

Untersuchung verschiedener Ein- und Dreikomponenten-P450-Systeme für die Anwendung in der Biokatalyse

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Master of Science (M. Sc.), Biotechnology

Alan Mertens

aus Aachen

Berichter: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. Anett Schallmey
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ulrich Schwaneberg

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2015

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Für Leonie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit betätige ich, dass die vorliegende Arbeit eigenhändig erstellt und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel zurate gezogen wurden, dass alle Abschnitte der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche gekennzeichnet sind. Zudem versichere ich, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner Prüfungsbehörde eingereicht wurde.

Aachen, den

Alan Mertens

Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Anett Schallmey für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die vielen wertvollen fachlichen Hinweise, ihre Zeit und die jährlichen Adventskalender.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg, der sich als Zweitgutachter meiner Dissertation zur Verfügung stellte und mir die Möglichkeit gab, am Lehrstuhl zu bleiben, als sich meine eigentliche Arbeitsgruppe auflöste.

Ich danke darüber hinaus dem dritten Mitglied meines Promotionskomitees, Prof. Dr. Andreas Schäffer und dem Vorsitzenden meines Promotionskomitees, Prof. Dr. Lothar Elling.

Ohne gute Kollegen geht man nicht gerne zur Arbeit und daher danke ich den Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe Biokatalyse: Dr. Paula Bracco, Dr. Sebastian Hofzumahaus, Julia Koopmeiners, Dr. Pere Picart und Shiva Saraeian. Dabei sind JuKoo und Pau hervorzuheben aufgrund ihrer großen Hilfe bei Fragen zur Analytik (Muchas gracias, chicas!).

Hiermit bedanke ich mich bei meinen Studenten Sarah Dedisch, Meena Reit, Thomas Göttlinger, Florian Jansen, Marie Schöpping, Dennis Warnecke, Ulrich Markel und Hannah Braß für ihren Einsatz und ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

Mein Dank gilt natürlich ebenfalls den restlichen (ehemaligen) Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie, insbesondere Tsvetan Kardashliev, Christian Pitzler und Christian Lehmann, Joëlle Ruff, Alexander Dennig, Josiane Frauenkron-Machedjou, Julia Kinzel und Nina Lülsdorf für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche.

Ich danke des Weiteren Marcus Schallmey sowie Angela Maurer und Nicole Pieper für die Vorarbeiten zu den Projekten.

Ich spreche auch den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie II an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf meinen Dank aus für ihre Kooperation und dafür, dass ich während meines Aufenthalts so offen aufgenommen wurde. Insbesondere bedanke ich mich bei Prof. Dr. Vlada Urlacher, Dr. Clemens von Bühler für seine Betreuung, Ansgar Rühlmann für die gute Zusammenarbeit und Dr. Marco Girhard für gute Tipps und einige Paper.

Zudem bedanke ich mich für die Finanzierung meiner Doktorarbeit im Rahmen der Exzellenzinitiative der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Förderung von Wissenschaft und Forschung an deutschen Universitäten.

Mein Dank gilt vor allem meinen Eltern, meiner Schwester, meiner restlichen Familie und meinen guten Freunden für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Das Wichtigste zum Schluss: Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei Claire und Leonie, die mir stets vor Augen führen, dass es im Leben bedeutungsvollere Dinge gibt als Arbeit.

Einige Resultate der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen von nachfolgend aufgeführten Forschungsarbeiten erreicht, die vom Autor betreut wurden:

„Expression und Charakterisierung putativer Elektronentransferproteine aus *Thermobifida fusca*“

Sarah Dedisch, Bachelorarbeit, RWTH Aachen (September 2012).

„Charakterisierung eines putativen Flavodoxins aus *Thermobifida fusca* und dessen Anwendung in Biokatalysen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen“

Marie Schöpping, Bachelorarbeit, RWTH Aachen (September 2013).

„Charakterisierung putativer Elektronentransferproteine aus *Thermobifida fusca* und deren Anwendung in Biokatalysen mit Cytochrom P450 Monooxygenase CYP154H1“

Florian Jansen, Masterarbeit, RWTH Aachen (Dezember 2013).

„Charakterisierung von CYP102K1, einer neuen *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenase aus *Azorhizobium caulinodans*“

Dennis Warnecke, Bachelorarbeit, Hochschule Emden / Leer (Februar 2014).

„Lipase-katalysierte Synthese potentieller P450-Substrate und deren Einsatz in Biokatalysen mit CYP102K1“

Ulrich Markel, Bachelorarbeit, RWTH Aachen (September 2014).

„Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer verkürzten CYP102K1-Variante“

Hannah Braß, Forschungsbericht, RWTH Aachen (März 2015).

Abkürzungsverzeichnis

Basisgrößen und ihre Einheiten wurden mit den international geltenden SI-Einheiten abgekürzt, chemische Elemente nach ihrer Bezeichnung im Periodensystem und gebräuchliche Wörter der deutschen Sprache wurden laut Duden abgekürzt.

A	Fläche
Abs	Absorption
AdR	Adrenodoxinreduktase
Adx	Adrenodoxin
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> /Rinderserumalbumin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CalB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
c_f	finale Stoffmengenkonzentration
CFE	<i>Cell-free extract</i> /Zellfreier Extrakt
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
C-terminal	Carboxy-terminal
CYD	Cyclodextrin
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
D	Verdünnungsfaktor
d	Schichtdicke
δ -ALA	δ -Aminolävulinsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH ₂ O	Doppelt-demineralisiertes Wasser
DF	Durchfluss
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FdR	Ferredoxinreduktase
Fdx	Ferredoxin
Fldx	Flavodoxin
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
GDH	Glucosedehydrogenase
HD	Häm-Domäne
His	Histidin
HK	Hauptkultur
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> /Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	Interner Standard
KHCF	Kaliumhexacyanoferrat
KP _i	Kaliumphosphat
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LM	Lösungsmittel
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTBE	Methyl-tert-butylether
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
n. b.	Nicht bestimmt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
OFOR	2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktase
P	Pellet
P450	Cytochrom P450 Monooxygenase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerasekettenreaktion
PdR	Putidaredoxinreduktase
Pdx	Putidaredoxin

PFAM	<i>Protein family</i>
PFOR	<i>Phthalate-family oxygenase reductase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
R _f	Retentionsfaktor
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> /Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SP	Sulfopropyl
SRS	<i>Substrate recognition sequence</i> /Substraterkennungssequenz
T ₅₀	Temperatur, bei der noch 50 % eines Enzyms aktiv sind
TAE	Tris-Acetat EDTA
TB	<i>Terrific broth</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TB-S	<i>Terrific broth-sorbitol</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline + Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TMCS	Trimethylchlorosilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand
UV	Ultra-violett
V	Volumen
VK	Vorkultur
z	Ladungszahl

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Biokatalyse	1
1.2	Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	2
1.2.1	Allgemeine Aspekte	2
1.2.2	Katalysemechanismus	4
1.2.3	Strukturelle Aspekte	6
1.3	Elektronentransfersysteme von Cytochrom P450 Monooxygenasen	7
1.3.1	Überblick.....	7
1.3.2	Das bakterielle Dreikomponentensystem der Klasse I.....	12
1.3.3	Das Einkomponentensystem der Klasse VIII	15
1.4	Cytochrom P450 Monooxygenasen in der industriellen Biotechnologie.....	19
1.5	<i>Thermobifida fusca</i> und die thermostabile CYP154H1	20
1.6	Lipasen in der Biokatalyse	22
1.6.1	Allgemeine Aspekte	22
1.6.2	Die <i>Candida antarctica</i> Lipase B	24
1.7	Vorarbeiten.....	24
1.8	Motivation und Zielstellung.....	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Gene und Proteine.....	28
2.1.2	Primer	30
2.1.3	Plasmide.....	31

2.1.4	Bakterienstämme	32
2.1.5	Enzyme.....	32
2.1.6	Chemikalien	33
2.1.7	Medien.....	33
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	35
2.1.9	Substrat-Stammlösungen für die Biokatalyse	46
2.1.10	Geräte	46
2.1.11	Kits	47
2.1.12	Software.....	47
2.2	Molekular- und mikrobiologische Methoden	47
2.2.1	Bestimmung der optischen Dichte	47
2.2.2	Übernachtskulturen	48
2.2.3	Gefrierkulturen	48
2.2.4	Plasmidisolations.....	48
2.2.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	48
2.2.6	DNA-Restriktion	48
2.2.7	Agarosegelelektrophorese	49
2.2.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	49
2.2.9	Ligation	49
2.2.10	Polymerasekettenreaktion	50
2.2.11	Kolonie-PCR	51
2.2.12	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	51
2.2.12.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	51
2.2.12.2	Herstellung elektrokompeter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	52
2.2.13	Transformation	52
2.2.13.1	Transformation in chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen	52
2.2.13.2	Transformation in elektrokompeter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	53
2.2.14	Heterologe Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	53

2.2.14.1	Expressionsstudien.....	53
2.2.14.2	Heterologe Proteinexpression im größeren Maßstab	54
2.2.14.3	Expression bakterieller Cytochrom P450 Monooxygenasen	55
2.2.14.4	Coexpression von CYP154H1 mit Elektronentransferproteinen aus <i>Pseudomonas putida</i>	55
2.2.15	Zelllyse und -aufschluss	56
2.3	Biochemische Methoden	57
2.3.1	SDS-PAGE	57
2.3.1.1	Tris-Glycin-SDS-PAGE	57
2.3.1.2	Tris-Tricin-SDS-PAGE	58
2.3.2	Western Blot.....	58
2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay.....	59
2.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm	59
2.3.5	NAD(P)H-Konzentrationsbestimmung.....	60
2.3.6	Kaliumhexacyanoferrat-Assay	60
2.3.7	Cytochrom c-Assay	61
2.3.8	Bestimmung der GDH- und FDH-Aktivität.....	62
2.3.9	CO-Differenzspektrum.....	62
2.3.10	Proteinaufreinigung.....	63
2.3.10.1	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie	63
2.3.10.2	Anionenaustauschchromatographie.....	64
2.3.10.3	Kationenaustauschchromatographie.....	64
2.3.10.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie.....	64
2.3.10.5	Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration.....	65
2.3.10.6	Pufferaustausch und Lagerung	65
2.4	Biokatalyse	65
2.4.1	Biokatalysen mit CYP154H1, CYP154C5 und CYP106A2.....	65
2.4.2	Biokatalyse mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1	67

2.4.2.1	Charakterisierung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 mittels Biokatalyse	67
2.4.2.2	Spektrophotometrischer Nachweis einer Substratbindung	69
2.4.2.3	Bestimmung der Kopplungseffizienz und der NADPH-Oxidationsrate	69
2.4.3	Biokatalysen mit <i>Candida antarctica</i> Lipase B	70
2.4.3.1	Biokatalysen im analytischen Maßstab.....	70
2.4.3.2	Biokatalyse im präparativen Maßstab	71
2.4.3.3	Aufreinigung der Produkte mittels Kieselgelsäulenchromatographie.....	72
2.5	Reaktionsanalytik.....	73
2.5.1	Dünnschichtchromatographie	73
2.5.2	Gaschromatographie	73
2.5.3	Massenspektrometrie-gekoppelte Gaschromatographie	76
2.5.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Analyse.....	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Untersuchung putativer Elektronentransferproteine aus <i>Thermobifida fusca</i>	79
3.1.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung	79
3.1.1.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung von putativen Ferredoxinen aus <i>T. fusca</i> ...	79
3.1.1.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung eines putativen Flavodoxins aus <i>T. fusca</i> ...	89
3.1.1.3	Klonierung, Expression und Aufreinigung von putativen Ferredoxinreduktasen.....	93
3.1.1.4	Übersicht über die optimalen Expressionsbedingungen der putativen Elektronentransferproteine aus <i>T. fusca</i>	100
3.1.2	Aktivitätsbestimmung.....	101
3.1.2.1	Bestimmung der Aktivität der putativen Ferredoxinreduktasen aus <i>T. fusca</i>	101
3.1.2.2	Bestimmung der Aktivität der putativen Ferredoxine und des putativen Flavodoxins aus <i>T. fusca</i>	103
3.1.3	Biokatalyse.....	106
3.1.3.1	Biokatalysen mit CYP154H1 und unterschiedlichen Redoxproteinkombinationen....	107
3.1.3.2	Biokatalyse mit CYP154C5 sowie CYP106A2 und unterschiedlichen Redoxproteinen aus <i>T. fusca</i>	112

3.1.4	Coexpression von putativen Elektronentransferproteinen mit CYP154H1 für den Einsatz in der Biokatalyse	117
3.1.4.1	Klonierung und Einsatz von Plasmiden zur Coexpression von putativen Elektronentransferproteinen mit CYP154H1	118
3.1.4.2	Bestimmung der Elektronentransferaktivität	119
3.1.4.3	Biokatalyse	120
3.2	Untersuchung neuer bakterieller <i>self-sufficient</i> Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	123
3.2.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung	124
3.2.1.1	Klonierung und Expression der <i>self-sufficient</i> Cytochrom P450 Monooxygenase aus <i>Nakamurella multipartia</i>	124
3.2.1.2	Klonierung, Expression und Aufreinigung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 aus <i>Azorhizobium caulinodans</i>	127
3.2.2	Charakterisierung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1	135
3.2.2.1	CO-Differenzspektrum, Cofaktorpräferenz und Elektronentransferaktivität	135
3.2.2.2	Untersuchung des Substratspektrums.....	136
3.2.2.3	Einfluss des Puffers und pH-Wertes.....	139
3.2.2.4	Einfluss der Temperatur und Thermostabilität.....	143
3.2.2.5	Einfluss der Substratkonzentration und Durchmischung	145
3.2.2.6	Überprüfung des Substratspektrums bei optimierten Reaktionsbedingungen.....	147
3.2.2.7	Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Umsatzes bei unterschiedlichen Temperaturen	150
3.2.2.8	Bestimmung der Kopplungseffizienz und der NADPH-Oxidationsrate	152
3.2.2.9	Bestimmung von Dissoziationskonstanten	153
3.3	Erweiterung des Substratspektrums von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1.....	154
3.3.1	Lipase-katalysierte Herstellung von potentiellen CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1- Substraten im analytischen Maßstab	155
3.3.1.1	Herstellung von Pimelinsäuremonopentylester	155
3.3.1.2	Herstellung von Succinylsäuremonooctylester.....	156

3.3.1.3	Herstellung von Pimelinsäuremonobutylamid und Succinylsäuremonooctylamid....	157
3.3.2	Lipase-katalysierte Herstellung von potentiellen CYP102K1- und N'-short-CYP102K1-Substraten im präparativen Maßstab.....	157
3.3.2.1	Herstellung von Pimelinsäuremonopentylester im präparativen Maßstab	157
3.3.2.2	Herstellung von Succinylsäuremonooctylester im präparativen Maßstab.....	159
3.3.3	Einsatz der hergestellten Monoester in Biokatalysen mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1.....	159
3.3.3.1	Einsatz des Pimelinsäuremonopentylesters	159
3.3.3.2	Einsatz des Succinylsäuremonooctylesters.....	161
4	Diskussion	163
4.1	Untersuchung putativer Elektronentransferproteine aus <i>Thermobifida fusca</i>	163
4.1.1	Heterologe Expression und Aufreinigung.....	163
4.1.2	Aktivitätsbestimmung.....	175
4.1.3	Biokatalyse.....	178
4.2	Untersuchung neuer bakterieller <i>self-sufficient</i> Cytochrom P450 Monooxygenasen....	186
4.2.1	Expression und Aufreinigung.....	186
4.2.2	Charakterisierung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1	188
4.3	Erweiterung des Substratspektrums von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1.....	201
5	Zusammenfassung.....	205
6	Literaturverzeichnis.....	207
7	Anhang.....	223
7.1	Gen- und Proteinsequenzen	223
7.2	Sequenzalignments	230

7.3	Vektorkarten.....	235
7.4	DNA-Marker.....	244
7.5	Proteinmarker.....	244
7.6	GC-Kalibriergeraden	245
7.7	Tabellen und Chromatogramme zu Proteinaufreinigungen	248
7.8	Gaschromatogramme und Massenspektren.....	256

1 Einleitung

1.1 Biokatalyse

Als Biokatalyse bezeichnet man den Einsatz natürlicher Katalysatoren („Biokatalysatoren“) zur chemischen Transformation organischer Verbindungen. Dabei kann der Biokatalysator als freies Enzym oder in Form einer ganzen Zelle vorliegen. Die Menschheit wendet die Biokatalyse in Form von Fermentationsprozessen bereits seit Tausenden von Jahren an, um Lebensmittel wie Bier, Wein und Käse herzustellen. Dabei war den Menschen lange nicht bewusst, dass Biokatalysatoren für diese Vorgänge verantwortlich sind. Aufgrund des steten Wissenszuwachses und des technologischen Fortschritts begannen Wissenschaftler vor mehr als hundert Jahren damit, lebende Zellen (oder Teile davon) für weitere nützliche chemische Transformationen zu verwenden. Damit brach laut Bornscheuer et al. (2012) die erste von drei Phasen der Biokatalyse an. So nutzte Rosenthaler beispielsweise bereits kurz nach Anbruch des zwanzigsten Jahrhunderts einen Pflanzenextrakt, um (*R*)-Mandelonitril aus Benzaldehyd und Blausäure herzustellen (Rosenthaler, 1908). Mitte des gleichen Jahrhunderts wurde zudem die Oxidation von Steroiden durch Mikroben beschrieben (zusammengefasst in Sedlacek und Smith, 1988). Weitere Beispiele umfassen den Einsatz von Proteasen in Waschmitteln, die Nutzung der Penicillin G-Acylase zur Herstellung semisynthetischer Antibiotika oder die Verwendung von Glucoseisomerase zur Umwandlung von Glucose zur süßeren Fructose (Estell et al., 1985; Bruggink et al., 1998; Jensen und Rugh, 1987). Die Enzymimmobilisierung ermöglichte eine Wiederverwendung der Enzyme und wirkte der größten Herausforderung, der limitierten Stabilität der Biokatalysatoren, entgegen. In den 1980er und 1990er Jahren, während der zweiten Phase der Biokatalyse, führten frühe, typischerweise strukturbasierte Methoden des Proteinengineerings zu einer Erweiterung des Substratspektrums der Enzyme. Dies ermöglichte die Synthese ungewöhnlicher synthetischer Intermediate und machte die Biokatalyse ebenfalls für Hersteller von Feinchemikalien und Spezialpharmazeutika interessant. Einige Beispiele sind die Carbonylreduktase-katalysierte Synthese enantiomerenreiner Alkohole für die Herstellung von Statinen zur Senkung des Cholesterinspiegels, die Synthese von Waxestern durch Lipasen für Kosmetika und die Acrylamidherstellung durch Nitrilhydratase-enthaltende *Rhodococcus*-Zellen (Shimizu et al., 1998; Hills, 2003; Nagasawa et al., 1990). Neben der Stabilisierung stand die Optimierung des Biokatalysators für unnatürliche Substrate als Herausforderung im Mittelpunkt des Proteinengineerings. Mit der Entwicklung der ersten Methoden für die gelenkte Evolution, welche eine schnelle und umfassende Modifikation eines Enzyms unabhängig von der Kenntnis seiner Struktur ermöglicht, brach Mitte der 1990er Jahre die dritte und bis heute andauernde Phase der Biokatalyse an. Zu Beginn dieser Phase bestand diese Technologie aus iterativen Zyklen zufallsbedingter Aminosäureaustausche in einem Protein und dem anschließenden Screening der

resultierenden Mutantenbibliothek, um in Bezug auf Aktivität, Stabilität, Substratspezifität oder Enantioselektivität verbesserte Proteinvarianten zu identifizieren. In der Folge wurden die Methoden weiterentwickelt, um die Effizienz der gelenkten Evolution zu erhöhen. Weitere Schlüsseltechnologien neben der gelenkten Evolution, welche diese dritte Phase der Biokatalyse ermöglichten, sind das weiterentwickelte Proteinengineering, die Gensynthese und Sequenzanalyse sowie Bioinformatiktools und Computermodellierung (Kazlauskas und Bornscheuer, 2009; Turner, 2009; Röthlisberger et al., 2008). Die zur Verfügung stehenden Methoden können zu neuen, beachtenswerten Einsatzmöglichkeiten der Enzyme in der Biokatalyse führen. So konnten beispielsweise Enzyme evolviert werden, die Substrate umsetzen, welche zuvor nicht akzeptiert wurden (Liang et al., 2009; Savile et al., 2010), oder die Substrate zu anderen Produkten umsetzen (Atsumi et al., 2008; O'Maille et al., 2008). Heutzutage werden im Feld der Biokatalyse häufig die Enzymeigenschaften an die Prozessanforderungen angepasst – im Gegensatz zu früher, wo der Enzym-basierte Prozess an die Limitationen des Enzyms angepasst wurde.

In industriell relevanten biokatalytischen Prozessen werden derzeit am häufigsten Hydrolasen (EC 3) eingesetzt, die zur Katalyse einer Vielzahl verschiedener Hydrolysereaktionen befähigt sind. Neben dem großen Vorteil unabhängig von Cofaktoren zu sein, weisen diese Enzyme ebenfalls eine hohe Selektivität auf (Bornscheuer und Kazlauskas, 2005). Auf die Anwendung von Lipasen, einer Enzymgruppe innerhalb der Hydrolasen, wird in Abschnitt 1.6 genauer eingegangen. Neben den Hydrolasen stellen Oxidoreduktasen (EC 1) eine weitere Enzymklasse mit industrieller Bedeutung dar. Da sie dazu in der Lage sind, eine große Anzahl wichtiger Redoxreaktionen zu katalysieren, werden sie häufig in industriellen Prozessen eingesetzt, auch wenn sie im Gegensatz zu Hydrolasen recht instabil und von Cofaktoren abhängig sind (Liese et al., 2006). Eine Enzymgruppe innerhalb der Oxidoreduktasen sind die Monooxygenasen, die dazu befähigt sind, ein einzelnes Sauerstoffatom auf ein Substrat zu übertragen. Cytochrom P450 Monooxygenasen stellen eine herausragende Familie dieser Enzymgruppe dar, da sie nicht-aktivierte Kohlenstoffatome hydroxylieren können und dabei eine oftmals hohe Regio- und Stereoselektivität aufweisen. Daher sind Cytochrom P450 Monooxygenasen von großer Bedeutung für die pharmazeutische Industrie bei der Synthese von Steroidhormonen (Bracco et al., 2013). Sie werden aber ebenfalls in anderen großtechnischen Biokatalyseprozessen eingesetzt (Bernhardt und Urlacher, 2014), wie in Abschnitt 1.4 beschrieben.

1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen

1.2.1 Allgemeine Aspekte

Cytochrom P450 Monooxygenasen (EC 1.14) wurden erstmals vor etwa 60 Jahren in Rattenlebermikrosomen anhand ihrer Pigmenteigenschaften identifiziert (Klingenberg, 1958). Heutzutage umfasst diese Enzymklasse mehr als 21.000 Vertreter (Nelson, 2015, 2009), wobei sie

ubiquitär in der Natur vorkommen. Es handelt sich um Cytochrome (Hämproteine), da sich im aktiven Zentrum dieser Enzyme die prothetische Gruppe Häm b befindet, dessen zentrales Eisenatom mit einem Cysteinrest des Proteins eine Thiolatbindung bildet. Die Thiolatbindung ist entscheidend für die Aktivität der Enzyme und weist charakteristische spektrale Eigenschaften auf. Die Terminologie P450 (P steht für Pigment) basiert nicht – wie bei Enzymen üblich – auf der katalysierten Reaktion, sondern auf diesen spektralen Eigenschaften der Enzyme. Das an der Thiolatbindung beteiligte Schwefelatom des Cysteinrests verursacht eine signifikante Störung der Elektronendichteverteilung am Häm, was im Normalzustand zu einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm führt (Bernhardt, 2006).

Nach Reduktion des Eisenions sowie Bindung von Kohlenmonoxid erfolgt eine Verschiebung dieser sogenannten Soretbande auf 450 nm (Omura und Sato, 1964). Die beschriebene Verschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 30 nm wird bis heute zur Bestimmung der P450-Konzentration im wässrigen Milieu genutzt.

Cytochrom P450 Monooxygenasen sind dazu in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Reaktionen wie Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Dealkylierungen und Dehalogenierungen zu katalysieren (Bernhardt, 2006). Dabei sind sie *in vivo* beispielsweise an der Assimilation von Kohlenstoffquellen, dem Abbau von Xenobiotika oder der Synthese von Sekundärmetaboliten beteiligt (Ortiz de Montellano, 2005). Wie aus Abbildung 1.1 hervorgeht, katalysieren Cytochrom P450 Monooxygenasen im Allgemeinen die Übertragung eines Sauerstoffatoms von molekularem Sauerstoff auf ein Substrat und damit verbunden erfolgt die Reduktion des zweiten Sauerstoffatoms unter Bildung von Wasser (Sono et al., 1996). Die für diese Reaktion notwendigen Elektronen werden von einem externen Elektronendonator, wie NAD(P)H, bezogen. Daher handelt es sich bei den Cytochrom P450 Monooxygenasen um externe Monooxygenasen (Bernhardt, 2006). Da die Elektronen jedoch – bis auf sehr wenige Ausnahmen – nicht direkt sondern nur mit Hilfe von Elektronentransferproteinen auf das Häm übertragen werden können, ist die überwiegende Mehrheit der Cytochrom P450 Monooxygenasen zusätzlich von diesen Redoxenzymen abhängig (Hannemann et al., 2007).

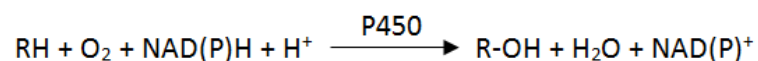


Abbildung 1.1: Durch Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysierte allgemeine Reaktion.

Cytochrom P450 Monooxygenasen werden bezüglich ihrer Nomenklatur mit „CYP“ abgekürzt, danach folgt eine Nummer für die Familie (≥ 40 % Sequenzidentität) und ein Buchstabe für die Unterfamilie (≥ 55 % Sequenzidentität) sowie eine weitere, fortlaufende Nummer, die das individuelle Enzym repräsentiert (Bernhardt, 2006).

1.2.2 Katalysemechanismus

Der Katalysemechanismus von Cytochrom P450 Monooxygenasen wurde erstmals Anfang der 1980er Jahre von White und Coon (1980) beschrieben und in der Folge intensiv erforscht (Poulos et al., 1987; Imai et al., 1989; Porter und Coon, 1991; Gerber und Sligar, 1992; Schlichting et al., 2000; Guengerich, 2002). Der in Abbildung 1.2 dargestellte Katalysezyklus beginnt im Ausgangszustand des Enzyms mit einem Wassermolekül als sechsten Liganden am Hämeisen. Dieser distale Ligand befindet sich gegenüber des proximalen Thiolats (**1**). Durch die Bindung eines Substrats im aktiven Zentrum des Enzyms wird das Wassermolekül als sechster Ligand verdrängt und hinterlässt eine freie Koordinationsstelle am Hämeisen (**2**), die nun für die Sauerstoffbindung zur Verfügung steht. Abhängig vom Enzym und/oder vom Substrat kann der Spinzustand des Enzyms von *low spin* zu *high spin* übergehen. Als Konsequenz wird das Redoxpotential zum Positiven verschoben, was die erste Elektronenübertragung vom Cofaktor (normalerweise NAD(P)H) auf das Hämeisen ermöglicht (**3**). Für bestimmte Cytochrom P450 Monooxygenasen konnte gezeigt werden, dass der Elektronentransfer nicht gezwungenermaßen mit einer Änderung des Spinzustandes einhergeht und daher ist es schwierig diesen Mechanismus als allgemeingültig anzusehen (Guengerich und Johnson, 1997). Anschließend bindet molekularer Sauerstoff an das reduzierte Eisenion (Fe^{II}), sodass ein Eisen(III)-Sauerstoffkomplex gebildet wird (**5a** und **5b**). Dieser Komplex stellt den letzten relativ stabilen Zustand des Zyklus dar, da die nachfolgenden Intermediate eine hohe Reaktivität aufweisen (Dawson und Sono, 1987; Ortiz de Montellano, 2005). Der anschließende zweite Elektronentransfer vom Cofaktor ist in der Regel der limitierende Schritt in diesem Zyklus und führt zu einer Reduktion des Eisen(III)-Sauerstoffkomplexes unter Bildung eines Eisen(III)-Peroxyanions (**6**). In der Folge wird das distale Sauerstoffatom des Peroxyanions protoniert (**7**) und die heterolytische Spaltung der O-O-Bindung führt zur Bildung des Eisen(IV)-Oxokomplexes (**8**, auch *compound I* genannt) und Freisetzung von Wasser. Im letzten Schritt wird das Substrat zum Produkt oxyfunktionalisiert, indem zunächst am zu funktionalisierenden Kohlenstoffatom des Substrats ein Proton abgespalten und anschließend die Hydroxylgruppe eingefügt wird (Groves et al., 1978). Nach der Produktfreisetzung nimmt wiederum ein Wassermolekül die distale Position ein, sodass das Enzym in seinen Ausgangszustand zurückkehrt und der Zyklus erneut beginnen kann (**1**).

Verschiedene Sauerstoffdonoren, wie Wasserstoffperoxid, Peroxycarbonsäuren und Natriumchlorit können zur direkten Bildung von *compound I* eingesetzt werden, ohne dass dazu teure Cofaktoren oder molekularer Sauerstoff erforderlich wären, die für den normalen Verlauf des Katalysezyklus benötigt werden. Diese Sauerstoffdonoren können unmittelbar mit Intermediat **2** reagieren, um oxyfunktionalisierte Produkte zu erhalten (White und Coon, 1980; Porter und Coon, 1991; Ortiz de Montellano, 2005). Allerdings sind die Reaktionsraten mit diesen Substanzen deutlich geringer als

bei Nutzung des nativen Cofaktors über den üblichen Katalyseweg. Darüber hinaus werden das Häm sowie das Enzym durch die Anwesenheit dieser reaktiven Stoffe geschädigt, sodass die Aktivität vergleichsweise schnell verloren geht (Bernhardt, 2006).

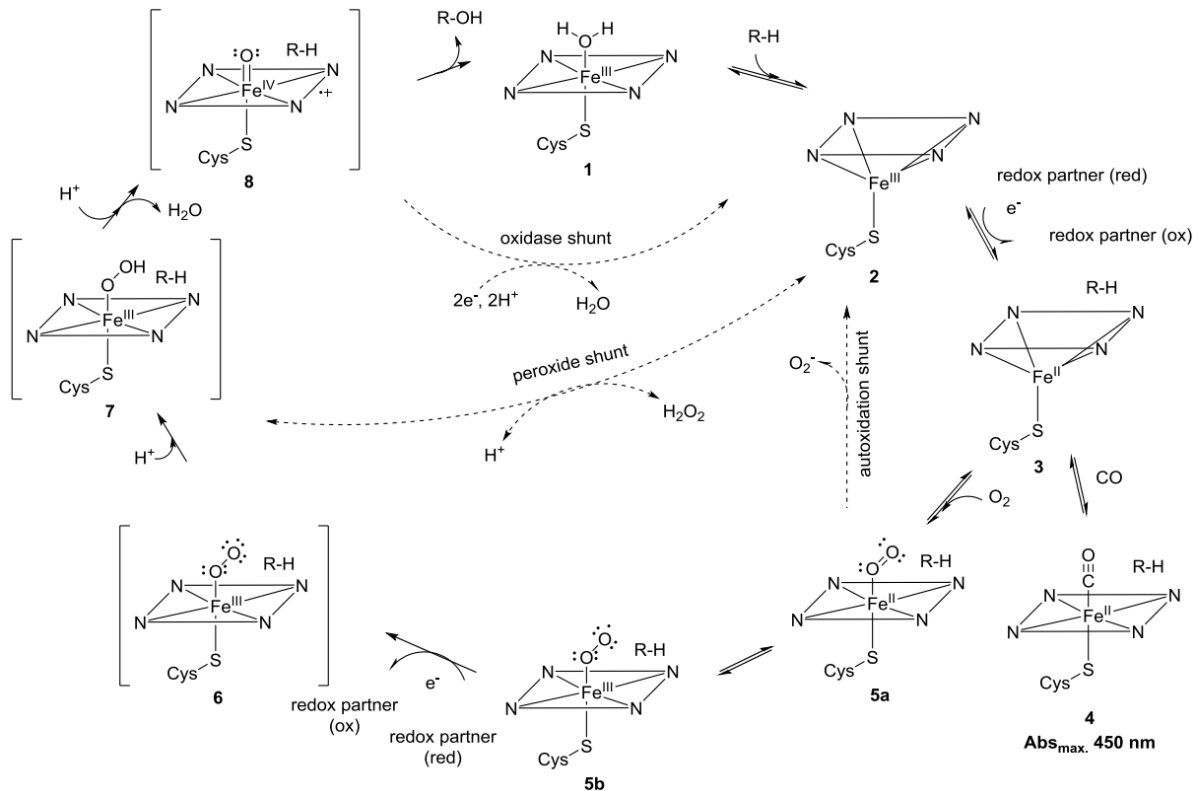


Abbildung 1.2: Katalysemechanismus von Cytochrom P450 Monooxygenasen. R-H und R-OH stehen für das Substrat bzw. Produkt. Die Hämgruppe ist als Parallelogramm mit den Stickstoffatomen in den Ecken dargestellt. Zustand 4 repräsentiert den reduzierten, CO-gebundenen P450-Komplex, der ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Verschiedene mögliche Enkopplungsreaktionen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Abbildung wurde aus der Dissertation von P. Bracco (2014) übernommen und basiert auf den Darstellungen von Denisov et al. (2005) und Sono et al. (1996).

Auf der anderen Seite kann es auch unter physiologischen Bedingungen im normalen Katalysezyklus zur Enkopplung von Elektronentransfer und Substratoxidation kommen, was zu unproduktiven Reaktionswegen ohne Produktbildung führt. Die erste Enkopplungsreaktion, der sogenannte *autooxidation shunt*, findet durch Autooxidation des Eisen(III)-Sauerstoffkomplexes (**5a**) statt und resultiert in der Freisetzung von hochreaktivem Superoxid. Diese Enkopplungsreaktion ist jedoch relativ selten, da der zweite Elektronentransferschritt meist deutlich schneller abläuft als die beschriebene Autooxidation (Sono et al., 1996). Der *peroxide shunt* stellt den zweiten möglichen Enkopplungsweg dar. Hier führt die Protonierung des unprotonierten Sauerstoffatoms im Intermediat **7** zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid. In der Folge wird aus dem Eisen(III)-Hydroperoxidkomplex statt *compound I* (**8**) das Intermediat **2** gebildet. Somit kommt es nicht zur

Produktbildung, obwohl NAD(P)H und molekularer Sauerstoff in einem molaren Verhältnis von 1:1 verbraucht wurden. Die dritte Möglichkeit der Entkopplung ist der sogenannte *oxidase shunt*. In diesem Fall wird das Sauerstoffatom in *compound I* (**8**) durch weiteren Elektronentransfer reduziert und protoniert, sodass ein weiteres Wassermolekül gebildet wird. In diesem Fall erfolgt ebenfalls keine Produktbildung, obwohl NADPH und molekularer Sauerstoff in einem molaren Verhältnis von 2:1 verbraucht wurden (Loida und Sligar, 1993; Kadkhodayan et al., 1995; Sono et al., 1996; Ortiz de Montellano, 2005). Eine hohe Beweglichkeit des Substrats im aktiven Zentrum sowie die Anwesenheit von überschüssigen Wassermolekülen in der Nähe des Hämeisens stellen potentielle Gründe für diese Form der Entkopplung dar (Sono et al., 1996).

Wie bereits zuvor erläutert, kann die Bindung eines Substrats an Cytochrom P450 Monooxygenasen zu einer Änderung des Hämeisenspinzustandes von *low spin* zu *high spin* führen. Dies ruft wiederum eine Erhöhung des Redoxpotentials von etwa -300 auf ca. 100 mV hervor (Denisov et al., 2005). Im Ausgangszustand (Fe^{III}) wird das Redoxpotential des $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ -Paares, welches in der Regel zwischen -400 und -100 mV liegt, durch den Cysteinrest als negativ geladenen, proximalen Thiolatliganden und durch die Koordinierung eines Wassermoleküls als sechsten oder distalen Liganden aufrecht erhalten. Auf diese Art und Weise wird der *low spin*-Zustand des Eisen(III)-Atoms stabilisiert. Im Fall einer Substratbindung wird das Wassermolekül als sechster Ligand vom Hämeisen verdrängt und der *low spin*-Zustand wird thermodynamisch destabilisiert. In der Folge wird das mittlere Redoxpotential zum Positiven verschoben, was die Reduktion des Häms ermöglicht. Als Konsequenz ist die Verschiebung des Redoxpotentials zum Positiven desto stärker ausgeprägt, je besser das Substrat das Wassermolekül als distalen Liganden verdrängen kann (Denisov et al., 2005).

1.2.3 Strukturelle Aspekte

Obwohl Cytochrom P450 Monooxygenasen innerhalb der Superfamilie nur eine geringe Sequenzidentität von $\leq 20\%$ aufweisen, besitzen sie eine ähnliche Faltung, die in Abbildung 1.3 wiedergegeben ist. Drei parallele Helices (D, I und L) sowie eine antiparallele Helix (E) sind strukturell konserviert. Zwischen der proximalen L-Helix und der distalen I-Helix befindet sich die Hämgruppe, die über die Cystein-Häm-Ligandenschleife an das Enzym gebunden ist, welche die konservierte Aminosäureabfolge FxxGx(H/R)xCxG beinhaltet (Denisov et al., 2005). Das Häm-bindende Cystein stellt eine weitere konservierte Aminosäure dar.

Darüber hinaus weisen Cytochrom P450 Monooxygenasen mit den flexiblen Substraterkennungssequenzen äußerst variable Regionen auf, die für das bemerkenswert breite Substratspektrum sowie die Regio- und Stereoselektivität der Enzyme verantwortlich sind (Gotoh, 1992). Die Struktur von Cytochrom P450 Monooxygenasen kann als dynamisch-flexibles Gerüst angesehen werden, das sich abhängig vom Oxidationszustand des Hämeisens und von der

Anwesenheit von Substrat verändern kann (Pochapsky et al., 2010). So weisen Cytochrom P450 Monooxygenasen im substratfreien Zustand (*low spin*) häufig eine offene Struktur auf, welche bei Substratbindung in Folge von Konformationsänderungen in den geschlossenen Zustand (*high spin*) übergeht (Li und Poulos, 1999; Zhao et al., 2005; Lee et al., 2010).



Abbildung 1.3: Allgemeine Faltung von Cytochrom P450 Monooxygenasen. Die im Text erwähnten Helices D, L, E und G sind mittels Beschriftung gekennzeichnet und die Substraterkennungssequenzen SRS1 – SRS6 sind schwarz eingefärbt. Die Abbildung stammt aus Denisov et al. (2005).

1.3 Elektronentransfersysteme von Cytochrom P450 Monooxygenasen

1.3.1 Überblick

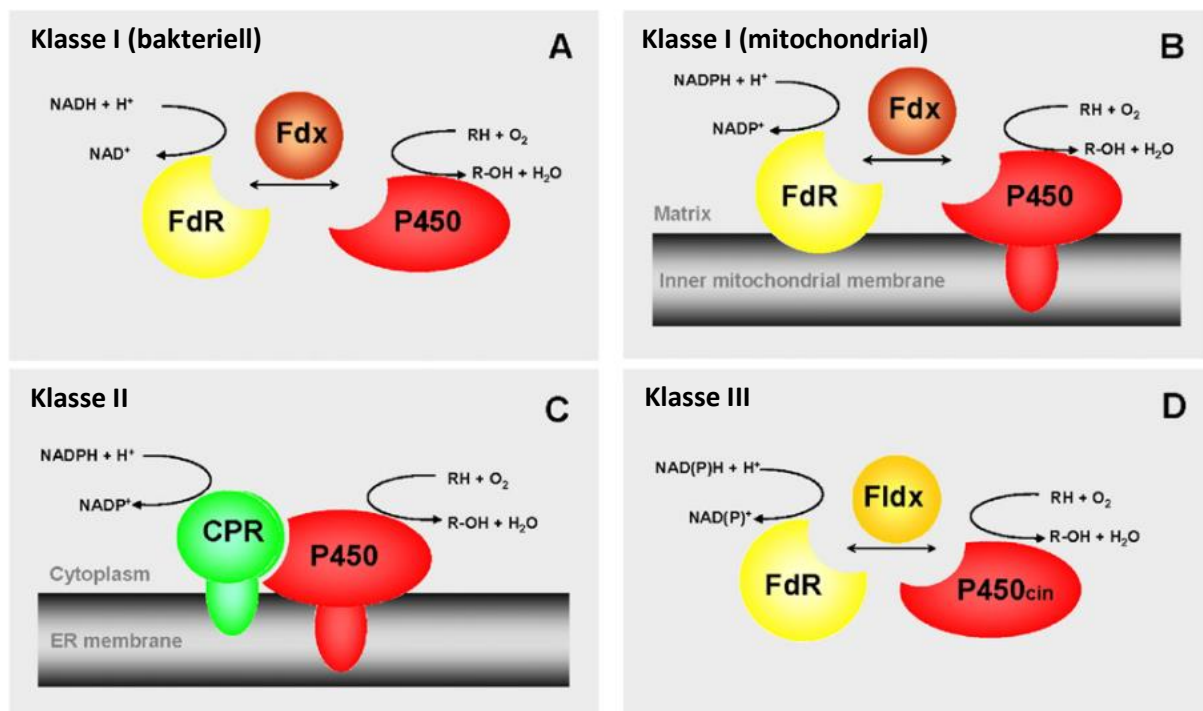
Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 1.2.1), benötigen Cytochrom P450 Monooxygenasen Elektronen von externen Cofaktoren, wobei diese Elektronen von Elektronentransferproteinen auf das Häm übertragen werden. In der Natur gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Elektronentransfersysteme für Cytochrom P450 Monooxygenasen (kurz: P450-Systeme), welche von Hannemann et al. (2007) in zehn Klassen eingeteilt wurden (Abbildung 1.4).

Das **Klasse I**-System ist ein klassisches Dreikomponentensystem bestehend aus einer FAD-haltigen Ferredoxinreduktase, einem Ferredoxin mit einem Eisenschwefelcluster als prosthetische Gruppe und der Häm-haltigen Cytochrom P450 Monooxygenase. Dabei werden die Elektronen zunächst vom Cofaktor auf die Reduktase übertragen, welche die beiden Elektronen nacheinander auf das Ferredoxin weitergibt. Das Ferredoxin agiert als Shuttleprotein und gibt die beiden Elektronen in

zwei separaten Elektronentransferschritten an die P450 Monooxygenase weiter, sodass der Katalysezyklus angetrieben wird und das Substrat oxyfunktionalisiert werden kann. Das Klasse I-System ist das am häufigsten in Bakterien vorkommende P450-System. Wie aus der schematischen Darstellung in Abbildung 1.4 A hervorgeht, liegen bei diesem System alle Komponenten gelöst im Cytoplasma vor. Das bakterielle Klasse I-System wird in Abschnitt 1.3.2 eingehender beschrieben.

In den Mitochondrien von Eukaryoten ist das **Klasse I**-System ebenfalls anzutreffen. In diesem Fall sind die Ferredoxinreduktase sowie die P450 Monooxygenase in der inneren Mitochondrienmembran verankert und nur das Ferredoxin liegt in löslicher Form in der Matrix vor (Abbildung 1.4 B).

Das in Eukaryoten am häufigsten vorkommende P450-System ist das **Klasse II**-System. In seiner einfachsten Form handelt es sich im Gegensatz zum Klasse I-System um ein im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Zweikomponentensystem, das aus einer FAD- sowie FMN-haltigen Cytochrom P450-Reduktase (EC 1.6.2.4) und aus der P450 Monooxygenase besteht (Abbildung 1.4 C). Beide Enzyme liegen membrangebunden an der cytosolischen Seite der ER-Membran vor. Die CPR ist zudem in der Lage, viele verschiedene P450-Isoenzyme zu reduzieren. Neben dieser einfachen Form existieren in den Mikrosomen ebenfalls verschiedene Elektronentransferwege über Cytochrom b_5 (Schenkman und Jansson, 2003). Darüber hinaus ist eine lösliche Version des Klasse II-Systems im Bakterium *Streptomyces carbophilus* identifiziert worden (Serizawa und Matsuoka, 1991).



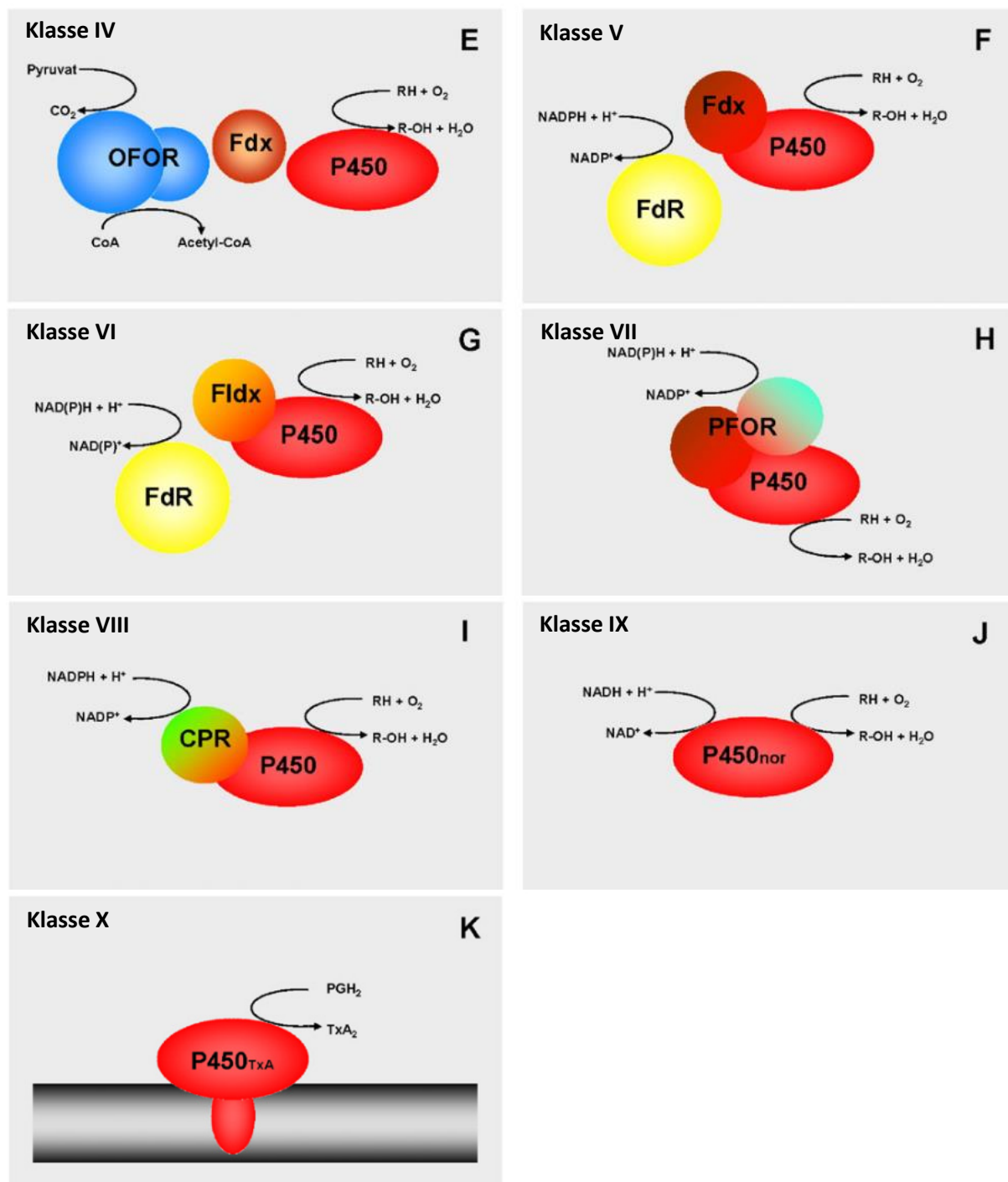


Abbildung 1.4: Überblick verschiedener, schematisch dargestellter Elektronentransfersysteme für Cytochrom P450 Monooxygenasen. (A) Klasse I, bakterielles System; (B) Klasse I, mitochondriales System; (C) Klasse II mikrosomales System; (D) Klasse III, bakterielles System; zum Beispiel P450cin; (E) Klasse IV, bakterielles thermophiles System; (F) Klasse V, bakterielles [Fdx]-[P450]-Fusionssystem; (G) Klasse VI, bakterielles [Fldx]-[P450]-Fusionssystem; (H) Klasse VII, bakterielles [PFOR]-[P450]-Fusionssystem; (I) Klasse VIII, bakterielles [CPR]-[P450]-Fusionssystem; (J) Klasse IX, lösliche eukaryotische P450_{nor}; (K) Klasse X, unabhängiges eukaryotisches System, als Beispiel P450_{TxA}. Die Abbildung wurde aus Hannemann et al. (2007) entnommen und leicht modifiziert.

Bei dem P450-System der **Klasse III** handelt es sich wie beim bakteriellen Klasse I-System ebenfalls um ein lösliches Dreikomponentensystem, das allerdings ein Flavodoxin anstelle eines Ferredoxins als Shuttleprotein aufweist (Abbildung 1.4 D). Der einzige charakterisierte Vertreter des Klasse III-Systems ist das P450cin-System aus *Citrobacter braakii*, das neben der Reduktase aus dem Flavodoxin Cindoxin und der CYP176A1 (P450cin) besteht (Hawkes et al., 2002).

Der erste Vertreter von **Klasse IV**, CYP119, ist eine lösliche Cytochrom P450 Monooxygenase aus dem acidothermophilen Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus*, die sehr thermostabil ($T_m = 91\text{ °C}$) und äußerst stabil gegenüber hohen Drücken (bis zu 200 MPa) ist (Wright et al., 1996; McLean et al., 1998; Koo et al., 2000). Auf der Suche nach potentiellen Redoxpartnern wurden in *S. tokodaii* sowie dem Ursprungsorganismus Elektronentransfersysteme aus 2-Oxosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktase und einem zugehörigen Ferredoxin identifiziert (Abbildung 1.4 E). Diese System stellen effiziente Elektronentransferpartnerketten für CYP119 dar (Fukuda et al., 2001; Puchkaev und Ortiz de Montellano, 2005). Damit ist CYP119 das erste Beispiel einer Cytochrom P450 Monooxygenase, welche die benötigten Reduktionsäquivalente nicht von einem NAD(P)H-abhängigen Flavoprotein erhält (Kojoh et al., 1999).

In Abbildung 1.4 F ist das **Klasse V**-System gezeigt, welches aus einem Fusionsprotein aus Ferredoxin und P450 Monooxygenase sowie einer putativen Reduktase besteht und somit ein Zweikomponentensystem repräsentiert. Die bisher einzige charakterisierte P450 Monooxygenase dieser Klasse ist die 14 α -Demethylase CYP51 aus *Methylococcus capsulatus*, auch MCCYP51FX genannt. In diesem Enzym ist der C-Terminus der Häm-domäne über eine Alanin-reiche Linkerregion mit einer Ferredoxindomäne verknüpft. Die vermutlich dazugehörige Reduktase konnte zwar noch nicht identifiziert werden, allerdings konnte der Elektronentransfer mit Spinatferredoxinreduktase als Ersatzenzym ermöglicht werden, was zeigt, dass die Ferredoxindomäne funktional ist (Jackson et al., 2002).

Das P450-System der **Klasse VI** ähnelt stark dem Klasse V-System, wobei in diesem Fall ein Flavodoxin-P450-Fusionsprotein anstelle des Ferredoxin-P450-Fusionsproteins vorliegt (Abbildung 1.4 G). Der erste P450-Vertreter dieser Klasse ist das Enzym CYP177A1 (XplA) aus *Rhodococcus rhodochrous*, welches den weit verbreiteten Sprengstoff Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) abbauen kann (Seth-Smith et al., 2002). Auch in diesem Fall konnte bisher keine Interaktion mit einer putativen Reduktase aus *R. rhodochrous* experimentell nachgewiesen werden, wenngleich sich im Genom des Organismus mit *xplB* ein Gen in unmittelbarer Nähe zum *xplA*-Gen befindet, das eine hohe Sequenzidentität zu anderen Reduktasegenen aufweist (Hannemann et al., 2007; Seth-Smith et al., 2002).

In Abbildung 1.4 H ist die strukturelle Organisation von Mitgliedern des **Klasse VII**-Systems dargestellt. So befinden sich alle für die Katalyse benötigten Komponenten auf einer Peptidkette und mit der Phthalat-Dioxygenase-Reduktasedomäne ist eine Reduktasedomäne mit dem P450-Enzym fusioniert, die normalerweise nicht an P450-Systemen beteiligt ist. Das zuerst entdeckte und zugleich bekannteste Enzym der Klasse VII ist CYP116B2 (P450RhF) aus *Rhodococcus* sp., bei dem die N-terminale Hämdomäne nur durch einen kurzen Linker von der C-terminalen Reduktasedomäne getrennt ist (Roberts et al., 2002). Die Reduktasedomäne enthält neben einer Cofaktorerkennungssequenz und einer Ferredoxindomäne ebenfalls ein prosthetisches FMN-Molekül. Dieses ist anstelle des bei Ferredoxinreduktasen üblichen FAD-Moleküls für die Reduktion des in der Ferredoxindomäne-enthaltenen Eisenschwefelclusters verantwortlich (Roberts et al., 2003).

Die **Klasse VIII** enthält – ähnlich wie Klasse VII – Fusionsproteine, deren Monooxygenasedomäne sich zusammen mit der entsprechenden Reduktasedomäne auf einer einzigen Polypeptidkette befindet (Abbildung 1.4 I). Allerdings handelt es sich bei dem Reduktaseanteil in diesem Fall um eine Diflavinreduktasedomäne, die FAD sowie FMN enthält und daher der eukaryotischen CPR gleicht. Die Mitglieder dieser Klasse (und ebenfalls der Klasse VII) sind Einkomponentenproteine und werden als „*self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen“ bezeichnet, da keine zusätzlichen Elektronentransferproteine für die Elektronenübertragung und entsprechend für die Katalyse benötigt werden. Eine detailliertere Beschreibung von Vertretern dieser Klasse ist in Abschnitt 1.3.3 zu finden.

Stickstoffmonoxidreduktase (EC 1.7.99.7) ist innerhalb der P450-Enzyme ein Sonderfall und das einzige Mitglied der **Klasse IX** (Abbildung 1.4 J). Die erste Stickstoffmonoxidreduktase (CYP55 oder P450nor) wurde im filamentösen Pilz *Fusarium oxysporum* entdeckt und stellt die erste lösliche Cytochrom P450 Monooxygenase aus Eukaryoten dar (Kizawa et al., 1991). Das Enzym wurde aus mitochondrialen und cytosolischen Fraktionen isoliert und katalysiert in einem für P450-Enzyme einzigartigen reduktiven Prozess den Umsatz von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid (Takaya et al., 1999). Diese Reaktion ist unabhängig von anderen Elektronentransferproteinen während NADH als Elektronendonator dient (Nakahara et al., 1993). Über Genomanalysen konnte herausgefunden werden, dass P450nor-Isoenzyme generell in Pilzen vorkommen (Daiber et al., 2005).

Die Vertreter der **Klasse X** stammen ebenfalls aus Eukaryoten und benötigen für den Substratumsatz weder Sauerstoff noch die Beteiligung einer zusätzlichen Reduktase(domäne), da Peroxid-haltige Verbindungen als Substrate und zugleich als Sauerstoffdonoren genutzt werden. Für die Katalyse ist somit auch kein Cofaktor wie NAD(P)H notwendig. Bei Pflanzen sind z. B. die Allenoxidsynthase

(CYP74A) oder die Hydroperoxidlyase (CYP74B/C) in den Chloroplasten zu finden (Lau et al., 1993; Shibata et al., 1995). Bei Säugetieren sind die in Abbildung 1.4 K dargestellte Thromboxansynthase (CYP5A1) oder die Prostacyclinsynthase (CYP8A1) als Beispiele dieses P450-Systems anzutreffen (Yokoyama et al., 1991; Wu und Liou, 2005).

1.3.2 Das bakterielle Dreikomponentensystem der Klasse I

Das P450cam-System aus *Pseudomonas putida* ist das am besten untersuchte Beispiel dieser Klasse und dient daher häufig als Modell für bakterielle Dreikomponenten-P450-Systeme. Die Cytochrom P450 Monooxygenase P450cam (CYP101A1, EC 1.14.15.1) katalysiert mit der 5-exo-Hydroxylierung von D-Campher den ersten Schritt des Campherabbaus, was dem Bakterium das Wachstum auf Campher als alleiniger C-Quelle ermöglicht (Pylypenko und Schlichting, 2004). Das Flavoprotein des Systems ist eine NADH-abhängige und FAD-haltige Ferredoxinreduktase namens Putidaredoxinreduktase (PdR, EC 1.18.1.3) (Gunsalus und Sligar, 1978). Putidaredoxin (Pdx), das zugehörige [2Fe-2S]-Cluster-haltige Ferredoxin, überträgt als Shuttleprotein die Elektronen von der Reduktase in zwei aufeinanderfolgenden Schritten auf CYP101A1 (McLean et al., 2005). Die Kristallstrukturen aller drei Komponenten konnten aufgeklärt werden, wobei die Struktur von CYP101A1 als erste Struktur einer Cytochrom P450 Monooxygenase überhaupt bestimmt werden konnte (Poulos et al., 1985; Sevrioukova et al., 2003, 2004; Pylypenko und Schlichting, 2004). Darüber hinaus konnten einige Jahre später ebenfalls die Kristallstrukturen des PdR-Pdx- sowie des Pdx-P450cam-Komplexes gelöst werden (Sevrioukova et al., 2010; Tripathi et al., 2013), sodass heutzutage viele strukturelle Informationen über dieses System verfügbar sind. Es sei darauf hingewiesen, dass die Komplexe in beiden Fällen über die Kopplung mit chemischen Linkermolekülen generiert wurden und dass im ersten Fall Pdx-Varianten mit erhöhter Stabilität verwendet wurden. Diese Modifikationen können sich prinzipiell auf die Struktur auswirken.

In Abbildung 1.5 A ist der von Sevrioukova et al. (2010) publizierte PdR-Pdx-Komplex und in Abbildung 1.5 B die Interaktionsfläche zwischen den beiden Proteinen gezeigt. Unter den zwanzig Aminosäureresten, die in PdR an der Interaktion mit Pdx beteiligt sind, befinden sich neun hydrophobe, fünf positiv geladene und vier polare Reste. Die Kontaktfläche in Pdx weist insgesamt vierzehn relevante Reste auf, worunter sich vier hydrophobe, drei geladene und ebenfalls vier polare Seitenketten befinden. Somit bietet die Kontaktfläche zwischen den beiden Proteinen die Möglichkeit der Ausbildung von sowohl hydrophoben als auch polaren Wechselwirkungen. Darüber hinaus befinden sich an der Kontaktfläche mit der Lys409_{PdR}-Glu72_{Pdx}- und der Arg310_{PdR}-Asp38_{Pdx}-Bindung nur zwei Salzbrücken. Für viele Redoxproteinpaare spielen Salzbrücken eine wichtige Rolle für die Bildung und Stabilisierung produktiver Elektronentransferkomplexe. Sie können die initiale Protein-Protein-Interaktion über eine weite Entfernung steuern, die Proteinorientierung optimieren,

um die maximale Aktivität zu erreichen und den Zugang von Solvenzien zur Interaktionsfläche beeinflussen (Sevrioukova et al., 2010). Anhand der gefunden Ergebnisse und unter der Berücksichtigung einiger Mutagenesestudien wurde gefolgert, dass die Arg310_{PdR}-Asp38_{Pdx}-Salzbrücke den entscheidenden Faktor für die Proteininteraktion darstellt und die beiden Enzyme in einer für den Elektronentransfer optimalen Weise positioniert (Sevrioukova et al., 2010).

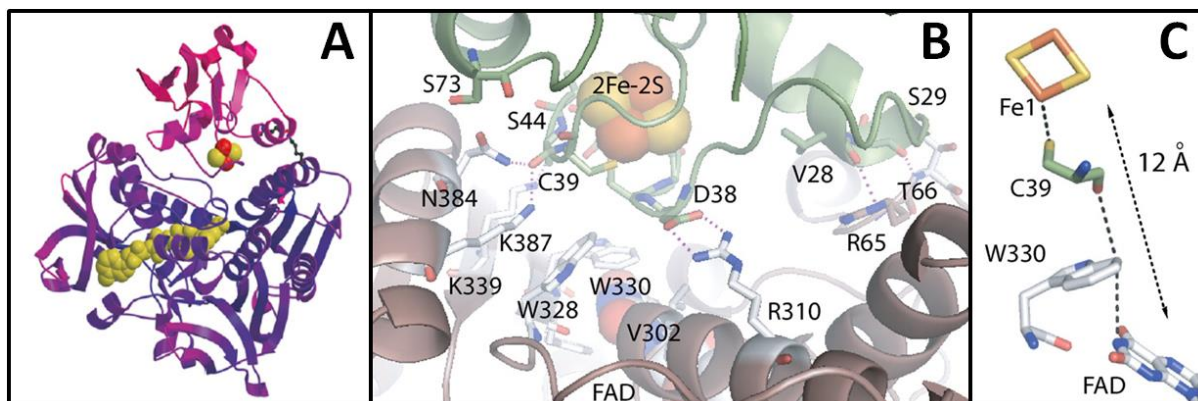


Abbildung 1.5: (A) PdR-Pdx-Komplex als Bänderdiagramm. PdR ist in Lila und Pdx in Magenta angefärbt. (B) Vergrößerter Ausschnitt des PdR-Pdx-Interaktionsbereichs. Nur ausgewählte Seitenketten von Pdx (grün) und PdR (braun/grau) sind hervorgehoben. Gestrichelte Linien zeigen elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an. FAD und der Eisenschwefelcluster sind in (A) und (B) als Kalottenmodell dargestellt. (C) Vorgeschlagene Elektronentransferroute zwischen FAD von PdR und dem 12 Å entfernten Eisenschwefelcluster von Pdx über Trp330_{PdR} und Cys39_{Pdx}. Die Abbildungen wurden Sevrioukova et al. (2010) entnommen und leicht modifiziert.

Wie Abbildung 1.5 B deutlich macht, bilden die Atome der Haupt- bzw. Seitenkette von Val28, Ser29, und Ser44 von Pdx mit Arg65, Thr66, Lys339, Asn384 und Lys387 von PdR Wasserstoffbrücken und somit weitere polare Wechselwirkungen. Zudem sind die Reste Val28, Tyr33, Leu36 und Met70 von Pdx mit den PdR-Seitenketten Val302, Pro303, Leu306, Trp328, Trp330, Pro380 und Phe383 an unpolaren Wechselwirkungen beteiligt. Die geringe Anzahl spezifischer elektrostatischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken legt die Mitwirkung hydrophober Kräfte sowie sterischer Komplementarität am PdR-Pdx-Arrangement nahe (Sevrioukova et al., 2010).

Durch die Kristallstruktur des PdR-Pdx-Komplexes konnte zudem herausgefunden werden, dass die Distanz zwischen dem FAD-Molekül von PdR und dem Eisenschwefelcluster von Pdx 12 Å beträgt. Der Weg über das FAD-flankierende Trp330 von PdR und den Eisenliganden Cys39 in Pdx stellt die direkteste und somit beste Elektronentransferroute zwischen dem Flavin und dem Eisenschwefelcluster dar (Abbildung 1.5 C).

Im von Tripathi et al. (2013) beschriebenen P450cam-Pdx-Komplex (Abbildung 1.6 A) ist zu erkennen, dass die Bindung von Pdx an der proximalen Seite von P450cam stattfindet, also an der Seite, wo sich das Hämthiolat befindet. In dem in Abbildung 1.6 B dargestellten Interaktionsbereich sind

verschiedene Schlüsselpositionen an der Bindung der beiden Proteine beteiligt. Das bereits für die PdR-Pdx-Interaktion entscheidende Asp38 in Pdx bildet eine ionische Bindung mit Arg112_{P450cam}, während das C-terminale Trp106_{Pdx} mit Ala113_{P450cam} interagiert und zudem über den Stickstoffhaltigen Indolring eine Wasserstoffbrücke mit Asn116_{P450cam} bildet. Darüber hinaus interagiert Arg109_{P450cam} mit der Carboxylgruppe von Trp106_{Pdx}.

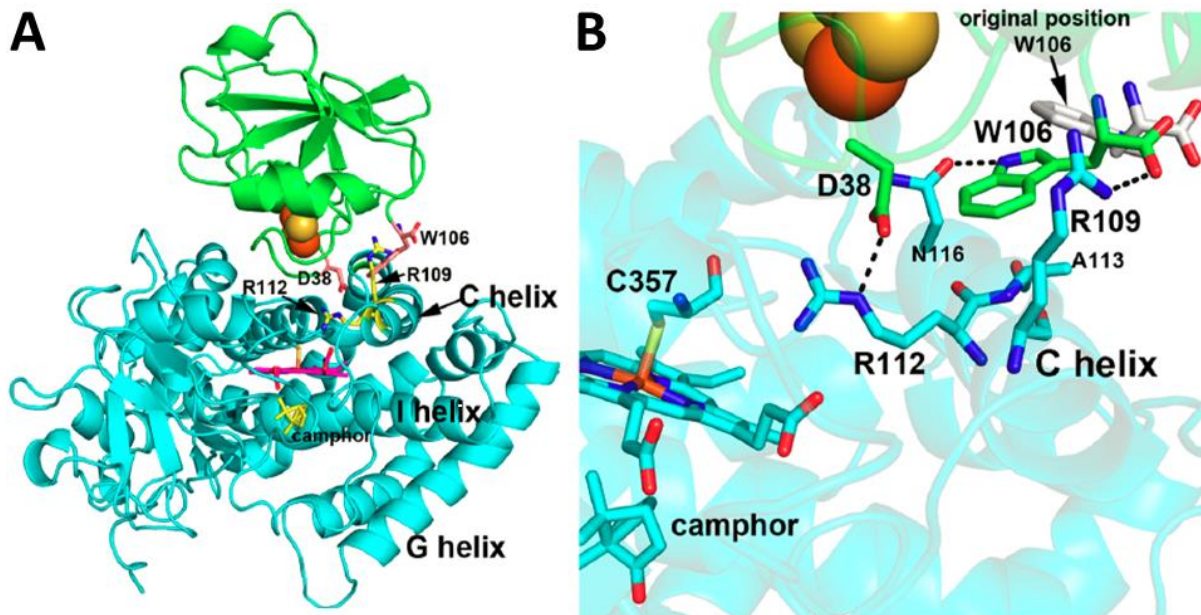


Abbildung 1.6: (A) Gesamtstruktur des Campher-gebundenen P450cam-Pdx-Komplexes. P450cam ist in Cyan und Pdx in Grün dargestellt. (B) Vergrößerter Ausschnitt des P450cam-Pdx-Interaktionsbereichs. Nur ausgewählte Seitenketten von Pdx (grün bzw. grau) und P450cam (cyan) sind hervorgehoben. Gestrichelte Linien zeigen elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken an. Trp106_{Pdx} nimmt zur Interaktion mit P450cam eine neue Rotamerkonformation ein und stellt damit die im Vergleich zum freien Pdx einzige signifikante strukturelle Änderung im mit P450cam-gebundenen Pdx dar. In P450cam sind für die elektrostatische Wechselwirkung von Arg112_{P450cam} mit Asp38_{Pdx} wenig strukturelle Änderungen notwendig, wogegen die Interaktion zwischen Trp106_{Pdx} und P450cam eine Bewegung der C-Helix von 2 – 3 Å Richtung Pdx erfordert. Die Abbildungen wurden Poulos et al. (2014) entnommen und leicht modifiziert.

Durch die Protein-Protein-Interaktion wird die Pdx-Konformation im Vergleich zum freien Enzym nur wenig beeinflusst, lediglich Trp106 nimmt eine andere Konfiguration an. In P450cam sind für die elektrostatische Wechselwirkung von Arg112_{P450cam} mit Asp38_{Pdx} ebenfalls wenig strukturelle Änderungen notwendig, wogegen die Interaktion zwischen Trp106_{Pdx} und Arg109, Ala113 sowie Asn116 in P450cam eine Bewegung der C-Helix von 2 – 3 Å Richtung Pdx erfordert. Es kommt in P450cam also durch die Interaktion mit Pdx zu starken strukturellen Änderungen einerseits an der Kontaktfläche und andererseits in der Substratbindetasche, welche die Substrathydroxylierung ermöglichen. Diese Tatsache wurde schon früh erkannt und führte zu der Schlussfolgerung, dass Pdx eine Effektorfunktion für P450cam aufweist (Gunsalus et al., 1973; Sligar et al., 1974). Laut Tripathi et al. und Poulos et al. überführt Pdx im Rahmen seiner Effektorrolle die Cytochrom P450

Monooxygenase von dem weniger favorisierten geschlossenen, substratgebundenen (*high spin*) Zustand in den offenen, substratfreien (*low spin*) Zustand. Des Weiteren übt Pdx seine beschriebene Effektorfunktion erst bei der Übertragung des zweiten Elektrons auf das Häm von P450cam in vollem Maße aus, da die induzierten strukturellen Änderungen die Bildung von *compound I* und damit die Substrathydroxylierung ermöglichen (Tripathi et al., 2013; Poulos, 2014).

Bereits vor einiger Zeit wurde von Roitberg et al. (1998) eine Elektronentransferroute vom Pdx-Eisenschwefelcluster zur Hämgruppe von P450cam vorgeschlagen. Diese wurde durch die strukturellen Erkenntnisse von Tripathi et al. (2013) bestätigt und ist in Abbildung 1.7 aufgezeigt. Demnach wird das Elektron vom prosthetischen Eisenschwefelcluster zunächst innerhalb des Putidaredoxins auf Cys39 und anschließend auf Asp38 übertragen. Somit ist Cys39 sowohl an der Elektronenaufnahme vom PdR-FAD als auch an der Elektronenabgabe auf das P450cam-Häm beteiligt. In der Folge kommt es zu zwei Elektronensprüngen, zunächst innerhalb des Pdx-P450cam-Interaktionsbereichs von Asp38_{Pdx} auf Arg112_{P450cam} und daraufhin von diesem Argininrest auf eine Propionatgruppe des Häms in P450cam. Im letzten Schritt erfolgt der Elektronentransfer auf das Hämeisen.

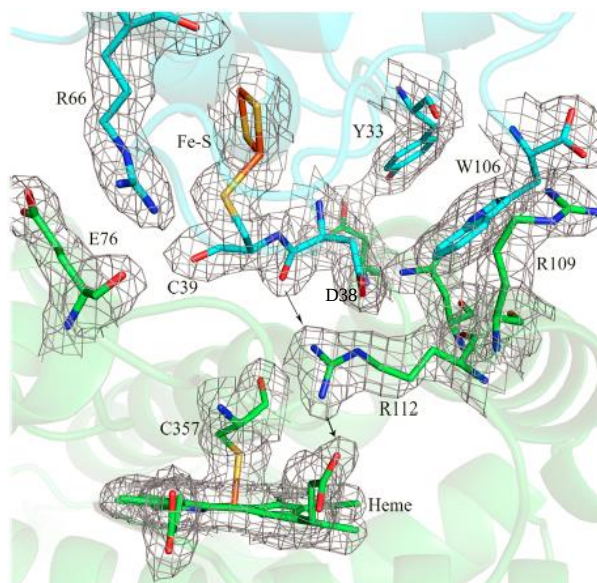


Abbildung 1.7: Ausschnitt des P450cam-Pdx-Interaktionsbereichs. Nur am Elektronentransfer bzw. an polaren Interaktionen beteiligte Seitenketten von Pdx (cyan) und P450cam (grün) sind hervorgehoben. Elektronensprünge von Asp38_{Pdx} auf Arg112_{P450cam} und von Arg112_{P450cam} auf eine Propionatgruppe des Häms sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Abbildung wurde Tripathi et al. (2013) entnommen.

1.3.3 Das Einkomponentensystem der Klasse VIII

Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 erwähnt, handelt es sich bei Vertretern der Klasse VIII um *self-sufficient* Einkomponentenenzyme, da sich alle zur Katalyse notwendigen Domänen auf einer

einzigsten Polypeptidkette befinden. Die N-terminale Hämdomäne ist über eine kurze Linkerregion mit der C-terminalen NADPH-abhängigen Diflavinreduktasedomäne (EC 1.6.2.4) fusioniert, welche die beiden prosthetischen Gruppen FAD und FMN enthält und somit der eukaryotischen CPR gleicht. Cytochrom P450 Monooxygenasen dieser Klasse wurden in verschiedenen Prokaryoten und niederen Eukaryoten entdeckt (Warman et al., 2005; Munro et al., 2007).

Das erste und zugleich mit Abstand bekannteste, sowie am besten charakterisierte Mitglied dieser Klasse ist die cytosolische Fettsäurehydroxylase CYP102A1 (P450_{BM3}, EC 1.14.14.1) aus dem Bodenbakterium *Bacillus megaterium*. Dieses nicht-membrangebundene Enzym wurde 1974 von Miura und Fulco entdeckt und in den folgenden Jahren eingehend studiert (Miura und Fulco, 1974, 1975; Ho und Fulco, 1976; Narhi und Fulco, 1982, 1986, 1987; Ruettinger et al., 1989; Fulco, 1991). Das Molekulargewicht des Vollängenproteins beträgt 119 kDa, wovon etwa 55 kDa auf die Hämdomäne zurückzuführen sind und ca. 65 kDa auf die NADPH-abhängige Reduktasedomäne, welche jeweils ein FAD- sowie FMN-Molekül enthält. Die vom NADPH stammenden Elektronen werden nacheinander vom FAD auf das FMN und im Anschluss auf die Hämgruppe der substratgebundenen Hämdomäne übertragen. Es wurde zudem herausgefunden, dass mittellange und langkettige gesättigte Fettsäuren von CYP102A1 an der ω -1-, ω -2- und ω -3-Position hydroxyliert werden und dabei Pentadecansäure das präferierte Substrat darstellt. Dabei werden für eine Cytochrom P450 Monooxygenase außerordentlich hohe Umsatzraten erzielt. Primäre lineare Alkohole und Amine geeigneter Kettenlänge werden zwar ebenfalls hydroxyliert aber resultierten in deutlich geringeren Umsätzen. Es wurde in der Folge gezeigt, dass ebenfalls ungesättigte bzw. verzweigte Fettsäuren entsprechender Kettenlängen geeignete Substrate für CYP102A1 darstellen und dass die Katalyse dabei teilweise mit höheren Raten stattfindet als bei Verwendung der linearen gesättigten Fettsäuren (Capdevila et al., 1996; Budde et al., 2006; Cryle et al., 2006). So konnten beispielsweise mit der vierfach ungesättigten Arachidonsäure Umsatzraten von bis zu ca. 17.000 min⁻¹ erreicht werden, was den höchsten Wert darstellt, der für CYP102A1 publiziert wurde (Noble et al., 1999; Girvan et al., 2009; Whitehouse et al., 2011).

Auf der strukturellen Ebene wurde schon kurz nach der Entdeckung von CYP102A1 vermutet, dass die funktionelle Form des Proteins einen Komplex bildet, der bei einer Verdünnung der Proteinlösung dissoziiert, da die spezifische Aktivität des Enzyms mit steigender Proteinkonzentration zunahm (Matson et al., 1977). Es konnte später mit Hilfe von Sedimentationsgeschwindigkeitsversuchen eine Mischung von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren nachgewiesen werden, doch nach Inkubation mit DTT lag CYP102A1 vorwiegend in der dimeren Form vor (Black und Martin, 1994). Das Enzym bildet also – soweit die Proteinkonzentration es zulässt – Dimere und es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Monomeren nicht vollständig

reversibel und das Monomer-Dimer-Gleichgewicht u. a. von der Anwesenheit von Substrat und von der Ionenstärke abhängig ist (Kitazume et al., 2007). Die Autoren derselben Studie konnten zudem nachweisen, dass der Elektronentransfer intermolekular verläuft, d. h. die Elektronen über das FAD eines CYP102A1-Moleküls auf das FMN und schließlich die Hämdomäne des anderen CYP102A1-Moleküls innerhalb des Dimerkomplexes übertragen werden und umgekehrt.

Bereits Anfang der 1990er Jahre gelang es, eine Kristallstruktur der CYP102A1-Hämdomäne zu erhalten (Boddupalli et al., 1992a). In der Folge wurden zahlreiche Kristallstrukturen der substratfreien sowie substratgebundenen CYP102A1-Hämdomäne mit besserer Auflösung veröffentlicht. Abbildung 1.8 zeigt eine Überlagerung der substratfreien CYP102A1-Hämdomänenstruktur (PDB-Code 1BU7; Sevrioukova et al., 1999) mit einer substratgebundenen Struktur (PDB-Code 1JPZ; Haines et al., 2001). Es wird deutlich, dass die Substratbindung strukturelle Änderungen hervorruft. Insbesondere verlagert sich die Position der F- und G-Helix sowie der F/G-Schleife, was beispielsweise zum Verschluss der Substratbindetasche führt.

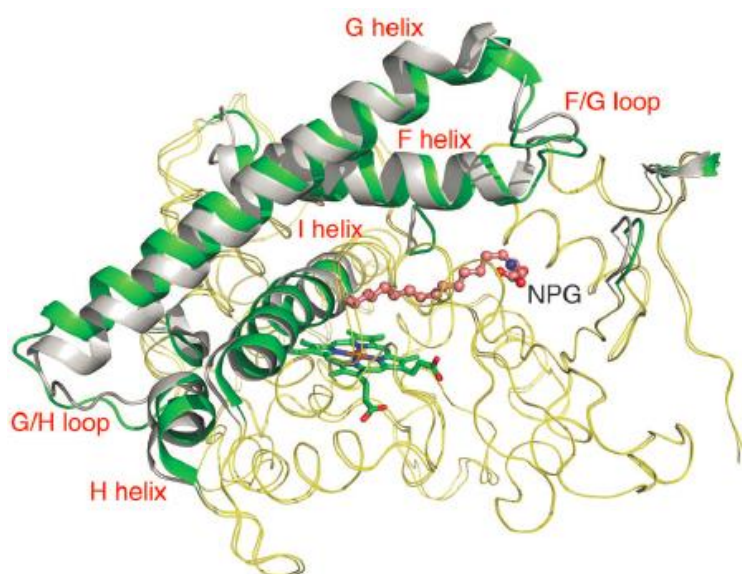


Abbildung 1.8: Überlagerung der substratfreien mit der substratgebundenen CYP102A1-Hämdomänenstruktur. Die Bereiche, die in Folge der Substratbindung strukturelle Änderungen eingehen, sind in der substratfreien Struktur (PDB-Code 1BU7; Sevrioukova et al., 1999) in Grau und der substratgebundenen Struktur (PDB-Code 1JPZ; Haines et al., 2001) in Grün dargestellt. Regionen, die kaum oder gar nicht von der Substratbindung beeinflusst werden, sind gelb gekennzeichnet. Das Hämeisen ist in Orange und das Substrat N-Palmitoylglycin (NPG) in Rosa dargestellt. Die Abbildung wurde Whitehouse et al. (2011) entnommen und leicht modifiziert.

Des Weiteren ist CYP102A1 häufig Gegenstand von Mutagenesearbeiten, um beispielsweise das Substratspektrum zu erweitern oder die Aktivität bzw. Stabilität zu erhöhen. So wurden zum Beispiel Mutanten generiert, die im Gegensatz zum Wildtyp in der Lage sind, Alkane, Phenole, Monoterpene,

Indol oder Steroide umzusetzen (Peters et al., 2003; Sulistyaningdyah et al., 2005; Watanabe et al., 2007; Huang et al., 2007; Vottero et al., 2011).

Es gibt laut der P450-Homepage (Nelson, 2015, 2009) bisher 30 weitere eingetragene Mitglieder der bakteriellen CYP102-Familie. Dabei umfasst die CYP102A-Unterfamilie schon sechzehn Vertreter und die restlichen fünfzehn Proteine gehören den anderen Unterfamilien (B – J) an (Nelson, 2015, 2009). Es sei darauf hingewiesen, dass manche der 31 geführten CYP102-Enzyme keine Fusionsproteine sind, da sie nur die Hämdomäne und keine Reduktasedomäne aufweisen (Lamb et al., 2010). Somit gehören nicht alle Mitglieder der CYP102-Familie zur P450-Systemklasse VIII, da es sich um keine *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen handelt. Es fällt zudem auf, dass CYP102-Enzyme bisher fast ausschließlich in Bodenbakterien identifiziert wurden (Lamb et al., 2010) und dass lediglich sieben CYP102-Mitglieder aus gram-negativen Bakterien stammen. In der CYP102A-Unterfamilie wurden neben CYP102A1 bisher nur CYP102A2 sowie A3 aus *Bacillus subtilis*, CYP102A5 aus *B. cereus*, CYP102A7 aus *B. licheniformis* und CYP102A14 aus einem unkultivierten Bodenbakterium eines Metagenomansatzes experimentell untersucht (Budde et al., 2004; Gustafsson et al., 2004; Chowdhary et al., 2007; Dietrich et al., 2008; Kim et al., 2007). Darüber hinaus wurden CYP102B1 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), CYP102D1 aus *Streptomyces avermitilis* und CYP102H1 aus *Nocardia farcinica* (partiell) charakterisiert (Lamb et al., 2010; Choi et al., 2012; Chung et al., 2012), allerdings handelt es sich bei CYP102B1 und CYP102H1 um keine *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen. Die charakterisierten Vertreter der CYP102-Familie stammen somit alle aus grampositiven Bakterien und die experimentelle Untersuchung eines CYP102-Enzyms aus einem gramnegativen Organismus steht daher noch aus. Allen beschriebenen CYP102A1-homologen Cytochrom P450-Monooxygenasen ist gemein, dass sie (z. T. ungesättigte) Fettsäuren oxyfunktionalisieren können, wenngleich CYP102A2 und CYP102A14 offenbar andere Substanzen als Substrate bevorzugen (Axarli et al., 2010; Kim et al., 2007).

Im Reich der Pilze existiert mit der CYP505-Familie ein Gegenstück zur bakteriellen CYP102-Familie. Die CYP505-Familie umfasst bisher mehr als 60 eingetragene Mitglieder, somit wurden in Pilzen bis dato mehr CYP102A1-homologe P450-Enzyme identifiziert als in Bakterien (Nelson, 2009). Der erste Vertreter dieser Familie, CYP505A1 (P450foxy), wurde zuerst aus dem Pflanzenpathogen *Fusarium oxysporum* isoliert und in der Folge als einziges Mitglied der CYP505-Familie eingehend studiert (Shoun et al., 1985; Nakayama et al., 1996; Kitazume et al., 2000, 2002). Demnach weist das Enzym bezüglich der Domänenstruktur, des Molekulargewichts, der hohen Umsatzgeschwindigkeit und weiterer enzymatischer Eigenschaften eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu CYP102A1 auf. Als Unterschiede zwischen den Enzymen sind die Präferenz für etwas kürzere Fettsäuren und die

Anwesenheit einer Transmembrandomäne zu nennen, wodurch CYP505A1 – wie bei eukaryotischen Cytochrom P450 Monooxygenasen üblich – membranassoziiert ist.

1.4 Cytochrom P450 Monooxygenasen in der industriellen Biotechnologie

Es steht außer Frage, dass Cytochrom P450 Monooxygenasen biotechnologisch wichtige Enzyme sind, da sie eine Vielzahl interessanter Reaktionen katalysieren können. So stellen beispielsweise Hydroxylierungs- und Epoxidierungsreaktionen etwa ein Zehntel aller industriellen Enzymprozesse dar (Liese et al., 2006). Nichtsdestotrotz sind erfolgreiche kommerzielle Anwendungen dieser Enzyme auf einige Beispiele beschränkt, da verschiedene Faktoren einen Einsatz im industriellen Maßstab erschweren. Zum einen ist die Aktivität vieler Cytochrom P450 Monooxygenasen unter Prozessbedingungen nur gering und die limitierte Anzahl substratgebundener 3D-Strukturen schränkt das Proteindesign ein. Zum anderen werden Elektronentransferpartner benötigt, die oftmals nicht bekannt sind und Limitationen im Elektronentransfer stellen ein weiteres Problem dar. Zusätzliche Einschränkungen sind die Abhängigkeit von teuren Cofaktoren wie NAD(P)H und die Entkopplung von Cofaktorverbrauch und Produktbildung. Darüber hinaus kann es bei Ganzzellsystemen u. a. zu Schwierigkeiten der Substratlöslichkeit, -aufnahme und -toxizität kommen (Bernhardt, 2006; Urlacher und Eiben, 2006; Julsing et al., 2008; O'Reilly et al., 2011).

Die regio- und stereoselektive Oxyfunktionalisierung von Steroidhormonen – eine Reaktion, die durch chemische Methoden nur schwierig durchzuführen ist – ist eine der bedeutendsten Anwendungen von Cytochrom P450 Monooxygenasen in der pharmazeutischen Industrie (Bracco et al., 2013). Die erste derartige Reaktion, die im industriellen Maßstab etabliert wurde, ist die Herstellung von Cortison aus Progesteron durch ein P450-haltiges *Rhizopus*-Ganzzellsystem, das von Upjohn (heute Pfizer, USA) kommerzialisiert wurde (Peterson et al., 1952). Weitere Beispiele sind die bei Sanofi (Frankreich) etablierten Synthesen von Hydrocortison und Pregnenolon durch *S. cerevisiae*-Zellen, die mit Säugetier-P450-Enzymen ausgestattet wurden (Szczepara et al., 2003; Duport et al., 1998). Bei Bayer (Deutschland) wurde ebenfalls eine Möglichkeit zur Hydrocortisonproduktion ausgehend von Desoxycortison etaliert, hier aber unter Nutzung von P450-haltigen *Curvularia*-Zellen (Petzoldt et al., 1982).

Weitere Beispiele für kommerzielle Prozesse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen sind die Herstellung des Cholesterinsenkers Pravastatin mittels *Streptomyces*-Zellen (Daiichi Sankyo Inc. und Bristol Myers Squibb, beide USA) und die *S. cerevisiae*-basierte Produktion von Artemisininsäure (Sanofi, Frankreich), eine Vorstufe des Antimalariamittels Artemisinin (Tsujita und Watanabe, 1989; Ro et al., 2006; Paddon et al., 2013). Darüber hinaus werden Cytochrom P450 Monooxygenasen für die Synthese von Dicarbonsäuren als Polymerbausteine (BASF, Deutschland) eingesetzt (Picataggio et al., 1992; Liu et al., 2004).

Ein größeres Anwendungsgebiet von Cytochrom P450 Monooxygenasen ist zudem die Synthese von Arzneimittelmetaboliten. Pharmahersteller benötigen diese Verbindungen, um beispielsweise Nebenwirkungen, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten oder die Toxizität des Wirkstoffs zu untersuchen. Eine Gruppe der Forschungsabteilung von Novartis (Schweiz) veröffentlichte vor einigen Jahren einen Ansatz zur Synthese von Arzneimittelmetaboliten mit rekombinant exprimierten humanen Cytochrom P450 Monooxygenasen (Schroer et al., 2010).

1.5 *Thermobifida fusca* und die thermostabile CYP154H1

Thermobifida fusca (früher *Thermomonospora fusca*) gehört zu den Actinomyceten und somit zu den grampositiven Bakterien. Es ist ein filamentöses, moderat thermophiles Bodenbakterium, das zwar bei Temperaturen von bis zu 70 °C wachsen kann, aber eine optimale Wachstumstemperatur von 50 – 55 °C aufweist. Dieses Actinobakterium ist dazu in der Lage, verschiedene thermo- sowie pH-stabile Cellulasen und Xylanasen zu sekretieren. Es gehört daher zu den Hauptdestruenten pflanzlicher Zellwände in selbstwärmender organischer Materie wie Mist- und Komposthaufen sowie verfaulendem Heu (Bachmann und McCarthy, 1991). Die angesprochenen sekretierten Enzyme sind aufgrund ihrer Eigenschaften von hohem wissenschaftlichen Interesse und waren bereits Gegenstand zahlreicher Studien (Wilson, 2004). Es sei zudem erwähnt, dass *T. fusca* Sporen bilden kann, die bei dauerhafter Exposition zu schweren allergischen Reaktionen („Dreschfieber“) führen können (Van den Bogart et al., 1993).

Das Genom von *T. fusca* wurde vor einigen Jahren vollständig sequenziert und veröffentlicht (Lykidis et al., 2007). Es wurden zehn Gene für putative Cytochrom P450 Monooxygenasen gefunden, von denen vier der CYP154-Familie angehören. Laut P450-Homepage umfasst diese Familie zurzeit 35 eingetragene Mitglieder, die alle aus Actinomyceten (hauptsächlich *Streptomyces*-Stämme) stammen (Nelson, 2009). Einige dieser Enzyme wurden bereits erforscht, darunter CYP154A1 und CYP154C1 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), deren Kristallstrukturen verfügbar sind (Podust et al., 2003, 2004). Darüber hinaus wurden die Steroid-hydroxylierenden CYP154C5 aus *Nocardia farcinica* und CYP154C3 aus *Streptomyces griseus* eingehender studiert (Bracco et al., 2013; Herzog et al., 2014; Makino et al., 2014). Eine weitere Cytochrom P450 Monooxygenase aus *N. farcinica*, CYP154A8, wurde ebenfalls experimentell beschrieben. So wurde für dieses Enzym eine Dealkylierungsaktivität für das Isoflavon Formononetin festgestellt und es konnten über zwanzig geeignete Substrate identifiziert werden (Choi et al., 2010; von Bühler et al., 2013). Mit CYP154H1 wurde von Schallmey et al. die erste Cytochrom P450 Monooxygenase aus *T. fusca* isoliert und eingehend charakterisiert (Schallmey et al., 2011). CYP154H1 wurde dabei heterolog in *E. coli* exprimiert (bis zu 14 % des löslichen Proteinanteils) und anschließend aufgereinigt. Das Enzym zeigt eine klare Präferenz für kleine aromatische und arylaliphatische Substanzen wie Ethylbenzol, Styrol

und Indolverbindungen. Des Weiteren werden von CYP154H1 verschiedene arylaliphatische Sulfide als Substrate akzeptiert, die zu den entsprechenden Sulfoxiden bzw. Sulfonen umgesetzt werden. Einige der genannten Reaktionen verlaufen zudem enantioselektiv. Der T_m von CYP154H1 beträgt 67 °C und damit handelt es sich um ein moderat thermostabiles Enzym, was mit den Wachstumseigenschaften des Ursprungsorganismus in Einklang steht. Die Vorteile des Enzyms, wie die Einfachheit der Herstellung, das interessante Substratspektrum und die ausgeprägte Thermostabilität, machen CYP154H1 zu einem attraktiven Biokatalysator. Ein Homologiemodell von CYP154H1, das auf Basis der Kristallstruktur von CYP154C1 (PDB-Code 1GWI) erstellt werden konnte, ist in Abbildung 1.9 gezeigt.

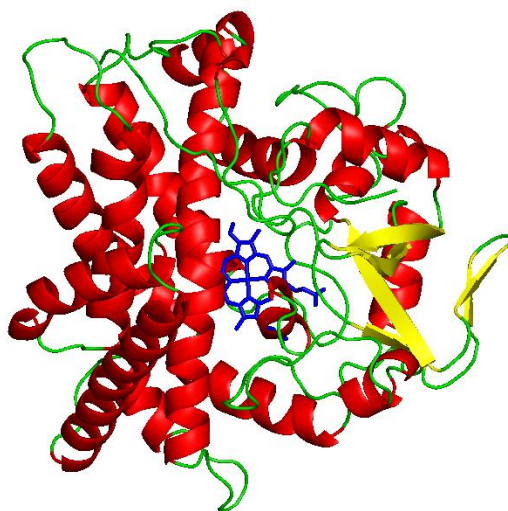


Abbildung 1.9: Homologiemodell von CYP154H1 aus *T. fusca* auf Basis von CYP154C1 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (PDB-Code 1GWI). α -Helices sind in Rot, β -Faltblätter in Gelb, Schleifen in Grün und die Hämgruppe in Blau dargestellt. Die Abbildung wurde von A. Schallmey zur Verfügung gestellt.

Vor kurzem wurde mit CYP154E1 eine weitere Cytochrom P450 Monooxygenase aus *T. fusca* experimentell beschrieben (von Bühler et al., 2013). Bei der Untersuchung des Substratspektrums wurden u. a. lineare und verzweigte Alkohole sowie gesättigte Fettsäuren und verschiedene Terpenoide, darunter das pharmazeutisch relevante Grundmann's Keton, als geeignete Substrate identifiziert. Des Weiteren werden von CYP154E1 wie durch CYP154H1 arylaliphatische Sulfide zu den entsprechenden Sulfoxiden bzw. Sulfonen umgesetzt (von Bühler et al., 2013; Bogazkaya et al., 2014). Beim Vergleich der Substrate, die von den verschiedenen beschriebenen Enzymen der CYP154-Familie akzeptiert werden, wird deutlich, dass die CYP154-Familie ein recht breites Substratspektrum aufweist.

Alle isolierten Vertreter der CYP154-Familie sind Dreikomponentenenzyme, doch die natürlichen Elektronentransferpartner sind in keinem Fall bekannt, sodass zur Durchführung von Biokatalysen auf Ersatzsysteme zurückgegriffen werden musste. Für die Arbeiten mit CYP154A1, CYP154C1 und

CYP154C3 aus *Streptomyces* wurde ein kommerziell erhältliches System aus Spinatferredoxin und der entsprechenden Reduktase genutzt, wobei im Fall von CYP154C3 zusätzlich ein Fusionsansatz mit der Reduktasedomäne von P450RhF angewendet wurde (Cheng et al., 2010; Podust et al., 2003; Makino et al., 2014). Der Elektronentransfer für die Katalyse mit CYP154C5 und CYP154A8 aus *N. farcinica* konnte in beiden Fällen mit Pdx und PdR aus dem P450cam-System gewährleistet werden, auch wenn sich für CYP154A8 die Kombination aus dem Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis* mit *E. coli*-Flavodoxinreduktase als vorteilhafter herausstellte (Bracco et al., 2013; Choi et al., 2010; Bogazkaya et al., 2014; von Bühler et al., 2013). Das letztgenannte System wurde ebenfalls für die Arbeiten mit CYP154E1 aus *T. fusca* genutzt, während für die Charakterisierung des anderen CYP154-Enzyms aus *T. fusca*, CYP154H1, wiederum Pdx und PdR eingesetzt wurden (von Bühler et al., 2013; Schallmeyer et al., 2011). Im Fall von CYP154H1 konnten die Autoren verschiedene Nachteile bei der Verwendung von Pdx und PdR als Elektronentransfersystem feststellen (Schallmeyer et al., 2011). Zum einen wurden nur geringe Umsatzraten erreicht, die auf einen hohen Entkopplungsgrad infolge eines ineffizienten Elektronentransfers zurückzuführen sein können. So sind heterolog exprimierte Cytochrom P450 Monooxygenasen meist mit den autologen Elektronentransferpartnern am aktivsten (Hannemann et al., 2007). Zum anderen musste die zur Charakterisierung genutzte Reaktionstemperatur an den Temperaturtoleranzbereich der Ersatzkomponenten angepasst werden. Insbesondere Pdx weist eine geringe Stabilität auf, da der Eisenschwefelcluster in Lösung recht schnell verloren geht (Sevrioukova et al., 2003). Daher konnte das Temperaturoptimum von CYP154H1, welches vermutlich deutlich höher liegt als die verwendete Reaktionstemperatur von 30 °C, nicht bestimmt werden. Es wird somit deutlich, dass die Identifizierung der natürlichen Elektronentransferproteine von CYP154H1 zwingend notwendig ist, um die katalytische Effizienz des Dreikomponentensystems zu verbessern.

1.6 Lipasen in der Biokatalyse

1.6.1 Allgemeine Aspekte

Lipasen (EC 3.1.1) sind den Serinhydrolasen zugehörig und besitzen eine charakteristische α/β -Hydrolasefaltung, die ebenfalls bei Esterasen anzutreffen ist (Stergiou et al., 2013). Wie in Abbildung 1.10 (Hinreaktion) dargestellt, katalysieren sie in wässriger Umgebung die hydrolytische Spaltung von (langkettigen) Triacylglyceriden, jedoch ebenfalls die Hydrolyse einfacher Ester und Amide (Adlercreutz, 2013; Jaeger et al., 1994; Jaeger und Eggert, 2002).

1.6.2 Die *Candida antarctica* Lipase B

Ende der 1980er Jahre wurden in der Hefe *Candida antarctica* zwei Lipase-Isoenzyme, Lipase A (CalA) und Lipase B (CalB), entdeckt und wenig später aufgereinigt sowie charakterisiert (Michiyo, 1988; Björkling et al., 1989; Heldt-Hansen et al., 1989; Patkar et al., 1993). Seitdem wurde CalB eingehend untersucht, sodass es bereits vor ca. zwei Jahrzehnten gelang, die Kristallstruktur des Proteins aufzuklären (Uppenberg et al., 1994). Demnach weist das 33 kDa schwere Enzym die für Hydrolasen charakteristische α/β -Faltung auf und es besitzt keinen Deckel, was einen Gegensatz zu vielen anderen Lipasen darstellt. Daher ist das Phänomen der Grenzflächenaktivierung für CalB nicht zutreffend und das Enzym wird deshalb in der Literatur teils als Hybrid aus Lipase und Esterase bezeichnet (Martinelle et al., 1995; Anderson et al., 1998). Das Enzym besitzt zudem eine Reihe weiterer vorteilhafter Merkmale. Die hydrophobe Substratbindetasche ermöglicht beispielsweise den reversiblen Umsatz von Triacylglyceriden, in dessen Folge sowohl an den primären als auch an der sekundären Hydroxylgruppe des Glycerins Ester gebildet bzw. hydrolysiert werden können. Viele kleinere Ester, Thioester und Amide werden im Vergleich zu Triacylglyceriden noch besser umgesetzt und beim Einsatz kurzkettiger Alkohole als Substrat ist eine klare Präferenz für sekundäre Hydroxylgruppen und somit eine ausgeprägte Regioselektivität zu erkennen (Anderson et al., 1998; Nelson et al., 1996). Die Lipase ist darüber hinaus sehr enantioselektiv, sodass sie ebenfalls zur Racematspaltung in industriellen Prozessen eingesetzt wird. Im wässrigen Milieu ist CalB über einen breiten pH-Bereich von 3,5 bis 9,5 stabil, während das pH-Optimum bei 7,0 liegt. Das Enzym ist ebenfalls gegenüber hohen Temperaturen stabil, da es – abhängig vom pH-Wert – erst bei Temperaturen zwischen 50 °C und 60 °C inaktiviert wird (Anderson et al., 1998). Es wurde sogar demonstriert, dass immobilisierte CalB nach einer Reaktionszeit von mehreren tausend Stunden noch aktiv war, obwohl die Lipase währenddessen Temperaturen zwischen 60 – 80 °C ausgesetzt war (Heldt-Hansen et al., 1989; Arroyo und Sinisterra, 1994). Wie zuvor in Abschnitt 1.6.1 erläutert, ist die Aktivität von Lipasen in fast wasserfreien Systemen von hoher Wichtigkeit. CalB weist sowohl in unpolaren als auch in polaren organischen Lösungsmitteln eine hohe Aktivität auf, was für die Löslichkeit hydrophiler Substanzen durchaus vorteilhaft sein kann (Anderson et al., 1998).

In Folge der ausgeprägten Enantio- und Regioselektivität, des breiten Substratspektrums und der hohen Stabilität gegenüber extremen Reaktionsbedingungen ist CalB heutzutage die am häufigsten eingesetzte Lipase weltweit (Poppe et al., 2013).

1.7 Vorarbeiten

Zur Untersuchung putativer Elektronentransferproteine aus *T. fusca* wurden im Vorfeld dieser Dissertation BLAST-Suchen von der Arbeitsgruppe Biokatalyse durchgeführt, um die Gensequenzen vermeintlicher Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen zu identifizieren. Die Suche nach

Ferredoxinen war bei Verwendung der Proteinsequenz von Putidaredoxin als Ausgangssequenz nicht erfolgreich. Daher wurde eine weitere BLAST-Suche mit den Proteinsequenzen verschiedener Ferredoxine aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) durchgeführt, welche zuvor beschrieben wurden (Chun et al., 2007; Lamb et al., 2002; Lei et al., 2004). Als Resultat dieser Suche wurden in *T. fusca* drei putative Ferredoxine identifiziert. Das *T. fusca*-Protein YP_288552 (Fdx 1) ist homolog zum *S. coelicolor* A3(2)-Ferredoxin NP_629284 (85 % Sequenzidentität), während YP_289538 (Fdx 2) und YP_289287 (Fdx 4) auf Basis der *S. coelicolor* A3(2)-Ferredoxine NP_625075 bzw. NP_631715 gefunden wurden. Die NCBI-Annotierung bestätigt im Fall von Fdx 1 und Fdx 2, dass es sich bei diesen Proteinen um Ferredoxine handelt. Es ist zudem interessant, dass das Gen für NP_625075 (SCO0773) im Genom von *S. coelicolor* A3(2) direkt neben dem Gen für die Fettsäurehydroxylase CYP105D5 (SCO0774) liegt. Chun et al. konnten darüber hinaus experimentell demonstrieren, dass das genannte Ferredoxin in der Lage ist, Elektronen auf CYP105D5 zu übertragen, wenngleich der Einsatz verschiedener heterologer Redoxpartner in Kombination mit diesem P450-Enzym zu besseren Umsätzen führte (Chun et al., 2007). Interessanterweise befindet sich auch im *T. fusca*-Genom das Gen des entsprechenden Ferredoxins Fdx 2 (Tfu_1479) unmittelbar neben dem Gen für CYP215A1 (Tfu_1478), einer bislang unerforschten Cytochrom P450 Monooxygenase.

Neben den oben erwähnten, über die BLAST-Suche identifizierten putativen Ferredoxinen wurde mit YP_288824 (Fdx 3) ein weiteres mutmaßliches Ferredoxin in *T. fusca* gefunden. Aufgrund seiner Kristallstruktur (PDB-Code 3BGU) ist es den Ferredoxin-ähnlichen Proteinen zuzuordnen (Joint Center for Structural Genomics, 2007).

Bei Verwendung der Proteinsequenz von Putidaredoxinreduktase als Ausgangssequenz für die BLAST-Suche nach Ferredoxinreduktasen konnten mit YP_290404 (FdR 5), YP_289288 (FdR 6) und YP_289971 (FdR 7) drei putative Ferredoxinreduktasen in *T. fusca* identifiziert werden. Im Fall von FdR 5 und FdR 6 bestätigt die NCBI-Annotierung, dass es sich um Ferredoxinreduktasen handelt, während FdR 7 (vermutlich fälschlicherweise) als Ferredoxin/Ferredoxin-NADP-Reduktase annotiert ist. FdR 6 ist dabei von besonderem Interesse, da sich das entsprechende Gen Tfu_1227 unmittelbar hinter dem Gen für das zuvor erwähnte Fdx 4 (Tfu_1226) befindet und diese Proteine folglich ein putatives Redoxpaar bilden. Das Fdx 4-Gen Tfu_1226 liegt wiederum direkt vor dem Gen Tfu_1225, welches für die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP217A1 codiert. Zudem sind diese drei Gene in einem putativen Polyketidsynthese-Operon lokalisiert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass CYP217A1 an der Polyketidsynthese beteiligt ist und dass FdR 6 und Fdx 4 die autologen Redoxpartner dieses P450-Enzyms sind. Neben den Genen für Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen wurde im Genom von *T. fusca* ebenfalls ein Gen (Tfu_3023) identifiziert, das

für ein Flavodoxin codiert. Dieses Protein (YP_291079) wurde über die entsprechende Annotierung in der NCBI-Datenbank ermittelt.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Maurer (2011) wurden anschließend die Gene der putativen Ferredoxine (Fdx 1 – 4) und Ferredoxinreduktasen (FdR 5 – 7) aus dem Genom von *T. fusca* kloniert. Dazu wurde zunächst *T. fusca* XY (Wildtyp, bereitgestellt von der DMSZ) kultiviert, um an das Genom zu gelangen. Das isolierte Bakteriengenom wurde anschließend als parentale DNA zur Amplifikation der Ferredoxin- und Ferredoxinreduktasegene mittels PCR eingesetzt. Die amplifizierten Gene wurden danach mit *Nde*I und *Hind*III verdaut und über enzymatische Ligation in die entsprechend geschnittenen Plasmide pIT2-MCS und pET28a(+) eingebracht. Die Vektoren wurden schließlich in die *E. coli*-Stämme TOP10 und C43 (DE3) transformiert. In der Folge wurde die heterologe Expression der verschiedenen Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen analysiert. Demnach konnte die Expression von zwei Ferredoxinen und allen Reduktasen erzielt werden, auch wenn nur Fdx 4, FdR 5 und FdR 7 zweifelsfrei in der löslichen Proteinfraction nachgewiesen werden konnten. Es wurden ebenfalls Aktivitätsassays durchgeführt, bei denen für FdR 5 und FdR 7, jedoch nicht für FdR 6 oder eines der Ferredoxine eine eindeutige Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Resultate der Aktivitätsbestimmungen der Ferredoxine sind allerdings aufgrund der hohen Hintergrundaktivität im zellfreien Extrakt nicht sehr verlässlich.

Darüber hinaus sind zwei weitere putative Gene (Tfu_1275 und Tfu_1273) für Redoxpartner im Genom von *T. fusca* vorhanden, welche zuvor bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vlada Urlacher (Institut für Biochemie II der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) aus dem Genom von *T. fusca* kloniert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Diese Gene codieren für YP_289336 (Fdx 8) und YP_289334 (FdR 9) und flankieren das Gen für CYP222A1 (Tfu_1274). Somit handelt es sich bei Fdx 8 und FdR 9 mit hoher Wahrscheinlichkeit um die natürlichen Elektronentransferpartner für CYP222A1.

1.8 Motivation und Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung verschiedener Ein- und Dreikomponenten-P450-Systeme für die Anwendung in der Biokatalyse. Dabei können die durchgeführten Arbeiten zwei Teilprojekten zugeordnet werden. Zum einen sollten die natürlichen Redoxpartner für das Dreikomponentensystem des attraktiven Biokatalysators CYP154H1 aus *T. fusca* identifiziert werden (siehe auch Abschnitt 1.5). Darüber hinaus sollten im Allgemeinen thermostabile Elektronentransfersysteme aus *T. fusca* untersucht werden, da diese ebenfalls für den Einsatz in Biokatalysen mit anderen Cytochrom P450 Monooxygenasen interessant sind. Innerhalb des zweiten Teilprojekts sollten neuartige bakterielle CYP102A1-homologe Cytochrom P450 Monooxygenasen und somit Vertreter des *self-sufficient* Einkomponentensystems der Klasse VIII

untersucht werden. Dabei war von Interesse, ob eine geringe Sequenzidentität der Hämdomäne mit einem unterschiedlichen Substratspektrum einhergeht.

Zur Identifizierung von thermostabilen Elektronentransferproteinen aus *T. fusca* sollten zunächst geeignete Expressions- und Aufreinigungsbedingungen für die verschiedenen putativen Redoxproteine etabliert werden. Die Aktivität der Proteine sollte zudem anhand geeigneter photometrischer Assays festgestellt werden. Im letzten und entscheidenden Schritt sollten verschiedene Kombinationen der putativen Elektronentransferkomponenten aus *T. fusca* in Biokatalysen mit verschiedenen Cytochrom P450 Monooxygenasen eingesetzt werden. Diese Versuche sollten zeigen, ob die eingesetzten Proteine dazu in der Lage sind, mit den P450-Enzymen zu kooperieren. Bei diesen Versuchsreihen standen die Umsatzexperimente mit CYP154H1 im Mittelpunkt, da – wie eingangs erwähnt – das natürliche Elektronentransfersystem des Enzyms herausgefunden werden sollte.

Um neue putative *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen zu finden, sollte zunächst eine BLAST-Suche durchgeführt werden. Dabei sollte die Sequenz der Hämdomäne von CYP102A1 (P450_{BM3}) als Ausgangssequenz dienen. Für weitere Untersuchungen sollten anschließend putative CYP102A1-homologe Enzyme mit geringer Sequenzidentität zur Hämdomäne von CYP102A1 identifiziert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die relativ geringe Sequenzidentität auch mit einem unterschiedlichen Substratspektrum einhergeht. Nach Auswahl von zwei geeigneten Enzymen, sollten geeignete Bedingungen zur heterologen Expression und Aufreinigung der putativen Cytochrom P450 Monooxygenasen gefunden werden. Daraufhin sollten die Enzyme charakterisiert werden. Dabei sollten zunächst allgemeine Eigenschaften wie Cofaktorpräferenz und Elektronentransferaktivität ermittelt werden. Anschließend sollten die putativen Cytochrom P450 Monooxygenasen bzgl. des Substratspektrums, der Selektivität und der Stabilität untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Biokatalysebedingungen optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gene und Proteine

Gene der putativen Elektronentransferproteine sowie der CYP154H1 aus *Thermobifida fusca*:

Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die während dieser Arbeit verwendeten Gene und entsprechenden Proteine aus *T. fusca*. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe der Website <http://web.expasy.org/protparam/> berechnet. Die Gen- und Proteinsequenzen können in der NCBI-Datenbank eingesehen werden.

Tabelle 2.1: Überblick über verwendete Gene und entsprechende Proteine aus *T. fusca*.

Gen	Länge	Protein	Abkürzung	Beschreibung	Länge	Molekulargewicht
<i>Accession</i> (NCBI)	bp	<i>Accession</i> (NCBI)	in dieser Arbeit	(putativ)	AS	ohne/mit His-Tag
Tfu_0491	318	YP_288552	Fdx 1	Ferredoxin	106	11,7 kDa/13,9 kDa
Tfu_1479	213	YP_289538	Fdx 2	Ferredoxin	71	7,5 kDa/9,6 kDa
Tfu_0763	288	YP_288824	Fdx 3	Ferredoxin	96	10,5 kDa/12,7 kDa
Tfu_1226	195	YP_289287	Fdx 4	Ferredoxin	64	7,1 kDa/9,3 kDa
Tfu_1275	192	YP_289336	Fdx 8	Ferredoxin	63	6,9 kDa/9,1 kDa
Tfu_3023	510	YP_291079	Fldx-s.	Flavodoxin	170	18,7 kDa/20,9 kDa
Tfu_3023*	582	YP_291079*	Fldx-s.-e.	Flavodoxin	194	20,3 kDa/22,5 kDa
Tfu_2348	1.200	YP_290404	FdR 5	Ferredoxinreduktase	400	42,7 kDa/44,9 kDa
Tfu_1227	1.242	YP_289288	FdR 6	Ferredoxinreduktase	414	44,2 kDa/46,3 kDa
Tfu_1915	1.377	YP_289971	FdR 7	Ferredoxinreduktase	459	49,7 kDa/51,9 kDa
Tfu_1273	1.191	YP_289334	FdR 9	Ferredoxinreduktase	395	42,3 kDa/44,5 kDa
Tfu_2802	1.230	YP_290858	CYP154H1	Cytochrom P450 Monooxygenase	409	45,9 kDa/48,0 kDa

*Es wurde zudem mit einer am 5'-Ende verlängerten Genvariante gearbeitet.

Die Gene für Fdx 1 – 4 und für FdR 5 – 7 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Angela Maurer (2011) mit Hilfe von PCR aus dem Genom von *T. fusca* isoliert, während die Gensequenzen für Fdx 8 und FdR 9 von Prof. Dr. Vlada Urlacher (Institut für Biochemie II der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden. Für die Arbeiten mit dem für das putative Flavodoxin-kodierenden Gen wurde eine synthetische, für die Expression in *E. coli* optimierte Sequenz bei GeneArt® bestellt (Tfu_3023-synth). Zudem wurde von diesem Gen eine am 5'-Ende verlängerte Variante durch PCR erzeugt (Tfu_3023-synth-elong). Die entsprechenden Sequenzen sind im Abschnitt 7 hinterlegt. Die Gensequenz für CYP154H1 wurde bereits von Schallmeyer et al. mittels PCR

aus genomischer DNA isoliert, in die Plasmide pIT2 und pET28a(+) eingebracht und in dieser Form bereitgestellt (Schallmey et al., 2011).

Gene von bakteriellen *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen:

Wie in Tabelle 2.2 aufgeführt, wurden die Gensequenzen von zwei putativen *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *Azorhizobium caulinodans* bzw. *Nakamurella multipartia* als synthetische, für die Expression in *E. coli* optimierte Sequenzen bei GeneArt® bestellt. Vom CYP102K1-Gen wurde zudem eine 3'-verkürzte Version durch PCR erzeugt, um die Häm-Domäne des Enzyms (CYP102K1-HD) zu erlangen. Des Weiteren wurden wiederum mittels PCR sowohl vom CYP102K1-Volllängen-Gen als auch vom entsprechenden Häm-Domänen-Gen 5'-verkürzte Varianten hergestellt (N'-short-CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1-HD). Die Gen- und Proteinsequenzen sind unter Abschnitt 7 dargelegt.

Tabelle 2.2: Übersicht über Gene bzw. Proteine aus *Azorhizobium caulinodans* und *Nakamurella multipartia*.

Gen	Länge	Protein	Abkürzung	Beschreibung	Länge	Molekulargewicht
<i>Accession</i> (NCBI)	bp	<i>Accession</i> (NCBI)	in dieser Arbeit	(putativ)	AS	ohne/mit His- Tag
AZC_3520	3.477	YP_001526436	CYP102K1	Cytochrom P450 Monooxygenase	1.158	123,3 kDa/ 125,5 kDa
AZC_3520*	1.722	YP_001526436*	CYP102K1-HD	Cytochrom P450 Monooxygenase	573	62,8 kDa/ 65,0 kDa
AZC_3520*	3.237	YP_001526436*	N'-short- CYP102K1	Cytochrom P450 Monooxygenase	1.078	115,3 kDa/ 117,5 kDa
AZC_3520*	1.482	YP_001526436*	N'-short- CYP102K1-HD	Cytochrom P450 Monooxygenase	493	54,8 kDa/ 56,0 kDa
Namu_2602	3.291	YP_003201943	CYP102 _{Nmu}	Cytochrom P450 Monooxygenase	1.096	117,5 kDa/ 119,7 kDa

*Es wurde zudem mit verkürzten Genvarianten gearbeitet.

