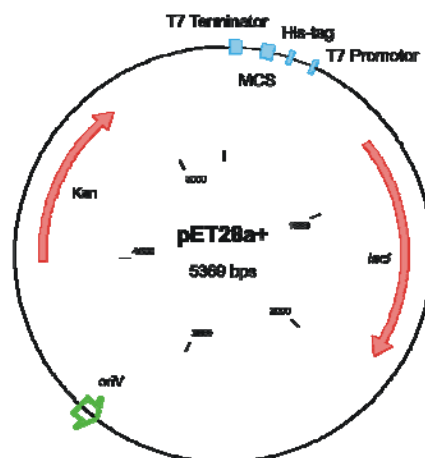


Abbildung VII-1: Plasmidkarte des Vektors pET28a+. Die für die Funktion wichtigen Sequenzbereiche sind gekennzeichnet: MCS bezeichnet die Klonierungsregion (multiple cloning site), *lacI* das Gen für den lac-Repressor, Kan das Kanamycinresistenz vermittelnde Gen für die Aminoglycosid-3'-phosphattransferase.

VII.1.8 Verwendete "Kits"

Bezeichnung	Hersteller
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

VII.1.9 Kulturmedien

LB-Medium:	10 g	NaCl
	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	1 l	H ₂ O
	pH =	7
TB-Medium:	12 g	Trypton
	24 g	Hefeextrakt
	4 ml	Glycerin
	900 ml	H ₂ O
	100 ml	autoklavierter Phosphatpuffer (0.17 M KH ₂ PO ₄ , 0.72 M K ₂ HPO ₄ , pH = 7)
SOC-Medium:	20 g l ⁻¹	Trypton
	5 g l ⁻¹	Hefeextrakt
	0.5 g l ⁻¹	NaCl
	0.19 g l ⁻¹	250 mM KCl-Lösung
	pH =	7

Nach Autoklavieren erfolgt die Zugabe von 5 ml autoklavierter 2 M MgCl₂-Lösung und 20 ml sterilfiltrierter 1 M Glucoselösung.

Alle Nährmedien wurden bei 121°C 20 min autoklaviert. Um Agarplatten herzustellen, versetzt man die Lösungen vor dem Autoklavieren mit 16g/l Agar, wobei hier die zur Selektion benötigten Antibiotika (Ampicillin oder Kanamycin) nach Abkühlen auf ca. 45°C zuzugeben sind. Bei Flüssigkulturen erfolgt die Antibiotikazugabe erst kurz vor dem Inokulieren.

Endkonzentration Ampicillin: 100 µg/ml für LB_{Amp}- und TB_{Amp}-Medium

Endkonzentration Kanamycin: 30 µg/ml für LB_{Kan}- und TB_{Kan}-Medium

VII.1.10 Puffer und Lösungen

EB-Puffer: 10 mM Tris
pH = 8.4 einstellen

TE-Puffer: 10 mM TRIS
1 mM EDTA
pH = 8.0

Puffer für die Agarosegelelektrophorese :

TAE-Puffer: 242 g TRIS
57 ml Essigsäure 100 %
ad 1 l dH₂O
pH = 8.0

Dieser Puffer muss vor Verwendung im Verhältnis 1 : 50 mit deionisiertem Wasser verdünnt werden.

DNA-Probenpuffer:

Für kurze DNA-Fragmente (100 bis 500 bp):

60 mM EDTA
0.05 % (m/v) Xylencyanol
0.2 % (m/v) Orange G
60 % (v/v) Glycerol

Für DNA-Fragmente >500 bp:

12.01 g	Harnstoff
0.21 g	EDTA
25 ml	Glycerin
50 mg	Bromphenolblau
ad 50 ml	dH ₂ O

DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf Agarosegele mit 20 bis 60 % DNA-Probenpuffer versetzt.

Puffer zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen:

Tfbl-Puffer:	0.59 g	KOAc
	2.42 g	RbCl
	0.29 g	CaCl ₂
	2.0 g	MnCl ₂ ·4 H ₂ O
	30 ml	Glycerin
	200 ml	dH ₂ O
	pH =	5.8 (Einstellen mit HOAc)

TfbII-Puffer:	0.21 g	MOPS
	1.1 g	CaCl ₂
	0.12 g	RbCl
	15 ml	Glycerin
	100 ml	dH ₂ O
	pH =	6.5 (Einstellen mit NaOH)

Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAAGE):

Elektrodenpuffer:	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 2 l	dH ₂ O

Lower Tris-Puffer:	36.34 g	Tris
	0.8 g	SDS
	200 ml	dH ₂ O
	pH =	8.8
Upper Tris-Puffer:	12.11 g	Tris/HCl, pH = 6.8
	0.8 g	SDS
	200 ml	dH ₂ O
	pH =	6,8
SDS-Probenpuffer:	500 mM	Tris/HCl, pH = 6,8
	10% (v/v)	Glycerin
	20% (v/v)	SDS
	2% (w/v)	Mercaptoethanol
	0,05% (m/v)	Bromphenolblau

Proteinproben wurden vor dem Denaturieren bei 95°C mit 20 bis 80 % SDS-Probenpuffer versetzt.

Entfärbelösung:	300 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	ad 1 l	dH ₂ O
Färbelösung:	100 ml	Entfärbelösung
	250 mg	Coomassie Brilliant Blue

Puffer für die Metallchelataffinitätschromatographie:

IMAC1:	100 mM	NaCl
	50 mM	KPi
	pH =	7.5

IMAC2:	100 mM	NaCl
	50 mM	KPi
	200 mM	Imidazol
	pH =	7.5

Sonstige Puffer und Lösungen:

KPi-Puffer:	50 mM	KH ₂ PO ₄
	pH =	7.5 mit KOH einstellen

10 x FDH-Reaktionspuffer:	3 M	Na ⁺ HCOO ⁻
	50 mM	KPi
	pH =	7.5

Der Puffer wurde vor Verwendung im Verhältnis 1 : 10 mit 50 mM KPi pH 7.5 bzw. den entsprechenden Zusätzen verdünnt.

VII.1.11 Stammlösungen

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg ml ⁻¹	Ampicillin-Natriumsalz in demineralisiertem dH ₂ O
-------------------------	---

Kanamycin-Stammlösung

30 mg ml ⁻¹	Kanamycin-Sulfat dH ₂ O
------------------------	---------------------------------------

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Stammlösung:

1 M	IPTG dH ₂ O
-----	---------------------------

Alle Stammlösungen, die während der Kultivierung von *E. coli* eingesetzt wurden, wurden sterilfiltriert (0.2 µM), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Phenylmethylsulfonylfluorid-Stammlösung:

100 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
	Ethanol absolut

VII.2 Methoden

VII.2.1 Molekularbiologische Methoden

VII.2.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA (bis 15 µg)

Die Isolierung plasmidischer DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgt meist durch alkalische Lyse der Zellen, gefolgt von der Ausfällung von Proteinen und genomischer DNA sowie einer Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Chromatographie an Kieselgel. Zur Isolierung kleiner Mengen an DNA wurde das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Saint Louis, USA) verwendet.

4 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden zentrifugiert (RT, 5000 rpm, 3 min) und das Zellpellet in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer kam es zur Lyse der Zellen und im Anschluss durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer zur Ausfällung von Proteinen und genomischer DNA. Nach Zentrifugation (RT, 14000 rpm, 10 min) wurde der geklärte Überstand auf die Anionenaustauschersäule dekantiert. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde gewaschen und in 75 µl EB-Puffer eluiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (15 bis 100 µg)

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (bis zu 100 µg) erfolgte mit dem Qiagen Plasmid-Midi Kit, Qiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers. Abgesehen von der Verwendung eines größeren Kulturvolumens (50 bis 100 ml) beruht das Verfahren auf denselben Grundlagen wie oben für die Isolierung von bis zu 5 µg Plasmid-DNA beschrieben.

Ethanolpräzipitation von DNA-Fragmenten

Die Ethanolfällung wurde verwendet um geringe Mengen DNA aufzukonzentrieren und zu reinigen (z. B. nach Restriktionsverdau). Schon bei DNA-Konzentrationen von 20 ng/ml kann annähernd quantitativ gefällt werden.

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) und anschließend mit dem Doppelten des Gesamtvolumens an eiskaltem Ethanol versetzt. Nach Präzipitation der DNA (–20°C, 30 min) wurde zentrifugiert (4°C, 14000

rpm, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, die gefällte DNA nach Entfernen des Überstands 30 min an der Luft getrocknet, in Wasser bzw. EB-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt bzw. direkt weiter verwendet.

Elektrophoretische Trennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten nach Größe sowohl für analytische (Gelvolumen 40 ml) als auch für präparative (Gelvolumen 60 ml) Zwecke wurden die Agarosegelelektrophorese verwendet. Zum Anfärben der DNA wurde der 1 %-igen Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von $0.5\ \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Nach Polymerisation der Agarose wurde die zu analysierende DNA-Lösung mit 1 – 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für 30 min mit TAE-Puffer als Elektrolyt. Nach der Auftrennung wurden die Gele mit Hilfe des LAS-1000 CH (Fuji Film, Japan) fotografiert.

Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen

Auch dieses Verfahren beruht auf dem für die Isolierung von Plasmid-DNA beschriebenen Verfahren.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die das gewünschte DNA-Fragment enthaltenden Bereiche des Agarosegels wurden hierfür ausgeschnitten, in Puffer bei 50°C aufgelöst und die DNA im Folgenden an eine Kieselgelmatrix gebunden. Nach Waschen der Matrix kann die DNA mit H_2O eluiert werden.

VII.2.1.2 Vervielfältigung, Sequenzierung und Manipulation von DNA

PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Das jeder PCR zugrundeliegende Prinzip beruht auf der mehrfachen Wiederholung dreier Teilschritte:

1. **Schmelze (*Denaturierung*):** Durch Erhitzen der DNA-Matrize auf $> 92^{\circ}\text{C}$ werden die komplementären Einzelstränge getrennt.
2. **Anlagerung (*Annealing*):** Bei Abkühlung der Reaktionsmischung auf $37 - 72^{\circ}\text{C}$ können sich kurze einzelsträngige DNA-Fragmente (Oligonukleotide sog. Primer) an die nun einzelsträngige DNA-Matrize anlagern. Die verwendeten Oligonukleotide sind komplementär zu kurzen Sequenzabschnitten am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Annealingtemperatur hängt von der Länge und Sequenz der verwendeten Primer ab.
3. **Synthese (*Elongation*):** Bei Temperaturen zwischen 68 und 72°C und optimalen Pufferbedingungen synthetisieren hitzestabile DNA-Polymerasen, beginnend an den angelagerten Oligonukleotiden, den komplementären DNA - Strang. Die Synthese erfolgt stets von 5' nach 3' unter Verwendung zugesetzter Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTPs).

