

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR SELEKTIVEN ENZYMATISCHEN HYDROXYLIERUNG
VON FETTSÄUREN**

VON DER FAKULTÄT ENERGIE-, VERFAHRENS- UND BIOTECHNIK DER
UNIVERSITÄT STUTTGART ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) GENEHMIGTE ABHANDLUNG

VORGELEGT VON
MATTHIAS DIETRICH
AUS KARLSRUHE

HAUPTBERICHTER: PROF. DR. ROLF D. SCHMID
MITBERICHTER: PROF. DR. GEORG SPRENGER

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 29. Juli 2008

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART

Eidesstattliche Erklärung

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

Stuttgart, den 14.05.2008 _____

(Matthias Dietrich)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas, sein stetiges Interesse, seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen am ITB.

Herrn Prof. Dr. Georg Sprenger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. Vlada Urlacher danke ich für ihren persönlichen Einsatz und die fachlichen Diskussionen, die wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Von besonderem Wert waren für mich die ständigen Anregungen, konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft von Dr. Daniel Appel, Dr. Michael Budde, Dr. Sabine Eiben, Katja Koschorreck, Dr. Luo Liu und M. eng. Sven Richter, dafür gilt ihnen mein herzlichster Dank.

Den Kollegen der Bioinformatikgruppe Tuan Anh Do und Alexander Seifert danke ich für interessante Diskussionen im Bereich der Strukturbiologie und für die Erstellung verschiedener Abbildungen von P450 Monooxygenasen.

Ich danke Marco Girhard, Dirk Schmid und Peter Staffelt für ihren Einsatz in ihren Forschungspraktika.

Svetlana Tihovsky danke ich für ihre Mitarbeit im Rahmen ihrer Studienarbeit.

Für das sehr gute Arbeitsklima und angenehme Zusammenarbeit danke ich allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts.

Tao Ge, Bo Li, Yan Li und XiaoYu Tang danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des Desaturaseprojekts und ihre Hilfestellungen während meines Aufenthaltes in Nanjing.

Für die Zusammenarbeit im Lacton- und Sesquiterpenprojekt danke ich Dr. Jens Schrader (Dechema e. V.) und Dr. Dirk Holtmann (Dechema e. V.).

Dr. Jürgen Rabenhorst (Symrise AG) danke ich für die Zusammenarbeit im Lactonprojekt.

Prof. He, Prof. Jiang und Prof. Ouyang danke ich für die freundliche Aufnahme an der Nanjing University of Technology.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	XIII
ABSTRACT	XV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Weiße Biotechnologie	1
1.1.1 Bulkchemikalien.....	1
1.1.2 Feinchemikalien.....	3
1.1.3 Geruchs- und Aromastoffe.....	3
1.1.4 Fettsäuren	5
1.1.5 Enzyme in der Biokatalyse	6
1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen	6
1.2.1 Nomenklatur	7
1.2.2 Struktur	7
1.2.3 Katalysemechanismus.....	10
1.2.4 Katalysierte Reaktionen.....	13
1.2.5 Die Familie CYP102A	16
1.2.6 Die Familie CYP152A	19
1.2.7 Spektroskopische Charakterisierung von P450 Monooxygenasen.....	21
1.2.8 Elektronentransfersysteme	23
1.2.9 Anwendung von P450 Monooxygenasen	28
1.3 Gezielte Verbesserung von Biokatalysatoren	30
1.3.1 Rationales Protein-Design	30
1.3.2 Gerichtete Evolution	31
1.3.3 Hochdurchsatzscreening	33
1.3.4 Veränderung von Eigenschaften von P450 Monooxygenasen	36
1.4 Zielsetzung	37

2	MATERIAL UND METHODEN	38
2.1	Chemikalien und Enzyme.....	38
2.2	Geräte und Verbrauchsgegenstände	39
2.3	Stämme, Oligonukleotide, Plasmide	42
2.3.1	Bakterienstämme.....	42
2.3.2	Oligonukleotide.....	42
2.3.3	Plasmide.....	45
2.4	Medien, Lösungen, Puffer	46
2.4.1	Medien.....	46
2.4.2	Puffer und Lösungen	47
2.5	Mikrobiologische Methoden	54
2.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	54
2.5.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Expressionsplasmiden.....	55
2.5.3	Induktion und Expression von pET28a(+)-Konstrukten	57
2.6	Molekularbiologische Methoden	57
2.6.1	Aufreinigung von DNA nach Restriktionsverdauung oder PCR	57
2.6.2	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	58
2.6.3	Enzymatische Verfahren mit DNA	59
2.6.4	Fragmentisolation aus Agarosegelen	61
2.6.5	Methoden zur Isolation von DNA	61
2.6.6	Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA.....	62
2.6.7	Sequenzierungen.....	70
2.7	Biochemische Methoden.....	70
2.7.1	Zellaufschluss.....	70
2.7.2	Bestimmung der P450-Konzentration	70
2.7.3	Chromatographischer Nachweis der Flavocytochrome	72
2.7.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	72
2.7.5	Proteinbestimmung.....	73
2.7.6	Automatische Zellvereinzlung mit dem Pickroboter	74
2.7.7	Proteinaufreinigung.....	75

2.7.8	Aktivitätstests.....	75
2.7.9	Bindungsstudien	77
2.8	Analytische Methoden.....	77
2.8.1	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....	77
2.8.2	Nasschemische Nachweise	80
2.9	Organische Synthese	81
2.9.1	Synthese der Surrogatsubstrate	81
3	ERGEBNISSE	86
3.1	Durchmusterung von Ausgangsmutanten von CYP102A1	86
3.1.1	Durchmusterung nach Aktivität gegenüber Fettsäuren.....	86
3.1.2	Analyse der Regioselektivität der Ausgangsmutanten.....	88
3.2	Sättigungsmutagenese	92
3.3	Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen Assays	95
3.3.1	Untersuchung einfacher Farbreaktionen in wässrigem Medium als Nachweis für Lactone.....	96
3.3.2	Entwicklung eines spektroskopischen Nachweises für die regiospezifische Hydroxylierung von Fettsäuren in δ -Position	98
3.4	Gerichtete Evolution.....	102
3.4.1	Herstellung einer Mutantenbibliothek.....	104
3.4.2	Analyse der Mutantenbibliothek.....	105
3.5	Protein-Design	107
3.6	Klonierung, Expression und Mutagenese von CYP152A1	112
3.6.1	Subklonierung von CYP152A1 in den Expressionsvektor pET28a(+)	112
3.6.2	Expression von CYP152A1 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	112
3.6.3	Regioselektivität von CYP152A1	113
3.6.4	Protein-Design mit CYP152A1.....	114
3.7	Expression und Charakterisierung von CYP102A7 aus <i>Bacillus licheniformis</i>.....	116

3.7.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung.....	116
3.7.2	Spektroskopische Charakterisierung von CYP102A7.....	117
3.7.3	Screening nach Substraten	118
3.7.4	Kinetische Untersuchungen und Bindungskonstanten.....	119
3.7.5	Identifizierung der verschiedenen Produkte.....	120
3.7.6	Enzymstabilität.....	122
4	DISKUSSION.....	124
4.1	Entwicklung von CYP102A1 zu einer γ-δ-Laurinsäure-Hydroxylase.....	125
4.1.1	Durchmusterung der CYP102A1-Ausgangsmutanten, Sättigungsmutagenese	125
4.1.2	Gerichtete Evolution	128
4.1.3	Rationales Protein-Design	130
4.2	Rationales Protein-Design von CYP152A1	131
4.3	Charakterisierung von CYP102A7	132
4.4	Ausblick.....	134
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	136
	LEBENS LAUF.....	149

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Amp	Ampicillin
ALA	5-Aminolävulinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase; engl. Phosphatase aus Kälberdarm
CYP	Cytochrom P450
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
dH ₂ O	einfach deionisiertes Wasser
dITP	2'-Desoxyinosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eq	konstante Teilchenzahl im System
et al.	et alii (lateinisch; und andere)
EtOH	Ethanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid

FMN	Flavinadeninmononukleotid
*g	Beschleunigung einer Zentrifuge als Vielfaches der Erdanziehungskraft
GC-MS	Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie
h	Stunde
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropylbetathiogalaktosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
k_{cat}	Wechselzahl
Da	Dalton
K_i	Kaliumphosphatpuffer
K_M	Michaelis-Konstante
LB	Luria-Bertani
M	molar (1 mol l^{-1})
m	Meter
min	Minute
m/V	Masse/Volumen
NAD(P)H	β -Nicotinamidadenindinukleotid (-phosphat)
n	nano (10^{-9})
NTA	Nitrilotriessigsäure
n. b.	nicht bestimmt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

OD _{XYZ}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge XYZ
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
T ₅₀	Temperatur, bei der 50%ige Inaktivierung nach 30 minütiger Inkubation eintritt
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TB	Terrific Broth
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
Vol	Volumenanteil
vs.	versus (lateinisch; gegenüber, gegen)
V/V	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
ε	Extinktionskoeffizient
μ	mikro (10 ⁻⁶)

DNA-Basen

A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

Zusammenfassung

Ziel der vorgelegten Arbeit war die Untersuchung der enzymatischen Oxidation von Fettsäuren mit P450 Monooxygenasen. Dabei stand die Hydroxylierung von gesättigten Fettsäuren bzw. die Veränderung der Hydroxylierungsposition im Vordergrund. Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) können molekularen Sauerstoff unter Aufnahme von zwei Elektronen aktivieren, wodurch ein Sauerstoffatom auf ein Substrat-Molekül übertragen wird, das andere Sauerstoffatom tritt bei der Reaktion in Form von Wasser aus [1]. Die Elektronen für die Katalyse stammen von Cofaktoren (meist NADH oder NADPH) und werden mittels Elektronentransferproteinen auf das Hämeisen von P450 Monooxygenasen übertragen [2].

Im Gegensatz zu den meisten anderen P450-Enzymen sind die Enzyme der Subfamilien CYP102A und CYP152A nicht von Redoxproteinen abhängig. Bei CYP102A-Enzymen handelt es sich um Fusionsproteine, die aus einer Monooxygenase- und einer FAD/FMN-enhaltenden Reduktasedomäne bestehen [3]. Die Elektronen werden vom Cofaktor NADPH auf die Reduktase übertragen. Der schnelle Elektronentransfer im CYP102A-System führt bei der Umsetzung mit natürlichen Substraten (mittel- und langkettige Fettsäuren) zu den höchsten für P450 Monooxygenasen gemessenen Umsatzraten ($>1000 \text{ min}^{-1}$) [4].

Bei CYP152A1 handelt es sich genau genommen um eine Peroxygenase, die Wasserstoffperoxid als Elektronen- und Sauerstoffquelle nutzt [5]. Mit langsameren Raten ist jedoch auch eine Katalyse mit molekularem Sauerstoff unter Verwendung von Elektronentransferproteinen möglich [6].

Die CYP102A-Enzyme und CYP152A1 unterscheiden sich in der Regioselektivität der katalysierten Hydroxylierung. Während CYP102A-Enzyme Fettsäuren in subterminalen Positionen (ω -1 bis ω -3) hydroxylieren, erfolgt durch CYP152A1 die Hydroxylierung in α - und β -Position. Die Verschiebung der Hydroxylierung der Capryl-, Caprin- und Laurinsäure nach γ - und δ -Position würde in Hydroxysäuren resultieren, die direkte Vorläufer von Lactonen darstellen. Lactone sind interessante Geruchs- und Aromastoffe mit fruchtigem Charakter (Pfirsich, Kokosnuss).

Für CYP152A1 wurden mit Hilfe des rationalen Protein-Designs verschiedene Mutanten erstellt, die eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Fettsäurebindestelle enthalten. Allerdings erwies sich nur der CYP152A1-Wildtyp als aktiv. Die erstellten Mutanten ließen sich zum Teil exprimieren, waren jedoch für die Umsetzung von Fettsäuren nicht

produktiv. CYP102A7 ließ sich erfolgreich exprimieren und konnte in dieser Arbeit charakterisiert werden. CYP102A7 hydroxyliert Fettsäuren hauptsächlich in ω -2-Position, daneben werden noch ω -1- und ω -3-Position hydroxyliert. Daher ist CYP102A7 nicht für die Entwicklung einer γ - oder δ -Hydroxylase prädestiniert. In Gegenwart des polaren Lösungsvermittlers DMSO zeigt CYP102A7 hohe Aktivität. Die Stabilität gegenüber Lösungsvermittlern ist besonders interessant für die Entwicklung von Prozessen mit hydrophoben Substraten. Neben Fettsäuren akzeptiert CYP102A7 auch Terpenoide als Substrate.

Es wurden bereits zahlreiche Untersuchungen an CYP102A1 (P450 BM3) durchgeführt. Verschiedene Kristallstrukturen (mit und ohne Substrat komplexiert) machen das Enzym zugänglich für Methoden des rationalen Protein-Designs.

Um die Regioselektivität der Fettsäurehydroxylierung von ω -1- bis ω -3-Position in Richtung γ - und δ -Position zu verschieben, wurden Methoden der gerichteten Evolution und des rationalen Protein-Designs angewendet. Mit Hilfe eines in der Arbeit entwickelten Assays, mit dem über 6000 Mutanten analysiert wurden, war es nicht möglich eine wesentliche Verschiebung im Vergleich zum Ausgangsenzym zu erhalten. Allerdings wurden durch rationales Protein-Design Positionen identifiziert, die für eine zielgerichtete Veränderung des Produktmusters vorteilhaft sind. Mit der Mutante S72Y V78A F87A wurden, gemessen am Gesamtprodukt, 16% δ -, 5% γ - und 9% β -Hydroxylaurinsäure erzeugt.

Abstract

The aim of this work was the investigation of the enzymatic oxidation of fatty acids for the production of commercially interesting compounds e. g. hydroxy fatty acids for lactone synthesis. As target enzymes Cytochrome P450 monooxygenases were investigated.

Cytochrome P450 monooxygenases are highly versatile biocatalysts. They are able to carry out different oxidation reactions like the epoxidation and hydroxylation of aliphatic and aromatic hydrocarbons as well as dealkylation reactions. Their ability to insert oxygen into non-activated C-H-bonds is one of the potentially most useful catalytic reactions which cannot be addressed chemically, yet [1]. Nevertheless, P450-catalysed reactions on an industrial scale have so far only been implemented in whole cell biotransformations.

P450 monooxygenases activate molecular oxygen. In the course of the reaction a two-electron reduction of the active site heme iron occurs. One oxygen atom is inserted into a substrate and the second oxygen atom is reduced to water. Electrons employed in catalysis are delivered from cofactors (usually NAD(P)H) and are transferred to the active site heme iron via electron transfer proteins [2].

The use of CYP102A enzymes simplifies the P450 system, because these enzymes are fusion enzymes consisting of a monooxygenase and a FAD/FMN containing reductase domain in one polypeptide chain [3]. The very efficient electron transfer in CYP102A enzymes leads to the highest turnover numbers measured for P450s so far ($>1000 \text{ min}^{-1}$) [4].

CYP152A1 was investigated in the thesis as well. It is a peroxygenase utilising hydrogen peroxide as an electron and oxygen source. This simplifies the P450 system compared to CYP102A enzymes since there is no need for the expensive cofactor NADPH [5].

CYP102A enzymes and CYP152A1 differ in regioselectivity of fatty acid hydroxylation. CYP152A1 catalyses hydroxylation mainly in β -position while CYP102A enzymes catalyse hydroxylation of fatty acids in subterminal positions (i. e. $\omega-1$ to $\omega-3$).

A change of the hydroxylation positions to γ - and δ -position leads to hydroxy fatty acids that are direct precursors for lactone synthesis. Lactones are flavours and fragrances having a fruity note (peach, coconut).

In the case of CYP152A1 different mutants were created which contained an altered fatty acid binding site. However, only the wild type enzyme showed activity.

CYP102A7 was expressed actively and characterised in this work. CYP102A7 hydroxylated fatty acids mainly at ω -2-position. ω -1-and ω -3-positions are hydroxylated in minor amounts. Therefore CYP102A7 was not suitable for evolving a γ - δ -hydroxylase. However CYP102A7 has some biotechnological potential for other reasons. In the presence of DMSO CYP102A7 shows high activity which is favourable to the implementation of processes using hydrophobic substrates. Besides fatty acids CYP102A7 also accepts terpenoids (e. g. limonene, geranylacetone and nerylacetone).

In contrast to CYP102A7 different crystal structures of CYP102A1 are available, which makes a rational protein design feasible.

To change regioselectivity of fatty acid hydroxylation from ω -1- and ω -3- to γ - and δ -position, methods of directed evolution and protein design were applied. After the development of a regiospecific hydroxylation assay over 6000 mutants of a CYP102A1 enzyme library were screened but no substantial change in regioselectivity was achieved.

Using rational protein design different positions in CYP102A1 were identified which proved to be beneficial to a desired change in regioselectivity. Hydroxylation of lauric acid with CYP102A1 mutant S72Y V78A F87A resulted in 16% δ -, 5% γ - and 9% β -hydroxy lauric acid.

1 Einleitung

1.1 Weiße Biotechnologie

Weiße oder industrielle Biotechnologie nutzt das Potenzial der Natur zur Produktion von Chemikalien und Arzneimitteln. Daher ergibt sich mit ihr die Möglichkeit, Herausforderungen, die sich in Industriegesellschaften ergeben, zu begegnen. Historisch gesehen hat die weiße Biotechnologie einen Vorläufer in der Herstellung fermentierter Lebensmittel wie zum Beispiel der Bier-, Tofu-, Kimchiherstellung oder der Verarbeitung von Milch zu Milchprodukten wie Käse. Die Entwicklung der weißen Biotechnologie zur Ergänzung der klassischen Chemieindustrie wird von verschiedenen Stellen positiv eingeschätzt. McKinsey prognostiziert, dass 2010 20% aller Chemikalien biotechnologisch hergestellt werden (Stand 2006: 5%) [7]. Das Marktvolumen liegt bei ca. 310 Milliarden US-Dollar.

Vorraussetzung für den zunehmenden Wechsel zu biotechnologischen Verfahrensweisen sind ökonomische Gesichtspunkte. Sie umfassen Prozessvereinfachungen, Einsparungen von Rohstoffen und Energieeinsatz, Vereinfachungen in der Produktaufarbeitung und –aufreinigung und die Verringerung von Energiekosten und Abfallströmen. Prozesse der weißen Biotechnologie haben den Vorteil, dass sie im Vergleich zu chemischen Verfahren umweltschonend durchgeführt werden können. In der Regel werden Enzymreaktionen bzw. Biotransformationen in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur, Atmosphärendruck und neutralem pH-Wert durchgeführt.

1.1.1 Bulkchemikalien

Als Bulkchemikalien bezeichnet man Chemikalien, deren Produktion bei über 10000 t/a liegt. Eingesetzt werden solche Produkte in der Nahrungsmittel- und Futtermittelindustrie sowie im Pharmabereich. Erfolgreiche Beispiele für die Etablierung biotechnologischer Verfahren liegen beispielsweise in der Produktion von Aminosäuren (L-Glutaminsäure, L-Lysin), Carbonsäuren (L-Milchsäure, Zitronensäure) und der Produktion von Vitaminen (Riboflavin, Vitamin C) [8].

Die Umstellung von einem klassisch chemischen zu einem biotechnologischen Prozess kann bei entsprechender Wirtschaftlichkeit sehr schnell erfolgen. Im Fall der

Riboflavinproduktion gelang es, in weniger als fünf Jahren auf biotechnologische Produktion umzustellen, wobei die Kosten um 50% reduziert werden konnten. Eine Übersicht über biotechnologisch hergestellte Produkte ist in Tabelle 1-1 gegeben.

Tabelle 1-1: Produkte der industriellen Biotechnologie [9]

Produkt	Welt- produktion [kt/a]	Welt- marktpreis [€/kg]	Anwendung
Aminosäuren			
L-Asparaginsäure	13	k. A.	Süßstoff
L-Glutaminsäure	1500	1,2	Geschmacksverstärker
L-Lysin	700	2	Futtermittelzusatz
L-Phenylalanin	10	10	Süßstoff, Medizin
L-Threonin	30	6	Futtermittelzusatz
Antibiotika			
Cephalosporine	30	k. A.	Medizin, Futtermittelzusatz
Penicilline	45	300	Medizin, Futtermittelzusatz
Lösungsmittel			
Aceton	3000	k. A.	Lösungsmittel
Bioethanol	18500	0,4	Lösungsmittel, Grundchemikalie, Energieträger
1-Butanol	1200	k. A.	Lösungsmittel
Biopolymere			
Polylactid	140	2,25	medizinische Anwendung, Verpackungen
Xanthan	40	8,4	Verdickungsmittel
Säuren			
Gluconsäure	100	1,5	Lebensmittel, Textil, Metall, Bau

Milchsäure	150	1,8	Lebensmittel, Leder, Textil
Zitronensäure	1000	0,8	Medizin, Lebensmittel, Metall, Waschmittel
Vitamine			
L-Sorbose	50	k. A.	Vitamin C-Vorstufe
Riboflavin	30	k. A.	Vorstufe für Flavin-Coenzyme
Vitamin C	80	8	Antioxidans

1.1.2 Feinchemikalien

Unter Feinchemikalien und Spezialitäten werden Produkte verstanden, deren Marktbedarf bei unter 10000 Tonnen pro Jahr liegen. Diese Produkte weisen oft eine hohe Chiralität auf und besitzen mehrere funktionelle Gruppen. Laut einer Prognose von McKinsey & Company (2003) geht man davon aus, dass im Jahr 2010 bei der Synthese von 30-60% aller Feinchemikalien ein biotechnologischer Prozess integriert sein wird [7].

Der Bereich Feinchemikalien lässt sich gut mit Methoden der weißen Biotechnologie erschließen. Man nutzt hierbei die Enantioselektivität von enzymkatalysierten Reaktionen zur Synthese chiraler Substanzen. Diese sind wichtige Ausgangsstoffe für Arzneimittel, Agrochemikalien, Flüssigkristalle und weitere Feinchemikalien. Eine Umfrage aus dem Jahr 2003 ergab, dass in 22 von 38 industriell durchgeführten asymmetrischen Synthesen Techniken der weißen Biotechnologie verwendet wurden [10].

1.1.3 Geruchs- und Aromastoffe

Geruchs- und Aromastoffe werden klassisch durch Extraktion aus pflanzlichen oder tierischen Ausgangsstoffen gewonnen. Inzwischen ist es jedoch möglich verschiedene Geruchs- und Aromastoffe biotechnologisch herzustellen. Das Spektrum umfasst Terpene und Terpenoide, Lactone, Carbonsäuren, Aldehyde und Alkohole (so genannte „Grüne Noten“). Ein klarer Vorteil der Biosynthese ist die hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität enzymatisch katalysierter Reaktionen. Darüber hinaus haben

biotechnologisch erzeugte Geruchs- und Aromastoffe, die strukturell den Zielsubstanzen entsprechen, den Status natürlicher Geruchs- und Aromastoffe und damit den Vorteil hoher Verbraucherakzeptanz und somit einen Marktvorteil. Laut der Neufassung der Aromenverordnung von 2006 sind natürliche Aromen "chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden".

Werden dieselben Geruchs- und Aromastoffe durch chemische Synthese erzeugt, gelten sie nicht als natürliche Geruchs- und Aromastoffe. Sie müssen als naturidentisch deklariert werden. Aufgrund geringerer Verbraucherakzeptanz sind naturidentische Geruchs- und Aromastoffe günstiger als natürliche Geruchs- und Aromastoffe. Der Marktpreis natürlicher Aromen ist oft bis zu einem Faktor 100 größer als der naturidentischer Verbindungen [11].

γ -Decalacton ist das wichtigste Lacton im Bereich der Geschmacksstoffe. Das Marktvolumen liegt bei mehreren Tonnen pro Jahr. Der Geschmack hat deutlichen Pfirsichcharakter. In den frühen 1980er Jahren lag der Marktpreis für den natürlichen Geschmacksstoff bei über 10000 US Dollar pro kg. Die Entwicklung eines mikrobiellen Prozesses mit Ricinolsäure als Vorläufersubstanz mit verschiedenen Pilzen wie zum Beispiel *Yarrowia lipolytica* führte zu einer drastischen Preisreduzierung auf 300 US Dollar pro kg. Ricinolsäure wird im Prozess in vier nacheinander ablaufenden β -Oxidationen und einer Reduktion zu 4-Hydroxydecansäure umgesetzt, die bei niedrigen pH-Werten spontan zu γ -Decalacton lactonisiert [12]. In Produktionsprozessen konnten bis zu 11 g Produkt pro Liter Fermentationsbrühe in 55 h erzielt werden, als Ausgangsstoff wurde Rizinusöl eingesetzt [13].

In Zukunft werden innovative Prozesse zur biotechnologischen Herstellung von Geruchsstoffen die großen Entwicklungen im Bereich der Biowissenschaften, wie der funktionellen Genomik, Proteomik, des Protein-Designs und des Metabolic Engineering nutzen und so zu verbesserten Prozessen führen. Die fortschreitende Aufklärung ganzer Pflanzengenome bietet eine neue Möglichkeit, Stoffwechselwege in der Biosynthese von Geruchsstoffen aufzuklären und diese dann in Mikroorganismen nachzubilden.

Beispielsweise wurde der Biosyntheseweg zur Valencenherstellung in Orangen in *E. coli* kloniert, was die Herstellung einer wichtigen Vorstufe des Grapefruitaromas ermöglicht [14, 15]. Die Synthese von γ -Decalacton ist momentan von Importrohstoffen aus tropischen Anbauregionen abhängig. Von dort wird das Rizinusöl bezogen, dessen Hauptkomponente Ricinolsäure (12-(*R*)-Hydroxy-9,10-cis-octadecensäure) den Ausgangsstoff für die biotechnologische γ -Decalacton-Herstellung bildet.

1.1.4 Fettsäuren

Fettsäuren haben neben Glycerin Hauptanteil an der Bildung von Glycerolipiden in Membranen [16]. Fettsäuren sind Monocarbonsäuren und kommen in Lipiden ab einer Länge von vier Kohlenstoffatomen vor. Über tausend verschiedene Fettsäuren sind bekannt, allein in Kuhmilch wurden über 500 verschiedene Fettsäuren identifiziert.

Ein Großteil der Fettsäuren in Membranen liegt ungesättigt vor und enthält somit eine oder mehrere Doppelbindungen in seiner Alkylkette. Der Sättigungsgrad hat einen physikalischen Einfluss auf die Eigenschaften von Fettsäuren und Membranlipiden. Ungesättigte Fettsäuren werden aus gesättigten Fettsäuren über Fettsäure-Desaturasen synthetisiert, diese oxidieren Einfachbindungen zu Doppelbindungen. Der Sättigungsgrad wird genetisch und umweltbedingt reguliert, wobei die Temperatur hierbei eine wesentliche Rolle spielt [17]. Bei einer Erniedrigung der Temperatur zeigen fast alle wechselwarmen Organismen auch Cyanobakterien und Bakterien einen erhöhten Anteil an ungesättigten Fettsäuren, um die Fluidität von Membranen aufrechtzuerhalten.

Verschiedene Fettsäuren sind essentiell und müssen mit der Nahrung zugeführt werden. Hierbei handelt es sich um mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Die Forschung an Fettsäuren ist zum großen Teil fokussiert auf Fettsäuren als Bestandteile von Lipiden. Allerdings haben Fettsäuren auch weitere Funktionen und wechselwirken beispielsweise mit dem Zellkern.

Als Vorläufer von Dicarbonsäuren sind Fettsäuren für die Polymerchemie von Interesse. Dicarbonsäuren eignen sich für die Synthese von Polyestern und Polyamiden.

Neben Dicarbonsäuren können auch Hydroxyfettsäuren als Bausteine zur Polymersynthese verwendet werden. Die Hydroxylierung von Fettsäuren erfolgt durch P450 Monooxygenasen (siehe 1.2). Neben dem Einsatz als Polymerbausteine besitzen Hydroxyfettsäuren noch Potenzial als Bestandteile in der Antibiotikasynthese [18].

Hydroxyfettsäuren können durch Ringschluss lactonisiert werden und als Geruchs- und Aromastoffe Verwendung finden (siehe 1.1.3).

1.1.5 Enzyme in der Biokatalyse

Es gibt viele Beispiele für die technische Verwendung von Enzymen, besonders in der organischen Synthese [19-21], wobei mehrere Prozesse inzwischen auch industriell genutzt werden [22]. Typische Charakteristika von Enzymen machen sie oft überlegen gegenüber herkömmlichen Katalysatoren. Die Vorteile liegen in einer hohen Chemo-, Regio- und Enantioselektivität und dem möglichen Einsatz bei Raumtemperatur. Dazu sind biotechnologische Prozesse meist ökologisch unbedenklicher als klassisch chemische Prozesse. Momentan liegt der Haupteinsatzbereich für Enzyme in der Waschmittelindustrie (32%). Ein Fünftel der verfügbaren Enzyme wird in technischen Prozessen eingesetzt. Darüber hinaus werden sie verwendet für die Herstellung von Lebensmitteln (33%) und Futtermitteln (11%).

Enzyme von technischer Relevanz gehören zu den Enzymklassen der Hydrolasen, Isomerasen, Oxidoreduktasen, Lyasen und Transferasen. Gemessen an der Menge stellen dabei die Hydrolasen die wichtigste Gruppe dar. Zu ihnen gehören Amylasen, Cellulasen, Pektinasen, Chitinasen, Phytasen, Lipasen, Proteasen, Nitrilasen und Amidasen. Sie finden unter anderem Einsatz als Waschmittelenzyme oder in der Getränkeindustrie.

Industrierelevant sind auch Oxidoreduktasen, die die Oxidation von nichtaktivierten Kohlenstoffatomen oder Kopplungsreaktionen katalysieren.

1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen (E. C. 1.14.14.1) sind Redoxenzyme. Sie gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen (E.C. 1.14.x.y) und stellen eine der größten Enzymsuperfamilien dar [23]. Die Enzyme tragen ihren Namen aufgrund charakteristischer spektraler Eigenschaften. P450 Monooxygenasen zeigen nach Begasung des reduzierten Enzyms mit Kohlenstoffmonoxid ein Absorptionsmaximum bei 450 nm [24]. P450 Monooxygenasen sind in der Natur weit verbreitet und kommen in allen Reichen des Lebens (Tiere, Pflanzen, Pilze, Bakterien, Protisten, Archaeen) vor. Sie katalysieren Schlüsselreaktionen im Stoffwechsel exo- und endogener

Verbindungen. Im Allgemeinen handelt es sich um die Aktivierung von molekularem Sauerstoff zur Oxidation unterschiedlichster Substrate. Die Aktivierung erfolgt unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten, die meist in Form der Cofaktoren NADH oder NADPH bereitgestellt werden. Über 8000 bekannte Enzyme gehören zu den P450 Monooxygenasen; damit ist die Familie der P450 Monooxygenasen eine der größten Enzymfamilien (<http://drnelson.utmem.edu/p450stats.Feb2008.htm>).

Allein in *Arabidopsis thaliana* einem Modellorganismus für Pflanzen wurden über 250 P450 Monooxygenasen entdeckt (<http://www.cyped.uni-stuttgart.de>). In der Literatur werden P450 Monooxygenasen als sehr vielseitige Enzyme beschrieben, die ein breites Substratspektrum akzeptieren. Teils werden Reaktionen regio- und stereoselektiv katalysiert (z. B. Steroidbiosynthese), teils erfolgen die Oxidationsreaktionen unselektiv.

1.2.1 Nomenklatur

Der Begriff Cytochrom wird für viele verschiedene Redoxproteine und Enzyme verwendet. Einzige Gemeinsamkeit dieser Proteine ist das Häm als prosthetische Gruppe. Die Proteine unterscheiden sich jedoch sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur. Zur eindeutigen Charakterisierung der P450 Monooxygenasen wird der Begriff Häm-Thiolat-Enzyme bevorzugt [25]. Im Unterschied zu anderen Cytochromen, die über ein Histidin mit dem Häm verbunden sind, ist der Ligand bei P450 Monooxygenasen ein Cysteinat. Das Nomenklatorsystem für P450 Monooxygenasen nutzt den Begriff CYP als Abkürzung für Cytochrom P450. Wird der Ausdruck kursiv dargestellt, bezieht man sich auf das entsprechende Gen [26, 27]. Auf den Begriff CYP folgt eine arabische Zahl, die Aufschluss über die Proteinfamilie gibt. Darauf folgt ein Großbuchstabe, der die Unterfamilie bezeichnet. Eine weitere arabische Zahl bezeichnet das jeweilige Enzym. Die Nomenklatur von P450 Monooxygenasen richtet sich nach der Sequenzidentität. Proteine mit einer Identität von über 40% gehören zur selben Familie. Mitglieder von Unterfamilien haben über 55% Sequenzidentität.

1.2.2 Struktur

P450 Monooxygenasen unterscheiden sich stark in ihrer Primärstruktur und weisen zum Teil nur geringe Sequenzidentitäten auf. Die erste publizierte Kristallstruktur von P450

Monooxygenasen (1987) ist die von P450cam (CYP101) aus *Pseudomonas putida*, einer Campher-5-exo-Hydroxylase [28]. Sie katalysiert den ersten Schritt im Abbau von Campher und ermöglicht dem Bakterium auf Campher als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. 1993 wurde die Kristallstruktur von CYP102A1 veröffentlicht [29]. Mittlerweile sind über 150 Strukturen gelöst, die von über 20 verschiedenen P450 Monooxygenasen stammen.

Der Vergleich der Strukturen zeigt, dass das einzigartige Faltungsmuster und somit die Abfolge der Sekundärstrukturelemente der verschiedenen Monooxygenasen stark konserviert ist, obwohl die Sequenzen teilweise zu weniger als 20% übereinstimmen. Alle P450-Strukturen, die gelöst wurden, zeigen das typische P450-Faltungsmuster. P450 Monooxygenasen lassen sich in zwei Domänen unterteilen (Abbildung 1-1). Eine Domäne besteht überwiegend aus β -Faltblättern und macht 22% des Enzyms aus, wohingegen die andere Domäne (ca. 70% des Proteins) überwiegend α -helikal aufgebaut ist. Die α -Domäne besteht aus den Helices B' bis K, Helix L und den β -Faltblättern β_3 , β_4 und β_5 . Die β -Domäne umfasst die β -Faltblätter β_1 und β_2 und die Helices A, B und K'. Obwohl das Faltungsmuster konserviert ist, weichen einzelne Anordnungen struktureller Elemente voneinander ab. Im Allgemeinen ist jedoch zu bemerken, dass insbesondere die Bereiche der Enzyme in unmittelbarer Nähe zum Häm, im Bereich des aktiven Zentrums, hoch konserviert sind. Der strukturelle Kern von P450 Monooxygenasen besteht aus einem Bündel von vier Helices (D, E, I, L), die von zwei weiteren Helices (J, K), dem Mäander, einer im nichtsubstratgebundenen Zustand unstrukturierten Schleife und den β -Faltblättern β_1 und β_2 , umgeben sind. Das Häm, die prosthetische Gruppe von P450 Monooxygenasen, liegt zwischen der distalen I-Helix und der proximalen L-Helix. Nur drei Aminosäuren sind komplett konserviert. Hierbei handelt es sich um das distale Cystein in der Häm-Binderegion, das als fünfter Ligand mit dem Hämeisen koordiniert ist und um ein Glutamat und Arginin in der K-Helix, die eine Helixdrehung voneinander entfernt sind. Glutamat und Arginin sind über eine Salzbrücke verbunden und zeigen in Richtung der Mäander-Schleife. Stark konserviert ist eine Sequenz in der Häm-Binderegion (F(G/S)XGX(H/R)XCXGX(I/L/F)A, vor der L-Helix gelegen, die auch das konservierte Cystein enthält.

Die I-Helix bildet einen Teil des Substratzugangskanals. Ein Threonin in der I-Helix ist hoch konserviert und es zeigt zum aktiven Zentrum. Aminoterminal davon gelegen ist ein Glutamat oder Aspartat. Beide spielen vermutlich eine Rolle in der Sauerstoffaktivierung. Der Austausch von Aminosäuren in der I-Helix durch hydrophobe

Aminosäuren resultiert in Varianten, die eine hohe Wasserstoffperoxidproduktion zeigen und nicht in der Lage sind, molekularen Sauerstoff zu spalten.

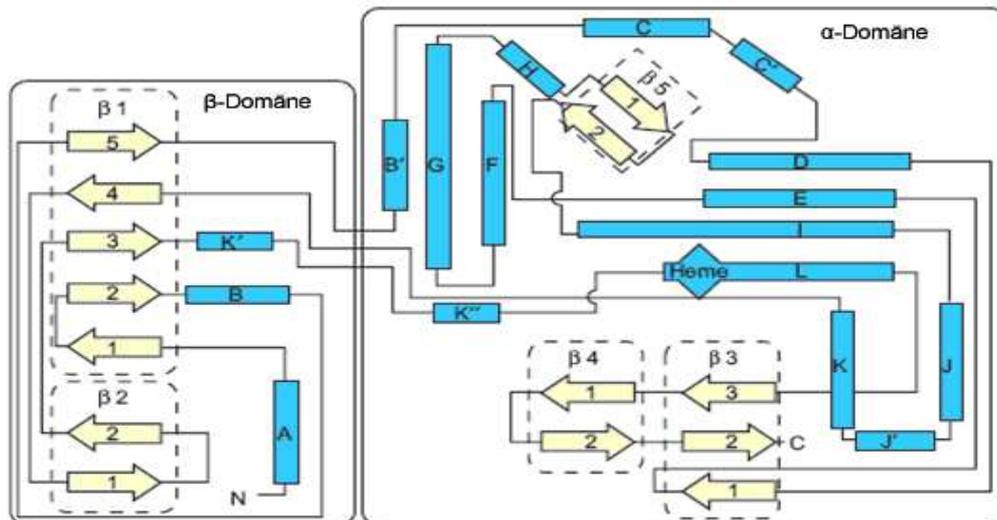


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung von P450 Monooxygenasen; gezeigt wird die relative Lage der Sekundärstrukturelemente von CYP102A1. α -Helices sind als blaue Rechtecke, β -Faltblätter als gelbe Pfeile dargestellt. Die Länge der Elemente in der Abbildung entspricht nicht ihrer Länge in der Primärstruktur (übernommen aus [30]).

Obwohl die allgemeine Faltung in P450 Monooxygenasen konserviert ist, unterscheiden sich P450 Monooxygenasen in einigen Punkten. Der größte strukturelle Unterschied ist für die Substratbindungstaschen zu verzeichnen, die sich grundlegend voneinander unterscheiden müssen, um eine Vielzahl von Substraten unterschiedlicher Größe, Struktur und Ladung zu binden und umzusetzen [31]. Im Vergleich zu Proteinen, die hydrophile Substrate umsetzen, ist die Substratbindung in P450 Monooxygenasen ein komplizierter Prozess, bei dem Substraterkennung und Bindung auf der Oberfläche, Substratzugang zum aktiven Zentrum am Ende eines hydrophoben Substratzugangskanals und die Substratorientierung im aktiven Zentrum für die Katalyse entscheidend sind [29]. Die Erkennung und Bindung von Substraten wird hauptsächlich über sechs Substratbindestellen (SRS1-SRS6) vermittelt. Mutationen in diesen Bereichen haben folglich einen hohen Einfluss auf das Substratspektrum. Große Abweichungen in der Struktur werden in der Lage der antiparallel zueinander liegenden F- und G-Helix und bei den vier Helices des Kerns beobachtet. Für die Katalyse benötigen P450 Monooxygenasen Elektronen, die meist von Reduktasen übertragen

werden. Da es unterschiedliche Reduktasesysteme gibt, unterscheiden sich die P450 Monooxygenasen in dem Bereich, der mit den Reduktasen wechselwirkt [2]. Ein weiterer Strukturunterschied befindet sich im N-terminalen Bereich, wo bei eukaryotischen CYPs meist ein Membrananker liegt.

Kristallstrukturen von P450 Monooxygenasen mit Substrat zeigen, dass diese Bereiche sehr flexibel sind. Oft tritt eine strukturelle Reorganisation nach Substratbindung ein (induced fit).

1.2.3 Katalysemechanismus

Der heute allgemein akzeptierte Reaktionsmechanismus wurde anhand von Kristallstrukturen (mit und ohne Substrat), EXAFS-Messungen zur näheren Untersuchung der ersten Koordinationssphäre des Eisens, ESR- und NMR Messungen, Mössbauer- und Schwingungsspektroskopie sowie anderer physikalisch-chemischer Methoden aufgeklärt [32]. Die Katalyse von P450 Monooxygenasen wird durch die Übertragung von zwei Elektronen, die vom Cofaktor NAD(P)H stammen, ermöglicht. Die Elektronen werden über einen oder mehrere Redoxpartner zum Häm übertragen. Wie im Folgenden beschrieben, erfolgt die Übertragung von Elektronen nur an definierten Punkten des Katalysemechanismus, um eine Katalyse zu ermöglichen (Abbildung 1-2).

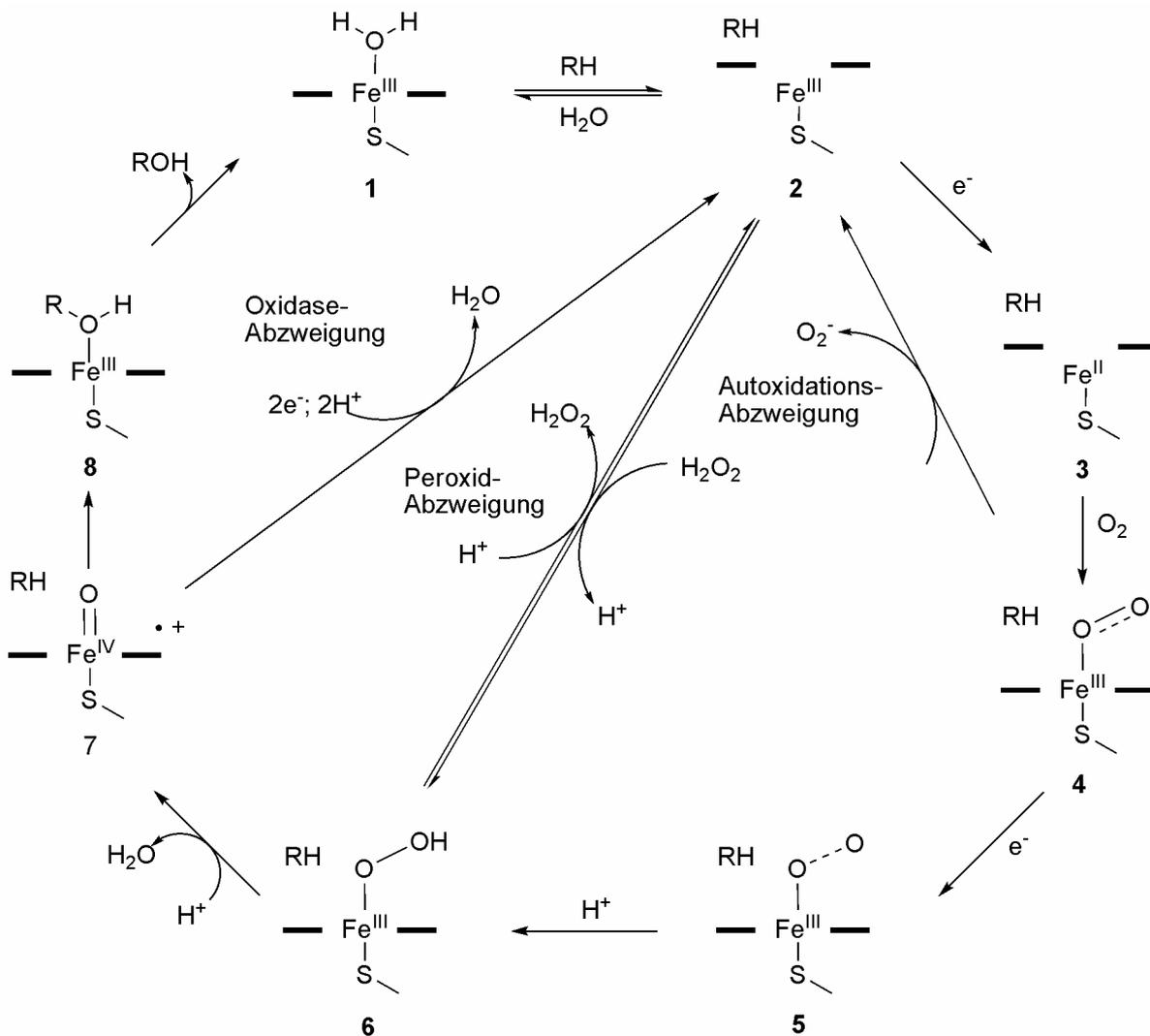


Abbildung 1-2: P450 Katalysemechanismus und Entkopplungsreaktionen. Der Porphyrinring ist durch zwei fette Balken dargestellt.