Gene weiterer Cytochrom P450 Monooxygenasen und Elektronentransferproteine:

Des Weiteren wurden die Gene für CYP154C5, CYP106A2 sowie für Putidaredoxin und Putidaredoxin-Reduktase verwendet. Alle hier aufgeführten Konstrukte wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit angefertigt und wurden entsprechend in dieser Form zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt pIT2_cyp154c5 zur Expression von CYP154C5 aus *Nocardia farcinica* (410 AS, NCBI-*Accession*: YP_121526) wurde von Bracco et al. (2013) angefertigt.

Das Gen für CYP106A2 (410 AS, NCBI-*Accession*: 2009359A) wurde mit Hilfe von PCR und dem Vektor pJNNcyp106A2camAB(t) (zur Verfügung gestellt von Dr. Harald Ruijsenaars, TNO, Delft, Niederlande (Ruijsenaars et al., 2007)) amplifiziert und anschließend in den pIT2-MCS-Vektor kloniert.

Das Konstrukt pACYC_CamAB zur Coexpression der Redoxpartner Putidaredoxinreduktase PdR (422 AS, *Accession*: P16640) und Putidaredoxin Pdx (107 AS, *Accession*: P00259) aus *Pseudomonas putida* wurde von Schallmeyer et al. (2011) angefertigt.

2.1.2 Primer

Sämtliche verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Alle Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt, oder wurden bei GATC Biotech direkt für die Sequenzierung in Auftrag gegeben.

Tabelle 2.3: Liste sämtlicher verwendeter Primer.

Name	Richtung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Anzahl Basen	T _m [°C]
T7_Fw	Vorwärts	TAATACGACTCACTATAGGG	20	53.2
T7_Rv	Rückwärts	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	19	56.7
Aca_Fwd2	Vorwärts	CGCATCGTTGAGGTGGCA	18	53.5
Aca_Fwd3	Vorwärts	TGAACGCATCTTCGTGTCC	19	50.9
Aca_Fwd4	Vorwärts	TGCGGCGGGTGACTATGA	18	53.7
Nmu_Fwd2	Vorwärts	GAGAGTGC GGAAGTCCTG	18	50.3
Nmu_Fwd3	Vorwärts	GTGTTAGTGCAGGCACCG	18	51.1
Nmu_Fwd4	Vorwärts	CGAGGCGTGGGTTCGTAG	18	53.1
F2	Vorwärts	ATGCCATAGCATTTTTATCC	20	48.4
R2	Rückwärts	CTGATTTAATCTGTATCAGG	20	45.2
pBAD-FP	Vorwärts	ATGCCATAGCATTTTTATCC	20	50.2
pTrcHis-RP	Rückwärts	CTGATTTAATCTGTATCAGG	20	45.6
pIT2_Fw	Vorwärts	ACTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCG	25	57.3
pIT2_Rv	Rückwärts	GCCCTGCAAAGTAACTGGATGGC	24	57.3
Fld-synth_XhoI	Rückwärts	TGGTGCTCGAGACGGGTAACCATGGTCAGC	30	64.9
pIT2_Fw_neu	Vorwärts	GCACTCCCGTTCTGGATAATG	21	51.8
pIT2_Rv_neu	Rückwärts	AGACCGCTTCTGCGTTCTG	19	53.8
N'-Fld-Primer	Vorwärts	TTACGACATATGCCGTCTTACCAGGTC ACTACCGGCCGTCGCCTGTAGGTGACA CCGGTCACGGTTTCGGTCGTCACGACA TGCTGGTGATGATTGGTTATGCAAGC	96	73.7
Rv_AcP450-Heme	Rückwärts	GACGAATTCTTACGCACCTTGGGTCTTCG	29	62.4
Fw_N'BspHI-fdr6	Vorwärts	GCCTCATGACCGCGCCCGCC	20	63.0
pACYC_Fw_T7.1	Vorwärts	TCTCCCTTATGCGACTCCT	19	50.6
pACYC_Rv_T7.1	Rückwärts	ATACGATTACTTTCTGTTCG	20	48.0
pACYC_Fw_T7.2	Vorwärts	GAACAGAAAGTAATCGTAT	19	42.8
pACYC_Rv_T7.2	Rückwärts	CAGCGGTTTCTTTACCAGAC	20	49.7
N'-shortened-CYP102K1	Vorwärts	AGGTCATATGCCTAGTAGTGCAGC	24	64.4

2.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit genutzten Plasmide samt Selektionsmarker und Herkunft sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Genutzte Expressions- und Klonierungsplasmide.

Plasmid	Resistenz	Herkunft
pMA	Ampicillin	GeneArt®
pMK	Kanamycin	GeneArt®
pBAD-N	Ampicillin	Jin et al., 2008
pET22b(+)	Ampicillin	Merck Millipore
pET28a(+)	Kanamycin	Merck Millipore
pET42b(+)	Kanamycin	Merck Millipore
pIT2-MCS	Tetracyclin	Bracco et al., 2013
pACYCDuet™-1	Chloramphenicol	Merck Millipore

In den Plasmiden pMA und pMK wurden die synthetischen Gene geliefert, welche bei GeneArt® bestellt wurden. Der Arabinosepromotor-haltige Vektor pBAD-N ist eine Plasmidvariante des kommerziellen Vektors pBAD/myc-HisA von Invitrogen (Carlsbad, USA), in die eine *NdeI* Restriktionsschnittstelle anstelle der *NcoI* Restriktionsschnittstelle eingebracht wurde (Jin et al., 2008). Mit diesem Plasmid wurde die Expression des CYP102_{Nmu}-Gens und des Fldx-s.-Gens ohne His-Tag getestet. pET22b(+) wurde für einige Expressionstests (Fdx 1-, Fdx 2-, Fdx 4-, Fdx 8-, FdR 9-Gen) verwendet. Alle pET22b(+)-Vektoren wurden von Dr. Vlada Urlacher (Institut für Biochemie II der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. pET28a(+) wurde als Standardexpressionsplasmid genutzt. So wurden sämtliche Proteine aus *T. fusca*, als auch die bakteriellen *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen und CYP154H1 unter Nutzung dieses Plasmids produziert. Durch die Verwendung der *NdeI* Schnittstelle in pET28a(+) besitzen die entsprechenden Proteine alle einen N-terminalen His-Tag. Das Plasmid pET42b(+) wurde als Alternative zu pET28a(+) eingesetzt, da über die Wahl der Schnittstelle am 3'-Ende des Gens (und entsprechend im Vektor) das Vorhandensein eines C-terminalen His-Tags am resultierenden Protein gesteuert werden kann. Zwar bietet pET22b(+) dieselbe Möglichkeit, allerdings enthält dieser – anders als pET42b(+) – kein favorisiertes Kanamycin-Resistenzgen, sondern ein Ampicillin-Resistenzgen. pET42b(+) wurde somit für die Herstellung des Flavodoxins mit und ohne C-terminalen His-Tag sowie der CYP102K1-Häm-Domäne ohne His-Tag genutzt. Schallmeyer et al. erzeugten das pIT2-MCS-Plasmid, welches ein Tetracyclinresistenzgen trägt (Schallmeyer et al., 2011). Dieses Plasmid wurde zusammen mit einem pET-Vektor zur Coexpression von potentiellen Redoxpaare aus *T. fusca* sowie zur Coexpression verschiedener Cytochrom P450 Monooxygenasen

zusammen mit verschiedenen Redoxpartnern (in pACYCDuet™-1) eingesetzt. Außerdem wurden die Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP154H1, CYP154C5 und CYP106A2 mit Hilfe dieses Vektors hergestellt. Die oben beschriebenen Plasmide pET22b(+), pET28a(+) sowie pET42b(+) verfügen alle über einen T7-Promotor. Das pACYCDuet™-1-Plasmid besitzt dagegen zwei T7-Promotoren zur gleichzeitigen Expression zweier Proteine. Entsprechend wurde dieses Plasmid zur Coexpression potentieller Redoxpartner verwendet (Pdx/PdR sowie Fdx 4/FdR 6). Das pIT2-MCS-Plasmid verfügt einen mit IPTG-induzierbaren trc-Promotor. Vektorkarten aller verwendeten Plasmide sind in Abschnitt 7.3 dargestellt.

2.1.4 Bakterienstämme

In Tabelle 2.5 sind alle Bakterienstämme aufgeführt, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

Tabelle 2.5: Genutzte Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Thermobifida fusca</i> XY	Wildtyp	DMSZ
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Novagen
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Lucigen

E. coli DH5α diente zur Klonierung, Stammhaltung und Isolation von Plasmiden. *E. coli* TOP10 wurde zu denselben Zwecken und zusätzlich für die zur Expression mancher Proteine eingesetzt. Die Stämme *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* C43 (DE3) wurden standardmäßig zur Expression verwendet.

2.1.5 Enzyme

In Tabelle 2.6 sind diejenigen Enzyme aufgelistet, welche gekauft, oder nicht eigenhändig produziert und zur Verfügung gestellt wurden. Zusätzlich wurden alle Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer bei NEB bestellt.

Tabelle 2.6: Kommerzielle und anderweitig bereitgestellte Enzyme.

Bezeichnung	Name	Aktivität	Puffer	Herkunft
Klonierung und PCR				
Ligase	T4-DNA Ligase	400 U/μL	10x T4-DNA Ligase-Puffer	NEB
DNA-Polymerase	High Fidelity Phusion-Polymerase (F-530)	2 U/μL	5x Phusion HF- oder GC-Puffer	Finnzymes

DNA-Polymerase	Taq-Polymerase	5 U/ μ L	10x Taq-Polymerase-Puffer	Lehrstuhl-Eigenproduktion
Kofaktor-Regenerierung				
Thermostabile, NAD ⁺ -abhängige FDH	Formiatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. („PseFDH“)	Ca. 80 U/mL	100 mM KP _i -Puffer (pH 7,0); 4 mM EDTA; 1,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Institut für Biochemie II, Universität Düsseldorf
NADP ⁺ - und NAD ⁺ -abhängige GDH	Glucosedehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. („GDH“)	≥ 200 U/mg	/	Sigma-Aldrich
NADP ⁺ -abhängige GDH	Glucosedehydrogenase IV aus <i>Bacillus megaterium</i> („GDH IV“)	Ca. 700 U/mL	50 mM NaP _i -Puffer (pH 6,5); 2 M NaCl	Institut für Biochemie II, Universität Düsseldorf
Biokatalyse				
CalB	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> hergestellt mit <i>Aspergillus niger</i> , immobilisiert mit Acryl-Harz	≥ 5.000 U/mg	/	Sigma-Aldrich
Cytochrom P450 Monooxygenase	CYP154C5 aus <i>Nocardia farcinica</i>	-	50 mM KP _i -Puffer (pH 7,4) + 10 % Glycerin	Bereitgestellt von Paula Bracco
Putidaredoxin-reduktase	Putidaredoxinreduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>	Ca. 500 U/mL	50 mM KP _i -Puffer (pH 7,4) + 10 % Glycerin	Bereitgestellt von Paula Bracco
Putidaredoxin	Putidaredoxin aus <i>Pseudomonas putida</i>	Ca. 3 U/mL	50 mM KP _i -Puffer (pH 7,4) + 10 % Glycerin	Bereitgestellt von Paula Bracco
Sonstige Enzyme				
Katalase	Katalase aus Rinderleber	≥ 2.000 U/mg	/	Sigma-Aldrich
Katalase-Lösung	Katalase aus <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Ca. 115 kU/mL	n. b.	Sigma-Aldrich
Superoxid Dismutase	Superoxid Dismutase aus Rindererythrozyten	≥ 3.000 U/mg	/	Sigma-Aldrich

2.1.6 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, von Sigma-Aldrich, Merck, AppliChem, Carl Roth, Thermo Scientific, ABCR und TCI Europe bezogen.

2.1.7 Medien

Alle Medien wurden standardmäßig in destilliertem Wasser angesetzt und zum Sterilisieren für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

LB-Medium

NaCl	5 g/L
Pepton/Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	10 g/L

Falls erforderlich, wurde der pH-Wert durch Zugabe von 1 M NaOH oder 1 M HCl auf 6,7 – 7,0 eingestellt. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 10 g/L Agar zum Medium hinzugefügt. Falls benötigt, wurden Antibiotika nach dem Abkühlen des LB-Agars auf unter 50 °C und vor dem Gießen der Platten hinzugegeben.

TB-Medium

<u>Medienkomponenten</u>		<u>Kaliumphosphatpuffer</u>	
Glycerin	4 g/L	KH ₂ PO ₄	2,31 g/L
Pepton/Trypton	12 g/L	K ₂ HPO ₄	12,54 g/L
Hefeextrakt	24 g/L		

Die Medienkomponenten wurden in 80 %, die Puffersalze in 20 % des gewünschten Volumens angesetzt. Anschließend wurden die beiden Lösungen getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen vereinigt.

TB-S-Medium

<u>Medienkomponenten</u>		<u>Kaliumphosphatpuffer</u>	
Glycerin	8 g/L	KH ₂ PO ₄	4,62 g/L
Pepton/Trypton	24 g/L	K ₂ HPO ₄	25,08 g/L
Hefeextrakt	48 g/L		

Zur Herstellung dieses Mediums wurde doppelt-konzentriertes TB-Medium 1:1 mit einer 1 M Sorbitollösung (227,9 g/L) gemischt. Zuvor wurden alle Lösungen getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen unter sterilen Bedingungen vereinigt.

SOB-Medium

NaCl	0,5 g/L
Pepton/Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L

Die Komponenten wurden in 450 mL destilliertem Wasser gelöst, bevor 5 mL 250 mM KCl-Lösung zugegeben wurden. Daraufhin wurde der pH-Wert mit Hilfe von 5 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Dann wurden 500 mL destilliertes Wasser mit dem Medium vereinigt und der Ansatz autoklaviert. Sobald das Medium abgekühlt war, wurden 2,5 mL sterile 2 M MgCl₂-Lösung hinzupipettiert.

SOC-Medium

NaCl	2 g/L
KCl	2 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Bacto-Trypton	10 g/L

Zunächst wurden alle Bestandteile in 960 mL ddH₂O gelöst und autoklaviert. Daraufhin wurden unter sterilen Bedingungen 10 mL sterile 1 M MgSO₄-Lösung, 10 mL sterile 1 M MgCl₂-Lösung sowie 20 mL sterilfiltrierte ($\emptyset$ 0,2 μ M) 1 M Glucoselösung hinzugefügt.

2.1.8 Puffer und Lösungen**Agarosegelelektrophorese****5 % Farbstoff für DNA-Ladepuffer**

Xylencyanol FF	50 mg/mL
Bromphenolblau R250	50 mg/mL

Die Komponenten wurden in 1 mL destilliertem Wasser gelöst.

6x DNA-Ladepuffer

50x TAE-Puffer	120 μ L	c_f (Tris) = 0,24 M, c_f (Essigsäure) = 0,12 M, c_f (EDTA) = 60 mM
Glycerin	600 μ L	
5 % Farbstoff	5 μ L	
		siehe oben

Alle Komponenten wurden gemischt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1 mL aufgefüllt.

50x TAE-Puffer

Tris-HCl	242,28 g/L	c_f = 2 M
Essigsäure	57,1 mL/L	c_f = 1 M

Die Pufferkomponenten wurden in 800 mL destilliertem Wasser gelöst, bevor 100 mL 0,5 M EDTA-Lösung dazugegeben wurden. Daraufhin wurde ein pH-Wert von 8,5 eingestellt und der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Antibiotika-Stammlösungen**1.000x Ampicillin-Stammlösung**

Ampicillin	100 mg/mL
------------	-----------

Das Antibiotikum wurde in ddH₂O gelöst, mittels eines Spritzenfilters ($\emptyset$ = 0,2 μ m) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

1.000x Chloramphenicol-Stammlösung

Chloramphenicol | 25 mg/mL

Das Antibiotikum wurde in 70 % Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert.

1.000x Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin | 100 mg/mL

Das Antibiotikum wurde in ddH₂O gelöst, mittels eines Spritzenfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

1.000x Tetracyclin-Stammlösung

Tetracyclin | 10 mg/mL

Das Antibiotikum wurde in 70 % Ethanol gelöst und bei -20 °C gelagert.

Expression1.000x δ -ALA-Stammlösung δ -ALA-Hydrochlorid | 83,7 mg/mL | $c_f = 0,5 \text{ M}$

Nach dem Lösen des Feststoffes in ddH₂O wurde die Stammlösung mittels eines Spritzenfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Arabinose-StammlösungL-Arabinose | 0,2 mg/mL | $c_f = 20 \%$

Nach dem Lösen des Feststoffes in ddH₂O wurde die Stammlösung mittels eines Spritzenfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

IPTG-StammlösungIPTG | 95,3 mg/mL | $c_f = 0,4 \text{ M}$

Nach dem Lösen des Feststoffes in ddH₂O wurde die Stammlösung mittels eines Spritzenfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Teilweise wurden auch 0,5 M und 0,8 M IPTG-Stammlösungen genutzt.

PMSF-StammlösungPMSF | 17,4 mg/mL | $c_f = 0,1 \text{ M}$

Der Feststoff wurde in 70 % Ethanol mit Hilfe des Ultraschallbads (Sonorex Super RK 106 von Bandelin) gelöst und bei 4 °C gelagert.

1.000x Spurenelemente-Stammlösung

MnSO ₄ · H ₂ O	0,10 g/L
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,16 g/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18 g/L
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,18 g/L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,50 g/L
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	16,70 g/L
Na ₂ -EDTA	20,10 g/L

Die Bestandteile wurden in 1 L ddH₂O gelöst und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Extraktionsmittel für BiokatalysenEthylacetat mit 5 % Dodecan (v/v)

Ethylacetat	47,5 mL
Dodecan	2,5 mL

Teilweise wurde ebenfalls Ethylacetat mit 0,5 % Dodecan eingesetzt.

Diethylether mit 1 mM Decansäure

Diethylether	49,5 mL	c _f = 1 mM
0,1 M Decansäure	0,5 mL	

Färbereagenzien für die DCPhosphomolybdänsäure-Reagenz

Phosphomolybdänsäure	2,5 g
Ce(SO ₄) ₂	1,0 g
Konz. H ₂ SO ₄	8,0 mL
Destilliertes Wasser	92 mL

Zunächst wurden zu den festen Komponenten 50 mL destilliertes Wasser zugefügt und die Schwefelsäure unter Rühren langsam zugegeben. Dann wurde mit destilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt und die Mischung so lange unter lichtgeschützten Bedingungen gerührt, bis alle Bestandteile vollständig gelöst waren. Das Reagenz wurde ebenfalls lichtgeschützt gelagert.

Kaliumpermanganat-Reagenz

KMnO ₄	1,5 g
K ₂ CO ₃	10 g
5 % NaOH (w/v)	2,5 mL
Destilliertes Wasser	150 mL

Nach dem Ansetzen des Reagenzes wurde es lichtgeschützt gelagert.

Herstellung kompetenter ZellenBEDS ohne DTT

Bicin	0,082 g	c _f = 10 mM
Sorbitol	9,11 g	c _f = 1 M
Ethylenglycol	1,5 mL	
DMSO	2,5 mL	

Zunächst wurden Bicin und Sorbitol in 40 mL destilliertem Wasser gelöst und durch Zugabe von 1 M NaOH ein pH-Wert von 8,3 eingestellt. Dann wurden Ethylenglycol und DMSO dazupipettiert und mit destilliertem Wasser ein Endvolumen von 50 mL eingestellt. Der Puffer wurde schlussendlich mit Hilfe eines Spritzenfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert.

BEDS mit DTT

Bicin	0,082 g	c _f = 10 mM
Sorbitol	9,11 g	c _f = 1 M
DTT	7,71 g	c _f = 1 M
Ethylenglycol	1,5 mL	
DMSO	2,5 mL	

Zunächst wurden Bicin, Sorbitol sowie DTT in 40 mL destilliertem Wasser gelöst und es wurde durch Zugabe von 1 M NaOH ein pH-Wert von 8,3 eingestellt. Dann wurden Ethylenglycol und DMSO dazupipettiert und es wurde mit destilliertem Wasser ein Endvolumen von 50 mL eingestellt. Der Puffer wurde schlussendlich mit Hilfe eines Spritzenfilters ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert.

RF1-Puffer

RbCl ₂	0,48 g	c _f = 100 mM
Kaliumacetat	0,117 g	c _f = 30 mM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,0588 g	c _f = 10 mM
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,3958 g	c _f = 50 mM
Glycerin	6 g	

Alle Komponenten wurden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst und es wurde mit Essigsäure ein pH-Wert von 5,8 eingestellt. Daraufhin wurde der Puffer mit Hilfe eines Spritzenfilter ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert.

RF2-Puffer

MOPS	0,083 g	$c_f = 10 \text{ mM}$
RbCl ₂	0,48 g	$c_f = 10 \text{ mM}$
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,411 g	$c_f = 75 \text{ mM}$
Glycerin	6 g	

Alle Komponenten wurden in 40 mL destilliertem Wasser gelöst und es wurde mit Essigsäure ein pH-Wert von 5,8 eingestellt. Daraufhin wurde der Puffer mit Hilfe eines Spritzenfilter ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert.

Proteinaufreinigung

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Bindepuffer

KH ₂ PO ₄	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K ₂ HPO ₄	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KCl	37,28 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$

Durch Zugabe von 1 M H₃PO₄ wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Elutionspuffer

KH ₂ PO ₄	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K ₂ HPO ₄	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$

Mit Hilfe von 1 M H₃PO₄ wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

Lysepuffer I

NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0,51 g/L	$c_f = 3,4 \text{ mM}$
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	5,84 g/L	$c_f = 16,6 \text{ mM}$
NaCl	29,22 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$
Imidazol	1,36 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$

Mit Hilfe von 1 M H₃PO₄ wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Waschpuffer

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,51 g/L	$c_f = 3,4 \text{ mM}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	5,84 g/L	$c_f = 16,6 \text{ mM}$
NaCl	29,22 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$
Imidazol	2,72 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$

Durch Zugabe von 1 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Elutionspuffer I

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,51 g/L	$c_f = 3,4 \text{ mM}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	5,84 g/L	$c_f = 16,6 \text{ mM}$
NaCl	29,22 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$
Imidazol	34,05 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$

Mit Hilfe von 1 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Lysepuffer II

KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KCl	37,28 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$
Imidazol	0,68 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$

Durch Zugabe von 5 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Elutionspuffer II

KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KCl	37,28 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$
Imidazol	34,05 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$

Mit Hilfe von 5 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Kationen- und AnionenaustauschchromatographieBindepuffer I

KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$

Durch Zugabe von 1 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Elutionspuffer I

KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KCl	37,28 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$

Mit Hilfe von 1 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Bindepuffer II

KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$

Durch Zugabe von 1 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Elutionspuffer II

KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KCl	37,28 g/L	$c_f = 500 \text{ mM}$

Mit Hilfe von 1 M H_3PO_4 wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

SDS-PAGE1,5 M Tris-HCl-SDS-Gel-Puffer, pH 8,8

Tris	181,5 g/L	$c_f = 1,5 \text{ M}$
------	-----------	-----------------------

Durch Zugabe von 1 M HCl wurde ein pH-Wert von 8,8 eingestellt.

3 M Tris-HCl-SDS-Gel-Puffer, pH 8,45

Tris	363 g/L	$c_f = 3 \text{ M}$
SDS	3 g/L	

Durch Zugabe von 1 M HCl wurde ein pH-Wert von 8,45 eingestellt.

1 M Tris-HCl-SDS-Gel-Puffer, pH 6,8

Tris	121,1 g/L	$c_f = 1 \text{ M}$
------	-----------	---------------------

Durch Zugabe von 1 M HCl wurde ein pH-Wert von 6,8 eingestellt.

4x SDS-PAGE-Ladepuffer

Tris-HCl	1,82 g	$c_f = 1 \text{ M}$
Glycerin	1,5 mL	
SDS	0,30 g	
Bromphenolblau R250	0,15 g	
DTT	0,23 g	$c_f = 0,1 \text{ M}$

Die Komponenten werden in 15 mL destilliertem Wasser gelöst und der Ladepuffer bei -20 °C gelagert.

5x Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer

Tris	15 g/L	$c_f = 0,1 \text{ M}$
Glycin	94 g/L	
10 % SDS-Lösung	50 mL/L	

5x Tris-Tricin-Kathodenpuffer

Tris	60,55 g/L	$c_f = 0,5 \text{ M}$
Tricin	89,60 g/L	
SDS	5,00 g/L	

5x Tris-Tricin-Anodenpuffer

Tris-HCl	112,1 g/L	$c_f = 1 \text{ M}$
----------	-----------	---------------------

Durch Zugabe von 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 8,9 eingestellt.

Färbelösung

Methanol	500 mL/L
Destilliertes Wasser	400 mL/L
Essigsäure	100 mL/L
Coomassie Brilliant Blue R-250	1 g/L

Zunächst wurde der Farbstoff in Methanol gelöst und dann das destillierte Wasser und die Essigsäure dazugegeben.

Entfärbelösung

Ethanol	300 mL/L
Destilliertes Wasser	600 mL/L
Essigsäure	100 mL/L

Depotlösung

Destilliertes Wasser	900 mL/L
Essigsäure	100 mL/L

Western Blot**10x TBS-Puffer, pH 7,4**

Tris-HCl	60,57 g/L	$c_f = 0,5 \text{ M}$
NaCl	87,66 g/L	$c_f = 1,5 \text{ M}$

Durch Zugabe von 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

1x TBST-Puffer

10x TBS-Puffer, pH 7,4	100 mL/L	$(c_f(\text{Tris-HCl}) = 50 \text{ mM}, c_f(\text{NaCl}) = 150 \text{ mM})$
Tween 20	0,5 mL/L	
Destilliertes Wasser	899,5 mL/L	

10x Transferpuffer

Tris-HCl	30,29 g/L	$c_f = 0,25 \text{ M}$
Glycin	144,13 g/L	$c_f = 1,92 \text{ M}$

Durch Zugabe von 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 8,9 eingestellt.

1x Transferpuffer

10x Transferpuffer	100 mL/L	$(c_f(\text{Tris-HCl}) = 25 \text{ mM}, c_f(\text{NaCl}) = 192 \text{ mM})$
Methanol	200 mL/L	
Destilliertes Wasser	700 mL/L	

Weitere Puffer**20 mM Acetat-Puffer, pH 5,0 oder 5,5**

Essigsäure	1,20 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$
Natriumacetat-Trihydrat	2,72 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$

Beide Bestandteile wurden als separate 20 mM-Lösungen angesetzt und durch Mischen beider Lösungen wurde ein pH-Wert von 5,0 bzw. 5,5 eingestellt.

100 mM Acetat-Puffer, pH 5,5

Essigsäure	6,01 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$
Natriumacetat-Trihydrat	13,61 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$

Beide Bestandteile wurden als separate 100 mM-Lösungen angesetzt und durch Mischen beider Lösungen wurde ein pH-Wert von 5,5 eingestellt.

20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 – 7,5

K_2HPO_4	3,48 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$
KH_2PO_4	2,72 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$

Die beiden Bestandteile wurden als separate 20 mM-Lösungen angesetzt und durch Mischen beider Lösungen wurde ein pH-Wert von 6,0, 6,5 oder 7,0 bzw. 7,5 eingestellt.

50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4

K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$

Durch das Verhältnis der Komponenten betrug der pH-Wert in der Regel 7,4. Bei Abweichungen wurde der pH-Wert entsprechend mit 1 M H_3PO_4 oder mit 1 M KOH korrigiert.

50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM NaCl, pH 7,4

K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
NaCl	5,24 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$

Durch das Verhältnis der Komponenten betrug der pH-Wert in der Regel 7,4. Bei Abweichungen wurde der pH-Wert entsprechend mit 1 M H_3PO_4 oder mit 1 M KOH korrigiert.

50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 20 mM NaCl, pH 7,4

K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
NaCl	1,06 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$

Durch das Verhältnis der Komponenten betrug der pH-Wert in der Regel 7,4. Bei Abweichungen wurde der pH-Wert entsprechend mit 1 M H_3PO_4 oder mit 1 M KOH korrigiert.

50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM KCl und 5 % Glycerin (v/v), pH 7,4

K_2HPO_4	6,98 g/L	$c_f = 40 \text{ mM}$
KH_2PO_4	1,35 g/L	$c_f = 10 \text{ mM}$
KCl	7,46 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$
Glycerin	50,0 mL/L	$c_f = 5 \% \text{ (v/v)}$

Durch das Verhältnis der Komponenten betrug der pH-Wert in der Regel 7,4. Bei Abweichungen wurde der pH-Wert entsprechend mit 1 M H_3PO_4 oder mit 1 M KOH korrigiert.

100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 oder 7,5

K_2HPO_4	17,42 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$
KH_2PO_4	13,61 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$

Beide Bestandteile wurden als separate 100 mM-Lösungen angesetzt und durch Mischen beider Lösungen wurde ein pH-Wert von 6,5 bzw. 7,5 eingestellt.

50 mM MOPS-Puffer, pH 7,0

MOPS	10,50 g/L	$c_f = 50 \text{ mM}$
------	-----------	-----------------------

Durch Zugabe von 1 M NaOH wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

100 mM MOPS-Puffer, pH 7,0

MOPS	21,00 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$
------	-----------	------------------------

Durch Zugabe von 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5

$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	17,80 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	15,60 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$

Beide Komponenten wurden als getrennte 100 mM-Lösungen angesetzt und durch Mischen beider Lösungen wurde der pH-Wert des Puffers auf 6,5 eingestellt.

20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 oder 8,5

Tris-HCl	3,15 g/L	$c_f = 20 \text{ mM}$
----------	----------	-----------------------

Durch Zugabe von 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 8,0 oder 8,5 eingestellt.

100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 oder 8,5

Tris-HCl	15,76 g/L	$c_f = 100 \text{ mM}$
----------	-----------	------------------------

Durch Zugabe von 5 M NaOH wurde ein pH-Wert von 8,0 oder 8,5 eingestellt.

Sonstige Lösungen

0,8 % Agarose	8 mg/mL in TAE-Puffer
Cytochrom c	10 mg/mL
1 M Glucose	180 mg/mL
10 mM KHCF(III)	3,30 mg/mL
5 mM NADH	3,32 mg/mL
5 mM NADPH	3,73 mg/mL
10 mM NAD^+	6,63 mg/mL

10 mM NADP ⁺	7,44 mg/mL
150 mM Na-Formiat	10,2 mg/mL

2.1.9 Substrat-Stammlösungen für die Biokatalyse

0,1 M β -Jonon	20,3 μ L/mL in DMSO
1 M Ethylbenzol	123 μ L/mL in Ethanol
0,5 M Styrol	57,5 μ L/mL in Ethanol
0,1 M Decansäure	17,6 mg/mL in DMSO
0,1 M Undecansäure	19,0 mg/mL in DMSO
0,1 M Dodecansäure	20,0 mg/mL in DMSO
0,1 M Tridecansäure	21,9 mg/mL in DMSO
0,1 M Tetradecansäure	22,8 mg/mL in DMSO
0,1 M Pentadecansäure	24,2 mg/mL in DMSO
0,1 M 12-Tridecensäure	21,2 mg/mL in DMSO
0,1 M Succinylsäuremonooctylester	23,0 mg/mL in DMSO
0,1 M Pimelinsäuremonopentylester	24,8 μ L/mL in DMSO
0,05 M Progesteron	15 mg/mL in 36 % CYD

2.1.10 Geräte

ÄKTAprime™ und ÄKTapurifier™	GE Healthcare
Biophotometer plus	Eppendorf
BioView-Transilluminator (USDF-20ML-8R)	Biostep
CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer	Varian
CO-Begasungssystem Lecture Bottle Station	Aldrich
Concentrator plus	Eppendorf
EmulsiFlex-C3 (Hochdruckhomogenisator)	Avestin Europe GmbH
Eppendorf Centrifuge 5424 (Rotor: FA-45-24-11)	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5415 R (Rotor: F-45-24-11)	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5810R (Rotor: A-4-81)	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5810R (Rotor: F-34-6-38)	Eppendorf
GC2010 plus mit AOC-20i-Injektor	Shimadzu
GCMS-QP2010 S mit AOC-20i-Injektor	Shimadzu
Gel Doc™ XR+ System	Biorad
Mastercycler® pro	Eppendorf

NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer	peqlab
Prominence UFLC (Module: CBM-20A, SPD-M20A, CTO-20AC, SIL-20AC HT, 2 x LC-20AD)	Shimadzu
Sorvall RC6+ Centrifuge (Rotoren: SS34 und F10S-6X500Y)	Thermo Scientific
Speed Vac® SC 110	Savant
U:Genius Compact Gel Imaging System	Syngene
Vibra-Cell™ VCX130 (Sonifikator)	Sonics

2.1.11 Kits

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
QIAexpress Detection and Assay Kit (Ni-NTA-AP Conjugate)	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen

2.1.12 Software

BioEdit (7.0.9.0.)	Tom Hall
Cary Win UV (4.10)	Varian
ChemBioDraw Ultra (12.0)	Perkin Elmer
Clone Manager (9.1)	Scientific & Educational Software
GCsolution (2.32.00)	Shimadzu
GCMsolutions (2.53)	Shimadzu
LabSolution (5.51)	Shimadzu
Prime View (5.31)	GE Healthcare
PyMOL (1.3)	Schrödinger, LCC
UNICORN (5.31)	GE Healthcare

2.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension wurde diese in eine Küvette überführt und mit Hilfe eines Photometers bei 600 nm vermessen. Um den linearen Messbereich zwischen 0,1 – 1,0 nicht zu verlassen, wurden ggf. Verdünnungen mit ddH₂O angesetzt. Eine Küvette mit ddH₂O diente ebenso als Blindwert.

2.2.2 Übernachtskulturen

Abhängig vom Zweck der Übernachtskultur (Plasmidisolierung, Expression oder Gefrierkultur) wurde das benötigte Volumen LB-Medium in ein Reagenzglas oder einen Erlenmeyerkolben überführt und mit Antibiotikum (1:1.000) versetzt. Daraufhin wurde mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm aus einer Gefrierkultur oder von einer Agarplatte angeimpft und die Übernachtskultur für etwa 15 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt.

2.2.3 Gefrierkulturen

Die Herstellung von Gefrierkulturen diente zur fortwährenden Lagerung der Bakterienstämme. In der Regel wurden 900 µL einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes mit 70 µL DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.4 Plasmidisolierung

Es wurden zunächst Übernachtskulturen angeimpft und am nächsten Tag erfolgte die Plasmidisolierung mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits von Macherey-Nagel. Abhängig vom Plasmid wurde nach den Anleitungen für *high-copy* bzw. *low-copy* Plasmide gearbeitet. Abweichend vom Standardprotokoll wurde der optionale Waschschriff mit dem AW-Puffer immer durchgeführt und es wurde stets zweimal mit A4-Puffer gewaschen. Zudem wurde in den meisten Fällen vor der Elution für 2 min bei 70 °C (im Thermostat plus, Eppendorf) inkubiert, um restliches Ethanol zu entfernen und für die Elution selbst wurden häufig 50 µL auf 70 °C erwärmtes ddH₂O statt Elutionspuffer EB verwendet. Daraufhin wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die Plasmide wurden zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurden diese mit Hilfe des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Als Blindwert wurde stets die Flüssigkeit verwendet, in der die entsprechende DNA-Probe gelöst war.

2.2.6 DNA-Restriktion

Für die Klonierung der verschiedenen Gene in Expressionsvektoren wurden Gene und Plasmide zunächst in Doppel-Restriktionsansätzen mit Enzymen von New England BioLabs® eingesetzt. Dazu wurde standardmäßig mindestens 1 µg DNA mit 10 – 20 U der verwendeten Restriktionsenzyme in einem Volumen von 50 µL verdaut. Dementsprechend wurden 5 µL 10x NE-Puffer 4 und ggf. 0,5 µL BSA (10 mg/mL) zugegeben und es wurde mit ddH₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde daraufhin für 4 – 6 h in einem Thermostat plus (Eppendorf) bei 37 °C inkubiert. Falls erforderlich, wurde anschließend der vom Hersteller empfohlene Hitze-Inaktivierungsschritt durchgeführt. Um konzentriertere Proben zu erhalten, wurden die Restriktionsansätze teilweise mit

Hilfe eines Concentrator plus (Eppendorf) eingeengt. Die Aufreinigung aller Restriktionsansätze erfolgte mittels präparativer Agarosegelelektrophorese.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Ein Agarosegelelektrophoresesystem von Carl Roth wurde genutzt, um PCR- und Restriktionsansätze zu analysieren. In der Regel wurden 0,8 %ige Agarosegele verwendet, für kleine DNA-Moleküle (< 500 bp) wurden ggf. 2 %ige Agarosegele genutzt. Zum Gießen der Gele wurde die in 1x TAE-Puffer gelöste Agarose mit 0,01 % Roti®-Safe GelStain zur Visualisierung gemischt. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder (SM0311) von Fermentas diente als Größenstandard (siehe auch Abschnitt 7.4), hiervon wurden stets 4 µL aufgetragen. Die Elektrophorese lief je nach Größe der Gele und DNA-Moleküle für ca. 20 – 50 min bei 90 – 100 V. Zur Detektion der DNA-Banden wurden die Gele im Anschluss anhand eines Gel-Dokumentationssystems unter UV-Licht fotografiert.

2.2.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von PCR- oder Restriktionsansätzen über präparative Agarosegelelektrophorese wurde die gesamte Probe zunächst mit 6x DNA-Ladepuffer gemischt und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die aufzureinigenden DNA-Banden wurden auf einem BioView-Transilluminator (Biostep) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Nucleo-Spin® Extract II-Kits oder des QIAquick® Gel Extraction Kits nach den Herstellerangaben isoliert. Abweichend vom Standardprotokoll wurde der Waschschrift normalerweise zweimal durchgeführt und in den meisten Fällen wurde vor der Elution für 2 min bei 70 °C inkubiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 30 – 35 µL auf 70 °C erwärmtem Elutionspuffer. Daraufhin wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die Proben wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

2.2.9 Ligation

Die verdauten, aufgereinigten Gene wurden über Ligation mit T4-DNA-Ligase in die entsprechenden Plasmide eingebracht. Dabei wurde das Gen im Verhältnis zum Plasmid in einem fünffachen Überschuss eingesetzt, um eine effektive Ligation zu gewährleisten. Die Menge an verdautem Insert wurde mit Formel 1 ausgerechnet.

$$\text{Masse des Gens [ng]} = 5 \cdot \frac{\text{Länge des Inserts [bp]}}{\text{Länge des Plasmids [bp]}} \cdot \text{Masse des Plasmids [ng]} \quad \text{Formel 1}$$

In einem typischen Ligationsansatz wurden 400 U T4-DNA-Ligase, 100 – 200 ng Plasmid, 1x Ligasepuffer und die entsprechende Menge an Insert eingesetzt. Es wurde mit ddH₂O auf Endvolumina zwischen 20 – 50 µL aufgefüllt und für mindestens 2 h bei 16 – 20 °C in einem

Thermostat plus (Eppendorf) inkubiert. Ligationen über Nacht wurden bei 4 °C durchgeführt. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz zur Transformation in *E. coli* DH5α oder *E. coli* TOP10 verwendet.

2.2.10 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung einer Nukleotidsequenz von einem Vektor wurde mit Hilfe eines Mastercycler® pro (Eppendorf) und mit *proof reading* Phusion®-DNA-Polymerase von Finnzymes durchgeführt, letzteres um das Einbauen von Fehlern während der Amplifikation der DNA zu vermeiden. In Tabelle 2.7 ist die Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes wiedergegeben. Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Nach der Reaktion wurden die Proben entweder mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und ggf. über Gelextraktion aufgereinigt oder direkt über das NucleoSpin PCR Clean Up Kit von Macherey Nagel aufgereinigt.

Um die ideale Hybridisierungstemperatur eines Primerpaares zu bestimmen, wurde zunächst eine Gradienten-PCR im 10 µL-Maßstab mit einem Temperaturbereich zwischen typischerweise 48 – 68 °C für die Hybridisierung durchgeführt. Anhand des folgenden Agarosegels wurde die beste Hybridisierungstemperatur identifiziert und diese für weitere Arbeiten verwendet.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes.

Bestandteil	C _f
5x Phusion® HF-/GC-Puffer	1 x
parentale DNA	100 ng
10 mM dNTPs	200 µM
5 µM Vorwärtsprimer	0,5 µM
5 µM Rückwärtsprimer	0,5 µM
Phusion® Polymerase (2 U/µL)	1 U
ddH ₂ O	auf das Endvolumen auffüllen

Tabelle 2.8: PCR-Bedingungen bei Nutzung der Phusion®-DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	0,5 min	25 – 30
Hybridisierung	Abh. vom Primer	0,5 min	
Elongation	72 °C	0,5 – 1 min	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1

2.2.11 Kolonie-PCR

Zur Identifizierung von *E. coli*-Klonen, die Plasmide mit dem gewünschten Gen als Insert trugen, wurde die Methode der Kolonie-PCR verwendet. Hierzu wurde *Taq*-DNA-Polymerase genutzt, deren höhere Fehleranfälligkeit im Vergleich zur Phusion®-DNA-Polymerase für diese Methode irrelevant war. Entsprechend der in Tabelle 2.9 aufgeführten Zusammensetzung eines typischen Kolonie-PCR-Ansatzes wurde zunächst etwas Zellmaterial mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von einer LB-Agarplatte in 5 µL steriles ddH₂O überführt und daraufhin wurden 5 µL eines doppelt-konzentrierten PCR-Mastermixes hinzugefügt. Anschließend wurde die PCR unter den in Tabelle 2.10 aufgeführten Bedingungen in einem Mastercycler® pro (Eppendorf) durchgeführt. Von entscheidender Bedeutung war hierbei der verlängerte erste Schritt der initialen Denaturierung, der dazu diente, die Zellen zu lysieren und somit die DNA für die Reaktion zugänglich zu machen. Im Anschluss an die PCR wurden die Proben mit je 2 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt und je 6 µL dieser Mischung auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung eines typischen Kolonie-PCR-Ansatzes.

Bestandteil	c _f in der Reaktion
10x <i>Taq</i> -Puffer	1 x
Zellmaterial einer Kolonie	-
10 mM dNTPs	200 µM
5 µM Vorwärtsprimer	0,5 µM
5 µM Rückwärtsprimer	0,5 µM
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µL)	2 U
ddH ₂ O	auf das Endvolumen auffüllen

Tabelle 2.10: Kolonie-PCR-Reaktionsbedingungen bei Nutzung der *Taq*-DNA-Polymerase.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	0,75 – 1 min	30
Hybridisierung	Abh. vom Primer	0,5 min	
Elongation	72 °C	0,5 – 1 min	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1

2.2.12 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

2.2.12.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Methode von Hanahan (1983) verwendet. Sämtliche benötigten Materialien wurden im Vorfeld auf 4 °C gekühlt. Ein Milliliter einer Übernachtskultur wurde genutzt, um 100 mL SOB-Medium anzuimpfen. Die Kultur wurde

anschließend bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 erreicht wurde. Daraufhin wurde die Kultur in gekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 25 min bei 4.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor F-34-6-38) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden behutsam in 8 mL kaltem RF1-Puffer auf Eis resuspendiert und anschließend wurde die Zellsuspension wiederum für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und der Überstand wurde erneut verworfen. Nun wurden die Zellpellets vorsichtig in 2 mL kaltem RF2-Puffer auf Eis resuspendiert und die Zellsuspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die chemisch kompetenten Zellen in gekühlte, sterile Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert (ca. 80 µL), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.12.2 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden sämtliche benötigten Materialien im Vorfeld auf 4 °C gekühlt. Zwei Milliliter einer Übernachtskultur wurden genutzt, um 250 mL LB-Medium anzuimpfen. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 erreicht wurde, und daraufhin in einen gekühlten Zentrifugenbecher gefüllt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 10 min bei 5.000 rpm (Sorvall RC6+ Centrifuge, Rotor F10S-6X500Y) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde behutsam in 250 mL kaltem, sterilem ddH₂O auf Eis resuspendiert und anschließend wurde die Zellsuspension wiederum für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und der Überstand wurde erneut verworfen. Nun wurde das Zellpellet in 125 mL eiskaltem, sterilem ddH₂O auf Eis resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Zellpellet in 20 mL kalter, steriler 20 % Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend in gekühlte 50 mL-Nalgene-Zentrifugenröhrchen gefüllt und für 15 min bei 10.000 rpm (Sorvall RC6+ Centrifuge, Rotor SS34) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellpellets wurden in 2 mL kalter, steriler 10 % Glycerin-Lösung resuspendiert. Daraufhin wurden die chemisch kompetenten Zellen in gekühlte, sterile Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert (ca. 50 µL) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren sowie bei -80 °C gelagert.

2.2.13 Transformation

2.2.13.1 Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen

Die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (ca. 80 µL) wurden mit 100 ng Plasmid-DNA oder 5 µL Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 60 s bei 42 °C in einem Thermostat plus (Eppendorf) erhitzt wurden. Daraufhin wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 mL 37 °C-warmem SOC-Medium gemischt und für 1 h bei 37 °C und 550 rpm in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert. Dann wurden die Zellen durch

Zentrifugation für 1 min bei 5.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) pelletiert und der Überstand bis auf ca. 100 µL verworfen. Das Zellpellet wurde in dem verbliebenen Überstand resuspendiert und ein Teil der Suspension auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatte wurde für etwa 16 h bei 37 °C durchgeführt und die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.13.2 Transformation in elektrokompetente *Escherichia coli*-Zellen

Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen (ca. 50 µL) wurden mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt und in eine gekühlte Elektroporationskuvette (2 mm Elektrodenabstand) pipettiert. Die Kuvette wurde kurz auf Eis inkubiert und dann wurde der Elektroschock in einem Elektroporator 2510 (Eppendorf) bei 2500 V für 5 ms durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Außenfläche der Kuvette zuvor vollständig trocken war. Nach dem Elektroschock wurde 1 mL 37 °C-warmes SOC-Medium zugegeben und kurz gemischt. Daraufhin wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 500 rpm in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 5.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) pelletiert und der Überstand bis auf ca. 100 µL verworfen. Das Zellpellet wurde in dem verbliebenen Überstand resuspendiert und ein Teil der Suspension auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatte wurde für etwa 16 h bei 37 °C durchgeführt mit anschließender Lagerung bei 4 °C.

2.2.14 Heterologe Proteinexpression in *Escherichia coli*

2.2.14.1 Expressionsstudien

Expressionsstudien dienten zur Identifikation geeigneter Expressionsbedingungen für die verschiedenen Zielproteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei verschiedenste Parameter variiert, um die heterologe Expression der verschiedenen Proteine zu optimieren. So wurden typischerweise verschiedene Expressionsstämme (*E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* C43 (DE3) oder *E. coli* TOP10) sowie Temperaturen (zwischen 15 °C und 37 °C) getestet. Zudem wurden häufig verschiedene verfügbare Plasmide (pET28a, pET42b, pET22b, pIT2-MCS, pACYCDuet™-1, pBAD-N) verwendet, um mit dem besten Konstrukt weiterzuarbeiten. Induktorkonzentration, Expressionsmedium sowie Medienzusammensetzung, Induktionszeitpunkt, und Füllvolumen-zu-Gefäßvolumen-Verhältnis stellten weitere Parameter dar, die zur Verbesserung der Expression bzw. zur Erhöhung des löslichen Proteinanteils variiert wurden. Teilweise wurde zudem als Negativkontrolle der entsprechende Stamm mit Leervektor kultiviert und identisch behandelt, wie die eigentliche Probe, um einen Vergleich zur basalen Expression zu erhalten.

Für die Durchführung einer Expressionsstudie wurde in der Regel die Hauptkultur, bestehend aus 65 mL Expressionsmedium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben, mit Spurenelementlösung und dem einzusetzenden Antibiotikum versetzt und mit einem entsprechenden Volumen Vorkultur angeimpft,

um eine Anfangs-OD₆₀₀ (OD_{600_HK-Start}) von 0,2 zu erhalten. Dazu wurde zunächst die OD₆₀₀ der Vorkultur (OD_{600_VK}) gemessen und mit Hilfe von Formel 2 das benötigte Inokulationsvolumen (V_{Inokulum}) ermittelt.

$$V_{\text{Inokulum}} = \frac{\text{OD}_{600_{\text{HK-Start}}} \cdot V_{\text{HK}}}{\text{OD}_{600_{\text{VK}}}} \quad \text{Formel 2}$$

Nach Inokulation wurde die Hauptkultur bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 1 erreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Probe für die spätere SDS-PAGE gezogen (s. unten) und die Expression mit 0,05 – 0,40 mM IPTG (pET-, pIT2-MCS- und pACYC-Vektoren) bzw. mit 0,0075 – 0,2 % Arabinose (pBAD-N) induziert. Zur Expression von Cytochrom P450 Monooxygenasen wurde zudem 0,5 mM δ-ALA als Häm-Vorstufe zugegeben. Nach der Induktion wurde die Hauptkultur bei der gewünschten Temperatur und 250 rpm für mind. 20 h inkubiert. Während der Kultivierung wurde zu bestimmten Zeiten, üblicherweise 2 h, 4 h und 20 h nach der Induktion, die OD₆₀₀ gemessen und es wurden Proben genommen. Bei niedrigeren Expressionstemperaturen wurde über einen längeren Zeitraum kultiviert und daher wurden auch noch zu späteren Zeitpunkten Proben entnommen. Basierend auf Erfahrungswerten wurde bei der Probennahme normalerweise darauf geachtet, dass die Gesamt-OD₆₀₀ der Probe mindestens einem Wert von 16 entsprach, um genügend Zellmaterial für den Aufschluss durch Ultraschall und die darauffolgende Analyse mittels SDS-PAGE zu erhalten. Wies die Kultur zum Probezeitpunkt beispielsweise eine OD₆₀₀ von 2 auf, wurden mindestens 8 mL Probe gezogen, damit die Gesamt-OD₆₀₀ der Probe den oben genannten Wert von mindestens 16 erreichte. Zur Probenaufarbeitung wurden die Proben zunächst für 1 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 mL 50 mM KP_i-Puffer, pH 7,4, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde entweder zwischenzeitlich bei -20 °C eingefroren, oder direkt aufgeschlossen (siehe Abschnitt 2.2.15) und für die SDS-PAGE aufbereitet (siehe Abschnitt 2.3.1).

2.2.14.2 Heterologe Proteinexpression im größeren Maßstab

Konnten geeignete Bedingungen zur Proteinexpression identifiziert werden, wurden diese Bedingungen auf einen größeren Maßstab übertragen, um das entsprechende Protein in größeren Mengen herzustellen. Teils wurde der entsprechende Stamm mit Leervektor oder Stämme gänzlich ohne Vektor kultiviert und identisch behandelt, wie die eigentliche Probe, um den resultierenden zellfreien Extrakt beispielsweise als Negativkontrolle für Biokatalysen oder Aktivitätsbestimmungen einzusetzen.

Es wurden bis zu 600 mL TB-Medium in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit dem benötigten Antibiotikum und Spurenelementlösung versetzt. Die OD₆₀₀ der entsprechenden Vorkultur wurde gemessen und die Hauptkultur wurde mit dem nötigen Volumen der Vorkultur angeimpft, sodass

eine $OD_{600_HK-Start}$ von 0,2 erhalten wurde. Das benötigte Volumen wurde mit Hilfe von Formel 2 ermittelt. Anschließend wurde die Hauptkultur bei 37 °C und 250 rpm inkubiert bis eine OD von etwa 1 erreicht wurde. Durch Zugabe von 0,2 – 0,8 mM IPTG wurde die Expression induziert (bei der Produktion von Cytochrom P450 Monooxygenasen wurde zudem 0,5 mM δ -ALA als Häm-Vorstufe zugegeben) und die Kultur bei der entsprechenden Temperatur und 250 rpm für eine definierte Dauer inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 5.000 rpm (Sorvall RC6+ Centrifuge, Rotor F10S-6X500Y) geerntet, der Überstand verworfen, die Zellen in 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, resuspendiert und schließlich für 30 min bei 4.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor: A-4-81) erneut pelletiert. Das resultierende Zellpellet wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C eingefroren. Standardmäßig wurden die Zellpellets, die aus den Expressionen im größeren Maßstab resultierten, mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen (siehe Abschnitt 2.2.15).

Die für jedes Protein spezifischen Bedingungen für die Expression im größeren Maßstab wie verwendeter Stamm, Expressionstemperatur, Induktorkonzentration und Dauer der Expression sind in den entsprechenden Abschnitten im Ergebnisteil zu finden.

2.2.14.3 Expression bakterieller Cytochrom P450 Monooxygenasen

CYP154H1

Die Produktion von CYP154H1 im größeren Maßstab wurde durchgeführt wie von Schallmey et. al (2011) beschrieben mit der Änderung, dass die Zellen bereits nach 24 h geerntet wurden (statt nach 48 h).

CYP106A2

CYP106A2 wurde hergestellt mit Hilfe von *E. coli* TOP10 pIT2_cyp106a2. Es wurden 200 mL TB-Medium, 0,8 mM IPTG und eine Expressionstemperatur von 30 °C verwendet. Die Kultivierung wurde 28 h nach Induktion abgebrochen.

2.2.14.4 Coexpression von CYP154H1 mit Elektronentransferproteinen aus *Pseudomonas putida*

Die Produktion von CYP154H1 zusammen mit Putidaredoxin und Putidaredoxin-Reduktase (unter Nutzung von pACYC_CamAB) im größeren Maßstab wurde durchgeführt wie von Schallmey et. al (2011) beschrieben mit den Abweichungen, dass die Expression mit 0,4 mM IPTG gestartet wurde, die Zellen bei 30 °C kultiviert wurden (anstatt bei 28 °C) und dass sie bereits nach 4 h geerntet wurden (statt nach 48 h), da gleiche Bedingungen wie bei der Expression von CYP154H1 + FdR 6 + Fdx 4 eingehalten werden sollten (siehe Abschnitt 3.1.4).

2.2.15 Zelllyse und -aufschluss

Zelllyse mittels B-PER

B-PER (Thermo Scientific) besteht aus einem patentgeschützten Mix unterschiedlicher Detergenzien in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5), der Zellwände und Membranen von Bakterienzellen zerstört. Ein Volumen von 30 µL dieses Reagenzes wurde genutzt, um aus Expressionsstudien stammende Zellpellets zu resuspendieren. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Die Überstände wurden in separate Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die Pellets in je 30 µL ddH₂O resuspendiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die aus den Expressionsstudien resultierenden Zellpellets wurden in einem definierten Volumen von 50 mM KP_i-Puffer, pH 7,4, resuspendiert, welches mit Hilfe von Formel 3 bestimmt wurde. Die Probenvolumina waren auf Basis von Erfahrungswerten entsprechend der OD₆₀₀ so gewählt worden, dass die Gesamt-OD₆₀₀ mindestens einem Wert von 16 entsprach, um genügend Zellmaterial für den Aufschluss durch Ultraschall und die darauffolgende Analyse mittels SDS-PAGE zu erhalten. Wies die Kultur zum Probezeitpunkt beispielsweise eine OD₆₀₀ von 2 auf, waren mindestens 8 mL Probe gezogen worden, damit die Gesamt-OD₆₀₀ der Probe den oben genannten Wert von mindestens 16 erreichte. Werden diese Werte in Formel 3 eingesetzt und durch den auf Erfahrungswerten basierenden Faktor von 0,033 geteilt, beträgt das zum Resuspendieren genutzte Volumen 485 µL. Unterhalb dieses Volumens war ein Aufschluss mittels Ultraschall wegen der Ultraschallsondengröße und aufgrund von Schaumbildung schwierig zu bewerkstelligen. Um dieses Volumen nicht zu unterschreiten und um das Probenmaterial zusätzlich über die OD₆₀₀ zu normieren, wurde die beschriebene Rechnung verwendet.

$$V_{\text{Aufschluss}} = \frac{OD_{600_Probe} \cdot V_{\text{Probe}}}{0,033} \quad \text{Formel 3}$$

Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden anschließend dreimal für je 30 s mit je 30 – 59 s Pause bei 40 – 50 % Amplitude (Vibra-Cell™ VCX130, kleine Ultraschallsonde) mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei 13.200 rpm und 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5415 R) zentrifugiert. Die Überstände wurden in separate Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die Zellpellets im gleichen Volumen (Formel 3) ddH₂O resuspendiert. Ein Teil der resultierenden Überstands- und Pelletproben wurde für die Analyse mittels SDS-PAGE verwendet. Der Rest der Proben wurde entweder verworfen oder für andere Analysen, wie beispielsweise Aktivitätsbestimmungen, genutzt. Größere Zellmengen (z. B. zur Herstellung von CFE für Biokatalysen) wurden ebenfalls mittels Ultraschall aufgeschlossen, allerdings wurden die entsprechenden Zellpellets in einem anderen Volumen von 50 mM KP_i-Puffer, pH 7,4, resuspendiert.

(ca. 2,5 – 3 mL Puffer pro g Zellpellet) und es wurde die große Ultraschallsonde verwendet. Dabei wurden die Zellen achtmal für je 30 s mit je 30 – 59 s Pause bei 40 – 70 % Amplitude (Vibra-Cell™ VCX130, Bandelin) mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen. Daraufhin wurden die Proben für mindestens 30 min bei 12.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor F-34-6-38) oder 18.000 rpm (Sorvall RC6+ Centrifuge, Rotor SS34) und 4 °C zentrifugiert.

Zellaufschluss durch Hochdruckhomogenisation

Sollten Proteine aus Zellpellets aufgereinigt werden, oder sollte die Hochdruckhomogenisation als alternative Aufschlussmethode zum Ultraschall ausprobiert werden, wurden die Zellen durch Nutzung eines Hochdruckhomogenisators (EmulsiFlex-C3, Avestin) aufgeschlossen. Das Zellpellet wurde dafür zuerst in Lysepuffer resuspendiert (ca. 5 mL pro g Zellpellet), zur Inhibition von Proteasen wurde üblicherweise 0,1 mM PMSF zugegeben und daraufhin wurde die Zellsuspension mit einer großen Ultraschallsonde dreimal für je 30 s mit je 59 s Pause bei 40 – 60 % Amplitude (Vibra-Cell™ VCX130, Bandelin) auf Eis homogenisiert. Daraufhin wurden die Zellen drei- bis fünfmal bei max. 1.500 bar im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die Proben wurden danach mindestens 30 min bei 12.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R, Rotor F-34-6-38) oder 18.000 rpm (Sorvall RC6+ Centrifuge, Rotor SS34) und 4 °C zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 SDS-PAGE

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde das Mini PROTEAN®-SDS-PAGE-System von Bio-Rad genutzt. Zur Analyse der Ferredoxin- und Flavodoxinproben wurde die Tris-Tricin-SDS-PAGE (Schägger und von Jagow, 1987) und für sonstige Proteinproben wurde die Tris-Glycin-SDS-PAGE angewendet.

Die zu analysierenden Proteinproben wurden zunächst ggf. verdünnt. Prinzipiell wurden 30 µL der Probe mit 10 µL 4x SDS-Ladepuffer versetzt. Daraufhin wurden die Proben für 5 min (Überstandsproben) bzw. 10 min (Pelletproben) bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Es wurden jeweils 6 µL der Proben und 4 – 5 µL des *PageRuler Prestained* Proteinmarkers (Fermentas) aufgetragen (siehe auch Abschnitt 7.5).

2.3.1.1 Tris-Glycin-SDS-PAGE

Die Zusammensetzung eines Tris-Glycin-SDS-Gels ist in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung eines Tris-Glycin-SDS-Gels.

Komponente	Sammelgel (5 % Acrylamid)	Trenngel (12 % Acrylamid)
ddH ₂ O	2,10 mL	1,11 mL
40 % Acrylamid	1,50 mL	190 µL
1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8)	1,25 mL	-
1 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	-	190 µL
10 % SDS	50 µL	15 µL
10 % APS	20 µL	15 µL
TEMED	5 µL	1,5 µL

Nach der Probenauftragung erfolgte die Elektrophorese zunächst für etwa 10 min bei 90 V, bevor die Spannung auf 180 V erhöht wurde, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Die Elektrophorese wurde bei dieser Spannung so lange durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel zur Visualisierung der Proteinbanden für ca. 20 min mit Färbelösung angefärbt und kurzfristig in Entfärbelösung oder über Nacht in Depotlösung inkubiert, um die Hintergrundfärbung zu entfernen.

2.3.1.2 Tris-Tricin-SDS-PAGE

Tabelle 2.12 gibt die Zusammensetzung eines Tris-Tricin-SDS-Gels wieder.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung eines Tris-Tricin-SDS-Gels.

Komponente	Sammelgel (5 % Acrylamid)	Trenngel (12 % Acrylamid)
ddH ₂ O	1,25 mL	1,11 mL
40 % Acrylamid	1,18 mL	190 µL
1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,45)	1,50 mL	-
1 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	-	190 µL
Glycerin	0,6 g	15 µL
10 % APS	20 µL	15 µL
TEMED	5 µL	1,5 µL

Die Vorbereitung der Proben sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgten wie bei der Tris-Glycin-SDS-PAGE mit dem Unterschied, dass eine andere Spannung (150 V statt 180 V) und andere Puffer für die Elektrophorese verwendet wurden.

2.3.2 Western Blot

Zur spezifischen Detektion von Proteinen über deren His-Tag wurden Western Blots mit dem Semi-Dry Western Blot System (BiocomDirect) in Kombination mit dem QIAexpress Detection and Assay

Kit (Qiagen) durchgeführt. Letzteres enthält ein Konjugat aus Ni-NTA und alkalischer Phosphatase, welches spezifisch mit dem His-Tag von Proteinen interagiert.

Zunächst wurden zwei Stücke Whatman Gel Blotting-Papier (Sigma Aldrich) sowie die Nitrocellulosemembran (Pure Nitrocellulose 0,45 µm Transfer membrane, AppliChem) auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Zur Aktivierung wurde die Membran anschließend für 10 min in 1x Transferpuffer inkubiert und das Whatman-Papier in 1x Transferpuffer getränkt. Zunächst wurde das SDS-Gel wie unter Abschnitt 2.3.1 behandelt, nach der Elektrophorese allerdings nicht angefärbt, sondern zum Waschen für 1 min in Transferpuffer inkubiert. Dann wurde ein Whatman-Papier auf die Kathode des Western Blot-Systems gelegt, darauf folgten zunächst Membran, dann SDS-Gel und abschließend das zweite Whatman-Papier. Zuletzt wurde das System durch die Befestigung der Anode komplettiert und der Western Blot für 80 – 90 min bei 60 mA pro Gel laufen gelassen. Die Membran wurde nach dem Blotten für 5 min in TBS-Puffer gewaschen und mit Ponceau-Rot (Sigma Aldrich) angefärbt, um die Laufspuren mit Hilfe eines Stifts kenntlich zu machen. Die Membran wurde anschließend mit TBS-Puffer entfärbt und für 1 h mit 3 % BSA in TBS-Puffer blockiert. Daraufhin wurde einmal für 10 min mit TBS-Puffer und zweimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Dann wurde das Ni-NTA-AP-Konjugat 1:1.000 in TBS-Puffer verdünnt und die Membran für 1 h in dieser Lösung inkubiert. Die drei genannten Waschschrte (einmal für 10 min in TBS-Puffer und zweimal für 10 min in TBST-Puffer) wurden in der Folge wiederholt. Zur Visualisierung von Proteinen mit His-Tag wurde die Membran schließlich lichtgeschützt in 1 mL BCIP®/NBT Purple Liquid-Substrat (Sigma-Aldrich) für 1 – 5 min inkubiert, bis die Banden deutlich zum Vorschein kamen. Ein Waschschrte mit ddH₂O wurde durchgeführt, um die Farbreaktion zu stoppen.

2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Proteinproben wurde der Bradford-Assay durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurde die Probe mit ddH₂O verdünnt, 800 µL der Verdünnung mit 200 µL 5x Roti[®]-Quant-Reagenz (Carl Roth) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde mit Hilfe des Biophotometers plus (Eppendorf) die Absorption bei 595 nm gemessen. Ein Ansatz mit ddH₂O und Bradford-Reagenz wurde dabei als Blindwert genutzt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Messung mit Hilfe einer BSA-Standardgeraden berechnet.

2.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm

Die Proteinkonzentration aufgereinigter Proteinlösungen wurde durch die Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelt. Dazu wurden 1,5 µL der zu messenden und ggf. verdünnten Proteinlösung auf ein NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (peqlab) aufgetragen und bei der entsprechenden Wellenlänge vermessen. Als Blindwert wurde zuvor der jeweilige Puffer eingesetzt. Das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel 4) wurde angewendet und durch Einsetzen von Schichtdicke d (1 cm) und

des Protein-spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} die Stoffmengenkonzentration c (in mol/L) berechnet. Die entsprechende Proteinkonzentration in g/L wurde durch Multiplikation mit dem Molekulargewicht M des Proteins berechnet. In

Tabelle 2.13 sind Extinktionskoeffizient und Molekulargewicht der Proteine aufgeführt, für welche diese Methode angewendet wurde.

$$\text{Abs}_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad \text{Formel 4}$$

Tabelle 2.13: Protein-spezifische Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte.

Protein	$\epsilon_{280} [\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$	$M [\text{g/mol}]$
Fdx 1	14,94	13,9
Fdx 2	1,62	9,6
Fdx 3	9,97	12,7
Fdx 4	3,11	9,3
Fdx 8	2,98	9,0
FdR 5	46,41	44,9
FdR 6	56,17	46,3
FdR 7	47,90	51,9
FdR 9	65,68	44,5

2.3.5 NAD(P)H-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der genauen Konzentration einer Cofaktor-Stammlösung wurde eine geeignete Verdünnung der Stammlösung in KP_i -Puffer angesetzt, in eine UV-Küvette überführt und mit einem CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer (Varian) bei 340 nm vermessen. Es wurde wiederum das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel 4) angewendet und durch Einsetzen von Schichtdicke d (1 cm) und des Cofaktor-spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ_{340} ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) die Stoffmengenkonzentration c (in mol/L) berechnet. Als Blindwert diente 1 mL KP_i -Puffer.

2.3.6 Kaliumhexacyanoferrat-Assay

Der Kaliumhexacyanoferrat-Assay wurde genutzt, um die Reduktaseaktivität von Ferredoxinreduktasen zu ermitteln und um den präferierten Cofaktor der Enzyme zu bestimmen. Der Assay basiert auf der Absorptionsabnahme bei 420 nm infolge der Reduktion von $\text{K}_3[\text{Fe(III)(CN)}_6]$ zu $\text{K}_4[\text{Fe(II)(CN)}_6]$ durch aktive Reduktasen (Lacour et al., 1998). Eine Küvette mit 1 mL 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, diente als Blindwert. Der Reaktionsansatz wurde in einer Küvette angesetzt und enthielt 50 μL $\text{K}_3[\text{Fe(III)(CN)}_6]$ (10 mM), typischerweise 0,625 μM aufgereinigte FdR oder 10 μL FdR-haltigen zellfreien Extrakt und es wurde mit 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, auf 900 μL aufgefüllt. Kurz nach Beginn der Messung in einem CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer (Varian) wurden 100 μL einer 5 mM NAD(P)H-Lösung zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die potentielle

Absorptionsänderung bei 420 nm wurde über einen Zeitraum von 2 min bei 20 °C oder bei RT verfolgt. Mit Formel 5 wurde die volumetrische Reduktaseaktivität berechnet. Hierbei steht ΔAbs für die Absorptionsänderung, d für die Schichtdicke der Küvette (1 cm) und D für den Verdünnungsfaktor, der Extinktionskoeffizient (ϵ_{420}) von $\text{K}_3[\text{Fe(III)}(\text{CN})_6]$ beträgt $1,02 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Zur Berechnung der spezifischen Reduktaseaktivität wurde die volumetrische Reduktaseaktivität durch die Proteinkonzentration dividiert.

$$\text{Vol. Akt. [U/mL]} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\epsilon \cdot d} \cdot D \quad \text{Formel 5}$$

Für FdR 9 wurde zudem der T_{50} -Wert bestimmt, welcher die Temperatur darstellt, bei der das Enzym die Hälfte seiner ursprünglichen Aktivität aufweist. Dazu wurde eine geeignete Verdünnung (10 μM) des Enzyms für 20 min bei bestimmten Temperaturen (40 – 70 °C) im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze kurz auf Eis inkubiert und für 5 min bei 13.200 rpm und 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5415 R) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 μL in den üblichen Reaktionsansatz gegeben und die Messung bei RT durchgeführt. Durch die Bestimmung der Enzymaktivität des zuvor auf Eis inkubierten Enzyms als Referenz konnte die jeweilige Restaktivität ermittelt und durch Auftragung der Restaktivität gegen die entsprechende Inkubationstemperatur der T_{50} -Wert abgelesen werden.

2.3.7 Cytochrom c-Assay

Zur Bestimmung der Elektronentransferaktivität und zur Untersuchung von Elektronentransferproteinkombinationen wurde der Cytochrom c-Assay durchgeführt (Lacour et al., 1998). Der Assay basiert auf der Absorptionszunahme bei 550 nm infolge der Cytochrom c-Reduktion. Eine Küvette mit 1 mL Puffer diente als Blindwert. Der Reaktionsansatz wurde in einer Küvette angesetzt und enthielt generell 40 μL Cytochrom c (10 mg/mL), die Protein-haltige Probe und es wurde mit Puffer auf 980 μL aufgefüllt. Kurz nach Beginn der Messung in einem CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer (Varian) wurden 20 μL NAD(P)H (5 mM) zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die potentielle Absorptionsänderung bei 550 nm wurde über einen Zeitraum von 2 min bei 20 °C oder bei Raumtemperatur verfolgt. Mit Formel 5 wurde die volumetrische Elektronentransferaktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient (ϵ_{550}) von Cytochrom c beträgt $19,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Im Fall der Überprüfung der Elektronentransferaktivität der Reduktasedomäne von CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1 wurden 10 μL einer geeigneten Verdünnung des aufgereinigten Enzyms bzw. des zellfreien Extrakts eingesetzt. Als Puffer wurden 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, 20 mM KP_i -Puffer, pH 6,5, oder 50 mM MOPS-Puffer, pH 7,0, verwendet.

Zum Nachweis der Aktivität von Ferredoxinen wurden geeignete Mengen Ferredoxinreduktase und Ferredoxin, in aufgereinigter Form oder in Form von zellfreiem Extrakt eingesetzt, und als Puffer

diente ausschließlich 50 mM KPi -Puffer, pH 7,4. Zur Berechnung der spezifischen Elektronentransferaktivität wurde die volumetrische Elektronentransferaktivität der Ferredoxine wurde lediglich die Ferredoxinkonzentration herangezogen.

Für Fdx 8 wurde zudem der T_{50} -Wert bestimmt. Dazu wurde eine geeignete Verdünnung (40 μM) des Enzyms für 20 min bei bestimmten Temperaturen (40 – 70 °C) im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze kurz auf Eis inkubiert und für 5 min bei 13.200 rpm und 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5415 R) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 μL in den üblichen Reaktionsansatz mit 10 μM FdR 9 gegeben und die Messung bei RT durchgeführt. Durch die Bestimmung der Aktivität des zuvor nur auf Eis inkubierten Ferredoxins als Referenz konnte die jeweilige Restaktivität ermittelt und durch Auftragung der Restaktivität gegen die entsprechende Inkubationstemperatur der T_{50} -Wert abgelesen werden.

2.3.8 Bestimmung der GDH- und FDH-Aktivität

Um die GDH- und FDH-Aktivität zu untersuchen, wurde die Reduktion von NAD(P)^+ zu NAD(P)H bei 340 nm in einem CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer (Varian) verfolgt. Eine UV-Küvette mit 1 mL Puffer diente als Blindwert. Der Reaktionsansatz wurde in einer UV-Küvette angesetzt und enthielt generell 10 μL 1 M Glucoselösung bzw. 100 μL 1,5 M Na-Formiatlösung, 10 μL GDH bzw. FDH in einer geeigneten Verdünnung und es wurde mit Puffer auf 900 μL aufgefüllt. Die Messung wurde in dem Puffer durchgeführt, der auch für die jeweilige Biokatalyse verwendet wurde. Kurz nach Beginn der Messung wurden 100 μL 10 mM NAD(P)^+ zugegeben, um die Reaktion zu starten. Anschließend wurde die Absorptionsänderung bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 min bei der entsprechenden Temperatur verfolgt. Mit Formel 5 wurde die volumetrische GDH- bzw. FDH-Aktivität berechnet, dabei wurde ein Extinktionskoeffizient (ϵ_{340}) für NAD(P)H von $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ eingesetzt.

2.3.9 CO-Differenzspektrum

Zur Bestimmung der Konzentration aktiver Cytochrom P450 Monooxygenase wurde ein CO-Differenzspektrum aufgenommen (Omura und Sato, 1964), bei dem das Absorptionsspektrum der Häm-haltigen Cytochrom P450 Monooxygenasen in reduzierter, CO-gebundener Form zwischen 350 und 500 nm gemessen wird. Für die Messungen wurde ein CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer (Varian) benutzt. Zunächst wurde Puffer in eine UV-Küvette gefüllt und die Basislinie aufgenommen. Dann wurde in der UV-Küvette eine geeignete Verdünnung der Cytochrom P450 Monooxygenase angesetzt und ein Spektrum aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung für etwa 5 – 10 s mit CO begast (CO Lecture Bottle Station, Aldrich), es wurde zügig eine Spatelspitze Natriumdithionit hinzugegeben, gemischt und erneut ein Spektrum aufgenommen. Es erfolgte eine Wiederholung von Begasen und Messen, bis die maximale Absorption erhalten wurde. Die Absorption bei ca. 450 nm (lokales Maximum) und bei 490 nm (Basislinie) wurde ermittelt und die Stoffmengenkonzentration

aktiver Cytochrom P450 Monooxygenase mit Hilfe von Formel 6 berechnet. Die Schichtdicke d betrug 1 cm und der Extinktionskoeffizient (ϵ_{450}) des reduzierten, CO-gebundenen Hämthiolats $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Zur Berechnung der Massenkonzentration wurde die Stoffmengenkonzentration mit dem Molekulargewicht der Cytochrom P450 Monooxygenase multipliziert.

$$c(\text{aktive P450}) = \frac{\text{Abs}_{450} - \text{Abs}_{490}}{\epsilon_{450} \cdot d} \cdot D \quad \text{Formel 6}$$

2.3.10 Proteinaufreinigung

Um ein Zielprotein aufzureinigen, wurden die entsprechenden Zellen zunächst aufgeschlossen und das Lysat abzentrifugiert (siehe Abschnitt 2.2.15). Der resultierende zellfreie Extrakt wurde auf eine Säule geladen und es wurde ein chromatographisches Verfahren zur Proteinaufreinigung angewendet. Wurde eine Aufreinigung zum ersten Mal durchgeführt, wurde ein Teil der gesammelten Fraktionen auf ein SDS-Gel aufzutragen, um die Elutionspeaks zu untersuchen und die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen zu identifizieren. Anschließend wurden diese vereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Nach einem Pufferaustausch- und Entsalzungsschritt mit Hilfe einer Entsalzungssäule wurde die Proteinlösung mit 10 % Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

2.3.10.1 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

Die Methode der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie wurde zur Aufreinigung sämtlicher Zielproteine aus *T. fusca* sowie von CYP102K1 und von N'-short-CYP102K1 genutzt. Zur Durchführung der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie wurde eine 5 mL HisTrap™ HP-Säule verwendet, angeschlossen an ein ÄKTA FPLC-System (beides GE Healthcare). Zunächst wurde die Säule mit Lysepuffer I bzw. Lysepuffer II bei einer Flussrate von 5 mL/min äquilibriert (max. zulässiger Druck: 0,6 MPa). Die Säule wurde mit filtriertem ($\varnothing$ 0,45 – 0,70 μm) zellfreien Extrakt bei einer Flussrate von 2 mL/min beladen und mit Lysepuffer gewaschen. Der Durchfluss wurde mit einem Fraktionsvolumen von 8 mL gesammelt. Daraufhin wurden ungebundene oder schwach gebundene Proteine durch Waschen mit Lysepuffer oder Waschpuffer entfernt. Das gebundene Zielprotein wurde anschließend mit Elutionspuffer I oder II über einen Gradienten von 100 – 120 mL Länge (Start bei 0 % Elutionspuffer, maximaler Anteil an Elutionspuffer wurde abhängig vom Experiment eingestellt) und einer Flussrate von 2 mL/min eluiert. Das Fraktionsvolumen wurde auf 3 mL eingestellt. Die Fraktionen des Durchflusses vom Beladungsvorgang (DF *load*), vom Waschvorgang (DF *wash*) und die Fraktionen der eluierten Zielproteine wurden jeweils vereinigt, ggf. verdünnt und es wurden Proben für die SDS-PAGE vorbereitet.

2.3.10.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit dem Ziel der Aufreinigung von Fldx-s. und von Fdx 4 durchgeführt. Es wurde eine 80 mL Q-Sepharose-Säule an einem ÄKTA FPLC-System verwendet. Zunächst wurde die Säule bei einer Flussrate von 5 mL/min mit Bindepuffer I bzw. Bindepuffer II äquilibriert und ein Maximaldruck von 0,6 MPa eingestellt. Anschließend erfolgte die Auftragung des filtrierten ($\emptyset$ 0,45 – 0,70 μ m) zellfreien Extrakts bei einer Flussrate von 2,5 mL/min. Daraufhin wurde mit einem Säulenvolumen Bindepuffer I bzw. Bindepuffer II gewaschen und es wurden Fraktionen von 9 mL aufgefangen. Anschließend wurde zur Elution des Zielproteins ein Gradient von 0 % bis 100 % Elutionspuffer I bzw. II über 150 mL (Fldx-s.) bzw. 400 mL (Fdx 4) bei einer Flussrate von 2 bzw. 5 mL/min gestartet. Das Fraktionsvolumen wurde auf 3 bzw. 6 – 10 mL eingestellt.

2.3.10.3 Kationenaustauschchromatographie

Die Kationenaustauschchromatographie wurde für die Aufreinigung von Fldx-s. getestet. Es wurde eine 15 mL TOYOPEARL® SP-Sepharose-Säule an einem ÄKTA FPLC-System für die Aufreinigung genutzt. Zunächst wurde die Säule bei einer Flussrate von 5 mL/min mit Bindepuffer I äquilibriert und ein Maximaldruck von 0,6 MPa eingestellt. Anschließend erfolgte die Auftragung des filtrierten ($\emptyset$ 0,45 μ m) zellfreien Extrakts bei einer Flussrate von 2 mL/min. Daraufhin wurde mit vier Säulenvolumen Bindepuffer I gewaschen und es wurden Fraktionen von 7 mL aufgefangen. Anschließend wurde zur Elution des Zielproteins ein Gradient von 0 % bis 100 % Elutionspuffer I über 100 mL bei einer Flussrate von 2 mL/min gestartet. Das Fraktionsvolumen wurde auf 1,5 mL eingestellt.

2.3.10.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die Aufreinigung von Fldx-s. mittels hydrophober Interaktionschromatographie wurde eine 20 mL Butyl-Sepharose-Säule an einem ÄKTA FPLC-System getestet. Zunächst wurde die Säule bei einer Flussrate von 5 mL/min mit Bindepuffer äquilibriert und ein Maximaldruck von 0,6 MPa eingestellt. Der zellfreie Extrakt wurde vor der Auftragung mit 0,5 M KCl versetzt, filtriert ($\emptyset$ 0,45 μ m) und mit einer Flussrate von 2 mL/min aufgetragen. Die Säule wurde im Anschluss mit vier Säulenvolumen Bindepuffer gespült. Daraufhin wurde zur Elution des Zielproteins ein Gradient von 0 % bis 100 % Elutionspuffer über 105 mL bei einer Flussrate von 1,4 mL/min gestartet. Zudem wurde der Elutionspuffer stufenweise immer stärker mit ddH₂O verdünnt bis ausschließlich ddH₂O für die Elution genutzt wurde. Abschließend wurden weitere Elutionsschritte mit 30 % Isopropanol und 0,1 M NaOH durchgeführt.

Zudem wurde für die hydrophobe Interaktionschromatographie zur Aufreinigung von Fldx-s. eine Phenyl-Sepharose-Säule mit einem Volumen von 30 mL eingesetzt. Die Aufreinigung wurde in

abgewandelter Form, wie oben beschrieben, durchgeführt, mit folgenden Änderungen: Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Bindepuffer gespült und der Gradient zur Elution des Zielproteins mit Elutionspuffer umfasste 150 mL. Zudem folgte auf den ersten ein weiterer Gradient mit ddH₂O über 120 mL. Die Flussrate betrug jeweils 2 mL/min.

2.3.10.5 Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration

Die vereinigten, Zielprotein-enthaltenden Fraktionen einer Aufreinigung wurden mittels eines Zentrifugalfilters (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, EMD Millipore) mit geeigneter Ausschlussgröße (MWCO) bei 4.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Rotor: A-4-81) und 4 °C auf 2,5 mL aufkonzentriert. Für Ferredoxine wurde ein MWCO von 3.000 Da, für das Flavodoxin ein MWCO von 10.000 Da und für die Ferredoxinreduktasen sowie CYP154H1 ein MWCO von 30.000 Da verwendet. Für CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 wurden Zentrifugalfilter mit 100.000 oder 50.000 Da MWCO genutzt.

2.3.10.6 Pufferaustausch und Lagerung

Bei Proteinen, die über immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigt wurden, kann das im Puffer enthaltene Imidazol auf das entsprechende Protein inhibierend wirken. Somit ist es erforderlich, das Imidazol zu entfernen. Zunächst wurde die Säule dreimal mit ddH₂O gewaschen und fünfmal mit dem zum Puffertausch genutzten Puffer äquilibriert. Nun wurden die 2,5 mL Proteinkonzentrat über eine PD10-Säule (Disposable PD10 desalting column, GE Healthcare) gegeben und mit 3,5 mL eines geeigneten Puffers ohne Imidazol eluiert. Dabei wurde, sofern nicht anders angegeben, der 50 mM KP_i-Puffer, pH 7,4, verwendet. Für CYP102K1 wurde abhängig von der jeweiligen Aufreinigung neben dem eben erwähnten Puffer auch 50 mM MOPS-Puffer, pH 7,0, oder 20 mM KP_i-Puffer, pH 6,5, genutzt.

Die aufgereinigte, aufkonzentrierte und umgepufferte Proteinlösung wurde abschließend mit 10 % Glycerin (c_f) versetzt, aliquotiert und in der Regel direkt bei -20 °C eingefroren. CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 wurden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor die Aliquots bei -20 °C gelagert wurden.

2.4 Biokatalyse

2.4.1 Biokatalysen mit CYP154H1, CYP154C5 und CYP106A2

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Elektronentransferproteine aus *T. fusca* in der Lage sind, Elektronen auf CYP154H1, CYP154C5 oder CYP106A2 zu übertragen, wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 1 mL in 12 mL Reagenzgläsern mit LABOCAP-Verschluss durchgeführt. Die Ansätze enthielten die zu untersuchenden Elektronentransferproteine in verschiedenen Kombinationen, 3 µM der entsprechenden Cytochrom P450 Monooxygenase, ein NAD(P)H-

Regenerationssystem bestehend aus 1 – 2 U/mL GDH und 30 mM Glucose bzw. 2 U/mL PseFDH und 150 mM Natriumformiat, sowie eines der eingesetzten Substrate β -Jonon (5 mM), Styrol oder Ethylbenzol (je 10 mM) für CYP154H1 bzw. Progesteron (0,5 mM und 2 mM) für CYP106A2 und CYP154C5. Es wurden stets 3 μ M der aufgereinigten Ferredoxinreduktasen verwendet, die Ferredoxine bzw. das Flavodoxin wurden entweder ebenfalls als aufgereinigte Proteine (12 μ M) oder in Form des entsprechenden zellfreien Extraktes (teils auch von Coexpressionsstämmen) zugegeben. Im ersten Fall wurden zusätzlich 600 U/mL Katalase aus Rinderleber zugefügt, welche im zellfreien Extrakt von *E. coli* bereits vorhanden ist. Die Reaktionen wurden durch Cofaktorzugabe (0,1 bzw. 0,5 mM NAD(P)H) gestartet und die Ansätze für ca. 15 h bei 250 rpm und 30 bzw. 50 °C geschüttelt (es wurden verschiedene Schüttler von Infors verwendet).

Es wurden zudem verschiedene Kontrollen angesetzt, die ebenfalls alle Standardkomponenten (Cofaktor und Cofaktorregenerationssystem, Substrat, ggf. Katalase) enthielten. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Elektronentransferproteine. Weitere Negativkontrollen enthielten zellfreien Extrakt von *E. coli* C43 (DE3) oder BL21 (DE3) pET28a(+) (Leervektor) bei denen in einem Ansatz die Cytochrom P450 Monooxygenase weggelassen wurde, im anderen jedoch nicht. Weitere Negativkontrollen wurden durchgeführt, wenn Ferredoxin oder Flavodoxin in Form von zellfreiem Extrakt eingesetzt wurden. Dann wurde ein Ansatz ohne Reduktase und ein Ansatz mit Leervektor-Zellextrakt statt des Ferredoxin- oder Flavodoxin-haltigen zellfreien Extrakts präpariert. Außerdem wurde anstelle der Redoxpartner aus *T. fusca* die Elektronentransferproteinkombination aus Pdx und PdR in jeweils aufgereinigter Form eingesetzt, diese Positivkontrolle enthielt ansonsten die gleichen Reaktionskomponenten. Dass diese Redoxproteinkombination als Elektronenlieferant mit den eingesetzten Cytochrom P450 Monooxygenasen funktioniert und somit als Ersatzsystem für unbekannte Elektronentransferproteine dient, war bereits bekannt (Agematu et al., 2006; Schallmeyer et al., 2011). Im Fall der Biokatalyse mit dem zellfreien Extrakt von pACYC-Konstrukt-haltigen Zellen wurden einerseits *E. coli* C43 (DE3) pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 und andererseits *E. coli* C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet™-1 als Negativkontrollen verwendet, während *E. coli* C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYC_CamAB zur Expression von CYP154H1, Pdx und PdR genutzt wurde und somit als Positivkontrolle diente.

Probenvorbereitung für die GC-Analyse:

Sämtliche Substrate, welche in Biokatalysen mit CYP154H1 eingesetzt wurden, konnten über GC analysiert werden. Zur Probenvorbereitung wurden die 1 mL-Reaktionsansätze in 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäße überführt, je 500 μ L Ethylacetat mit 5 bzw. 0,5 % Dodecan als internem Standard hinzugegeben und für 2 min mit Hilfe eines Vortex durchmischt. Im Anschluss wurde zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (2 min bei 14.680 rpm mit Eppendorf Centrifuge 5424). Bei

Ausbildung einer Gellée-artigen Interphase wurde eine Spatelspitze NaCl zugefügt, erneut durchmischt und für 5 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Die organische Phase wurde anschließend in ein separates Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit einer Spatelspitze wasserfreiem Natrium- oder Magnesiumsulfat getrocknet und erneut durchmischt sowie 2 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Ein Volumen von 250 µL der getrockneten organischen Phase wurde in ein GC-Vial mit Microeinsatz (250 µL) überführt und für die GC- bzw. GC-MS-Analyse verwendet (siehe Abschnitt 2.5.2 bzw. 2.5.3).

Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse:

Die Biokatalysen von Progesteron mit CYP154C5 und CYP106A2 wurden über HPLC analysiert. Zur Extraktion wurden die 1 mL-Reaktionsansätze zunächst in 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäße überführt, je 700 µL Ethylacetat hinzugegeben und 2 min mit Hilfe eines Vortex durchmischt. Zur besseren Phasentrennung wurde ein zentrifugiert (2 min bei 14.680 rpm mit Eppendorf Centrifuge 5424) durchgeführt. Bei Bildung einer Gellée-artigen Interphase wurde je eine Spatelspitze NaCl zugefügt, erneut durchmischt und für 5 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden anschließend in neue 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die Extraktion der Reaktionsansätze mit je 500 µL Ethylacetat und anschließend mit je 500 µL Chloroform wie eben beschrieben wiederholt. Die organischen Extrakte eines Reaktionsansatzes wurden dabei jeweils vereint. Das Lösungsmittel der organischen Extrakte wurde daraufhin innerhalb 1 h in einem Konzentrator (Speed Vac® SC 110, Savant) eingedampft, die Rückstände im Anschluss in je 1 mL Acetonitril:ddH₂O (60:40) resuspendiert und bei 50 °C im Ultraschallbad behandelt, bis aller Feststoff gelöst war. Danach wurden je 200 µL der Proben mit je 800 µL Acetonitril:ddH₂O (60:40) in HPLC-Vials verdünnt und für die HPLC-Analyse eingesetzt (siehe Abschnitt 2.5.4).

2.4.2 Biokatalyse mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

2.4.2.1 Charakterisierung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 mittels Biokatalyse

Um geeignete Substrate für CYP102K1 zu identifizieren, wurde ein Substratscreening am Institut für Biochemie II an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nach von Bühler et al. (2013) durchgeführt. Für alle in Düsseldorf getätigten Versuche wurden 2 µM CYP102K1, 200 µM Substrat, 200 µM NADP⁺ und 1.200 U/mL Katalase eingesetzt. Als NADPH-Regenerationssystem wurden 10 U/mL Glucosedehydrogenase IV aus *Bacillus megaterium* (Eigenproduktion der in Düsseldorf ansässigen Arbeitsgruppe) mit 20 mM Glucoselösung verwendet. Des Weiteren ein 100 mM KP_i-Puffer, pH 7,5, eingesetzt und die Reaktionen wurden in einem Volumen von je 0,5 mL in 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäßen bei 25 °C und ohne Durchmischung durchgeführt. Neben den in der Publikation erwähnten Substanzen wurden zudem Tri- und Pentadecansäure,

Tetradecansäuremethylester, 1- und 2-Heptanol sowie 2-Nonanol und 2-Decanol in dem Substratscreening berücksichtigt.

Zur anschließenden detaillierteren Charakterisierung von CYP102K1 und deren verkürzter Variante N'-short-CYP102K1 wurden verschiedene Biokatalysen bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Dabei bestand ein Reaktionsansatz generell aus dem eingesetzten Puffer, 0,5 – 20 μ M CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1-Konzentrat, einem NADPH-Regenerationssystem bestehend aus 0,5 – 10 U/mL GDH und 20 mM Glucoselösung (außer bei Versuchen bei pH 4,0 – 5,0), aus mind. 1.200 U/mL Katalase und aus einem der getesteten Substrate in einer Konzentration von 0,2 – 3 mM sowie aus 0,05 – 5 mM NADPH. Parallele Ansätze ohne CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 dienten als Negativkontrollen. Bei der Untersuchung neuer Substrate wurde in der Regel ein zusätzlicher Ansatz mit Tridecansäure als Positivkontrolle mitgeführt. Die Konzentrationen der verwendeten Komponenten sowie Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Reaktionszeit, Durchmischung) wurden je nach Experiment variiert. Die Reaktionen wurden in der Regel in einem Volumen von je 0,5 mL in 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt. Zur Bestimmung von zeitlichen Umsätzen bei verschiedenen Temperaturen wurden Reaktionen dagegen in 1,8 – 4 mL-Volumen in 12 mL-Glasgefäßen durchgeführt.

In der Regel wurde ein Mastermix mit allen Komponenten, außer der ggf. zu variierenden Komponente sowie CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 oder NADPH, vorbereitet, gemischt und bei der jeweiligen Temperatur des Experiments vorinkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde entweder NADPH oder CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 zugegeben, gemischt und die Ansätze wurden im Thermomixer comfort (Eppendorf) bzw. im Thermomixer KTM-133 (HLC) für größere Volumina inkubiert. Die individuellen Reaktionsbedingungen der verschiedenen Experimente sind im jeweiligen Abschnitt des Ergebnisteils aufgeführt.

Probenvorbereitung für die GC-Analyse:

Zur späteren Analyse der Proben mittels GC wurden die 500 μ L-Reaktionsansätze abhängig vom eingesetzten Substrat auf unterschiedliche Art und Weise extrahiert. Wurden andere Substanzen als Fettsäuren als Substrat verwendet, wurde wie unter Abschnitt 2.4.1 beschrieben extrahiert. Wurden Fettsäuren als Substrat eingesetzt, wurde zunächst mit 20 μ L 2 M HCl angesäuert und zweimal mit je 500 μ L Diethylether extrahiert, der ggf. zuvor mit 0,1 M Decansäure als internem Standard versetzt wurde. Zur Extraktion wurde je 2 min mit dem Vortex durchmischt und anschließend für 1 – 2 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Bei Ausbildung einer Gellee-artigen Interphase wurde eine Spatelspitze NaCl zugefügt, erneut durchmischt und für 5 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Die organischen Phasen eines Ansatzes wurden jeweils in einem neuen Eppendorfreaktionsgefäß vereint. Daraufhin wurde der organische Extrakt mit

wasserfreiem Natrium- oder Magnesiumsulfat versetzt und erneut durchmischt und 2 min bei 14.680 rpm (Eppendorf Centrifuge 5424) zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel der je 400 µL Extrakte mit Hilfe eines Konzentrators (Speed Vac® SC 110, Savant) entfernt und die Rückstände entweder zur späteren Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren, oder direkt in 100 – 130 µL N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid mit 1 % Trimethylchlorsilan (Sigma Aldrich, Produkt-Nummer: 15238) resuspendiert und für mindestens 1 h bei 60 °C im Thermomixer comfort (Eppendorf) bei und 0 – 500 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Proben in GC-Vials mit Microeinsatz (250 µL) überführt und für die GC- bzw. GC-MS-Analyse verwendet (siehe Abschnitt 2.5.2 bzw. 2.5.3).

2.4.2.2 Spektrophotometrischer Nachweis einer Substratbindung

Die Substratbindung kann den Spinzustand des Hämeisens und daher die spektrophotometrischen Eigenschaften von Cytochrom P450 Monooxygenasen beeinflussen. So wurde beispielsweise eine Verschiebung des charakteristischen Peaks bei etwa 420 nm zu ca. 390 nm beschrieben, deren Ausprägung von der Substratkonzentration abhängig ist (Schenkman et al., 1967). Wird die entsprechende Absorptionsdifferenz gegen die Substratkonzentration aufgetragen, kann aus der resultierenden Kurve die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) ermittelt werden.

Zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten von CYP102K1 für verschiedene Substrate, wurde aufgereinigte CYP102K1 mit Substrat in steigender Konzentration versetzt und spektrophotometrisch vermessen. Es wurden 2 µM CYP102K1 in 20 mM KP_i -Puffer, pH 6,5, in eine UV-Küvette gefüllt und es wurde Substrat (Un-, Do-, oder Tridecansäure) in Konzentrationen von 0 – 500 µM zugegeben. Dazu wurden verschiedene Substratstammlösungen mit geeigneten Konzentrationen in DMSO angesetzt. Anschließend wurde das Absorptionsspektrum zwischen 300 – 600 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer, Varian) bei RT aufgenommen. Als Leerwert diente eine Küvette mit 2 µM CYP102K1 in 20 mM KP_i -Puffer, pH 6,5, zu welcher anstelle der Substratlösung das entsprechende Volumen an DMSO zugefügt wurde.

2.4.2.3 Bestimmung der Kopplungseffizienz und der NADPH-Oxidationsrate

Um die Kopplungseffizienz von CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 für den Umsatz verschiedener Substrate zu ermitteln, wurde zunächst der NADPH-Verbrauch einer Reaktion bei 340 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (CARY 50 Bio UV-VIS Spektrophotometer, Varian) bei 20 °C verfolgt und anschließend die gebildete Menge Produkt bestimmt. Die 0,7 mL-Reaktionsansätze wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und bestanden aus 0,4 µM CYP102K1, 300 – 500 µM Substrat, 600 U/mL Katalase, 200 U/mL SOD und 150 µM – 200 µM NADPH in 20 mM KP_i -Puffer, pH 6,5. Die Ansätze wurden in UV-Küvetten überführt und in das temperierte Photometer gestellt. Im Anschluss wurden die Reaktionen durch CYP102K1-Zugabe gestartet. Nachdem das NADPH vollständig

verbraucht war, wurden je 500 µL der Ansätze in separate Eppendorfreaktionsgefäße überführt und gemäß der Anleitung unter Abschnitt 2.4.2.1 extrahiert. Mittels GC-Analytik und entsprechender Kalibriergeraden für die verwendeten Substrate (siehe Abschnitt 7.6) konnte zunächst die Menge an umgesetztem Substrat bestimmt und schließlich die Kopplungseffizienz über Formel 7 berechnet werden. Dabei steht $[S_0]$ für die Anfangssubstratkonzentration und $[S_t]$ für die Substratkonzentration zum Zeitpunkt der Extraktion sowie $[NADPH_0]$ für die Anfangskonzentration an Cofaktor (alle Größen in µmol/L).

$$\text{Kopplungseffizienz [\%]} = \frac{[S_0] - [S_t]}{[NADPH_0]} \cdot 100 \quad \text{Formel 7}$$

Darüber hinaus wurde die NADPH-Oxidationsrate (in $\text{mmol} \cdot \text{mmol}^{-1}_{\text{P450}} \cdot \text{min}^{-1}$) durch Anwendung von Formel 8 berechnet. Dabei steht ΔAbs für die Absorptionsdifferenz bei 340 nm (in min^{-1}) während der ersten zwei Minuten der Reaktion, ϵ_{340} ist der Extinktionskoeffizient von NAD(P)H ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bei dieser Wellenlänge, $[P450]$ steht für die P450-Konzentration (in mM) und d für die Schichtdicke der Küvette (in cm).

$$\text{NADPH-Oxidationsrate} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\epsilon_{340} \cdot [P450] \cdot d} \quad \text{Formel 8}$$

2.4.3 Biokatalysen mit *Candida antarctica* Lipase B

2.4.3.1 Biokatalysen im analytischen Maßstab

Um geeignete Bedingungen für die Ester- bzw. Amidsynthese im größeren Maßstab zu identifizieren, wurden zunächst Biokatalysen im analytischen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden die Feststoffkomponenten in GC-Vials eingewogen, Lösungsmittel hinzugefügt und die Reaktionen durch Zugabe des entsprechenden (flüssigen) Alkohols bzw. Amins gestartet. In Tabelle 2.14 sind die eingesetzten Mengen und Volumina der verschiedenen Komponenten wiedergegeben.

Tabelle 2.14: Komponentenmengen für die Biokatalyse mit CalB im analytischen Maßstab.

Komponente	Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol ^{a)}	Reaktion von Pimelinsäure mit Butylamin ^{b)}
Pimelinsäure	320 mg (2 mmol)	125 mg (0,8 mmol)
<i>n</i> -Pentanol	218 µL (2 mmol)	-
<i>n</i> -Butylamin	-	372 µL (3,8 mmol)
Lösungsmittel ^{c)}	500 µL	372 µL
Komponente	Reaktion von Succinylsäure mit Octanol	Reaktion von Succinylsäure mit Octylamin
Succinylsäure	150 mg (1,2 mmol)	74 mg (0,6 mmol)
<i>n</i> -Octanol	200 mL (1,2 mmol)	-
<i>n</i> -Octylamin	-	104 µL (0,6 mmol)
Lösungsmittel ^{d)}	200 µL	400 µL

a) Die Reaktion wurde mit einer Enzymmenge von 10 mg pro Ansatz durchgeführt.

b) Bei Ansätzen ohne Lösungsmittel wurden doppelte Substrat- und Enzymmengen eingesetzt.

c) Es wurden für die Reaktion mit Pentanol die Lösungsmittel Diisopropylether, MTBE und Dibutylether getestet. Bei der Reaktion mit Butylamin wurde die Reaktion sowohl mit, als auch ohne Diisopropylether als Lösungsmittel durchgeführt. Außerdem wurde jeder Ansatz einmal mit einfacher Enzymmenge (5 mg bzw. 10 mg) und einmal mit dreifacher Enzymmenge (15 mg bzw. 30 mg) durchgeführt.

d) Im Fall der Reaktion mit Octanol wurde MTBE als Lösungsmittel eingesetzt. Bei Ansätzen ohne Lösungsmittel wurden doppelte Substrat- und Enzymmengen eingesetzt. Bei der Reaktion mit Octylamin wurde Aceton als Lösungsmittel getestet.

Es wurden, sofern nicht gesondert erwähnt, 5 mg CalB eingewogen und zehn Kugeln Molekularsieb (3 Å, Merck) zugefügt. Vor dessen Verwendung wurde das Molekularsieb bei 110 °C im Trockenschrank gelagert. Die Reaktionen wurden bei 50 °C und 1.000 rpm (Thermo-Shaker, Universal Labortechnik) für mind. 19 h inkubiert. Währenddessen wurden 20 – 100 µL-Proben zu verschiedenen Zeitpunkten zur Analyse mittels DC, GC oder GC-MS genommen (siehe Abschnitte 2.5.1 – 2.5.3).

2.4.3.2 Biokatalyse im präparativen Maßstab

Um die synthetisierten Monoester über eine Kieselgel-Säule aufzureinigen und in Biokatalysen mit CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 einsetzen zu können, wurden die Reaktionen der Dicarbonsäuren mit den jeweiligen Alkoholen ebenfalls im präparativen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden im Fall der Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol alle Komponenten (Tabelle 2.15) in einem 50 mL-Rundkolben gemischt (Reaktion mit Pentanol gestartet) und die Reaktion in einem Ölbad bei 50 °C und 1.000 rpm inkubiert. Für die Reaktion von Succinylsäure mit Octanol wurde zunächst der Ansatz gemäß Tabelle 2.14 in einem verschließbaren 5 mL Glasgefäß vorbereitet (Reaktion mit Octanol gestartet) und anschließend in einem Thermomixer (KTMR-133, HLC) bei 50 °C und 700 rpm inkubiert. Ein Teil der Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol (2 mL der Flüssigphase) und der komplette Ansatz der Reaktion von Succinylsäure mit Octanol wurden nach 17,5 h (Succinylsäureansatz) bzw. nach 23 h (Pimelinsäureansatz) Reaktionszeit mittels Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt. Der Rest der Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol wurde bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 2.15: Komponentenmengen für die Biokatalyse mit CalB im präparativen Maßstab.

Komponente	Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol	Reaktion von Succinylsäure mit Octanol
Dicarbonsäure	3,20 g (20 mmol)	0,75 g (6,3 mmol)
Alkohol	2,18 mL (20 mmol)	1,00 mL (6,3 mmol)
MTBE	5,00 mL	1,00 mL
CalB	0,100 g	0,025 g
Molekularsieb	0,500 g	0,125 g

2.4.3.3 Aufreinigung der Produkte mittels Kieselgelsäulenchromatographie

Zunächst wurde eine geeignete Kieselgelsäule vorbereitet. Dazu wurde eine Glassäule am unteren Ende mit Watte abgedichtet und mit in Laufmittel 1 (Tabelle 2.16) suspendiertem Kieselgel 60 (Merck) bis zu einer Füllhöhe von etwa 25 cm befüllt. Nachdem sich das Säulenbett gesetzt hatte, wurde der Reaktionsansatz aufgetragen. Der Pimelinsäureansatz wurde zunächst 2 min bei 14.680 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5424), um immobilisiertes Enzym und Molekularsieb abzutrennen, und anschließend wurden 2 mL des Überstandes aufgetragen. Im Fall des Succinylsäureansatzes wurde der Ansatz zur Abtrennung der Feststoffkomponenten filtriert und mit insgesamt 7 mL MTBE in mehreren Schritten gewaschen. Das Filtrat wurde daraufhin am Rotationsverdampfer (RV 10 basic, IKA®) bei 50 mbar und 40 rpm eingeeengt und anschließend auf die Säule aufgetragen. Die Aufreinigung erfolgte jeweils mit einem Laufmittel-Gradienten, bei dem der Ethylacetat-Anteil im Laufmittel *n*-Heptan:Ethylacetat schrittweise gesteigert wurde (Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Eingesetzte Laufmittel für die Kieselgelsäulenchromatographie.

Laufmittel	Pimelinsäure-Ansatz	Succinylsäure-Ansatz
Laufmittel 1	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (7:1)	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (9:1)
Laufmittel 2	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (3:1)	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (5:1)
Laufmittel 3	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:1)	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (2:1)
Laufmittel 4	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:2)	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:1)

Die Analyse der gesammelten Fraktionen erfolgte mittels DC. Potentielle Produkt- bzw. Substratfraktionen wurden jeweils vereinigt und die Inhaltsstoffe der vereinigten Fraktionen mittels GC-MS verifiziert. Daraufhin wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer (RV 10 basic, IKA®) vollständig abgedampft (bei 10 mbar, RT und 25 rpm). Geringe Mengen der aufgereinigten Produkte wurden mit 130 µL BSTFA derivatisiert und mittels GC analysiert, um deren Reinheit zu bestimmen.

2.5 Reaktionsanalytik

2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Die DC wurde zur qualitativen und semi-quantitativen Analyse von Biokatalysen eingesetzt. Dazu wurden Kieselgelplatten (POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel) verwendet. Mit Hilfe von 5 µL- Glaskapillaren (ringcaps®, Hirschmann® Laborgeräte) wurden die Proben aufgetragen. Die Bestandteile der aufgetragenen Proben wurden durch die Wanderung der mobilen Phase aufgetrennt und im Anschluss wurde die DC-Platte mit Kaliumpermanganat- oder Phosphomolybdänsäurefärbereagenz benetzt und mit Hilfe einer Heißluftpistole entwickelt. Abhängig vom eingesetzten Biokatalysesubstrat wurden unterschiedliche Laufmittel verwendet. Für die Analyse von Pimelinsäure und Pentanol wurde *n*-Heptan:Ethylacetat (1:1) eingesetzt und zur Analyse von Succinylsäure und Octanol das Laufmittel *n*-Heptan:Ethylacetat (2:1).

Zudem konnte nach der Dünnschichtchromatographie der Retentionsfaktor (R_f) einer Substanz nach Formel 9 berechnet werden, der die Laufeigenschaften der Substanz im Verhältnis zur Laufront des Laufmittels wiedergibt. Dabei stehen l_1 für die Distanz von der Startlinie der DC-Platte bis zum Mittelpunkt des Spots und l_2 für Distanz zwischen Startlinie und Laufront (jeweils in cm).

$$R_f = \frac{l_1}{l_2} \quad \text{Formel 9}$$

In Tabelle 2.17 sind die R_f -Werte der mittels DC aufgetrennten Substanzen aufgelistet.

Tabelle 2.17: R_f -Werte von mittels DC analysierten Substanzen.

Substanz	Eingesetztes Laufmittel	R_f -Wert
Pimelinsäure	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:1)	0,27
<i>n</i> -Pentanol	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:1)	0,61 oder 0,68
Pimelinsäuremonopentylester	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:1)	0,61 oder 0,68
Pimelinsäuredipentylester	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (1:1)	0,87
Succinylsäure	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (2:1)	0,00
<i>n</i> -Octanol	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (2:1)	0,36
Succinylsäuremonooctylester	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (2:1)	0,27
Succinylsäuredioctylester	<i>n</i> -Heptan:Ethylacetat (2:1)	0,73

2.5.2 Gaschromatographie

Substrat- und Produktkomponenten wurden zur qualitativen und quantitativen Untersuchung mit Hilfe eines Gaschromatographen (GC2010 plus mit AOC-20i-Injektor, Shimadzu) analysiert. Als Trägergas diente Wasserstoff. Abhängig von der Substanz wurde eine FS-Supreme-5ms-Säule (30 m x 0,25 ID, 0,4 mm OD, CS-Chromatographie Service GmbH) oder eine Optima 17 MS-Säule (30 m x 0,25

ID, 0,4 mm OD, Macherey-Nagel) mit entsprechendem Temperaturprogramm verwendet, wie in Tabelle 2.18 dargestellt. Die einzelnen Bestandteile der Proben werden dabei nach ihren Retentionszeiten aufgetrennt und über einen Flammenionisationsdetektor (FID) erfasst. Mit Hilfe der verwendeten Software (GCsolutions 2.32, Shimadzu) wurden die Peakflächen (A) bestimmt und mit Formel 10 der Umsatz berechnet, wenn keine Kalibriergerade für das eingesetzte Substrat vorlag, wenn kein interner Standard verwendet wurde oder wenn relative Aktivitätswerte berechnet werden sollten.

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{\sum A_{\text{Produkte}}}{\sum A_{\text{Substrate}} + \sum A_{\text{Produkte}}} \cdot 100 \quad \text{Formel 10}$$

Alternativ wurde der Umsatz mit Formel 11 auf Basis der Substratabnahme und somit mit Hilfe von Kalibriergeraden für das verwendete Substrat berechnet. Darin stehen $[S_0]$ und $[S_t]$ für die Anfangssubstratkonzentration und die Substratkonzentration zum Probezeitpunkt (jeweils in $\mu\text{mol/L}$). Diese Berechnungsweise wurde für die zeitlichen Verläufe der Umsätze von Tridecansäure mit CYP102K1 und in Zusammenhang der Umsatzraten bzw. Kopplungseffizienzen von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 verwendet.

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{[S_0] - [S_t]}{[S_0]} \cdot 100 \quad \text{Formel 11}$$

Die Berechnung von Umsatzraten (in $\mu\text{mol}_{\text{umgesetztes Substrat}} \cdot \mu\text{mol}^{-1}_{\text{CYP102K1}} \cdot \text{min}^{-1}$) erfolgte über Formel 12. Darin stehen $[S_0]$ und $[S_t]$ für die Anfangssubstratkonzentration und die Substratkonzentration zum Probezeitpunkt (jeweils in $\mu\text{mol/L}$), t_{Probe} für den Zeitpunkt der Probennahme (in min) und $[P450]$ für die P450-Konzentration (in $\mu\text{mol/L}$).

$$\text{Umsatzrate} = \frac{[S_0] - [S_t]}{t_{\text{Probe}} \cdot [P450]} \quad \text{Formel 12}$$

Formel 13 wurde zur Berechnung der Standardabweichung genutzt, sofern Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Darin steht σ für die Standardabweichung, x und $\bar{x}$ in dem Fall für den Umsatz bzw. dessen Mittelwert und n für den Stichprobenumfang.

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Formel 13}$$

Tabelle 2.19 enthält eine Übersicht der Retentionszeiten verschiedener mittels GC analysierter Substanzen. Dabei basieren die aufgeführten Retentionszeiten teils auf Analysen derivatisierter Proben.

Tabelle 2.18: Verwendete GC-Methoden und zugehörige Parameter.

Parameter	Methode 1 ^{a)}	Methode 2 ^{b)}
Injektionsvolumen	1 µL	1 µL
Split	1:20	1:20
Injektortemperatur	300 °C	250 °C
Säule	Optima 17 MS, 30 m bzw. FS-Supreme-5ms, 30 m	FS-Supreme-5ms, 30 m
Säulendruck	41,9 kPa	52,8 kPa
Säulenflussrate	1,0 mL/min	0,8 mL/min
Temperaturprogramm:		
○ Anfangstemperatur	40 °C (1 min)	150 °C (1 min)
○ 1. Aufheizrate	10 °C/min	15 °C/min
○ Zwischentemperatur	-	230 °C (0 min)
○ 2. Aufheizrate	-	40 °C/min
○ Endtemperatur	300 °C (1 min)	300 °C (4 min)
Detektortemperatur	300 °C	300 °C

a) Zur Analyse von β -Jonon-, Styrol- und Ethylbenzol-Umsätzen (FS-Supreme-5ms) sowie von den CalB-katalysierten Reaktionen (Optima 17 MS).

b) Zur Analyse von Fettsäure-Umsätzen.

Tabelle 2.19: Übersicht der Retentionszeiten verschiedener mittels GC analysierter Substanzen.

Substanz	Retentionszeit [min]	
	Methode 1	Methode 2
Dodecan (IS)	11,4	-
β -Jonon	15,4	-
3-Hydroxy- β -jonon	17,6	-
Ethylbenzol	5,9	-
(R)-1-Phenylethanol	9,3	-
Styrol	6,4	-
Styroloxid	9,4	-
Decansäure (IS)	14,2	4,2
Produkt 1	-	6,1
Produkt 2	-	6,0
Produkt 3	-	5,8
Undecansäure	-	4,8
Produkt 1	-	6,7
Produkt 2	-	6,6
Produkt 3	-	6,5
Dodecansäure	-	5,6
Produkt 1	-	7,3
Produkt 2	-	7,2

Produkt 3	-	7,1
Tridecansäure	17,7	6,2
Produkt 1	20,2	7,8
Produkt 2	20,0	7,7
Produkt 3	19,7	7,5
Tetradecansäure	-	6,9
Produkt 1	-	8,2
Produkt 2	-	8,1
Produkt 3	-	8,0
Pentadecansäure	-	7,5
Produkt 1	-	8,6
Produkt 2	-	8,5
Produkt 3	-	8,4
12-Tridecensäure	-	6,2
Produkt	-	7,6
Pimelinsäure	16,3	-
Succinylsäure	12,5	-
Octanol	9,7	-
Pimelinsäuremonoester	19,5	-
Produkt 1	21,7	-
Produkt 2	21,4	-
Pimelinsäurediester	22,5	-
Succinylsäuremonoester	19,2	-
Produkt 1	21,5	-
Produkt 2	21,3	-
Succinylsäurediester	24,8	-

2.5.3 Massenspektrometrie-gekoppelte Gaschromatographie

Die Massenspektrometrie-gekoppelte Gaschromatographie wurde angewendet, um verschiedene Substanzen eines Stoffgemisches zu identifizieren und zur Bestätigung von vermuteten Substanzen. Die Messungen wurden mit einem GCMS-QP2010 S (Shimadzu) durchgeführt. Zunächst wurde das Stoffgemisch mittels gaschromatographischer Methoden aufgetrennt (Säule: Optima 17 MS (30 m x 0,25 ID, 0,4 mm OD), Macherey-Nagel) und im Anschluss wurden die einzelnen Substanzen im gekoppelten Massenspektrometer analysiert. Helium diente als Trägergas und EI (*electron impact*) als Ionisierungsmethode. Alle Messungen wurden mit dem Temperaturprogramm, dem Säulendruck sowie der Säulenflussrate der entsprechenden Methoden (Tabelle 2.18) durchgeführt, wobei das Split-Verhältnis teils leicht verändert wurde (1:5). Die Temperatur von Injektor, Ionenquelle und *interface* wurde auf 300 °C, 200 °C und 300 °C eingestellt. Zudem wurde der Zeitpunkt des Ein- und Ausschaltens des MS-Detektors variiert. Mit der zugehörigen Software (GCMSolutions 2.53, Shimadzu) erfolgte die Datenauswertung. Tabelle 2.20 enthält eine Übersicht der Retentionszeiten verschiedener mittels GC-MS analysierter Substanzen.

Tabelle 2.20: Übersicht der Retentionszeiten verschiedener mittels GC-MS analysierter Substanzen.