Jeder synthetisierte DNA-Strang dient im nächsten Zyklus wieder als Matrize, so dass die Anzahl der DNA-Stränge unter optimalen Synthesebedingungen exponentiell anwächst.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Anwendung sind v.a. folgende Parameter zu variieren:

- Wahl der DNA-Polymerase: Es existieren verschiedene käufliche, thermostabile Polymerasen, die sich hauptsächlich in folgenden Eigenschaften unterscheiden: Korrekturleseaktivität, Synthesegeschwindigkeit, Synthesetemperatur, Stabilität etc.
- Wahl der Primer: Für Standard-PCRs sollten die verwendeten Primer ca. 20 bp lang sein, eine Schmelztemperatur T_M von $50 - 60^{\circ}\text{C}$ und einen GC-Gehalt von nicht mehr als 60 % haben. Zusätzlich sollte gewährleistet sein, dass sie weder

unspezifisch an der eingesetzten DNA binden, noch eine Sekundärstruktur bilden können.

- Zusätze:

Magnesiumionen: Sämtliche DNA-Polymerasen benötigen zur Funktion die Anwesenheit von Magnesiumionen im Reaktionsansatz. Durch Zugabe von zusätzlichem Magnesium kann die DNA-Ausbeute im Einzelfall erhöht werden.

DMSO: DMSO interagiert mit dem Matrizenstrang, so dass die Anlagerung der Primer erschwert wird. Dadurch sinkt die Gefahr unspezifischer Primerbindungen, die Anlagerungstemperatur kann erniedrigt werden.

- Anlagerungstemperatur: Sie berechnet sich aus der Schmelztemperatur T_M der eingesetzten Primer nach folgender Formel:

$$T_M = 64,9 + \left(41 \times \frac{yG + zC - 16,4}{wA + xT + yG + zC} \right) [^\circ\text{C}]$$

wobei w, x, y, and z der Anzahl der Basen A, T, G bzw. C in der Sequenz entsprechen. Zur Berechnung der Anlagerungstemperatur der Primer wurde in dieser Arbeit das im Internet frei zugängliche Programm „Oligocalculator“ eingesetzt. Unspezifische Bindung, resultierend in einem Gemisch von PCR-Produkten, spricht für eine zu tiefe Anlagerungstemperatur.

- Elongationstemperatur: Je nach der optimalen Arbeitstemperatur der eingesetzten DNA-Polymerase

- Elongationsdauer: Je nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Geschwindigkeit der eingesetzten DNA-Polymerase; für die meisten DNA-Polymerasen gilt: 1 min Elongationsdauer für 1000 bp

Tabelle VII-1: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [μl]
10x Reaktionspuffer	5
dNTPs (Mischung, je 2.5 mM)	2
DNA-Matrize (20-200 ng μl^{-1})	2
1. PCR Primer (10 pM μl^{-1})	2
2. PCR Primer (10 pM μl^{-1})	2
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2 U μl^{-1})	0.5
H ₂ O (für die Molekularbiologie)	36.5

Tabelle VII-2: Temperaturprogramm eines Standard-PCR-Ansatzes

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	1.5	25
Anlagerung	62	2	
Synthese	72	6	
Synthese	72	6	1

Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange®)

Bei dieser Methode dienen zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide von 25 - 40 bp Länge, welche die gewünschte Mutation im Zentrum ihrer Sequenz tragen als Primer. Zur Amplifikation wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, welche Korrekturlesefunktion besitzt. Während der Amplifikation entstehen ausgehend von den Primern Kopien des Plasmids, welche nun die gewünschte Mutation tragen. Da diese Kopien linear sind und die Elongation durch Polymerasen immer vom 5'- zu 3'-Ende eines DNA-Strangs voranschreitet, können sie nicht als Templat während der nächsten Syntheszyklen dienen. Demnach verläuft die Produktzunahme in diesem Fall im Gegensatz zur Standard-PCR nicht exponentiell, sondern linear.

Nach der PCR liegt ein Gemisch an Produkt mit gewünschter Mutation und Ausgangsplasmid ohne Mutation vor. Da das Ausgangsplasmid in *E. coli* DH5 α synthetisiert wurde, liegt es im Gegensatz zum PCR-Produkt methyliert vor. Methylierte DNA wird durch die Restriktionsendonuclease *DpnI* hochspezifisch abgebaut. Nach Inkubation des PCR-Ansatzes mit *DpnI* (37°C, 1 h), liegt demnach nur noch DNA mit den gewünschten Mutationen vor, die direkt zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet werden kann.

Tabelle VII-3: Zusammensetzung eines QuikChange® PCR Ansatzes

Komponente	Volumen [μ l]
10x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	5
dNTPs (Mischung, je 2,5 mM)	2
DNA-Matrize (20-200 ng/ μ l)	2
1. PCR Primer (10 pM/ μ l)	2
2. PCR Primer (10 pM/ μ l)	2
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	0,5
DMSO	2,5
H ₂ O (für die Molekularbiologie)	34

Tabelle VII-4: Temperaturprogramm einer QuikChange® PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	94	1	} 16-20
Anlagerung	55	1	
Synthese	72	7-16 ^a	
Synthese	72	16	1

^a: Die Synthesedauer richtete sich nach Größe des zu amplifizierenden Plasmids. *Pfu*-DNA-Polymerase benötigt zwei Minuten pro 1000 Basen.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger {Sanger, 1977 #203; Sanger, 1992 #204} durchgeführt. Dabei wird die DNA ausgehend von nur einem eingesetzten Primer von 5' nach 3' mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase repliziert. Im Gegensatz zur PCR werden hierbei neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) im Unterschuss zugegeben, die bei Einbau in den DNA-Strang einen Kettenabbruch zur Folge haben. Somit entsteht ein Gemisch von unterschiedlich langen DNA-Strängen, welche auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Da jede ddNTP-Spezies (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, kann festgestellt werden, mit welcher Base ein DNA-Fragment endet. Der Lesekopf des DNA-Sequenzierers detektiert die Abfolge der Fluoreszenzfarbstoffe entlang des Trenngels und bestimmt somit die Abfolge der Basen im sequenzierten DNA-Bereich. Es wurde das Big Dye Terminator Kit (Perkin Elmer) verwendet. In einer vom Hersteller gelieferten Mischung befinden sich bereits Puffersubstanzen, DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide und sonstige Zusätze. Tabelle VII-5 zeigt den typischen Ansatz für die Sequenzier-PCR, Tabelle VII-6 ein Standardtemperaturprogramm.

Tabelle VII-5: Zusammensetzung eines Sequenzier-PCR Ansatzes

Komponente	Volumen [µl]
Big Dye Terminator Mix	4
Primer (3,3 pM/µl)	1
DNA-Matrize (20-200 ng/µl)	5
H ₂ O (für die Molekularbiologie)	10

Tabelle VII-6: Temperaturprogramm einer Sequenzier-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	6	1
Denaturierung	95	1	25
Anlagerung	55	1	
Synthese	60	5	
Synthese	60	5	1

Die weitere Analyse wurde mit dem Sequenzierer ABI-Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) wie vom Hersteller angegeben durchgeführt.

Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur analytischen Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden 1 bis 2 µl Plasmid-DNA mit 0.5 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease in 10 µl Gesamtvolumen in den den Angaben des Herstellers entsprechenden Reaktionspuffern inkubiert. Zum präparativen Restriktionsverdau für die Umklonierung von CYP102A1 und verschiedenen CYP102A1-Varianten wurden 0.1 – 5 µg DNA mit 1 bis 2 U der Enzyme Bam HI und Eco RI gleichzeitig in 50 µl Puffer B (Boehringer) geschnitten. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Restriktionsenzyme inaktiviert (60°C, 15 min) um unspezifische Reaktionen zu verhindern.

Behandlung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase

Um die Religation geschnittener Plasmid-DNA zu verhindern wurden die 5'-ständigen Phosphatreste durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) abgespalten. Dazu wurde 1 bis 2 U CIAP nach Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen direkt in den Restriktionsansatz pipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Geschnittene und gereinigte Vektor- und Insert-DNA wurde im Stoffmengenverhältnis 1:2 bis 1:10 zur Ligation eingesetzt. Die DNA wurde dazu mit 10x Ligasepuffer und 1 U T4-Ligase versetzt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT oder alternativ 16 h bei 16°C.

VII.2.2 Mikrobiologische Methoden

Kultivierung von *Escherichia coli*

Sämtliche *E. coli*-Stämme wurden in Luria-Bertani (LB)-Medium oder – zur Erhöhung der Wachstumsrate und Proteinexpression – in Terrific-Broth (TB)-Medium kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde je nach verwendetem Plasmid Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml Ampicillin-Natriumsalz) oder Kanamycin (Endkonzentration: 30 µg/ml) zugesetzt. Für Übernachtskulturen wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Zur Stammhaltung wurde die Kultur mit 25 % sterilem Glycerin versetzt und bei – 80°C gelagert. Diese Glycerinkulturen wurden ein Mal jährlich erneuert.

Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit der Rubidiumchlorid - Methode wurden 100 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert (10 min 4000 rpm 4°C) und in 40 ml TfbI - Puffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde wiederum abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C) und das Pellet in 4 ml TfbII - Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis in Aliquots zu je 200 µl in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt.

Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden transformationskompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurde 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 45 s wurden die Zellen wiederum 2 min auf Eis gestellt und dann mit 1 ml SOC-Medium versetzt. Nach 45 min bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen - bei Transformation von Ligationsansätzen und ortsgerecht mutierten Plasmiden - abzentrifugiert (2 min, 5000 rpm, RT), 900 µl Medium abgenommen, die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektionsmarker ausplattiert. Bei der direkten Transformation von Plasmiden kann auf den letzten Zentrifugationsschritt verzichtet

werden. Stattdessen wurden 50 – 100 µl des Transformationsansatzes direkt ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C über Nacht bzw. bis Kolonien erkennbar waren.

VII.2.2.1 Expression von CYP102A1 und genetisch veränderten Varianten

Expression im Schüttelkolben mittels des Vektors pT-USC1BM3^[147]

Mit dem pCYTEXP1-Derivat pT-USC1BM3 frisch transformierte *E. coli* DH5 α -Zellen wurden zur Inokulation von 5 ml mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin versetztem LB-Medium (LB_{Amp}-Medium) verwendet. Nach 16 h Inkubation bei 37°C und 180 rpm wurde die Vorkultur zu 400 ml LB_{Amp}-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben gegeben und unter denselben Bedingungen weiter kultiviert. Nach Erreichen einer Absorption von 0.8 bis 1.0 bei 578 nm wurde durch Temperaturerhöhung auf 42°C bei gleichzeitiger Reduktion der Schüttelfrequenz auf 160 rpm die CYP102A1-Expression induziert. Nach 4 h bei 42°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 12000 *g) geerntet.

Batch-Fermentation von CYP102A1 im 30 l-Maßstab

Zur Produktion von CYP102A1 und Varianten im Grammaßstab wurde der temperaturinduzierbare Vektor pT-USC1BM3 verwendet. 5 ml LB_{Amp}-Medium wurden mit frisch mit pT-USC1BM3 transformierten *E. coli* DH5 α angeimpft. Diese Vorkultur wurde nach 9 h Inkubation bei 37°C und 180 rpm zur Inokulation von 400 ml TB_{Amp}-Medium verwendet. Nach 16 h bei 30°C und 180 rpm wurde diese Kultur (OD₅₇₈ \approx 5) benutzt, um 30 l TB_{Amp}-Medium im 30 l Bioengineering Fermenter zu inokulieren. Während der folgenden Wachstumsphase wurde eine Rührergeschwindigkeit von 385 min⁻¹, eine Luftzufuhr von 10 l min⁻¹ und eine Temperatur von 37°C eingestellt. Zur Verhinderung starker Schaumbildung wurden 100 µl steriles Antischaum (Silikonöl) zugegeben. Die Induktion der CYP102A1-Expression erfolgte bei einem OD₅₇₈-Wert von \sim 2 durch Temperaturerhöhung auf 42°C. Gleichzeitig wurde die Rührergeschwindigkeit so eingeregelt, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff auf 5 bis 10 % der Sättigungskonzentration sank. Ein drastischer Anstieg der Sauerstoffkonzentration 5 bis 7 h nach Induktion zeigt den vollständigen

Verbrauch von Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle im Medium an. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 12000 *g) geerntet.