Durch Substratbindung wird Wasser als sechster Ligand des Hämeisens (1) in proximaler Position aus dem aktiven Zentrum verdrängt (2). Die vier äquatorialen Positionen des Eisenkomplexes sind durch die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome des Protoporphyrin IX besetzt, die distale Position ist durch die freien Elektronenpaare eines Cysteinats belegt. Durch Substratbindung verändert sich der Spinzustand des Eisens von low-spin ($S=1/2$) zu high-spin ($S=5/2$), was mit einer Erhöhung des Redoxpotenzials verbunden ist. Gleichzeitig verschiebt sich die Lage des Fe^{III}-Ions in eine Position unterhalb der Hämebene (out-of plane Struktur). Das erhöhte Redoxpotenzial ermöglicht den Elektronentransfer zum Häm und eine Reduktion von Fe^{III} zu Fe^{II}, an das das Substrat stärker gebunden ist (3). Die Veränderung des Redoxpotenzials durch Substratbindung ist ein wichtiger Regulator, der die

unkontrollierte Übertragung von Elektronen und somit den unkontrollierten Verbrauch des Cofaktors (NAD(P)H) verhindert. Die Bindung von molekularem Sauerstoff im nächsten Schritt führt zu einem quasi-stabilen oxy-P450-Komplex, der das letzte beobachtbare Zwischenprodukt im Reaktionszyklus bildet (4). Es enthält wahrscheinlich ein Fe(III)-Superoxid in einer in-plane-Koordination. Im nächsten Reaktionsschritt folgt eine weitere Reduktion, die zu einem Peroxyeisenzwischenprodukt führt (5). Dessen Protonierung resultiert in einem Hydroperoxoeisenkomplex (6). Eine weitere Protonierung und Wasserabspaltung führt zum Oxo-Eisenkomplex (7, „Compound I“), der reaktiven Spezies, die das Substrat oxidiert. In den letzten Jahren wurden diese Schritte mit verschiedenen Methoden untersucht, allerdings sind die letzten Zwischenstufen des Katalysezyklus aufgrund ihrer hohen Reaktivität nur schwer zu charakterisieren. Es wurde ein Komplex der Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* identifiziert, der dem als Compound I (7) beschriebenen Zustand entspricht. In P450 Monooxygenasen wurde er jedoch noch nicht identifiziert. Ausgehend von (7) wurde ein so genannter Reboundmechanismus vorgeschlagen (Abbildung 1-3), durch den das Substrat oxidiert wird und das Porphyrinsystem in seinen Ausgangszustand zurückgelangt [33]. Dieser Mechanismus wurde in Versuchen mit P450cam (CYP101), CYP102A1 und α - und β -Thujon als Substraten bestätigt.

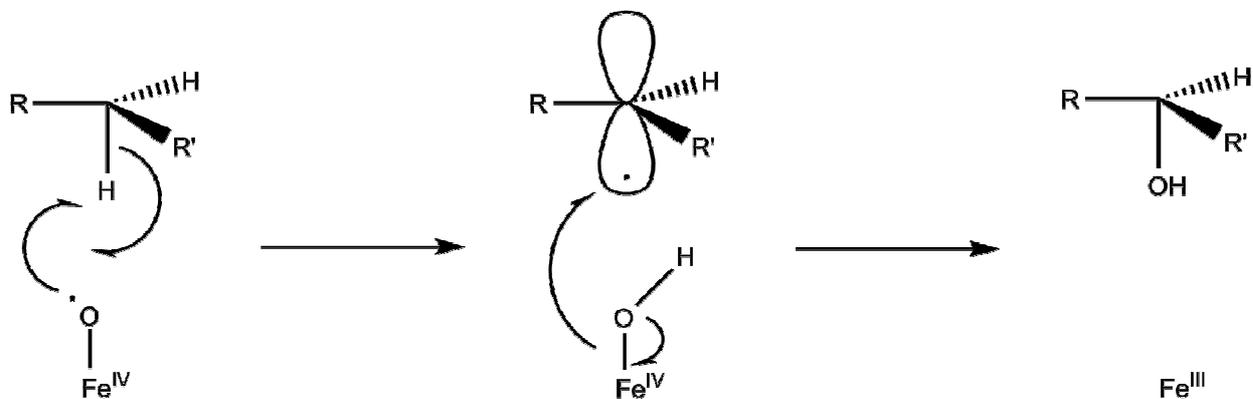


Abbildung 1-3: "Rebound" Mechanismus für die von P450 Monooxygenasen katalysierte Hydroxylierungsreaktion

Im Reaktionszyklus gibt es mehrere Möglichkeiten für Nebenreaktionen, in denen Cofaktoren nicht produktiv verbraucht werden. Man spricht hierbei vom Prozess der Entkopplung, das heißt der Verbrauch von Cofaktoren ist nicht an die Produktbildung gebunden, sondern führt zur Bildung von Nebenprodukten. Von (4) aus kann durch eine

Autoxidation mit Abgabe eines Superoxidanions der Zustand (2) erreicht werden (so genannte Autoxidationsabzweigung).

Unter Dissoziation von Wasserstoffperoxid in der Peroxid-Abzweigung geht (6) in (2) über. In der Oxidaseabzweigung wird ausgehend von (7) nicht das Substrat oxidiert, sondern Wasser wird unter Aufnahme von zwei Elektronen und zwei Protonen von (7) abgespalten. Im biokatalytischen Einsatz ist das Auftreten von Entkopplungsreaktionen aus verschiedenen Gründen ungünstig: zum einen wird der teure Cofaktor verschwendet und somit sinkt die Effizienz der Katalyse, zum anderen werden in den Entkopplungsreaktionen reaktive Spezies wie Wasserstoffperoxid erzeugt, die das Apoprotein irreversibel verändern, was zur Inaktivierung des Enzyms führt [34, 35].

1.2.4 Katalysierte Reaktionen

Kennzeichnend für P450 Monooxygenasen sind die große Anzahl und die unterschiedlichen Strukturen ihrer Substrate. P450 Monooxygenasen katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen (Tabelle 1-2), beispielsweise in der Ergosterolsynthese [36], der Biosynthese von Insektenhormonen [37] und sie sind beteiligt an Fruchtreife, Geruchs- und Farbbildung von Pflanzen [38]. Mikrosomale P450 Monooxygenasen von Säugern spielen eine Rolle im Stoffwechsel von Pharmaka und anderen Fremdstoffen [25, 39]. Sie haben die Aufgabe, im Phase I-Stoffwechsel hydrophobe Substrate durch unspezifische Hydroxylierung löslicher zu machen. Die Oxidation von Fremdstoffen macht diese bioverfügbar und ermöglicht somit eine weitere Verstoffwechslung durch so genannte Phase II-Enzyme, wie Glutathion-Transferase oder N-Acetyltransferase. Im Gegensatz zu mikrosomalen P450 weisen mitochondriale und die meisten bakteriellen P450 Monooxygenasen einen hohen Grad an Selektivität auf.

Neben typischen Reaktionen, wie Hydroxylierung und Epoxidierung, können P450 Monooxygenasen außergewöhnlichere Oxidationen, wie die Sulfoxidation, Dealkylierungen oder Deaminierungen, katalysieren [40, 41]. Diese Reaktionen erfolgen über Sauerstoffeinbau, der zu instabilen Zwischenprodukten (z. B. Halbacetale) führt, die im Folgenden zerfallen.

Die von bakteriellen P450 Monooxygenasen am häufigsten katalysierte Reaktion ist die Hydroxylierung nichtaktivierter Kohlenstoffatome [42]. Ein Beispiel hierfür ist die Hydroxylierung von Campher zu 5-exo-Hydroxycampher durch P450cam (CYP101) aus *Pseudomonas putida*. Die 5-exo-Campherhydroxylase erlaubt dem Bakterium,

Campher als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Neben P450cam gibt es noch eine Reihe weiterer P450, die in der Erschließung von Kohlenstoffquellen, wie Terpeneol, Linalool oder Cineol, eine Rolle spielen.

Neben dem Abbau von Stoffen kommt P450 Monooxygenasen auch eine Rolle in der Biosynthese zu. Besonders für die aliphatische Hydroxylierung von Antibiotikavorstufen spielen P450 Monooxygenasen eine Rolle. P450PicK ist ein Beispiel für diese Enzyme. Es stammt aus *Streptomyces venezuelae* und ist an der Synthese von vier verschiedenen Makrolidantibiotika beteiligt [43].

Ein anderer weit verbreiteter Reaktionstyp, der von P450 Monooxygenasen katalysiert wird, ist die Epoxidierung von C-C-Doppelbindungen, z. B. von Thiazol enthaltenden Makrolactonen [44]. Die Produkte haben nur begrenzte antimykotische Wirkung. Sie sind allerdings wie Taxol in der Lage, Mikrotubuli zu stabilisieren und kommen daher für die Krebstherapie in Betracht.

Neben aliphatischer Hydroxylierung umfassen P450 katalysierte Reaktionen auch Hydroxylierungen an aromatischen Kohlenstoffatomen, die sowohl in der Biosynthese als auch im Abbau von Fremdstoffen relevant sind. Man geht davon aus, dass die Hydroxylierung über eine Epoxidzwischenstufe am Aromat, gefolgt von der Öffnung des Epoxids und einer Hydridverlagerung, abläuft. Bei der Bildung von Stigmatellin A, einem Elektronentransportinhibitor, katalysiert P450StiL die Hydroxylierung eines aromatischen Ringes [45]. Reaktionen im biologischen Abbau, wie die Hydroxylierung von Warfarin oder Testosteron werden von CYP105D1 aus *Streptomyces griseolus* katalysiert [46].

Neben der Oxidation von Aromaten sind P450 Monooxygenasen auch in der Lage oxidative Phenolkupplungen zu knüpfen. Die Biosynthese von Vancomycin und anderer Antibiotika in verschiedenen *Amycolatopsis*-Arten erfolgt durch oxidative Phenolkupplung dreier aromatischer Seitenketten mit der Kernstruktur, einem Heptapeptid.

Die von P450 Monooxygenasen katalysierten Dealkylierungsreaktionen spielen einerseits im biologischen Abbau von industriellen Abfällen und Herbiziden eine Rolle [47, 48], andererseits werden sie auch in Nachweisreaktionen für das Hochdurchsatzscreening eingesetzt. Besonders Substrate, wie Alkylcoumarine und Alkylresorufine, finden dabei Anwendung. Katalysieren P450 Monooxygenasen mehr als eine Reaktion an ein und demselben Substrat, können daraus unterschiedliche Produkte entstehen. Einerseits können weitere Oxidationen auftreten, wie zum Beispiel

Dihydroxylierungen. In anderen Reaktionen können Ketone entstehen oder die C-C-Bindung kann gespalten werden [125].

Tabelle 1-2: Beispiele für Reaktionen katalysiert von P450 Monooxygenasen [49, 50]

Aliphatische Hydroxylierung und Ketonbildung	$R_1-CH_2-CH_2-R_2 \xrightarrow{\text{OH}} R_1-CH(OH)-CH_2-R_2 \xrightarrow{\text{O}} R_1-C(=O)-CH_2-R_2$
Aliphatische Epoxidierung	$R_1-CH=CH-R_2 \xrightarrow{\text{O}} R_1-CH(O)-CH(R_2)$
Aromatische Hydroxylierung	$C_6H_5-R \xrightarrow{\text{OH}} C_6H_4(OH)-R$
Aromatische Epoxidierung	$C_6H_6 \xrightarrow{\text{O}} C_6H_5O$
Oxidation an Schwefelatomen	$R_1-S-R_2 \xrightarrow{\text{O}} R_1-S(=O)-R_2 \xrightarrow{\text{O}} R_1-S(=O)_2-R_2$
Oxidation an Stickstoffatomen	$R-NH_2 \xrightarrow{\text{O}} R-N(O)H \xrightarrow{\text{O}} R-N^+(H)_2$
Oxidative Dealkylierung	$R_1-X-CH_2-R_2 \xrightarrow{\text{O}} R_1-X-H + H-C(=O)-R_2$ <p>X: NH; O, S</p>

Oxidative Deaminierung	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{H} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{H} \end{array}$
Oxidative Dehalogenierung	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{Cl} \\ \\ \text{H} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{R}_2 \\ \\ \text{R}_1-\text{C}=\text{O} \end{array}$

1.2.5 Die Familie CYP102A

Derzeit gehören 20 Proteine zur CYP102A-Familie. Nur fünf davon wurden bisher charakterisiert und beschrieben. Der bekannteste Vertreter der Familie ist CYP102A1, das ursprünglich auch unter dem Namen P450 BM3 bekannt wurde. Diesen Namen trägt es, da es die dritte in *Bacillus megaterium* identifizierte P450 Monooxygenase war. CYP102A1 gehört neben P450cam (CYP101A1) zu den am besten untersuchten Monooxygenasen. Produkte seiner Fettsäurehydroxylaseaktivität wurden erstmals vor über 30 Jahren beschrieben [51]. Im Jahre 1980 gelang es in der Arbeitsgruppe von Fulco, das Enzym zu identifizieren [52, 53]. Die heterologe Expression und Charakterisierung in *E. coli* erfolgte sieben Jahre später in derselben Arbeitsgruppe [54]. Es handelt sich um ein wasserlösliches Protein und verfügt über ein Redoxsystem: eine FAD-, FMN-haltige, NADPH-abhängige Reduktase, die mit der Monooxygenase C-terminal, zu einem Polypeptid fusioniert ist. CYP102A1 war das erste identifizierte Fusionsprotein. Es hat eine Molekularmasse von 119 kDa. Seine strukturelle Ähnlichkeit zu eukaryotischen P450 und die Einfachheit in der Handhabung als Fusionsprotein führten dazu, dass es schnell zum Modellenzym für diese Enzymklasse wurde. CYP102A1 katalysiert die subterminale Hydroxylierung von Fettsäuren, hauptsächlich in ω -1-, ω -2- und ω -3-Position. Ungesättigte Fettsäuren werden epoxidiert. CYP102A1 bevorzugt Fettsäuren einer Kettenlänge von 12-20 Kohlenstoffatomen. Es zeigt die höchste Umsatzrate, die bisher für P450 Monooxygenasen berichtet wurde (17000 min^{-1} für Arachidonsäure) [55]. Die hohen Umsatzzahlen werden durch den schnellen Elektronentransfer im P450-System ermöglicht, was mit der Domänenstruktur des Enzyms in Verbindung gebracht wird. NADPH ist im Vergleich zu NADH der bessere Cofaktor. Der Elektronentransfer von NADPH auf FAD hat eine Geschwindigkeit von 700 s^{-1} und ist somit weit schneller als der Elektronentransfer in humanen P450. Auch

der interne Elektronentransfer von FAD auf FMN ist schneller als in der humanen Reduktase [56].

Die physiologische Rolle von CYP102A1 ist noch nicht ausreichend geklärt. In den letzten 15 Jahren wurden 30 Kristallstrukturen von CYP102A1, mit und ohne Substrat gebunden, veröffentlicht. Die Strukturen umfassen jedoch nur die P450 Monooxygenase oder P450 Monooxygenase mit FMN. Eine Kristallstruktur der Monooxygenasedomäne von CYP102A1 ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Bisher gelang es noch nicht die Struktur der Reduktase vollständig zu lösen (www.cyped.uni-stuttgart.de).

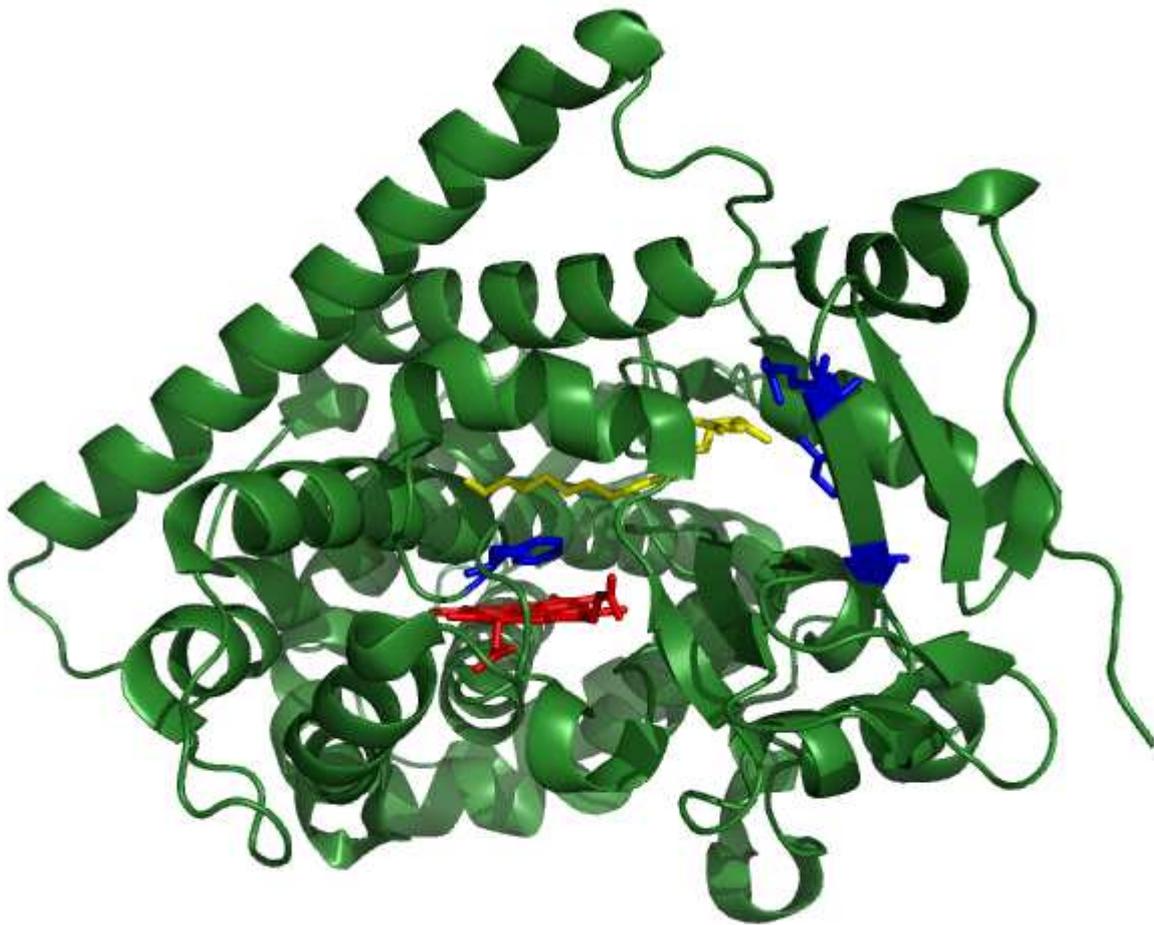


Abbildung 1-4: Kristallstruktur der Monooxygenasedomäne von CYP102A1 (PDB-Eintrag 1j pz); rot: Häm-Gruppe, gelb: Palmitoleinglycin, blau: für Substratbindung bzw. Regioselektivität wichtige Aminosäuren (R47 und Y51 im Substratzugangskanal, F87 im aktiven Zentrum)

Es wurden verschiedene Aminosäuren identifiziert, die für die Aktivität von CYP102A1 eine Bedeutung haben (Tabelle 1-3). CYP102A1 zeigt große Ähnlichkeit zu eukaryotischen P450 Monooxygenasen der CYP4A-Familie, die ebenfalls die

Hydroxylierung von Fettsäuren katalysieren. Aus diesem Grund und in Ermangelung von P450 Kristallstrukturen aus Säugern wurde CYP102A1 als Experimentalmodell für eukaryotische Klasse II-Redoxsysteme benutzt, um Fragestellungen bezüglich Substratselektivität, Cofaktor-Bindung und Elektronentransfer zu untersuchen [57].

Vorliegende Kristallstrukturen ermöglichten auch die Durchführung von rationalem Protein-Design mit CYP102A1. In nachfolgenden Untersuchungen konnten mehrere für die Fettsäurebindung relevante Aminosäuren identifiziert werden. Hervorzuheben sind hier Arginin 47 und Tyrosin 51 am Eingang des Substratzugangskanals, die über Wasserstoffbrücken Wechselwirkungen mit der Carboxylatgruppe der Fettsäuren eingehen [58]. Eine wichtige Aminosäure für das Produktspektrum ist Phenylalanin 87. Sie liegt über dem Hämeisen und limitiert den Zugang zum aktiven Zentrum. Bei Substratbindung dreht es sich von horizontaler in eine vertikale Position [55, 59].

Erst mit der zunehmenden Durchführung von Sequenzierungen ganzer Genome in den 1990er Jahren wurden Gene identifiziert, die für Enzyme codieren, die große Sequenzähnlichkeit zu CYP102A1 zeigen (>55%). Die Gene wurden unter anderem in verschiedenen *Bacillus* Arten, *Ralstonia metallidurans* und *Bradyrhizobium japonicum* identifiziert [60, 61]. In den letzten zehn Jahren wurden zwei CYP102A-Enzyme aus *Bacillus subtilis* (CYP102A2 und CYP102A3) und weitere P450 Monooxygenasen aus *Bacillus cereus* (CYP102A5) und *Bacillus licheniformis* (CYP102A7) exprimiert und charakterisiert [62-65]. Alle charakterisierten Enzyme sind Fettsäurehydroxylasen, die sich jedoch in ihrem Produktmuster und in ihren Aktivitäten unterscheiden.

CYP102A-Enzyme eignen sich aufgrund ihres Aufbaus als Fusionsprotein, ihrer Löslichkeit, hohen Aktivität und Stabilität im Vergleich zu anderen P450 Monooxygenasen wesentlich besser für den Einsatz in biotechnologischen Verfahren.

Tabelle 1-3: Wichtige Aminosäuren in CYP102A1

Aminosäure	vermutete Aufgabe	Quelle
F42	hydrophobe Kappe über dem Substratzugangskanal	[66]
R47	initiale Substraterkennung	[66]
Y51	initiale Substraterkennung	[66]
F87	Selektivität	[66, 67]
W96	Hämbindung	[68]
T268	Sauerstoffbindung, Elektronentransport	[69]
F393	ausschlaggebend für das Hämreduktionspotenzial	[70, 71]
C400	Ligand des Hämeisens	[72]

1.2.6 Die Familie CYP152A

Die Enzyme der Subfamilie CYP152A umfassen derzeit zwei Mitglieder. CYP152A1 (P450 Bs β) aus *Bacillus subtilis* und CYP152A2 aus *Clostridium acetobutylicum* [5, 6]. Sie katalysieren die Hydroxylierung von Fettsäuren in α - und β -Position, wobei CYP152A1 die β - und CYP152A2 die α -Position bevorzugt. Die Kristallstruktur von CYP152A1 wurde gelöst und das Enzym war somit zugänglich für Methoden des rationalen Protein-Designs [73]. CYP152A1 zeigt das für P450 Monooxygenasen typische Faltungsmuster. Eine Kristallstruktur von CYP152A1 ist in Abbildung 1-5 dargestellt.

Die Regioselektivität der katalysierten Reaktion ist bemerkenswert, da die meisten vorher bekannten P450 Monooxygenasen Fettsäuren nur in ω -Position oder subterminal hydroxylieren [74, 75]. Allerdings ist mit der verwandten CYP152B1 aus *Sphingomonas paucimobilis* noch eine weitere α -Hydroxylase bekannt [76]. Die Orientierung des Substrates unterscheidet sich grundlegend von der Lage in anderen Monooxygenasen wie zum Beispiel CYP102A1. Die Fettsäure wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren im Substratzugangskanal und der Alkylkette

und durch elektrostatische Wechselwirkungen der endständigen Carboxylatgruppe mit der Guanidgruppe des Arginin in Position 242 stabilisiert [77]. Während sich in CYP102A1 das ω -Kohlenstoffatom in direkter Nähe zum Häm befindet, liegt in CYP152A1 das C1-Atom über dem Häm in unmittelbarer Nähe der I-Helix. CYP152A1 und CYP152A2 sind von Wasserstoffperoxid abhängig und übertragen ein Sauerstoffatom auf ihr Substrat. Obwohl in dieser Reaktion nicht molekularer Sauerstoff sondern Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonor fungiert, gehört diese Reaktion zu den Monooxygenasereaktionen. Im Zusammenhang mit dem Verlauf der Reaktion bezeichnet man die CYP152A-Enzyme auch als Peroxygenasen. Die Größe der Enzyme liegt bei 48 kDa. Die Untersuchung der Primärstrukturen von CYP152A1 und CYP152A2 und der Struktur von CYP152A1 ermöglichen es nicht diese Monooxygenasen anhand eines möglichen Redoxpartners zu klassifizieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CYP152A1 und CYP152A2 Ferredoxin und Ferredoxinreduktase oder die Reduktase aus CYP102A1 als Elektronentransferpartner akzeptieren können [6]. Zwar liegen die anfänglichen Aktivitäten von beiden CYP152A-Enzymen mit Elektronentransferproteinen unter den mit Wasserstoffperoxid gemessenen, allerdings ist die Produktausbeute nach einer Stunde Reaktionszeit bis zu 40-mal höher als unter Verwendung von Wasserstoffperoxid. Niedrige Gesamtausbeuten des Systems unter Verwendung von Wasserstoffperoxid sind auf die denaturierende Wirkung von Wasserstoffperoxid auf Enzyme zurückzuführen. Auch andere P450 Monooxygenasen können über den Peroxidweg Wasserstoffperoxid für die Katalyse nutzen, allerdings liegt die Rate weit unter dem unter physiologischen Bedingungen erzielten Umsatz [78].

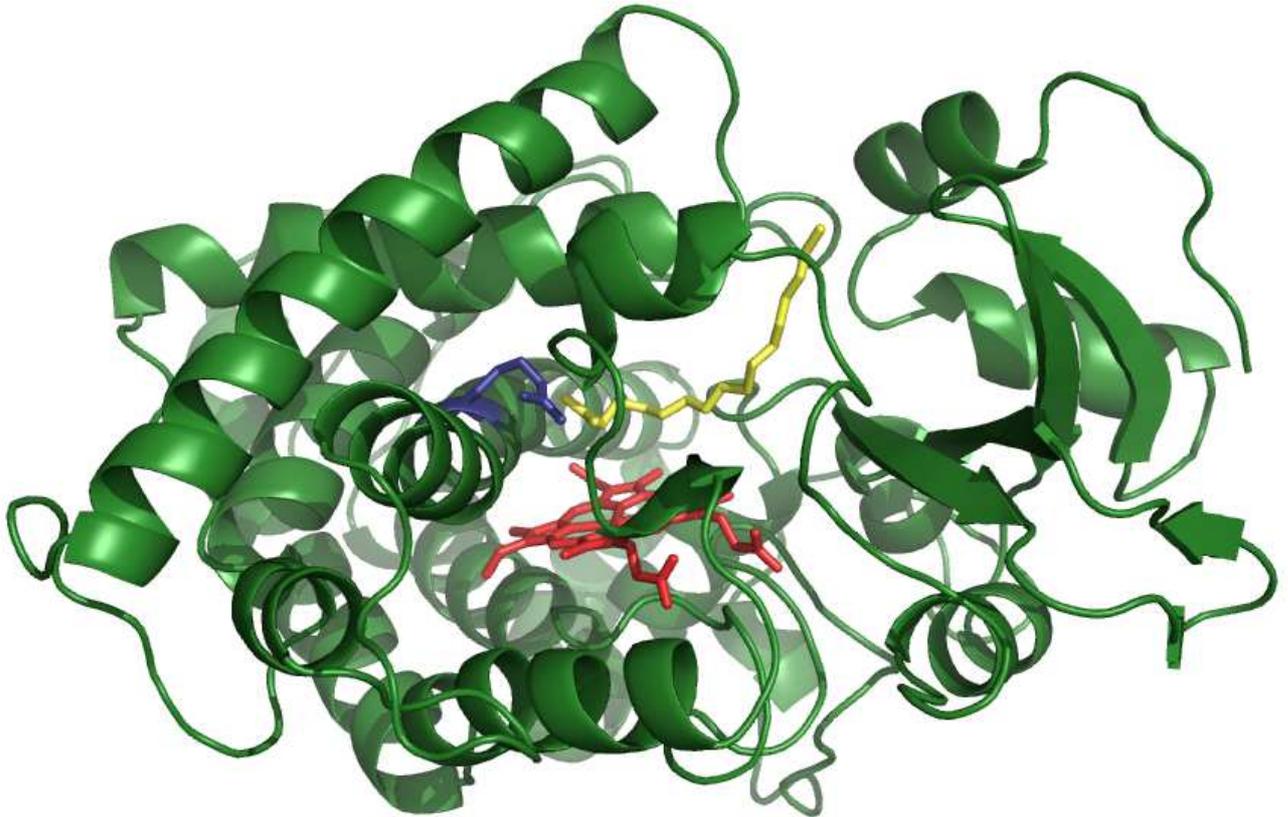


Abbildung 1-5: Kristallstruktur von CYP152A1 (P450 Bsβ; PDB-Eintrag 1izo); rot: Häm-Gruppe, gelb: Palmitoleinsäure, blau: für Substratbindung wichtige Aminosäure R242

1.2.7 Spektroskopische Charakterisierung von P450 Monooxygenasen

Zur Aufklärung von Struktur und Funktion von P450 Monooxygenasen wurden viele unterschiedliche spektroskopische Techniken eingesetzt [25]. Die UV-VIS-Spektroskopie führte zur Entdeckung der P450 Monooxygenasen und bildete auch die Grundlage für die Namensgebung.

Die spektroskopische Herangehensweise zur Untersuchung von P450 Monooxygenasen ermöglicht die Aufklärung verschiedener Parameter, wie der Dissoziationskonstante von Substraten, dem Redoxzustand und die Aufklärung der Beschaffenheit der Redoxpartner [24]. Im oxidierten, freien Zustand absorbieren P450 Monooxygenasen bei 420 nm, was unter anderem auch ihre Aufreinigung erleichtert. Im durch NADPH oder Natriumdithionit reduzierten Zustand werden die Flavincofaktoren der Reduktase reduziert, die im oxidierten Zustand zwischen 450 und 500 nm beobachtbare Schulter verschwindet [79]. Reduktion und Begasung mit Kohlenstoffmonoxid führen zu dem für P450 Monooxygenasen namensgebenden Peak

bei 450 nm im CO-Differenzspektrum. Die Veränderungen der Absorption im UV-VIS-Bereich beruhen auf elektronischen Übergängen in der prosthetischen Gruppe des Enzyms, dem Häm. Die Veränderung des Spinzustandes bzw. lokale Veränderungen in der Hämumgebung wirken sich direkt auf die Absorption im UV-VIS-Bereich aus [80]. Daher kann die UV-VIS-Spektroskopie eingesetzt werden, um Wechselwirkungen zwischen Substraten oder Inhibitoren und dem Enzym nachzuvollziehen. Es wurden bisher drei verschiedene Substratbindungsspektren charakterisiert, die sich je nach Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym unterscheiden lassen. Man unterscheidet die Bindungsspektren Typ I, Typ II und reversen Typ I in Abhängigkeit von der Veränderung eines Differenzspektrums von substratgebundenem Enzym gegenüber freiem Enzym [81]. Das Typ I-Bindungsspektrum ist gekennzeichnet durch eine durch Substratbindung hervorgerufene Verschiebung des Spinzustands in Richtung high-spin. Dies ist im Absorptionsspektrum durch eine Abnahme des Soretbandmaximums bei 420 nm und eine Zunahme der Absorption bei 390 nm gekennzeichnet. P450 Monooxygenasen im low-spin-Zustand absorbieren bei 416-420 nm, wohingegen die high-spin-Form zwischen 385 und 394 nm absorbiert. Die meisten P450-Substrate weisen ein Typ I-Spektrum auf. Im Gegensatz dazu nimmt die Absorption im Typ II-Spektrum zwischen 390 und 405 nm ab und gleichzeitig zwischen 425 und 435 nm zu. Im Typ II-Spektrum ist eine Verschiebung der Absorption zu längeren Wellenlängen zu beobachten, die mit einer Verschiebung des Spinzustands zum low-spin-Zustand verbunden ist. Das Typ II-Bindungsspektrum wird hauptsächlich für P450-Inhibitoren beobachtet, die direkt mit dem Hämeisen ligiert sind.

Das reverse Typ I-Spektrum gleicht einem gespiegelten Typ I-Spektrum und ähnelt somit auch dem Typ II-Spektrum, ohne jedoch die für Typ II charakteristische Verschiebung der Absorptionsmaxima aufzuweisen. In diesem Fall geht man davon aus, dass das Substrat nicht direkt mit dem Häm ligiert ist.

Am Beispiel von CYP102A7 sind UV-VIS-Absorptionsspektren in Abbildung 1-6 dargestellt.

Infrarot- (IR) und Resonanzramanspektroskopie (RR) wurden genutzt um das Häm in P450 Monooxygenasen zu untersuchen [82]. Viele der Hämzustände können durch IR und RR untersucht werden, wobei einige der Zustände sich in charakteristischen Banden widerspiegeln, die Aufschluss über Spinzustand oder Redoxpotenzial geben können [83]. Beispielsweise ist eine Bande bei 350 cm^{-1} im RR-Spektrum charakteristisch für die mit Cysteinat ligierte Hämgruppe in P450 Monooxygenasen. Das

während dem Katalysemechanismus entstehende Superoxid ist durch eine Bande bei 1140 cm^{-1} nachweisbar [84, 85].

Die Liganden des Häm wurden mittels EXAFS, ESR und magnetischem Circular dichroismus untersucht [86].

Auch die Aktivität von P450 Monooxygenasen bzw. vielmehr die Oxidation des für die Katalyse notwendigen Cofaktors NAD(P)H lässt sich photometrisch nachvollziehen und ermöglicht somit kinetische Untersuchungen dieser Enzyme.

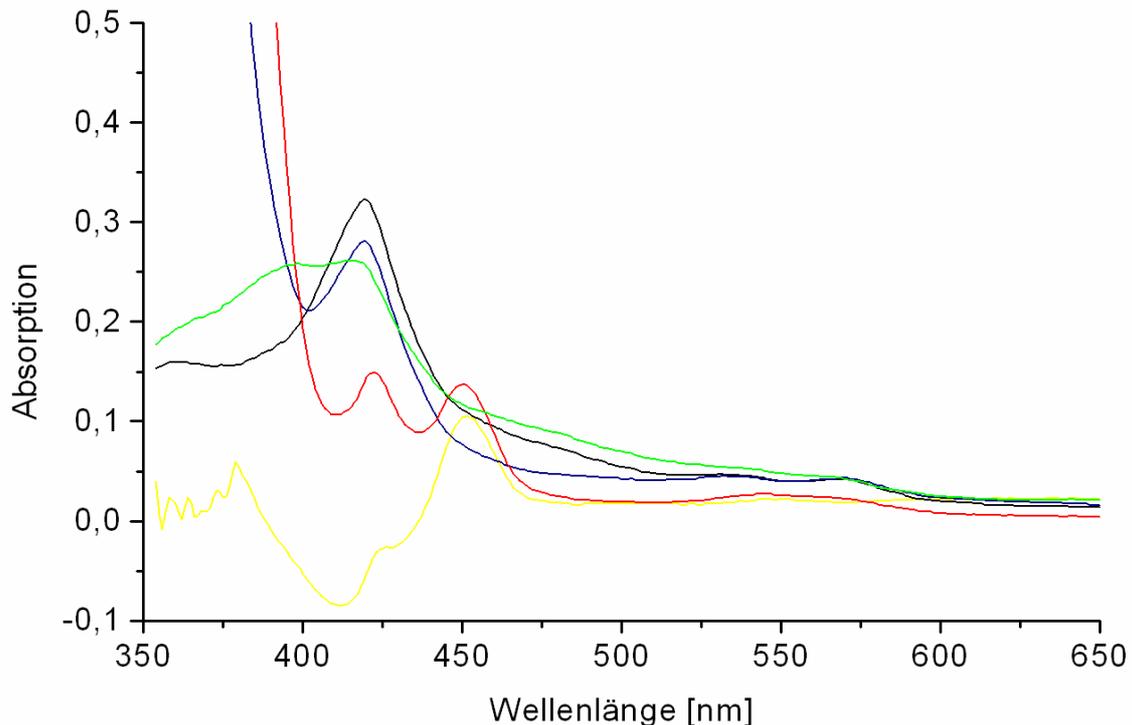


Abbildung 1-6: UV-VIS-Absorptionsspektren von CYP102A7 im oxidierten Zustand (schwarz), im oxidierten Zustand mit gebundener Myristinsäure (grün), im NADPH-reduzierten Zustand (blau), im Natriumdithionit-reduzierten, CO-gebundenen Zustand (rot), Differenzspektrum von im Natriumdithionit reduzierten, CO-gebundenen Zustand und im Natriumdithionit reduzierten Zustand (gelb)

1.2.8 Elektronentransfersysteme

Die meisten P450-Systeme verfügen über mehrere katalytisch wichtige Domänen, wie das Häm, aber auch über die für den Elektronentransfer wichtige Reduktase und Redoxproteine. Die Elektronenübertragungen beginnen meist mit dem Transfer von Elektronen von NAD(P)H und enden mit der reduktiven Spaltung von Sauerstoff und dem Einbau eines Sauerstoffatoms in das Substrat durch P450 Monooxygenasen [87].

In Abhängigkeit des Elektronentransfers teilten Chapman *et al.* P450-Systeme in vier verschiedene Gruppen ein (<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html>). Dieses System wurde inzwischen von Hannemann *et al.* erweitert [2]. Aufgrund der großen Diversität der Elektronentransfersysteme werden inzwischen zehn Klassen unterschieden (Abbildung 1-7). Die Klasse I umfasst die meisten bakteriellen P450-Systeme und mitochondriale P450-Systeme aus Eukaryoten. Obwohl kein direkter Bezug besteht, setzt sich das P450-System in beiden Gruppen aus drei unterschiedlichen Proteinen zusammen. Es handelt sich hierbei meist um eine FAD-haltige Reduktase, die Elektronen von NAD(P)H auf ein zweites Protein: das Ferredoxin überträgt. Das Ferredoxin reduziert im Folgenden das Hämeisen der P450 Monooxygenase. In Bakterien sind alle drei Proteine löslich, wohingegen in Eukaryoten nur das Ferredoxin ein lösliches Protein ist, das die Elektronen von der membranassoziierten Reduktase zur P450 Monooxygenase überträgt. Der Prototyp bakterieller P450 der Klasse I ist das P450cam (CYP101A1) aus *Pseudomonas putida*. Es verfügt über eine Putidaredoxinreduktase (eine FAD-haltige streng NADH-abhängige Ferredoxin-Reduktase) und ein Eisenschwefelprotein (Putidaredoxin), das die Elektronen von der Reduktase zur Monooxygenase transportiert. Die Kristallstrukturen aller drei Komponenten sind gelöst, wobei die Struktur von P450cam die erste veröffentlichte P450-Struktur ist [28, 88, 89]. Die mitochondrialen P450-Enzyme von Säugern spielen einerseits eine entscheidende Rolle in der Biosynthese von Steroidhormonen auf Cholesterinbasis. Sie sind jedoch auch wichtig in der Vitamin D- und Gallensäuresynthese. Ein Beispiel für ein Klasse I-Enzym aus Eukaryoten ist das CYP11B1, das die Hydroxylierung in 11- β -Position in der Cortisolbiosynthese katalysiert.

Cytochrom P450 Monooxygenasen der Klasse II sind in Eukaryoten sehr verbreitet. Sie katalysieren Reaktionen im oxidativen Stoffwechsel von Fettsäuren, Steroiden, Prostaglandinen und auch Fremdstoffen, wie Therapeutika und Giftstoffen [90]. In Pflanzen katalysieren P450 Monooxygenasen der Klasse II Reaktionen im Sekundärmetabolismus. In Fungi sind sie an der Synthese von Membranbestandteilen beteiligt. In der grundlegenden Form besteht das Monooxygenasesystem der Klasse II aus zwei integralen Membranproteinen: der P450 Monooxygenase und einer NADPH-abhängigen Cytochrom P450 Reduktase, die FAD und FMN als Cofaktoren enthält. Die Reduktase überträgt die Reduktionsäquivalente auf verschiedene Isoenzyme. In vielen Fällen wird der Elektronentransfer im Klasse II-System durch zusätzliche Proteine wie

Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 -Reduktase erweitert [91]. Das Klasse III-System besteht wie Klasse I aus drei verschiedenen Proteinen. Elektronen werden von NAD(P)H über eine FAD-haltige Ferredoxinreduktase und ein zweites Hilfsredoxprotein auf eine P450 Monooxygenase übertragen. Im Klasse I-System ist das Hilfsprotein ein Eisenschwefelprotein. Im Klasse III-System handelt es sich um ein FMN-haltiges Flavodoxin. Was die Cofaktoren betrifft ähneln Klasse III-Systeme somit den eukaryotischen Klasse II-Systemen, allerdings befinden sich FAD und FMN auf unterschiedlichen Proteinen. CYP119 aus dem acidothermophilen Mikroorganismus *Sulfolobus solfataricus* stellt den am besten bekannten Vertreter der Klasse IV dar. Das Enzym ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Es ist mit 43 kDa kleiner als die meisten P450 Monooxygenasen, zeigt extreme Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und Drücken, wobei die Denaturierung unter hohem Druck nach zunehmender Entspannung reversibel ist. CYP119 hat zwei Redoxpartner: ein Ferredoxin und eine 2-Oxosäureferredoxinreduktase. CYP119 ist somit das erste Beispiel einer NAD(P)H unabhängigen Monooxygenase.

Im Gegensatz zu den klassischen Drei-Komponenten-Systemen umfasst Klasse V nur zwei Proteine: eine zuvor unbekannte NAD(P)H-abhängige Reduktase und ein Fusionsprotein zwischen einer P450 Monooxygenase und einem Ferredoxin. Bis jetzt wurde nur ein Vertreter dieser Klasse beschrieben, CYP51 aus *Methylococcus capsulatus*. Es handelt sich um eine 14α -Demethylase.

Das Klasse VI-System beinhaltet eine NAD(P)H-abhängige Flavoproteinreduktase und ein Flavodoxin-P450-Fusionsenzym. Die Klasse hat dieselben Elektronentransferpartner wie CYP102A1 oder P450cin. Der Unterschied liegt einzig in der Anordnung der Transferpartner. Das erste Beispiel für ein P450 dieser Klasse wird durch das Gen *xpIA* aus *Rhodococcus rhodochrous* codiert. Es katalysiert den Abbau des Sprengstoffes RDX (Royal Demolition Explosive) [92].

In der Klasse VII ist die Cytochrom P450 Monooxygenase C-terminal mit einer Reduktasedomäne fusioniert. Diese Reduktase, eine Phtalatdioxygenasereduktase, wird sonst nicht mit P450 Monooxygenasesystemen in Verbindung gebracht. CYP116B2 aus *Rhodococcus sp.* zeigt den für Klasse VII typischen Aufbau. P450-Domäne und Reduktasedomäne sind durch eine 16 Aminosäuren lange Verbindungsregion verbunden. Die Reduktase besteht aus drei verschiedenen Einheiten: einer FMN-Bindedomäne, einer NADH-Bindedomäne und einer [2Fe-2S] Ferredoxin-Bindedomäne.

Die P450 Monooxygenasen der Klasse VIII sind mit einer Diflavinreduktase verbunden, wie sie in Eukaryoten vorkommt. Es handelt sich bei dieser Klasse um katalytisch unabhängige Monooxygenasen. Dieser Enzymtyp wurde in verschiedenen Prokaryoten und niederen Eukaryoten beschrieben [93]. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind CYP102A1 (P450 BM3) aus *Bacillus megaterium* (1.2.5) und CYP505A1 (P450foxy) aus *Fusarium oxysporum* [94].

Die Nitritoxidreduktase (P450nor, CYP55) aus *Fusarium oxysporum* ist das einzige bekannte Mitglied der Klasse IX. Es ist ein NADPH-abhängiges lösliches Enzym und lokalisiert in cytosolischen und mitochondrialen Zellfraktionen. Physiologisch liegt seine Rolle in der Denitrifizierung. Die meisten P450 Monooxygenasen sind abhängig vom Transfer von Elektronen durch Redoxproteine. Nur die zur Klasse X gehörenden Enzyme nutzen unabhängige intramolekulare Elektronentransfersysteme und sind unabhängig von molekularem Sauerstoff. Sie nutzen Acylhydroperoxid des Substrats als Sauerstoffdonor und bilden neue Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen in Substraten.