Substanz	Retentionszeit [min]	
	Methode 1 ^{a)}	Methode 2 ^{a)}
Dodecan (IS)	-	-
β-Jonon	15,3	-
3-Hydroxy-β-jonon	18,3	-
Ethylbenzol	-	-
(R)-1-Phenylethanol	-	-
Styrol	-	-
Styroloxid	-	-
Decansäure (IS)	3,6	-
Undecansäure	-	4,3
Produkt 1	-	6,0
Produkt 2	-	5,9
Produkt 3	-	5,6
Dodecansäure	-	5,1
Produkt 1	-	6,6
Produkt 2	-	6,5
Produkt 3	-	6,3
Tridecansäure	17,7	5,7
Produkt 1	20,2	7,2
Produkt 2	20,0	7,1
Produkt 3	19,7	6,9
Tetradecansäure	-	6,4
Produkt 1	-	7,7
Produkt 2	-	7,6
Produkt 3	-	7,4
Pentadecansäure	-	7,0
Produkt 1	-	8,1
Produkt 2	-	8,0
Produkt 3	-	7,9
12-Tridecensäure	-	5,8
Produkt	-	7,1
Pimelinsäure	15,4	-
Succinylsäure	11,5	-
Octanol	ca. 9 ^{b)}	-
Pimelinsäuremonoester	18,4	-
Produkt 1	20,6	-
Produkt 2	20,3	-
Pimelinsäurediester	21,4	-
Succinylsäuremonoester	18,2	-
Produkt 1	20,4	-
Produkt 2	20,2	-
Succinylsäurediester	23,6	-

a) Die aufgeführten Retentionszeiten basieren teils auf Analysen derivatisierter Proben.

b) Durch den Detektionsstart bei 9 min konnten nur anteilige Octanol-Peaks dargestellt werden.

2.5.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Analyse

Progesteron und dessen Produkte wurden über eine Prominence UFLC (Module: CBM-20A, SPD-M20A, CTO-20AC, SIL-20AC HT, 2 x LC-20AD) der Firma Shimadzu analysiert, welche mit einer Nucleosil 100, 5 C18-Säule (250 x 4,5 mm, CS-Chromatographie Service GmbH) ausgerüstet war. Dabei wurde das Gemisch Acetonitril:ddH₂O (60:40) als mobile Phase, ein Injektionsvolumen von 20 µL und eine Flussrate von 1,2 mL/min genutzt. Die Säulenofentemperatur betrug 50 °C. Die Substanzen wurden mit Hilfe eines UV-Diodenarraydetektors im bei 242 nm detektiert. Progesteron wies dabei eine Retentionszeiten von 9,3 min auf und die Produkte Retentionszeiten von 4,3 min (16α-Hydroxyprogesteron) und 4,4 min (15β-Hydroxyprogesteron). Die integrierten Peakflächen wurden genutzt, um den Umsatz mittels Formel 10 (siehe Abschnitt 2.5.2) zu berechnen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung putativer Elektronentransferproteine aus *Thermobifida fusca*

Das Ziel dieses Teilprojekts war die Identifikation thermostabiler Elektronentransferpartner aus *T. fusca* für die Anwendung in Biokatalysen mit verschiedenen Cytochrom P450 Monooxygenasen. Dazu wurden die entsprechenden Gene zunächst in geeignete Vektoren eingebracht und diese in Expressionsstämme transformiert. Anschließend wurden möglichst optimale Bedingungen zur Proteinproduktion identifiziert. Falls möglich, wurden die Proteine aufgereinigt. Zudem wurde die Aktivität der Proteine bestimmt und diese schließlich in Biokatalysen eingesetzt. Die dabei erhaltenen Resultate werden im Folgenden beschrieben.

3.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung

3.1.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung von putativen Ferredoxinen aus *T. fusca*

Die Gene der putativen Ferredoxine Fdx 1 bis Fdx 4 waren zuvor bereits innerhalb einer Bachelorarbeit in die Vektoren pIT2-MCS und pET28a(+) eingebracht worden. Zur Klonierung des Fdx 8-Gens von pET22b_Tfu_1275 in pET28a(+) wurden die Restriktionsenzyme *NdeI* und *EcoRI* verwendet. Die resultierenden Vektoren und die von Prof. Dr. Vlada Urlacher (Institut für Biochemie II der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellten pET22b(+)-Plasmide (mit dem Fdx 1-, Fdx 2-, Fdx 4-, Fdx 8- und FdR 9-Gen) wurden in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert (teils wurden auch Stämme zur Coexpression von Ferredoxinen und Ferredoxinreduktasen erzeugt). Die Expression der Zielproteine in den entsprechenden Stämmen wurde daraufhin bei verschiedenen Bedingungen getestet (siehe Abschnitt 2.2.14.1). Die jeweils beste Bedingung (höchste lösliche Expression) wurde anschließend für die Expression im größeren Maßstab (siehe Abschnitt 2.2.14.2) genutzt. In der Folge wurde versucht die Proteine mit Hilfe einer HisTrap™ HP-Säule aufzureinigen und daraufhin einen Pufferaustausch durchzuführen. Zur visuellen Abschätzung der Reinheit der aufgereinigten Zielproteine mittels SDS-PAGE wurden jeweils der zellfreie Extrakt und das zugehörige, konzentrierte Zielprotein aufgetragen, um diese miteinander zu vergleichen (Abbildung 3.1). Im Fall von Fdx 4 wurden verschiedene Aufreinigungsstrategien getestet, da die Aufreinigung mittels HisTrap™ HP-Säule zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führte.

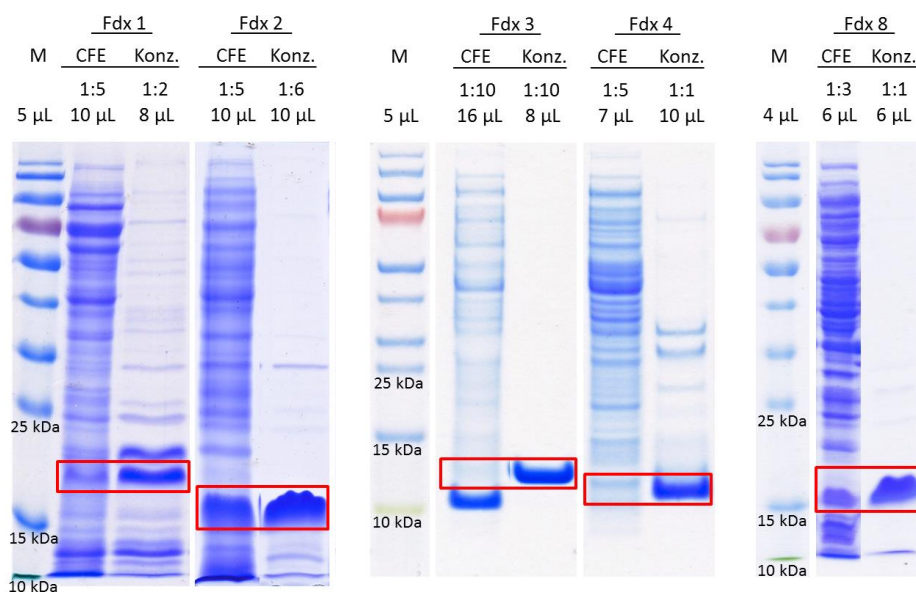


Abbildung 3.1: SDS-Gele zur Reinheitsüberprüfung der fünf über HisTrap™ HP-Säule aufgereinigten Ferredoxine. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe der Zielproteine an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Konz.: Konzentrat des aufgereinigten Ferredoxins.

Fdx 1

Zur Expression des Fdx 1-Gens wurden verschiedene Expressionsstämme im Rahmen von Expressionsstudien auf Proteinproduktion getestet. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_0491 wurde bei 37 bzw. 30 °C kultiviert und die resultierenden Proben mittels B-PER aufgeschlossen. Zudem wurden *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_0491 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_0491 bei 30 °C inkubiert und die entsprechenden Proben mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Unabhängig von der getesteten Expressionsbedingung konnten auf den SDS-Gelen nur schwache Fdx 1-Banden bei ca. 17 kDa identifiziert werden, sodass zum spezifischen Nachweis auch Western Blots durchgeführt wurden. Die besten Expressionsergebnisse zur Herstellung von löslichem Fdx 1 wurden schließlich für *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_0491 bei 37 °C und einer Expressionsdauer von weniger als 5 h erhalten, da in diesem Zeitraum deutliche Banden auf dem SDS-Gel und dem Western Blot für die lösliche Fraktion zu sehen sind (Abbildung 3.2). Diese Parameter wurden für die Expression im größeren Maßstab (500 mL Kultur) genutzt und die Kultivierung 3,5 h nach Induktion abgebrochen. Es wurde daraufhin versucht Fdx 1 mittels einer HisTrap™ HP-Säule aufzureinigen. Zunächst wurde die Säule mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Ab einer Imidazolkonzentration von ca. 240 mM begann die Elution des Zielproteins, allerdings war kein definierter Elutionspeak erkennbar (Abbildung 7.9 im Anhang). Wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich wird, war das resultierende Protein nicht sauber. Der Proteingehalt des Konzentrats und der Anteil am Gesamtprotein waren ebenfalls äußerst gering (Tabelle 7.1 im Anhang). Zudem wies die

Proteinlösung keine Ferredoxin-spezifische bräunliche Färbung auf, welche durch den Eisenschwefelcluster hervorgerufen wird. Dies kann zum einen daran liegen, dass das Ferredoxin in einer zu geringen Konzentration vorlag, um eine sichtbare Braunfärbung hervorzurufen. Zum anderen ist es möglich, dass in das Protein kein Eisenschwefelcluster eingebaut wurde oder dass es die prosthetische Gruppe im Laufe der Aufreinigung verloren hatte.

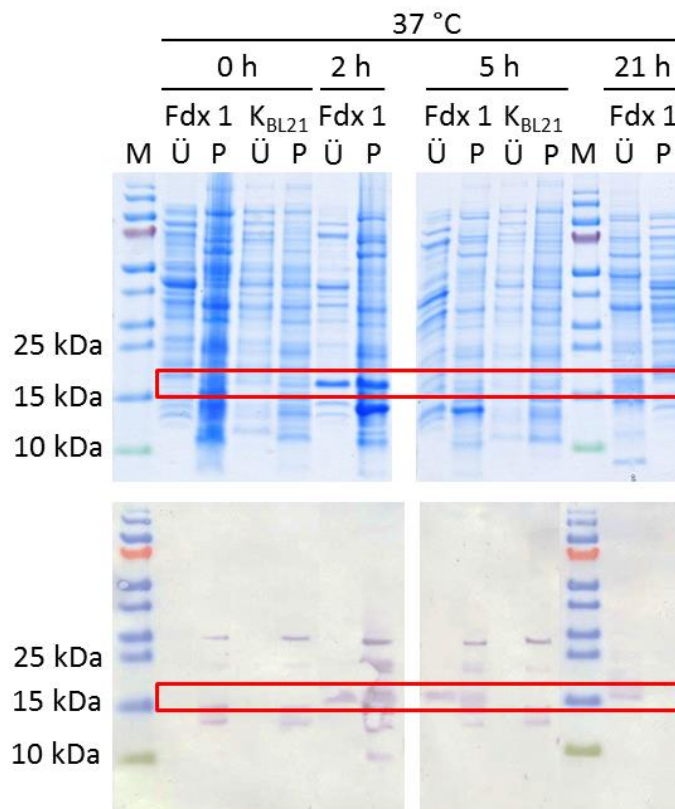


Abbildung 3.2: SDS-Gele und Western Blots zur Analyse der Expression von Fdx 1 in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_0491 bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Die Zellyse erfolgte mit B-PER. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Ü: Überstandsfraktion, P: Pelletfraktion, K_{BL21}: *E. coli* BL21 (DE3)-Leervektorkontrolle.

Fdx 2

Um die Expression des Fdx 2-Gens zu untersuchen, wurden verschiedene Expressionsstämme im Rahmen von Expressionsstudien getestet. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1479 wurde bei 37 bzw. 30 °C kultiviert und die resultierenden Proben wurden mittels B-PER aufgeschlossen. Zudem wurden *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1479 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1479 bei 30 °C inkubiert und die entsprechenden Proben durch Ultraschall aufgeschlossen.

Für die Fdx 2-Expression wurden dabei ähnliche geeignete Bedingungen gefunden wie für Fdx 1. Das beste Resultat ergab sich, wenn *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1479 bei 37 °C und einer Expressionsdauer von weniger als 5 h kultiviert wurde, da in diesem Zeitraum deutliche Banden bei

etwa 15 kDa auf dem SDS-Gel und dem Western Blot für die lösliche Fraktion zu sehen sind (Abbildung 3.3).

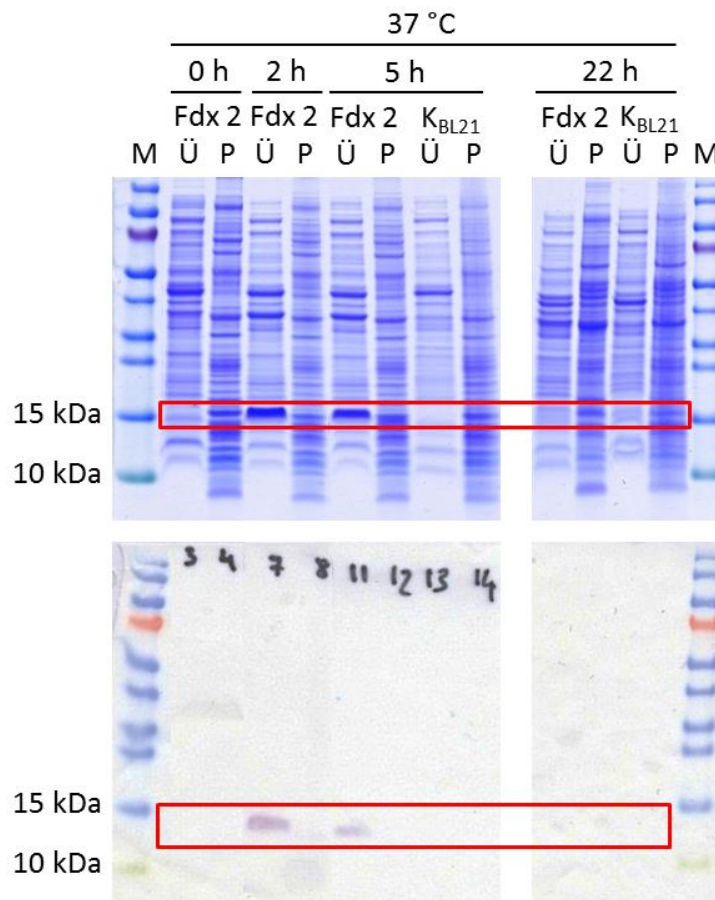


Abbildung 3.3: SDS-Gele und Western Blots zur Analyse der Expression von Fdx 2 in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1479 bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Die Zellyse erfolgte mit B-PER. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Ü: Überstandsfraktion, P: Pelletfraktion, K_{BL21} : *E. coli* BL21 (DE3)-Leervektorkontrolle.

Diese Parameter wurden auf die Expression im größeren Maßstab (500 mL Kultur) übertragen und die Zellen 3,5 h nach Induktion geerntet. Für die anschließende Fdx 2-Aufreinigung mit Hilfe einer HisTrap™ HP-Säule wurde diese zunächst mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Während der Aufreinigung war eine schwache Ferredoxin-typische Braunfärbung auf der Säule zu beobachten. Die Zielprotein-haltigen Fraktionen wiesen ebenfalls eine bräunliche Färbung auf. Der Fdx 2-Elutionspeak ist im entsprechenden Chromatogramm (Abbildung 7.10) deutlich zu erkennen. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, beträgt der geschätzte Reinheitsgrad des Fdx 2-haltigen Konzentrats etwa 70 %. Darüber hinaus ist der Anteil am Gesamtprotein mit ca. 17,8 % für eine Ferredoxinexpression ungewöhnlich hoch (siehe auch Tabelle 7.1 im Anhang).

Fdx 3

Der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_0763 wurde zur Expression des Fdx 3-Gens bei 30 °C und 37 °C getestet und die resultierenden Zellpellets der genommenen Proben mittels B-PER lysiert.

Die Ergebnisse für Fdx 3 glichen ebenfalls den Resultaten für Fdx 1 und 2. Die besten Expressionsergebnisse zur Herstellung von löslichem Fdx 3 wurden schließlich für *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_0763 bei 37 °C und einer Expressionsdauer von weniger als 5 h festgestellt (Abbildung 3.4).

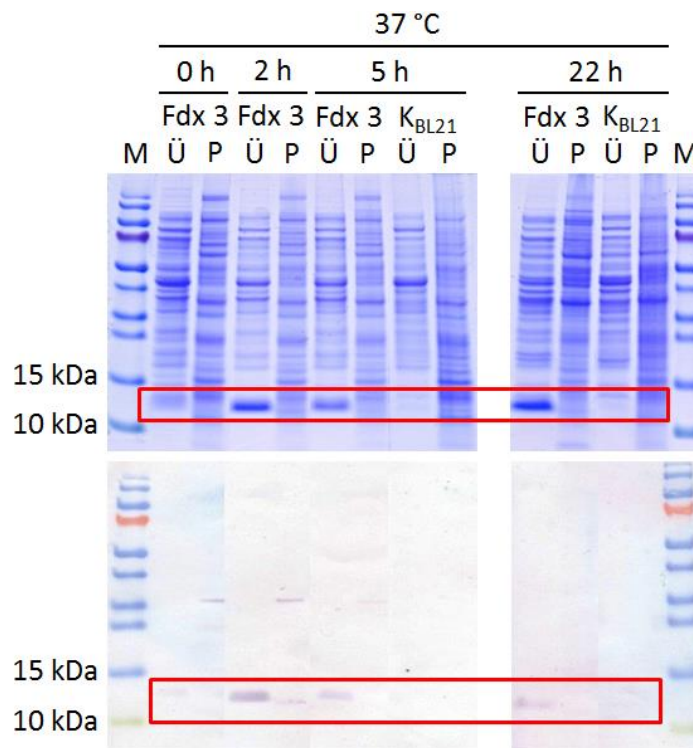


Abbildung 3.4: SDS-Gele und Western Blots zur Analyse der Expression von Fdx 3 in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_0763 bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Die Zellyse erfolgte mit B-PER. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Ü: Überstandsfraktion, P: Pelletfraktion, K_{BL21} : *E. coli* BL21 (DE3)-Leervektorkontrolle.

Zwar konnte diesmal auch eine deutliche Fdx 3-Bande bei ca. 12 kDa nach über Nacht-Expression auf dem SDS-Gel erkannt werden, allerdings war die Bande auf dem zugehörigen Western Blot schwächer als in den früheren Proben. Daher wurde für die Expression im größeren Maßstab (500 mL Kultur) ein Expressionszeitraum von 3,5 h gewählt. Für die Fdx 3-Aufreinigung mittels einer HisTrap™ HP-Säule wurde zunächst die Säule mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Im entsprechenden Chromatogramm (Abbildung 7.11) sind während des

Gradienten überlagernde Peaks zu erkennen und es konnte zu keinem Zeitpunkt der Aufreinigung eine Ferredoxin-typische Färbung beobachtet werden. Dennoch waren die Proteinkonzentration und Reinheit des Proteins (Tabelle 7.1 im Anhang bzw. Abbildung 3.1) vergleichsweise hoch. Das Ausbleiben der Braunfärbung bei gleichzeitig hoher Proteinkonzentration und Reinheit weist darauf hin, dass dem Zielprotein der Eisenschwefelcluster fehlt. Es ist zudem überraschend, dass die SDS-Gelprobe des Fdx 3-haltigen zellfreien Extrakts eine intensive Proteinbande bei etwa 10 kDa aufweist (Abbildung 3.1). Diese Bande wurde nicht bei der Analyse der übrigen Ferredoxin-haltigen zellfreien Extrakte beobachtet und es kann aufgrund des zu niedrigen Molekulargewichts ausgeschlossen werden, dass es sich um die Bande für das Fdx 3 handelt.

Fdx 4

Es wurden mit *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1226 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 sowie *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1226 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1226 zunächst unterschiedliche Expressionsstämme konstruiert und im Rahmen von Expressionsstudien getestet, um die Expression des Fdx 4-Gens zu untersuchen. Die pET28a_Tfu_1226-enthaltenden Stämme wurden auf Expression bei 30 °C und 37 °C getestet und die entsprechenden Proben mit B-PER bzw. Ultraschall aufgeschlossen. Dagegen wurden die Stämme, die pET22b_Tfu_1226 enthielten, nur bei 37 °C inkubiert und die resultierenden Zellpellets durch Ultraschall aufgeschlossen. Es konnte allerdings mit keinem der Stämme eine zufriedenstellende lösliche Expression von Fdx 4 erzielt werden, was im Fall von *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 nicht den Ergebnissen einer im Vorfeld angefertigten Bachelorarbeit entsprach (Maurer, 2011).

Da die Einzelexpression von Fdx 4 zu keiner sichtbaren löslichen Fdx 4-Expression und somit nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt hatte, wurde in der Folge die Coexpression von Fdx 4 mit FdR 6 untersucht. Die Gene dieser beiden Proteine liegen im Genom von *T. fusca* direkt hintereinander und befinden sich zudem zusammen mit dem Gen für CYP217A1 (Tfu_1225) in einem Operon (vermutlich für die Polyketidsynthese). Daher wurde angenommen, dass die resultierenden Proteine miteinander und mutmaßlich mit CYP217A1 sowie ggf. mit weiteren Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperieren. Des Weiteren wurde vermutet, dass das Vorhandensein des einen Redoxproteins in der Zelle sich stabilisierend auf die Produktion des putativen Redoxpartners auswirken könnte. Aus diesem Grunde wurden insgesamt vier Coexpressionsstämme angefertigt, bei denen das Gen für Fdx 4 jeweils in einem pET-Vektor und das Gen für FdR 6 im pIT2-MCS-Vektor vorlag: *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227 sowie *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227. Die pET28a_Tfu_1226-enthaltenden Coexpressionsstämme

wurden auf Expression bei 30 °C und 37 °C getestet und die entsprechenden Proben mittels B-PER bzw. Ultraschall aufgeschlossen. Die Coexpressionsstämme, welche pET22b_Tfu_1226 enthielten, wurden nur bei 30 °C inkubiert und die resultierenden Zellpellets der genommenen Proben mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Zur Herstellung von löslichem Fdx 4 wurden schließlich mit dem Stamm *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227 die besten Ergebnisse erzielt (Abbildung 3.5). Es handelt sich also um einen Coexpressionsstamm, bei dem sich das Gen für Fdx 4 in dem pET28a(+)-Vektor (mit His-Tag) und das Gen für FdR 6 in dem pIT2-MCS-Vektor (ohne His-Tag) befindet.

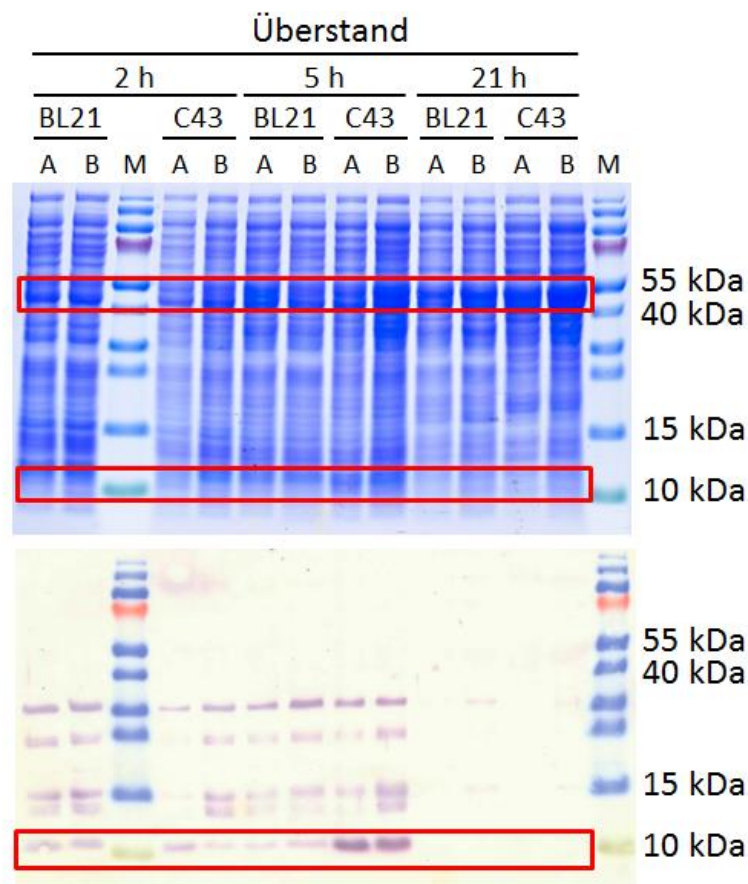


Abbildung 3.5: SDS-Gel und Western Blot zur Analyse der löslichen Expression von Fdx 4 und FdR 6 in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1226 + pIT2_Tfu_1227 bzw. C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 + pIT2_Tfu_1227 bei 37 °C (A) und 30 °C (B) in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe der Zielproteine an (Fdx 4: ca. 10 kDa, FdR 6: ca. 45 kDa). M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Auf dem entsprechenden SDS-Gel sind zwar wegen des geringen Expressionslevels keine definierten Banden für Fdx 4 bei ca. 10 kDa zu erkennen, dafür aber auf dem zugehörigen Western Blot. Es ist offensichtlich, dass eine Expressionsdauer von 5 h die geeignetste der getesteten Bedingungen darstellt. Da es in den Resultaten der Expression bei 30 °C und 37 °C kaum visuelle Unterschiede gab,

wurde für die Expression im größeren Maßstab die Temperatur gewählt, bei der die entsprechende Kultur zu dem Zeitpunkt die höhere OD_{600} aufwies. Daher fiel in diesem Fall die Wahl auf eine Expressionstemperatur von 30 °C. Nach der Proteinherstellung im größeren Maßstab (üblicherweise 500 mL Kultur und 4,5 h Expressionsdauer) sollte die Proteinaufreinigung durchgeführt werden. Es wurde zunächst eine standardmäßige Aufreinigung über eine HisTrap™ HP-Säule getestet. Dafür wurde die Säule zunächst mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Nach Beladen und Waschen der Säule konnte eine schwache Braunfärbung der Säule beobachtet werden. Das Zielprotein eluierte ab einer Imidazolkonzentration von ca. 260 mM. Im zugehörigen Chromatogramm ist jedoch kein definierter Elutionspeak erkennbar (Abbildung 7.12). Nach der Aufkonzentrierung der Fdx 4-enthaltenden Proben war ebenfalls eine bräunliche Färbung erkennbar. Bei dem anschließenden Pufferaustausch zur Entfernung des Imidazols denaturierte allerdings ein Großteil des Proteins und die bräunliche Färbung ging ebenso verloren. Dementsprechend war die Gesamtproteinmenge der aufgereinigten Fdx 4-Lösung gering und die Reinheit wurde auf ca. 75 % geschätzt (siehe Tabelle 7.1 im Anhang bzw. Abbildung 3.1).

Da die Bedingungen der oben beschriebenen Aufreinigungsmethode aufgrund der Denaturierung während des Pufferaustauschs nicht zur Fdx 4-Aufreinigung geeignet waren, wurden im Anschluss weitere Versuche der Aufreinigung unternommen. So wurde zunächst getestet, ob ein anderes Puffersystem während der Aufreinigung (Verwendung von den Kaliumphosphatpuffern Lysepuffer II und Elutionspuffer II) zu einer verbesserten Stabilität führt. Ebenso wurde untersucht, ob ein schonender Pufferaustausch im Anschluss an die Aufreinigung mittels HisTrap™ HP-Säule zu einer Stabilisierung des Enzyms führt. Dabei wird eine langsame Reduktion der Imidazolkonzentration durch Verdünnen der Proteinlösung mit Puffer ohne Imidazol (50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, mit 100 mM NaCl (c_f) und 5 % Glycerin (c_f)) und anschließende Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration erreicht. Zudem wurde in einem weiteren Versuch während des eben beschriebenen, schonenden Pufferaustauschs aufgereinigte FdR 6 zugegeben, um eine mögliche Stabilisierung auf Fdx 4 zu bewirken. Jedoch denaturierte das Fdx 4 trotz dieser Maßnahmen. Daher wurde im Folgenden eine Aufreinigungsstrategie ohne Nutzung des His-Tags getestet, um die Verwendung des Imidazols zu umgehen. Dafür sollte Fdx 4 im ersten Schritt mittels Anionenaustauschchromatographie über eine Q-Sepharose-Säule und im zweiten Schritt mittels hydrophober Interaktionschromatographie über eine Butyl- oder Phenyl-Sepharose-Säule aufgereinigt werden. Nach dem ersten Aufreinigungsschritt lag das Zielprotein stark verdünnt und in einer Mischung mit vielen verschiedenen anderen Proteinen vor, weshalb zunächst aufkonzentriert wurde. Während dieser Aufkonzentrierung denaturierte erneut ein großer Teil des enthaltenen Proteins, sodass direkt zur

Aktivitätsbestimmung übergegangen wurde, ohne den ursprünglich geplanten zweiten Aufreinigungsschritt durchzuführen.

Fdx 8

Zunächst stand für die Untersuchung der Fdx 8-Expression nur der pET22b_Tfu_1275-Vektor zur Verfügung. Dementsprechend wurde dieser in *E. coli* BL21 (DE3) und C43 (DE3) eingebracht und es resultierten *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1275 bzw. C43 (DE3) pET22b_Tfu_1275. Es wurden mit beiden Stämmen Expressionsstudien bei 37 °C durchgeführt und *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1275 wurde zudem bei 30 °C getestet. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Es konnte jedoch für keine der untersuchten Expressionsbedingungen eine lösliche Fdx 8-Expression festgestellt werden.

Motiviert durch die Ergebnisse für Fdx 4 wurde daraufhin untersucht, ob die Coexpression mit einer Ferredoxinreduktase aus *T. fusca* eine Verbesserung der löslichen Fdx 8-Expression zur Folge haben würde. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht das FdR 9-Gen im pIT2-MCS-Vektor verfügbar war, wurden die vorhandenen Plasmide pIT2_Tfu_2348 und pIT2_Tfu_1227 zur Coexpression von Fdx 8 mit FdR 5 bzw. FdR 6 eingesetzt. Die entsprechend erzeugten Stämme *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1275 pIT2_Tfu_2348 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1275 pIT2_Tfu_2348 sowie *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1227 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1227 wurden bei 30 °C kultiviert und die Zellpellets der genommenen Proben anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Allerdings konnten auch mit diesen Stämmen keine geeigneten Bedingungen für die Expression von löslichem Fdx 8 identifiziert werden.

In der Folge sollte untersucht werden, ob ein Wechsel des Expressionsvektors zu einer Verbesserung der Fdx 8-Expression führen würde. Der bisher verwendete pET22b(+) verfügt über eine Ampicillinresistenz und das resultierende Protein besitzt in diesem Fall keinen His-Tag. Als alternativer Vektor sollte das pET28a(+)-Plasmid mit Kanamycinresistenz verwendet werden. Zudem wurde durch die Wahl der entsprechenden Restriktionsschnittstellen sichergestellt, dass das Protein über einen N-terminalen His-Tag verfügt. Nach einer Umklonierung des Fdx 8-Gens von pET22b_Tfu_1275 in pET28a(+) wurde der resultierende Vektor pET28a_Tfu_1275 in *E. coli* BL21 (DE3) und C43 (DE3) transformiert, sodass die entsprechenden Stämme *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1275 bzw. C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 für Expressionsstudien bei 37 °C genutzt wurden. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Darüber hinaus wurde ebenfalls das FdR 9-Gen in den pIT2-MCS-Vektor eingebracht, sodass neben den erwähnten pET28a_Tfu_1275-haltigen Stämmen zur Einzelexpression ebenfalls die

Coexpressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1273 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1273 generiert werden konnten. Die Gene für Fdx 8 und FdR 9 liegen im Genom von *T. fusca* in unmittelbarer Nähe zueinander und flankieren zudem das Gen für CYP222A1 (Tfu_1274). Daher bestand die Möglichkeit, dass die resultierenden Proteine miteinander und womöglich mit CYP222A1 sowie ggf. mit weiteren Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperieren. Darüber hinaus wurde angenommen, dass das Vorhandensein des einen Redoxproteins in der Zelle sich stabilisierend auf die Produktion des putativen Redoxpartners auswirken könnte. Die Expressionsstudien mit den Coexpressionsstämmen wurden bei 30 °C und 37 °C durchgeführt und die Zellpellets der genommenen Proben wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Gleich mehrere Expressionsstudien mit pET28a_Tfu_1275-enthaltenden Stämmen resultierten in guten Ergebnissen. In Abbildung 3.6 sind in zeitlicher Reihenfolge die Proben der löslichen Expression mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 (A) und *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1275 (B), sowie der Coexpression mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1273 (C) bei 37 °C dargestellt. Es ist ersichtlich, dass alle Proben – bis auf alle 0 h-Proben und die 24 h-Probe von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1275 – intensive Proteinbanden bei etwa 16 kDa aufweisen. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Bande für Fdx 8, da diese Bande unabhängig vom verwendeten Expressionsstamm in den ersten Proben nach der Induktion stets intensiver ist als in der 0 h-Probe vor Induktion. Darüber hinaus wurde diese Bande in anderen Expressionsstudien zu keiner Zeit beobachtet. Offenbar läuft das Zielprotein Fdx 8 mit einem Molekulargewicht von 9,1 kDa deutlich höher als ursprünglich erwartet. Bei der Expression mit *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1275 führte die Induktion dazu, dass das Wachstum der Zellen gehemmt war und die OD₆₀₀ der Kultur über mehrere Stunden kaum anstieg. Daher wurde keine 5 h-Probe abgenommen, da aufgrund der niedrigen OD₆₀₀ ein äußerst hohes Probenvolumen notwendig gewesen wäre, um genügend Zellmaterial für den Zellaufschluss mittels Ultraschall und die folgende SDS-PAGE-Analyse zur Verfügung zu haben. Da die *E. coli* BL21 (DE3)-Kultur bis zur Induktion eine normale OD₆₀₀ aufwies, wurde die Wachstumshemmung daher wahrscheinlich durch die Überexpression des Ferredoxins verursacht. Für Aufreinigungen und den folgenden Einsatz in Biokatalysen wurde Fdx 8 im größeren Maßstab (200 – 500 mL) mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 bzw. *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1273 bei 37 °C hergestellt. Trotz der intensiveren Proteinbande auf dem SDS-Gel für die 2 h-Probe wurde eine Expressionsdauer von 5 h gewählt, denn die Kultur wies zu diesem Zeitpunkt eine deutlich höhere OD₆₀₀ auf. Bei der anschließenden Aufreinigung mittels HisTrap™ HP-Säule wurde diese zunächst mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Nach Beladung und Waschen war eine Braunfärbung der Säule erkennbar. In den Zielprotein-haltigen

Fraktionen war ebenso eine bräunliche Färbung zu beobachten. Der Fdx 8-Elutionspeak (Elution ab ca. 165 mM Imidazol) ist im entsprechenden Chromatogramm (Abbildung 7.13) eindeutig zu erkennen. Die vereinigten Fdx 8-haltigen Fraktionen wurden nach der Aufkonzentrierung schonend umgepuffert, d. h. es wurde eine langsame Reduktion der Imidazolkonzentration durch Verdünnen der Proteinlösung mit Puffer ohne Imidazol (50 mM KPi -Puffer, pH 7,4, mit 20 bzw. 100 mM NaCl (c_i) und 5 % Glycerin (c_f)) und anschließende Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration erreicht. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, wurde die Reinheit des resultierenden Fdx 8-haltigen Konzentrats auf etwa 95 % geschätzt. Der Anteil am Gesamtprotein lag bei geringen ca. 2,4 % (siehe Tabelle 7.1 im Anhang).

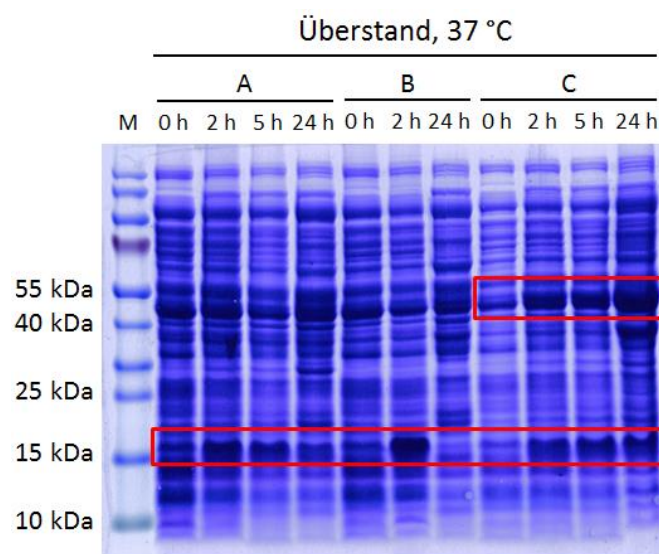


Abbildung 3.6: SDS-Gel zur Analyse der löslichen Expression von Fdx 8 (A, B, C) und Fdx 9 (C) in *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 (A) bzw. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1275 (B) bzw. *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 pT2_Tfu_1273 (C) bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($\text{OD}_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $\text{OD} = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe der Zielproteine an (Fdx 8: ca. 16 kDa, Fdx 9: ca. 45 kDa). M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

3.1.1.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung eines putativen Flavodoxins aus *T. fusca*

Im Gegensatz zu den Genen für die Ferredoxine und die Ferredoxinreduktasen wurde das Gen für das Flavodoxin aus *T. fusca* nicht über PCR aus dem Genom des Ursprungsorganismus isoliert, sondern als synthetisches, für die Expression in *E. coli* optimiertes Gen bestellt. Für die Klonierung dieses synthetischen Gens Tfu_3023-synth (Proteinbezeichnung: Fldx-s.) wurde es mit *Nde*I und *Eco*RI verdaut und in pET28a(+) (mit N-terminalem His-Tag), pET42b(+) und pBAD-N (beide ohne His-Tag) eingebracht. Durch PCR wurde die *Eco*RI-Schnittstelle durch eine *Xho*I-Schnittstelle ersetzt und das Gen (Tfu_3023-synth_*Xho*I) anschließend nach Restriktion mit *Nde*I und *Xho*I in pET42b(+) eingefügt, wodurch das resultierende Protein über einen C-terminalen His-Tag verfügte. Darüber

hinaus wurde in einer alten Annotierung des *T. fusca*-Genoms eine 5'-verlängerte Version des Tfu_3023-Gens entdeckt. Diese Version weist 24 Codons vor dem Startcodon des Tfu_3023-Gens der aktuellen Annotierung ein alternatives Startcodon (GTG) auf. Um auszuschließen, dass in der aktuellen Annotierung ein Fehler vorliegt und in der Folge mit einer verkürzten Variante gearbeitet wird, wurde durch PCR mit einem ebenfalls Codon-optimierten Primer eine 5'-verlängerte Genvariante (Tfu_3023-synth-elong) erzeugt. Dabei wurde das alternative Startcodon (GTG) gegen ein konventionelles Startcodon (ATG) ausgetauscht. Wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist, besitzt das resultierende Protein Fldx-s.-e. im Vergleich zu Fldx-s. am N-Terminus einen Überhang von 24 Aminosäuren.

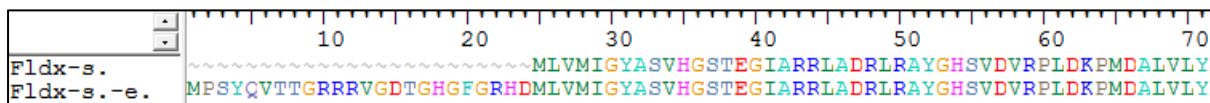


Abbildung 3.7: Proteinsequenz vom Flavodoxin nach neuer Annotierung (Fldx-s.) im Vergleich zum Flavodoxin nach alter Annotierung (Fldx-s.-e.), welches einen N-terminalen Überhang von 24 Aminosäuren aufweist.

Zur Restriktion des verlängerten Gens Tfu_3023-synth-elong wurden erneut *NdeI* und *EcoRI* verwendet und das Gen in pET28a(+) (mit N-terminalem His-Tag) und pET42b(+) (ohne His-Tag) eingefügt. Die entsprechenden Plasmide wurden in verschiedene *E. coli*-Stämme (TOP10, BL21 (DE3), C43 (DE3)) eingebracht und es wurde eine Vielzahl an Expressionsstudien durchgeführt, um geeignete Bedingungen zur Expression des synthetischen Flavodoxingens bzw. des am N-Terminus verlängerten synthetischen Flavodoxingens zu identifizieren (siehe Abschnitt 2.2.14.1). Dabei wurden verschiedene Temperaturen (20 – 37 °C), unterschiedliche Induktorkonzentrationen (0,1 – 0,4 mM IPTG bzw. 0,0075 – 0,02 % Arabinose) und verschiedene Medien (TB- sowie TB-S-Medium) getestet. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden bei allen Expressionsstudien mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Die höchste lösliche Expression von Fldx-s. wurde mit *E. coli* C43 (DE3) pET42b_Tfu_3023-synth bei 30 °C gefunden (Abbildung 3.8). Es sind eindeutig Banden bei ca. 16 kDa auszumachen, die dem putativen Flavodoxin (Molekulargewicht: 18,7 kDa) zuzuordnen sind. Es läuft daher etwa auf der erwarteten Höhe.

Da das resultierende Protein über keinen His-Tag verfügt, wurden nach erfolgter Expression im größeren Maßstab (500 mL Kultur) für 22 h verschiedene Methoden der Ionenaustausch- und hydrophoben Interaktionschromatographie getestet. Für alle Chromatographieverfahren wurden Binde- und Elutionspuffer (I) mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet. Zunächst wurde eine Kationenaustauschchromatographie mit einer SP-Sepharose-Säule und Puffern bei pH 7,0 getestet,

da der theoretische isoelektrische Punkt von Fldx-s. bei 8,1 liegt (berechnet mit Hilfe des Programms ProtParam unter <http://expasy.org/tools/protparam>) und das Protein somit unter den gewählten Bedingungen eine positive Nettoladung aufweisen sollte. Allerdings wurde das durch den gebundenen Cofaktor FMN gelb-gefärbte Fldx-s. nach dem Aufreinigungsdurchgang fast ausschließlich im Durchfluss nachgewiesen, was bedeutet, dass das Protein nicht an das Säulenmaterial gebunden hatte (Analyse mittels SDS-PAGE).

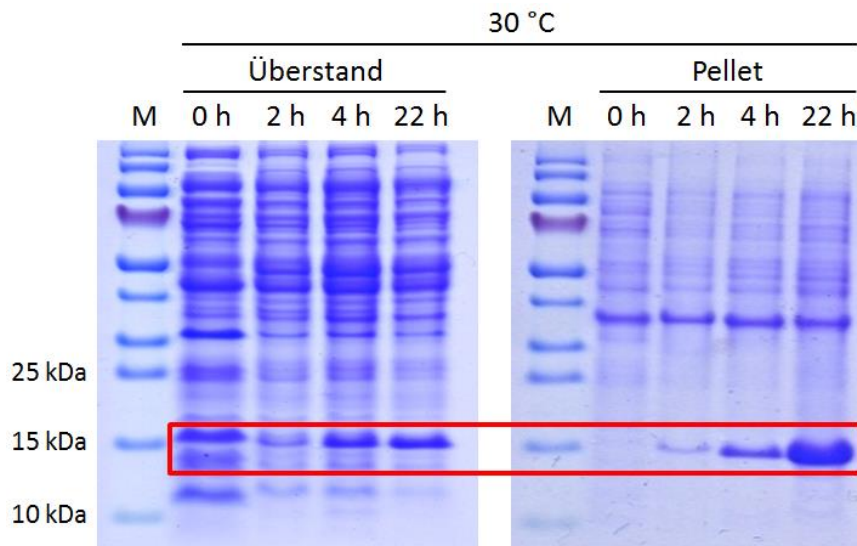


Abbildung 3.8: SDS-Gel zur Analyse der Expression von Fldx-s. in *E. coli* C43 (DE3) pET42b_Tfu_3023-synth bei 30 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{start} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Daher wurde zu einer anderen Chromatographiemethode übergegangen und die hydrophobe Interaktionschromatographie mit einer Butyl-Sepharose-Säule und Puffern bei pH 7,0 getestet. Dabei konnte bereits durch eine Gelbfärbung der Säule die Interaktion von Fldx-s. mit der stationären Phase festgestellt werden. Allerdings konnte eine Elution des Proteins von der Säule nur mit reinem ddH₂O bzw. später mit NaOH und Isopropanol erreicht werden (Nachweis durch Verfolgung der Absorption bei 450 nm und mittels SDS-PAGE). Dies wies darauf hin, dass ein großer Teil des Proteins auf der Säule denaturiert war. Die Fraktionen der Elution in reinem ddH₂O wurden mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und dabei festgestellt, dass wiederum der Großteil an Protein ausfiel. Außerdem lag das verbliebene Fldx-s. nicht aufgereinigt, sondern verunreinigt mit vielen weiteren Proteinen vor. Daher führte auch diese getestete Methode der hydrophoben Interaktionschromatographie zu keinem befriedigenden Ergebnis, weshalb anschließend eine Anionenaustauschchromatographie getestet wurde. In diesem Fall wurde eine Q-Sepharose-Säule genutzt und ebenfalls Puffer bei pH 7,0 verwendet. Nach Beladung der Säule und während des

Elutionsgradienten konnte zwar keine Gelbfärbung festgestellt werden, aber mit Hilfe der SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass das Fldx-s. im Laufe des Gradienten zusammen mit vielen weiteren Proteinen von der Säule eluierte. Deshalb wurde im zweiten Schritt eine Phenyl-Sepharose-Säule zur Durchführung einer hydrophoben Interaktionschromatographie eingesetzt. Nach Beladung und Waschen der Säule konnte auf der Phenyl-Sepharose-Säule eine Gelbfärbung beobachtet werden. Jedoch konnte eine Elution des Zielproteins (und weiterer Proteine) wieder nur mit reinem ddH₂O bzw. später mit NaOH und Isopropanol erreicht werden (Nachweis durch Verfolgung der Absorption bei 450 nm und mittels SDS-PAGE). Die Fraktionen der Elution in reinem ddH₂O wurden direkt mit Elutionspuffer versetzt, um einer möglichen Denaturierung des Zielproteins in ddH₂O vorzubeugen. Im Anschluss wurden die Fldx-s.-haltigen Fraktionen vereinigt. Diese Lösung sollte mittels Ultrafiltration mit geeigneter Ausschlussgröße (30.000 Da MWCO) weiter aufgereinigt werden, indem größere Proteine zurückgehalten werden sollten und das Zielprotein die Filtermembran passieren sollte. Allerdings wurde das Fldx-s. trotz seines geringen Molekulargewichts (18,7 kDa) und der deutlich größeren Porenweite der Filtermembran zurückgehalten. Da die resultierende Proteinlösung viele verschiedene Proteine enthielt und verhältnismäßig wenig Fldx-s., wurde der Aufreinigungsansatz nicht weiter verfolgt.

Für das im Vergleich zum Fldx.-s. am N-Terminus verlängerte Fldx-s.-e. wurde nach den oben erwähnten Expressionstests die höchste lösliche Expression mit *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_3023-synth-elong bei 25 °C und einer Expressionsdauer von etwa 5 h gefunden. Das Molekulargewicht von Fldx-s.-e. mit His-Tag beträgt 22,5 kDa und Abbildung 3.9 zeigt eine ausgeprägte Bande auf der erwarteten Höhe bei der erwähnten Expressionsbedingung.

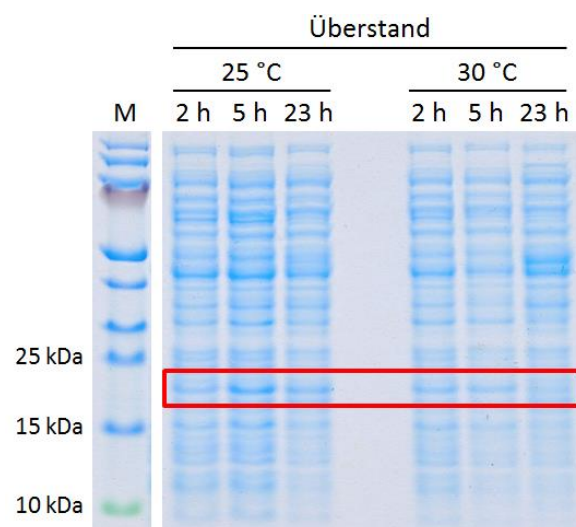


Abbildung 3.9: SDS-Gel zur Analyse der löslichen Expression von Fldx-s.-e. in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_3023-synth-elong bei 25 °C und 30 °C in Abhängigkeit von der Zeit (OD_{Start} = 0,2; induziert mit 0,4 mM IPTG bei OD = 1). Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Zudem ist ersichtlich, dass eine Expressionstemperatur von 25 °C gegenüber 30 °C zu mehr löslichem Fldx-s.-e. führt. Nach der Expression im größeren Maßstab bei ähnlichen Bedingungen (Expressionsdauer 6,3 h) wurde die Fldx-s.-e.-Aufreinigung mit Hilfe einer HisTrap™ HP-Säule getestet. Dazu wurde die Säule mit Lysepuffer II äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer II gestartet wurde. Zwar konnte zunächst sehr sauberes Fldx-s.-e. bei einer Imidazolkonzentration von 500 mM erhalten werden (Abbildung 7.18), beim anschließenden Aufkonzentrieren und Pufferaustausch denaturierte jedoch ein Großteil des Proteins und die Gelbfärbung ging verloren.

3.1.1.3 Klonierung, Expression und Aufreinigung von putativen Ferredoxinreduktasen

Die Gene der putativen Ferredoxinreduktase FdR 5 bis FdR 7 waren zuvor bereits innerhalb einer Bachelorarbeit in die Vektoren pIT2-MCS und pET28a(+) eingebracht worden. Zur Klonierung des FdR 9-Gens von pET22b_Tfu_1273 in pET28a(+) wurden die Restriktionsenzyme *NdeI* und *EcoRI* verwendet, für die Klonierung in pIT2-MCS dagegen *NdeI* und *HindIII*. Alle resultierenden Vektoren sowie das zur Verfügung gestellte pET22b_Tfu_1273-Plasmid wurden in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert (teils wurden auch Stämme zur Coexpression von Ferredoxinen und Ferredoxinreduktasen erzeugt) und die Expression in den entsprechenden Stämmen wurde bei verschiedenen Bedingungen getestet (siehe Abschnitt 2.2.14.1). Die beste Bedingung (höchste lösliche Expression) wurde für die Expression im größeren Maßstab (siehe Abschnitt 2.2.14.2) genutzt, die Proteine mit Hilfe einer HisTrap™ HP-Säule aufgereinigt und daraufhin ein Pufferaustausch durchgeführt. Zur visuellen Abschätzung der Reinheit der aufgereinigten Zielproteine mittels SDS-PAGE wurden jeweils der zellfreie Extrakt und das zugehörige, konzentrierte Zielprotein aufgetragen, um diese miteinander zu vergleichen (Abbildung 3.10).

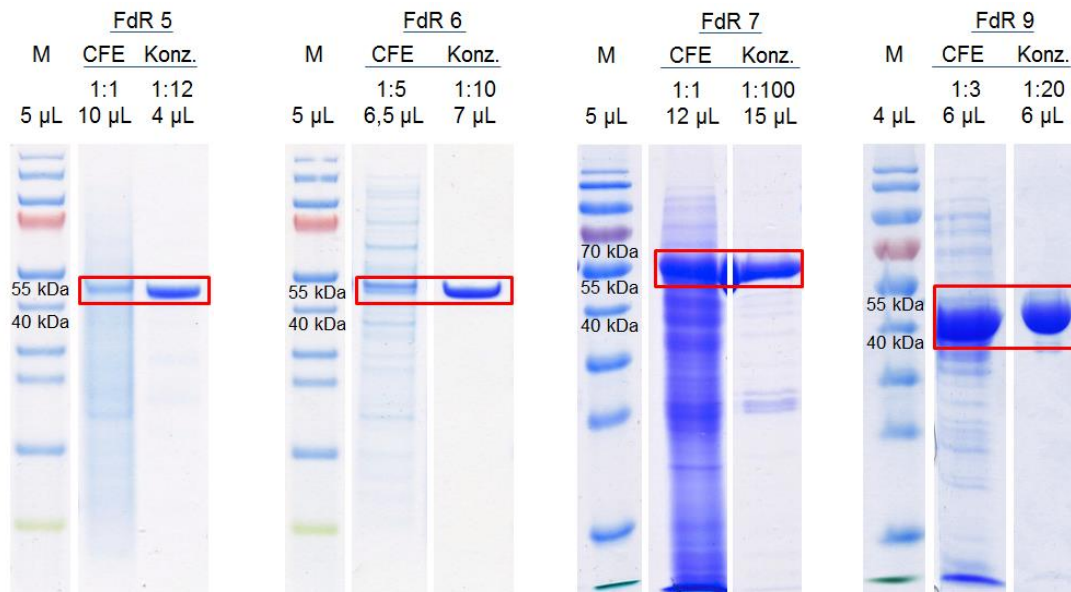


Abbildung 3.10: SDS-Gele zur Reinheitsüberprüfung der vier über HisTrap™ HP-Säule aufgereinigten Ferredoxinreduktasen. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe der Zielproteine an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Konz.: Konzentrat der aufgereinigten Ferredoxinreduktase.

FdR 5

Zur Expression des FdR 5-Gens wurden die beiden Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_2348 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_2348 konstruiert und im Rahmen von Expressionsstudien bei 30 °C (nur *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_2348) und 37 °C getestet. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden mit B-PER aufgeschlossen.

Für die FdR 5-Produktion wurde die beste lösliche Expression mit *E. coli* C43 (DE3) + pET28a_Tfu_2348 bei 37 °C und einer Expressionsdauer von ca. 20 h festgestellt, was die entsprechenden Banden bei ca. 42 kDa auf dem SDS-Gel und dem Western Blot in Abbildung 3.11 belegen. Für die Expression im größeren Maßstab (500 mL Kultur) wurde allerdings eine Expressionsdauer von 25 h und zudem eine Kultivierungstemperatur von 30 °C verwendet, da davon ausgegangen wurde, dass sich damit der Anteil an löslichem Protein erhöhen würde.

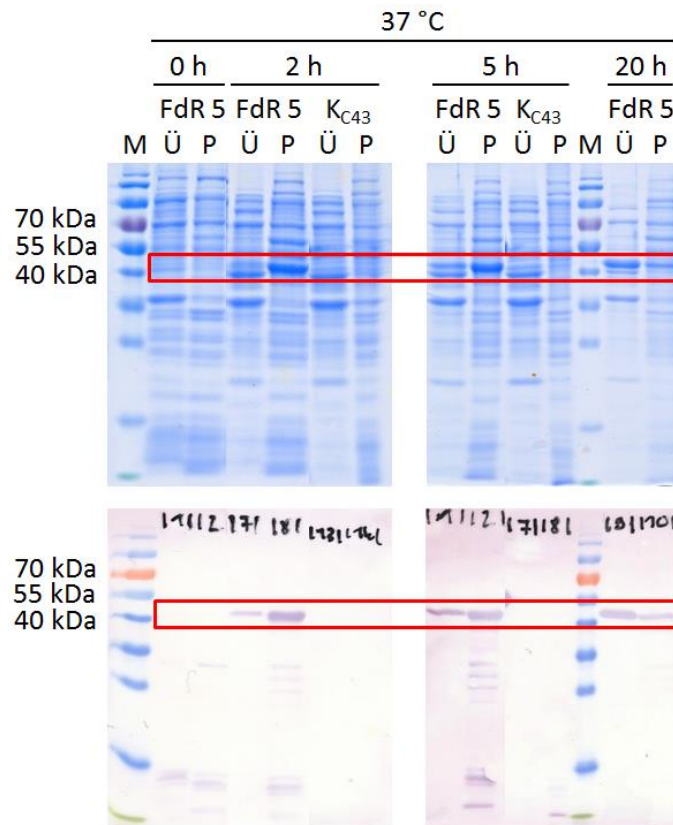


Abbildung 3.11: SDS-Gele und Western Blots zur Analyse der Expression von FdR 5 in *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_2348 bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Die Zellyse erfolgte mit B-PER. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Ü: Überstandsfraction, P: Pelletfraction, K_{C43} : *E. coli* C43 (DE3)-Leervektorkontrolle.

Bei der anschließenden FdR 5-Aufreinigung mit Hilfe einer HisTrap™ HP-Säule wurde die Säule mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Nach Beladen und Waschen war eine deutliche Gelbfärbung der Säule zu beobachten, die durch das in Reduktasen als prosthetische Gruppe befindliche FAD hervorgerufen wurde. Die Elution von FdR 5 begann bei einer Imidazolkonzentration von etwa 200 mM, der entsprechende Peak ist im Chromatogramm (Abbildung 7.14) eindeutig ersichtlich. Die Zielprotein-haltigen Fraktionen wiesen ebenfalls eine gelbe Färbung auf. Nach der über Nacht-Lagerung der Fraktionen bei 4 °C ohne vorherigen Puffertausch war ein Teil des Proteins ausgefallen. Die Fraktionen wurden trotzdem zur Aufkonzentrierung genutzt, da durch ein SDS-Gel bestätigt werden konnte, dass noch genügend Reduktase in gelöster Form vorlag. Die Präzipitation des Zielproteins könnte eine Folge der Dauer oder Art der Lagerung bei 4 °C gewesen sein. Dass die Denaturierung durch die hohe Imidazolkonzentration in den Fraktionen ausgelöst wurde, ist weniger wahrscheinlich, da der Ausfall auch beobachtet wurde, wenn das entsalzte Proteinkonzentrat für einen Test aufgetaut und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert wurde. Es kann also daran

liegen, dass sich eine Temperatur von 4 °C nicht zur dauerhaften Lagerung eignet, oder dass dem Puffer gewisse Zusätze fehlen, welche die FdR 5 in Lösung halten. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, ist die Reinheit des resultierenden FdR 5-haltigen Konzentrats zufriedenstellend und der Anteil am Gesamtprotein lag bei etwa 17 % (siehe auch Tabelle 7.2 im Anhang). Es konnten insgesamt ca. 83 mg FdR 5 aus einem Liter Kultur isoliert werden.

FdR 6

Um die Expression des FdR 6-Gens zu untersuchen, wurden mit *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1227 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1227 zwei Expressionsstämme konstruiert und im Rahmen von Expressionsstudien bei 30 °C und 37 °C getestet. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden mittels B-PER aufgeschlossen. Allerdings konnte bei keiner der verwendeten Expressionsbedingungen eine zufriedenstellende lösliche Expression von FdR 6 erzielt werden.

Da die Einzelexpression von FdR 6 zu keiner sichtbaren löslichen Fdx 6-Expression und somit nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt hatte, wurde in der Folge die Coexpression von FdR 6 mit Fdx 4 untersucht. Wie bereits im Abschnitt zur Expression von Fdx 4 detaillierter erläutert (siehe Abschnitt 3.1.1.1), liegen die Gene dieser beiden Proteine im Genom von *T. fusca* direkt hintereinander. Daher wurde angenommen, dass die resultierenden Proteine miteinander kooperieren und dass das Vorhandensein des einen Proteins in der Zelle sich stabilisierend auf die Produktion des putativen Redoxpartners auswirken könnte. Aus diesem Grunde wurden insgesamt vier Coexpressionsstämme angefertigt, bei denen das Gen für FdR 6 jeweils in einem pET-Vektor und das Gen für Fdx 4 im pIT2-MCS-Vektor vorlag: *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 sowie *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226.

Es wurden schließlich mit dem Stamm *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 bei 30 °C die besten Ergebnisse erzielt. Es handelt sich also um einen Coexpressionsstamm, bei dem sich das Gen für FdR 6 in dem pET28a(+)-Vektor (mit His-Tag) und das Gen für Fdx 4 in dem pIT2-MCS-Vektor (ohne His-Tag) befindet. Auf dem entsprechenden SDS-Gel (Abbildung 3.12) sind zumindest bei 5 h (nur *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226) und 21 h (beide Stämme) Banden bei etwa 50 kDa ersichtlich, die der FdR 6 (ca. 46 kDa) zuzuordnen sind. Auf dem zugehörigen Western Blot ist der Nachweis des Proteins allerdings deutlich besser zu erkennen. Banden für Fdx 4 (ca. 7 kDa) sind dagegen nicht auszumachen, was für den Western Blot auch zu erwarten war, da Fdx 4 in diesem Fall über keinen His-Tag verfügt.

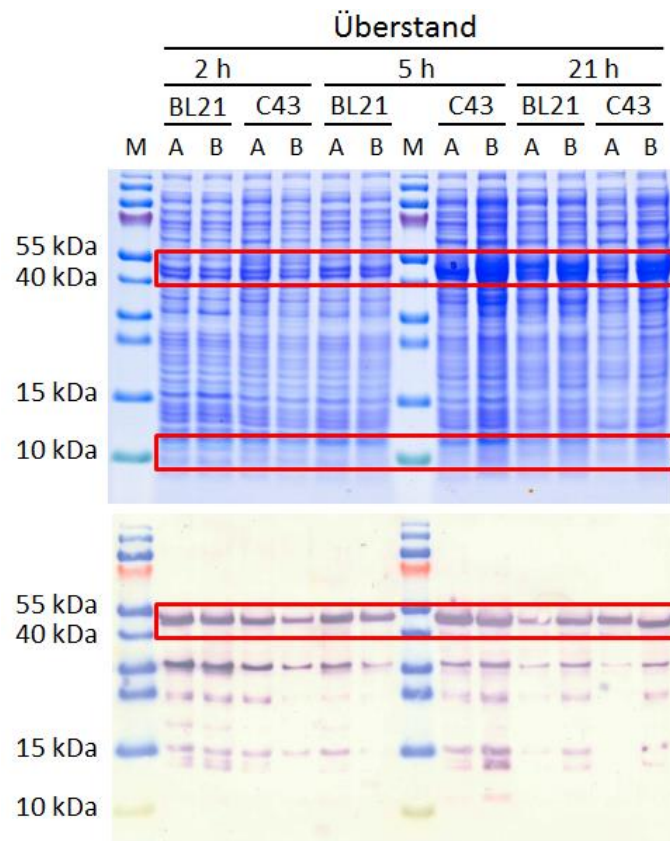


Abbildung 3.12: SDS-Gele und Western Blots zur Analyse der löslichen Coexpression von FdR 6 und Fdx 4 in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 bzw. *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 bei 37 °C (A) und 30 °C (B) in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{Start} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe der Zielproteine an (FdR 6: ca. 46 kDa, Fdx 4: ca. 7 kDa). M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Für die Expression im größeren Maßstab (500 mL Kultur) wurde *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226 bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C und einer Expressionsdauer von etwa 21 h verwendet, da für diese Bedingung eine intensive FdR 6-Bande auf dem oben gezeigten SDS-Gel beobachtet wurde und die Kultur zu diesem Zeitpunkt eine höhere OD_{600} aufwies als zu früheren Zeitpunkten. Nach der Expression im größeren Maßstab bei den eben erwähnten Bedingungen wurde die FdR 6 über eine HisTrap™ HP-Säule aufgereinigt. Die Säule wurde zunächst mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Während der Aufreinigung war eine deutliche Gelbfärbung der Säule zu erkennen. Die FdR 6-Elution begann bei einer Imidazolkonzentration von etwa 350 mM (siehe Chromatogramm in Abbildung 7.15). Die Fraktionen, die eine gelbe Färbung aufwiesen, wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Dabei fiel ein großer Teil des enthaltenen Proteins aus, sodass am Ende nur 34 mg/(L Kultur) erhalten wurden, wogegen eine optimale Reinheit festgestellt wurde (Tabelle 7.2 im Anhang und Abbildung 3.10).

FdR 7

E. coli BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1915 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1915 wurden zur Expression des FdR 7-Gens konstruiert und im Rahmen von Expressionsstudien bei 30 °C (nur *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1915) und 37 °C getestet. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden mit B-PER aufgeschlossen.

Die beste lösliche Expression für FdR 7 wurde mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1915 bei 30 °C und einer Expressionsdauer von ca. 22 h festgestellt, wie in Abbildung 3.13 gezeigt (Banden bei ca. 50 kDa).

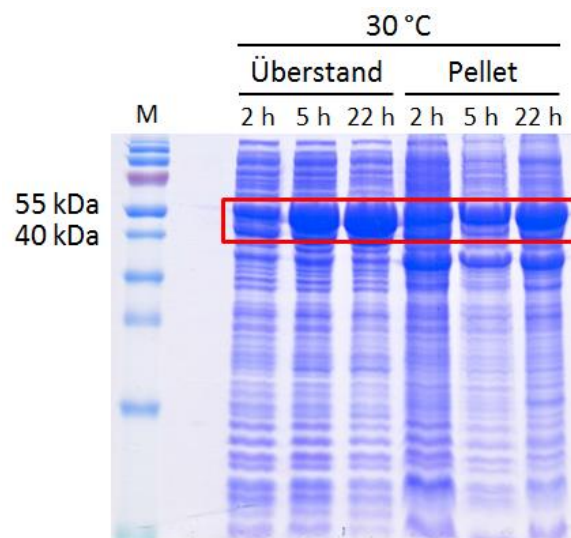


Abbildung 3.13: SDS-Gel zur Analyse der Expression von FdR 7 in *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1915 bei 30 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Für die Expression im größeren Maßstab (500 mL) wurde allerdings eine Expressionsdauer von 26 h verwendet. Bei der anschließenden FdR 7-Aufreinigung mit Hilfe einer HisTrap™ HP-Säule wurde diese mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Es war eine deutliche Gelbfärbung der Säule ersichtlich. Die Elution von FdR 7 begann bereits bei ca. 110 mM Imidazol, der zugehörige Peak ist im entsprechenden Chromatogramm (Abbildung 7.16) eindeutig ersichtlich. Die Zielprotein-haltigen Fraktionen wiesen ebenfalls eine gelbe Färbung auf. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, ist die Reinheit des FdR 7-haltigen Konzentrats zufriedenstellend und die Ausbeute bezogen auf einen Liter Kultur war mit 429 mg vergleichsweise hoch. Der Anteil des Zielproteins am Gesamtprotein war mit ca. 43 % ebenfalls sehr hoch (siehe auch Tabelle 7.2 im Anhang).

FdR 9

Es wurden verschiedene Expressionsstämme konstruiert und im Rahmen von Expressionsstudien getestet, um die Expression des FdR 9-Gens zu untersuchen. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_Tfu_1273 und C43 (DE3) pET28a_Tfu_1273 sowie *E. coli* BL21 (DE3) pET22b_Tfu_1273 und C43 (DE3) pET22b_Tfu_1273 wurden bei 30 °C und 37 °C getestet. Die Zellpellets der genommenen Proben wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Dabei führten gleich mehrere Expressionsbedingungen zu guten Ergebnissen. In Abbildung 3.13 sind in zeitlicher Reihenfolge die Proben der (löslichen) Expression mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1273 bei 30 °C bzw. 37 °C wiedergegeben. Alle Proben weisen Proteinbanden bei etwa 50 kDa auf. Hierbei handelt es sich um die Bande für FdR 9 (Molekulargewicht: 44,5 kDa). Zwar konnte für die Expression von FdR 9 in *E. coli* C43 (DE3) pET22b_Tfu_1273 (ohne His-Tag) eine noch höhere lösliche Expression festgestellt werden, für die Expression im größeren Maßstab und Folgearbeiten wurde allerdings das pET28a_Tfu_1273-Plasmid verwendet, da zur Aufreinigung eine einfache IMAC favorisiert wurde. Für die Aufreinigung und den folgenden Einsatz in Biokatalysen wurde FdR 9 im größeren Maßstab (600 mL Kultur) mit dem oben erwähnten *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1273-Stamm bei 37 °C und einer Expressionsdauer von 24 h hergestellt, da bei diesen Parametern auf dem entsprechenden SDS-Gel (Abbildung 3.14) die intensivste FdR 9-Bande in der löslichen Fraktion erkennbar war. Bei der anschließenden Aufreinigung mittels HisTrap™ HP-Säule wurde die Säule mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Eine Gelbfärbung der Säule während der Aufreinigung war deutlich erkennbar. In den Zielprotein-haltigen Fraktionen war ebenso eine gelbe Färbung zu beobachten. Der FdR 9-Elutionspeak (Elution bereits ab ca. 35 mM Imidazol) ist im entsprechenden Chromatogramm (Abbildung 7.17) eindeutig zu erkennen. Die vereinigten FdR 9-haltigen Fraktionen wurden nach der Aufkonzentrierung schonend umpuffert, d. h. es wurde eine langsame Reduktion der Imidazolkonzentration durch Verdünnen der Proteinlösung mit Puffer ohne Imidazol (50 mM KP_i-Puffer, pH 7,4) und anschließender Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration durchgeführt. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, wurde die Reinheit des resultierenden FdR 9-haltigen Konzentrats auf etwa 90 % geschätzt und mit der Isolation von 159 mg FdR 9 aus einem Liter Kultur (Tabelle 7.2 im Anhang) konnte die Aufreinigung als erfolgreich betrachtet werden.

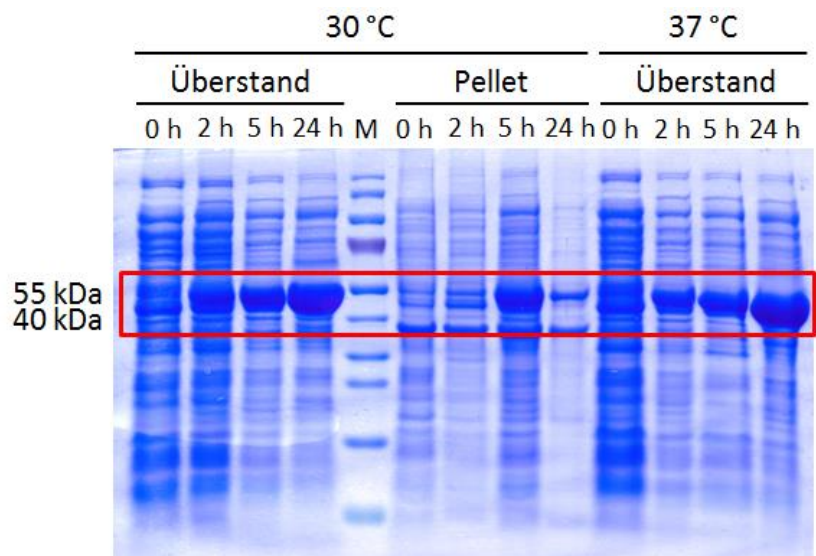


Abbildung 3.14: SDS-Gel zur Analyse der Expression von FdR 9 in *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1273 bei 30 °C und 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{Start} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker “PageRuler Prestained Protein Ladder” von Fermentas.

3.1.1.4 Übersicht über die optimalen Expressionsbedingungen der putativen Elektronentransferproteine aus *T. fusca*

In Tabelle 3.1 sind zusammenfassend die optimalen Expressionsbedingungen aufgeführt, die anschließend für die Expression der verschiedenen putativen Elektronentransferproteine aus *T. fusca* im größeren Maßstab genutzt wurden.

Tabelle 3.1: Optimale Expressionsbedingungen der putativen Elektronentransferproteine aus *T. fusca*.

Protein	Stamm	T [°C]	Expressionsdauer [h]
Fdx 1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28_Tfu_0491	37	3,5
Fdx 2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28_Tfu_1479	37	3,5
Fdx 3	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28_Tfu_0763	37	3,5
Fdx 4 (+ FdR 6)	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227	30	4,5
Fdx 8	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275	37	5
Fdx 8 (+ FdR 9)	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a_Tfu_1275 pIT2_Tfu_1273	37	5
Fldx-s.	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET42b_Tfu_3023-synth	30	22
Fldx-s.-e.	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a_Tfu_3023-synth-elong	25	6,3
FdR 5	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28_Tfu_2348	37	25
FdR 6 (+ Fdx 4)	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28_Tfu_1227 pIT2_Tfu_1226	30	20,5
FdR 7	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28_Tfu_1915	30	26
FdR 9	<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a_Tfu_1273	37	24

3.1.2 Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität der exprimierten und ggf. aufgereinigten Elektronentransferproteine wurde für die Ferredoxinreduktasen der Kaliumhexacyanoferrat (KHCF)-Assay und für die Ferredoxine der Cytochrom c-Assay genutzt. Letzterer wurde ebenfalls für die Aktivitätsbestimmung des putativen Flavodoxins getestet. Da der Cytochrom c-Assay vom Vorhandensein aktiver Ferredoxinreduktasen abhängig ist (die Elektronen müssen zunächst vom Cofaktor auf die Reduktase und von dieser über das Ferredoxin auf Cytochrom c übertragen werden), wurde die Aktivität dieser Enzyme zuerst untersucht.

3.1.2.1 Bestimmung der Aktivität der putativen Ferredoxinreduktasen aus *T. fusca*

Zur Bestimmung der Aktivität der Ferredoxinreduktasen in aufgereinigter Form wurde die Reduktion von KHCF bei 420 nm nach Zugabe von NADH bzw. NADPH als Cofaktor bei 20 °C oder RT spektrophotometrisch verfolgt (siehe Abschnitt 2.3.6). Um die Absorptionsänderung zu ermitteln, wurde der Anstieg im linearen Bereich der Absorptionskurve verwendet. Anschließend wurden volumetrische und spezifische Aktivität berechnet. Um die Hintergrundaktivität der im Reaktionsansatz vorhandenen Komponenten zu bestimmen, wurden verschiedene Ansätze ohne Enzym bzw. ohne Cofaktor untersucht. So wurde festgestellt, dass der Ansatz mit Cofaktor und ohne Enzym ebenfalls eine gewisse Absorptionsänderung aufwies. Daher wurde der entsprechende Wert jeweils von der Absorptionsänderung der Probe abgezogen.

In Abbildung 3.15 sind die ermittelten spezifischen Aktivitäten der aufgereinigten Ferredoxinreduktasen graphisch wiedergegeben.

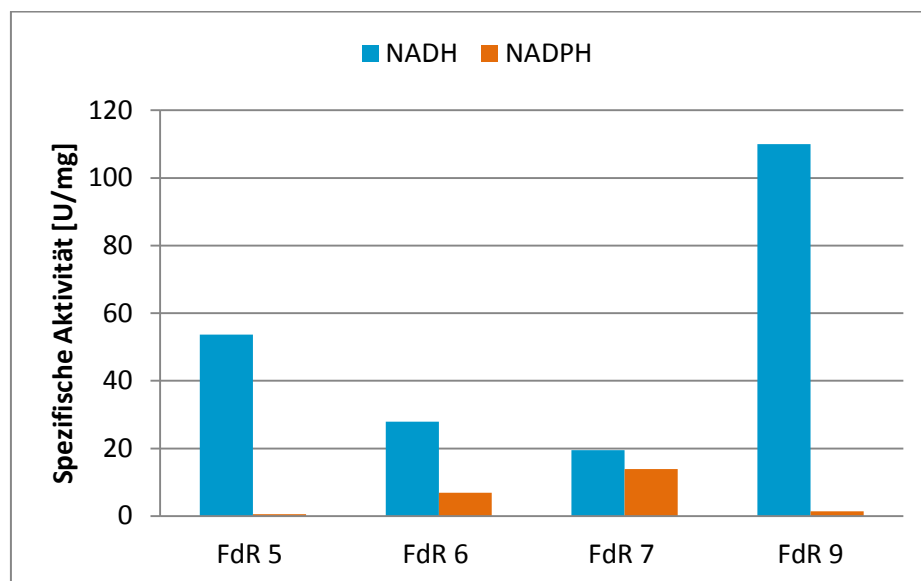


Abbildung 3.15: Spezifische Aktivitäten der aufgereinigten Ferredoxinreduktasen bestimmt mittels Kaliumhexacyanoferrat-Assay bei 20 °C bzw. RT (nur FdR 9) mit NADH bzw. NADPH als Cofaktoren.

Es wird deutlich, dass alle aufgereinigten Reduktasen aktiv sind und eine Präferenz für die Nutzung des Cofaktors NADH zeigen, da die spezifische Aktivität jeweils höher liegt als für NADPH. FdR 6 und vor allem FdR 7 sind aber offenbar in der Lage, auch NADPH als Elektronenlieferant zu nutzen, wohingegen FdR 5 und FdR 9 mit NADPH kaum Aktivität aufweisen. FdR 9 zeigt zusammen mit NADH die höchste spezifische Aktivität. In einem zusätzlichen Test wurde ebenfalls die spezifische Aktivität von aufgereinigter PdR bei RT untersucht und es resultierten Werte von 1063 U/mg für NADH bzw. 30 U/mg für NADPH. Somit ist selbst die aktivste Ferredoxinreduktase aus *T. fusca* (FdR 9) bei den getesteten Bedingungen um fast eine Zehnerpotenz weniger aktiv als PdR.

Im Fall von FdR 5 – 7 wurde deren Aktivität nach längerer Lagerung (> ein Jahr) bei -20 °C erneut untersucht. Alle Konzentrate wiesen zu dem Messzeitpunkt noch eine deutliche Gelbfärbung auf, es wurde aber bei FdR 5 und vor allem bei FdR 6 denaturiertes Protein in den zur Lagerung genutzten Gefäßen beobachtet. Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen ist, waren alle Reduktasen noch aktiv. Zwar ist ein genauer Vergleich nicht möglich, da die entsprechenden Messungen bei RT (etwa 23 °C) durchgeführt wurden (statt bei 20 °C wie für die Bestimmung der in Abbildung 3.15 dargestellten Aktivitätswerte), der Trend bleibt aber gleich. Es ist auffällig, dass die Aktivitätswerte mit NADPH als Cofaktor sogar höher sind als die ursprünglich bestimmten und dass in diesem Fall FdR 7 scheinbar eine Cofaktorpräferenz für NADPH aufweist. Diese Beobachtungen können allerdings ebenso auf Messschwankungen aufgrund der Sensitivität und der damit verbundenen Fehleranfälligkeit des Assays zurückzuführen sein.

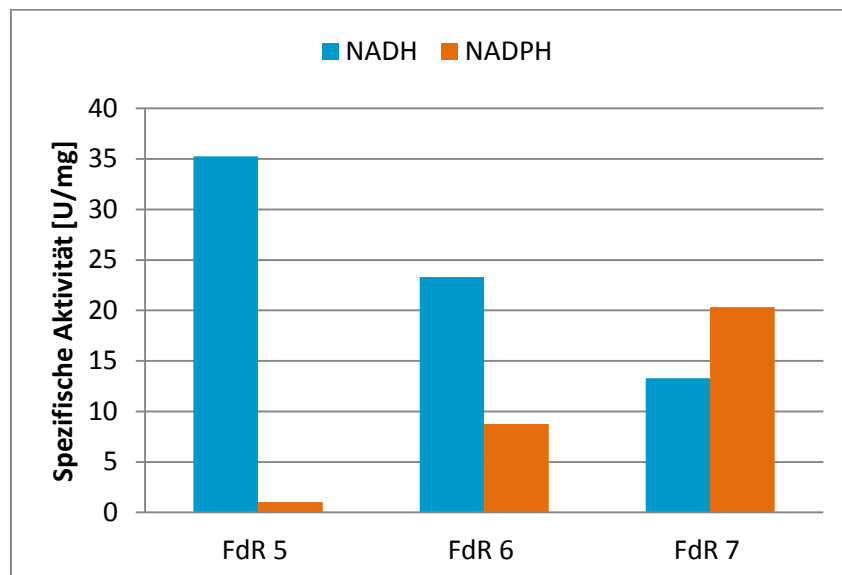


Abbildung 3.16: Spezifische Aktivitäten der aufgereinigten Ferredoxinreduktasen nach längerer Lagerung bestimmt mittels Kaliumhexacyanoferrat-Assay bei RT mit NADH bzw. NADPH als Cofaktoren.

Für FdR 9 wurde mit Hilfe des KHCF-Assays ebenfalls der T_{50} -Wert bestimmt, welcher die Temperatur darstellt, bei der das Protein die Hälfte seiner ursprünglichen Aktivität aufweist (siehe Abschnitt 2.3.6). Dazu wurde FdR 9 für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, auf Eis abgekühlt und im KHCF-Assay bei RT eingesetzt. Anhand des Referenzwerts (Aktivität von unbehandelter FdR 9) konnte die Restaktivität ermittelt und durch Auftragung der Restaktivität gegen die Temperatur der T_{50} -Wert bestimmt werden. Aus Abbildung 3.17 geht dabei hervor, dass das Protein nach Inkubation bei ca. 59 °C noch 50 % Restaktivität aufweist. Dies deutet darauf hin, dass FdR 9 moderat thermoresistent ist.

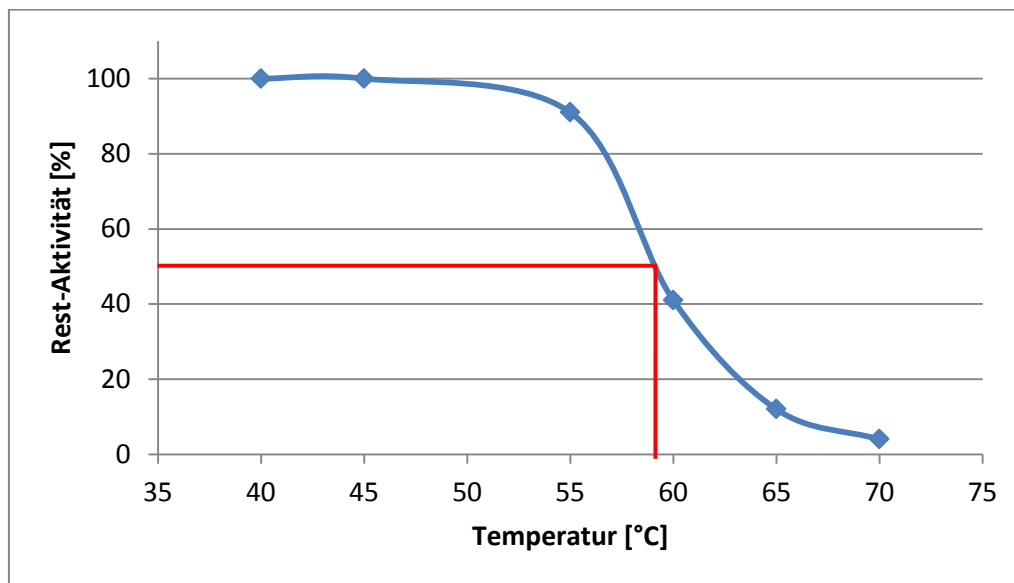


Abbildung 3.17: Auftragung der über den KHCF-Assay ermittelten Restaktivität von FdR 9 gegen die Inkubationstemperatur zur Bestimmung des T_{50} -Werts. Nach einer 20-minütigen Inkubation des aufgereinigten Enzyms (10 μ M) bei der jeweiligen Temperatur, Abkühlen auf Eis und einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden 10 μ L des resultierenden Überstands im KHCF-Assay bei RT eingesetzt.

3.1.2.2 Bestimmung der Aktivität der putativen Ferredoxine und des putativen Flavodoxins aus *T. fusca*

Um geeignete Redoxpartnerkombinationen aus Ferredoxin bzw. Flavodoxin und Ferredoxinreduktase zu identifizieren und die Ferredoxin- bzw. Flavodoxinaktivität zu bestimmen, wurde der Cytochrom c-Assay durchgeführt. Dabei war allerdings unklar, ob das Flavodoxin überhaupt mit Cytochrom c interagiert und der Assay möglicherweise nicht für den Nachweis der Flavodoxin-Aktivität geeignet ist. Bei dem Cytochrom c-Assay werden die Elektronen vom Cofaktor NADH bzw. NADPH zunächst auf die eingesetzte Ferredoxinreduktase übertragen. Bei einer Kooperation von Ferredoxinreduktase und eingesetztem Ferredoxin bzw. Flavodoxin werden diese von der Reduktase reduziert. Im letzten Schritt werden die Elektronen von dem Ferredoxin bzw. Flavodoxin auf das Cytochrom c weitergeleitet, falls diese Komponenten miteinander interagieren.

Infolge der Cytochrom c-Reduktion findet eine Absorptionszunahme bei 550 nm statt, die spektrophotometrisch erfasst werden kann (siehe Abschnitt 2.3.7). Diese Nachweismethode setzt dabei verschiedene Gegebenheiten voraus. Zunächst muss die eingesetzte Ferredoxinreduktase aktiv sein, sonst werden die Elektronen nicht vom Cofaktor auf die Reduktase und von der Reduktase auf das Ferredoxin bzw. Flavodoxin übertragen. Zudem müssen Ferredoxin bzw. Flavodoxin aktiv sein und in der Lage sein, mit Cytochrom c zu interagieren. Zusätzlich müssen Ferredoxinreduktase und Ferredoxin bzw. Flavodoxin miteinander kooperieren, damit Elektronentransfer erfolgt und Reduktion von Cytochrom c stattfindet, was wiederum durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Daher wurde die Aktivität der Reduktasen stets vor dem Einsatz im Cytochrom c-Assay mittels KHCF-Assay überprüft. Für die Assaytests an sich wurde bevorzugt aufgereinigtes Ferredoxin bzw. Flavodoxin und Ferredoxinreduktase verwendet. Da eine Aufreinigung von Fdx 1, Fdx 3, Fdx 4 und Fldx-s. nicht etabliert werden konnte, wurde für diese jeweils zellfreier Extrakt eingesetzt und von den resultierenden Aktivitätswerten wurde die Hintergrundaktivität abgezogen. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurde zellfreier Extrakt von *E. coli* BL21 (DE3) bzw. C43 (DE3)-Zellen, die den entsprechenden Vektor ohne Insert enthielten, hergestellt und für den Assay verwendet. Es wurden alle aufgereinigten Ferredoxinreduktasen mit den verschiedenen Ferredoxinen bzw. dem Flavodoxin mit NADH als Cofaktor in dem Assay kombiniert. Teilweise wurden zusätzlich Pdx und PdR in die Experimente eingesetzt. Bei Nutzung von FdR 6 und FdR 7 als Ferredoxinreduktase wurde ebenfalls eine Testreihe mit NADPH als Cofaktor durchgeführt. Prinzipiell wurde die aus der Reduktion von Cytochrom c resultierende Steigung bei RT oder 20 °C verfolgt. Darauf basierend wurde schließlich die spezifische Aktivität in U/(mg Ferredoxin) für aufgereinigte Ferredoxine und in U/(mg Gesamtprotein) für Ferredoxin- bzw. Flavodoxin-haltige zellfreie Extrakte berechnet. Zur Ermittlung der Hintergrundaktivität wurden Messungen mit Ferredoxin bzw. Flavodoxin aber ohne Reduktase sowie Messungen mit Reduktase aber ohne Ferredoxin bzw. Flavodoxin durchgeführt, wobei der Wert mit der höheren Absorptionsänderung zur Berechnung der entsprechenden Hintergrundaktivität verwendet wurde. Abbildung 3.18 gibt einen Überblick über die Redoxpartnerkombinationen, welche nach Abzug der Hintergrundaktivität eine spezifische Aktivität von $\geq 0,1$ U/mg aufwiesen. Alle anderen Kombinationen resultierten in niedrigeren Aktivitätswerten, welche im Vergleich zu den Werten der Positivkontrolle als zu gering erachtet und daher vernachlässigt wurden. Aus Abbildung 3.18 ist zunächst ersichtlich, dass der höchste aller spezifischen Aktivitätswerte für die Kombination von FdR 9 und Fdx 8 mit NADH erreicht wird. Dieser übersteigt sogar den Wert für die Positivkontrolle aus PdR und Pdx. Dies ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass diese Redoxpartner effektiv miteinander kooperieren. Es ist weiterhin festzustellen, dass FdR 9 zusammen mit Fdx 2 und NADH ebenfalls eine vergleichsweise

hohe Elektronentransferaktivität aufweist und hinter der zuvor erwähnten Kombination und der Positivkontrolle die drittbeste Redoxpartnerkombination mit NADH als Cofaktor darstellt.

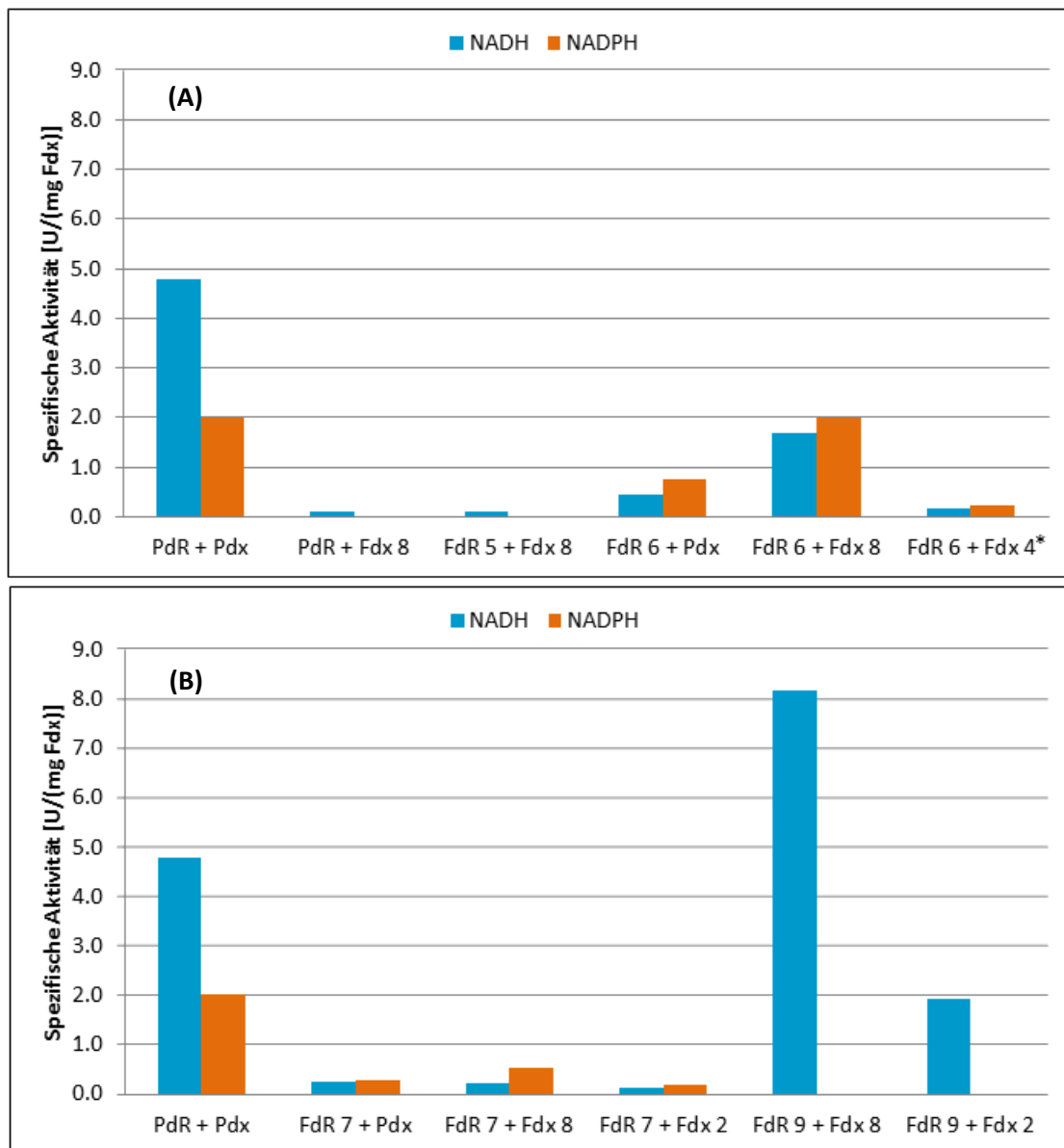


Abbildung 3.18: Spezifische Elektronentransferaktivität resultierend aus der Kombination verschiedener Ferredoxinreduktasen mit unterschiedlichen Ferredoxinen bestimmt mittels des Cytochrom c-Assays bei RT mit NADH bzw. NADPH als Cofaktoren. Es wurden nur Werte $\geq 0,1$ U/mg berücksichtigt. (A) Aktivitätswerte für PdR, FdR 5 und FdR 6 mit verschiedenen Ferredoxinen. (B) Aktivitätswerte für FdR 7 sowie FdR 9 mit verschiedenen Ferredoxinen; die Positivkontrolle (PdR + Pdx) ist aus Vergleichsgründen ebenfalls dargestellt. * Im Fall von Fdx 4 wurde kein aufgereinigtes Fdx 4-Konzentrat eingesetzt, sondern eine partiell über Q-Sepharose aufgereinigte Fdx 4-haltige Proteinlösung, die ebenfalls viele weitere Proteine enthielt.

Zudem ist interessant, dass Fdx 8 offenbar von allen eingesetzten Reduktasen reduziert werden kann, da es in Kombination mit jeder Reduktase in der Lage war, Cytochrom c zu reduzieren. Während die Aktivitätswerte zusammen mit PdR, FdR 5 und FdR 7 sehr niedrig sind, ist neben der

bereits erwähnten Kombination mit FdR 9 auch eine eindeutige Kooperation mit FdR 6 zu erkennen. Zusammen mit dieser Reduktase und NADPH erreicht Fdx 8 annähernd den Aktivitätswert der Positivkontrolle mit NADPH. Prinzipiell erreicht FdR 6 ebenfalls zusammen mit anderen Proteinen wie Pdx und einer Fdx 4-haltigen Proteinlösung (resultierend aus einer Aufreinigung über eine Q-Sepharose-Säule) zusammen mit NADPH etwas höhere Aktivitätswerte als mit NADH. Dies ist überraschend, da FdR 6 im KHCF-Assay eine klare Präferenz für NADH aufwies. Aus Abbildung 3.18 geht zudem hervor, dass FdR 7 zusammen mit Pdx, Fdx 8 und Fdx 2 sowohl NADH als auch NADPH als Cofaktor nutzen kann, was mit den Ergebnissen des KHCF-Assays übereinstimmt. Mit den Ferredoxinen Fdx 1 und Fdx 3 sowie dem Flavodoxin wurden unabhängig von der eingesetzten Reduktase keine Aktivitätswerte $\geq 0,1$ U/mg festgestellt.

Ähnlich wie für FdR 9 im vorherigen Abschnitt, wurde auch für Fdx 8 der T_{50} -Wert bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.7). Aus Abbildung 3.19 geht hervor, dass das Enzym bei einer Temperatur von etwa 61 °C die Hälfte seiner Restaktivität aufweist. Dieser Wert unterscheidet sich nur geringfügig vom T_{50} -Wert von FdR 9 (ca. 59 °C). Fdx 8 ist somit ebenfalls moderat thermoresistent.

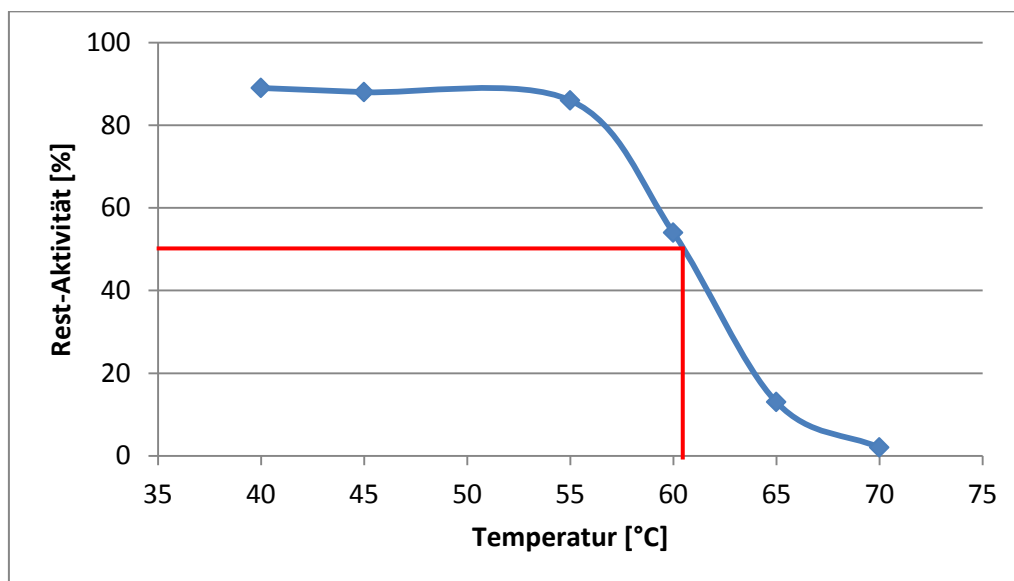


Abbildung 3.19: Auftragung der über den Cytochrom c-Assay ermittelten Restaktivität von Fdx 8 gegen die Inkubationstemperatur zur Bestimmung des T_{50} -Werts. Nach einer 20-minütigen Inkubation des aufgereinigten Proteins (10 μ M) bei der entsprechenden Temperatur und einem folgenden Zentrifugationsschritt wurden 10 μ L des resultierenden Überstands zusammen mit 10 μ M aufgereinigter FdR 9 (unbehandelt) im Assay bei RT eingesetzt.

3.1.3 Biokatalyse

Um herauszufinden, ob die Redoxpartnerkombination aus Ferredoxinreduktasen und Ferredoxinen bzw. Flavodoxin ebenfalls Elektronen auf Cytochrom P450 Monooxygenasen übertragen können,

wurden sie in Biokatalysen mit der ebenfalls aus *T. fusca* stammenden CYP154H1 sowie zwei Steroidhydroxylierenden Enzymen, CYP154C5 (aus *N. farcinica*) und CYP106A2 (aus *B. megaterium*), eingesetzt. Dabei lag der Fokus zunächst auf den Kombinationen, die im Cytochrom c-Assay in Abschnitt 3.1.2.2 eine eindeutige Aktivität aufwiesen. Im Anschluss wurden jedoch auch weitere Redoxproteinkombinationen in Biokatalysen getestet.

3.1.3.1 Biokatalysen mit CYP154H1 und unterschiedlichen Redoxproteinkombinationen

Ein Ziel dieses Teilprojekts bestand darin, die natürlichen Elektronentransferpartner der CYP154H1 zu identifizieren. Daher galt dem Einsatz der CYP154H1 zusammen mit den verschiedenen möglichen Kombinationen an Elektronentransferproteinen besonderes Interesse. Wie bereits eingangs erwähnt, wurden zuerst die Redoxpartnerkombinationen getestet, bei denen im Cytochrom c-Assay eine eindeutige Elektronentransferaktivität nachgewiesen werden konnte. Im Fall von Fdx 4 wurde für die Biokatalyse zellfreier Extrakt aus *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 + pIT2_Tfu_1227 (Fdx 4/FdR 6-CFE) verwendet, sodass dieser Fdx 4 und FdR 6 enthielt. Zusätzlich wurde zellfreier Extrakt, der das N'-verlängerte Flavodoxin enthält (Fldx-s.-e. CFE), zusammen mit allen verfügbaren Ferredoxinreduktasen in Biokatalysen mit CYP154H1 eingesetzt. Als Substrat wurde jeweils β -Jonon verwendet. Im Rahmen einer früheren Bachelorarbeit (Schiffer, 2011) konnte bereits gezeigt werden, dass CYP154H1 zusammen mit Pdx und PdR das Substrat β -Jonon zu 3-Hydroxy- β -jonon (Hauptprodukt) und dem entsprechenden Keton (Nebenprodukt) im Verhältnis 24:1 umsetzt (Abbildung 3.20).

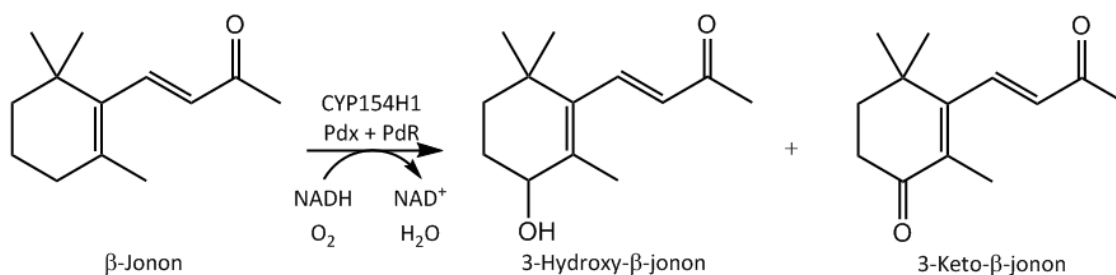


Abbildung 3.20: Umsatz des Substrats β -Jonon zu 3-Hydroxy- β -jonon (Hauptprodukt) und 3-Keto- β -jonon (Nebenprodukt) durch CYP154H1.

Die Biokatalysen wurden mit 5 mM β -Jonon und 3 μM CYP154H1 durchgeführt. Es wurde jeweils der Cofaktor eingesetzt, für den die verwendete Reduktase im zuvor durchgeführten KHCF-Assay die höhere Aktivität aufwies. Um zu testen, ob eine höhere Elektronentransferproteinkonzentration in einem höheren Umsatz resultiert, wurden FdR 9 und Fdx 8 neben der normalen Konzentration von 3 μM bzw. 12 μM ebenfalls in einer fünffach höheren Konzentration eingesetzt (15 μM FdR 9 + 60 μM Fdx 8). Zudem wurden zum Vergleich verschiedene Negativkontrollen sowie eine Positivkontrolle mit PdR und Pdx durchgeführt. Wie in Tabelle 3.2 gezeigt, wurden alle Biokatalysen

in zwei Testreihen bei 30 °C und bei 50 °C durchgeführt. Letztere Temperatur wurde vor dem Hintergrund gewählt, dass CYP154H1 ein moderat thermostabiles Enzym ist (T_m von 67 °C) und untersucht werden sollte, ob CYP154H1 zusammen mit Redoxpartnern auch bei höherer Temperatur aktiv ist. Die für die Positivkontrolle genutzten Redoxpartner PdR und Pdx sind dagegen bei 50 °C nicht stabil, vor allem Pdx weist eine geringe Stabilität auf (Sevrioukova et al., 2003). Es ist allerdings zu erwähnen, dass bei diesem Experiment nicht sofort zu Reaktionsbeginn eine Temperatur von 50 °C in den Reaktionsgefäßen herrschte, da die Komponenten nicht vorinkubiert wurden. Somit dauerte es etwa 10 Minuten, bis die angestrebte Temperatur erreicht wurde. Darüber hinaus wurde aufgrund der zu erwartenden geringeren Cofaktor- und GDH-Stabilität für die Reaktionen bei 50 °C die fünffache Cofaktorkonzentration eingesetzt.

Tabelle 3.2: Übersicht über die Ergebnisse der Biokatalysen mit CYP154H1 in Kombination mit verschiedenen Elektronentransferproteinen und Verwendung von β -Jonon als Substrat bei 30 °C und 50 °C.

Reaktion	Umsatz [%] bei 30 °C	Umsatz [%] bei 50 °C
<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 1)	0,6	0,9
CYP154H1 + <i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 2)	3,8	2,5
CYP154H1 + PdR + Pdx (Positivkontrolle)	20	16
CYP154H1 + FdR 9 + Fdx 8	0,4	0,6
CYP154H1 + 5x FdR 9 + 5x Fdx 8	0,3	0,4
CYP154H1 + FdR 9 + Fdx 2	0,6	0,5
CYP154H1 + FdR 6 + Fdx 8	0,4	0,5
CYP154H1 + FdR 6 + Fdx 4/FdR 6-CFE	3,9	3,5
CYP154H1 + Fldx-s.-e.-CFE (Negativkontrolle 3)	1,7	1,1
CYP154H1 + FdR 5 + Fldx-s.-e.-CFE	1,7	1,3
CYP154H1 + FdR 6 + Fldx-s.-e.-CFE	1,2	1,4
CYP154H1 + FdR 7 + Fldx-s.-e.-CFE	4,2	2,0
CYP154H1 + FdR 9 + Fldx-s.-e.-CFE	1,6	1,2

Reaktionsbedingungen: 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, 5 mM β -Jonon, 3 μ M CYP154H1, 3 μ M FdR, 12 μ M Fdx oder Fdx 4- bzw. Fldx-s.-e.-haltiger CFE mit unbekannter Fdx- bzw. Fldx-s.-e.-Konzentration (finale Gesamtproteinkonzentration: 9,5 mg/mL), 0,1 mM (30 °C) bzw. 0,5 mM (50 °C) NAD(P)H, 2 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NAD^+ pro Minute bei pH 7,4 und RT reduzierte), 30 mM Glucose, 600 U/mL Katalase (nur wenn kein CFE eingesetzt wurde), Inkubationsdauer: ca. 15 h, 30 °C bzw. 50 °C, 250 rpm, geschlossene 12 mL Glasgefäße, für Leervektor-CFE über Proteingehalt (9,5 mg/mL) normiert.

Nach der über Nacht-Inkubation bei den entsprechenden Temperaturen wurden die Umsätze extrahiert (siehe Abschnitt 2.4.1) und mittels GC und Methode 1 analysiert (siehe Abschnitt 2.5.2).

Substrat und Produkt wiesen dabei Retentionszeiten von 15,4 min bzw. 17,6 min auf. Die Berechnung des Umsatzes erfolgte über die integrierten Peakflächen mit Hilfe von Formel 10.

Aus Tabelle 3.2 wird zunächst ersichtlich, dass im Allgemeinen nur sehr geringe Umsätze erzielt wurden. Selbst in der Positivkontrolle wurden bei 30 °C nur ca. 20 % des Substrats zu Produkt umgesetzt. Dies legt die Vermutung nahe, dass entweder CYP154H1 und/oder Pdx und/oder PdR unter den gegebenen Bedingungen nach kurzer Zeit inaktiviert wurden. Die Werte der eigentlichen Biokatalysen liegen zudem bis auf wenige Ausnahmen unterhalb der Umsätze der Negativkontrollen. So kommt es offensichtlich zur reproduzierbaren Produktbildung, sobald CYP154H1 und zellfreier Extrakt von *E. coli* kombiniert werden. Dies weist darauf hin, dass *E. coli* Redoxproteine enthält, welche Elektronen auf CYP154H1 übertragen können. Der Einsatz der aufgereinigten Redoxpartner FdR 9 mit Fdx 8 bzw. Fdx 2 sowie FdR 6 mit Fdx 8 zusammen mit CYP154H1 führte lediglich zu minimalen Produktmengen. Somit scheinen die Redoxpartnerkombinationen, welche im Cytochrom c-Assay die besten Ergebnisse erzielten, keine Elektronen auf CYP154H1 übertragen zu können. Die einzige Bedingung, die auch nach Abzug der Negativkontrolle (Negativkontrolle 2) noch einen signifikanten Umsatz aufweist, ist die Kombination von CYP154H1 mit FdR 7 und Fldx-s.-e.-CFE. Allerdings hätte zur Negativkontrolle, welche CYP154H1 und *E. coli* C43 (DE3) pET28a-CFE enthielt, ebenfalls FdR 7 zugefügt werden müssen, um auch diese Komponente gleich zu halten und somit einen genauen Vergleich zu erreichen. Für die Biokatalysen bei 50 °C kann festgestellt werden, dass die meisten Reaktionen noch geringere Umsätze aufweisen als bei 30 °C. In einigen Fällen ist der Umsatz zwar etwas höher, jedoch wurde bereits in den entsprechenden Reaktionen bei 30 °C eine sehr niedrige Produktbildung nachgewiesen. Vor dem Hintergrund der Genauigkeit der GC-Analytik sind diese geringen Werte vermutlich stark fehlerbelastet, sodass die beschriebenen geringen Unterschiede als nicht signifikant anzusehen sind. Schlussendlich konnte für keine Reaktion eine signifikante Produktbildung nachgewiesen werden, die deutlich höher war als bei der entsprechenden Negativkontrolle. Somit konnten unter den gegebenen Bedingungen weder die getesteten Ferredoxine noch das N'-verlängerte Flavodoxin in einem für die Katalyse ausreichendem Maße mit CYP154H1 kooperieren.

In der Folge wurden verschiedene weitere Biokatalysen mit CYP154H1 durchgeführt. Zum einen wurden solche Reaktionen wiederholt, die im ersten Versuch höhere Umsätze erreicht hatten, auch wenn diese im Bereich der Negativkontrollen lagen. Zum anderen wurden weitere Elektronentransferproteinkombinationen zusammen mit CYP154H1 eingesetzt, um mögliche Redoxpartner für CYP154H1 zu identifizieren. Des Weiteren wurde für diesen Versuch ein anderes Substrat verwendet, das von CYP154H1 besser umgesetzt werden sollte als das zuvor eingesetzte β -Jonon. Bezüglich der Reproduktion der zuvor gefundenen Ergebnisse wurde die Kombination aus

CYP154H1, FdR 7 und Fldx-s.-e.-CFE (mit N'-verlängertem Flavodoxin) erneut getestet, diesmal allerdings mit entsprechender Negativkontrolle mit FdR 7. Die Kombination aus CYP154H1, FdR 6 und Fdx 4/FdR 6-CFE wurde ebenfalls wiederholt und dabei deutlich konzentrierterer Fdx 4/FdR 6-CFE eingesetzt. Um weitere Elektronentransferproteinkombinationen zusammen mit CYP154H1 zu untersuchen, wurden Biokatalysen mit der Kombination aus Fldx-s.-CFE (zellfreier Extrakt mit Flavodoxin ohne N-terminale Verlängerung) und FdR 7 durchgeführt. Darüber hinaus wurden die putativen Ferredoxine Fdx 1 und Fdx 3 in Form von zellfreiem Extrakt zusammen mit allen verfügbaren Ferredoxinreduktasen in Biokatalysen mit CYP154H1 eingesetzt. Diese beiden putativen Ferredoxine sollten als mögliche Elektronentransferpartner nicht ausgeschlossen werden, obwohl sie bei der Bestimmung der Elektronentransferaktivität (siehe Abschnitt 3.1.2.2; eingesetzt in Form von zellfreiem Extrakt) keine Aktivität mit einer der getesteten Reduktasen aufwiesen. Außerdem wurde für dieses Experiment das CYP154H1-Substrat Ethylbenzol für die Reaktionen verwendet, das besser umgesetzt werden sollte als das zuvor eingesetzte β -Jonon. Abbildung 3.21 zeigt die CYP154H1-katalysierte Oxidation des Ethylbenzols unter Bildung von (R)-1-Phenylethanol (Hauptprodukt) und Acetophenon (Nebenprodukt) im Verhältnis 22:3 (Schallmey et al., 2011).

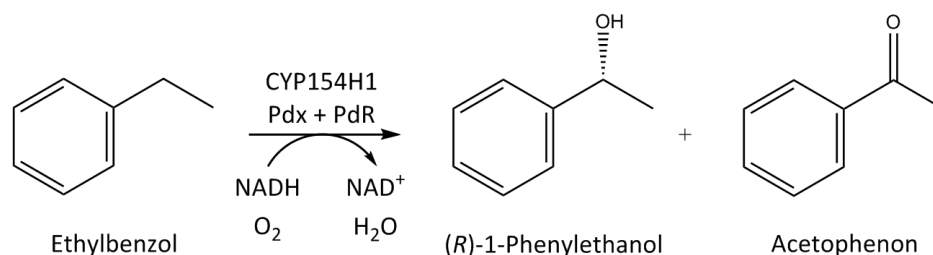


Abbildung 3.21: Umsatz von Ethylbenzol zu (R)-1-Phenylethanol und Acetophenon durch CYP154H1 zusammen mit Pdx und PdR als Redoxpartner.

Die in den Biokatalysen verwendete Substratkonzentration betrug 10 mM und die CYP154H1-Konzentration 3 μ M. Es wurde jeweils der Cofaktor eingesetzt, für den die verwendete Reduktase im zuvor durchgeführten KHCF-Assay die höhere Aktivität aufwies. Die Reaktionen wurden bei 30 °C und 250 rpm für ca. 15 h inkubiert und die anschließende Extraktion erfolgte wie unter Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Die Extrakte wurden mittels GC und Methode 1 analysiert (siehe Abschnitt 2.5.2). Das Substrat und das Hauptprodukt wiesen dabei Retentionszeiten von 5,9 min bzw. 9,3 min auf. Die Berechnung der Umsätze (Tabelle 3.3) erfolgte über die integrierten Peakflächen mit Hilfe von Formel 10.

Tabelle 3.3: Übersicht über die Ergebnisse der Biokatalysen mit CYP154H1 in Kombination mit verschiedenen Elektronentransferproteinen und Verwendung von Ethylbenzol als Substrat bei 30 °C.

Reaktion	Umsatz [%] bei 30 °C
<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 1)	0,4
CYP154H1 + PdR + Pdx (Positivkontrolle)	11
CYP154H1 + <i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 2)	5,3
CYP154H1 + FdR 6 + <i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 3)	4,4
CYP154H1 + FdR 6 + Fdx 4/FdR 6-CFE*	3,0
CYP154H1 + Fdx 4/FdR 6-CFE*	3,5
CYP154H1 + FdR 7 (Negativkontrolle 4)	0,4
CYP154H1 + Fldx-s.-e.-CFE (Negativkontrolle 5)	0,6
CYP154H1 + FdR 7 + <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 6)	2,3
CYP154H1 + FdR 7 + Fldx-s.-e.-CFE	0,7
CYP154H1 + Fldx-s.-CFE (Negativkontrolle 7)	2,1
CYP154H1 + FdR 7 + Fldx-s.-CFE	2,5
CYP154H1 + Fdx 1-CFE (Negativkontrolle 8)	0,9
CYP154H1 + FdR 5 + Fdx 1-CFE	0,8
CYP154H1 + FdR 6 + Fdx 1-CFE	1,1
CYP154H1 + FdR 7 + Fdx 1-CFE	1,2
CYP154H1 + FdR 9 + Fdx 1-CFE	0,9
CYP154H1 + Fdx 3-CFE (Negativkontrolle 9)	0,9
CYP154H1 + FdR 5 + Fdx 3-CFE	1,0
CYP154H1 + FdR 6 + Fdx 3-CFE	0,9
CYP154H1 + FdR 7 + Fdx 3-CFE	0,8
CYP154H1 + FdR 9 + Fdx 3-CFE	0,7

Reaktionsbedingungen: 50 mM K_P-Puffer, pH 7,4, 10 mM Ethylbenzol, 3 µM CYP154H1, 3 µM FdR, Fdx- bzw. Fldx-haltiger CFE mit unbekannter Fdx- bzw. Fldx-Konzentration (finale Gesamtproteinkonzentration: 8,5 mg/mL; * Ausnahme: Fdx 4/FdR 6-CFE: 26 mg/mL), 0,1 mM NAD(P)H, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 µmol NAD⁺ pro Minute bei pH 7,4 und RT reduzierte), 30 mM Glucose, Inkubationsdauer: ca. 15 h, 30 °C, 250 rpm, geschlossene 12 mL Glasgefäße, für Leervektor-CFE über Proteingehalt (8,5 mg/mL) normiert.