Expression im Schüttelkolben mittels des Vektors pET28a+

Der Vektor pET28a+ mit einkloniertem CYP102A1 erlaubt bedeutend höhere Expressionsraten als der Vektor pCYTEXP1. Nachteilig – vor allem im größeren Maßstab ist – dass der teure Induktor Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) verwendet werden muss. Deshalb wurde der Vektor pET28a+ nur zur Expression im 400 ml-Maßstab verwendet.

Hierzu wurden 5 ml LB_{Kan}-Medium mit einer mit pET28a+CYP102A1 transformierten Einzelkolonie angeimpft. Nach 4 h bei 37°C und 180 rpm wurde diese Vorkultur benutzt, um 400 ml TB_{Kan}-Medium zu inokulieren. Innerhalb von 4 bis 5 h bei 180 rpm und 37°C erreichte diese Kultur einen OD₅₇₈-Wert von 0.4 bis 0.7. Daraufhin wurde die Temperatur auf 25°C und die Schüttelfrequenz auf 160 rpm gesenkt. Nach weiteren 15 min wurde durch Zugabe von 200 μ l 1 M IPTG-Stammlösung (Endkonzentration 0.5 mM) die Proteinexpression induziert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 12000 *g) 16 h nach Induktion.

VII.2.3 Biochemische Methoden

VII.2.3.1 Zellaufschluss

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Bis zu einer Biofeuchtmasse von 25 g wurden Zellen durch Behandlung mit Ultraschall aufgeschlossen.

Bei -20°C gelagerte bzw. frisch geerntete *E. coli*-Zellen wurden in KPi-Puffer resuspendiert (5 bis 10 ml Puffer pro Gramm Biofeuchtmasse) und mit 0.1 mM des Proteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels des Ultraschalldesintegrators Branson Sonifier 250 (5 x 2 min Ultraschallpulse (Leistungsabgabe 40%, Arbeitsintervall 40%), mit jeweils 1 min Pause zwischen den zweiminütigen Ultraschallbehandlungen). Die Suspension wurde während des gesamten Zellaufschlusses auf Eis gekühlt. Zur Abtrennung von

Zelldebris wurde zentrifugiert (20 min, 35000 *g). Der erhaltene klare Rohextrakt wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisation

Zellmassen von über 25 g wurden durch Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen. Hierzu wurden bis zu 150 g Zellen in 500 ml KPi-Puffer resuspendiert und mit 0.1 mM PMSF versetzt. Im Hochdruckhomogenisator wird die Zellsuspension auf hohen Druck (Einstellung 800 bar) gebracht und daraufhin durch eine feine Düse entspannt. Durch die Scherkräfte zerreißen die Zellen. Die erhaltene trübe Suspension wurde 2 h bei 4°C und 12000 *g zentrifugiert. Der erhaltene klare Rohextrakt wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

VII.2.3.2 Charakterisierung von P450-Monooxygenasen

Reduziertes Kohlenmonoxid-Differenzspektrum (CO-Differenzspektrum)

Zur Bestimmung der P450-Konzentration wurden reduzierte CO-Differenzspektren aufgenommen. Die Methode beruht auf der Bildung eines bei 450 nm absorbierenden Häm-Fe(II)-Carbonyl-Komplexes. Wird als Referenz bei der Aufnahme des Spektrums eine nicht mit CO begaste Probe verwendet, so ist im Spektrum einer aktiven und korrekt gefalteten P450-Monooxygenase nur ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zu erkennen. Für inaktive, denaturierte P450-Monooxygenasen wird ein Absorptionsmaximum bei 420 nm beobachtet.

Die CYP102A1 enthaltende Lösung wurde im Verhältnis 1 : 10 bis 1 : 100 verdünnt (Endvolumen 2 ml). Die Reduktion des Eisens zu Eisen(II) erfolgt durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit. Daraufhin wurde die Probe in zwei Küvetten aufgeteilt. Eine der Proben wurde vorsichtig mit CO begast. Nach 10 min wurde ein Differenzspektrum zwischen 400 und 500 nm mit der unbegasten Probe als Referenz aufgenommen. Aus der Absorptionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm kann über das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $E = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ die Konzentration der P450-Monooxygenase berechnet.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAAGE)

Zum Nachweis von Proteinen und zur Analyse ihrer Reinheit wird häufig die SDS-PAAGE angewandt{Laemmli, 1970 #205}. Die in einem Gemisch vorhandenen

Proteine werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Analyse von CYP102A1 wurden 10 % Acrylamid enthaltende Trenngele hergestellt und nach der Polymerisation mit 4 %-igen Sammelgelen überschichtet. Die Proteinproben wurden mit 20 bis 80 % SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugation der Proben (2 min, 14000 rpm, 4°C) zur Präzipitation der ausgefallenen DNA wurde das Gel beladen. Nach Zugabe von SDS-Elektrodenpuffer erfolgte die Elektrophorese zunächst 10 min bei 10 mA pro Gel, anschließend 1 Stunde bei 25 mA pro Gel. Als Größenmarker dienten die Proteinstandards 10 kDa Proteinmarker (Gibco, Eggenstein) und *Broad range molecular weight marker* (Roth GmbH, Karlsruhe).

Tabelle VII-7: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

	Trenngel (10 % Acrylamid)	Sammelgel (4 % Acrylamid)
Rotiphorese® Gel 3	2.67 ml	0.52 ml
4 x upper TRIS	-	1.00 ml
4 x lower TRIS	2.00 ml	-
dH ₂ O	3.33 ml	2.47 ml
10 % (m/v) APS	40 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Die Polymerisation des Acrylamids wird durch Zugabe von TEMED gestartet.

Die Proteinbanden wurden durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel eine Stunde in SDS-Färbelösung inkubiert und nachfolgend mehrfach in frische SDS-Entfärbelösung gelegt. Nach dieser Prozedur sind die Proteinbanden selektiv angefärbt.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts wässriger Lösungen wurde nach der Methode von Bradford mit dem Protein Assay Kit von Biorad durchgeführt. Diese Nachweismethode beruht auf der Bindung von Coomassie *brilliant blue* G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption der Lösung ist proportional zum Proteingehalt. Durch eine externe Kalibrierung mit BSA als Referenz lässt sich der Proteingehalt quantifizieren.

Zur Messung wurden 800 µl einer entsprechend verdünnten Proteinlösung mit 200 µl Bradfordlösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde in einer 1 ml Küvette am Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Spektrophotometer gemessen.

VII.2.3.3 Aufreinigung von CYP102A1

Bei der Aufreinigung von P450-Monooxygenasen können die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen auf Grund der einzigartigen spektroskopischen Eigenschaften dieser Enzymfamilie leicht identifiziert werden. Im nativen Zustand ist dies die Absorption von Licht einer Wellenlänge von 417 nm bzw. die sich daraus ergebende gelbe Färbung der entsprechenden Fraktionen.

Aufreinigung über immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)

Die im Vektor pET28a+ einklonierten CYP102A1-Varianten wurden als Fusionsproteine mit N-terminaler Hexahistidinsequenz exprimiert. Dies ermöglicht die Aufreinigung durch IMAC. Diese chromatographische Methode wurde 1975 von Porath *et al.* erstmals beschrieben (Porath *et al.*, 1975). Bei Ni-NTA handelt es sich um ein von Hoffmann-la-Roche entwickeltes, verbessertes Verfahren (The Qiaexpressionist, 3/2001), das die bis zu 95 %-ige Anreicherung von Proteinen mit Oligohistidinsequenz in nur einem Aufreinigungsschritt ermöglicht (Janknecht *et al.*, 1991). Neben Ni-NTA wurde in dieser Arbeit auch Ni-Sepharose HP (Amersham) verwendet. Dieses neuentwickelte Material besitzt gegenüber Ni-NTA den Vorteil einer vielfach höheren Proteinbindungskapazität bei ansonsten sehr ähnlichen Eigenschaften.

Aufzureinigende Proben wurden direkt in einer Mischung aus 10 % Puffer IMAC2 und 90 % Puffer IMAC1 (Endkonzentrationen: 20 Imidazol, 100 mM NaCl, 50 mM KPi, pH 7.5) aufgeschlossen wie oben beschrieben. Restliche Schwebstoffe wurden über einen 0.22 µm-Filter abgetrennt.

Während der gesamten Aufreinigung wurde das ÄKTA-Explorer-FPLC-System mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ betrieben. Die Säule (Volumen 5 ml) wurde zunächst mit zwei Säulenvolumina 100 mM NiCl₂ beladen, daraufhin mit Puffer IMAC1 äquilibriert bis die Absorption bei 280 nm konstant blieb und mit der aufzureinigenden

Proteinlösung beladen. Dabei wurden ca. 40 mg CYP102A1 pro Milliliter Säulenvolumen auf die Ni-Sepharose-Säule HP (Amersham) bzw. 5 mg ml⁻¹ auf die Ni-NTA-Säule (Qiagen) aufgetragen. Zur Detektion eluierenden Proteins wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, während die P450-Monooxygenase an Hand der Absorption bei 417 nm detektiert wurde.

Daraufhin wurde wiederum mit einer Mischung aus 10 % IMAC1 und 90 % IMAC2 gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm konstant blieb. Unspezifisch gebundene Proteine wurden im nächsten Waschschrift mit einer Mischung aus 20 % Puffer IMAC1 und 80 % IMAC2 entfernt (40 mM Imidazol). CYP102A1-Varianten wurden mit einer 1 : 1-Mischung der Puffer IMAC1 und IMAC2 (100 mM Imidazol) eluiert. Die Säule wurde daraufhin mit drei Säulenvolumina IMAC2 gereinigt und anschließend mit 20 % Ethanol gespült.

Die CYP102A1 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung von Imidazol zwei Mal gegen 5 l KPi-Puffer dialysiert. Die Reinheit des aufgereinigten CYP102A1 wurde sowohl durch Messung der CYP102A1- und der Gesamtproteinkonzentration, als auch elektrophoretisch durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kontrolliert.

VII.2.3.4 Aktivitätstests und Enzymcharakterisierung

Bestimmung der NADPH-Oxidationsrate für CYP102A1-Varianten

NADPH absorbiert im Gegensatz zu NADP⁺ Licht einer Wellenlänge von 340 nm. Dies lässt sich zur Messung NADPH-abhängiger P450-Aktivität nutzen. Allerdings ist - durch die häufig auftretende Entkopplung der NADPH-Oxidation von der Produktbildung - der NADPH-Verbrauch kein direktes Maß für die Hydroxylierungs- bzw. Epoxidierungsaktivität.