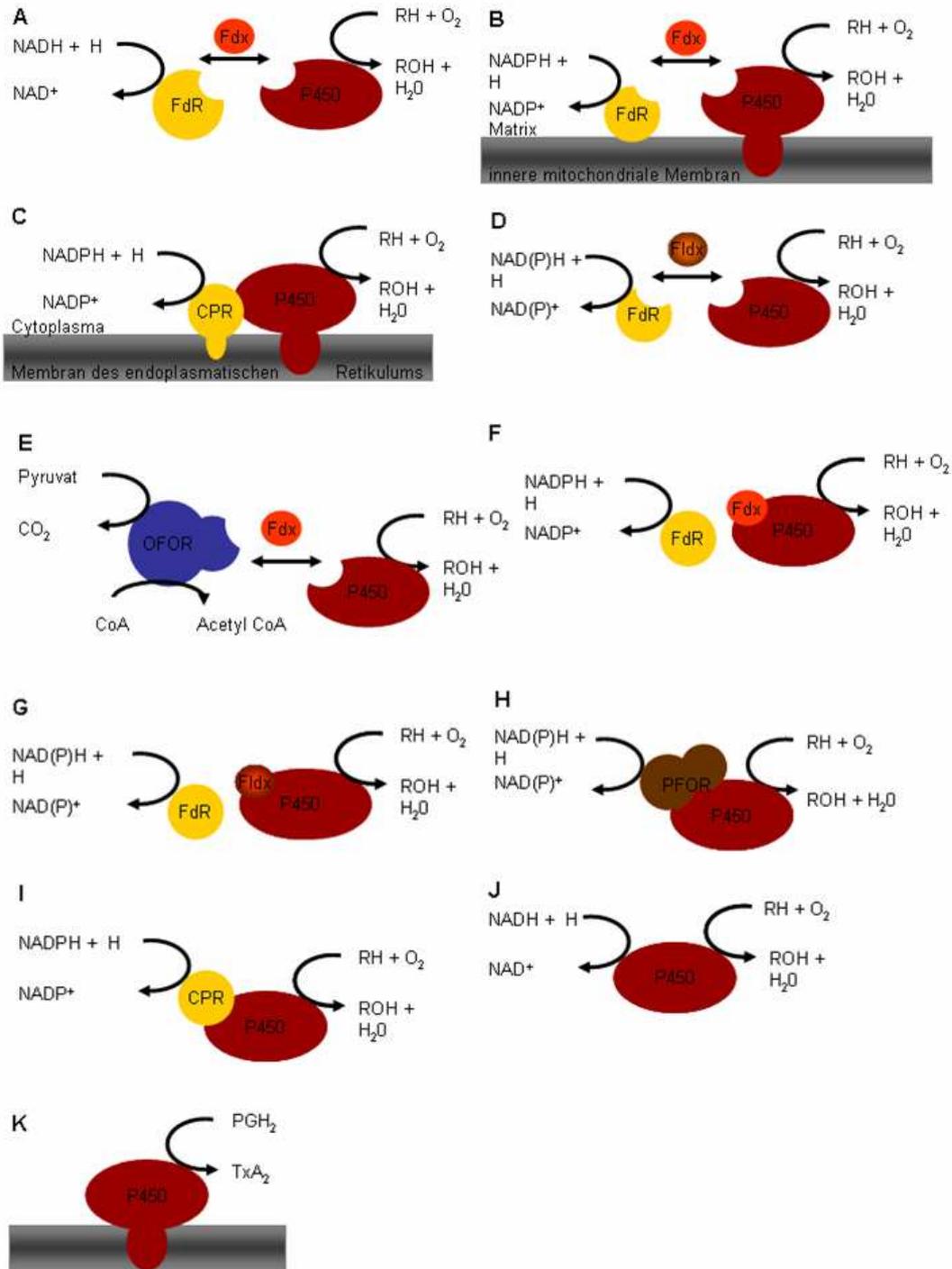


Abbildung 1-7: Übersicht über die P450 Elektronentransfersysteme; A) Klasse I, bakterielles System; B) Klasse I, mitochondriales System; C) Klasse II, mikrosomales System; D) Klasse III, bakterielles System z. B. P450cin; E) Klasse IV, bakterielles thermophiles System; F) Klasse V, [Fdx]-[P450]-Fusionssystem; G) Klasse VI, bakterielles [Fidx]-[P450]-Fusionssystem; H) Klasse VII, [PFOR]-[P450]-System; I) Klasse VIII, bakterielles [CPR]-[P450]-System; J) Klasse IX, lösliches eukaryotisches System, z. B. P450nor; K) Klasse X, unabhängiges eukaryotisches System, z. B. P450TxA; adaptiert von [13]

1.2.9 Anwendung von P450 Monooxygenasen

P450 Monooxygenasen sind vielseitige Biokatalysatoren, die eine Reihe von Reaktionen katalysieren (1.2.4.). Sie bieten sich an für die Synthese von Feinchemikalien, Geruchstoffen, Pharmazeutika und im Abbau von Giftstoffen. Biokatalytische Prozesse haben gegenüber klassischen chemischen Umsetzungen z. B. Sharpless-Reaktion oft den Vorteil einer besseren Ökobilanz. In einigen etablierten Prozessen werden kommerzielle Produkte durch P450 Monooxygenasen erzeugt. Lonza AG entwickelte einen Prozess zur Synthese von 5-Methylpyrazin-2-carbonsäure ausgehend von 2,5-Dimethylpyrazine. Der Prozess nutzt wachsende Zellen des Stammes *Pseudomonas putida* ATCC 33015. Die Reaktion wird durch eine Xylenoxygenase katalysiert [22]. Das Produkt ist ein Intermediat in der 5-Methyl-2-Carbonsäure-4-oxid-Synthese. Hierbei handelt es sich um einen Wirkstoff (Acipimox), der antilipolytische Aktivität besitzt. 5-Methylpyrazin-2-carbonsäure ist auch ein Vorläufer von Glipicid, einem Wirkstoff mit hypoglykämischer Aktivität, der zur Kontrolle von Diabetes eingesetzt wird.

Nippon Mining hat einen Prozess etabliert, bei dem Alkene epoxidiert werden [22]. Die Reaktion wird in einem Ganzzellprozess mit *Nocardia corallina* B 276 durchgeführt. Die aliphatischen Epoxide werden in der Synthese chiraler Intermediate zur Produktion ferroelektrischer Flüssigkristalle eingesetzt.

Die Hydroxylierung von Reichstein S in 11- β -Position zu Hydrocortison mit *Curvularia lunata* bei der Schering AG ist ein Prozess, der im Maßstab von mehreren hundert Tonnen pro Jahr durchgeführt wird [95].

Bei der Pfizer AG wird ein Prozess zur Cortisonsynthese aus Progesteron mit *Rhizopus* sp. durchgeführt, der in den 1950er Jahren bei Pharmacia and Upjohn entwickelt wurde [96].

Ein Medikament zur Senkung des Cholesterinspiegels, Pravastatin, wird bei Sankyo Pharma und Bristol-Myers Squibb in einer Biotransformation hergestellt.

Bei allen hier beschriebenen Prozessen handelt es sich um Ganzzell-Biotransformationen mit Monooxygenaseaktivität. In Ganzzellumsetzungen stammen die Cofaktoren aus dem Metabolismus der Mikroorganismen. Durch Coexpression von Dehydrogenasen und Transportproteinen kann das Cofaktorlevel in Zellen erhöht werden, was eine effektivere Biotransformation erlaubt [97]. Die große Herausforderung für Ganzzellbiotransformationen liegt in der Verfügbarkeit von Substraten. Darüber

hinaus können Substrat oder Produkt toxisch für die Zellen sein oder verstoffwechselt werden. Biotransformationen erfordern aufwändige Aufarbeitungsschritte, die die Prozesskosten stark erhöhen [98].

Aufgrund der geschilderten Probleme in Ganzzellprozessen erscheint die Untersuchung von *in vitro*-Prozessen interessant, die jedoch durch verschiedene Limitierungen erschwert werden. P450 Monooxygenasen benötigen eine kompatible Reduktase, um den Elektronentransfer vom Cofaktor (meist NAD(P)H) zu gewährleisten. Die genannten Cofaktoren werden in äquimolaren Mengen mit dem Substrat eingesetzt und sind relativ teuer. Eukaryotische P450 Monooxygenasen katalysieren häufig interessante Reaktionen. Allerdings sind die Enzyme meist membrangebunden und weisen niedrige Umsatzraten auf, was ihren Einsatz erschwert [99]. Prokaryotische Monooxygenasen bieten gegenüber eukaryotischen Vertretern den Vorteil, dass sie einfach zu exprimieren sind und in löslicher Form vorliegen. Eine große Herausforderung in solchen *in vitro*-Prozessen ist die Regenerierung des teuren Cofaktors NAD(P)H [100].

Eine Lösung zu diesem Problem stellt die enzymatische Regenerierung des Cofaktors mittels Dehydrogenasen dar. Erschwert wird dieser Ansatz durch die NAD⁺-Abhängigkeit der meisten Dehydrogenasen, da viele interessante P450 Monooxygenasen NADPH-abhängig sind. Ein Lösungsansatz liegt in der Veränderung der Cofaktorabhängigkeit von P450 Monooxygenasen von NADPH zu NADH [101, 102]. NADH ist um den Faktor zehn günstiger als NADPH und unter Prozessbedingungen stabiler. Beispielhaft wurden in der Umsetzung von Myristinsäure mit einer NADH-abhängigen CYP102A1-Mutante unter Cofaktorregenerierung durch eine Formiatdehydrogenase aus *Pseudomonas sp.* 101 Gesamtumsatzzahlen von 30000 erreicht, wobei die volumetrische Produktivität mit dem NADPH-abhängigen Enzym vergleichbar ist [102]. Hohe Cofaktorkosten können auch unter Verwendung der Peroxid-Abzweigung vermieden werden (Abbildung 1-2). Problematisch ist die Verwendung von Peroxiden anstelle des Cofaktors NAD(P)H, da sie sich für eine schnelle Inaktivierung des Biokatalysators verantwortlich zeigen. In mehreren Ansätzen wurden CYP102A1 (P450 BM3) und CYP101 (P450cam) für den Einsatz mit Peroxiden optimiert [103-105]. Weitere Möglichkeiten der Cofaktorsubstitution bieten eine direkte Übertragung von Elektronen durch Elektroden oder die Verwendung von Elektronenmediatoren [106, 107]. Zwar ermöglichen diese Ansätze Umsetzungen ohne den teuren Cofaktor NAD(P)H, allerdings sind die Umsatzraten solcher Prozesse für

eine kommerzielle Anwendung noch zu gering. Sie liegen deutlich niedriger als bei Reaktionen, die mit Cofaktor katalysiert werden.

Weitere für die Durchführung von Prozessen wichtige Parameter können durch Methoden der gerichteten Evolution oder des Protein-Designs verändert werden. Von Interesse ist hierbei eine hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln, in denen die meist hydrophoben Substrate von P450 Monooxygenasen gelöst werden können. Darüber hinaus ist die Erhöhung der Lagerstabilität und der absoluten Umsatzzahlen von Interesse. Auch die Veränderung der Substratspezifität ist beschrieben. Im Folgenden werden einige Methoden für die Verbesserung von Enzymen für konkrete Anwendungen dargestellt (siehe 1.3).

1.3 Gezielte Verbesserung von Biokatalysatoren

Die effiziente Anwendung von Biokatalysatoren verlangt nach nutzbaren Enzymen, die Prozesse mit hoher Aktivität, Selektivität und Stabilität unter Prozessbedingungen katalysieren. Wildtyp-Enzyme bieten ein interessantes Ausgangsmaterial für diese Anforderungen, allerdings bedürfen sie oft noch der Optimierung. Der Einsatz gentechnischer Methoden ermöglicht die Verbesserung von Enzymen, bzw. bietet die Möglichkeit Enzyme für verschiedene Prozesse maßzuschneidern. Die hierfür verwendeten Methoden rationales Protein-Design und gerichtete Evolution ergänzen sich und ermöglichen die Verbesserung von Enzymen für verschiedene Anwendungen.

1.3.1 Rationales Protein-Design

Im rationalen Protein-Design nutzt man strukturelle Informationen über das Enzym, das Wissen über die Wechselwirkungen von Substrat und Enzym und die Beziehungen zwischen Sequenz und Struktur von Enzymen. Diese Herangehensweise erfordert daher ein hohes Maß an Information, das aus Kristallstrukturen, NMR-Daten, Homologiemodellen und Sequenzvergleichen stammt. Die über das Enzym verfügbaren Daten werden zur gezielten Veränderung der Aminosäuresequenz genutzt. Je nach Aufgabenstellung werden Aminosäureveränderungen durch Sequenzvergleiche identifiziert [108].

Diese Methode wurde erfolgreich eingesetzt in der Veränderung der Substratspezifität, der Veränderung der Cofaktorabhängigkeit und der Veränderung der Enantioselektivität

von Reaktionen [109-111]. Darüber hinaus konnte die Thermostabilität einer α -Amylase durch Austausch von Asparaginresten und die Einführung von Prolinresten erhöht werden [112, 113]. Auch die thermische Stabilität des Waschmittelenzyms Subtilisin konnte durch Design neuer Disulfidbrücken und des Austausches von Methioninresten durch Serin erhöht werden [114]. Es gibt mehrere Beispiele, in denen die Aktivität von Enzymen stark erhöht wurde. Für die Erhöhung der Aktivität der Pyruvatdecarboxylase machte man sich sterische Effekte zu nutze, indem man das sperrige Tryptophan in Position 392 im Substratbindungskanal durch eine kleinere Aminosäure ersetzte [115]. Das rationale Protein-Design wurde auch in der Erweiterung des Substratspektrums eingesetzt. Nach Mutation zweier aromatischer Aminosäuren im Substratzugangskanal von P450cam (F87 und Y96) katalysierte das Enzym die Oxidation polyzyklischer Aromaten. Das Wildtypenzym katalysiert die 5-exo-Hydroxylierung von Campher [116].

1.3.2 Gerichtete Evolution

Die Herangehensweise bei der gerichteten Evolution beinhaltet die Herstellung einer großen Menge zufällig erzeugter unterschiedlicher Enzymvarianten, die im Folgenden mit Testsystemen in hohem Durchsatz durchmustert werden. Der Prozess der gerichteten Evolution ist eine Anlehnung an den natürlichen Vorgang der Evolution. Zwei Faktoren sind für den Erfolg der gerichteten Evolution ausschlaggebend. Einerseits muss eine Gen-Bibliothek mit großer Variation erzeugt werden, andererseits muss ein geeigneter Assay zur Verfügung stehen, mit dem verbesserte Mutanten identifiziert werden können [117]. In der Natur stellen klimatische Bedingungen, Populationszahlen oder Generationszahlen oft einen Selektionsdruck dar. Im Labor erfolgt die Selektion durch die Wahl eines geeigneten Testsystems. Der in einem Test ermittelte beste Kandidat dient als Ausgangspunkt für die Herstellung einer neuen Generation von Enzymvarianten. Nach mehreren Generationsschritten können die gewünschten Eigenschaften stark verbessert worden sein. Es handelt sich somit bei der gerichteten Evolution um einen iterativen Prozess, bei dem sich zufällige Mutagenese und Selektion von Mutanten mit erwünschten Eigenschaften abwechseln, bis das Enzym mit gewünschten Eigenschaften erzeugt worden ist. Der Vorteil der gerichteten Evolution liegt darin, dass sie in der Lage ist, die Eigenschaften von Enzymen zu verbessern, ohne dass strukturelle Informationen über den Biokatalysator vorliegen. Da Enzyme mehr Aminosäuren haben, die weit vom aktiven Zentrum entfernt liegen, als

solche, die in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum liegen, begünstigt die zufällige Mutagenese Mutationen, die weit vom aktiven Zentrum entfernt sind [118]. Diese Aminosäuren haben oft nur geringen Einfluss auf das aktive Zentrum. Daher erfordert die gerichtete Evolution immer eine hinreichend große Bibliotheksgröße. Die Herangehensweise bietet allerdings auch die Chance weitreichende Wechselwirkungen (sog. long-range effects) aufzuklären, die mit Methoden des rationalen Proteindesigns nur schwer identifizierbar sind. So gelang es mit dieser Herangehensweise, die Enantioselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* von $E=1,1$ auf $E=25,8$ zu steigern, wobei alle fünf eingeführten Mutationen nicht im aktiven Zentrum lagen [119]. Mit Methoden des rationalen Protein-Designs hätte diese Enzymvariante nicht vorgeschlagen werden können. Neben der Mutagenese eines ganzen Gens ist es auch möglich, einzelne Abschnitte eines Gens zufällig zu mutieren, man spricht in diesem Fall von Kassettenmutagenese. Generell kann man für die Herangehensweise in der gerichteten Evolution rekombinierende und nichtrekombinierende Methoden unterscheiden [120]. Bei der am häufigsten genutzten Methode, der so genannten *error-prone* PCR, der fehlerbehafteten Polymerase-Kettenreaktion, handelt es sich um eine nichtrekombinierende Methode. Mit ihr werden zufällige Mutationen in ein Zielgen eingebracht. Man nutzt hierfür die *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Dieser Polymerase fehlt die 5'-3'-„proofreading“-Aktivität, was zu einer erhöhten Fehlerrate führt [121]. Durch Einsatz von Manganchlorid, Variation der Magnesium- und dNTP-Konzentration kann die Fehlerrate variiert werden. Hohe Fehlerraten können sich als problematisch erweisen, da positive Mutationen mit inaktivierenden Mutationen kombiniert auftreten können [121]. Daher hält man die Fehlerrate in der Regel niedrig bei zwei bis drei Mutationen auf 1000 Basenpaaren. Nach der fehlerbehafteten PCR werden die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen verdaut und in einen Expressionsvektor kloniert und in einen Expressionsstamm transformiert. Statt der *error-prone* PCR können auch so genannte Mutatorstämme eingesetzt werden (z. B. *Epicurian coli* XL1 RED). Diese Wirtsstämme weisen Defekte in ihren DNA-Reparaturmechanismen auf, was zu Mutationen im gesamten Genom und somit auch auf dem Expressionsplasmid führt. Mit einer geeigneten Testmethode (dem so genannten Screening) werden Mutanten mit positiven Eigenschaften identifiziert, die in weiteren Mutageneserunden optimiert werden.

Das DNA-shuffling ist ein Beispiel für eine rekombinierende Methode für die gerichtete Evolution [122]. Die Methode basiert auf der Kombination verschiedener verwandter

DNA-Fragmente, um neue Genvarianten zu erzeugen. Die DNA-Fragmente werden hierbei meist durch einen kontrollierten DNase I-Verdau von verschiedenen Genen einer Enzymfamilie oder Genen einer *error-prone*-Bibliothek erhalten. Die Rekombination erfolgt mittels der Polymerase-Kettenreaktion, wobei die Häufigkeit der Rekombination von der Ähnlichkeit der DNA-Sequenzen abhängig ist. In der PCR dienen sich die DNA-Fragmente gegenseitig als Primer. Die Methode erlaubt die Kombination positiv getesteter Varianten oder nah verwandter Enzyme auf DNA-Ebene. Durch Rekombination werden positive Effekte kombiniert und negative Mutationen entfernt. Die Grundidee des DNA-shuffling wurde inzwischen variiert. Im so genannten StEP (Staggered Extension Process) werden in einer PCR verschiedene Matrizen denaturiert und kurzen Anlagerungs- und Synthesezeiten unterworfen [123]. StEP verzichtet auf den Einsatz von DNase. Durch die kurze Synthesezeit wird in jedem Schritt nur ein kleiner Teil des Gens amplifiziert. Im nächsten Syntheseschritt ist die Anlagerung an eine andere Matrize wahrscheinlich, wodurch die Rekombination ermöglicht wird. Im synthetischen Shuffling werden nur definierte synthetische Oligonukleotide eingesetzt [124]. Dies erlaubt ein hohes Maß an Kontrolle über den Shufflingprozess.

Eine relativ neue Methode, das so genannte CASTing kombiniert Elemente des rationalen Protein-Designs und der gerichteten Evolution [125]. Hierbei werden zwei Aminosäuren in unmittelbarer räumlicher Nähe einer Sättigungsmutagenese unterzogen, und die produzierten Varianten werden getestet. Für die Methode ist die Kenntnis der Struktur des Enzyms notwendig, da die Auswahl der Aminosäuren und der Abstand zwischen ihnen von der Sekundärstruktur des Enzyms abhängig sind.

1.3.3 Hochdurchsatzscreening

Limitierend für den Erfolg der gerichteten Evolution sind die ausreichende Größe einer Bibliothek und die Verfügbarkeit eines hochdurchsatzfähigen Testsystems. Grundlegende Voraussetzungen für ein erfolgreiches Testsystem sind hohe Sensitivität, Einfachheit, Schnelligkeit und Effizienz. Die verwendeten Testsysteme müssen robust sein, das heißt, sie dürfen nicht stark von schwankenden Reaktionsbedingungen beeinflusst werden. Ein robustes System muss ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit garantieren. Die wohl einfachsten Methoden der Durchmusterung von Enzymlibliotheken (Screening) werden auf Agarplatten durchgeführt. Für Plattentests

kommen vor allem Hydrolasen in Frage. Beispiele sind die Suche nach Lipaseaktivität auf Agarplatten mit einer Tributyrinemulsion, die Suche nach Phospholipaseaktivität auf Eigelbplatten und die Suche nach Amylaseaktivität auf mit Stärke angereicherten Agarplatten [126-128]. In allen drei Fällen lassen sich Kolonien, die die gewünschte Aktivität zeigen, durch eine Hofbildung um die Kolonien identifizieren.

Sind Tests auf Agarplatten nicht möglich, bieten sich photometrische Messmethoden an. Hierfür werden Kolonien in so genannten Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Vertiefungen kultiviert. Nach Expression des Enzyms erfolgt häufig der Umsatz mit einem Ersatzsubstrat, das nach Umsetzung seine Farbe ändert oder fluoresziert. Liegt das Enzym intrazellulär vor, müssen die Zellen permeabilisiert oder lysiert werden, um das Enzym für das Substrat verfügbar zu machen. Die Farbänderung oder auftretende Fluoreszenz kann mit Mikrotiterplattenspektrophotometern automatisiert für jede Vertiefung individuell gemessen werden.

Solche Testsysteme wurden für verschiedene Enzymklassen wie Hydrolasen und Oxidoreduktasen publiziert [129, 130].

Eine große Herausforderung im Hochdurchsatzscreening ist die Spezifität der Enzyme für die im Screening eingesetzten Ersatzsubstrate. So lautet eine goldene Regel der gerichteten Evolution: Man erhält nur die Mutanten, nach denen man sucht und der Erfolg einer Methode ist unmittelbar abhängig von den betrachteten Eigenschaften („You get what you screen for“) [131]. Aus diesem Grund ist der Einsatz von chromophoren Ersatzsubstraten teilweise problematisch. Durch Ersatzsubstrate erzielte Ergebnisse lassen sich nicht unbedingt direkt auf Zielsubstrate übertragen.

Hochdurchsatzscreeningsysteme, die Chromatographie, NMR-Spektroskopie, Massenspektroskopie oder andere Spektroskopiemethoden nutzen, können direkt für ein Zielsubstrat verwendet werden, um Produkte zu identifizieren und machen den Einsatz von Ersatzsubstraten unnötig. Allerdings sind diese Systeme mit einem hohen apparativen Aufwand und hohem Maß an Automatisierung verbunden. Aus diesem Grund kommen sie nur in seltenen Fällen zum Einsatz [132].

1.3.3.1 Hochdurchsatzassays für P450 Monooxygenasen

Inzwischen existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Hochdurchsatztests. Daher ist es nicht möglich einen umfassenden Überblick zu geben. Im Folgenden werden Beispiele für Testsysteme zur Optimierung von P450 Monooxygenasen beschrieben. Die am

häufigsten verwendeten Verfahren basieren auf photometrischen Tests, bei denen eine Veränderung der Absorption oder Fluoreszenz bei der Umsetzung beobachtet wird.

Beispielsweise absorbiert die reduzierte Form des Cofaktors NAD(P)H bei 340 nm, während NAD(P)⁺ bei 340 nm keine Absorption zeigt. Mit dieser Methode kann generell unabhängig vom eingesetzten Substrat der Verbrauch an Cofaktor bestimmt werden [133]. Aufgrund der im P450-Reaktionszyklus auftretenden Entkopplungsreaktionen lässt sich allerdings nicht immer direkt auf Produktbildung schließen.

Andere Tests nutzen verschiedene Ersatzsubstrate, die zu Farbstoffen oder fluoreszierenden Produkten oxidiert werden. Die Aktivitäten von eukaryotischen P450 Monooxygenasen werden oft über die Dealkylierung von Coumarin- oder Resorufinethern bestimmt. Das Produkt kann mit einem Fluoreszenzmessgerät detektiert werden.

Viele Hochdurchsatzassays nutzen die durch die Freisetzung von *p*-Nitrophenolat entstehende Gelbfärbung. Für P450 Monooxygenasen ist der Veretherung von Fettsäuren und Alkanen mit *p*-Nitrophenol in ω -Position beschrieben [130, 134]. Hydroxylierung in dieser Position führt zu einem instabilen Halbacetal, das zerfällt und *p*-Nitrophenolat freisetzt. Die durch *p*-Nitrophenolat hervorgerufene Gelbfärbung lässt sich bei 410 nm detektieren.

Für die Hydroxylierung von Octan wurde ein Testsystem entwickelt, mit dem die regioselektive Hydroxylierung in terminaler Position detektiert werden kann. Als Ersatzsubstrat dient Hexylmethylether (HME), das hinsichtlich physikalischer Charakteristika dem Octan sehr ähnlich ist. Nur die Hydroxylierung der Methoxygruppe von HME führt zur Bildung von Formaldehyd und Hexan-1-ol. Formaldehyd kann mit dem Farbstoff Purpald als violette Verfärbung sensitiv nachgewiesen werden [135]. Unter Verwendung eines weiteren Enzyms gelang es am ITB einen für die terminale Hydroxylierung von Octan spezifischen Assay mit Octan als Substrat zu etablieren. Nach der Umsetzung von Octan mit einer P450 Monooxygenase wird Octan-1-ol mit einer NAD⁺-abhängigen Alkoholdehydrogenase zu Octanal oxidiert. Das während der Reaktion entstehende NADH kann photometrisch bei 340 nm detektiert werden [136]. In einem Assay zur Detektion der Epoxidierung von Alkenen wird Styrol als Substrat eingesetzt. Das Produkt der Styroloxydation, Styroloxid wird mit γ -(4-Nitrobenzyl)pyridin zu einem Farbstoff umgesetzt. Dieser hat eine violette Farbe und kann photometrisch detektiert werden [137].

1.3.4 Veränderung von Eigenschaften von P450 Monooxygenasen

Mit den in 1.3.1, 1.3.2 und 1.3.3 geschilderten Methoden gelang es P450 Monooxygenasen für den Einsatz in Biosensoren, den Abbau von Schadstoffen, die Synthese von Feinchemikalien und Pharmazeutika zu verbessern. Die Untersuchung eukaryotischer Monooxygenasen wurde durch die heterologe Expression in bakteriellen Systemen erleichtert. Unter anderem aufgrund unterschiedlicher Nutzung der Codons gestaltete sich die Expression eukaryotischer P450 Monooxygenasen in *E. coli* jedoch als schwierig. Veränderungen in der Nukleotid- und teils in der Aminosäuresequenz führten zu einer verbesserten heterologen Expression. Besonders Änderungen im N-terminalen Bereich der eukaryotischen P450 Monooxygenasen, wie der Austausch der zweiten Aminosäure oder N-terminale Trunkierung, erhöhten die Ausbeute an Protein [138-140].

Das Substrat- und Produktspektrum von P450 Monooxygenasen wurde in mehreren Fällen verändert. In einem auf gerichteter Evolution basierenden Ansatz wurden P450-Mutanten erzeugt, die Indol hydroxylieren, was zur Produktion von Indigo führte [141]. In einem anderen Fall wurde das Substratspektrum der Fettsäurehydroxylase CYP102A1 auf Ethan erweitert [142]. Durch Proteindesign wurden Mutanten erzeugt, die (+)-Valencen zum wertvollen Geruchs- und Aromastoff Nootkaton oxidieren.

Zur Optimierung des Elektronentransfers wurden künstliche Fusionspartner zwischen Monooxygenase und Reduktase erstellt. Allerdings hat bis jetzt kein künstliches P450-Fusionsprotein die Aktivitäten der natürlichen Fusionsproteine aus der CYP102A-Familie erreicht. Kopplungsraten liegen bei meist nicht mehr als 10% [143, 144]. Auch eine Nebenreaktion von P450 Monooxygenasen, die so genannte Peroxidabzweigung, wurde verbessert, wodurch die Katalyse in Abhängigkeit von Wasserstoffperoxid durchgeführt werden kann. Umsetzungen mit Wasserstoffperoxid verlaufen jedoch langsamer als mit dem natürlichen Cofaktor NADPH. Ein weiterer Nachteil liegt in der raschen Inaktivierung der Enzyme durch Peroxide.

Weitere Eigenschaften, die für P450 Monooxygenasen optimiert wurden, umfassen die Erhöhung der Lösemitteltoleranz, um das Enzym zugänglicher für hydrophobe Substrate zu machen und die Erhöhung der Thermostabilität [145, 146].

1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Oxyfunktionalisierung von Fettsäuren durch P450 Monooxygenasen. Für die Hydroxylierung von Fettsäuren wurden verschiedene P450 Monooxygenasen untersucht. Der Fokus lag hierbei besonders auf einer Verschiebung des Produktmusters in γ - und δ -Position. Besonders γ - und δ -Hydroxyprodukte kurz- und mittelkettiger Fettsäuren stellen eine interessante Vorstufe in der Lactonsynthese dar. Beispielsweise wäre bei der Synthese von γ -(R)-Decalacton, dem aufgrund seines typischen Frucht- und Pfirsicharomas wirtschaftlich bedeutendsten Lacton, eine Abkopplung der heimischen Produktionsprozesse von Importrohstoffen aus tropischen Anbauregionen denkbar. Fettsäuren heimischer Nutzpflanzen könnten theoretisch durch geplante Innovationen als alternative Substrate für die Synthese des natürlichen Lactons Verwendung finden.

Aus dieser Fragestellung ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- I. Durchmusterung der Bereits am ITB vorhandenen P450 Monooxygenasen hinsichtlich veränderter Aktivität und Regioselektivität im Hinblick auf interessante Fettsäuren, wie zum Beispiel Laurinsäure
- II. Weiterentwicklung identifizierter Mutanten durch Methoden der gerichteten Evolution und des rationalen Protein-Designs
- III. Analyse weiterer P450 Monooxygenasen und Erzeugung von Mutanten mit Methoden des rationalen Protein-Designs

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien, Kits und Enzyme

Hersteller	Chemikalien, Enzyme, Kits
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5U/ μ l]
Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	5-Aminolävulinsäure, Agar, Caprinsäure, Caprylsäure, Cytochrom c, Dikaliumhydrogenphosphat, Ethidiumbromid, EDTA, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Katalase, Laurinsäure, Linolsäure, Lysozym aus Hühnereiweiss, Magnesiumsulfat, Methanol, Myristinsäure, Nalidixinsäure, Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriumdodecylsulfat, Palmitinsäure, <i>p</i> -Nitrophenylacetat, <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat, Stearinsäure
Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland	1 kb Ladder (Standard für Agarosegele)
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	NucleoSpin Extract Kit
MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	CIAP (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm), <i>Pfu</i> -Polymerase, <i>Pfu</i> -Puffer, Restriktionsenzyme und Puffer, T4 DNA Ligase und Puffer
metabion international, Planegg-Martinsried, Deutschland	Oligonukleotide
Merck, Darmstadt, Deutschland	Isopropanol
Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland	Oligonukleotide
Qiagen, Hilden, Deutschland	Qiagen Gel Extraction Kit

Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	DMSO, Ethanol (abs.), D-Glucose, Glycerin, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Tween 20
Roth, Karlsruhe, Deutschland	Acrylamid, Hefeextrakt, Trypton, TEMED
Sigma, Saint Louis, USA	GenElute™ Plasmid Miniprep Kit
Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	Ammoniumpersulfat, BSA, DNase, 12-Methylmyristinsäure, 13-Methylmyristinsäure
Sigma ARK, Darmstadt, Deutschland	Oligonukleotide
Stratagene, La Jolla, USA	dNTPs
Uptima interchim, Montluçon, Frankreich	BC Assay Protein Quantitation Kit

2.2 Geräte und Verbrauchsgegenstände

Tabelle 2-2: Verwendete Geräte und Materialien

Hersteller	Geräte	Typbezeichnung
Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	Ultrazentrifuge Pipettierroboter	Optima LE-80 K Biomek 2000
BioRobotics, Cambridge, England	Pickroboter	Biopick
Bio-Rad, München, Deutschland	DNA-Gelelektrophorese Elektroporation SDS-PAGE Proteinblotting	Mini-Sub™ DNA Cell, Mini-Sub™ DNA Cell GT Gene Pulser, Pulse Controller Model 583 Gel-Dryer Trans Blot semi-dry
Branson Ultraschall, Dietzenbach, Deutschland	Sonifier	Sonifier 250
Du Pont Instruments, Bad Homburg, Deutschland	Zentrifuge	Sorvall RC-5B

Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen, Deutschland	Mikrotiterplatteninkubator	TH30, Timix control
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Photometer Pipetten Reaktionsgefäße SpeedVac Thermocycler Thermomixer Tischzentrifugen Rotoren	Biophotometer Eppendorf research 1,5 ml; 2 ml Concentrator 5301 Mastercycler gradient Thermomixer 5436 Centrifuge 5417C Centrifuge 5417R A-4-62
Finnaqua, Tuusula, Finnland	Lyophilisator	Lyovak GT-2
Getinge AB, Getinge, Schweden	Autoklav	Pacs 2000
Greiner, Fredensborg, Dänemark	Petrischalen Pipettenspitzen Plastiktubes (15 u. 50 ml)	Petrischale, ohne Nocken Typ Eppendorf® Typ Falcon®
Haake, Karlsruhe, Deutschland	Wasserbad	B3 Dc10
IKA Labortechnik, Stauffen, Deutschland	Heizrührer Inkubator Vortexer	RCT Basic HS501 Digital Janke und Kunkel
Infors, Bottmingen, Schweiz	Inkubatoren	HAT Schüttelinkubatoren
Labortechnik Fröbel, Lindau, Deutschland	Laborwipptisch	Rocky
Millipore, Molsheim, Frankreich	Sterilfilter	Ø 0,22 µm
Molecular Devices, Ismaning, Deutschland	Mikrotiterplattenphotometer	Spectramax 340

Moulinex, Radolfzell, Deutschland	Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935
MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland	DNA-Gelelektrophorese	UV Leuchttisch
Nunc, Wiesbaden	Mikrotiterplatten	96 MicroWell™ Platten
Ohaus Waagen, Giessen, Deutschland	Waage	Precision Advanced
Pall, Dreieich, Deutschland	Nitrocellulosemembran	Biotrace™ NT
Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland	Photometer	UV/Visible ultrospec 3000
Ritter, Mainz, Deutschland	Deepwellplatten	riplate sw, aus PP, 2 ml
Sartorius, Göttingen, Deutschland	Waage	Basic
Schleicher & Schuell Bio Science, Dassel, Deutschland	Nitrocellulosemembran	Optitran®
Schott Glas, Mainz, Deutschland	Glaswaren	Erlenmeyerkolben, Bechergläser, Flaschen
Scientific Industries, Bohemia, USA	Vortexer	Vortex Genie 2
Shimadzu Europe, Duisburg, Deutschland	GC-MS UV-VIS-Photometer	GCMS-QP-2010 Nicolet 100
Stratagene, La Jolla, USA	Thermocycler	Robocycler Gradient
Sorvall, Langenselbold, Deutschland	Rotoren	SS-34, SLA-3000
V & P Scientific, San Diego USA	MTP-Replikatoren	96-well Deep-Well, 96- well standard- well Replicator

WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland	Inkubatoren	Brutschränke WTC Binder
WTW, Weilheim, Deutschland	pH Meter	level 2

2.3 Stämme, Oligonukleotide, Plasmide

2.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	relevanter Genotyp	Anbieter
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ clts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 Gen 1</i>)	Novagen, Madison, USA
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ ΔM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clontech, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i>	M15 [pREP4]	<i>lac ara gal mtl recA⁺ uvr⁺</i> [pREP4, <i>lacI, kan^r</i>]	Qiagen, Hilden
<i>Escherichia coli</i>	Novablue (DE3)	<i>endA1 hsdR17(rK12- mK12+)</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'</i> [<i>proA+B+ lacIqZΔM15 ::Tn 10(TetR)</i>]	Novagen, Madison, USA

2.3.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden bei Sigma-ARK, Operon oder metabion international bezogen. In Tabelle 2-4 die Nukleotidsequenz und der jeweilige Name aufgeführt. Restriktionsschnittstellen und veränderte Codons sind durch Kleinschreibweise gekennzeichnet.

Tabelle 2-4: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Verwendung
R47f	CTTTAAATTCGAGGCGCCTGGTnnnGTAACGCGCTA CTTATCAAGTCAG	CYP102A1- Sättigungs- mutagenese
R47r	CTGACTTGATAAGTAGCGCGTTACnnnACCAGGCGC CTCGAATTTAAAG	
Y51f	CTGGTCGTGTAACGCGCnnnTTATCAAGTCAGCGTC	
Y51r	GACGCTGACTTGATAAnnnGCGCGTTACACGACCAG	
F87f	GCAGGAGACGGGTTAAnnnACAAGCTGGACGCATG	
F87r	CATGCGTCCAGCTTGnnnTAACCCGTCTCCTGC	
L188f	GAAGCAATGAACAAGNNNCAGCGAGCAAATCCAG	
L188r	CTGGATTTGCTCGCTGNNNCTTGTTcATTGCTTC	
kBamHlf	GGACAGCAAATGGGTCGCGtcTCCATGACAATTTAA GAAATGCC	CYP102A1- Deletion
kBamHlr	GGCATTCTTTAATTGTCATGGAgcCGCGACCCATT TGCTGTCC	<i>Bam</i> HI in pET28a(+)
BamHlf	GCTATACGGaTCcAATATGG	CYP102A1 - Einführung
BamHlr	CCATATTgGAtCCGTATAGC	<i>Bam</i> HI Schnittstelle in Linker
ePf	CTCGATCCCGCGAAATTAATAC	CYP102A1 - error-prone PCR
ePr	CTAACCAGTCGACAAATTGC	
K69Hf	GCATGCGATGAATCACGCTTTGATcacAACTTAAGTC AAGCGC	CYP102A1- Punkt- mutationen
K69Hr	GCGCTTGACTTAAGTTgtgATCAAAGCGTGATTCATC GCATGC	

V78AS72Yf	GATAAAAACCTTAtatCAAGCGCTTAAATTTGcACGTGA TTTTGCAGGAGACGGG	CYP102A1- Punkt- mutationen
V78AS72Yr	CCCGTCTCCTGCAAAATCACGTgCAAATTTAAGCGC TTGataTAAGTTTTTATC	
V78Af	GCGCTTAAATTTGcACGTGATTTTGCAGGAGACGGG	
V78Ar	CCCGTCTCCTGCAAAATCACGTcCAAATTTAAGCGC	
V78Ff	CAAGCGCTTAAATTTtcCGTGATTTTGCAGG	
V78Fr	CCTGCAAAATCACGgaaAAATTTAAGCGCTTG	
V78Gf	GCGCTTAAATTTGgaCGTGATTTTGCAGGAGACGGG	
V78Gr	CCCGTCTCCTGCAAAATCACGtcCAAATTTAAGCGC	
V78Lf	CAAGCGCTTAAATTTctaCGTGATTTTGCAGG	
V78Lr	CCTGCAAAATCACGtagAAATTTAAGCGCTTG	
T260Af	CGAGAACATTCGCTATCAAATTATTgcgTTCTTAATT GCGGGACACG	
T260Ar	CGTGTCCCGCAATTAAGAAcgcAATAATTTGATAGCG AATGTTCTCG	
I263Af	CGCTATCAAATTATTACATTCTTAgctGCGGGACACG AAACAAC	
I263Ar	GTTGTTTCGTGTCCCGCagcTAAGAATGTAATAATTT GATAGCG	
I263Gf	CGCTATCAAATTATTACATTCTTAggtGCGGGACACG AAACAAC	
I263Gr	GTTGTTTCGTGTCCCGCaccTAAGAATGTAATAATTT GATAGCG	
S332Yf	GCCAACTGCTCCTGCGTTTTaCCTATATGCAAAAGA AGATACG	
S332Yr	CGTATCTTCTTTTGCATATAGGtAAAACGCAGGAGC AGTTGGC	

Bsbf	CGg gatccATGAATGAGCAGATTCCACATG	CYP152A1 - Klonierung
Bsbr	CCGctcgagTTAACTTTTTTCGTCTGATTCC	
F79Vf	CGGGTGCAGAAATCGCTGgTTGGTGTTAATGCGATT CAGGG	CYP152A1– Punkt- mutationen
F79Vr	CCCTGAATCGCATTAACACCAAcCAGCGATTTCTGC ACCCG	
R242Ff	CTGATTAATGTA CTGttcCCTATTGTCGCCATTTCTTA CTTTCTG	
R242Fr	CAGAAAGTAAGAAATGGCGACAATAGGgaaCAGTAC ATTAATCAG	
R242FN239Rf	GAGCTGATTcggGTA CTGttcCCTATTGTCGCC	CYP152A1– Punkt- mutationen
R242FN239Rr	GGCGACAATAGGgaaCAGTACccgAATCAGCTC	
R242FI238Rf	GAGCTGcgtAATGTA CTGttcCCTATTGTCGCC	
R242FI238Rr	GGCGACAATAGGgaaCAGTACATTacgCAGCTC	
BsbSeq	GAAGTCATGATTGAAGATGC	Sequen- zierung
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7 Terminator	CTAGTTATTGCTCAGCGG	

2.3.3 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind zusammen mit den relevanten Promotoren und Resistenzen in Tabelle 2-5 angegeben.

Tabelle 2-5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Merkmale	Resistenz	Anbieter
pET28a(+)	T7-Promotor	Kanamycin	Novagen, San Diego, USA
pQE-30	T5-Promotor	Ampicillin	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.4 Medien, Lösungen, Puffer

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 min. bei 121 °C autoklaviert [147]. Bei Flüssigkulturen erfolgte die Zugabe von Selektionsantibiotika direkt vor dem Inokulieren. Zur Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugegeben (Endkonzentration: 1,5% (m/V)). Antibiotikum wurde für Selektionsplatten nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben.

2.4.1 Medien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g
dH ₂ O	ad 1000 ml
pH 7	mit NaOH

SOC-Medium:

Hefeextrakt	5 g
KCl (1 M)	2,5 ml
NaCl	0,5 g
Trypton	20 g
dH ₂ O	ad 980 ml
pH 7	mit NaOH

Nach dem Autoklavieren wurden 20 ml einer sterilen 1 M Glucoselösung zugegeben.

TB-Medium:

(DMSO)	50 ml
Glycerin	4 ml
Hefeextrakt	24 g
Trypton	12 g
dH ₂ O	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄ zugegeben.

2.4.2 Puffer und Lösungen

2.4.2.1 Standardlösungen und Puffer

EB-Puffer:

Tris	10 mM
pH 8,4	mit HCl (aq)

Phosphatpuffer (KP_i):

KH ₂ PO ₄	50 mM
K ₂ HPO ₄	50 mM
pH 7,5	

1x TE:

EDTA	1 mM
Tris	10 mM
pH 7,5 oder pH 8	mit HCl (aq)

Lysepuffer:

DNase	0,05 U/ml
MgCl ₂	10 mM
Lysozym	1 mg/ml
Tris	50 mM
pH 8	mit HCl (aq)

2.4.2.2 Lösungen für die Expression

IPTG-Lösung:

IPTG	1 M
------	-----

Lagerung sterilfiltriert bei -20 °C

5-ALA-Lösung:

5-Aminolävulinsäure	1 M
---------------------	-----

Lagerung sterilfiltriert bei -20 °C

4000x Spurenelementelösung:

MgCl ₂	5 mM
FeCl ₂ · 6 H ₂ O	120 mM
ZnCl ₂ · 4 H ₂ O	4,5 mM
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,8 mM
NaMoO ₄ · 2 H ₂ O	4,5 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	3,4 mM
CuCl ₂	7,5 mM
H ₃ BO ₃	3,2 mM

Die Bestandteile der Spurenelementelösung wurden in 10% HCl (aq) gelöst.

2.4.2.3 Lösungen für die Proteinaufreinigung

Puffer A:

Na-Phosphat pH 7,5	50 mM
--------------------	-------

Puffer B:

Na-Phosphat pH 7,5	50 mM
--------------------	-------

NaCl	1 M
------	-----

BP (Bindepuffer):

K-Phosphat pH 7,5	50 mM
-------------------	-------

Imidazol	20 mM
----------	-------

NaCl	300 mM
------	--------

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

WP (Waschpuffer):

KP _i pH 7,5	50 mM
------------------------	-------

Imidazol	60 mM
----------	-------

NaCl	300 mM
------	--------

EP (Elutionspuffer):

KP _i pH 7,5	50 mM
------------------------	-------

Imidazol	200 mM
----------	--------

NaCl	300 mM
------	--------

2.4.2.4 Verwendete Antibiotika

Zur Selektion von Mikroorganismen mit resistenzvermittelnden Genen wurden folgende Antibiotika verwendet:

Tabelle 2-6: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml ddH ₂ O	30 µg/ml

2.4.2.5 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer:

EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
Essigsäure	57,1 ml
Tris	242 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

1%ige Agarose-Gellösung:

Agarose	6 g
1x TAE Puffer	ad 600 ml

Die Agarose wurde mit 1xTAE Puffer wiederholt aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand.

6x DNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblau	0,2% (m/V)
EDTA, pH 7,5	25 mM
Glycerin	30% (m/V)

2.4.2.6 Lösungen für die Transformation von *E. coli*

Psi-Broth:

Hefe Extrakt	5 g
MgSO ₄	5 g
Trypton	20 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,6	mit KOH

Tfbl (Transformationspuffer I):

CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15% (V/V)
KAc	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl ₂	100 mM
pH 5,8	mit Essigsäure

TfbII (Transformationspuffer II):

CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15% (V/V)
MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM
pH 6,5	mit NaOH

2.4.2.7 Lösungen für die SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer:

Tris	100 mM
DTT	200 mM
SDS	4% (m/V)
Bromphenolblau	0,2% (m/V)
Glycerin	20%

DTT wurde für jeden Elektrophoreselauf neu zugegeben; hierfür wurde eine 1 M Stammlösung verwendet.

Trenngel (12,5%):

4x-Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl-Puffer; pH 8,8; 0,4% (m/V) SDS)	2 ml
Acrylamidlösung 30% (m/V)	3,33 ml
APS 10% (m/V)	40 µl
H ₂ O	2,67 ml
TEMED	4 µl

Sammelgel (4%):

4x-Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl- Puffer; pH 6,8; 0,4% (m/V) SDS)	1 ml
Acrylamidlösung 30% (m/V)	0,52 ml
APS 10% (m/V)	40 µl
H ₂ O	2,47 ml
TEMED	4 µl

Elektrophoresepuffer:

Tris	3 g/l
Glycin	14,4 g/l
SDS	1 g/l

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie-Brilliant Blue R-250	1 g/l
Methanol	30% (V/V)
Essigsäure (99,8%)	10% (V/V)

Coomassie-Entfärbelösung:

Methanol	30% (V/V)
Essigsäure (99,8%)	10% (V/V)

2.4.2.8 Lösungen für nasschemische Nachweise

Phenolphthaleinlösung:

Phenolphthalein	250 mg
Ethanol	50 ml

0,1 N ethanolische Natronlauge:

NaOH	4 g
dH ₂ O	8 ml
Ethanol	ad 100 ml

0,5 N ethanolische Hydroxylaminhydrochloridlösung:

Hydroxylaminhydrochlorid	1,737 g
Ethanol	ad 50 ml

6 N Natronlauge:

NaOH	4,8 g
dH ₂ O	ad 20 ml

Eisen(III)-chloridlösung:

Eisen(III)-chlorid	2,5 g
dH ₂ O	50 ml

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von *E. coli*

2.5.1.1 Feste Nährböden

Nach dem Ausplattieren wurden LB-Agarplatten bei 37 °C ÜN inkubiert, danach mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlraum gelagert. Die Zellen sind bei Lagerung im Kühlraum ca. acht Wochen haltbar. Um Plasmidverlust zu vermeiden, wurden transformierte Zellen auf Selektivplatten ausplattiert. Für *E. coli* werden zur Selektion im Allgemeinen Antibiotika eingesetzt.