Ähnlich wie in den ersten Biokatalysen mit β -Jonon wurden hier mit Ethylbenzol ebenfalls nur sehr geringe Umsätze erzielt. Die Positivkontrolle weist ebenfalls nur geringe 11 % Umsatz auf. Der Wechsel zum Substrat Ethylbenzol konnte somit keine Erhöhung des Umsatzes im Allgemeinen bewirken. Außerdem konnten wiederum keine Redoxpartnerkombinationen identifiziert werden, die

zusammen mit CYP154H1 einen signifikant höheren Umsatz erzielen, als die entsprechende Negativkontrolle. In dem vorherigen Experiment mit β -Jonon als Substrat wurde unter Verwendung von CYP154H1, FdR 7 und Fldx-s.-e.-CFE ein Umsatz erreicht, der höher war als in der Negativkontrolle. Dieses Ergebnis konnte in den Biokatalysen mit Ethylbenzol als Substrat jedoch nicht bestätigt werden. Dies kann daran liegen, dass im Gegensatz zum vorigen Versuch der Negativkontrolle aus CYP154H1 und *E. coli* BL21 (DE3) pET28a-CFE diesmal FdR 7 zugesetzt wurde (Negativkontrolle 6). Es ist außerdem erneut auffällig, dass signifikante Produktbildung nachgewiesen werden kann, sobald CYP154H1 mit *E. coli* BL21 (DE3) bzw. C43 (DE3) pET28a-CFE kombiniert wird. Interessanterweise scheint der Umsatz aber im direkten Vergleich zur Leervektorkontrolle zu sinken, wenn der CFE ein putatives Ferredoxin oder das putative Flavodoxin enthält. Aufgrund des hohen Fehlers bei solchen geringen Umsätzen kann aus den gefundenen Ergebnissen nur abgeleitet werden, dass für keine der Kombinationen (außer für die Positivkontrolle) eine eindeutige Aktivität nachgewiesen werden konnte und eine weitere Interpretation der Daten nicht möglich ist.

Da die Umsätze der Negativkontrolle nicht signifikant überschritten und somit die Umsätze der Positivkontrolle nicht erreicht wurden, muss geschlossen werden, dass sich die natürlichen Elektronentransferpartner für CYP154H1 nicht unter den getesteten Redoxproteinen befanden, vorausgesetzt letztere waren unter den gegebenen Bedingungen korrekt gefaltet und aktiv.

3.1.3.2 Biokatalyse mit CYP154C5 sowie CYP106A2 und unterschiedlichen Redoxproteinen aus *T. fusca*

Neben CYP154H1 wurden ebenfalls weitere Cytochrom P450 Monooxygenasen in Kombination mit verschiedenen Elektronentransferproteinen aus *T. fusca* getestet. Es sollte untersucht werden, ob ein funktionsfähiges Redoxpartnersystem aus *T. fusca* identifiziert werden konnte, das zwar nicht mit CYP154H1 jedoch mit verschiedenen anderen Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperiert. Dazu wurden die verfügbaren Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP154C5 aus *N. farcinica* und CYP106A2 aus *B. megaterium* verwendet. Es handelt sich in beiden Fällen um Steroidhydroxylierende Enzyme. Während CYP154C5 verschiedene Steroide an der 16 α -Position hydroxyliert (Bracco et al., 2013), katalysiert CYP106A2 beispielsweise die Hydroxylierung an der 15 β -Position verschiedener Steroide (Berg et al., 1976), wie Abbildung 3.22 exemplarisch für Progesteron wiedergibt. Für CYP106A2 wurden allerdings ebenfalls einige an anderer Position hydroxylierte Nebenprodukte identifiziert (Berg et al., 1976; Lisurek et al., 2004). Für beide Cytochrom P450 Monooxygenasen sind die natürlichen Elektronentransferpartner unbekannt und daher wurden von den Autoren Pdx und PdR für CYP154C5 und Adx und AdR für CYP106A2 als Ersatzsysteme genutzt.

Die beiden Cytochrom P450 Monooxygenasen wurden, wie bereits zu Beginn des Abschnitts 3.1.3 erwähnt, zuerst mit den Redoxpartnerkombinationen getestet, die auch im Cytochrom c-Assay offensichtlich miteinander kooperierten und eine eindeutige Aktivität aufwiesen. Wie bei der Biokatalyse mit CYP154H1, wurde ebenfalls Fldx-s.-e.-CFE zusammen mit CYP154C5 und allen verfügbaren Ferredoxinreduktasen eingesetzt, um eine mögliche Katalyse zu untersuchen. Für alle Versuche wurde CYP154C5 als aufgereinigtes Enzym und CYP106A2 in Form von zellfreiem Extrakt eingesetzt. Die P450-Konzentration betrug in allen Reaktionen 3 μM . Progesteron in einer Konzentration von 2 mM diente für beide Enzyme als Substrat. Außerdem wurde jeweils der Cofaktor eingesetzt, für den die verwendete Reduktase im zuvor durchgeführten KHCF-Assay die höhere Aktivität aufwies. Um zu testen, ob eine höhere Elektronentransferproteinkonzentration in einem höheren Umsatz resultiert, wurden FdR 9 und Fdx 8 neben der normalen Konzentration (3 μM FdR 9 und 12 μM Fdx 8) zusätzlich in einer fünffach höheren Konzentration eingesetzt (15 μM FdR 9 + 60 μM Fdx 8). Zudem wurden zum Vergleich verschiedene Negativkontrollen und eine Positivkontrolle mit PdR und Pdx durchgeführt. Dass diese Redoxpartnerkombination ebenfalls für CYP106A2 funktioniert, wurde bereits von Agematu et al. beschrieben (2006).

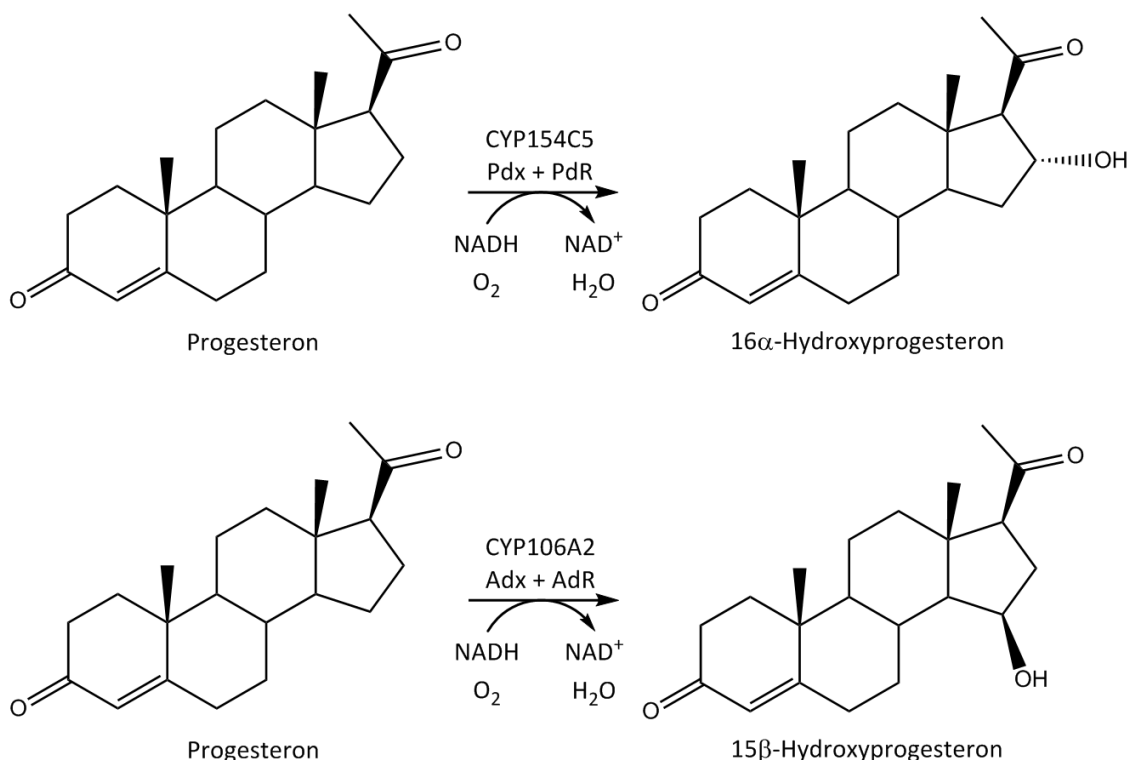


Abbildung 3.22: Umsatz von Progesteron zu 16 α -Hydroxyprogesteron bzw. 15 β -Hydroxyprogesteron durch CYP154C5 zusammen mit Pdx und PdR bzw. CYP106A2 zusammen mit Adx und AdR.

Nach der über Nacht-Inkubation bei 30 °C wurden die Umsätze extrahiert (siehe Abschnitt 2.4.1) und mittels HPLC analysiert (siehe Abschnitt 2.5.4). Das Substrat und die Produkte wiesen dabei

Retentionszeiten von 9,3 min bzw. 4,3 min (16 β -Hydroxyprogesteron) und 4,4 min (15 β -Hydroxyprogesteron) auf. Die Berechnung der Umsätze (Tabelle 3.4) erfolgte anhand von Formel 10.

Tabelle 3.4: Übersicht über die Ergebnisse der Biokatalysen mit CYP154C5 und CYP106A2 in Kombination mit verschiedenen Elektronentransferproteinen unter Verwendung von Progesteron als Substrat bei 30 °C.

Reaktion	Umsatz [%] mit CYP154C5	Umsatz [%] mit CYP106A2
<i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 1)	0,5	0,5
P450 + PdR + Pdx (Positivkontrolle)	99	40
P450 + FdR 9 + Fdx 8	0,8	0,0
P450 + 5x FdR 9 + 5x Fdx 8	2,2	0,0
P450 + FdR 9 + Fdx 2	1,0	0,0
P450 + <i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 2)	7,8	3,9
P450 + FdR 6 + Fdx 8	0,6	0,0
P450 + FdR 6 + Fdx 4/FdR 6-CFE	15	7,6
P450 + Fldx-s.-e.-CFE (Negativkontrolle 3)	1,7	1,1
P450 + FdR 5 + Fldx-s.-e.-CFE	3,0	n. b.
P450 + FdR 6 + Fldx-s.-e.-CFE	3,1	n. b.
P450 + FdR 7 + Fldx-s.-e.-CFE	4,2	n. b.
P450 + FdR 9 + Fldx-s.-e.-CFE	2,7	n. b.

Reaktionsbedingungen: 50 mM KPi-Puffer, pH 7,4, 2 mM Progesteron, 3 μ M aufgereinigte CYP154C5 bzw. CYP106A2-enthaltender CFE mit einer P450-Konzentration von 3 μ M, 3 μ M FdR, 12 μ M Fdx oder Fdx 4- bzw. Fldx-s.-e.-haltiger CFE mit unbekannter Fdx- bzw. Fldx-s.-e.-Konzentration (finale Gesamtproteinkonzentration: 9,5 mg/mL), 0,1 mM NAD(P)H, 2 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NAD⁺ pro Minute bei pH 7,4 und RT reduzierte), 30 mM Glucose, 600 U/mL Katalase (nur wenn kein CFE eingesetzt wurde), Inkubationsdauer: ca. 15 h, 30 °C, 250 rpm, geschlossene 12 mL Glasgefäße, für Leervektor-CFE über Proteingehalt (9,5 mg/mL) normiert. Die Abkürzung „n. b.“ steht für „nicht bestimmt“.

Aus Tabelle 3.4 wird zunächst ersichtlich, dass die Umsätze mit CYP154C5 im Allgemeinen etwa doppelt so hoch sind, wie die mit CYP106A2, was an der vergleichsweise hohen Substratkonzentration von 2 mM liegen könnte. CYP154C5 weist im Gegensatz zu CYP106A2 in diesem recht hohen Substratkonzentrationsbereich keine Substratinhibition auf (Bracco et al., 2013). Des Weiteren ist zu erkennen, dass bei den Ansätzen mit aufgereinigten Elektronentransferproteinen kein (CYP106A2) oder nur sehr wenig (CYP154C5) Produkt gebildet wurde. Zudem weisen alle Reaktionen mit Fldx-s.-e.-haltigen CFE zusammen mit CYP154C5 oder CYP106A2 geringere Umsätze auf als die Negativkontrolle mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a-CFE und Cytochrom P450 Monooxygenase (Negativkontrolle 2). Lediglich in den Reaktionen mit FdR 6 und

Fdx 4/FdR 6-haltigem CFE wurden etwa doppelt so hohe Umsätze wie in der zugehörigen Negativkontrolle (Negativkontrolle 2) erzielt. Allerdings hätte dieser Negativkontrolle für einen ganz exakten Vergleich ebenfalls noch FdR 6 zugesetzt werden müssen. Daher konnten aus diesem Versuch keine präzisen Aussagen über eine mögliche Kooperation von Fdx 4 mit CYP154C5 oder CYP106A2 abgeleitet werden. Des Weiteren fällt wiederum auf, dass signifikante Mengen Produkt gebildet werden, sobald CYP154C5 oder CYP106A2 mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a-CFE kombiniert werden. Dies weist erneut darauf hin, dass *E. coli*-eigene Redoxproteine ebenfalls Elektronen auf CYP154C5 und CYP106A2 übertragen können.

Es wurden nachfolgend verschiedene weitere Reaktionen mit CYP154C5 und CYP106A2 durchgeführt. So wurden einige Biokatalysen mit CYP106A2 bei einer geringeren Substratkonzentration (0,5 mM Progesteron) wiederholt, um die Substratinhibition des Enzyms bei höheren Substratkonzentrationen zu umgehen. Außerdem wurden die Reaktionen mit CYP154C5 und Fdx 4/FdR 6-CFE bzw. Fldx-s.-e.-CFE wiederholt, da diese im ersten Versuch höhere bzw. ähnlich hohe Umsätze erreicht hatten wie die Negativkontrolle mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a-CFE und CYP154C5. Es sei darauf hingewiesen, dass bei diesem Versuch im Vergleich zu dem vorherigen Experiment sowohl für die Reaktion mit CYP154C5 als auch mit CYP106A2 deutlich konzentrierterer Fdx 4/FdR 6-CFE verwendet wurde. Des Weiteren wurden einige Negativkontrollen angepasst, um einen genaueren Vergleich zwischen Negativkontrolle und eigentlicher Reaktion zu erhalten. Zur Identifikation potentieller Redoxpartner von CYP154C5 und CYP106A2 wurden diese P450-Enzyme ebenfalls zusammen mit weiteren Elektronentransferproteinkombinationen in Biokatalysen eingesetzt. Dementsprechend wurden für beide Cytochrom P450 Monooxygenasen Reaktionen mit der Kombination aus Fldx-s.-CFE (zellfreier Extrakt mit Flavodoxin ohne N-terminale Verlängerung) und FdR 7 durchgeführt. Zudem wurden die putativen Ferredoxine Fdx 1 und Fdx 3 in Form von zellfreiem Extrakt zusammen mit allen verfügbaren Ferredoxinreduktasen in Biokatalysen mit CYP154C5 getestet. Ähnlich wie für CYP154H1 sollten diese beiden putativen Ferredoxine als mögliche Elektronentransferpartner nicht ausgeschlossen werden, obschon im Cytochrom c-Assay keine Elektronentransferaktivität nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.2.2; eingesetzt in Form von zellfreiem Extrakt). Wie im vorigen Experiment wurde CYP154C5 als aufgereinigtes Enzym und CYP106A2 in Form von zellfreiem Extrakt eingesetzt. Die P450-Konzentration von 3 μM wurde beibehalten. Während die Substratkonzentration für CYP106A2 auf 0,5 mM reduziert wurde, wurden für CYP154C5 weiterhin 2 mM verwendet. Außerdem wurde wiederum jeweils der Cofaktor eingesetzt, für den die verwendete Reduktase im zuvor durchgeführten KHCF-Assay die höhere Aktivität aufwies. Die Biokatalysen wurden für ca. 15 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert und

anschließend extrahiert wie unter Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Die in Tabelle 3.5 gezeigten Umsätze wurden mittels Formel 10 berechnet.

Tabelle 3.5: Übersicht über die Ergebnisse der Biokatalysen mit CYP154C5 und CYP106A2 in Kombination mit weiteren Redoxproteinen aus *T. fusca* unter Verwendung von Progesteron als Substrat bei 30 °C.

Reaktion	Umsatz [%] mit CYP154C5	Umsatz [%] mit CYP106A2
P450 + <i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 1)	14	27
P450 + PdR + Pdx (Positivkontrolle)	100	84
P450 + FdR 9 + Fdx 8	n. b.	0,0
P450 + FdR 9 + Fdx 2	n. b.	0,0
P450 + FdR 6 + Fdx 8	n. b.	0,0
P450 + FdR 6 + <i>E. coli</i> C43 (DE3) pET28a-CFE (Negativkontrolle 2)	12	27
P450 + FdR 6 + Fdx 4/FdR 6-CFE*	18	4,3
P450 + FdR 7 (Negativkontrolle 3)	0,5	0,0
P450 + Fldx-s.-e.-CFE (Negativkontrolle 4)	4,3	2,4
P450 + FdR 7 + <i>E. coli</i> BL21 pET28a-CFE (Negativkontrolle 5)	6,8	22
P450 + FdR 7 + Fldx-s.-e.-CFE	4,9	3,4
P450 + Fldx-s.-CFE (Negativkontrolle 6)	10	21
P450 + FdR 7 + Fldx-s.-CFE	12	21
P450 + Fdx 1-CFE (Negativkontrolle 7)	2,8	n. b.
P450 + FdR 5 + Fdx 1-CFE	2,8	n. b.
P450 + FdR 6 + Fdx 1-CFE	2,4	n. b.
P450 + FdR 7 + Fdx 1-CFE	3,3	n. b.
P450 + FdR 9 + Fdx 1-CFE	2,1	n. b.
P450 + Fdx 3-CFE (Negativkontrolle 8)	3,1	n. b.
P450 + FdR 5 + Fdx 3-CFE	3,8	n. b.
P450 + FdR 6 + Fdx 3-CFE	3,8	n. b.
P450 + FdR 7 + Fdx 3-CFE	5,0	n. b.
P450 + FdR 9 + Fdx 3-CFE	2,9	n. b.

Reaktionsbedingungen: 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, 2 mM (bei CYP154C5-Reaktionen) bzw. 0,5 mM (bei CYP106A2-Reaktionen) Progesteron, 3 μ M aufgereinigte CYP154C5 bzw. CYP106A2-enthaltender CFE mit einer P450-Konzentration von 3 μ M, 3 μ M FdR, 12 μ M Fdx oder Fdx- bzw. Fldx-haltiger CFE mit unbekannter Fdx- bzw. Fldx- Konzentration (finale Gesamtproteinkonzentration: 8,5 mg/mL (CYP154C5) bzw. 6,5 mg/mL (CYP106A2), * Ausnahme: Fdx 4/FdR 6-CFE (CYP154C5): 22 mg/mL), 0,1 mM NAD(P)H, 1 U/mL (CYP154C5) bzw. 2 U/mL GDH (CYP106A2) (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NAD^+ pro Minute bei pH 7,4 und RT reduzierte), 30 mM Glucose, 600 U/mL Katalase (nur wenn kein CFE eingesetzt wurde), Inkubationsdauer: ca. 15 h, 30 °C, 250 rpm, geschlossene 12 mL Glasgefäße, für Leervektor-CFE über Proteingehalt (8,5 mg/mL (CYP154C5) bzw. 6,5 mg/mL (CYP106A2)) normiert. Die Abkürzung „n. b.“ steht für „nicht bestimmt“.

Im Fall der Biokatalysen mit CYP154C5 konnte diesmal zusammen mit FdR 6 und dem Fdx 4-haltigen CFE ein Umsatz erzielt werden, der den Umsatz der Negativkontrollen 1 und 2 signifikant übersteigt. Allerdings muss dazu gesagt werden, dass die Gesamtproteinkonzentration in der besagten Reaktion im Vergleich zur Negativkontrolle 2 etwa zweieinhalbmal so hoch war, da mit konzentriertem CFE gearbeitet wurde. Eine Kontrollreaktion mit entsprechend konzentriertem *E. coli* C43 (DE3) pET28a-CFE wurde nicht durchgeführt. Daher kann weder bewiesen noch ausgeschlossen werden, dass Fdx 4 in der Lage ist, mit CYP154C5 zu interagieren. Ansonsten liegen die Umsätze der anderen getesteten Kombinationen mit Flavodoxin-haltigem CFE oder Fdx 1- bzw. Fdx 3-haltigem CFE ungefähr auf dem Niveau der entsprechenden Negativkontrolle, wobei die Werte für Fdx 1- bzw. Fdx 3-haltigen CFE prinzipiell sehr niedrig sind. Für den Einsatz der aufgereinigten Ferredoxine Fdx 8 und Fdx 2 in Kombination mit FdR 9 und FdR 6 sowie CYP106A2 konnte erneut keine Produktbildung nachgewiesen werden. Die Biokatalysen mit CYP106A2, FdR 6 und Fdx 4-haltigem CFE resultierten in deutlich niedrigeren Umsätzen als die Negativkontrollen 1 und 2 mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a-CFE. In diesem Fall wiesen die verwendeten zellfreien Extrakte die gleiche Proteinkonzentration auf. Dies weist darauf hin, dass Fdx 4 nicht mit CYP106A2 interagiert. Darüber hinaus wurde abermals signifikant Produkt gebildet, sobald CYP154C5 oder CYP106A2 mit *E. coli* BL21 (DE3) bzw. C43 (DE3) pET28a-CFE kombiniert wird. Im direkten Vergleich der Leervektorkontrolle zu den restlichen Negativkontrollen scheint der Umsatz interessanterweise zu sinken, wenn der CFE putatives Ferredoxin oder putatives Flavodoxin enthält.

Da die Umsätze der Negativkontrolle nicht signifikant überschritten und somit die Umsätze der Positivkontrolle nicht erreicht wurden, muss geschlossen werden, dass sich keine Redoxpartner für CYP154C5 oder CYP106A2 unter den getesteten Elektronentransferproteinen befanden, vorausgesetzt letztere waren unter den gegebenen Bedingungen korrekt gefaltet und aktiv.

3.1.4 Coexpression von putativen Elektronentransferproteinen mit CYP154H1 für den Einsatz in der Biokatalyse

Wie unter Abschnitt 3.1.1.1 erläutert, bilden Fdx 4 und FdR 6 ein mögliches Redoxpaar, da die entsprechenden Gene (Tfu_1226 bzw. Tfu_1227) im Genom von *T. fusca* unmittelbar aufeinander folgen. Zudem codiert das direkt benachbarte Gen Tfu_1225 für die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP217A1, sodass Fdx 4 und FdR 6 putative Redoxpartner dieses Enzyms sind. Daher wurde vermutet, dass die Kombination aus Fdx 4 und FdR 6 womöglich ebenfalls für die Kooperation mit anderen Cytochrom P450 Monooxygenasen geeignet ist.

Wiederum in Abschnitt 3.1.1.1 wurde gezeigt, dass die Expression von Fdx 4 bei gleichzeitiger Coexpression von FdR 6 mit dem Stamm *E. coli* C43 (DE3) pET28a_Tfu_1226 pIT2_Tfu_1227 verbessert werden konnte, was ein weiterer Hinweis dafür ist, dass Fdx 4 und FdR 6 ein Redoxpaar

bilden. Die Aufreinigung von Fdx 4 führte allerdings zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Aus diesem Grund wurde für die Biokatalysen mit CYP154H1, CYP154C5 und CYP106A2 Fdx 4-haltiger zellfreier Extrakt des eben erwähnten Stammes eingesetzt, der aufgrund der Coexpression mit FdR 6 ebenfalls diese Reduktase enthielt (siehe Abschnitt 3.1.3). In der Folge wurde die Coexpression von CYP154H1, Fdx 4 und FdR 6 getestet. Dabei sollte untersucht werden, ob die Expression der Cytochrom P450 Monooxygenase die Expression der anderen Proteine beeinflusst bzw. umgekehrt. Da ein Teilziel dieser Arbeit darin bestand, die natürlichen Redoxpartner von CYP154H1 aus *T. fusca* zu identifizieren, wurden die folgenden Versuche nur mit CYP154H1 und mit keinen weiteren P450-Enzymen durchgeführt. Für die Coexpression von CYP154H1, Fdx 4 und FdR 6 sollten sich die Gene für Fdx 4 und FdR 6 zusammen auf einem Coexpressionsvektor und das Gen für CYP154H1 auf einem separaten Vektor befinden. Es wurden pACYCDuet™-1 als Plasmid zur Coexpression von FdR 6 und Fdx 4 sowie pIT2_cyp154h1 zur CYP154H1-Expression gewählt. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich zwischen dem Einsatz des entsprechenden Konstrukts pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 und dem Einsatz von pACYC_CamAB, welches für die Coexpression von PdR und Pdx verwendet wurde. Dieses Plasmid wurde bereits von Schallmeyer et al. in Kombination mit pIT2_cyp154h1 zur Bestimmung des Substratspektrums von CYP154H1 eingesetzt (Schallmeyer et al., 2011). Der entsprechende Stamm *E. coli* C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYC_CamAB stand daher als Positivkontrolle für die späteren Biokatalysen mit CYP154H1-, Fdx 4- und FdR 6-haltigem zellfreiem Extrakt zur Verfügung. Im Folgenden sind zunächst die Ergebnisse der Klonierung und Coexpression gezeigt. Im Anschluss folgen die Resultate der Aktivitätsbestimmung und der Biokatalyse.

3.1.4.1 Klonierung und Einsatz von Plasmiden zur Coexpression von putativen Elektronentransferproteinen mit CYP154H1

Um den Vektor pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 zu erhalten, wurde zunächst über PCR die *NdeI*-Schnittstelle des FdR 6-Gens gegen eine *BspHI*-Erkennungssequenz ausgetauscht (pET28a_Tfu_1227 diente als parentale DNA). Die resultierende Gensequenz wurde über Verdau mit *BspHI* sowie *HindIII* und Ligation in den mit *NcoI* sowie *HindIII* verdauten Leervektor pACYCDuet™-1 eingefügt. Der resultierende Vektor pACYCDuet_Tfu_1227 stand daraufhin zum Einbringen des Fdx 4-Gens zur Verfügung. Dafür wurden Vektor wie auch Gen mit *NdeI* und *XhoI* verdaut und durch Ligation beider wurde pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 erhalten. Um schließlich eine Coexpression der Gene für FdR 6, Fdx 4 und CYP154H1 zu realisieren, wurden die Plasmide pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 und pIT2_cyp154h1 in *E. coli* BL21 (DE3) und C43 (DE3) co-transformiert. Im Rahmen einer Expressionsstudie im großen Maßstab (500 mL TB-Medium) wurde bei 30 °C die Coexpression getestet. Bei dieser Expressionsstudie war das Ziel – neben der üblichen Analyse der Expression mittels SDS-PAGE – die P450-Konzentration zu bestimmen, wozu deutlich mehr Probe notwendig war, als zur alleinigen Analyse via SDS-PAGE. Daher wurden im Vergleich zu üblichen

Expressionsstudien deutlich größere Proben genommen, um genügend Zellmaterial für die nachfolgenden Analysen zu erhalten.

Für die Expression mit *E. coli* C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 bei 30 °C wurden dabei die besten Resultate erhalten, da bei dieser Bedingung die höchste CYP154H1-Konzentration festgestellt werden konnte. Der Nachweis der drei Zielproteine über das entsprechende SDS-Gel (Abbildung 3.23) gestaltet sich als schwierig. Einerseits war es in diesem Fall nicht einfach möglich, die Zielproteine spezifisch über einen Western Blot nachzuweisen, da keines der Proteine über einen His-Tag verfügte. Andererseits besitzen FdR 6 (44,2 kDa) und CYP154H1 (45,9 kDa) ähnliche Molekulargewichte, sodass die Banden auf der entsprechenden Höhe nicht genau zuzuordnen sind.

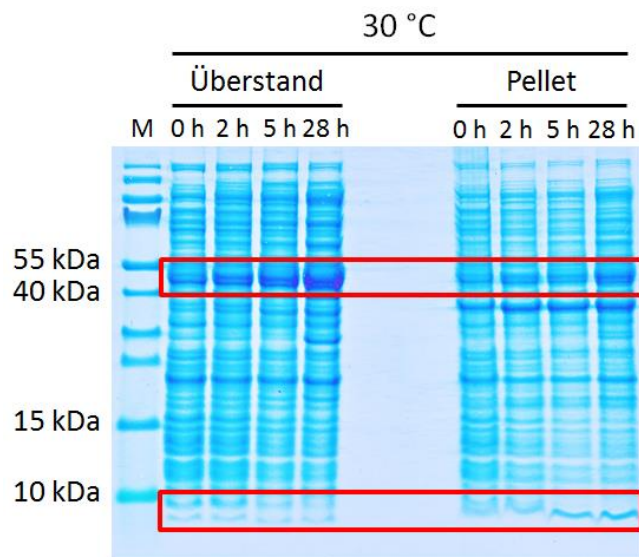


Abbildung 3.23: SDS-Gel zur Analyse der Expression von FdR 6, Fdx 4 und CYP154H1 in *E. coli* C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 bei 30 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{start}} = 0,2$; induziert mit 0,4 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe der Zielproteine an (FdR 6 und CYP154H1: ca. 45 kDa, Fdx 4: ca. 7 kDa). M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

3.1.4.2 Bestimmung der Elektronentransferaktivität

Die Elektronentransferaktivität der zellfreien Extrakte von *E. coli* BL21 (DE3) pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 bzw. C43 (DE3) pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 (zur Coexpression von FdR 6 und Fdx 4) sowie *E. coli* BL21 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 bzw. C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 (zur Coexpression von CYP154H1 mit FdR 6 und Fdx 4) wurde ebenfalls untersucht und mit den Werten für den zellfreien Extrakt von *E. coli* BL21 (DE3) bzw. C43 (DE3) (ohne Vektor) verglichen. Die dafür verwendeten Zellen stammten aus einer Expressionsstudie und somit wurde die Elektronentransferaktivität der zu verschiedenen Zeitpunkten gezogenen Proben (0 h, 2 h, 5 h und 24 h nach Induktion) ermittelt. Dabei wurden

generell sehr niedrige Aktivitätswerte (unter 0,1 U/mg) festgestellt und die Werte der zellfreien Extrakte von *E. coli* BL21 (DE3) pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 bzw. C43 (DE3) pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 sowie *E. coli* BL21 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 bzw. C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 waren entweder niedriger oder nicht signifikant höher als die Werte der zellfreien Extrakte von *E. coli* BL21 (DE3) bzw. C43 (DE3) (Negativkontrollen). Möglicherweise war das Fdx 4-Expressionslevel zu gering oder das Ferredoxin interagiert nicht mit Cytochrom c, sodass keine signifikante Aktivität in Form von Cytochrom c-Reduktion detektiert werden konnte.

3.1.4.3 Biokatalyse

Der Einsatz von FdR 6 und Fdx 4 bzw. PdR und Pdx wurde in Biokatalysen mit CYP154H1 verglichen. Für die Produktion von CYP154H1-, Fdx 4- und FdR 6-haltigem zellfreien Extrakt wurde *E. coli* C43 (DE3) pIT2_cyp154h1 pACYCDuet_Tfu_1227+Tfu_1226 nach Induktion für 4 h bei 30 °C kultiviert und anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Für die Kontrollen wurden jeweils die gleichen Bedingungen beibehalten. Als Substrate für die Biokatalysen wurden das bereits beschriebene β -Jonon sowie Styrol verwendet. Styrol wurde ebenfalls von Schallmey et al. (2011) als Substrat für CYP154H1 identifiziert, wobei als Produkt Styroloxid resultiert (Abbildung 3.24).

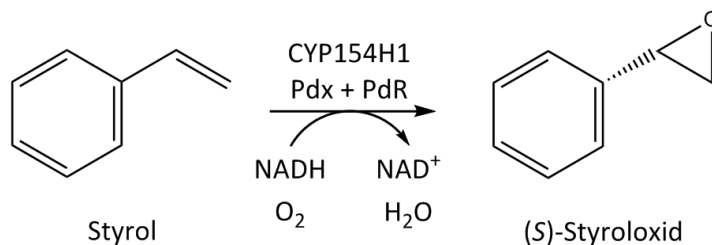


Abbildung 3.24: Umsatz von Styrol zu (S)-Styroloxid durch CYP154H1 zusammen mit Pdx und PdR.

Die Reaktionen wurden jeweils bei 30 °C und bei 50 °C durchgeführt. In diesem Fall wurden die 50 °C-Ansätze vor Start der Reaktion (durch Cofaktorzugabe) für 20 Minuten bei der entsprechenden Temperatur im Wasserbad inkubiert, sodass die Ansätze zum Reaktionsstartpunkt tatsächlich die gewünschte Temperatur aufwiesen. Es wurde NADH als Cofaktor eingesetzt und da mittlerweile auch ein thermostabiles Enzym zur Cofaktor-Regenerierung bei höheren Temperaturen zur Verfügung stand (PseFDH), wurde keine höhere NADH-Konzentration für die 50 °C-Reaktionen benötigt. Es ist zu beachten, dass für diesen Versuch über die P450-Konzentration normiert wurde und nicht über den Gesamtproteingehalt. Somit verfügten zwar alle CYP154H1-haltigen Reaktionen über die gleiche CYP154H1-Endkonzentration von 17 μM , aber durch die unterschiedlichen Gesamtproteinkonzentrationen in den verschiedenen zellfreien Extrakten wich der Proteingehalt der einzelnen Ansätze voneinander ab. Die Reaktionen wurden für ca. 16 h bei der entsprechenden

Temperatur und 250 rpm inkubiert, die anschließende Extraktion erfolgte wie unter Abschnitt 2.4.1 beschrieben und die Substanzen wurden mittels GC und Methode 1 analysiert (siehe Abschnitt 2.5.2). β -Jonon und dessen Hauptprodukt wiesen wiederum Retentionszeiten von 15,4 min bzw. 17,6 min auf, während Styrol und dessen Hauptprodukt bei 6,4 min bzw. 9,4 min detektiert wurden. Die Berechnung des Umsatzes (Tabelle 3.6) erfolgte über die integrierten Peakflächen mit Hilfe von Formel 10.

Tabelle 3.6: Übersicht über die Ergebnisse der Biokatalysen mit CYP154H1 unter Verwendung der coexprimierten Proteine FdR 6 und Fdx 4 bzw. PdR und Pdx sowie β -Jonon und Styrol als Substrate bei 30 °C und 50 °C.

Reaktion	Umsatz [%] bei 30 °C	Umsatz [%] bei 50 °C
β-Jonon		
Reaktionsgemisch ohne CFE (Negativkontrolle 1)	0,9	0,5
FdR 6/Fdx 4-CFE (Negativkontrolle 2)	1,0	2,0
CYP154H1-CFE (Negativkontrolle 3)	19	2,9
CYP154H1/PdR/Pdx-CFE (Positivkontrolle)	99	5,0
CYP154H1/FdR 6/Fdx 4-CFE	24	3,3
Styrol		
Reaktionsgemisch ohne CFE (Negativkontrolle 1)	0,0	0,0
FdR 6/Fdx 4-CFE (Negativkontrolle 2)	0,0	0,2
CYP154H1-CFE (Negativkontrolle 3)	1,0	0,2
CYP154H1/PdR/Pdx-CFE (Positivkontrolle)	11	1,4
CYP154H1/FdR 6/Fdx 4-CFE	1,9	2,4

Reaktionsbedingungen: 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,4, 5 mM Substrat, 17 μ M CYP154H1, FdR 6- und Fdx 4- bzw. PdR- und Pdx-haltiger CFE mit unbekannter FdR- und Fdx-Konzentration (Volumen normiert über CYP154H1-Konzentration), 0,1 mM NADH, 2 U/mL PseFDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NAD^+ pro Minute bei pH 7,4 und RT reduzierte), 150 mM Natriumformiat, Inkubationsdauer: ca. 16 h, 30 °C und 50 °C, 250 rpm, geschlossene 12 mL Glasgefäße, 50 °C-Reaktionen vor Cofaktorzugabe für 20 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert.

Zuerst fällt auf, dass eine starke Diskrepanz zwischen den Umsätzen von β -Jonon und denen von Styrol besteht. Während bei 30 °C das β -Jonon in der Positivkontrolle fast vollständig umgesetzt wird, wird für die Positivkontrolle von Styrol ein deutlich niedriger Umsatz von nur ca. 11 % erzielt. Dementsprechend weisen die restlichen Reaktionen mit Styrol als Substrat ebenfalls nur geringe Umsätze auf, was die Interpretation der Ergebnisse schwierig gestaltet. In den Reaktionen mit β -Jonon bei 30 °C werden dagegen ebenfalls von dem Ansatz mit CYP154H1-, FdR 6- und Fdx 4-haltigem CFE und von Negativkontrolle 3 mit CYP154H1-haltigem CFE zweistellige Umsätze erzielt. Dabei ist der Umsatz des CYP154H1-, FdR 6- und Fdx 4-haltigen Ansatzes im Vergleich zur

Negativkontrolle 3 etwa fünf Prozentpunkte höher, was auf eine mögliche Interaktion zwischen Fdx 4 und CYP154H1 hinweist. Allerdings lag der Proteingehalt des zellfreien Extrakts in der genannten Reaktion ca. 14 % über dem der Negativkontrolle 3, sodass ein genauer Vergleich schwierig ist. Des Weiteren sind die Werte des erwähnten Umsatzes nicht annähernd so hoch wie der Umsatz der Positivkontrolle mit PdR und Pdx. Es ist zudem zu beobachten, dass selbst im Substratstandard ohne CYP154H1 bzw. CFE (Negativkontrolle 1) Produkt nachgewiesen wurde. Dies zeigt, dass bereits im Substrat ein kleiner Anteil des Produkts enthalten ist, oder eine Substanz, die mit der verwendeten GC-Methode die gleiche Retentionszeit aufweist wie das Produkt. Für die Tests bei 50 °C wurde generell nur sehr geringe Produktbildung festgestellt. So weisen die Positivkontrollen nur noch ca. 5 % (β -Jonon) bzw. etwa 10 % (Styrol) des bei 30 °C erzielten Umsatzes auf. Zwar übersteigen die Umsätze mit CYP154H1-, FdR 6- und Fdx 4-haltigem CFE für beide Substrate die entsprechende Negativkontrolle 3 (CYP154H1-haltiger CFE), für Styrol ist der erwähnte Umsatz sogar höher als bei der Positivkontrolle, trotzdem sollten die Werte aufgrund der prinzipiell niedrigen Produktbildung mit Vorsicht betrachtet werden. Darüber hinaus sollte beachtet werden, dass bei 50 °C die Verdampfung höher ist und die Bestimmung des Umsatzes damit einem höheren Fehler unterliegt.

Es kann abschließend weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, dass die Redoxpartnerkombination aus FdR 6 und Fdx 4 für die Kooperation mit CYP154H1 geeignet ist. Die Umsätze mit diesen Proteinen und CYP154H1 waren stets leicht höher als in der Negativkontrolle, die Umsätze der Positivkontrolle wurden allerdings nicht erreicht.

3.2 Untersuchung neuer bakterieller *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen

Mit dem Ziel neuartige bakterielle *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen zu identifizieren, welche sich möglichst stark von der bekannten P450_{BM3} (CYP102A1) unterscheiden, wurde im Vorfeld des Projekts eine BLAST-Suche durchgeführt, bei der die Sequenz der Hämdomäne von CYP102A1 als Ausgangssequenz diente. In Abbildung 3.25 sind die dabei erhaltenen homologen Enzyme in Form eines phylogenetischen Stammbaumes dargestellt. Für weitere Untersuchungen wurden anschließend CYP102A1-Homologe gewählt, deren Hämdomäne eine Sequenzidentität von weniger als 40 % im Vergleich zu CYP102A1 aufwies. Dabei sollte untersucht werden, ob die relativ geringe Sequenzidentität auch mit einem unterschiedlichen Substratspektrum einhergeht.

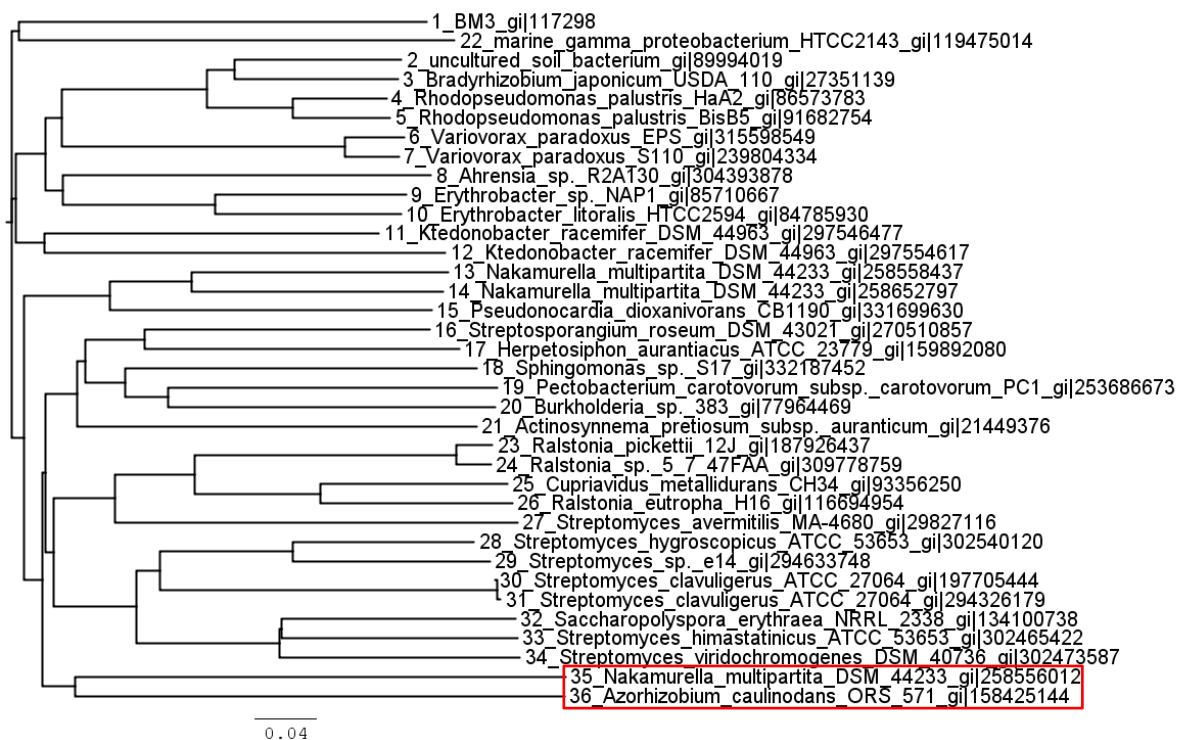


Abbildung 3.25: Ergebnisse der Suche nach neuartigen *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen mit der Sequenz von CYP102A1 (P450_{BM3}) als Ausgangssequenz. Der rot umrahmte Bereich markiert die Organismen, die für weitere Arbeiten genutzt wurden. Die Abbildung wurde von M. Schallmey zur Verfügung gestellt.

Die gewählten *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen sind CYP102_{Nmu} aus *Nakamurella multipartita* und CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans*, deren Hämdomänen Sequenzidentitäten von 37 bzw. 34 % zur Hämdomäne von CYP102A1 aufweisen. *Nakamurella multipartita* ist ein gram-positives, kokkenförmiges Bakterium, das weder freibeweglich ist, noch sporenbildende Eigenschaften aufweist. Es ist obligat aerob und in der Lage, in einem Temperaturbereich von 10 – 35 °C und einem pH-Bereich von pH 5,0 – 9,0 zu wachsen. Dabei wächst es selbst unter den besten

Bedingungen (25 °C und pH 7,0) äußerst langsam. Zudem besitzt es die Eigenschaft, große Polysaccharidspeicher zu bilden (Yoshimi et al., 1996). *Azorhizobium caulinodans* ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, das beweglich und obligat aerob ist. Zudem ist es in der Lage in einem Temperaturbereich von 12 – 43 °C zu wachsen und gleich gutes Wachstum erfolgt in einem pH-Bereich von pH 5,5 – 7,8 (Dreyfus et al., 1988). Es hat darüber hinaus die außergewöhnliche Eigenschaft sowohl als freilebender Organismus als auch in Symbiose mit Sträuchern der Spezies *Sesbania* Stickstoff zu fixieren (Elmerich et al., 1982). Die Symbiose mit *Sesbania rostrata*, einem schnell-wachsenden Busch der Sahel-Region, ist besonders gut beschrieben und es kommt dabei zur Knöllchenbildung an der Wurzel und am Stängel der Pflanze (Dreyfus et al., 1984). Der P450 Monooxygenase aus *A. caulinodans* wurde der systematische Name CYP102K1 zugeteilt (Dr. David Nelson). Das Enzym ist das 32. identifizierte und eingetragene Mitglied der CYP102-Familie und gehört trotz der geringen Sequenzidentität zur selben P450-Familie wie P450_{BM3} (CYP102A1), stellt aber das erste Isoenzym einer eigenen Unterfamilie dar (Nelson, 2009). CYP102K1 ist darüber hinaus erst das achte Mitglied der CYP102-Familie, das in einem gram-negativen Bakterium identifiziert wurde.

3.2.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung

Die synthetischen Gene von CYP102_{Nmu} aus *N. multipartia* und CYP102K1 aus *A. caulinodans* wurden codonoptimiert für die Expression in *E. coli* bestellt. Dabei wurden beide Gene in je zwei Teilen bestellt und anschließend in mehreren Schritten in pET28a(+)-Vektoren zusammenkloniert.

3.2.1.1 Klonierung und Expression der *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenase aus *Nakamurella multipartia*

Für die Klonierung wurde zunächst das 5'-Ende des CYP102_{Nmu}-Gens über Verdau mit *NdeI* und *BamHI* in den pET28a(+)-Vektor eingebracht. Das zweite Teilstück (3'-Ende) wurde mit *KpnI* und *EcoRI* verdaut. Die resultierenden DNA-Moleküle wurden über Ligation in den jeweiligen, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pET28a(+)-Vektor eingefügt, der wie zuvor erwähnt, bereits das jeweilige 5'-Ende des Gens beinhaltet. Der resultierende Vektor pET28a_{nmu} wurde anschließend in die Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) und C43 (DE3) transformiert und die Expression getestet.

Zunächst wurden verschiedene Expressionsstudien durchgeführt, bei denen vor allem unterschiedliche Temperaturen getestet wurden. Allerdings wurde das Zielprotein stets in der unlöslichen Pelletfraktion gefunden, wie exemplarisch auf dem SDS-Gel bzw. Western Blot in Abbildung 3.26 für *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_{nmu} bei 37 °C zu sehen ist.

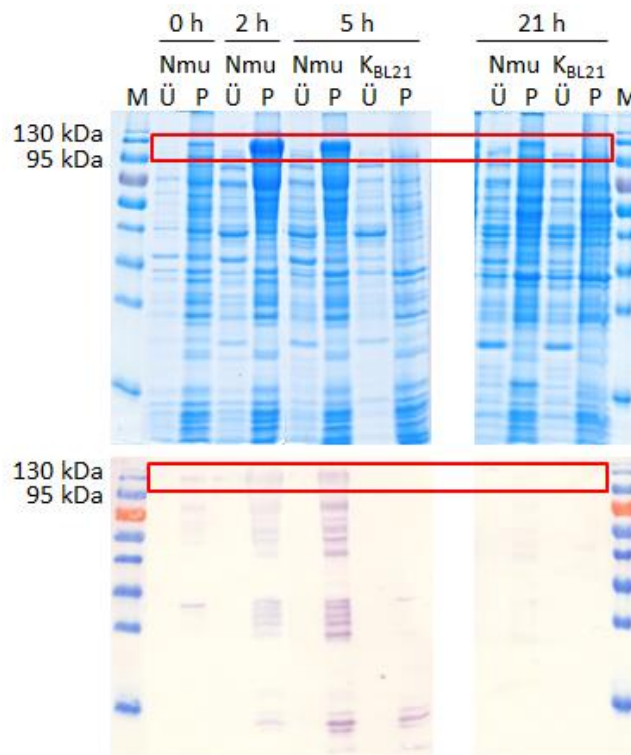


Abbildung 3.26: SDS-Gele und Western Blots zur Analyse der Expression von CYP102_{Nmu} in *E. coli* BL21 (DE3) pET28a_nmu in TB-Medium bei 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{start}} = 0,2$; induziert mit 0,2 mM IPTG bei $OD = 1$). Die Zellyse erfolgte mit B-PER. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, Ü: Überstandsfraction, P: Pelletfraction, K_{BL21}: *E. coli* BL21 (DE3)-Leervektorkontrolle.

Daraufhin wurden neben der Temperatur weitere Parameter variiert, um den löslichen Anteil des Proteins zu erhöhen. So wurden verschiedene Induktorkonzentrationen, Expressionsmedien sowie Aufschlussmethoden (Ultraschall, Hochdruckhomogenisation und B-PER) untersucht. Zudem wurde getestet, ob der Induktionszeitpunkt (OD_{600} bei Induktion) oder das Füllvolumen im Erlenmeyerkolben (Füllvolumen-zu-Gefäßvolumen-Verhältnis) die Expression beeinflussen. Im Fall der Variation der Medien wurde neben dem normalen TB-Medium auch TB-S-Medium verwendet, welches durch den hohen Sorbitolanteil das Wachstum der Zellen verlangsamen sollte. Dadurch bleibt den Proteinen mehr Zeit, ihre korrekte Faltung einzunehmen, was den löslichen Proteinanteil erhöhen kann. Außerdem wurden verschiedene TB-Medium-Zusammensetzungen in weiteren Expressionsstudien untersucht. Dazu wurden Hefeextrakt und Pepton verschiedener Hersteller zum Ansetzen des TB-Mediums verwendet. Die Ausgangsstoffe und Verarbeitungsweise der Medienkomponenten variieren abhängig vom Hersteller und teils sogar Charge, was dazu führt, dass sich jeweils die genaue Zusammensetzung unterscheidet. Dies kann sich wiederum auf das Wachstum und die Expression auswirken (Hofzumahaus, 2013). Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Zugabe des Detergenz Triton X-100 (0,4 %) in den Puffer, der zum Aufschluss mittels

Ultraschall verwendet wurde, einen Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins hat. Jedoch konnte keine dieser Maßnahmen den Anteil an löslicher CYP102_{Nmu} erhöhen.

Daher wurde ein anderer Vektor zur Expression getestet und das CYP102_{Nmu}-Gen in den pBAD-N-Vektor kloniert (ohne His-Tag). Um dies zu erreichen, wurde die Gensequenz mit *NdeI* und *EcoRI* aus dem pET28a_{nmu}-Plasmid geschnitten und in den entsprechend verdauten pBAD-N-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid pBAD-N_{nmu} wurde in die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3), C43 (DE3) und TOP10 eingebracht und es wurden wiederum Expressionsstudien durchgeführt, bei denen wiederum die bereits erwähnten Parameter variiert wurden. Unglücklicherweise lag das Zielprotein trotz der zahlreichen unternommenen Versuche bei keiner der getesteten Bedingungen in der löslichen Fraktion vor, wie die exemplarischen SDS-Gele für die Expression mit *E. coli* TOP10 pBAD-N_{nmu} in Abbildung 3.27 belegen.

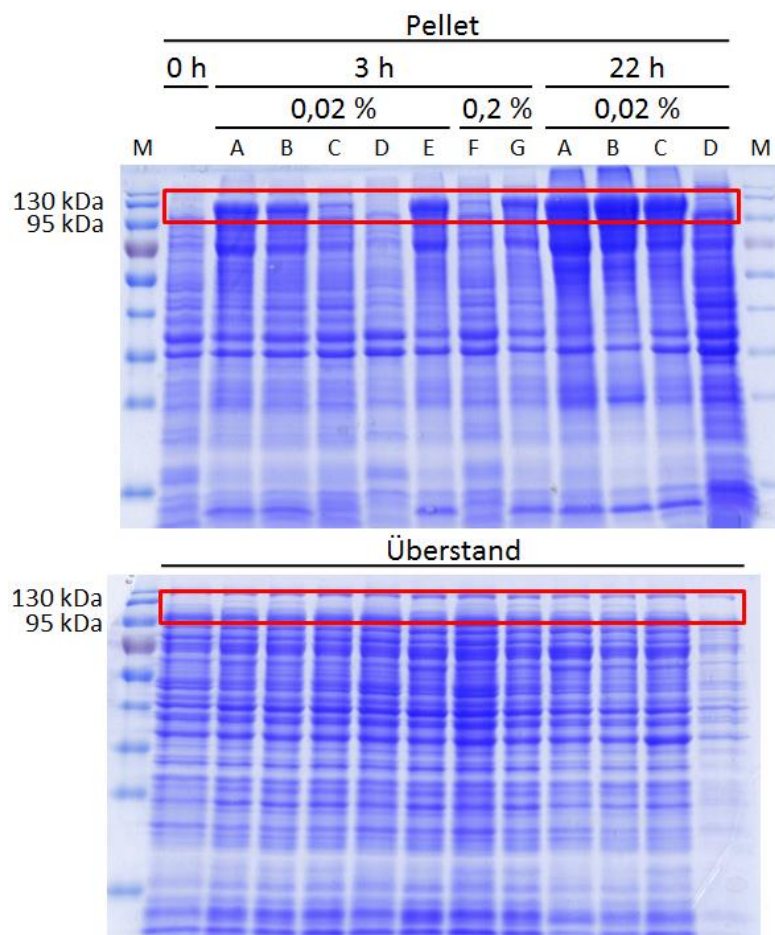


Abbildung 3.27: SDS-Gele zur Analyse der Expression von CYP102_{Nmu} in *E. coli* TOP10 pBAB-N_{nmu} in TB-S-Medium bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,02 bzw. 0,2 % Arabinose bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, A & E: 37 °C, B & G: 30 °C, C: 25 °C, D & F: 20 °C, E: 37 °C, das Luft-zu-Flüssigkeitsverhältnis betrug für alle Kulturen 0,6, außer für E (0,12).

Da keine geeigneten Bedingungen zur löslichen Expression von CYP102_{Nmu} gefunden werden konnten, wurde mit diesem Enzym nicht weitergearbeitet.

3.2.1.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans*

CYP102K1

Zur Klonierung des CYP102K1-Gens wurde zunächst das 5'-Ende des Gens mit Hilfe von *NdeI* und *BamHI* in den pET28a(+)-Vektor eingebracht. Das 3'-Ende des Gens wurde anschließend über Verdau mit *BamHI* und *EcoRI* und anschließender Ligation in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pET28a(+)-Vektor eingebracht, der wie zuvor erwähnt, bereits das 5'-Ende des Gens beinhaltet. Das resultierende pET28a_cyp102k1-Plasmid wurde daraufhin in die Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) und C43 (DE3) transformiert.

Im Rahmen von Expressionsstudien zur Analyse der CYP102K1-Expression wurden TB-Medium und 0,2 mM IPTG als Induktor eingesetzt sowie 30 °C und 37 °C als Expressionstemperaturen getestet (siehe auch Abschnitt 2.2.14.1). Die resultierenden Proben wurden mit B-PER, Ultraschall oder mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen. Dabei wurde für die Expression mit *E. coli* C43 (DE3) pET28a_cyp102k1 bei 30 °C und einer Expressionsdauer von etwa 22 h sowie Ultraschall oder Hochdruckhomogenisation als Aufschlussmethode ein sehr gutes Ergebnis festgestellt, wie das entsprechende SDS-Gel in Abbildung 3.28 zeigt.

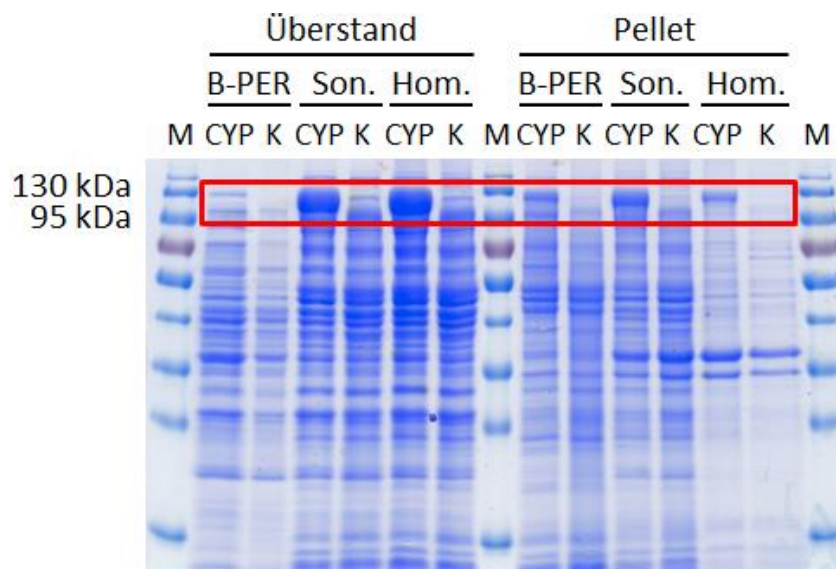


Abbildung 3.28: SDS-Gel zur Analyse der Expression von CYP102K1-Gen in *E. coli* C43 (DE3) pET28a_cyp102k1 bei 30 °C und einer Expressionsdauer von etwa 22 h in Abhängigkeit von der Zellaufschlussmethode ($OD_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,2 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mittels B-PER, Ultraschall (Son.) oder Hochdruckhomogenisation (Hom.). Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas, CYP: CYP102K1-Proben, K: *E. coli* C43 (DE3)-Leervektorkontrolle.

Aus Abbildung 3.28 geht hervor, dass der lösliche Proteinanteil nach dem Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisation am höchsten ist, gefolgt von dem Aufschluss durch Ultraschall. Es ist auffällig, dass die B-PER-Proben keine Zielproteinbande in der löslichen und nur eine sehr schwache in der unlöslichen Fraktion aufweisen, obwohl für alle Aufschlussmethoden Zellpellets der gleichen Kultivierung genutzt wurden. Möglicherweise führten die im B-PER enthaltenen Detergenzien zu einer Fragmentierung oder Aggregation des Zielproteins. Im Fall einer Aggregation lässt sich das Protein nur schwierig solubilisieren, sodass es sein kann, dass die auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinproben kaum Zielprotein enthielten.

Die Expression im 500 mL-Maßstab wurde ebenfalls in TB-Medium für ca. 22 h bei 30 °C durchgeführt und die IPTG-Konzentration betrug gleichermaßen 0,2 mM (siehe auch Abschnitt 2.2.14.2). Nach der Zellernte wurden die Zellen mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen und abzentrifugiert. Der resultierende zellfreie Extrakt wurde anschließend für die Aufreinigung der CYP102K1 mittels IMAC verwendet. Die HisTrap™ HP-Säule wurde zunächst mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Nach Beladen und Waschen der Säule war eine deutliche Braunfärbung der Säule zu beobachten, die durch das in Cytochrom P450 Monooxygenasen als prosthetische Gruppe befindliche Häm hervorgerufen wird. Die Elution von CYP102K1 begann bei etwa 300 mM Imidazol, der entsprechende Peak ist im Beispielchromatogramm (Abbildung 7.19) eindeutig zu erkennen. Die ebenfalls braun gefärbten Zielprotein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach der Aufkonzentrierung schonend umgepuffert. D. h. es wurde eine langsame Reduktion der Imidazolkonzentration durch Verdünnen der Proteinlösung mit Puffer ohne Imidazol und anschließender Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration durchgeführt. Der gleiche Puffer wurde ebenfalls für den entsprechenden Entsalzungsschritt mittels PD10-Säule verwendet. Im Anschluss wurden das Konzentrat der aufgereinigten CYP102K1 und der zur Aufreinigung genutzte zellfreie Extrakt anhand verschiedener Methoden analysiert. Mittels SDS-PAGE wurde die Aufreinigung überprüft und die Reinheit des CYP102K1-haltigen Konzentrats wurde auf etwa 90 % geschätzt (Abbildung 3.29). Des Weiteren wurden die Gesamtprotein- und die P450-Konzentration sowie die Elektronentransferaktivität von CFE und Konzentrat bestimmt (siehe auch Abschnitt 3.2.2.1), um den CYP102K1-Anteil am Gesamtprotein und Ausbeuten zu ermitteln (Tabelle 3.7). Demnach betrug der CYP102K1-Anteil am Gesamtprotein etwa 21 % und das Konzentrat bestand zu ca. 98 % aus CYP102K1. Die über die Proteingehaltsmessungen bestimmte Reinheit ist somit höher, als die optisch abgeschätzte. Die P450- sowie Aktivitätsverluste während der Aufreinigung betrugen jeweils etwa 50 %. Insgesamt konnten etwa 66 mg aktive CYP102K1 aus einem Liter Kultur isoliert werden.

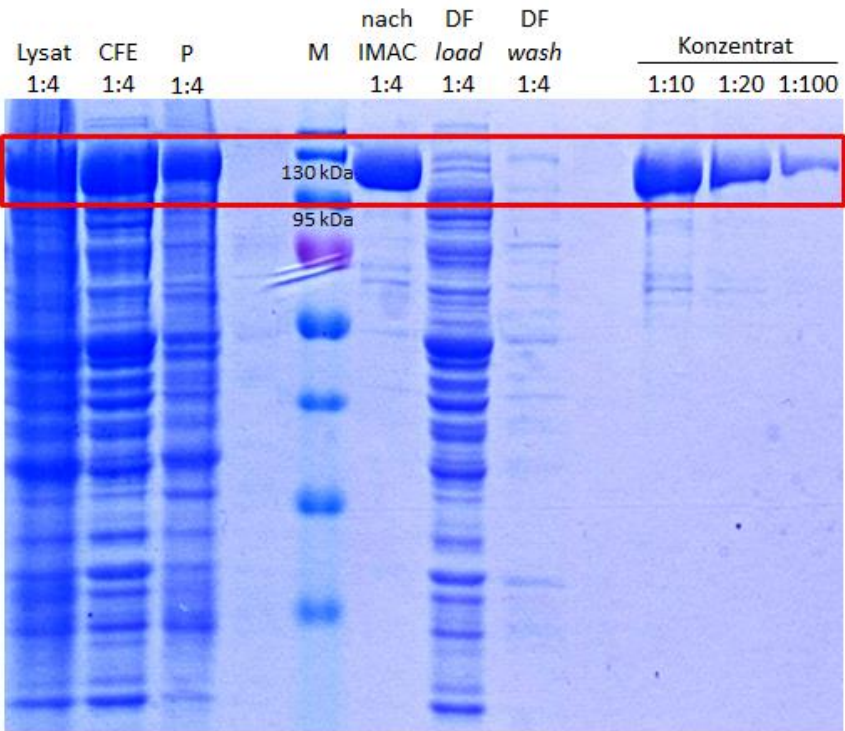


Abbildung 3.29: SDS-Gel zur Analyse der Aufreinigung von CYP102K1. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. Untersucht wurden das Lysat, der CFE, das Pellet nach Aufschluss (P), die aufgereinigte P450 (nach IMAC), der Durchfluss bei Beladen der Säule mit dem CFE (DF *load*), der Durchfluss beim Waschvorgang (DF *wash*), sowie das finale Konzentrat in verschiedenen Verdünnungen. M: Proteinmarker “PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Fermentas.

Tabelle 3.7: Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Analysen von CYP102K1-CFE und -Konzentrat repräsentativ für eine der durchgeführten Aufreinigungen.

	CFE ^{a)}	Konzentrat ^{b)}
Analysiertes Parameter		
Gesamtproteingehalt [mg]	304	35,1
Gesamtmenge an aktiver P450 [mg]	65,3	34,6
Gehalt aktive P450 [%] ^{c)}	21,5	98,4
Aufreinigungsfaktor (P450-Gehalt)		4,5
Gesamtelektronentransferaktivität [U]	1.949	886
Spez. Elektronentransferaktivität [U/mg Protein] ^{c)}	6,4	25,2
Aufreinigungsfaktor (Elektronentransferaktivität)		4
Ausbeuten		
Ausbeute aktive P450 [%]	-	52,9
Ausbeute Elektronentransferaktivität [%]	-	45,5

a) Bei Gesamtangaben bezogen auf 33 mL CFE

b) Bei Gesamtangaben bezogen auf 3,9 mL Konzentrat

c) Bezogen auf Gesamtproteingehalt

CYP102K1-Hämdomäne

Um mehr Informationen über die Struktur von CYP102K1 zu erlangen, sollte die Hämdomäne kristallisiert werden. Dazu wurde mit der Gruppe von Prof. Dr. Osami Shoji an der Nagoya Universität in Nagoya, Japan, zusammengearbeitet. Um die entsprechende Gensequenz der separaten Hämdomäne zu erhalten, wurde mit Hilfe von PCR und eines geeigneten Rückwärtsprimers ein Stoppcodon hinter dem 573. Codon des Volllängengens eingefügt. Somit wurde die Transkription in dem Bereich zwischen der Hämdomäne und der Flavodoxindomäne unterbrochen, wie in dem Proteinsequenzausschnitt in Abbildung 3.30 zu erkennen ist. Die experimentell hergestellte Hämdomäne ist daher 48 Aminosäuren länger als die annotierte Hämdomäne. Diese Verlängerung wurde eingefügt, um einen gewissen Abstand zur annotierten Hämdomäne zu schaffen. Damit sollte eine versehentliche Deletion von für die Aktivität essentiellen Aminosäuren vermieden werden.

	530	540	550	560	570	580
CYP102K1	QRFTARPKDPHYVLCHKQALTVPDHLDMLERRPEVKGREFVPRTEAPKTQGAFLAVAQAGGRPMRVL					
Annotierte Hämdomäne	QRFT					
Flavodoxindomäne						
Exprimierte Hämdomäne	QRFTARPKDPHYVLCHKQALTVPDHLDMLERRPEVKGREFVPRTEAPKTQGA					

Abbildung 3.30: Sequenzausschnitt des Volllängenproteins CYP102K1, dessen annotierter Häm- sowie Flavodoxindomäne und der experimentell hergestellten Hämdomäne. Die experimentell hergestellte Hämdomäne weist im Vergleich zur annotierten Hämdomänensequenz eine Verlängerung von 48 Aminosäuren auf.

Für die anschließende Klonierung wurde der erwähnte Rückwärtsprimer ebenfalls mit einer *EcoRI*-Schnittstelle ausgestattet. Nach der PCR mit pET28a_cyp102k1 als parentale DNA und dem T7-Vorwärtsprimer wurde das resultierende PCR-Produkt mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut. Das entsprechende Genfragment der Hämdomäne, *cyp102k1*-hd, wurde daraufhin in die Plasmide pET28a(+) und pET42b(+) eingebracht, welche zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurden. Somit verfügte die Hämdomäne bei Expression mit Hilfe des pET28a_cyp102k1-hd-Vektors über einen N-terminalen His-Tag. Wurde das pET42b_cyp102k1-hd-Plasmid zur Expression verwendet, enthielt die resultierende Hämdomäne dagegen keinen His-Tag. Die Vektoren wurden jeweils in *E. coli* BL21 (DE3) und C43 (DE3) transformiert und die Expression bei 30 °C und 25 °C (nur *E. coli* BL21 (DE3) pET42b_cyp102k1-hd) getestet (siehe Abschnitt 2.2.14.1). Die IPTG-Konzentration betrug jeweils 0,2 mM. Für beide Plasmide wurden die besten Ergebnisse mit *E. coli* C43 (DE3) bei einer Temperatur von 30 °C und einer Expressionsdauer von ca. 22 h erreicht. Abbildung 3.31 zeigt exemplarisch die SDS-Gele der Expressionsstudie mit *E. coli* BL21 (DE3) pET42b_cyp102k1-hd bzw. C43 (DE3) pET42b_cyp102k1-hd bei 25 °C bzw. 30 °C. In dieser Abbildung ist für *E. coli* C43 (DE3) eine intensive Bande der CYP102K1-Hämdomäne bei ca. 60 kDa in der löslichen Fraktion nach 22 h zu erkennen. Somit liegt die Bande auf der erwarteten Höhe (Molekulargewicht von CYP102K1-HD

ohne His-Tag: ca. 63 kDa). Zudem wird deutlich, dass in *E. coli* BL21 (DE3) pET42b_cyp102k1-hd selbst bei niedriger Kultivierungstemperatur (25 °C) überwiegend *inclusion bodies* gebildet werden.

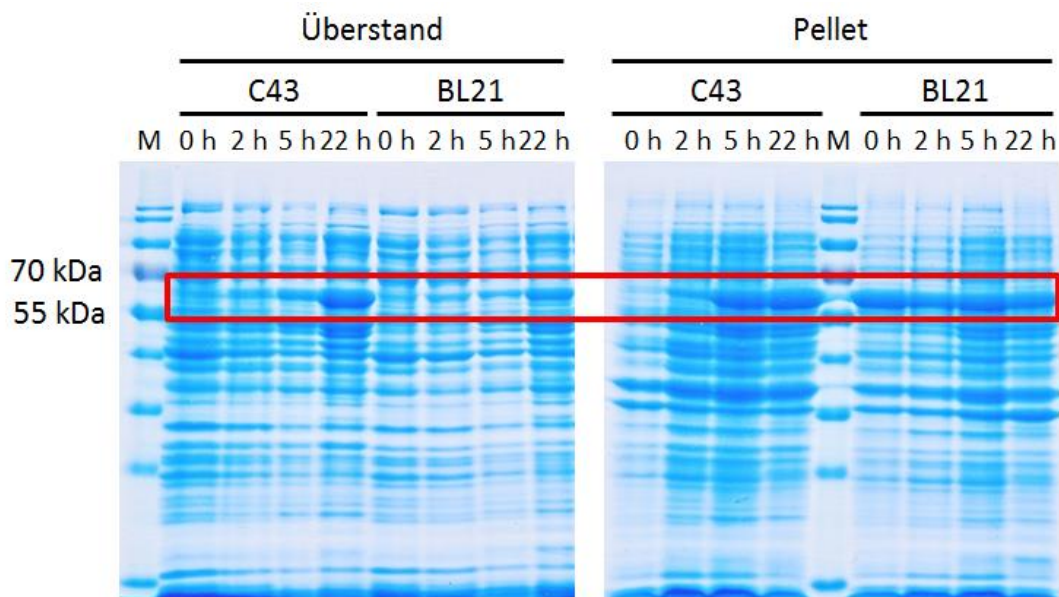


Abbildung 3.31: SDS-Gel zur Analyse der Expression von CYP102K1-HD in *E. coli* BL21 (DE3) pET42b_cyp102k1-hd bei 25 °C bzw. C43 (DE3) pET42b_cyp102k1-hd bei 30 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{Start}} = 0,2$; induziert mit 0,2 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Die Plasmide wurden anschließend zur Kristallisierung der CYP102K1-Hämdomäne zum Kooperationspartner nach Japan geschickt.

N'-short-CYP102K1

Die annotierte, in NCBI hinterlegte Proteinsequenz von CYP102K1 trägt am N-Terminus eine Verlängerung von 87 Aminosäuren, die nicht in P450_{BM3} oder anderen homologen Cytochrom P450 Monooxygenasen zu finden ist. Somit stellte sich die Frage, ob dieser Überhang wichtiger Bestandteil des Enzyms ist, oder lediglich auf einer falschen Annotierung beruhte. Daher wurde im Verlauf des Projektes ebenfalls eine verkürzte Version des Proteins hergestellt. Bei genauer Analyse der CYP102K1-Gensequenz wurde festgestellt, dass Codon 81 (GTG) einen möglichen alternativen Translationsstart darstellt, wie in Abbildung 3.32 gezeigt ist. Eine zugehörige typische Ribosomenbindestelle, also eine sechs bis neun Nukleotide umfassende A/G-reiche Region, die sich normalerweise fünf bis sieben Nukleotide vor dem Startcodon befindet (Shine und Dalgarno, 1975; Vellanoweth und Rabinowitz, 1992; Hu et al., 2012), konnte nicht identifiziert werden. Dies wurde ebenfalls für ein anderes Gen aus *A. caulinodans* berichtet (Goethals et al., 1994), sodass untypische Ribosomenbindestellen für diesen Organismus nicht unbedingt außergewöhnlich zu sein scheinen.

Als mögliche Ribosomenbindestelle kommt in diesem Fall beispielsweise die Sequenzabfolge TGGTGG (Position 224 – 229) in Frage, auch wenn dies nicht mit Sicherheit gesagt werden kann.

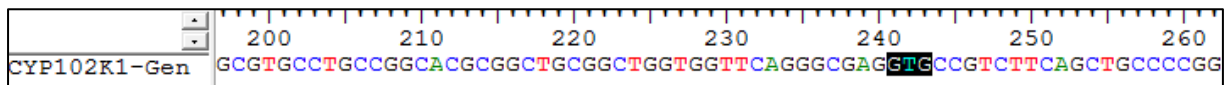


Abbildung 3.32: Sequenzausschnitt des CYP102K1-Gens. Das alternative Startcodon ist in Schwarz markiert.

Zur Herstellung einer verkürzten CYP102K1-Variante wurde ein entsprechender Vorwärtsprimer entworfen, um den N-terminalen Überhang zu entfernen und durch Einfügen einer *NdeI*-Schnittstelle gleichzeitig das alternative Startcodon GTG durch das von *E. coli* präferierte ATG-Startcodon zu ersetzen. Dies führte zum Austausch V81M am N-Terminus der verkürzten Variante N'-short-CYP102K1 (Abbildung 3.33).

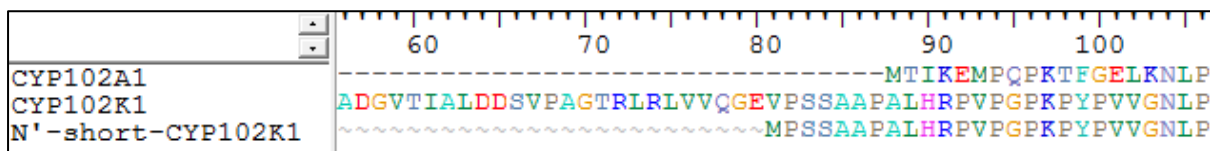


Abbildung 3.33: Sequenzausschnitt des N-terminalen Überhangs von CYP102K1 und der N-Termini von P450_{BM3} (CYP102A1) sowie der verkürzten Variante N'-short-CYP102K1.

Zur Klonierung des Genfragmentes N'-short-*cyp102k1* wurde nach der PCR mit pET28a_*cyp102k1* als parentale DNA und dem T7-Rückwärtsprimer das PCR-Produkt mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut und anschließend in das entsprechend geschnittene Plasmid pET28a(+) ligiert. Der resultierende Vektor pET28a_N'-short-*cyp102k1* wurde in *E. coli* C43 (DE3) eingebracht und die Expression des codierten Enzyms N'-short-CYP102K1 untersucht (siehe Abschnitt 2.2.14.1). Dabei wurden die gleichen optimalen Expressionsbedingungen wie für das Volllängenenzym verwendet (TB-Medium, 0,2 mM IPTG, 30 °C). Das zugehörige SDS-Gel der Expression im 500 mL-Maßstab ist in Abbildung 3.34 wiedergegeben. Es zeigt für die 23 h-Probe der löslichen Fraktion sowie die 4 und 23 h-Proben der Pelletfraktion intensive Banden für N'-short-CYP102K1 auf einer Höhe von ca. 120 kDa. Dies entsprach bezüglich des Molekulargewichts den Erwartungen (Molekulargewicht von N'-short-CYP102K1: 117,5 kDa).

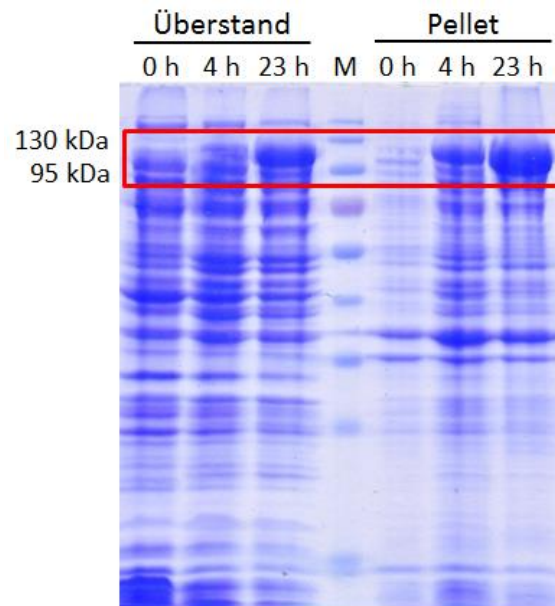


Abbildung 3.34: SDS-Gel zur Analyse der Expression von N'-short-CYP102K1 in *E. coli* C43 (DE3) pET28a_N'-short-cyp102k1 bei 30 °C in Abhängigkeit von der Zeit ($OD_{\text{start}} = 0,2$; induziert mit 0,2 mM IPTG bei $OD = 1$). Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Die restlichen Zellen wurden für eine Aufreinigung von N'-short-CYP102K1 mittels IMAC genutzt. Dazu wurden sie aufgeschlossen und der zellfreie Extrakt auf eine HisTrap™ HP-Säule geladen. Diese wurde zuvor mit Lysepuffer I äquilibriert und nach der Probenbeladung mit dem gleichen Puffer gewaschen, bevor der Gradient mit Elutionspuffer I gestartet wurde. Nach der Beladung war eine deutliche Braunfärbung der Säule zu beobachten, genau wie in den Zielprotein-haltigen Fraktionen. Die Elution von N'-short-CYP102K1 begann bereits bei etwa 30 mM Imidazol, der entsprechende Peak ist im Chromatogramm (Abbildung 7.20) eindeutig zu erkennen. Dass das Enzym im Vergleich zu CYP102K1 bei einer deutlich geringeren Imidazolkonzentration eluierte, weist darauf hin, dass es in diesem Fall eher schwach an die Säule band. Die Zielprotein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach der Aufkonzentrierung durch langsame Reduktion der Imidazolkonzentration schonend umgepuffert. Im Anschluss wurden das Konzentrat und der zur Aufreinigung genutzte zellfreie Extrakt anhand verschiedener Methoden analysiert. Mittels SDS-PAGE wurde die Aufreinigung überprüft und die Reinheit des N'-short-CYP102K1-haltigen Konzentrats auf etwa 90 % geschätzt (Abbildung 3.35). Dies stellt keinen Unterschied zur CYP102K1-Aufreinigung dar. Zudem fällt auf, dass signifikante Mengen des Proteins im Durchfluss der Aufkonzentrierung nachgewiesen wurden. Offensichtlich war die gewählte Porengröße des Zentrifugalfilters (MWCO: 100 kDa) ungeeignet. Des Weiteren wurden die Gesamtprotein- und P450-Konzentration sowie Elektronentransferaktivität von N'-short-CYP102K1 im CFE und Konzentrat bestimmt (siehe auch Abschnitt 3.2.2.1), um den N'-short-CYP102K1-Anteil am Gesamtprotein und Ausbeuten zu ermitteln (Tabelle 3.8). Das Erste, was

auffällt, ist die im Vergleich zur CYP102K1-Aufreinigung deutlich höhere Gesamtproteinkonzentration in CFE sowie im Konzentrat. Der Gehalt an aktiver P450 ist ebenso in beiden Fällen geringer (ca. 16 % bzw. 76 %), obwohl für das Konzentrat die gleiche Reinheit wie für das CYP102K1-Konzentrat abgeschätzt wurde. Dagegen wurde im Vergleich zu CYP102K1 eine höhere Elektronentransferaktivität im CFE ermittelt. Dazu muss erwähnt werden, dass zur Bestimmung der Elektronentransferaktivität für CYP102K1 in der Regel 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) verwendet wurde, da noch kein optimaler pH-Wert bekannt war. Für N'-short-CYP102K1 wurde hingegen mit dem optimierten 20 mM KP_i -Puffer (pH 6,5) gearbeitet. Somit sind diese Werte nicht einwandfrei miteinander vergleichbar. Es wurde außerdem festgestellt, dass die Verluste im Vergleich zur CYP102K1-Aufreinigung höher und die Ausbeuten dadurch geringer ausfielen. Demnach konnten etwa 59 mg aktive N'-short-CYP102K1 aus einem Liter Kultur isoliert werden, was im Vergleich zur CYP102K1-Ausbeute ca. 10 % weniger sind.

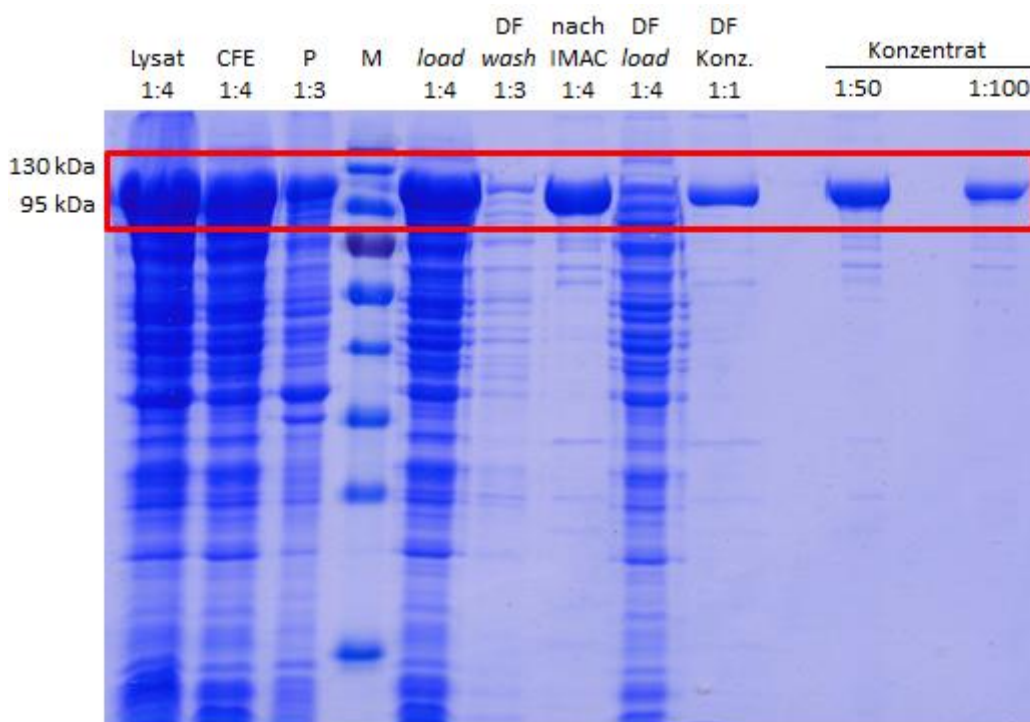


Abbildung 3.35: SDS-Gel zur Analyse der Aufreinigung von N'-short-CYP102K1. Die rot markierten Bereiche geben die Höhe des Zielproteins an. Untersucht wurden das Lysat, der CFE, das Pellet nach Aufschluss (P), die geladene Probe (*load*), der Durchfluss beim Waschvorgang (*DF wash*), die aufgereinigte P450 (nach IMAC), der Durchfluss bei Beladen der Säule mit dem CFE (*DF load*), der Durchfluss bei der Aufkonzentrierung, sowie das finale Konzentrat in verschiedenen Verdünnungen. M: Proteinmarker "PageRuler Prestained Protein Ladder" von Fermentas.

Tabelle 3.8: Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Analysen von N'-short-CYP102K1-CFE und -Konzentrat der durchgeführten Aufreinigung.

	CFE ^{a)}	Konzentrat ^{b)}
Analysiertes Parameter		
Gesamtproteingehalt [mg]	432	39,1
Gesamtmenge an aktiver P450 [mg]	68,3	29,6
Gehalt aktive P450 [%] ^{c)}	15,7	75,7
Aufreinigungsfaktor (P450-Gehalt)		4,8
Gesamtelektronentransferaktivität [U]	3.080	915
Spez. Elektronentransferaktivität [U/mg Protein] ^{c)}	7,9	23,4
Aufreinigungsfaktor (Elektronentransferaktivität)		3
Ausbeuten		
Ausbeute aktive P450 [%]	-	43,8
Ausbeute Elektronentransferaktivität [%]	-	29,7

a) Bei Gesamtangaben bezogen auf 32,5 mL CFE

b) Bei Gesamtangaben bezogen auf 3,8 mL Konzentrat

c) Bezogen auf Gesamtproteingehalt

N'-short-CYP102K1-Hämdomäne

Es sollte ebenfalls eine verkürzte Version des Hämdomänenengens hergestellt werden, um eine mögliche Kristallisierung der Hämdomäne ohne den N-terminalen Überhang zu untersuchen. Dazu wurden für die PCR die gleichen Primer eingesetzt wie für das Vollhängen und pET42b_cyp102k1-hd diente als parentale DNA. Das PCR-Produkt wurde mit *NdeI* und *EcoRI* geschnitten und in den pET42b(+)-Vektor ligiert, der zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut worden war. Bei Expression mit dem resultierenden Plasmid pET42b_N'-short-cyp102k1-hd enthielt die verkürzte Hämdomäne somit keinen His-Tag. Der Vektor wurde anschließend den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt und nach Japan geschickt.

3.2.2 Charakterisierung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

3.2.2.1 CO-Differenzspektrum, Cofaktorpräferenz und Elektronentransferaktivität

Es wurden zunächst CO-Differenzspektren aufgenommen, um zu überprüfen, ob die Hämdomäne von CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 korrekt gefaltet und aktiv war (Abbildung 3.36). Darüber hinaus konnte auf diese Weise ebenfalls die Cytochrom P450 Monooxygenase-Konzentration bestimmt werden.

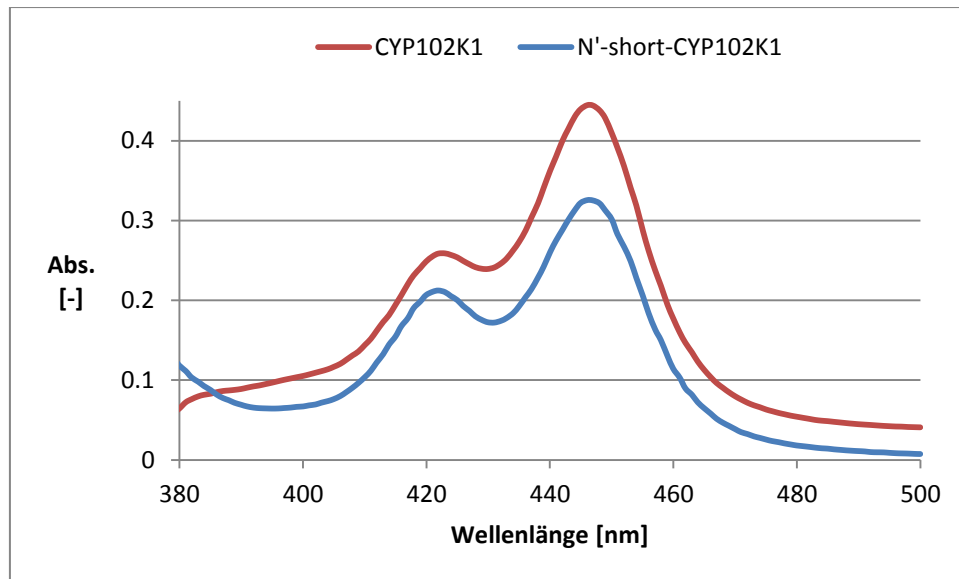


Abbildung 3.36: CO-Differenzspektrum von reduzierter CYP102K1 (Rot) und N'-short-CYP102K1 (Blau).

Es wird deutlich, dass die Hämdomäne beider Varianten überwiegend intakt war und es sich folglich sowohl bei CYP102K1 als auch bei N'-short-CYP102K1 um aktive Cytochrom P450 Monooxygenasen handelt, da die Proteine nach Begasung mit CO jeweils den charakteristischen Peak bei ca. 450 nm aufweisen. Allerdings scheint in beiden Fällen nicht die komplette Probe aus aktivem Enzym zu bestehen, da ebenfalls ein kleinerer Peak bei 420 nm verbleibt. Demnach war das Häm teils nicht für das CO zugänglich, was auf eine Fehlfaltung der Enzyme hinweist (Martinis et al., 1996).

Im nächsten Schritt wurden die Cofaktorpräferenz sowie die Elektronentransferaktivität der FMN- und FAD-haltigen Cytochrom P450 Reduktasedomäne (CPR) von CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 untersucht. Dazu wurde zunächst ein Cytochrom c-Assay mit CYP102K1 durchgeführt und es wurden NADH und NADPH als Cofaktoren getestet. Dabei war vorerst unklar, ob dieser Assay überhaupt mit dem Enzym funktionieren würde, da die Elektronen von der Reduktasedomäne grundsätzlich auch auf das Häm des Enzyms übertragen werden könnten anstatt auf Cytochrom c. Allerdings konnte eindeutig eine Cytochrom c-Reduktion detektiert werden, was wiederum bedeutet, dass definitiv Elektronen von der CPR auf Cytochrom c übertragen wurden. Anhand der spezifischen Elektronentransferaktivität, 24,9 U/mg mit NADPH und 1,5 U/mg mit NADH, konnte eindeutig NADPH als der präferierte Cofaktor identifiziert werden. Für N'-short-CYP102K1 wurde daher nur NADPH als Cofaktor getestet und die ermittelte spezifische Elektronentransferaktivität von 23,4 U/mg entspricht fast dem Aktivitätswert für CYP102K1.

3.2.2.2 Untersuchung des Substratspektrums

Um das Substratspektrum der Cytochrom P450 Monooxygenase zu untersuchen, wurden zunächst verschiedenste Stoffe unterschiedlicher Substanzklassen in Biokatalysen zusammen mit CYP102K1 oder CYP102K1-haltigem CFE getestet. Dabei wurden verschiedene offenkettige Alkane bzw. Alkene

(n-Hexan, n-Decan, 1-Decen, 1-Pentadecen, 1-Heptadecen), zyklische Alkene (Cyclohexan und Cyclohexen) sowie Styrol und Diethylbenzen eingesetzt. Aus der Gruppe der Terpene und Norisoprenoide wurden α - und β -Jonon, 7,8-Dihydro- α -jonon, α -Isomethyljonon, α -Jonol, α -Pinen, (*R*)-(+)-Limonen, (*S*)-(-)-Limonen und (+)-Valencen verwendet. Es wurden außerdem die Fettsäuren Hexan- und Hexadecansäure, das Steroid Progesteron sowie weitere diverse Substanzen (Ethanolamin, 7-Ethoxycoumarin, Indol, β -Carotin, Melatonin sowie Methylphenylsulfid) getestet. Allerdings konnte nur für β -Jonon Produktbildung mit einem recht geringen Umsatz von unter 10 % nachgewiesen werden. Dabei wies das Produkt in der in Abbildung 3.37 dargestellten gaschromatographischen Analyse mit 17,6 min exakt die gleiche Retentionszeit auf wie 3-Hydroxy- β -jonon, das Hauptprodukt der CYP154H1-Reaktion mit β -Jonon als Substrat (Abbildung 3.20).

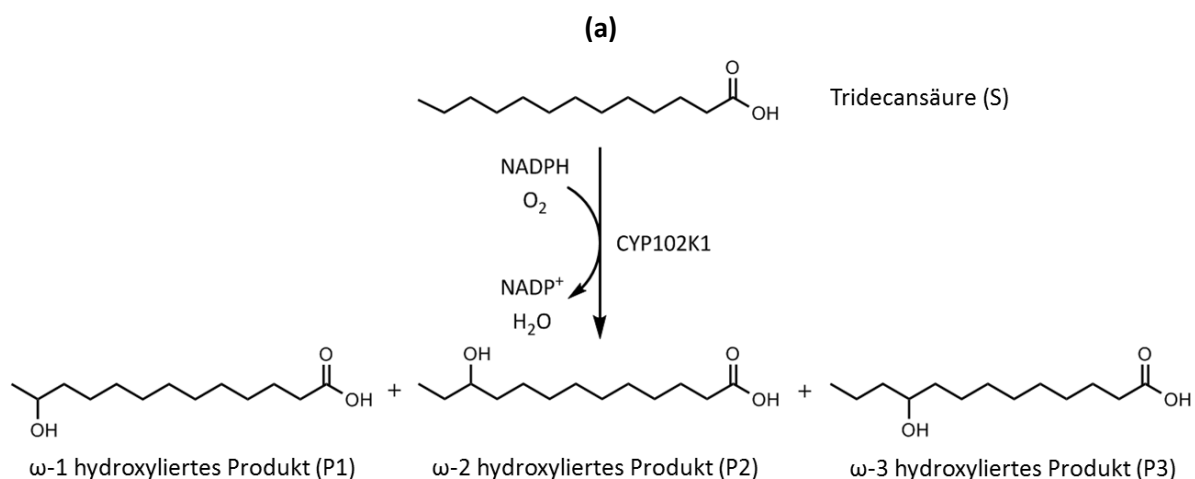


Abbildung 3.37: Gaschromatographische Analyse des Umsatzes vom Substrat β -Jonon (S) durch CYP102K1 (pink) im Vergleich zur Negativkontrolle ohne CYP102K1 (schwarz) und zum β -Jonon-Umsatz durch CYP154H1 (blau). Der Substratpeak ist rot-umrandet, der Produktpeak (P) ist grün-umrandet. Verwendete GC-Methode: Methode 1 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Produkt der β -Jononumsetzung mit CYP102K1 um eben jenes 3-Hydroxy- β -jonon handelt. Allerdings wurden keine weiteren Untersuchungen zur genauen Produktbestimmung durchgeführt. Im Anschluss wurden Versuche unternommen, den Umsatz durch Variation der Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert bzw. Pufferart und Substratkonzentration) zu optimieren. Allerdings konnten keine Bedingungen identifiziert werden, die zu einem deutlich höheren Umsatz geführt hätten. Somit war auch eine genauere Untersuchung des gebildeten Produktes kaum möglich.

Um noch weitere geeignete Substrate für CYP102K1 zu identifizieren, wurde ein Substratscreening am Institut für Biochemie II an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nach der von von Bühler et al. (2013) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 57 verschiedene Substanzen auf Umsatz getestet und mittels GC- bzw. LC-MS analysiert. Dabei wurde für alle in Düsseldorf durchgeführten Versuche ein 100 mM KPi -Puffer, pH 7,5, und 10 U/mL Glucosedehydrogenase IV aus *Bacillus megaterium* (Eigenproduktion des Instituts für Biochemie II) sowie eine Reaktionstemperatur von 25 °C verwendet. Auf diese Weise konnten zwei weitere Substrate identifiziert werden, die zweifelsfrei umgesetzt wurden: Tridecansäure und Tetradecansäure. Wie Abbildung 3.38 am Beispiel vom Umsatz von Tridecansäure zeigt, konnten in beiden Fällen drei hydroxylierte Produkte detektiert werden, wobei die Hydroxylierung laut den GC-MS-Daten jeweils an der ω -1-, ω -2- und ω -3-Position der entsprechenden Fettsäure stattfand (Abbildung 7.22 im Anhang). Das an ω -3-Position hydroxylierte Produkt machte dabei jeweils den geringsten Anteil an der Produktbildung aus. Da in beiden Fällen noch hohe Restsubstratmengen detektiert wurden, war der Umsatz bei den gegebenen Bedingungen noch recht gering. Für weitere untersuchte gesättigte Fettsäuren (Kettenlänge: C_9 bis C_{16}) konnte bei den gegebenen Bedingungen gar kein Umsatz nachgewiesen werden.

Um die Reaktionsbedingungen der Biokatalyse mit CYP102K1 zu optimieren, wurden im Anschluss an die Durchmusterung der Substratbibliothek mit dem Substrat Tridecansäure weitere Experimente zur Bestimmung optimaler Puffer-, pH-, Temperatur- und Durchmischungsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Biokatalysen in allen Fällen mittels GC analysiert.



(b)



Abbildung 3.38: GC-MS-Analyse (in Düsseldorf) des in (a) gezeigten Umsatzes von Tridecansäure durch CYP102K1. (b): Im Gaschromatogramm sind in der Probe (schwarz) im Vergleich zur Negativkontrolle ohne CYP102K1 (pink) drei Produktpeaks erkennbar (S: Substrat (rot-umrandet), P: Produkt (grün-umrandet)).
Reaktionsbedingungen der Biokatalyse: 2 μM CYP102K1, 0,2 mM Tridecansäure, 0,1 mM NADP^+ , 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH IV (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP^+ pro Minute bei pH 7,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 100 mM KP_i -Puffer (pH 7,5), 25 °C, 17 h, ohne Durchmischung.

3.2.2.3 Einfluss des Puffers und pH-Wertes

Um das pH-Optimum von CYP102K1 zu bestimmen, wurden Biokatalysen in verschiedenen Puffern mit variierenden pH-Werten durchgeführt. Da sich bei dem Substratscreening in Düsseldorf Tridecansäure als geeignetes Substrat herausstellte, wurde dieses Substrat zur weiteren Charakterisierung des Enzyms genutzt. Zunächst wurde getestet, welches Puffersalz sich für die Biokatalysen mit CYP102K1 am besten eignet, wobei unterschiedliche organische und anorganische Puffer (je 100 mM) im pH-Bereich von 5,5 – 8,5 eingesetzt wurden. Wie aus Abbildung 3.39 ersichtlich wird, konnten bei Verwendung von MOPS-Puffer, pH 7,0, sowie Natrium- bzw. Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, innerhalb von 18 h 0,2 mM Tridecansäure vollständig umgesetzt werden. Dabei wird deutlich, dass weniger das verwendete Puffersalz als vielmehr der pH-Wert des Puffers eine zentrale Rolle für die Aktivität der CYP102K1 spielen.

Allerdings geht aus Abbildung 3.39 nicht hervor, welche Zeit tatsächlich notwendig ist, um 100% Umsatz zu erreichen. Deshalb wurde ein zusätzlicher Test durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf des Umsatzes besser nachvollziehen zu können. Der Einfachheit halber wurde der Versuch lediglich mit 100 mM MOPS-Puffer, pH 7,0, durchgeführt. Dieses Experiment zeigte, dass etwa 50 % des Substrates (0,2 mM) bereits zwei Minuten nach Reaktionsbeginn umgesetzt wurden, nach einer Stunde waren 80 % umgesetzt und nach drei Stunden 90 % (Abbildung 3.40). Daher wurde die Reaktionsdauer für alle folgenden Biokatalysen zur Charakterisierung der CYP102K1 auf maximal drei Stunden reduziert. Des Weiteren wurde ebenfalls der Einfluss der Pufferkonzentration auf die

Aktivität des Enzyms untersucht. Dazu wurden die Biokatalysen in MOPS-Puffern (pH 7,0) verschiedener Konzentrationen (1 – 100 mM) durchgeführt. Dabei konnten allerdings kaum Unterschiede festgestellt werden, sodass die Pufferkonzentration offenbar keine entscheidende Rolle spielt.

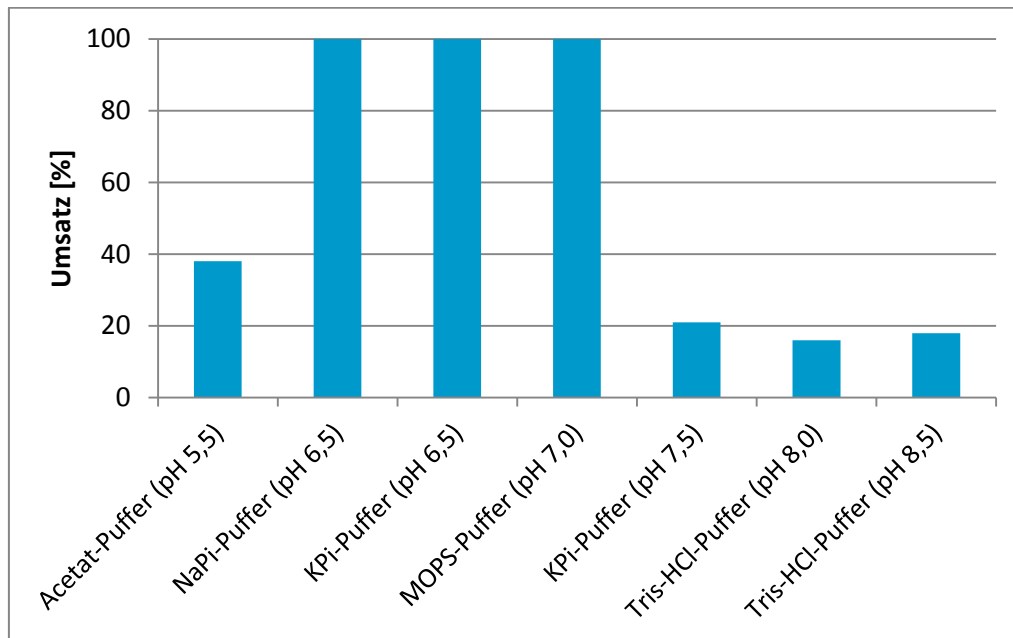


Abbildung 3.39: Umsatz von Tridecansäure mit CYP102K1 in verschiedenen Puffern. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 2 μM CYP102K1, 0,2 mM Tridecansäure, 0,2 mM NADPH, 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH IV (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP^+ pro Minute bei pH 7,0 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, verschiedene 100 mM Puffer, 26 °C, 18 h, ohne Durchmischung.

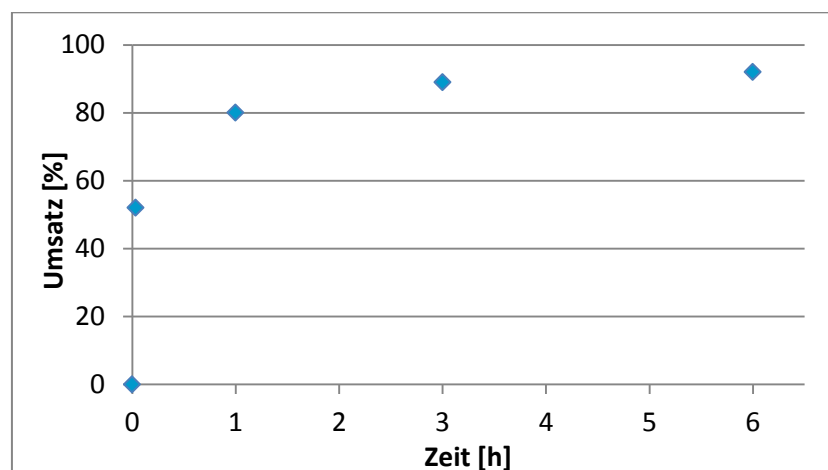


Abbildung 3.40: Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von Tridecansäure mit CYP102K1. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 2 μM CYP102K1, 0,2 mM Tridecansäure, 0,2 mM NADPH, 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH IV (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP^+ pro Minute bei pH 7,0 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 100 mM MOPS-Puffer, 26 °C, 18 h, ohne Durchmischung.

Da die verwendete Pufferkonzentration keinen erkennbaren Einfluss auf die Aktivität der CYP102K1 ausübt, wurde anschließend standardmäßig eine Pufferkonzentration von 20 mM verwendet, um ausreichend Pufferkapazität für die Bildung des Coproduktes Glucono- δ -lacton während der Cofaktorregenerierung zu gewährleisten (Albin et al., 1987; Strecker, 1955). Um nun noch das pH-Optimum des Enzyms genauer zu bestimmen wurden weitere Biokatalysen in verschiedenen KPi - und MOPS-Puffern im pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 durchgeführt. Wie in Abbildung 3.41 zu erkennen ist, weist CYP102K1 unter den gegebenen Reaktionsbedingungen die höchste Aktivität im leicht sauren pH-Bereich bei pH 6,0 – 6,5 auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kaliumphosphat- und MOPS-Puffer ist dabei wiederum nicht erkennbar. Für alle weiteren Versuche mit CYP102K1 wurde anschließend der 20 mM KPi -Puffer bei pH 6,5 verwendet, um nicht zu nah am isoelektrischen Punkt des Enzyms ($pI = 6,1$) zu arbeiten.

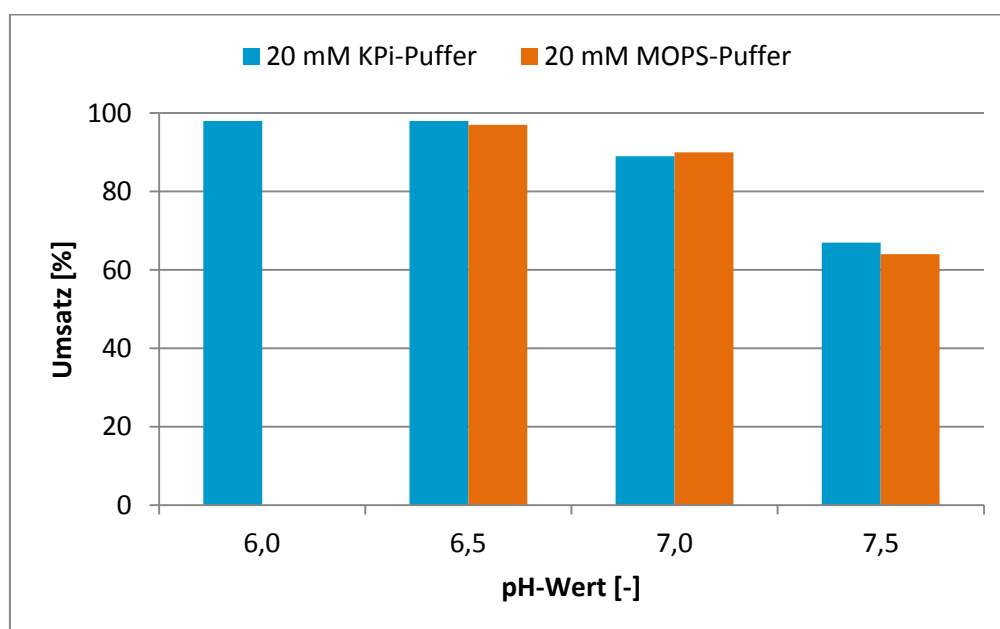


Abbildung 3.41: Umsatz von Tridecansäure mit CYP102K1 in verschiedenen MOPS- und KPi -Puffern. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 2 μM CYP102K1, 0,2 mM Tridecansäure, 0,2 mM NADPH, 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH IV (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP^+ pro Minute bei pH 7,0 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, verschiedene 20 mM Puffer, 20 °C, 3 h, ohne Durchmischung.

Zur Bestimmung des pH-Optimums von N'-short-CYP102K1 wurden ebenfalls verschiedene organische und anorganische Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten bei einer Pufferkonzentration von 20 mM getestet. Um einen direkten Vergleich mit CYP102K1 zu ermöglichen, wurden parallel ebenfalls Reaktionen mit CYP102K1 durchgeführt. Dabei wurden für dieses Experiment andere Reaktionsbedingungen verwendet als bei der vorherigen Bestimmung des pH-Optimums von CYP102K1. In Abbildung 3.42 ist die relative Aktivität der beiden Varianten gegen den pH-Wert

aufgetragen und es wird deutlich, dass beide Varianten prinzipiell das gleiche pH-Profil aufweisen. Signifikante Unterschiede sind nur im alkalischen Milieu (pH 8,0 und 8,5) sowie bei pH 5,0 festzustellen, wo N'-short-CYP102K1 jeweils eine höhere Aktivität aufweist. Interessanterweise weist CYP102K1 in diesem Versuch bei pH 7,0 eine gleich hohe Aktivität wie für pH 6,5 auf, obwohl der in Abbildung 3.41 gezeigte Umsatz für pH 7,0 noch etwa 10 % niedriger als für pH 6,5 ausfällt. Überraschend ist dagegen die Tatsache, dass CYP102K1 nun ebenfalls bei pH 5,5 eine deutlich höhere Aktivität zeigt, als noch in Abbildung 3.40 wiedergegeben. Dies könnte auf eine Limitierung durch die Cofaktorregenerierung zurück zu führen sein, da für die in Abbildung 3.40 dargestellten Reaktionen eine andere GDH (GDH IV) eingesetzt worden war. Es ist daher möglich, dass diese trotz Einsatzes von theoretisch 10 U/mL (für pH 7,5) bei pH 5,5 nicht ausreichend aktiv war. Für die hier verwendete GDH wurde vor der Biokatalyse sichergestellt, dass das Enzym auch bei pH 5,5 aktiv war. Da die Aktivität bei diesem pH-Wert etwa zehn Mal niedriger war als bei pH 6,5, wurden 10 U/mL statt der üblichen 1 U/mL eingesetzt.

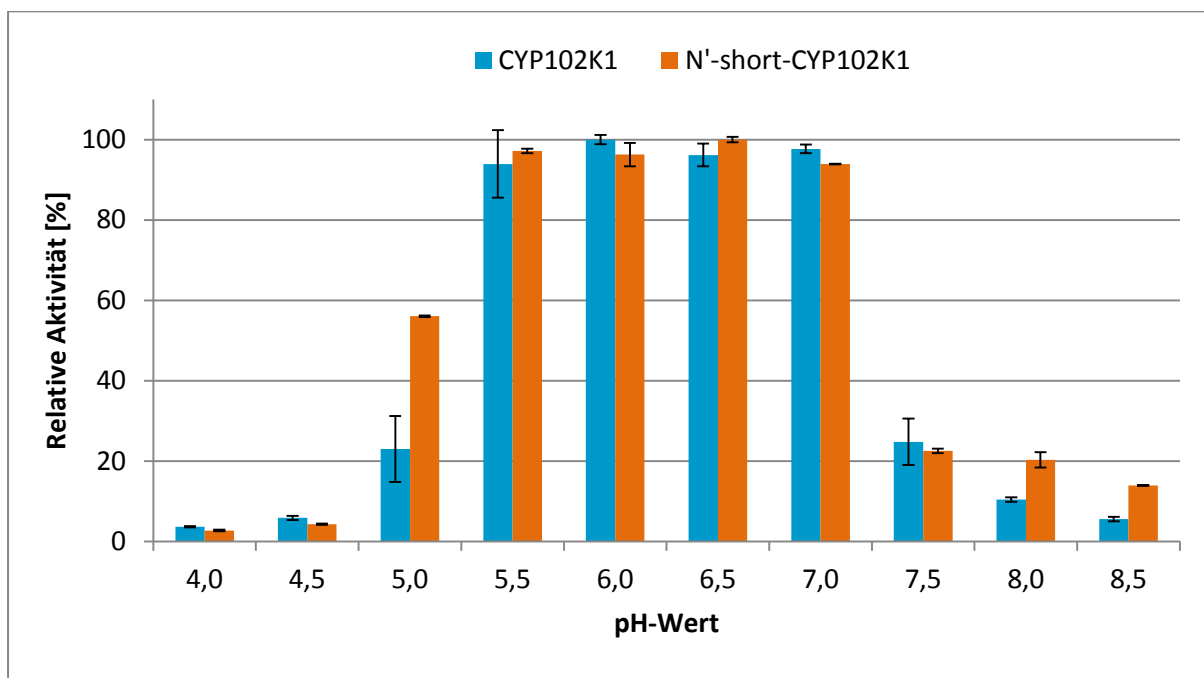


Abbildung 3.42: Relative Aktivität von CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 bei verschiedenen pH-Werten. Zur Berechnung der relativen Aktivität wurde der jeweils höchste Umsatz beider Varianten (je 81 ± 1 % für N'-short-CYP102K1 bei pH 6,5 und für CYP102K1 bei pH 7,0) als 100 % gesetzt und die restlichen Umsätze entsprechend angepasst. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die dargestellte Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen. Reaktionsbedingungen: 1 μ M CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1, 0,5 mM Tridecansäure, 0,05 mM bzw. 5 mM (nur pH 4,0 – 5,0) NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL (pH 6,5 – 8,5) bzw. 10 U/mL (pH 5,5 – 6,0) GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, verschiedene 20 mM Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten, 20 °C, 1 h, 500 rpm.

Abschließend kann somit festgehalten werden, dass beide Enzyme ein sehr ähnliches pH-Profil aufweisen und sich das pH-Optimum jeweils im schwach sauren bis neutralen Bereich befindet.

3.2.2.4 Einfluss der Temperatur und Thermostabilität

Um herauszufinden, bei welcher Temperatur die Varianten CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 den höchsten Umsatz erzielen, wurden Biokatalysen bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, die Reaktionen für jeweils 1 h inkubiert und anschließend mittels GC analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.43 dargestellt.

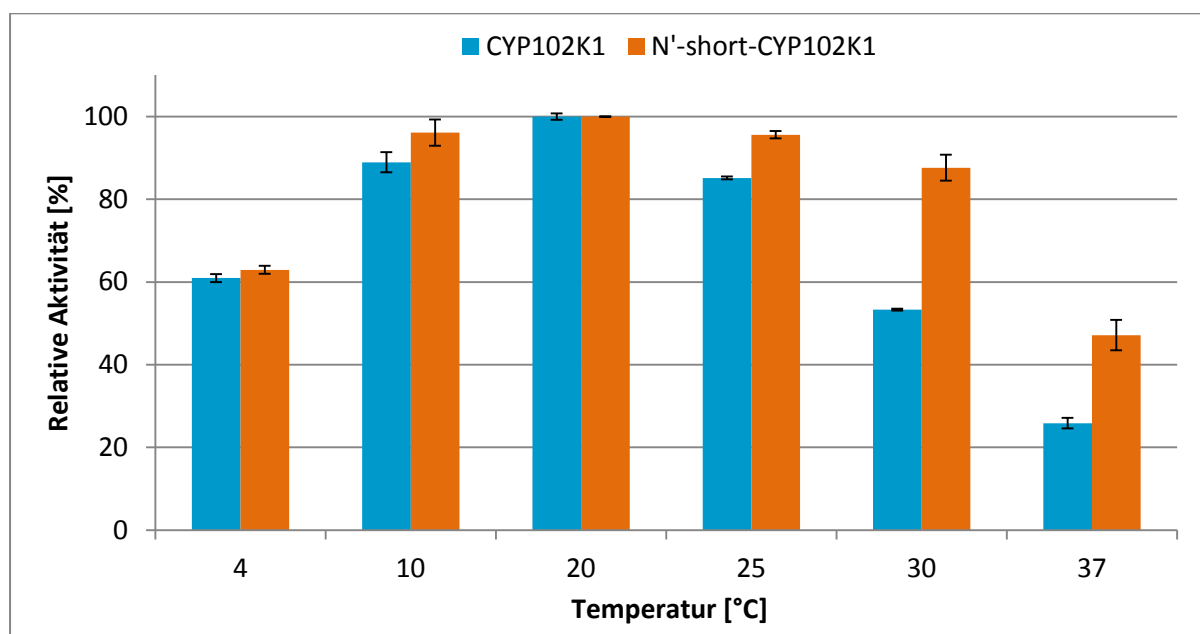


Abbildung 3.43: Relative Aktivität von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 bei verschiedenen Temperaturen. Zur Berechnung der relativen Aktivität wurde der jeweils höchste Umsatz beider Varianten (86 ± 1 % für CYP102K1 und 81 ± 1 % für N'-short-CYP102K1 bei jeweils 20 °C) als 100 % gesetzt und die restlichen Umsätze entsprechend angepasst. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die dargestellte Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen. Reaktionsbedingungen: 1 μ M N'-short-CYP102K1 bzw. CYP102K1, 0,5 mM Tridecansäure, 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL bzw. 10 U/mL (nur bei 4 °C und 10 °C) GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP^+ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, KP_i -Puffer (pH 6,5), verschiedene Temperaturen, 1 h, 500 rpm.

Aus Abbildung 3.43 geht hervor, dass sowohl N'-short-CYP102K1 als auch CYP102K1 über einen weiten Temperaturbereich von 4 °C bis 37 °C aktiv sind. Bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C fand dagegen kein nachweisbarer Umsatz mehr statt (nur für CYP102K1 getestet). Es ist weiterhin festzustellen, dass beide Varianten ein Temperaturoptimum von 20 °C aufweisen. Bei Temperaturen oberhalb von 25 °C (CYP102K1) bzw. 30 °C (N'-short-CYP102K1) und unterhalb von 10 °C ist zudem ein deutlicher Aktivitätsverlust erkennbar. Es ist zudem ersichtlich, dass CYP102K1 bei Temperaturen

über 20 °C offenbar niedrigere Umsätze erzielt als N'-short-CYP102K1. Insbesondere bei 30 °C und 37 °C sind deutliche Unterschiede zwischen beiden Varianten zu erkennen.

Aufgrund der gewonnen Erkenntnisse wurde für alle weiteren Experimente standardmäßig eine Reaktionstemperatur von 20 °C gewählt.

Um Aussagen über den T_{50} -Wert von CYP102K1 treffen zu können, wurde das Enzym für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend in Biokatalysen bei 20 °C eingesetzt. Mit einem ersten Test, für den das Enzym in 10 °C-Schritten in einem Temperaturbereich von 20 °C – 80 °C inkubiert wurde, konnte gezeigt werden, dass das Enzym zwischen 40 °C – 50 °C denaturiert. Die gesamte Enzymaktivität ging durch Inkubation bei Temperaturen von ≥ 60 °C verloren, während bei Temperaturen unter 40 °C kein signifikanter Aktivitätsverlust erkennbar war. Um ein detaillierteres Denaturierungsprofil zu erhalten, wurde das Experiment wiederholt, wobei das Enzym diesmal in einer Doppelbestimmung bei Temperaturen zwischen 40 °C – 55 °C inkubiert wurde. Für die Auswertung wurde die Restaktivität nach Inkubation gegen die Temperatur aufgetragen, wie in Abbildung 3.44 gezeigt. Somit konnte für CYP102K1 ein T_{50} -Wert von ca. 49 °C bestimmt werden. Dies entspricht dem Wert, der für CYP102A1 bei ähnlicher Versuchsdurchführung erhalten wurde (Eiben et al., 2007).

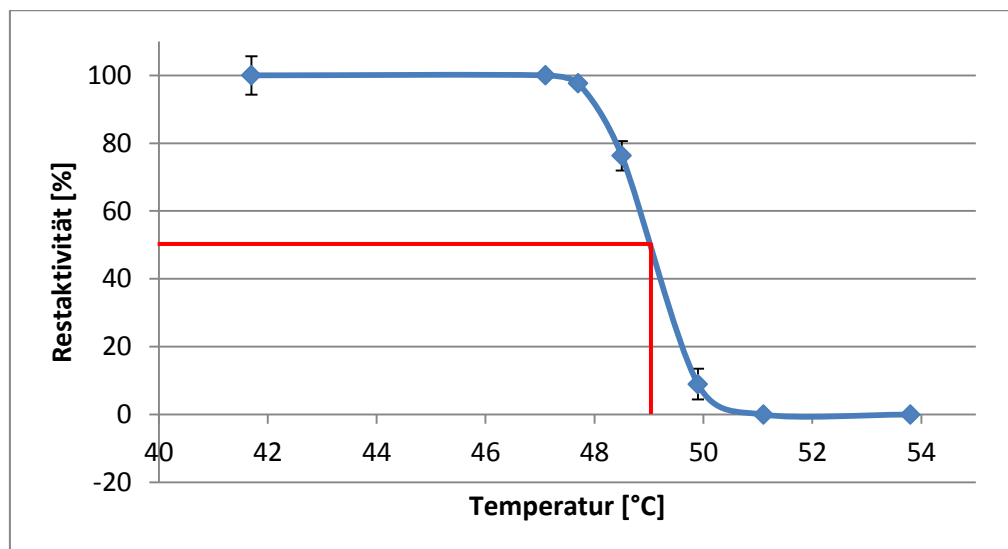


Abbildung 3.44: Über den Umsatz von Tridecansäure bestimmte Restaktivität von thermisch behandelter CYP102K1 zur Bestimmung des T_{50} -Werts. Die Restaktivität wurde auf Basis des Umsatzes bei der niedrigsten Inkubationstemperatur berechnet. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die dargestellte Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen. Reaktionsbedingungen: 2 μ M CYP102K1 (zuvor für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert), 0,5 mM Tridecansäure, 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 20 °C, 2 h, 500 rpm.

Um ebenfalls die Thermoresistenz von N'-short-CYP102K1 zu untersuchen und den entsprechenden T_{50} -Wert zu bestimmen, wurde das bereits für CYP102K1 beschriebene Experiment mit N'-short-CYP102K1 durchgeführt. Dabei wurde direkt ein engerer Temperaturbereich (ca. 46 °C – 52 °C) gewählt, zur Orientierung diente der T_{50} -Wert von CYP102K1. Wie in Abbildung 3.45 dargestellt, liegt der T_{50} -Wert von N'-short-CYP102K1 ebenso bei etwa 49 °C und unterscheidet sich somit nicht von dem T_{50} -Wert für CYP102K1.

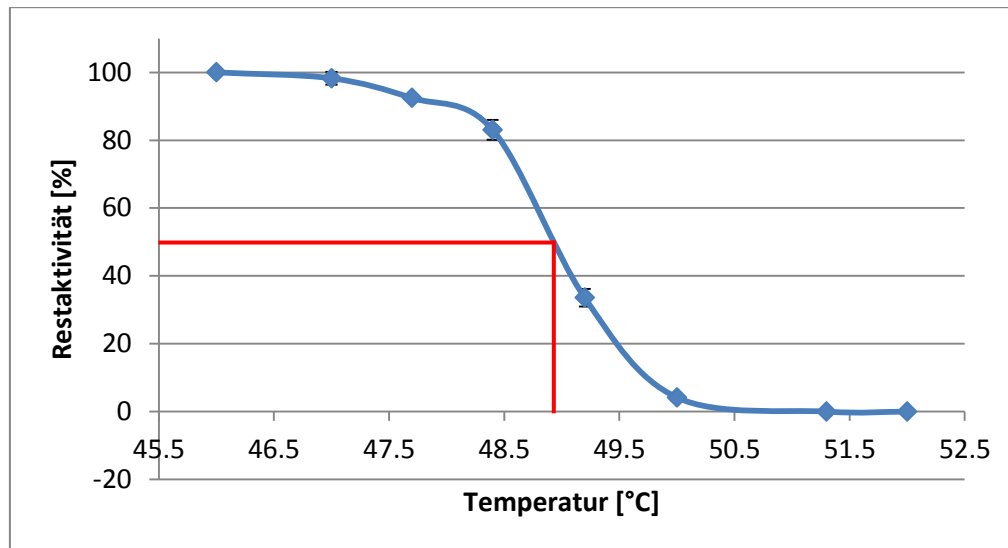


Abbildung 3.45: Über den Umsatz von Tridecansäure bestimmte Restaktivität von thermisch behandelter N'-short-CYP102K1 zur Bestimmung des T_{50} -Werts. Die Restaktivität wurde auf Basis des Umsatzes berechnet, der bei Verwendung von unbehandeltem Enzym erzielt wurde. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die dargestellte Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen. Reaktionsbedingungen: 2 μ M N'-short-CYP102K1 (zuvor für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert), 0,5 mM Tridecansäure, 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 20 °C, 2 h, 500 rpm.

3.2.2.5 Einfluss der Substratkonzentration und Durchmischung

Um die Biokatalysebedingungen weiter zu optimieren, wurde ebenfalls der Einfluss der Substratkonzentration und der Durchmischung untersucht. Prinzipiell gilt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Substratkonzentration bis zur Substratsättigung steigt. Mittellange Fettsäuren sind jedoch in wässrigen Medien schwer löslich und im Fall der Tridecansäure flockt das Substrat trotz Verwendung des Cosolvens DMSO bereits bei einer Konzentration von 1 mM aus, sodass es für das Enzym nicht mehr vollständig zugänglich ist. Dies hat zur Folge, dass der Umsatz der Fettsäure durch die CYP102K1 abnimmt, wie in Abbildung 3.46 dargestellt.

Ein Mittel, um den Umsatz eines teils ungelösten Substrats zu erhöhen, ist die Durchmischung des Reaktionsansatzes. Dabei werden Enzym und Substrat besser miteinander in Kontakt gebracht. Um

dies näher zu untersuchen, wurden zwei Testreihen mit verschiedenen Substratkonzentrationen und zwei unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten zur Durchmischung durchgeführt. Zudem wurden stets entsprechende Reaktionen ohne Durchmischung parallel laufen gelassen.

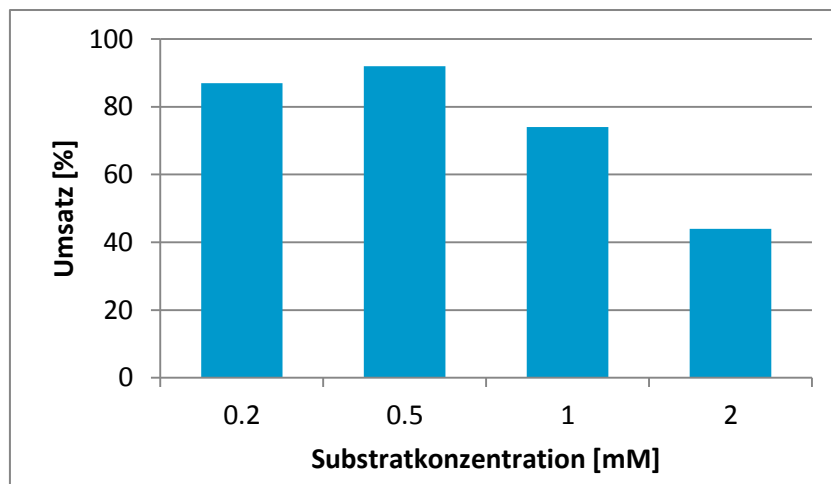
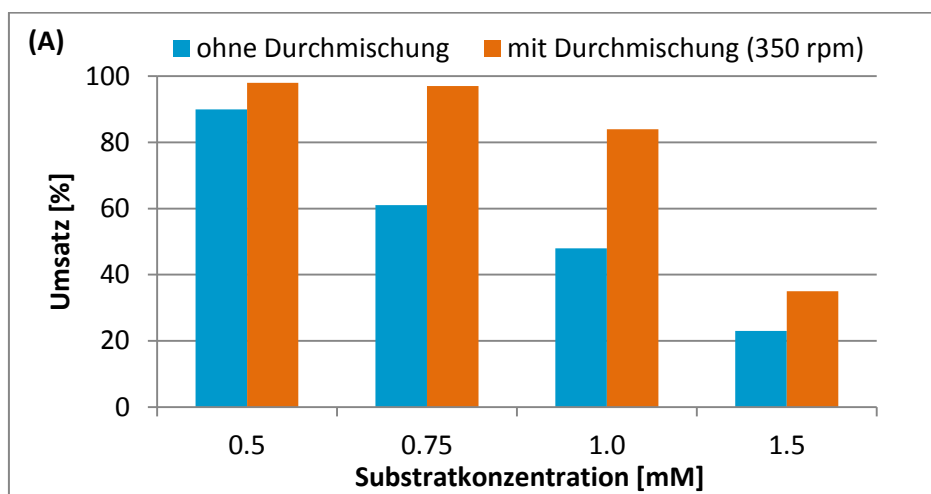


Abbildung 3.46: Umsatz von Tridecansäure mit CYP102K1 bei variierender Substratkonzentration. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 2 μM CYP102K1, verschiedene Tridecansäurekonzentrationen, 0,2 mM NADPH, 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH IV (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP⁺ pro Minute bei pH 7,0 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,0), 20 °C, 3 h, ohne Durchmischung.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.47 zeigen, dass sich der Umsatz im Konzentrationsbereich von 0,75 – 1,0 mM Tridecansäure bei leichter Durchmischung (350 rpm) erkennbar erhöhen ließ. Um den gleichen Effekt auch bei höheren Konzentrationen zu erreichen, ist dagegen eine stärkere Durchmischung (800 rpm) notwendig. Dabei ist aber die mechanische Beanspruchung des Enzyms zu berücksichtigen, die speziell bei längeren Inkubationszeiträumen zu einer Denaturierung des Enzyms führen kann. Die meisten folgenden Experimente wurden mit 0,5 mM Substrat und mittelstarker Durchmischung (500 rpm) durchgeführt, da bei diesen Bedingungen noch alles Substrat gelöst war.



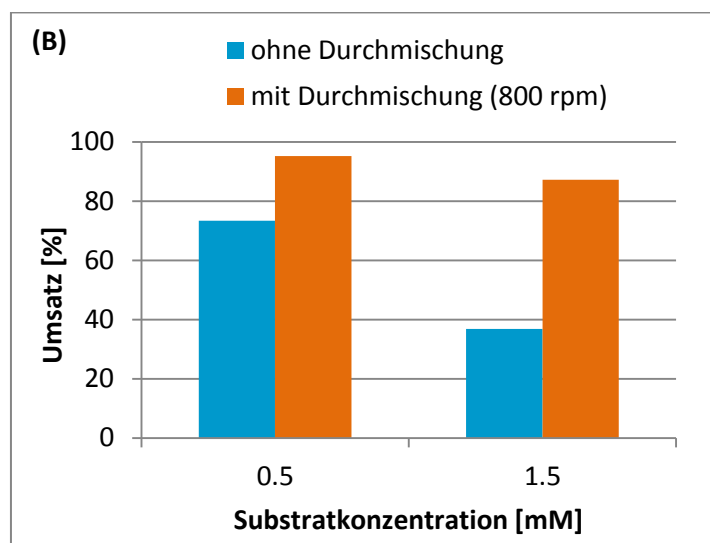


Abbildung 3.47: Umsatz von Tridecansäure mit CYP102K1 bei variierender Substratkonzentration, mit und ohne Durchmischung. (A) bei leichter Durchmischung (B) bei stärkerer Durchmischung. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 2 μM CYP102K1, verschiedene Substratkonzentrationen, 0,2 mM NADPH, 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH IV (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP⁺ pro Minute bei pH 7,0 (A) bzw. 6,5 (B) und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) (A) / 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5) (B), 20 °C, 3 h (A) / 2 h (B), mit (800 rpm) und ohne Durchmischung.

3.2.2.6 Überprüfung des Substratspektrums bei optimierten Reaktionsbedingungen

Nach Optimierung der Reaktionsparameter wurde das Substratspektrum von CYP102K1 erneut untersucht. Dabei wurden neben den bereits bekannten Fettsäuresubstraten weitere potentielle Substrate in Biokatalysen getestet, die bezüglich der Kettenlänge dem Substrat Tridecansäure ähnelten, sich allerdings jeweils in ihrer funktionellen Gruppe unterschieden. So wurden das Alkan Tetradecan, der Alkohol 1-Tridecanol, das Aldehyd Tridecanal, der Ester Methyltridecanoat und das Amin 1-Tridecanamin untersucht. Des Weiteren wurden erneut die Terpene und Norisoprenoide α - und β -Jonon, 7,8-Dihydro- α -jonon, α -Isomethyljonon, α -Jonol, α -Pinen, (R)-(+)-Limonen, (S)-(-)-Limonen und (+)-Valencen unter den optimierten Biokatalysebedingungen getestet und mittels GC(-MS) analysiert (siehe Abschnitt 2.5.2 und 0). Allerdings konnte nur für die Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zehn bis fünfzehn Kohlenstoffatomen, die ungesättigte Fettsäure 12-Tridecensäure sowie β -Jonon Produktbildung nachgewiesen werden (Abbildung 3.48). Zugehörige Chromatogramme und Massenspektren sind im Anhang (Abbildung 7.21 und Abbildung 7.23) zu finden.

Mit N'-short-CYP102K1 wurden dagegen lediglich Biokatalysen mit den Substraten durchgeführt, die auch von CYP102K1 akzeptiert werden. Anschließend wurden die entsprechenden Umsätze der verschiedenen Substrate mit beiden Varianten verglichen (Abbildung 3.48).

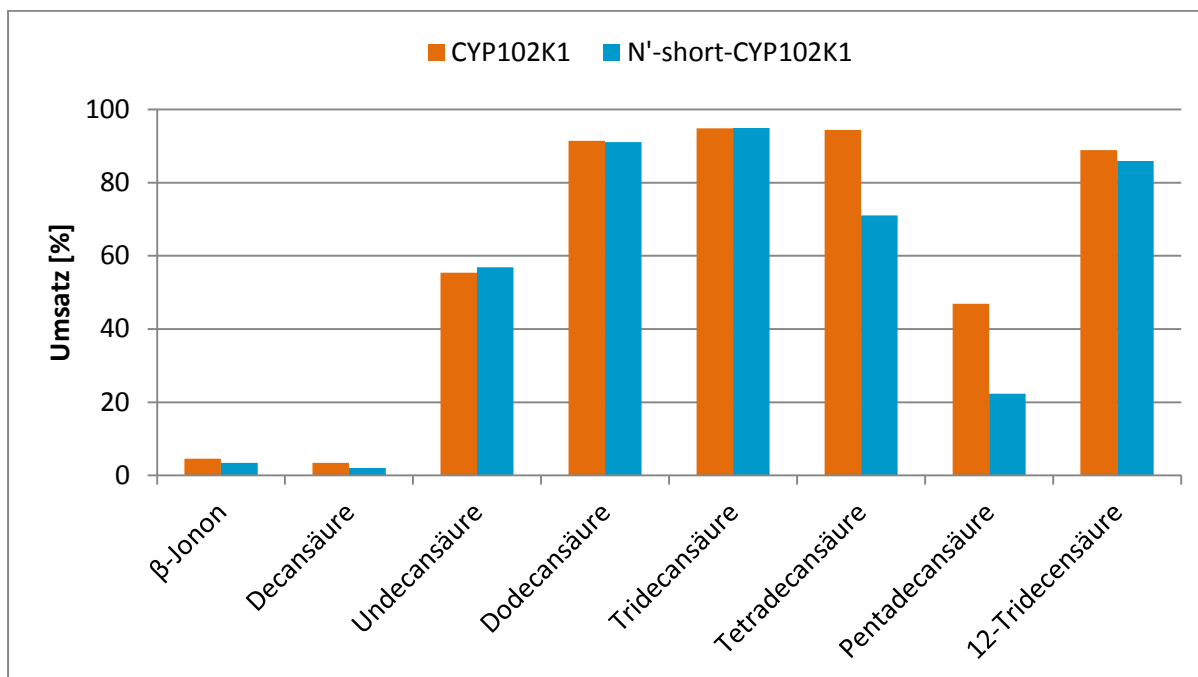


Abbildung 3.48: Vergleich der Umsätze der verschiedenen Substrate mit N'-short-CYP102K1 und CYP102K1. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 1 μ M CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1, 0,5 mM (Fettsäuren) bzw. 1,5 mM Substrat (β -Jonon), 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 20 °C, 2,3 h (Fettsäuren) bzw. 24 h (β -Jonon), 500 rpm.

Aus Abbildung 3.48 wird deutlich, dass Tridecansäure das von CYP102K1 bevorzugte Substrat mit höchstem Umsatz innerhalb der Reaktionszeit ist, gefolgt vom Umsatz von Dodecansäure und Tetradecansäure, die über nur ein Kohlenstoffatom weniger bzw. mehr verfügen. Steigt oder sinkt die Kettenlänge um ein weiteres Kohlenstoffatom, sinkt der Umsatz auf je ca. 50 %. Für Decansäure konnte nur noch eine minimale Produktbildung festgestellt werden. 12-Tridecensäure wurde ähnlich wie Tridecansäure nahezu vollständig in Produkt umgewandelt. Substrate mit entsprechender Kettenlänge, jedoch unterschiedlicher funktioneller Gruppe (Alkan, Alkohol, Amin, Aldehyd, Ester) wurden dagegen allesamt nicht umgesetzt. Somit scheint die Carboxylgruppe der Fettsäuren für die Bindung der Substrate entscheidend zu sein.

Im Vergleich zu den mit CYP102K1 erzielten Umsätzen fallen die Umsätze mit N'-short-CYP102K1 für die verschiedenen Substrate interessanterweise nicht völlig identisch aus. Im Fall von Tetra- und Pentadecansäure werden mit der verkürzten Variante deutlich geringere Umsätze erzielt als mit CYP102K1 (71 % im Vergleich zu 94 % für Tetradecansäure bzw. 22 % im Vergleich zu 47 % für Pentadecansäure).

Um Aussagen über die Regioselektivität der CYP102K1 und der N'-short-CYP102K1 treffen zu können, wurden die Peakflächen der einzelnen Produkte ins Verhältnis gesetzt (Tabelle 3.9). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Produktverteilung für beide Varianten sehr ähnlich ausfiel. Undecan- und Dodecansäure wurden jeweils in annähernd gleichem Verhältnis überwiegend an der ω -1- und ω -2-Position hydroxyliert, während bei Tridecansäure die ω -1-Position von beiden Varianten für die Hydroxylierung präferiert wurde. Dagegen wurde Tetradecansäure jeweils zu zwei Dritteln an der ω -2-Position hydroxyliert und bei Pentadecansäure wurden alle drei Produkte in nahezu gleichem Verhältnis gebildet, wobei N'-short-CYP102K1 eine leichte Präferenz für die ω -1-Position aufweist. Beim Umsatz von 12-Tridecensäure konnte nur ein Produkt (Hydroxylierung an der ω -2-Position) mit Sicherheit identifiziert werden. Bei der zugehörigen GC-MS-Datenanalyse waren noch andere Peaks zu erkennen, die im Substratstandard nicht zu beobachten waren. Allerdings konnte über das entsprechende Massenspektrum bzw. Fragmentierungsmuster keine eindeutige Struktur zugeordnet werden, sodass weder ausgeschlossen noch bestätigt werden kann, dass weitere Produkte gebildet wurden.

Tabelle 3.9: Übersicht über die von CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 gebildeten Produkte und deren prozentuale Verteilung in Biokatalysen mit verschiedenen Fettsäuren sowie β -Jonon unter optimierten Reaktionsbedingungen.

Substrat	CYP102K1			N'-short-CYP102K1		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
β -Jonon	3-Hydroxy- β -jonon	-	-	3-Hydroxy- β -jonon	-	-
Decansäure	ω -1 74 %	ω -2 15 %	ω -3 11 %	ω -1 68 %	ω -2 18 %	ω -3 14 %
Undecansäure	ω -1 51 %	ω -2 45 %	ω -3 4 %	ω -1 49 %	ω -2 42 %	ω -3 9 %
Dodecansäure	ω -1 44 %	ω -2 47 %	ω -3 9 %	ω -1 44 %	ω -2 47 %	ω -3 9 %
Tridecansäure	ω -1 50 %	ω -2 41 %	ω -3 9 %	ω -1 50 %	ω -2 41 %	ω -3 9 %
Tetradecansäure	ω -1 27 %	ω -2 63 %	ω -3 10 %	ω -1 28 %	ω -2 62 %	ω -3 10 %
Pentadecansäure	ω -1 35 %	ω -2 35 %	ω -3 30 %	ω -1 39 %	ω -2 31 %	ω -3 30 %
12-Tridecensäure	ω -2	-	-	ω -2	-	-

Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Reaktionsbedingungen: 1 μ M CYP102K1, verschiedene Substrate, 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 20 °C, unterschiedliche Reaktionszeiten, 500 rpm.

Um Umsatzraten der CYP102K1 und der N'-short-CYP102K1 für die am besten umgesetzten Substrate zu bestimmen, wurden Biokatalysen durchgeführt und zu einem definierten Zeitpunkt extrahiert (Tabelle 3.10). Die Quantifizierung der Umsätze und zugehörigen Umsatzraten erfolgte mit Hilfe von Standardkurven für die eingesetzten Substrate.

Tabelle 3.10: Umsätze und Umsatzraten von CYP102K1 für verschiedene Substrate. Die angegebene Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen. *Im Fall von Tetradecansäure stand beim Umsatz mit N'-short-CYP102K1 nur eine Reaktion zur Auswertung zur Verfügung, weshalb keine Standardabweichung angegeben werden kann.

Substrat	CYP102K1		N'-short-CYP102K1	
	Umsatz [%]	Umsatzrate [min^{-1}]	Umsatz [%]	Umsatzrate [min^{-1}]
Dodecansäure	41 ± 7	$13,6 \pm 2,3$	44 ± 8	$14,8 \pm 2,6$
Tridecansäure	58 ± 8	$19,5 \pm 2,7$	60 ± 3	$19,9 \pm 1,0$
Tetradecansäure*	24 ± 7	$8,1 \pm 2,2$	20	6,7
12-Tridecensäure	55 ± 3	$18,4 \pm 1,1$	58 ± 3	$19,5 \pm 0,9$

Reaktionsbedingungen: 1 μM CYP102K1, verschiedene Substrate, 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 20 °C, 15 min Reaktionszeit, 500 rpm.

Wie aus Tabelle 3.10 hervorgeht, unterscheiden sich die für N'-short-CYP102K1 erhaltenen Umsätze und Umsatzraten insgesamt kaum von denen der CYP102K1. Übereinstimmend mit dem Ergebnis aus Abbildung 3.48 wird Tridecansäure von beiden Varianten am besten umgesetzt. Für 12-Tridecensäure liegt die Umsatzrate jeweils fast genauso hoch wie für Tridecansäure, während für Dodecan- und Tetradecansäure für beide Varianten niedrigere Werte erhalten wurden. Die niedrigen Umsätze für Tetradecansäure sind im Vergleich zu den Daten aus Abbildung 3.48 eher unerwartet, da für dieses Substrat zuvor ein ähnlich hoher Umsatz erzielt wurde wie für Tridecansäure. Nur bei kurzen Reaktionszeiten ist erkennbar, dass Tetradecansäure deutlich langsamer umgesetzt wird als Tridecansäure, was in Einklang steht mit der niedrigeren Umsatzrate der CYP102K1-Varianten für Tetradecansäure. Bei längeren Reaktionszeiten (wie für die Daten aus Abbildung 3.48) sind kaum noch Umsatzunterschiede zwischen den beiden Fettsäuren festzustellen, da sie zu diesem Zeitpunkt bereits annähernd vollständig umgesetzt wurden.

3.2.2.7 Bestimmung des zeitlichen Verlaufs des Umsatzes bei unterschiedlichen Temperaturen

Um Aussagen über die Reaktionsgeschwindigkeit der CYP102K1 in Abhängigkeit von der Temperatur treffen zu können, wurde der zeitliche Verlauf von Reaktionen mit Tridecansäure als Substrat bei verschiedenen Temperaturen verfolgt. Dazu wurden 2 μM Enzym und 500 μM Substrat in großen Reaktionsansätzen bei 4 °C, 10 °C und 20 °C eingesetzt (siehe Abbildung 3.49). Die Biokatalysen wurden während der ersten Stunde der Reaktion beprobt, um den Umsatz zu den verschiedenen

Probezeitpunkten zu bestimmen. Von der zur Cofaktorregenerierung genutzten GDH wurde für die Reaktionen bei 10 °C und 4 °C mehr als die üblichen 1 U/mL eingesetzt, da in einem vorangegangenen Experiment festgestellt wurde, dass die GDH bei diesen Temperaturen nur noch etwa 20 % (10 °C) bzw. 10 % (4 °C) der bei Raumtemperatur ermittelten Aktivität aufweist.

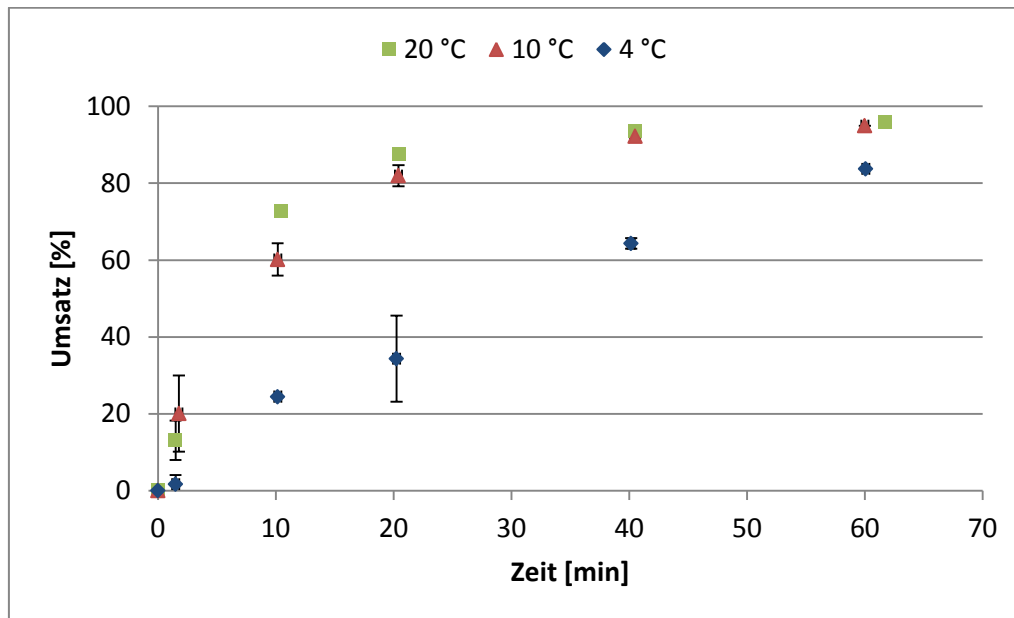


Abbildung 3.49: Zeitlicher Verlauf der ersten Stunde des Umsatzes von Tridecansäure mit CYP102K1 bei verschiedenen Temperaturen. Verwendete GC-Methode: Methode 2 (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die dargestellte Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen. Reaktionsbedingungen: 2 µM CYP102K1, 0,5 mM Tridecansäure, 0,05 mM NADPH, 20 mM Glucose, 1 U/mL (bei 20 °C) bzw. 5 U/mL (10 °C) bzw. 10 U/mL (4 °C) GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 µmol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), verschiedene Temperaturen und Reaktionszeiten, 500 rpm.

Mit Hilfe einer angefertigten Tridecansäure-Kalibriergerade (Abbildung 7.5) und der entsprechenden Geradengleichung konnten die Flächen der Substratpeaks in Stoffmengenkonzentrationen umgerechnet werden. Somit konnten basierend auf der Substratabnahme Umsätze und Umsatzraten berechnet werden. Wie in Abbildung 3.49 zu erkennen ist, weisen die Umsätze bei allen Temperaturen prinzipiell einen ähnlichen Verlauf auf, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur fällt, was in Einklang mit der RGT-Regel steht. Die Umsatzraten von CYP102K1 für den Umsatz von Tridecansäure bei den jeweiligen Temperaturen wurden basierend auf dem Zeitpunkt der höchsten Substratverbrauchsrate mit der niedrigsten Standardabweichung (in diesem Fall der Probezeitpunkt um 10 min) ermittelt. Bei 20 °C lag die Umsatzrate bei $17,3 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ und stellt somit die höchste Umsatzrate dar, bei 10 °C lag die Umsatzrate bei $14,8 \pm 1,0 \text{ min}^{-1}$ und bei 4 °C bei $6,1 \pm 0,0 \text{ min}^{-1}$. Auch diese Ergebnisse entsprechen der RGT-Regel.

In weiteren Versuchen wurden ebenfalls Verlaufsexperimente bei 30 °C, 37 °C und 50 °C durchgeführt. Bei 50 °C wurde keine Produktbildung detektiert, was zu erwarten war, da CYP102K1 bei dieser Temperatur nicht aktiv ist (siehe Abschnitt 3.2.2.4). Beim Verlauf des Umsatzes bei 30 °C und 37 °C wurde nach zehnmütiger Inkubation des Enzyms bei diesen Temperaturen wiederum kein Umsatz festgestellt. Dies weist darauf hin, dass CYP102K1 auch bei 30 °C und 37 °C nicht stabil ist und diese Temperaturen daher für einen Einsatz des Enzyms nicht in Frage kommen.

Da für N'-short-CYP102K1 ähnliche Ergebnisse bezüglich des Umsatzes bei den getesteten Temperaturen gefunden wurden (siehe Abschnitt 3.2.2.4), wurden keine Verlaufsexperimente für diese CYP102K1-Variante durchgeführt.

3.2.2.8 Bestimmung der Kopplungseffizienz und der NADPH-Oxidationsrate

Kopplungseffizienz und NADPH-Oxidationsrate sind entscheidende Parameter zur Untersuchung der Effizienz der Katalyse in Abhängigkeit des umgesetzten Substrats. Die Kopplungseffizienz stellt den Prozentsatz der vom Cofaktor NADPH stammenden Elektronen dar, die tatsächlich zur Produktbildung genutzt wurden. Die NADPH-Oxidationsrate repräsentiert dagegen die Geschwindigkeit, mit welcher der Cofaktor NADPH von der CYP102K1-Reduktasedomäne oxidiert wird. Zur Bestimmung dieser Parameter wurde der Umsatz von 500 µM Substrat (gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von elf bis vierzehn Kohlenstoffatomen sowie 12-Tridecensäure) bzw. 300 µM Pentadecensäure mit 0,4 µM CYP102K1 bei 20 °C im Spektrophotometer durchgeführt. Währenddessen wurde der NADPH-Verbrauch der Reaktionen bei 340 nm verfolgt. Nachdem der Cofaktor vollständig verbraucht war, wurden die Reaktionsansätze extrahiert und die Substratkonzentration gaschromatographisch bestimmt. Aus der Steigung des NADPH-Verbrauchs während der ersten zwei Minuten konnte die NADPH-Oxidationsrate ermittelt und anhand der Substratabnahme die Kopplungseffizienz der Reaktionen berechnet werden (siehe auch Abschnitt 2.4.2.3). Die Substrate β -Jonon und Decensäure wurden aufgrund des zuvor festgestellten sehr niedrigen Umsatzes nicht in diesem Test berücksichtigt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.11 aufgelistet. Es wird deutlich, dass CYP102K1 für Substrate, die schnell umgesetzt werden, ebenfalls eine höhere NADPH-Oxidationsrate und/oder höhere Kopplungseffizienz aufweist als für Substrate, die langsamer umgesetzt werden. Zudem fällt auf, dass die Kopplungseffizienz für alle Substrate deutlich unterhalb von 100 % liegt. Selbst der Wert für das beste Substrat, Tridecensäure, liegt lediglich bei 61 ± 4 %. Dies zeigt, dass ein hoher Anteil der aus NADPH stammenden Elektronen nicht für die Katalyse verwendet wird, sondern durch Entkopplungsreaktionen verloren geht.

Zur Bestimmung der NADPH-Oxidationsrate und Kopplungseffizienz von N'-short-CYP102K1 wurde mit Tridecensäure nur ein Substrat getestet. Dabei wurden im Vergleich zu CYP102K1 jeweils Werte

der gleichen Größenordnung festgestellt. Somit scheint sich der Überhang nicht auf die Kopplungseffizienz oder die NADPH-Oxidationsrate des Enzyms auszuwirken.

Tabelle 3.11: NADPH-Oxidationsrate und Kopplungseffizienz der CYP102K1 in Biokatalysen verschiedener Fettsäuren. Die angegebene Standardabweichung basiert auf einem Doppelansatz der Reaktionen.

Substrat	NADPH-Oxidationsrate* [min^{-1}]	Kopplungseffizienz [%]
Undecansäure	$55,0 \pm 1,7$	26 ± 5
Dodecansäure	$189,9 \pm 1,2$	47 ± 2
Tridecansäure	$118,9 \pm 2,5$	61 ± 4
Tetradecansäure	$17,0 \pm 2,4$	33 ± 1
Pentadecansäure	$3,0 \pm 0,1$	5 ± 2
12-Tridecensäure	$41,4 \pm 0,6$	59 ± 2

*Rate während der ersten zwei Minuten der Reaktion.

Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der NADPH-Oxidationsrate und der Kopplungseffizienz:
 0,4 μM CYP102K1, 500 μM bzw. 300 μM (nur Pentadecansäure) verschiedener Substrate, 0,02 mM NADPH, 20 mM Glucose, 200 U/mL SOD, 600 U/mL Katalase, 20 mM KPi -Puffer (pH 6,5), 20 °C, unterschiedliche Reaktionszeiten, ohne Durchmischung.

3.2.2.9 Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Mit dem Ziel Dissoziationskonstanten der CYP102K1 für die gefundenen Substrate zu bestimmen, wurde versucht, die Substratbindung spektrophotometrisch nachzuweisen. Die Substratbindung führt bei Cytochrom P450 Monooxygenasen häufig zu einer optisch messbaren Änderung des Spinzustandes des Hämeisens. Ist kein Substrat vorhanden, befindet sich ein Wassermolekül als sechster Ligand am Hämeisen im aktiven Zentrum des Enzyms. In diesem Fall weist das Hämeisen eine *low spin*-Konfiguration mit einem Absorptionsmaximum von etwa 420 nm auf. Bei Substratzugabe wird das Wassermolekül durch die Substratbindung im aktiven Zentrum und die Interaktion des Substrats mit dem Hämeisen verdrängt. Dies führt zu einem Wechsel des Hämeisenspinzustands zur *high spin*-Konfiguration, welcher im Fall der Typ I-Bindespektren mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu ca. 390 nm einhergeht (Schenkman et al., 1967; Luthra et al., 2011).

Zunächst wurde CYP102K1 ohne Substrat vermessen und im Anschluss mit Substrat, um eine mögliche Peakverschiebung aufzuzeichnen. Als Referenz diente stets eine CYP102K1-haltige Küvette, die statt mit Substrat mit dem entsprechenden Volumen DMSO versetzt worden war. Wie in Abbildung 3.50 beispielhaft für Tridecansäure gezeigt, konnte jedoch mit keiner der getesteten Fettsäuren (Un-, Do-, Tridecansäure) eine erkennbare Peakverschiebung erreicht werden, weshalb auch keine Dissoziationskonstanten berechnet werden konnten. Zwar ist mit steigender Substratkonzentration eine Verkleinerung des Peaks bei ca. 420 nm zu beobachten. Allerdings müsste bei etwa 390 nm eine entsprechende Absorptionszunahme ausfindig zu machen sein, wenn

diese Absorptionsabnahme durch die Substratbindung verursacht worden wäre (Maves et al., 1997; Ost et al., 2000; Yeom und Sligar, 1997). Doch weder um 390 nm noch bei einer anderen Wellenlänge ist eine Absorptionszunahme zu erkennen. Bei bis zu 300 μM Substrat sollte zumindest eine anfängliche Peakverschiebung zu sehen sein, da das Enzym bei diesen Substratkonzentrationen eindeutig aktiv ist. Eine höhere Substratkonzentration war wegen der geringen Löslichkeit der Substrate in wässriger Lösung auch nicht möglich.

Da für CYP102K1 kein spektrophotometrischer Nachweis einer Substratbindung gelang, wurde ein entsprechender Versuch für N'-short-CYP102K1 auch nicht durchgeführt.

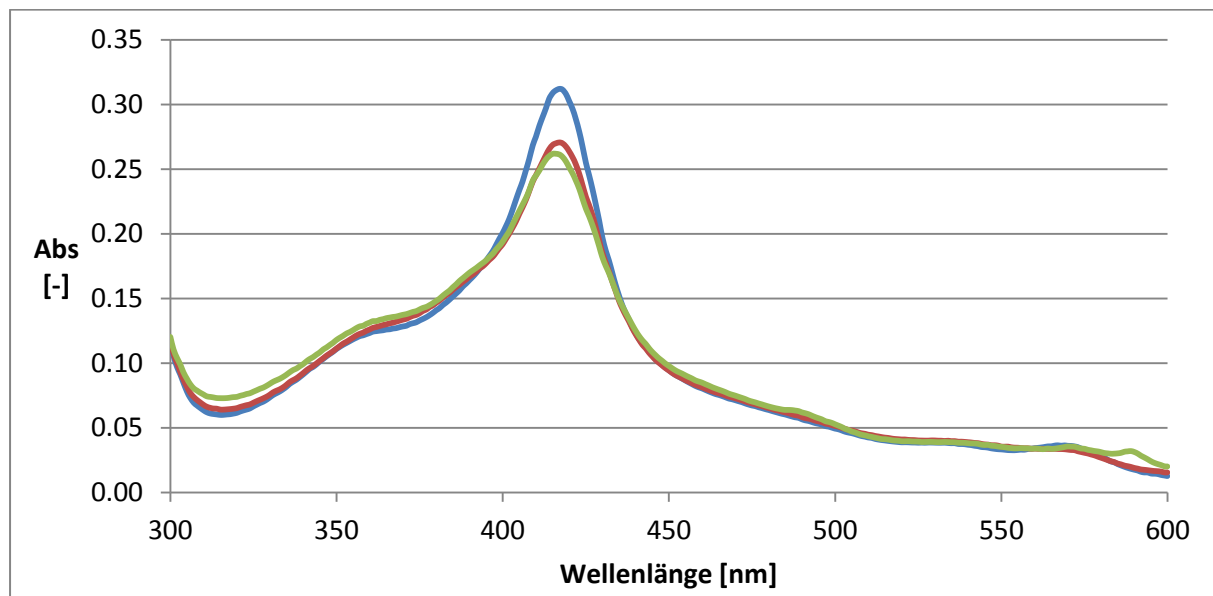


Abbildung 3.50: Spektrum von 2 μM CYP102K1 in 20 mM KP_i -Puffer (pH 6,5) ohne (blaue Kurve) sowie mit Zugabe von 100 μM (Rot) bzw. 300 μM (Grün) Tridecansäure.

3.3 Erweiterung des Substratspektrums von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

Wie bereits unter Abschnitt 3.2.2.6 erwähnt, werden durch CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 lediglich Fettsäuren mittlerer Kettenlänge umgesetzt (jeweils präferiertes Substrat: Tridecansäure). Substanzen mit entsprechender Kettenlänge, die sich jedoch in ihrer funktionellen Gruppe unterschieden (Alkan, Alkohol, Amin, Aldehyd, Ester), wurden dagegen nicht umgesetzt. Die Carboxylgruppe scheint also für die Akzeptanz eines Substrats eine ausschlaggebende Bedeutung zu haben. Daher wurde ein Konzept entwickelt, um das Substratspektrum der CYP102K1 zu erweitern. Unter Nutzung von CalB sollten geeignete Dicarbonsäuren mit kurzkettigen primären Alkoholen bzw. Aminen verknüpft werden, um Ester bzw. Amide mit ähnlicher Kettenlänge wie Tridecansäure zu erhalten. Dazu wurden die zwei Dicarbonsäuren Pimelin- und Succinylsäure eingesetzt, welche mit *n*-Pentanol und *n*-Butylamin bzw. *n*-Octanol und *n*-Octylamin verknüpft werden sollten. Als Beispiel ist

in Abbildung 3.51 die CalB-katalysierte Monoveresterung von Pimelinsäure und Pentanol zu Pimelinsäuremonopentylester und die doppelte Veresterung der Säure zum Pimelinsäuredipentylester wiedergegeben. Die Beschreibung der Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 2.4.3 zu finden.

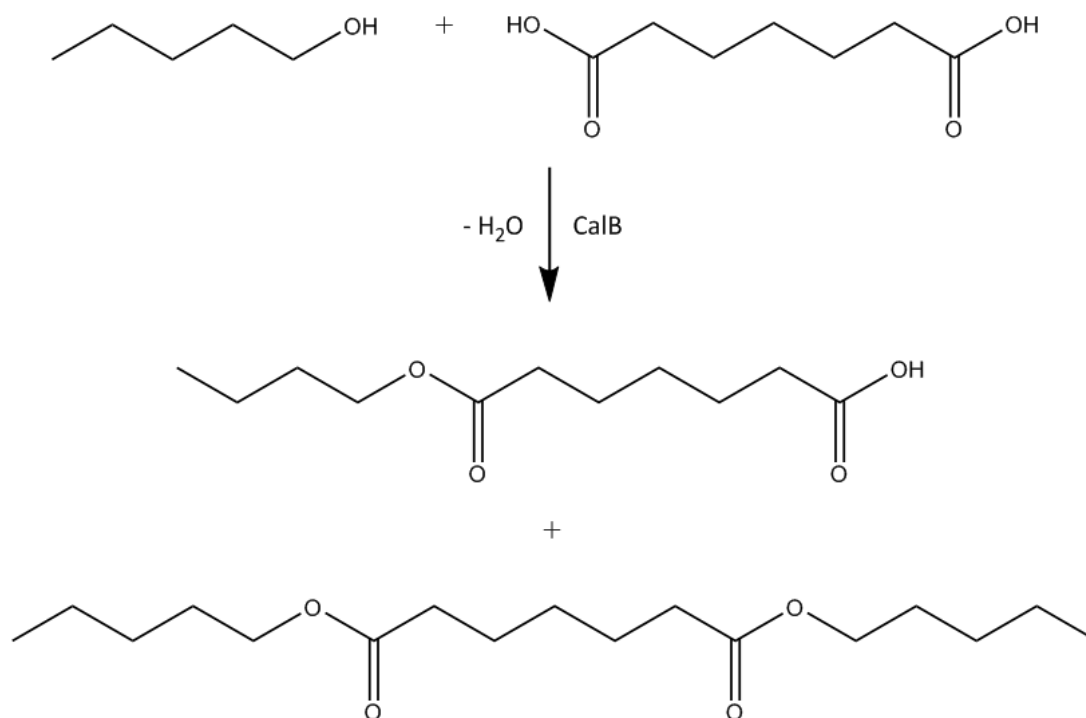


Abbildung 3.51: CalB-katalysierte Veresterung von Pimelinsäure mit *n*-Pentanol im organischen Medium.

3.3.1 Lipase-katalysierte Herstellung von potentiellen CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1- Substraten im analytischen Maßstab

3.3.1.1 Herstellung von Pimelinsäuremonopentylester

Zur Synthese des Pimelinsäuremonopentylesters mithilfe von CalB wurden Pimelinsäure und Pentanol in äquimolaren Mengen eingesetzt, um die Bildung des Diesters möglichst gering zu halten. Des Weiteren musste ein organisches Lösungsmittel zugesetzt werden, um genügend Flüssigphase zu erhalten. Deshalb wurden drei unterschiedliche Lösungsmittel (Dibutylether, Diisopropylether und MTBE) getestet. Die Inkubation der Reaktionen erfolgte bei 50 °C. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, die mittels GC(-MS) analysiert wurden. Die Identifikation von Mono- und Diester erfolgte in den GC-MS Analysen anhand der Molekülmassen und zugehörigen Massenspektren (Abbildung 7.24). Da für GC und GC-MS Analysen die gleiche GC-Säule sowie gleiche Temperaturbedingungen verwendet wurden, war somit auch die Zuordnung der Peaks in der GC-Analyse möglich. Pentanol konnte unter den gewählten Bedingungen weder mittels GC noch mittels GC-MS detektiert werden. Anhand der Peakflächen der zugehörigen GC-Chromatogramme wurden

für alle Reaktionen Umsatz sowie das Verhältnis von Pimelinsäuremono- zu -diester bestimmt (Tabelle 3.12). Zur Berechnung des Umsatzes wurde lediglich Pimelinsäure als Substrat berücksichtigt, da – wie eben erwähnt – Pentanol weder per GC, noch per GC-MS detektiert werden konnte.

Tabelle 3.12: Umsätze und Mono- zu Diester-Verhältnisse der CalB-katalysierten Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol unter Einsatz verschiedener Lösungsmittel und einer Inkubationsdauer von 19 h.

Lösungsmittel	Umsatz [%]	Verhältnis Mono- zu Diester
Dibutylether	73	1,8
Diisopropylether	74	1,8
MTBE	67	2,2

Unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel betrug der Gesamtumsatz nach 19 h Inkubation bei 50 °C etwa 70 %. Bei Einsatz des Lösungsmittels MTBE wurde dabei das höchste Mono- zu Diester-Verhältnis erreicht. Deshalb wurde MTBE ebenfalls für die Herstellung des Pimelinsäuremonoesters im präparativen Maßstab eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3.2).

3.3.1.2 Herstellung von Succinylsäuremonooctylester

Zur Synthese des Succinylsäuremonooctylesters mithilfe von CalB wurden Reaktionen mit Succinylsäure und Octanol analog den Reaktionen zur Herstellung von Pimelinsäuremonopentylester durchgeführt. Diesmal wurde direkt MTBE als Lösungsmittel eingesetzt und mit entsprechenden Reaktionen ohne Lösungsmittelzusatz verglichen. Die Identifikation gebildeter Produktpeaks erfolgte ebenfalls mittels GC-MS (Abbildung 7.25). Die Bestimmung von Umsätzen sowie des Verhältnisses von Mono- zu Diester erfolgte ebenfalls auf Basis der Peakflächen in den zugehörigen Gaschromatogrammen (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: Umsätze und Monoester- zu Diester-Verhältnisse im Verlauf einer CalB-katalysierten Reaktion von Succinylsäure mit Octanol mit und ohne MTBE.

Zeit [h]	Umsatz [%]		Verhältnis Mono- zu Diester	
	Ohne MTBE	Mit MTBE	Ohne MTBE	Mit MTBE
1	< 1	< 1	1,5	3,1
4,5	5	3	0,3	0,8
45	85	87	0,2	0,3

Wie in Tabelle 3.13 zu erkennen ist, stieg der Umsatz in beiden Reaktionen im Laufe der Zeit an, sodass nach 45 h unabhängig vom Lösungsmittel etwa 85 % der Substrate umgesetzt waren. Das

Monoester- zu Diester-Verhältnis war mit MTBE zu jedem Zeitpunkt höher als ohne MTBE, allerdings nahm es in beiden Fällen mit fortschreitender Reaktionszeit stark ab.

Im Gegensatz zur Herstellung der Pimelinsäurepentylester wurde im Fall der CalB-katalysierten Succinylsäureoctylestersynthese bei signifikantem Umsatz bevorzugt der Diester gebildet.

3.3.1.3 Herstellung von Pimelinsäuremonobutylamid und Succinylsäuremonooctylamid

Des Weiteren wurde getestet, ob CalB ebenfalls die Verknüpfung von Pimelinsäure und Butylamin katalysiert. Dafür wurde ein im Verhältnis zu Pimelinsäure ca. fünffacher molarer Überschuss Butylamin eingesetzt und die Reaktion zunächst ohne Zugabe von Lösungsmittel bei 50 °C inkubiert. Dabei fiel auf, dass sich im Reaktionsgemisch nach etwa einer Stunde zwei Phasen ausgebildet hatten. Die Unterphase besaß eine hohe Viskosität, welche sich deutlich erschwerend auf die Probenahme und die anschließende Weiterverarbeitung der Probe auswirkte. Nach Übernachtinkubation war nur noch eine einzige viskose Phase vorhanden. Diese Feststellungen legen die Vermutung nahe, dass eine Reaktion abgelaufen war, die zur Bildung eines viskosen Produktes bzw. Produktgemisches führte.

Es wurden verschiedene GC-Methoden getestet, um das Reaktionsgemisch aufzutrennen, allerdings konnte dies in keinem Fall erreicht werden. Aufgrund fehlender Analytik wurde deshalb nicht weiter an der Synthese des Pimelinsäurebutylamids gearbeitet.

Ebenfalls wurde die Monoamidsynthese aus Succinylsäure und Octylamin getestet. Allerdings bildete sich unabhängig von der Gegenwart von CalB bei Zugabe von Octylamin zur Succinylsäure unverzüglich eine schaumartige, weiße Substanz. Im Anschluss wurde versucht dieses Phänomen zu vermeiden. So wurde die Succinylsäure vor der Octylaminzugabe in Aceton gelöst und es wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln versucht, die weiße Substanz nach dessen Bildung zu lösen, doch keine der Maßnahmen führte zu einer Besserung. Daher wurde die Synthese des Succinylsäuremonooctylamids nicht weiter verfolgt.

3.3.2 Lipase-katalysierte Herstellung von potentiellen CYP102K1- und N'-short-CYP102K1-Substraten im präparativen Maßstab

Da für keines der Monoamide geeignete Bedingungen zur Synthese etabliert werden konnten, wurden nur die Synthesen der Pimelinsäure- und Succinylsäuremonoester im präparativen Maßstab wiederholt.

3.3.2.1 Herstellung von Pimelinsäuremonopentylester im präparativen Maßstab

Da MTBE bei den Reaktionen im analytischen Maßstab als das Lösungsmittel mit dem besten Mono- zu Diester-Verhältnis identifiziert worden war, wurde es ebenfalls für die Herstellung im präparativen Maßstab eingesetzt. Dem Ansatz wurde ebenfalls getrocknetes Molekularsieb

zugegeben, um das während der Veresterung freigesetzte Wasser aus dem Reaktionsmedium zu entfernen und somit die Rückreaktion (Hydrolyse) zu verhindern. Die Reaktion mit einem Volumen von ca. 11 mL wurde für 23 h bei 50 °C laufen gelassen und anschließend abzentrifugiert, um Enzym und Molsieb zu entfernen. Es wurden exakt 2 mL des Überstandes auf die Kieselgelsäule aufgetragen und im Anschluss wurde der Ethylacetatanteil und damit die Polarität im Laufmittel (Gemisch aus *n*-Heptan und Ethylacetat) kontinuierlich erhöht, um eine Elution der Ester zu gewährleisten. Alle Fraktionen wurden über DC analysiert und anschließend die Fraktionen, welche Pimelinsäuremonopentylester enthielten, vereinigt. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass in den Fraktionen ebenfalls noch Pentanol enthalten war, da sich die Spots für Pentanol und Pimelinsäuremonopentylester auf der DC-Platte nicht eindeutig voneinander trennen ließen. Die vereinigten Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer eingedunstet, wobei eine klare, gelbliche Flüssigkeit verblieb. Es konnte mangels Detektionsmöglichkeiten nicht gaschromatographisch ausgeschlossen werden, dass noch ein gewisser Anteil Pentanol in der Flüssigkeit vorhanden war. Allerdings kann durch die mehrtägige Einengung im Rotationsverdampfer mit dem damit verbundenen Anlegen von Vakuum davon ausgegangen werden, dass das Pentanol verdampft worden ist. Da sich das Volumen der verbliebenen Flüssigkeit am Ende der Einengung über einen mehrstündigen Zeitraum nicht mehr änderte, wurde angenommen, dass es sich bei der Flüssigkeit um das Pimelinsäuremonopentylester handelt. Um die Reinheit zu überprüfen, wurde eine kleine Probe derivatisiert und gaschromatographisch analysiert. Wie im entsprechenden Chromatogramm in Abbildung 3.52 zu erkennen ist, konnten keine Spuren von Pimelinsäure und nur äußerst geringe Mengen Diester nachgewiesen werden. Es wurde daher eine Reinheit > 99 % angenommen.



Abbildung 3.52: Gaschromatogramm zur Bestimmung der Reinheit des aufgereinigten Pimelinsäuremonopentylesters (unten) im Vergleich zu einer Injektion von Chloroform mit Derivatisierungsreagenz (oben). Substrat (S): Pimelinsäure (rot-umrandet); Produkte (P): Pimelinsäuremono- (P1) und Pimelinsäuredipentylester (P2) (jeweils grün-umrandet).

Somit wurden aus 2 mL des Reaktionsansatzes 420 mg Pimelinsäuremonopentylester erhalten, was einer Konzentration von 210 mg Monoester pro Milliliter Reaktionsansatz und einer Ausbeute von 45 % entspricht.

3.3.2.2 Herstellung von Succinylsäuremonooctylester im präparativen Maßstab

Da bei den Reaktionen im analytischen Maßstab mit MTBE im Vergleich zu Reaktionen ohne MTBE ein besseres Mono- zu Diester-Verhältnis festgestellt worden war, wurde das Lösungsmittel ebenfalls für die Herstellung im präparativen Maßstab eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt zudem Molekularsieb zur Entfernung der entstehenden Wassermoleküle und wies ein Volumen von etwa 2,5 mL auf. Die Reaktion wurde für 17,5 h bei 50 °C laufen gelassen. Der komplette Reaktionsansatz wurde nach einem Filtrationsschritt auf die Kieselgelsäule aufgetragen und anschließend wurde die Polarität im Laufmittel (Gemisch aus *n*-Heptan und Ethylacetat) durch Erhöhung des Ethylacetatanteils kontinuierlich erhöht, um eine Elution der Ester zu erreichen. Sämtliche Fraktionen wurden mittels DC analysiert und anschließend die Fraktionen, welche Succinylsäuremonooctylester in hoher Reinheit enthielten, vereinigt. Das Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen wurde im Rotationsverdampfer vollständig entfernt, wobei 220 mg eines weiß-gelblichen, kristallinen Feststoffs zurückblieben. Dies entspricht einer Ausbeute von etwa 15 %. Die Substanz wurde mittels GC als Succinylsäuremonooctylester bestätigt und eine Reinheit > 99 % festgestellt, da keine anderen Peaks für Substrate bzw. Produkte der Reaktion detektiert werden konnten (Abbildung 7.26).

3.3.3 Einsatz der hergestellten Monoester in Biokatalysen mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

3.3.3.1 Einsatz des Pimelinsäuremonopentylesters

Der im größeren Maßstab hergestellte und aufgereinigte Pimelinsäuremonopentylester wurde zunächst in Biokatalysen mit CYP102K1 eingesetzt, um zu untersuchen, ob die Verbindung von dem Enzym als Substrat akzeptiert wird. In die Biokatalysen wurden 2 – 10 µM CYP102K1 und 0,2 – 3 mM Pimelinsäuremonopentylester eingesetzt. Die Reaktionen wurden bei 20 °C durchgeführt, über Nacht laufen gelassen und anschließend extrahiert (siehe auch Abschnitt 2.4.2.1). Zunächst konnten in den mittels GC analysierten Reaktionen keine Produkte identifiziert werden, stattdessen wurden hohe Mengen an Pimelinsäure detektiert. Somit fand offensichtlich eine Hydrolyse des Esters statt. Da diese Esterhydrolyse ebenso in den Negativkontrollen ohne CYP102K1 beobachtet wurde, konnte sie offensichtlich nicht durch die Cytochrom P450 Monooxygenase verursacht worden sein. Eine genaue Analyse aller Reaktionskomponenten ergab daraufhin, dass eine Enzymverunreinigung der verwendeten Katalase für die Hydrolyse des Substrates verantwortlich war. Deshalb wurden im Anschluss Biokatalysen mit CYP102K1 durchgeführt, in denen eine andere Katalase (aus *Micrococcus*

lysodeikticus) bzw. keine Katalase eingesetzt wurde. In beiden Fällen konnten bei der anschließenden GC-Analyse kleine potentielle Produktpeaks bei Retentionszeiten von 21,7 min (Produkt 1) und 21,4 min (Produkt 2) gefunden werden. Diese Vermutung wurde durch eine entsprechende GC-MS-Analyse (Abbildung 3.53) bestätigt. Die charakteristischen Spaltmuster der zugehörigen Massenspektren der Produkte legen nahe, dass es sich um einen an ω -1-Position (Produkt 1) und einen an ω -2-Position (Produkt 2) hydroxylierten Pimelinsäuremonopentylester handelt. Bei Produkt 1 fällt ein deutlicher Peak bei $m/z = 117$ auf. Dieser Peak repräsentiert das kleinere Fragment, welches bei der Spaltung zwischen dem ω -2-Kohlenstoffatom und dem hydroxylierten ω -1-Kohlenstoffatom entsteht. Ein deutlicher Peak ist bei $m/z = 129$ für Produkt 2 zu erkennen. Höchstwahrscheinlich steht dieser Peak für das kleinere Fragment resultierend aus der Spaltung zwischen dem ω -3-Kohlenstoffatom und dem hydroxylierten ω -2-Kohlenstoffatom, welches normalerweise einen m/z -Wert von 131 aufweist.

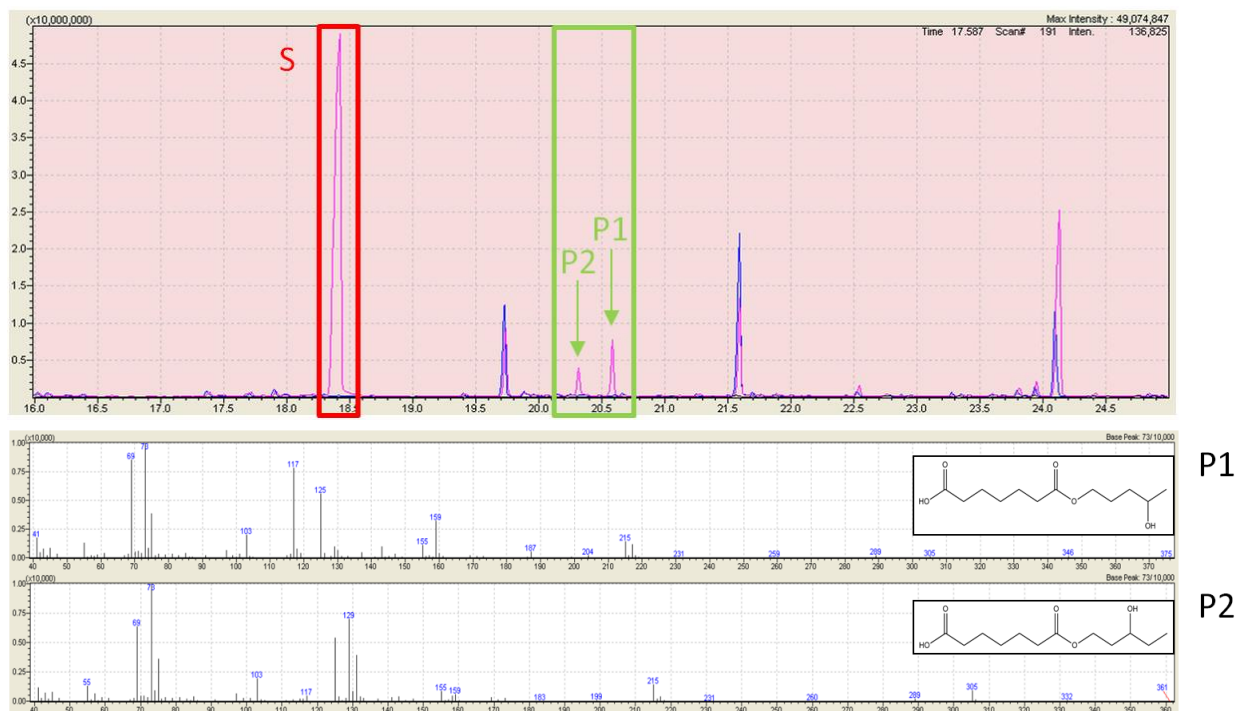


Abbildung 3.53: Ausschnitt der GC-MS-Analyse der Reaktion von Pimelinsäuremonopentylester mit CYP102K1. Oben: Charakteristisches Chromatogramm der Reaktionen [Schwarz: Chloroform; Blau: Chloroform mit Derivatisierungsreagenz (BSTFA); Pink: Reaktionsansätze mit Pimelinsäuremonopentylester und CYP102K1]. Die Peaks für das Substrat Pimelinsäuremonopentylester (S) sowie die Produkte P1 (ω -1-hydroxylierter Pimelinsäuremonopentylester) und P2 (ω -2-hydroxylierter Pimelinsäuremonopentylester) sind markiert. Unten: Massenspektren von P1 und P2. Reaktionsbedingungen: 2 μ M CYP102K1, 0,5 mM Substrat, 0,05 mM NADPH, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μ mol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 20 mM Glucose, 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 17 h bei 20 °C, ohne Durchmischung.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden weitere Biokatalysen unter Variation der CYP102K1- und Substratkonzentration durchgeführt. Allerdings konnten selbst bei Einsatz von 10 μM CYP102K1, 0,5 mM Pimelinsäuremonopentylesters und einer Laufzeit von etwa 17 – 19 h laut GC-Analyse nur 2 % (mit Katalase) bzw. 5 % (ohne Katalase) Umsatz erzielt werden. Der Einsatz höherer Substratkonzentrationen (3 mM) oder die Verwendung von weniger Enzym (2 μM) führten zu keinem besseren Ergebnis.

Es wurden ebenfalls Biokatalysen von Pimelinsäuremonopentylester mit N'-short-CYP102K1 unter ähnlichen Bedingungen (10 μM Enzym, 0,5 mM Substrat, keine Katalase, 24 h Laufzeit) durchgeführt. Dabei konnten zwar die gleichen Produkte wie für CYP102K1 detektiert werden, aber der Umsatz fiel mit < 1 % noch geringer aus.

3.3.3.2 Einsatz des Succinylsäuremonooctylesters

Der im größeren Maßstab hergestellte und aufgereinigte Succinylsäuremonooctylester wurde ebenfalls in Biokatalysen mit CYP102K1 eingesetzt. Dabei konnten bei einer ersten Reaktion mit 2 μM CYP102K1 und 0,5 mM Substrat kleine potentielle Produktpeaks bei 21,5 min (Produkt 1) und 21,3 min (Produkt 2) durch GC-Analyse identifiziert werden. Im Gegensatz zum Pimelinsäuremonopentylester wurde keine Hydrolyse des Substrates beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass das im Katalasepulver enthaltene Enzym, welches Pimelinsäuremonopentylester hydrolysiert hatte, selektiv ist. Anschließend wurden weitere Biokatalysen mit höheren CYP102K1- (10 μM bzw. 20 μM) und Monoesterkonzentrationen (bis zu 1 mM) durchgeführt, um die potentiellen Produkte in anschließenden GC-MS Analysen genauer untersuchen zu können. Wie in Abbildung 3.54 gezeigt, sind die Produkte ausschließlich in Proben mit CYP102K1 und nicht in den entsprechenden Negativkontrollen vorhanden. Es fällt zudem auf, dass die Produktpeaks bei doppelter CYP102K1- und Monoesterkonzentration größer ausfallen. Die zugehörigen Massenspektren der Produkte legen nahe, dass es sich um einen an ω -1-Position (Produkt 1) und einen an ω -2-Position (Produkt 2) hydroxylierten Succinylsäuremonooctylester handelt. Wie schon beim oben beschriebenen Pimelinsäuremonopentylester konnte anhand von charakteristischen Spaltprodukten die Position der Hydroxylgruppe ermittelt werden. Bei Produkt 1 fällt erneut der Peak bei $m/z = 117$ auf, der charakteristisch ist für die Hydroxylierung an der ω -1-Position. Der deutliche Peak bei $m/z = 131$ für Produkt 2 weist auf eine Hydroxylierung an der ω -2-Position hin.

Um die Reaktionsbedingungen zu optimieren, wurden ebenfalls weitere Biokatalysen unter Variation der CYP102K1- und Substratkonzentration, sowie der Reaktionsdauer durchgeführt. Für alle mittels GC analysierten Ansätze wurden schließlich Umsätze berechnet. Der höchste Umsatz von 20 % konnte für eine Reaktion mit 10 μM Enzym, 0,5 mM Substrat und einer Laufzeit von 40 h erzielt

werden. Der Einsatz geringerer Enzymmengen bzw. höherer als auch niedrigerer Substratkonzentrationen führten zu keiner Umsatzsteigerung.

Es wurden ebenfalls Biokatalysen mit N'-short-CYP102K1 unter ähnlichen Bedingungen (10 μM Enzym, 0,5 mM Substrat, 24 h Laufzeit) durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Produkte gebildet und der Umsatz erreichte mit 18 % ebenfalls einen ähnlichen Wert wie für CYP102K1.

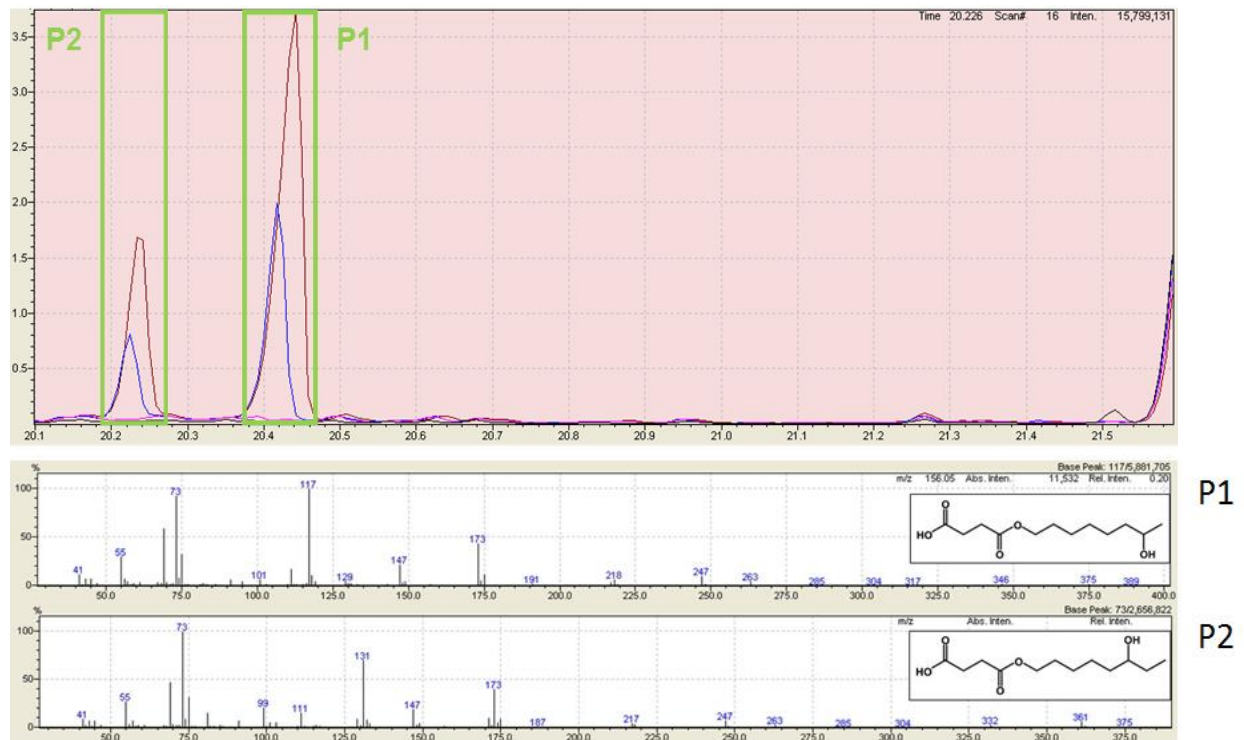


Abbildung 3.54: Ausschnitt der GC-MS-Analyse zweier Reaktionen von Succinylsäuremonooctylester mit CYP102K1 unter Verwendung verschiedener Substrat- und CYP102K1-Konzentrationen. Oben: Charakteristische Chromatogramme der Reaktionen [Schwarz: Chloroform mit Derivatisierungsreagenz (BSTFA); Pink: Negativkontrolle ohne CYP102K1; Blau bzw. braun: Reaktionsansätze mit Succinylsäuremonooctylester (0,5 mM bzw. 1 mM) und CYP102K1 (10 μM bzw. 20 μM)]. Unten: Massenspektren der Produkte P1 (ω -1-hydroxylierter Succinylsäuremonooctylester) und P2 (ω -2-hydroxylierter Succinylsäuremonooctylester). Reaktionsbedingungen: variierende CYP102K1- und Substratkonzentration, 0,05 mM NADPH, 1 U/mL GDH (1 U entsprach der Enzymmenge, welche 1 μmol NADP⁺ pro Minute bei pH 6,5 und RT reduzierte), 20 mM Glucose, 1.200 U/mL Katalase, 20 mM KP_i-Puffer (pH 6,5), 22,5 h bei 20 °C, ohne Durchmischung.

4 Diskussion

4.1 Untersuchung putativer Elektronentransferproteine aus *Thermobifida fusca*

Das Ziel dieses Teilprojekts war die Identifikation thermostabiler Elektronentransferpartner aus *T. fusca* für die Anwendung in Biokatalysen mit verschiedenen Cytochrom P450 Monooxygenasen. Dazu wurden fünf putative Ferredoxine, zwei Varianten eines putativen Flavodoxins und vier putative Ferredoxinreduktasen aus *T. fusca* untersucht. Nach Bestimmung optimaler Expressionsbedingungen wurden die Proteine aufgereinigt und bzgl. ihrer Aktivität untersucht. Anschließend wurden sie in Biokatalysen mit unterschiedlichen Cytochrom P450 Monooxygenasen getestet.

4.1.1 Heterologe Expression und Aufreinigung

Ferredoxine

Es stellte sich teilweise als schwierig heraus, eine Expression der Ferredoxine mittels SDS-PAGE nachzuweisen, da in der Regel nur wenig intensive Ferredoxin-Banden auf den SDS-Gelelen zu beobachten waren, obwohl mit der Tris-Tricin-SDS-PAGE eine SDS-PAGE-Methode verwendet wurde, die speziell für kleine Proteine geeignet ist. Dies kann neben einer schwachen Expression auch an der geringen Größe der Proteine liegen. Nach Durchführung der Elektrophorese wurde eine Coomassie-Brillant-Blau-haltige Färbelösung zur Färbung der SDS-Gele eingesetzt. Neben der Tatsache, dass kleine Proteine aus dem Gel während des Färbevorgangs ausgewaschen werden können (Schägger und von Jagow, 1987), lagert sich der Coomassie-Farbstoff nur unspezifisch an basische Aminosäuren an und je kleiner ein Protein ist, desto weniger basische Aminosäuren sind durchschnittlich in dem Protein vorhanden. Dadurch werden sie im Vergleich zu größeren Proteinen von der Färbelösung weniger stark angefärbt und dies erschwert eine Visualisierung der Ferredoxinbanden. Daher wurde neben der SDS-PAGE standardmäßig ebenfalls ein Western Blot zur spezifischen Detektion von Proteinen über deren His-Tag durchgeführt. Dies war für alle Ferredoxine möglich, die durch die Expression mit pET28a(+) und die Klonierung über die *NdeI*-Schnittstelle über einen N-terminalen His-Tag verfügten. Es ist zudem zu erwähnen, dass die Banden der meisten putativen Ferredoxine (Ausnahmen: Fdx 3 und Fdx 4) im SDS-Gel bei deutlich höheren Molekulargewichten zu beobachten waren als erwartet, was die Identifikation der richtigen Zielproteinbande zusätzlich erschwerte.

Wird der Einsatz der Plasmide pET22b(+) und pET28a(+) zur Ferredoxinexpression verglichen, wurden interessanterweise stets bei Verwendung des pET28a(+)-Plasmids die besten Expressionsbedingungen gefunden. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Vektoren liegt darin, dass die Proteine, die mit Hilfe des entsprechenden pET22b(+)-Plasmids exprimiert

wurden, über keinen N-terminalen His-Tag verfügen. Daher war eine Überprüfung der Expression mittels Western Blot im Fall der Verwendung von pET22b(+) nicht direkt möglich und die Analyse mittels SDS-PAGE war die einzige zur Verfügung stehende Methode die Expression einzuschätzen. Da dies teils ohne zusätzlichen Nachweis mittels Western Blot durchaus schwerfiel, kann es sein, dass eine Zielproteinexpression übersehen worden ist. Wäre diese Expression allerdings deutlich stärker ausgeprägt gewesen, als die Expression mit pET28a, wäre sie sicherlich bei Betrachtung der entsprechenden SDS-Gele bemerkt worden. Daher ist es durchaus möglich, dass pET28a(+) tatsächlich in allen Fällen die besseren Expressionsergebnisse lieferte.

Die Ferredoxingene wurden im Vorfeld dieser Arbeit über PCR aus dem Genom von *T. fusca* isoliert, in verschiedene Plasmide eingebracht und zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen wurden also nicht für eine Expression in *E. coli* optimiert. Eine Codonanalyse der Ferredoxingene mit Hilfe eines Browser-gestützten Programms (*E. coli* Codon Usage Analysis 2.0) ergab, dass 10 – 18 % der vorhandenen Codons nur selten in *E. coli* verwendet werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass mit Ausnahme der Fdx 8-Gensequenz in allen Ferredoxingensequenzen mindestens zwei in *E. coli* selten verwendete Codons aufeinander folgen. Werden gewisse Codons nur selten in einem Organismus verwendet, liegt häufig die entsprechende tRNA nur in geringen Mengen in der Zelle vor, in dessen Folge die Translation abgebrochen werden oder niedrig ausfallen kann (Bulmer, 1987; Dong et al., 1996; Kanaya et al., 2001). Daher ist es möglich, dass sich der N-terminale His-Tag als Expressionsstartpunkt positiv auf die Expression auswirkt, da die entsprechenden Codons für eine Expression in *E. coli* ausgelegt sind. Fehlt der N-terminale His-Tag, ist es möglich, dass die Expression aufgrund der unterschiedlichen *codon usage* der beiden Organismen stark verlangsamt und in der Folge abgebrochen wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AT-reiche Regionen am Anfang einer Gensequenz die heterologe Expression in *E. coli* verbessern können (Nishikubo et al., 2005). Die Gensequenz des verwendeten N-terminalen His-Tags weist innerhalb der ersten neun Codons einen hohen AT-Gehalt von 52 % auf. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass sich der His-Tag positiv auf die Expression auswirken kann.

Im Fall von Fdx 4 wurde die Coexpression mit FdR 6 untersucht, da die Gene von Fdx 4 (Tfu_1226) und FdR 6 (Tfu_1227) im Genom von *T. fusca* direkt hintereinander liegen. Weiterhin befinden sich beide Gene zusammen mit dem Gen für CYP217A1 (Tfu_1225) in einem größeren Operon (vermutlich für die Polyketidsynthese). Daher wurde angenommen, dass die resultierenden Proteine miteinander und mutmaßlich mit CYP217A1 kooperieren und dass das Vorhandensein des einen Proteins in der Zelle sich stabilisierend auf die Produktion des putativen Redoxpartners auswirken könnte.

Interessanterweise wurde die Expression von Fdx 4 nur dann deutlich verbessert, wenn sich das Gen für Fdx 4 im pET28a(+)-Vektor und das Gen für FdR 6 im pIT2-MCS-Vektor befand, aber nicht wenn die umgekehrte Kombination gewählt wurde. Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass es sich bei pET28a(+) um einen *high copy*-Vektor mit hoher Kopienzahl pro Zelle handelt und bei pIT2-MCS um ein *low copy*-Plasmid mit deutlich niedrigerer Kopienzahl. Zum anderen resultiert die Expression mit pET28a(+) in der Expression des Zielproteins mit N-terminalem His-Tag, wogegen das Protein bei Expression mit pIT2-MCS über keinen His-Tag verfügt. Dies ist ein weiterer Hinweis für die zuvor geäußerte Vermutung, dass sich der N-terminale His-Tag positiv auf die Expression auswirkt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Verwendung des *low copy*-Plasmids pACYCDuet™ als Coexpressionssystem gefunden. In diesem Fall waren die Gene von Fdx 4 und FdR 6 in den gleichen Vektor eingebracht worden, um die Coexpression zu untersuchen. Dabei konnte keine sichtbare Fdx 4-Expression beobachtet werden. Einerseits kann dies dadurch erklärt werden, dass es sich bei pACYC um ein *low copy*-Plasmid handelt und die Expression dadurch niedriger ausfallen kann. Andererseits kann es daran liegen, dass kein N-terminaler His-Tag vorhanden war und somit – wie bereits eben diskutiert – nicht positiv auf die Expression einwirken konnte. Des Weiteren war, falls eine schwache Expression vorhanden gewesen wäre, eine spezifische Detektion mittels Western Blot nicht ohne Weiteres möglich.

Dass die Coexpression mit FdR 6 (Gen im pIT2) tatsächlich die Expression von Fdx 4 (Gen im pET28a(+)) verbesserte, weist darauf hin, dass sich die Interaktion der Proteine positiv auf die Faltung oder schützend vor einem Proteinabbau auswirkt. Zwar wurde in der Literatur kein konkretes Beispiel gefunden, in dem die Coexpression von Ferredoxin und Ferredoxinreduktase zu einer Expressionsverbesserung geführt hat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression der Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP105A1 und CYP105B1 aus *Streptomyces griseolus* durch die Coexpression zweier autologer Ferredoxine und einer Ferredoxinreduktase aus *Streptomyces coelicolor* stark erhöht werden konnte (Hussain und Ward, 2003). Dieser Effekt wurde auf eine Stabilisierung der korrekt gefalteten, aktiven P450-Enzyme durch die coexprimierten Redoxproteine zurückgeführt. Es ist daher durchaus möglich, dass sich die Anwesenheit von FdR 6 stabilisierend auf die Expression von Fdx 4 ausgewirkt hat. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass in *Streptomyces coelicolor* A3(2) die Expression von Cytochrom P450 Monooxygenasen und Ferredoxinen über die Verfügbarkeit bestimmter Reduktasen reguliert wird (Lei et al., 2004).

Bei der Betrachtung der Expressionsergebnisse aller Ferredoxine fällt auf, dass die zugehörigen Proteinbanden auf den SDS-Gelen bereits ca. 2 h nach Induktion (bei Nutzung von *E. coli* BL21 (DE3) als Expressionswirt) die höchste Intensität aufwiesen und die Intensität mit fortlaufender

Expressionsdauer wieder abnahm. Wurde *E. coli* C43 (DE3) als Expressionsstamm genutzt, wurden die intensivsten Ferredoxinbanden im Allgemeinen zu späteren Probezeitpunkten (etwa 4 – 5 h nach Induktion) beobachtet. Dies zeigt, dass die Expression in der *E. coli* BL21 (DE3)-Variante C43 (DE3) prinzipiell etwas langsamer abläuft als im *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm, was auf mindestens eine Mutation zurückzuführen ist (Miroux und Walker, 1996).

Unabhängig vom Expressionsstamm war die Ferredoxinexpression nach über Nacht-Inkubation nur noch für Fdx 3 und Fdx 8 eindeutig über SDS-PAGE bzw. Western Blot nachweisbar. Anscheinend werden die Ferredoxine in den zur Expression genutzten Zellen recht rasch wieder abgebaut. Es ist weiterhin möglich, dass ein Teil der Zellen durch den mit der Kultivierungsdauer abnehmenden Selektionsdruck das zur Expression der Zielproteine notwendige Plasmid verliert und die Zellen ohne Plasmid in der Folge die verbliebenen Ferredoxin-exprimierenden Zellen überwachsen. Dabei sollte der letzte Punkt durch den Einsatz von ausreichenden Mengen Antibiotikum eigentlich ausgeschlossen sein. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass das Wachstum der Zellen nach der Induktion teilweise gehemmt war, beispielsweise bei der Fdx 8-Expression mit *E. coli* BL21 (DE3). Zum einen ist dies möglicherweise auf eine außerordentlich hohe Expression zurückzuführen, welche einen Großteil der Energie der Zelle benötigt und den restlichen Stoffwechsel damit stark verlangsamt. Zum anderen ist auch möglich, dass die Ferredoxinexpression an sich den Stoffwechsel der exprimierenden *E. coli*-Zellen negativ beeinflusst. Dies könnte wiederum dazu führen, dass die Ferredoxin-exprimierenden Zellen langsamer wachsen, als nicht exprimierende Zellen, sodass das Expressionslevel mit fortlaufender Dauer abnimmt. Es kann daher sein, dass die Ferredoxine auf die für viele Stoffwechselwege entscheidende Elektronenübertragung einwirken, indem sie die Elektronen auf andere Proteine oder Moleküle (wie z. B. Sauerstoff) in der Zelle übertragen. Bei Verwendung molekularen Sauerstoffs als Elektronenakzeptor würden beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen entstehen, die sich toxisch auf die Zelle auswirken können. Somit wird der Stoffwechsel gestört und der Redoxzustand der Zelle beeinflusst, was eine Beeinträchtigung des Wachstums zur Folge hat. Dazu müssen die Ferredoxine allerdings zunächst von einer Reduktase reduziert werden, da Ferredoxine lediglich als Shuttleproteine dienen und nicht eigenständig Elektronen von Cofaktoren erhalten können. Es wurde bereits vor etwa 40 Jahren herausgefunden, dass *E. coli* mindestens eine NADPH-abhängige Flavodoxinreduktase besitzt, die zur Aktivierung der Methioninsynthase mit einem entsprechenden Flavodoxin interagiert (Fujii und Huennekens, 1974). In der Folge wurden mit der Formiatacetyltransferase, der anaeroben Ribonukleotidreduktase und der Biotinsynthase weitere *E. coli*-Enzyme gefunden, welche diese Redoxpartner als natürliches Elektronentransfersystem zur Katalyse benötigen (Blaschkowski et al., 1982; Bianchi et al., 1993; Birch et al., 1995). Zudem konnte

gezeigt werden, dass die Flavodoxinreduktase ebenfalls in der Lage ist, ein an der Bildung von Eisenschwefelclustern beteiligtes *E. coli*-Ferredoxin zu reduzieren (Blaschkowski et al., 1982; Zheng et al., 1998). Somit wird dieses Enzym in der Literatur sowohl als Flavodoxinreduktase als auch als Ferredoxinreduktase bezeichnet. In weiteren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die FdR aus *E. coli* das Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis* reduzieren kann (Girhard et al., 2010; von Bühler et al., 2013). Da die *E. coli*-FdR offenbar in der Lage ist, mit verschiedenen Flavodoxinen und Ferredoxinen zu interagieren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese ebenfalls Elektronen auf die heterolog exprimierten Ferredoxine aus *T. fusca* überträgt, was wiederum den Stoffwechsel von *E. coli* während der Ferredoxinexpression und somit ebenfalls die Ferredoxinexpression selbst negativ beeinflussen kann. Entgegen dieser Hypothesen konnte jedoch die Expression von Fdx 4 durch Coexpression mit FdR 6 verbessert werden. Die Kooperation der beiden Proteine wird aufgrund der benachbarten Lokalisierung der entsprechenden Gene im *T. fusca*-Genom als sehr wahrscheinlich angenommen, sodass die mögliche Beeinflussung des Stoffwechsels in diesem Fall wohl keinen Grund für eine schwache Expression darstellt.

Da die Proteine aus einem thermophilen Organismus stammen und die optimale Wachstumstemperatur von *T. fusca* bei 50 – 55 °C liegt (Bachmann und McCarthy, 1991), besteht weiterhin die Möglichkeit, dass für eine bessere Expression der Ferredoxine höhere als die getesteten Temperaturen notwendig sind. Diese sind durch den Einsatz von *E. coli* als Expressionswirt aber nicht erreichbar, da dieser Organismus nicht in der Lage ist, bei Temperaturen > 44 °C über einen längeren Zeitraum zu wachsen (Farewell und Neidhardt, 1998).

Nach der Ferredoxinexpression im größeren Maßstab wurden die Proteine aufgereinigt. Dabei wurden abhängig vom entsprechenden Ferredoxin sehr unterschiedliche Ergebnisse erhalten.

Die Aufreinigung über IMAC, die Aufkonzentrierung sowie der Pufferaustausch verliefen für Fdx 2 und Fdx 8 ohne Probleme und es wurden braune Proteinlösungen erhalten. Die braune Färbung weist auf den Einbau von Eisenschwefelclustern hin, welche typischerweise als prosthetische Gruppe in Ferredoxinen vorhanden sind. Dabei kann es sich um [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- oder [4Fe-4S]-Cluster handeln, die in Ferredoxinen vorkommen können (Johnson et al., 2005). Dies gilt ebenfalls für Ferredoxine, die nachweislich mit Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperieren (Sevrioukova et al., 2003; Sielaff und Andreesen, 2005; Green et al., 2003). Laut der PFAM-Analyse in der NCBI-Datenbank enthalten sowohl Fdx 2 als auch Fdx 8 je ein [4Fe-4S]-Cluster. Die Aminosäuresequenzen beider Ferredoxine weisen allerdings ein CXXHXXC(X)_nCP-Sequenzmotiv auf. Dieses Motiv ist ebenfalls in dem [3Fe-4S]-Cluster-enthaltenden Ferredoxin HaPuxC aus *Rhodopseudomonas palustris* HaA2 vorhanden, dessen Kristallstruktur aufgeklärt wurde (Zhang et al., 2014). Anhand der Kristallstruktur (PDB-Code 4ID8) wird deutlich, dass das in dem Sequenzmotiv enthaltene Histidin

mit einem Schwefelatom des Eisenschwefelclusters interagiert (Zhang et al., 2014). Es ist jedoch bekannt, dass Histidin ebenfalls eines der vier Eisenatome von [4Fe-4S]-Clustern binden kann (Johnson et al., 2005). Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um aufzuklären, welcher Typ Eisenschwefelcluster in Fdx 2 und Fdx 8 enthalten ist. Nach Aufreinigung und Konzentrierung wies die Fdx 2-haltige Proteinlösung mit 4,6 mg/mL eine fast doppelt so hohe Proteinkonzentration auf wie das Fdx 8-Konzentrat (2,5 mg/mL), obwohl beim Fdx 8-Konzentrat eine deutlich intensivere Braunfärbung erkennbar war. Dies deutet darauf hin, dass nicht alles Fdx 2 auch den Eisenschwefelcluster enthielt. Darüber hinaus ist es möglich, dass die höhere Proteinkonzentration im Fdx 2-Konzentrat neben Proteinverunreinigungen auch auf restliche Imidazolverunreinigungen zurückzuführen ist.

Fdx 4 konnte ebenfalls über IMAC aufgereinigt und im Anschluss aufkonzentriert werden, wobei das Konzentrat eine braune Färbung aufwies. Daher war offenbar während der Expression der Eisenschwefelcluster in das Protein eingebaut worden. Wie bei Fdx 2 und Fdx 8 ist auch in der Fdx 4-Proteinsequenz ein CXXHXXC(X)_nCP-Sequenzmotiv vorhanden, das auf die Bindung des [3Fe-4S]-Clusters hinweist (Zhang et al., 2014). Wie bereits zuvor diskutiert, ist jedoch ebenfalls die Bindung des [4Fe-4S]-Clusters vorstellbar, welches laut PFAM-Zuordnung in dem Ferredoxin vorhanden sein soll. Das Fdx 4 fiel allerdings beim anschließenden Pufferaustausch mittels PD10-Säule zur Entfernung des Imidazols vollständig aus und die ursprüngliche braune Färbung war nicht mehr vorhanden. Dies weist darauf hin, dass das Protein entweder infolge des Verlusts des Eisenschwefelclusters denaturierte, oder der Eisenschwefelcluster während der Denaturierung verloren ging. In beiden Fällen folgt daraus der Verlust jeglicher Aktivität. In der Folge wurden mehrere Versuche unternommen, nach der IMAC den Pufferaustausch möglichst schonend zu gestalten, doch stets führte eine Entfernung des Imidazols zur Denaturierung des Zielproteins. Eine hohe Imidazolkonzentration bzw. Ionenstärke scheint sich also stabilisierend auf das Protein auszuwirken. Durch die IMAC war zudem schon vor dem Pufferaustausch die coexprimierte FdR 6 entfernt worden, sodass diese nicht mehr stabilisierend auf Fdx 4 wirken konnte. Des Weiteren wurde eine Anionenaustauschchromatographie zur Fdx 4-Aufreinigung durchgeführt, wobei das Zielprotein in den Elutionsfraktionen stark verdünnt vorlag, sodass eine eindeutige Identifizierung von Fdx 4 nicht ohne Weiteres möglich war. Während der folgenden Aufkonzentrierung kam es erneut zu einem massiven Proteinausfall. Möglicherweise ist dies wiederum auf eine Änderung der Ionenstärke zurückzuführen. Es ist zudem möglich, dass das Protein auf der Membran des Zentrifugalfilters denaturierte.

Bei Fdx 1 und Fdx 3 konnte zu keinem Zeitpunkt der Aufreinigung eine braune Färbung beobachtet werden, sodass diese Proteine wahrscheinlich über keinen Eisenschwefelcluster verfügten oder die

Verdünnung der Proteine zu hoch war, um eine Braunfärbung festzustellen. Die zweite Begründung trifft bei Fdx 3 eher nicht zu, da eine vergleichsweise hohe Proteinkonzentration im sehr reinen Konzentrat festgestellt wurde. Falls der Eisenschwefelcluster fehlte, konnten Fdx 1 und Fdx 3 nicht aktiv sein, da die prosthetische Gruppe für die Elektronenübertragung benötigt wird. Es kann zum einen sein, dass die Faltung der Ferredoxine nicht korrekt ausgebildet wurde, sodass der Eisenschwefelcluster nicht eingebaut werden konnte und die Proteine somit nicht funktionell vorlagen. Ein Grund für die Fehlfaltung könnte sein, dass benötigte Faltungshelfer, wie Chaperone, fehlten. Es ist zudem möglich, dass der N-terminale His-Tag die Faltung beeinträchtigt oder den Einbau des Eisenschwefelclusters behindert haben könnte. In der Literatur existieren mehrere Hinweise dafür, dass sich His-Tags negativ auf die Struktur, Aktivität oder Löslichkeit von Proteinen auswirken können (Araújo et al., 2000; Freydank et al., 2008; Tolia und Joshua-Tor, 2006; Woestenenk et al., 2004). Besonders bei kleinen Proteinen wie Ferredoxinen besteht die Möglichkeit, dass der im Verhältnis zum restlichen Protein recht lange His-Tag die Faltung beeinflusst.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei Fdx 1 und Fdx 3 gar nicht um echte Ferredoxine handelt. Zumindest im Fall von Fdx 1 wäre dies überraschend, da Fdx 1 mit einer Sequenzidentität von 85 % homolog zum Ferredoxin NP_629284 aus *S. coelicolor* A3(2) ist (Chun et al., 2007) und in der NCBI-Datenbank ebenfalls als Ferredoxin annotiert ist. Die PFAM-Analyse in der NCBI-Datenbank ergab (wie für Fdx 2, Fdx 4 und Fdx 8), dass Fdx 1 zu den [4Fe-4S]-Cluster-enthaltenden Ferredoxinen gehören soll. Anders als Fdx 2, Fdx 4 und Fdx 8 enthält die Fdx 1-Aminosäuresequenz kein CXXHXXC(X)_nCP-Sequenzmotiv für ein [3Fe-4S]-Cluster und auch kein anderes Sequenzmotiv, welches für die Bindung einer bestimmten Eisenschwefelclusterart typisch wäre (Busch et al., 1996; Macedo-Ribeiro et al., 2001; McLean et al., 2006; Zhang et al., 2014). Interessanterweise weist die Fdx 1-Sequenz sieben Cysteinreste auf, während Fdx 2, Fdx 4 und Fdx 8 nur drei Cysteinreste besitzen. Mit sieben Cysteinresten können theoretisch sieben Eisenatome über Thiolatbindungen gebunden werden, sodass Fdx 1 ein putatives [7Fe-8S]-Cluster-haltiges Ferredoxin sein könnte. Diese Ferredoxine binden ein [3Fe-4S]-Cluster sowie ein [4Fe-4S]-Cluster (Aono et al., 1994; Busch et al., 1996; Katayama et al., 2003). Auch wenn es sich dabei um eine spezielle Eisenschwefelclusteranordnung handelt, ist es unwahrscheinlich, dass *E. coli* nicht in der Lage ist, die benötigten Eisenschwefelcluster zu bilden und diese in die Proteine einzubauen, da *E. coli* über die dafür notwendigen biosynthetischen Systeme verfügt (Nakamura et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Tokumoto und Takahashi, 2001). Darüber hinaus wurden bereits zahlreiche [7Fe-8S]-Cluster-haltige Ferredoxine unter Verwendung von *E. coli* als Expressionswirt heterolog exprimiert (Dimri et al., 1988; Aono et al., 1994; Busch et al., 1996). Daher ist anzunehmen, dass tatsächlich die Faltung von

Fdx 1 nicht korrekt ausgebildet wurde, sodass keine funktionelle Expression des Ferredoxins erfolgte. Dagegen ist recht wahrscheinlich, dass es sich bei Fdx 3 um kein echtes Ferredoxin handelt. Dieses Protein wurde in der Auswahl möglicher *T. fusca*-Ferredoxine berücksichtigt, da es aufgrund seiner Kristallstruktur (PDB-Code 3BGU) als Ferredoxin-ähnliches Protein zugeordnet wurde (Joint Center for Structural Genomics, 2007). Allerdings fehlt bereits in der Struktur der Eisenschwefelcluster. Es ist weiterhin auffällig, dass die Aminosäuresequenz von Fdx 3 keinen Cysteinrest enthält. Daher ist es in Fdx 3 nicht möglich, Eisenatome über Thiolate zu binden und somit fehlt dem Protein die wichtigste Möglichkeit zur Bindung von Eisenschwefelclustern. Es ist zudem unwahrscheinlich, dass ausschließlich mit anderen Aminosäureresten, wie Aspartat, Histidin oder Serin, eine ausreichend starke Bindung des Eisenschwefelclusters erreicht werden kann, da normalerweise höchstens ein Eisenatom des Eisenschwefelclusters über eine der genannten Aminosäuren gebunden wird (Johnson et al., 2005). Unter Berücksichtigung dieser Informationen muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei Fdx 3 um kein echtes Ferredoxin handelt sondern lediglich um ein Protein mit einer Ferredoxin-ähnlichen Faltung.

Flavodoxin

Im Vorfeld der Arbeiten mit dem Flavodoxin wurde bereits in der Gruppe von Prof. Dr. Vlada Urlacher (Institut für Biochemie II der Heinrich Heine Universität Düsseldorf) eine Bachelorarbeit durchgeführt, bei der die Expression und Aufreinigung des Flavodoxins untersucht wurde (Krüger, 2013). Dabei konnte festgestellt, dass das Expressionslevel des Proteins sehr niedrig und das Flavodoxin nur über einen Western Blot nachzuweisen war. Genauere Analysen des zugehörigen Gens ergaben, dass viele der vorhandenen Codons des Flavodoxingens in *E. coli* nur selten verwendet werden, was die geringe Expression hervorrufen kann. Daher wurde für die vorliegende Arbeit das Flavodoxingen für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert, als synthetisches Gen bestellt und in Expressionsstudien eingesetzt, um geeignete Bedingungen zur löslichen Expression von Fldx-s. zu finden. Selbst unter den besten Expressionsbedingung (*E. coli* C43 (DE3) pET42b_Tfu_3023-synth bei 30 °C in TB-Medium) wurde der Großteil des Zielproteins nicht in der löslichen Fraktion, sondern in Form von *inclusion bodies* in der Pelletfraktion gefunden. Eine Ursache dafür kann ein sehr hohes Expressionslevel sein, in dessen Folge die Proteine nicht genügend Zeit zur Faltung haben und aggregieren. Zudem kann die Bildung der *inclusion bodies* möglicherweise auf die unnatürlichen Expressionsbedingungen zurückgeführt werden. So besteht die Möglichkeit, dass für eine korrekte Faltung beispielsweise eine andere Wachstumstemperatur benötigt wird, oder dass in *E. coli* Chaperone fehlen, die für die Faltung des *T. fusca*-Flavodoxins essentiell sind. Weitere Experimente zeigten, dass weder niedrigere Expressionstemperaturen (20 bzw. 25 °C) noch geringere Induktorkonzentrationen den löslichen Flavodoxinanteil erhöhen konnten. Stattdessen wurde

lediglich eine Abnahme der Fldx-s.-Gesamtexpression unter diesen Bedingungen festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bildung von *inclusion bodies* nicht durch ein zu hohes Expressionslevel sondern die unnatürlichen Expressionsbedingungen verursacht wurde.

Während die Expression des Flavodoxins mit einem C-terminalen His-Tag zumindest zur Bildung geringer Mengen löslichen Fldx-s. führte, konnte bei der Expression mit N-terminalem His-Tag keine lösliche Expression nachgewiesen werden. Es ist daher möglich, dass sich der N-terminale His-Tag in diesem Fall negativ auf die Expression bzw. Faltung des Proteins ausgewirkt hat. Nach der Expression verfügt das Fldx-s. durch den N-terminalen His-Tag bei einer Gesamtlänge von 190 Aminosäuren über einen zwanzig Aminosäuren langen Überhang am N-Terminus. Dieser N-terminale Überhang könnte einen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Flavodoxins haben und somit eine Fehlfaltung hervorrufen. Diese Vermutung steht im Gegensatz zu der bezüglich der Ferredoxinexpression geäußerten Theorie, in deren Folge sich der N-terminale His-Tag als Expressionsstartpunkt positiv auf die Expression auswirkt.

Im Rahmen der bereits zuvor genannten Bachelorarbeit im Institut von Prof. Dr. Vlada Urlacher (Krüger, 2013) wurde das Flavodoxin über einen mittels PCR eingebrachten C-terminalen His-Tag und IMAC aufgereinigt. Anschließend wurden mit der Größenausschlusschromatographie, der Ultrafiltration sowie der Dialyse verschiedene Methoden getestet, um nach der Aufreinigung das Imidazol wieder zu entfernen. Doch unabhängig von der verwendeten Methode resultierte die Entfernung des Imidazols in der Präzipitation und damit Denaturierung des Proteins. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst von der Aufreinigung des Flavodoxins mittels IMAC abgesehen und stattdessen Ionenaustauschchromatographie und hydrophobe Interaktionschromatographie zur Aufreinigung von Fldx-s. getestet. Dazu wurde zunächst eine Kationenaustauschersäule (SP-Sepharose) bei pH 7,0 eingesetzt. In der Folge wurde festgestellt, dass das Fldx-s. trotz eines theoretischen isoelektrischen Punkts von 8,1 nach dem Aufreinigungsdurchgang fast ausschließlich im Durchfluss nachgewiesen wurde. Bei Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) bei gleichem pH wurde dagegen eine stärkere Interaktion zwischen dem Zielprotein und dem Säulenmaterial beobachtet. Daher kann festgestellt werden, dass das Fldx-s. unter den gegebenen Bedingungen auf seiner Oberfläche mehr negativ als positiv geladene Aminosäuren aufweist.

Die getesteten Verfahren der hydrophoben Interaktionschromatographie (Butyl- bzw. Phenyl-Sepharose) ließen eine starke Interaktion des Flavodoxins mit den Säulenmaterialien erkennen, da entweder reines ddH₂O zur Elution oder gar NaOH oder Isopropanol zum Lösen des Proteins eingesetzt werden mussten. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ein Teil des Flavodoxins durch die Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial auf der Säule ausgefallen ist und daher so schwierig wieder

abzulösen war. Des Weiteren ist möglich, dass die Fldx-s.-Oberfläche über große und/oder stark hydrophobe Bereiche verfügt, oder dass die hydrophobe Oberfläche des Säulenmaterials zur Entfaltung des Flavodoxins beitrug. Die in reinem ddH₂O eluierten Fraktionen der hydrophoben Interaktionschromatographien wurden jeweils mit Elutionspuffer versetzt und aufkonzentriert. Dabei wurde eine Denaturierung des Proteins ersichtlich, da es ausfiel und sich auf der Filtermembran absetzte. Vermutlich lag die geringe Stabilität daran, dass keine nativen Bedingungen vorlagen und dass die Elution in reinem ddH₂O destabilisierend auf das Zielprotein gewirkt hatte, da zunächst keine Komponenten vorhanden waren, die stabilisierende Wechselwirkungen ausbilden konnten.

Des Weiteren wurde die verlängerte Flavodoxinvariante Fldx-s.-e. untersucht, da in einer alten Annotierung des *T. fusca*-Genoms ein alternatives Startcodon 72 Nukleotide vor dem Startcodon des aktuell annotierten Tfu_3023-Gens entdeckt worden war. Fldx-s.-e. weist somit im Vergleich zum Fldx-s. einen 24 Aminosäuren langen Überhang am N-Terminus auf. Um auszuschließen, dass in der aktuellen Annotierung ein Fehler vorliegt und in der Folge mit einer verkürzten Variante gearbeitet wird, wurde eine 5'-verlängerte Genvariante (Tfu_3023-synth-elong) erzeugt und die heterologe Expression mit verschiedenen Expressionsstämmen und bei verschiedenen Bedingungen getestet. Dabei wurde generell eine schwache Expression festgestellt, was darauf hinweist, dass entweder die Flavodoxinexpression durch den N-terminalen Überhang negativ beeinflusst oder das Fldx-s.-e. fehlgefaltet und abgebaut wurde. Wie bereits im Fall der Ferredoxine erwähnt, könnte das Fldx-s.-e. zudem den Stoffwechsel der Wirtszellen beeinflussen, indem es die Elektronen auf andere Proteine oder Moleküle in der Zelle überträgt. Möglicherweise könnte das Flavodoxin die dafür notwendigen Elektronen wiederum von der *E. coli*-Flavodoxinreduktase erhalten haben.

Trotz der eingangs beschriebenen Probleme beim Pufferaustausch, wurde ein Versuch unternommen, die verlängerte Flavodoxinvariante Fldx-s.-e. über IMAC aufzureinigen, da der Einsatz der oben erwähnten Methoden zur Aufreinigung von Fldx-s. nicht erfolgreich war. Durch die Verlängerung am N-Terminus bestand zudem die Möglichkeit, dass es sich bei Fldx-s.-e. um ein stabileres Protein handelt. Zwar konnte bei der Aufreinigung sehr sauberes Fldx-s.-e. bei einer Imidazolkonzentration von 500 mM von der Säule eluiert werden, aber beim anschließenden Aufkonzentrieren und Pufferaustausch ging die gelbe Färbung verloren und es wurde ein starker Proteinausfall beobachtet. Somit hatte der N-terminale Überhang keinen positiven Einfluss auf die Stabilität des Flavodoxins. Es ist darüber hinaus möglich, dass wiederum das Imidazol stabilisierend auf das Protein wirkte und dass dieser stabilisierende Effekt mit abnehmender Imidazolkonzentration immer geringer wurde.

Ferredoxinreduktasen

Die heterologe Expression von Ferredoxinreduktasen in *E. coli* ist häufig durch die geringe Stabilität der Zielproteine und niedrige Expressionslevel limitiert (Broadbent und Cartwright, 1974; Ewen et al., 2012; Hussain und Ward, 2003; Ramachandra et al., 1991). Allerdings war in diesem Fall die Identifikation geeigneter Expressionsbedingungen für die lösliche Expression der *T. fusca*-Ferredoxinreduktasen im Vergleich zu den Ferredoxinen und zum Flavodoxin deutlich einfacher. So konnten auf Anhieb sehr gute Expressionsbedingungen für die lösliche Expression von FdR 7 und FdR 9 identifiziert werden. Das Expressionslevel von FdR 5 fiel zwar nicht sehr hoch aus, der Anteil an löslichem Zielprotein war jedoch ausreichend für die spätere Proteinaufreinigung. Im Fall von FdR 6 (Gen im pET28a(+)) führte nur die Coexpression mit Fdx 4 (Gen im pIT2) zu einer löslichen FdR 6-Expression, auch wenn der lösliche Anteil der FdR 6-Gesamtexpression vergleichsweise gering ausfiel. Dieser Coexpressionsansatz wurde aufgrund der benachbarten Lokalisierung der entsprechenden Gene im *T. fusca*-Genom untersucht. So bestand die Vermutung, dass die resultierenden Proteine miteinander kooperieren und das Vorhandensein des einen Proteins in der Zelle sich stabilisierend auf die Produktion des putativen Redoxpartners auswirken könnte. Es wurde schon bei der Fdx 4-Expression gezeigt, dass die Expression des Ferredoxins durch die Coexpression mit FdR 6 verbessert werden konnte. Dies wurde auf eine mögliche Stabilisierung der korrekt gefalteten Ferredoxinstruktur durch die FdR 6 zurückgeführt, da bereits beschrieben wurde, dass sich Redoxproteine stabilisierend auf die Faltung von coexprimierten Proteinen auswirken können (Hussain und Ward, 2003). Daher liegt auch im vorliegenden Fall wahrscheinlich eine Stabilisierung der FdR 6 durch das coexprimierte Fdx 4 vor. Bei Verwendung des Plasmids pACYCDuet™ als Coexpressionssystem von Fdx 4 und FdR 6 konnte keine FdR 6-Expression zweifelsfrei nachgewiesen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei pACYC um ein *low copy*-Plasmid handelt, so dass während der Transkription weniger mRNA gebildet wird als bei einem *high copy*-Plasmid. Dies wiederum wirkt sich auf die anschließende Translationsrate und somit das Expressionslevel aus.

Im Fall der Ferredoxine wurde das Vorkommen seltener Codons in der Gensequenz als ein Grund für deren geringe Expression genannt. Eine Codonanalyse der Ferredoxinreduktasegene mit Hilfe eines Browser-gestützten Programms (*E. coli* Codon Usage Analysis 2.0) ergab, dass 14 – 20 % der entsprechenden Codons selten in *E. coli* verwendet werden. Damit ist der Anteil an Codons, die in *E. coli* selten vorkommen, in den verwendeten Ferredoxinreduktase- und Ferredoxingenen ähnlich hoch (Ferredoxingene: 10 – 18 %). Es muss daher einen anderen Grund geben, warum die Reduktasen prinzipiell deutlich besser exprimiert werden konnten als die Ferredoxine. Wie bereits erwähnt, wird vermutet, dass die Ferredoxine auf die für viele Stoffwechselwege entscheidende Elektronenübertragung einwirken und dadurch den Stoffwechsel der Zelle beeinflussen. Dies kann

wiederum zu einer niedrigeren Expression führen. Ferredoxinreduktasen können die reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH oxidieren und somit das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Cofaktor innerhalb der Zelle beeinflussen. Weiterhin können Ferredoxinreduktasen die dabei erhaltenen Elektronen zur Reduktion von anderen Elektronentransferproteinen oder kleineren Molekülen (wie Sauerstoff) nutzen. Daher können auch Ferredoxinreduktasen den Redoxzustand und somit den Stoffwechsel der Zelle beeinflussen. Offenbar hat dies jedoch keinen großen Effekt auf die Expression der Proteine, sodass kein eindeutiger Grund für die im Vergleich zu den Ferredoxinen bessere Expression der Ferredoxinreduktasen genannt werden kann.

Ähnlich wie die Expression, verlief die Aufreinigung der Ferredoxinreduktasen vergleichsweise problemlos. Alle aufgereinigten Reduktasen wiesen eine deutliche FAD-spezifische Gelbfärbung auf. Das Vorhandensein dieser prosthetischen Gruppe ist Voraussetzung für den Elektronentransfer und somit für die Aktivität. Die Aufreinigungen von FdR 7 und FdR 9 funktionierten ohne jegliche Komplikation und es konnten insgesamt 429 mg FdR 7 sowie 159 mg FdR 9 mit einer Reinheit von ca. 80 % bzw. 90 % isoliert werden. Bei der Aufreinigung von FdR 5 kam es zu größeren Proteinverlusten, da während der über Nacht-Lagerung bei 4 °C ein Teil des Zielproteins in den Fraktionen nach der Aufreinigung ausfiel. Es lag jedoch noch genügend Reduktase in gelöster Form vor, da entsprechende SDS-Gele deutliche Banden für FdR 5 aufzeigten. Es konnten 83 mg FdR 5 isoliert werden und das Konzentrat wies eine Reinheit von etwa 75 % auf. Dass die Ausbeute geringer ausfällt als bei FdR 7 oder FdR 9, liegt neben dem beschriebenen Verlust durch den Proteinausfall ebenfalls an dem geringeren Expressionslevel.

Weitere Probleme gab es bei der FdR 6-Aufreinigung. In diesem Fall kam es während der Aufkonzentrierung der durch die Aufreinigung erhaltenen Zielprotein-haltigen Fraktionen zur Proteinpräzipitation und damit zu einem hohen Proteinverlust. Das mit der FdR 6 coexprimierte Fdx 4 wurde bei der Aufreinigung mittels IMAC entfernt, da es über keinen His-Tag verfügt und es ist durchaus möglich, dass die FdR 6 ohne das Fdx 4 nicht dauerhaft stabil ist. Die im Vergleich zu den Fraktionen höhere FdR 6-Konzentration während der Aufkonzentrierung könnte außerdem erklären, warum die Reduktase erst bei der Aufkonzentrierung und nicht bereits zuvor ausfiel. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass das Zielprotein auf der Membran des Zentrifugalfilters denaturierte. Insgesamt konnten lediglich 34 mg FdR 6 isoliert werden, dafür wies das Protein eine sehr hohe Reinheit von nahezu 100 % auf.

4.1.2 Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität der Ferredoxinreduktasen wurde der KHCF-Assay verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass alle vier aufgereinigten Reduktasen aktiv waren und eine Cofaktorpräferenz für NADH aufweisen. Im Vergleich der verschiedenen *T. fusca*-Reduktasen war FdR 9 mit Abstand die aktivste, gefolgt von FdR 5, FdR 6 und FdR 7. Interessanterweise wiesen FdR 9 und FdR 5 kaum eine Aktivität mit NADPH als Cofaktor auf, welche bei Nutzung von NADH die höchsten Aktivitätswerte aufzeigten. Diese Enzyme sind also sehr spezifisch für NADH. Im Gegensatz dazu waren FdR 6 und insbesondere FdR 7 dazu in der Lage, ebenfalls NADPH als Cofaktor zu nutzen, wenngleich die Aktivitätswerte stets relativ niedrig waren. Die Aktivitätsunterschiede bei Nutzung verschiedener Cofaktoren sind auf die Bindungsaffinität (K_M) der Reduktasen für NADH bzw. NADPH zurückzuführen.

Um geeignete Redoxpartnerkombinationen aus Ferredoxin bzw. Flavodoxin und Ferredoxinreduktase zu finden und um die Ferredoxin- bzw. Flavodoxinaktivität zu untersuchen, wurde der Cytochrom c-Assay durchgeführt. Für die mögliche Reduktion der Ferredoxine bzw. des Flavodoxins konnten die aufgereinigten Reduktasen verwendet werden, da sie alle nachweislich aktiv waren.

Der höchste aller spezifischen Aktivitätswerte wurde für die Kombination von FdR 9 und Fdx 8 mit NADH erreicht. Dieser überstieg sogar den Wert für die Positivkontrolle aus PdR und Pdx. Dies ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass FdR 9 und Fdx 8 effektiv miteinander kooperieren und ein Redoxpaar bilden. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass FdR 9 nicht nur mit Fdx 8 kooperiert, sondern ebenfalls andere Ferredoxine (wie Fdx 2) reduzieren kann, wenngleich der Elektronentransfer offenbar nicht so effektiv abläuft. Das kann beispielsweise an unterschiedlichen Aminosäuren liegen, die an der Wechselwirkung zwischen Reduktase und Ferredoxin beteiligt sind. Zudem ist interessant, dass Fdx 8 offenbar von allen eingesetzten Reduktasen reduziert werden kann, da es in Kombination mit jeder Reduktase in der Lage war, Cytochrom c zu reduzieren. Zwar waren die Aktivitätswerte zusammen mit PdR, FdR 5 und FdR 7 sehr niedrig, aber neben der bereits erwähnten Kombination mit FdR 9 ist auch eine Kooperation mit FdR 6 zu erkennen. Prinzipiell erzielte FdR 6 ebenfalls zusammen mit anderen Proteinen wie Pdx und einer Fdx 4-haltigen Proteinlösung (resultierend aus einer Aufreinigung über eine Q-Sepharose-Säule) zusammen mit NADPH im Vergleich zum Einsatz mit NADH höhere Aktivitätswerte, was etwas überraschend ist, da sie im KHCF-Assay eine klare Präferenz für NADH aufwies. Möglicherweise bewirkt die Interaktion mit dem Ferredoxin eine Konformationsänderung der Reduktase, sodass entweder die Interaktion mit NADH erschwert oder eine Wechselwirkung mit NADPH begünstigt werden könnte. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass die Bindung von NADPH zu strukturellen Änderungen in der Reduktase

führt, welche eine bessere Wechselwirkung mit dem Ferredoxin ermöglichen. Ebenfalls eine Präferenz für NADPH zeigte FdR 7 in den Kombinationen mit Pdx, Fdx 8 und Fdx 2. Dies ist aber weniger verwunderlich, weil bei diesem Enzym bereits im KHCF-Assay die geringsten Unterschiede zwischen der Verwendung der beiden Cofaktoren festgestellt wurden.

Der Einsatz der putativen Ferredoxine Fdx 1, Fdx 3 und Fdx 4 sowie des Flavodoxins in aufgereinigter Form oder in Form von CFE zusammen mit allen verfügbaren aufgereinigten Reduktasen resultierte in keiner signifikanten Aktivität. Dies war für die mittels IMAC aufgereinigten Fdx 1, Fdx 3 und Fdx 4 weniger erstaunlich, da – wie bereits unter Abschnitt 4.1.1 diskutiert – die entsprechenden Konzentrate keine braune Färbung und die Ferredoxine somit keine Eisenschwefelcluster aufwiesen. Dass auch beim Einsatz des entsprechenden Fdx 4-haltigen zellfreien Extrakts keine signifikante Aktivität beobachtet werden konnte, kann verschiedene Gründe haben. So ist es möglich, dass das Expressionslevel zu gering war, um eine signifikante Aktivität in Form von Cytochrom c-Reduktion zu detektieren. Es sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass verschiedene Ferredoxine auch eine unterschiedliche Interaktion mit Cytochrom c aufweisen können. Daher lässt eine über den Cytochrom c-Assay ermittelte niedrige Aktivität nicht unbedingt auf eine schlechte Interaktion des Ferredoxins mit Cytochrom P450 Monooxygenasen schließen. Die geringe Aktivität kann möglicherweise ebenso damit begründet werden, dass zwar der Eisenschwefelcluster in das Ferredoxin eingebaut wurde, das Protein jedoch trotzdem keine vollkommen korrekte Faltung aufwies. In der Folge wäre denkbar, dass die Bindung an die Reduktase gestört wird, was die Reduktion des Ferredoxins durch die Reduktase unterbindet. Auf der anderen Seite ist vorstellbar, dass der Bereich für die Interaktion mit dem Cytochrom c nicht korrekt konfiguriert war und daher keine Elektronen auf dieses Protein übertragen werden konnten. An dieser Stelle sei erneut darauf hingewiesen, dass Fdx 4 bei Einsatz des pET28a(+)-Plasmids einen N-terminalen His-Tag aufweist und dass der N-terminale His-Tag vermutlich v. a. bei kleinen Proteinen die Faltung beeinflussen kann. Es ist weiterhin möglich, dass der His-Tag die Bindung zwischen Reduktase und Ferredoxin stören kann, sofern sich der N-Terminus in der Nähe der Interaktionsfläche zur Wechselwirkung mit der Reduktase befindet. Dies kann nicht ausgeschlossen werden, da sich zwei der möglicherweise zur Bindung des Eisenschwefelclusters benötigten Cysteinreste in der Aminosäuresequenz von Fdx 4 an Position zehn und fünfzehn und somit in nicht allzu weiter Entfernung zum N-Terminus befinden. Da beim Elektronentransfer die Elektronen von der Reduktase auf den Eisenschwefelcluster des Ferredoxins übertragen werden und die Interaktionsfläche der Proteine daher nahe des Eisenschwefelclusters lokalisiert sein muss, besteht in der Folge die Möglichkeit, dass benachbarte Reste an der Elektronenübertragung oder der Interaktion mit der Reduktase beteiligt sind (Hu et al., 1999). Allerdings können ohne Strukturmodell keine eindeutigen Aussagen über die strukturelle

Anordnung der N-terminalen Reste und deren Beteiligung an der Interaktion mit der Reduktase getroffen werden. Mit einer partiell aufgereinigten Fdx 4-haltigen Lösung wurde nur in Kombination mit FdR 6 eine signifikante Aktivität gefunden, was darauf hinweist, dass die beiden Proteine kooperieren. Allerdings ist es schwierig zu beurteilen, ob wirklich das Fdx 4 für diesen Effekt verantwortlich ist, oder andere in *E. coli* vorkommende Redoxproteine, wie das *E. coli*-Flavodoxin oder -Ferredoxine. In diesem Fall müsste das entsprechende *E. coli*-eigene Protein aber spezifisch mit FdR 6 kooperieren, da nur bei dieser Reduktase eine signifikante Aktivität festgestellt werden konnte.

Im Fall des Flavodoxins konnten keine Aktivitätswerte erzielt werden, die sich signifikant von denen der Negativkontrolle unterschieden. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass nicht bekannt ist, ob der Cytochrom c-Assay auch für Flavodoxine geeignet ist, also ob eine Interaktion zwischen Flavodoxin und Cytochrom c stattfindet und das Redoxpotential des Flavodoxins ausreicht, um das im Cytochrom c enthaltende Häm zu reduzieren. Allerdings konnte mittels dieses Assays ebenfalls für die *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenase CYP102K1 und deren verkürzte Variante die Elektronentransferaktivität bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.2.2.1). In diesen Enzymen befindet sich neben der FAD-haltigen Reduktasedomäne eine FMN-haltige Flavodoxin-ähnliche Domäne, welche wahrscheinlich die Elektronen auf das Cytochrom c überträgt. Daher ist es durchaus möglich, dass dieser Assay prinzipiell ebenfalls für nicht mit anderen Domänen fusionierte Flavodoxine geeignet ist. Daher sind die Ergebnisse möglicherweise durch andere Faktoren zu begründen. So besteht die Möglichkeit, dass das Flavodoxin nicht richtig gefaltet und daher inaktiv war. Zwar wies das Flavodoxin eine FMN-charakteristische Gelbfärbung auf, es ist aber trotzdem möglich, dass das Protein nicht vollkommen korrekt gefaltet war. Es kann darüber hinaus sein, dass die Reduktasen nicht mit dem Flavodoxin interagierten, da die Proteine keine geeigneten strukturellen Bereiche zur gegenseitigen Wechselwirkung aufwiesen.

Die optimale Wachstumstemperatur des Ursprungsorganismus *T. fusca* liegt bei 50 – 55 °C und damit handelt es sich um einen thermophilen Organismus (Bachmann und McCarthy, 1991). Es konnte bereits für zahlreiche andere Enzyme aus *T. fusca* gezeigt werden, dass diese bei Temperaturen um 30 °C nur eine geringe Aktivität aufweisen und dass ab 50 °C eine deutliche Aktivitätssteigerung verzeichnet werden kann (Deng et al., 2013; Kleeberg et al., 2005; McGrath und Wilson, 2006; Posta et al., 2004). Daher besteht auch für das Flavodoxin die Möglichkeit, dass höhere Temperaturen notwendig gewesen wären, um eine signifikante Aktivität hervorzurufen.

Bei allen Messungen, bei denen CFE eingesetzt wurde, ist zudem zu berücksichtigen, dass weitere Komponenten des zellfreien Extrakts die Messungen beeinflusst haben könnten. So ist denkbar, dass

der Cofaktor nur in beschränktem Maße für die Reduktion von Cytochrom c zur Verfügung stand, da er durch andere im zellfreien Extrakt vorhandene Enzyme verbraucht wurde.

FdR 9 und Fdx 8 wurden genauer untersucht und deren T_{50} -Werte bestimmt. FdR 9 wies bei einer Temperatur von ca. 59 °C die Hälfte seiner Restaktivität auf. Für Fdx 8 wurde mit etwa 61 °C ein sehr ähnlicher T_{50} -Wert gefunden. Dies zeigt, dass beide Proteine moderat thermoresistent sind. Die von Schallmey et. al. mittels Circular dichroismus bestimmte Schmelztemperatur von CYP154H1 aus *T. fusca* lag bei 67 °C (Schallmey et al., 2011). In einem weiteren Experiment der genannten Studie wurde ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit das Enzym zunächst bei verschiedenen Temperaturen inkubiert, abgekühlt und anschließend dessen Restaktivität bestimmt. Dabei wurde bei 65 °C eine Restaktivität von 54 % erlangt, was in Einklang steht mit der über Circular dichroismus ermittelten Schmelztemperatur. Zur Ermittlung der Restaktivität von CYP154H1 wurde im Vergleich zu FdR 9 und Fdx 8 eine halb so lange Inkubationszeit gewählt. Wird dies in Betracht gezogen, scheint bezüglich der Thermostabilität von CYP154H1 und FdR 9 sowie Fdx 8 kein deutlicher Unterschied zu bestehen. Die gefundenen T_{50} -Werte für FdR 9 und Fdx 8 stehen zudem in Einklang mit der Tatsache, dass es sich bei *T. fusca* um einen thermophilen Organismus handelt.

4.1.3 Biokatalyse

Nach erfolgter Expression und Aktivitätsbestimmung wurden die Elektronentransferproteine aus *T. fusca* in Biokatalysen mit CYP154H1 und den zwei Steroid-hydroxylierenden Enzymen CYP154C5 (aus *N. farcinica*) und CYP106A2 (aus *B. megaterium*) eingesetzt, um thermostabile Redoxpartner für Cytochrom P450 Monooxygenasen zu identifizieren. Unabhängig von den eingesetzten Proteinen wurden dabei allerdings keine im Vergleich zu den Negativkontrollen signifikant höheren Umsätze erzielt, während die Umsätze der Positivkontrolle deutlich höher lagen. Unter der Annahme, dass die untersuchten Redoxproteine aktiv waren und eine korrekte Faltung aufwiesen, wurde daher geschlossen, dass sich unter den getesteten Proteinen weder die natürlichen Elektronentransferpartner für CYP154H1 noch Redoxpartner für CYP154C5 oder CYP106A2 befanden.

Es stellt sich daher speziell für CYP154H1 die Frage, warum offenbar mit keiner der getesteten Elektronentransferproteinkombinationen aus *T. fusca* eine Reduktion der Cytochrom P450 Monooxygenase erzielt werden konnte, die in der Folge zu signifikanten Umsätzen geführt hätte.

Zunächst ist es prinzipiell möglich, dass die Reaktionsbedingungen der Biokatalyse für die Elektronentransferproteine aus *T. fusca* nicht optimal gewesen sein könnten. Allerdings herrschten während der Biokatalyse in Bezug auf den pH-Wert ähnliche Bedingungen wie beim Cytochrom c-Assay, wo zumindest für manche der getesteten Kombinationen zweifelsfrei eine Kooperation

nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Elektronentransferproteine aufgrund der unterschiedlichen Struktur von Cytochrom P450 Monooxygenasen und Cytochrom c nicht unbedingt in der Lage sind, Elektronen auf Cytochrom P450 Monooxygenasen zu übertragen, obschon sie in dem erwähnten Assay Cytochrom c reduzieren konnten. Um auszuschließen, dass höhere Temperaturen für eine Aktivität der Elektronentransferproteine aus *T. fusca* ausschlaggebend sind, wurden ebenfalls Biokatalysen bei 50 °C durchgeführt. Diese führten keineswegs zu höheren Umsätzen, sondern es konnte kaum Substratumsatz verzeichnet werden, wobei die geringe Stabilität der Cofaktoren bei dieser Temperatur auch eine mögliche Rolle spielen kann (Alivisatos et al., 1965).

Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass die Reaktionsbedingungen die Katalyse an sich in einem hohen Maße negativ beeinflussten. Diese Aussage wird zudem dadurch bekräftigt, dass mit der Positivkontrolle stets Umsatz nachgewiesen werden konnte, was beweist, dass die Cytochrom P450 Monooxygenasen aktiv waren und dass ein Elektronentransfer prinzipiell möglich war. Offensichtlich konnten die getesteten Ferredoxine bzw. das Flavodoxin nicht ausreichend mit den Cytochrom P450 Monooxygenasen interagieren bzw. einen Elektronentransfer gewährleisten. Dies kann natürlich daran liegen, dass zumindest manche dieser putativen Shuttleproteine inaktiv waren, was womöglich für Fdx 1 und das Flavodoxin der Fall war, oder dass die verfügbaren Reduktasen nicht in der Lage waren, Elektronen auf Fdx 1 und das Flavodoxin zu übertragen (siehe Abschnitt 4.1.2). Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, handelt es sich dagegen bei Fdx 3 wahrscheinlich um gar kein Ferredoxin, sondern lediglich ein Protein mit Ferredoxin-ähnlicher Struktur, sodass es nicht erstaunlich ist, dass mit diesem Protein keine Aktivität und kein signifikanter Umsatz festgestellt wurde.

Es bleibt zu diskutieren, warum der Einsatz von Fdx 2, Fdx 4 und Fdx 8 in keiner signifikanten Produktbildung resultierte. Es ist denkbar, dass im Fall von Fdx 4 einfach das Expressionslevel zu niedrig war (siehe Abschnitt 4.1.1). Eine weitere Möglichkeit bezieht sich auf die Rolle der Aminosäuren, die in Ferredoxinen für die Interaktion mit den getesteten Cytochrom P450 Monooxygenasen notwendig sind. So ist es möglich, dass die für Bindung und Elektronentransfer notwendigen Bereiche in den eingesetzten Ferredoxinen nicht vorhanden waren oder in einer ungünstigen Konformation vorlagen. Im zweiten Fall wäre wiederum denkbar, dass der N-terminale His-Tag die Interaktion mit den Cytochrom P450 Monooxygenasen bzw. den Elektronentransfer beeinflusst. So wurde für P450_{mor} aus *Mycobacterium* sp. im Vergleich zum Ferredoxin ohne His-Tag ein deutlich niedrigerer Umsatz festgestellt, wenn das eingesetzte Ferredoxin einen His-Tag enthielt, was auf einen ineffizienten Elektronentransfer zurückgeführt wurde (Sielaff und Andreessen, 2005). Diese Erklärung könnte ebenfalls auf die untersuchten Ferredoxine aus *T. fusca* zutreffen,

wobei zumindest im Fall von Fdx 4 auch das Protein ohne His-Tag (über pACYC exprimiert) zusammen mit CYP154H1 zu keiner eindeutigen Verbesserung der Biokatalyse führte. Dies kann jedoch wiederum an der geringen Ferredoxinexpression liegen, welche – wie bereits diskutiert – häufig beobachtet wurde, wenn das Ferredoxin ohne N-terminalen His-Tag exprimiert wurde wie im vorliegenden Fall.

Für das P450cam-System konnte gezeigt werden, dass Pdx für CYP101A1 (P450cam) eine Effektorrolle einnimmt. Im Rahmen dieser Effektorfunktion überführt Pdx die Cytochrom P450 Monooxygenase von der weniger favorisierten geschlossenen, substratgebundenen Form (*high spin*) in den offenen, substratfreien Zustand (*low spin*) (Tripathi et al., 2013). Diese starken strukturellen Änderungen in P450cam ermöglichen die Produktfreisetzung und tragen damit zur Hydroxylierung des Substrats bei (Zhang et al., 2008; Lee et al., 2010). Es ist daher möglich, dass die getesteten Cytochrom P450 Monooxygenasen eine Effektorfunktion benötigen, aber dass die eingesetzten *T. fusca*-Ferredoxine nicht über die notwendigen strukturellen Bereiche zur Ausübung der Effektorrolle verfügen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die erwähnte Effektorfunktion bisher nur für Pdx und für kein anderes Ferredoxin beschrieben wurde. Des Weiteren ist die Sequenzidentität zwischen Pdx und den Ferredoxinen aus *T. fusca* äußerst gering. Zwar weisen zumindest Fdx 1 und Fdx 3 im Vergleich laut einer BLAST-Suche eine Sequenzidentität von 43 bzw. 42 % zu Pdx auf, aber für alle anderen getesteten Ferredoxine aus *T. fusca* war es nicht möglich eine signifikante Sequenzidentität zu Pdx nachzuweisen. Es ist daher äußerst fraglich, ob die Ferredoxine aus *T. fusca* genauso funktionieren wie Pdx.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Fdx 4 und Fdx 8 zwar über geeignete Bereiche zur Interaktion mit Cytochrom P450 Monooxygenasen verfügen, diese aber spezifisch sind für CYP217A1 bzw. CYP222A1. Diese Aussage basiert auf der Tatsache, dass die jeweiligen Gene im Genom von *T. fusca* in beiden Fällen in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Das Gen für Fdx 4 (Tfu_1226) liegt direkt hinter dem Gen für CYP217A1 (Tfu_1225) und vor dem Gen des putativen Redoxpartners FdR 6 (Tfu_1227). Im Fall von Fdx 8 flankieren die Gene für Fdx 8 (Tfu_1275) und FdR 9 (Tfu_1273) das Gen für CYP222A1 (Tfu_1274). In einer Studie über die Charakterisierung von CYP105D5 aus dem Actinomycet *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurden ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit sämtliche bekannte Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen des Organismus kombiniert und in Biokatalysen mit der Cytochrom P450 Monooxygenase eingesetzt, um das natürliche Elektronentransfersystem von CYP105D5 zu identifizieren (Chun et al., 2007). Interessanterweise konnte in der zitierten Publikation nur eines der sechs getesteten Ferredoxine mit CYP105D5 kooperieren, sodass eine spezifische Interaktion vorliegt. Dabei handelte es sich um das Ferredoxin, dessen Gen sich im Genom von *Streptomyces coelicolor* A3(2) direkt hinter dem CYP105D5-Gen befindet. Es kann daher

sein, dass Fdx 4 und Fdx 8 spezifisch nur mit CYP217A1 bzw. CYP222A1 interagieren. Dies würde begründen, warum der Einsatz dieser Ferredoxine in Biokatalysen mit anderen Cytochrom P450 Monooxygenasen zu keinem signifikanten Umsatz führte. In den vorherigen Abschnitten wurden bereits zahlreiche Hinweise dafür genannt, dass Fdx 4 und FdR 6 sowie Fdx 8 und FdR 9 Redoxpaare bilden. So wurde beispielsweise im Fall von Fdx 4 und FdR 6 festgestellt, dass die lösliche Expression durch Coexpression des entsprechenden putativen Redoxpartners jeweils verbessert wurde (siehe Abschnitt 4.1.1). Im Rahmen der Aktivitätsbestimmungen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass bei Verwendung einer partiell aufgereinigten Fdx 4-haltigen Proteinlösung nur in Kombination mit FdR 6 und mit keiner anderen getesteten Reduktase eine signifikante Aktivität festgestellt werden konnte. Bei Einsatz von FdR 9 war die Aktivität zusammen mit Fdx 8 mit Abstand am höchsten und übertraf sogar die Aktivitätswerte der Positivkontrolle (siehe Abschnitt 4.1.2). Es gilt also als sicher, dass die genannten Ferredoxine jeweils mit den im Genom benachbarten Ferredoxinreduktasen kooperieren, sodass es auch recht wahrscheinlich ist, dass die Ferredoxine Elektronen auf die im Genom benachbarten Cytochrom P450 Monooxygenasen übertragen können.

Ein ungeeignetes Redoxpotential der putativen Elektronentransferproteine stellt einen weiteren möglichen Grund dafür dar, dass die Biokatalyse mit den verschiedenen Cytochrom P450 Monooxygenasen in Kombination mit den getesteten Ferredoxinen bzw. dem eingesetzten Flavodoxin nicht funktioniert hat. Weisen diese Proteine ein Redoxpotential auf, das nicht negativ genug ist, besteht die Möglichkeit, dass keine Elektronen auf das Häm übertragen werden und keine Katalyse stattfindet. Ferredoxine beispielsweise können abhängig von der Eisenschwefelclusterart und der Funktion verschiedene Redoxpotentiale aufweisen (Stephens et al., 1996). Im Allgemeinen weisen Ferredoxine mit einem [4Fe-4S]-Cluster häufig sehr negative Redoxpotentiale von um die -400 mV oder negativer auf (Langen et al., 1992), was ebenfalls auf solche [4Fe-4S]-Ferredoxine zutrifft, die mit Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperieren (Green et al., 2003). Bei [2Fe-2S]-Ferredoxinen weisen dagegen Ferredoxine zur Reduktion von P450-Enzymen (wie Pdx und Adx) in der Regel positivere Redoxpotentiale (etwa -250 mV) auf als Ferredoxine, die an der Biosynthese von Eisenschwefelclustern beteiligt sind (etwa -350 mV) (Ewen et al., 2011; Grinberg et al., 2000; Jung et al., 1999; Schiffler et al., 2004; Sligar et al., 1974; Ta und Vickery, 1992). Des Weiteren ist das Redoxpotential von Ferredoxinen mit [3Fe-4S]-Cluster oftmals geringfügig negativ (Bruschi und Guerlesquin, 1988; Cammack et al., 1977; McLean et al., 2006). Zwar wurden bisher bereits einige [3Fe-4S]-Ferredoxine beschrieben, deren Kooperation mit Cytochrom P450 Monooxygenasen experimentell nachgewiesen werden konnte (Chun et al., 2007; McLean et al., 2006; Poupin et al., 1999; Sielaff et al., 2001), das einzige gut charakterisierte Beispiel ist jedoch lediglich das autologe Ferredoxin für CYP51 aus *Mycobacterium tuberculosis* (McLean et al., 2006). Für dieses Redoxprotein

wurde ein vergleichsweise positives Redoxpotential von -31 mV gemessen. Interessanterweise konnte trotz des wenig negativen Redoxpotentials des Ferredoxins eine Katalyse mit CYP51 erzielt werden, da die Elektronenübertragung von der verwendeten Reduktase auf das Ferredoxin ein deutlich negativeres Redoxpotential aufwies. Dadurch wird die Elektronenübertragung von NADPH über die gesamte Elektronentransferkette (Reduktase und Ferredoxin) auf die Cytochrom P450 Monooxygenase thermodynamisch möglich, sodass die Reduktion des P450-Enzyms und in der Folge Substratumsatz erfolgen kann. Es wurde geschlussfolgert, dass der Zwischenschritt des Elektronentransfers vom Ferredoxin auf CYP51 vermutlich von regulativer Bedeutung ist und die Geschwindigkeit der CYP51-katalysierten Demethylierungsreaktion steuert. Somit ist das beschriebene positive Redoxpotential des Ferredoxins möglicherweise auf eine thermodynamische Hürde bezüglich des Elektronentransfers zwischen dem beschriebenen Ferredoxin und der assoziierten CYP51 zurückzuführen (McLean et al., 2006). Weist also ein Ferredoxin ein nur geringfügig negatives Redoxpotential auf, ist eine Elektronenübertragung vom Ferredoxin auf die zugehörige Cytochrom P450 Monooxygenase nicht unbedingt ausgeschlossen. Die Modulierung des Redoxpotentials des Häms der entsprechenden Cytochrom P450 Monooxygenase spielt dabei ebenfalls eine wichtige Rolle und hängt beispielsweise von der Substratbindung ab (Poulos, 2014).

Überdies ist nicht ausgeschlossen, dass für die Biokatalyse mit CYP154H1 andere Elektronentransferproteine aus *T. fusca* benötigt werden, die in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wurden, da sie nicht über Sequenzabgleiche und Annotierungen gefunden werden konnten. Es kann zudem sein, dass zwar noch das Gen für CYP154H1 im Genom vorhanden ist, die Gene für die entsprechenden Elektronentransferpartner allerdings im Laufe der Evolution von *T. fusca* verloren gegangen sind. So könnten womöglich andere Cytochrom P450 Monooxygenasen die Funktion von CYP154H1 weitgehend übernommen haben. Es ist ebenfalls möglich, dass *T. fusca* beispielsweise durch horizontalen Gentransfer zwar das Gen für CYP154H1, aber nicht die Gene für die funktionellen Redoxpartner aufgenommen hat. In der Folge hätte CYP154H1 in *T. fusca* womöglich gar keine Funktion.

Es stellt sich ebenfalls die Frage, warum PdR und Pdx so viel besser dazu in der Lage sind, Elektronen auf die untersuchten Cytochrom P450 Monooxygenasen zu übertragen als die getesteten Redoxproteinkombinationen aus *T. fusca*. Die Kombination aus PdR und Pdx wurde bereits als Ersatzsystem für eine Vielzahl von Cytochrom P450 Monooxygenasen, u. a. auch für CYP154E1 aus *T. fusca* verwendet (O’Keefe et al., 1991; Agematu et al., 2006; Chun et al., 2007; Girhard et al., 2010; Bogazkaya et al., 2014), für die die natürlichen Redoxpartner ebenfalls nicht bekannt sind. Möglicherweise kann die Fähigkeit von Pdx, Elektronen auf viele verschiedene P450-Enzyme übertragen, auf ein vorteilhaftes Redoxpotential oder auf besondere strukturelle Eigenschaften

zurückgeführt werden. Für Letzteres ist beispielsweise vorstellbar, dass die Kontaktfläche von Pdx, die normalerweise die Bindung mit P450cam eingeht und den Elektronentransfer ermöglicht, Aminosäurereste aufweist, welche die Interaktion mit vielen anderen Cytochrom P450 Monooxygenasen ermöglichen.

Darüber hinaus wurde für CYP105D5 aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) festgestellt, dass die Cytochrom P450 Monooxygenase bezüglich der Redoxpartner aus dem Ursprungsorganismus sehr selektiv ist, aber gleichzeitig mit verschiedenen heterologen Elektronentransfersystemen aus Bakterien und Pflanzen kooperieren kann (Chun et al., 2007). Im Vergleich zum autologen Redoxsystem lief dabei die Biokatalyse bei Verwendung der heterologen Redoxpartner mit ähnlicher Effizienz ab. Außerdem wurde bereits für zwei Cytochrom P450 Monooxygenasen aus *Sorangium cellulosum* demonstriert, dass die Biokatalyse mit einem heterologen Elektronentransfersystem (in diesem Fall AdR und Adx) durchaus effizienter ablaufen kann als mit dem autologen (Khatri et al., 2010). Daher scheint es für bakterielle Cytochrom P450 Monooxygenasen nicht unbedingt ungewöhnlich zu sein, dass heterologe Redoxproteine im Vergleich zum natürlichen Elektronentransfersystem ähnlich gut oder sogar besser für die Elektronenübertragung geeignet sind. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit kein geeignetes autologes Elektronentransfersystem für CYP154H1 identifiziert werden, um einen ähnlichen Vergleich aufzustellen.

Bei der Biokatalyse mit CYP154H1 konnten überraschenderweise selbst mit der Positivkontrolle in der Regel nur geringe Umsätze erzielt werden (siehe Abschnitt 3.1.3.1). Diese Umsätze lagen dabei deutlich unterhalb der bereits publizierten Werte (Schallmey et al., 2011). Dass die für die Biokatalysen eingesetzten Proteine prinzipiell aktiv waren, wurde vor den Versuchen stets überprüft (CYP154H1: CO-Differenzspektrum, PdR & Pdx: Cytochrom c-Assay). Es könnte also sein, dass eines oder mehrere der Proteine unter den gegebenen Bedingungen über keinen längeren Zeitraum stabil waren, oder dass eine Inhibition eines der Proteine vorlag. Ein Unterschied zu der zitierten Arbeit lag in der Aufreinigung von CYP154H1. Statt einer Hitzefällung und anschließender Ionenaustauschchromatographie zu Beginn der Aufreinigung, wurde das Enzym direkt über die IMAC aufgereinigt. Die Inkubation bei hohen Temperaturen kann speziell bei Enzymen aus thermophilen Organismen zu einer Aktivierung führen, die auf Hitze-induzierten strukturellen Änderungen basiert (Klump et al., 1992; Dowling et al., 1982). Der Einfluss der Inkubation bei 50 °C auf die Aktivität von CYP154H1 wurde deshalb in einer der Biokatalysen untersucht, indem das aufgereinigte Enzym vor dem Einsatz in der Reaktion für 20 min bei der genannten Temperatur behandelt wurde. Es wurden jedoch im Vergleich zu dem entsprechenden Ansatz mit unbehandeltem Enzym keine besseren Umsätze erzielt. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch Imidazolreste von der

IMAC in dem CYP154H1-Konzentrat anwesend waren, obschon beim Puffertausch und bei der Entsalzung darauf geachtet wurde, sämtliches Imidazol zu entfernen. Imidazol ist ein bekannter P450-Inhibitor (Correia und Montellano, 2005; Testa und Jenner, 1981), sodass es sein kann, dass die Aktivität von CYP154H1 durch Imidazolreste negativ beeinflusst wurde. Möglicherweise wirkte auch eine andere in den Reaktionsansätzen vorhandene Komponente inhibierend auf eines der Enzyme. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kupferionen Cytochrom P450 Monooxygenasen inhibieren können (Kim et al., 2002). Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die eingesetzte GDH durch das zum Lösen der Substrate genutzte Lösungsmittel (Ethanol bzw. DMSO) – trotz des geringen prozentualen Volumenanteils von 1 % – inaktiviert wurde. In der Folge wäre nach einer gewissen Reaktionszeit der Cofaktor verbraucht gewesen und dieser hätte limitierend gewirkt auf die Reaktion, sodass keine weitere Produktbildung stattfinden konnte. Der genaue Grund für die prinzipiell geringen Umsätze bleibt jedenfalls ungeklärt.

Wie in Abschnitt 3.1.3 gezeigt, kam es bereits in den Negativkontrollen zur reproduzierbaren Produktbildung, sobald eine der getesteten Cytochrom P450 Monooxygenasen und zellfreier Extrakt von *E. coli* kombiniert wurden. Dies weist darauf hin, dass *E. coli* Redoxproteine enthält, welche Elektronen auf Cytochrom P450 Monooxygenasen übertragen können. Zwar besitzt *E. coli* keine Cytochrom P450 Monooxygenase, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die bereits unter Abschnitt 4.1.2 erwähnte Kombination aus *E. coli*-FdR und -Flavodoxin in der Lage ist, Elektronen auf eine bovine Cytochrom P450 Monooxygenase (P450c17) zu übertragen (Jenkins und Waterman, 1994). Darüber hinaus konnte diese Kombination ebenfalls als Redoxersatzsystem für die Biokatalyse mit weiteren Cytochrom P450 Monooxygenasen angewendet werden (Yamazaki et al., 1995; Chun et al., 2007; Girhard et al., 2010). Das *E. coli*-Flavodoxin scheint also in der Lage zu sein, Elektronen auf verschiedene Cytochrom P450 Monooxygenasen zu übertragen. Daher ist durchaus vorstellbar, dass das *E. coli*-Flavodoxin ebenfalls mit den eingesetzten Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperieren konnte. Dabei ist es irrelevant, ob es von der *E. coli*-FdR oder von einer der getesteten *T. fusca*-Reduktasen reduziert wurde. Möglicherweise interagiert das *E. coli*-Flavodoxin besser mit den eingesetzten Cytochrom P450 Monooxygenasen als die getesteten Redoxproteine aus *T. fusca*, da die beobachteten Umsätze in den Negativkontrollen teils höher waren als in den eigentlichen Ansätzen mit den exprimierten *T. fusca*-Elektronentransferproteinen. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Redoxproteine aus *T. fusca* durchaus mit den eingesetzten Cytochrom P450 Monooxygenasen kooperierten, aber dies aufgrund der höheren Hintergrundaktivität nicht auf die *T. fusca*-Elektronentransferproteine zurückgeführt wurde.

Dass die Umsätze in den Negativkontrollen je nach Ansatz etwas variieren, kann daran liegen, dass manche der eingesetzten Shuttleproteine tatsächlich von den Reduktasen reduziert werden, aber

die Elektronen im Anschluss nicht weiter auf die Cytochrom P450 Monooxygenase übertragen werden. Im beschriebenen Fall würden die Elektronen somit auch nicht für die in *E. coli* vorkommenden Redoxproteine zur Elektronenübertragung auf die Cytochrom P450 Monooxygenase zur Verfügung stehen. In der Folge könnten die Elektronen nicht für die Katalyse genutzt werden und der Umsatz würde geringer ausfallen. Eine weitere Erklärung für die Schwankung zwischen verschiedenen Negativkontrollen ist die mögliche Variation der Expression von *E. coli*-Redoxproteinen. Demnach kann das Expressionslevel dieser Proteine je nach Expressionsansatz unterschiedlich ausfallen, sodass diesbezüglich keine reproduzierbaren Bedingungen vorlagen.

4.2 Untersuchung neuer bakterieller *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen

Mit CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans* und CYP102_{Nmu} aus *Nakamurella multipartia* sollten zwei neuartige bakterielle *self-sufficient* Cytochrom P450 Monooxygenasen charakterisiert werden. Die Sequenzidentität der Häm-domäne dieser Enzyme lag im Vergleich zur CYP102A1-Häm-domäne bei unter 40 %. Dabei sollte untersucht werden, ob die geringe Sequenzidentität auch mit einem unterschiedlichen Substratspektrum einhergeht.

4.2.1 Expression und Aufreinigung

CYP102_{Nmu}

Für die CYP102_{Nmu} konnten keine geeigneten Bedingungen für die lösliche Expression gefunden werden, obwohl verschiedene Expressionsstämme, Plasmide (mit und ohne resultierenden His-Tag) sowie Medien getestet und Einflussfaktoren wie die Kultivierungstemperatur, die Induktorkonzentration, der Induktionszeitpunkt, das Füllvolumen im Erlenmeyerkolben sowie die Aufschlussmethode variiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Keine der getroffenen Maßnahmen führte zu einer Erhöhung des löslichen Proteinanteils. Ein Grund dafür könnte die Codonoptimierung des Gens sein, sodass die Expression an sich zwar sehr gut in *E. coli* funktioniert, aber dem Protein in Folge der schnellen und hohen Expression nicht genügend Zeit zur Faltung bleibt. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass das Enzym spezielle Faltungshelfer benötigt, die in *E. coli* nicht vorhanden sind. Um herauszufinden, ob das Enzym möglicherweise in membrangebundener Form vorliegt und daher stets in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen wurde, wurden Aufschlussversuche mit Triton X-100 durchgeführt. Diese Substanz kann Membranen auflösen und daher membrangebundene Proteine in die lösliche Fraktion überführen. Allerdings wurde das Enzym trotzdem ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen. Zudem konnten mit dem Browser-gestützten DAS-TMfilter-Programm zur Vorhersage von Transmembranbereichen keine entsprechenden Bereiche gefunden werden (Cserző et al., 2002). Prinzipiell liegen bakterielle Cytochrom P450 Monooxygenasen in löslicher Form im Cytosol vor (Hannemann et al., 2007) und diese Ergebnisse bestätigen, dass dies wohl auch auf die CYP102_{Nmu} zutrifft.

Es könnten zukünftig weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um doch noch lösliche CYP102_{Nmu} zu erhalten. Zunächst könnte die Codonoptimierung des CYP102_{Nmu}-Gens variiert werden, um den Einfluss der Codonoptimierung auf die Expression bzw. die Faltung zu untersuchen. Des Weiteren könnte beispielsweise die Coexpression von Chaperonen wie GroEL-GroES, DnaK-DnaJ-GrpE oder dem *trigger factor* (TF) getestet werden. Diese *E. coli*-Hitzeschockproteine ermöglichen beim Auftreten von Zellstress die korrekte Faltung von essentiellen Proteinen (Baneyx und Mujacic,

2004). Darüber hinaus könnte versucht werden, durch Rückfaltung der *inclusion bodies* an lösliche CYP102_{Nmu} zu gelangen.

CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

Im Vergleich zur CYP102_{Nmu} wurden für CYP102K1 relativ schnell geeignete Expressionsbedingungen identifiziert (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Beim Vergleich verschiedener Aufschlussmethoden wurde festgestellt, dass der lösliche Proteinanteil nach dem Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisation am höchsten war, gefolgt von dem Aufschluss durch Ultraschall (Abbildung 3.28). Dies zeigt, dass die Hochdruckhomogenisation zu einem effizienteren Aufschluss der *E. coli*-Zellen führt als die Ultraschallmethode. Trotzdem wurden für die Proben beider Aufschlussmethoden stets noch Zielproteinbanden in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen, was auf einen unvollständigen Zellaufschluss oder auf die Bildung von *inclusion bodies* schließen lässt.

Die identifizierten Bedingungen konnten ohne größere Einbußen in der Zielproteinexpression auf die Expression von CYP102K1-HD und N'-short-CYP102K1 übertragen werden. Es konnte wiederum festgestellt werden, dass der Zielproteinanteil in der löslichen Fraktion bei Aufschluss mittels Hochdruckhomogenisator im Vergleich zum Aufschluss mittels Ultraschall deutlich gesteigert werden konnte (Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35). Demnach können das Expressionslevel von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 und der jeweilige lösliche Anteil an der Expression als annähernd gleich angesehen werden. Das Fehlen des N-terminalen Überhangs scheint sich also nicht negativ auf die Expression oder die Faltung auszuwirken.

Werden die Aufreinigungen von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 verglichen, fällt zunächst auf, dass die Elution von CYP102K1 erst bei etwa 300 mM Imidazol begann, während N'-short-CYP102K1 bereits bei etwa 30 mM Imidazol eluierte. Dies zeigt, dass N'-short-CYP102K1 im Vergleich zu CYP102K1 eher schwach mit der Säule interagiert. Möglicherweise liegt der N-terminale His-Tag von N'-short-CYP102K1 wegen des fehlenden Überhangs weniger frei zugänglich auf der Oberfläche des Enzyms. Bezüglich der Ausbeute konnten knapp 66 mg aktive CYP102K1 bzw. 59 mg aktive N'-short-CYP102K1 aus einem Liter Kultur isoliert werden. Dass der Wert für N'-short-CYP102K1 etwas niedriger ausfällt, lag höchstwahrscheinlich überwiegend an der Verwendung von Zentrifugalfiltern mit zu großem Porendurchmesser (MWCO: 100 kDa). So wurde ein nicht unwesentlicher Anteil des Proteins beim Aufkonzentrieren im Durchfluss wiedergefunden. Die abgeschätzte Reinheit lag in beiden Fällen bei etwa 90 %. Bei der Analyse der Aufreinigung von N'-short-CYP102K1 fiel die im Vergleich zur CYP102K1-Aufreinigung deutlich höhere Gesamtproteinkonzentration im CFE sowie im Konzentrat auf, was beim CFE auf einen besseren Zellaufschluss zurückgeführt werden kann. Allerdings ist gleichzeitig der Gehalt an aktiver P450 in beiden Fällen geringer (ca. 16 % bzw. 76 %),

obwohl für das N'-short-CYP102K1-Konzentrat die gleiche Reinheit wie für das CYP102K1-Konzentrat über SDS-PAGE abgeschätzt werden konnte (90 %). Es ist daher möglich, dass der zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzte Bradford-Assay fehlerbehaftet war. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass restliches Imidazol im Konzentrat vorhanden war und die Proteinkonzentration daher höher schien, obwohl beim Puffertausch und bei der Entsalzung nach der Aufreinigung darauf geachtet wurde, sämtliches Imidazol zu entfernen.

4.2.2 Charakterisierung von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

Biochemische Charakterisierung

Die CO-Differenzspektren von aufgereinigter CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 weisen große Ähnlichkeiten auf (Abbildung 3.36). Daher konnte aus diesem Experiment die wichtige Erkenntnis abgeleitet werden, dass das Fehlen des Überhangs offensichtlich keinen negativen Einfluss auf den Einbau des Häm in die Cytochrom P450 Monooxygenase oder deren prinzipielle aktive Konformation hatte. Jedoch ist in beiden Fällen nach Reduktion und Begasung noch ein deutlicher Peak bei 420 nm erkennbar. Dieser lässt darauf schließen, dass ein Teil der Enzyme fehlgefaltet und somit inaktiv ist, da das Häm teils nicht für das CO zugänglich ist (Martinis et al., 1996). In den Spektren der entsprechenden zellfreien Extrakte nach Begasung und Reduktion trat ebenfalls dieser Peak bei 420 nm auf. Dies weist darauf hin, dass nicht die Aufreinigung oder einer der nachfolgenden Schritte für die partielle Inaktivierung der CYP102K1-Varianten verantwortlich ist. Es ist dagegen denkbar, dass ein Teil der Proteine von vornherein nicht richtig gefaltet war oder durch die im Rahmen der Messung durchgeführte Reduktion mit Natriumdithionit die natürliche Konformation verloren hatte.

Mit Hilfe des Cytochrom c-Assays konnten die Elektronentransferaktivität sowie die Cofaktorpräferenz der CYP102K1-Varianten untersucht werden. Die dabei festgestellte Präferenz für NADPH ist nicht überraschend, da CYP102A1 ebenfalls eine Präferenz für diesen Cofaktor aufweist. Diese Bevorzugung resultiert aus der Bindung der zusätzlichen Phosphatgruppe im NADPH (im Vergleich zu NADH) durch verschiedene CYP102A1-Aminosäurereste (S965, R966, K972 und Y974) (Maurer et al., 2005). Über ein Sequenzalignment (siehe Abschnitt 7.2) konnten entsprechende Positionen in CYP102K1 (S1083, R1084, R1090 und Y1092) bzw. N'-short-CYP102K1 (S1003, R1004, R1010 und Y1012) identifiziert werden. Zwar befindet sich in CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 ein Arginin an Position 1090 bzw. 1010 anstelle des Lysins 972 in CYP102A1, jedoch handelt es sich in beiden Fällen um basische Aminosäuren, die daher über ähnliche Eigenschaften verfügen.

Für die aufgereinigten Enzyme CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 wurden sehr ähnliche spezifische Elektronentransferaktivitätswerte ermittelt. Somit hat der Überhang offenbar keinen Einfluss auf

den Elektronentransfer, was nicht erstaunlich ist, da sich der Überhang am N-Terminus befand und nicht am C-Terminus, wo sich die Reduktasedomäne befindet.

Zur Bestimmung des pH-Optimums von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 wurden die beiden Varianten in Biokatalysen bei verschiedenen pH-Werten (pH 4,0 – 8,5) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 prinzipiell das gleiche pH-Profil aufweisen (Abbildung 3.42). Beide Enzyme sind über einen recht breiten pH-Bereich aktiv und das pH-Optimum befindet sich jeweils im schwach sauren bis neutralen Bereich. Dies steht nahezu im Einklang mit dem Wachstumsverhalten des Ursprungsorganismus, da *Azorhizobium caulinodans* im Bereich zwischen pH 5,5 und 7,8 ein ähnlich gutes Wachstum aufweist (Dreyfus et al., 1988). Allerdings ist es aufgrund der grundlegend unterschiedlichen Bedingungen schwierig, die Stabilität aufgereinigter Enzyme mit der Stabilität von intrazellulären Enzymen zu vergleichen. Größere Abweichungen in der Aktivität von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 sind oberhalb von pH 7,5 und bei pH 5,0 festzustellen, wo N'-short-CYP102K1 jeweils höhere Umsätze erzielte. Es ist vorstellbar, dass die Aktivitätswerte, die bei pH-Werten < 5,5 gefunden wurden, wegen der geringen Cofaktorstabilität bei geringen pH-Werten neben der Enzym- ebenfalls von der NADPH-Stabilität abhängen. Die NADPH-Stabilität ist beispielsweise bei pH 5,0 achtmal geringer als bei pH 6,5 und sinkt weiter mit dem pH-Wert bis zu einem pH von 3; bei basischen pH-Werten (bestätigt bis pH 9,0) ist der Cofaktor dagegen weitgehend stabil (Wu et al., 1986). Da für beide getesteten Varianten dieselben Bedingungen galten, kann die relative Aktivität trotzdem verglichen werden. Darüber hinaus wurde für die Versuche bei pH-Werten < 5,5 aufgrund der geringen GDH-Aktivität unter den gegebenen Bedingungen kein Cofaktorregenerierungssystem verwendet, sondern es wurde NADPH in hohem Überschuss eingesetzt (5 mM Cofaktor mit 0,5 mM Substrat). Dabei kann die Menge an Cofaktor zumindest bei pH 5,0 nicht für beide Varianten limitierend gewesen sein, da N'-short-CYP102K1 bei diesem pH-Wert eine eindeutig höhere Aktivität aufwies als CYP102K1.

Da N'-short-CYP102K1 auch bei den leicht basischen pH-Werten höhere Umsätze erreichte, scheint die verkürzte Variante in diesen pH-Bereichen stabiler zu sein als CYP102K1 mit dem 80 Aminosäuren langen N-terminalen Überhang. Der Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von N'-short-CYP102K1 mit der Aminosäurezusammensetzung des Überhangs in Tabelle 4.1 zeigt, dass in dem Überhang überproportional viel Glycin enthalten ist. Glycin ist ein Helixbrecher und häufig in flexiblen Regionen von Proteinen zu finden. Daher ist vorstellbar, dass der Überhang über keine stabilisierte Sekundärstruktur verfügt und somit das gesamte Protein schneller destabilisiert. Für CYP102A1 wurde gezeigt, dass die Aktivität in einem pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,0 relativ konstant ist, unterhalb von pH 6,5 aber drastisch abnimmt (Miura und Fulco, 1974; Ho und Fulco, 1976). Somit scheint der optimale pH-Bereich für CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 im Vergleich zu

CYP102A1 um etwa eine pH-Stufe zum Säuren verschoben zu sein. So nehmen die Aktivitäten von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 im sauren Bereich erst bei pH-Werten von unter pH 5,5, im neutralen Bereich aber schon bei pH-Werten von über pH 7,0 drastisch ab. Ein Grund dafür könnte der unterschiedliche Anteil an geladenen Aminosäuren sein, welcher in CYP102A1 mit 28,4 % deutlich höher liegt als bei den beiden CYP102K1-Varianten. Allerdings wird das pH-Profil nicht generell durch alle geladenen Aminosäuren eines Enzyms beeinflusst, sondern vor allem von jenen, die für die Katalyse bzw. Substratbindung wichtig sind. Genauere Begründungen für das pH-Profil von CYP102A1 sind in der Literatur allerdings nicht beschrieben.

Tabelle 4.1: Analyse der Aminosäurezusammensetzungen von N'-short-CYP102K1 und vom 80 Aminosäuren langen N-terminalen Überhang von CYP102K1.

Aminosäure	Eigenschaft	Überhang		N'-short-CYP102K1	
		Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
Alanin (Ala)	hydrophob	13	16,2 %	179	15,5 %
Arginin (Arg)	basisch	5	6,2 %	77	6,6 %
Asparagin (Asn)	polar	0	0,0 %	18	1,6 %
Aspartat (Asp)	sauer	4	5,0 %	61	5,3 %
Cystein (Cys)	polar	0	0,0 %	15	1,3 %
Glutamin (Gln)	polar	1	1,2 %	34	2,9 %
Glutamat (Glu)	sauer	5	6,2 %	66	5,7 %
Glycin (Gly)	(hydrophob)	10	12,5 %	103	8,9 %
Histidin (His)	basisch	1	1,2 %	31	2,7 %
Isoleucin (Ile)	hydrophob	1	1,2 %	30	2,6 %
Leucin (Leu)	hydrophob	8	10,0 %	121	10,4 %
Lysin (Lys)	basisch	1	1,2 %	31	2,7 %
Methionin (Met)	hydrophob	0	0,0 %	21	1,8 %
Phenylalanin (Phe)	aromatisch (hydrophob)	2	2,5 %	43	3,7 %
Prolin (Pro)	hydrophob	4	5,0 %	82	7,1 %
Serin (Ser)	polar	6	7,5 %	49	4,2 %
Threonin (Thr)	polar	7	8,8 %	63	5,4 %
Tryptophan (Trp)	aromatisch (hydrophob)	1	1,2 %	12	1,0 %
Tyrosin (Tyr)	aromatisch (polar)	0	0,0 %	29	2,5 %
Valin (Val)	hydrophob	11	13,8 %	93	8,0 %

Beim Vergleich der CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1-katalysierten Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen wurde deutlich, dass beide Varianten prinzipiell das gleiche Temperaturprofil aufweisen (Abbildung 3.43). Dabei wurden in beiden Fällen bei 37 °C und unterhalb von 10 °C die höchsten Aktivitätsverluste festgestellt. Der Temperaturbereich, in dem

Azorhizobium caulinodans wachsen kann, liegt zwischen 12 °C und 43 °C (Dreyfus et al., 1988). Daher ist es nicht erstaunlich, dass die höchsten Aktivitätsverluste bei den genannten Temperaturen beobachtet wurden, da diese nah an den Wachstumsgrenzen des Organismus liegen. Allerdings ist, wie bereits erwähnt, die Stabilität von in Zellen befindlichen Enzymen schlecht mit der von isolierten Enzymen vergleichbar. Intrazelluläre Proteine sind häufig stabiler, da sie besser vor äußeren Einflüssen geschützt sind und die Anwesenheit von Makromolekülen und Chaperonen stabilisierend auf die Proteine wirken kann (Ebbinghaus et al., 2010; Cheung et al., 2005; Ai et al., 2006; Dobson und Ellis, 1998).

Zusätzlich spielt bei der Bestimmung des Temperaturprofils auch wieder die Stabilität des Cofaktors NADPH eine Rolle. So beträgt beispielsweise bei pH 6,0 die Halbwertszeit von NADPH bei 41 °C nur 55 min im Vergleich zu 525 min bei 19 °C (Wu et al., 1986). Bei den Experimenten zur Bestimmung des Temperaturprofils der CYP102K1-Varianten kann der Cofaktor allerdings nicht limitierend gewesen sein, da ein Cofaktorregenerierungssystem eingesetzt wurde und die dazu genutzte GDH bei höheren Temperaturen eine hohe Aktivität aufweist (empfohlene Temperatur des Herstellers zur Verwendung des Enzyms liegt bei 37 °C).

Das unter den gegebenen Bedingungen ermittelte Temperaturoptimum der beiden CYP102K1-Varianten liegt bei 20 °C. Des Weiteren erzielt CYP102K1 bei Temperaturen über 20 °C insgesamt niedrigere Umsätze als N'-short-CYP102K1. Somit weist N'-short-CYP102K1 im Vergleich zu CYP102K1 offenbar neben einer höheren pH-Stabilität ebenfalls eine höhere Thermostabilität auf. Dies könnte wiederum mit dem potentiell ungeordneten N-terminalen Überhang der CYP102K1 und der daraus möglicherweise resultierenden Destabilisierung des gesamten Enzyms erklärt werden. So konnte bereits für eine Peptid-Deformylase aus *E. coli* demonstriert werden, dass die Entfernung eines strukturell ungeordneten Überhangs am C-Terminus zu einer höheren Thermostabilität führt (Meinzel et al., 1996).

Im Vergleich zu CYP102A1 weist N'-short-CYP102K1 ein nahezu identisches Temperaturprofil auf, mit den Ausnahmen, dass CYP102A1 bei Temperaturen unterhalb von 10 °C noch immer etwa 90 % der maximalen Aktivität aufweist und bei dieser Temperatur damit deutlich aktiver ist als N'-short-CYP102K1 (Maurer et al., 2003). In der gleichen Publikation wurde für CYP102A1 zudem ein Temperaturoptimum von 25 °C gefunden.

Neben der Bestimmung des Temperaturprofils wurde ebenfalls der zeitliche Verlauf des Umsatzes von Tridecansäure mit CYP102K1 bei verschiedenen Temperaturen verfolgt und der Einfluss der Temperatur auf die Umsatzrate untersucht. Im Rahmen dieser Experimente wurde festgestellt, dass das Enzym bei 30 °C und 37 °C nur über kurze Zeiträume stabil ist, was in Einklang mit dem erhaltenen Temperaturprofil steht.

Zusätzlich wurde zur Untersuchung der Thermoresistenz der T_{50} -Wert von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 bestimmt. In beiden Fällen lag dieser bei einer Temperatur von ca. 49 °C, was genau dem Wert entspricht, der für CYP102A1 bei ähnlicher Versuchsdurchführung publiziert wurde (Eiben et al., 2007). In diesem Fall scheint der Überhang also keinen Einfluss zu haben. Zur Bestimmung der Thermoresistenz wurden beide Enzyme jeweils für 20 min bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und nach Abkühlung in Biokatalysen bei 20 °C eingesetzt. Dabei wurden jeweils 100 % Restaktivität bei Inkubationstemperaturen > 40 °C gefunden, obwohl CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 andererseits nur über einen kurzen Zeitraum aktiv sind, wenn die Biokatalysen bei Temperaturen > 30 °C durchgeführt werden (siehe oben). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die aktive Konformation der Enzyme nach der Inkubation bei höheren Temperaturen während des Abkühlens wiedererlangt wird. Anscheinend ist der Überhang bei diesem Prozess weder von Nach- noch von Vorteil.

Biokatalyse mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

Obwohl eine Vielzahl verschiedener Substanzen getestet wurde, konnte in Biokatalysen mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 nur beim Einsatz der gesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zehn bis fünfzehn Kohlenstoffatomen, der ungesättigten Fettsäure 12-Tridecensäure sowie bei der Reaktion mit β -Jonon eine Produktbildung nachgewiesen werden (Abbildung 3.48). Die gesättigten Fettsäuren wurden dabei allesamt regioselektiv an der ω -1-, ω -2- und ω -3-Position hydroxyliert, wobei der prozentuale Anteil der verschiedenen Produkte je nach Fettsäure unabhängig von der getesteten CYP102K1-Variante variierte (Tabelle 3.9). Für 12-Tridecensäure konnte nur ein Produkt (Hydroxylierung an der ω -2-Position) mit Sicherheit identifiziert werden. Weiteren potentiellen Produktpeaks konnte keine eindeutige Struktur zugeordnet werden, sodass weder ausgeschlossen noch bestätigt werden kann, dass weitere Produkte gebildet wurden. Fettsäuren stellen ebenfalls für CYP102A1 bevorzugte Substrate dar, wobei Pentadecensäure das am besten umgesetzte Substrat ist und die Aktivität bei längeren oder kürzeren Kettenlängen abnimmt (Miura und Fulco, 1975). Eine Hydroxylierung von Decensäure durch CYP102A1 wurde bisher nicht nachgewiesen (Boddupalli et al., 1992b) und für Undecensäure konnte keine Referenz gefunden werden, welche Informationen diesbezüglich bereitstellt. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass Undecensäure von CYP102A1 als Substrat akzeptiert wird, da dies bei der ungesättigten 10-Undecensäure der Fall ist (Chen et al., 2011). Das Muster der Hydroxylierung an den ω -1- bis ω -3-Positionen ist ebenso für CYP102A1 bekannt, jedoch ist die prozentuale Verteilung der verschiedenen Produkte im Vergleich zu CYP102K1 größtenteils unterschiedlich (Whitehouse et al., 2011). Demnach wird beispielsweise Tridecensäure von CYP102A1 zu einem Großteil an der ω -2-Position hydroxyliert, während beide CYP102K1-Varianten die ω -1-Position bevorzugen.

Es konnte für CYP102K1 gezeigt werden, dass Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zwölf bis vierzehn Kohlenstoffatomen präferierte Substrate darstellen und dass Tridecansäure von den getesteten Fettsäuren innerhalb des Reaktionszeitraums am schnellsten hydroxyliert wird. Tridecansäure war zwar auch für N'-short-CYP102K1 das bevorzugte Substrat, allerdings werden längere Fettsäuren von dieser Variante deutlich langsamer umgesetzt als von CYP102K1. Vermutlich ist der N-terminale Überhang in diesem Fall von Vorteil. Aus Tabelle 4.1 zum Vergleich der Aminosäurezusammensetzung des Überhangs mit der Aminosäurezusammensetzung von N'-short-CYP102K1 geht hervor, dass der Überhang deutlich mehr Valin enthält. Bei Valin handelt es sich um eine hydrophobe Aminosäure. Somit ist vorstellbar, dass die hydrophoben Aminosäuren im Überhang die initiale Interaktion mit den längeren und damit hydrophoberen Fettsäuren verbessern und dadurch die Kettenlängenpräferenz von CYP102K1 beeinflussen. Darüber hinaus ist denkbar, dass das Enzym durch den Überhang eine leicht abgeänderte Faltung einnimmt, die es längeren Fettsäuren eher ermöglicht, zum aktiven Zentrum zu gelangen.

Im Gegensatz zu den Fettsäuren wurden andere Verbindungen mit entsprechender Kettenlänge, die sich aber in ihrer funktionellen Gruppe unterschieden (Alkane, Alkohole, Amine, Aldehyde, Ester), von beiden CYP102K1-Varianten nicht umgesetzt. Somit scheint die Carboxylgruppe der Fettsäuren entscheidend zu sein für die Akzeptanz eines Substrats. Da, wie erwähnt, auch kein Alkohol, Amin oder Aldehyd umgesetzt wurde, reicht eine endständige polare Gruppe offenbar nicht aus, um von den CYP102K1-Varianten gebunden und somit hydroxyliert zu werden. Im Gegensatz zu den CYP102K1-Varianten ist CYP102A1 interessanterweise dazu in der Lage, ebenfalls Alkohole und Amine mit geeigneter Kettenlänge in dem typischen Muster zu hydroxylieren, auch wenn diese Verbindungen im Vergleich zu den Fettsäuren eher schlechte Substrate darstellen (Miura und Fulco, 1975). In diesem Fall reicht das Vorhandensein einer endständigen polaren Gruppe offensichtlich aus, um prinzipiell als Substrat akzeptiert zu werden. Im aktiven Zentrum von CYP102A1 sind Arg47 und Tyr51 von herausragender Bedeutung für die Substratbindung (Li und Poulos, 1999). Bei der Verwendung von Fettsäuren als Substrate sind demnach beide Reste entscheidend an der Interaktion mit der Carboxylgruppe beteiligt. Die positiv geladene Arg47-Seitenkette bildet elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Teil der Carboxylgruppe aus und Tyr51 interagiert anhand seiner Hydroxylgruppe über Wasserstoffbrücken mit dem Carbonylsauerstoff der Carboxylgruppe. Bei Alkoholen und Aminen können die Seitenketten von sowohl Tyr51 als auch Arg47 nur schwächere Wasserstoffbrücken mit der endständigen polaren Gruppe der Substrate bilden. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass Alkohole und Amine zwar ebenfalls von CYP102A1 als Substrat akzeptiert, im Vergleich zu Fettsäuren aber nur schlecht umgesetzt werden.

Es war zunächst etwas überraschend, dass die beiden CYP102K1-Varianten Fettsäuren als präferierte Substrate akzeptieren, welche ebenfalls von CYP102A1 bevorzugt umgesetzt werden. Darüber hinaus weisen CYP102A1- und N'-short-CYP102K1 das gleiche Hydroxylierungsmuster wie CYP102A1 auf. Die Sequenzidentität der Hämdomänen der Enzyme ist mit < 40 % vergleichsweise niedrig und daher wurde ursprünglich vermutet, dass sich die Substratspektren von CYP102K1 und CYP102A1 deutlicher unterscheiden würden. Mit Hilfe eines strukturellen Vergleichs können die gefundenen Resultate allerdings zu einem überwiegenden Teil erklärt werden. Zunächst wurde auf Basis der Kristallstruktur der substratgebundenen CYP102A1-Hämdomäne (PDB-Code 1ZOA, Substrat: Palmitoylglycin) ein Homologiemodell von der CYP102K1-Hämdomäne mit SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) erstellt. Dazu war es allerdings zwingend erforderlich, den Überhang in der Proteinsequenz von CYP102K1 zu entfernen, da die Übereinstimmung ansonsten zu niedrig war und kein Homologiemodell auf Basis von CYP102A1 erstellt werden konnte. Eine Überlagerung der CYP102A1- und N'-short-CYP102K1-Hämdomänen in Abbildung 4.1 zeigt, dass die prinzipielle Struktur beider Enzyme sehr ähnlich ist; lediglich einige wenige Bereiche (insbesondere am C- und N-Terminus) unterscheiden sich, da das Modell für CYP102K1 in diesen Bereichen eine unstrukturierte Faltung vorschlägt.

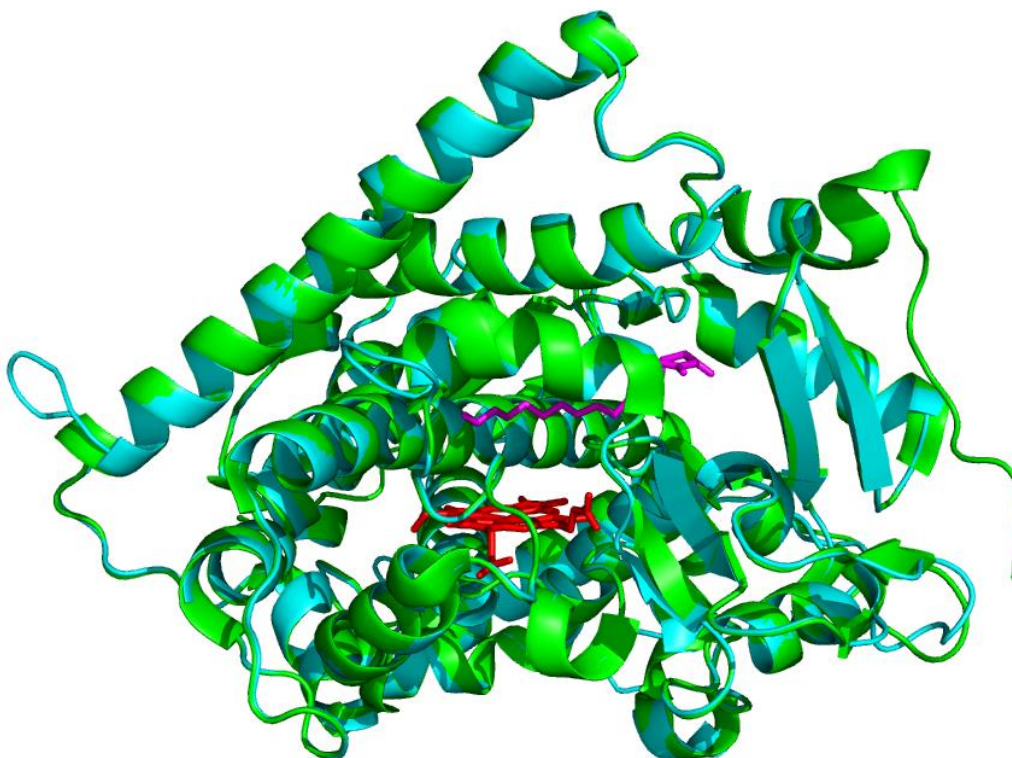


Abbildung 4.1: Überlagerung der Kristallstruktur der CYP102A1-Hämdomäne (grün, PDB-Code 1ZOA) mit dem Homologiemodell der CYP102K1-Hämdomäne (hellblau), das auf Basis der erwähnten Kristallstruktur erstellt wurde. In Rot ist die Hämgruppe und in Magenta das in der Kristallstruktur von CYP102A1 vorhandene Substrat N-Palmitoylglycin erkennbar.

Werden die sogenannten Schlüsselpositionen im aktiven Zentrum genauer betrachtet (Abbildung 4.2), sind wiederum deutliche Ähnlichkeiten für beide Enzyme erkennbar, die mit einem Sequenzalignment der Proteinsequenzen übereinstimmen (siehe Abschnitt 7.2). Im Modell weist CYP102K1 in unmittelbarer Nähe zur Hämgruppe ein Phenylalanin auf (Phe99), das in die Substratbindetasche hineinragt. Das entsprechende Phe87 in CYP102A1 stellt eine der wichtigsten Positionen in CYP102A1 dar, da sie die Substratspezifität des Enzyms beeinflusst und dessen Aktivität reguliert (Whitehouse et al., 2011). Eine der wichtigsten Funktionen von Phe87 ist die Verankerung der Alkylkette von Substraten über der Hämgruppe (Li und Poulos, 1999). Diese Position ist häufig Gegenstand von Mutagenesearbeiten, da der Austausch zu einer kleineren Aminosäure den Umsatz größerer Substrate durch CYP102A1 erlaubt.

Die beiden unmittelbar miteinander benachbarten Aminosäuren Glu267 und Thr268 stellen in CYP102A1 ebenfalls Schlüsselpositionen dar. Glu267 hat eine wichtige Funktion bezüglich der Substratpositionierung und des Wassergehalts im aktiven Zentrum (Whitehouse et al., 2011; Stjernschantz et al., 2008), während Thr268 maßgeblich an der Stabilisierung eines entscheidenden Wassermoleküls im aktiven Zentrum und an der Sauerstoffbindung beteiligt ist (Truan und Peterson, 1998; Yeom et al., 1995). Die entsprechenden Reste sind in der CYP102K1-Hämdomäne an Position Glu282 und Thr283 zu finden. Daher gibt es diesbezüglich ebenfalls keine Unterschiede zwischen CYP102A1 und CYP102K1.

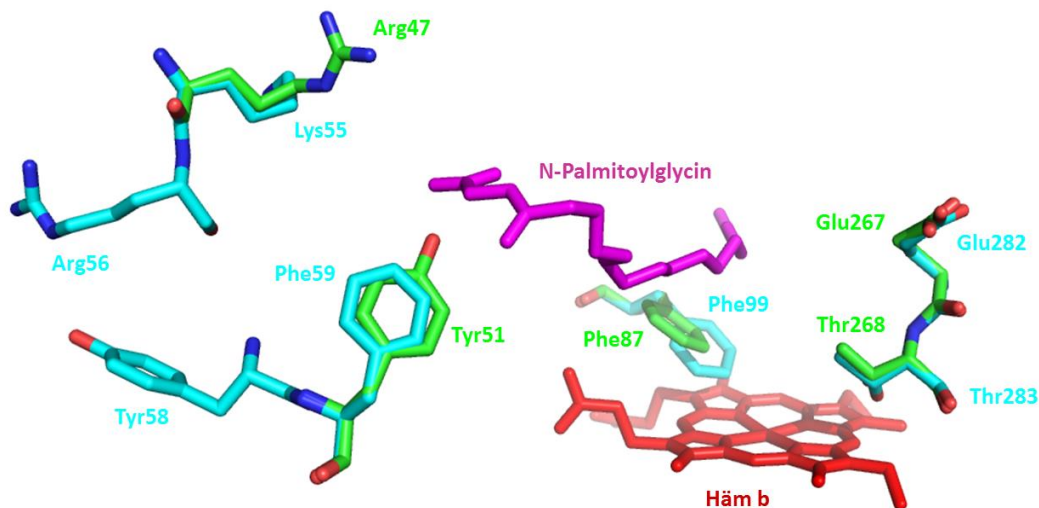


Abbildung 4.2: Vergrößerte Darstellung von Schlüsselpositionen im aktiven Zentrum von CYP102A1 (grün, PDB-Code 1ZOA) und CYP102K1 (hellblau). In Rot ist die Hämgruppe und in Magenta das in der Kristallstruktur von CYP102A1 vorhandene Substrat N-Palmitoylglycin erkennbar.

Wie bereits zuvor erwähnt, sind Arg47 und Tyr51 weitere Aminosäuren von besonderer Bedeutung im aktiven Zentrum von CYP102A1, da sie eine wichtige Rolle für die Substratbindung spielen. Tyr51

ist in der Lage, Wasserstoffbrücken auszubilden, während Arg47 über ionische Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken mit Substratmolekülen interagieren kann. Anhand von Mutageneseexperimenten konnte gezeigt werden, dass Substratbindung und Katalyse nur geringfügig beeinflusst werden, wenn nur eine der beiden Interaktionen unterbunden wird. Die Eliminierung beider Wechselwirkungen zur Substratinteraktion hat jedoch einen sehr großen Effekt, sodass diese Positionen zusammen eine regulierende Schranke für die Bindung von Substraten im aktiven Zentrum bilden (Li und Poulos, 1999; Noble et al., 1999; Cowart et al., 2001). Darüber hinaus wird vermutet, dass die Aminosäurereste wichtig sind für den Einlass von Wassermolekülen und Cosolventien (Carmichael und Wong, 2001; Roccatano et al., 2005). Interessanterweise befinden sich laut Homologiemodell und Sequenzalignment in CYP102K1 an den entsprechenden Positionen jeweils andere Reste. Anstatt des Arginins, liegt an der äquivalenten Position ein Lysin (Lys55) und anstelle des Tyrosins ein Phenylalanin (Phe59). Im Fall der ersten Position erscheint dies nicht besonders außergewöhnlich, da ein basisches und daher positiv geladenes Arginin durch ein ebenfalls basisches Lysin ersetzt wird. Dessen Seitenkette besitzt zwar im Vergleich zu Arginin nur eine stickstoffhaltige Gruppe, aber verfügt ansonsten über eine ähnliche Funktion. Dass dagegen ein Phenylalanin die Funktion eines Tyrosins ausfüllen kann, ist weniger wahrscheinlich. Phenylalanin hat zwar mit Tyrosin den aromatischen Ring gemein, die für weitere Eigenschaften entscheidende Hydroxylgruppe fehlt aber. Somit ist mit der Seitenkette nur die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen möglich und nicht die Bildung von Wasserstoffbrücken. Falls das Homologiemodell prinzipiell verlässlich ist, was in Bezug auf die allgemeine Struktur und ausgewählte Schlüsselpositionen (Phe99, Thr268 und Glu267) zutrifft, würde dieser Unterschied an Position 51 bzw. 59 die Tatsache erklären, warum die CYP102K1-Varianten im Gegensatz zu CYP102A1 nur Fettsäuren und keine anderen Verbindungen mit geeigneter Kettenlänge hydroxylieren können. Anscheinend steht mit Lys55 nur ein positiv geladener Rest zur elektrostatischen Interaktion zur Verfügung. Verbindungen mit einer unter den verwendeten Bedingungen positiv geladenen funktionellen Gruppe, wie Amine, können wegen der elektrostatischen Abstoßung nicht binden und werden daher nicht umgesetzt. Verbindungen mit einer nicht-geladenen funktionellen Gruppe, wie Alkohole, Aldehyde und Ester, können womöglich nur unzureichend mit der Aminogruppe interagieren, da prinzipiell nur schwächere Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Die Stärke einer Wasserstoffbrücke reicht möglicherweise nicht aus, um über die gegebene Distanz eine stabilisierende Bindung zu gewährleisten. Bei CYP102A1 steht neben der Guanidinogruppe von Arg47 ebenfalls die Hydroxylgruppe von Tyr51 zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung, sodass eine stärkere Bindung möglich ist. Neben CYP102K1 weist ebenfalls CYP505A1 aus der Hefe *Fusarium*

oxysporum an den entsprechenden Positionen ein Lysin und ein Phenylalanin (Lys48 und Phe52) auf (Kitazume et al., 2000). Diese eukaryotische Einkomponenten-P450 Monooxygenase ist ebenfalls homolog zu CYP102A1 und hydroxyliert Fettsäuren nach dem gleichen Muster an der ω -1- bis ω -3-Position; über den Umsatz von Verbindungen ohne Carboxylgruppe ist jedoch nichts bekannt (Kitazume et al., 2000, 2002). Prinzipiell sollte jedoch bedacht werden, dass es sich bei dem Homologiemodell trotz der vielen Übereinstimmungen nur um ein Modell handelt. Durch die geringe Sequenzidentität der Regionen um die genannten Positionen ist das Homologiemodell möglicherweise nicht sehr genau, sodass die entsprechenden Bereiche eine andere als die im Modell gezeigte Struktur einnehmen könnten. So wäre denkbar, dass die an der jeweils direkt benachbarten Position befindlichen Aminosäuren Arg56 und Tyr58 homolog mit den in CYP102A1 befindlichen Resten (Arg47 und Tyr51) sind, da es sich um genau die gleichen Seitenketten handelt. Allerdings wäre nur wenig Platz zwischen den Positionen Arg56 und Tyr58, da sie nur von einer Aminosäure getrennt werden (bei CYP102A1, CYP505A1 und dem CYP102K1-Modell liegen drei Aminosäuren dazwischen) und laut Modell wäre eine räumliche Umorientierung der Reste schwierig.

Aufgrund der genannten Übereinstimmungen bei ausgewählten, für die Substratbindung entscheidenden Schlüsselpositionen und der prinzipiellen Struktur der Hämdomäne, ist es nicht erstaunlich, dass CYP102A1 und CYP102K1 ähnliche Substrate bevorzugen, obwohl die Sequenzidentität der Hämdomäne äußerst niedrig ist.

Bezüglich der physiologischen Funktion der Enzyme sind lineare gesättigte Fettsäuren zwar geeignete Substrate für CYP102A1, doch das bedeutet nicht, dass dies auch die natürlichen Substrate des Enzyms sind (Budde et al., 2006; Cryle et al., 2006; Cryle und De Voss, 2008). Daher ist auch nicht klar, ob lineare gesättigte Fettsäuren die natürlichen Substrate für die CYP102K1-Varianten sind. Für CYP102A1 wird beispielsweise vermutet, dass die Detoxifizierung xenobiotischer Lipide pflanzlichen Ursprungs eine Funktion des Enzyms sein könnte (English et al., 1994; Palmer et al., 1998; Whitehouse et al., 2011). Dies ist ebenfalls für das in *A. caulinodans* vorkommende CYP102K1-Enzym vorstellbar, da *A. caulinodans* eine enge Symbiose mit *Sesbania*-Sträuchern eingeht und daher häufig mit Pflanzenmetaboliten in Kontakt kommen wird (Elmerich et al., 1982). Gestützt wird diese Argumentation durch die Tatsache, dass Enzyme der CYP102-Familie bisher nahezu ausschließlich in Bodenbakterien gefunden wurden (Lamb et al., 2010).

Um die Bindungsaffinität von CYP102K1 für die verschiedenen Fettsäuren zu untersuchen, wurden Versuche zur spektrophotometrischen Bestimmung von Dissoziationskonstanten durchgeführt. Die Substratbindung führt bei Cytochrom P450 Monooxygenasen häufig zu einer optisch messbaren Änderung des Hämeisenspinzustandes. Bei den sogenannten Typ I-Bindespektren geht das Hämeisen von der *low spin*-Konfiguration mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 420 nm in den *high spin*-

Zustand über mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 390 nm (Schenkman et al., 1967; Luthra et al., 2011). Die resultierende Peakverschiebung kann in der Folge zur Berechnung von Dissoziationskonstanten genutzt werden. Allerdings konnte im Fall von CYP102K1 mit keiner der getesteten Fettsäuren eine eindeutig erkennbare Peakverschiebung festgestellt werden, weshalb auch keine Dissoziationskonstanten bestimmt werden konnten. Bei Substratkonzentrationen bis zu 300 μM , bei denen CYP102K1 eindeutig aktiv ist, sollte eigentlich genug Substrat vorhanden sein, um zumindest eine anfängliche Peakverschiebung zu beobachten. Eine höhere Substratkonzentration war wegen der geringen Löslichkeit der Substrate in wässriger Umgebung jedoch ohnehin nicht möglich.

Im Gegensatz dazu wurden für CYP102A1 zahlreiche Dissoziationskonstanten für eine Vielzahl von Substraten publiziert (Clark et al., 2006; Cryle und De Voss, 2008; Huang et al., 2007; Tsotsou et al., 2002). Es stellt sich also die Frage, warum die Inkubation mit Substrat bei CYP102K1 zu keiner Absorptionsveränderung geführt hat, die mit der Substratbindung in Zusammenhang zu bringen ist. Für CYP51 aus Mohrenhirse konnte ebenfalls für verschiedene Substanzen keine Substratbindung spektrophotometrisch nachgewiesen werden, obwohl diese umgesetzt wurden. Dies wurde auf einen stark bevorzugten *low spin*-Zustand oder auf eine partielle Inaktivierung des Enzyms zurückgeführt (Kahn et al., 1996). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Substratbindung zu keiner Veränderung des Spinzustandes führt, die als Peakverschiebung im Absorptionsspektrum nachgewiesen werden könnte. Interessanterweise konnten für die bereits erwähnte Fettsäurehydroxylase CYP505A1 aus *Fusarium oxysporum* nur partielle Peakverschiebungen in teils recht geringem Maße erzielt werden (Kitazume et al., 2002). Dies wurde mit einem Gleichgewicht zwischen dem *low spin*- und *high spin*-Zustand des Häms begründet, welches von der Kettenlänge des Substrats abhängig ist.

Für die vier besten CYP102K1-Substrate (Do-, Tri-, Tetradecansäure sowie 12-Tridecensäure) wurden für beide CYP102K1-Varianten Umsatzraten bestimmt (Tabelle 3.10). Zwischen den zwei Varianten wurden dabei nur geringe Unterschiede festgestellt. Die Rate für den Umsatz von Tridecensäure war für beide CYP102K1-Varianten am höchsten ($19,5 \pm 3,7 \text{ min}^{-1}$ für CYP102K1 bzw. $19,9 \pm 1,4 \text{ min}^{-1}$ für N'-short-CYP102K1), was unterstreicht, dass Tridecensäure das präferierte Substrat der Varianten darstellt. Diese Tatsache ist nicht uninteressant, da Tridecensäure als ungeradzahlige Fettsäure selten in der Natur vorkommt. Auf der anderen Seite wurde mit Pentadecansäure ebenfalls eine ungeradzahlige Fettsäure als präferiertes Substrat für CYP102A1 identifiziert (Miura und Fulco, 1975). Zudem wurde Tetradecansäure im Gegensatz zu Dodecansäure von beiden CYP102K1-Varianten deutlich langsamer umgesetzt. Dies beweist, dass die Varianten offensichtlich Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zwölf bis dreizehn Kohlenstoffatomen bevorzugen.

Bei der Bestimmung der Kopplungseffizienz und der NADPH-Oxidationsrate von CYP102K1 gegenüber verschiedenen Substraten war nicht überraschend, dass CYP102K1 für Substrate, die schnell umgesetzt werden, ebenfalls eine höhere NADPH-Oxidationsrate bzw. höhere Kopplungseffizienz aufwies als für Substrate, die langsamer umgesetzt werden (Tabelle 3.11). Interessanterweise wurde für Dodecansäure eine höhere NADPH-Oxidationsrate festgestellt als für das präferierte Substrat Tridecansäure. Allerdings war gleichzeitig auch die Kopplungseffizienz geringer, sodass für die Bildung der gleichen Produktmenge mehr NADPH benötigt wird. Bezüglich der Kopplungseffizienz war auffällig, dass selbst der beste Wert ($61 \pm 5 \%$ für Tridecansäure) nicht annähernd an das Maximum von 100 % herankam. Für N'-short-CYP102K1 wurden ähnliche Ergebnisse gefunden, sodass kein Einfluss des N-terminalen Überhangs auf die Kopplungseffizienz zu erkennen ist. Dies zeigt, dass ein Großteil der Elektronen von NADPH nicht für die Katalyse verwendet wird, sondern durch Entkopplungsreaktionen verloren geht.

Werden die gefundenen Ergebnisse zur Umsatzgeschwindigkeit, der NADPH-Oxidationsrate und der Kopplungseffizienz mit den entsprechenden Daten für CYP102A1 verglichen, fällt wiederum auf, dass CYP102A1 jeweils deutlich höhere Werte erzielt. So liegt die Rate von CYP102A1 für den Umsatz von Hexadecansäure beispielsweise bei ca. 1.600 min^{-1} und ist damit um den Faktor 80 höher als die Rate des Tridecansäureumsatzes mit N'-short-CYP102K1 (Cryle et al., 2006). Des Weiteren sind die NADPH-Oxidationsraten in etwa um eine Zehnerpotenz höher und die Kopplungseffizienz präferierter Substrate liegt bei etwa 90 % (Whitehouse et al., 2011; Cryle und De Voss, 2008). Möglicherweise sind die CYP102K1-Varianten unter den genutzten Bedingungen nicht stabil, sodass eigentlich nur ein Teil der ursprünglich eingesetzten Enzymmenge zur Katalyse zur Verfügung steht und deshalb die Umsatzraten niedriger ausfallen. Die geringe Stabilität ist vermutlich auf die hohe Entkopplung und der damit verbundenen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen. Zwar wurde in den Biokatalysen standardmäßig Katalase eingesetzt, um H_2O_2 aus dem *peroxide shunt* zu entfernen, aber Superoxid Dismutase zur Eliminierung von Superoxidanionen aus dem *autoxidation shunt* wurde nur bei der Bestimmung der Kopplungseffizienz und ansonsten in keine anderen Biokatalysen eingesetzt. Somit ist denkbar, dass die möglicherweise gebildeten Superoxidanionen das Enzym schädigten. Aufgrund der geringen Umsatz- und NADPH-Oxidationsraten besteht zudem die Möglichkeit, dass trotz der Verwendung eines Einkomponenten-P450-Systems der Elektronentransfer von Reduktase- zu Hämdomäne nicht effizient abläuft. Dies kann zu einer Entkopplung während des Katalysezyklus führen und damit auch ein Grund für die geringe Kopplungseffizienz sein. Wie bereits in dem Diskussionsabschnitt bezüglich des Substratspektrums dargelegt, ist es möglich, dass es sich bei den verwendeten Substraten nicht um die natürlichen Substrate des in *A. caulinodans* vorkommenden CYP102K1-Enzyms handelt, sodass

die Substanzen vergleichsweise schlecht binden und in der Folge langsam umgesetzt werden sowie zu geringeren Kopplungseffizienzen führen.

Unter Berücksichtigung aller gesammelten Erkenntnisse bzgl. der Charakterisierung von CYP102K1 bzw. N'-short-CYP102K1 stellt sich die Frage, ob der N-terminale Überhang eine physiologische Relevanz hat und welche der beiden Varianten daher unter natürlichen Bedingungen in *A. caulinodans* vorkommt. Die Sequenz von CYP102K1 mit Überhang ist möglicherweise das Ergebnis einer falschen Genannotierung in der Genomsequenz von *A. caulinodans*, da ein entsprechender Überhang weder in CYP102A1 noch in anderen homologen Cytochrom P450 Monooxygenasen zu finden ist. Die verkürzte Variante N'-short-CYP102K1 wurde aufgrund eines möglichen alternativen Startcodons erzeugt. Für dieses alternative Startcodon konnte allerdings keine zugehörige typische Ribosomenbindestelle identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Eine typische Ribosomenbindestelle ist eine sechs bis neun Nukleotide umfassende A/G-reiche Region, die sich normalerweise fünf bis sieben Nukleotide vor dem Startcodon befindet (Shine und Dalgarno, 1975; Vellanoweth und Rabinowitz, 1992; Hu et al., 2012). Untypische Ribosomenbindestellen scheinen für *A. caulinodans* nicht unbedingt außergewöhnlich zu sein, da auch für ein anderes Gen aus diesem Organismus keine typische Ribosomenbindestelle identifiziert werden konnte (Goethals et al., 1994). Wie Abbildung 4.3 deutlich macht, existiert jedoch vor dem Startcodon des CYP102K1-Gens ein Sequenzbereich, der die Kriterien einer typischen Ribosomenbindestelle erfüllt. Dies weist darauf hin, dass die CYP102K1-Variante mit N-terminalem Überhang natürlicherweise in *A. caulinodans* vorkommt. Darüber hinaus werden längere Fettsäuren ebenfalls schneller von CYP102K1 umgesetzt. Andererseits weist die verkürzte Variante N'-short-CYP102K1 eine höhere pH- und Thermostabilität auf. Es ist somit vorstellbar, dass beide Varianten in *A. caulinodans* gebildet werden können und abhängig von den physiologischen Bedingungen gewisse Vorteile für den Organismus bieten.

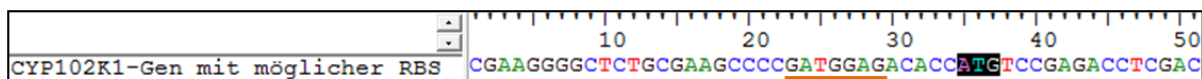


Abbildung 4.3: Sequenzausschnitt des CYP102K1-Gens und der davorliegenden DNA im Genom von *A. caulinodans*. Das Startcodon ist in Schwarz markiert, die mögliche zugehörige Ribosomenbindestelle ist in Orange unterstrichen.

4.3 Erweiterung des Substratspektrums von CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

CalB-katalysierte Herstellung von potentiellen CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1- Substraten

Die CalB-katalysierten Synthesen von Pimelinsäuremonopentyl- und Succinylsäuremonooctylester konnten im analytischen Maßstab erfolgreich durchgeführt werden. Mittels GC(-MS) konnten Pimelin- und Succinylsäure, die jeweiligen Mono- sowie Diester und Octanol detektiert werden. Pentanol konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da es wahrscheinlich zusammen mit dem Lösungsmittel bzw. Derivatisierungsreagenz von der Säule eluiert. Der Einsatz von MTBE als Lösungsmittel beeinflusste bei beiden Synthesen die Selektivität von CalB zugunsten des Monoesters. Allerdings wurde über einen längeren Reaktionszeitraum nur im Fall der Pimelinsäurepentylester ein deutlich höheres Mono- zu Diester-Verhältnis erreicht. Die unterschiedliche Solvatisierung von Substraten durch verschiedene Lösungsmittel sowie die Substrat-abhängige Verdrängung von Lösungsmittelmolekülen im aktiven Zentrum wurden bereits als mögliche Gründe für die Beeinflussung der Enantioselektivität von CalB identifiziert (Orrenius et al., 1998; Ottosson et al., 2002). Es kann sein, dass die genannten Effekte ebenfalls einen Einfluss darauf haben, wie gut der Monoester vom Enzym weiter zum Diester umgesetzt wird. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass der Monoester als Zwischenprodukt das aktive Zentrum des Enzyms gar nicht erst verlässt, sondern nach Umorientierung des Zwischenproduktes im aktiven Zentrum direkt zum Diester weiter umgesetzt werden kann. Besonders im Fall des Succinylsäureesters könnte dies erklären, warum stets deutlich mehr Di- als Monoester erhalten wird, da hier die beiden Carboxylgruppen recht nah beieinander liegen. Das gewählte Lösungsmittel, hier MTBE, könnte dabei die Freisetzung des Monoesters aus dem aktiven Zentrum positiv bzw. die Bindung des Monoesters für die weitere Umsetzung im aktiven Zentrum negativ beeinflussen, so dass bei Einsatz von MTBE als Lösungsmittel insgesamt mehr Monoester erhalten werden konnte als mit anderen getesteten Lösungsmitteln.

Die Monoestersynthesen wurden in präparativen Ansätzen wiederholt und die Monoester anschließend über Kieselgelchromatographie aufgereinigt. Dabei wurde im Fall des Pimelinsäuremonopentylesters eine viskose Flüssigkeit und im Fall des Succinylsäuremonooctylesters ein Feststoff erhalten. Die Reinheit der aufgereinigten Ester betrug jeweils > 99 %.

Dagegen verliefen die Synthesen von Pimelinsäuremonobutyl- und Succinylsäuremonooctylamid nicht erfolgreich. Beim Versuch der Herstellung von Pimelinsäuremonobutylamid kam es mit steigender Reaktionszeit zur zunehmenden Ausbildung einer zweiten Phase, was auf die Bildung eines Produktes bzw. Produktgemisches hinweist. Die Herstellung von Amiden konnte jedoch nicht reproduzierbar nachgewiesen werden. Einerseits kann dies möglicherweise auf die schwierige Etablierung geeigneter Analytik zurückgeführt werden. Zwar wurden verschiedene DC-Laufmittel

und GC(-MS)-Programme getestet, allerdings konnten bis auf eine Ausnahme (potentieller Monoamidpeak über GC-MS identifiziert) in keinem Fall Hinweise auf eine Produktbildung gefunden werden. Es ist auf der anderen Seite ebenfalls möglich, dass die CalB die gewünschte Reaktion unter den gegebenen Bedingungen nicht oder mit einer sehr geringen Geschwindigkeit katalysiert. Zwar gibt es zahlreiche Beispiele für die Nutzung des Enzyms zur Amidsynthese, doch bei Verwendung von primären Aminen wurden durchweg Ester und keine freien Carbonsäuren eingesetzt (Anderson et al., 1998). Im vorliegenden Fall waren die entsprechenden Ester jedoch nicht kommerziell erhältlich, sodass diese Möglichkeit nicht ohne Weiteres getestet werden konnte. Es kann daher durchaus sein, dass das Enzym die Reaktion unter den gegebenen Bedingungen nur sehr langsam katalysierte und daher keine Produktbildung festgestellt werden konnte.

Succinylsäuremonooctylamid konnte nicht synthetisiert werden, da es unabhängig von der Anwesenheit von CalB im Reaktionsgemisch zur Bildung einer weißen Substanz kam. Die Ursache dieses Resultats konnte nicht geklärt werden. Vermutlich kam es zu einer Reaktion zwischen der Dicarbonsäure und dem Amin, oder das beobachtete Phänomen ist auf eine Präzipitation der Succinylsäure zurückzuführen. Maßnahmen zur Vermeidung bzw. Verminderung des Phänomens führten nicht zum Erfolg und daher wurden die Versuche zur Herstellung von Succinylsäuremonooctylamid nicht weiter verfolgt.

Einsatz der hergestellten Monoester in Biokatalysen mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Tridecansäure stellten die mit Hilfe von CalB hergestellten Monoester potentielle CYP102K1- und N'-short-CYP102K1-Substrate dar. So wurden die im größeren Maßstab hergestellten und aufgereinigten Pimelinsäuremonopentyl- und Succinylsäuremonooctylester in Biokatalysen mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 eingesetzt.

Beim Einsatz von Pimelinsäuremonopentyl- und Succinylsäuremonooctylester wurde jeweils die Bildung geringer Produktmengen nachgewiesen. Die charakteristischen Spaltmuster der Produktmassenspektren legten nahe, dass es sich bei den Produkten in beiden Fällen um an der ω -1-Position und der ω -2-Position hydroxylierte Monoester handelt. Diese Regioselektivität steht in Einklang mit den Ergebnissen, die für den Umsatz mittellanger linearer Fettsäuren festgestellt wurden. Die erhaltenen Umsätze waren trotz des Einsatzes von hohen Enzymmengen und langen Reaktionszeiten im Allgemeinen sehr niedrig, wobei die Umsätze mit Succinylsäuremonooctylester als Substrat höher ausfielen. Darüber hinaus wurden mit CYP102K1 im Allgemeinen etwas höhere Umsätze erzielt als mit N'-short-CYP102K1. Interessanterweise wiesen im Fall von CYP102K1 und Pimelinsäuremonopentylester als Substrat die Ansätze ohne Katalase höhere Umsätze auf als die Reaktionen mit Katalase. Es ist daher möglich, dass die eingesetzte Katalaselösung Komponenten

beinhaltet, welche CYP102K1 inhibieren. Da die Katalase das über den *peroxide shunt* gebildete H_2O_2 entfernt haben sollte, sind die geringen Umsätze eher nicht auf eine Enzymschädigung durch H_2O_2 zurück zu führen. Diese Aussage gilt natürlich nur unter den Voraussetzungen, dass die Katalase aktiv war und das H_2O_2 aus dem aktiven Zentrum gelangte, bevor es das Enzym schädigen konnte. Andererseits kann während der Entkopplungsreaktion über den *autoxidation shunt* ebenfalls Superoxid gebildet werden, welches durch die Katalase nicht unschädlich gemacht wird und somit zur Enzyminaktivierung führen kann. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die eingesetzten Monoester einfach schlechte Substrate für die CYP102K1-Varianten darstellen und daher nur geringe Umsätze erzielt wurden. Auch wenn zwischen den Estern und dem favorisierten Substrat Tridecansäure eine strukturelle Ähnlichkeit, v. a. bezüglich der Kettenlänge, besteht und diese offenbar ausreicht, um prinzipiell im aktiven Zentrum des Enzyms aufgenommen zu werden, existieren dennoch signifikante Unterschiede zwischen den Verbindungen mit deutlichem Einfluss auf die Substratbindung. So weisen die Ester eine Carbonylgruppe innerhalb der Kette auf, welche die Substratbindung möglicherweise negativ beeinflusst. So könnte z. B. die zusätzliche Carbonylgruppe aufgrund ihrer Fähigkeit, Wasserstoffbrücken auszubilden, zu einer ungünstigen Orientierung des Substrates im Substratkanal führen. Für Succinylsäuremonooctylester sitzt diese Carbonylgruppe dabei am vierten Kohlenstoffatom (ausgehend von der freien Carboxylgruppe), während die Carbonylgruppe des Pimelinsäuremonopentylesters am siebten C-Atom positioniert ist. Da für Succinylsäuremonooctylester insgesamt höhere Umsätze erzielt wurden als für Pimelinsäuremonopentylesters, scheint die Position der zusätzlichen Carbonylgruppe somit eine bedeutende Rolle zu spielen. Basierend auf dem Homologiemodell von CYP102K1 (Abbildung 4.1) scheint die Bindung des Pimelinsäuremonopentylesters im Substratkanal sterisch behindert zu sein, wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist. Dagegen scheint für die zusätzliche Carbonylgruppe des Succinylsäuremonooctylesters zumindest genügend Raum zur Verfügung zu stehen. Allerdings handelt es sich bei dem zugrundeliegenden Homologiemodell lediglich um ein Modell und die Substratorientierung im Substratkanal wurde nicht durch zusätzliche Dockingstudien überprüft. Somit kann die tatsächliche Platzierung der Substrate im Substratkanal von CYP102K1 auch anders aussehen.

Darüber hinaus ist angesichts der niedrigen Umsätze nicht überraschend, dass nur das an ω -1- bzw. ω -2-Position hydroxylierte Produkt und kein drittes, an der ω -3-Position hydroxyliertes Produkt nachgewiesen werden konnte, da dessen Anteil an der Produktbildung bei den gesättigten Fettsäuren stets am geringsten war (siehe Tabelle 3.9). Vermutlich wurde dieses wenig bevorzugte Produkt in solch geringen Mengen gebildet, dass es unterhalb der Detektionsgrenze lag.

Trotz der vergleichsweise noch niedrigen Umsätze konnte aber insgesamt gezeigt werden, dass die durch CalB synthetisierten Monoester tatsächlich Substrate für CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 darstellen und das Substratspektrum dieser Enzyme somit erweitert werden konnte.

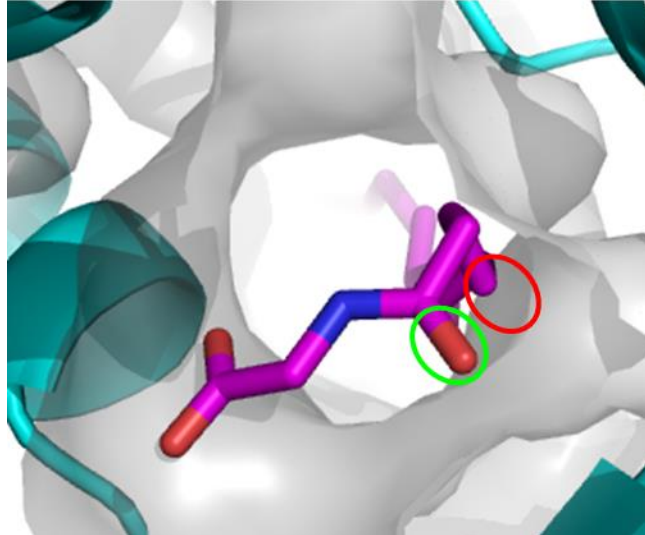


Abbildung 4.4: Vergrößerter Substratkanal des CYP102K1-Homologiemodells (Hellblau), welches auf Basis von CYP102A1 (PDB-Code 1ZOA) erstellt wurde. In Magenta ist das in der Kristallstruktur von CYP102A1 vorhandene Substrat N-Palmitoylglycin und in Grau die innere Oberfläche des Substratkanals erkennbar. Der grün- bzw. rot-umrandete Bereich zeigt den Platz an, der zur Funktionalisierung des vierten bzw. siebten Atoms der Substratkette zur Verfügung steht.

5 Zusammenfassung

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt zwei verschiedene Teilprojekte bearbeitet. Im ersten Teilprojekt wurden putative Elektronentransferproteine aus dem thermophilen Bakterium *Thermobifida fusca* untersucht. Dabei sollten einerseits die natürlichen Elektronentransferpartner von CYP154H1, einer thermostabilen Dreikomponenten-P450 Monooxygenase aus *T. fusca*, identifiziert werden. Darüber hinaus sollten auch thermostabile Redoxpartner weiterer Cytochrom P450 Monooxygenasen für deren Einsatz in der Biokatalyse gefunden werden. Dazu wurden zunächst für alle ausgewählten Redoxproteine aus *T. fusca* (fünf Ferredoxine, ein Flavodoxin und vier Ferredoxinreduktasen) geeignete Bedingungen zur löslichen Expression in *E. coli* etabliert. Die Ferredoxinreduktasen sowie zwei Ferredoxine konnten zudem erfolgreich aufgereinigt werden. Alle Ferredoxinreduktasen waren aktiv und deren Cofaktorpräferenz wurde bestimmt. Im Cytochrom c-Assay konnten zudem verschiedene Redoxproteinkombinationen identifiziert werden, die in der Lage sind, miteinander zu kooperieren. Die Kombination von Fdx 8 mit FdR 9 stach dabei besonders heraus, da die ermittelte spezifische Aktivität sogar die Aktivität der Positivkontrolle aus Pdx und PdR übertraf. In der Folge wurden die verschiedenen Redoxpartnerkombinationen in Biokatalysen mit CYP154H1, CYP154C5 aus *N. farcinica* und CYP106A2 aus *B. megaterium* eingesetzt. Die Auswertung der Biokatalysen ergab allerdings, dass in keinem Fall ein Umsatz erzielt werden konnte, der signifikant und reproduzierbar höher als der Umsatz der entsprechenden Negativkontrollen ausfiel. Die Umsätze der Positivkontrollen mit Pdx, PdR und den jeweiligen Cytochrom P450 Monooxygenasen lagen dagegen immer deutlich über denen der Negativkontrollen. Daher kann geschlossen werden, dass sich die natürlichen Elektronentransferpartner für CYP154H1 wahrscheinlich nicht unter den getesteten Proteinen befanden, vorausgesetzt alle getesteten Redoxproteine waren unter den gegebenen Bedingungen korrekt gefaltet und aktiv. Gleichfalls stellte sich heraus, dass die verschiedenen Redoxpartner ebenfalls nicht in der Lage waren, Elektronen auf die beiden anderen getesteten Cytochrom P450 Monooxygenasen, CYP154C5 und CYP106A2, zu übertragen.

Das zweite Teilprojekt umfasste die Untersuchung der zu CYP102A1 homologen Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP102K1 aus dem gram-negativen Bakterium *Azorhizobium caulinodans* sowie CYP102_{Nmu} aus *Nakamurella multipartia*. Die Sequenzidentitäten der Hämdomänen beider Enzyme lagen im Vergleich zur CYP102A1-Hämdomäne jeweils bei unter 40 %. Daher sollte untersucht werden, ob eine solch geringe Sequenzidentität der Hämdomäne ebenfalls ein unterschiedliches Substratspektrum mit sich bringt. Jedoch konnte nur CYP102K1 in löslicher Form heterolog in *E. coli* exprimiert werden, während sämtliche Versuche zur löslichen Expression von CYP102_{Nmu} nicht erfolgreich waren. CYP102K1 konnte in guter Ausbeute (66 mg pro Liter Kultur) und hoher Reinheit

(ca. 90 %) über IMAC aufgereinigt werden. Im Cytochrom c-Assay zeigte das Enzym eine eindeutige Präferenz für den Cofaktor NADPH gegenüber NADH. Die Untersuchung des Substratspektrums ergab, dass lineare gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zehn bis fünfzehn Kohlenstoffatomen, die lineare ungesättigte Fettsäure 12-Tridecensäure und β -Jonon geeignete Substrate für CYP102K1 darstellen. Dabei wies CYP102K1 eine eindeutige Präferenz für Tridecensäure auf, eine selten vorkommende Fettsäure, die bisher für keinen anderen Vertreter der CYP102-Familie als bevorzugtes Substrat bekannt ist (Choi et al., 2012; Chowdhary et al., 2007; Dietrich et al., 2008; Gustafsson et al., 2004). Bei Analyse der Fettsäureprodukte wurde eine eindeutige Regioselektivität des Enzyms für die ω -1- bis ω -3-Position ersichtlich. Damit werden interessanterweise, trotz der geringen Sequenzidentität von CYP102K1 und CYP102A1, von beiden P450-Enzymen sehr ähnliche Substrate mit vergleichbarer Regioselektivität umgesetzt.

Zusätzlich wurde eine N-terminal verkürzte CYP102K1-Variante, N'-short-CYP102K1, erzeugt und untersucht. Dazu wurde der in CYP102A1 nicht vorhandene 80 Aminosäuren lange Überhang am N-Terminus von CYP102K1 entfernt. Bei der anschließenden Charakterisierung des aufgereinigten Enzyms wurden viele Ähnlichkeiten zu CYP102K1 festgestellt. Es stellte sich jedoch ebenfalls heraus, dass diese Variante im Vergleich zu CYP102K1 jeweils eine etwas höhere Stabilität bezüglich des pH-Werts und der Reaktionstemperatur aufweist. Dagegen wurden längere Fettsäuren von CYP102K1 deutlich besser umgesetzt. Ohne den N-terminalen Überhang war es ebenfalls möglich, ein Homologiemodell auf Basis von CYP102A1 zu erstellen. Anhand dessen konnten strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den CYP102K1-Varianten und CYP102A1 gefunden werden, welche die ähnlichen Substratspektren erklären.

Um das Substratspektrum von CYP102K1 zu erweitern, wurden zusätzlich zwei verschiedene Dicarbonsäuremonoester, Pimelinsäuremonopentyl- und Succinylsäuremonooctylester, mittels Lipasekatalyse im präparativen Maßstab synthetisiert und anschließend in Biokatalysen mit CYP102K1 und N'-short-CYP102K1 getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Monoester tatsächlich Substrate für die genannten Varianten darstellen. In beiden Fällen wurden Produkte nachgewiesen, die an der ω -1- und ω -2-Position hydroxyliert wurden, auch wenn die erzielten Umsätze nur relativ gering ausfielen. Durch anschließende Hydrolyse der Produkte könnten somit die gebildeten kurzkettigen aliphatischen Dirole freigesetzt werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass zum ersten Mal Dicarbonsäuremonoester als Substrate für Cytochrom P450 Monooxygenasen der CYP102-Familie eingesetzt und tatsächlich als akzeptierte Substrate nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren wurde mit CYP102K1 zum ersten Mal eine zu CYP102A1 homologe Einkomponenten-P450 aus einem gram-negativen Bakterium charakterisiert.

6 Literaturverzeichnis

- Adlercreutz, P., 2013. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6406–6436.
- Agematu, H., Matsumoto, N., Fujii, Y., Kabumoto, H., Doi, S., Machida, K., Ishikawa, J., Arisawa, A., 2006. Hydroxylation of Testosterone by Bacterial Cytochromes P450 Using the *Escherichia coli* Expression System. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 307–311.
- Ai, X., Zhou, Z., Bai, Y., Choy, W.-Y., 2006. ¹⁵N NMR Spin Relaxation Dispersion Study of the Molecular Crowding Effects on Protein Folding under Native Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3916–3917.
- Albin, G.W., Horbett, T.A., Miller, S.R., Ricker, N.L., 1987. Theoretical and experimental studies of glucose sensitive membranes. *J. Controlled Release* 6, 267–291.
- Alivisatos, S.G.A., Ungar, F., Abraham, G.J., 1965. Spontaneous Reactions of 1,3-Substituted 1,4-Dihydropyridines with Acids in Water at Neutrality. I. Kinetic Analysis and Mechanism of the Reactions of Dihydronicotinamide-Adenine Dinucleotide with Orthophosphates*. *Biochemistry (Mosc.)* 4, 2616–2630.
- Anderson, E.M., Larsson, K.M., Kirk, O., 1998. One Biocatalyst – Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal. Biotransformation* 16, 181–204.
- Anobom, C.D., Pinheiro, A.S., De-Andrade, R.A., Aguiéiras, E.C.G., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V., Freire, D.M., 2014. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *BioMed Res. Int.* 2014, e684506.
- Aono, S., Nakamura, S., Aono, R., Okura, I., 1994. Cloning and Expression of the Gene Encoding the 7Fe Type Ferredoxin from a Thermophilic Hydrogen Oxidizing Bacterium, *Bacillus schlegelii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 938–942.
- Araújo, A.P.U., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R.C., Cáceres, O., Beltramini, L.M., 2000. Influence of the Histidine Tail on the Structure and Activity of Recombinant Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 480–484.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195–201.
- Arroyo, M., Sinisterra, J.V., 1994. High Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized Lipase from *Candida antarctica*: A Mechanistic Approach. *J. Org. Chem.* 59, 4410–4417.
- Atsumi, S., Hanai, T., Liao, J.C., 2008. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451, 86–89.
- Axarli, I., Prigipaki, A., Labrou, N.E., 2010. Cytochrome P450 102A2 Catalyzes Efficient Oxidation of Sodium Dodecyl Sulphate: A Molecular Tool for Remediation. *Enzyme Res.* 2010, 125429.
- Bachmann, S.L., McCarthy, A.J., 1991. Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2121–2130.
- Baneyx, F., Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1399–1408. doi:10.1038/nbt1029
- Berg, A., Gustafsson, J.A., Ingelman-Sundberg, M., 1976. Characterization of a cytochrome P-450-dependent steroid hydroxylase system present in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 251, 2831–2838.
- Bernhardt, R., 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124, 128–145.
- Bernhardt, R., Urlacher, V.B., 2014. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6185–6203.
- Bianchi, V., Reichard, P., Eliasson, R., Pontis, E., Krook, M., Jörnvall, H., Haggård-Ljungquist, E., 1993. *Escherichia coli* ferredoxin NADP⁺ reductase: activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (fpr), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* 175, 1590–1595.

- Birch, O.M., Fuhrmann, M., Shaw, N.M., 1995. Biotin Synthase from *Escherichia coli*, an Investigation of the Low Molecular Weight and Protein Components Required for Activity in Vitro. *J. Biol. Chem.* 270, 19158–19165.
- Björkling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O., 1989. A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 934–935.
- Black, S.D., Martin, S.T., 1994. Evidence for Conformational Dynamics and Molecular Aggregation in Cytochrome P450 102 (BM-3). *Biochemistry (Mosc.)* 33, 12056–12062.
- Blaschkowski, H.P., Knappe, J., Ludwig-Festl, M., Neuer, G., 1982. Routes of Flavodoxin and Ferredoxin Reduction in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 123, 563–569.
- Boddupalli, S.S., Hasemann, C.A., Ravichandran, K.G., Lu, J.Y., Goldsmith, E.J., Deisenhofer, J., Peterson, J.A., 1992a. Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of P450terp and the hemoprotein domain of P450BM-3, enzymes belonging to two distinct classes of the cytochrome P450 superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 5567–5571.
- Boddupalli, S.S., Pramanik, B.C., Slaughter, C.A., Estabrook, R.W., Peterson, J.A., 1992b. Fatty acid monooxygenation by P450BM-3: product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 20–28.
- Bogazkaya, A.M., von Bühler, C.J., Kriening, S., Busch, A., Seifert, A., Pleiss, J., Laschat, S., Urlacher, V.B., 2014. Selective allylic hydroxylation of acyclic terpenoids by CYP154E1 from *Thermobifida fusca* YX. *Beilstein J. Org. Chem.* 10, 1347–1353.
- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K., 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185–194.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J., 2005. *Hydrolases in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bracco, P., 2014. Selective steroid hydroxylation by bacterial cytochrome P450 monooxygenases. RWTH Aachen.
- Bracco, P., Janssen, D.B., Schallmey, A., 2013. Selective steroid oxyfunctionalisation by CYP154C5, a bacterial cytochrome P450. *Microb. Cell Factories* 12, 95.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Broadbent, D.A., Cartwright, N.J., 1974. Bacterial attack on phenolic ethers. Electron acceptor-substrate binding proteins in bacterial O-dealkylases: purification and characterization of cytochrome P-450npd of *Nocardia*. *Microbios* 9, 119–130.
- Bruggink, A., Roos, E.C., de Vroom, E., 1998. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Org. Process Res. Dev.* 2, 128–133.
- Bruschi, M., Guerlesquin, F., 1988. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 54, 155–175.
- Budde, M., Maurer, S.C., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., 2004. Cloning, expression and characterisation of CYP102A2, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 180–186.
- Budde, M., Morr, M., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., 2006. Selective hydroxylation of highly branched fatty acids and their derivatives by CYP102A1 from *Bacillus megaterium*. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 7, 789–794.
- Von Bühler, C., Le-Huu, P., Urlacher, V.B., 2013. Cluster Screening: An Effective Approach for Probing the Substrate Space of Uncharacterized Cytochrome P450s. *ChemBioChem* 14, 2189–2198.
- Bulmer, M., 1987. Coevolution of codon usage and transfer RNA abundance. *Nature* 325, 728–730.
- Busch, J.L., Breton, J.L., Bartlett, B.M., James, R., Hatchikian, E.C., Thomson, A.J., 1996. Expression in *Escherichia coli* and characterization of a reconstituted recombinant 7Fe ferredoxin from *Desulfovibrio africanus*. *Biochem. J.* 314, 63–71.
- Cammack, R., Rao, K.K., Hall, D.O., Moura, J.J., Xavier, A.V., Bruschi, M., Le Gall, J., Deville, A., Gayda, J.P., 1977. Spectroscopic studies of the oxidation-reduction properties of three forms of ferredoxin from *Desulphovibrio gigas*. *Biochim. Biophys. Acta* 490, 311–321.

- Capdevila, J.H., Wei, S., Helvig, C., Falck, J.R., Belosludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S.E., Peterson, J.A., 1996. The Highly Stereoselective Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by Cytochrome P450BM-3. *J. Biol. Chem.* 271, 22663–22671.
- Carmichael, A.B., Wong, L.L., 2001. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 3117–3125.
- Cheng, Q., Lamb, D.C., Kelly, S.L., Lei, L., Guengerich, F.P., 2010. Cyclization of a Cellular Dipentaenone by *Streptomyces coelicolor* Cytochrome P450 154A1 without Oxidation/Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15173–15175.
- Chen, X., Su, Z., Horner, J.H., Newcomb, M., 2011. Oxidation of 10-undecenoic acid by cytochrome P450(BM-3) and its Compound I transient. *Org. Biomol. Chem.* 9, 7427–7433.
- Cheung, M.S., Klimov, D., Thirumalai, D., 2005. Molecular crowding enhances native state stability and refolding rates of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4753–4758.
- Choi, K.-Y., Jung, E., Jung, D.-H., Pandey, B.P., Yun, H., Park, H., Kazlauskas, R.J., Kim, B.-G., 2012. Cloning, expression and characterization of CYP102D1, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Streptomyces avermitilis*. *FEBS J.* 279, 1650–1662.
- Choi, K.-Y., Park, H.-Y., Kim, B.-G., 2010. Characterization of bi-functional CYP154 from *Nocardia farcinica* IFM10152 in the O-dealkylation and ortho-hydroxylation of formononetin. *Enzyme Microb. Technol.* 47, 327–334.
- Chowdhary, P.K., Alemseghed, M., Haines, D.C., 2007. Cloning, expression and characterization of a fast self-sufficient P450: CYP102A5 from *Bacillus cereus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 468, 32–43.
- Chung, Y.-H., Song, J.-W., Choi, K.-Y., Yoon, J.W., Yang, K.-M., Park, J.-B., 2012. Cloning, expression, and characterization of P450 monooxygenase CYP102H1 from *Nocardia farcinica*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 55, 259–264.
- Chun, Y.-J., Shimada, T., Sanchez-Ponce, R., Martin, M.V., Lei, L., Zhao, B., Kelly, S.L., Waterman, M.R., Lamb, D.C., Guengerich, F.P., 2007. Electron Transport Pathway for a Streptomyces Cytochrome P450 – Cytochrome P450 105D5-catalyzed Fatty Acid Hydroxylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* 282, 17486–17500.
- Clark, J.P., Miles, C.S., Mowat, C.G., Walkinshaw, M.D., Reid, G.A., Daff, S.N., Chapman, S.K., 2006. The role of Thr268 and Phe393 in cytochrome P450 BM3. *J. Inorg. Biochem.*, Special Issue Containing Contributions from the 12th International Conference on Biological Inorganic Chemistry 100, 1075–1090.
- Correia, M.A., Montellano, P.R.O. de, 2005. Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes, in: Montellano, P.R.O. de (Ed.), *Cytochrome P450*. Springer US, pp. 247–322.
- Cowart, L.A., Falck, J.R., Capdevila, J.H., 2001. Structural determinants of active site binding affinity and metabolism by cytochrome P450 BM-3. *Arch. Biochem. Biophys.* 387, 117–124.
- Cryle, M.J., De Voss, J.J., 2008. The Role of the Conserved Threonine in P450BM3 Oxygen Activation: Substrate-Determined Hydroxylation Activity of the Thr268Ala Mutant. *ChemBioChem* 9, 261–266.
- Cryle, M.J., Espinoza, R.D., Smith, S.J., Matovic, N.J., De Voss, J.J., 2006. Are branched chain fatty acids the natural substrates for P450(BM3)? *Chem. Commun. Camb. Engl.* 2353–2355.
- Cserző, M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B., Simon, I., 2002. On filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng.* 15, 745–752.
- Daiber, A., Shoun, H., Ullrich, V., 2005. Nitric oxide reductase (P450nor) from *Fusarium oxysporum*. *J. Inorg. Biochem.* 99, 185–193.
- Dawson, J.H., Sono, M., 1987. Cytochrome P-450 and chloroperoxidase: thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination of their active-site structures and mechanistic implications of thiolate ligation. *Chem. Rev.* 87, 1255–1276.
- Deng, H., Chen, S., Wu, D., Chen, J., Wu, J., 2013. Heterologous expression and biochemical characterization of glucose isomerase from *Thermobifida fusca*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 1211–1219.

- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I., 2005. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* 105, 2253–2278.
- Dietrich, M., Eiben, S., Asta, C., Do, T.A., Pleiss, J., Urlacher, V.B., 2008. Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 931–940.
- Dimri, G.P., Roy, K.B., Das, H.K., 1988. Cloning of ferredoxin I gene from *Azotobacter vinelandii* using synthetic oligonucleotide probes. *J. Biosci.* 13, 323–327.
- Dobson, C.M., Ellis, R.J., 1998. Protein folding and misfolding inside and outside the cell. *EMBO J.* 17, 5251–5254.
- Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C.G., 1996. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J. Mol. Biol.* 260, 649–663.
- Dowling, T.E., Preston, G.G., Ludden, P.W., 1982. Heat activation of the Fe protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 257, 13987–13992.
- Dreyfus, B., Alazard, D., Dommergues, Y.R., 1984. Stem-nodulating rhizobia, in: *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C, pp. 161–169.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L., Gillis, M., 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 89–98.
- Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., Pompon, D., 1998. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat. Biotechnol.* 16, 186–189.
- Ebbinghaus, S., Dhar, A., McDonald, J.D., Gruebele, M., 2010. Protein folding stability and dynamics imaged in a living cell. *Nat. Methods* 7, 319–323.
- Eiben, S., Bartelmäs, H., Urlacher, V.B., 2007. Construction of a thermostable cytochrome P450 chimera derived from self-sufficient mesophilic parents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1055–1061.
- Elmerich, C., Dreyfus, B.L., Reyssset, G., Aubert, J.-P., 1982. Genetic analysis of nitrogen fixation in a tropical fast-growing *Rhizobium*. *EMBO J.* 1, 499–503.
- English, N., Hughes, V., Wolf, C.R., 1994. Common pathways of cytochrome P450 gene regulation by peroxisome proliferators and barbiturates in *Bacillus megaterium* ATCC14581. *J. Biol. Chem.* 269, 26836–26841.
- Estell, D.A., Graycar, T.P., Wells, J.A., 1985. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* 260, 6518–6521.
- Ewen, K.M., Kleser, M., Bernhardt, R., 2011. Adrenodoxin: The archetype of vertebrate-type [2Fe–2S] cluster ferredoxins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics, Cytochrome P450: Structure, biodiversity and potential for application* 1814, 111–125.
- Ewen, K.M., Ringle, M., Bernhardt, R., 2012. Adrenodoxin – A versatile ferredoxin. *IUBMB Life* 64, 506–512.
- Farewell, A., Neidhardt, F.C., 1998. Effect of Temperature on In Vivo Protein Synthetic Capacity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 4704–4710.
- Freydank, A.-C., Brandt, W., Dräger, B., 2008. Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 72, 173–183.
- Fujii, K., Huennekens, F.M., 1974. Activation of Methionine Synthetase by a Reduced Triphosphopyridine Nucleotide-dependent Flavoprotein System. *J. Biol. Chem.* 249, 6745–6753.
- Fukuda, E., Kino, H., Matsuzawa, H., Wakagi, T., 2001. Role of a highly conserved YPITP motif in 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase: heterologous expression of the gene from *Sulfolobus* sp. strain 7, and characterization of the recombinant and variant enzymes. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 5639–5646.
- Fulco, A.J., 1991. P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 177–203.

- Gerber, N.C., Sligar, S.G., 1992. Catalytic mechanism of cytochrome P-450: evidence for a distal charge relay. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8742–8743.
- Girhard, M., Klaus, T., Khatri, Y., Bernhardt, R., Urlacher, V.B., 2010. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 595–607.
- Girvan, H.M., Toogood, H.S., Littleford, R.E., Seward, H.E., Smith, W.E., Ekanem, I.S., Leys, D., Cheesman, M.R., Munro, A.W., 2009. Novel haem coordination variants of flavocytochrome P450 BM3. *Biochem. J.* 417, 65.
- Goethals, K., Leyman, B., Van Den Eede, G., Van Montagu, M., Holsters, M., 1994. An *Azorhizobium caulinodans* ORS571 locus involved in lipopolysaccharide production and nodule formation on *Sesbania rostrata* stems and roots. *J. Bacteriol.* 176, 92–99.
- Gotoh, O., 1992. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* 267, 83–90.
- Green, A.J., Munro, A.W., Cheesman, M.R., Reid, G.A., von Wachenfeldt, C., Chapman, S.K., 2003. Expression, purification and characterisation of a *Bacillus subtilis* ferredoxin: a potential electron transfer donor to cytochrome P450. *Biol. J. Inorg. Biochem.* 93, 92–99.
- Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R., 2000. Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 40, 590–612.
- Groves, J.T., McClusky, G.A., White, R.E., Coon, M.J., 1978. Aliphatic hydroxylation by highly purified liver microsomal cytochrome P-450. Evidence for a carbon radical intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 154–160.
- Guengerich, F.P., 2002. Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biol. Chem.* 383, 1553–1564.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., 1997. Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 14741–14750.
- Gunsalus, I.C., Lipscomb, J.D., Meeks, J.R., 1973. Cytochrome P-450cam Substrate and Effector Interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 212, 107–121.
- Gunsalus, I.C., Sligar, S.G., 1978. Oxygen reduction by the P450 monooxygenase systems. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47, 1–44.
- Gustafsson, M.C.U., Roitel, O., Marshall, K.R., Noble, M.A., Chapman, S.K., Pessegueiro, A., Fulco, A.J., Cheesman, M.R., von Wachenfeldt, C., Munro, A.W., 2004. Expression, Purification, and Characterization of *Bacillus subtilis* Cytochromes P450 CYP102A2 and CYP102A3: Flavocytochrome Homologues of P450 BM3 from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 5474–5487.
- Haines, D.C., Tomchick, D.R., Machius, M., Peterson, J.A., 2001. Pivotal Role of Water in the Mechanism of P450BM-3[†]. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 13456–13465.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R., 2007. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1770, 330–344.
- Hawkes, D.B., Adams, G.W., Burlingame, A.L., Montellano, P.R.O. de, Voss, J.J.D., 2002. Cytochrome P450cin (CYP176A), Isolation, Expression, and Characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 27725–27732.
- Heldt-Hansen, H.P., Michiyo, I., Patkar, S.A., Hansen, T.T., Eigtved, P., 1989. A New Immobilized Positional Nonspecific Lipase for Fat Modification and Ester Synthesis, in: *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 158–172.

- Herzog, K., Bracco, P., Onoda, A., Hayashi, T., Hoffmann, K., Schallmey, A., 2014. Enzyme–substrate complex structures of CYP154C5 shed light on its mode of highly selective steroid hydroxylation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 2875–2889.
- Hills, G., 2003. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 601–607.
- Hofzumahaus, S., 2013. Verbesserung der Substrataufnahme in Ganzzellbiotransformationen mit *Escherichia coli* 25.11.2013. Publikationsserver der RWTH Aachen University.
- Ho, P.P., Fulco, A.J., 1976. Involvement of a single hydroxylase species in the hydroxylation of palmitate at the omega-1, omega-2 and omega-3 positions by a preparation from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* 431, 249–256.
- Huang, W.-C., Westlake, A.C.G., Maréchal, J.-D., Joyce, M.G., Moody, P.C.E., Roberts, G.C.K., 2007. Filling a Hole in Cytochrome P450 BM3 Improves Substrate Binding and Catalytic Efficiency. *J. Mol. Biol.* 373, 633–651.
- Hung, T.-C., Giridhar, R., Chiou, S.-H., Wu, W.-T., 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 26, 69–78.
- Hussain, H.A., Ward, J.M., 2003. Enhanced Heterologous Expression of Two *Streptomyces griseolus* Cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* Ferredoxin Reductase as Potentially Efficient Hydroxylation Catalysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 373–382.
- Hu, Y., Faham, S., Roy, R., Adams, M.W.W., Rees, D.C., 1999. Formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*: the 1.85 Å resolution crystal structure and its mechanistic implications. *J. Mol. Biol.* 286, 899–914.
- Hu, Y., Feng, L., Li, Y., Zhang, Y., Lu, P., Rayner, S., Chen, S., 2012. Ribosomal Binding Site Switching: An Effective Strategy for High-Throughput Cloning Constructions. *PLoS ONE* 7, e50142.
- Imai, M., Shimada, H., Watanabe, Y., Matsushima-Hibiya, Y., Makino, R., Koga, H., Horiuchi, T., Ishimura, Y., 1989. Uncoupling of the cytochrome P-450cam monooxygenase reaction by a single mutation, threonine-252 to alanine or valine: possible role of the hydroxy amino acid in oxygen activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7823–7827.
- Jackson, C.J., Lamb, D.C., Marczylo, T.H., Warrilow, A.G.S., Manning, N.J., Lowe, D.J., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2002. A Novel Sterol 14 α -Demethylase/Ferredoxin Fusion Protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* Represents a New Class of the Cytochrome P450 Superfamily. *J. Biol. Chem.* 277, 46959–46965.
- Jaeger, K.-E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390–397.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 29–63.
- Jaeger, K.-E., Reetz, M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16, 396–403.
- Jenkins, C.M., Waterman, M.R., 1994. Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J. Biol. Chem.* 269, 27401–27408.
- Jensen, V.J., Rugh, S., 1987. Industrial-scale production and application of immobilized glucose isomerase, in: Mosbach, K. (Ed.), *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C*. Academic Press, pp. 356–370.
- Jin, J., Mazon, H., van den Heuvel, R.H.H., Heck, A.J., Janssen, D.B., Fraaije, M.W., 2008. Covalent flavinylation of vanillyl-alcohol oxidase is an autocatalytic process. *FEBS J.* 275, 5191–5200.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., Johnson, M.K., 2005. Structure, Function, and Formation of Biological Iron-Sulfur Clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 247–281.
- Joint Center for Structural Genomics, 2007. Crystal structure of dimeric ferredoxin-like protein of unknown function (YP_288824.1) from *Thermobifida fusca* YX at 1.50 Å resolution.
- Julsing, M.K., Cornelissen, S., Bühler, B., Schmid, A., 2008. Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr. Opin. Chem. Biol., Biocatalysis and biotransformation/Bioinorganic chemistry* 12, 177–186.

- Jung, Y.-S., Gao-Sheridan, H.S., Christiansen, J., Dean, D.R., Burgess, B.K., 1999. Purification and Biophysical Characterization of a New [2Fe-2S] Ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a Putative [Fe-S] Cluster Assembly/Repair Protein. *J. Biol. Chem.* 274, 32402–32410.
- Kadkhodayan, S., Coulter, E.D., Maryniak, D.M., Bryson, T.A., Dawson, J.H., 1995. Uncoupling oxygen transfer and electron transfer in the oxygenation of camphor analogues by cytochrome P450-CAM. Direct observation of an intermolecular isotope effect for substrate C-H activation. *J. Biol. Chem.* 270, 28042–28048.
- Kahn, R.A., Bak, S., Olsen, C.E., Svendsen, I., Møller, B.L., 1996. Isolation and Reconstitution of the Heme-Thiolate Protein Obtusifolioside 14 α -Demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Biol. Chem.* 271, 32944–32950.
- Kanaya, S., Yamada, Y., Kinouchi, M., Kudo, Y., Ikemura, T., 2001. Codon Usage and tRNA Genes in Eukaryotes: Correlation of Codon Usage Diversity with Translation Efficiency and with CG-Dinucleotide Usage as Assessed by Multivariate Analysis. *J. Mol. Evol.* 53, 290–298.
- Katayama, M., Kondo, T., Xiong, J., Golden, S.S., 2003. IdpA Encodes an Iron-Sulfur Protein Involved in Light-Dependent Modulation of the Circadian Period in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Bacteriol.* 185, 1415–1422.
- Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T., 2009. Finding better protein engineering strategies. *Nat. Chem. Biol.* 5, 526–529.
- Khatri, Y., Hannemann, F., Ewen, K.M., Pistorius, D., Perlova, O., Kagawa, N., Brachmann, A.O., Müller, R., Bernhardt, R., 2010. The CYPome of *Sorangium cellulosum* So ce56 and Identification of CYP109D1 as a New Fatty Acid Hydroxylase. *Chem. Biol.* 17, 1295–1305.
- 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., 2007. Sequence-based screening for self-sufficient P450 monooxygenase from a metagenome library. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1392–1400.
- Kim, J.-S., Ahn, T., Yim, S.-K., Yun, C.-H., 2002. Differential Effect of Copper (II) on the Cytochrome P450 Enzymes and NADPH-Cytochrome P450 Reductase: Inhibition of Cytochrome P450-Catalyzed Reactions by Copper (II) Ion[†]. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 9438–9447.
- Kitazume, T., Haines, D.C., Estabrook, R.W., Chen, B., Peterson, J.A., 2007. Obligatory Intermolecular Electron-Transfer from FAD to FMN in Dimeric P450BM-3. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 11892–11901.
- Kitazume, T., Takaya, N., Nakayama, N., Shoun, H., 2000. *Fusarium oxysporum* Fatty-acid Subterminal Hydroxylase (CYP505) Is a Membrane-bound Eukaryotic Counterpart of *Bacillus megaterium* Cytochrome P450BM3. *J. Biol. Chem.* 275, 39734–39740.
- Kitazume, T., Tanaka, A., Takaya, N., Nakamura, A., Matsuyama, S., Suzuki, T., Shoun, H., 2002. Kinetic analysis of hydroxylation of saturated fatty acids by recombinant P450foxy produced by an *Escherichia coli* expression system. *Eur. J. Biochem.* 269, 2075–2082.
- Kizawa, H., Tomura, D., Oda, M., Fukamizu, A., Hoshino, T., Gotoh, O., Yasui, T., Shoun, H., 1991. Nucleotide sequence of the unique nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 cDNA from *Fusarium oxysporum*. *J. Biol. Chem.* 266, 10632–10637.
- Kleeberg, I., Welzel, K., VandenHeuvel, J., Müller, R.-J., Deckwer, W.-D., 2005. Characterization of a New Extracellular Hydrolase from *Thermobifida fusca* Degrading Aliphatic-Aromatic Copolyesters. *Biomacromolecules* 6, 262–270.
- Klingenberg, M., 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376–386.
- Klump, H., Ruggiero, J.D., Kessel, M., Park, J.B., Adams, M.W., Robb, F.T., 1992. Glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Thermal denaturation and activation. *J. Biol. Chem.* 267, 22681–22685.
- Kojoh, K., Matsuzawa, H., Wakagi, T., 1999. Zinc and an N-terminal extra stretch of the ferredoxin from a thermoacidophilic archaeon stabilize the molecule at high temperature. *Eur. J. Biochem. FEBS* 264, 85–91.

- Koo, L.S., Tschirret-Guth, R.A., Straub, W.E., Moënné-Loccoz, P., Loehr, T.M., Ortiz de Montellano, P.R., 2000. The active site of the thermophilic CYP119 from *Sulfolobus solfataricus*. J. Biol. Chem. 275, 14112–14123.
- Krüger, P., 2013. Klonierung, Expression und Charakterisierung von flavin-haltigen Proteinen aus *Thermobifida fusca*. Bachelorarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Lacour, T., Achstetter, T., Dumas, B., 1998. Characterization of Recombinant Adrenodoxin Reductase Homologue (Arh1p) from Yeast. Implication in in Vitro Cytochrome P450_{11beta} Monooxygenase System. J Biol Chem 273, 23984–23992.
- Lamb, D.C., Lei, L., Zhao, B., Yuan, H., Jackson, C.J., Warrilow, A.G.S., Skaug, T., Dyson, P.J., Dawson, E.S., Kelly, S.L., Hachey, D.L., Waterman, M.R., 2010. *Streptomyces coelicolor* A3(2) CYP102 Protein, a Novel Fatty Acid Hydroxylase Encoded as a Heme Domain without an N-Terminal Redox Partner. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1975–1980.
- Lamb, D.C., Skaug, T., Song, H.-L., Jackson, C.J., Podust, L.M., Waterman, M.R., Kell, D.B., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2002. The Cytochrome P450 Complement (CYPome) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Biol. Chem. 277, 24000–24005.
- Langen, R., Jensen, G.M., Jacob, U., Stephens, P.J., Warshel, A., 1992. Protein control of iron-sulfur cluster redox potentials. J. Biol. Chem. 267, 25625–25627.
- Lau, S.M., Harder, P.A., O'Keefe, D.P., 1993. Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues. Biochemistry (Mosc.) 32, 1945–1950.
- Lee, Y.-T., Wilson, R.F., Rupniewski, I., Goodin, D.B., 2010. P450cam Visits an Open Conformation in the Absence of Substrate. Biochemistry (Mosc.) 49, 3412–3419.
- Lei, L., Waterman, M.R., Fulco, A.J., Kelly, S.L., Lamb, D.C., 2004. Availability of specific reductases controls the temporal activity of the cytochrome P450 complement of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 494–499.
- Liang, J., Lalonde, J., Borup, B., Mitchell, V., Mundorff, E., Trinh, N., Kochrekar, D.A., Nair Cherat, R., Pai, G.G., 2009. Development of a Biocatalytic Process as an Alternative to the (–)-DIP-Cl-Mediated Asymmetric Reduction of a Key Intermediate of Montelukast. Org. Process Res. Dev. 14, 193–198.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., 2006. Industrial Biotransformations, 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Li, H., Poulos, T.L., 1999. Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450BM-3. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1441, 141–149.
- Lisurek, M., Kang, M.-J., Hartmann, R.W., Bernhardt, R., 2004. Identification of monohydroxy progesterones produced by CYP106A2 using comparative HPLC and electrospray ionisation collision-induced dissociation mass spectrometry. Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 677–682.
- Liu, S., Li, C., Fang, X., Cao, Z., 2004. Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain α,ω -dicarboxylic acid by *Candida tropicalis*. Enzyme Microb. Technol. 34, 73–77.
- Loida, P.J., Sligar, S.G., 1993. Molecular recognition in cytochrome P-450: Mechanism for the control of uncoupling reactions. Biochemistry (Mosc.) 32, 11530–11538.
- Luthra, A., Denisov, I.G., Sligar, S.G., 2011. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. Arch. Biochem. Biophys. 507, 26–35.
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D.B., Kyrpides, N., 2007. Genome Sequence and Analysis of the Soil Cellulolytic Actinomycete *Thermobifida fusca* YX. J. Bacteriol. 189, 2477–2486.
- Macedo-Ribeiro, S., Martins, B.M., Pereira, P.J., Buse, G., Huber, R., Soulimane, T., 2001. New insights into the thermostability of bacterial ferredoxins: high-resolution crystal structure of the seven-iron ferredoxin from *Thermus thermophilus*. J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem. 6, 663–674.

- Makino, T., Katsuyama, Y., Otomatsu, T., Misawa, N., Ohnishi, Y., 2014. Regio- and Stereospecific Hydroxylation of Various Steroids at the 16 α Position of the D Ring by the *Streptomyces griseus* Cytochrome P450 CYP154C3. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1371–1379.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K., 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 1258, 272–276.
- Martinis, S.A., Blanke, S.R., Hager, L.P., Sligar, S.G., Hui Bon Hoa, G., Rux, J.J., Dawson, J.H., 1996. Probing the Heme Iron Coordination Structure of Pressure-Induced Cytochrome P420cam. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 14530–14536.
- Matson, R.S., Hare, R.S., Fulco, A.J., 1977. Characteristics of a cytochrome P-450-dependent fatty acid ω -2 hydroxylase from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 487, 487–494.
- Maurer, A., 2011. Untersuchung putativer Elektronentransferproteine aus *Thermobifida fusca* als Elektronenlieferanten für Cytochrom P450 Monooxygenasen. Bachelorarbeit. RWTH Aachen.
- Maurer, S.C., Kühnel, K., Kaysser, L.A., Eiben, S., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., 2005. Catalytic Hydroxylation in Biphasic Systems using CYP102A1 Mutants. *Adv. Synth. Catal.* 347, 1090–1098.
- Maurer, S.C., Schulze, H., Schmid, R.D., Urlacher, V., 2003. Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP+ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-Containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* 345, 802–810.
- Maves, S.A., Yeom, H., McLean, M.A., Sligar, S.G., 1997. Decreased substrate affinity upon alteration of the substrate-docking region in cytochrome P450BM-3. *FEBS Lett.* 414, 213–218.
- McGrath, C.E., Wilson, D.B., 2006. Characterization of a *Thermobifida fusca* beta-1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 14094–14100.
- McLean, K.J., Sabri, M., Marshall, K.R., Lawson, R.J., Lewis, D.G., Clift, D., Balding, P.R., Dunford, A.J., Warman, A.J., McVey, J.P., Quinn, A.-M., Sutcliffe, M.J., Scrutton, N.S., Munro, A.W., 2005. Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 796–801.
- McLean, K.J., Warman, A.J., Seward, H.E., Marshall, K.R., Girvan, H.M., Cheesman, M.R., Waterman, M.R., Munro, A.W., 2006. Biophysical Characterization of the Sterol Demethylase P450 from *Mycobacterium tuberculosis*, Its Cognate Ferredoxin, and Their Interactions. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 8427–8443.
- McLean, M.A., Maves, S.A., Weiss, K.E., Krepich, S., Sligar, S.G., 1998. Characterization of a cytochrome P450 from the acidothermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 166–172.
- Meinzel, T., Lazennec, C., Dardel, F., Schmitter, J.M., Blanquet, S., 1996. The C-terminal domain of peptide deformylase is disordered and dispensable for activity. *FEBS Lett.* 385, 91–95.
- Michiyo, I., 1988. Positionally non-specific lipase from *Candida* sp, a method for producing it, its use and a recombinant dna process for producing it. WO1988002775 A1.
- Miroux, B., Walker, J.E., 1996. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289–298.
- Miura, Y., Fulco, A.J., 1975. Omega-1, Omega-2 and Omega-3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* 388, 305–317.
- Miura, Y., Fulco, A.J., 1974. (ω -2) Hydroxylation of Fatty Acids by a Soluble System from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 249, 1880–1888.
- Munro, A.W., Girvan, H.M., McLean, K.J., 2007. Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1770, 345–359.
- Nagasawa, T., Nakamura, T., Yamada, H., 1990. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 322–324.

- Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., Shoun, H., 1993. Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. *J. Biol. Chem.* 268, 8350–8355.
- Nakamura, M., Saeki, K., Takahashi, Y., 1999. Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hs cA-fdx-ORF3 gene cluster. *J. Biochem. (Tokyo)* 126, 10–18.
- Nakayama, N., Takemae, A., Shoun, H., 1996. Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem. (Tokyo)* 119, 435–440.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J., 1987. Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 262, 6683–6690.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J., 1986. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 261, 7160–7169.
- Narhi, L.O., Fulco, A.J., 1982. Phenobarbital induction of a soluble cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 257, 2147–2150.
- Nelson, D.R., 2015. Cytochrome P450 Homepage (Internetseite). URL <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> (zuletzt besucht am 21.04.2015).
- Nelson, D.R., 2009. The Cytochrome P450 Homepage. *Hum. Genomics* 4, 59.
- Nelson, L.A., Foglia, T.A., Marmer, W.N., 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1191–1195.
- Nishikubo, T., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R., 2005. Improved heterologous gene expression in *Escherichia coli* by optimization of the AT-content of codons immediately downstream of the initiation codon. *J. Biotechnol.* 120, 341–346.
- Noble, M.A., Miles, C.S., Chapman, S.K., Lysek, D.A., MacKay, A.C., Reid, G.A., Hanzlik, R.P., Munro, A.W., 1999. Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3. *Biochem. J.* 339, 371–379.
- O’Keefe, D.P., Gibson, K.J., Emptage, M.H., Lenstra, R., Romesser, J.A., Litle, P.J., Omer, C.A., 1991. Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus*. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 447–455.
- O’Maille, P.E., Malone, A., Dellas, N., Andes Hess, B., Smentek, L., Sheehan, I., Greenhagen, B.T., Chappell, J., Manning, G., Noel, J.P., 2008. Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene synthases. *Nat. Chem. Biol.* 4, 617–623.
- Omura, T., Sato, R., 1964. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes I. Evidence for its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.
- O’Reilly, E., Köhler, V., Flitsch, S.L., Turner, N.J., 2011. Cytochromes P450 as useful biocatalysts: addressing the limitations. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 47, 2490–2501.
- Orrenius, C., Hbfffner, F., Rotticci, D., öhrner, N., Norin, T., Hult, K., 1998. Chiral Recognition Of Alcohol Enantiomers In Acyl Transfer Reactions Catalysed By Candida Antarctica Lipase B. *Biocatal. Biotransformation* 16, 1–15. doi:10.3109/10242429809040107
- Ortiz de Montellano, P.R., 2005. *Cytochrome P450 - Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed. Springer.
- Ost, T.W.B., Miles, C.S., Murdoch, J., Cheung, Y.-F., Reid, G.A., Chapman, S.K., Munro, A.W., 2000. Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3. *FEBS Lett.* 486, 173–177.
- Ottosson, J., Fransson, L., King, J.W., Hult, K., 2002. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1594, 325–334. doi:10.1016/S0167-4838(01)00324-7
- Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M.D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D.R., Teoh, K.H., Reed, D.W., Treynor, T., Lenihan, J., Jiang, H., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., Diola, D., Dorin, G., Ellens, K.W., Fickes, S.,

- Galazzo, J., Gaucher, S.P., Geistlinger, T., Henry, R., Hepp, M., Horning, T., Iqbal, T., Kizer, L., Lieu, B., Melis, D., Moss, N., Regentin, R., Secrest, S., Tsuruta, H., Vazquez, R., Westblade, L.F., Xu, L., Yu, M., Zhang, Y., Zhao, L., Lievense, J., Covello, P.S., Keasling, J.D., Reiling, K.K., Renninger, N.S., Newman, J.D., 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496, 528–532.
- Palmer, C.N.A., Axen, E., Hughes, V., Wolf, C.R., 1998. The Repressor Protein, Bm3R1, Mediates an Adaptive Response to Toxic Fatty Acids in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 273, 18109–18116.
- Patkar, S.A., Bjoerking, F., Zundel, M., Schukein, M., Svendsen, A., Heldt-Hansen, H.P., Gormsen, E., 1993. Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Ind. J. Chem.* 32B(1), 76–80.
- Peters, M.W., Meinhold, P., Glieder, A., Arnold, F.H., 2003. Regio- and Enantioselective Alkane Hydroxylation with Engineered Cytochromes P450 BM-3. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13442–13450.
- Peterson, D.H., Murray, H.C., Eppstein, S.H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, P.D., Leigh, H.M., 1952. Microbiological Transformations of Steroids.1 I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 5933–5936
- Petzoldt, K., Annen, K., Laurent, H., Wiechert, R., 1982. Process for the preparation of 11 β -hydroxy steroids. US4353985 A.
- Picataggio, S., Rohrer, T., Deanda, K., Lanning, D., Reynolds, R., Mielenz, J., Eirich, L.D., 1992. Metabolic Engineering of *Candida tropicalis* for the Production of Long-Chain Dicarboxylic Acids. *Nat. Biotechnol.* 10, 894–898.
- Pochapsky, T.C., Kazanis, S., Dang, M., 2010. Conformational Plasticity and Structure/Function Relationships in Cytochromes P450. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1273–1296.
- Podust, L.M., Bach, H., Kim, Y., Lamb, D.C., Arase, M., Sherman, D.H., Kelly, S.L., Waterman, M.R., 2004. Comparison of the 1.85 Å structure of CYP154A1 from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with the closely related CYP154C1 and CYPs from antibiotic biosynthetic pathways. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 13, 255–268.
- Podust, L.M., Kim, Y., Arase, M., Neely, B.A., Beck, B.J., Bach, H., Sherman, D.H., Lamb, D.C., Kelly, S.L., Waterman, M.R., 2003. The 1.92-Å Structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) CYP154C1 – A new Monooxygenase that Functionalizes Macrolide Ring Systems. *J. Biol. Chem.* 278, 12214–12221.
- Poppe, J.K., Garcia-Galan, C., Matte, C.R., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., Ayub, M.A.Z., 2013. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 94, 51–56.
- Porter, T.D., Coon, M.J., 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266, 13469–13472.
- Posta, K., Béki, E., Wilson, D.B., Kukolya, J., Hornok, L., 2004. Cloning, characterization and phylogenetic relationships of cel5B, a new endoglucanase encoding gene from *Thermobifida fusca*. *J. Basic Microbiol.* 44, 383–399.
- Poulos, T.L., 2014. Heme Enzyme Structure and Function. *Chem. Rev.*
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C., Kraut, J., 1985. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 260, 16122–16130.
- Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J., 1987. High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J. Mol. Biol.* 195, 687–700.
- Poupin, P., Ducrocq, V., Hallier-Soulier, S., Truffaut, N., 1999. Cloning and characterization of the genes encoding a cytochrome P450 (PipA) involved in piperidine and pyrrolidine utilization and its regulatory protein (PipR) in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *J. Bacteriol.* 181, 3419–3426.

- Puchkaev, A.V., Ortiz de Montellano, P.R., 2005. The *Sulfolobus solfataricus* electron donor partners of thermophilic CYP119: an unusual non-NAD(P)H-dependent cytochrome P450 system. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 169–177.
- Pylypenko, O., Schlichting, I., 2004. Structural aspects of ligand binding to and electron transfer in bacterial and fungal P450s. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 991–1018.
- Ramachandra, M., Seetharam, R., Emptage, M.H., Sariaslani, F.S., 1991. Purification and characterization of a soybean flour-inducible ferredoxin reductase of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 173, 7106–7112.
- Roberts, G.A., Çelik, A., Hunter, D.J.B., Ost, T.W.B., White, J.H., Chapman, S.K., Turner, N.J., Flitsch, S.L., 2003. A Self-Sufficient Cytochrome P450 with a Primary Structural Organization That Includes a Flavin Domain and a [2Fe-2S] Redox Center. *J. Biol. Chem.* 278, 48914–48920.
- Roberts, G.A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S.L., Turner, N.J., 2002. Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J. Bacteriol.* 184, 3898–3908.
- Roccatano, D., Wong, T.S., Schwaneberg, U., Zacharias, M., 2005. Structural and dynamic properties of cytochrome P450 BM-3 in pure water and in a dimethylsulfoxide/water mixture. *Biopolymers* 78, 259–267.
- Ro, D.-K., Paradise, E.M., Ouellet, M., Fisher, K.J., Newman, K.L., Ndungu, J.M., Ho, K.A., Eachus, R.A., Ham, T.S., Kirby, J., Chang, M.C.Y., Withers, S.T., Shiba, Y., Sarpong, R., Keasling, J.D., 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440, 940–943.
- Roitberg, A.E., Holden, M.J., Mayhew, M.P., Kurnikov, I.V., Beratan, D.N., Vilker, V.L., 1998. Binding and Electron Transfer between Putidaredoxin and Cytochrome P450cam. Theory and Experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8927–8932.
- Rosenthaler, L., 1908. Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthese. *Biochem. Z.* 238–253.
- Röthlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A.M., Jiang, L., DeChancie, J., Betker, J., Gallaher, J.L., Althoff, E.A., Zanghellini, A., Dym, O., Albeck, S., Houk, K.N., Tawfik, D.S., Baker, D., 2008. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* 453, 190–195.
- Ruettinger, R.T., Wen, L.P., Fulco, A.J., 1989. Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 264, 10987–10995.
- Ruijsenaars, H.J., Sperling, E.M.G.M., Wiegerinck, P.H.G., Brands, F.T.L., Wery, J., de Bont, J.A.M., 2007. Testosterone 15 β -hydroxylation by solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J. Biotechnol.* 131, 205–208.
- Savile, C.K., Janey, J.M., Mundorff, E.C., Moore, J.C., Tam, S., Jarvis, W.R., Colbeck, J.C., Krebber, A., Fleitz, F.J., Brands, J., Devine, P.N., Huisman, G.W., Hughes, G.J., 2010. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science* 329, 305–309.
- Schägger, H., Jagow, G. von, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Schallmeyer, A., den Besten, G., Teune, I.G.P., Kembaren, R.F., Janssen, D.B., 2011. Characterization of cytochrome P450 monooxygenase CYP154H1 from the thermophilic soil bacterium *Thermobifida fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1475–1485.
- Schenkman, J.B., Jansson, I., 2003. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.* 97, 139–152.
- Schenkman, J.B., Remmer, H., Estabrook, R.W., 1967. Spectral Studies of Drug Interaction with Hepatic Microsomal Cytochrome. *Mol. Pharmacol.* 3, 113–123.
- Schiffer, M., 2011. Stereoselektive Terpen-Oxidationen durch CYP154H1 aus *Thermobifida fusca*. Bachelorarbeit. RWTH Aachen University.
- Schiffler, B., Bureik, M., Reinle, W., Müller, E.-C., Hannemann, F., Bernhardt, R., 2004. The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria. *J. Inorg. Biochem.* 98, 1229–1237.

- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., Sligar, S.G., 2000. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science* 287, 1615–1622.
- Schroer, K., Kittelmann, M., Lütz, S., 2010. Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 106, 699–706.
- Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., Kiley, P.J., 2000. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9009–9014.
- Sedlaczek, L., Smith, L.L., 1988. Biotransformations of Steroids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 7, 187–236.
- Serizawa, N., Matsuoka, T., 1991. A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 35–40.
- Seth-Smith, H.M.B., Rosser, S.J., Basran, A., Travis, E.R., Dabbs, E.R., Nicklin, S., Bruce, N.C., 2002. Cloning, Sequencing, and Characterization of the Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine Degradation Gene Cluster from *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4764–4771.
- Sevrioukova, I.F., Garcia, C., Li, H., Bhaskar, B., Poulos, T.L., 2003. Crystal Structure of Putidaredoxin, the [2Fe–2S] Component of the P450cam Monooxygenase System from *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* 333, 377–392.
- Sevrioukova, I.F., Hazzard, J.T., Tollin, G., Poulos, T.L., 1999. The FMN to Heme Electron Transfer in Cytochrome P450BM-3 – Effect of Chemical Modification of Cysteines Engineered at the FMN-Heme Domain Interaction Site. *J. Biol. Chem.* 274, 36097–36106.
- Sevrioukova, I.F., Li, H., Poulos, T.L., 2004. Crystal Structure of Putidaredoxin Reductase from *Pseudomonas putida*, the Final Structural Component of the Cytochrome P450cam Monooxygenase. *J. Mol. Biol.* 336, 889–902.
- Sevrioukova, I.F., Poulos, T.L., Churbanova, I.Y., 2010. Crystal Structure of the Putidaredoxin Reductase-Putidaredoxin Electron Transfer Complex. *J. Biol. Chem.* 285, 13616–13620.
- Sharma, S., Kanwar, S.S., 2014. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *Sci. World J.* 2014, e625258.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwar, T., Hatanaka, A., 1995. Fatty acid hydroperoxide lyase is a heme protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 438–443.
- Shimizu, S., Kataoka, M., Kita, K., 1998. Chiral alcohol synthesis with yeast carbonyl reductases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5, 321–325.
- Shine, J., Dalgarno, L., 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254, 34–38.
- Shoun, H., Sudo, Y., Beppu, T., 1985. Subterminal hydroxylation of fatty acids by a cytochrome P-450-dependent enzyme system from a fungus, *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem. (Tokyo)* 97, 755–763.
- Sielaff, B., Andreesen, J.R., 2005. Kinetic and binding studies with purified recombinant proteins ferredoxin reductase, ferredoxin and cytochrome P450 comprising the morpholine monooxygenase from *Mycobacterium* sp. strain HE5. *FEBS J.* 272, 1148–1159.
- Sielaff, B., Andreesen, J.R., Schröder, T., 2001. A cytochrome P450 and a ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 458–464.
- Sligar, S.G., Debrunner, P.G., Lipscomb, J.D., Namtvedt, M.J., Gunsalus, I.C., 1974. A Role of the Putidaredoxin COOH-terminus in P-450cam (Cytochrome m) Hydroxylations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 3906–3910.
- Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., Dawson, J.H., 1996. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2841–2888.

- Stephens, P.J., Jollie, D.R., Warshel, A., 1996. Protein Control of Redox Potentials of Iron–Sulfur Proteins. *Chem. Rev.* 96, 2491–2514.
- Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E.M., 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol. Adv.* 31, 1846–1859.
- Stjernschantz, E., van Vugt-Lussenburg, B.M.A., Bonifacio, A., de Beer, S.B.A., van der Zwan, G., Gooijer, C., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E., Oostenbrink, C., 2008. Structural rationalization of novel drug metabolizing mutants of cytochrome P450 BM3. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 71, 336–352.
- Strecker, H.J., 1955. Glucose dehydrogenase from liver, in: *Enzymology*, B.-M. in (Ed.), . Academic Press, pp. 335–339.
- Sulistyaningdyah, W.T., Ogawa, J., Li, Q.-S., Maeda, C., Yano, Y., Schmid, R.D., Shimizu, S., 2005. Hydroxylation activity of P450 BM-3 mutant F87V towards aromatic compounds and its application to the synthesis of hydroquinone derivatives from phenolic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 556–562.
- Szcebara, F.M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Duport, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., Cauet, G., Degryse, E., Balbuena, D., Winter, J., Achstetter, T., Spagnoli, R., Pompon, D., Dumas, B., 2003. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat. Biotechnol.* 21, 143–149.
- Ta, D.T., Vickery, L.E., 1992. Cloning, sequencing, and overexpression of a [2Fe-2S] ferredoxin gene from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 11120–11125.
- Takaya, N., Suzuki, S., Kuwazaki, S., Shoun, H., Maruo, F., Yamaguchi, M., Takeo, K., 1999. Cytochrome P450_{nor}, a Novel Class of Mitochondrial Cytochrome P450 Involved in Nitrate Respiration in the Fungus *Fusarium oxysporum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 340–346.
- Testa, B., Jenner, P., 1981. Inhibitors of Cytochrome P-450s and their mechanism of action. *Drug Metab. Rev.* 12, 1–117.
- Tokumoto, U., Takahashi, Y., 2001. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 63–71.
- Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., 2006. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat. Methods* 3, 55–64.
- Tripathi, S., Li, H., Poulos, T.L., 2013. Structural Basis for Effector Control and Redox Partner Recognition in Cytochrome P450. *Science* 340, 1227–1230.
- Truan, G., Peterson, J.A., 1998. Thr268 in substrate binding and catalysis in P450BM-3. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 53–64.
- Tsotsou, G.E., Cass, A.E.G., Gilardi, G., 2002. High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens. Bioelectron.* 17, 119–131.
- Tsujita, Y., Watanabe, Y., 1989. Pravastatin Sodium: A Novel Cholesterol-Lowering Agent that Inhibits HMG-CoA Reductase. *Cardiovasc. Drug Rev.* 7, 110–126.
- Turner, N.J., 2009. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* 5, 567–573.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A., 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, 293–308.
- Urlacher, V.B., Eiben, S., 2006. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 24, 324–330.
- Van den Bogart, H.G., Van den Ende, G., Van Loon, P.C., Van Griensven, L.J., 1993. Mushroom worker's lung: serologic reactions to thermophilic actinomycetes present in the air of compost tunnels. *Mycopathologia* 122, 21–28.

- Van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C., 1993. Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 362, 814–820.
- Vellanoweth, R.L., Rabinowitz, J.C., 1992. The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Mol. Microbiol.* 6, 1105–1114.
- Vottero, E., Rea, V., Lastdrager, J., Honing, M., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., 2011. Role of residue 87 in substrate selectivity and regioselectivity of drug-metabolizing cytochrome P450 CYP102A1 M11. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 899–912.
- 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., 2005. Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 747–753.
- Watanabe, Y., Laschat, S., Budde, M., Affolter, O., Shimada, Y., Urlacher, V.B., 2007. Oxidation of acyclic monoterpenes by P450 BM-3 monooxygenase: influence of the substrate E/Z-isomerism on enzyme chemo- and regioselectivity. *Tetrahedron* 63, 9413–9422.
- Whitehouse, C.J.C., Bell, S.G., Wong, L.-L., 2011. P450BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chem Soc Rev* 41, 1218–1260.
- White, R.E., Coon, M.J., 1980. Oxygen Activation by Cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 315–356.
- Wilson, D.B., 2004. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *Chem. Rec. N. Y.* N 4, 72–82.
- Woestenenk, E.A., Hammarström, M., van den Berg, S., Härd, T., Berglund, H., 2004. His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 217–229.
- Wright, R.L., Harris, K., Solow, B., White, R.H., Kennelly, P.J., 1996. Cloning of a potential cytochrome P450 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett.* 384, 235–239.
- Wu, J.T., Wu, L.H., Knight, J.A., 1986. Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* 32, 314–319.
- Wu, K.K., Liou, J.-Y., 2005. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 45–52.
- Yamazaki, H., Ueng, Y.-F., Shimada, T., Guengerich, F.P., 1995. Roles of Divalent Metal Ions in Oxidations Catalyzed by Recombinant Cytochrome P450 3A4 and Replacement of NADPH-Cytochrome P450 Reductase with Other Flavoproteins, Ferredoxin, and Oxygen Surrogates. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 8380–8389.
- Yeom, H., Sligar, S.G., 1997. Oxygen Activation by Cytochrome P450BM-3: Effects of Mutating an Active Site Acidic Residue. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 209–216.
- Yeom, H., Sligar, S.G., Li, H., Poulos, T.L., Fulco, A.J., 1995. The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450BM-3. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 14733–14740.
- Yokoyama, C., Miyata, A., Ihara, H., Ullrich, V., Tanabe, T., 1991. Molecular cloning of human platelet thromboxane synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1479–1484.
- Yoshimi, Y., Hiraishi, A., Nakamura, K., 1996. Isolation and Characterization of *Microsphaera multipartita* gen. nov., sp. nov., a Polysaccharide-Accumulating Gram-Positive Bacterium from Activated Sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 519–525.
- Zhang, T., Zhang, A., Bell, S.G., Wong, L.-L., Zhou, W., 2014. The structure of a novel electron-transfer ferredoxin from *Rhodopseudomonas palustris* HaA2 which contains a histidine residue in its iron–sulfur cluster-binding motif. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 1453–1464.
- Zhang, W., Pochapsky, S.S., Pochapsky, T.C., Jain, N.U., 2008. Solution NMR Structure of Putidaredoxin–Cytochrome P450cam Complex via a Combined Residual Dipolar Coupling–Spin Labeling Approach Suggests a Role for Trp106 of Putidaredoxin in Complex Formation. *J. Mol. Biol.* 384, 349–363.

- Zhao, B., Guengerich, F.P., Bellamine, A., Lamb, D.C., Izumikawa, M., Lei, L., Podust, L.M., Sundaramoorthy, M., Kalaitzis, J.A., Reddy, L.M., Kelly, S.L., Moore, B.S., Stec, D., Voehler, M., Falck, J.R., Shimada, T., Waterman, M.R., 2005. Binding of two flavin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) cytochrome P450 158A2. *J. Biol. Chem.* 280, 11599–11607.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R., 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273, 13264–13272.

7 Anhang

7.1 Gen- und Proteinsequenzen

Flavodoxin aus *T. fusca*:

Codon-optimierte Gensequenz des annotierten Originalgens Tfu_3023 (Tfu_3023-synth)

ATGCTGGTGATGATTGGTTATGCAAGCGTTCATGGTAGCACCGAAGGTATTGCACGTCGTCTGGCAGA
TCGTCTGCGTGCCATATGGTCATAGCGTTGATGTTTCGTCCGCTGGATAAACCGATGGATGCACTGGTTC
TGTATGATGCATTTATTCTGGGTAGCGCAGTTCATGGTGGTAGCTGGCTGCGTCAGGCAACCGGTTTT
GCAGAACGTGAAGCAGAAATTCTGAGCCGTCGTCCGTTTTGGCTGTTTAGCGTTGGTCTGGCACGTGT
TCTGGGTGGTTCGTTTTGCAAGTGCCGGTGATGTTCCGAAAGGTGTTCCGGAAGTTATTCGTGATACCG
GTGCACGTGATCATCACCTGTTTGCCGGTGCAATTCAGCCGAGCCATCTGCCGGTTTTTGGTCGTTTT
CTGTATAAAGCAATGGGTGGTCGCTATGGTGATTTTCGTGATTGGGCTGAAGTTGATGATTGGGCAGA
AAGCATTGCAGCACAGCTGACCATGGTTACCCGTTAA

Proteinsequenz (Fldx-s.)

MLVMIGYASVHGSTEGIARRLADRLRAYGHSVDVRPLDKPMDALVLYDAFILGSAVHGGSWLRQATGF
AEREAEILSRRPVWLFVGLARVLGGRFASAGDVPKGVPEVIRDTGARDHHLFAGAIQPSHLPVFGRF
LYKAMGGRYGDFRDWAEVDDWAESIAAQLTMVTR

N'-verlängertes Flavodoxin aus *T. fusca*:

Codon-optimierte Gensequenz der 5'-verlängerten Originalsequenz (Tfu_3023-synth-elongated)

ATGCCGTCTTACCAGGTCACCTACCGGCCGTCGCCGTGTAGGTGACACCGGTCACGGTTTCGGTCGTCA
CGACATGCTGGTGATGATTGGTTATGCAAGCGTTCATGGTAGCACCGAAGGTATTGCACGTCGTCTGG
CAGATCGTCTGCGTGCCATATGGTCATAGCGTTGATGTTTCGTCCGCTGGATAAACCGATGGATGCACTG
GTTCTGTATGATGCATTTATTCTGGGTAGCGCAGTTCATGGTGGTAGCTGGCTGCGTCAGGCAACCGG
TTTTGCAGAACGTGAAGCAGAAATTCTGAGCCGTCGTCCGTTTTGGCTGTTTAGCGTTGGTCTGGCAC
GTGTTCTGGGTGGTCGTTTTGCAAGTGCCGGTGATGTTCCGAAAGGTGTTCCGGAAGTTATTCGTGAT
ACCGGTGCACGTGATCATCACCTGTTTGCCGGTGCAATTCAGCCGAGCCATCTGCCGGTTTTTGGTCG
TTTTCTGTATAAAGCAATGGGTGGTCGCTATGGTGATTTTCGTGATTGGGCTGAAGTTGATGATTGGG
CAGAAAGCATTGCAGCACAGCTGACCATGGTTACCCGTTAA

Proteinsequenz (Fldx-s.-e.)

MPSYQVTTGRRRVGDTGHGFGRHMLVMIGYASVHGSTEGIARRLADRLRAYGHSVDVRPLDKPMDAL
VLYDAFILGSAVHGGSWLRQATGFAEREAEILSRRPVWLFVGLARVLGGRFASAGDVPKGVPEVIRDT
TGARDHHLFAGAIQPSHLPVFGRFLYKAMGGRYGDFRDWAEVDDWAESIAAQLTMVTR

CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans*:

Codon-optimierte Gensequenz des annotierten Originalgens AZC_3520

ATGAGTGAGACGAGTACCCACCTGCATTGAAGTCCGTTGACCTGGGCCCTGGCAGCAGGTACGGTTCCG
TGTGGGTTGGTTCCCTGGCGCATCCAGAGAGGCGGTGTTGGCAGCGGTCCGTGGTGCAGCAGGCCTGT
CCGGCGAGACGGCATTCCACGTCGAGACCGCGGACGGCGTTACCATTGCACTGGACGACTCCGTTCCG
GCAGGCACGCGTTTGCGTTTGGTGGTGCAAGGTGAAGTTCCCTAGTAGTGACGCGCTGCGCTGCACAG
ACCGGTGCCGGGCCCTAAACCGTATCCGGTTGTGGGTAAATCTGCCAGAATTGCATAACCGGAGGGTC
TGGTCGCGGCGGTCGATGCGCTGCATGCAAAGCATGGTGAGTTCTTCGCATTTACGGTGGGTGGCAAG
CGTGCGTATTTCTGCTCCGACGCGGACATTATCTCCGAGATGTGCGCGGCACCTGACGTGTTTCGCGAA
GCTGGTCAAGGTCGTGGCGGCTTGGGCAACCTGGCAGAAAAATCCGTGGGTAGTGCACTGTTACCCG
CGAGTGACAATGACCCGCTGTGGCATCAAGCGCACCGTATCCTGGCGCCGGCGTTTGGCGCGACGGCA

TTGAAAACTACTACGGTCGCATCGTTGAGGTGGCAGATGACTTGCTGGATCACCTGGATAGACTGGC
 GCCTGGCGAAAGTTTTCTGGCGACCGATCTGATGACCCGCATGACGTTTCGAGGCGATTAGTTATGCAG
 CGTTTAACAGACGTTATGGCGCGATTGATAGTCCTGCGTTGCCTGCGTTTCGTGGAAGCAATGAACGTT
 GTGCTGACCGACGCGATGGCAGAGCCTAAAAGACTGCTGCCGGAGGTTTTTTACCATGAAGCACGTAA
 GACCCGCGCAGCGGCGGATAAAAATTATGCTGGAGGAGGTTGAAACCATTATTGCAGAGCGTCGCTTCG
 CGATGGCGGGCGGGCGCACCGGTCCCTACCGACCTGCTGCAGGTGATGTTGACCACCCCTGACCGTGTT
 ACCGGCCAAAAGCTGCCTGACGACAACATCCGTGGCCAGCTGATTGTCTTGCTGATTGCAGGCCACGA
 GACGACGTCCGGTATGCTGGCGTACGCGCTGTACCACCTGTGGAAGTACCCAGAGACCATGGAAAAAT
 TGATTGCAGAGGTGGACGAGGTCTTGGGCCGTGATTTTAGTTATAAGCCGACGTACGAGGATGTGGGC
 CGTCTGGCATATACGCAACGCGTGCTGAAGGAGGCGCTGCGTCTGTGCCCGCCAGTTCCGATGTTCCC
 ACGTTACGTACCCGTGACGCAACGGTGGGTAACGGTCGTTATGATCTGAAGGCGGGTGAACGCATCT
 TCGTGTCCCTGTCCGCAATGCAGAAGAACCCGCGTTTTTTGGGGTGCGGACGCGCTGGTCTTTCGTCCG
 GAGAGATTCCGGTCCTGAGGAAGAGAAACACCATCACCCGCATGCATATCATCCGTTCCGGTATGGGTGC
 GCGTCTCTGTATCGTTTTTCAATTTGCGCTGGTGGAGGCGAAGATGGTCTTGGCGCGCTTTATCCAAC
 GCTTTACGGCGCGTCCAAAGGATCCGCACTATGTTTTGTGCCATAAACAAAGCATTGACCGTCAAACCA
 GATCATTTTGACATGCTGCTGGAAAGACGCCCGGAAGTCAAAGGTCGTTTTCCGGTGCGTACCGAGGC
 GCCGAAGACCCAAGGTGCGCCTTTGGCGGTGCGACAAGCAGGCGGTGCTCCAATGAGAGTGTGTATG
 GCAGTAACATGGGTGGTTGCAGAGATATCGCGTTGAGTTTGGCACAGCAAGCGGGCGCGCGTGGTTTTT
 GCAGCGACCGTGCGCAGAGTTGGATGAACAGGTTCGGCCAACCATGGCTGACGGACGGTCTGTGGTGAT
 CGTTACGAGTACCTACAACGGCACGCCGCCAGATAACGCGGCACGTTTCGCGAAGTGGCTGGAGACCG
 CGCCGGCAGGTGTCTGCGCAGGCGTTCCGCCACGCGGTGCTGGGTGCGGTAATACGCAGTGGCACCAA
 ACCTTCCAAAAATTCCTTAAGACGATTGCGAGTGGCCTGGCGGCGCTGGGTGGTACCGCGTTGTTGGA
 TGAGGGTACGGCGGATGCGGCGGGTGACTATGAAGCGGCAGTGGAGGGCTGGACCGCGGCACTGTGGC
 CAGCACTGGAGGCGGCATTTCGGCGGCGCGGCAGGTGCAGCGTTATTGGTTCCGCAGAGGCGGCAGCG
 GAGGCGCCTGCAGTGAAGGTTGAAGTGGTGAACCTCGCAGGCGCGGCGACGGGTGCGGCACCGCGCAC
 CGGCACCCGTTTGATCAAGGCGCGCAATTGTCCCGTATTCTGTGTCAACCGTGAACCTGCTGTCCCCAG
 GTGCGCAGGGTAGTACCAGACATATCGAGATTCCACTGCCTGCGGGTACCTCCTACGCAGCGGGTGAC
 CACTTGGCAGTTTTCCCTGTTAATCCACCGGCGCTGGTTGCGGCGGCAGCAGCGCTTGTTGGTCTGGC
 ACCAGAAACCCAGGTTCTGCTGACCGCGCTGCACCCGGACGCAGCGAGTGAAGCGGGTCTGCCGTTTCG
 GTGTTCCGGTGTCCGTGGGTGAATTGTTGGCGGAGCACGTGGATCTGGCGGGCCCGGTGACGCGTAGA
 GACCTGAGAGCGTGGGCGCAGGCGGCACAATGTCCGCCGATCGCGCGAGAATCGCGGGCTGGTTGAG
 TGACTTCCCGAGTGCAGTGGCAGAGCGAAGCCGAGAATGGAGGATTTGCTGGCACAGGTGCCGAGTG
 TTCAGCTGGACCTGGCGGCACTGCTGACGGTGAGACCGGCGTTGAAGCCTCGCTATTACTCCATTAGT
 AGTAGTCCTCTGATGAGTCCGGATGCGTGCGCACTGACGGTGGGTGTCCACCAGTTCACGACCGCAGA
 CGGTGTGCGTCACGATGGTCTGTGTAGTAGTTATTTGGTCAGTTGTGGCGAGGATGCGCCTGTTTCGTG
 TGCTGGTGAAAGACACCGGCAGTACCTTTTCATCTGCCGGCGGACCCAGCGGTTCCCTCTGATCCTGGTC
 GGTCCGGGCACCGTTTTGGCGCCGTTGAGAGGCTTTATTCAAGAGAGACATGCGCTGCGTGACACAAGG
 CCGTGCGACCGGCCAGTGCTGCTGTTTTTTCGGCTGCCGTGATGATGGTGATTATTTGTATCGCGAGG
 AGCTGGAAGCGTATCGTGACGAAGGTACCCTGAGTTTGCTGGCGGTTGGTTTCAGTAGAAGACCGGGC
 ACCCTCGTACCTATGTTCAAGATCTGCTGCGTACCCACGGCGATGCAGTTAGAGAGCAGGTGGCAGC
 GGGCGCAAGTATTTTGATTTGCGGTAACGCAAGAACGATGGCGCCAGACGTTTCATGCGGCGTTTTCTGG
 AGTTGCTGGGTGCAGGCGCAGTTGCAGAACTGGAAGCGGGCGGTGCTATCTGCAAGATGTTTTGGGCG
 AGTTCCTAAG

Proteinsequenz (CYP102K1)

MSETSTPPALKSVDLGLAAGTVRVGWFPASREAVLAAVRGAAGLSGETAFHVETADGVTIALDDSV
 AGTRLRLVVQGEVPSSAAPALHRPVPGPYPVVGNLPELHNAEGLVAAVDALHAKHGEFFAFQVGGK
 RAYFCSDADI I SEMCAAPDVFAKLVEGRGGLGNLAEKSVGSALFTASDNDPLWHQAHRI LAPAFGATA
 LKNYYGRIVEVADDLLDHLDR LAPGESFLATDLMTRMTFEAISYAAFNRRYGAIDSPALPAFVEAMNV

VLTDAMAEPKRLLPEVIFYHEARKTRAAADKIMLEEVETIIAERRFAMAAGAPVPTDLLQVMLTTPDRV
 TGQKLPDDNIRGQLIVLLIAGHETTSGLMAYALYHLWKYPETMEKLIAEVDEVLGRDFSYPKTYEDVG
 RLAYTQORVLKEALRLCPPVPMFPRYVTRDATVGNTRYDLKAGERIFVSLSAMQKNPRFWGADALVFRP
 ERFGPREEKHHPHAYHPFGMGARSCIGFQFALVEAKMVLARFIQRFTARPKDPHYVLCHKQALTVPK
 DHLDMLLERRPEVKGRFPVRTEAPKTQGAPLAVAQAGGRPMRVLYGSNMGGCRDIALSLAQQAGARGF
 AATVAELDEQVGQPWLTGDPVVIIVTSTYNGTPPDNAARFAKWLETAPAGVCAGVRHAVLGCNTQWHQ
 TFQKFPKTIASGLAALGGTALLDEGTADAAGDYEAAVEGWTAALWPALEAAFVGAAGAAVIGSAEAAA
 EAPAVKVEVVNFAGAATGAAPRTGTRLDQGAQLSRIRVNRRELLSPGAQGSTRHIEIPLPAGTSYAAGD
 HLAVFPVNPPALVAAAAARCGLAPETQVLLTALHPDAASEAGLPFGVPVSVGELLAEHVDLAGPVTRR
 DLRAWAQAQCPDRARIAGWLSDFPSAVAEAKPRMEDLLAQVPSVQLDLAALLTVRPALKPRYSSIS
 SSPLMSPDACALTVGVHQFTTADGVRHDGLCSSYLVSCGEDAPVRVLVKDTGSTFHLPPADPAVPLILV
 GPGTGLAPLRGFIQERHALRAQGRATGPVLLFFGCRDDGDYLYREELEAYRDEGTLSLLAVGFSRRPG
 TPRTYVQDLLRTHGDAVREQVAAGASILICGNARTMAPDVHAAFLLELLGAGAVAELEAGGRYLQDVWA
 SS

Hämdomäne von CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans*:

Codon-optimierte Gensequenz der Hämdomäne des annotierten Originalgens AZC_3520

ATGAGTGAGACGAGTACCCACCTGCATTGAAGTCCGTTGACCTGGGCCCTGGCAGCAGGTACGGTTTCG
 TGTGGGTTGGTTCCCTGGCGCATCCAGAGAGGCGGTGTTGGCAGCGGTCCGTGGTGCAGCAGGCCTGT
 CCGGCGAGACGGCATTCCACGTCGAGACCGCGGACGGCGTTACCATTGCACTGGACGACTCCGTTCCG
 GCAGGCACGCGTTTGCCTTGGTGGTGAAGGTGAAGTTCCCTAGTAGTGACGCGCTGCGCTGCACAG
 ACCGGTGCCGGGCCCTAAACCGTATCCGGTGTGGGTAACTGCCAGAATTGCATAACGCGGAGGGTC
 TGGTGCAGCGCGGTGCGTGCATGCAAGCATGGTGAAGTTCTTCGCATTTACGGTGGGTGGCAAG
 CGTGCGTATTTCTGCTCCGACGCGGACATTATCTCCGAGATGTGCGCGGCACCTGACGTGTTCCGCAA
 GCTGGTCAAGGTCGTGGCGGCTTGGGCAACCTGGCAGAAAAATCCGTGGGTAGTGCACTGTTACCG
 CGAGTGACAATGACCCGCTGTGGCATCAAGCGCACCGTATCCTGGCGCCGGCGTTTGGCGCGACGGCA
 TTGAAAACTACTACGGTCGCATCGTTGAGGTGGCAGATGACTTGCTGGATCACCTGGATAGACTGGC
 GCCTGGCGAAAGTTTTCTGGCGACCGATCTGATGACCCGCATGACGTTTCGAGGCGATTAGTTATGCAG
 CGTTTAACAGACGTTATGGCGCGATTGATAGTCCTGCGTTGCCTGCGTTCTGGAAGCAATGAACGTT
 GTGCTGACCGACGCGATGGCAGAGCCTAAAAGACTGCTGCCGGAGGTTTTTTACCATGAAGCACGTAA
 GACCCGCGCAGCGGCGGATAAAATTATGCTGGAGGAGGTTGAAACCATTATTGCAGAGCGTCGCTTCG
 CGATGGCGGCGGGCGCACCGGTCCCTACCGACCTGCTGCAGGTGATGTTGACCACCCCTGACCGTGTT
 ACCGGCCAAAAGCTGCCTGACGACAACATCCGTGGCCAGCTGATTGTCTTGCTGATTGCAGGCCACGA
 GACGACGTCCGGTATGCTGGCGTACGCGCTGTACCACCTGTGGAAGTACCCAGAGACCATGGAAAAAT
 TGATTGCAGAGGTGGACGAGGTCTTGGGCCGTGATTTTAGTTATAAGCCGACGTACGAGGATGTGGGC
 CGTCTGGCATATACGCAACGCGTGTGAAGGAGGCGCTGCGTCTGTGCCCGCCAGTTCCGATGTTCCC
 ACGTTACGTACCCGTGACGCAACGGTGGGTAACGGTCGTTATGATCTGAAGGCGGGTGAACGCATCT
 TCGTGTCCCTGTCCGCAATGCAGAAGAACCCGCGTTTTTGGGGTGGCGACGCGCTGGTCTTTCGTCCG
 GAGAGATTCCGTCCTGAGGAAGAGAAACACCATCACCCGCATGCATATCATCCGTTCCGTATGGGTGC
 GCGTCTCTGTATCGGTTTTCAATTTGCGCTGGTGGAGGCGAAGATGGTCTTGGCGCGCTTTATCCAAC
 GCTTTACGGCGCGTCCAAAGGATCCGCACTATGTTTTGTGCCATAAACAAGCATTGACCGTCAAACCA
 GATCATTTGGACATGCTGCTGGAAAGACGCCCGGAAGTCAAAGTCGTTTTCCGGTGGTACCGAGGC
 GCCGAAGACCCAAGGTGCGTAA

Proteinsequenz (CYP102K1-HD)

MSETSTPPALKSVDLGLAAGTVRVGWFPASREAVLAAVRGAAGLSGETAFHVETADGVTTIALDDSV
 AGTRLRLVVQGEVPSSAAPALHRPVPGPYPVVGNLPELHNAEGLVAAVDALHAKHGEFFAFQVGGK
 RAYFCSADADIISEMCAAPDVFAKLVEGRGGLGNLAEKSVGSALFTASDNDPLWHQAHRI LAPAFGATA

LKNYYGRIVEVADDLLDHLDR LAPGESFLATDLMTRMTFEAISYAAFNRRYGAIDSPALPAFVEAMNV
 VLTDAMAEPRKLLPEV FYHEARKTRAAADKIMLEEVETIIAERRFAMAAGAPVPTDLLQVMLTTPDRV
 TGQKLPDDNIRGQLIVLLIAGHETTS GMLAYALYHLWKYPETMEKLIAEVDEV LGRDFS YKPTYEDVG
 RLAYTQ RVLKEALRLCPVPMFPRYVTRDATVGN GR YDLKAGERIFVSLSAMQKNPRFWGADALVFRP
 ERFGP EEEKHHHPHAYHPFGMGARSCIGFQFALVEAKMVLARFIQRFTARPKDPHYVLCHKQALT VKP
 DHLDM LLERRPEVKGRFPVRTEAPKTQGA

N'-short-CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans*:

Codon-optimierte Gensequenz des 5'-verkürzten Originalgens AZC_3520

ATGCCTAGTAGTGCAGCGCCTGCGCTGCACAGACCGGTGCCGGGCCCTAAACCGTATCCGGTTGTGGG
 TAATCTGCCAGAATTGCATAACGCGGAGGGTCTGGTCGCGCGGTCGATGCGCTGCATGCAAAGCATG
 GTGAGTTCTTCGCATTTTCAGGTGGGTGGCAAGCGTGCATATTTCTGCTCCGACGCGGACATTATCTCC
 GAGATGTGCGCGGCACCTGACGTGTTTCGCGAAGCTGGTCGAAGGTCGTGGCGGCTTGGGCAACCTGGC
 AGAAAAATCCGTGGGTAGTGCATGTTTACCGCGAGTGACAATGACCCGCTGTGGCATCAAGCGCACC
 GTATCCTGGCGCCGGCGTTTGGCGCGACGGCATTGAAAACTACTACGGTCGCATCGTTGAGGTGGCA
 GATGACTTGCTGGATCACCTGGATAGACTGGCGCCTGGCGAAAGTTTTCTGGCGACCGATCTGATGAC
 CCGCATGACGTTTCGAGGCGATTAGTTATGCAGCGTTTAAACAGACGTTATGGCGCGATTGATAGTCCTG
 CGTTGCCTGCGTTCTGTTGAAGCAATGAACGTTGTGCTGACCGACGCGATGGCAGAGCCTAAAAGACTG
 CTGCCGGAGGTTTTTTTACCATGAAGCACGTAAGACCCGCGCAGCGGCGGATAAAATTATGCTGGAGGA
 GGTGAAACCATATTATGCAGAGCGTCGCTTCGCGATGGCGGCGGGCGCACCCGGTCCCTACCGACCTGC
 TGCAGGTGATGTTGACCACCCCTGACCGTGTTACCGGCCAAAAGCTGCCTGACGACAACATCCGTGGC
 CAGCTGATTGTCTTGCTGATTGCAGGCCACGAGACGACGTCCGGTATGCTGGCGTACGCGCTGTACCA
 CCTGTGGAAGTACCCAGAGACCATGGAAAAATTGATTGCAGAGGTGGACGAGGTCTTGGGCCGTGATT
 TTAGTTATAAGCCGACGTACGAGGATGTGGGCCGTCTGGCATATACGCAACGCGTGCTGAAGGAGGCG
 CTGCGTCTGTGCCCGCCAGTTCCGATGTTCCACGTTACGTCACCCGTGACGCAACGGTGGGTAACGG
 TCGTTATGATCTGAAGGCGGGTGAACGCATCTTCGTGTCCCTGTCCGCAATGCAGAAGAACCCGCGTT
 TTTGGGTGCGGACGCGCTGGTCTTTCGTCCGAGAGATTCGGTCCTGAGGAAGAGAAACACCATCAC
 CCGCATGCATATCATCCGTTCCGGTATGGGTGCGCGCTCCTGTATCGGTTTTCAATTTGCGCTGGTGG
 GGCGAAGATGGTCTTGGCGCGCTTTATCCAACGCTTTACGGCGCGTCCAAAGGATCCGCACTATGTTT
 TGTGCCATAAACAAAGCATTGACCGTCAAACCAGATCATTTGGACATGCTGCTGGAAAGACGCCCCGAA
 GTCAAAGGTTCGTTTTCCGGTTCGTACCGAGGCGCCGAAGACCCAAGGTGCGCCTTTGGCGGTTCGCACA
 AGCAGGCGGTTCGTCCAATGAGAGTGTGTATGGCAGTAACATGGGTGGTTGCAGAGATATCGCGTTGA
 GTTTGGCACAGCAAGCGGGCGCGCTGGTTTTGCAGCGACCGTGGCAGAGTTGGATGAACAGGTTCGGC
 CAACCATGGCTGACGGACGGTCCTGTGGTGATCGTTACGAGTACCTACAACGGCACGCCGCCAGATAA
 CGCGGCACGTTTTCGCGAAGTGGCTGGAGACCGCGCCGGCAGGTGTCTGCGCAGGCGTTCCGCACGCGG
 TGCTGGGTTGCGGTAATACGCAGTGGCACCAAACCTTCCAAAAATTCCCTAAGACGATTGCGAGTGGC
 CTGGCGGCGCTGGGTGGTACCGGTTGTTGGATGAGGGTACGGCGGATGCGGCGGGTGACTATGAAGC
 GGCAGTGGAGGGCTGGACCGCGGCACTGTGGCCAGCACTGGAGGCGGCATTCGGCGGCGCGGCAGGTG
 CAGCGGTTATTGGTTCCGCAGAGGCGGCAGCGGAGGCGCCTGCAGTGAAGGTTGAAGTGGTGAACCTC
 GCAGGCGCGGCGACGGGTGCGGCACCGCGCACCGGCACCCGTTTGGATCAAGGCGCGCAATTGTCCCG
 TATTCGTGTCAACCGTGAACCTGCTGTCCCCAGGTGCGCAGGGTAGTACCAGACATATCGAGATTCCAC
 TGCTTGC GG GTACCTCCTACGCAGCGGGTGACCACTTGGCAGTTTTTCCCTGTTAATCCACCGGCGCTG
 GTTGC GG CGGCAGCAGCGCTGTGGTCTGGCACCAGAAACCAGGTTCTGCTGACCGCGCTGCACCC
 GGACGCAGCGAGTGAAGCGGGTCTGCCGTTCCGGTGTTCGGTGTCCGTGGGTGAATTGTTGGCGGAGC
 ACGTGGATCTGGCGGGCCCGGTGACGCGTAGAGACCTGAGAGCGTGGGCGCAGGCGGCACAATGTCCG
 CCGGATCGCGCGAGAATCGCGGGCTGGTTGAGTGACTTCCCGAGTGCGGTGGCAGAAGCGAAGCCGAG
 AATGGAGGATTTGCTGGCACAGGTGCCGAGTGTTTCAGCTGGACCTGGCGGCACTGCTGACGGTGAGAC

CGGCGTTGAAGCCTCGCTATTACTCCATTAGTAGTAGTCCTCTGATGAGTCCGGATGCGTGCGCACTG
 ACGGTGGGTGTCCACCAGTTCACGACCGCAGACGGTGTGCGTCACGATGGTCTGTGTAGTAGTTATTT
 GGTCAGTTGTGGCGAGGATGCGCCTGTTTCGTGTGCTGGTGAAAGACACCGGCAGTACCTTTCATCTGC
 CGGCGGACCCAGCGGTTTCCTCTGATCCTGGTCCGGGACCGGTTTGGCGCCGTTGAGAGGCTTT
 ATTCAAGAGAGACATGCGCTGCGTGACACAAGGCCGTGCGACCGGCCAGTGCTGCTGTTTTTCGGCTG
 CCGTGATGATGGTGATTATTTGTATCGCGAGGAGCTGGAAGCGTATCGTGACGAAGGTACCCTGAGTT
 TGCTGGCGGTTGGTTTCAGTAGAAGACCGGGCACCCCTCGTACCTATGTTCAAGATCTGCTGCGTACC
 CACGGCGATGCAGTTAGAGAGCAGGTGGCAGCGGGCGCAAGTATTTTGATTGCGGTAACGCAAGAAC
 GATGGCGCCAGACGTTTCATGCGGCGTTTCTGGAGTTGCTGGGTGCAGGCGCAGTTGCAGAACTGGAAG
 CGGGCGGTGCGCTATCTGCAAGATGTTTGGGCGAGTTCCTAA

Proteinsequenz (N'-short-CYP102K1)

MPSSAAPALHRPVPGPYPVVGNLPELHNAEGLVAAVDALHAKHGEFFAFQVGGKRAYFCSDADIIS
 EMCAAPDVFAKLVEGRGGLGNLAEKSVGSALFTASDNDPLWHQAHRI LAPAFGATALKNYYGRIVEVA
 DDLLDHLDR LAPGESFLATDLMTRMTFEAISYAAFNRRYGAIDSPALPAFVEAMNVVLT D AMAEPKRL
 LPEV FYHEARKTRAAADKIMLEEVETIIAERRFAMAAGAPVPTDLLQVMLTTPDRVTGQKLPDDNIRG
 QLIVLLIAGHETTSGMLAYALYHLWKYPETMEKLI AEVDEV LGRDFS YKPTYEDVGR LAYTQ RVLKEA
 LRLCPPVPMFPRYVTRDATVGNTRYDLKAGERIFVSLSAMQKNPRFWGADALVFRPERFGPEEEKHHH
 PHAYHPFGMGARSCIGFQFALVEAKMVLARFIQRFTARPKDPHYVLCHKQALTVKPDHLDMLLERRPE
 VKGRFPVRTEAPKTQGA PLAVAQAGGRPMRVLYGSNMGGCRDIALSLAQQAGARGFAATVAELDEQVG
 QPWLTDGPVVI VTSTYNGTTPDNAARFAKWLETAPAGVCAGVRHAVLGCGNTQWHQTFQKFPKTIASG
 LAALGGTALLDEGTADAAGDYEA AVEGWTAALWPAL EAAFGGAAGAAVIGSAEAAA EAPAVKVEVVNF
 AGAATGAAPRTGTRLDQGAQLSRIRVNRELLSPGAQGSTRHIEIPLPAGTSYAAGDHLAVFPVNPPAL
 VAAAAARCLAPETQVLLTALHPDAASEAGLPFGVPVSVGELLA EHVDLAGPVTRRDLRAWAQA AQCP
 PDRARIAGWLSDFPSAVAEAKPRMEDLLAQVPSVQLDLAALLTVRPALKPRYYSISSSPLMSPDACAL
 TVGVHQFTTADGVRHDGLCSSYLVSCGEDAPVRVLVKDTGSTFHL PADPAVPLILVGP GTGLAPLRGF
 IQERHALRAQGRATGPVLLFFGCRDDGDYLYREELEAYRDEGTL SLLAVGFSRRPGTPRTYVQDLLRT
 HGDVREQVAAGASILICGNARTMAPDVHAAFLLELLGAGAVAELEAGGRYLQDVWASS

Hämdomäne von N'-short-CYP102K1 aus *Azorhizobium caulinodans*:

Codon-optimierte Gensequenz der Hämdomäne des 5'-verkürzten Originalgens AZC_3520

ATGCCTAGTAGTGACGCGCTGCGCTGCACAGACCGGTGCCGGGCCCTAAACCGTATCCGGTTGTGGG
 TAATCTGCCAGAAATGCATAACGCGGAGGGTCTGGTTCGCGGCGGTTCGATGCGCTGCATGCAAAGCATG
 GTGAGTTCTTCGCATTT CAGGTGGGTGGCAAGCGTGC GTATTTCTGCTCCGACGCGGACATTATCTCC
 GAGATGTGCGCGGCACCTGACGTGTTTCGCGAAGCTGGTTCGAAGGTCGTGGCGGCTTGGGCAACCTGGC
 AGAAAAATCCGTGGGTAGTGCACTGTTACCGCGAGTGACAATGACCCGCTGTGGCATCAAGCGCACC
 GTATCCTGGCGCCGCGCTTTGGCGCGACGGCATTGAAAACTACTACGGTCGCATCGTTGAGGTGGCA
 GATGACTTGCTGGATCACCTGGATAGACTGGCGCCTGGCGAAAGTTTTCTGGCGACCGATCTGATGAC
 CCGCATGACGTTTCGAGGCGATTAGTTATGCAGCGTTTAAACAGACGTTATGGCGCGATTGATAGTCCTG
 CGTTGCCTGCGTTCGTGGAAGCAATGAACGTTGTGCTGACCGACGCGATGGCAGAGCCTAAAAGACTG
 CTGCCGGAGGTTTTTTACCATGAAGCACGTAAGACCCGCGCAGCGGCGGATAAAATTATGCTGGAGGA
 GGTGAAACCATTATTGCAGAGCGTCGCTTCGCGATGGCGGCGGGCGCACCGGTCCCTACCGACCTGC
 TGCAGGTGATGTTGACCACCCCTGACCGTGTTACCGGCCAAAAGCTGCCTGACGACAACATCCGTGGC
 CAGCTGATTGTCTTGCTGATTGCAGGCCACGAGACGACGTCCGGTATGCTGGCGTACGCGCTGTACCA
 CCTGTGGAAGTACCCAGAGACCATGGAAAAATTGATTGCAGAGGTGGACGAGGTCTTGGGCCGTGATT
 TTAGTTATAAGCCGACGTACGAGGATGTGGGCCGTCTGGCATATACGCAACGCGTGCTGAAGGAGGCG
 CTGCGTCTGTGCCCGCCAGTTCCGATGTTCCACGTTACGTCACCCGTGACGCAACGGTGGGTAACGG
 TCGTTATGATCTGAAGCGGGTGAACGCATCTTCGTGTCCCTGTCCGCAATGCAGAAGAACCCGCGTT

TTTGGGGTGCGGACGCGCTGGTCTTTCGTCCGGAGAGATTCGGTCCTGAGGAAGAGAAACACCATCAC
CCGCATGCATATCATCCGTTCCGGTATGGGTGCGCGCTCCTGTATCGGTTTTCAATTTGCGCTGGTGGA
GGCGAAGATGGTCTTGGCGCGCTTTATCCAACGCTTTACGGCGCGTCCAAAGGATCCGCACTATGTTT
TGTGCCATAAACAAAGCATTGACCGTCAAACCAGATCATTTGGACATGCTGCTGGAAAGACGCCCCGAA
GTCAAAGGTCGTTTTCCGGTGCGTACCGAGGCGCCGAAGACCCAAGGTGCGTAA

Proteinsequenz (N'-short-CYP102K1-HD)

MPSSAAPALHRPVPGPYPVVGNLPELHNAEGLVAAVDALHAKHGEFFAFQVGGKRAYFCSDADIIS
EMCAAPDVFAKLVEGRGGLGNLAEKSVGSALFTASDNDPLWHQAHRI LAPAFGATALKNYYGRIVEVA
DDL LDHLDR LAPGESFLATDLMTRMTFEAISYAAFNRRYGAIDSPALPAFVEAMNVVLTDAMAE PKRL
LPEV FYHEARKTRAAADKIMLEEVETIIAERRFAMAAGAPVPTDLLQVMLTTPDRV TGQKL PDDNIRG
QLIVLLIAGHETTSGMLAYALYHLWKYPETMEKLI AEVDEV LGRDFS YKPTYEDVGR LAYTQRVLKEA
LRLCPPVPMFPRYVTRDATVGNRGYDLKAGERIFVSLSAMQKNPRFWGADALVFRPERFGPEEEKHHH
PHAYHPFGMGARSCIGFQFALVEAKMVLARFIQRFTARPKDPHYVLCHKQALT VKPDHLDMLLERPE
VKGRFPVRTEAPKTQGA

CYP102_{Nmu} aus *Nakamurella multipartia*:

Codon-optimierte Gensequenz des annotierten Originalgens *Namu_2602*

ATGACCGACAAGGCGATCCCGCATCCGAAAGCGTTGCCTATTATCGGTAATGCGCTGGTCAGTATTAA
CCCTGCGACCGCGTTACACGGACCTGCAGAGACTGGCGGATGAGCTGGGTCCGATTTACGCGCTGGACA
TGCCGGGCTACCATGATCAAGTGGTTCTGACCGGTCCTGACCTGTTCCGGTGAGGCATGTGACGACAGT
CGCTTCGACAAGTCCCCTGCGCAGCGTCTGAGAGCGGTGTTGGGCGACGGCCTGTTTACGGCATTACAC
GGACTCCAGAGCGTGGCAGAGAGGCCATCGTATTATCGCGCCTGCGTTTACGGGCGCGGCGATTAGTA
GACTGTATCCGAGTATTGTGGACCCTATTACAGCAGTTGGCAGAACGTCTGGTTCGTATGGAACCGGGT
TCCGATGTGGACGTGCCTACGCTGACCAGTGCGATGACGCTGGACGTTGTGGGTTTGTGCTTGTTTAG
TTATCGCTTCGGTAACGTGTATACCAATACGCCTACCCCGTTTTTGCAGGCGCTGGATCGCGCGCTGA
CCCTGCTGGCGGAAGGTGCAGGCAAAAAGGATCTGTATGCGGTGATGCATCCTCGCGCAACCCGCGAC
CTGAGAGAGAGTGCGGAAGTCCTGATTTCCCTTTGTGCGATGATTTTGTGAAGAGACGTCGCAGTATGCC
GGATGGTAACGCACCTGACGACCTGCTGCAACACATGCTGACGGCGGCAGACCCAGATACCGGCGAGA
GACTGTCCGACATCGAGGTCCGTCAACAGACCCTGACCCTGTTGATCGCGGGTCACGAAACCACCTCC
GGTACGCTGGCGTTTCGCATTGCATCATTTGGCGGGCGCAGCCGACAGTTCAAGATTGGGCGCGCGAGCA
GGTGGACGAGGTGTTGGGTTCCGACCGCTCCGTGTTGCCTACGATGGAGCAGGTTGGTCAGCTGGATC
GTATTCATCAAATCGTTGATGAGACCTTGAGACTGCATCCGACCGCACCCGTTTTTGTGCGTCACCCCT
CGCCGCGCAACGACCATCGGTGGCGGCTACCACCTGGATGCAGGTGCGACGATCCTGATTCCGCTGCC
AAAAGTCCACATTGACCCGGCAATCTGGGGTCCAGACGCGGAGGTTTTCCGCCCTCGTCGCTGGGAAA
GTGTGGGTCAGTTGCCGGCAGGTGCATATCAACCGTTTGGTGTGGCGTGCGTGGTTGCATCGGTCGT
CTGTTTGCCTGGCGGAGGCGAGAGCGACGCTGGCGGTTTTGCTGCACAGATTTCGAGATCAGAGACCC
ACACCCGGCACCGCTGACGATCGCGCTGCACATTACGCTGAAACCTCAGAACGTACCCCTGCGCTTTC
TGGCAAGACCGGGTGTTAGTGCAGGCACCGCGGGCGGCGACCGCAAGTCCGGCAGATGTGAGACCGGCG
GATGGCAGAACCGGTACCGATATGCCAGGTGCAACCGCAGCGGGCTCCGTGTCGGCAGGTTCCGTCCA
GCCACCTCCGAACCTCCGATGGTCATCAACAAAGACTGGTGGTGGCAGCGTCCTCCGACGGCGGTACGG
CGCGCCATTTGGGTTACGACTTGGCGCATGAAGCGGTTGACGCGGGCGATGCGGCGGACGGTGTTGAA
TTGAATGCATTGGTTGATCGTTTGCCAGTTGATCGTCCACTGGTGGTTATCACCGCGAGTTACAACGG
TCAGCCGGCGGCGAGGCGCGCGTGATTTTGTCTCCTGGCTGAGTGCGGGCGCCGGATGGCGCAGCGCATG
GCGTGCGCTTCGCAGTCTTCGGTTGCGGTGATCACAACCTGGCCGACCACGTACCAGGCGGTTCTGCG
CTGATTGATCGTGAATTGGTGGCATCGGCGGCGAGCGTTTGTGATCGATCGCGGTGAAGGTGACAGTAG
TGGTGATCTGGATGGCGCGTTACCCGTTGGAGTCGTAGTCTGTGGCAAGCACTGGACGCGGGTCGTC
CAGGTCCTCCGCGTGAGACCCGTAATCCGGTTGGTTCGTTATGTTGCGAGTGAGGTCCGTCGCGGAGT

GCGGACGGCCCCGGCGGACGCGTTTGGCATGGGCGAGGCGTGGGTTCGTAGTGTCACGGAACCTGACCAG
 ACGTCCGCCTGATCTGGGTAGTGACCTGGCAGACATCCCTGATGCGGGTCCAGGCGCAGACGGTGAGA
 GAGTTACCATGCATCTGGATGTGGAGTTGGACCCTGCGGTCTCCTACCGCCCGGGTGACCACCTGCTG
 GTGCTGCCGCAAAACCGTCAGACCATTATCTGGCGTGCGGCGAGAACCTTGAAGTTCGACCCTTCCTT
 GGTGGTGGAACTGCATGCGACCACGACCGTTGAGACGGGCGTGCCGCTGGGTGAGCCGACGATGATGT
 ACGATCTGCTGGCAGGCTACTGTGACCTGCGTGACCTGCAACCCGTCGTGGCATCGATATCCTGGCG
 GCACATGTCGATCGCGACCCTGCGAGAGCGGCGTTGCTGGCGCTGACCGCGGACGACGATGCATTTCGC
 GGGTGGTGT TTTTGGCACGTCGCGTCTCCCTGCTGGATTTGGCAACCGAGTACCCTCCGGACCAACCTA
 TTCTCCGGCATTTGGTGGTTCGAGGCGTTTCCGATGTTGAAGCCGCGTCCATACAGTATTTCCAGTGCA
 CCTATCGGTGAGCCGAACAGAGTTGGTATTACCGTCGGCCTGGTCTCCGGCCAAGCGCTGTCCGGCCA
 CGGCCGTTACTACGGTGTGACGAGTAGTTACCTGGTCACGTTGGGTGCAGGTTTGAGAATCCTGGCGC
 GTGTGGCAGATCCAGGCCCGCAATTTTCATCCGCCTGCGGACCCGCGTACGCCGCTGGTGATGGTGTGC
 GCGGGCACCGGCGTGGCGCCGTTTTCGCGGCTTTCTGCAAGAGCGTGCAGCAGAAAGAGCAATCGGTGCG
 CCCGGTCGGCCCAACCTTGCTGTTTCGTGGTTGCCGCCACCTGACTTGATAGAATTTACGGTTCGTG
 AACTGGATACCTGGGCAGGCCAGGGCTGGCTGGACTTGATGAAGCATAACAGTCGCCCAGATGGCGGT
 AGTGGTAGATACGTTTACGAGGAGTTCGCGACCATGGTGCGGATGTTCTGGACCTGCTGGACCGTGA
 TGCAGTTGTGTATGTTTTCGCGTAACCGTCACACGATGGCACCTGAAGTCTCCAGTACCATTGCAGCAT
 TGCACGCGGATCGTACCGGTGAGGCGGGCGAACCGTGGATCAGTGAAGTGGCAGCAGCAGGCCGTTAC
 GTCGAAGACAATTGGGGCGCGGGCTAA

Proteinsequenz (CYP102_{Nmu})

MTDKAI PHPKALPI I GNALVS INPATAFTDLQRLADELGPIYALDMPGYHDQVVLTPGDLFGEACDDS
 RFDKSPAQRRLRAVLGDGLFTAFTDSRAWQRGHR I IAPAFTGAAISRLYPSIVDP I IQQLAERLVRMEPG
 SDVDVPTLT SAMTLDVVLCLFSYRFGNVYTNTP T PFLQALDRALTLAEGAGKKDLYAVMHPRATRD
 LRESAEVLISFVDDFVKRRRSM PDGNAPDDLQHMLTAADPD TGERLSDIEVRQQTLTLLIAGHETTS
 GTLAFALHHLAAQPQVQDWAREQVDEVLGSDRSVLPTMEQVGQLDRIHQIVDET LRLHPTAPVLLRHP
 RRATTIGGGYHLDAGATIL I PLPKVHIDPAIWGPDAEVFRPRRWESVGQLPAGAYQPFVGVGRGCI GR
 LFALAEARATLAVLLHRFEIRD PHPAPLTIALHITLKPQNVTLRFLARPGVSAGTAAATASPADVRPA
 DGRTGTDMPGATAAGSVAAGSVQPPPNSDGHQQRLVVAASSDGGTARHLGYDLAHEAVDAGDAADGVE
 LNALVDRLPVDRPLVVITASYNQQAAGARDFVSWLSAAPDGA AHGVRFAVFGCGDHNWPTTYQAVPA
 LIDRELVRIGGERLIDRGE GDSSGDLDGAFTWRSRLWQALDAGRPGPPRETRNPVGRYVASEVGRAS
 ADGPADAFGMGEAWRSVTELTRPPDLGSDLADIPDAGPGADGERVTMHLDELDP AVSYRPGDHLL
 VLPQNRQTI IWRAARTLKFDPSLVVELHATTTVETGVPLGQPTMMYDLLAGYCDLRAPATRRGIDILA
 AHVDRD PARAALLALTADDDAFAGGVLARRVSLDLATEYPPDQPIPPALVVEAFPM LKPRPYSISSA
 PIGEPNRVGITVGLVSGQALS GHGRYYGVTS SYLVTLGAGLRILARVADPGPQFHPPADPRTPLVMVC
 AGTGVAPFRGFLQERAAERAIGRPVGPTLLFRGCRHPDL DRIYGRELDTWAGQGWL DLYEAYS RPDGG
 SGRYVQQAVRDHGADVLDLLDRDAVVYVCGNRHTMAPEVSSTIAALHADRTGEAGEPWISELAAAGRY
 VEDN WGAG

7.2 Sequenzalignments

Sequenzalignment der Volllängensequenz von CYP102A1, CYP102K1 und N'-short-CYP102K1

Es sei darauf hingewiesen, dass jeweils nicht Methionin sondern die darauffolgende Aminosäure als Startamino­säure angesehen wurde. Schlüsselpositionen für die NADPH-Bindung sind gelb markiert.

	
	5 15 25 35 45
CYP102A1	-----
CYP102K1	SETSTPPALK SVDLGLAAGT VRVGWFPGAS REAVLAAVRG AAGLSGETAF
N'-short-CYP102K1	-----
	
	55 65 75 85 95
CYP102A1	-----T-IK EMPQPKTFGE
CYP102K1	HVETADGVTI ALDDSVPA GT RLRLVVQGEV PSSAAPALHR PVPGPKPYPV
N'-short-CYP102K1	----- PSSAAPALHR PVPGPKPYPV
	
	105 115 125 135 145
CYP102A1	LKNLPLLNTD KPVQALMKIA DEL-GEIFKF EAPGRVTRYL SSQRLIKEAC
CYP102K1	VGNLPELHNA EGLVAAVDAL HAKHGEFFAF QVGGKRAYFC SDADIISEMC
N'-short-CYP102K1	VGNLPELHNA EGLVAAVDAL HAKHGEFFAF QVGGKRAYFC SDADIISEMC
	
	155 165 175 185 195
CYP102A1	ESRFDKNLS ----QALKFV RDFAGDGLFT SWTHEKNWKK AHNILLPSFS
CYP102K1	AAPDVFAKL V EGRGGLGNLA EKSVGSALFT ASDNDPLWHQ AHRILAPAFG
N'-short-CYP102K1	AAPDVFAKL V EGRGGLGNLA EKSVGSALFT ASDNDPLWHQ AHRILAPAFG
	
	205 215 225 235 245
CYP102A1	QQAMKGYHAM MVDIAVQLVQ KWERLN-ADE HIEVPEDMTR LTLDITIGLCG
CYP102K1	ATALKNYYGR IVEVADDLLD HLDRLA-PGE SFLATDLMTR MTFEAISYAA
N'-short-CYP102K1	ATALKNYYGR IVEVADDLLD HLDRLA-PGE SFLATDLMTR MTFEAISYAA
	
	255 265 275 285 295
CYP102A1	FNRYRFSFYR DQPHPFITSM VRALDEAMNK LQRANPDDPA YDENKRQFQE
CYP102K1	FNRRYGAI DS PALPAFVEAM NVVLTDAMAE PKRLLPEVFY HEAR-KTRAA
N'-short-CYP102K1	FNRRYGAI DS PALPAFVEAM NVVLTDAMAE PKRLLPEVFY HEAR-KTRAA

	
	305 315 325 335 345
CYP102A1	DIKVMNDLVD KIIADR---K ASGEQS-DDL LTHMLNGKDP ETGEPLDDEN
CYP102K1	ADKIMLEEVE TIIAERRFAM AAGAPVPTDL LQVMLTTPDR VTGQKLPDDN
N'-short-CYP102K1	ADKIMLEEVE TIIAERRFAM AAGAPVPTDL LQVMLTTPDR VTGQKLPDDN
	
	355 365 375 385 395
CYP102A1	IRYQIITFLI AGHETTSGLL SFALYFLVKN PHVLQKAAEE AARVLVD---
CYP102K1	IRGQLIVLLI AGHETTSGLL AYALYHLWKY PETMEKLIAE VDEVLGDRFS
N'-short-CYP102K1	IRGQLIVLLI AGHETTSGLL AYALYHLWKY PETMEKLIAE VDEVLGDRFS
	
	405 415 425 435 445
CYP102A1	PVPSYKQVKQ LKYVGMVLNE ALRLWPTAPA FSLYAKEDTV LG-GEYPLEK
CYP102K1	YKPTYEDVGR LAYTQRVLKE ALRLCPPVPM FPRYVTRDAT VGNGRYDLKA
N'-short-CYP102K1	YKPTYEDVGR LAYTQRVLKE ALRLCPPVPM FPRYVTRDAT VGNGRYDLKA
	
	455 465 475 485 495
CYP102A1	GDELMVLIPQ LHRDKTIWGD DVEEFRPERF E--NPSAIPQ HAFKPFNGNQ
CYP102K1	GERIFVSLSA MQKNPRFWGA DALVFRPERF GPREEKHHP HAYHPFGMGA
N'-short-CYP102K1	GERIFVSLSA MQKNPRFWGA DALVFRPERF GPREEKHHP HAYHPFGMGA
	
	505 515 525 535 545
CYP102A1	RACIGQQFAL HEATLVLGMM LKHFDDEDHT -NYELDIKET LTLKPEGFVV
CYP102K1	RSCIGFQFAL VEAKMVLARF IQRFTARPKD PHYVLCHKQA LTVKPDHLDL
N'-short-CYP102K1	RSCIGFQFAL VEAKMVLARF IQRFTARPKD PHYVLCHKQA LTVKPDHLDL
	
	555 565 575 585 595
CYP102A1	KAKSK----- ----KIPLG GIPSPSTEQS AKKVRKKAEN AHNTPLLVLY
CYP102K1	LLERR----- ----PEVKG RFPVRTEAPK TQGAPLAVAQ AGGRPMRVLY
N'-short-CYP102K1	LLERR----- ----PEVKG RFPVRTEAPK TQGAPLAVAQ AGGRPMRVLY
	
	605 615 625 635 645
CYP102A1	GSNMGTAEGT ARDLADIAMS KGFAPQVATL DSHAGN-LPR EGAVLIVTAS
CYP102K1	GSNMGGCRDI ALSLAQQAGA RGFAATVAEL DEQVGQPWLT DGPVVIVTST
N'-short-CYP102K1	GSNMGGCRDI ALSLAQQAGA RGFAATVAEL DEQVGQPWLT DGPVVIVTST

	
	655 665 675 685 695
CYP102A1	YNGHPPDNAK QFVDWLDQAS A-DEVKGVRY SVFGCGDKNW ATTYQKVPAF
CYP102K1	YNGTPPDNAA RFAKWLETAP A-GVCAGVRH AVLGCNGTQW HQTFQKFPKT
N'-short-CYP102K1	YNGTPPDNAA RFAKWLETAP A-GVCAGVRH AVLGCNGTQW HQTFQKFPKT
	
	705 715 725 735 745
CYP102A1	IDETLAAKGA ENIADRGEAD ASDDFEGTYE EWREHMWSDV AAYFN-----
CYP102K1	IASGLAALGG TALLDEGTAD AAGDYEAAVE GWTAALWPAL EAAFGGAAGA
N'-short-CYP102K1	IASGLAALGG TALLDEGTAD AAGDYEAAVE GWTAALWPAL EAAFGGAAGA
	
	755 765 775 785 795
CYP102A1	--LDIENSED NKSTLSLQFV DSAADMPLAK MHGAFSTNVV ASKELQQPGS
CYP102K1	AVIGSAEAAA EAPAVKVEVV NFAGAATGAA PRTGTRLDQG AQLSRIRVNR
N'-short-CYP102K1	AVIGSAEAAA EAPAVKVEVV NFAGAATGAA PRTGTRLDQG AQLSRIRVNR
	
	805 815 825 835 845
CYP102A1	-----A R-STRHLEIE LPKEASYQEG DHLGVIPRNY EGIVNRVTAR
CYP102K1	ELLSPG---A QGSTRHIEIP LPAGTSYAAG DHLAVFPVNP PALVAAAAAR
N'-short-CYP102K1	ELLSPG---A QGSTRHIEIP LPAGTSYAAG DHLAVFPVNP PALVAAAAAR
	
	855 865 875 885 895
CYP102A1	FGLDASQQIR LEAEE---EK LAHLPLAKTV SVEELL-QYV ELQDPVTRTQ
CYP102K1	CGLAPETQVL LTALHPDAAS EAGLPFGVPV SVGELLAEHV DLAGPVTRRD
N'-short-CYP102K1	CGLAPETQVL LTALHPDAAS EAGLPFGVPV SVGELLAEHV DLAGPVTRRD
	
	905 915 925 935 945
CYP102A1	LRAMAAKTVC PPHKVELEA- ----LLEKQA YKEQVLAKRL TMLELLEKYP
CYP102K1	LRAWAQAAQC PPDRARIAG- -----WLSF FPSAVAEAKP RMEDLLAQVP
N'-short-CYP102K1	LRAWAQAAQC PPDRARIAG- -----WLSF FPSAVAEAKP RMEDLLAQVP
	
	955 965 975 985 995
CYP102A1	AC--EMKFSE FIALLPISIRP RYYSISSSPR VDEKQASITV SVVSGEAWSG
CYP102K1	SV--QLDLAA LLTVRPALKP RYYSISSSPL MSPDACALTV GVHQFTTADG
N'-short-CYP102K1	SV--QLDLAA LLTVRPALKP RYYSISSSPL MSPDACALTV GVHQFTTADG

	
	1005 1015 1025 1035 1045
CYP102A1	YGEYKGIASN YLAELQEGDT ITCFISTPQS EFTLPKDPET PLIMVGPGTG
CYP102K1	-VRHDGLCSS YLVSCGEDAP VRVLVKDTGS TFHLPADPAV PLILVGPGTG
N'-short-CYP102K1	-VRHDGLCSS YLVSCGEDAP VRVLVKDTGS TFHLPADPAV PLILVGPGTG
	
	1055 1065 1075 1085 1095
CYP102A1	VAPFRGFVQA RKQLKEQQQS LGEAHLVFGC RSPHEDYLYQ EELENAQSEG
CYP102K1	LAPLRGFIQE RHALRAQGRA TGPVLLFFGC RD-DGDYLYR EELEAYRDEG
N'-short-CYP102K1	LAPLRGFIQE RHALRAQGRA TGPVLLFFGC RD-DGDYLYR EELEAYRDEG
	
	1105 1115 1125 1135 1145
CYP102A1	IITLHTA-FS R MPNQPK T YV QHVMEQDGKK LIELLDQGAH FYICGDGSQM
CYP102K1	TLSLLAVGFS R RPGT P R T YV QDLLRTHGDA VREQVAAGAS ILICGNARTM
N'-short-CYP102K1	TLSLLAVGFS R RPGT P R T YV QDLLRTHGDA VREQVAAGAS ILICGNARTM
	
	1155 1165 1175 1185 1195
CYP102A1	APAVEATLMK SYAD-VHQVS EADARLWLQQ LEEKGRYAKD VWAG-.
CYP102K1	APDVHAAFL E LLGA----- -----GAVAE LEAGGRYLQD VWASS.
N'-short-CYP102K1	APDVHAAFL E LLGA----- -----GAVAE LEAGGRYLQD VWASS.

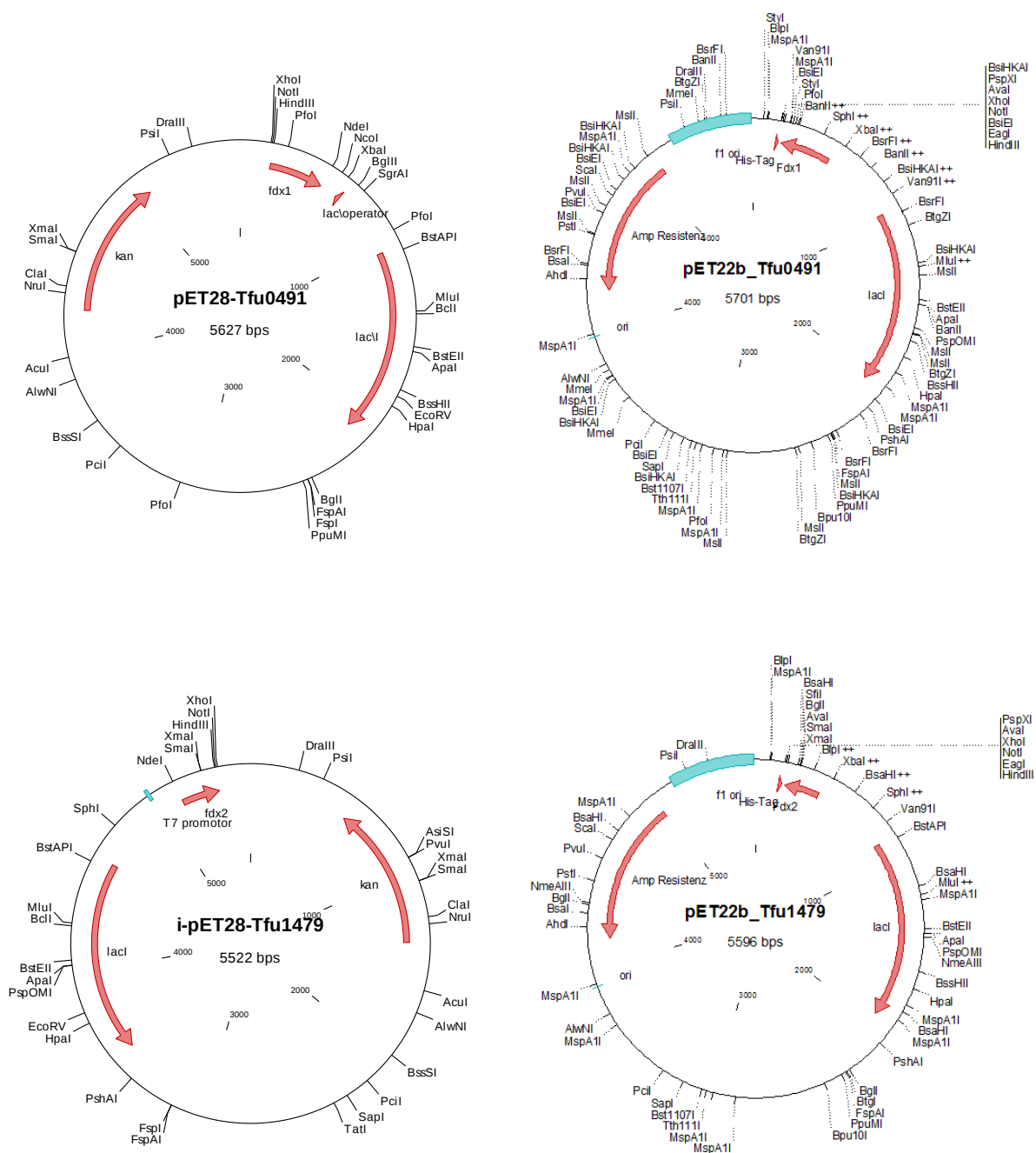
Sequenzalignment der Hämdomänen von CYP102A1 und N'-short-CYP102K1

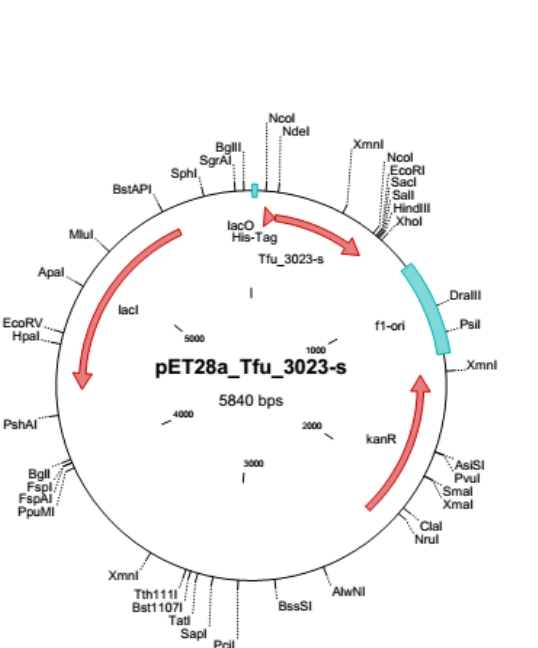
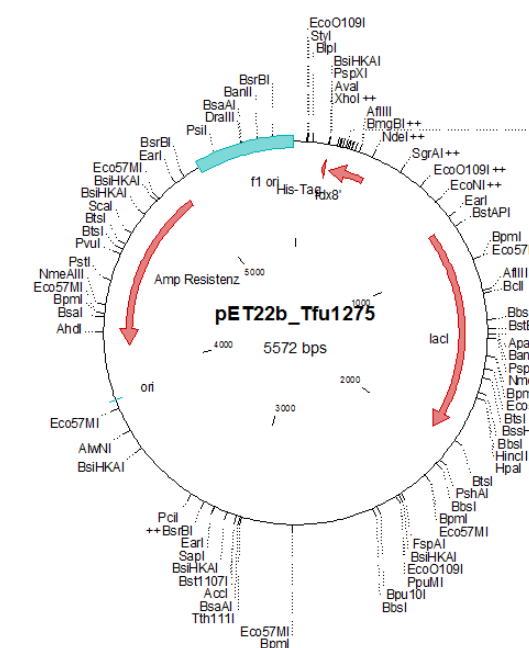
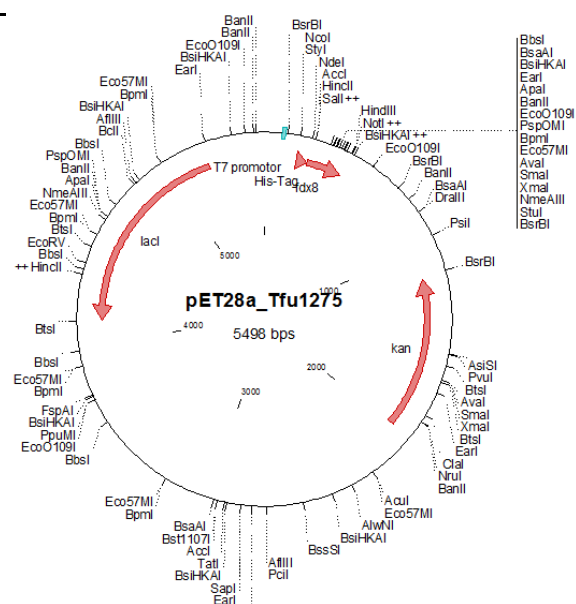
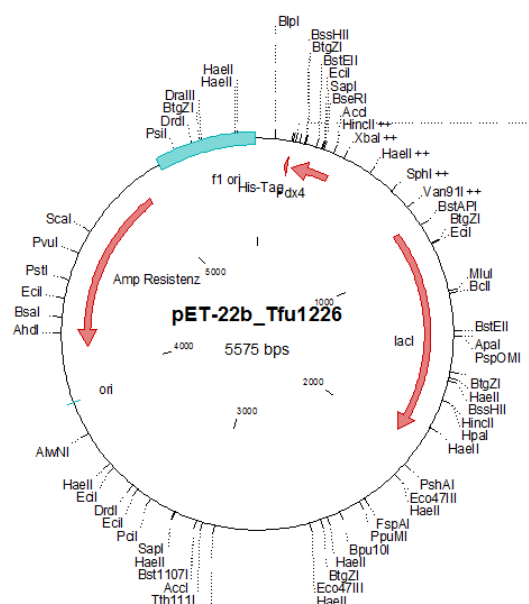
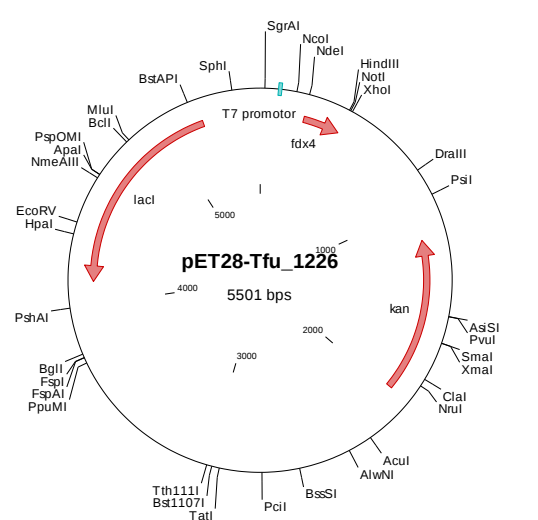
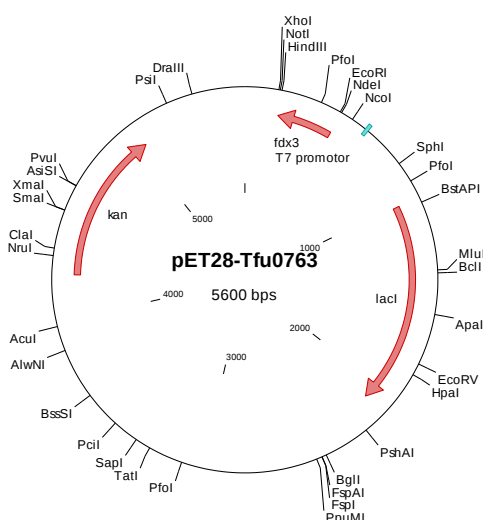
Es sei darauf hingewiesen, dass jeweils nicht Methionin sondern die darauffolgende Aminosäure als Startamino-säure angesehen wurde. Schlüsselpositionen im aktiven Zentrum sind gelb markiert.

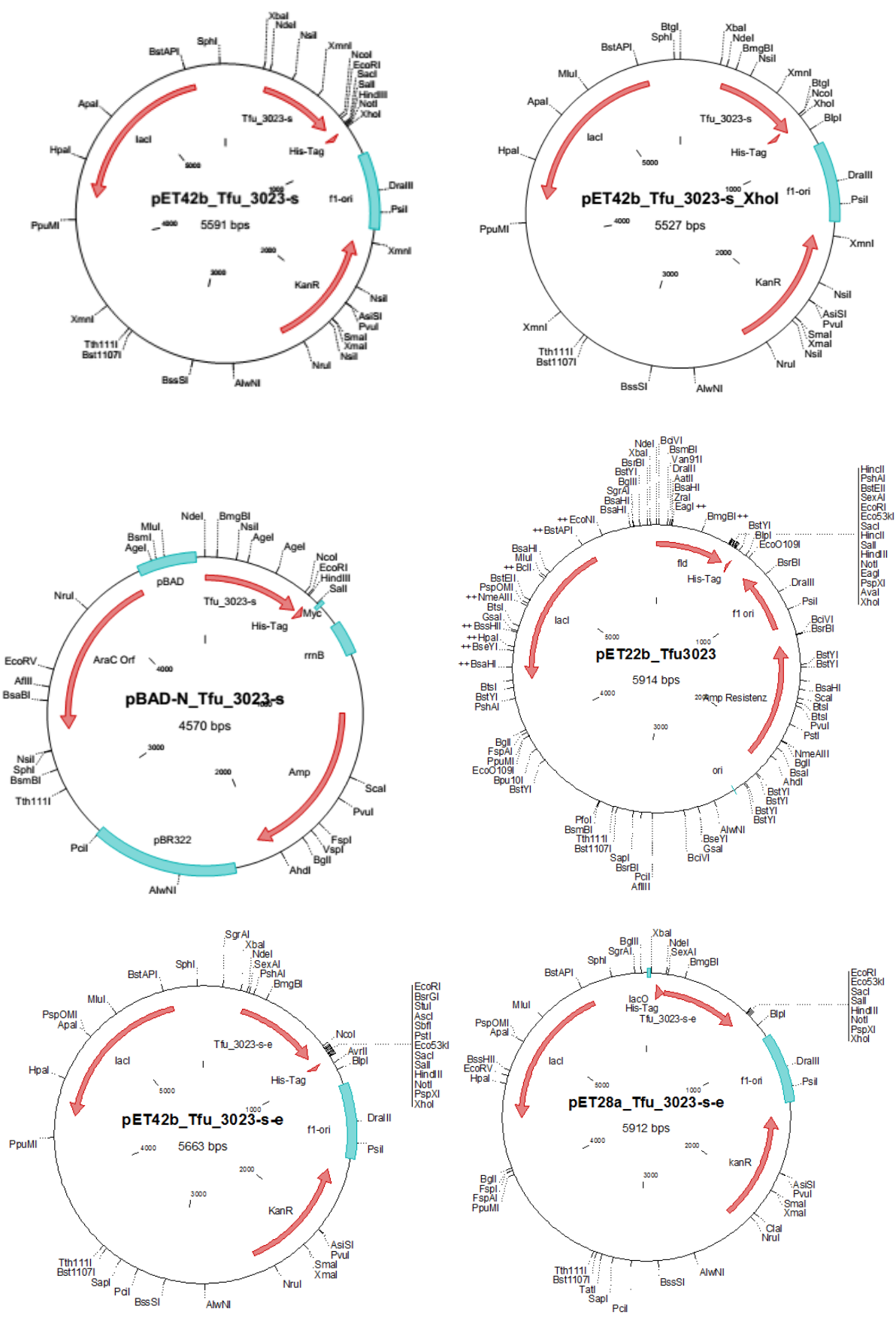
	
	5 15 25 35 45
CYP102A1	-----TIK EMPQPKTFGE LKNLPLLNTD KPVQALMKIA DEL-GEIFKF
N'-short-CYP102K1	PSSAAPALHR PVPGPKPYPV VGNLPELHNA EGLVAAYDAL HAKHGEFFAF
	
	55 65 75 85 95
CYP102A1	EAPGR V TR Y L SSQR L IKEAC DESRFDKNLS ----QALKFV RDFAGDGL F T
N'-short-CYP102K1	QVG G KRAY E C SDADIISEMC AAPDVFAKL V EGRGGLGNLA EKSVGSAL F T

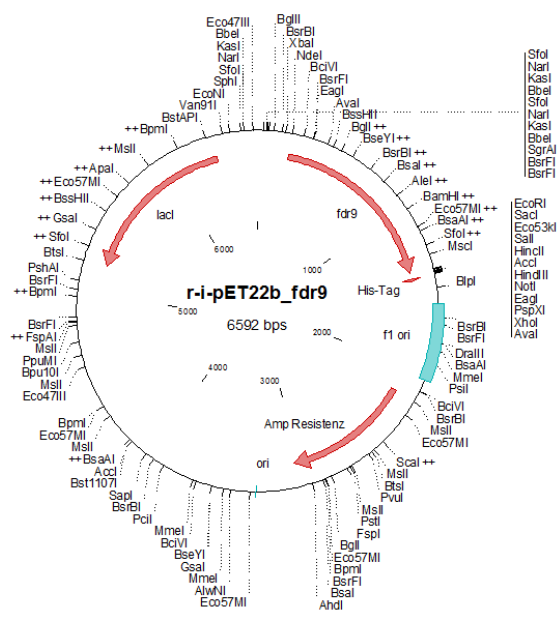
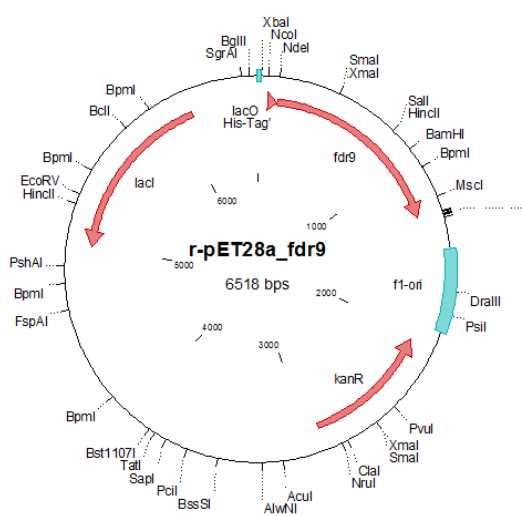
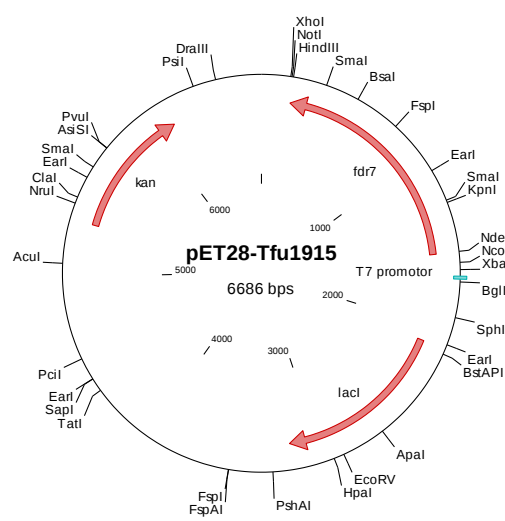
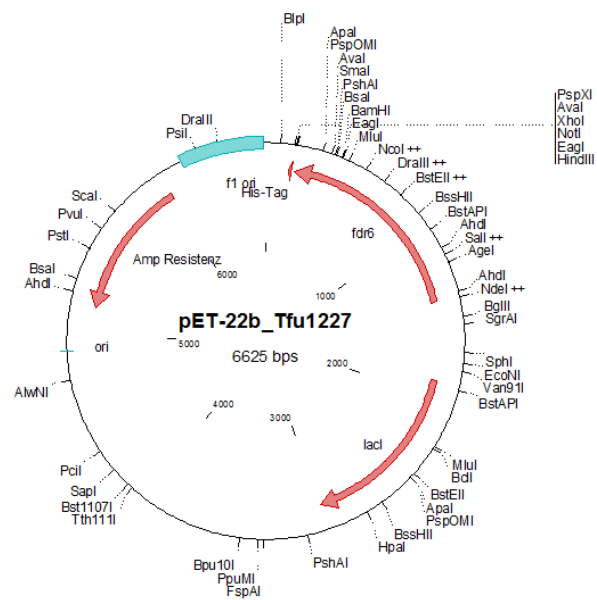
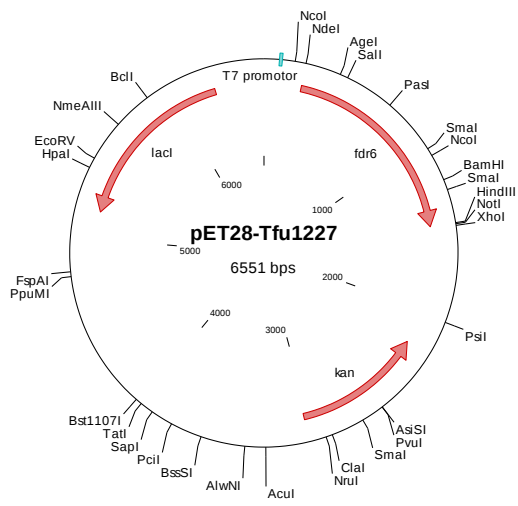
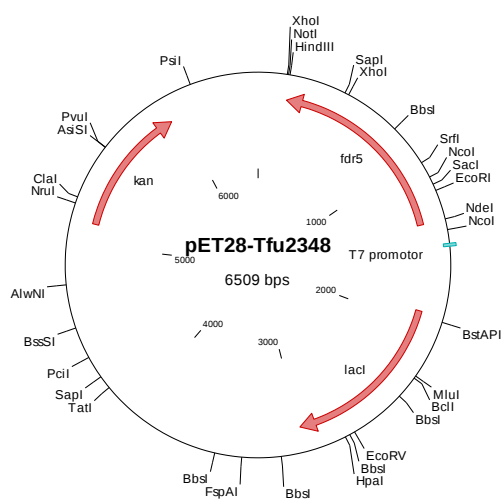
	
	105 115 125 135 145
CYP102A1	SWTHEKNWKK AHNILLPSFS QQAMKGYHAM MVDIAVQLVQ KWERLN-ADE
N'-short-CYP102K1	ASDNDPLWHQ AHRILAPAFG ATALKNYYGR IVEVADDLLD HLDRLA-PGE
	
	155 165 175 185 195
CYP102A1	HIEVPEDMTR LTLDITIGLCG FNYRFNSFYR DQPHPFITSM VRALDEAMNK
N'-short-CYP102K1	SFLATDLMTR MTFEAISYAA FNRRYGAIDS PALPAFVEAM NVVLTDAMAE
	
	205 215 225 235 245
CYP102A1	LQRANPDDPA YDENKRQFQE DIKVMNDLVD KIIADR---K ASGEQS-DDL
N'-short-CYP102K1	PKRLLPEVfy HEAR-KTRAA ADKIMLEEVE TIIAERRFAM AAGAPVPTDL
	
	255 265 275 285 295
CYP102A1	LTHMLNGKDP ETGEPLDDEN IRYQIITFLI AGHETSGLL SFALYFLVKN
N'-short-CYP102K1	LQVMLTTPDR VTGQKLPDDN IRGQLIVLLI AGHETSGML AYALYHLWKY
	
	305 315 325 335 345
CYP102A1	PHVLQKAAEE AARVLVD--- PVPSYKQVKQ LKYVGMVLNE ALRLWPTAPA
N'-short-CYP102K1	PETMEKLIAE VDEVLGGRFS YKPTYEDVGR LAYTQRVLKE ALRLCPPVPM
	
	355 365 375 385 395
CYP102A1	FSLYAKEDTV LG-GEYPLEK GDELMVLIPQ LHRDKTIWGD DVEEFRPERF
N'-short-CYP102K1	FPRYVTRDAT VGNGRYDLKA GERIFVSLSA MQKNPRFWGA DALVFRPERF
	
	405 415 425 435 445
CYP102A1	E--NPSAIPQ HAFKPFNGNQ RACIGQQFAL HEATLVLGMM LKHFDFFEDHT
N'-short-CYP102K1	GPEEEKHHHP HAYHPFGMGA RSCIGFQFAL VEAQMVLARF IQRFTARPKD
	
	455 465 475
CYP102A1	-NYELDIKET LTLKPEGFVV KAKSK
N'-short-CYP102K1	PHYVLCHKQA LTVKPDHLDM LLERR

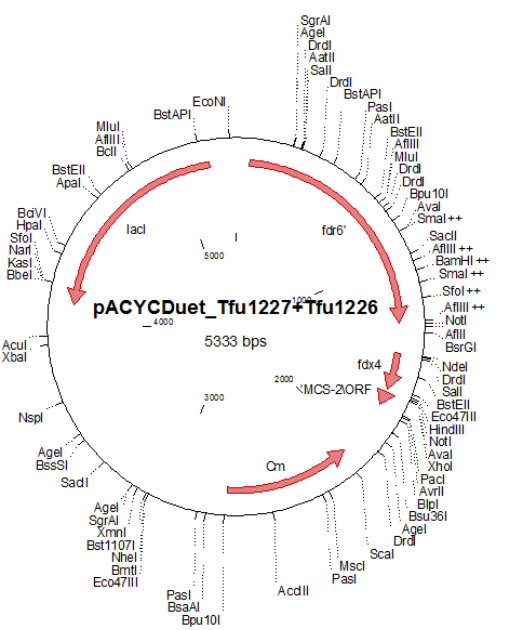
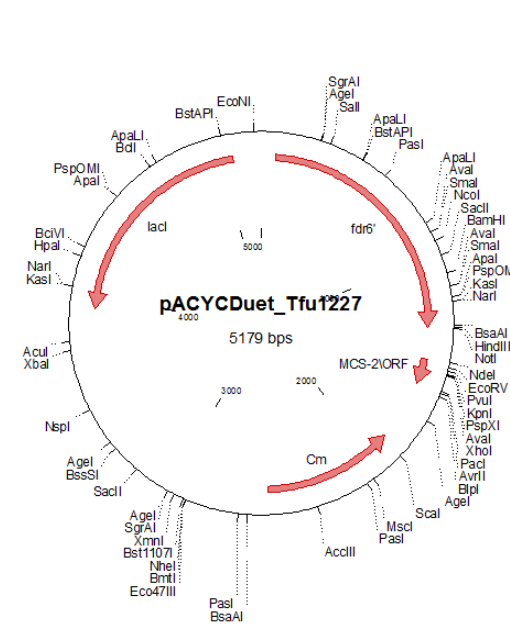
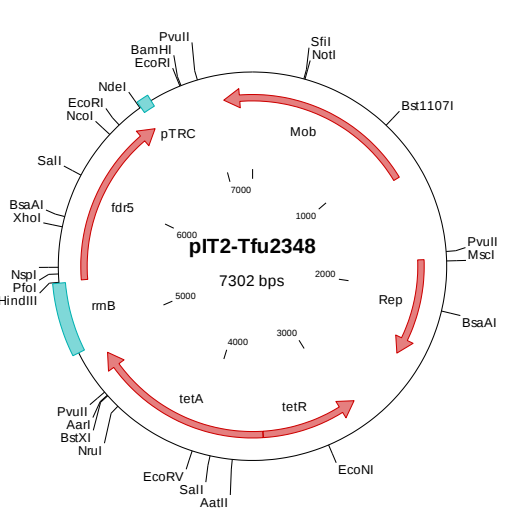
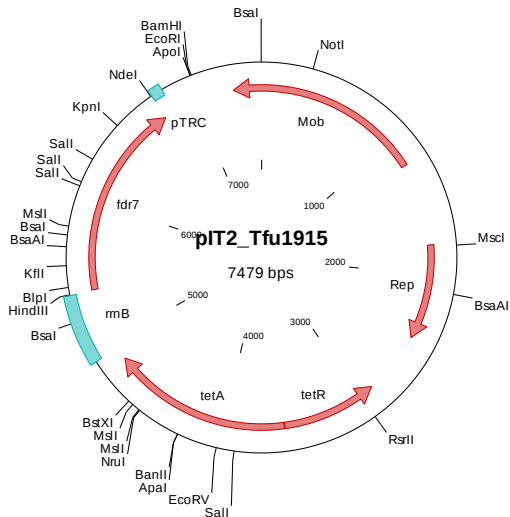
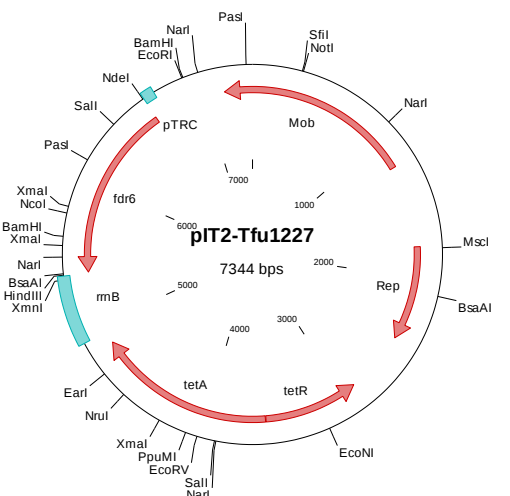
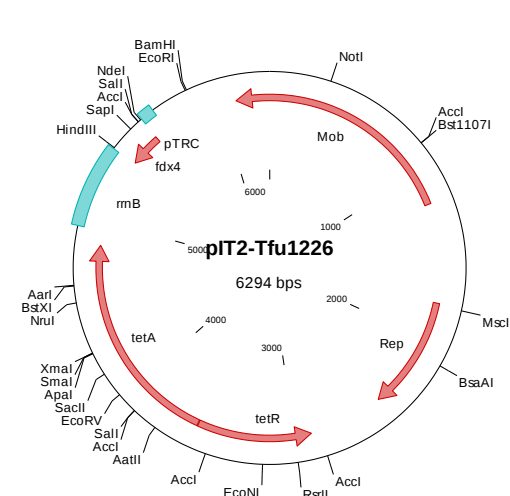
7.3 Vektorkarten

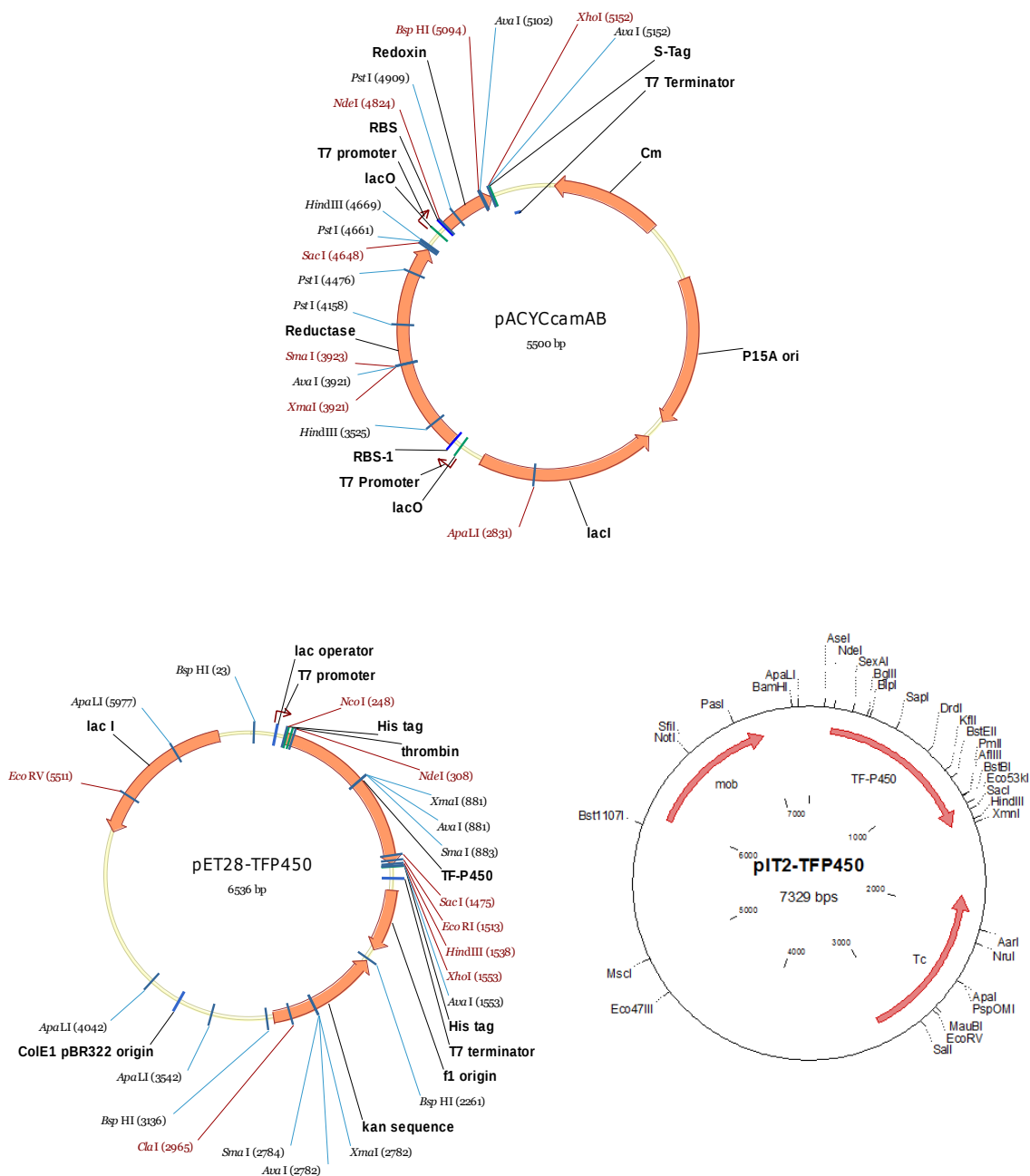




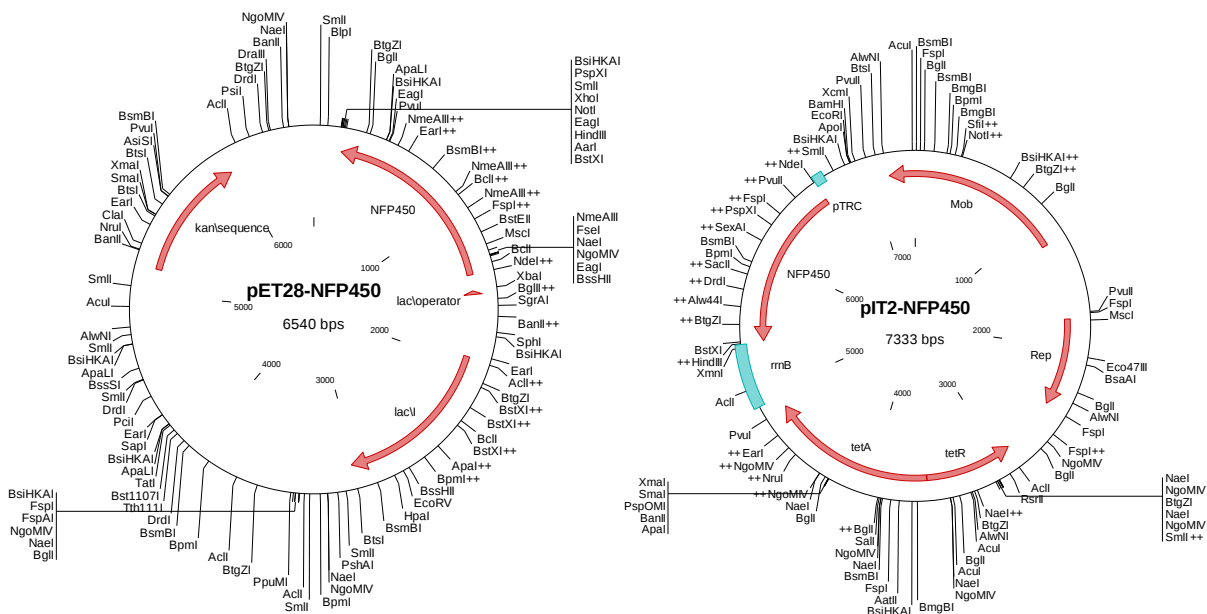




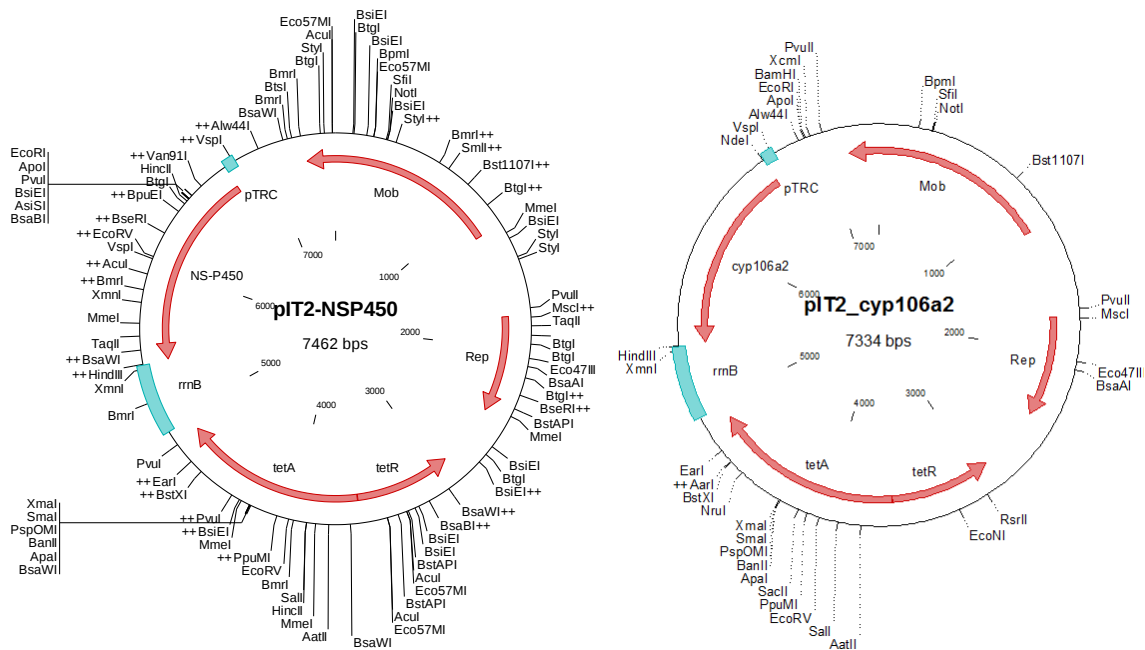




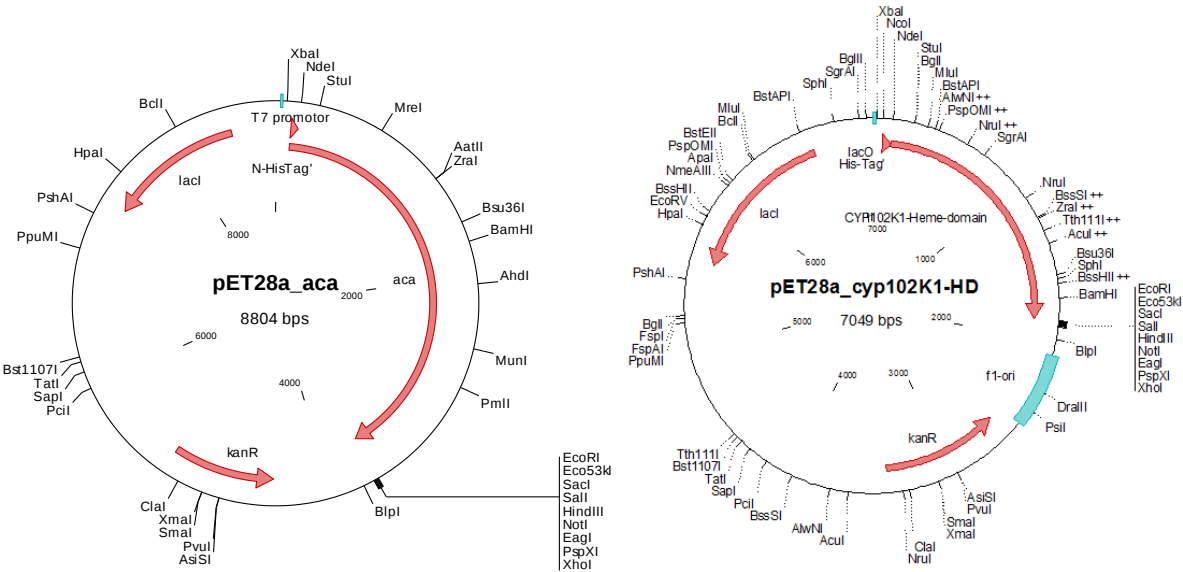
“TFP450” steht für CYP154H1



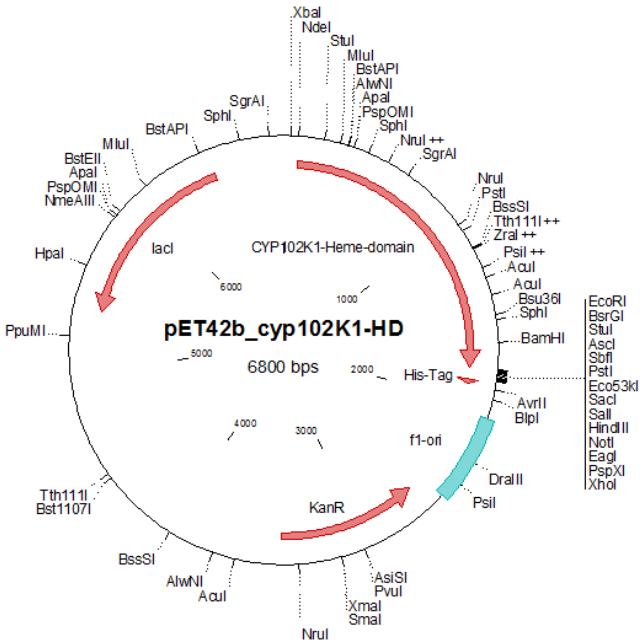
“NFP450” steht für CYP154C5

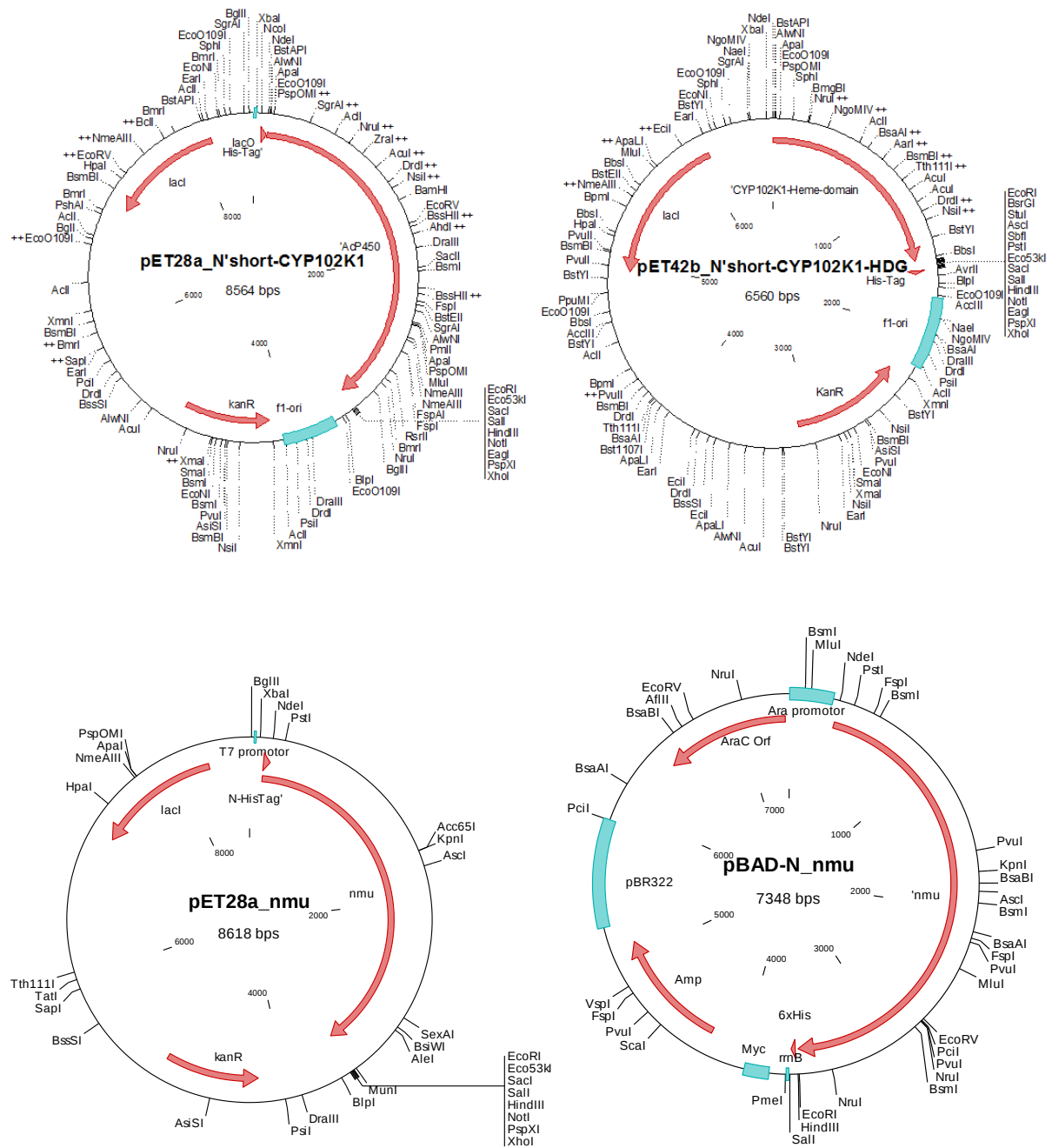


„NSP450“ steht für CYP110D1



“aca” steht für CYP102K1





“Nmu” steht für P450 aus *Nakamurella multipartia*

7.4 DNA-Marker

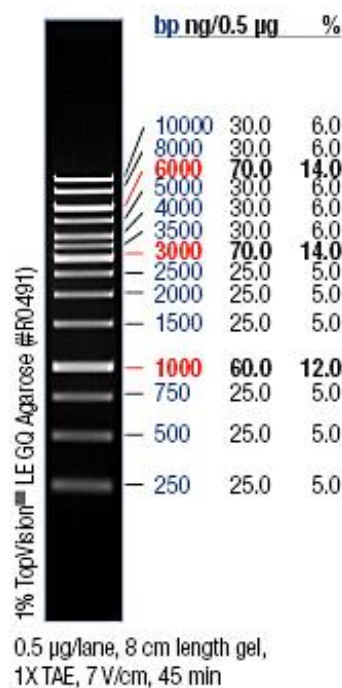


Abbildung 7.1: Der als Größenstandard für Agarosegele genutzte DNA-Marker „GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder“ von Fermentas.

7.5 Proteinmarker

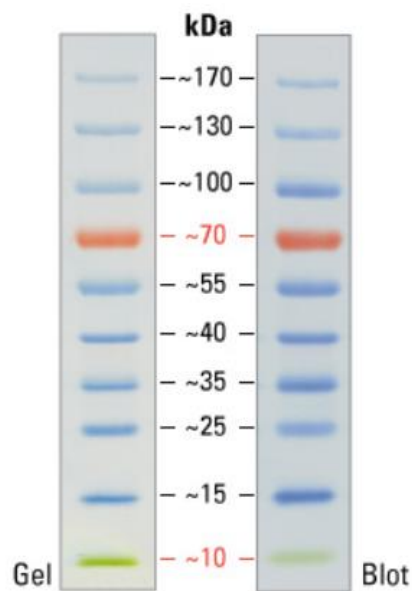


Abbildung 7.2: Der als Größenstandard für die SDS-PAGE genutzte Proteinmarker “PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Fermentas.

7.6 GC-Kalibriergeraden

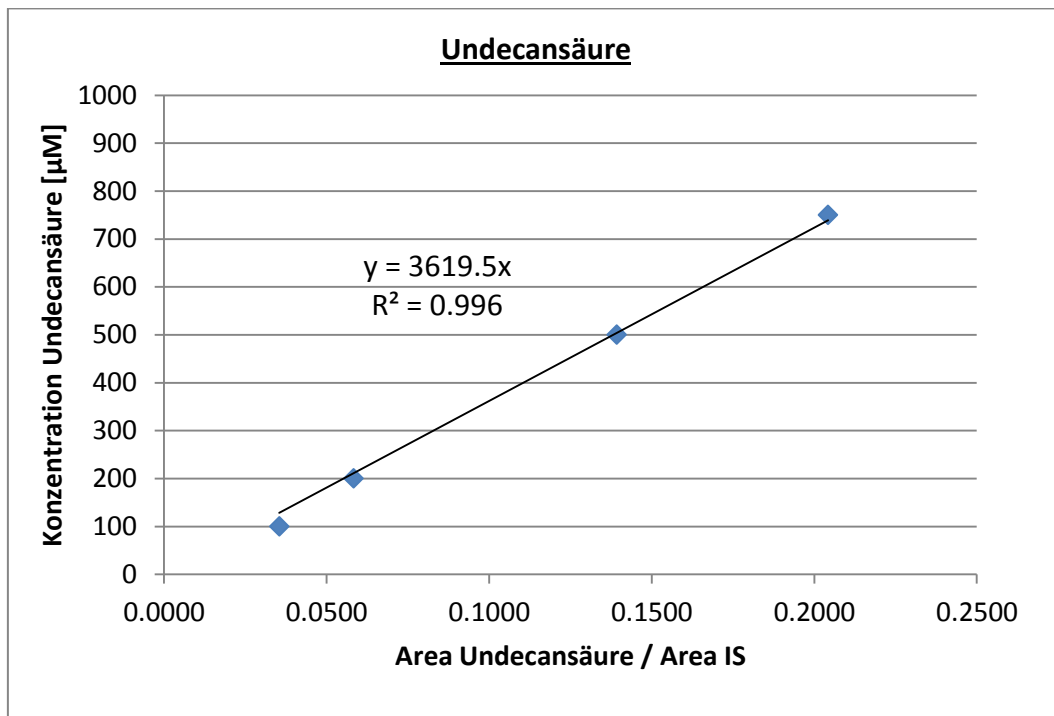


Abbildung 7.3: Kalibriergerade der Undecansäurestammlösung.

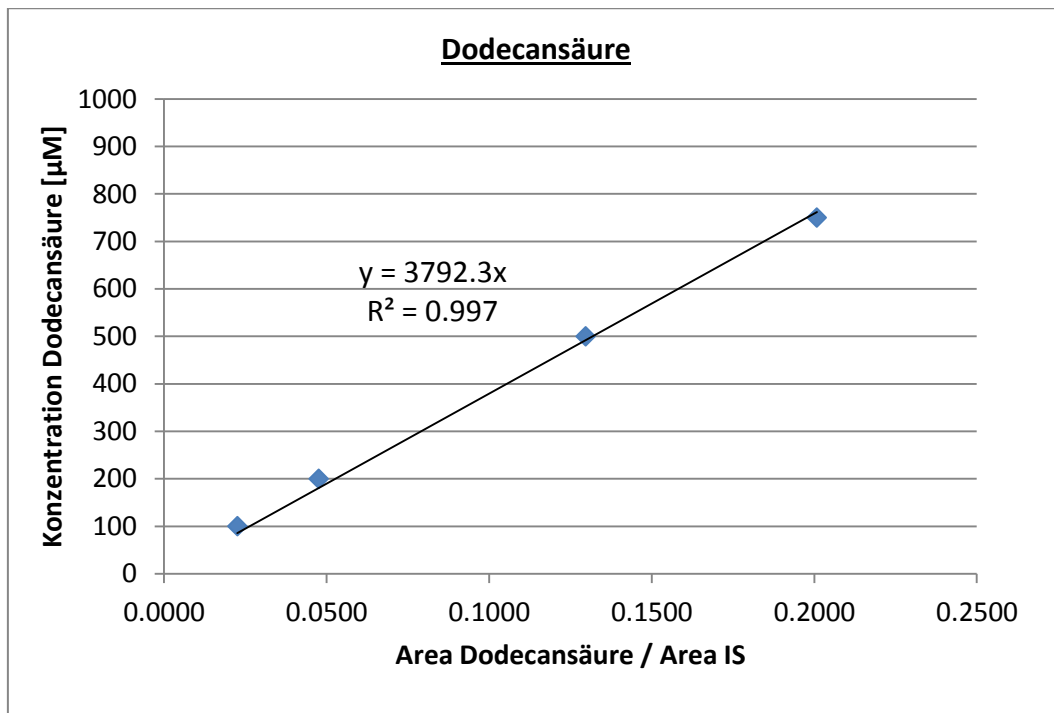


Abbildung 7.4: Kalibriergerade der Dodecansäurestammlösung.

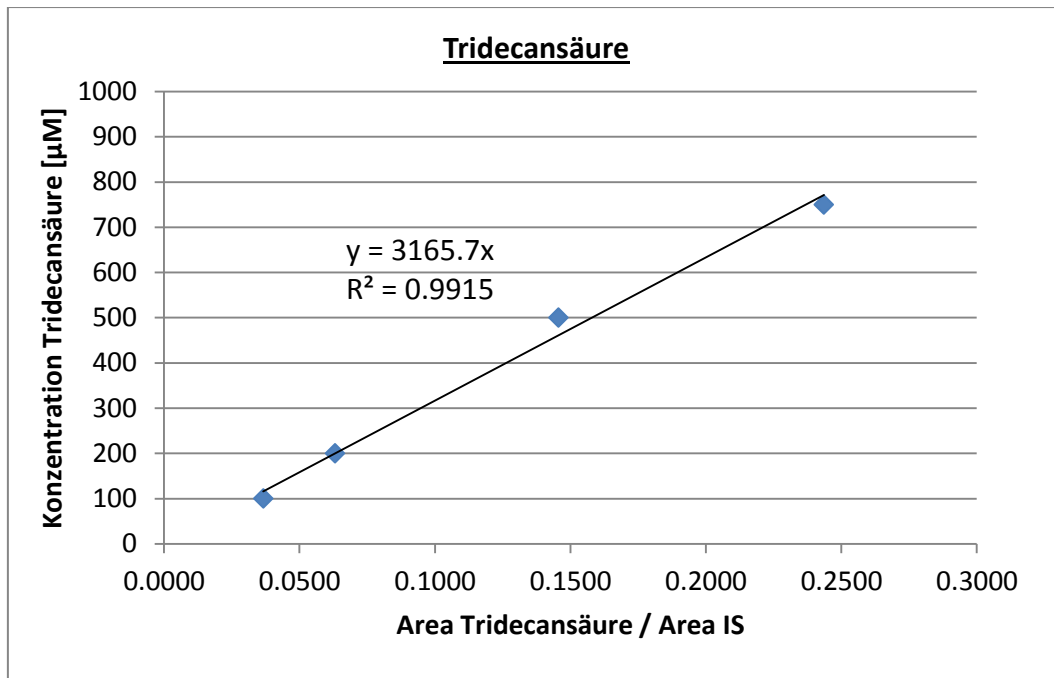


Abbildung 7.5: Kalibriergerade der Tridecansäurestammlösung.

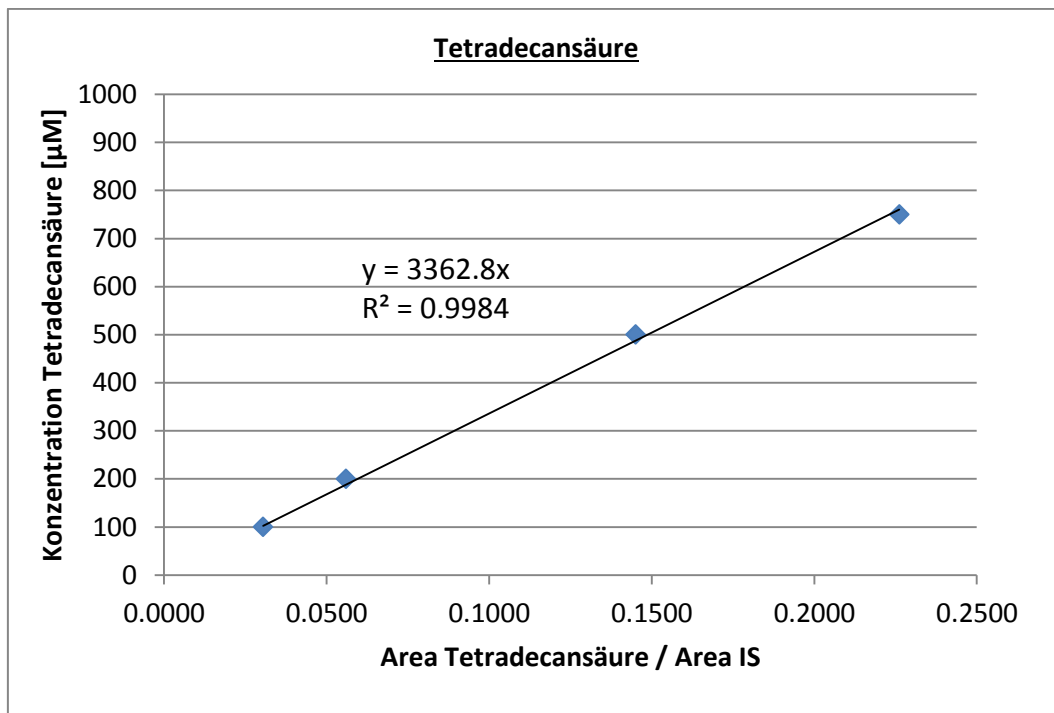


Abbildung 7.6: Kalibriergerade der Tetradecansäurestammlösung.

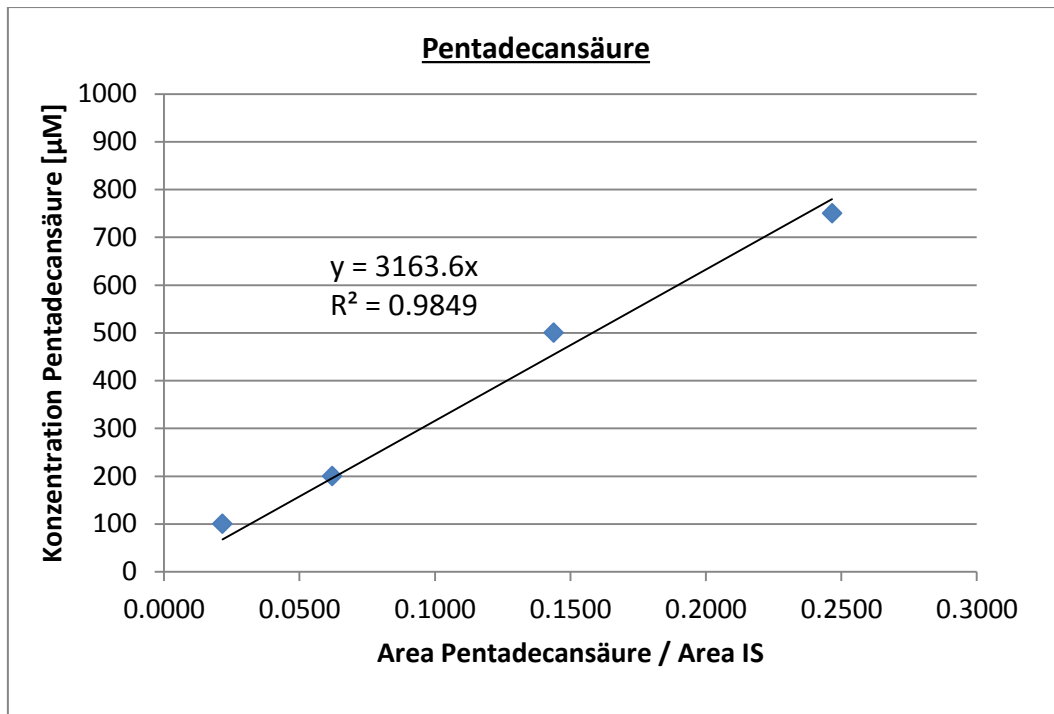


Abbildung 7.7: Kalibriergerade der Pentadecansäurestammlösung.

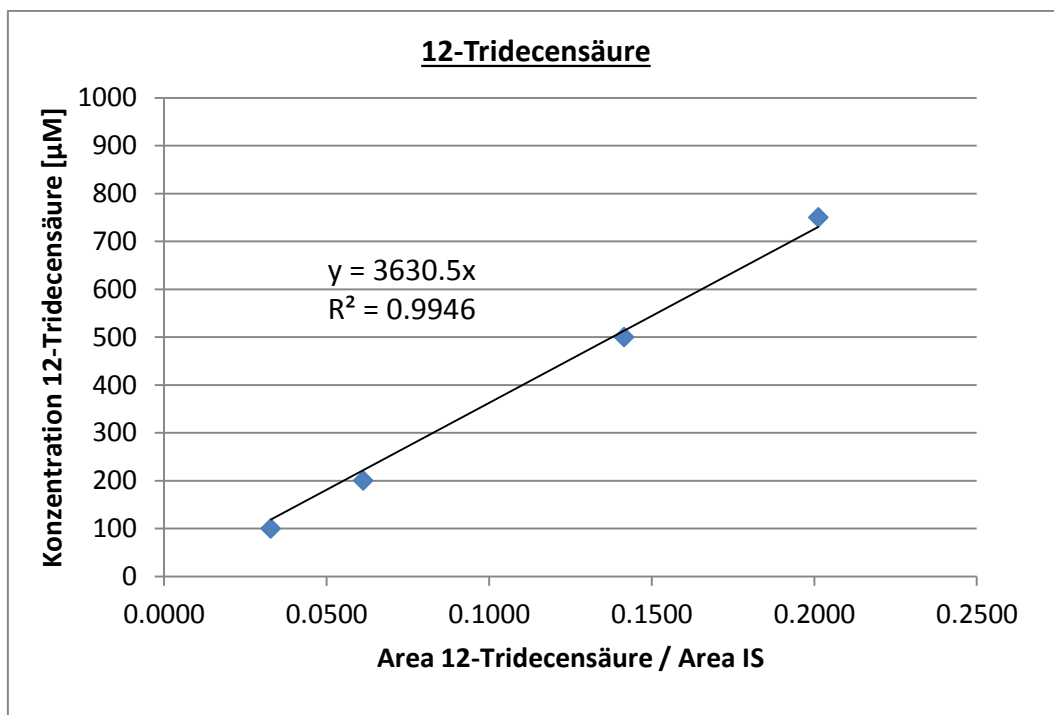


Abbildung 7.8: Kalibriergerade der 12-Tridecensäurestammlösung.

7.7 Tabellen und Chromatogramme zu Proteinaufreinigungen

Tabelle 7.1: Aufreinigungstabelle der Ferredoxin-Aufreinigungen über HisTrap™ HP-Säule

Probe	Volumen [mL]	c _{Protein} [mg/mL]	Gesamtprotein [mg]	Reinheit [%]	Anteil am Gesamtprotein [%]
Zellfreier Extrakt (Fdx 1)	32,5	7,0	227,9	-	100
Fdx 1 (aufgereinigt)	3,9	1,2	4,7	30	2,1
Zellfreier Extrakt (Fdx 2)	23,0	8,8	203,4	-	100
Fdx 2 (aufgereinigt)	7,9	4,6	36,3	70	17,8
Zellfreier Extrakt (Fdx 3)	38,0	9,0	375,0	-	100
Fdx 3 (aufgereinigt)	7,9	7,6	60,0	100	16,0
Zellfreier Extrakt (Fdx 4)	23,0	20,9	480,0	-	100
Fdx 4 (aufgereinigt)	3,9	2,6	10,1	75	2,1
Zellfreier Extrakt (Fdx 8)	28,5	13,5	385,9	-	100
Fdx 8 (aufgereinigt)	3,9	2,5	9,8	95	2,4

Tabelle 7.2: Aufreinigungstabelle der Ferredoxinreduktase-Aufreinigungen über HisTrap™ HP-Säule

Probe	Volumen [mL]	c _{Protein} [mg/mL]	Gesamtprotein [mg]	Reinheit [%]	Anteil am Gesamtprotein [%]
Zellfreier Extrakt (FdR 5)	36,0	14,2	494,0	-	100
FdR 5 (aufgereinigt)	3,9	21,3	83,1	75	16,8
Zellfreier Extrakt (FdR 6)	20,5	12,2	249,4	-	100
FdR 6 (aufgereinigt)	7,9	4,3	34,0	100	13,6
Zellfreier Extrakt (FdR 7)	38,0	26,4	1.004,2	-	100
FdR 7 (aufgereinigt)	7,9	54,3	429,0	80	42,7
Zellfreier Extrakt (FdR 9)	29,0	n. b.	n. b.	-	100
FdR 9 (aufgereinigt)	7,8	20,4	159,1	90	n. b.

Für die nachfolgenden Chromatogramme gilt folgende Beschriftung:

Blau: Absorption bei 280 nm (UV-Signal); Rot: Leitfähigkeit; Hellgrün: Konzentration Puffer B; Orange: Fraktionen; Braun: Logbuch und/oder Druck (nur FdR 7); Hellblau: Absorption bei 455 nm (nur Fdx 8 und Fldx-s.-e.); Dunkelgrün: Absorption bei 420 nm (nur CYP102K1). Der Elutionspeak des jeweiligen Zielproteins ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

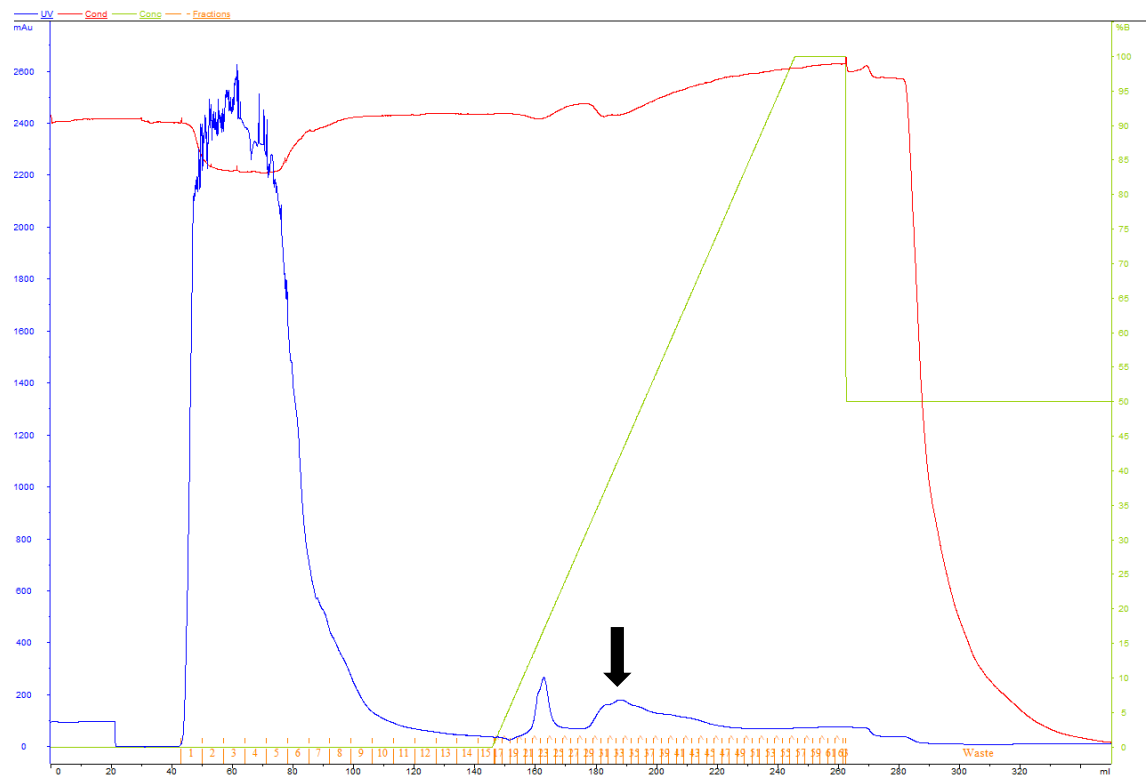


Abbildung 7.9: Chromatogramm der Aufreinigung von Fdx 1 über IMAC.

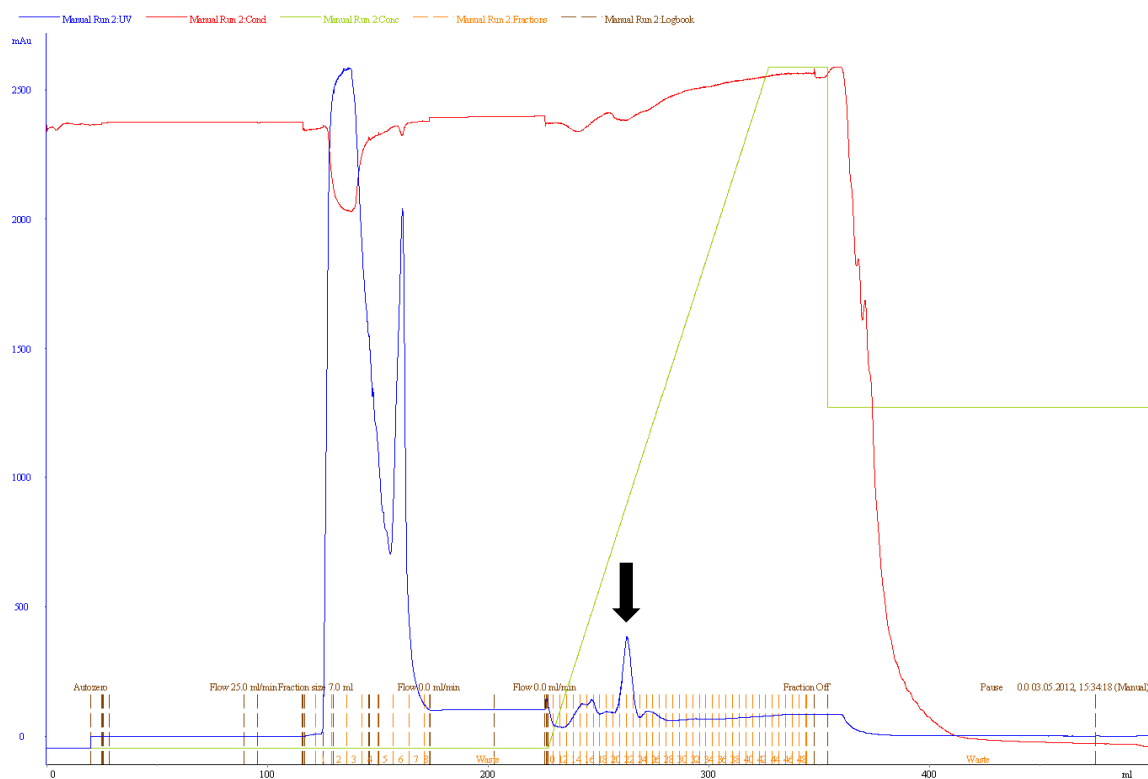


Abbildung 7.10: Chromatogramm der Aufreinigung von Fdx 2 über IMAC.

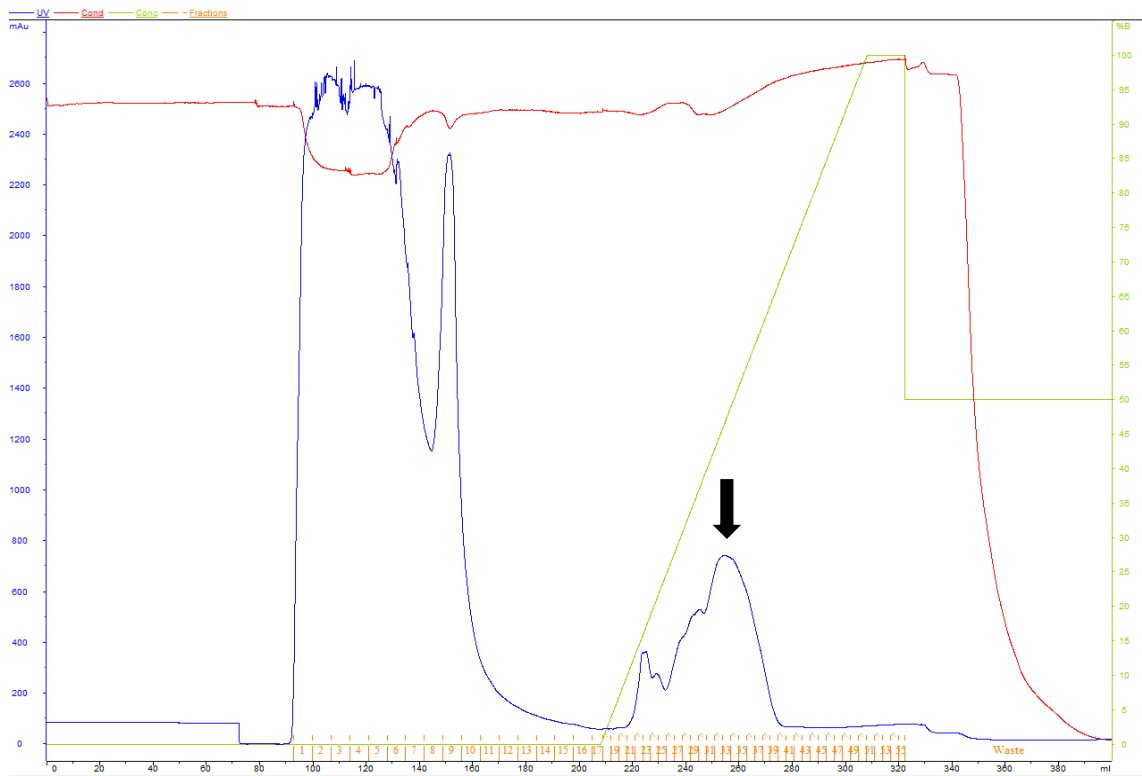


Abbildung 7.11: Chromatogramm der Aufreinigung von Fdx 3 über IMAC.

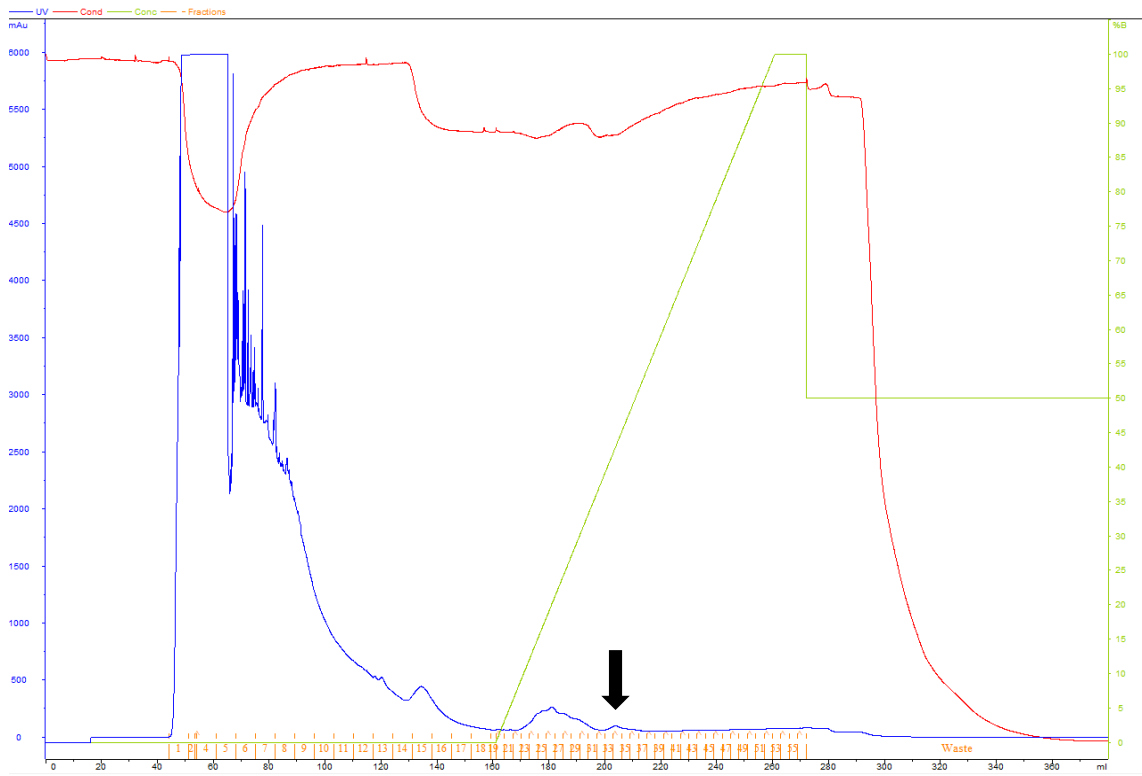


Abbildung 7.12: Chromatogramm der Aufreinigung von Fdx 4 über IMAC.

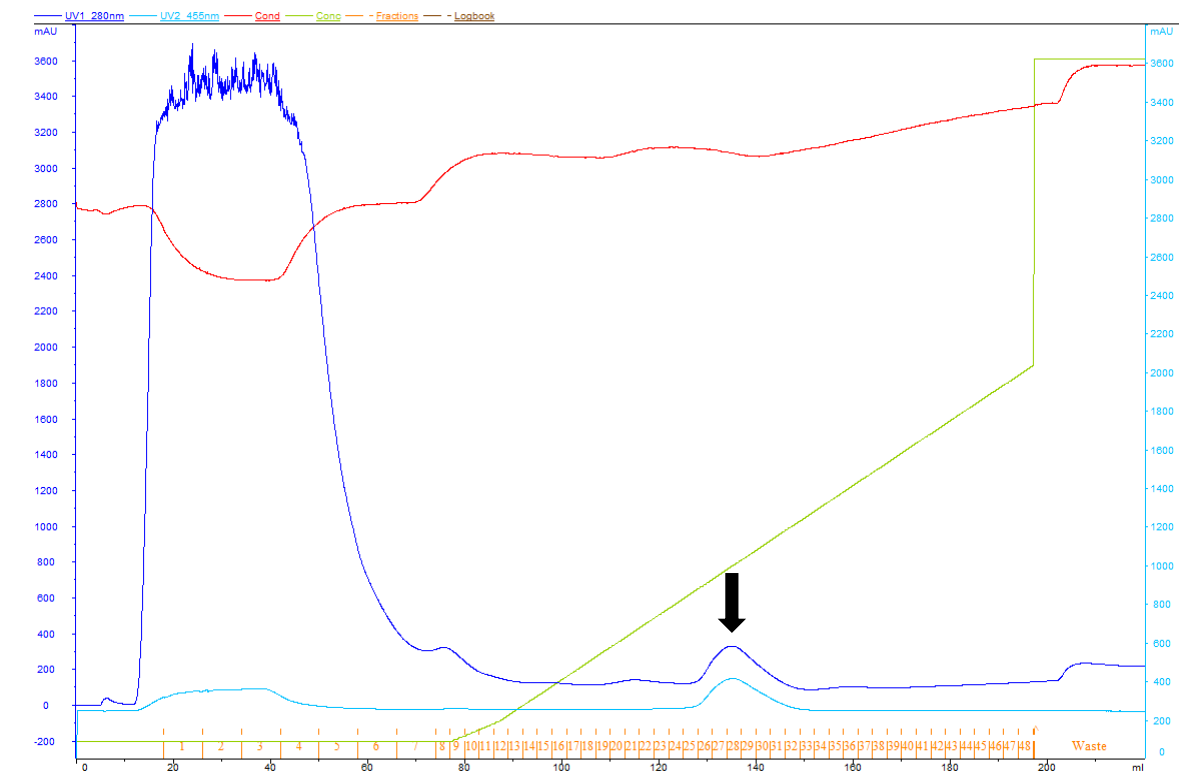


Abbildung 7.13: Chromatogramm der Aufreinigung von Fdx 8 über IMAC.

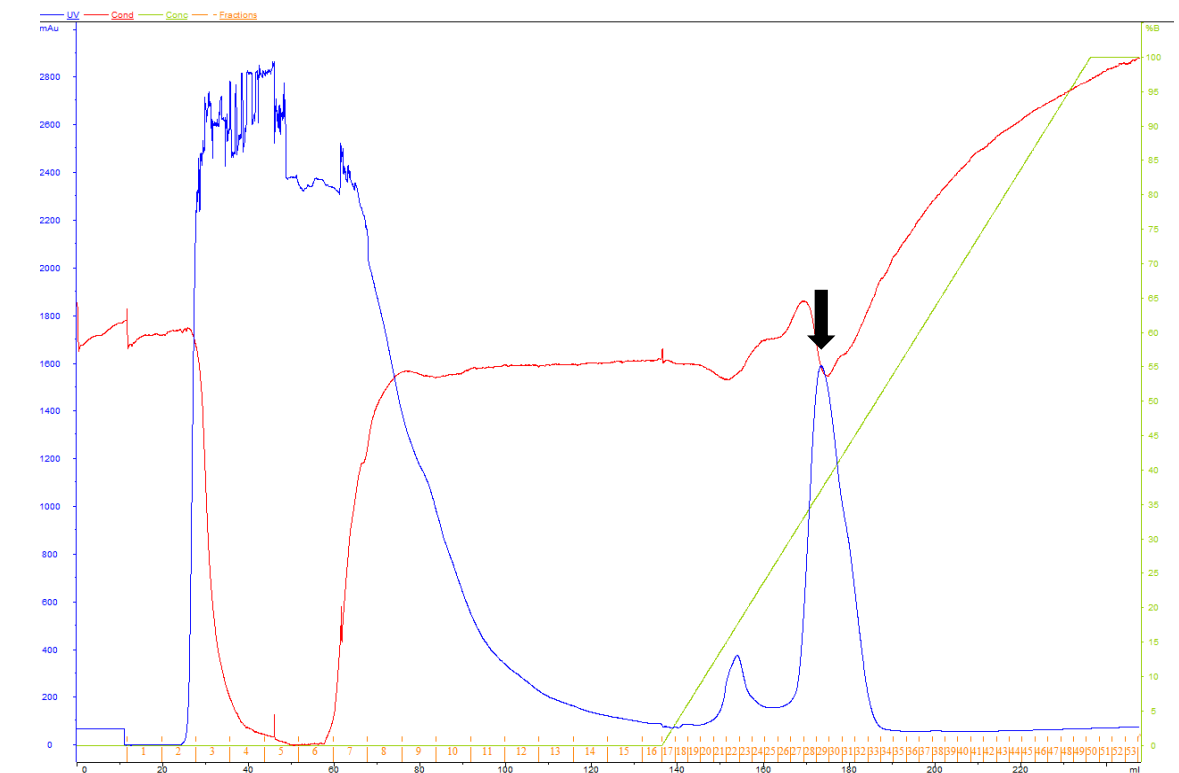


Abbildung 7.14: Chromatogramm der Aufreinigung von FdR 5 über IMAC.

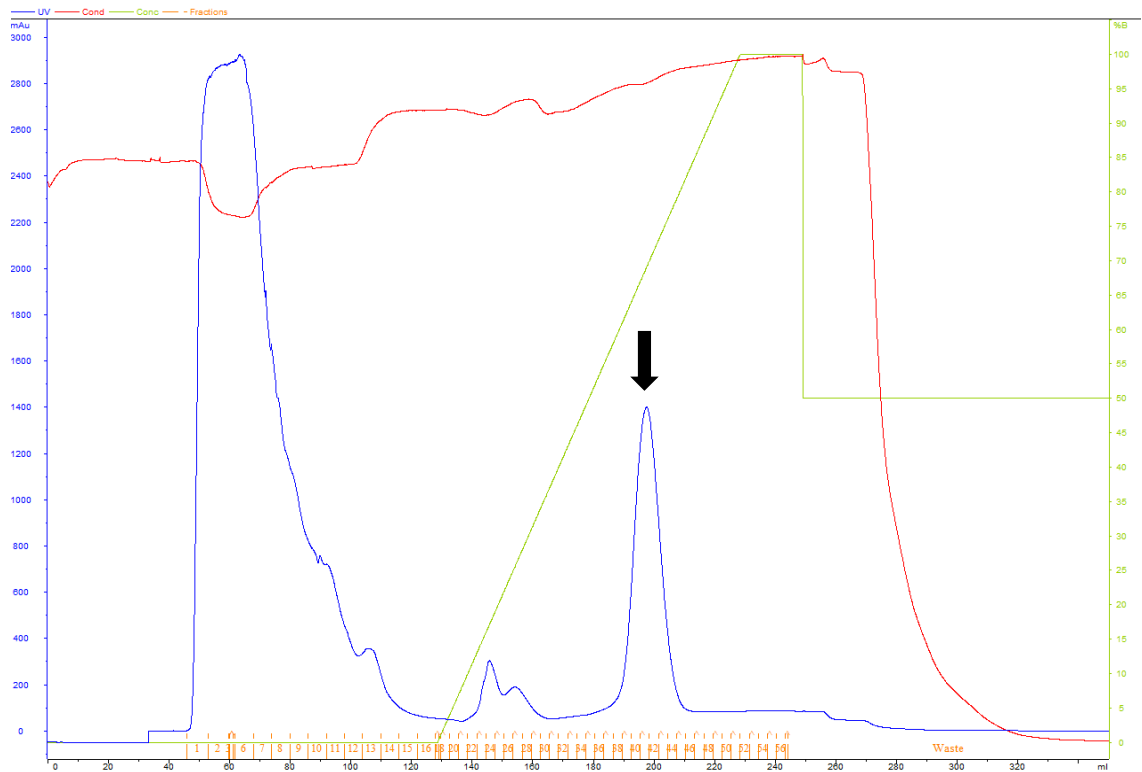


Abbildung 7.15: Chromatogramm der Aufreinigung von FdR 6 über IMAC.

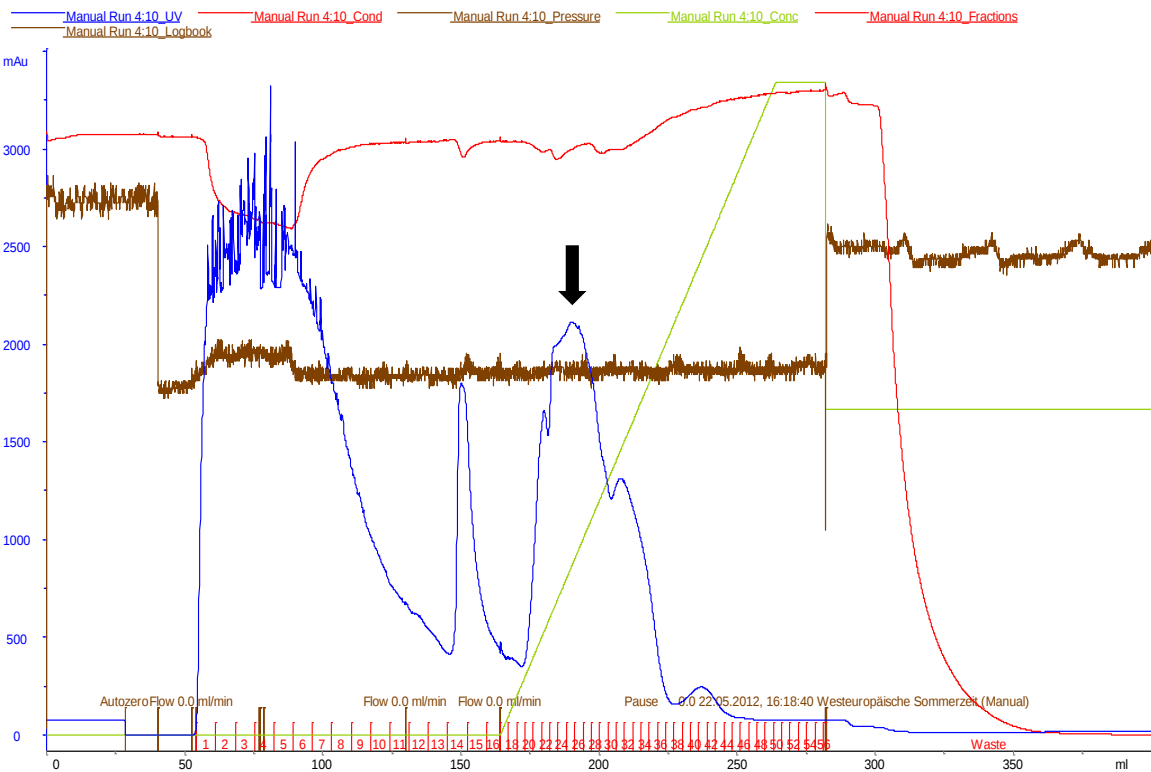


Abbildung 7.16: Chromatogramm der Aufreinigung von FdR 7 über IMAC.

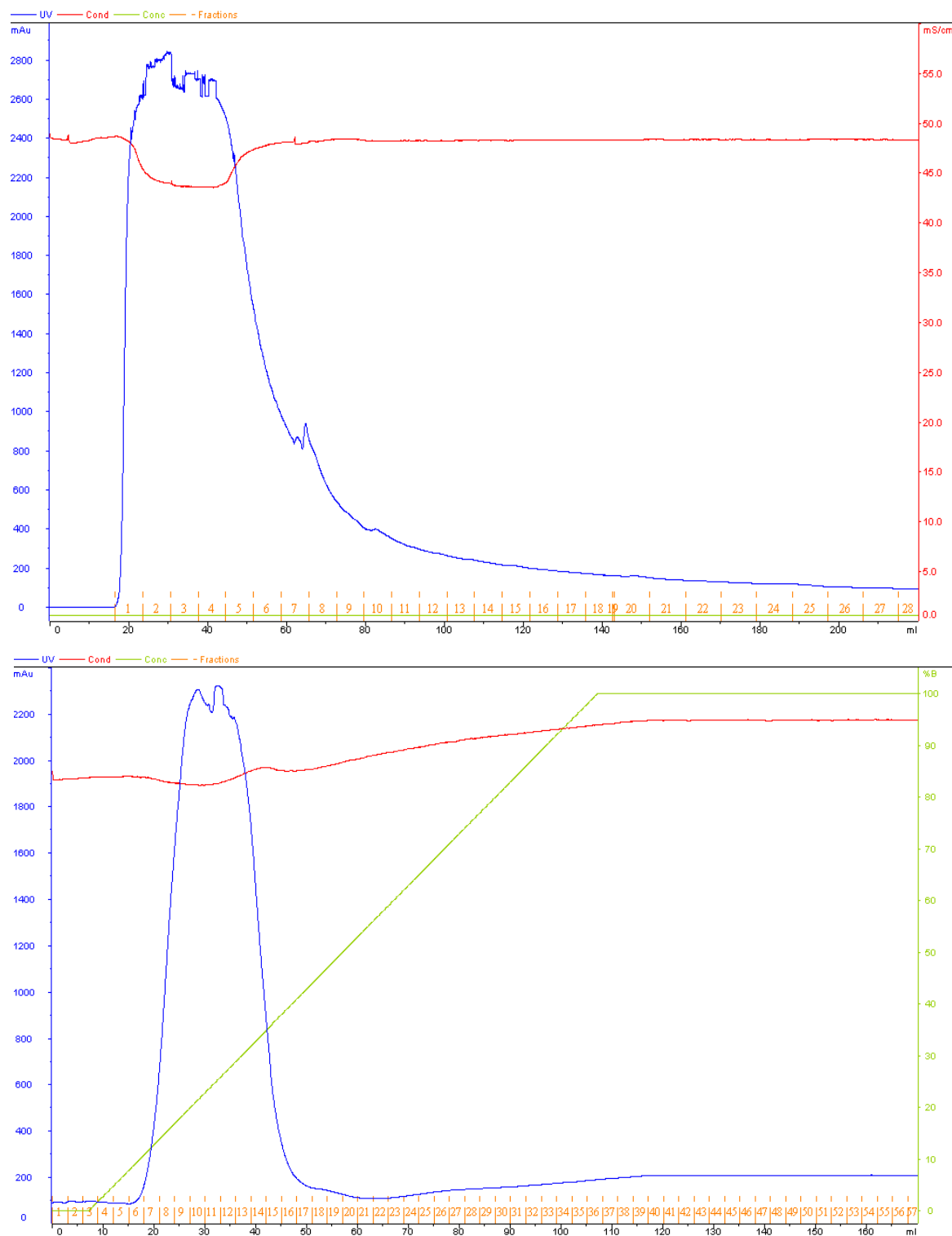


Abbildung 7.17: Chromatogramm der Aufreinigung von FdR 9 über IMAC. Oben: Beladung und Waschen; unten: Elution durch Imidazolgradient.



Abbildung 7.18: Chromatogramm der Aufreinigung von Fldx-s.-e. über IMAC.

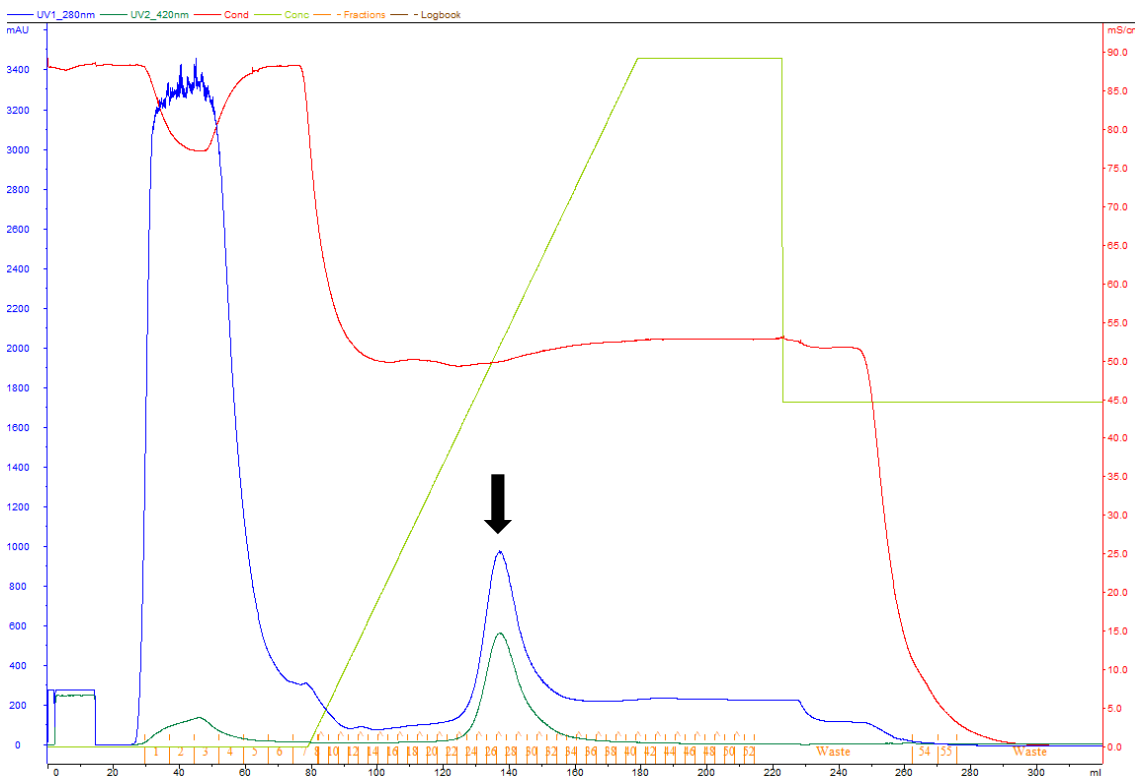


Abbildung 7.19: Chromatogramm der Aufreinigung von CYP102K1 über IMAC.

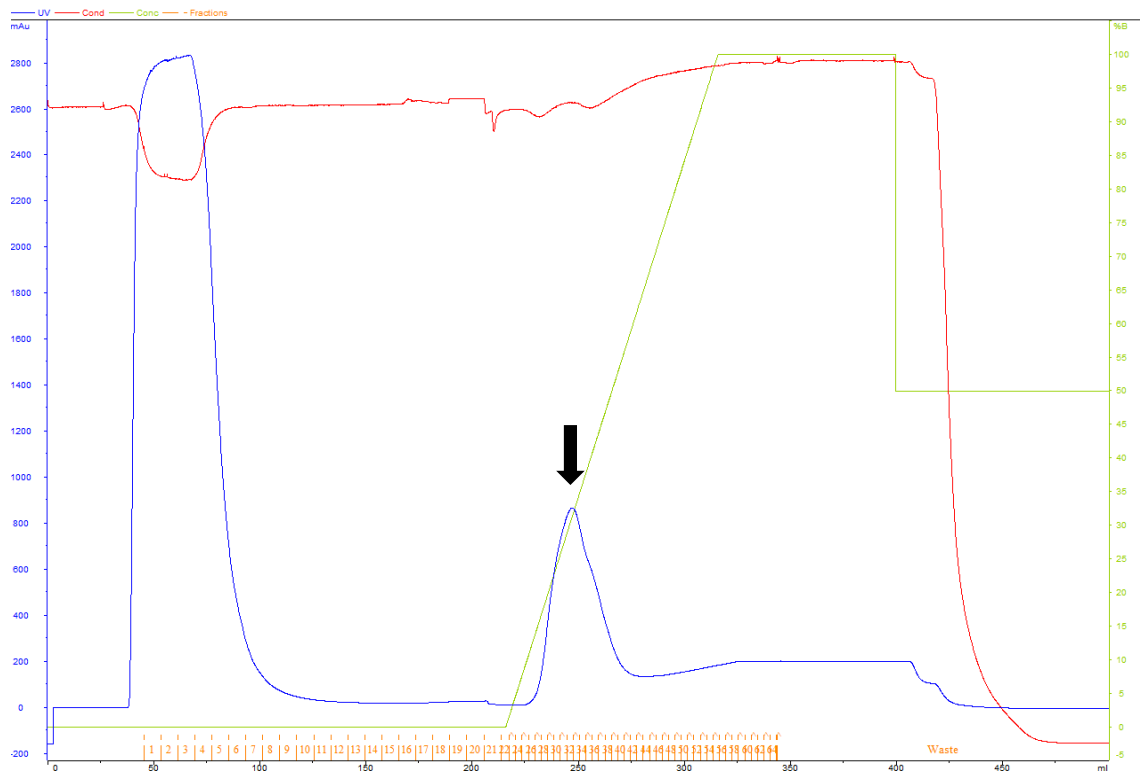
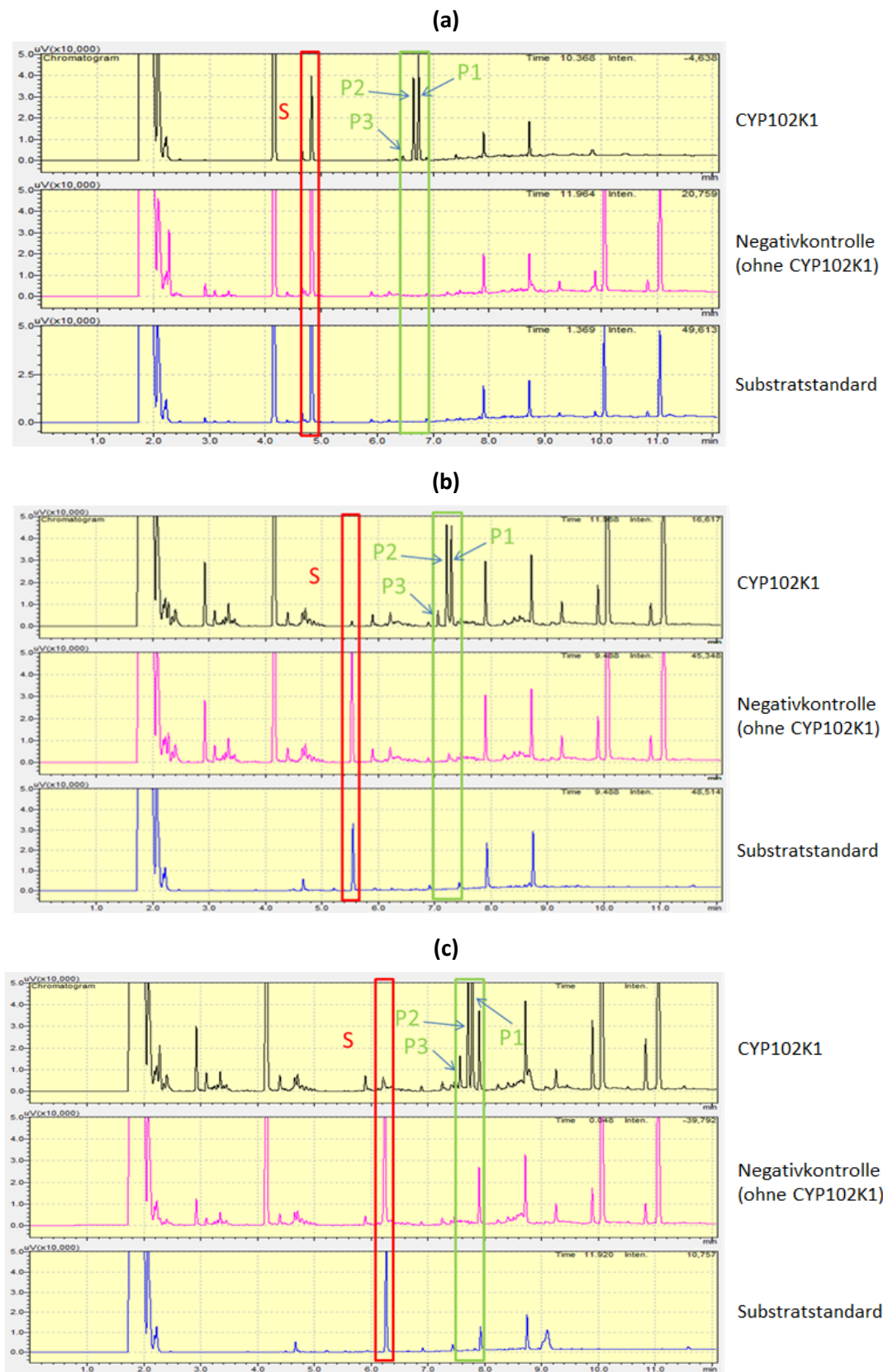


Abbildung 7.20: Chromatogramm der Aufreinigung von N'-short-CYP102K1 über IMAC.

7.8 Gaschromatogramme und Massenspektren



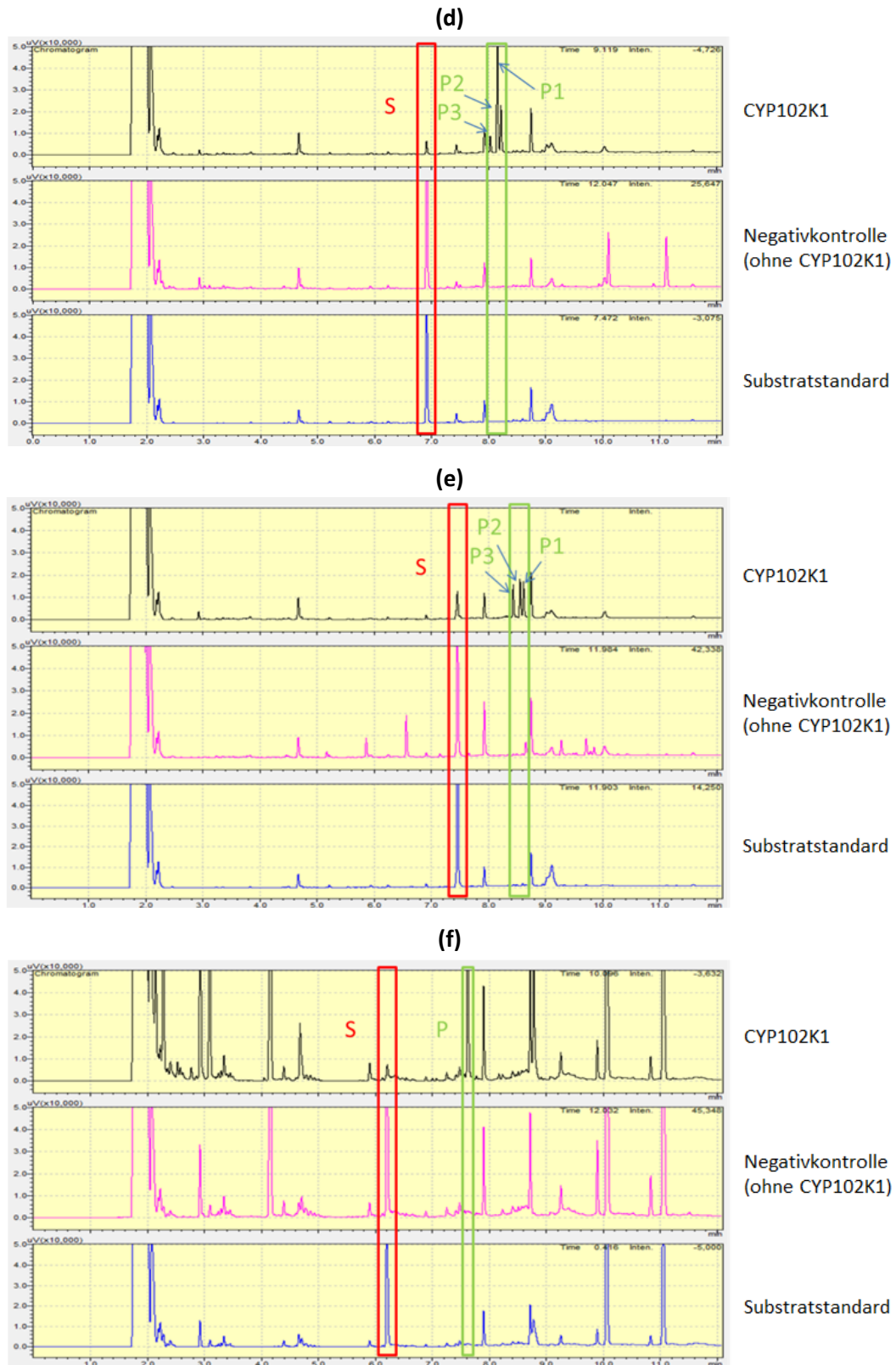


Abbildung 7.21: Gaschromatogramme der durch CYP102K1 umgesetzten Substrate. (a) Undecansäure; (b) Dodecansäure; (c) Tridecansäure; (d) Tetradecansäure; (e) Pentadecansäure; (f) 12-Tridecensäure. Der Substratpeak (S) ist rot-umrandet, die Produktpeaks (P) sind grün-umrandet.

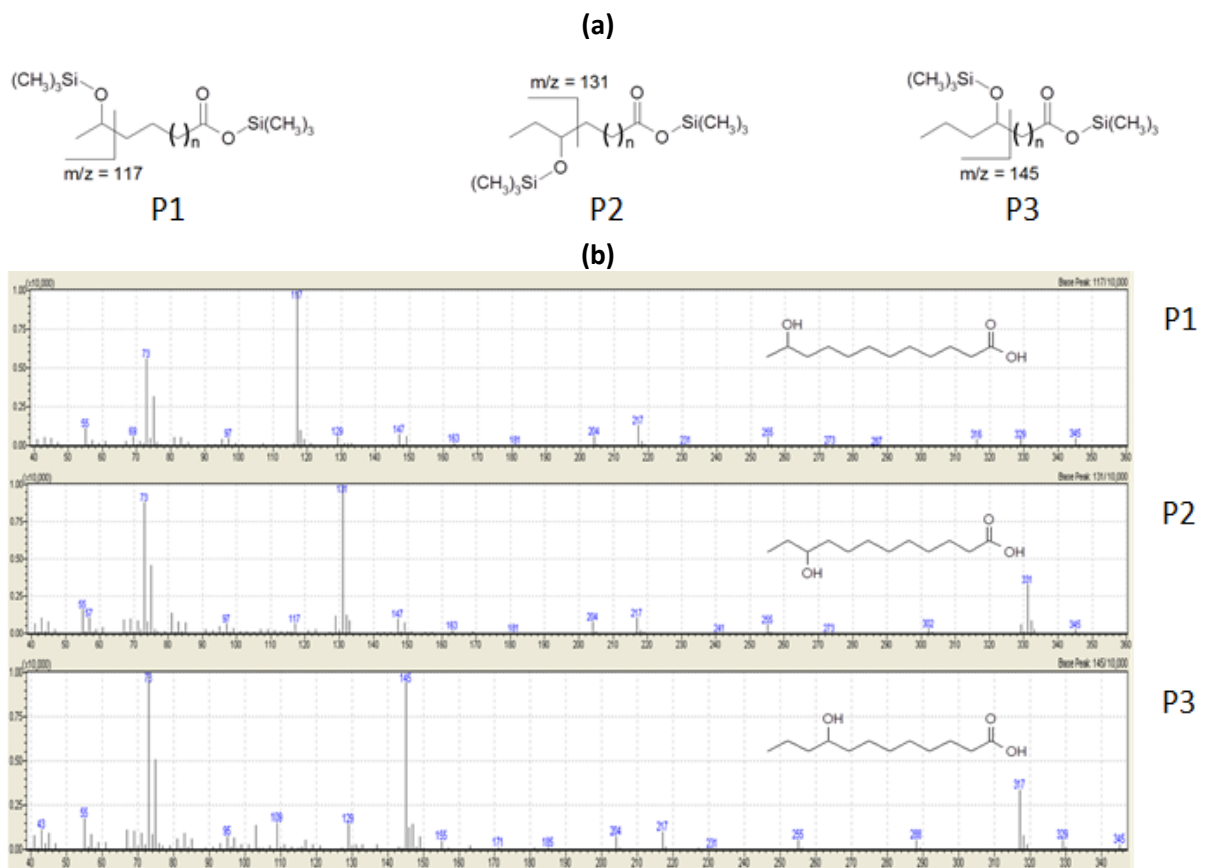
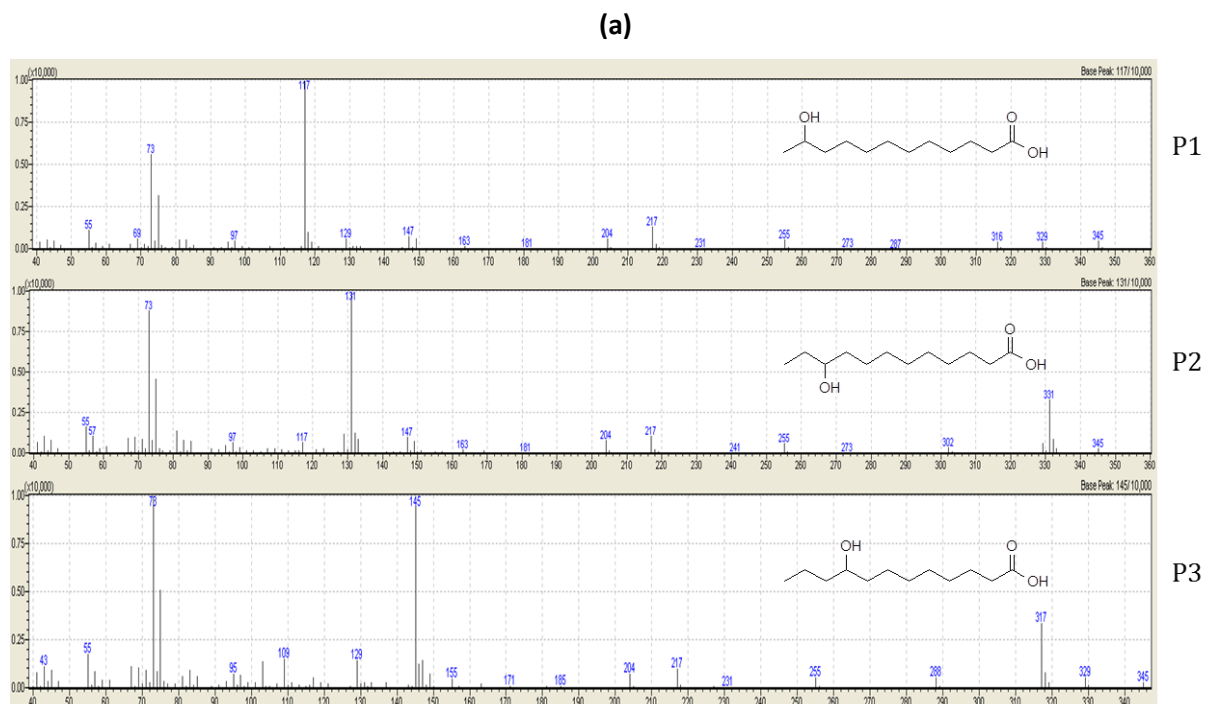
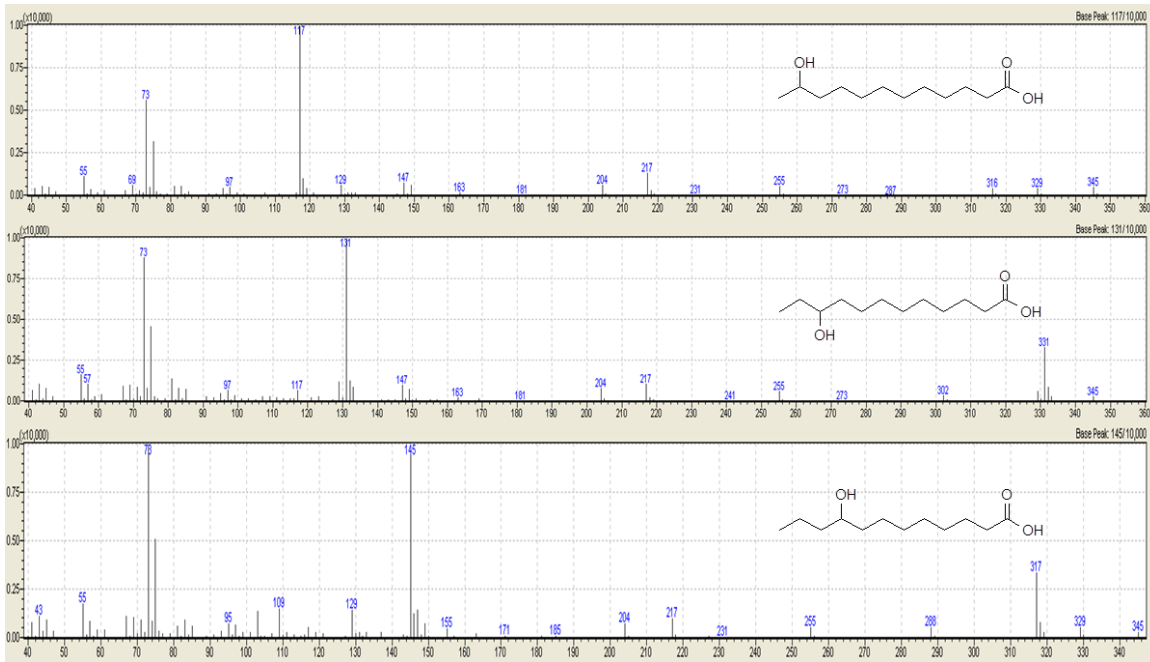


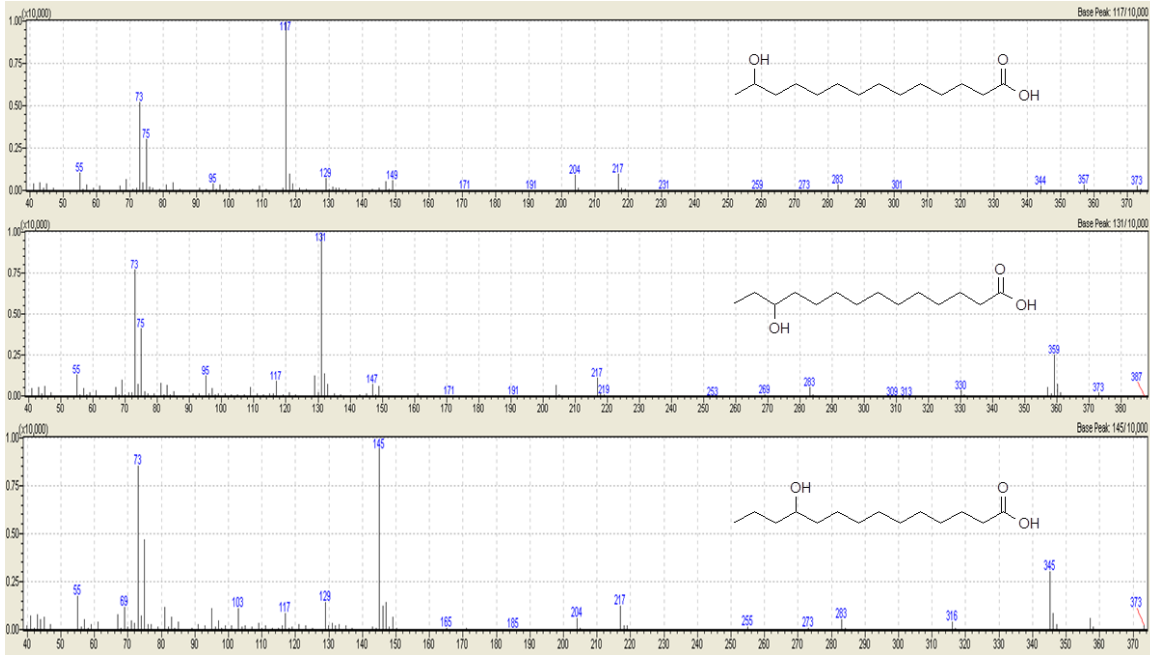
Abbildung 7.22: GC-MS-Analyse (in Düsseldorf) des in Abbildung 3.38 gezeigten Umsatzes von Tridecansäure durch CYP102K1. (a): Die derivatisierten Fettsäureprodukte weisen charakteristische Spaltmuster auf. (b): Massenspektren der derivatisierten Fettsäureprodukte und chemische Formeln der zugehörigen Hydroxyfettsäuren.



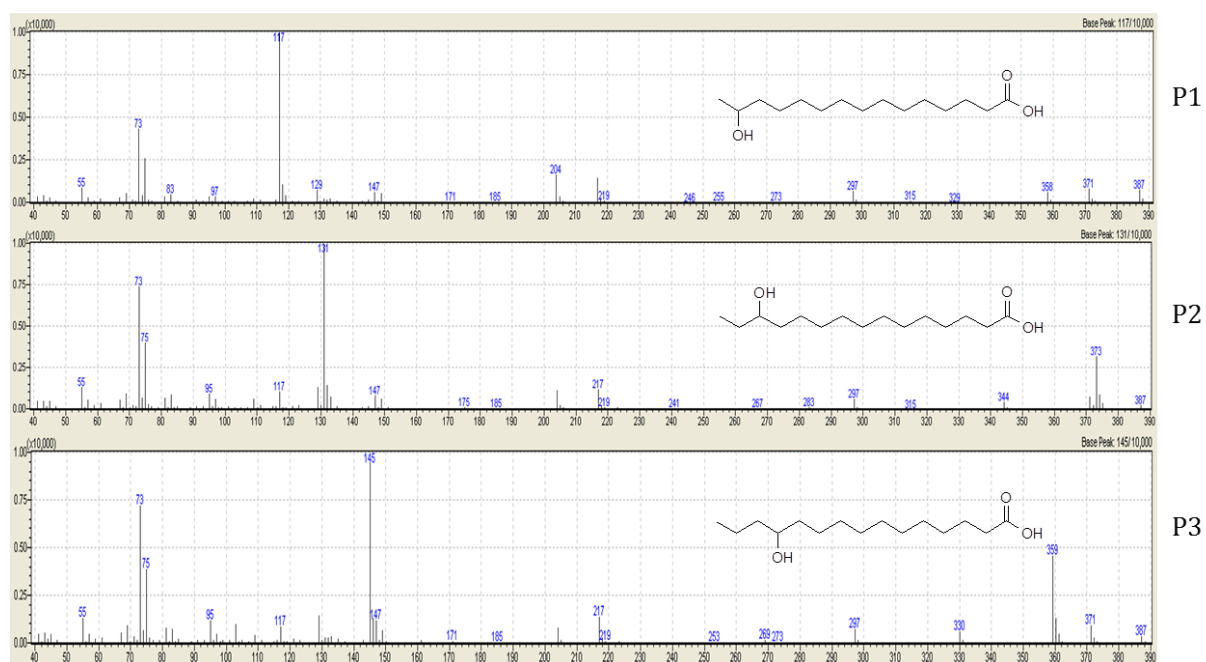
(b)



(c)



(d)



(e)

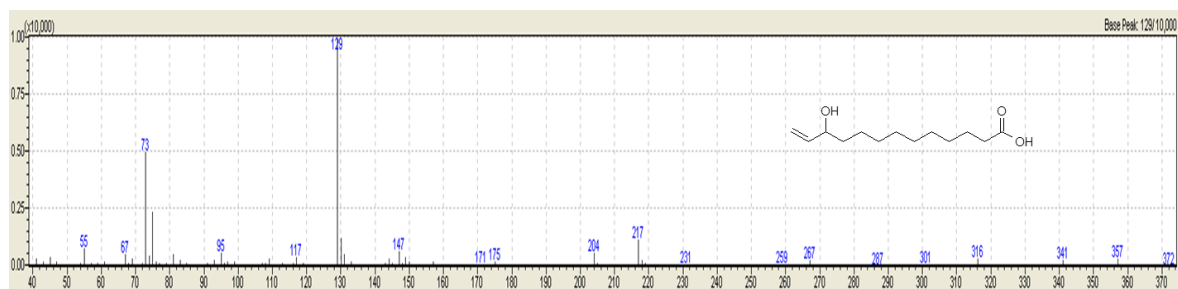


Abbildung 7.23: Massenspektren der Produktpeaks aus den GC-MS-Analysen der umgesetzten Substrate. (a) Undecansäure; (b) Dodecansäure; (c) Tetradecansäure; (d) Pentadecansäure; (e) 12-Tridecensäure. Alle Spektren basieren auf mit BSTFA derivatisierten Formen der in den Abbildungen dargestellten Strukturen.

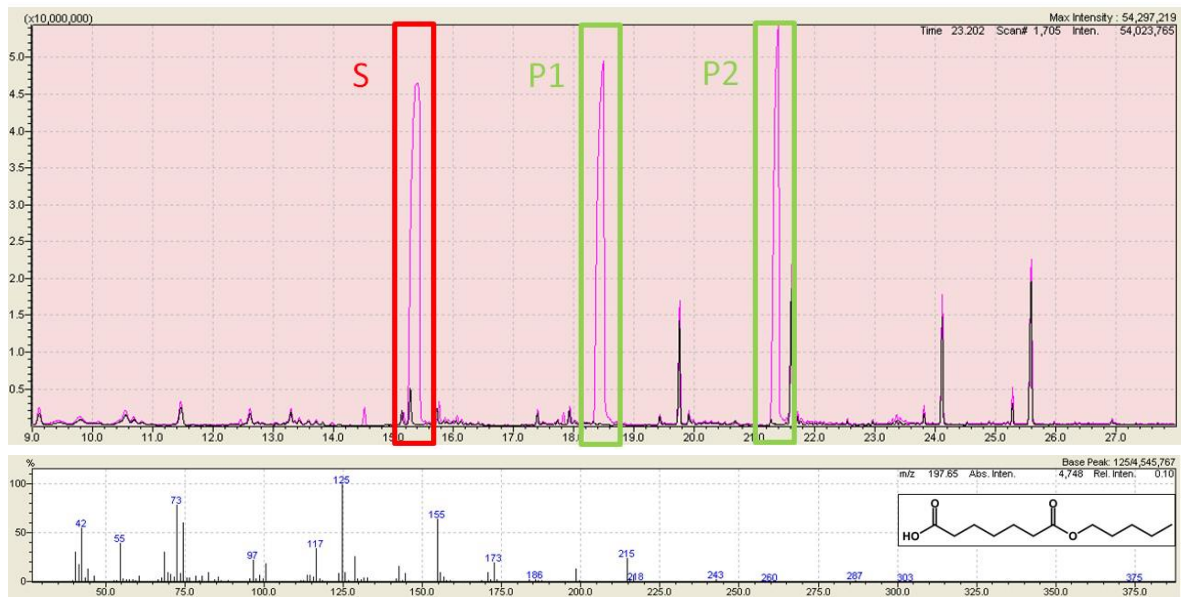


Abbildung 7.24: GC-MS-Analyse einer CalB-katalysierten Reaktion von Pimelinsäure mit Pentanol. Oben: Charakteristisches Chromatogramm der Analyse. Schwarz: Chloroform mit Derivatisierungsreagenz (BSTFA). Pink: Probe eines Reaktionsansatzes mit dem Substrat Pimelinsäure (S; rot-umrandet) sowie den Produkten Pimelinsäuremonopentylester (P1) und Pimelinsäuredipentylester (P2) (jeweils grün-umrandet). Es konnte kein Peak für Pentanol detektiert werden. Unten: Massenspektrum von zweifach derivatisiertem Pimelinsäuremonopentylester.

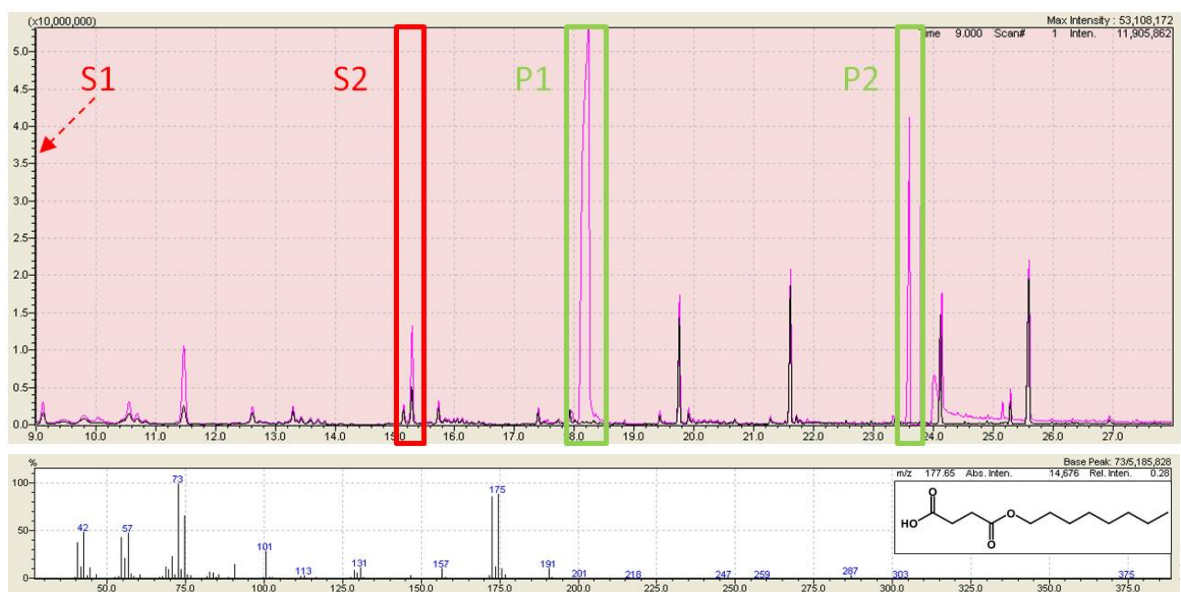


Abbildung 7.25: GC-MS-Analyse einer CalB-katalysierten Reaktion von Succinylsäure mit Octanol. Oben: Charakteristisches Chromatogramm der Analyse. Schwarz: Chloroform mit Derivatisierungsreagenz (BSTFA). Pink: Probe eines Reaktionsansatzes mit den Substraten Succinylsäure Octanol (S1) und Succinylsäure (S2; rot-umrandet) sowie den Produkten Succinylsäuremonooctylester (P1) und Succinylsäuredioctylester (P2) (jeweils grün-umrandet). Besonders stark ausgeprägte Octanol-Peaks konnten als halbe Peaks bei einer Retentionszeit von ca. 9 min detektiert werden. Unten: Massenspektrum von zweifach derivatisiertem Succinylsäuremonooctylester.

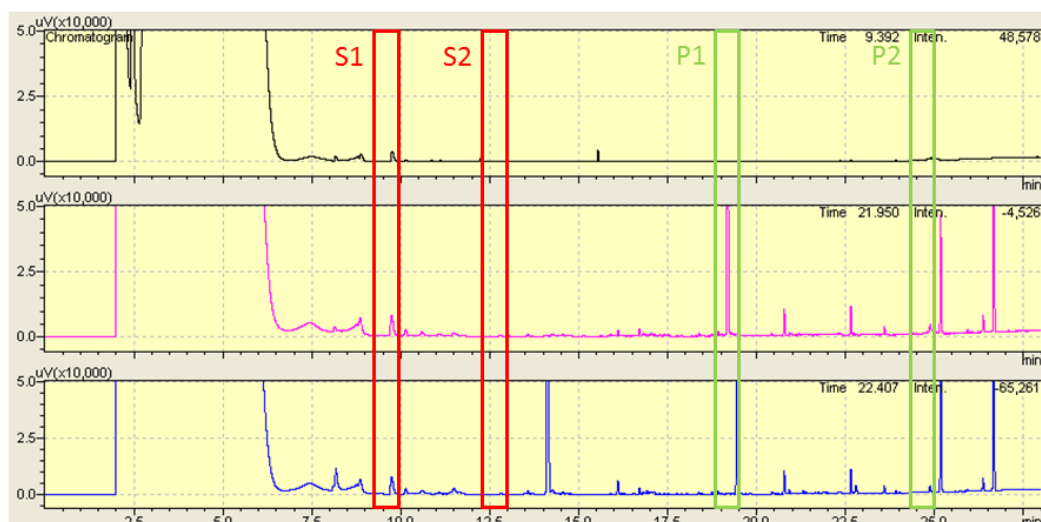


Abbildung 7.26: Gaschromatogramm zur Bestimmung der Reinheit des aufgereinigten Succinylsäuremonooctylesters (Mitte) im Vergleich zu einer Injektion von Chloroform mit Derivatisierungsreagenz (oben) und einer weiteren Probe, die aus einem anderen Versuch stammt, aber vor der Succinylsäuremonooctylesterprobe injiziert wurde und mit der gleichen Methode vermessen wurde (unten). Substrate: Octanol (S1) und Succinylsäure (S2) (jeweils rot-umrandet); Produkte: Succinylsäuremono- (P1) und Succinylsäuredioctylester (P2) (jeweils grün-umrandet).

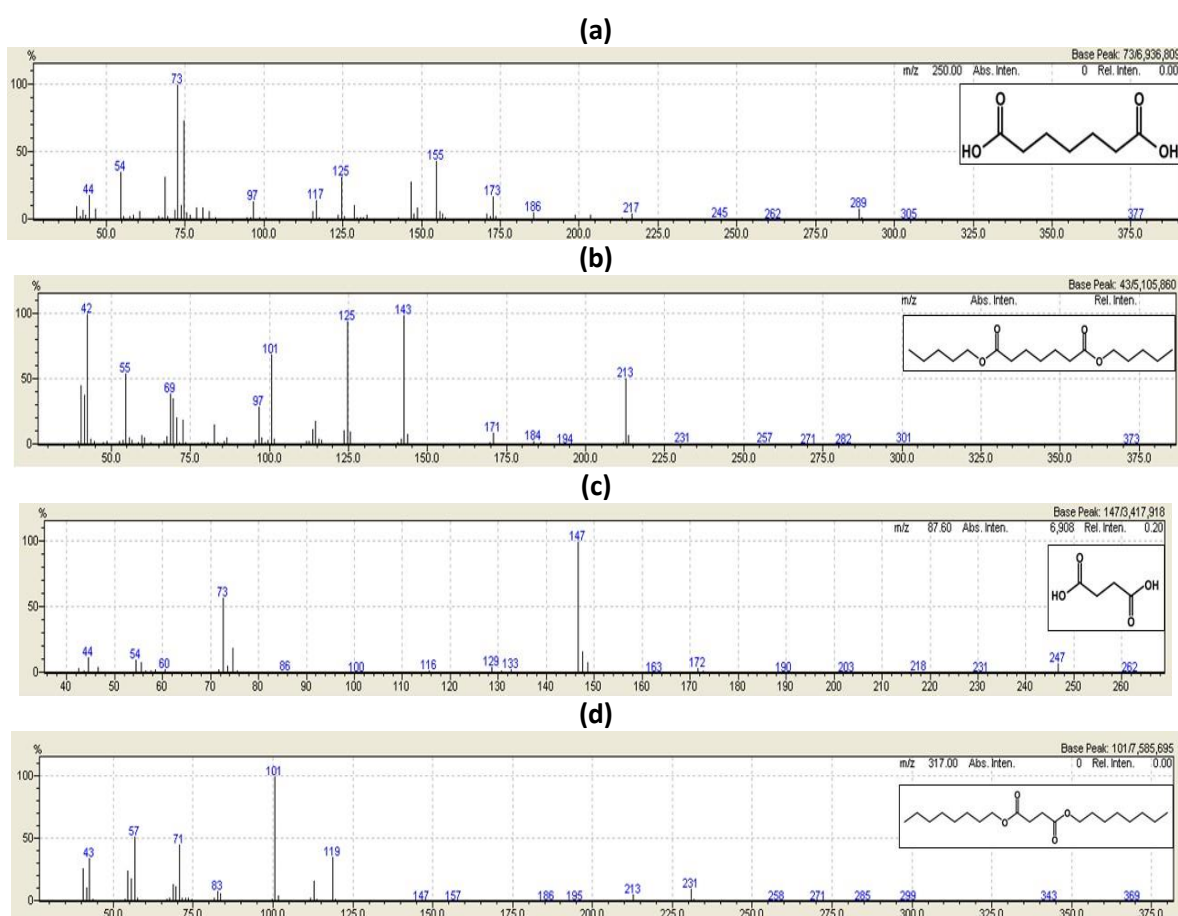


Abbildung 7.27: Massenspektren von mittels GC-MS analysierten und identifizierten Substanzen, die für die Lipase-katalysierte Synthese potentieller CYP102K1- bzw. N'-short-CYP102K1-Substrate relevant sind. (a) Pimelinsäure; (b) Pimelinsäuredipentylester; (c) Succinylsäure; (d) Succinylsäuredioctylester. Alle Spektren basieren auf mit BSTFA derivatisierten Formen der in den Abbildungen dargestellten Strukturen.