Für den NADPH-Verbrauchstest wurden 0.1 bis 1 nmol der entsprechenden CYP102A1-Variante und 10 µl einer 10 mM Lösung des jeweiligen Substrats in DMSO in einem Volumen von 900 µl gemischt. Nach Start der photometrischen Messung bei 340 nm wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl einer 1 mM NADPH-Lösung gestartet. Die NADPH-Oxidationsrate (Steigung der erhaltenen Kurve) wurde im linearen Bereich innerhalb der ersten 20 s der Reaktion gemessen. Aus der Steigung wurde mittels des Extinktionskoeffizienten von NADPH ($E = 6.22$

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) und der CYP102A1-Konzentration die Umsatzrate [$\text{eq}(\text{NADPH}) \text{eq}(\text{P450})^{-1} \text{min}^{-1}$] berechnet.

Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit von CYP102A1-Varianten bei Variation der Substratkonzentration

Für P450-Monooxygenasen wird im Allgemeinen angenommen, dass ihr kinetisches Verhalten dem Modell von Michaelis und Menten gehorcht. Dieses kinetische Modell gilt streng nur für Reaktionen eines Enzyms mit einem einzigen Substrat. CYP102A1 besitzt neben dem organischen Substrat zwei weitere Reaktionspartner: Sauerstoff und NADPH. Sind die Konzentrationen von Sauerstoff und NADPH konstant (wovon bei zu Reaktionsbeginn ausgegangen werden kann) und im Bereich der Sättigung der entsprechenden Bindungsstellen des Enzyms, so kann, sofern keine allosterischen Effekte auftreten, das Michaelis-Menten-Modell der Enzymkinetik angewandt werden.

Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten von CYP102A1-katalysierten Reaktionen wurde wie oben beschrieben die NADPH-Oxidationsrate bei Variation der Konzentration des organischen Substrats unter Beibehaltung aller anderen Parameter bestimmt.

Bindungsdifferenzspektren für CYP102A1

Wie in der Einleitung (Kapitel III.1.4) beschrieben, tritt bei der Bindung von Substraten am aktiven Zentrum von P450-Monooxygenasen auf Grund der Verdrängung des Wasserliganden vom Hämeisen ein Übergang zum high-spin Eisen(III) auf. Dieser Übergang lässt sich im UV/vis-Spektrum des Proteins durch eine Abschwächung der Absorption bei 417 nm und eine gleichzeitige Zunahme der Absorption bei 390 nm beobachten. Wird nun mit einem Substrat titriert, kann durch Steigerung der Substratkonzentration bis zur Sättigungskonzentration (die Substratkonzentration, ab der bei weiterer Substratzugabe keine weitere Änderung des Spinzustandes mehr auftritt) die Konstante für die Bindung dieses Substrats an das aktive Zentrum der entsprechenden P450-Monooxygenase ermittelt werden.

Zur Aufnahme von Bindungsdifferenzspektren wurde folgendermaßen vorgegangen: Proben der zu untersuchenden CYP102A1-Variante wurden auf Quarzglasküvetten aufgeteilt. Dabei wurden in jede Küvette genau gleiche Stoffmengen der P450-Monooxygenase gegeben. Dann wurde eine der Proben mit KPi-Puffer auf 1 ml

aufgefüllt, während die weiteren Proben mit KPi-Puffer und einem mit dem entsprechenden Substrat gesättigten KPi-Puffer auf 1 ml Volumen aufgefüllt wurden. Die Substratkonzentration in der jeweiligen Küvette muss dabei genau bekannt sein. Die Küvette ohne Substrat wurde bei Aufnahme der Spektren (350 bis 500 nm) als Referenz benutzt. Die Probenküvette wurde nacheinander gegen die Proben unterschiedlicher Substratkonzentration ausgetauscht. Mit steigender Substratkonzentration werden auf diese Weise Spektren mit einem zunehmend intensiven Absorptionsmaximum bei 390 nm und einem ebenfalls zunehmend ausgeprägten Absorptionsminimum bei 417 nm erhalten.

Bestimmung der Kopplungseffizienz zwischen NADPH-Oxidation und Produktbildung

Um die wie oben beschrieben ermittelten NADPH-Verbrauchsdaten mit der Produktbildung zu korrelieren, wurde die Kopplungseffizienz, d. h. der prozentuale Anteil an gebildetem Produkt im Verhältnis zum verbrauchtem NADPH, ermittelt.

Hierzu wurden 0.1 bis 1 nmol der entsprechenden CYP102A1-Variante und 200 nmol Substrat in 20 µl DMSO in einem Volumen von 900 µl gemischt. Nach Start der photometrischen Messung bei 340 nm wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 mM NADPH-Lösung gestartet. Die Absorption bei 340 nm wurde verfolgt, bis sie wieder auf den Wert vor der NADPH-Zugabe gefallen war. Zu diesem Zeitpunkt ist das zugegebene NADPH vollständig umgesetzt. Die Probe wurde daraufhin drei Mal mit Diethylether oder Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, im Falle von Fettsäuren derivatisiert und über GC bzw. GC/MS analysiert. Die Konzentration von Produkt und Substrat wurde durch Kalibrierung der Signalfächen unter Verwendung von Standards bekannter Konzentration ermittelt. Wie oben beschrieben wurde vom jeweiligen Substrat die doppelte Stoffmenge wie vom Kofaktor NADPH eingesetzt. Demnach entspricht ein 1 : 1 –Verhältnis von Produkt zu Substrat einer Kopplungseffizienz von 100 %.

pNCA-Test für CYP102A1 ^[147]

Bei Verwendung von ω-*para*-Nitrophenoxyfettsäuren wie beispielsweise 10-*para*-Nitrophenoxydecansäure (10-pNCA) kann die Produktbildung direkt – ohne den Umweg über Bestimmung von NADPH-Verbrauchsrate und Kopplungseffizienz – gemessen werden. Durch Hydroxylierung von 10-pNCA an C10 (ω-Kohlenstoffatom

der Fettsäure) der Fettsäure entsteht ein instabiles Halbacetal, das zu *p*-Nitrophenolat (*p*NP) und 10-Oxodecansäure zerfällt. Die Bildung von *p*-Nitrophenolat kann bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch verfolgt werden. Allerdings muss beachtet werden, dass nur Oxidation am ω -Kohlenstoffatom der Fettsäure detektiert wird.

Für den *p*NCA-Test wurden in Küvetten von 1 ml Volumen folgende Komponenten gemischt: 0.1 – 1 μ M CYP102A1, 0.1 mM *p*NCA (Stammlösung 10 mM in DMSO) und 50 mM KPi pH 8.1. Durch Zugabe von 100 μ l 1 mM NADPH-Lösung wurde das Volumen auf 1 ml eingestellt und die Reaktion gestartet. Die zur Reaktionsgeschwindigkeit proportionale *p*-Nitrophenolatbildungsrate wurde im linearen Bereich gemessen und mittels des Extinktionskoeffizienten $E_{pNP} = 14.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in die Reaktionsgeschwindigkeit [min^{-1}] umgerechnet.

***p*NCA-Test unter Substitution / Regenerierung von NADPH**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, NADPH durch alternative Reagenzien zu ersetzen. Dabei wurde einerseits auf die literaturbekannte Verwendung des starken Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid zurückgegriffen. Eine weitere Alternative stellt die Verwendung eines Systems aus Zink-Staub als Elektronenquelle und Cobalt-Sepulchrat als Elektronenmediator dar. Auch die Verwendung von Riboflavin als Elektronenmediator wurde untersucht. Riboflavin kann durch NADPH, durch Licht oder kathodisch reduziert werden. Bei Reduktion über Riboflavin bzw. Verwendung von Wasserstoffperoxid wurde nur die CYP102A1-Monooxygenasedomäne als Katalysator verwendet. Als letzte Alternative zur Verwendung von NADPH wurde die Zugabe von NADP^+ und einer NADP^+ -abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Pseudomonas* sp. 101 untersucht.

Für Riboflavin als Elektronenüberträger wurden folgende Konzentrationen der Komponenten für den *p*NCA-Test eingesetzt: 10 μ M CYP102A1-Hämdomäne, 100 μ M Riboflavin, 1 mM NADH, 1mM EDTA, 1 mM *p*NCA in einem Puffer aus 25 mM Tris/HCl und 25 mM KPi pH7.5.

Bei Verwendung von FDH wurde vorgegangen, wie oben für den *p*NCA-Test unter Verwendung von NADPH beschrieben. Der einzige Unterschied bestand in der Verwendung von 0.1 mM NADP^+ statt NADPH und der Zugabe von 0.1 bis 0.01 U ml^{-1} FDH.

pNCA-Test für in einer Sol-Gel-Matrix immobilisiertes CYP102A1

Der einfache photometrische pNCA-Test kann für das feindisperse Sol-Gel-immobilisierte CYP102A1 nicht verwendet werden, da die Trübung durch die festen Partikel das Ergebnis verfälscht. Außerdem muss während der Reaktion gerührt oder geschüttelt werden, um eine ausreichende Durchmischung der heterogen katalysierten Reaktion zu gewährleisten. Um die katalytische Aktivität von immobilisierten Enzympräparationen zu vergleichen, wurde deshalb folgendermaßen vorgegangen: 5 mg ml⁻¹ Immobilisat wurden zu einer Lösung von 0.1 mM 10-pNCA, 0.1 mM NADPH in 50 mM KPi bei pH 8.1 gegeben und 1 h bei 800 U min⁻¹ geschüttelt. Durch Zentrifugation (1 min, 20000 g) wurde der Katalysator abgetrennt und daraufhin die Absorption bei 410 nm gegen eine Referenzlösung gemessen. Die Referenzlösung wurde, abgesehen davon, dass kein NADPH zugegeben wurde, identisch behandelt.

Aktivitätstest für Formiatdehydrogenase (FDH)

Die Aktivität der Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 wurde über die photometrische Messung des aus NADP⁺ gebildeten NADPH bestimmt. Hierzu wurden 0.01 bis 0.1 U FDH in FDH-Reaktionspuffer gegeben. Nach Beginn der photometrischen Messung bei 340 nm wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 mM NADP⁺-Lösung gestartet. Die Steigung der erhaltenen Kurve wurde mittels des Extinktionskoeffizienten von NADPH ($E = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in die Reaktionsgeschwindigkeit umgerechnet. Diese Reaktion wurde auch zur Kontrolle der FDH-Aktivität während der präparativen Oxidationsreaktionen benutzt.