2.5.1.2 Glycerin-Dauerkulturen

Glycerin-Dauerkulturen eignen sich zur langfristigen Lagerung verschiedener Klone (15% (V/V) Glycerin, 85% (V/V) ÜN-Kultur). Die Glycerin-Dauerkulturen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

2.5.1.3 Übernachtkulturen

5 ml LB-Medium wurde in sterilen Reagenzgläsern unter Verwendung von sterilen Zahnstochern, bzw. Pipettenspitzen mit Kolonien von Agarplatten oder aus Glycerin-Dauerkulturen angeimpft. Bei Bedarf wurde das LB-Medium zuvor mit Antibiotika versetzt (beispielsweise für Plasmidpräparationen). Die Kulturen wurden ÜN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

2.5.1.4 Vorkulturen in Mikrotiterplatten

150 µl TB-DMSO-Medium mit Antibiotikum wurden mit Hilfe eines Pickroboters mit einer Kolonie pro Kavität angeimpft. Die Platte wurde 24 h bei 30 °C und 600 rpm inkubiert.

Die Platte wurde zum Animpfen von Hauptkulturen genutzt und konnte bei -80 °C gelagert werden.

2.5.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Expressionsplasmiden

2.5.2.1 Rubidiumchloridmethode zur Herstellung superkompetenter *E. coli*-Zellen

Prinzip:

Die Methode beruht auf der Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen unter Anwendung von Rubidiumchlorid und Hitzeschock.

Während der Transformation nimmt eine Zelle Plasmide bzw. lineare dsDNA auf. Zufriedenstellende Transformationsraten werden durch eine Erhöhung der Zellwandpermeabilität erreicht. Die Zellwandpermeabilität kann auf chemischem Weg durch die Rubidiumchloridmethode (2.5.2.1) oder andere Methoden erhöht werden. Auch in einem elektrischen Feld wird die Zellwandpermeabilität erhöht (2.5.2.2). Der Einsatz von Antibiotika bzw. Selektionsmedien soll garantieren, dass nur Mikroorganismen überleben, die ein Plasmid mit Selektionsmarker aufgenommen haben.

Durchführung:

Herstellung kompetenter Zellen:

100 ml Psi-Broth wurden mit 1 ml einer *E. coli*-ÜN-Kultur in einem 500 ml Erlenmeyerkoben angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert. 50 ml Aliquots wurden in einer Tischzentrifuge 10 min bei 3000 *g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,4 Vol. gekühltem TfBI resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 min auf Eis gekühlt und dann 10 min bei 3000 *g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 0,04 Vol. eisgekühltem TfBII resuspendiert. Der Ansatz wurde in Aliquots à 200 µl aufgeteilt und in vorgekühlte Reaktionsgefäße gefüllt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation:

Ein Aliquot wurde auf Eis aufgetaut, 50 ng Plasmid-DNA bzw. bis zu 20 µl Ligationsansatz zugegeben, gemischt und der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 45 s bei 42 °C inkubiert, danach 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml SOC-Medium aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (1700 *g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der verbliebenen Restflüssigkeit resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer im Brutschrank vorgewärmten Platte ausplattiert (37 °C).

2.5.2.2 Transformation durch Elektroporation

Prinzip:

Zellsuspensionen und DNA werden einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, wodurch in der Cytoplasmamembran temporär Poren erzeugt werden. Durch diese Poren kann DNA in die Zelle gelangen [148].

Durchführung:

Herstellung kompetenter Zellen:

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0.5 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C 15 min bei 3000 *g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 Vol eiskalten 10%igen Glycerin (V/V) resuspendiert und erneut bei 4 °C 15 min bei 3000 *g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet zweimal mit eiskaltem ddH₂O gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 2 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots à 40 µl aufgeteilt, in vorgekühlte Reaktionsgefäße gefüllt und am selben Tag verwendet.

Transformation:

In einem Reaktionsgefäß wurden 40 µl kompetente Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA gemischt. Gegebenenfalls wurde die DNA dialysiert, um das Risiko eines Kurzschlusses bei der Elektroporation zu reduzieren. Der Transformationsansatz wurde dann in eine eisgekühlte sterile Elektroporationsküvette überführt und 5 min auf Eis inkubiert.

Die Elektroporation von *E. coli* wurde mit 1500 V, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Im Anschluss wurde die Küvette mit 1 ml SOC-Medium aufgefüllt. Die Zellsuspension

wurde 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, auf LB-S elektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.3 Induktion und Expression von pET28a(+)-Konstrukten

2.5.3.1 Expression im Schüttelkolben.

Zur Expression von CYP102A-Enzymen wurden 400 ml TB-Medium mit Antibiotikum 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,8 bei 37 °C und 180 rpm in einem 2 l Erlenmeyerkolben kultiviert. Danach wurde mit einer 1 M IPTG-Lösung im Verhältnis 1:1000 induziert (Endkonzentration: 1 mM IPTG) und 100 µl der Spurenelementelösung zugesetzt. Die Zellen wurden 16 h Stunden bei 25 °C und 130 rpm kultiviert und danach geerntet.

Zur Expression von CYP152A1 wurden 400 ml TB-Medium mit 1 ml eines Transformationsansatzes inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 16 h später wurde mit 1 M IPTG-Lösung induziert (Endkonzentration 0.25 mM). Die OD_{600} lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 2. Die Kultur wurde mit 100 µl Spurenelementelösung supplementiert

2.5.3.2 Expression in Deepwellplatten

Pro Kavität wurden 600 µl TB-Medium mit Antibiotikum von einer Vorkulturplatte mit Hilfe eines Replikators angeimpft. Die Platte wurde 8 h bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 100 µl TB-Medium pro Kavität, das mit Spurenelementelösung, IPTG und 5-ALA versetzt war (Endkonzentration IPTG: 0,25 mM, 5-ALA 1 mM). Die Mikrotiterplatte wurde 24 h bei 30 °C und 600 rpm inkubiert und danach geerntet (4 °C, 1 h, 3000 *g).

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Aufreinigung von DNA nach Restriktionsverdauung oder PCR

Zur Aufreinigung von DNA wurde das Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Aufreinigung beruht auf einer spezifischen Bindung der DNA an einer Silicagelmatrix in Gegenwart chaotroper Salze. Enzyme und Salze werden durch einen

Waschschritt entfernt. Unter leicht alkalischen Bedingungen und geringer Ionenstärke wird die DNA eluiert.

2.6.2 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Prinzip:

Elektrophorese ist die Auftrennung von Stoffgemischen in einem elektrischen Feld. Zur Auftrennung von DNA können Agarose- und Polyacrylamid-Gelsysteme eingesetzt werden. Polyacrylamidgele zeichnen sich durch ein hohes Auflösungsvermögen aus. Agarosegele hingegen können über einen weiten Längenbereich Nukleinsäuren trennen. Agarose wird durch Erhitzen in Puffer gelöst. Nach Abkühlung geliert es wieder und bildet je nach Konzentration Poren unterschiedlicher Weite. Wird an ein Gel elektrische Spannung angelegt, wandert die negativgeladene DNA zur Anode. Kleine DNA-Fragmente wandern schnell durch die Poren des Gels, längere Fragmente werden durch die kleinen Poren am Lauf gehindert und wandern langsam. 1%ige Agarosegele eignen sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten von 500 bp - 10 kbp Größe. Die Auftrennung der DNA wird durch Einsatz von Ethidiumbromid sichtbar. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA. Unter UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid und zeigt somit die Lage der DNA an. Ethidiumbromid ist positiv geladen und wandert daher im Gel zur Kathode, der DNA-Laufrichtung entgegen. Die Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgt durch Vergleich mit einem Standard.

Durchführung:

Der Gelschlitten wurde in eine Gießapparatur eingespannt. 40 ml 1%ige Agaroselösung wurden mit ca. 3 µl Ethidiumbromid versetzt und in den Schlitten gegossen. Im Anschluss wurde der DNA-Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min wurde der Probenkamm entfernt. Das Gel wurde in der Elektrophoreseapparatur mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer, der durch seine hohe Dichte das Einsinken der DNA in die Taschen garantiert, versetzt. Die Taschen wurden mit 15 µl Probe beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über 30 min. Zur Dokumentation wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

2.6.3 Enzymatische Verfahren mit DNA

2.6.3.1 Dephosphorylierung durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Prinzip:

Alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung an 5'-überhängenden Enden, sowie stumpfen (blunt) Enden bei ssDNA, dsDNA, ssRNA, dsRNA. Sie wird beispielsweise zur Dephosphorylierung von 5'-Enden bei dsDNA verwendet, um Religationen der Vektor-DNA vor der Insertion von DNA-Fragmenten zu verhindern.

Durchführung:

Das Ansatzvolumen betrug 50 µl. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und konnte dann für Ligationen eingesetzt werden. Verwendet wurde alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP).

Pipettierschema:

DNA	28 µl aus Restriktionsverdauung
10x CIAP Puffer	5 µl
CIAP [1 U/µl]	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Alternativ konnte CIAP auch direkt der Restriktionsverdauung zugegeben werden. CIAP wurde mit dem NucleoSpin Extract Kit von der DNA abgetrennt.

2.6.3.2 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Prinzip:

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe doppelsträngiger DNA. T4-DNA-Ligase ligiert sowohl stumpfe (blunt), als auch überhängende (sticky) Enden. Für diese Reaktion wird ATP als Cofaktor benötigt. T4-Ligase ermöglicht so die Zyklisierung eines linearen DNA-Moleküls bzw. das Verbinden zweier linearer DNA-Moleküle, z.B. Vektor und Insert.

Durchführung:

Das Ansatzvolumen betrug 20 µl. Ein übliches molekulares Verhältnis Vektor zu Insert beträgt für sticky ends 1:3, bei blunt ends wird das Insert in fünffachem Überschuss

eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde ÜN bei 16 °C inkubiert und konnte dann transformiert werden.

Pipettierschema:

Insert	x µl
Vektor	y µl
10x T4-Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase [1 U/µl]	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.6.3.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Prinzip:

Restriktionsenzyme katalysieren die Spaltung von DNA-Molekülen an einer spezifischen Schnittstelle.

Durchführung:

Die Restriktionsverdauung von DNA-Molekülen wurde unter den für das Enzym vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei Doppelverdauungsreaktionen wurde der Puffer Y⁺/Tango (MBI Fermentas) verwendet.

Pipettierschema einer präparativen Restriktionsverdauungsreaktion:

Plasmid-DNA (Miniprep) oder Insert	30 µl
10x Puffer (enzymspezifisch)	5 µl bzw. 10 µl
Restriktionsendonuklease A [10 U/µl]	0,5 µl
Restriktionsendonuklease B [10 U/µl]	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Der Ansatz wurde 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsenzyme wurden durch Aufreinigung mit dem NucleoSpin Extract Kit aus dem Ansatz entfernt. Die Verdauungsreaktion wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

Pipettierschema einer analytischen Verdauungsreaktion:

Plasmid-DNA (Miniprep)	4 μ l
10x Puffer (enzymspezifisch)	2 μ l bzw. 4 μ l
Restriktionsendonuklease A [1 U/ μ l]	1 μ l
BSA	enzymabhängig
ddH ₂ O	ad 20 μ l

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdauung wurde anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.6.4 Fragmentisolation aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe von anderen DNA-Fragmenten zu trennen, wurde die DNA-Lösung (PCR oder Verdauungsreaktion) einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde auf dem UV-Leuchttisch die gesuchte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.6.5 Methoden zur Isolation von DNA

2.6.5.1 Plasmidisolation nach dem GenElute Plasmid MiniPrep Kit

Zur Isolation von reiner Plasmid-DNA für präparative Zwecke, wie z.B. für Sequenzierungen, wurde das GenElute Plasmid MiniPrep Kit der Firma Sigma verwendet. Das Protokoll basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen, gefolgt von einer DNA-Aufreinigung durch Ionenaustauschersäulen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Ausbeute betrug bis zu 20 μ g Plasmid DNA pro ml Kultur.

2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung von DNA

2.6.6.1 Standard-PCR

Prinzip:

Die Polymerase-Kettenreaktion [149] dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Die dabei ablaufenden Vorgänge ähneln dem Ablauf der Replikation in Zellen. Hierbei synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend von Startmolekülen, den so genannten Primern, einen neuen DNA-Strang, wobei einer der DNA-Stränge der „*Template*“-DNA als Matrize dient. Bei der PCR werden als Startmoleküle synthetisch erzeugte Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die mit komplementären Bereichen der „*Template*“-DNA hybridisieren. Ausgehend von den Primern synthetisiert die DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung unter Verwendung von dNTPs einen neuen DNA-Strang. Werden in der PCR zwei gegenläufig orientierte Primer benutzt, die einen DNA-Abschnitt begrenzen, kann gezielt dieser Bereich amplifiziert werden. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Schritte der PCR wird die Vervielfältigung der DNA ermöglicht. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei ca. 95 °C, was ein Aufschmelzen der Doppelstränge bewirkt. Es entsteht einzelsträngige DNA. Im zweiten Schritt lagern sich die Oligonukleotide an die Matrizen-DNA an. Die „*Annealing*“ Temperatur gibt hierbei die Temperatur an, bei der Oligonukleotid und DNA-Matrize spezifisch hybridisieren. Die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA ist in erster Linie abhängig von dem GC-Gehalt der Sequenz und der Länge der Primer. Da Guanin und Cytosin miteinander drei Wasserstoffbrücken eingehen, Adenin und Thymin jedoch nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, bedingen GC-reiche Sequenzen hohe Denaturierungstemperaturen. Die Annealingtemperatur wurde mithilfe eines Online-Programms berechnet (<http://bioinformatics.org/JaMBW>). Sie ergibt sich aus den freien Enthalpien der Bindungsstärken.

Die Synthese der neuen DNA-Moleküle erfolgt durch eine thermostabile DNA-Polymerase (z. B. *Taq* aus *Thermus aquaticus*, *Pfu* aus *Pyrococcus furiosus*) von den Primern ausgehend bei ca. 72 °C. Der Einsatz einer hitzestabilen Polymerase ermöglicht die Wiederholung der oben genannten Schritte automatisiert in Thermocyclern.

Durchführung:

Für analytische PCRs wurde die *Taq-Polymerase* aus *Thermus aquaticus*, für präparative PCRs wurde die *Pfu-Polymerase* aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. *Pfu-Polymerase* verfügt über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Diese reduziert die Fehlerrate bei der PCR, man spricht von einer Korrekturlesefunktion. PCR-Ansätze wurden nach Tabelle 2-7 auf Eis pipettiert. In Tabelle 2-8 ist exemplarisch ein Thermocyclerprogramm aufgeführt. Die optimalen Programmparameter, besonders die Annealingtemperatur mussten jedoch empirisch bestimmt werden.

Tabelle 2-7: Pipettierschema für die Standard-PCR

Komponente	Volumen	Arbeitskonzentration/ Menge
10x Polymerase Puffer*	5 µl	1x
dNTP-Mix**	4 µl	0,2 mM
Primer forward	1 µl	0,2 pmol/µl
Primer reverse	1 µl	0,2 pmol/µl
„ <i>Template</i> “-DNA***	10-100 ng	0,1-100 ng
ddH ₂ O für die Molekular- biologie	ad 49 µl	
Polymerase (5 U/µl)	1 µl	5 U

* enthält Mg²⁺ (15 mM)

** dATP, dCTP, dGTP, dTTP jeweils 2,5 mM, insgesamt also 10 mM

*** Plasmid-DNA oder genomischer DNA

Tabelle 2-8: Temperaturprogramm für die Standard-PCR

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	1	20
Anlagerung	50	1	
Synthese	72	3	
Synthese	72	6	1
Ruhephase	8	∞	1

Zur Überprüfung von Ligationen wurde die Kolonie-PCR angewendet (Tabelle 2-9, Tabelle 2-10). Dabei setzt man kein Plasmid als Matrize, sondern transformierte Zellen ein, die mit einem Zahnstocher von einer Zellkolonie entnommen werden. Als Primer dienen die Oligonukleotide, die auch für die Amplifikation der Zielsequenz verwendet wurden.

Tabelle 2-9: Pipettierschema für die Kolonie-PCR

Komponente	Volumen	Arbeitskonzentration/ Menge
10x Taq-Polymerase Puffer*	5 µl	1x
dNTP-Mix**	1 µl	0,2 mM
Primer forward	1 µl	2 pmol/µl
Primer reverse	1 µl	2 pmol/µl
„ <i>Template</i> “	gepickte Kolonie	0,1-100 ng
ddH ₂ O für die Molekular- biologie	ad 48 µl	
Polymerase (5 U/µl)	2 µl	10 U

Tabelle 2-10: Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	20
Anlagerung	40,5	1	
Synthese	72	3	
Synthese	72	6	1
Ruhephase	8	∞	1

2.6.6.2 Fehlerbehaftete PCR (*error-prone PCR*)

Prinzip:

Durch Veränderung der Standard-PCR-Bedingungen kann die Polymerase-Kettenreaktion dazu genutzt werden, Mutationen in einen bestimmten Abschnitt einer Sequenz einzubauen [150].

Eingesetzt wird die fehlerbehaftete PCR zur parallelen Erzeugung mehrerer Tausend Mutanten in Experimenten der gerichteten Evolution. Die fehlerbehaftete PCR erlaubt auf diese Weise die Veränderung unterschiedlichster Enzymeigenschaften, wie z. B. Thermostabilität, Aktivität und Selektivität. Die Fehlerrate wird durch die Durchführung der PCR unter nicht optimalen Bedingungen erhöht. Der Zusatz von Manganchlorid und ein nicht ausgeglichenes Verhältnis der dNTPs mit einer Base im Überschuss oder die Zugabe von dNTP Analoga wie dITP führen zur Steigerung der Fehlerrate.

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Tabelle 2-11 erstellt und im Thermocycler nach Angaben aus Tabelle 2-12 inkubiert. Nach der PCR wurde die amplifizierte DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten, in einen Vektor ligiert und dann transformiert. Für die fehlerbehaftete PCR wurde eines der dNTPs im Überschuss mit einer Konzentration von 0,4 mM eingesetzt, die anderen drei dNTPs und dITP wurden mit einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

Tabelle 2-11: Pipettierschema für die *error-prone* PCR

Komponente	Volumen	Menge
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µl	12.5 nmol
MnCl ₂ (0,5 mM)	1-10 µl	0,5-5 nmol
error-prone dNTPs	5 µl	variabel, siehe 2.6.6.2
10x <i>Taq</i> -Puffer	5 µl	1x
Plasmid-DNA	1 µl	2 fmol
Primer 1 (10 pmol/µl)	1 µl	10 pmol
Primer 2 (10 pmol/µl)	1 µl	10 pmol
ddH ₂ O	ad 48 µl	
<i>Taq</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)	2 µl	5 U

Tabelle 2-12: *error-prone* PCR-Programm

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	94	1	1
Denaturierung	94	1	30
Anlagerung	50	1	
Synthese	72	3	
Synthese	72	6	1
Ruhephase	8	∞	1

2.6.6.3 Ortspezifische Mutagenese (nach der QuikChange®-Methode, Stratagene)

Prinzip:

Punktmutationen in Plasmid-DNA werden durch die PCR-basierte ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) erzeugt. Hierzu werden Oligonukleotide einer Länge von 25-45 Nukleotiden verwendet,

die zu der DNA-Matrize bis auf Nukleotide im Zentrum der Primer komplementär sind. Für das Design der Primer wurde der Stratagene Quikchange Primer Tm Calculator verwendet (<http://www.stratagene.com/QPCR/tmCalc.aspx>). Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer sollte über 78 °C liegen und die Primer auf ein oder mehrere Guanin bzw. Cytosinbasen enden. Die Lage der Primer sowie das Mutageneseprinzip sind in Abbildung 2-1 kurz dargestellt. Das Plasmid wird mit Hilfe der Primer unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase vollständig amplifiziert. Die Abschriften enthalten die durch die Primer eingebrachte Mutation. Neben Mutationen sind auch Insertionen und Deletionen möglich. Da in der QuikChange-Reaktion lineare Kopien der DNA-Matrizen erzeugt werden, können diese nicht als Templat für den nächsten Syntheszyklus dienen. Die Amplifikation verläuft deshalb im Gegensatz zur klassischen PCR nicht exponentiell sondern linear. Vor der Transformation in *E. coli* erfolgt die Verdauungsreaktion der parentalen, methylierten DNA durch *DpnI*. *In vitro* synthetisierte nichtmethylierte DNA wird von *DpnI* nicht abgebaut.

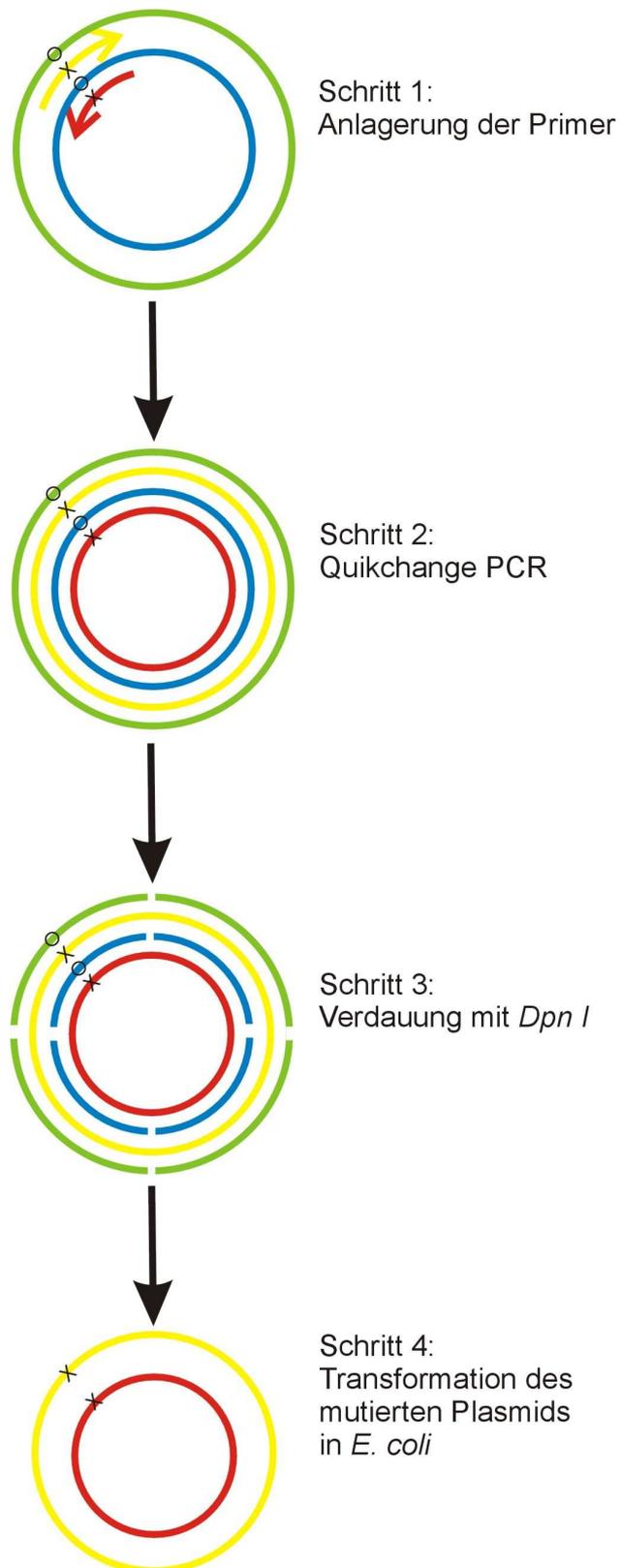


Abbildung 2-1: Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Tabelle 2-13 erstellt und im Thermocycler nach Tabelle 2-14 inkubiert. Zum Abbau der parentalen, methylierten Plasmid-DNA wurde der PCR-Ansatz mit 2 μl *DpnI* (10 U/ μl) bei 37 °C 3 h verdaut. Nach der Verdauungsreaktion wurde die nichtmethylierte DNA zur Propagation in *E. coli* transformiert. Nach Plasmidisolierung mit dem Sigma GenElute Plasmid Miniprep Kit erfolgte die Kontrolle der Mutagenese durch Sequenzierung.

Tabelle 2-13: Pipettierschema für die QuikChange PCR

Komponente	Volumen	Menge
10x <i>Pfu</i> -Puffer	5 μl	-
Plasmid-DNA	2 μl	5-50 ng
Primer 1 (10 pmol/ μl)	1 μl	10 pmol
Primer 2 (10 pmol/ μl)	1 μl	10 pmol
dNTPs (10 mM/ dNTP)	1 μl	10 nmol
ddH ₂ O	ad 48 μl	-
<i>Pfu</i> DNA Polymerase (2,5 U/ μl)	2 μl	5

Tabelle 2-14: Parameter für QuikChange PCR

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	0,5	16
Anlagerung	55±5 °C +0,4 °C/Zyklus	1	
Synthese	72	16,5	
Synthese	72	10	1
Ruhephase	8	∞	1

2.6.7 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden bei GATC Biotech AG, Konstanz durchgeführt. Die Proben wurden nach Angaben des Dienstleisters vorbereitet und verschickt.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Zellaufschluss

Zellaufschluss mittels Ultraschall:

Bei -20 °C gelagerte bzw. frisch geerntete Zellen wurden in 50 mM KP_i pH 7,5 resuspendiert. Pro Gramm Biofeuchtmasse wurden 3 ml Puffer verwendet. Der Puffer wurde mit 0,1 mM PMSF, einem Proteaseinhibitor, supplementiert, um den Abbau von Proteinen zu verhindern. Der Zellaufschluss wurde mit dem Ultraschalldesintegrator Branson Sonifier 250 durchgeführt (3*2 min Ultraschallpulse, Leistungsabgabe 40%, Output control Position 4), wobei die Proben in Eiswasser gekühlt wurden. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wurden die Proben 2 min auf Eis gekühlt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (20 min, 4 °C, 35000 *g). Das erhaltene Zellysate wurde aliquotiert, filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

Zellaufschluss mittels Lysozym:

Lysozym ist ein bakterizides Enzym, das im Nasenschleim und im Eiklar enthalten ist. Das 1922 von A. Fleming entdeckte Lysozym spaltet die glykosidische Bindung des Mureins zwischen dem C1-Atom der N-Acetylmuraminsäure und dem C4-Atom des N-Acetylglucosamins und baut die Muropolysaccharidkette zu einem Disaccharid ab.

Zum Zellaufschluss von Zellpellets aus Mikrotiterplattenexpressionen wurde das Pellet in 400 µl Lysepuffer resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Lysate und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt (1 h, 4 °C, 3000 *g).

2.7.2 Bestimmung der P450-Konzentration

Prinzip:

Mit Kohlenstoffmonoxid begaste Cytochrom P450-Lösungen zeigen in reduzierter Form eine intensive Absorption bei 450 nm (Soret-Bande), die durch die Bildung eines Häm-Fe(II)-Carbonyl-Komplexes zu Stande kommt. 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 ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zu erkennen. Für inaktive P450 Monooxygenasen wird ein Absorptionsmaximum bei 420 nm beobachtet.

Cytochrom P450 kann daher mittels Differenzspektrum in durch Dithionit reduzierten Lösungen nachgewiesen werden.

Die P450-Konzentration wird mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt. Dabei wird ein Differenzspektrum zwischen reduziertem P450-CO-Komplex und reduziertem P450 aufgenommen.

$$c(P450) = \frac{\Delta A_{450-490} * 1000 * f}{\epsilon * l}$$

c(P450): Konzentration von P450 [nmol/ml]

$\Delta A_{450-490}$: Absorptionsdifferenz zwischen 450 nm der CO-begasten Probe und 490 nm der nicht begasten Probe

f: Verdünnungsfaktor

l: Länge der durchstrahlten Küvette (cm)

ϵ : Extinktionskoeffizient von P450 (91 mM⁻¹*cm⁻¹)

Durchführung:

Das Zelllysat wurde in einem Gesamtvolumen von 2 ml im Verhältnis 1:10 bis 1:40 verdünnt und mit einer Spatelspitze Na-Dithionit reduziert. Der Ansatz wurde in 2 Küvetten aufgeteilt. Einer der Ansätze wurde eine Minute mit CO begast. Im Anschluss wurde ein Differenzspektrum zwischen 400 und 500 nm aufgenommen, wobei die nichtbegaste Probe als Referenz diente. Zur Aufnahme von CO-Differenzspektren mit CYP152A1 wurde ein Aliquot zuerst begast und danach beide Aliquots mit Na-Dithionit reduziert.

Zur Aufnahme des CO-Differenzspektrums in Mikrotiterplatten wurden 100 µl Lysat mit 20 µl Na-Dithionitlösung (50 mg/ml in 50 mM KP_i pH 8) gemischt. Von der Reaktionslösung wurde im unbegasten und im mit CO-begasten Zustand ein Spektrum aufgenommen. Aus der Differenz wurde die P450-Konzentration bestimmt.

2.7.3 Chromatographischer Nachweis der Flavocytochrome

Prinzip:

Die Flavincofaktoren der Reduktase-Domäne von CYP102A-Enzymen können unter Erhitzen und Denaturierung des Enzyms freigesetzt werden. Die Auftrennung der Cofaktoren erfolgt chromatographisch über Dünnschichtchromatographie. Die Cofaktoren können durch ihre Fluoreszenz unter UV-Licht detektiert werden.

Durchführung:

Eine CYP102A7-Lösung wurde 30 min bei 80 °C inkubiert. Die Probe wurde 2 min bei 20000 *g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand durch Dünnschichtchromatographie analysiert und mit FAD- und FMN-Standardlösungen verglichen. Die Konzentration der Standardlösungen lag im Bereich der Konzentration an CYP102A7 (1-10 µM). Das verwendete Laufmittelgemisch bestand aus *n*-Butanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 5:2:3 (V:V:V). Nach Anregung bei 280 nm konnten die Cofaktoren als grüne Punkte detektiert werden.

2.7.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Prinzip:

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nutzt das Prinzip aller elektrophoretischen Trenntechniken: Geladene Moleküle wandern im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von Größe, Ladung und Form der Moleküle und Porenweite des Gels. Die Verwendung eines Gelsystems reduziert den Einfluss physikalischer Faktoren wie Diffusion und Konvektion. Polyacrylamidgele entstehen durch radikalische Polymerisation des Monomers Acrylamid und des quervernetzenden Methylenbisacrylamids. Die Porengröße der Gele ist abhängig von der Acrylamidkonzentration und dem Verhältnis von Monomer zu Quervernetzer. Hohe Acrylamidkonzentrationen (bis 30%) führen zu einem hohen Molekularsiebeffekt, große Moleküle werden in ihrem Lauf stark retardiert.

Die SDS-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von Proteingemischen, zum Nachweis rekombinant exprimierter Proteine und zur Kontrolle von Proteinaufreinigungen durchgeführt [151]. SDS, ein anionisches Detergenz, denaturiert und solubilisiert Proteine, indem es sich mit seinem hydrophoben Rest an Proteine anlagert. Außerdem maskiert es die native Ladung, die Proteine werden negativ

geladen. Eine vollständige Denaturierung erreicht man durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C und den Einsatz von β -Mercaptoethanol oder DTT im Probenpuffer zur Reduktion von Disulfidbrücken. Im diskontinuierlichen System, das aus Sammel- und Trenngel besteht, durchlaufen die Proben zuerst das 4%ige Sammelgel. Die Chloridionen im Sammelgel haben eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als die Proteine. Sie werden Leitungen genannt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Glycinionen im Elektrophoresepuffer ist hingegen geringer, als die der Proteinproben. Die Glycinionen werden als Folgeionen bezeichnet. Die schneller wandernden Ionen erzeugen zwischen sich und den langsamer wandernden Proteinen einen Bereich geringerer Leitfähigkeit. Dies führt zu einer Fokussierung der Proteine zwischen Chlorid- und Glycinionen. Die Verschiebung des pH-Wertes von 6,8 auf 8,8 beim Übergang vom Sammelgel zum Trenngel erhöht die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen im Laufpuffer. Die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Durchführung:

Die Glasplatten wurden mit Isopropanol gereinigt, ein Gummikeil zwischen die Glasplatten gelegt und mit drei Klammern fixiert. Die 12,5%ige Trenngellösung wurde bis 1 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol dekantiert. Die Sammelgellösung wurde auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Gummikeil und der Probenkamm entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Im Anschluss wurde die Elektrophoreseapparatur mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit Puffer gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert, abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Pro Bahn wurden 10 μ g Protein bzw. 12 μ l Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 10 min bei 10 mA/Gel und 55 min bei 25 mA/Gel. Zur Detektion von Proteinbanden wurde das Gel \ddot{U} N mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, am nächsten Tag mit Entfärbelösung solange entfärbt bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren bzw. der Hintergrund farblos wurde. Das Gel wurde anschließend im Gelrockner getrocknet.

2.7.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde entweder das BCA-Kit der Firma Uptima-Interchim oder das Bradford-Kit von Biorad verwendet.

2.7.5.1 BCA-Assay

Der Proteinbestimmungstest beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen in Anwesenheit von Proteinen im alkalischen Milieu. Cu^+ -Ionen bilden mit Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex. Die Zunahme der Absorption der Messlösung ist proportional zum Proteingehalt und kann bei 562 nm detektiert werden. Durch eine externe Kalibrierung mit BSA als Referenz lässt sich eine quantitative Aussage des Proteingehalts treffen. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.5.2 Bradford-Assay

Diese Nachweismethode beruht auf der Bindung von Coomassie *brilliant blue* G-250 an Proteine. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Lösung von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption der Messlösung ist proportional zur Proteinkonzentration. Durch eine externe Kalibrierung mit BSA als Referenz lässt sich eine quantitative Aussage des Proteingehalts treffen.

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 photometrisch gemessen.

2.7.6 Automatische Zellvereinzellung mit dem Pickroboter

Um große Bibliotheken durchmustern zu können, müssen die einzelnen Klone in getrennte Reaktionsgefäße, wie z. B. in Mikrotiterplatten, überführt werden.

Der Pickroboter BioPick nahm über eine Kamera das Bild einer Agarplatte auf und erfasste mittels eines Bilderkennungssystems dabei die Lage einzelner Kolonien, welche dann von einer Nadel gepickt und in mit TB-Medium gefüllte Mikrotiterplatten überführt wurden. Die Erkennungsparameter wurden empirisch der Anzahl der Kolonien, ihrem Durchmesser und der Plattenfüllhöhe angepasst.

2.7.7 Proteinaufreinigung

2.7.7.1 Aufreinigung von Monooxygenasen über Metallaffinitätschromatographie

Die spektroskopischen Eigenschaften von P450 Monooxygenasen ermöglichen eine einfache Detektion des aufzureinigenden Proteins. Im nativen Zustand absorbieren P450 Monooxygenasen Licht bei 417 nm, was photometrisch detektiert werden kann.

Die in Vektor pET28a(+) einklonierten P450 Monooxygenasevarianten wurden als Fusionsproteine mit einer N-terminalen Hexahistidinsequenz exprimiert. Dies erlaubte die Aufreinigung über Metallaffinitätschromatographie. Diese chromatographische Methode wurde zuerst von Porath et al. beschrieben [152]. Hierbei binden Seitenketten verschiedener Aminosäuren vor allem Histidin, Tryptophan und Cystein an Übergangsmetallen z. B. Zink, Nickel oder Cobalt, die an einer Festphase immobilisiert werden.

Als Matrix diente eine Ni-NTA-Säule. Nitrilotriessigsäure (NTA) ist ein Chelatbildner, der vier Koordinationsstellen des Ni^{2+} -Ions besetzt, die restlichen zwei Koordinationsstellen werden von Histidinen des His-Tag besetzt. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert und danach wurde die Proteinlösung mit einer peristaltischen Pumpe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit steigenden Konzentrationen von Imidazol, das ebenfalls an Ni^{2+} -Ionen binden kann und das Protein verdrängt. Zur Aufreinigung wurde ein 50 mM KP_i pH 7,5 mit 500 mM NaCl und ein Elutionspuffer (50 mM KP_i pH 7,5 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte über einen mehrstufigen Gradienten. Nachdem das Enzym auf der Säule gebunden hatte, wurde mit 30 mM Imidazol gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Danach wurde die Imidazolkonzentration auf 60 und 150 mM erhöht, bei 200 mM Imidazol wurde das Protein eluiert. Die aufgereinigten Fraktionen wurden über Nacht in 2 l 50 mM KP_i pH 7,5 dialysiert.

2.7.8 Aktivitätstests

2.7.8.1 Bestimmung der NADPH-Oxidationsrate für CYP102A1-Varianten

Prinzip:

NADPH absorbiert im Gegensatz zu NADP^+ Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Abnahme der Absorption bei 340 nm in Umsetzungen lässt auf NADPH-abhängige

P450-Aktivität schließen. Allerdings ist dieses Testsystem wegen der häufig auftretenden Entkopplung der NADPH-Oxidation von der Produktbildung kein direktes Maß für die Hydroxylierungs- bzw. Epoxidierungsaktivität (siehe Abbildung 1-2).

Durchführung:

Für den NADPH-Verbrauchstest wurden 1 nmol der entsprechenden CYP102A1-Variante und 20 µl einer 25 mM Lösung des jeweiligen Substrats in DMSO mit Puffer gemischt, das Gesamtvolumen betrug 900 µl. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl einer 1 mM NADPH-Lösung gestartet und bei 340 nm photometrisch verfolgt. Die NADPH-Oxidationsrate (Steigung der erhaltenen Kurve) wurde im linearen Bereich innerhalb der ersten 30 s der Reaktion gemessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Aus der gemittelten Steigung wurde mittels des Extinktionskoeffizienten von NADPH ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der CYP102A1-Konzentration die Umsatzrate [$\text{eq(NADPH) eq(P450)}^{-1} \text{ min}^{-1}$] berechnet.

Zur Durchführung in Mikrotiterplatten wurde der Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 200 µl skaliert. Lysat und Substrat wurden in einem Volumen von 100 µl KP_i vereinigt, 5 min bei RT inkubiert und der Nullwert bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl NADPH Lösung (0,2 mg/ml) gestartet. Die Veränderung der Absorption wurde über einen Zeitbereich von 5 min verfolgt.

2.7.8.2 Reaktionen mit CYP152A1

Der Reaktionsansatz wurde in einem Volumen von 1 ml 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 durchgeführt. Der Ansatz enthielt 0,2 mM H_2O_2 , 0,5 mM Substrat und 1 µM Enzym und wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.7.8.3 δ -pNCA-Test, Assay im Mikrotiterplattenformat

Zur Bestimmung der Aktivität der Mutantenbibliothek wurden 100 µl 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8 mit 0,25 mM Ersatzsubstrat mit 100 µl Zelllysate gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1,2 mM NADPH-Lösung gestartet und bei 412 nm verfolgt.

2.7.9 Bindungsstudien

Prinzip:

Die Bindung eines Substrats an eine P450 Monooxygenase wird in der Regel von spektralen Änderungen begleitet. Man unterscheidet hierbei drei Typen (Typ I, Typ II und reverser Typ I). Typ I-Verhalten zeigt bei zunehmender Substratkonzentration eine Zunahme der Absorption bei 390 nm und eine Abnahme bei 420 nm. Zurückzuführen ist dies auf eine Verschiebung des spin-Zustandes des Eisens von low-spin zu high-spin.

Durchführung:

Die Messungen erfolgten in Quarzglasküvetten in einem Volumen von 500 µl. Eine aufgereinigte CYP-Lösung wurde mit 1 µl einer substrathaltigen DMSO-Lösung versetzt, eine weitere diente als Referenz. Die Substratkonzentrationen lagen zwischen 2 und 1000 µM. Zwischen 360 und 450 nm wurden Differenzspektren aufgenommen. Der reziproke Wert der Differenz zwischen Maximum und Minimum wurde in einer zu Lineweaver-Burk analogen Auftragsweise dargestellt und die Bindungskonstante bestimmt. Der K_D -Wert entspricht dem negativen Kehrwert des x-Achsenabschnitts.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Prinzip:

Die Gaschromatographie mit Massenspektrometrie ist eine sensitive Nachweismethode, bei der Produkte zuerst in einem Gasstrom aufgetrennt und dann die nachzuweisenden Produkte fragmentiert werden. Anhand von Laufverhalten und Fragmentierung ist eine Identifikation der Substanzen möglich. Hydroxyprodukte von Fettsäuren zerfallen im GC-MS uncharakteristisch, darüber hinaus sind keine Referenzsubstanzen erhältlich. Aus diesem Grund wurden Fettsäuren und deren Hydroxyprodukte mit Trimethylchlorosilan silyliert. Die trimethylsilylierten Substanzen können anhand ihrer Fragmentmuster eindeutig identifiziert werden.

Durchführung:

Die Reaktionsansätze mit Fettsäuren aus NADPH-Oxidationsreaktionsansätzen (2.7.8.1) und Umsetzungen mit Wasserstoffperoxid (2.7.8.2) wurden mit verdünnter Salzsäure auf pH 2 angesäuert, mit 1 Vol Diethylether extrahiert und über $MgSO_4$

(wasserfrei) getrocknet, der Diethylether wurde über Nacht abgedampft. Der Rückstand wurde in 35 μl Derivatisierungslösung (1% Trimethylchlorsilan in N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid)) aufgenommen. Der Ansatz wurde 30 min bei 70 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und über GC-MS analysiert. Aus dem Quotient an gemessenem Produkt-Eduktverhältnis und dem theoretischen Produkt-Eduktverhältnis ließ sich die Kopplungseffizienz bestimmen.

Allgemeine Parameter:

Gerät: Shimadzu GC/MS QP2010

Trägergas: Helium, Trägergasgeschwindigkeit: 30 cm s^{-1}

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

GC-Einstellungen: Injektortemperatur: 250 $^{\circ}\text{C}$; Interfacetemperatur: 285 $^{\circ}\text{C}$

MS-Einstellungen: Ionenquellentemperatur: 200 $^{\circ}\text{C}$

Programm Fettsäuren:

1) 100 $^{\circ}\text{C}$ isotherm 1 min 2) 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ von 100 bis 300 $^{\circ}\text{C}$

3) 5 $^{\circ}\text{C min}$ bei 300 $^{\circ}\text{C}$

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

Start m/z: 50

Ende m/z : 450

Programm Laurinsäure:

Säule: 1) 100 $^{\circ}\text{C}$ isotherm 1 min 2) 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ von 100 $^{\circ}\text{C}$ bis 190 $^{\circ}\text{C}$

3) 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ von 190 $^{\circ}\text{C}$ bis 197 $^{\circ}\text{C}$

4) 30 $^{\circ}\text{C min}$ bei 300 $^{\circ}\text{C}$

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

Start m/z: 50

Ende m/z : 450

Die trimethylsilylierten Fettsäurederivate wurden an Hand ihrer charakteristischen Massenfragmente zugeordnet.

Programm Geranyl-, Nerylaceton:

Säule: 1) 120 °C isotherm 3 min 2) 5 °C min⁻¹ von 120 °C bis 180 °C
3) 10 °C min⁻¹ von 180 °C bis 280 °C

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

Start m/z: 50

Ende m/z : 450

Programm Ionon:

Säule: 1) 150 °C isotherm 1 min 2) 20 °C min⁻¹ von 150 °C bis 250 °C
3) 250 °C isotherm 5 min

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

Start m/z: 50

Ende m/z : 450

Programm Limonen:

Säule: 1) 80 °C isotherm 2 min 2) 10 °C min⁻¹ von 80 °C bis 180 °C
3) 30 °C min⁻¹ von 180 °C bis 250 °C
4) 30 °C min bei 300 °C

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

Start m/z: 50

Ende m/z : 450

2.8.2 Nasschemische Nachweise

2.8.2.1 Rohjahn-Probe

Prinzip:

Die Rohjahn-Probe erlaubt den Nachweis verseifbarer Verbindungen, wie z. B. Ester, Lactone, Anhydride, verschiedene Halogenide, Amide und Nitrile. Die Verseifung lässt sich über eine Änderung des pH-Wertes mit pH-Indikatoren anzeigen. Der in der Rohjahn-Probe eingesetzte pH-Indikator Phenolphthalein färbt den Reaktionsansatz vor dem Ablauf der Reaktion rot, durch die Verseifung sinkt der pH-Wert und die Lösung wird farblos.

Durchführung:

Eine definierte Menge Lacton wurde in Ethanol gelöst, mit 3 Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt und 0,1 N ethanolische Natronlauge zugefügt. Die Proben wurden nach einer Inkubationszeit vermessen, bzw. zuerst im Wasserbad erwärmt und danach abgekühlt.

Zum quantitativen spektrometrischen Nachweis wurde der Versuchsansatz wie folgt abgeändert:

Die jeweils angegebene Menge Lacton wurde in genau 3 ml Ethanol gelöst, mit 3 Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt und dann 20 µl ethanolische Natronlauge 0,1 N zugefügt. Der Inhalt der Eppendorfgefäße wurde sorgfältig durchmischt und dann für 10 min verschlossen bei RT inkubiert. Nach der ersten Messung wurden diese offen für weitere 30 min inkubiert, gemessen und dann noch einmal für weitere 30 min inkubiert und bei 560 nm gemessen.

2.8.2.2 Hydroxamsäuretest

Prinzip:

Der Hydroxamsäuretest beruht auf der Aminolyse von Carbonsäurederivaten durch Hydroxylamin unter Bildung von Hydroxamsäuren, die mit Eisen(III)-Ionen einen roten Komplex bilden.