VII.2.4 Analyse der Prozessstabilität von CYP102A1**Prozessstabilität von CYP102A1**

In eine Ultrafiltrationsapparatur (AMICON-Ultrafiltrationszelle), ausgestattet mit einer Ultrafiltrationsmembran aus regenerierter Cellulose (MWCO 30 kDa), wurden in 100 µl Kpi-Puffer 1 µmol CYP102A1 gegeben. Zum Start der Reaktion wurde 1 ml einer das Substrat 10-pNCA (0.25 mM) und den Kofaktor NADPH (0.5 mM) in 50 mM Kpi, pH 8.1 enthaltenden Lösung zugegeben. Nach 20 min Reaktionszeit wurde durch Anlegen eines Drucks von ca. 2 bar 1 ml der das gelbe Reaktionsprodukt 10-pNCA enthaltenden Lösung entnommen. Im Anschluss wurde wiederum 1 ml der das

Substrat und den Kofaktor enthaltenden Lösung zugegeben. Die *p*-Nitrophenolatkonzentration in der Reaktionsmischung wurde photometrisch bei 410 nm bestimmt. Dieses Verfahren aus Entnahme des Reaktionsproduktes, Nachfüllen frischer Reaktanden und Bestimmung des Umsatzes wurde in 30 min-Abständen wiederholt. Anhand der Abnahme des Umsatzes wurde auf die fortschreitende Deaktivierung von CYP102A1 geschlossen.

Bestimmung der Prozessstabilität von immobilisiertem CYP102A1

Zur Bestimmung der Prozessstabilität von immobilisierten CYP102A1-Präparationen wurden 200 mg des Feststoffs in eine Röhre mit Fritte und Hahn gegeben. Zu Reaktionsbeginn wurde 1 ml einer den Kofaktor NADPH (0.5 mM) und das Pseudosubstrat 10-*p*NCA (0.25 mM) enthaltenden Lösung zugegeben. Nach 30 min Reaktion wurde dieses Flüssigkeitsvolumen vollständig in eine Küvette überführt und der Festbettreaktor mit frischer Kofaktor- und Substratlösung beschickt. Die *p*-Nitrophenolatkonzentration in der die Reaktionsprodukte enthaltenden Küvette wurde photometrisch bestimmt. Dieses Verfahren aus Entnahme des Reaktionsproduktes, Nachfüllen frischer Reaktanden und Bestimmung des Umsatzes wurde in 30-minütigen Abständen wiederholt. Anhand der Abnahme des Umsatzes wurde auf die fortschreitende Deaktivierung von CYP102A1 geschlossen.

VII.2.5 Proteinchemische Methoden für Elektronenübertragung durch Riboflavin

Riboflavinilyierung von CYP102A1^[107, 116]

Es wurde eine leicht abgewandelte Version des von Shumyantseva et al. für die Riboflavinilyierung von eukaryotischen P450-Monooxygenasen verwendeten Protokolls verwendet.

Zur Aktivierung von Riboflavin wurden 0.6 mg Riboflavin in 100 µl Dioxan gelöst und mit einem Überschuss (zur Minimierung der Dimerisierungsreaktion) Carbonyldiimidazol versetzt. Die Reaktion wurde eine Stunde bei RT unter Schütteln im Dunklen durchgeführt. Nach Evaporation des Dioxan wurden 10 nmol CYP102A1-Hämdomäne in 100 µl 50 mM KPi, pH 7.5 zugegeben. Die Kopplung des durch Carbonyldiimidazol aktivierten Riboflavins an CYP102A1 erfolgte über 12 h bei 4°C.

Nachfolgend wurden die Nebenprodukte der Reaktion über eine Celluloseacetatmembran abgetrennt. Das modifizierte Protein wurde hinsichtlich seiner spektroskopischen und katalytischen Eigenschaften charakterisiert.

Riboflavin als Elektronenüberträger

Eine 10 μM Lösung der CYP102A1-Hämdomäne in 25 mM TRIS-Puffer, 1 mM EDTA, pH 7.5 wurde mit 100 μM Riboflavin versetzt. Diese Lösung wurde sowohl für die Aufnahme von CO-Differenzspektren als auch zur Dealkylierung von 10-*p*NCA genutzt.

Für die Aufnahme von Kohlenmonoxiddifferenzspektren wurden 0.1 mM Myristinsäure (Stammlösung 10 mM in DMSO) zugegeben, die Lösung zur Entfernung von Sauerstoff 15 min mit Stickstoff gespült, anschließend mit 1 mM NADPH versetzt, die Probe in zwei Küvetten á 1 ml aufgeteilt und der Inhalt einer der Küvetten drei Minuten mit Kohlenmonoxid begast. Nach zehn Minuten wurde ein Differenzspektrum aufgenommen.

Zum Nachweis von katalytischer Aktivität unter Übertragung von Reduktionsäquivalenten durch Riboflavin wurde die Reaktion mit 10-*p*NCA genutzt. Hierfür wurden zur oben beschriebenen Mischung aus CYP102A1-Hämdomäne und Riboflavin 0.2 mM 10-*p*NCA (10 mM in DMSO) gegeben, die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und der Reaktionsfortschritt bei 410 nm detektiert.

Denaturierung der CYP102A1-Hämdomäne

2 ml der hochkonzentrierten CYP102A1-Hämdomäne (100 bis 200 μM) wurden zu 18 ml Denaturierungspuffer (8 M Harnstoff, 50 mM Kpi, pH 7.5) gegeben. Nach 16 h war die Denaturierung vollständig, was daran erkennbar war, dass im CO-Differenzspektrum kein Absorptionsmaximum bei 450 nm mehr auftrat.

Renaturierung der CYP102A1-Hämdomäne

Zur Renaturierung von CYP102A1 wurde die Lösung des denaturierten Proteins im Verhältnis 1 : 14 in Renaturierungspuffer (100 mM Histidin, 20 mM Dithiothreitol, 2 μM Hemin, 20% Glycerin, pH 8) verdünnt. Zusätzlich wurde über Nacht gegen Renaturierungspuffer dialysiert. Daraufhin ist im CO-Differenzspektrum wieder das für die native Monooxygenasedomäne charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm zu erkennen. Zum Einschub von Riboflavin in die denaturierte

Monooxygenasedomäne wurde die Renaturierung in Gegenwart von Riboflavin (10 bis 200 μM) bzw. in Gegenwart von mittels Carbonyldiimidazol aktiviertem Riboflavin (hergestellt wie unter Kap. beschrieben) durchgeführt.

VII.2.6 Sol-Gel-Immobilisierung von CYP102A1-Varianten

Zur fluoridkatalysierte Bildung des Sols wurden zunächst fünf Volumenanteile Tetraethoxyorthosilikat (TEOS) mit einem Volumenanteil 20 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 6000 in 50 mM Kpi pH 7.5 gemischt. Über den Anteil an PEG kann die Porengröße des entstehenden porösen Silikats gesteuert werden. Die Bildung des Sols wird durch Zugabe von 0.25 Volumenanteilen 0.2 M Natriumfluoridlösung auf Eis durchgeführt. Nach drei Minuten wurden 2.5 Volumenanteile einer aufgereinigten und gegen 50 mM Kpi, pH 7.5 dialysierten Lösung von CYP102A1 (2 bis 12 μM) zugegeben. Die Mischung wurde weitere 15 min auf Eis gerührt, wobei sich eine homogene Emulsion bildet. Dieses Hydrogel wurde 5 bis 7 Tage bei 4°C gelagert, wobei sich ein gelb-weißer Feststoff, das sogenannte Xerogel bildete. Dieser Feststoff wurde durch Aufschlännen mit Kpi, anschließendes Zentrifugieren und Dekantieren des Überstands gewaschen. Diese Waschprozedur wurde fünf Mal wiederholt und die Waschlösung jeweils spektroskopisch auf ihren P450-Gehalt überprüft. Die Immobilisate wurden daraufhin lyophilisiert. Die Ausbeute an Sol-Gel betrug durchschnittlich 60 % der Theorie. Der CYP102A1-Gehalt der Sol-Gel-Matrix wurde abgeschätzt, indem von der eingesetzten CYP102A1-Menge die in der Waschlösung detektierte Menge abgezogen wurde. Es wurden Beladungen mit CYP102A1 von 13 bis 60 nmol CYP102A1 pro Gramm Sol-Gel erreicht.

VII.2.7 Umsatz von Substraten

VII.2.7.1 Umsatz von Oktan, Naphthalin, β -Jonon und 10-*p*NCA mit sol-gel-immobilisiertem CYP102A1

Die Substrate wurden in einer Konzentration von 10 μM in DMSO gelöst. Diese Lösung wurde in einer Konzentration von 2 % mit 50 mM Kpi pH 7.5 gemischt. Nach Zugabe der entsprechenden immobilisierten CYP102A1-Variante wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.4 μM NADPH gestartet. Die Reaktionen wurden unter Schütteln (800 U min^{-1}) für zwei Stunden durchgeführt. Daraufhin wurden die Produkte mittels Diethylether extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und gaschromatographisch analysiert.

Für die Analyse der Dealkylierung von 10-*p*NCA entfällt der Extraktionsschritt. Nach Zentrifugation wurde die *p*-Nitrophenolatkonzentration der nun klaren Lösung direkt photometrisch bei 410 nm bestimmt ($E = 14.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

1.2.7.2 Umsatz von Substraten im Zweiphasensystem

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen durch Testen unterschiedlichster löslichkeitsvermittelnder und stabilisierender Zusätze wurde zur Herstellung der wässrigen Biokatalysatorphase folgendermaßen vorgegangen: Das die entsprechende CYP102A1-Variante enthaltende Zelllysate wurde mit 50 mM Kpi, pH 7.5 gemischt und mit 10 mg ml^{-1} BSA, 0.2 mg ml^{-1} (600 U ml^{-1}) Katalase, 0.1 mM NADP^+ und 250 mM Formiat versetzt. Die einzusetzende Aktivität [U] an FDH wurde so berechnet, dass die FDH-Aktivität zu Reaktionsbeginn 20 % über der NADPH oxidierenden Aktivität von CYP102A1 in Gegenwart des jeweiligen Substrats lag.

Cyclohexan und Oktan

Das oben beschriebene wässrige Katalysatorsystem wurde mit demselben Volumen des organischen Substrats versetzt und bei ca. 200 rpm so gerührt, dass eine Durchmischung der Phasen gerade eintrat. Bei Ansätzen unter Belüftung wurde in der Abluft befindliches Produkt und Substrat über einen Rückflusskühler bzw. über eine mit Trockeneis befüllte Kühlfalle kondensiert. Zur Probennahme wurde jeweils 1

ml der Emulsion entnommen und zur Phasentrennung 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde mittels GC und GC/MS analysiert und der Gehalt an Reaktionsprodukten quantifiziert. Mit einer Probe aus der wässrigen Phase (10 bis 100 μl) wurde der oben beschriebene FDH-Aktivitätstest durchgeführt. Bei sehr geringer oder nicht mehr messbarer FDH-Aktivität wurde dieses Enzym erneut zum Reaktionsansatz gegeben. Wenn keine weitere Steigerung der Konzentration an Reaktionsprodukten mehr zu beobachten war, wurde die Reaktion abgebrochen (nach 80 bis 140 h). Zunächst wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. In der organischen Phase befindliches denaturiertes Protein wurde mittels wasserfreien Na_2SO_4 ausgefällt. Die organische Phase wurde mit 200 g l^{-1} NaCl versetzt und zwei Mal mit MTBE extrahiert. Die getrockneten organischen Phasen wurden vereinigt und für präparative Ansätze die Produkte durch Destillation in Reinform gewonnen.

Styrol

Für die Epoxidierung von Styrol ergab die Optimierung eine Steigerung der maximalen Zyklenzahl um annähernd einen Faktor drei, wenn zum oben beschriebenen wässrigen Reaktionssystem 35 mM des statistisch methylierten β -Cyclodextrins CAVASOL W7M Pharma gegeben wurde. Ansonsten wurden die Reaktionen wie oben für Cyclohexan und Oktan beschrieben durchgeführt.

Myristinsäure

Es wurde ebenfalls das oben beschriebene wässrige Biokatalysatorsystem eingesetzt.

Als organische Phase diente Dodecan, das kein Substrat der für die Umsetzung von Myristinsäure verwendeten Variante A74G/F87V/L188Q darstellt. Myristinsäure wurde in einer Konzentration von 100 mM in Dodecan gelöst und diese Lösung als organische Phase im Zweiphasensystem eingesetzt. Zur Probennahme wurde jeweils 1 ml der Emulsion entnommen und zur Phasentrennung 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde nach Trimethylsilylierung mittels GC und GC/MS analysiert und der Gehalt an Reaktionsprodukten quantifiziert. Mit einer Probe aus der wässrigen Phase (10 bis 100 μl) wurde der oben beschriebene FDH-Aktivitätstest durchgeführt. Bei sehr geringer oder nicht mehr messbarer FDH-Aktivität wurde dieses Enzym erneut zum Reaktionsansatz gegeben. Wenn keine weitere Steigerung der Konzentration an Reaktionsprodukten mehr zu beobachten war,

wurde die Reaktion abgebrochen (nach 24 bis 48 h). Die entstandene Emulsion wurde nach Ansäuern auf pH 2 drei Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nachdem der leichtflüchtige Diethylether verdampft war, fiel ein weißer Feststoff aus der nun hauptsächlich aus Dodecan bestehenden Lösung aus. Bei diesem Feststoff handelte es sich um die nur noch mit ca. 10 % Myristinsäure verunreinigten Reaktionsprodukte. Nicht umgesetzte Myristinsäure befand sich im Gegensatz dazu hauptsächlich in der organischen Phase: Dort lagen neben 95 % Myristinsäure nur 5 % hydroxylierte Derivate vor.

VII.2.7.3 Umsatz von Myristinsäure in homogener Lösung

In einer Lösung von 50 mM KPi pH 7.5, 0.65 μM CYP102A1, 6.5 U ml^{-1} FDH, 0.1 mM NADP^+ , 0.2 mg ml^{-1} Katalase, 20 mM statistisch methyliertem β -Cyclodextrin (CAVASOL W7M Pharma) und 300 mM Na^+HCOO^- wurden 10 mg ml^{-1} fein gemörserte Myristinsäure suspendiert. Innerhalb einiger Stunden wird die feste Myristinsäure vollständig gelöst. Nach 30 h wurde die Reaktion durch Ansäuern auf pH 2 mit verdünnter Salzsäure abgebrochen. Das Ansäuern hydrolysiert das eingesetzte Cyclodextrin und protoniert die Fettsäure. Beide Effekte erleichtern die Extraktion von Produkt und Substrat. Es wurde drei Mal mit Diethylether extrahiert und das Lösungsmittel verdampft. Die hydroxylierte Myristinsäure wurde vom Edukt durch Chromatographie an Kieselgel getrennt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus *n*-Hexan und Ethylacetat (Verhältnis 4 : 1) verwendet. Nach Elution underivatisierter Myristinsäure wurde die Mischung regioisomerer hydroxylierter Myristinsäurederivate mit reinem Ethylacetat eluiert.

VII.2.8 GC- und GC/MS-Analytik

Für die Analyse von Edukten und Produkten der untersuchten Reaktionen wurden die im Folgenden angegebenen Kapillartrennsäulen, GC-Ofenprogramme und sonstigen Einstellungen verwendet.

Zur Quantifizierung wurde die Signalintensität des GC-Detektors (Flammenionisationsdetektor (FID) für Fisons HRGC 2000 und Fisons GC 8000, Massenspektrometer für Shimadzu GC/MS-QP2010) mittels Standards bekannter Konzentration kalibriert.

VII.2.8.1 GC-Methoden

Geräte: Fisons HRGC 2000 und GC 8000

Trägergas: Wasserstoff

Detektor: FID

Injektortemperatur: 250°C

β-Jonon, 4-Hydroxy-β-Jonon

Säule: 60 m Zebron ZB1 (Polydimethylsiloxan)

Trägergasdruck: 100 kPa

Ofenprogramm: 1) 90°C isotherm 5 min 2) 10°C min⁻¹ von 90 bis 300°C
3) 300°C isotherm 10 min.

Oktan, 2-, 3- und 4-Oktanol, 2-, 3- und 4-Oktanon

Säule: 60 m Zebron ZB1 (Polydimethylsiloxan)

Trägergasdruck: 50 kPa

Ofenprogramm: 1) 45°C isotherm 8 min 2) 2 °C min⁻¹ von 45 bis 100°C
3) 10°C min⁻¹ von 100 bis 240°C

Naphthalin, 1- und 2-Naphthol

Säule: 60 m Zebron ZB1 (Polydimethylsiloxan)

Trägergasdruck: 100 kPa

Ofenprogramm: 1) 100°C isotherm 10 min 2) 2°C min⁻¹ von 100 bis 140°C
3) 10°C min⁻¹ von 140 bis 250°C 4) 250°C isotherm 5 min

Styrol, R- und S-Styroloxid

Säule: 50 m Macherey-Nagel Hydrodex-β-PM (internal diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μM)

Trägergasdruck: 80 kPa

Ofenprogramm : 1) 100°C isotherm 40 min 2) 10°C min⁻¹ von 100 bis 170°C
3) 170°C isotherm 10 min

VII.2.8.2 GC/MS-Methoden

Gerät: Shimadzu GC/MS QP2010

Trägergas: Helium

Säule: 30 m FS-Supreme (Innendurchmesser 0.25 mm, Filmdicke 0.25 μM, Polydimethylsiloxan mit 5 % Phenylanteil)

Detektor: Massenspektrometer

Trägergasgeschwindigkeit: 30 cm s⁻¹

Injektortemperatur: 250°C

Interface: 285°C

Cyclohexan, Cyclohexanol, Cyclohexanon

Ofenprogramm: 1) 50°C isotherm 5 min 2) 20° min⁻¹ von 50 bis 200°C
3) 200°C isotherm 2 min

MS-Einstellungen: Intervall zwischen Aufnahme der Spektren: 0.5 s

Start m/z: 30

End m/z : 200

Myristinsäure, 8- bis 13-Hydroxymyristinsäure

Vor der Messung wurden die Carboxyl- und Hydroxyfunktionalitäten trimethylsilyliert. Dazu wurden die wasserfreien Substanzen direkt im GC-Probengläschen in 50 μl einer Mischung aus 1% Trimethylchlorsilan in N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid

gelöst. Nach 30 min bei 70°C wurde die GC/MS-Analyse unter Verwendung folgender Methode durchgeführt:

Säule: 1) 175°C isotherm 1 min 2) 5°C min⁻¹ von 175 bis 275°C
 3) 275°C isotherm 1 min

MS-Einstellungen: Intervall zwischen Aufnahme der Spektren: 0.5 s

Start m/z: 50

End m/z : 350

Die regioisomeren trimethylsilylierten Derivate wurden an Hand ihrer charakteristischen Massenfragmente zugeordnet.

Styrol, Styroloxid (achiral)

Ofenprogramm: 1) 80°C isotherm 5 min 2) 5°C min⁻¹ von 80 bis 90°C
 3) 90°C isotherm 1 min 4) 40°C min⁻¹ von 90 bis 250

MS-Einstellungen: Intervall zwischen Aufnahme der Spektren: 0.5 s

Start m/z: 30

End m/z : 200

VIII Literaturverzeichnis

- [1] S. A. Goff, D. Ricke, T. H. Lan, G. Presting, R. L. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma et al. *Science* **2002**, 296, 92.
- [2] J. Yu, S. N. Hu, J. Wang, G. K. S. Wong, S. G. Li, B. Liu, Y. J. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Q. Zhang, et al. *Science* **2002**, 296, 79.
- [3] L. Zhong, K. Wang, J. Tan, W. Li, S. G. Li, *Science in China Series C-Life Sciences* **2002**, 45, 512.
- [4] I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar, I. Schlichting, *Chem Rev* **2005**, 105, 2253.
- [5] K. G. Ravichandran, S. S. Boddupalli, C. A. Hasermann, J. A. Peterson, J. Deisenhofer, *Science* **1993**, 261, 731.
- [6] I. F. Sevrioukova, H. Li, H. Zhang, J. A. Peterson, T. L. Poulos, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, 1863.
- [7] T. L. Poulos, B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner, J. Kraut, *J Biol Chem* **1985**, 260, 16122.
- [8] T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *Biochemistry* **1986**, 25, 5314.
- [9] T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *J Mol Biol* **1987**, 195, 687.
- [10] H. Li, T. L. Poulos, *Nat Struct Biol* **1997**, 4, 140.
- [11] J. K. Yano, L. S. Koo, D. J. Schuller, H. Li, P. R. Ortiz de Montellano, T. L. Poulos, *J Biol Chem* **2000**, 275, 31086.
- [12] L. M. Podust, T. L. Poulos, M. R. Waterman, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 3068.
- [13] J. K. Yano, F. Blasco, H. Li, R. D. Schmid, A. Henne, T. L. Poulos, *J Biol Chem* **2003**, 278, 608.
- [14] J. R. Cupp-Vickery, T. L. Poulos, *Nat Struct Biol* **1995**, 2, 144.
- [15] J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout, E. F. Johnson, *J Biol Chem* **2004**, 279, 38091.
- [16] M. R. Wester, J. K. Yano, G. A. Schoch, C. Yang, K. J. Griffin, C. D. Stout, E. F. Johnson, *J Biol Chem* **2004**, 279, 35630.
- [17] G. A. Schoch, J. K. Yano, M. R. Wester, K. J. Griffin, C. D. Stout, E. F. Johnson, *J Biol Chem* **2004**, 279, 9497.
- [18] E. E. Scott, Y. A. He, M. R. Wester, M. A. White, C. C. Chin, J. R. Halpert, E. F. Johnson, C. D. Stout, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, 13196.
- [19] M. R. Wester, E. F. Johnson, C. Marques-Soares, S. Dijols, P. M. Dansette, D. Mansuy, C. D. Stout, *Biochemistry* **2003**, 42, 9335.
- [20] M. R. Wester, E. F. Johnson, C. Marques-Soares, P. M. Dansette, D. Mansuy, C. D. Stout, *Biochemistry* **2003**, 42, 6370.
- [21] E. F. Johnson, M. R. Wester, C. D. Stout, *Endocr Res* **2002**, 28, 435.
- [22] M. R. Wester, C. D. Stout, E. F. Johnson, *Methods Enzymol* **2002**, 357, 73.
- [23] D. Werck-Reichhart, R. Feyereisen, *Genome Biol* **2000**, 1, REVIEWS3003.
- [24] D. C. Haines, D. R. Tomchick, M. Machius, J. A. Peterson, *Biochemistry* **2001**, 40, 13456.
- [25] M. J. Cryle, J. E. Stok, J. J. De Voss, *Australian Journal of Chemistry* **2003**, 56, 749.
- [26] J. O. Miners, *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2002**, 29, 1040.
- [27] C. Ioannides, D. F. Lewis, *Curr Top Med Chem* **2004**, 4, 1767.
- [28] F. J. Gonzalez, *Trends Pharmacol Sci* **1992**, 13, 346.
- [29] M. Morant, S. Bak, B. L. Moller, D. Werck-Reichhart, *Curr Opin Biotechnol* **2003**, 14, 151.