Durchführung:

Eine definierte Menge Lacton wurde mit 1 ml der 0,5 N ethanolischer Hydroxylaminhydrochloridlösung versetzt und 200 µl 6 N Natronlauge wurden

zugegeben. Nach Erhitzen bis zum Sieden und anschließendem Abkühlen der Lösung wurden 2 ml Salzsäure zugetropft. Um die Trübung wieder aufzulösen, wurden noch 2 ml Ethanol und im Anschluss 3 Tropfen 5%ige Eisen(III)-chloridlösung zugegeben. Die Probe färbte sich intensiv dunkelrot bis violett.

2.9 Organische Synthese

2.9.1 Synthese der Surrogatsubstrate

2.9.1.1 Darstellung von 5-Hydroxydodecansäuremethylester

In einem Kolben mit Rückflußkühler und Trockenrohr mit Calciumchlorid wurden 50 mmol (9,915 g) δ -Dodecalacton in 100 ml Methanol gelöst und unter Rühren mit 300 mmol (30,357 g) Triethylamin versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel und Triethylamin wurden unter vermindertem Druck vollständig entfernt.

2.9.1.2 Darstellung von 5-Hydroxydecansäuremethylester

45 mmol (7,66 g) δ -Decalacton, 270 mmol Triethylamin (27,32 g, 37,4 ml) und 90 ml Methanol wurden, wie bei der Darstellung von 5-Hydroxydodecansäuremethylester beschrieben, für 12 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel und Triethylamin unter vermindertem Druck abdestilliert.

2.9.1.3 Darstellung von 5-Hydroxyoctansäuremethylester

70 mmol (9,95 g) δ -Octalacton, 420 mmol Triethylamin (58 ml) und 140 ml Methanol wurden, wie beim 5-Hydroxydodecansäuremethylester beschrieben, für 12 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel und Triethylamin unter vermindertem Druck abdestilliert.

2.9.1.4 Synthese von 5-Ioddodecansäuremethylester

30 mmol (7,868 g) Triphenylphosphin und 30 mmol (2,042 g) Imidazol wurden in einem Kolben mit Magnetrührer und Tropftrichter nach dreimaligem Evakuieren der Apparatur und anschließendem Spülen mit Stickstoff, in 30 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad gekühlt. Über eine Dauer von 1,5 h wurden 30 mmol (7,61 g) Iod in kleinen Portionen zugegeben. Nach 30 min Reaktionszeit wurden unter weiterer Kühlung im Eisbad 22 mmol (5 g) 5-Hydroxydodecansäuremethylester, in 14 ml Dichlormethan gelöst zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Der Reaktionsansatz wurde über Kieselgel abfiltriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Das Rohprodukt wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Hexan/Diethylether; 9/1 (V/V)). Man erhielt ein blassrosa öliges Produkt, das sich nach längerem Stehen dunkelrot färbte.

2.9.1.5 Synthese von 5-Bromdodecansäuremethylester

30 mmol (7,868 g) Triphenylphosphin und 30 mmol (2,042 g) Imidazol wurden in einem Kolben mit Magnetrührer und Tropftrichter nach dreimaligem Evakuieren der Apparatur und anschließendem Spülen mit Stickstoff, in 25 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad gekühlt und eine Lösung aus 30 mmol (4,795 g, 1,537 ml) Brom in 15 ml Dichlormethan zugetropft, wobei leicht gelbliche Kristalle von Ph_3PBr_2 ausfielen. Nach 30 min wurden unter weiterer Kühlung 22 mmol (5 g, Reinheit GC 85%) 5-Hydroxydodecansäuremethylester in 15 ml Dichlormethan gelöst zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt.

Das Lösungsmittel aus dem Reaktionsansatz wurde unter vermindertem Druck weitgehend abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel (Säule 50 x 8 cm, Füllmenge ca. 250 g) chromatographiert.

2.9.1.6 Darstellung von 5-Bromdodecansäuremethylester unter variierter Aufarbeitung

Bei einem Ansatz mit 44 mmol 5-Hydroxydodecansäuremethylester und entsprechend 60 mmol Triphenylphosphin, Imidazol und Brom erhielt man bei folgender, variierter Aufarbeitung 37 mmol an 5-Bromdodecansäuremethylester.

Variierte Aufarbeitung:

Die vorher nicht eingeeengte Reaktionsmischung wurde mit 75 ml gesättigter Natriumsulfitlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck (900 mbar, 60 °C). Der Rückstand wurde mit insgesamt 400 ml eines Gemisches aus Hexan-Diethylether (3/1; V/V) viermal extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über etwas Kieselgel abfiltriert und das Lösungsmittel anschließend (bei zuerst 900 mbar, dann 330 mbar) abdestilliert. Man erhielt ein farbloses dünnflüssiges Öl.

2.9.1.7 Darstellung von 5-Bromdecansäuremethylester

40 mmol 5-Hydroxydecansäuremethylester wurden mit je 56 mmol Triphenylphosphin, Imidazol und Brom in insgesamt 110 ml Dichlormethan, analog zu der Darstellung des 5-Bromdodecansäuremethylester, umgesetzt.

Die Aufarbeitung wurde in der variierten Form vorgenommen: Die Reaktionslösung wurde zweimal mit je 100 ml gesättigter Natriumsulfitlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der zurückbleibende Feststoff wurde mit insgesamt 400 ml eines Hexan-Diethylethergemisches (9/1; V/V) extrahiert. Die Extrakte wurden zusammengegeben und dann über Kieselgel filtriert, anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert.

2.9.1.8 Darstellung von 5-Bromoctansäuremethylester

40 mmol 5-Hydroxyoctansäuremethylester wurden mit je 56 mmol Triphenylphosphin, Imidazol und Brom in insgesamt 110 ml Dichlormethan, analog zu der Darstellung des 5-Bromdodecansäuremethylester, umgesetzt.

Die Aufarbeitung wurde in der variierten Form wie beim 5-Bromdecansäuremethylester vorgenommen.

2.9.1.9 Synthese von 5-*p*-Nitrophenoldodecansäuremethylester aus dem 5-Ioddodecansäuremethylester

4,7 mmol (1,6 g) 5-Ioddodecansäuremethylester wurden in 30 ml DMSO gelöst und dann mit 5,1 mmol (0,823 g) Natrium-*p*-nitrophenolat versetzt. Der Ansatz wurde unter

Rückflusskühlung bei 120 °C für 1,5 h erhitzt. 15 mmol (5 g) 5-Bromdodecansäuremethylester wurden in 50 ml DMSO gelöst. Der Lösung wurden 16 mmol (2,58 g) Natrium-*p*-nitrophenolat zugegeben. Der Ansatz wurde mit aufgesetztem Rückflußkühler bei 120 °C für 2,5 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit 75 ml deionisiertem Wasser versetzt und erst mit 50 ml und anschließend mit zweimal 20 ml Hexan extrahiert. Die Extrakte wurden zusammen gegeben und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck abdestilliert (330 mbar, Wasserbad 60 °C). Nach dem zweiten Mal Trocknen über Magnesiumsulfat verschwand auch die gelbe Farbe vollständig.

Um die noch vorhandenen Verunreinigungen von Triphenylphosphinoxid zu entfernen wurde der Rückstand in 75 ml Hexan aufgenommen und über Kieselgel abfiltriert. Das Kieselgel wurde anschließend mit insgesamt 100 ml Hexan nachgespült.

2.9.1.10 Syntheseveruche zur Darstellung von 5-*p*-Nitrophenoldodecansäuremethylester mit verschiedenen Lösungsmitteln

7,4 mmol (2,5 g) 5-Bromdodecansäuremethylester wurden in 50 ml Aceton gelöst. Zur Lösung wurden dann 8,05 mmol (1,30 g) Natrium-*p*-nitrophenolat zugegeben. Der Ansatz wurde zuerst bei Raumtemperatur für 24 h gerührt. Nach Entnahme einer Probe wurde für 2,5 h unter Rühren erhitzt.

Das Lösungsmittel aus dem vorherigen Ansatz wurde unter vermindertem Druck vollständig abdestilliert. Nach Zugabe von 50 ml Acetonitril wurde wie beim Ansatz mit Aceton zunächst bei RT gerührt, eine Probe entnommen und anschließend unter Rückfluß erhitzt.

2.9.1.11 Synthese von 5-*p*-Nitrophenoldodecansäure durch chemische Esterhydrolyse

6 mmol (0,829 g) Kaliumcarbonat wurden in 5 ml deionisiertem Wasser gelöst und zu der Lösung von 3 mmol (1,05 g) 5-*p*-Nitrophenoldodecansäuremethylester in Methanol zugetropft. Der Ansatz wurde über Nacht unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Methanol bei vermindertem Druck abdestilliert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit insgesamt 30 ml Diethylether extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet.

2.9.1.12 Synthese von 5-*p*-Nitrophenoldodecansäure durch enzymatische Esterhydrolyse

3 mmol (1,05 g) 5-*p*-Nitrophenoldodecansäuremethylester wurden mit 100 ml Aceton-Kaliumphosphatpufferlösung (35% Aceton, 0,1 mM KP_i pH 7,5) versetzt und eine Lipasemischung aus 100 mg *Pseudomonas cepacia* und 100 mg *Candida antarctica* zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die immobilisierte Base abfiltriert. Das Aceton wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 30 ml Diethylether extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

3 Ergebnisse

3.1 Durchmusterung von Ausgangsmutanten von CYP102A1

3.1.1 Durchmusterung nach Aktivität gegenüber Fettsäuren

Um einen Überblick über die Aktivitäten verschiedener CYP102A1-Mutanten zu gewinnen, wurde die Aktivität einer kleineren Anzahl bereits vorhandener Mutanten für verschiedene mittel- und langkettige Fettsäuren bestimmt. Die Mutanten waren in verschiedenen Positionen relativ zum Häm verändert. Die Positionen R47 und Y51 liegen am Anfang des Substratzugangskanals und bilden mit der Carboxylatgruppe der Fettsäuren Salz- bzw. Wasserstoffbrückenbindungen aus. Diese Positionen wurden ursprünglich verändert, um andere Substrate für CYP102A1 nutzbar zu machen. F87 liegt wie ein Schild über dem Häm und scheint den Zugang von Substraten zu limitieren. In der Etablierung des *p*NCA-Assays wurde F87A eingesetzt, um die Anwendbarkeit des Assays zur Aktivitätssteigerung zu nutzen [130]. L188 und A74 liegen im Substratzugangskanal. Eine Mutante A74G F87V L188Q wurde erstellt, um das Substratspektrum von CYP102A1 zu erweitern [153]. A264 befindet sich in der I-Helix über dem aktiven Zentrum (siehe Abbildung 3-12). Die Lage der zuvor aufgeführten Positionen ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

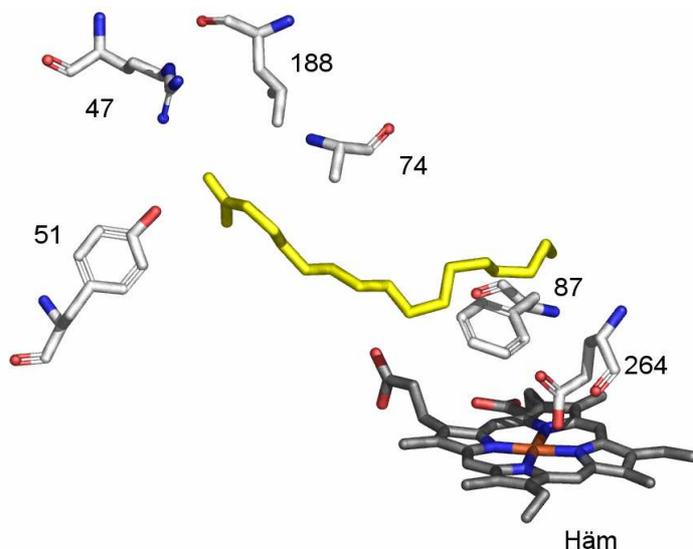


Abbildung 3-1: Lage wichtiger Aminosäuren in der CYP102A1 Kristallstruktur (PDB-Eintrag 1smj). Palmitoleinsäure ist in Gelb dargestellt.

Eine weitere Position P386 wurde in einem *error-prone*-Experiment identifiziert. Sie liegt an der Oberfläche des Enzyms [154]. Wie Tabelle 3-1 zeigt, konnten mit den

verwendeten Mutanten Veränderungen für die Aktivität und für die Präferenz von Fettsäuren mit verschiedenen Kettenlängen beobachtet werden. Mit A74G F87V L188Q und A74E F87V P386S wurden zwei Mutanten identifiziert, die die höchste Aktivität gegenüber Laurinsäure aufweisen. Die anderen Mutanten zeigen höchste Aktivität gegenüber Palmitin- oder Stearinsäure.

Tabelle 3-1: Aktivitäten verschiedener CYP102A1-Mutanten gegenüber mittel- und langkettigen gesättigten Fettsäuren, bestimmt über die NADPH-Oxidationsrate [$\text{eq (NADPH) eq (P450)}^{-1} \text{min}^{-1}$]

CYP102A1-Mutante	Caprylsäure	Caprinsäure	Laurinsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure
Fettsäurenkettenlänge	C8	C10	C12	C16	C18
WT	69±50	232±67	527±48	357±35	1803±67
F87A	30±6	45±23	97±15	454±43	427±35
F87G	28±5	96±23	227±44	340±31	437±39
F87S	2±2	3±2	8±2	32±7	30±7
F87V	39±8	55±19	163±24	355±34	684±96
L188Q	101±32	288±88	205±47	399±195	1610±191
A74G L188Q	251±34	590±189	278±26	3156±590	1989±303
A74G F87V L188Q	181±13	854±218	1052±153	812±442	512±341
F87A A264G	4±2	18±4	38±2	63±15	59±8
R47L Y51F F87V	4±1	17±2	22±1	64±3	37±7
A74E F87V P386S	65±16	87±12	139±29	115±18	115±24
A264G	18±2	36±5	50±13	43±20	66±24

3.1.2 Analyse der Regioselektivität der Ausgangsmutanten

Für die Herstellung von γ - und δ -Lactonen aus γ - und δ -Hydroxyfettsäuren eignen sich besonders Capryl-, Caprin- und Laurinsäure, da die γ - und δ -Lactone mit einer Kohlenstoffanzahl von C8 bis C12 interessante Eigenschaften für die Anwendung als Fruchtaromen haben (Cocos- bzw. Pfirsicharoma). Hinsichtlich der interessanten Zielsubstrate zeigten die getesteten CYP102A1-Mutanten die höchste Aktivität gegenüber Laurinsäure. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Großteil der Messungen mit Laurinsäure durchgeführt.

Silylierte Derivate der Hydroxyfettsäuren wurden entsprechend ihrer charakteristischen Fragmentierungsmuster mittels GC-MS identifiziert. Eine Übersicht über die Art der Fragmentierungsmuster und die Abhängigkeit der Massenfragmente von der Fettsäurenkettenlänge sind in Abbildung 3-2 und Tabelle 3-2 gegeben. Die durch Umsetzungen mit verschiedenen Mutanten erzielten Produktmuster sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

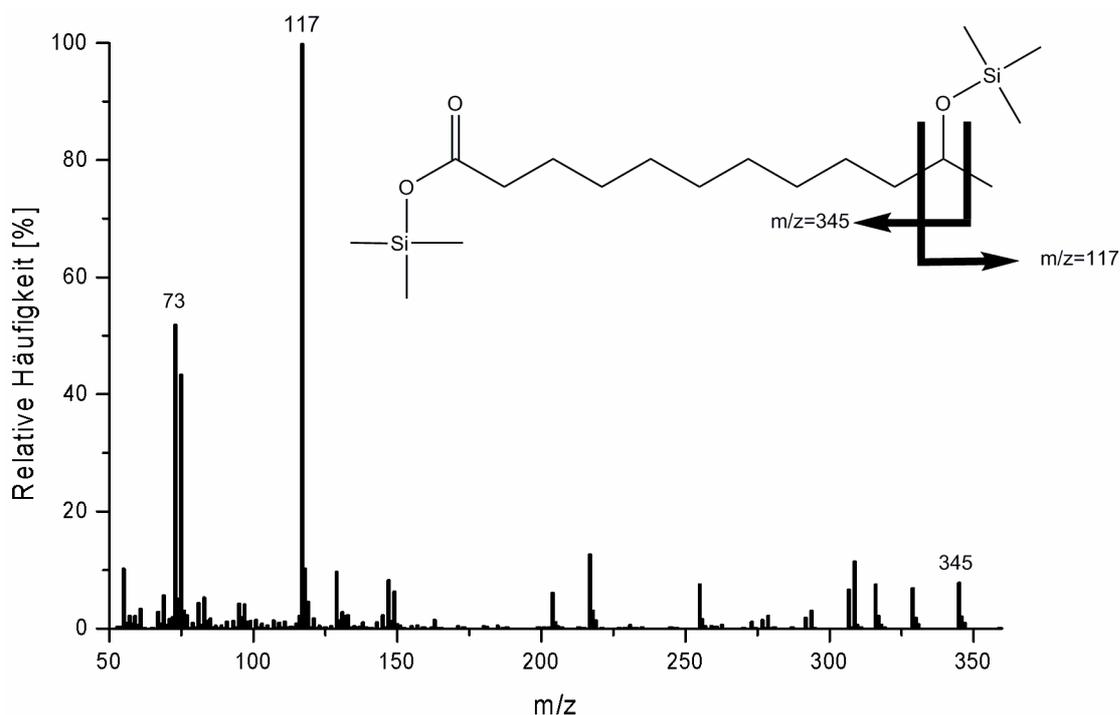


Abbildung 3-2: Fragmentierungsmuster von trimethylsilylierter ω -1-Hydroxylaurinsäure

Tabelle 3-2: Abhängigkeit der charakteristischen Massenfragmente silylierter Hydroxylaurinsäure von der Hydroxylierungsposition

Hydroxylierungsposition	Fragment 1	Fragment 2
ω -1	117	345
ω -2	131	331
ω -3	145	317
ω -4	159	303
ω -5	173	289
ω -6	187	275
ω -7	201	261
ω -8	215	243

CYP102A1-WT katalysiert die Hydroxylierung von Laurinsäure in ω -1- bis ω -3-Position mit leichter Präferenz für die ω -1- und ω -3-Position. Der Austausch von Phenylalanin 87 durch kleinere Aminosäuren führt zur Erweiterung des Produktspektrums. Für F87A, F87G, F87V und F87S werden neben ω -1- bis ω -3-Position auch die Positionen ω -4 und ω -5 hydroxyliert, wobei ein Großteil der Hydroxylierung an ω -3-Position erfolgt. Der Austausch von Phenylalanin 87 durch kleinere Aminosäuren (Valin, Alanin, Glycin und Serin) führt zu einer verringerten Aktivität gegenüber Laurinsäure. Am deutlichsten wird dies durch den Austausch F87S. In diesem Fall liegt die Aktivität um den Faktor 20 niedriger als beim Wildtyp.

Die Substitution von Leucin durch Glutamin in Position 188 im Substratzugangskanal verschiebt das Gesamtspektrum im Vergleich zum Wildtyp kaum, allerdings ist in Spuren Hydroxylierung in ω -4-Position nachweisbar. Die veränderte Regioselektivität bleibt bei der Dreifachmutante mit den Aminosäureaustauschen A74G F87V L188Q und der Doppelmutante A74G F87V erhalten und resultiert in höherer Aktivität, wobei die Präferenz für die ω -3-Position abnimmt und Hydroxylierungen in ω -4- und ω -5-Position erfolgen. Diese Mutante wurde als Grundlage für weitere Experimente mit Methoden der gerichteten Evolution und des Proteindesigns verwendet.

Ein am Institut hergestelltes chimäres Enzym (F12), das auf CYP102A1 mit Bereichen des FG-Loops aus dem humanen CYP2C9 [155] basiert, zeigt ein verschobenes

Produktspektrum in Richtung ω -3-Position. Hydroxylierung in ω -4-Position ist nur in Spuren zu sehen. Die Chimäre wurde ursprünglich mit dem Ziel erstellt, Substrate des CYP2C9 (z. B. Warfarin) zu akzeptieren. Die Kombination dieser Chimäre mit F87A allerdings verstärkt die für die Mutante F87A beobachteten Effekte. Der größte Teil der Hydroxylierung (32%) erfolgt in ω -5-Position.

Die Kombination von F87V mit den Mutationen A74E und P386S verändert das Produktspektrum nicht, die Verteilung entspricht der der Einfachmutante.

Die Doppelmutante A74G L188K hydroxyliert Laurinsäure in den Positionen ω -1 bis ω -3, mit Präferenz für ω -1. Wird eine zusätzliche Mutation (F87V) eingeführt, verschiebt sich das Produktmuster, ω -4- und ω -5-Position werden in Spuren hydroxyliert. Das Maximum verschiebt sich von ω -1- zur ω -2-Position. In der Fünffachmutante V26T R47F A74G F87V L188K ist das Maximum Richtung ω -3-Position verschoben, darüber hinaus erfolgt Hydroxylierung in ω -4- und ω -5-Position.

Die Doppelmutante F87A A264G zeigt gegenüber F87A einen höheren Anteil an Hydroxylierungen in ω -1- und ω -2-Position.

Werden die für die Substratbindung als wichtig erachteten Positionen R47 und Y51 durch unpolare Aminosäuren substituiert und mit L188Q kombiniert, entspricht das Produktmuster etwa dem der Einfachmutante L188Q.

Tabelle 3-3: Produktverteilung der Hydroxylierung von Laurinsäure mit ausgewählten Mutanten

Mutante	Produktverteilung [%]				
	ω -5	ω -4	ω -3	ω -2	ω -1
WT	-	-	36	28	36
F87A	21	17	45	11	6
F87V	3	4	50	25	18
F87G	34	19	34	6	7
F87S	7	16	49	17	11
L188Q	-	<1	36	28	36
F12	<1	<1	47	26	26
F12 F87A	32	20	24	16	8
F87V A74G	3	2	31	32	32
F87A A264G	11	16	36	27	22
F87V A74G L188Q	1	1	35	38	25
F87V A74E P386S	3	3	50	26	18
A74G L188Q	-	-	28	28	44
A74G F87V L188K	<1	<1	33	51	15
R47L Y51F L188Q	-	-	34	30	36
R47L Y51F F87L L188Q	2	2	47	34	15

Die untersuchten Einzelmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine wesentlich geringere Aktivität (Faktor 3). Die Doppelmutante A74G L188Q und die Kombination dieser Doppelmutante mit F87V zeigen eine erhöhte Aktivität. Die Dreifachmutante R47L Y51F L188Q zeigt eine Aktivität, die in der Höhe des Wildtyps liegt (Abbildung 3-3).

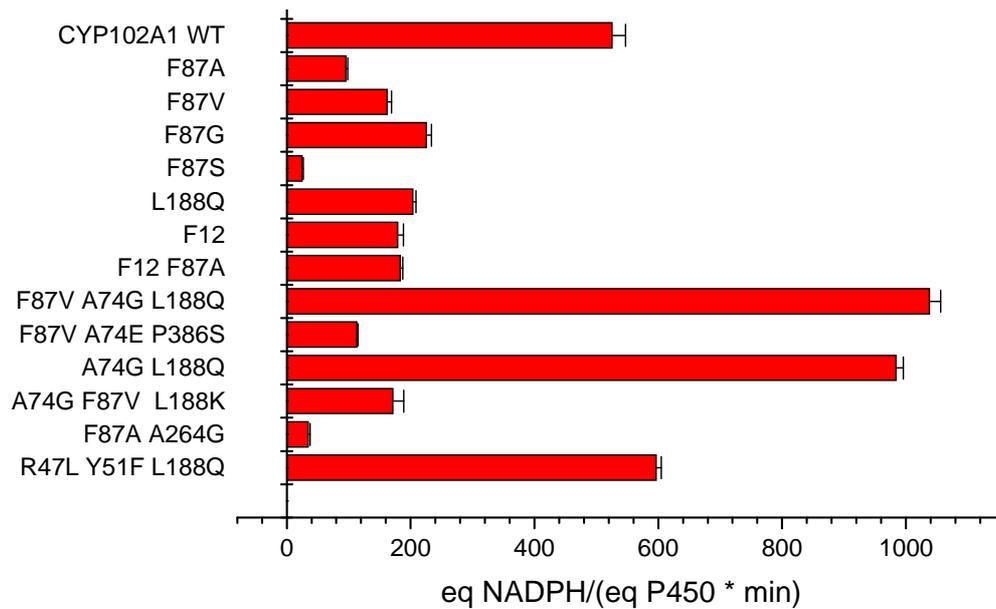


Abbildung 3-3: Aktivitäten der getesteten Mutanten gegenüber Laurinsäure

3.2 Sättigungsmutagenese

Die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen (siehe 3.1) und die genaue Betrachtung der Kristallstrukturen von CYP102A1 legen nahe, dass verschiedene Aminosäuren im Substratzugangskanal für die Bindung der Substrate verantwortlich sind. Es ist daher anzunehmen, dass Mutationen in diesem Bereich auch dazu führen können, das Produktspektrum zu verschieben. In vier Aminosäurepositionen, namentlich R47, Y51, F87 und L188, wurden jeweils Sättigungsmutageneseexperimente durchgeführt (siehe Abbildung 1-1). Hierbei wurden die Aminosäuren in diesen Positionen durch die 19 anderen proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. Für jede der zu veränderten Positionen wurde eine Bibliothek erstellt. In zuvor durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Seitenketten von R47 und Y51 am Eingang des Substratzugangskanals eine große Bedeutung für die Fettsäureerkennung und Stabilisierung haben [66]. Die Mutante A74G F87V L188Q wurde aufgrund ihrer hohen Aktivität gegenüber Laurinsäure und des leicht verschobenen Produktmusters als Templat eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten photometrisch. P450 Monooxygenasen benötigen für ihre Aktivität den externen Cofaktor NAD(P)H, dessen Elektronen für die Reduktion des Eisens im Häm verantwortlich sind (1.2.3). NAD(P)H absorbiert Licht bei 340 nm, nach Oxidation des Cofaktors zeigt NAD(P)⁺ keine Absorption bei dieser Wellenlänge. Diese physikalische

Eigenschaft ermöglicht die photometrische Beobachtung der Aktivität, indem die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgt wird. Die Bibliotheken wurden über den NADPH-Oxidationsassay mit Laurinsäure als Substrat durchmustert (siehe 2.7.8.1). Die Analyse des Produktmusters der Umsetzung von Laurinsäure mit Hilfe verschiedener Mutanten erfolgte durch GC-MS.

Im Screening wurden Mutanten identifiziert, die nach Umsetzungen mit Laurin- (Tabelle 3-4) bzw. mit Caprinsäure (Tabelle 3-5) auf ihre Produktverteilung untersucht wurden.

Tabelle 3-4: Produktverteilung der Hydroxylierung von Laurinsäure mit Mutanten aus Sättigungsmutageneseexperimenten

Mutante	Produktverteilung [%]				
	ω -5	ω -4	ω -3	ω -2	ω -1
A74G F87V L188Q	1	1	35	38	25
R47A A74G F87V L188Q	3	2	37	40	18
R47D A74G F87V L188Q	2	1	37	40	20
R47F A74G F87V L188Q	2	2	39	39	18
R47Y A74G F87V L188Q	2	1	38	39	20
Y51D A74G F87V L188Q	8	2	33	37	20
Y51S A74G F87V L188Q	10	3	39	32	16
A74G F87A L188Q	18	14	38	19	11
A74G F87G L188Q	41	19	30	8	2
A74G F87I L188Q	1	1	18	27	53
A74G F87L L188Q	-	-	17	43	40
A74G F87V	4	2	31	32	31
A74G F87V L188P	2	2	35	42	19
F87V A74G L188S	2	1	31	44	22
F87V A74G L188V	2	1	39	37	21
F87V A74G L188Y	1	1	35	40	23

Die Aminosäureaustausche in Position 47 zeigen alle eine geringe Veränderung der Regioselektivität. Der Austausch des Tyrosin in Position 51 durch die polare Aminosäure Serin oder die saure Aminosäure Asparaginsäure führt zu einer Verschiebung der Hydroxylierungsmuster in Richtung ω -5-Position. Mit der Vierfachmutante Y51S A74G F87V L188Q können 10% ω -5-Hydroxylaurinsäure detektiert werden, fünfmal mehr als mit der Ausgangsmutante. Das Produktmuster ist insgesamt in Richtung ω -3-, ω -4- und ω -5-Position verschoben, jedoch fällt die Aktivität von der Aktivität der Ausgangsmutante A74G F87V L188Q auf das Niveau des Wildtyps oder sogar darunter ab (Abbildung 3-4). Auch der Austausch des Valins in Position 87 durch kleinere Aminosäuren wie Alanin oder Glycin verschieben das Hydroxylierungsmuster in Richtung ω -5-Position. In den meisten Fällen geht dies zu Lasten der ω -1-Position. Nur Austausche in Position 87 durch kleinere Aminosäuren bewirken auch eine drastische Abnahme an ω -2-Hydroxyprodukt. Der Austausch des Valins in Position 87 durch Leucin und Isoleucin verschiebt die Verteilung der Hydroxylierung auf die ω -1- und ω -2-Position. Der Austausch des Glutamins in Position 188 führt nur zu leichten Verschiebungen des Hydroxylierungsmusters, besonders in ω -1- bis ω -3-Position.

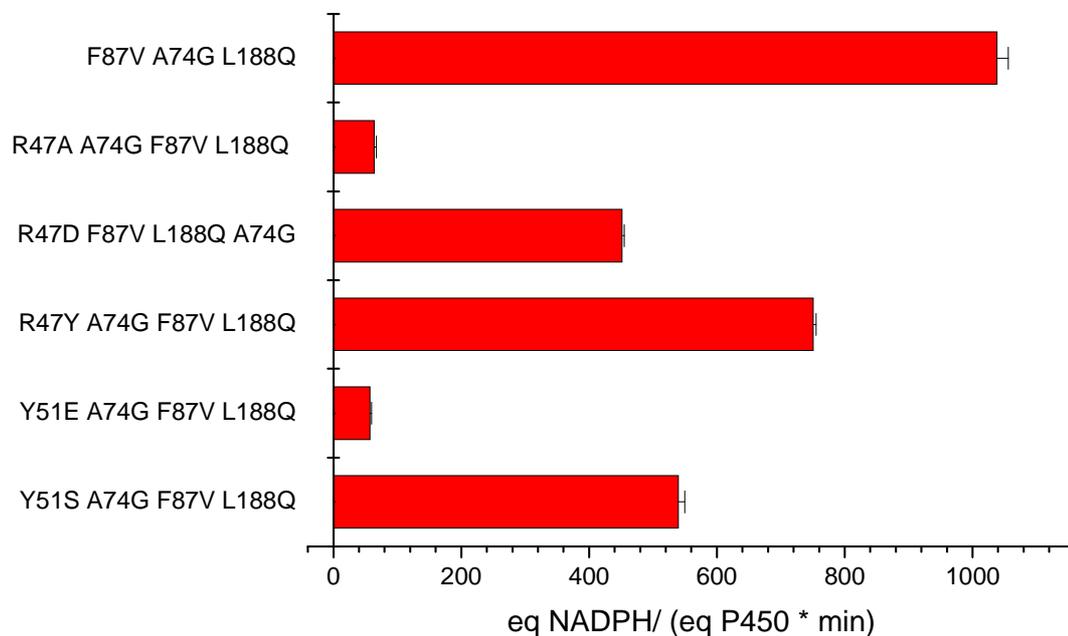


Abbildung 3-4: Aktivitäten ausgesuchter Mutanten des Sättigungsmutageneseexperiments gegenüber Laurinsäure

Bei der Umsetzung von Caprinsäure zeigt die Startmutante A74G F87V L188Q eine deutliche Präferenz für die ω -1-Position (Tabelle 3-5). Ein Aminosäureaustausch in Position 51 durch die saure Aminosäure Aspartat bzw. die polare Aminosäure Serin verschiebt das Hydroxylierungsmuster in Richtung ω -3-Position. Die Substitution von Valin in Position 87 durch Isoleucin verschiebt das Hydroxylierungsmuster in ω -1-Position, das ω -1-Hydroxyprodukt macht für diese Mutante 87% aus. Die in Position 188 substituierten Mutanten haben ihren Hauptpeak alle in ω -1-Position. Für weitere Untersuchungen wurde Laurinsäure verwendet, da die Verteilung der Hydroxylierung auf fünf Positionen, anstelle von drei Positionen eine genauere Unterscheidung für die Verschiebung der Regioselektivität erlaubt. Darüber hinaus zeigen CYP102A1-Mutanten gegenüber Laurinsäure höhere Aktivität als gegenüber Caprinsäure, was Messungen erleichtert (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-5: Produktverteilung der Hydroxylierung von Caprinsäure mit Mutanten aus Sättigungsmutageneseexperimenten

Mutante	Produktverteilung [%]		
	ω -3	ω -2	ω -1
A74G F87V L188Q	13	32	55
Y51D A74G F87V L188Q	43	28	29
Y51S A74G F87V L188Q	43	22	35
A74G F87I L188Q	3	9	87
A74G F87V	26	23	51
A74G F87V L188S	21	26	53
A74G F87V L188V	21	23	56
A74G F87V L188Y	19	18	63

3.3 Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen Assays

Die Entwicklung eines hochdurchsatzfähigen Assays ist für eine gerichtete Evolutionsstrategie zur Detektion der Hydroxylierung von Fettsäuren in γ -/ δ -Position notwendig. Hierbei bieten sich zwei Strategien an. Einerseits ist die die Ringschließung möglicher γ -/ δ -Hydroxyprodukte zu Lactonen und deren anschließender Nachweis

denkbar, andererseits ist der Nachweis regioselektiver Hydroxylierung mit Hilfe eines Ersatzsubstrates möglich. Beide Strategien stellen ähnliche Anforderungen an die Assaysysteme. Die Assays sollten schnell, die Nachweismethode zuverlässig und die Durchführung einfach sein. Zur Durchführung des Assays in hohem Durchsatz sollte das Testsystem automatisierbar sein.

3.3.1 Untersuchung einfacher Farbreaktionen in wässrigem Medium als Nachweis für Lactone

3.3.1.1 Rohjahn-Probe

Untersucht werden sollte der Nachweis von Lactonen, speziell δ -Dodecalacton, mit Hilfe der Rohjahn-Probe [156]. Mit diesem Nachweis können verseifbare Verbindungen, wie z. B. Ester, Lactone, Anhydride, verschiedene Halogenide, Amide und Nitrile detektiert werden. Die Verseifung dieser Verbindungen führt zu einer Veränderung des pH-Wertes, die durch einen Farbumschlag mit pH-Indikatoren nachgewiesen werden kann (siehe 2.8.2.1).

Dieser qualitative Nachweis wurde so variiert, dass eine quantitative Auswertung möglich sein sollte. Ebenfalls wurde die untere Nachweisgrenze für einen quantitativen Nachweis des Lactons bestimmt.

Kohlenstoffdioxid aus der Umgebungsluft stellt eine mögliche Störquelle für den Nachweis von niedrigen Konzentrationen an Lacton dar. Löst sich Kohlenstoffdioxid in der Testlösung, entsteht Kohlensäure und der pH-Wert sinkt. Zur Untersuchung der Auswirkungen von Kohlenstoffdioxid aus der Umgebungsluft wurden zwei identische Verdünnungsreihen angesetzt. Die einen Proben wurden unter Stickstoff in verschlossenen Eppendorfgefäßen, die anderen wurden unverschlossen an der Luft für zwölf Stunden inkubiert. Die unter Stickstoff aufbewahrten Proben blieben unverändert, während sich die Proben der anderen Verdünnungsreihe alle entfärbt hatten.

Die Proben wurden nach der Messung für eine weitere Stunde an der Umgebungsluft inkubiert. Danach war in aufgenommenen Spektren (Wellenlängen von 350 nm bis 650 nm) der Proben kein Maximum mehr zu erkennen. Die untere Nachweisgrenze wurde bestimmt, sie liegt im Assay bei ca. 0,15 mM (Abbildung 3-5).

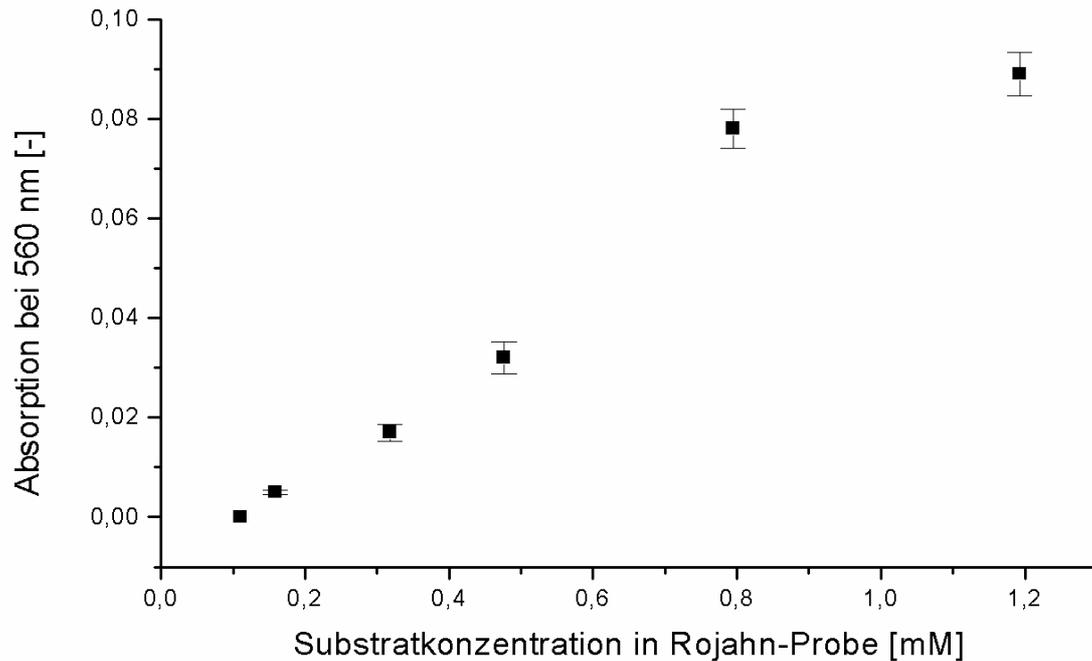


Abbildung 3-5: Ermittlung der Nachweisgrenze für die Rojahnprobe

3.3.1.2 Hydroxamsäuretest

Der Hydroxamsäuretest bot sich als weitere mögliche „nasschemische“ Methode zum Lactonnachweis an [156]. Bei diesem wurde ebenfalls die Nachweisgrenze von δ -Dodecalacton anhand der spektrometrischen Untersuchung von verschiedenen Lactonkonzentrationen untersucht.

Der Hydroxamsäuretest beruht auf der Aminolyse von Carbonsäurederivaten (Ester, Lactone, Anhydride, Säurehalogenide, geminale Trihalogenide, Amide und Nitrile) durch Hydroxylamin unter Bildung von Hydroxamsäuren, die mit Eisen(III)-Ionen einen roten Komplex bilden (2.8.2.2). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,06 mM (Abbildung 3-6).

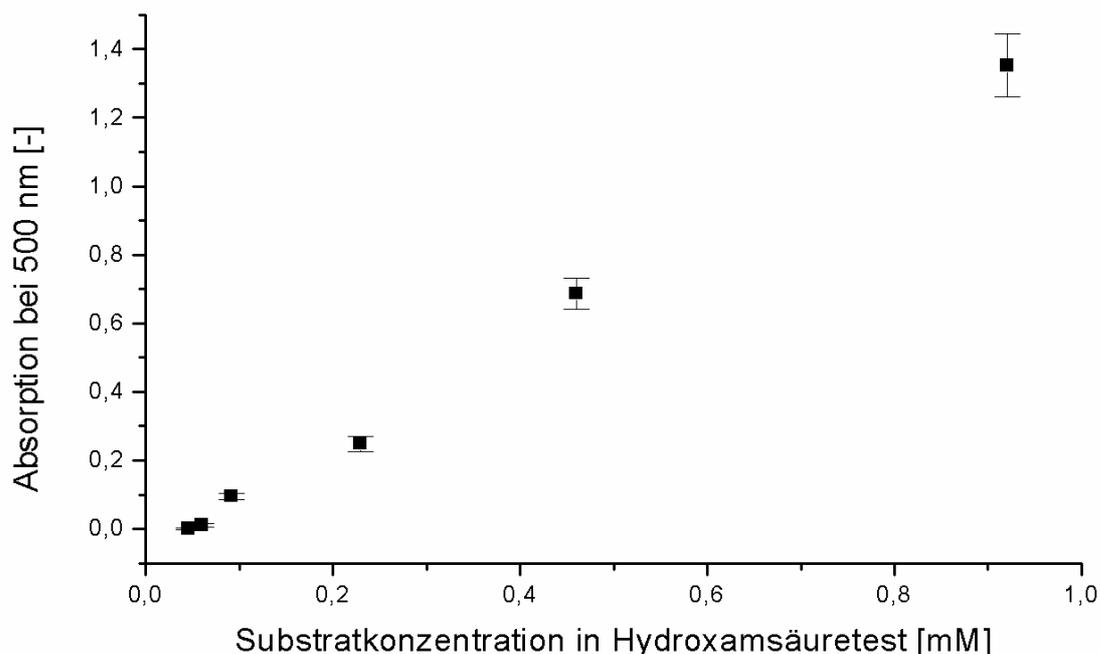


Abbildung 3-6: Ermittlung der Nachweisgrenze für den Hydroxamsäuretest

3.3.2 Entwicklung eines spektroskopischen Nachweises für die regiospezifische Hydroxylierung von Fettsäuren in δ -Position

Ziel war die Entwicklung eines spektroskopischen Aktivitätsnachweises für CYP102A1-Mutanten, mit dem spezifisch die Hydroxylierung von Fettsäuren in δ -Position nachgewiesen werden kann. Gegenüber klassischen Produktnachweisen, wie GC-MS und HPLC-MS, bieten spektroskopische Methoden den Vorteil, dass sie einfacher automatisiert werden können. So ist es möglich Enzymvarianten mit hohem Durchsatz zu untersuchen. Der entwickelte Aktivitätsnachweis basiert auf einem etablierten Assay für die Fettsäurehydroxylierung, dem *p*-Nitrophenoxycarbonsäuren-Assay (*p*-NCA-Assay) [130]. Im Gegensatz zum bereits entwickelten Assay ist das Chromophor *p*-Nitrophenolat nicht am terminalen ω -C-Atom, sondern an der δ -Position einer Fettsäure verethert.

In Abbildung 3-7 ist die Idee des spektroskopischen Nachweises der δ -Hydroxylaseaktivität dargestellt. Nach Hydroxylierung in δ -Position entsteht ein instabiles Halbacetal, das zu einer δ -Ketocarbonsäure und *p*-Nitrophenolat dissoziiert.

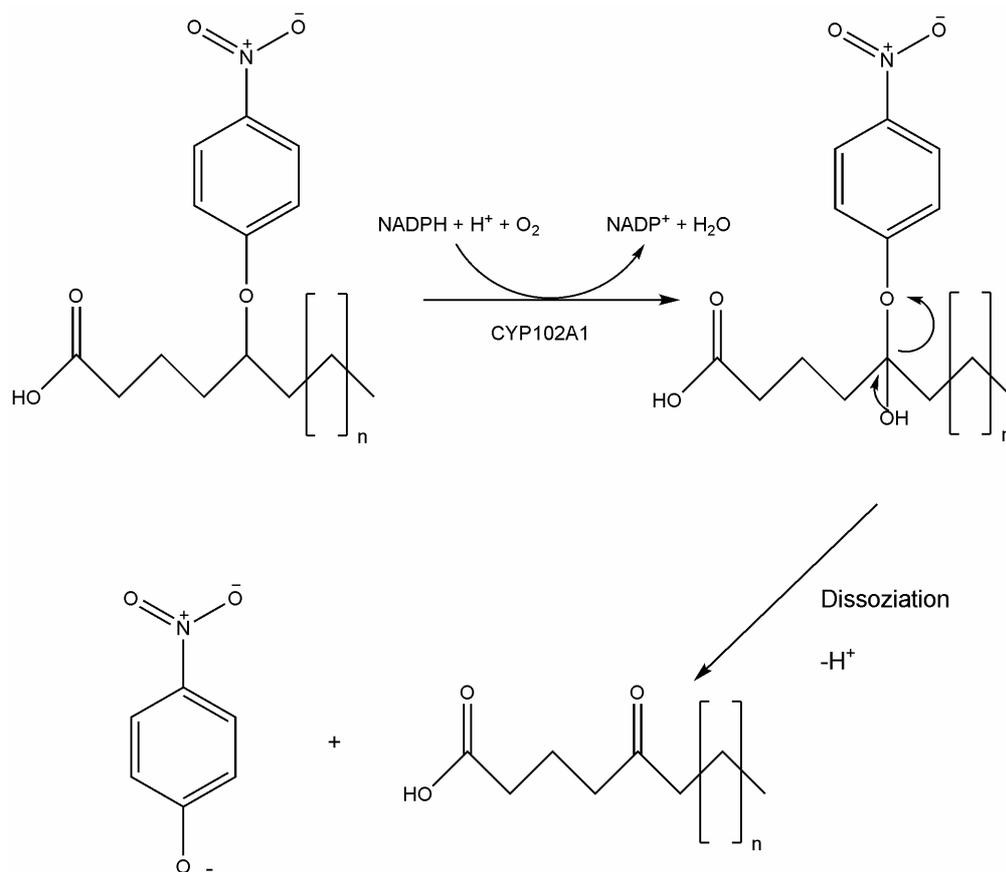


Abbildung 3-7: δ -pNCA-Assay im Überblick

3.3.2.1 Synthese der δ -p-Nitrophenoxycarbonsäuren

Die pNCA-Verbindungen wurden in einer vierstufigen Synthese, wie in Abbildung 3-8 dargestellt, synthetisiert. Ausgehend von entsprechenden Lactonen wurden Hydroxycarbonsäuremethylester dargestellt. Die Hydroxypositionen wurden im Folgenden halogeniert, um eine verbesserte Abgangsgruppe zu erhalten. Bromierte Carbonsäuremethylester wurden in einer S_N2-Reaktion mit Natrium-*p*-nitrophenolat und darauffolgender lipasekatalysierter Hydrolyse des Methylesters zu δ -*p*-Nitrophenoxycarbonsäuren umgesetzt.

Zur Darstellung des 5-Hydroxydodecansäuremethylester wurde δ -Dodecalacton mit einem Überschuss Methanol, in Gegenwart von Triethylamin umgeestert. Die Reaktion war bei Raumtemperatur nicht erfolgreich, deshalb wurde der Ansatz für zweieinhalb Stunden bei 60 °C erhitzt. Das NMR-Spektrum wies einen Umsatz von 82% aus.

Die Darstellung des 5-Hydroxydecansäuremethylester erfolgte analog zum Ester des Dodecalactons; ebenso die des 5-Hydroxyoctansäuremethylesters. Die Umsetzung des

Octalactons erfolgte vollständig. Bei der Darstellung des 5-Hydroxydecansäuremethylesters wurde nur ein Umsatz von 21% erreicht.

Das Erhitzen über zwei bis drei Stunden war für die Einstellung des Gleichgewichts ausreichend. Bei längerem Erhitzen wurde eine leichte Gelbfärbung der Ansätze beobachtet, allerdings konnten mittels GC-Messung keine Nebenprodukte nachgewiesen werden.

Die Synthese des 5-Ioddodecansäureesters über die Appel-Reaktion verlief unter Schutzgasatmosphäre mit ausgeheizten Glasgeräten problemlos. Die mittels GC-MS ermittelte Reinheit des chromatographierten Produkts betrug 94,4%. Im NMR-Spektrum waren keine Verunreinigungen zu erkennen.

Für weitere Synthesen erwies sich der Iodcarbonsäureester jedoch als ungünstig. Er zersetzte sich nach zwei bis drei Tagen an der Luft, was sich durch eine dunkelrote Färbung zeigte. Die Zersetzung ließ sich auch durch Elementaranalyse und GC-MS bestätigen. Die Darstellung der Bromcarbonsäureester erfolgte analog zur Darstellung der Iodcarbonsäureester, diese waren bei Raumtemperatur stabil.

Außer einer Verunreinigung von ca. 7% Triphenylphosphinoxid bei der Synthese von 5-Bromdodecansäuremethylester waren nach Auswertung des NMR-Spektrums keine Nebenprodukte zu erkennen.

Die Umsetzung des Bromcarbonsäuremethylesters zum *p*-Nitrophenoxydodecansäuremethylester erfolgte wie in der Arbeit von Schwaneberg beschrieben [157]. Nach Zugabe von Wasser fiel allerdings kein Feststoff aus. Lediglich eine leichte Trübung war auffällig. Auf der DMSO/Wasser-Phase hatte sich nach kurzer Zeit ein öliger Film abgeschieden.

Die Aufarbeitung wurde folglich dahingehend verändert, dass nach Zugabe von Wasser das Produkt mit *n*-Hexan extrahiert wurde. Eine weitere Aufarbeitung, um den Überschuss an *p*-Nitrophenolat zu entfernen, war nicht notwendig. Das nicht umgesetzte *p*-Nitrophenolat blieb in der wässrigen Phase gelöst.

In der enzymatischen Hydrolyse des δ -*p*-Nitrophenoxycarbonsäuremethylesters wurden 66% Produkt erhalten. Nachdem die Synthese des Ersatzsubstrates erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden größere Mengen durch die Firma Symrise bereitgestellt.

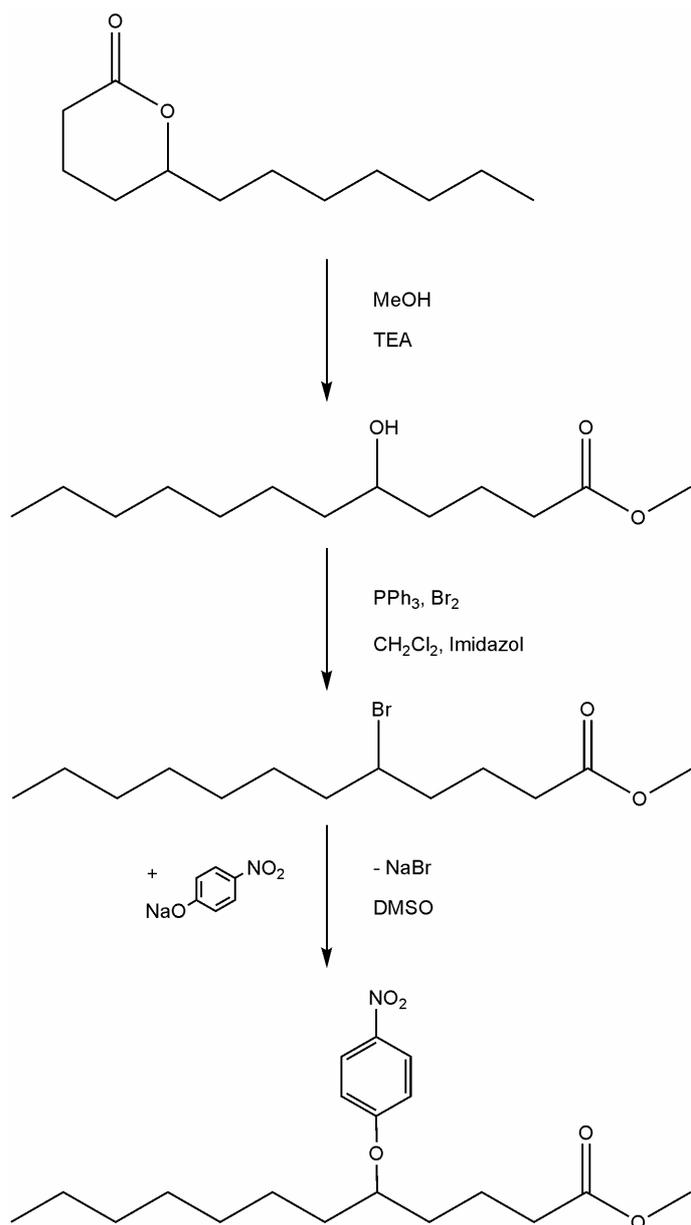
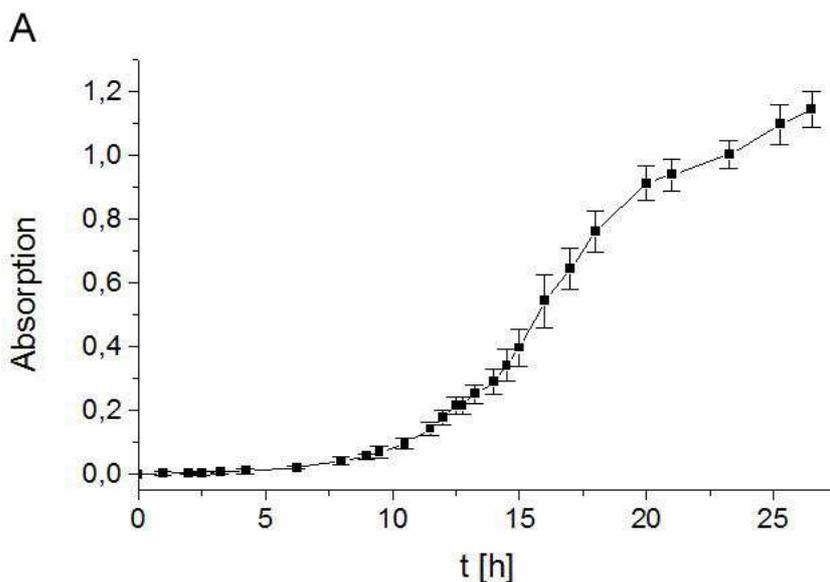


Abbildung 3-8: Schematische Ansicht der 5-*p*-Nitrophenoxylaurinsäuremethylester-Synthese

3.4 Gerichtete Evolution

Die Wahl eines geeigneten Screeningverfahrens ist in erster Linie abhängig von der Aufgabenstellung. Grundsätzlich sollten die gewählten Testbedingungen (Substrat; pH-Wert; Temperatur; Lösungsmittel; usw.) die Anforderungen des angestrebten biokatalytischen Prozesses bestmöglich imitieren. Das Testsystem sollte darüber hinaus unempfindlich sein gegenüber veränderten Parametern, die nicht von Mutationen des Gens herrühren. Mögliche Fehlerquellen in Hochdurchsatzassays stellen unter anderem ungleichmäßiger Sauerstoffeintrag in die Vertiefungen, unterschiedliche Verdunstungsraten des Mediums oder unterschiedliches Wachstum der Zellen dar. Eine typische Strategie in Experimenten der gerichteten Evolution stellt die Erzeugung von Genvarianten mit verschiedenen Methoden dar, diese werden in Bakterienzellen transformiert. Die Bakterienzellen werden auf Agarplatten vereinzelt. Einige Strategien erlauben schon in diesem Stadium die Unterscheidung von aktiven und inaktiven Mutanten. Lipaseaktivität wird beispielsweise auf Tributyrin-Agarplatten durch eine Hofbildung um aktive Klone beobachtet [158]. In anderen Fällen werden die Kolonien von Agarplatten mit Hilfe von Zahnstochern oder Impfösen in Mikrotiterplatten mit Medium überimpft, dort kultiviert und die Expression der heterologen Enzyme induziert. Nachfolgend werden die Mutanten in einem Screening untersucht. Die Herausforderung für ein Screening-System ergibt sich aus starken Abweichungen im Wachstum von Zellen in Mikrotiterplatten unter Realbedingungen (Abbildung 3-9).



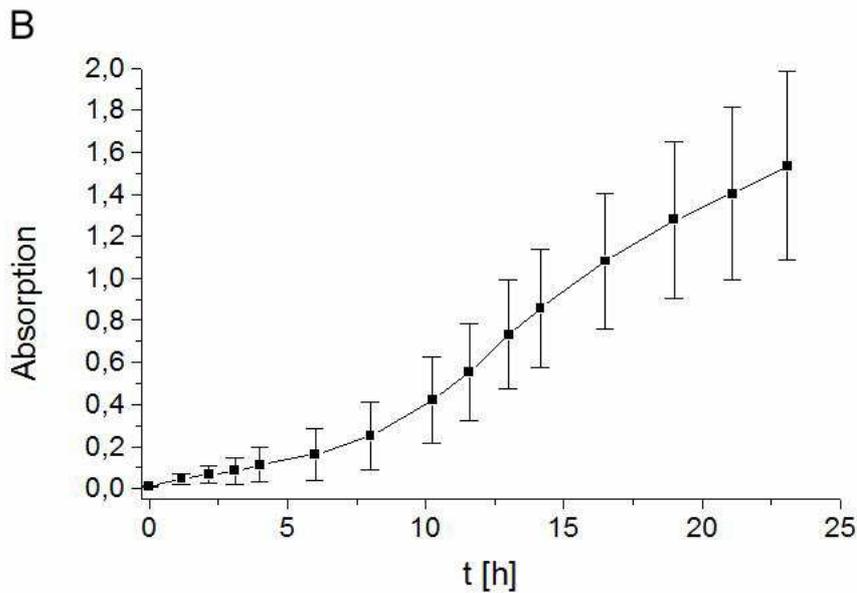


Abbildung 3-9: A Wachstumsverlauf kultivierter *E. coli* Zellen in Mikrotiterplatten mit Standardabweichung, die einzelnen Vertiefungen wurden mit der gleichen Zelldichte angeimpft. **B** Wachstumsverlauf in Mikrotiterplatten mit Standardabweichung für von Hand angeimpfte Vertiefungen.

Das Wachstum in Mikrotiterplatten ist stark von der anfänglich eingesetzten Zellkonzentration abhängig, was einen reaktionsspezifischen Assay notwendig macht. Abbildung 3-9 zeigt die Abhängigkeit des Wachstums von *E. coli*-Kulturen in Mikrotiterplatten von unterschiedlichen Startbedingungen. In beiden Fällen sind verschiedene Wachstumsphasen (Anlaufphase, exponentielle Phase und Beginn der stationären Phase) einer typischen Wachstumskurve zu erkennen [159].

Für Graphik A und B wurde jeweils das Wachstum in 48 Mikrotiterplattenvertiefungen analysiert. Für A wurden alle Vertiefungen mit einer derselben Zelldichte aus einer Übernachtskultur angeimpft. Sie befinden sich für ca. 12 h in der Anlaufphase, gehen dann in die exponentielle Phase über, der Eintritt in die stationäre Phase erfolgt nach ca. 20 h. Im Fall B wurde die Kultur jeder Vertiefung mit einem Zahnstocher von einer Kolonie angeimpft. Unterschiede zwischen Anlaufphase, exponentieller Phase und stationärer Phase sind wesentlich schwächer als im Fall von A. Für B ist die Standardabweichung im Wachstum deutlich größer im Vergleich zu A. Dies ist unter anderem auf eine große Varianz in den Wachstumsverläufen im Fall von B zurückzuführen. Diese hat auch Auswirkungen auf die Unterschiede am

Expressionslevel an heterolog exprimiertem Enzym. Daher ist die Qualität eines Assays hinsichtlich Selektivität bedeutend für die in einem Screening gefundenen Treffer.

Aktivitätsunterschiede können oftmals von höheren Expressionsleveln stammen.

3.4.1 Herstellung einer Mutantenbibliothek

Die Affinität zwischen Substrat und P450 Monooxygenase kann mit Hilfe der so genannten Bindungskonstanten (K_D) ausgedrückt werden (siehe 2.7.9). Klassische P450-Substrate bewirken in P450 Monooxygenasen eine Verschiebung des spin-Zustandes des Eisens von low-spin zu high-spin. Das Ausmaß der Verschiebung ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Substrats und kann photometrisch nachverfolgt werden. Mit zunehmender Substratkonzentration sind eine Zunahme der Absorption bei 390 nm und eine Abnahme bei 420 nm zu beobachten.

Der reziproke Wert der Differenz zwischen Maximum und Minimum wird in einer zu Lineweaver-Burk analogen Auftragsweise dargestellt und die Bindungskonstante bestimmt.

Die Bindungskonstanten für die Ersatzsubstrate mit der Mutante A74G F87V L188Q wurden bestimmt und sind in Tabelle 3-6 dargestellt.

Tabelle 3-6: Bindungskonstanten für Ersatzsubstrate und Laurinsäure mit der CYP102A1-Mutante A74G F78V L188Q

Substrat	K_D [μ M]
Laurinsäure	43,0
δ - <i>p</i> -Nitrophenoxylaurinsäure	37,8
δ - <i>p</i> -Nitrophenoxycaprylsäure	29,9

Die Bindungskonstanten für δ -*p*-Nitrophenoxylaurinsäure und δ -*p*-Nitrophenoxycaprylsäure liegen in der Größenordnung von Laurinsäure. Die Enzymbibliothek wurde ausgehend von der Mutante A74G F87V L188Q unter Zuhilfenahme der *error-prone* PCR erstellt. Diese Mutante zeigt eine hohe Aktivität und weist ein schon erweitertes Produktmuster auf. Mit Hilfe der verwendeten Ersatzsubstrate sollten Mutanten gefunden werden, die Fettsäuren in δ -Position hydroxylieren.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nur für die Monooxygenasedomäne durchgeführt. Durch eine stille Mutation im Linkerbereich zwischen Monooxygenasedomäne und Reduktasedomäne wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt, der die Subklonierung des durch *error-prone* PCR erzeugten DNA-Abschnitts erlaubte. Die *Bam*HI-Schnittstelle stromaufwärts vom CYP102A1-Gen gelegen wurde durch QuikChange PCR eliminiert, der resultierende Vektor wurde pET28a(+)BM3-3xep genannt. Zur Vervielfältigung der Monooxygenasedomäne wurden parallele Ansätze verwendet, wobei ein dNTP im Unterschuss eingesetzt wurde (2.6.6.2). Die *error-prone* PCR-Produkte wurden isoliert, mit *Nhe*I und *Bam*HI verdaut und im Anschluss mit pET28a(+)BM3-3xep ligiert und in *E. coli* NovaBlue (DE3) transformiert. Die einzelnen Kolonien wurden mit einem Pickroboter in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) mit LB-DMSO für die Stammhaltung überführt und bei -80°C gelagert.

3.4.2 Analyse der Mutantenbibliothek

Zur Analyse der erzeugten Mutantenbibliothek wurden die Stammhaltungsplatten auf neue Mikrotiterplatten repliziert. Diese Mikrotiterplatten wurden als Vorkultur kultiviert und in Deepwellplatten überimpft. Nach Optimierung der Expressionsprotokolle lag die Konzentration an P450 in Deepwellplatten mit 600 µl Kulturvolumen bei $1,9 \pm 0,78$ µM. Die Expression in Deepwellplatten war um den Faktor vier besser als in Standardmikrotiterplatten mit 200 µl Kulturvolumen. Nach Expression wurden die Mikrotiterplatten abzentrifugiert und bei -20°C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte automatisiert mit einem Robotersystem in einer Lysozymlösung. Nach der Lyse wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt, um Trübungen bzw. Störungen durch Zellbestandteile zu minimieren. Die erstellte Bibliothek wurde mittels CO-Differenzspektroskopie untersucht, ca. 40% der erstellten Klone zeigten einen Peak bei 420 nm im CO-Differenzspektrum und wurden somit in einer inaktiven Form exprimiert. Zur Durchmusterung wurden die Reagenzien (Lysat, NADPH-Lösung und Ersatzsubstrat) vereinigt und die Absorption bei 410 nm nach 60 min bestimmt. In den Experimenten zur gerichteten Evolution wurde hauptsächlich 5-*p*-Nitrophenoxyoctansäure als Ersatzsubstrat eingesetzt. Insgesamt wurden 67 Mikrotiterplatten durchmustert. Beispielhaft ist Absorptionsveränderung in der ersten

Stunde des Assays in Abbildung 3-10 dargestellt. Die Absorption der Startmutante A74G F87V L188Q liegt bei $0,052 \pm 0,025$.

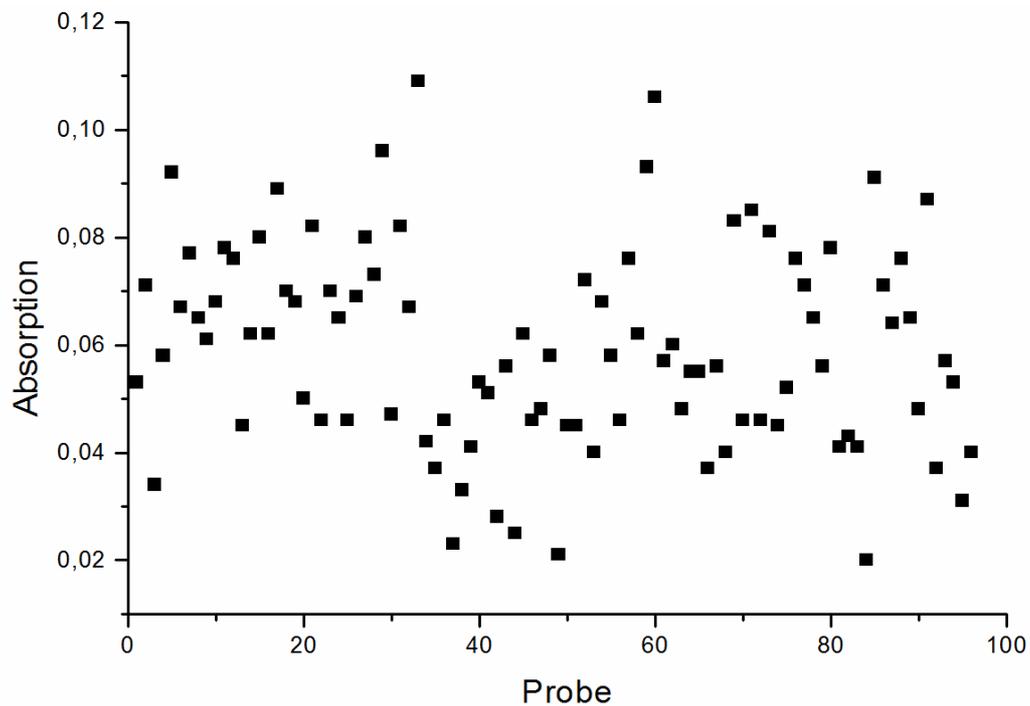


Abbildung 3-10: Verteilung der Absorption bei 410 nm für eine Mikrotiterplatte nach Durchführung des δ -pNCA-Assays

Die Enzym-Varianten in jeder Platte, die stärkste Absorption zeigten, wurden separat in 100 ml LB-Medium exprimiert, die Zellen wurden aufgeschlossen und Laurinsäure wurde mit den Lysaten umgesetzt. Die meisten aktiv exprimierten Mutanten zeigen keine starke Abweichung in der Produktverteilung gegenüber der Ausgangsmutante. Die Mutante 10A12 (Platte 10, Vertiefung A12) weist um den Faktor 4 erhöhte Hydroxylierung in ω -5- Position (8% statt 2%) und reduzierte Hydroxylierungsanteile in ω -1-Position auf (14% statt 22%). Eine Verschiebung der Hydroxylierungsprodukte in Richtung ω -6-, ω -7- Position konnte aber nicht beobachtet werden.

3.5 Protein-Design

In diesem Projektteil sollte das Hydroxylierungsmuster der durch CYP102A1 katalysierten Laurinsäurehydroxylierung mit rationalen Methoden von den subterminalen Positionen ω -1, ω -2 und ω -3 in Richtung γ - und δ -Position verschoben werden. Hierfür wurden positive Ergebnisse aus den Projektteilen Sättigungsmutagenese und gerichteter Evolution übernommen (siehe 3.2, 3.4.). Die CYP102A1-Mutanten F87A bzw. A74G F87A/V L188Q wurden als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen verwendet. Durch Protein-Design sollten drei neue Elemente in CYP102A1 eingefügt werden, um die Regioselektivität von CYP102A1 gegenüber Laurinsäure zu verändern:

- I. Vergrößerung des aktiven Zentrums in unmittelbarer Nähe zum Häm (K69, V78, F87).
- II. Vergrößerung des Raumes für den ω -Terminus von Fettsäuren (T260, I263)
- III. Einführung einer carboxylatbindenden Aminosäure tiefer im Substratzugangskanal bzw. in unmittelbarer Nähe zum Häm (S72, S332)

Ausgehend von einer Kristallstruktur der CYP102A1-Häm-Domäne (PDB-Eintrag 1smj) wurden drei Zielpositionen identifiziert. Der Austausch in diesen Positionen (V78 und F87) durch kleinere Aminosäuren in unmittelbarer Nähe des Häms sollte die Zugänglichkeit für das Substrat erhöhen (Abbildung 3-11). Der Einfluss der Position 87 auf die Aktivität und Regioselektivität wurde schon im anfänglichen Screening mit vorhandenen Mutanten, in Sättigungsmutageneseexperimenten und von anderen Forschungsgruppen nachgewiesen (3.2, [78]). Der Austausch von Phenylalanin 87 durch kleinere Aminosäuren führt zur Vergrößerung des Produktspektrums von ω -1- bis ω -3- auf ω -1- bis ω -5-Hydroxylaurinsäure. Die veränderte Regioselektivität bleibt bei der Dreifachmutante mit den Aminosäureaustauschen A74G, L188Q erhalten und resultiert in höherer Aktivität. Für weitere Experimente wurden die Mutante F87A und die Mutante A74G F87A L188Q benutzt. Durch die Einführung der Mutation F87A, in eine in einem Sättigungsmutageneseexperiment erstellte Vierfachmutante (Y51S A74G F87V L188Q) wurde der Anteil an ω -5-Hydroxyprodukt (44%) verdoppelt. ω -6-Hydroxylaurinsäure konnte jedoch nicht detektiert werden.

Aus sterischen Gründen war zu erwarten, dass auch Aminosäureaustausche direkt im aktiven Zentrum, axial neben dem Häm zu einer Verschiebung der Regioselektivität führen würden. Lysin 69 liegt in unmittelbarer Nähe des Porphyrinrings (Abbildung

3-11). Der Austausch von Lysin durch eine kleiner Aminosäure sollte den zur Verfügung stehenden Raum für die Alkylkette vergrößern und die γ - und δ -Positionen in die Nähe des Häm bringen. Der Austausch der basischen Aminosäure durch eine aliphatische resultiert in inaktivem Enzym, das nur ein Maximum bei 420 nm im CO-Differenzspektrum aufweist. Andere Austausche durch eine kleinere (Histidin) bzw. eine größere Aminosäure (Arginin) führen nicht zu einer Erweiterung des Produktmusters und entsprechende Mutanten zeigen geringere Aktivität.

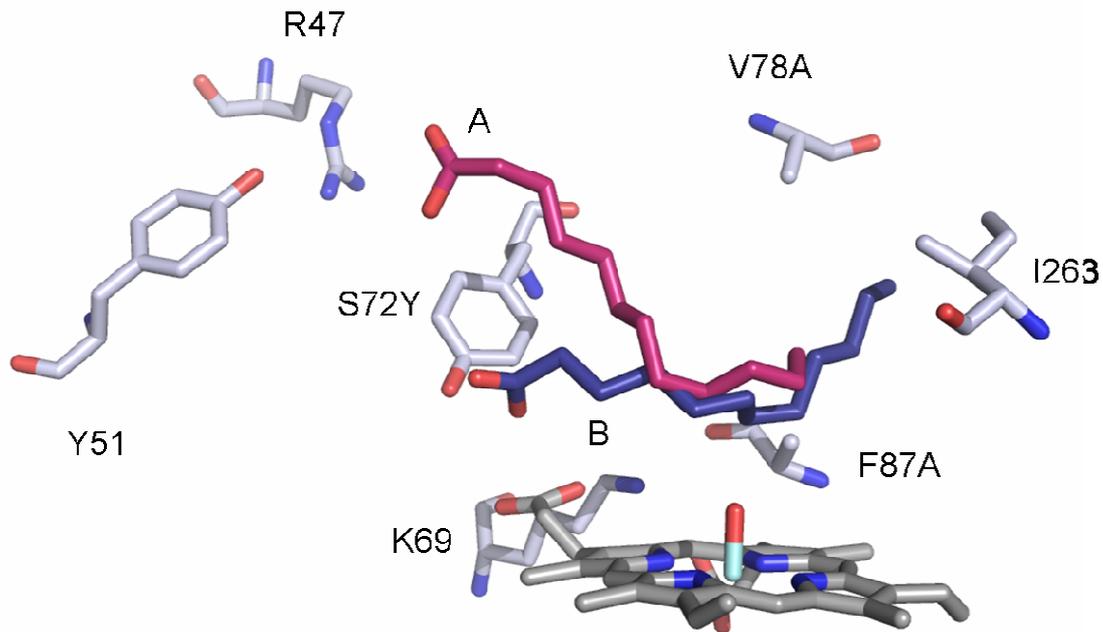


Abbildung 3-11: Übersicht über die veränderten Aminosäuren (Grafik wurde von Tuan Anh Do zur Verfügung gestellt). Die Daten stammen aus einer molekulardynamischen Simulation der Mutante S72Y V78A F87A (durchgeführt von Tuan Anh Do). Die Bindung zwischen der Carboxylatgruppe der Laurinsäure A und den Aminosäuren R47, Y51 wurde in einer frühen Simulationsphase beobachtet und ermöglicht die Hydroxylierung in ω -1- bis ω -3-Positionen. Im Folgenden bewegte sich die Laurinsäure tiefer in die Bindetasche. Die Laurinsäurekonformation B tritt in einer späteren Phase der Simulation auf, die die Hydroxylierung in ω -5- bis ω -9-Position ermöglicht. Die Carboxylatgruppe geht dabei Wasserstoffbindungen zu Tyrosin in Position 72 ein. Das Häm ist grau dargestellt.

Valin in Position 78 liegt im Substratzugangskanal in der B'-Helix oberhalb von F87. Die Mutanten, die statt Valin Alanin oder das kleinere Glycin enthalten, hydroxylieren Laurinsäure in ω -1- bis ω -9-Position. Mit diesen Mutanten konnten für die Oxidation von Laurinsäure erstmals ω -6- bis ω -9-Hydroxyprodukte detektiert werden (Tabelle 3-7). Die NADPH-Oxidationsrate war zwar 2,6 fach höher, als der mit F87A gemessene

Verbrauch (Tabelle 3-8). Allerdings sank die Kopplungseffizienz von 100 auf 55%, wodurch sich die Oxidationsrate des Substrats kaum ändert (siehe 1.2.3 und 2.7.8.1).

Durch den Austausch von Valin durch Glycin in Position 78 konnten der Anteil an γ -Hydroxylaurinsäure auf 4% und der Anteil an β -Hydroxylaurinsäure auf über 10% gesteigert werden.

Tabelle 3-7: Produktverteilung der Hydroxylierung von Laurinsäure mit Mutanten aus Protein-Design-Experimenten (2x entspricht A74G L188Q)

Mutante	Produktverteilung [%]								
	ω -9	ω -8	ω -7	ω -6	ω -5	ω -4	ω -3	ω -2	ω -1
F87A V78L	-	-	-	-	9	21	53	10	7
F87A V78F	-	-	-	-	8	50	34	5	3
2x Y51S F87A	-	-	-	-	44	21	23	9	3
2x K69R F87A	-	-	-	-	17	15	40	19	9
2x K69H F87A	-	-	-	-	10	12	28	35	14
2x F87A T260A	-	-	-	1	22	15	42	13	7
2x F87A I263A	-	-	-	1	27	24	34	9	5
2x F87A I263V	-	-	-	1	28	18	24	17	10
2x Y51S F87A I263G	-	-	-	-	50	17	22	8	3
V78A F87A	3	-	1	4	42	14	24	7	5
V78A F87G	12	4	3	4	30	10	20	9	8
V78A F87A I263A	-	-	8	3	30	11	22	12	14
V78A F87A I263G	3	2	14	4	23	8	11	13	22
V78A F87A S332Y	-	-	2	4	66	16	8	3	-
V78A F87A S72Y	9	5	16	25	3	1	2	28	11

Die NADPH-Oxidationsrate konnte bei V78G F87A im Vergleich zu V78A F87A leicht gesteigert werden (Tabelle 3-8). Die Kopplungseffizienz fiel jedoch auf 16%. Aus

diesem Grund wurde die Mutante V87A F87A in weiteren Experimenten gegenüber V78G F87A vorgezogen.

Ein Austausch der Position 78 durch die hydrophoben, größeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin in Kombination mit F87A resultiert in einer verringerten Hydroxylierung in ω -5-Position. Die Substitution von V78 durch größere Aminosäuren, die gut in den hydrophoben Substratzugangskanal passen, sollten dazu führen, dass die Alkylkette tiefer zum Häm geführt wird und in einer erhöhten Hydroxylierung in ω -5-Position resultieren.

Substrat-Docking-Experimente, die von Tuan Anh Do in der Bioinformatikgruppe durchgeführt wurden, legten den Schluss nahe, dass für eine Verschiebung der Hydroxylierungsposition in γ - oder δ -Position der zugängliche Raum für den ω -Terminus der Alkylkette erhöht werden sollte. Von besonderem Interesse sind hierbei Aminosäuren der I-Helix. Die I-Helix befindet sich in direkter Nähe über dem Häm (siehe Abbildung 1-1 und Abbildung 1-4, Abbildung 3-12). Das Rückgrat der Helix lässt sich nicht ohne weiteres verschieben, da diese Helix für die Stabilisierung des Sauerstoffs und der Übertragung von Elektronen in der Katalyse von Bedeutung ist. Ausgehend von A74G F87A L188Q konnte durch Austausch der Position T260 und I263 durch kleinere Aminosäuren das Produktspektrum auf ω -6 Hydroxylaurinsäure erweitert werden. Je kleiner der Rest dieser Aminosäuren, desto größer ist der zur Verfügung stehende Platz für die Alkylgruppe und desto höher ist die Menge an ω -5-Hydroxyprodukt. Die Verschiebung des Produktspektrums war in beiden Fällen begleitet von einer Verringerung der Aktivität. Eine Mutante mit Mutationen in Position 260 und 263 konnte nicht aktiv exprimiert werden.

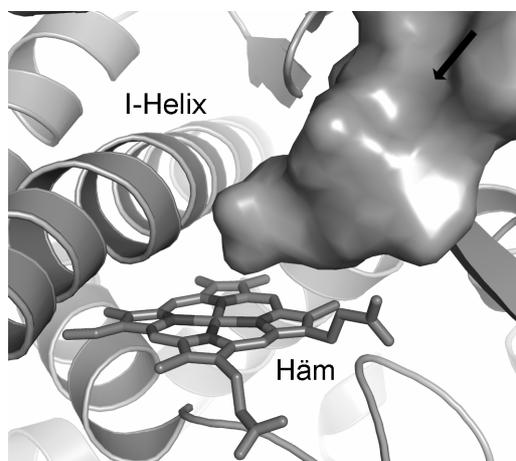


Abbildung 3-12: Aktives Zentrum von CYP102A1 (PDB-Eintrag 1j pz). Die Substratbindetasche ist durch die Van-der-Waals-Oberfläche dargestellt, der Substrateingang ist durch einen Pfeil markiert (verändert nach [160]).

Die wichtige Rolle von R47 und Y51 für die Substraterkennung und Substratstabilisierung ist literaturbekannt [66]. Um das Substrat (Laurinsäure) näher am aktiven Zentrum zu stabilisieren, wurden verschiedene Aminosäuren tiefer im Substratzugangskanal durch Tyrosin ersetzt. Es handelt sich hierbei um die Positionen 72 und 332. Die Einführung der Mutation S332Y in die Doppelmutante V78A F87A führt zu einer Verringerung der NADPH-Oxidationsrate, dabei konnte keine Erhöhung der γ - oder δ -Hydroxylaurinsäureanteile erreicht werden. Der Anteil an ω -5-Hydroxylaurinsäure ist jedoch stark erhöht, sie stellt mit 66% das Hauptprodukt dar.

Die Mutante S72Y V78A F87A weist im Vergleich zu V78A F87A eine verringerte Aktivität und Kopplungseffizienz auf, die relativen Anteile an γ - und δ -Hydroxylaurinsäure waren die höchsten bisher gemessenen (5 und 16%).

Tabelle 3-8: Aktivitäten und Kopplungseffizienzen ausgesuchter P450 CYP102A1-Mutanten, die durch Protein-Design erzeugt wurden (2x entspricht A74G L188Q)

Mutante	NADPH-Oxidationsrate [eq(NADPH) eq(P450) ⁻¹ min ⁻¹]	Kopplungs- effizienz [%]	Oxidationsrate [eq(O) eq(P450) ⁻¹ min ⁻¹]
2x Y51S F87A	14,4±0,1	n. b.	n. b.
2x K69R F87A	126±6,8	n. b.	n. b.
2x K69H F87A	141±5,02	14	19,7±0,7
2x F87A T260A	10,3±1	35	3,6±0,3
2x Y51S F87A I263G	22±3,5	1	2,2±0,01
V78A F87A	271,6±4,9	23	62,5±1,1
V78A F87A I263A	11,4±0,7	4	0,5±0,02
V78A F87A I263G	52,5±2,4	6	3,2±0,1
V78A F87A S332Y	30,3±1,4	7	2,1±0,1
V78A F87A S72Y	75±4,6	7	5,3±0,3

3.6 Klonierung, Expression und Mutagenese von CYP152A1

Der Einsatz eines Biokatalysators kann durch einfache und kostengünstige Produktion ermöglicht werden. Aus diesem Grund wurde in Analogie zu CYP102A1 ein Expressionssystem auf der Basis des Vektors pET28a(+) entwickelt. CYP152A1 katalysiert die Hydroxylierung von Myristinsäure in α - und β -Position [5]. β -Hydroxyfettsäuren bilden jedoch das Hauptprodukt. Zur Erzeugung von γ - und δ -Hydroxyfettsäuren, die wichtige Zwischenstufen zur Lactonsynthese darstellen, muss das Produktmuster um ein bzw. zwei Kohlenstoffatome verschoben werden. CYP152A1 wird als Alternative zu Enzymen der CYP102A-Familie für die Entwicklung einer γ -, δ -Hydroxylase untersucht.

3.6.1 Subklonierung von CYP152A1 in den Expressionsvektor pET28a(+)

Grundlage für die Erstellung des Expressionssystems bildete der Vektor pET28a(+), der die Expression von Genen unter Kontrolle des starken T7-Promotors erlaubt. Das CYP152A1-Wildtypgen ybdT wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vom Vektor pQE-30tBs β amplifiziert [161]. Hierfür wurden die Primer Bsbf und Bsbr eingesetzt.

Das PCR-Produkt hatte eine erwartete Größe von ca. 1,2 kb und wurde aus einem präparativen Agarosegel isoliert. Nach einer Verdauungsreaktion von PCR Produkt und pET28a(+)-Vektor mit dem Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI wurde der DNA-Abschnitt mit dephosphoryliertem Vektor ligiert. Der Erfolg der Ligation wurde mittels Kolonie-PCR bestätigt. Die Sequenz wurde unter Verwendung der T7-Promotor und T7-Terminator Primer überprüft.

Der gebildete Vektor trägt den Namen pET28a(+)CYP152A1.

3.6.2 Expression von CYP152A1 in *E. coli* BL21 (DE3)

Der Vektor pET28a(+)CYP152A1 wurde erstellt, um eine starke Expression des Zielproteins zu erzielen. Unter den für CYP102A-Enzymen verwendeten Bedingungen ließ sich CYP152A1 nicht aktiv exprimieren (siehe 2.5.3).

Eine Veränderung der Expressionsbedingungen ermöglichte die Expression von CYP152A1 in *E. coli* BL3 (DE3). Hierfür wurden 400 ml LB-Medium direkt mit 1 ml

Transformationsansatz inkubiert und über Nacht bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Die Kultur wurde durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, mit 1 mM (Endkonzentration) 5-Aminolävulinsäure supplementiert und weitere 4 h bei 30 °C inkubiert.

Dieses Expressionsprotokoll ergab 2,5 bis 6 g Biofeuchtmasse pro Liter Kultur und Expressionslevel von 400 nmol pro Liter LB-Medium und liegt somit im Rahmen von für CYP102A-Enzymen erreichte Expressionslevel [162]. Das mit dem Originalplasmid, pQE-30tBs β , das auf einem pQE30 Vektor basiert, erreichte Expressionslevel lag ca. 20-fach niedriger, bei 21 nmol pro Liter LB-Medium [161]. Das Enzym lies sich über IMAC erfolgreich aufreinigen (Abbildung 3-13). Die densitometrisch bestimmte Reinheit betrug über 95%. Das Protein lies sich selektiv eluieren, andere Proteine wurden nicht mit dem Zielprotein eluiert.

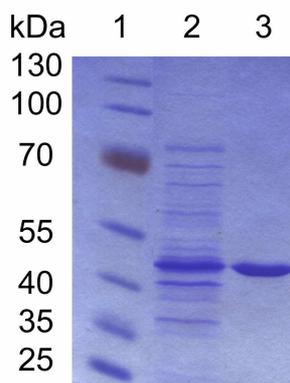


Abbildung 3-13: Aufreinigung von CYP152A1; 1: Proteinstandard; 2: Zelllysate vor der Aufreinigung; 3: aufgereinigtes CYP152A1

Die rötlich gefärbten Fraktionen, die CYP152A1 enthielten, wurden gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer dialysiert, um Imidazol, einen Inhibitor der P450 Monooxygenaseaktivität, aus der Lösung zu entfernen.

3.6.3 Regioselektivität von CYP152A1

CYP152A1 ist eine Peroxygenase, sie wurde mit verschiedenen Fettsäuren in Gegenwart von Wasserstoffperoxid umgesetzt. Die Produkte wurden mit Trimethylchlorsilan derivatisiert und im GC-MS analysiert.

CYP151A1 hydroxyliert Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure in α - und β -Position. Das Produktmuster ist unabhängig von der Fettsäurekettenlänge. Die Verteilung ist in Tabelle 3-9 gegeben.

Tabelle 3-9: Hydroxylierungsmuster verschiedener Fettsäuren bei der Umsetzung von CYP152A1

Substrat	α -Hydroxysäure	β -Hydroxysäure
Laurinsäure	22	78
Myristinsäure	25	75
Palmitinsäure	22	78

3.6.4 Protein-Design mit CYP152A1

In diesem Projektteil sollte das Hydroxylierungsmuster für Laurinsäure von den α - und β -Positionen zur γ - und δ -Position verschoben werden. In der Kristallstruktur von CYP152A1 (PDB-Eintrag 1izo) sind deutliche Wechselwirkungen zwischen dem Arginin 242 in der I-Helix des Enzyms und der Carboxylatgruppe des Enzyms zu sehen [77]. Mit Hilfe des rationalen Protein-Designs wurden verschiedene Zielpositionen identifiziert, an denen dieses Substratbindemotiv imitiert werden sollte. Arginin 242 wurde zu Phenylalanin mutiert und somit wurde die für die Substratbindung wichtige Aminosäure entfernt. Die Mutante R242F konnte aktiv in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert werden.

Die Bedeutung von R242 auf die Substratbindung geben die unterschiedlichen Bindungskonstanten von Wildtyp und Einfachmutante mit Laurin- und Myristinsäure wieder (Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Bindungskonstanten für CYP152A1-Wildtyp und R242F mit Laurinsäure und Myristinsäure

Fettsäure	K_D CYP152A1 Wildtyp	K_D CYP152A1 R242F
Laurinsäure	48,4 μ M	2325,4 μ M
Myristinsäure	37,8 μ M	155,9 μ M

Ausgehend von einer Kristallstruktur von CYP152A1 (PDB-Eintrag 1izo) wurden verschiedene Zielpositionen identifiziert. Der Austausch in den Positionen N239 bzw.

I238 durch Arginin sollte ermöglichen, das Hydroxylierungsmuster durch veränderte Bindung der Fettsäure zu verschieben (Abbildung 3-14). Für beide Zielmutanten zeigen molekulardynamische Simulationen, durchgeführt von Tuan Anh Do in der Bioinformatikabteilung, dass eine Bindung der Carboxylatgruppe mit I238R bzw. N239R die γ - und δ -Position von Laurinsäure über das Häm ausrichtet.

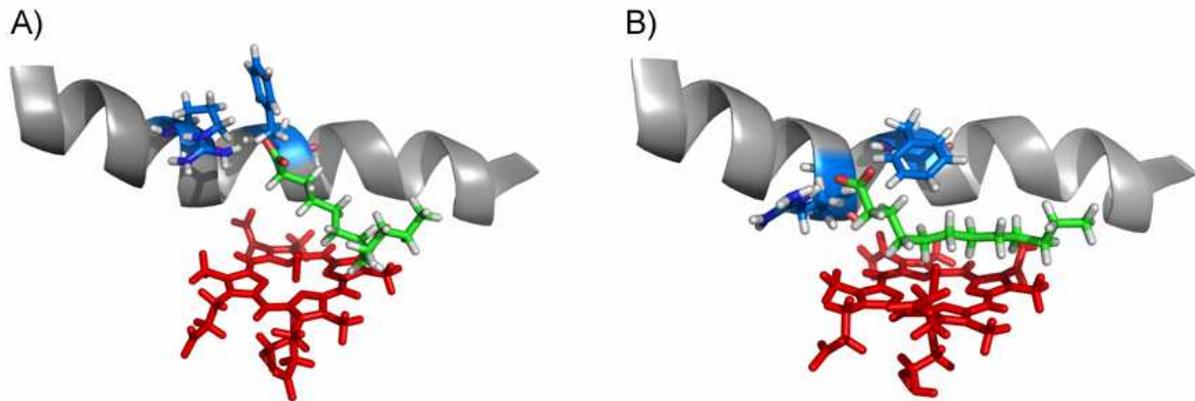


Abbildung 3-14: Darstellung des aktiven Zentrums der CYP152A1-Mutanten A) I238R R242F und B) N239R R242F; in rot ist das Häm, in grün Laurinsäure, in grau die I-Helix und in blau die veränderten Aminosäuren dargestellt.

Die Doppelmutante N239R R242F konnte nicht funktionell exprimiert werden. Im CO-Differenzspektrum konnte nur ein Peak bei 420 nm detektiert werden, was bedeutet, dass das Cysteinat nicht kovalent mit dem Porphyrinring ligiert ist.

I238R R242F konnte in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert werden und zeigte im CO-Differenzspektrum einen Peak bei 450 nm. Umsetzungen mit Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure führten jedoch nicht zu Produkten. Möglicherweise wird der Zugang der Fettsäure zu I238R durch eine andere Aminosäure verhindert. Die Kristallstruktur legt nahe, dass es sich dabei um Phenylalanin in Position 79 handelt. Um mehr Platz im aktiven Zentrum für die Fettsäure zu schaffen, wurde Position 79 in CYP152A1 Wildtyp und in der Doppelmutante I238R R242F durch Valin ersetzt (Abbildung 3-15). Es konnte jedoch nur die Einzelmutante F87V aktiv exprimiert werden. Umsetzungen mit Laurinsäure führten zu 64% α -Hydroxylaurinsäure und 36% β -Hydroxylaurinsäure. Die Mutante hatte somit eher die Eigenschaften einer α -Hydroxylase.

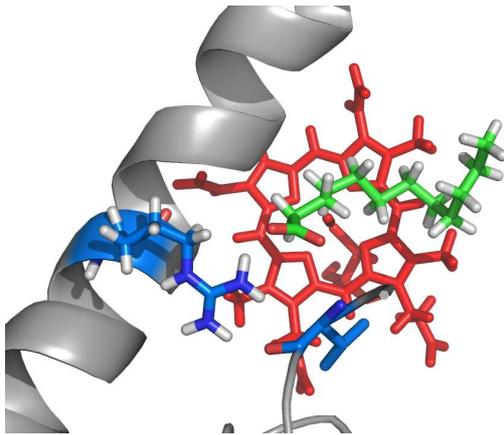


Abbildung 3-15: CYP152A1 F79V, Darstellung des Häm in rot, Laurinsäure in grün, F79V im Loop, R242 in der I-Helix

3.7 Expression und Charakterisierung von CYP102A7 aus *Bacillus licheniformis*

3.7.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung

CYP102A7 ist ein Vertreter der CYP102A-Familie. Das Gen (YrhJ) wurde bei der Sequenzierung des *Bacillus licheniformis* Genoms identifiziert [163]. Das CYP102A7-Gen wurde in einer vorangegangenen Diplomarbeit am ITB isoliert und in den Vektor pET28a(+) subkloniert [164]. Durch Expression in *E. coli* BL21 (DE3) unter Standardbedingungen in Schüttelkolben (siehe 2.5.3) konnten 400 nmol P450 pro Liter Kultur erzeugt werden. Dies entspricht 48 mg Enzym pro Liter Kultur. Das CYP102A7-Enzym wurde mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule unter Verwendung des im pET28a(+) kodierten His-tags aufgereinigt. Anfängliche Aufreinigungsexperimente wurden bei pH 7,5 durchgeführt. Allerdings band das Zielenzym bei diesen Bedingungen nicht an der Säule. Die Aufreinigung gelang bei einem pH-Wert von 8,1. Nur 10% des Enzyms wurden in der Elutionsfraktion wiedergefunden. Der Aufreinigungsfaktor betrug 6,6. Abbildung 3-16 zeigt ein Polyacrylamidgel, auf dem Lysat, Säulendurchfluss, Waschfraktion und eluiertes Enzym zu sehen sind. Die densitometrisch auf einem SDS-Polyacrylamidgel bestimmte Reinheit des Enzyms betrug 95%, was dem durch CO-Differenzspektroskopie bestimmten Anteil P450 am Gesamtprotein entsprach. Folglich wurde das Häm, die prosthetische Gruppe des Enzyms, in praktisch jedes Apoenzym eingebaut. Schwache Banden bei ca. 60 kDa auf dem SDS-Gel stammen vermutlich von proteolytischen Abbauprodukten, die auch bei CYP102A1, CYP102A2 und

CYP102A5 beobachtet wurden [62, 63, 165]. Die CYP102A7 enthaltenden Fraktionen wurden gegen 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert, um Imidazol, einen Inhibitor der P450 Monooxygenaseaktivität, aus der Lösung zu entfernen.

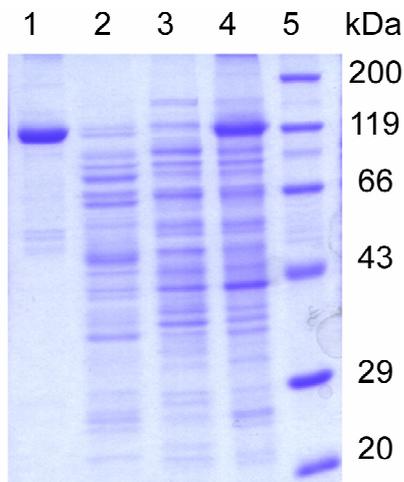


Abbildung 3-16: SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung von CYP102A7. Es wurden 10 µg Protein pro Bahn aufgetragen. 1: aufgereinigtes CYP102A7, 2: Waschfraktion, 3: Durchfluss, 4: Zellysate, 5: Proteinstandard.

3.7.2 Spektroskopische Charakterisierung von CYP102A7

CYP102A7 zeigt in UV-VIS spektroskopischen Untersuchungen typische Charakteristika einer P450 Monooxygenase (Abbildung 3-17). Das Absorptionsspektrum von oxidiertem Enzym zeigt eine typische Soret-Bande bei 420 nm und eine Schulter bei 450 bis 500 nm, die von den Flavin-Cofaktoren der Reduktase hervorgerufen wird. Die α - und β -Absorptionsbanden des Hämeisens liegen bei 535 und 567 nm. Durch Zugabe von Natriumdithionit oder NADPH werden die Flavin-Cofaktoren zu Hydrochinonen reduziert. Als Folge verschwindet die Schulter zwischen 450 und 500 nm. Das CO-Differenzspektrum zwischen reduzierter und reduzierter CO-gebundener Form des Enzyms zeigt den für P450 Monooxygenasen namensgebenden Peak bei 450 nm. Bei 420 nm ist eine kleine Schulter zu sehen, die durch inaktives Enzym hervorgerufen wurde. Nach Zugabe von Myristinsäure zum oxidierten Enzym nimmt die Soret-Bande bei 420 nm deutlich ab, darüber hinaus wurde ein Absorptionsmaximum bei 390 nm beobachtet. Dies entspricht der Veränderung des Häm spinzustandes von low-spin zu high-spin während der Substratbindung.

Der Anteil an Flavinen wurde über Dünnschichtchromatographie nach Denaturierung des Enzyms bei 95 °C bestimmt. Die analysierten Proben zeigten zwei Flecken. Einer

lag bei einem R_F Wert von 0,27, der andere bei einem R_F Wert von 0,41. Dies entspricht den R_F Werten von verwendeten FAD- und FMN-Standards.

Die Aktivität der Diflavinreduktase des Enzyms wurde unter Verwendung von Cytochrom c, einem externen Elektronenakzeptor, bestimmt [64]. CYP102A7 katalysiert die Reduktion von Cytochrom c mit einem K_M von $4,1 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Der k_{cat} beträgt $7343 \pm 142 \text{ min}^{-1}$ (siehe Tabelle 3-11).

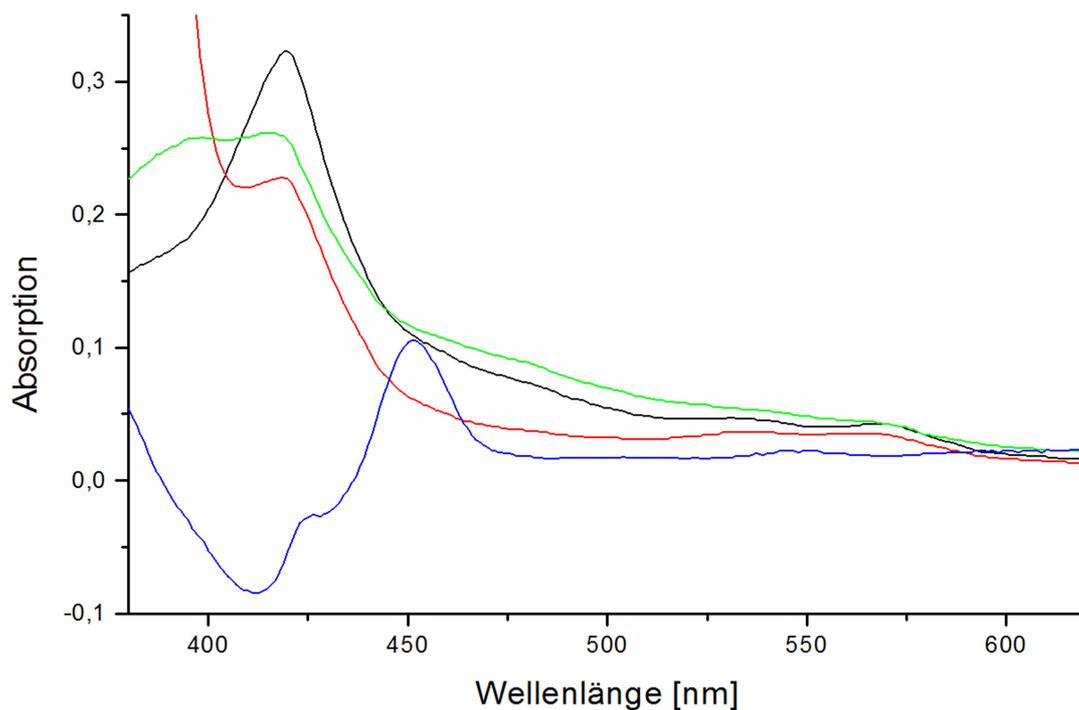


Abbildung 3-17: UV-VIS-Absorptionsspektren von CYP102A7 im oxidierten Zustand (schwarz), im oxidierten Zustand mit gebundener Myristinsäure (grün), im NADPH-reduzierten Zustand (rot), Differenzspektrum von im Natriumdithionit reduzierten, CO-gebundenen Zustand und im Natriumdithionit reduzierten Zustand (blau)

3.7.3 Screening nach Substraten

Alle bisher charakterisierten CYP102A-Enzyme (CYP102A1, CYP102A2, CYP102A3 und CYP102A5) sind Fettsäurehydroxylasen. Aus diesem Grund beinhaltete das Screening für CYP102A7 ungesättigte, gesättigte und verzweigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 8 bis 22 Kohlenstoffatomen. Darüber hinaus umfassten die getesteten potenziellen Substrate Chemikalien aus den Stoffgruppen azyklische Alkane, zyklische und azyklische Terpene und Terpenoide. Außerdem wurden verschiedene Substanzen

getestet, die typische Substrate für mikrosomale P450 Monooxygenasen darstellen. Dazu gehörten Ethoxycoumarin, 11-Deoxycortisol und Testosteron.

Für ein Vorscreening wurde die Oxidation des Cofaktors NADPH photometrisch bei 340 nm verfolgt. Gesättigte Fettsäuren mit Kettenlängen unter zehn Kohlenstoffatomen wurden nicht als Substrate akzeptiert. CYP102A7 zeigte stärkste Aktivität gegenüber Myristinsäure. Gegenüber länger- und kürzerkettigen Fettsäuren nahm die Aktivität ab (Tabelle 3-11).

Neben Fettsäuren katalysiert CYP102A7 auch die Oxidation verschiedener Terpene und Terpenoide. Besonders die Oxidation von (*R*)-(+)-, (*S*)-(-)-Limonen, Nerylaceton, Geranylaceton wurde mit hohen Aktivitäten katalysiert. CYP102A7 katalysierte die Deethylierung von 7-Ethoxycoumarin mit $2 \text{ eq}(7\text{-Ethoxycoumarin}) \text{ eq} (\text{P450})^{-1} \text{ min}^{-1}$.

11-Deoxycortisol, Dextromethorphan, Testosteron sowie zyklische und azyklische Alkane wurden nicht als Substrate akzeptiert.

3.7.4 Kinetische Untersuchungen und Bindungskonstanten

Die beschriebenen CYP102A-Enzyme unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität im Bezug auf Fettsäuren. Aus diesem Grund ist die genaue Untersuchung der kinetischen Konstanten von CYP102A7 mit verschiedenen gesättigten, ungesättigten und verzweigten Fettsäuren von Interesse (Tabelle 3-11). Die aufgenommenen Kinetiken entsprechen dem Michaelis-Menten-Typ.

CYP102A7 zeigt, wie CYP102A1, CYP102A2 und CYP102A5, mit Fettsäuren ein Typ I-Bindungsspektrum. Die höchste Affinität wurde für Palmitinsäure gemessen. Zwar zeigt CYP102A7 in seiner Aktivität eine Präferenz für gesättigte Fettsäuren, die Bindungskonstante für Linolsäure ist mit der von Palmitinsäure vergleichbar. Seine Affinität gegenüber Methyltetradecansäure liegt im Bereich von Myristinsäure und Palmitinsäure.

Obwohl auch Terpenoide von CYP102A7 als Substrate akzeptiert werden, konnte keine Veränderung des Spinzustands in Anwesenheit von Terpenen beobachtet werden. Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Substratscreening konnten bestätigt werden. Myristinsäure stellte das beste Substrat für CYP102A7 hinsichtlich der Umsatzraten dar. Kürzer und längerkettige Fettsäure waren schlechtere Substrate für CYP102A7, mit Umsatzraten, die zweifach niedriger waren als die für Myristinsäure.

Zwar zeigt CYP102A7 hohe Affinität zu verzweigten Fettsäuren, die k_{cat} -Werte liegen jedoch deutlich unter denen von Myristinsäure.

Tabelle 3-11: Kinetische und Bindungsparameter für CYP102A7 mit Fettsäuren und Cytochrom c als Elektronenakzeptor

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	K_D [μM]
Laurinsäure	$102,0 \pm 2,5$	$1663,9 \pm 39,8$	$184,0 \pm 7$
Myristinsäure	$50,9 \pm 1,6$	$3589,0 \pm 689,0$	$16,7 \pm 5,5$
12-Methylmyristinsäure	$12,9 \pm 2,6$	$832,0 \pm 31,1$	$3,5 \pm 0,6$
13-Methylmyristinsäure	$16,5 \pm 2,2$	$1264,5 \pm 58,9$	$5,1 \pm 0,9$
Palmitinsäure	$38,6 \pm 2,8$	$1539,0 \pm 52,9$	$0,7 \pm 0,1$
Palmitoleinsäure	$16,5 \pm 3,7$	$1369,0 \pm 185$	n. b.
Stearinsäure	$11,8 \pm 0,4$	$971,0 \pm 12$	n. b.
Linolsäure	$55,1 \pm 4,4$	$1760,0 \pm 110,2$	$1,0 \pm 0,1$
Cytochrom c	$4,1 \pm 0,5$	$7343,0 \pm 141,7$	-

3.7.5 Identifizierung der verschiedenen Produkte

Wie auch die anderen Mitglieder der CYP102A-Familie ist CYP102A7 nicht streng regioselektiv. Umsetzungen von Fettsäuren mit CYP102A-Enzymen resultieren in Mischungen von Hydroxyfettsäuren (Tabelle 3-12). Es konnten nur subterminale Hydroxylierungen beobachtet werden [166]. CYP102A7 bevorzugt die ω -2-Position vor der ω -1- und ω -3-Position für alle getesteten Fettsäuren. Im Fall von 13-Methylmyristinsäure, wo die Methylgruppe in ω -1-Position liegt, wird fast ausschließlich die ω -2-Position hydroxyliert (92%). Für 12-Methylmyristinsäure ist die ω -2-Position methylverzweigt, die Produkte sind in diesem Fall gleichmäßiger verteilt. Am tertiären C-Atom erfolgen 30% der Hydroxylierung. 13-Hydroxy-12-methylmyristinsäure bildet das Hauptprodukt (57%). Alle getesteten Fettsäuren werden mit hoher Kopplungsrate von knapp 80% oder höher hydroxyliert.

Tabelle 3-12: Kopplungseffizienz und Produktverteilung der Hydroxylierung von Fettsäuren durch CYP102A7

Substrat	Kopplung [%]	Produktverteilung [%]		
		ω -3	ω -2	ω -1
Laurinsäure	80	32	40	28
Myristinsäure	>95	20	50	30
Palmitinsäure	>95	10	65	25
12-Methylmyristinsäure	>95	15	28	57
13- Methylmyristinsäure	>95	-	92	8
Palmitoleinsäure	77	68	18	14
Linolsäure	89	3	75	22

Neben Fettsäuren wurden auch Produktspektren verschiedener Terpenoide wie β -Ionon, Limonen, Geranylaceton und Nerylaceton analysiert. Die Umsetzung von β -Ionon resultierte nur in einem Produkt, 4-Hydroxy- β -Ionon. Wohingegen das Regioisomer von β -Ionon, α -Ionon nicht als Substrat akzeptiert wird.

Die zwei Stereoisomere von Limonen, (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(-)-Limonen werden von CYP102A7 mit unterschiedlicher Stereo- und Chemoselektivität oxidiert (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-13: Produktverteilung der Limonenoxidation mit CYP102A7 [%]; 1: *cis*-1,2-Limonenepoxid, 2: *trans*-1,2-Limonenepoxid, 3 und 4: *cis*- und *trans*-8,9-Limonenepoxid, 5: *cis*-Carveol, 6: *trans*-Carveol

Produkte \ Substrate	1	2	3	4	5	6
(<i>R</i>)-(+)-Limonen	32	10	4	11	28	16
(<i>S</i>)-(-)-Limonen	6	43	17	9	20	6

(*R*)-(+)-Limonen wird zu zwei Hauptprodukten oxidiert. Der Anteil an *cis*-1,2-Limonenepoxid beträgt 32%, der Anteil an *cis*-Carveol beträgt 28%. Daneben werden

vier weitere Produkte beobachtet. Im Fall von (S)-(-)-Limonen wird als Hauptprodukt *trans*-1,2-Limoneneepoxid identifiziert.

Die *cis/trans*-Isomere Geranylaceton und Nerylaceton werden unspezifisch oxidiert und ergeben sieben bzw. sechs Produkte. Das Hauptprodukt für die Oxidation von Geranylaceton ist 9,10-Epoxynerylaceton (41%). Darüber hinaus konnten zwei weitere Produkte 11-Hydroxygeranylaceton (14%) und 5,6-Epoxygeranylaceton (4%) identifiziert werden. Nur zwei der sechs Nerylacetonoxidationsprodukte konnten mit Hilfe von Standards identifiziert werden. Es handelte sich um 9,10-Epoxynerylaceton (18%) und 5,6-Epoxynerylaceton (15%). Die vier weiteren Peaks konnten nicht identifiziert werden. Ihre MS-Fragmentationsmuster zeigen jedoch, dass es sich um Oxidationsprodukte von Nerylaceton handeln muss.

3.7.6 Enzymstabilität

In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurden Lösungsmittelstabilität und pH-Optimum von CYP102A7 untersucht [164]. Es konnte gezeigt werden, dass CYP102A7 über eine außergewöhnlich hohe Lösungsmittelstabilität verfügt. Die höchste Aktivität wurde bei 6% DMSO gemessen. Bei 26% DMSO lag die Restaktivität noch bei 50%. Das pH-Optimum lag bei pH 7,5. Obwohl sich die NADPH-Oxidationsraten bei niedrigeren und höheren pH-Werten nicht stark von der am pH-Optimum unterschieden, führten höhere und niedrigere pH-Werte zu einem höheren Maß an Entkopplung. Die Inkubation des Enzyms für 30 min bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte, dass die Aktivität gegenüber Myristinsäure nach Inkubation bei 27,5 °C leicht erhöht war (115%). Höhere Temperaturen führten zu einer reduzierten Restaktivität (Abbildung 3-18). Nach einer Inkubation bei 60 °C konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden.

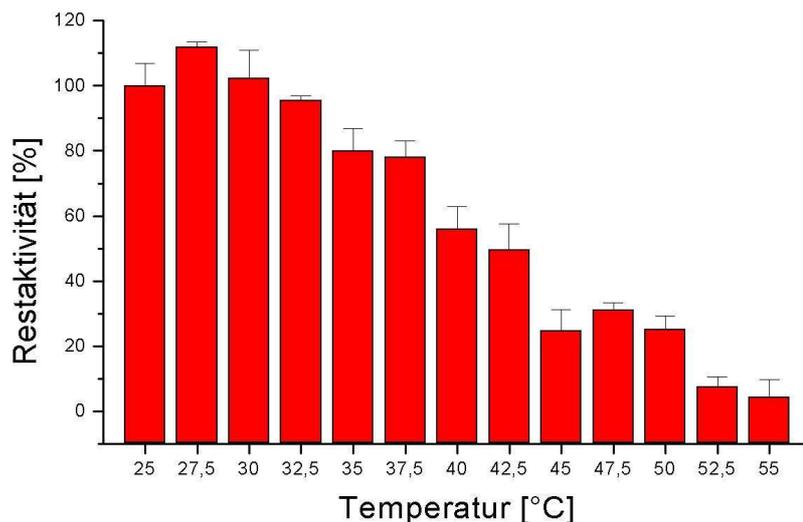


Abbildung 3-18: Aktivität von CYP102A7 nach 30 minütiger Temperaturinkubation

Die Stabilität unter Dauerreaktionsbedingungen wurde mit einem Enzymmembranreaktor und 10-*p*NCA als Substrat ermittelt. Die Halbwertszeit im Betrieb bei Raumtemperatur liegt bei 100 Minuten (Abbildung 3-19) und damit deutlich unter dem Wert, der für CYP102A2 erreicht wurde (5 h) [62]. Für CYP102A1 wurde die Prozessstabilität in einem mit Formiatdehydrogenase betriebenen Regenerationsystem untersucht. Die Werte sind somit nicht direkt vergleichbar. Das CYP102A1-System ist bis zu 6 h aktiv, allerdings zeigt das System nach 45 min nur noch 12,5% der Anfangsaktivität [166].

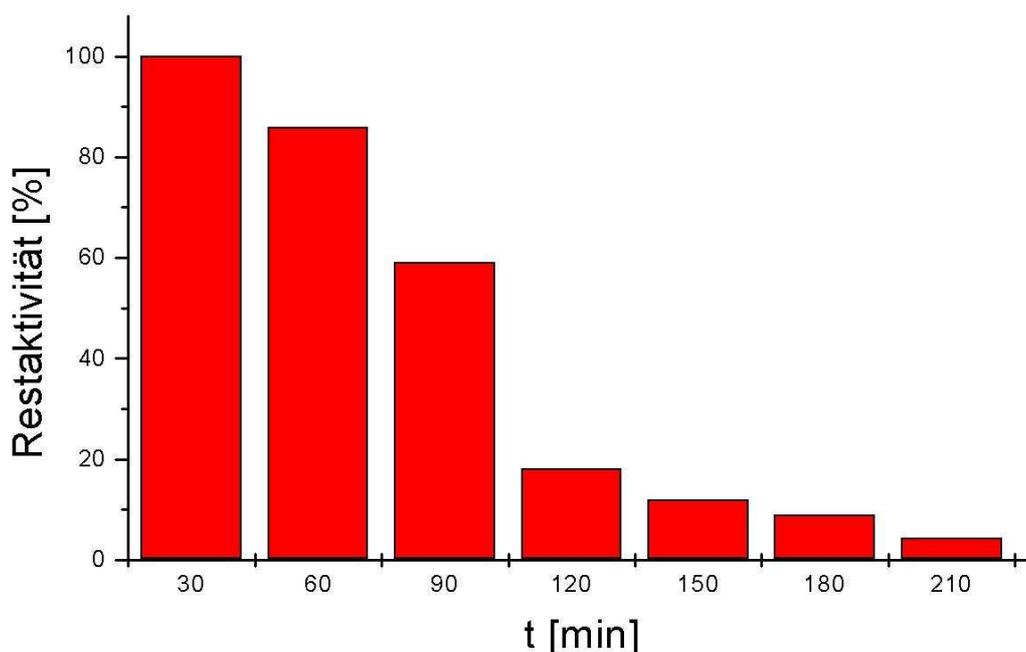


Abbildung 3-19: Prozess-Stabilität von CYP102A7

4 Diskussion

Im Fokus dieser Dissertation stand die enzymatische Fettsäuremodifikation mit Cytochrom P450 Monooxygenasen. Fettsäuren sind Grundbausteine von Lipiden. In der Natur sind über 1000 verschiedene Fettsäuren bekannt. Allein in Kuhmilch finden sich über 500 verschiedene Fettsäuren. Bestimmte Fettsäuren sind essentielle Bestandteile der Nahrung und können weder von Menschen noch Tieren synthetisiert werden. Neben ihrer Rolle als Bestandteile von Lipiden haben verschiedene Fettsäuren auch physiologische Bedeutung, indem sie z. B. an Transkriptionsfaktoren binden (siehe auch http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/fa_eic.html). Ein Großteil einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren senken das Risiko von Herz-Kreislaufkrankungen [167, 168]. Darüber hinaus scheint die Einnahme großer Mengen einfach ungesättigter Fettsäuren vor kognitiven Veränderungen im Alter zu schützen [169]. Diäten, die reich an einfach ungesättigten Fettsäuren sind, verringern den Cholesterinspiegel und die Konzentrationen an Triacylglyceriden und haben somit eine positive Auswirkung auf die Gesundheit [170]. Langkettige Hydroxyfettsäuren sind Bestandteile in Tieren- und Pflanzenzellen und haben wichtige physiologische Auswirkungen. Vermutlich haben diese Verbindungen auch wichtige Bedeutungen in Hefen. Auch mehrfach ungesättigte Hydroxyfettsäuren sind von biotechnologischer Bedeutung. Diese Substanzen sind teure Lipide, die einen medizinischen Einsatz finden [171].

Viele Bakterien und auch Hefen bauen Fettsäuren über die β -Oxidation ab. Generell wäre es möglich, aus Zellsuspensionen oxidierte Zwischenprodukte des Zellstoffwechsels zu isolieren. So werden Mutanten, die in verschiedenen Schritten des β -Oxidationswegs blockiert sind, zur Synthese von Hydroxyfettsäuren, Diolen oder Dicarbonsäuren verwendet [172-174]. Dennoch erscheint es zur Optimierung von Produktausbeuten und zur Verbesserung der Produktabtrennung sinnvoller, die Reaktionen unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* durchzuführen. Aus diesem Grund wurden die Oxidationsreaktionen mit isolierten P450 Monooxygenasen durchgeführt.

Produkte der P450-katalysierten Fettsäureoxidation sind Hydroxyfettsäuren oder Epoxyfettsäuren. Subterminale Hydroxyfettsäuren sind chirale Moleküle. Ihre Anwendung ist für die Produktion enantiomerenreiner synthetischer Bausteine, besonders im Bereich der Wirkstoffsynthese, denkbar [18]. Darüber hinaus werden langkettige Hydroxyfettsäuren als Vorläufer von Polymeren und Lactonen verwendet.

Lactone ihrerseits werden als Bestandteile von Geruchsstoffen und Antibiotika eingesetzt.

Die chemische Synthese einiger subterminaler Hydroxyfettsäuren ist zwar möglich, sie erfordert jedoch die Verwendung teurer, funktionalisierter Substrate und mehrere Syntheseschritte [175-177]. Eine chemische Synthese von subterminalen Hydroxyfettsäuren ausgehend von nichtmodifizierten Fettsäuren ist nicht möglich [18].

Enzyme der Familien CYP4, CYP102 und CYP152 sind Fettsäurehydroxylasen, die terminale bzw. subterminale Hydroxylierung gesättigter Fettsäuren katalysieren [178]. Die Expression von P450 Monooxygenasen der CYP102A-Familie wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten am Institut etabliert [62, 65, 102, 141, 166, 179]. Besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Verschiebung der Hydroxylierungsposition für Laurinsäure nach γ - bzw. δ -Position. Die untersuchten P450 Monooxygenasen stammten aus den Klassen CYP102A und CYP152A. CYP102A-WT katalysiert die Hydroxylierung von Laurinsäure in ω -1-, ω -2- und ω -3-Position, während CYP152A-WT die Hydroxylierung von Laurinsäure in α - und β -Position katalysiert. Die Veränderung dieser Enzyme zu einer γ -/ δ -Hydroxylase ermöglicht einen neuen Weg zur Produktion von γ -/ δ -Lactonen. Beide Lactone können durch zyklische Veresterung (Lactonisierung) thermochemisch direkt aus den Hydroxyfettsäuren erzeugt werden.

4.1 Entwicklung von CYP102A1 zu einer γ -/ δ -Laurinsäure-Hydroxylase

4.1.1 Durchmusterung der CYP102A1-Ausgangsmutanten, Sättigungsmutagenese

Bei der Durchmusterung von bereits im Institut vorhandenen CYP102A1-Mutanten zeigte die Dreifach-Mutante A74G F87V L188Q die höchsten Aktivitäten gegenüber Laurinsäure und Caprinsäure. Sie wurde in einem gerichteten Evolutionsexperiment erhalten, in dem die Substratspezifität auf mittelkettige Fettsäuren optimiert wurde [141]. Zellkulturen, in denen diese Mutante exprimiert wird, fallen vor allem durch eine blaue Färbung auf. Indol aus dem Medium wird von dieser Mutante zu 2-Hydroxyindol und 3-Hydroxyindol oxidiert, das an der Luft spontan zu Indigo und Indirubin dimerisiert [141]. Darüber hinaus katalysiert diese Mutante auch die Oxidation von Alkanen, Terpenoiden, Aromaten und heterozyklischen Verbindungen, die nicht vom Wildtyp umgesetzt werden

[180-182]. Gegenüber Laurinsäure zeigt A74G F87V L188Q hohe Aktivität und auch ein erweitertes Produktspektrum. Neben Hydroxylierung in ω -1- bis ω -3-Position, hydroxyliert die Mutante auch Laurinsäure in ω -4- und ω -5-Position. Aus diesen Gründen wurde die Mutante als Basis für Sättigungsmutagenese und gerichtete Evolution verwendet.

Sättigungsmutagenese beinhaltet den Austausch von Codons in einer bestimmten Position eines Gens, wodurch Mutanten erzeugt werden können, die alle proteinogenen Aminosäuren in dieser Position enthalten.

Die Positionen 47, 51, 87 und 188 wurden für das Sättigungsmutageneseexperiment ausgewählt. R47 geht mit der Carboxylatgruppe elektrostatische Wechselwirkungen ein. Y51 bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Carboxylatgruppe des Substrates aus. Die Aminosäuren sind daher wichtig für eine gute Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum [66, 72]. Beide Aminosäuren liegen im Eingangsbereich des langen, hydrophoben Substratzugangskanals. Untersuchungen über die Bedeutung dieser zwei Positionen auf die Aktivität sind bekannt. Für Fettsäuren der Kettenlänge C12-C16 bleibt die Aktivität bei den Austauschen R47E, R47A und R47G erhalten. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) nimmt jedoch um den Faktor 5-15 im Vergleich zum Wildtyp ab [58, 66, 183]. Arginin 47 geht mit der Carboxylatgruppe von Fettsäuren elektrostatische Bindungen ein und ist, wie Aminosäuresubstitutionen gezeigt haben, für die Aktivität des Enzyms mit Fettsäuren von großer Bedeutung [66]. Austausche in Position 47 hatten jedoch kaum Einfluss auf die Veränderung der Regioselektivität. Der Einfluss von Position 51 auf die Aktivität ist geringer als der der Position 47, Auswirkungen auf die Regioselektivität der Hydroxylierung von Fettsäuren wurden bisher, wie für alle anderen Positionen noch nicht systematisch untersucht [66]. Der Austausch Y51S führte zu einer Verschiebung des Produktmusters, es wurde fünfmal soviel ω -5-Hydroxylaurinsäure wie mit der Ausgangsmutante erzeugt. Eine Erweiterung des Produktspektrums auf ω -6- und ω -7-Position konnte jedoch noch nicht beobachtet werden. Ein Vergleich von substratgebundener mit substratfreier Kristallstruktur zeigt, dass besonders im Bereich der Substratbindestellen R47 und Y51 eine Konformationsänderung eintritt, begleitet von weiteren Konformationsänderungen in den F- und G-Helices und den F/G- und G/H-Loops [72]. Wahrscheinlich werden die Wechselwirkungen zwischen Hydroxylgruppe und Carboxylat durch den Austausch von Tyrosin zu Serin geschwächt. Eine Veränderung der Regioselektivität durch veränderte Bindungsstärken konnte auch für die Oxidation von Palmitoleinsäure beobachtet

werden. Bei niedrigen pH-Werten konnte gezeigt werden, dass für Palmitoleinsäure der Anteil an Epoxidierung im Verhältnis zur Hydroxylierung zunimmt [53]. Bei niedrigen pH-Werten liegt das Substrat protoniert vor, somit sind die Wechselwirkungen zwischen Position 47, 51 und Substrat geschwächt.

Die Aminosäure F87 ist stark konserviert, sie liegt im aktiven Zentrum über der Häm-Gruppe und ist von großer Bedeutung für die richtige Orientierung der Alkylkette der Fettsäuren [184]. Ein Vergleich der substratfreien und substratgebundenen Kristallstrukturen von CYP102A1 zeigt substratinduzierte Konformationsänderungen, die durch eine Bewegung des Phenylrings von Phenylalanin hervorgerufen werden [29, 72]. Da CYP102A1 Fettsäuren nicht wie eukaryotische Fettsäurehydroxylasen (z. B. CYP4A1) in ω -Position hydroxyliert, ging man davon aus, dass Phenylalanin in Position 87 Hydroxylierung in ω -Position verhindert. In Kristallstrukturen erscheint das Phenylalanin in Position 87 wie ein Pförtner, das den Zugang der Substrate zum aktiven Zentrum reguliert. NMR-Daten legten nahe, dass die Mutante F87A ω -Hydroxylierung von Fettsäuren ermöglicht. In GC-MS-Messungen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden [185]. Hydroxylierung in ω -Position ist chemisch schwer zu katalysieren. Die Abstraktion eines Protons in terminaler Position ist energetisch aufwändiger als in subterminaler Position [186]. In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit keiner Mutante ω -Hydroxylierung nachgewiesen werden. Allerdings wurde in unserem Institut gezeigt, dass CYP102A1 die terminale Hydroxylierung von verzweigten Fettsäuren katalysieren kann [187]. Für die Mutation F87V konnte die Bedeutung dieser Position für die Oxidation von Arachidonsäure hinsichtlich Aktivität, Stereo- und Regioselektivität gezeigt werden [55]. CYP102A1 F87V ist eine regioselektive Arachidonsäure-14(*S*),15(*R*)-epoxygenase, wohingegen CYP102A1 Wildtyp Arachidonsäure zu 18(*R*)-Hydroxyeicosatetraensäure (80% an Produkt) und 14(*S*),15(*R*)-Epoxyeicosatriensäure oxidiert [188]. Mutationen in Position F87, zentral über dem Häm gelegen, haben auch für die Oxidation von Laurinsäure eine starke Auswirkung auf das Produktmuster. Substitutionen hin zu kleineren Aminosäuren, wie Serin, Valin, Alanin oder Glycin führen zur Hydroxylierung in ω -4- und ω -5-Position. Das Substrat kann bei diesen Mutanten ungehindert zum aktiven Zentrum gelangen, wobei mehrere Positionen der Alkylkette über dem aktiven Zentrum zu liegen kommen können und hydroxyliert werden. Die Ergebnisse von literaturbekannten Daten konnten für F87V bestätigt werden [189]. Obwohl Lentz et al. für F87V keine ω -4- und ω -5-Hydroxylaurinsäure als

Produkte identifizieren konnten, zeigt das Chromatogramm zwei Peaks vor dem ω -3-Hydroxylaurinsäurepeak, die ω -4- und ω -5- Hydroxyprodukten entsprechen [189].

Die Mutante F87A eignete sich für die Weiterentwicklung von CYP102A1 zu einer γ - δ -Hydroxylase. Diese Mutante weist ein erweitertes Substratspektrum mit hoher Stabilität auf. Zwar ist die Menge an gebildeter ω -5-Hydroxylaurinsäure in F87G höher als in F87A und stellt sogar das Hauptprodukt dar, die Mutante ist jedoch instabiler als F87A und daher nicht für weitere Mutageneseschritte hin zu einer γ - δ -Hydroxylase geeignet. Der Austausch von Position 87 durch größere ungeladene Aminosäuren, wie Leucin und Isoleucin verschiebt das Produktmuster. Besonders der Anteil an ω -1-Hydroxylaurinsäure nimmt dabei zu. Vermutlich wird der Zugang der Alkylkette zum aktiven Zentrum durch Van-der-Waals Kräfte erschwert.

Austausche in Position 188 im Substratzugangskanal haben hingegen nur geringe Auswirkungen auf die Regioselektivität der Laurinsäurehydroxylierung. Die Alkylkette der Fettsäure ist im Vergleich zu anderen P450-Substraten (z. B. Aromaten) sterisch nicht anspruchsvoll, daher sind Austausche in dieser Position des Substratzugangskanals für Laurinsäure nur von geringer Bedeutung.

4.1.2 Gerichtete Evolution

Zur Anpassung von Enzymen mit unbekannter Struktur an biokatalytische Prozesse wird die gerichtete Evolution eingesetzt. Bei diesem Ansatz werden mithilfe von molekularbiologischen Techniken mehrere Tausend Varianten eines Ausgangsgens, so genannte Genbibliotheken, erzeugt. In hochparallelen Ansätzen wird die entsprechende Enzybibliothek exprimiert. Die Verwendung geeigneter Assaysysteme ermöglicht das schnelle Durchmustern der Bibliotheken. Verbesserte Enzyme können in weiteren Mutagenese- und Screeningrunden weiter optimiert werden. Die gerichtete Evolution imitiert das Prinzip der Evolution im Reagenzglas. Entscheidend für den Erfolg der gerichteten Evolution sind Parameter wie die funktionelle Expression des Enzyms, die Qualität des hochdurchsatzfähigen Assaysystems und die Diversität der Bibliothek. CYP102A1 wurde aus praktischen Gesichtspunkten als Objekt für den Einsatz von Protein-Design und gerichteter Evolution gewählt. Unter Prozessbedingungen ist CYP102A1 wesentlich stabiler, als andere Mitglieder der CYP102A-Familie [166]. Für CYP102A1 gelang es in der Vergangenheit das Substratspektrum von mittelkettigen Fettsäuren (C12-C20) auf Caprin- und Caprylsäure (C8 und C10) zu erweitern. Hierfür

wurden die Ersatzsubstrate 10- und 8-*p*NCA eingesetzt [190]. In vorangegangenen Arbeiten konnte gerichtete Evolution erfolgreich eingesetzt werden, um die Aktivität von CYP102A1 bzw. dessen Stabilität zu verbessern [103, 134, 145, 191]. Gerichtete Evolution ist nicht abhängig vom strukturellen Verständnis von Enzymen, vielmehr können die damit erzielten Mutanten helfen, Einblicke in Struktur-Funktionsbeziehungen zu erlangen.

Die im Screening verwendeten Ersatzsubstrate 5-*p*-Nitrophenoxydodecansäure, 5-*p*-Nitrophenoxydecansäure und 5-*p*-Nitrophenoxyoctansäure konnten ausgehend von den jeweiligen δ -Lactonen synthetisiert werden.

Eine Synthese von 4-*p*-Nitrophenoxyfettsäuren war nicht erfolgreich. Dies lag wahrscheinlich an der größeren Stabilität von γ -Lactonen, die nicht durch Methanolyse gespalten werden konnten.

Die getesteten Ersatzsubstrate zeigen Bindungskonstanten mit der in den gerichteten Evolutionsexperimenten verwendeten Mutante A74G F87V L188Q, die in der Größenordnung der Bindungskonstanten von Laurinsäure liegen. Die Ausbildung eines Typ I-Bindungsspektrums mit CYP102A1 A74G F87V L188Q und δ -*p*-Nitrophenoxylaurinsäure und δ -*p*-Nitrophenoxycaprylsäure ist ein Indiz für eine produktive Positionierung der Substrate über dem Häm, der prosthetischen Gruppe des Enzyms [25]. Allerdings gab es keine Möglichkeit die Funktionalität des Assays hinreichend im Vorfeld zu testen. Mit den durch *error-prone* PCR erzeugten Mutanten ließ sich keine Erweiterung des Produktmusters erreichen. Die Ergebnisse für das verwendete Ersatzsubstrat (Hydroxylierung des Ersatzsubstrates in δ -Position) lassen sich nicht direkt auf Fettsäuren übertragen. Vermutlich ist die *p*-Nitrophenolatgruppe, wenn sie an δ -Position mit der Fettsäure verethert ist, sterisch zu anspruchsvoll, d. h. die Fettsäure wird durch das Ersatzsubstrat nicht ausreichend imitiert. Einen möglichen Lösungsansatz bietet die Verwendung anderer Ersatzsubstrate (z. B. Thiocyanatfettsäurederivate), was derzeit untersucht wird.

4.1.3 Rationales Protein-Design

Von CYP102A1 liegen über 30 Kristallstrukturen (mit und ohne Substrat) vor, die rationales Protein-Design ermöglichen (siehe auch <http://www.cyped.uni-stuttgart.de>).

Darüber hinaus sind die Aufgaben vieler Aminosäuren im Substratzugangskanal und im aktiven Zentrum bekannt. Thermodynamik, Kinetik und Dynamik der Bindung von Fettsäuren wurde untersucht [186].

Für das Protein-Design wurden neben bereits diskutierten Positionen auch Position 69 in axialer Lage zum Häm, Position 78 in der B'-Helix über dem Häm und Aminosäuren der I-Helix (T260, I263) über dem Häm untersucht.

Position 69 liegt in unmittelbarer Nähe zum Häm. Da der Austausch des basischen Lysins zu Valin in dieser Position in inaktivem Enzym resultiert, Austausche der basischen Aminosäure Lysin durch andere basische Aminosäuren (Arginin und Histidin) nur geringeren Einfluss auf die Stabilität und Aktivität haben, lässt sich schließen, dass Lysin 69 mit dem Häm wechselwirkt und seine Lage stabilisiert. Allerdings konnte durch Austausche in Position 69 das Produktspektrum nicht weiter in Richtung δ -Position verschoben werden.

Die Aminosäure 78 befindet sich in der B'-Helix und hat in anderen P450 Monooxygenasen einen hohen Einfluss auf die Substratspezifität [192]. Die Aminosäuren 73-84 sind, wie aus einer Kristallstruktur hervorgeht, unter anderem für die Bindung von Palmitoleat verantwortlich und bilden zwei Drittel des Substratzugangskanals [72, 193].

Die Bedeutung von Substitutionen in Position 87 auf die Hydroxylierung von Laurinsäure wurde bereits in 4.1 diskutiert. F87A zeigte neben einem hohen Anteil an Hydroxylierung in ω -5-Position auch ausreichende Stabilität für die Entwicklung einer γ - δ -Hydroxylase. Die Kombination der Mutation F87A mit V78A/G erlaubt die Detektion von β - und δ -Hydroxylaurinsäure. Vermutlich ermöglicht der vergrößerte Raum im aktiven Zentrum neue Konformationen der Laurinsäure, wodurch β - und δ -Position für die Hydroxylierung zugänglich werden. Der Austausch von Valin in Position 78 durch größere hydrophobe Aminosäuren wie Leucin führt zu einem geringeren Anteil an ω -5-Hydroxylaurinsäure. Die ursprüngliche Idee, durch den Aminosäureaustausch das Substrat tiefer zum Häm zu „drücken“, konnte nicht verwirklicht werden.

Die Verringerung der Aktivität durch Austausch von Aminosäuren in der I-Helix (T260A, I263G) unterstreicht die wichtige Funktion der I-Helix für die Aktivität. Neben der

Hämbindung ist die I-Helix von Bedeutung für die Bindung und Aktivierung von molekularem Sauerstoff und auch für die Substratbindung [25]. Das Produktspektrum von CYP102A1 lässt sich von ω -1- bis ω -3- auf ω -1- bis ω -9-Hydroxylaurinsäure erweitern. Dies wurde erreicht durch eine Restrukturierung des aktiven Zentrums und der Einführung einer neuen putativen Bindestelle für die Carboxylatgruppe (S72Y), die näher am Häm liegt, als Y51. V78G F87A und S72Y V78A F87A stellen mögliche Kandidaten für die Produktion von Lactonvorstufen in *in vitro*-Prozessen dar.

4.2 Rationales Protein-Design von CYP152A1

CYP152A1, eine β -Hydroxylase aus *Bacillus subtilis*, ließ sich im Schüttelkolben unter Verwendung eines *E. coli* BL21(DE3) / pET28(a+)-Systems effektiv heterolog exprimieren. Das Expressionslevel für CYP152A1 lag im Rahmen der für CYP102A-Enzyme erreichte Expressionslevel. Umsetzungen des Enzyms mit Myristinsäure bestätigten die Präferenz des Enzyms für die β -Position [5]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass neben Myristinsäure auch Laurin- und Palmitinsäure als Substrate akzeptiert werden.

In der Kristallstruktur von CYP152A1 steht Arginin 242 in der I-Helix mit der Carboxylatgruppe des Substrats in Kontakt. Zur Entwicklung einer γ -/ δ -Hydroxylase sollte dieses Bindemotiv verschoben werden, indem das Arginin in der I-Helix auf die Positionen 238 bzw. 239 verschoben wurde.

Zuerst wurde eine Einfachmutante R242F hergestellt. Die K_D -Werte für Laurinsäure mit der R242F-Einfachmutante liegen fast 50-mal höher als für den Wildtyp, im Falle der Myristinsäure viermal höher. Dies entspricht den Erwartungen, da bei der R242F-Einfachmutante das für die Carboxylatbindung wichtige Arginin fehlt und folglich das Substrat nicht so gut im aktiven Zentrum fixiert werden kann.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Myristinsäure als Substrat von dem Wildtyp geringfügig besser und von der R242F-Einfachmutante viel besser als die Laurinsäure gebunden wird. Dies war auch zu erwarten, da in der Literatur [14] die Myristinsäure als das bevorzugte Substrat für CYP152A1 beschrieben wird.

Es konnten weder bei der R242F-Einfachmutante noch bei den Doppelmutanten I238R R242F und N239R R242F Hydroxylierungsprodukte (Abb. 34-35) festgestellt werden. Bei der R242F-Einfachmutante wurde dies auch erwartet, da sie das für die Carboxylatbindung erforderliche Arginin nicht enthält und deswegen nicht in der Lage

sein sollte, weder Hydroxylierung in α -/ β - noch in γ -/ δ -Position zu katalysieren. Bei der I238R R242F Doppelmutante wurde allerdings erwartet, dass das Substrat in γ -/ δ -Position hydroxyliert wird.

Möglicherweise wird der Zugang des Substrats zu I238R durch eine andere Aminosäure erschwert. Phenylalanin in Position 79 liegt über dem Häm, im aktiven Zentrum. Um im aktiven Zentrum mehr Platz für die Fettsäure zu schaffen wurde Position 79 in CYP152A1 Wildtyp und in der Doppelmutante I238R R242F durch Valin ersetzt. Es konnte jedoch nur die Einzelmutante F87V aktiv exprimiert werden. Umsetzungen mit Laurinsäure führten zu 64% α -Hydroxylaurinsäure und 36% β -Hydroxylaurinsäure. Mit der Mutante F79V konnte gezeigt werden, dass die Regioselektivität von CYP152A1 verändert werden kann. CYP152A1 wurde zu einer α -Hydroxylase mutiert, eine Verschiebung des Hydroxylierungsmusters in Richtung γ - und δ -Position konnte jedoch nicht erreicht werden.