- [30] O. Lentz, A. Feenstra, T. Habicher, B. Hauer, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Chembiochem* **2005**.
- [31] D. Appel, S. Lutz-Wahl, P. Fischer, U. Schwaneberg, R. D. Schmid, *J Biotechnol* **2001**, *88*, 167.
- [32] E. T. Farinas, U. Schwaneberg, A. Glieder, F. H. Arnold, *Adv Synth Catal* **2001**, *343*, 601.
- [33] A. Glieder, E. T. Farinas, F. H. Arnold, *Nat Biotechnol* **2002**, *20*, 1135.
- [34] S. Graham-Lorence, G. Truan, J. A. Peterson, J. R. Falck, S. Wei, C. Helvig, J. H. Capdevila, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 1127.
- [35] O. Lentz, Q. S. Li, U. Schwaneberg, S. Lutz-Wahl, P. Fischer, R. D. Schmid, *J Mol Cat B* **2001**, *15*, 123.
- [36] Q. S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, R. D. Schmid, *Chemistry* **2000**, *6*, 1531.
- [37] Q. S. Li, U. Schwaneberg, M. Fischer, J. Schmitt, J. Pleiss, S. Lutz-Wahl, R. D. Schmid, *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1545*, 114.
- [38] S. C. Maurer, V. Urlacher, H. Schulze, R. D. Schmid, *Adv Synth Catal* **2003**, *345*, 802.
- [39] M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 13442.
- [40] D. F. V. Lewis, *Cytochromes P450*, Taylor & Francis Ltd, London, **1996**.
- [41] L. Dai, A. M. Klibanov, *Biotechnol Bioeng* **2000**, *70*, 353.
- [42] L. Galzigna, M. P. Schiappelli, M. Scarpa, A. Rigo, *Free Radic Res* **1997**, *27*, 501.
- [43] N. Spreti, R. Germani, A. Incani, G. Savelli, *Biotechnol Prog* **2004**, *20*, 96.
- [44] H. B. ten Brink, A. Tuynman, H. L. Dekker, W. Hemrika, Y. Izumi, T. Oshiro, H. E. Schoemaker, R. Wever, *Inorg Chem* **1998**, *37*, 6780.
- [45] N. M. Kamerbeek, A. J. Olsthoorn, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Appl Environ Microbiol* **2003**, *69*, 419.
- [46] G. I. Lepesheva, C. Virus, M. R. Waterman, *Biochemistry* **2003**, *42*, 9091.
- [47] H. Schulze, R. D. Schmid, T. T. Bachmann, *Anal Chem* **2004**, *76*, 1720.
- [48] D. F. Lewis, in *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism* (Ed.: D. F. Lewis), Taylor and Francis Ltd., London, **1996**, pp. 115.
- [49] D. Berg, M. Plempel, K. Buchel, G. Holmwood, K. Stroech, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *544*, 338.
- [50] R. Feyereisen, *Annu. Rev. Entomol.* **1999**, *44*, 507.
- [51] F. Durst, D. P. O'Keefe, *Drug Metab. Drug Interact* **1995**, *12*, 171.
- [52] T. A. Holton, F. Brugliera, D. R. Lester, Y. Tanaka, C. D. Hyland, J. G. Menting, C. Y. Lu, E. Farcy, T. W. Stevenson, E. C. Cornish, *Nature* **1993**, *366*, 276.
- [53] A. el-Monem, H. el-Refai, A. R. Sallam, H. Geith, *Acta Microbiol Pol B* **1972**, *4*, 31.
- [54] L. Sallam, N. Naim, A. Zeinel-Abdin Badr, A. El-Refai, *Rev Latinoam Microbiol* **1977**, *19*, 151.
- [55] D. Kupfer, K. A. Holm, *Drug Metab. Rev.* **1989**, *20*, 753.
- [56] K. Zerbe, K. Woithe, D. B. Li, F. Vitali, L. Bigler, J. A. Robinson, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 6709.
- [57] M. C. Betlach, J. T. Kealey, G. W. Ashley, R. McDaniel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14937.
- [58] P. Roy, D. J. Waxman, *Toxicol In Vitro* **2005**.
- [59] J. A. Goldstein, M. B. Faletto, *Environ. Health Perspect.* **1993**, *100*, 169.
- [60] M. A. McLean, S. A. Maves, K. E. Weiss, S. Krepich, S. G. Sligar, *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *252*, 166.

- [61] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J Biol Chem* **1986**, 261, 7160.
- [62] A. J. Fulco, R. T. Ruettinger, *Life Sci* **1987**, 40, 1769.
- [63] G. C. Shaw, C. H. Sung, A. Chiang, *Current Microbiology* **1996**, 32, 124.
- [64] S. S. Boddupalli, R. W. Estabrook, J. A. Peterson, *J Biol Chem* **1990**, 265, 4233.
- [65] H. Li, T. L. Poulos, *Biochimie* **1996**, 78, 695.
- [66] L. Kaysser, Diploma Thesis thesis, University of Stuttgart (Stuttgart), **2004**.
- [67] S. C. Maurer, L. A. K. Katja Kühnel, Sabine Eiben, Rolf D. Schmid, Vlada B. Urlacher, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2005**, 347, 1090.
- [68] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, et al., *Nature* **1997**, 390, 249.
- [69] M. Budde, S. C. Maurer, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Appl Microbiol Biotechnol* **2004**, 66, 180.
- [70] O. Lentz, V. Urlacher, R. D. Schmid, *J Biotechnol* **2004**, 108, 41.
- [71] M. Budde, M. Morr, R. D. Schmid, V. Urlacher, *ChemBioChem* **2006**.
- [72] M. C. Gustafsson, O. Roitel, K. R. Marshall, M. A. Noble, S. K. Chapman, A. Pessegueiro, A. J. Fulco, M. R. Cheesman, C. von Wachenfeldt, A. W. Munro, *Biochemistry* **2004**, 43, 5474.
- [73] C. Asta, Diploma thesis, Universität Stuttgart (Stuttgart), **2005**.
- [74] R. De Mot, A. H. Parret, *Trends Microbiol* **2002**, 10, 502.
- [75] T. Kitazume, A. Tanaka, N. Takaya, A. Nakamura, S. Matsuyama, T. Suzuki, H. Shoun, *Eur J Biochem* **2002**, 269, 2075.
- [76] N. Nakayama, A. Takemae, H. Shoun, *J Biochem (Tokyo)* **1996**, 119, 435.
- [77] S. Sukumaran, W. M. Atkins, R. Shanker, *Appl Biochem Biotechnol* **2002**, 102-103, 291.
- [78] M. Shimoji, H. Yin, L. Higgins, J. P. Jones, *Biochemistry* **1998**, 37, 8848.
- [79] R. C. Wade, P. J. Winn, I. Schlichting, Sudarko, *J Inorg Biochem* **2004**, 98, 1175.
- [80] T. W. Ost, C. S. Miles, J. Murdoch, Y. Cheung, G. A. Reid, S. K. Chapman, A. W. Munro, *FEBS Lett* **2000**, 486, 173.
- [81] Q. S. Li, J. Ogawa, R. D. Schmid, S. Shimizu, *FEBS Lett* **2001**, 508, 249.
- [82] Q. S. Li, J. Ogawa, R. D. Schmid, S. Shimizu, *Appl Environ Microbiol* **2001**, 67, 5735.
- [83] T. Jovanovic, R. Farid, R. A. Friesner, A. E. McDermott, *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 13548.
- [84] G. A. Schoch, R. Attias, M. Belghazi, P. M. Dansette, D. Werck-Reichhart, *Plant Physiol* **2003**, 133, 1198.
- [85] L. Banci, I. Bertini, S. Marconi, R. Pierattelli, *Eur J Biochem* **1993**, 215, 431.
- [86] S. Modi, M. J. Sutcliffe, W. U. Primrose, L. Y. Lian, G. C. Roberts, *Nat Struct Biol* **1996**, 3, 414.
- [87] S. Graham-Lorence, G. Truan, J. A. Peterson, J. R. Falck, S. Z. Wei, C. Helvig, J. H. Capdevila, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 1127.
- [88] W. T. Sulistyaningdyah, J. Ogawa, Q. S. Li, C. Maeda, Y. Yano, R. D. Schmid, S. Shimizu, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, 67, 556.
- [89] P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, 42, 3299.
- [90] A. B. Carmichael, L. L. Wong, *Eur J Biochem* **2001**, 268, 3117.
- [91] L. A. Cowart, J. R. Falck, J. H. Capdevila, *Arch Biochem Biophys* **2001**, 387, 117.

- [92] F. H. Arnold, G. Georgiou, in *Methods Mol Biol*, Vol. 230, Humana Press, Totowa, New Jersey, **2003**.
- [93] F. H. Arnold, G. Georgiou, in *Methods Mol Biol*, Vol. 231, Humana Press, Totowa, New Jersey, **2003**.
- [94] P. Meinhold, M. W. Peters, M. M. Chen, K. Takahashi, F. H. Arnold, *Chembiochem* **2005**, 6, 1765.
- [95] T. Kubo, M. W. Peters, P. Meinhold, F. H. Arnold, *Chemistry* **2005**.
- [96] T. Seng Wong, F. H. Arnold, U. Schwaneberg, *Biotechnol Bioeng* **2004**, 85, 351.
- [97] V. B. Urlacher, A. Makhsumkhanov, R. D. Schmid, *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 1.
- [98] R. J. Sowden, S. Yasmin, N. H. Rees, S. G. Bell, L. L. Wong, *Org Biomol Chem* **2005**, 3, 57.
- [99] J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends Biotechnol* **2003**, 21, 170.
- [100] D. L. Craft, K. M. Madduri, M. Eshoo, C. R. Wilson, *Appl Environ Microbiol* **2003**, 69, 5983.
- [101] R. D. Schmid, *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [102] B. A. Ward, A. Morocho, A. Kandil, R. E. Galinsky, D. A. Flockhart, Z. Desta, *Br J Clin Pharmacol* **2004**, 58, 277.
- [103] S. Pflug, Diploma Thesis thesis, University of Stuttgart (Stuttgart), **2005**.
- [104] C. R. Nishida, P. R. Ortiz de Montellano, *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 338, 437.
- [105] A. V. Puchkaev, P. R. Ortiz de Montellano, *Arch Biochem Biophys* **2005**, 434, 169.
- [106] F. Blasco, I. Kauffmann, R. D. Schmid, *Appl Microbiol Biotechnol* **2004**, 64, 671.
- [107] V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, R. D. Schmid, A. I. Archakov, *Biosens Bioelectron* **2002**, 17, 233.
- [108] B. I. Ipe, C. M. Niemeyer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**.
- [109] H. Joo, Z. Lin, F. H. Arnold, *Nature* **1999**, 399, 670.
- [110] X. Fang, J. R. Halpert, *Drug Metab Dispos* **1996**, 24, 1282.
- [111] R. W. Estabrook, M. S. Shet, K. Faulkner, C. W. Fisher, *Endocr Res* **1996**, 22, 665.
- [112] U. Schwaneberg, D. Appel, J. Schmitt, R. D. Schmid, *J Biotechnol* **2000**, 84, 249.
- [113] F. Hollmann, A. Schmid, E. Steckhan, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, 40, 169.
- [114] F. Hollmann, P. C. Lin, B. Witholt, A. Schmid, *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 8209.
- [115] F. Hollmann, K. Hofstetter, T. Habicher, B. Hauer, A. Schmid, *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 6540.
- [116] V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, S. A. Usanov, R. D. Schmid, C. Nicolini, A. I. Archakov, *J Inorg Biochem* **2001**, 87, 185.
- [117] V. Reipa, M. P. Mayhew, V. L. Vilker, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, 94, 13554.
- [118] J. Kazlauskaitė, A. C. G. Westlake, L.-L. Wong, H. A. O. Hill, *Chem Commun* **1996**, 18, 2189.
- [119] B. D. Fleming, Y. Tian, S. G. Bell, L. L. Wong, V. Urlacher, H. A. Hill, *Eur J Biochem* **2003**, 270, 4082.