Girhard et al. konnten zeigen, dass CYP152A1 neben Peroxygenaseaktivität auch Monooxygenaseaktivität besitzt. CYP152A1 zeigt sowohl Wechselwirkung mit Flavodoxin und Flavodoxin-Reduktase aus *E. coli* und der CYP102A1-Reduktase. Bei Umsetzungen über einen längeren Zeitraum ist dieses Mehrkomponentensystem dem Einsatz von Wasserstoffperoxid überlegen und liefert höhere Produktanteile [6]. Somit steht mittelfristig ein alternativer Biokatalysator zur Verfügung. Die Nachteile einer Peroxygenase, wie z .B. Inaktivierung durch Wasserstoffperoxid, entfallen.

4.3 Charakterisierung von CYP102A7

P450 Monooxygenasen, die mit ihrem Redoxpartner fusioniert sind, haben ein großes Potenzial für künftige biotechnologische Anwendungen (siehe 1.2.5). Allerdings unterscheiden sich diese Enzyme häufig in ihrer Spezifität und Aktivität. Daher ist es interessant unterschiedliche fusionierte P450 Monooxygenasen mit neuen Eigenschaften zu untersuchen. Zwar sind alle CYP102A-Enzyme Fettsäurehydroxylasen, ihr Substratspektrum umfasst teilweise jedoch noch andere Stoffgruppen. CYP102A1 katalysiert auch die Oxidation von Homoserinlacton [194]. Ein weiteres Enzym der CYP102A-Familie, SYK181 aus einem Bodenbakterium, oxidiert neben Fettsäuren auch polyzyklische Aromaten [195]. Das Substratspektrum von CYP102A2 und CYP102A3 beschränkt sich jedoch streng auf Fettsäuren. CYP102A7 wurde in einer vorangegangenen Diplomarbeit aus *Bacillus licheniformis* kloniert, um

eine weitere Monooxygenase für die biotechnologische Anwendung zu erschließen [164].

Die heterologe Proteinexpression fand im Schüttelkolbenmaßstab unter Verwendung eines *E. coli* BL21(DE3) / pET28(a+)-Systems statt. Die mit diesem System erreichten Proteinausbeuten lagen bei 48 mg l^{-1} und somit etwa um den Faktor 3 niedriger, als mit CYP102A1 erreichte Proteinausbeuten [196].

Fettsäuren werden durch CYP102A7 hauptsächlich in ω -2-Position hydroxyliert. Das Hydroxylierungsmuster macht das Enzym für die Synthese von Polyestern interessant.

CYP102A7 eignet sich jedoch nicht zwangsläufig als Ausgangsenzym für die Entwicklung einer γ - oder δ -Hydroxylase.

Die unterschiedlichen Substratspezifitäten und Regioselektivitäten für die Oxidation von Fettsäuren mit Enzymen der CYP102A-Familie liegen wahrscheinlich in der unterschiedlichen Architektur des aktiven Zentrums begründet. Wie CYP102A1, CYP102A2 und CYP102A3 akzeptiert CYP102A7 auch methylverzweigte Fettsäuren als Substrate. Analog zu CYP102A2 wird das tertiäre Kohlenstoffatom des Substrats deutlich schlechter als das sekundäre Kohlenstoffatom hydroxyliert. 13-Methylmyristinsäure wird selektiv oxidiert, über 90% der Hydroxylierung erfolgt in ω -2-Position.

CYP102A7 akzeptiert neben Fettsäuren noch andere Substrate wie zum Beispiel Terpenoide, was das Enzym als möglichen Kandidat für den biotechnologischen Einsatz attraktiv erscheinen lässt. Am Beispiel von (*R*)-(+)- und (*S*)-(-)-Limonen zeigt sich, dass die Oxidation unselektiv erfolgt. Die Umsetzung von Limonen mit CYP102A7 resultiert in sechs verschiedenen Produkten, wobei die Produktverteilung abhängig von den verwendeten Stereoisomeren ist. Durch Protein-Design könnte versucht werden die Selektivität des Biokatalysators zu erhöhen.

Bioinformatische Modelle legen den Schluss nahe, dass der zur Verfügung stehende Raum über dem Häm für CYP102A1 kleiner ist als der für CYP102A7. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass zyklische Verbindungen besser von CYP102A7 umgesetzt werden.

In Gegenwart des polaren Lösungsvermittlers DMSO zeigt CYP102A7 hohe Aktivität. Bei einem Anteil von 26% DMSO ist CYP102A7 noch zu 50% aktiv, wohingegen CYP102A1 schon bei 15% vollständig inaktiviert ist. Die Stabilität gegenüber Lösungsvermittlern ist besonders interessant für die Entwicklung von Prozessen mit

hydrophoben Substraten, da somit die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Substrate erhöht wird. Die Temperatur, bei der nach 30 minütiger Inkubation 50%ige Inaktivierung eintritt (T_{50}), liegt mit 42,5 °C über der von CYP102A3 ($T_{50}=35$ °C), aber unter der von CYP102A1 und CYP102A2 ($T_{50}=49$ °C und $T_{50}=46$ °C) [62, 166]. Die Halbwertszeit der Prozessstabilität lag mit 100 min niedriger als mit CYP102A2 [62]. Die katalytischen Konstanten für den Elektronentransfer liegen jedoch im Rahmen derer bereits für andere CYP102A-Familienmitgliedern publizierten Werten [64].

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte das Produktspektrum von CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* durch rationales Protein-Design zur γ - und δ -Position verschoben werden. Die entwickelten Biokatalysatoren bilden die Grundlage für die Entwicklung von Prozessen zur Synthese von Fruchtaromen, wie z. B. γ - und δ -Dodecalacton. Nach einer Vergrößerung des Reaktionsansatzes, begleitet von Prozessoptimierung wird sich zeigen, ob die Produkte ökonomisch gewonnen werden können. Im Rahmen einer Kooperation werden die erzeugten Mutanten mittels Elektrokatalyse umgesetzt werden, wodurch auf den teuren Cofaktor NADPH verzichtet werden kann. Maurer et al. veränderten die Cofaktorpräferenz von CYP102A1 von NADPH zu NADH, um eine Verringerung der Prozesskosten zu erzielen [102]. Der Vorteil bei der Verwendung von NADH liegt in seinem geringeren Preis und der höheren Stabilität im Vergleich zu NADPH [197]. Weitere Verringerungen der Prozesskosten lassen sich durch die Verwendung kostengünstiger biomimetischer Cofektoranaloga erreichen. Ryan et al. haben die Verwendung von N-benzyl-1-4-dihyronicotinamid anstelle von NADH in NADH-abhängigen CYP102A1-Mutanten untersucht. Die Aktivität der Doppelmutante R966D W1046S war vergleichbar mit der Aktivität in Anwesenheit von NADPH und betrug ca. 70% der Aktivität mit NADH [198].

In der Arbeit konnten darüber hinaus das Arsenal der biotechnologisch nutzbaren CYP102A-Enzyme vergrößert werden. Mit CYP102A7 wurde eine Monooxygenase gefunden, die Terpenoide (β -Ionon, Limonen, Geranylaceton, Nerylaceton) umsetzt. Mit diesem Enzym wird der Einstieg in neue Stoffströme und somit neuer Wertschöpfungsketten ermöglicht.

Für CYP152A1 war es möglich die Regioselektivität in Richtung der α -Position zu verschieben. Eine Verschiebung der Regioselektivität in Richtung γ - und δ -Position

steht noch aus. Das Enzym bietet sich auch für die Etablierung eines elektrokatalytischen Prozesses an, da physiologische Redoxpartner des Enzyms nicht bekannt sind und das Enzym in Abhängigkeit von Wasserstoffperoxid aktiv ist.

5 Literaturverzeichnis

1. Munro, A.W., Girvan, H.M., McLean, K.J., *Variations on a (t)heme--novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(3): 585-609.
2. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R., *Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1770**(3): 330-344.
3. Munro, A.W., Girvan, H.M., McLean, K.J., *Cytochrome P450--redox partner fusion enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1770**(3): 345-359.
4. Girvan, H.M., Waltham, T.N., Neeli, R., Collins, H.F., McLean, K.J., Scrutton, N.S., Leys, D., Munro, A.W., *Flavocytochrome P450 BM3 and the origin of CYP102 fusion species*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): 1173-1177.
5. Matsunaga, I., Ueda, A., Fujiwara, N., Sumimoto, T., Ichihara, K., *Characterization of the ybdT gene product of Bacillus subtilis: novel fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450*. Lipids, 1999. **34**(8): 841-846.
6. Girhard, M., Schuster, S., Dietrich, M., Durre, P., Urlacher, V.B., *Cytochrome P450 monooxygenase from Clostridium acetobutylicum: a new alpha-fatty acid hydroxylase*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(1): 114-119.
7. McKinsey&Company, *Industrial Biotechnology (www.mckinsey.com)*. 2003.
8. Antranikian, G., Heiden, S., *Weiße Biotechnologie: Status quo und Zukunft*. Nachrichten aus der Chemie, 2006. **54**(12): 1202-1206.
9. Bott, M., Buchholz, S., Daußmann, T., Flaschel, E., Karos, M., Liese, A., Renken, E., Reuss, M., Scriba, A., Sell, D., Syldatk, C., Takors, R., Ulber, R., Zinke, H., *Positionspapier der Dechema e. V. : Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland*. 2004.
10. Blaser, H., Schmidt, E., *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale - Challenges, Approaches and Solutions*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH.
11. Schrader, J., Etschmann, M.M., Sell, D., Hilmer, J.M., Rabenhorst, J., *Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds--current industrial processes and future prospects*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(6): 463-472.
12. Gatfield, I., Güntert, M., Sommer, H., Werkhoff, P., *Some aspects of microbial manufacture of flavor active lactones with particular reference to gamma-decalactone*. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1993. **15**: 165-170.
13. Rabenhorst, J., Gatfield, I., *Method of producing gamma-decalactone*. 2000.
14. Chappell, J., *Valencene synthase--a biochemical magician and harbinger of transgenic aromas*. Trends Plant Sci, 2004. **9**(6): 266-269.
15. Sharon-Asa, L., Shalit, M., Frydman, A., Bar, E., Holland, D., Or, E., Lavi, U., Lewinsohn, E., Eyal, Y., *Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of Cstps1, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene*. Plant J, 2003. **36**(5): 664-674.
16. Sakamoto, T., Murata, N., *Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(2): 208-210.
17. Los, D.A., Murata, N., *Structure and expression of fatty acid desaturases*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1394**(1): 3-15.

18. Schneider, S., Wubbolts, M.G., Sanglard, D., Witholt, B., *Biocatalyst engineering by assembly of fatty acid transport and oxidation activities for In vivo application of cytochrome P-450BM-3 monooxygenase*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): 3784-3790.
19. Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J., *Hydrolases in Organic Synthesis Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 1999, Weinheim: Wiley-VCH.
20. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*. 2000, Berlin: Springer.
21. Patel, R.N., *Stereoselective Biotransformations*. 2000, New York: Marcel Dekker.
22. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*. 2000, Weinheim: Wiley-VCH.
23. Degtyarenko, K.N., Archakov, A.I., *Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems*. FEBS Lett, 1993. **332**(1-2): 1-8.
24. Omura, T., Sato, R., *Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes .I. Evidence for Its Hemoprotein Nature*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**(7): 2370-2378.
25. Lewis, D.F., *Cytochromes P450 Structure, Function and Mechanism*. 1996, London: Taylor and Francis.
26. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., et al., *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature*. DNA Cell Biol, 1993. **12**(1): 1-51.
27. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W., *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics, 1996. **6**(1): 1-42.
28. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J., *High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam*. J Mol Biol, 1987. **195**(3): 687-700.
29. Ravichandran, K.G., Boddupalli, S.S., Hasermann, C.A., Peterson, J.A., Deisenhofer, J., *Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's*. Science, 1993. **261**(5122): 731-736.
30. Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., *Cytochromes P450: a success story*. Genome Biol, 2000. **1**(6): REVIEWS3003.
31. Gotoh, O., *Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): 83-90.
32. Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I., *Structure and chemistry of cytochrome P450*. Chem Rev, 2005. **105**(6): 2253-2277.
33. Groves, J.T., McClusky, G.A., *Aliphatic hydroxylation via oxygen rebound. Oxygen transfer catalyted by iron*. J. Am. Chem. Soc, 1976. **98**: 859-861
34. Karuzina, II, Archakov, A.I., *Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions*. Free Radic Biol Med, 1994. **17**(6): 557-567.
35. Karuzina, II, Archakov, A.I., *The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(1): 73-97.

36. Berg, D., Plempel, M., Buchel, K.H., Holmwood, G., Stroech, K., *Sterol biosynthesis inhibitors. Secondary effects and enhanced in vivo efficacy*. Ann N Y Acad Sci, 1988. **544**: 338-347.
37. Feyereisen, R., *Insect P450 enzymes*. Annu Rev Entomol, 1999. **44**: 507-533.
38. Holton, T.A., *Modification of flower colour via manipulation of P450 gene expression in transgenic plants*. Drug Metabol Drug Interact, 1995. **12**(3-4): 359-368.
39. Hollenberg, P.F., *Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism*. Faseb J, 1992. **6**(2): 686-694.
40. Cryle, M.J., Stok, J.E., De Voss, J.J., *Reactions catalyzed by bacterial cytochromes P450*. Australian Journal of Chemistry, 2003. **56**(8): 749-762.
41. Miners, J.O., *Evolution of drug metabolism: Hitchhiking the technology bandwagon*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2002. **29**(11): 1040-1044.
42. Cryle, M.J., Matovic, N.J., De Voss, J.J., *Products of cytochrome P450(Biol) (CYP107H1)-catalyzed oxidation of fatty acids*. Org Lett, 2003. **5**(18): 3341-3344.
43. Kelly, S.L., Kelly, D.E., Jackson, C.J., Warrilow, A.G.S., Lamb, D.C., *The Diversity and Importance of Microbial Cytochromes P450*, in *Cytochrome P450*, P.R. Ortiz de Montellano, Editor. 2005, Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York.
44. Mendes, M.V., Anton, N., Martin, J.F., Aparicio, J.F., *Characterization of the polyene macrolide P450 epoxidase from Streptomyces natalensis that converts de-epoxypimaricin into pimaricin*. Biochem J, 2005. **386**(Pt 1): 57-62.
45. Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blocker, H., Hofle, G., Muller, R., *The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase*. J Biol Chem, 2002. **277**(15): 13082-13090.
46. Taylor, M., Lamb, D.C., Cannell, R., Dawson, M., Kelly, S.L., *Cytochrome P450105D1 (CYP105D1) from Streptomyces griseus: heterologous expression, activity, and activation effects of multiple xenobiotics*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): 838-842.
47. McLean, M.A., Maves, S.A., Weiss, K.E., Krepich, S., Sligar, S.G., *Characterization of a cytochrome P450 from the acidothermophilic archaea Sulfolobus solfataricus*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(1): 166-172.
48. Puchkaev, A.V., Koo, L.S., Ortiz de Montellano, P.R., *Aromatic stacking as a determinant of the thermal stability of CYP119 from Sulfolobus solfataricus*. Arch Biochem Biophys, 2003. **409**(1): 52-58.
49. Guengerich, F.P., *Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(6): 611-650.
50. Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., Dawson, J.H., *Heme-Containing Oxygenases*. Chem Rev, 1996. **96**(7): 2841-2888.
51. Miura, Y., Fulco, A.J., *(Omega -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from bacillus megaterium*. J Biol Chem, 1974. **249**(6): 1880-1888.
52. Matson, R.S., Stein, R.A., Fulco, A.J., *Hydroxylation of 9-hydroxystearate by a soluble cytochrome P-450 dependent fatty acid hydroxylase from Bacillus megaterium*. Biochem Biophys Res Commun, 1980. **97**(3): 955-961.

53. Ruettinger, R.T., Fulco, A.J., *Epoxidation of unsaturated fatty acids by a soluble cytochrome P-450-dependent system from Bacillus megaterium*. J Biol Chem, 1981. **256**(11): 5728-5734.
54. Narhi, L.O., Wen, L.P., Fulco, A.J., *Characterization of the protein expressed in Escherichia coli by a recombinant plasmid containing the Bacillus megaterium cytochrome P-450BM-3 gene*. Mol Cell Biochem, 1988. **79**(1): 63-71.
55. Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J.A., Falck, J.R., Wei, S., Helvig, C., Capdevila, J.H., *An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S,15R)-arachidonic acid epoxygenase*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): 1127-1135.
56. Munro, A.W., Daff, S., Coggins, J.R., Lindsay, J.G., Chapman, S.K., *Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains*. Eur J Biochem, 1996. **239**(2): 403-409.
57. Roitel, O., Scrutton, N.S., Munro, A.W., *Electron transfer in flavocytochrome P450 BM3: kinetics of flavin reduction and oxidation, the role of cysteine 999, and relationships with mammalian cytochrome P450 reductase*. Biochemistry, 2003. **42**(36): 10809-10821.
58. Ost, T.W., Miles, C.S., Murdoch, J., Cheung, Y., Reid, G.A., Chapman, S.K., Munro, A.W., *Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3*. FEBS Lett, 2000. **486**(2): 173-177.
59. Haines, D.C., *A role for the strained phenylalanine ring rotation induced by substrate binding to cytochrome CYP102A1*. Protein Pept Lett, 2006. **13**(10): 977-980.
60. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., et al., *The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis*. Nature, 1997. **390**(6657): 249-256.
61. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., Wattiez, R., *Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): 385-410.
62. Budde, M., Maurer, S.C., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., *Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from Bacillus subtilis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **66**(2): 180-186.
63. Chowdhary, P.K., Alemseghed, M., Haines, D.C., *Cloning, expression and characterization of a fast self-sufficient P450: CYP102A5 from Bacillus cereus*. Arch Biochem Biophys, 2007. **468**(1): 32-43.
64. Gustafsson, M.C., Roitel, O., Marshall, K.R., Noble, M.A., Chapman, S.K., Pessequeiro, A., Fulco, A.J., Cheesman, M.R., von Wachenfeldt, C., Munro, A.W., *Expression, purification, and characterization of Bacillus subtilis cytochromes P450 CYP102A2 and CYP102A3: flavocytochrome homologues of P450 BM3 from Bacillus megaterium*. Biochemistry, 2004. **43**(18): 5474-5487.
65. Lentz, O., Urlacher, V., Schmid, R.D., *Substrate specificity of native and mutated cytochrome P450 (CYP102A3) from Bacillus subtilis*. J Biotechnol, 2004. **108**(1): 41-49.

66. Noble, M.A., Miles, C.S., Chapman, S.K., Lysek, D.A., MacKay, A.C., Reid, G.A., Hanzlik, R.P., Munro, A.W., *Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3*. *Biochem J*, 1999. **339 (Pt 2)**: 371-379.
67. Li, Q.S., Ogawa, J., Schmid, R.D., Shimizu, S., *Residue size at position 87 of cytochrome P450 BM-3 determines its stereoselectivity in propylbenzene and 3-chlorostyrene oxidation*. *FEBS Lett*, 2001. **508(2)**: 249-252.
68. Munro, A.W., Malarkey, K., McKnight, J., Thomson, A.J., Kelly, S.M., Price, N.C., Lindsay, J.G., Coggins, J.R., Miles, J.S., *The role of tryptophan 97 of cytochrome P450 BM3 from Bacillus megaterium in catalytic function. Evidence against the 'covalent switching' hypothesis of P-450 electron transfer*. *Biochem J*, 1994. **303 (Pt 2)**: 423-428.
69. Yeom, H., Sligar, S.G., Li, H., Poulos, T.L., Fulco, A.J., *The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450BM-3*. *Biochemistry*, 1995. **34(45)**: 14733-14740.
70. Chen, Z., Ost, T.W., Schelvis, J.P., *Phe393 mutants of cytochrome P450 BM3 with modified heme redox potentials have altered heme vinyl and propionate conformations*. *Biochemistry*, 2004. **43(7)**: 1798-1808.
71. Ost, T.W., Miles, C.S., Munro, A.W., Murdoch, J., Reid, G.A., Chapman, S.K., *Phenylalanine 393 exerts thermodynamic control over the heme of flavocytochrome P450 BM3*. *Biochemistry*, 2001. **40(45)**: 13421-13429.
72. Li, H., Poulos, T.L., *The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid*. *Nat Struct Biol*, 1997. **4(2)**: 140-146.
73. Lee, D.S., Yamada, A., Matsunaga, I., Ichihara, K., Adachi, S., Park, S.Y., Shiro, Y., *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of fatty-acid hydroxylase cytochrome P450BSbeta from Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002. **58(Pt 4)**: 687-689.
74. Boddupalli, S.S., Pramanik, B.C., Slaughter, C.A., Estabrook, R.W., Peterson, J.A., *Fatty acid monooxygenation by P450BM-3: product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions*. *Arch Biochem Biophys*, 1992. **292(1)**: 20-28.
75. Sawamura, A., Kusunose, E., Satouchi, K., Kusunose, M., *Catalytic properties of rabbit kidney fatty acid omega-hydroxylase cytochrome P-450ka2 (CYP4A7)*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1168(1)**: 30-36.
76. Matsunaga, I., Yokotani, N., Gotoh, O., Kusunose, E., Yamada, M., Ichihara, K., *Molecular cloning and expression of fatty acid alpha-hydroxylase from Sphingomonas paucimobilis*. *J Biol Chem*, 1997. **272(38)**: 23592-23596.
77. Lee, D.S., Yamada, A., Sugimoto, H., Matsunaga, I., Ogura, H., Ichihara, K., Adachi, S., Park, S.Y., Shiro, Y., *Substrate recognition and molecular mechanism of fatty acid hydroxylation by cytochrome P450 from Bacillus subtilis. Crystallographic, spectroscopic, and mutational studies*. *J Biol Chem*, 2003. **278(11)**: 9761-9767.
78. Cirino, P.C., Arnold, F.H., *Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant F87A in reactions driven by hydrogen peroxide*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2002. **344(9)**: 932-937.
79. Hazzard, J.T., Govindaraj, S., Poulos, T.L., Tollin, G., *Electron transfer between the FMN and heme domains of cytochrome P450BM-3. Effects of substrate and CO*. *J Biol Chem*, 1997. **272(12)**: 7922-7926.

80. Schenkman, J.B., Sligar, S.G., Cinti, D.L., *Substrate interaction with cytochrome P450*. Pharmacology and Therapeutics, 1981. **12**: 43-71.
81. Gibson, G.G., Skett, P., *Introduction to Drug Metabolism*. 1994, London: Chapman & Hall.
82. Hildebrandt, P., Heibel, G., Anzenbacher, P., Lange, R., Kruger, V., Stier, A., *Conformational analysis of mitochondrial and microsomal cytochrome P-450 by resonance Raman spectroscopy*. Biochemistry, 1994. **33**(43): 12920-12929.
83. Lewis, D.F., *Physical methods in the study of the active site geometry of cytochromes P-450*. Drug Metab Rev, 1986. **17**(1-2): 1-66.
84. Champion, P.M., Stallard, B.R., Wagner, G.C., Gunsalus, I.C., *Resonance Raman detection of an Fe-S bond in cytochrome P450cam*. Journal of the American Chemical Society, 1982. **104**: 5469-5473.
85. Egawa, T., Ogura, T., Makino, R., Ishimura, Y., Kitagawa, T., *Observation of the O-O stretching Raman band for cytochrome P-450cam under catalytic conditions*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): 10246-10248.
86. Dawson, J.H., Andersson, L.A., Sono, M., *Spectroscopic investigations of ferric cytochrome P-450-CAM ligand complexes. Identification of the ligand trans to cysteinate in the native enzyme*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): 3606-3617.
87. Porter, T.D., Coon, M.J., *Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms*. J Biol Chem, 1991. **266**(21): 13469-13472.
88. Sevrioukova, I.F., Garcia, C., Li, H., Bhaskar, B., Poulos, T.L., *Crystal structure of putidaredoxin, the [2Fe-2S] component of the P450cam monooxygenase system from Pseudomonas putida*. J Mol Biol, 2003. **333**(2): 377-392.
89. Sevrioukova, I.F., Li, H., Poulos, T.L., *Crystal structure of putidaredoxin reductase from Pseudomonas putida, the final structural component of the cytochrome P450cam monooxygenase*. J Mol Biol, 2004. **336**(4): 889-902.
90. Hasler, J.A., Estabrook, R.W., Murray, M., Pikuleva, M., Waterman, M.R., Capdevila, J.H., Holla, V., Helvig, C., Falck, J.R., Farrell, G., *Human Cytochromes P450*. Mol. Aspects. Med., 1999. **20**(1999): 1-137.
91. Porter, T.D., *The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions*. J Biochem Mol Toxicol, 2002. **16**(6): 311-316.
92. Rylott, E.L., Jackson, R.G., Edwards, J., Womack, G.L., Seth-Smith, H.M., Rathbone, D.A., Strand, S.E., Bruce, N.C., *An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(2): 216-219.
93. Warman, A.J., Roitel, O., Neeli, R., Girvan, H.M., Seward, H.E., Murray, S.A., McLean, K.J., Joyce, M.G., Toogood, H., Holt, R.A., Leys, D., Scrutton, N.S., Munro, A.W., *Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 4): 747-753.
94. Nakayama, N., Takemae, A., Shoun, H., *Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus Fusarium oxysporum*. J Biochem, 1996. **119**(3): 435-440.
95. Petzoldt, K., *Process for the production of 11-beta-hydroxy steroids*, B. Schering Aktiengesellschaft, Editor: Germany.
96. Hogg, J.A., *Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation*. Steroids, 1992. **57**(12): 593-616.

97. Schewe, H., Kaup, B.A., Schrader, J., *Improvement of P450(BM-3) whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in E. coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **78**(1): 55-65.
98. van Beilen, J.B., Duetz, W.A., Schmid, A., Witholt, B., *Practical issues in the application of oxygenases*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(4): 170-177.
99. Urlacher, V.B., Eiben, S., *Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(7): 324-330.
100. Holtmann, D., Schrader, J., *Approaches to Recycling and Substituting NAD(P)H as a CYP Cofactor in Modern Biooxidation*, R. Schmid and V. Urlacher, Editors. 2007, Wiley-VCH: Weinheim.
101. Gutierrez, A., Doehr, O., Paine, M., Wolf, C.R., Scrutton, N.S., Roberts, G.C., *Trp-676 facilitates nicotinamide coenzyme exchange in the reductive half-reaction of human cytochrome P450 reductase: properties of the soluble W676H and W676A mutant reductases*. Biochemistry, 2000. **39**(51): 15990-15999.
102. Maurer, S.C., Kuhnel, K., Kaysser, L.A., Eiben, S., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., *Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2005. **347**(7-8): 1090-1098.
103. Cirino, P.C., Arnold, F.H., *A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(28): 3299-3301.
104. Joo, H., Lin, Z., Arnold, F.H., *Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation*. Nature, 1999. **399**(6737): 670-673.
105. Otey, C.R., Silberg, J.J., Voigt, C.A., Endelman, J.B., Bandara, G., Arnold, F.H., *Functional evolution and structural conservation in chimeric cytochromes p450: calibrating a structure-guided approach*. Chem Biol, 2004. **11**(3): 309-318.
106. Kazlauskaitė, J., Hill, H.A., Wilkins, P.C., Dalton, H., *Direct electrochemistry of the hydroxylase of soluble methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath)*. Eur J Biochem, 1996. **241**(2): 552-556.
107. Schwaneberg, U., Appel, D., Schmitt, J., Schmid, R.D., *P450 in biotechnology: zinc driven omega-hydroxylation of p-nitrophenoxydodecanoic acid using P450 BM-3 F87A as a catalyst*. J Biotechnol, 2000. **84**(3): 249-257.
108. Bornscheuer, U.T., Pohl, M., *Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(2): 137-143.
109. Eiben, S., Kaysser, L., Maurer, S., Kuhnel, K., Urlacher, V.B., Schmid, R.D., *Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases -- a critical appraisal*. J Biotechnol, 2006. **124**(4): 662-669.
110. van Den Heuvel, R.H., Fraaije, M.W., Ferrer, M., Mattevi, A., van Berkel, W.J., *Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): 9455-9460.
111. Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R.D., Pleiss, J., *Blocking the tunnel: engineering of Candida rugosa lipase mutants with short chain length specificity*. Protein Eng, 2002. **15**(7): 595-601.
112. Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., Gaillardin, C., *Probing structural determinants specifying high thermostability in Bacillus licheniformis alpha-amylase*. J Mol Biol, 2000. **301**(4): 1041-1057.
113. Igarashi, K., Ozawa, T., Ikawakitayama, K., Hayashi, Y., Araki, H., Endo, K., Hagihara, H., Ozaki, K., Kawai, S., Ito, S., *Thermostabilization by proline*

- substitution in an alkaline, liquefying alpha-amylase from Bacillus sp. strain KSM-1378. Biosci Biotechnol Biochem, 1999. 63(9): 1535-1540.*
114. Bryan, P.N., *Protein engineering of subtilisin*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1543**(2): 203-222.
115. Pohl, M., *Optimierung von Biokatalysatoren für technische Prozesse*. Chem Ing Technik, 2000. **72**: 883-885
116. Harford-Cross, C.F., Carmichael, A.B., Allan, F.K., England, P.A., Rouch, D.A., Wong, L.L., *Protein engineering of cytochrome p450(cam) (CYP101) for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Protein Eng, 2000. **13**(2): 121-128.
117. Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., Gershenson, A., *How enzymes adapt: lessons from directed evolution*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(2): 100-106.
118. Horsman, G.P., Liu, A.M., Henke, E., Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J., *Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of Pseudomonas fluorescens esterase towards methyl 3bromo-2-methylpropanoate and ethyl 3phenylbutyrate*. Chemistry, 2003. **9**(9): 1933-1939.
119. Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., Jaeger, K.E., *Directed evolution of an enantioselective lipase*. Chem Biol, 2000. **7**(9): 709-718.
120. Williams, G.J., Nelson, A.S., Berry, A., *Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(24): 3034-3046.
121. Valetti, F., Gilardi, G., *Directed evolution of enzymes for product chemistry*. Nat Prod Rep, 2004. **21**(4): 490-511.
122. Stemmer, W.P., *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): 10747-10751.
123. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., Arnold, F.H., *Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(3): 258-261.
124. Ness, J.E., Kim, S., Gottman, A., Pak, R., Krebber, A., Borchert, T.V., Govindarajan, S., Mundorff, E.C., Minshull, J., *Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(12): 1251-1255.
125. Reetz, M.T., Carballeira, J.D., Peyralans, J., Hobenreich, H., Maichele, A., Vogel, A., *Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing*. Chemistry, 2006. **12**(23): 6031-6038.
126. Kauffmann, I., Schmidt-Dannert, C., *Conversion of Bacillus thermocatenulatus lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design*. Protein Eng, 2001. **14**(11): 919-928.
127. Eom, G.T., Song, J.K., Ahn, J.H., Seo, Y.S., Rhee, J.S., *Enhancement of the efficiency of secretion of heterologous lipase in Escherichia coli by directed evolution of the ABC transporter system*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(7): 3468-3474.
128. Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.H., Schmid, R.D., *Directed evolution of a bacterial alpha-amylase: toward enhanced pH-performance and higher specific activity*. Protein Sci, 2003. **12**(10): 2141-2149.

129. Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U., Schmid, R.D., *Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from Bacillus thermocatenulatus*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1214**(1): 43-53.
130. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., Schmid, R.D., *A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A*. Anal Biochem, 1999. **269**(2): 359-366.
131. You, L., Arnold, F.H., *Directed evolution of subtilisin E in Bacillus subtilis to enhance total activity in aqueous dimethylformamide*. Protein Eng, 1996. **9**(1): 77-83.
132. Reetz, M.T., *An overview of high-throughput screening systems for enantioselective enzymatic transformations*. Methods Mol Biol, 2003. **230**: 259-282.
133. Glieder, A., Meinhold, P., *High-throughput screens based on NAD(P)H depletion*. Methods Mol Biol, 2003. **230**: 157-170.
134. Farinas, E.T., Schwaneberg, U., Glieder, A., Arnold, F.H., *Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2001. **343**(6-7): 601-606.
135. Meinhold, P., Peters, M.W., Hartwick, A., Hernandez, A.R., Arnold, F.H., *Engineering cytochrome P450BM3 for terminal alkane hydroxylation*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2006. **348**(6): 763-772.
136. Lentz, O., Feenstra, A., Habicher, T., Hauer, B., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., *Altering the regioselectivity of cytochrome P450 CYP102A3 of Bacillus subtilis by using a new versatile assay system*. Chembiochem, 2006. **7**(2): 345-350.
137. Alcalde, M., Farinas, E.T., Arnold, F.H., *Colorimetric high-throughput assay for alkene epoxidation catalyzed by cytochrome P450 BM-3 variant 139-3*. J Biomol Screen, 2004. **9**(2): 141-146.
138. Chen, G.F., Inouye, M., *Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the Escherichia coli genes*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(6): 1465-1473.
139. Looman, A.C., Bodlaender, J., Comstock, L.J., Eaton, D., Jhurani, P., de Boer, H.A., van Knippenberg, P.H., *Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in Escherichia coli*. Embo J, 1987. **6**(8): 2489-2492.
140. Gillam, E.M., Guo, Z., Guengerich, F.P., *Expression of modified human cytochrome P450 2E1 in Escherichia coli, purification, and spectral and catalytic properties*. Arch Biochem Biophys, 1994. **312**(1): 59-66.
141. Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, P., Schmid, R.D., *Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst*. Chemistry, 2000. **6**(9): 1531-1536.
142. Meinhold, P., Peters, M.W., Chen, M.M., Takahashi, K., Arnold, F.H., *Direct conversion of ethane to ethanol by engineered cytochrome P450 BM3*. Chembiochem, 2005. **6**(10): 1765-1768.
143. Fisher, C.W., Shet, M.S., Caudle, D.L., Martin-Wixtrom, C.A., Estabrook, R.W., *High-level expression in Escherichia coli of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): 10817-10821.

144. Shet, M.S., Fisher, C.W., Holmans, P.L., Estabrook, R.W., *Human cytochrome P450 3A4: enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): 11748-11752.
145. Wong, T.S., Arnold, F.H., Schwaneberg, U., *Laboratory evolution of cytochrome p450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents*. Biotechnol Bioeng, 2004. **85**(3): 351-358.
146. Kumar, S., Sun, L., Liu, H., Muralidhara, B.K., Halpert, J.R., *Engineering mammalian cytochrome P450 2B1 by directed evolution for enhanced catalytic tolerance to temperature and dimethyl sulfoxide*. Protein Eng Des Sel, 2006. **19**(12): 547-554.
147. Sambrook, J., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.* . 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.; Auflage: 3rd Labmn (Januar 2001). 2100.
148. Titomirov, A.V., Sukharev, S., Kistanova, E., *In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1088**(1): 131-134.
149. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): 487-491.
150. Cadwell, R.C., Joyce, G.F., *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. PCR Methods Appl, 1992. **2**(1): 28-33.
151. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4*. Nature, 1970. **227**(5259): 680-&.
152. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., *Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation*. Nature, 1975. **258**(5536): 598-599.
153. Appel, D., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schwaneberg, U., Schmid, R.D., *A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes*. J Biotechnol, 2001. **88**(2): 167-171.
154. Urlacher, V.B., Makhsumkhanov, A., Schmid, R.D., *Biotransformation of beta-ionone by engineered cytochrome P450 BM-3*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **70**(1): 53-59.
155. Koschorreck, M., *Design und Charakterisierung einer chimären P450-Monooxygenase in Institut für Technische Biochemie*. 2005, Universität Stuttgart: Stuttgart. 77.
156. Becker, H.G.O., Habicher, W.D., Beckert, R., Metz, P., Domschke, G., Pavel, D., Fanghänel, E., Schwetlick, K., *Organikum*. Vol. 19. 1993, Heidelberg, Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag.
157. Schwaneberg, U., *Entwicklung eines in vitro Cytochrom P450 CYP102 (BM-3) Enzym-Membran-Reaktors*, in *Institut für Technische Biochemie*. 1999, Universität Stuttgart: Stuttgart. 47f.
158. Chung, G.H., Lee, Y.P., Jeohn, G.H., Yoo, O.J., Rhee, J.S., *Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from Pseudomonas fluorescens SIK W1*. Agric Biol Chem, 1991. **55**(9): 2359-2365.
159. Fuchs, G., *Allgemeine Mikrobiologie*. 2006, Stuttgart: Thieme.
160. Dietrich, M., Eiben, S., Asta, C., Do, A., Pleiss, J., Urlacher, V., *Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450*

- monooxygenase from Bacillus licheniformis* Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **79**(6): 931-940.
161. Matsunaga, I., Ueda, A., Sumimoto, T., Ichihara, K., Ayata, M., Ogura, H., *Site-directed mutagenesis of the putative distal helix of peroxygenase cytochrome P450*. Arch Biochem Biophys, 2001. **394**(1): 45-53.
162. Pflug, S., Richter, S.M., Urlacher, V.B., *Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from Bacillus megaterium in E. coli*. J Biotechnol, 2007. **129**(3): 481-488.
163. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K.H., Ehrenreich, P., Baumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., *The complete genome sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2004. **7**(4): 204-211.
164. Asta, C., *Klonierung, Expression und Charakterisierung von CYP102A7*, in *Institut für Technische Biochemie*. 2005, Universität Stuttgart: Stuttgart.
165. Narhi, L.O., Fulco, A.J., *Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in Bacillus megaterium*. J Biol Chem, 1986. **261**(16): 7160-7169.
166. Eiben, S., Bartelmas, H., Urlacher, V.B., *Construction of a thermostable cytochrome P450 chimera derived from self-sufficient mesophilic parents*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **75**(5): 1055-1061.
167. Kris-Etherton, P.M., *Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease*. Circulation, 1999. **100**(11): 1253-1258.
168. Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rimm, E., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Hennekens, C.H., Willett, W.C., *Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women*. New England Journal of Medicine, 1997. **337**(21): 1491-1499.
169. Solfrizzi, V., Panza, F., Torres, F., Mastroianni, F., Del Parigi, A., Venezia, A., Capurso, A., *High monounsaturated fatty acids intake protects against age-related cognitive decline*. Neurology, 1999. **52**(8): 1563-1569.
170. Kris-Etherton, P.M., Pearson, T.A., Wan, Y., Hargrove, R.L., Moriarty, K., Fishell, V., Etherton, T., *High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations*. American Journal of Clinical Nutrition, 1999. **70**(6): 1009-1015.
171. Vandyk, M.S., Kock, J.L.F., Botha, A., *Hydroxy Long-Chain Fatty-Acids in Fungi*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1994. **10**(5): 495-504.
172. Hill, F.F., Venn, L., Lukas, K.L., *Studies on the Formation of Long-Chain Dicarboxylic-Acids from Pure Normal-Alkanes by a Mutant of Candida-Tropicalis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986. **24**(2): 168-174.
173. Shiio, I., Uchio, R., *Microbial Production of Long-Chain Dicarboxylic-Acids from N-Alkanes .1. Screening and Properties of Microorganisms Producing Dicarboxylic-Acids*. Agricultural and Biological Chemistry, 1971. **35**(13): 2033-&.
174. Uchio, R., Shiio, I., *Microbial Production of Long-Chain Dicarboxylic-Acids from Alkanes .2. Production by Candida-Cloacae Mutant Unable to Assimilate Dicarboxylic-Acid*. Agricultural and Biological Chemistry, 1972. **36**(3): 426-&.
175. Tulloch, A.P., Spencer, J.F.T., Gorin, P.A.J., *Fermentation of Long-Chain Compounds by Torulopsis Magnoliae .1. Structures of Hydroxy Fatty Acids Obtained by Fermentation of Fatty Acids and Hydrocarbons*. Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie, 1962. **40**(7): 1326-&.

176. Villemin, D., Cadiot, P., Kuetegan, M., *A New Synthesis of Omega-Hydroxyalkanoic Acids Via Copper Catalysis*. Synthesis-Stuttgart, 1984(3): 230-231.
177. Voss, G., Gerlach, H., *Ortho Esters with 2,4,10-Trioxadamantane Structure as Carboxyl Protecting Group - Applications in the Synthesis of Substituted Carboxylic-Acids by Means of Grignard-Reagents*. Helvetica Chimica Acta, 1983. **66**(7): 2294-2307.
178. Ortiz de Montellano, P., R., *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. 1995, New York: Plenum Press.
179. Maurer, S.C., Schulze, H., Schmid, R.D., Urlacher, V., *Immobilisation of P450BM-3 and an NADP(+) cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2003. **345**(6-7): 802-810.
180. Appel, D., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schwaneberg, U., Schmid, R.D., *A P450BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes*. Journal of Biotechnology, 2001. **88**(2): 167-171.
181. Li, Q.S., Ogawa, J., Schmid, R.D., Shimizu, S., *Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(12): 5735-5739.
182. Sulistyaningdyah, W.T., Ogawa, J., Li, Q.S., Shinkyo, R., Sakaki, T., Inouye, K., Schmid, R.D., Shimizu, S., *Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by cytochrome P450 BM-3 and its mutant*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(24): 1857-1860.
183. Cowart, L.A., Falck, J.R., Capdevila, J.H., *Structural determinants of active site binding affinity and metabolism by cytochrome P450 BM-3*. Arch Biochem Biophys, 2001. **387**(1): 117-124.
184. Oliver, C.F., Modi, S., Sutcliffe, M.J., Primrose, W.U., Lian, L.Y., Roberts, G.C., *A single mutation in cytochrome P450 BM3 changes substrate orientation in a catalytic intermediate and the regiospecificity of hydroxylation*. Biochemistry, 1997. **36**(7): 1567-1572.
185. Rock, D.A., Boitano, A.E., Wahlstrom, J.L., Rock, D.A., Jones, J.P., *Use of kinetic isotope effects to delineate the role of phenylalanine 87 in P450(BM-3)*. Bioorg Chem, 2002. **30**(2): 107-118.
186. Feenstra, K.A., Starikov, E.B., Urlacher, V.B., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., *Combining substrate dynamics, binding statistics, and energy barriers to rationalize regioselective hydroxylation of octane and lauric acid by CYP102A1 and mutants*. Protein Sci, 2007. **16**(3): 420-431.
187. Budde, M., Morr, M., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., *Selective hydroxylation of highly branched fatty acids and their derivatives by CYP102A1 from Bacillus megaterium*. Chembiochem, 2006. **7**(5): 789-794.
188. Capdevila, J.H., Wei, S., Helvig, C., Falck, J.R., Belosludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S.E., Peterson, J.A., *The highly stereoselective oxidation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450BM-3*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): 22663-22671.
189. Lentz, O., Qing-Shang, L.I., Schwaneberg, U., Lutz-Wahl, S., Fischer, P., Schmid, R.D., *Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450BM-3 from Bacillus megaterium by directed evolution: A validated assay*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2001. **15**(4-6): 123-133.

190. Li, Q.S., Schwaneberg, U., Fischer, M., Schmitt, J., Pleiss, J., Lutz-Wahl, S., Schmid, R.D., *Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1545**(1-2): 114-121.
191. Salazar, O., Cirino, P.C., Arnold, F.H., *Thermostabilization of a cytochrome p450 peroxxygenase*. *Chembiochem*, 2003. **4**(9): 891-893.
192. Poulos, T.L., *Cytochrome P450*. *Curr Opin Struct Biol*, 1995. **5**(6): 767-774.
193. Murataliev, M.B., Trinh, L.N., Moser, L.V., Bates, R.B., Feyereisen, R., Walker, F.A., *Chimeragenesis of the fatty acid binding site of cytochrome P450BM3. Replacement of residues 73-84 with the homologous residues from the insect cytochrome P450 CYP4C7*. *Biochemistry*, 2004. **43**(7): 1771-1780.
194. Chowdhary, P., Keshavan, N., Nguyen, H., Peterson, J., Gonzalez, J., Haines, D., *Bacillus megaterium CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines* *Biochemistry*, 2007. **46** (50): 14429 -14437.
195. Kim, B.S., Kim, S.Y., Park, J., Park, W., Hwang, K.Y., Yoon, Y.J., Oh, W.K., Kim, B.Y., Ahn, J.S., *Sequence-based screening for self-sufficient P450 monooxygenase from a metagenome library*. *J Appl Microbiol*, 2007. **102**(5): 1392-1400.
196. Maurer, S.C., *Oxidationsreaktionen mittels der Cytochrom P450-Monooxygenase CYP102A1 in Enzymreaktionen*, in *Institut für Technische Biochemie*. 2006, Universität Stuttgart: Stuttgart.
197. Wu, J.T., Wu, L.H., Knight, J.A., *Stability of Nadph - Effect of Various Factors on the Kinetics of Degradation*. *Clinical Chemistry*, 1986. **32**(2): 314-319.
198. Ryan, J.D., Fish, R.H., Clark, D., *Engineering Cytochrome P450 Enzymes for Improved Activity Towards Biomimetic 1,4-NADH Cofactors*. 2008, Department of Chemical Engineering, University of California, Berkeley: Berkeley. 1-7.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Dietrich
Vorname: Matthias
Geburtsdatum: 23.04.1978
Geburtsort: Karlsruhe, Deutschland
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulischer Werdegang

1984 -1988 Johannes-Kepler Grundschule, Keltern
1988 - 1997 Gymnasium Karlsbad, Karlsbad-Langensteinbach

Zivildienst

1997 – 1998 Schule für Körperbehinderte, Karlsbad-Langensteinbach,
Betreuung, pflegerische Tätigkeiten

Akademische Ausbildung

1998 – 2003 Studium Technische Biologie, Universität Stuttgart, Stuttgart
Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie der
Universität Stuttgart mit dem Titel „ Heterologe Coexpression
von CYP2D6 und CPR in *Pichia pastoris*.“
2004 – 2008 Promotionsstudium am Institut für Technische Biochemie,
Universität Stuttgart, Stuttgart
2007 März bis September Forschungsaufenthalt am College for
Life Science and Pharmacy, Nanjing University of
Technology, Nanjing, VR China