- [120] V. V. Shumyantseva, Y. D. Ivanov, N. Bistolas, F. W. Scheller, A. I. Archakov, U. Wollenberger, *Anal Chem* **2004**, *76*, 6046.
- [121] S. N. Daff, S. K. Chapman, K. L. Turner, R. A. Holt, S. Govindaraj, T. L. Poulos, A. W. Munro, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13816.
- [122] B. Munge, C. Estavillo, J. B. Schenkman, J. F. Rusling, *Chembiochem* **2003**, *4*, 82.
- [123] C. Estavillo, Z. Lu, I. Jansson, J. B. Schenkman, J. F. Rusling, *Biophys Chem* **2003**, *104*, 291.
- [124] M. Hara, S. Iazvovskaia, H. Ohkawa, Y. Asada, J. Miyake, *J Biosci Bioeng* **1999**, *87*, 793.
- [125] A. J. Bard, M. Stratmann, in *Bioelectrochemistry, Vol. 9* (Ed.: G. S. Wilson), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, p. 624.
- [126] F. Hollmann, B. Witholt, A. Schmid, *J Mol Cat B* **2002**, *791*, 1.
- [127] W. Hilt, G. Pfeleiderer, P. Fortnagel, *Biochim Biophys Acta* **1991**, *1076*, 298.
- [128] R. Wichmann, D. Vasic-Racki, *Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production* **2005**, *92*, 225.
- [129] F. Kaufmann, D. R. Lovley, *Journal of Bacteriology* **2001**, *183*, 4468.
- [130] I. Yamamoto, T. Saiki, S. M. Liu, L. G. Ljungdahl, *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 1826.
- [131] H. B. Anstall, J. M. Trujillo, *Am J Clin Pathol* **1967**, *47*, 296.
- [132] C. H. Wong, D. G. Drueckhammer, H. M. Sweers, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 4028.
- [133] T. Mitamura, I. Urabe, H. Okada, *Eur J Biochem* **1989**, *186*, 389.
- [134] M. Kataoka, L. P. Sri Rohani, M. Wada, K. Kita, H. Yanase, I. Urabe, S. Shimizu, *Biosci Biotechnol Biochem* **1998**, *62*, 167.
- [135] K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, A. M. Egorov, C. Wandrey, U. Kragl, *Tetrahedron Lett* **1996**, *37*, 1377.
- [136] T. W. Johannes, R. D. Woodyer, H. Zhao, *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*, 5728.
- [137] V. I. Tishkov, A. G. Galkin, A. M. Egorov, *Dokl Akad Nauk SSSR* **1991**, *317*, 745.
- [138] V. I. Tishkov, A. G. Galkin, G. N. Marchenko, Y. D. Tsygankov, A. M. Egorov, *Biotechnol Appl Biochem* **1993**, *18 (Pt 2)*, 201.
- [139] V. S. Lamzin, A. E. Aleshin, B. V. Strokopytov, M. G. Yukhnevich, V. O. Popov, E. H. Harutyunyan, K. S. Wilson, *Eur J Biochem* **1992**, *206*, 441.
- [140] V. S. Lamzin, Z. Dauter, V. O. Popov, E. H. Harutyunyan, K. S. Wilson, *J Mol Biol* **1994**, *236*, 759.
- [141] A. M. Rojkova, A. G. Galkin, L. B. Kulakova, A. E. Serov, P. A. Savitsky, V. V. Fedorchuk, V. I. Tishkov, *FEBS Lett* **1999**, *445*, 183.
- [142] V. I. Tishkov, A. G. Galkin, V. V. Fedorchuk, P. A. Savitsky, A. M. Rojkova, H. Gieren, M. R. Kula, *Biotechnol Bioeng* **1999**, *64*, 187.
- [143] L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [144] J. Y. Houg, J. S. Liao, *Biotechnol Lett* **2003**, *25*, 17.
- [145] M. M. Etschmann, D. Sell, J. Schrader, *Biotechnol Bioeng* **2005**, *92*, 624.
- [146] J. R. Falck, Y. K. Reddy, D. C. Haines, K. M. Reddy, U. M. Krishna, S. Graham, B. Murry, J. A. Peterson, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 4131.
- [147] U. Schwaneberg, Doktorarbeit, Universität Stuttgart, **1999**.
- [148] T. Omura, R. Sato, *J Biol Chem* **1964**, *239*, 2379.
- [149] S. Kunugi, Y. Murakami, K. Ikeda, N. Itoh, *Int J Biol Macromol* **1992**, *14*, 210.
- [150] K. Kühnel, Diploma thesis, University of Stuttgart (Stuttgart), **2005**.
- [151] P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2002**, *344*, 932.

- [152] S. Panke, B. Witholt, A. Schmid, M. G. Wubbolts, *Appl Environ Microbiol* **1998**, *64*, 3546.
- [153] K. Otto, K. Hofstetter, M. Rothlisberger, B. Witholt, A. Schmid, *J Bacteriol* **2004**, *186*, 5292.
- [154] S. Panke, M. Held, M. G. Wubbolts, B. Witholt, A. Schmid, *Biotechnol Bioeng* **2002**, *80*, 33.
- [155] R. V. Orru, K. Faber, *Curr Opin Chem Biol* **1999**, *3*, 16.
- [156] A. Celik, D. Sperandio, R. E. Speight, N. J. Turner, *Org Biomol Chem* **2005**, *3*, 2688.
- [157] K. Hofstetter, J. Lutz, I. Lang, B. Witholt, A. Schmid, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 2163.
- [158] J. Lutz, V. V. Mozhaev, Y. L. Khmelnitsky, B. Witholt, A. Schmid, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2002**, *19*, 177.
- [159] F. Zambianchi, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, J. M. Woodley, *Biotechnol Bioeng* **2002**, *78*, 489.
- [160] C. R. Otey, G. Bandara, J. Lalonde, K. Takahashi, F. H. Arnold, *Biotechnol Bioeng* **2006**, *93*, 494.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Steffen Christian Maurer
Anschrift	Bergstraße 30, 73525 Schwäbisch Gmünd
Geburtsdatum	20. 03. 1976, Esslingen a. N.
Familienstand	verheiratet seit 24. 05. 2005
Kinder	Zora Sophie Maurer, geb. 25. 02. 2003
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1982 – 1986	Grund- und Hauptschule Aichwald
1986 – 1995	Theodor-Heuss-Gymnasium, Esslingen a. N. Abschluss: Abitur (Note: 1,5)

Zivildienst

1995 – 1996	Feierabendheim Kennenburg / Johanniter- Unfall-Hilfe e. V., Esslingen a. N., Pflegerische Tätigkeit
--------------------	---

Hochschulausbildung

1997 – 2002	Studium der Chemie mit Wahlpflichtfach Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe- Universität, Frankfurt a. M.
10/1999	Auszeichnung mit dem Dr. Albert Hloch- Stiftungspreis für das beste Vordiplom

03/2002

Abschluss: Diplom-Chemiker (Gesamtnote: sehr gut)

Thema der Diplomarbeit: (Note: sehr gut)

„Expression, Aufreinigung und NMR-spektroskopische Untersuchungen an der DFPase aus *Loligo vulgaris*“ angefertigt am Institut für Biophysikalische Chemie, Prof. Dr. Heinz Rüterjans, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a. M.

seit 05/2002

Promotionsstudium Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie, Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Thema der Dissertation:

„Verwendung der Cytochrom P450 Monooxygenase CYP102A1 in der präparativen zellfreien Biokatalyse“

Berufliche Erfahrung

09 - 10/1998

Werkstudent Hoechst AG, Frankfurt a. M.

09 - 10/1999

Werkstudent Hoechst AG, Frankfurt a. M.

09 - 10/2000

Wissenschaftliche Hilfskraft, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M., Institut für Organische Chemie, Prof. Dr. Christian Griesinger

seit 05/2002

Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart

Betreuung mehrerer Studien- und Diplomarbeiten im Rahmen des Dissertationsprojekts.

11/2005

Forschungsaufenthalt bei der BASF AG, Ludwigshafen

Auslandsaufenthalte

12/1996 – 03/1997

Arbeitsaufenthalt in London, GB

10/2004

Aufenthalt in Hangzhou, China im Rahmen des DAAD-Projekts „Fatty acid hydroxylase from *Bacillus megaterium* (P450 BM-3) for polyestersynthesis: directed evolution of monooxygenase for organic co-solvents at higher temperatures”

10/2005

Vortrag „Cytochrome P450 Monooxygenases in Biotechnology: CYP102A1 as a Platform for Hydroxylation and Epoxidation Reactions” auf dem „International Symposium of Biocatalysis and Biotechnology 2005” in Taichung, Taiwan

Publikationen

11/2001

Löhr F., Schmidt J. M., Maurer S., Rüterjans H.; *J. Magn. Reson.* 2001, 153 (1): 75 - 82

06/2003

Maurer S. C., Schmid R. D., Urlacher V.; *Adv. Synth. Catal.* 2003, 345: 802 – 810

12/2004

Budde M., Maurer S. C., Schmid R. D., Urlacher V. B.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 66(2):180 - 186.

06/2005

Maurer, S. C., Kühnel, K., Kaysser L. A., Eiben, S., Schmid, R. D., Urlacher, V. B.; *Adv. Synth. Catal.* 2005, 347: 1090 - 1098

06/2005

Katsemi, V., Lücke, C., Koepke, J., Löhr, F., Maurer, S., Fritsch, G., Rüterjans, H., *Biochemistry* 2005, 44(25): 9022-9033

Patent

07/2004

Hauer, B., Habicher, T., Schmid, R., Maurer, S. C., Urlacher, V. B., Schulze, H., Huber, N., Bachmann, T. T.

PCT Int. Appl. 2004, WO 2004099398

CAN 141:409884 AN 2004:996318

Buchbeitrag

2005

Maurer, S. und Schmid R. D.; "Biocatalysts for the Epoxidation and Hydroxylation of Fatty Acids and Fatty Alcohols" in Handbook of Industrial Biocatalysis; 4-1 bis 4-25, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA