

Charakterisierung
ausgewählter Cytochrome P450
aus *Sorangium cellulosum* So ce56
Neue potentielle Biokatalysatoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Dipl. Chem. Michael Ringle

Saarbrücken

2013

Tag des Kolloquiums: 07.06.2013

Dekan: Prof. Dr. V. Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bernhardt

Prof. Dr. A. Speicher

Prof. Dr. V. B. Urlacher

Vorsitz: Prof. Dr. G. Jung

Akad. Mitarbeiter: Dr. K. Schneider

Emancipate yourselves from mental slavery;

None but ourselves can free our minds.

Redemption Song von Bob Marley 1979

*Im Gedenken an meine Oma Gisela Jung
und an alle,
die an mich geglaubt haben und glauben.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abkürzungen für Aminosäuren	VII
Abkürzungen für die Dna-Basen	VII
Summary	VIII
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Enzyme in der Biokatalyse	1
1.2 Cytochrome P450	5
1.2.1 Geschichte und Nomenklatur	5
1.2.2 Aufbau und Struktur	6
1.2.3 Katalyse: Reaktionen und Mechanismus	9
1.3 Cytochrome P450 als Biokatalysatoren und ihre Herausforderungen	13
1.3.1 NAD(P)H und Redoxpartner	15
1.3.2 Ganzzellkatalysatoren	18
1.4 Cytochrome P450 von <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	20
1.5 Steroidbiotransformationen und Steroidhydroxylasen	23
1.6 Aufgabenstellung	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Proteine	28
2.1.2 Oligonukleotide	29
2.1.3 Plasmide	30
2.1.4 Bakterienstämme	31
2.1.5 Kultivierung von Bakterien	32
2.1.6 Lagerung der Bakterien	34

2.2	Methoden	35
2.2.1	Bioinformatische Methoden	35
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.3	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung	39
2.2.4	UV/Vis-spektroskopische Methoden	42
2.2.5	Elektrophoretische Methoden	45
2.2.6	Cytochrom P450 abhängige Substratumsätze	46
2.2.7	Chromatographische Methoden	47
2.2.8	NMR-Spektroskopie	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Proteinherstellung und Reinigung	51
3.1.1	Cytochrome P450 von <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	51
3.1.2	Flavodoxinreduktase (Fpr) und Flavodoxin A (FldA) aus <i>E. coli</i>	54
3.2	Charakterisierung von CYP266A1	56
3.2.1	Redoxpartneridentifizierung	56
3.2.2	Identifizierung potentieller Substrate mittels Typ I-Spektren	57
3.3	Substratidentifizierung für CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1, CYP264A1 und Δ CYP260A1	60
3.3.1	Identifizierung neuer Substrate für CYP109D1	60
3.3.2	Substratidentifizierung für CYP264A1	62
3.3.3	Identifizierung neuer Substrate und Vergleich der Produktmuster für die Mitglieder der CYP260 Familie	64
3.4	Fpr als Redoxpartner für Adx ₄₋₁₀₈	68
3.4.1	Cytochrome c Assays	68
3.4.2	Elektronenübertragung auf CYP264A1	69
3.4.3	NADPH-Verbrauch und Entkopplung bei CYP264A1 abhängigem Substratumsatz	70
3.5	Aufbau des Ganzzellsystems in <i>E. coli</i> für die Cytochrome P450	72
3.5.1	Klonierungsstrategie	72
3.5.2	Etablierung des Ganzzellsystems mit CYP109D1	74
3.5.3	Austausch von AdR durch Fpr in der Adx unterstützten Redoxkette	77

3.5.4	Optimierung der CYP264A1 abhängigen Reaktionen durch verschiedene Medien	79
3.5.5	Einfluss von Indol auf den CYP264A1 abhängigen Ganzzellumsatz	83
3.5.6	Produktcharakterisierung des CYP264A1 abhängigen Ganzzellumsatzes von 4-Methyl-3Phenylcumarin	84
3.6	Charakterisierung der CYP260A1-abhängigen Umsätze	86
3.6.1	Produktcharakterisierung mittels LC-MS	86
3.6.2	Charakterisierung der Hauptprodukte	103
3.6.3	Modellierung von CYP260A1 zur Charakterisierung der Substratbindetasche	114
3.7	Optimierung des CYP260A1-abhängigen Umsatzes von Testosteron	121
3.7.1	Vergleich von AdR und Fpr als Reduktase im CYP260A1-abhängigen Monooxygenasesystem	121
3.7.2	Klonierung der Vektoren für das neue CYP260A1 Ganzzellsystem	122
3.7.3	Charakterisierung des neuen 2 Vektorsystems für CYP260A1	125
4	Diskussion	129
4.1	Charakterisierung von CYP266A1	130
4.1.1	Bestimmung der Redoxpartner	130
4.1.2	Substratidentifikation	131
4.2	Substratidentifikation von CYP109D1, CYP264A1 und der CYP260A1 Familie	133
4.2.1	CYP109D1	133
4.2.2	CYP264A1	134
4.2.3	CYP260 Familie	134
4.2.4	Verkürzung von CYP260A1 zu Δ CYP260A1	136
4.3	Entwicklung eines P450 abhängigen Ganzzellkatalysators in <i>Escherichia coli</i>	138
4.3.1	Einfluss des Mediums	139
4.3.2	<i>E. coli</i> Reduktase als Alternative zur Adrenodoxinreduktase	141
4.3.3	Bedeutung der etablierten Systeme für die Anwendung	144
4.4	CYP260A1 als Steroidhydroxylase	147
4.4.1	Einfluss von funktionellen Gruppen auf Aktivität und Selektivität	147
4.4.2	Bindung der Steroide und resultierende Hydroxylierungsposition	153

	4.4.3 Bedeutung der von CYP260A1 katalysierten Hydroxylierungen	155
5	Literaturverzeichnis	160
6	Anhang	173
6.1	Allgemeine Substanzbibliothek	173
6.2	Substanzbibliothek von Gif-sur-Yvette	180
6.3	Sequenzen und Alignments	183
	6.3.1 Aminosäuresequenzen	183
	6.3.2 Gensequenz	184
	6.3.3 Aligment für CYP260 Familie	185
6.4	Veröffentlichungen und Präsentationen	187

Abkürzungsverzeichnis

AdR	Adrenodoxinreduktase
Adx	Adrenodoxin
Adx ₄₋₁₀₈	C-terminal verkürzte Form von Adrenodoxin
Ap	Ampicillin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	Casamino acids (Aminosäuremischung)
Cm	Chloramphenicol
CYP	Cytochrom P450
δ	Chemische Verschiebung
δ -Ala	δ -Aminolävulinsäure
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
FdR	Ferredoxinreduktase
Fld	Flavodoxin
Fpr	Ferredoxin-/Flavodoxinreduktase aus <i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
h	Stunde
His-tag	N- oder C-terminale Proteinmarkierung bestehend aus 6 Histidinresten
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high Performance liquid Chromatography)
Hz	Hertz
IEX	Ionenaustauschchromatographie (ion exchange chromatography)
IMAC	immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KPP	Kaliumhydrogenphosphatpuffer
l	Liter
LC	Flüssigchromatographie (liquid Chromatography)
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
M	Molar; mol pro Liter
Mbp	Megabasenpaare; 1000 Basenpaare
MCS	Multiple Cloning Site

MeCN	Acetonitril
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NB	Nutrient Broth I (Nährmedium)
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
P450	Cytochrom P450
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PdR	Putidaredoxinreduktase
Pdx	Putidaredoxin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCR	strukturell konservierte Region (structurally conserved region)
SDS	Sodiumdodecylphosphat
SEC	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography)
Sm	Streptomycin
SRS	Substraterkennungsstelle (substrate recognition site)
Sub	Substrat
T	Temperatur
TB	Terrific Broth (Nährmedium)
T _m	Schmelztemperatur
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UF	Ultrafiltration
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
V _{max}	maximal Geschwindigkeit

Als Präfixe für Einheiten wurden die SI-Präfixe nach DIN 1301 verwendet

Abkürzungen für Aminosäuren

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

Abkürzungen für die Dna-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Summary

In the last years, Cytochromes P450 have become more and more popular as biocatalysts due to their ability to introduce molecular oxygen into non-activated C-H bonds. This work is concerned with the characterization of the P450s CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1, CYP264A1 and CYP266A1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. For this purpose, the P450s were recombinantly expressed in *E. coli* and the purified enzymes were used to identify potential substrates. In order to obtain sufficient quantities of product for structural characterization, a universally applicable *E. coli* whole-cell system was established, in which the respective P450 was co-expressed with a heterologous redox system consisting of adrenodoxin reductase and adrenodoxin. This system could be significantly enhanced by the exchange of the badly expressible AdR by the *E. coli* own reductase (Fpr). With the first-time application of M9CA medium the endogenous indole synthesis and its inhibitory effect on the P450 biotransformations could be suppressed. Using this whole-cell system; the products of the CYP260A1 dependent biotransformations from 9 steroids could be isolated and characterized. Interestingly, CYP260A1 was shown to act as a 1α -steroidhydroxylase. Thus, CYP260A1 is a promising candidate for biotransformations aiming at the production of hitherto unknown steroid derivatives.

Zusammenfassung

Cytochrome P450 erfreuen sich in den letzten Jahren immer größerer Beliebtheit als Biokatalysatoren, da sie den Einbau von atomarem Sauerstoff in nicht aktivierte C-H-Bindungen katalysieren. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Charakterisierung der P450 CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1, CYP264A1 und CYP266A1 aus *S. cellulosum* So ce56. Hierfür wurden die P450 in *E. coli* rekombinant exprimiert und mögliche Substrate wurden mit den gereinigten Enzymen identifiziert. Um für die anschließende Produktcharakterisierung ausreichende Produktmengen herzustellen, wurde ein universell einsetzbares *E. coli* Ganzzellsystem etabliert, bei dem das jeweilige P450 mit einem heterologen Redoxsystem, bestehend aus Adrenodoxinreduktase (AdR) und Adrenodoxin (Adx), coexprimiert wurde. Dieses System konnte durch den Austausch der schwer exprimierbaren AdR durch die *E. coli* eigene Reduktase (Fpr) entscheidend optimiert werden. Gleichzeitig wurde durch den erstmaligen Einsatz des M9CA-Mediums die endogene Bildung von Indol und die daraus resultierende Inhibition der P450 Biotransformationen verhindert. Mit dem CYP260A1-abhängigen Ganzzellsystem wurden 9 Steroide erfolgreich umgesetzt und die Produkte anschließend isoliert und charakterisiert. Interessanterweise stellte sich heraus, dass es sich bei CYP260A1 um die erste beschriebene 1α -Steroidhydroxylase handelt, mit der es möglich ist, bislang noch nicht bekannte Steroidderivate herzustellen.

1 Einleitung

1.1 Enzyme in der Biokatalyse

Von Biokatalyse spricht man, wenn man Enzyme und Mikroben in der synthetischen Chemie anwendet und Enzyme für Zwecke gebraucht, für die sie sich eigentlich nicht entwickelt haben (Bornscheuer *et al.* 2012). Als Pionierarbeit der Biokatalyse sind wohl die Versuche von Louis Pasteur um 1857 zur Gärung von Lactat, Alkoholen und der späteren Entdeckung der Racematspaltung von Weinsäure durch die Fermentation mit dem Schimmelpilz *Penicillium glaucum* zu nennen (Gal 2008, Wohlgemuth 2010). Neben der Erforschung der Gärprozesse kam es dann Anfang des 19. Jahrhunderts zu einem größeren Interesse von Wissenschaftlern, chemische Transformationen mit Hilfe von lebenden Zellen (Biotransformationen) durchzuführen, wie die Herstellung von chiralen Cyanhydrinen aus Benzaldehyd und Blausäure (Rosenthaler 1908) oder diverser mikrobieller Umsetzungen von Steroiden insbesondere zur Herstellung der entzündungshemmenden Glucocorticoide (Sedlacek & Smith 1988). Nichtsdestotrotz erfreute sich die Anwendung von Enzymen in der Herstellung von organischen Molekülen bis 1970 keiner großen Beliebtheit (Roberts *et al.* 2007). Die mit der Gentechnik einhergehende Möglichkeit, die Enzyme rekombinant in Expressionssystemen wie *Escherichia coli* herzustellen (Tao & Xu 2009) und auch durch erstes strukturbasiertes Proteindesign die enzymatischen Anwendungen zu verbessern bzw. zu erweitern, führte in den 1980er und 1990er Jahren zu einem gesteigerten Interesse der pharmazeutischen und chemischen Industrie an Biokatalysen, speziell zur Herstellung chiraler Moleküle (Bornscheuer *et al.* 2012). Hinzu kam die Erkenntnis, dass Enzyme neben ihren natürlichen Substraten auch ein breites Spektrum anderer Verbindungen akzeptieren (Koeller & Wong 2001). Die kürzlich von Bornscheuer deklarierte dritte und momentan noch andauernde Phase der Biokatalysatoren ist zeitlich nicht direkt von der zweiten Phase zu trennen und startete mit den Arbeiten zur „gerichteten Evolution“ (engl.: Directed evolution) (Chen & Arnold 1993, Stemmer 1994), das heißt der Evolution der Enzyme durch molekularbiologische Methoden im Reagenzglas. Der dahinter stehende Gedanke ist, dass sich Enzyme bzw. ganze Organismen gemäß der Evolutionstheorie Darwins über Jahrmillionen an ihre natürlichen Aufgaben optimal angepasst haben, jedoch oftmals nicht für industrielle Anwendungen verwendbar sind. Die „gerichtete Evolution“ machte bzw. macht es nun möglich, in kürzester Zeit eine Vielzahl von verschiedenen

Biokatalysatoren herzustellen und sie individuell an eine gewünschte industrielle Anwendung anzupassen (Arnold 2001).

Die Nachfrage nach Enzymen und somit biokatalytischen Prozessen ist bis heute ungebrochen und erfreut sich eines stetigen Wachstums. Der Anfang dieser Entwicklung beginnt mit der wachsenden Nachfrage nach umweltfreundlicheren und ökonomischen Prozessen auch im Hinblick auf den Einsatz erneuerbarer Quellen für Energie und chemische Ausgangsmaterialien und dem damit zusammenhängenden Umdenken der Gesellschaft. Dieses Denken beeinflusste auch die Chemie am Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts, als der Begriff der Atomökonomie für chemische Synthesen aufkam. Dabei sollten Synthesen entwickelt werden, die fast alle an der Reaktion beteiligten Atome in das Endprodukt einbinden (Trost 1991). Später wurde dieser Begriff in der Pharmazie mit den Leitbildern der sogenannten „Grünen Chemie“ verknüpft. Diese beinhaltet 12 Anforderungen an neue Verfahren: Verhinderung von Abfall, Atomökonomie, weniger giftige Synthesen, sicherere Produkte, sicherere Lösungsmittel, höhere Energieeffizienz, erneuerbare Rohstoffe, Verhinderung von Derivatisierungsschritten, katalytische Reagenzien, Abbaubarkeit der Produkte, direkte Analysen zur Schadstoffreduktion und sicherere Verfahren zur Verhinderung von Unfällen (Anastas & Eghbali 2010). Biokatalysen erfüllen eine Vielzahl dieser Anforderungen dadurch, dass sie unter milden Reaktionsbedingungen (physiologischer pH, geringe Temperatur, Wasser als Reaktionsmedium) ablaufen, umweltfreundliche Katalysatoren aus erneuerbaren Rohstoffen (Enzyme oder Zellen) sind und ihre Reaktionen chemo-, regio- und stereoselektiv katalysieren. Zusätzlich benötigen Biokatalysatoren keine Aktivierung funktioneller Gruppen und vermeiden außerdem die in traditionellen organischen Synthesen oftmals unerlässlichen Schützungs- und Entschützungs-schritte. Diese Eigenschaften führen zu kürzeren Prozessen, die weniger Abfall produzieren, und somit ökologischer und ökonomischer sind (Muñoz Solano *et al.* 2012). Um in Zukunft wirklich das gesamte Potential der Biokatalyse bei der Entwicklung von grünen Prozessen auszuschöpfen, ist es wichtig, diese strategisch in die Synthese, schon auf der Ebene der Retrosynthese, zu integrieren (Tao & Xu 2009).

2007 waren mehr als 3000 verschiedene Enzyme bekannt, von denen ca. hundert kommerziell erhältlich sind (Hudlicky & Reed 2009). Diese werden in 6 Enzymklassen anhand ihrer katalysierten Reaktionen eingeteilt (siehe Tab. 1.1). Von allen Klassen sind bislang Anwendungen als Biokatalysatoren beschrieben, dabei stehen bzw. standen vor allem die Hydrolasen im Interesse der Forschung. Etwa zwei Drittel der gesamten Forschung und Anwendung im Bereich der Biotransformationen beschäftigen sich mit dieser großen Enzymklasse (Faber &

Kroutil 2005) (siehe Abb. 1.1). Hydrolasen katalysieren die Bildung bzw. Spaltung von Estern und Amiden und ihr Vorteil gegenüber anderen Enzymen besteht in ihrer hohen Aktivität sowohl in Wasser als auch in nicht wässrigem Milieu. Außerdem sind sie sehr leicht zu verwenden, da sie keine Cofaktoren für ihre katalytische Aktivität benötigen und sich durch geringe Substratspezifität bei hoher Selektivität auszeichnen (Muñoz Solano *et al.* 2012).

Tab. 1.1: Enzymklassen und ihre katalysierten Reaktionen.

Enzyme	Reaktionen
Hydrolasen	Hydrolyse von Estern, Peptiden, Glyceriden
Transferasen	Transfer von Acyl-, Phosphoryl-, Glycosyl- oder Aminogruppen
Lyasen	Spaltung verschiedener Bindungen
Isomerasen	Isomerisierung von Olefinen, Racemisierungen
Ligasen	Bildung von C-C, C-O, C-N, C-S und Phosphorylbindungen
Oxidoreduktasen	Oxidation oder Reduktionsreaktionen

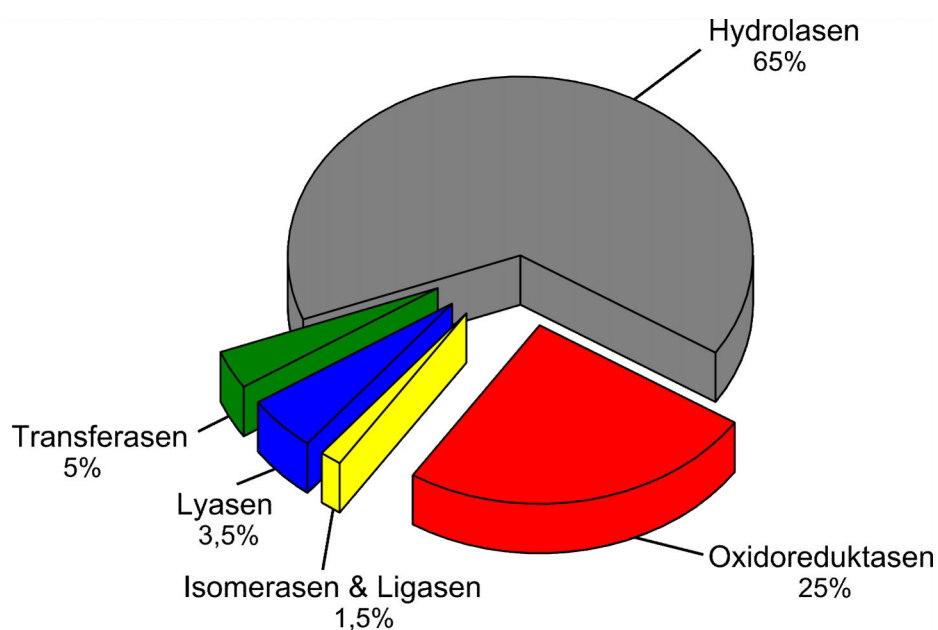


Abb. 1.1: Prozentuale Verteilung der Enzymklassen nach ihrer industriellen Anwendung (Faber 2011) basierend auf veröffentlichten Daten (Fernández-Arrojo *et al.* 2010).

Das verbleibende Drittel der Forschungsaktivitäten bzw. Anwendungen beschäftigt sich mit den 5 anderen Enzymklassen den Transferasen, Isomerasen, Lyasen, Ligasen und Oxidoreduktasen. Diese benötigen oftmals Cofaktoren für ihre Reaktionen, was ihren Einsatz als Bio-

katalysatoren stark beschränkt, da ein Recycling der Cofaktoren oftmals zu aufwendig oder die Prozesse nicht rentabel sind. Ligasen und Isomerasen spielen als Biokatalysatoren nur eine geringe Rolle und werden nur in speziellen Fällen angewendet (Wohlgemuth 2010). Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung der Xyloseisomerase zur Umwandlung von Glucose zu der süßeren Fructose, welche eine der größten enzym-katalysierten Prozesse darstellt (Marschall *et al.* 1957, Roberts *et al.* 2007) Transferasen werden vor allem genutzt, um Zuckermoleküle auf Zuckerpolymere oder Peptide zu übertragen und diese somit biologisch aktiv zu machen. Lyasen werden zur Addition von Blausäure an Carbonylgruppen und zur Addition von Wasser und Ammoniak an Doppelbindungen zur Bildung chiraler Synthesestufen mit 100% Atomökonomie genutzt (Faber 2011). Die zweitgrößte Anwendung erfährt die Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Diese spaltet sich in 3 Gruppen: die Dehydrogenasen, Monooxygenasen und Oxidasen. Während die Dehydrogenasen jetzt schon sehr gut als Biokatalysatoren einsetzbar sind, steigt die Bedeutung der Gruppe der Monooxygenasen als Biokatalysatoren für Baeyer-Villiger-Oxidationen oder für selektive Oxidationen von inaktiven C-H-Bindungen in der Forschung und Industrie stetig. Eine sehr interessante Enzymfamilie aus der Gruppe der Monooxygenasen sind die Cytochrome P450, die im Fokus der hier behandelten Doktorarbeit stehen und daher in den folgenden Kapiteln näher in Augenschein genommen werden.

1.2 Cytochrome P450

1.2.1 Geschichte und Nomenklatur

Der Name P450 in Zusammenhang mit Cytochromen erscheint erstmals in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts in der Literatur, wobei die Isolierung dieser Enzyme aus Tierleber bereits 1958 gelang. Damals isolierten Klingenberg und Garfinkel unabhängig voneinander ein CO-bindendes Pigment aus Lebermikrosomen von Ratten (Klingenberg 1958) bzw. Schweinen (Garfinkel 1958). Die Besonderheit dabei war die Absorption des Pigments bei 450 nm unter Benutzung von Reduktionsmitteln, wie Dithionit. Beide Forscher vermuteten, dass das Pigment ein Metall bzw. eine Hämgruppe beinhalten musste, wobei sich die Absorptionsbande im reduzierten CO-Spektrum von 450 nm von den bis dahin bekannten Hämproteinen unterschied, welche ein Absorptionsmaximum bei 420 nm zeigten. Diese Theorie wurde durch weitere Experimente von Omura und Sato bestätigt und in einer „short communication“ 1962 veröffentlicht. Sie konnten beweisen, dass es sich bei dem Pigment 450 (P450) wirklich um ein neues Hämprotein (Cytochrom) in der Leber handelt (Omura & Sato 1962). Diese Entdeckung sorgte aber erst 1964 für Aufsehen als Omura und Sato ihre detaillierten Untersuchungen an den Cytochromen P450 veröffentlichten (Omura & Sato 1964a, Omura & Sato 1964b). Die Funktion der CYPs als Monooxygenasen konnte ebenfalls im gleichen Jahrzehnt aufgeklärt werden. Hierzu trugen hauptsächlich die Arbeiten von Estabrook und seinen Mitarbeitern bei, die Schritt für Schritt die membranständigen P450 und ihre zugehörigen Redoxpartner aus mikrosomalen Fraktionen der Leber aber auch aus mitochondrialen Fraktionen der Nebennieren isolierten (Estabrook 2003, Estabrook *et al.* 1963). Das erste lösliche, bakterielle P450, wurde von Gunsalus und Mitarbeitern gefunden. Es handelte sich um das Kampfer metabolisierende P450cam aus dem Bakterium *Pseudomonas putida* (Gunsalus & Sligar 1976, Tyson *et al.* 1972). Das Interesse an diesem „Pigment 450“, welches eine große bzw. die größte Enzymfamilie (Gensuperfamilie) bildet, das in allen Organismen, Tiere, Pflanzen, Bakterien und sogar in Archaeen zu finden ist, steigerte sich zusehends. Diese Biodiversität führte zu einer einheitlichen Nomenklatur der P450s, die im Gegensatz zu anderen Enzymen nicht auf ihren Eigenschaften sondern auf Homologien in der Gensequenz beruht (Nebert *et al.* 1987). Der Name setzt sich aus dem Kürzel CYP, für Cytochrom P450, einer Zahl, die die Enzymfamilie angibt, einem Buchstaben, der die Subfamilie und einer weiteren Zahl für das individuelle Enzym zusammen. Die Mitglieder einer CYP-

Familie haben dabei untereinander eine von mindestens 40% und die der Subfamilien von mehr als 55%. Aufgrund des Zeitpunktes dieser Festlegung und dem dabei verwendeten Algorithmus zur Berechnung der Homologie, erscheint diese Einteilung heute durch die extreme Entwicklung von neuen Algorithmen in der Bioinformatik, wie ClustalW (Larkin *et al.* 2007), und der steigenden Anzahl von veröffentlichten Genomen oftmals veraltet. Nichtsdestotrotz wurden die Arbeiten von damals weitergeführt (Nebert *et al.* 1991, Nelson *et al.* 1993, Nelson *et al.* 1996) und mündeten in der Zusammenstellung aller benannter Cytochrome P450 in der im Internet frei verfügbaren P450-Datenbank (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) von Nelson (Nelson 2009). Diese umfasste Ende 2010 12.456 verschiedene Enzyme aus allen biologischen Reichen (Nelson 2011). Die Anzahl der P450s im Genom des einzelnen Organismus schwankt dabei beträchtlich. Das menschliche Genom besitzt 57, das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* 20, die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* 272 und die Nutzpflanze Reis sogar 457 individuelle P450 Gene (Ortiz de Montellano 2010), dahingegen besitzt die Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae* nur 3 Gene und das Darmbakterium *Escherichia coli* sogar gar keine P450s. Daraus kann man erkennen, dass die Cytochrome P450 keine Notwendigkeit für einen lebenden Organismus darstellen, aber einen evolutionären Vorteil bilden, da sie in allen komplexeren Organismen vorkommen.

1.2.2 Aufbau und Struktur

Trotz ihrer Biodiversität und ihrer geringen Sequenzidentitäten von oft weniger als 20% zwischen einzelnen Familien (Graham & Peterson 1999) haben alle Cytochrome P450 Gemeinsamkeiten in ihrer Proteinsequenz und sogar in ihrer Tertiärstruktur. Wie schon erwähnt und es der Name auch besagt, handelt es sich bei allen Cytochromen P450 um Hämproteine. Im Gegensatz zu anderen Hämproteinen bindet das Eisen neben dem Protoporphyrin IX Ring als fünften Liganden aber nicht Histidin sondern ein Thiolatanion eines Cysteinrestes (Sono *et al.* 1996). Dies führt zu der schon beschriebenen für P450 charakteristischen Absorption bei 450 nm im reduzierten Eisen-CO-Komplex (siehe Abb. 1.2).

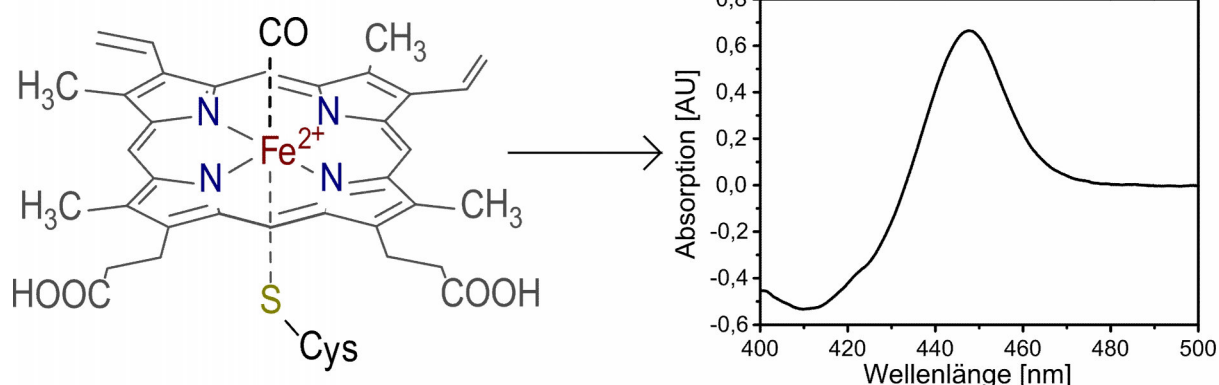


Abb. 1.2: P450-Hämring im reduzierten Eisen-CO-Komplex mit dem typischen axialen Thiolatliganden und dem daraus resultierenden UV/Vis-Spektrum mit dem Absorptionsmaximum bei 450 nm.

Das Cystein ist einer der drei total konservierten Aminosäurereste in der Aminosäuresequenz von P450s und ist Bestandteil des Hämbindemotivs $FxxGx(H/R)x\underline{C}xG$. (Denisov *et al.* 2005). Zwei weitere Aminosäuren können in allen P450-Strukturen gefunden werden, das Glutamat und das Arginin des ExxR-Motifs. Neben der Primärstruktur ist aber vor allem die Sekundärstruktur (siehe Abb. 1.3) und die daraus resultierende Tertiärstruktur bzw. Faltung bei allen P450 stark konserviert und bildet so genannte strukturell konservierte Regionen (SCR; engl. structurally conserved region) (Sirim *et al.* 2010). Diese sind hauptsächlich verantwortlich für die einheitliche Struktur und die Bindung des Häms der Cytochrome P450. Die Sekundärstruktur besteht aus 12-14 α -Helices. Die 12 Haupthelices sind alphabetisch von A-L benannt. Hierbei bilden die Helices D, L, I und E ein Vier-Helix-Bündel, das zusammen mit den Helices J und K (beinhaltet das ExxR-Motiv) die hämbindende Kernstruktur ausmachen (siehe Abb. 1.4)(Mestres 2005). Die lange I-Helix verläuft nahe zum Häm und beinhaltet die dritte stark konservierte Konsensussequenz $(A/G)Gx(E/D)\underline{T}$. Das Threonin spielt dabei für die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs während der Katalyse der Cytochrome P450 eine entscheidende Rolle. Dennoch gibt es auch hier Variationen von Enzym zu Enzym, sogar das Threonin ist nicht in allen P450 zu finden, wie das Beispiel P450eryF (CYP107A1) (Poulos & Johnson 2005) zeigt. Je näher die Sekundärstrukturen am Häm liegen, desto mehr sind diese auch strukturell konserviert.

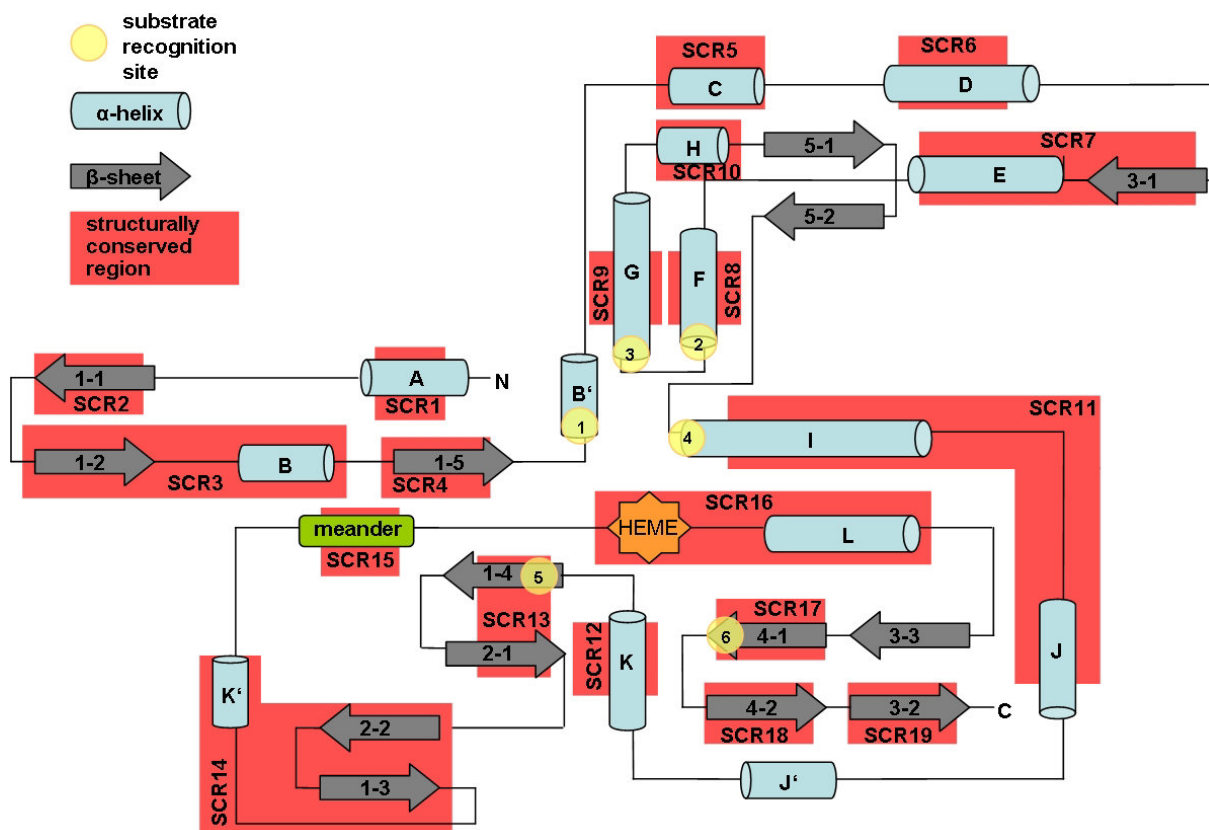


Abb. 1.3: Allgemeine Sekundärstruktur von Cytochromen P450 mit den α -Helices und β -Faltblättern (engl.: sheet). Strukturell konservierte Regionen SCR sind rot unterlegt und die Substraterkennungsstellen SRS sind mit gelben Kreisen markiert. Die Abbildung wurde aus der Publikation von Sirim *et al.* entnommen (Sirim *et al.* 2010).

Daneben gibt es aber auch eine Vielzahl von sehr variablen Regionen, wie z.B. die β -Faltblattdomänen (siehe Abb. 1.4), die an der Substratbindung und an dem Substratzugang zum aktiven Zentrum beteiligt sind. Diese so genannten Substraterkennungsstellen (SRS: engl. substrate recognition sites) wurden erstmals für die CYP2-Familie beschrieben und sind für die Substratspezifität verantwortlich (Gotoh 1992). Die SRS1 liegt in der stark variablen Region der B-C-Schleife zwischen B- und C-Helix. Die SRS2 befindet sich am C-terminalen Ende der F-Helix, der sich räumlich nahe die SRS3 anschließt, nämlich am N-terminalen Ende der G-Helix. Die SRS4 ist am N-terminalen Ende der I-Helix zu finden. Die beiden letzten Regionen befinden sich in β -Faltblättern, die SRS5 im Faltblatt 1-4 und die SRS 6 im Faltblatt 4-1.

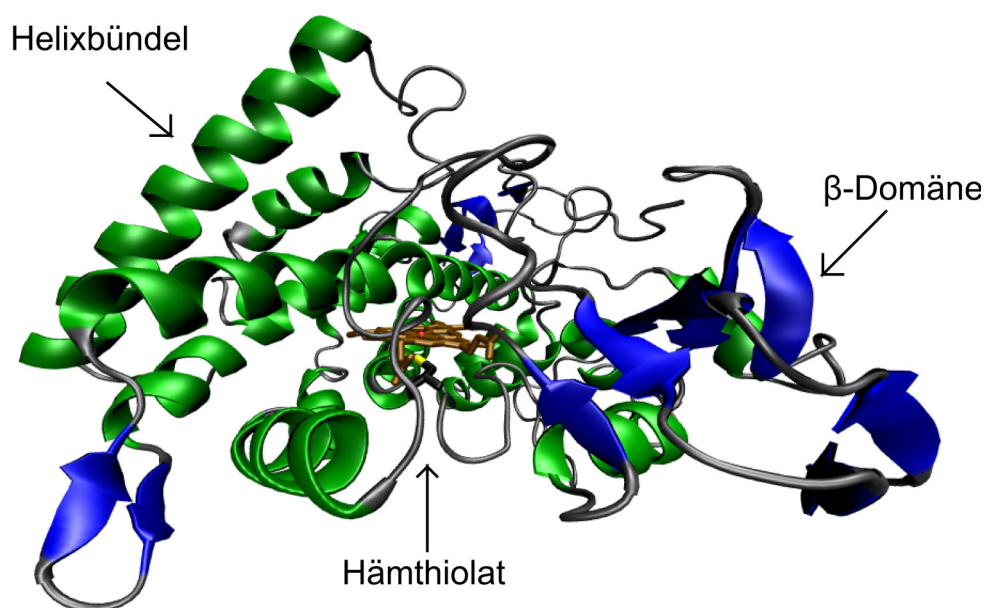


Abb. 1.4: Kristallstruktur von CYP107E1 (PDB-ID: 2Y5N) mit den α -Helices in grün, den β -Faltblättern in blau, dem Hämring in braun (Eisen in rot), dem Cystein in schwarz (Schwefel in gelb).

1.2.3 Katalyse: Reaktionen und Mechanismus

Wie schon ganz am Anfang in Kapitel 1.1 erwähnt handelt es sich bei den Cytochromen P450 um Oxygenasen der Oxidoreduktasegruppe, genauer gesagt um Monooxygenasen. Sie übertragen ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff auf ihr Substrat, wobei das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Hierfür sind Elektronen notwendig, die sie von externen Elektronendonatoren erhalten. Man spricht deshalb von externen Monooxygenasen. Sie sind an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt. Die Hauptreaktion ist dabei die Hydroxylierung von Kohlenstoffatomen (siehe Abb. 1.5 A). Diese Reaktion ist mechanistisch sehr gut verstanden und bildet oftmals die Grundlage für weitere Reaktionen im aktiven Zentrum, wie z.B. Dehydrierungen. Vier weitere Reaktionen sind ebenfalls sehr häufig und deshalb auch mechanistisch bekannt. Es handelt sich um Oxidationen von Heteroatomen (meist Stickstoff), Heteroatomabspaltungen, Epoxidierungen und Oxidationen von Olefinen, Acetylenen und Aromaten. Des Weiteren gibt es noch mehr als 20 weitere Reaktionen. Eine Übersicht über die wichtigsten gibt die Tab. 1.2 wieder (Guengerich 2001, Isin & Guengerich 2007, Ortiz de Montellano & Voss 2005, Sono *et al.* 1996).

Tab. 1.2: Übersicht über die typischen und untypischen Reaktionen, die von Cytochromen P450 katalysiert werden.

Cytochrome P450 katalysierte Reaktionen	
typische	untypische
<ul style="list-style-type: none"> • Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen • Oxidation von Heteroatomen • Heteroatomabspaltung • Epoxidierung • Oxidationen von Olefinen, Acetylenen und Aromaten 	<ul style="list-style-type: none"> • Dehydrierung • Dehalogenierung • C-C-Bindungsspaltung • Reduktion von Stickstoffoxiden • oxidative Esterspaltung • Oxidation von Alkoholen und Aldehyden • Lactonisierung • C-C oder C-N Kupplung • Isomerisierung • Ringbildung • Baeyer-Villiger-Oxidationen

Wegen dieser Vielfalt an katalysierten Reaktionen zeigen die Cytochrome P450 beim Betrachten der Endprodukte oftmals eher die Eigenschaften von anderen Enzymen wie Lyasen, Ligasen, Isomerasen, Transferasen und Reduktasen. Trotzdem vereint die Katalyse von Cytochromen P450 ein entscheidender Schritt, die Aktivierung von molekularem Sauerstoff durch schrittweise Reduktion. Dieser Katalysezyklus wurde erstmals im Zuge der Erforschung des P450_{cam} und der mitochondrialen Enzyme schon in den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts postuliert (Estabrook *et al.* 1971, Katagiri *et al.* 1968). Heutzutage geht man von einem Zyklus aus, der 8 Schritte enthält (siehe Abb. 1.5 B) (Denisov *et al.* 2005). Diese Schritte wurden mittels Analyse von Kristallstrukturen sowie zahlreichen spektroskopischen Methoden wie EPR-, Mössbauer-, EXAFS-, Raman-, NMR- MCD- und UV/Vis-Spektroskopie aufgeklärt (Isin & Guengerich 2007, Luthra *et al.* 2011).

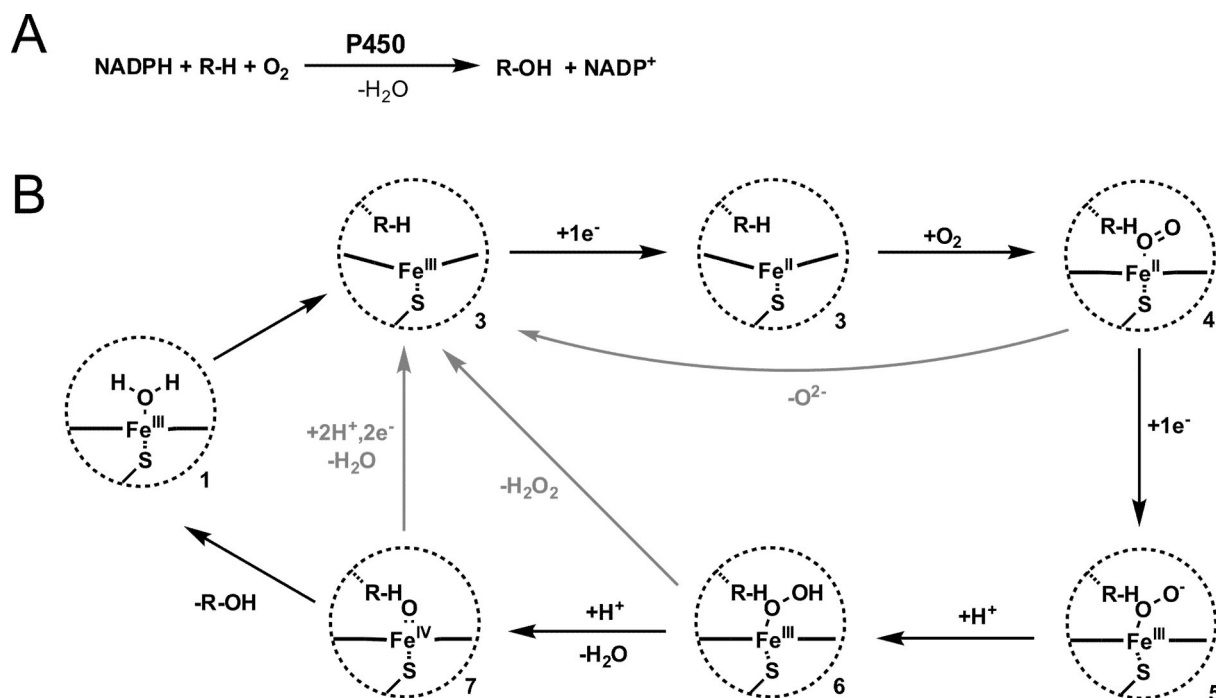


Abb. 1.5: A) Allgemeine Reaktionsgleichung für Cytochrome P450; B) Katalysezyklus der Cytochrome P450, gezeigt am aktiven Zentrum mit dem Hämeisen. Die Reaktionen des Zyklus sind in schwarz dargestellt, Nebenreaktionen in grau.

Das zentrale Eisen(III)kation der Cytochrome P450 bindet distal an die 4 Stickstoffatome der Hämgruppe und proximal an die Thiolatgruppe des Proteins. Als sechster Ligand befindet sich trans zu jenem Thiolat in wässriger Lösung ein Wassermolekül (1). Durch die Bindung eines hydrophoben Moleküls wie z.B. dem Substrat im aktiven Zentrum wird dieses Wasser verdrängt und das Ligandenfeld des Eisens ändert sich von oktaedrisch in quadratisch pyramidal, wobei die d-Elektronen des Eisens vom low-spin zum high-spin Zustand wechseln (2). Dieser Wechsel kann spektroskopisch durch eine Verschiebung der 420 nm Absorptionsbande des Eisen(III) zu geringeren Wellenlängen beobachtet werden, ein sogenannter TypI-Shift. Durch die Spinänderung ist das Redoxpotential des Hämeisens erheblich herabgesetzt und es kann im folgenden Schritt durch ein Elektron reduziert werden (3). Molekularer Sauerstoff und auch Kohlenstoffmonoxid (vgl. Hämoglobin) sind sehr gute Liganden für Fe^{2+} -Hämgruppen, woraus sich auch die Stabilität des reduzierten Eisen-CO-Komplexes der Cytochrome P450 mit seiner Absorption bei 450 nm begründet. Im Katalysezyklus bindet Sauerstoff als ein Eisen(II)-Sauerstoff-Komplex (4), der wiederum durch ein Elektron zum Eisen (III)-Peroxid-Komplex reduziert wird (5). Dieser Schritt ist häufig langsam und somit limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit der Cytochrome P450. Nun folgt eine Protonierung des Peroxids zum Hydroperoxid (6), welches im folgenden Schritt Wasser abspaltet. Es bildet sich ein

hochreaktiver Oxo-Eisen(IV)-Komplex (7). Diese so genannte „*compound I*“ ist zwar schon lange postuliert, konnte aber erst vor 2 Jahren bewiesen werden (Rittle & Green 2010). Aufgrund ihrer hohen Reaktivität kann diese Verbindung das Substrat angreifen und ist somit für den Sauerstofftransfer auf selbiges verantwortlich. Bei diesem Zyklus gibt es aber auch Nebenreaktionen, die die Oxidation des Substrates verhindern. Zum einen ist da die Autooxidation des Eisen(II)-Sauerstoff-Komplexes (4) zum oxidierten Eisen(III)-Zustand (2) zu nennen. Eine andere reversible Nebenreaktion ist der so genannte „Peroxid-shunt“, wobei der Hydroperoxid-Komplex (6) Wasserstoffperoxid abspaltet bzw. der oxidierte Eisen(III)-Zustand Wasserstoffperoxid aufnimmt. Die letztmögliche Nebenreaktion findet auf der Stufe „*compound I*“ statt. Hier wird durch eine weitere Reduktion der Sauerstoff zu Wasser reduziert und abgespalten, es entsteht wieder der Eisen(III)-Zustand (2).

1.3 Cytochrome P450 als Biokatalysatoren und ihre Herausforderungen

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, dass Cytochrome P450 eine sehr große Proteinfamilie darstellen, die man aus verschiedenen Organismen isolieren kann. Darüber hinaus katalysieren sie eine Vielzahl von interessanten Reaktionen. Vor allem die selektive Einführung einer OH-Gruppe ist dabei von hohem Interesse, da diese Reaktion chemisch meist nicht möglich ist oder viele Zwischenstufen benötigt. Durch diese Einführung einer funktionellen Gruppe wird oftmals eine weitere Synthese erst möglich, wie zum Beispiel die Herstellung von Artemisin-säure durch CYP71AV exprimierende Hefezellen (Ro *et al.* 2006), die als Ausgangsstoff für die Produktion des Antimalariawirkstoffs Artemisinin dienen. Die zusätzlich eingeführte Hydroxylgruppe kann auch zu einer höheren pharmakologischen Wirkung führen, wie bei dem HMG-CoA Reduktaseinhibitor Pravastatin (Watanabe *et al.* 1995). Eine logische Schlussfolgerung wäre, dass sich die P450 einer breiten Anwendung in der Industrie erfreuen. Die Realität sieht aber anders aus. Obwohl es sich bei fast einem Viertel der in der Industrie angewandten Biokatalysatoren um Oxidoreduktasen handelt (siehe Abb. 1.1)(Faber 2011), finden nur wenige von Cytochromen P450 katalysierte Reaktionen als großtechnische Prozesse Anwendung (siehe Tab. 1.3). Der Grund hierfür ist, dass Cytochrome P450 als Biokatalysatoren die von den Herstellern für Feinchemikalien gewünschten Ausbeuten von 1g/l bei einer Raumzeitausbeute von 0,1g/l/h nicht erreichen. Abhängig von der Wertsteigerung zwischen Substrat und Produkt sind aber auch schon geringere Ausbeuten, wie sie die pharmazeutische Industrie benötigt, von 0,1 g/l bei einer Raumzeitausbeute von 0,001 g/l/h von Interesse, wobei diese in der Literatur meist nicht angegeben sind oder noch untersucht werden. Ein prominentes Beispiel ist hierfür die Hydroxylierung von Vitamin D₃ zu seinen bioaktiven Metaboliten 25 α -Hydroxyvitamin D₃ und 1 α ,25 α -Dihydroxyvitamin D₃ (Sakaki 2012). Weitere Beispiele und eine Übersicht sind in Tab. 1.3 gegeben. Des Weiteren werden in der Pharmaindustrie schon die humanen Cytochrome P450 aus der Leber in Ganzzellsystemen eingesetzt, um den Abbau und die dabei entstehenden Metabolite von Arzneistoffen besser zu charakterisieren (Hanlon *et al.* 2007). Auch für die Synthese von bioaktiven Naturstoffen erfreuen sich die Cytochrome P450 großer Beliebtheit, da sie oftmals den entscheidenden Schritt in der Biosynthese katalysieren. Auch hier ist wie kürzlich gezeigt (Podust & Sherman 2012) eine Vielzahl von Anwendungen möglich. Eine weitere und immer größer werdende Anwendung finden Cytochrome P450 auch im Bereich der Dekontamination von Gewässern und Böden.

Ein Hauptabfallprodukt bei Industrieprozessen sind polyaromatische Kohlenwasserstoffe und polychlorierte Biphenyle. Diese können von einigen P450, vor allem der CYP1A Familie metabolisiert werden (Kumar 2010) und es sind auch schon Biodegradationen mit P450 exprimierenden Zellen bekannt (Sakaki *et al.* 2002, Shinkyō *et al.* 2006).

Tab. 1.3: Übersicht über großtechnische und interessante Anwendungen von Cytochromen P450 als Biokatalysatoren.

Reaktion	Biokatalysator <i>Expressionswirt</i>	Ausbeute	Literatur
Großtechnische Anwendungen			
n-Tridekan → Tridekansäure	CYP52A1 <i>C. tropicalis</i>	166 g/l	(Julsing <i>et al.</i> 2008)
Compactin → Pravastatin	CYP105A3 <i>S. carbophilus</i>	1 g/l	(Julsing <i>et al.</i> 2008)
Simvastatin → 6β-Hydroxymethylsimvastatin	unbekanntes P450 <i>N. autotropica</i> *	0,8 g/l	(Julsing <i>et al.</i> 2008)
Amorpha-1,4-dien → Artemisinsäure	CYP71AV <i>S. cerevisiae</i>	0,12 g/l	(Julsing <i>et al.</i> 2008)
11-Deoxycortisol → Cortisol	P450 _{lun} <i>C. lunata</i> *	/	(Julsing <i>et al.</i> 2008)
Biotechnologisch interessante Anwendungen			
Vitamin D3 → 25 α-Hydroxyvitamin bzw. 1α,25α-Dihydroxyvitamin D ₃	CYP107 oder CYP105A1 Mutante <i>S. lividans</i>	/ 0,008 g/l bzw. 0,002 g/l	(Yasutake <i>et al.</i> 2010) (Hayashi <i>et al.</i> 2010)
Progesteron → 11α-Progesteron	CYP106A2 Mutante <i>E. coli</i>	0,012 g/l	(Nguyen <i>et al.</i> 2012)
Amorpha-1,4-dien → Artemisin-11,12-epoxid	CYP102A1 Mutante <i>E. coli</i>	0,25 g/l	(Dietrich <i>et al.</i> 2009)
Valencen → Nootkaton	CYP109B1 <i>E. coli</i>	0,12 g/l	(Girhard <i>et al.</i> 2009)
Endogene Steroide → Cortisol	CYP11A1, CYP17, CYP21 <i>S. cerevisiae</i>	0,011 g/l	(Szczębara <i>et al.</i> 2003)
Indol → Indigo	CYP2 Familie <i>E. coli</i> oder CYP102 Mutante <i>E. coli</i>	/ 0,76 g/l	(Gillam & Guengerich 2001) (Lu & Mei 2007)
L-Limonen → (-)-Peryll Alkohol	CYP153 <i>P. putida</i>	6,8 g/l	(van Beilen <i>et al.</i> 2005)
Hydroxylierung von Alkanen und Fettsäuren	CYP102A1 und Mutanten	/	(Whitehouse <i>et al.</i> 2012)

* nicht rekombinat exprimierendes System

Die Frage stellt sich nun, warum die Cytochrome P450 als Biokatalysatoren gegenüber anderen Enzymen so schwer anwendbar sind, obwohl sie ein so großes Potential besitzen. Dies liegt an verschiedenen limitierenden Faktoren wie der Substratspezifität, der Aktivität, der Lösemitteltoleranz, der Stabilität und der im Folgenden besprochenen Notwendigkeit von NAD(P)H und den Redoxpartnern. Diese Probleme tauchen auch bei anderen Enzymsystemen auf und werden heutzutage mittels „protein engineering“ versucht zu lösen (Bernhardt 2006, O'Reilly *et al.* 2011). In den folgenden Abschnitten soll das Hauptaugenmerk auf die für Cytochrome P450 speziellen Herausforderungen der Redoxpartner in Abhängigkeit von Redoxsystemen und der Etablierung von Ganzzellsystemen gelegt werden.

1.3.1 NAD(P)H und Redoxpartner

Als externe Monooxygenasen benötigen Cytochrome P450, wie schon zuvor beschrieben, Elektronen von einem externen Elektronendonator. Meist handelt es sich bei diesen um die Reduktionsmittel NADH bzw. NADPH. Diese werden im Organismus gebildet und stetig regeneriert. Bei zellfreien Biotransformationen stellen sie wie alle enzymatischen Cofaktoren einen hohen Kostenfaktor und damit eine Limitierung der Anwendbarkeit der Biokatalysen dar (Chefson & Auclair 2006). Wie schon für andere Oxygenasen beschrieben, existiert eine Vielzahl von verschiedenen Möglichkeiten, diese Cofaktoren durch elektrochemische Verfahren oder Chemikalien zu ersetzen oder intelligente und kostengünstige Recyclingprozesse zu entwickeln (Faber 2011, Holtmann & Schrader 2007). Als Recyclingprozess werden Enzyme, sogenannte Dehydrogenasen, an die Reaktion gekoppelt, die NAD^+ bzw. NADP^+ wieder reduzieren und dabei ein kostengünstigeres Substrat verbrauchen. Beispiele hierfür sind die Formiatdehydrogenase für die Regeneration von NADH oder die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (GDH) für NADPH. Cytochrome P450 sind aber im Gegensatz zu anderen Oxygenasen noch weitaus komplexer. Sie können die Elektronen nicht direkt von NAD(P)H aufnehmen sondern benötigen andere vorgeschaltete Redoxproteine, die die Elektronen schrittweise auf sie übertragen. Man spricht deshalb bei der Gesamtheit dieser Proteine von Cytochrome P450-Systemen. In der Natur überwiegen vor allem 2 Systeme, die der sogenannten Klasse I und II, die auch schon direkt im Zusammenhang mit der Erforschung der Cytochrome P450 entdeckt wurden (Estabrook 2003). Bei der Klasse I handelt es sich um das „mitochondriale System“ bzw. das in den Bakterien am häufigsten vorkommende „bakterielle System“. Es besteht außer dem Cytochrome P450 aus 2 weiteren Redoxproteinen, einer FAD-

haltigen Reduktase und einem Ferredoxin mit einem Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe. Die Reduktase nimmt bei der Reaktion die zwei Elektronen vom Cofaktor NAD(P)H auf und gibt jeweils ein Elektron auf das Ferredoxin ab. Dieses reduziert wiederum das eigentliche Cytochrom P450 und ermöglicht somit die Aktivierung des Sauerstoffes. Der Unterschied zwischen dem „mitochondrialen System“ und dem „bakteriellen“ besteht darin, dass im Mitochondrium die Reduktase und das Cytochrome P450 membrangebunden sind und das lösliche Ferredoxin zwischen den beiden hin- und herwandert, während im Bakterium alle drei Komponenten in löslicher Form vorliegen. Die Klasse II oder das „mikrosomale System“ kommt wie das „mitochondriale System“ nur in Eukaryoten vor. Es besteht aus zwei membrangebundenen Komponenten, der FAD- und FMN-haltigen CPR (Cytochrome P450 Reduktase) und dem P450 selbst. Mittlerweile ist eine Einteilung in nur zwei Klassen aufgrund der steigenden Anzahl von Ausnahmen nicht mehr möglich, da die Biodiversität an Cytochrom P450-Systemen vergleichbar mit den Cytochromen P450 selbst ist und neben den Klassen I und II noch 8 weitere Klassen umfasst, wobei diese bisher noch eher Ausnahmen bilden (Hannemann *et al.* 2007). Diese kommen fast ausschließlich in Bakterien und Pilzen vor. Im Hinblick auf die Anwendung von P450s als Biokatalysatoren sollte zur Vollständigkeit auch noch die Klasse VIII erwähnt werden. Es handelt sich hierbei im Gegensatz zu allen anderen Klassen um autarke Einkomponentensysteme, d.h. die Vertreter dieser Klasse können wie gewöhnliche Oxygenasen direkt Elektronen von NAD(P)H beziehen. Sie sind ähnlich wie die Klasse II aufgebaut, wobei die CPR mit der P450-Komponente fusioniert ist und als bakterielles Enzym in gelöster Form vorliegt. Ihr prominentester Vertreter ist das schon zuvor erwähnte CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* (alter Name, P450_{BM3}). Gerade dieses P450 scheint das „Allzweckwerkzeug“ für P450-Biokatalysen zu sein (Wong 2011), da es eine hohe Aktivität besitzt und mit ihm bisher die meisten Fortschritte im Bereich des „protein engineering“ gemacht wurden.

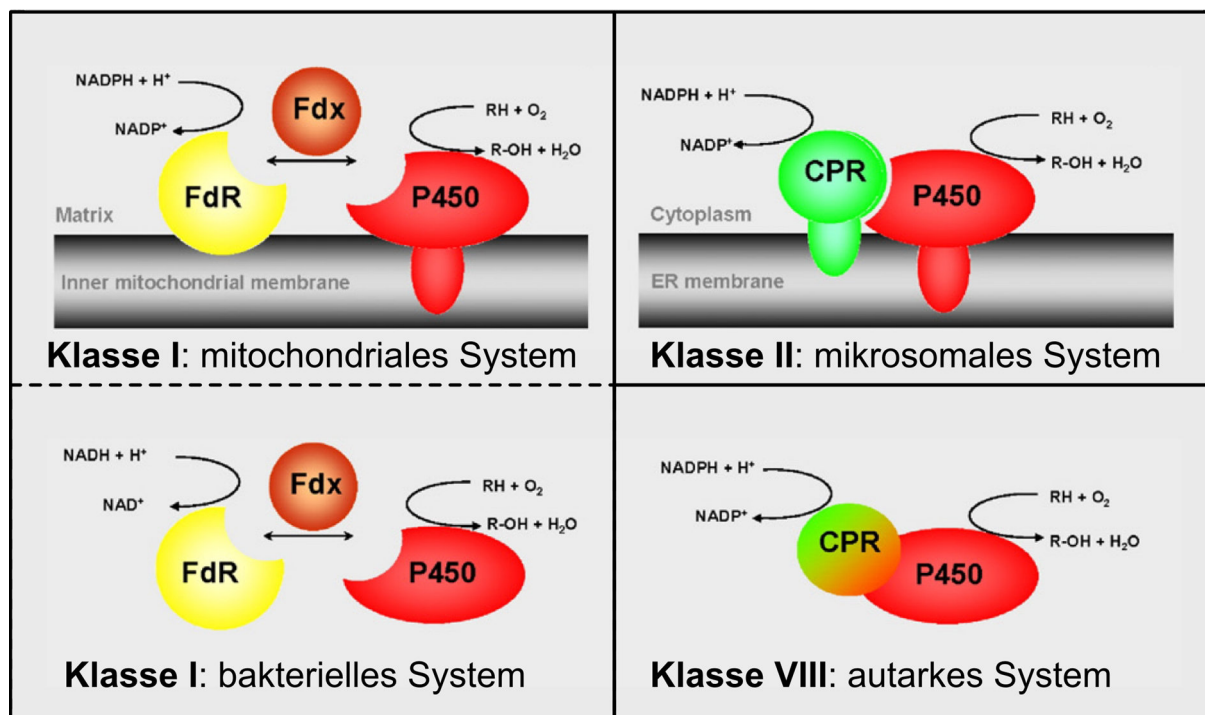


Abb. 1.6: Cytochrom P450-Systeme der Klasse I, mitochondriales und bakterielles System, der Klasse II, mikrosomales System, und der Klasse VIII, autarkes System. Grafik entnommen aus Hannemann *et al.* 2007.

Durch die räumliche Nähe der fusionierten CPR-Domäne besitzt CYP102A1 hohe Aktivitäten und ist durch die Fusion unabhängig von Redoxpartnern, wodurch bei Mutagenesen keine Wechselwirkungen mit den Redoxpartnern zu berücksichtigen sind. Dies gilt nicht für die anderen Klassen. Hier ist zum Teil gerade die Identifizierung der richtigen Redoxpartner im Genom eine große Herausforderung, insbesondere bei Bakterien. Ein gutes Beispiel für diese Herausforderung bietet das Genom von *Streptomyces coelicolor* A3(2). Dieses Bakterium besitzt 4 Reduktasen, 6 Ferredoxine und 18 Cytochrome P450. Daraus ergeben sich 24 mögliche Kombinationen der Redoxpartner, um mit einem Klasse I System Elektronen für ein Cytochrom P450 bereitzustellen. Am Ende konnte im Fall des CYP105D1 nur mit einer Kombination erfolgreich ein Substrat umgesetzt werden (Chun *et al.* 2007). Für alle 18 Cytochrome P450 würde dies bedeuten, man müsste 28 Proteine isolieren und mit ihnen 432 Kombinationen mittels Substratumsatz durchspielen. Aus diesem Grund kommen häufig heterologe Redoxpartner zum Einsatz. Hierbei zeigte sich, dass eine kleine Gruppe von Redoxpartnern gut geeignet ist, um sie universell einzusetzen. Hierzu gehören das kommerziell erhältliche Spinatferredoxin und die Spinatferredoxinreduktase (Chun *et al.* 2007, O'Keefe *et al.* 1991, Yasutake *et al.* 2010), das Putidaredoxin (Pdx) und die Putidaredoxinreduktase (PdR) von *Pseudomonas putida* und das Flavodoxin (Fld) und seine Reduktase (Fpr) aus *Escherichia*

coli (Urlacher & Girhard 2012). Weitere vielversprechende Redoxpartner scheinen das aus dem Rind stammende Adrenodoxin und die Adrenodoxinreduktase zu sein, da dieses Paar nicht nur Elektronen auf mitochondriale P450 überträgt (natürliche Funktion), sondern auch mit der verkürzten Form des Adx (Adx₄₋₁₀₈) auf bakterielle P450, wie CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* (Lisurek *et al.* 2004) und CYP109B1 aus *Bacillus subtilis* (Girhard *et al.* 2010).

1.3.2 Ganzzellkatalysatoren

Nur wenige zellfreie Enzyme erfüllen die Anforderungen, die an Biokatalysatoren bei der Herstellung von größeren Produktmengen gestellt werden, speziell die zellfreie Anwendung von Cytochrome P450 Systemen ist durch die zuvor genannten Limitierungen beschränkt (Chefson & Auclair 2006). Aus diesem Grund sind Ganzzellsysteme für diese Enzymfamilie wie auch generell für alle Cofaktor benötigenden Enzyme eine sehr gute Möglichkeit, die Reinigung der Proteine und die Kosten der Cofaktoren zu umgehen, da die Zelle diese selbst zur Verfügung stellt, was neben den Kosten auch Zeit einspart (Carballeira *et al.* 2009). Betrachtet man die Tab. 1.3, so lässt sich erkennen, dass bei allen Cytochrom P450 Prozessen, bei denen Ausbeuten publiziert sind bzw. diese Prozesse sogar großtechnisch angewendet werden, mit Ganzzellsystemen gearbeitet wird. Die Herausforderung liegt dabei darin, dass neben dem Cytochrom P450 selbst auch funktionelle Redoxpartner in dem Organismus vorliegen oder coexprimiert werden müssen. Das gesamte Cytochrom P450-System wird hierbei meist rekombinant exprimiert. Der häufigste Expressionswirt ist dabei das Darmbakterium *Escherichia coli* (Urlacher & Girhard 2012). Als Gründe hierfür sind zu nennen, dass dieser Modellorganismus schon lange bekannt und leicht gentechnisch veränderbar ist, sowie hohe Wachstums- und Expressionsraten besitzt (Schroer *et al.* 2010). Im Falle der Cytochrome P450 sind außerdem keine Nebenreaktionen durch andere P450 zu erwarten, da der Organismus keine eigenen P450-Gene besitzt. In den letzten zehn Jahren wurde eine Vielzahl von verschiedenen Strategien speziell zur Expression der Cytochrom P450-Systeme für dieses Bakterium erarbeitet. Zum einen wurden 1-Vektorsysteme, bei dem die Gene der Redoxpartner und Cytochrome P450 auf einem Expressionsplasmid angeordnet sind, verwendet. Für die Anwendung von mikrosomalen P450, die mit der Cytochrome P450 Reduktase (CPR) coexprimiert werden, wurden hierzu bicistronische Vektoren entworfen, bei denen die beiden Gene direkt hintereinander geschaltet sind (Gillam *et al.* 1999, Hanlon *et al.* 2007). Bei Cytochromen P450 der Klasse I wurden analog dazu tricistronische Vektoren, bestehend aus der

jeweiligen Reduktase, dem Ferredoxin und dem P450 verwendet (Agematu *et al.* 2006, Salamanca-Pinzón & Guengerich 2011). Eine andere Anwendung bei den Klasse I Systemen besteht darin mit 2 Vektoren zu arbeiten, wobei die Gene der beiden Redoxpartner auf einem bicistronischen Vektor kloniert sind und das Cytochrom P450 sich auf einem kompatiblen Vektor befindet (Hannemann *et al.* 2006). Eine neue flexiblere Möglichkeit, die Gene auf Vektoren zu verteilen, bieten die Duet-Vektoren von Novagen. Diese auf Multi-Enzym-Komplexe ausgelegten Expressionskonstrukte besitzen 2 unabhängige Klonierungsstellen (MCS: „multiple cloning sites“) und 4 zueinander kompatible Vektoren (Held *et al.* 2003, Novy *et al.* 2002). Diese Vektoren wurden im Falle von dem Klasse I System von *Novosphingobium aromaticivorans* benutzt. Hierbei waren die Gene der Reduktase und des Ferredoxins auf einem Duet-Vektor in den zwei unabhängigen MCS vorhanden und auf einem anderen Duet-Vektor das P450-Gen und wiederum das Gen des Ferredoxins (Bell *et al.* 2010). Neben der Verwendung von *Escherichia coli* Ganzzellsystemen existieren noch eine Vielzahl von rekombinanten Systemen in anderen Mikroorganismen (Bernhardt 2006, Carballeira *et al.* 2009). Die größte Herausforderung hierbei besteht in der Substrataufnahme der meist hydrophoben Substrate durch die Mikroorganismen.

1.4 Cytochrome P450 von *Sorangium cellulosum* So ce56

In der vorliegenden Dissertation wurde mit Cytochromen P450 aus dem Bakterium *Sorangium cellulosum* So ce56 gearbeitet. *Sorangium cellulosum* gehört zu den Myxobakterien. Diese sind gram-negative Bodenbakterien, die zur δ -Gruppe der Proteobakterien gehören. Sie besitzen einzigartige Fähigkeiten wie die Ausbildung multizellulärer, artspezifischer Fruchtkörper oder ihre gleitende Fortbewegung auf festen Oberflächen. Ihrer Genome gehören mit denen der Gattung der *Streptomyces* zu den größten im Reich der Prokaryoten und ihre DNA besitzt einen sehr hohen GC-Gehalt von 64-72% (Dawid 2000, Reichenbach 1999), vergleichbar eher mit der DNA von Eukaryoten. Darüber hinaus sind sie als hervorragende Produzenten von bioaktiven Sekundärmetaboliten bekannt und stehen zurzeit im Fokus der pharmazeutischen Forschung (Diez *et al.* 2012, Weissman & Muller 2010, Wenzel & Muller 2009). Im Zusammenhang mit Cytochromen P450 machte der Stamm *Sorangium cellulosum* So ce90 erstmals auf sich aufmerksam, als man erkannte, dass er die Antikrebsmittel Epothilon A und Epothilon B produziert. Verantwortlich für den letzten Schritt der Synthese dieser Macrolactone (Macrolide), die Epoxidierung einer Doppelbindung, und somit für die Bioaktivität des Produkts, ist das Cytochrome P450 CYP167A1 (P450_{epoK}), welches erstmals mittels rekombinanter Expression in *Escherichia coli* isoliert werden konnte (Ogura *et al.* 2004). Das komplette Genom dieses Stammes wurde bisher noch nicht publiziert. 2007 wurde aber das Genom des eng verwandten *Sorangium cellulosum* So ce56 Stammes veröffentlicht (Schneiker *et al.* 2007). Mit seiner Größe von 13 Mbp ist es bis heute das größte veröffentlichte Genom eines Bakteriums. In diesem großen Genom befinden sich 21 Cytochrome P450 (Khatri *et al.* 2010b), die alle in einer, dieser Dissertation vorangegangenen, Arbeit isoliert, rekombinant exprimiert und gereinigt wurden (Khatri 2009). Verglichen mit anderen sporenbildenden Myxobakterien, *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (18 P450), *Haliangium ochraceum* DSM 14365 (17 P450) und *Myxococcus xanthus* DK1622 (7 P450), besitzt *Sorangium cellulosum* So ce56 auch das größte CYPome (Gesamtheit der Cytochrome P450) (Khatri *et al.* 2011). Für die Erforschung der biotechnologischen Anwendung von Cytochromen P450 ist das *Sorangium cellulosum* So ce56 somit eine kleine Schatzkiste, vergleichbar dem von *Streptomyces avermitilis* (33 P450) und *Streptomyces coelicolor* A3(2) (18 P450) (Lamb *et al.* 2003). Bei den 21 Cytochromen P450 von *Sorangium cellulosum* So ce56 handelt es sich um bislang unbekannte Enzyme dieser Gen-Superfamilie, von denen 14 anhand ihrer Aminosäuresequenz 9 neuen Familien (CYP259-266) zugeteilt werden können, d.h. sie besitzen eine Sequenzgleichheit

von unter 40 Prozent. Jedes von den 21 Monooxygenasen besitzt demnach das Potential, interessante und neuartige Biotransformationen durchzuführen. In diesem Kontext wurden 3 dieser Cytochrome P450 eingehender untersucht, CYP109D1, CYP260A1 und CYP264B1.

Tab. 1.4: Übersicht über die bisher bekannten Substrate von Cytochromen P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56, sowie die bekannten Produkte (OH = Hydroxylierung; epoxy = Epoxidierung) bzw. die Anzahl der unbekannt Produkte (kursiv).

P450	Substrat	Produkte	Literatur *
CYP109D1	Caprinsäure	ω -1 & ω -2 OH	(Khatri 2009)
	Laurinsäure	ω -1 bis ω -3 OH	(Khatri <i>et al.</i> 2010b)
	Tridekansäure	ω -1 bis ω -5 OH	(Khatri 2009)
	Myristinsäure	ω -1 bis ω -5 OH	(Khatri <i>et al.</i> 2010b)
	Palmitinsäure	ω -1 bis ω -6 OH	(Khatri <i>et al.</i> 2010b)
	Oleanolsäure	ω -6 & ω -7 OH	(Khatri 2009)
	13-Methylmyristinsäure	ω -2 bis ω -4 OH	(Khatri 2009)
	15-Methylpalmitinsäure	ω -2 bis ω -6 OH	(Khatri 2009)
	Geraniol	2,3 epoxy 6,7 epoxy 2,3-,6,7 diepoxy	(Khatri 2009)
	Nerol	2,3 epoxy 6,7 epoxy	(Khatri 2009)
	R-Limonen	<i>6-Produkte</i>	(Khatri 2009)
	α -Ionon	3-OH	(Khatri <i>et al.</i> 2010a)
	β -Ionon	4-OH	(Khatri <i>et al.</i> 2010a)
CYP260A1	Nootkaton	<i>1 Hauptprodukt</i> <i>3 Nebenprodukte</i>	(Ewen <i>et al.</i> 2009)
	Progesteron	<i>10 Produkte</i>	(Khatri 2009)
	11-Deoxycorticosteron	<i>1 Hauptprodukt</i> <i>1 Nebenprodukte</i>	(Khatri 2009)
CYP264B1	α -Ionon	<i>3-OH</i>	(Ly <i>et al.</i> 2012)
	β -Ionon	<i>3-OH</i>	(Ly <i>et al.</i> 2012)
	Nootkaton	13-OH <i>1 Nebenprodukt</i>	(Ly <i>et al.</i> 2012)

* Bei den Literaturstellen wurden, wenn möglich die Publikationen, nicht die Dissertationen angegeben

Dabei kam es zu dem schon im vorherigen Kapitel besprochenen Problem, die richtigen Redoxpartner in dem Genom zu finden. Insgesamt konnten im Zuge der Erforschung möglicher Klasse I Redoxsysteme 2 Reduktasen und 8 potentielle Ferredoxine gefunden werden (Ewen 2009). Von letzteren konnten nur 5 erfolgreich isoliert und gereinigt werden, Fdx1, Fdx2, Fdx3, Fdx5 und Fdx 8. Es sind mit den verbleibenden Proteinen also 10 Kombinationen mög-

lich, um Elektronen auf die Cytochrome P450 von *Sorangium cellulosum* So ce56 zu übertragen. Anhand des CYP260A1 konnte gezeigt werden, dass prinzipiell 4 Kombinationen, bestehend aus den Reduktasen, FdR_A und FdR_B, und den Ferredoxinen, Fdx2 und Fdx8, einen Substratumsatz des Sesquiterpens Nootkaton durch das P450 katalysieren, wobei sich die Reduktase FdR_B als der bessere Elektronendonator für die beiden Ferredoxine herausstellte und diese in Kombination mit Fdx2 am besten funktionierte (Ewen *et al.* 2009). Der Vorteil der FdR_B konnte auch mit CYP109D1 gezeigt werden (Khatri *et al.* 2010b), wobei hier das Fdx8 den Vorzug gegenüber Fdx2 erhält. Die Umsatzraten mit diesen homologen Redoxpartner waren aber um den Faktor 3 niedriger als mit dem heterologen System, bestehend aus bovinem AdR und Adx₄₋₁₀₈ (verkürzte Mutante des Wildtyps). Das gleiche Phänomen konnte auch für die Reduktion von CYP264B1 beobachtet werden, wo nur 5% des Cytochroms P450 mit den homologen Redoxpartner reduziert werden konnten, im Gegensatz zu 90% mit dem AdR/Adx₄₋₁₀₈ System (Ly *et al.* 2012). Mit Hilfe dieses Redoxsystems konnten nun erfolgreich verschiedene Substrate für die drei Cytochrome P450 und einige der Produkte durch zellfreie Umsätze charakterisiert werden. Die Substrate und die charakterisierten Produkte sind in Tab. 1.4 aufgelistet. Interessant erscheint hierbei das CYP260A1, da es in der Lage ist, Steroide umzusetzen und es sich wahrscheinlich um eine neue Steroidhydroxylase handelt. Seine Produkte wurden aber noch nicht charakterisiert, so dass noch keine Aussage über die Katalysefähigkeiten dieses P450 gemacht werden kann.

1.5 Steroidbiotransformationen und Steroidhydroxylasen

Steroide sind verantwortlich für viele biologische Funktionen in Zellen. Sterole wie Cholesterol sind Bestandteile der Zellmembran und verantwortlich für dessen Stabilität, das Zellwachstum und stellen die wichtigste Vorstufe zur Biosynthese der Steroidhormone des Estran-, Androstan- und Pregnantyps dar (siehe Abb. 1.7). Gerade diese stehen immer am Ende aller Bestrebungen, Steroide biokatalytisch umzusetzen, da sie als Hormone schon in geringer Menge hohe Bioaktivitäten besitzen. Wie schon ganz am Anfang dieser Einleitung erwähnt, gehören Steroidbiotransformationen zu den ersten, mikrobiell durchgeführten Biotransformationen und sind seither eng mit diesen verbunden (Sedlacek & Smith 1988). Steroide sind sehr schwierig durch konventionelle Methoden zu synthetisieren. Hier bieten die mikrobiellen Transformationen eine effektive Alternative. Die Bemühungen in diesem Forschungsfeld begannen mit der Entdeckung der pharmakologischen Effekte von Progesteron und Cortisol und der Identifizierung der 11α -Hydroxylierung durch Schimmelpilze der Gattung *Rhizopus* (Bhatti & Khera 2012). Die große Vielfalt und Bedeutung von Mikroorganismen in der Produktion von kommerziell wertvollen Steroiden ist schon seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts anerkannt (Mahato & Garai 1997). In Kombination mit Synthesemethoden wurden mit Hilfe dieser Biotransformationen eine Vielzahl von Steroiden bzw. Steroidderivaten hergestellt und deren Bioaktivität getestet. Sie finden breite Anwendung als Entzündungshemmer, Immunsuppressivum, Progestativa, Diuretika, Anabolika und als Verhütungsmittel, sowie in Behandlungen von Brust- und Prostatakrebs und vielen anderen Krankheiten, die direkt mit der Biosynthese der Steroidhormone zu tun haben (Bhatti & Khera 2012). Ihre physiologische Aktivität hängt von ihrer Struktur, dem Typ, der Anzahl, und der Regio- und Stereoposition von funktionellen Gruppen an der Steroidkernstruktur ab. Die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe an der 11β -Position ist zum Beispiel entscheidend für die entzündungshemmende Wirkung, die 17β -Hydroxylgruppe bestimmt die Eigenschaften der Androgene (männliche Geschlechtshormone) und die Aromatisierung des A-Rings die der Östrogene (weibliche Geschlechtshormone) (Donova & Egorova 2012, Fragkaki *et al.* 2009, Funder 2010). Die durch Mikroorganismen bewerkstelligten Transformationen von Steroiden beinhalten den Seitenkettenabbau von Sterolen, Redoxreaktionen an funktionellen Gruppen oder Hydroxylierungen der Kernstruktur. Diese wurden kürzlich von Donova *et al.* und Bhatti *et al.* zusammengefasst (Bhatti & Khera 2012, Donova & Egorova 2012).

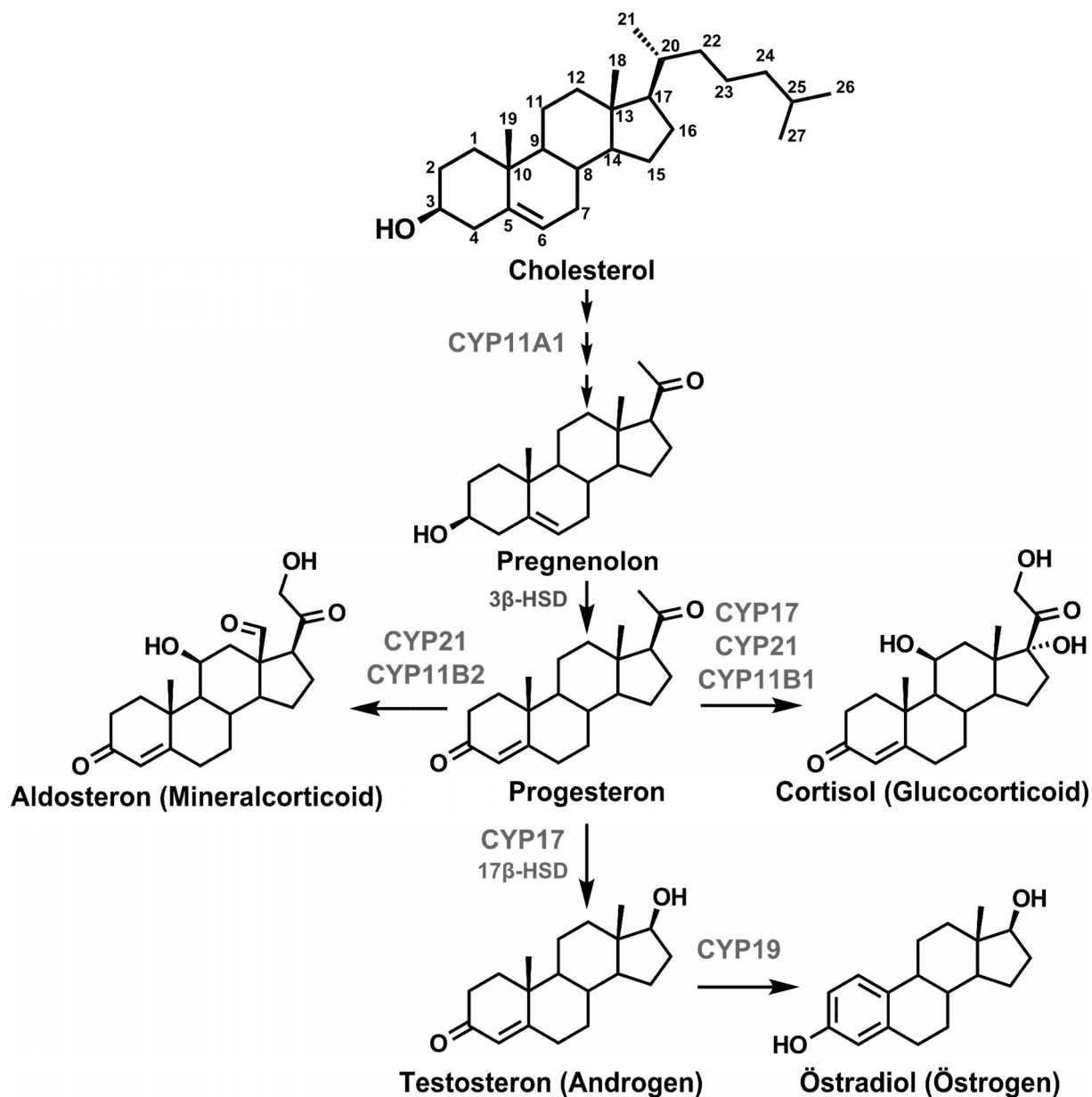


Abb. 1.7: Vereinfachtes Schema der Biosynthese der Steroidhormone ausgehend von Cholesterol, dessen Struktur auch die steroidtypische Nummerierung zeigt, zu den Mineralcorticoiden, Glucocorticoiden, Androgenen und Östrogenen mit je einem Beispiel. Die beteiligten Enzyme (vor allem Cytochrome P450) an den Reaktionen sind grau gekennzeichnet.

Da in dieser Arbeit fast ausschließlich Steroidhydroxylierungen untersucht wurden, werden im Folgenden diese näher betrachtet. Steroide werden ausschließlich von Cytochromen P450 hydroxyliert. Durch die Hydroxylierung ändert sich die Polarität der Moleküle, was sich auf ihre Toxizität, ihre Ausscheidung und ihren Transport in der Zelle auswirkt. Die Positionen der Hydroxylierungen zwischen P450 aus Eukaryoten und Prokaryoten unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Bedeutung dieser Prozesse in der Natur. In Eukaryoten dienen Hydroxylierungen einerseits der Steroidbiosynthese, andererseits in der Leber (mikrosomale

P450) zum Abbau der Steroide, während in Bakterien diese exogenen Substanzen zur eigenen Verwendung hydroxyliert werden. Der momentane Trend bei mikrobiellen Hydroxylierungen ist die Suche nach neuen Biokatalysatoren, die die für die Industrie wichtigen 7α , 9α , 11α , 11β , 16α , 17α Hydroxysterioide produzieren (Donova & Egorova 2012). Eine vor allem am Anfang dieses Jahrzehnts häufig verwendete Methode ist die rekombinante Expression der an der Steroidhormonbiosynthese beteiligten Cytochrome P450 in Hefen, wie die in Tab. 1.3 gezeigte Produktion von Cortisol in *Saccharomyces cerevisiae* (Szczepara *et al.* 2003) oder die heterologe Expression von humanem CYP11B1 (Drăgan *et al.* 2005), CYP11B2 (Tin *et al.* 2011) und CYP21 (Zehentgruber *et al.* 2010) in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe*. Ebenfalls in der Spaltheife konnte auch die zuvor erwähnte 11α -Hydroxylierung durch die rekombinante Expression von CYP509C12 (*Rhizopus oryzae*) durchgeführt werden. Aber auch die Steroidhydroxylasen aus Bakterien erfreuen sich immer größerer Beliebtheit, wobei deren Selektivitäten bereits durch Mutationen verbessert wurden. Bis vor zwei Jahren waren in diesem Zusammenhang nur Arbeiten unseres Instituts an der 15β -Steroidhydroxylase CYP106A2 bekannt (Hannemann *et al.* 2006, Virus & Bernhardt 2008, Virus *et al.* 2006). In den letzten zwei Jahren wurden dann fünf Artikel veröffentlicht, die sich mit der Selektivitätsänderung von bakteriellen Steroidhydroxylasen beschäftigten. Eine beschäftigte sich wiederum mit CYP106A2, wobei eine Veränderung der Regioselektivität von 15β zu 11α durch gerichtete Mutagenese erreicht wurde (Nguyen *et al.* 2012). Die vier weiteren Publikationen behandelten die Verbesserung der Regioselektivitäten von CYP102A1 an den Positionen 2β und 15β (Kille *et al.* 2011) und den Positionen 16β und 16α (de Beer *et al.* 2012, Rea *et al.* 2012, Venkataraman *et al.* 2012).

1.6 Aufgabenstellung

Cytochrome P450 stellen eine einzigartige Proteinfamilie dar. Aufgrund ihrer katalytischen Fähigkeit molekularen Sauerstoff in organische Moleküle einzubauen, sind sie in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Biokatalyse gerückt. In dem Zusammenhang spielen vor allem bakterielle Cytochrome P450 eine bedeutende Rolle, da sie sich durch sehr verschiedenartige Substratspektren und hohe rekombinante Expressionslevel auszeichnen. In Folge der stetig steigenden Anzahl von neu veröffentlichten Genomdaten für Mikroorganismen steigen auch die Möglichkeiten, neue Cytochrome P450 mit neuen biokatalytischen Fähigkeiten zu finden.

In der Gruppe von Prof. Bernhardt beschäftigt man sich seit 2006 mit der Entdeckung von neuartigen Cytochromen P450 aus dem Bodenbakterium *Sorangium cellulosum* So ce56. Dieses Bakterium besitzt gegenüber anderen Prokaryoten die hohe Anzahl von 21 Cytochromen P450 sowie verschiedene potentielle Redoxsysteme der Klasse I. In bereits abgeschlossenen Arbeiten von Yogan Khatri und Kerstin Ewen konnten diese Proteine erfolgreich rekombinant hergestellt und gereinigt werden (Ewen 2009, Khatri 2009). Eine vollständige Charakterisierung des Substratspektrums der Enzyme und eine detaillierte Analyse der Produkte lag aber Ende 2009 mit dem Abschluss der Arbeiten nicht vor. Vor allem die Produkte der potentiellen Steroidhydroxylase CYP260A1 konnten in diesen Arbeiten nicht aufgeklärt werden, so dass ihr Potential als Biokatalysator noch nicht geklärt war.

Aufbauend auf den oben genannten Arbeiten sollten daher in der vorliegenden Dissertation ausgewählte P450s aus *Sorangium cellulosum* So ce56 hinsichtlich ihres Substratspektrums charakterisiert werden, wobei das Hauptaugenmerk auf ihr Potential als Biokatalysatoren gelegt werden sollte. Neben den bereits von Herrn Khatri im Ansatz charakterisierten CYP109D1 und CYP260A1 wurden für die hier geplanten Untersuchungen noch 3 weitere viel versprechende P450s (CYP266A1, CYP264A1 und CYP260B1) ausgewählt, da sich diese in guten Ausbeuten rekombinant exprimieren lassen (Khatri 2009), was als eine der Grundvoraussetzungen für die geplante Verwendung als Biokatalysator angesehen werden kann. Zunächst sollten die Enzyme gereinigt und *in vitro* untersucht werden, um neue bzw. erste Substrate zu identifizieren. Da, wie zuvor erwähnt, bakterielle Cytochrome P450 nur in Verbindung mit einer üblicherweise aus 2 Proteinen bestehenden Elektronentransportkette funktionell aktiv sind, mussten im Fall des CYP266A1 zuvor außerdem noch geeignete Redoxpartner gefunden werden. Nach erfolgreicher Substratidentifikation durch Produktbildung sollten

die enzymabhängigen Reaktionen mittels chromatographischer Methoden wie HPLC analysiert und in Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen die Funktionalisierung der Produkte aufgeklärt werden.

Ein weiteres wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, neue Methoden im Bereich der P450-basierten Ganzzellkatalyse zu entwickeln, da sie Vorteile für die Produktcharakterisierung bietet. Für die meisten der in Tab. 1.4 gezeigten Produkte stehen leider keine Standards zur Verfügung, so dass eine vollständige Charakterisierung nur mittels NMR-Spektroskopie möglich ist, wofür aber Produktausbeuten im mg Bereich nötig sind. Solche Mengen sind durch *in vitro* Verfahren aber sehr mühsam zu erreichen und gleichzeitig mit hohen Kosten verbunden. Kombiniert man aber die für die im kleinen Maßstab *in vitro* etablierten Methoden für die Produktisolierung mit einem Ganzzellsystem für die Produktherstellung, ist es möglich, gleichermaßen Zeit und Kosten bei der Produktcharakterisierung zu sparen. Darüber hinaus hätte ein generell auf Klasse I P450s anwendbares Ganzzellsystem den Vorteil, dass es prinzipiell zur Charakterisierung jedes beliebigen bakteriellen P450s einsetzbar wäre und damit eine Grundlage für nachfolgende Arbeiten mit anderen P450 aus diesem aber auch aus anderen Organismen bieten würde.

Darüber hinaus wären die zu entwickelten Ganzzellsysteme ein erster Schritt in die biotechnologische Anwendung der hier untersuchten Cytochrome P450.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien und Enzyme stammten aus Standardbezugsquellen und waren von analytischer Reinheit. Die in der Arbeit verwendeten Substrate aus der allgemeinen Substanzbibliothek und der Substanzbibliothek von Gif-sur-Yvette (nahe Paris, französische Kooperation mit CNRS en Ile-de-France Sud in der Gruppe von Denis Pompon; jetzt in Toulouse) sind einzeln mit Strukturformel und der dreistelligen Codierung im Anhang aufgeführt (siehe Anhang 6 und 6.2).

2.1.1 Proteine

Die Redoxproteine AdR (100 μ M Stocklösung) und Ad_{x4-108} (1 mM Stocklösung) aus *Bos taurus* wurden im Institut von Katharina Bompais und Wolfgang Reinle in *E. coli* Zellen rekombinant exprimiert und mittels chromatographischer Methoden nativ gereinigt (Sagara *et al.* 1993, Uhlmann *et al.* 1994). Die potentiellen Redoxproteine aus *Sorangium cellulosum* Soce56 wurden von Dr. Kerstin Ewen im Rahmen ihrer Promotion hergestellt und gereinigt (Ewen 2009). Die gereinigten Ferredoxine EtpI^{fd} aus *Schizosaccharomyces pombe* und seine Mutante EtpI^{fd} (516–618) standen aus früheren Arbeiten (Müller *et al.* 2011, Schiffler *et al.* 2004) zur Verfügung. Das Ferredoxin Cdx aus *Citrobacter braakii* (Hawkes *et al.* 2010) wurde freundlicherweise von Dr. Max Cryle (Max Planck Institut Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Oligonukleotide

Tab. 2.1: Übersicht über die im Rahmen der Dissertation verwendeten Primer mit deren Verwendungszweck und Sequenz. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Sequenz
T7	Sequenzierprimer vorwärts für pET- und pCDF-Vektoren	TAATACGACTCACTATAGGG
T7term	Sequenzierprimer rückwärts für pET- und pCDF-Vektoren	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
DuetDown1	Sequenzierprimer rückwärts für die MCS1 der pET- und pCDFDuet-Vektoren	GATTATGCGGCCGTGTACAA
C5_int1_for	Interner Sequenzierprimer vorwärts für pETMR5 und MR6	GGACCGCGAGATCATCGATC TGCT
C8_int1_for	Interner Sequenzierprimer vorwärts für pETMR1 und MR2	GACACGCCCGAGGCGGTCCG
C16_int1_for	Interner Sequenzierprimer vorwärts für pETMR4 und MR7	GGTCGTGCTCACGTTGATCCT CGGCA
C17_int1_for	Interner Sequenzierprimer vorwärts für pETMR3 und MR8	GGCAGATCGTGCTGAGCCTG ATA
Fpr1f_HindIII	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fpr mit <i>HindIII</i> , RBS und <i>NcoI</i>	CGGGAAGCTTAAGAAGGAG ATATACCATGGCTGATTGGGT AACAGGCAAAGTCAC
Fpr1r_KpnI	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Fpr mit <i>KpnI</i> und zusätzlicher <u>Deletion von <i>NdeI</i></u>	CGGGGTACCTTACCAGTAAT GCTCCGCTGTCATGTGGCC GGTCGGC
Genom_Fpr_for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Fpr mit <i>NdeI</i>	CATATGGCTGATTGGGTAACA GGCAAAGTCACTAAAGTGCA GAACTGG
Glu6P_for	Vorwärtsprimer zur Amplifikation von Glu6P DH mit <i>EcoRI</i> , RBS und <i>NcoI</i>	GAATTC AAGAAGGAGATATA CCATGGCGGTAACGCAAACA GCCCA
Glu6P_rev	Rückwärtsprimer zur Amplifikation von Glu6P DH mit <i>HindIII</i> und <i>NotI</i>	GCGGCCGCAAGCTTTTACTC AAACTCATTCCAGGAACGAC CATCA
Fpr_delHind_for	QC-Primer vorwärts zur <u>Deletion von <i>HindIII</i> in Fpr</u>	GGCAATTTACCAAGCTGGGC CTTGAAATCGACG
Fpr_delHind_rev	QC-Primer rückwärts zur <u>Deletion von <i>HindIII</i> in Fpr</u>	CGTCGATTTCAAGGCCCAGC TTGGTAAATTGCC
meg_NdeI_for	QC-Primer vorwärts zur <u>Einführung einer <i>NdeI</i> Schnittstelle in CYP106A2</u>	GCGGGAATTCCATATGAAAG AAGTTATGCAGTAAAAG
meg_NdeI_rev	QC-Primer rückwärts zur <u>Einführung einer <i>NdeI</i> Schnittstelle in CYP106A2</u>	CTTTTACTGCAATAACTTCTT TCATATGGAATCCCCGC
Adx_NdeIdel_f	QC-Primer vorwärts zur <u>Deletion von 2. <i>NdeI</i> in Adx₄₋₁₀₈</u>	AATGACATGCTTGATCTGGC CTATGGACTAACA GATAGAT
Adx_NdeIdel_r	QC-Primer rückwärts zur <u>Deletion von 2. <i>NdeI</i> in Adx₄₋₁₀₈</u>	ATCTATCTGTTAGTCCATAGG CCAGATCAAGCATGTCATT
Adx_int1_for	QC-Primer vorwärts zur <u>Korrektur der Mutation D78G in Adx₄₋₁₀₈</u>	ATCACTGATGAGGAGAATGA CATGCTTGATCTGGCCTAT
Adx_int1_rev	QC-Primer vorwärts zur <u>Korrektur der Mutation D78G in Adx₄₋₁₀</u>	ATAGGCCAGATCAAGCATGT CATTCTCCTCATCAGTGAT
QC_dC17_for	QC-Primer vorwärts zur <u>Verkürzung von CYP260A1 durch <i>NdeI</i></u>	TCCATAGCGTCTCCCATATGG ATTTCCCGCT
QC_dC17_rev	QC-Primer rückwärts zur <u>Verkürzung von CYP260A1 durch <i>NdeI</i></u>	AGCGGGAAATCCATATGGGA GACGCTATGGA

2.1.3 Plasmide

Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren mit einer kurzen Beschreibung und deren Referenzen.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pCWori_C2	pCWori ⁺ (Ap ^R) mit CYP266A1 (C-terminalem His-tag)	(Khatri 2009)
pCWori_C5	pCWori ⁺ (Ap ^R) mit CYP264A1 (C-terminalem His-tag)	(Khatri 2009)
pCWori_C8	pCWori ⁺ (Ap ^R) mit CYP109D1 (C-terminalem His-tag)	(Khatri 2009)
pCWori_C16	pCWori ⁺ (Ap ^R) mit CYP260B1 (C-terminalem His-tag)	(Khatri 2009)
pCWori_C17	pCWori ⁺ (Ap ^R) mit CYP260A1 (lange Version und C-terminalem His-tag)	(Khatri 2009)
pET11a_FldA	pET11a (Ap ^R) mit FldA	(Jenkins & Waterman 1994)
pET16_Fpr	pET16 (Ap ^R) mit Fpr (N-terminaler His-tag)	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
pETH11b1_Twin	pET17b (Ap ^R) mit humanem CYP11B1 (C-terminalem His-tag) _AdR_ Adx ₁₋₁₀₈	(Hobler 2008)
pETDuet-1	pET basierter Expressionsvektor (Ap ^R) mit zwei MCSs mit je einem T7 Promotor	(Novy <i>et al.</i> 2002)
pCDFDuet-1	pCDF-1b basierter Expressionsvektor (Sm ^R) mit zwei MCSs mit jeweils einem T7 Promotor (kompatibel zu pET- und pACYC-Vektoren)	(Held <i>et al.</i> 2003)
pACYC_FHH2.8	pACYC (Cm ^R) mit CYP106A2	(Hannemann <i>et al.</i> 2006)
pKKHC_Adx ₄₋₁₀₈	pKKHC (Ap ^R) mit Adx ₄₋₁₀₈	(Uhlmann <i>et al.</i> 1994)
pBARTwin	pCWori ⁺ (Ap ^R) mit AdR und Adx ₁₋₁₀₈	(Hannemann <i>et al.</i> 2006)
pCR4® Blunt-TOPO®	offener Vektor für Zero Blunt® Topo® PCR cloning Kit (Ap ^R)	Invitrogen (2012)

Tab. 2.3: Übersicht über die im Rahmen dieser Dissertation hergestellten Expressionsvektoren mit einer kurzen Beschreibung und dem Verweis auf deren Plasmidkarte im Kapitel Ergebnisse.

Bezeichnung	Beschreibung	Plasmidkarte
pET17b_C5	pET17b (Ap ^R) mit CYP264A1 (C-terminalem His-tag)	Abb. 3.1
pET17b_C8	pET17b (Ap ^R) mit CYP109D1 (C-terminalem His-tag)	Abb. 3.1
pET17b_C16	pET17b (Ap ^R) mit CYP260B1 (C-terminalem His-tag)	Abb. 3.1
pET17b_C17	pET17b (Ap ^R) mit CYP260A1 (lange Version und C-terminalem His-tag)	Abb. 3.1
pET22b_C17	pET22b (Ap ^R) mit CYP260A1 (lange Version und C-terminalem His-tag)	Abb. 3.44B
pET22b_ΔC17	pET22b (Ap ^R) mit CYP260A1 (kurze Version und C-terminalem His-tag)	Abb. 3.44B
pET22b_C17 _{meg}	pET22b (Ap ^R) mit CYP260A1 (kurze Version für <i>B. meg</i> optimiert und C-terminalem His-tag)	Abb. 3.44B
pETMR1	pET17b (Ap ^R) mit CYP109D1 (C-terminalem His-tag) _AdR_ Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9C

pETMR2	pET17b (Ap ^R) mit CYP109D1 (C-terminalem His-tag) _Fpr_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9D
pETMR3	pET17b (Ap ^R) mit CYP260B1 (C-terminalem His-tag) _AdR_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9C
pETMR4	pET17b (Ap ^R) mit CYP260A1 (lange Version und C-terminalem His-tag) _AdR_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9C
pETMR5	pET17b (Ap ^R) mit CYP264A1 (C-terminalem His-tag) _AdR_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9C
pETMR6	pET17b (Ap ^R) mit CYP264A1 (C-terminalem His-tag) _Fpr_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9D
pETMR7	pET17b (Ap ^R) mit CYP260A1 (lange Version und C-terminalem His-tag) _Fpr_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9D
pETMR8	pET17b (Ap ^R) mit CYP260B1 (ohne interne <i>NcoI</i> Restriktionsschnittstelle und C-terminalem His-tag) _Fpr_Adx ₁₋₁₀₈	Abb. 3.9D
pCDF_dFA	pCDFDuet-1 (Sm ^R) mit MCS1: Adx ₄₋₁₀₈ und MCS2: Fpr (ohne interne <i>NdeI</i> Restriktionsschnittstelle)	Abb. 3.44A
pET_dc17A	pETDuet-1 (Ap ^R) mit MCS1: Adx ₄₋₁₀₈ und MCS2: CYP260A1 (kurze Version für <i>B. meg</i> optimiert und C-terminalem His-tag)	Abb. 3.44C
pET_dc17GDH	pETDuet-1 (Ap ^R) mit MCS1: Glu6P-Dehydrogenase und MCS2: CYP260A1 (kurze Version für <i>B. meg</i> optimiert und C-terminalem His-tag)	Abb. 3.44D

2.1.4 Bakterienstämme

Tab. 2.4: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme mit deren Genotyp, Verwendungszweck und Referenzen.

Bezeichnung	Genotyp	Verwendungszweck	Referenz
Top10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Sm ^R) endA1 nupG	Klonierungen mit dem Zero Blunt® Topo® PCR cloning Kit (Stratagene)	Invitrogen (2012)
Top10F'	F'(lacI _q Tn10) (Tet ^R) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Sm ^R)endA1 nupG	Standardklonierungen	Invitrogen (2012)
NovaBlue	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi ⁻¹ recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15::Tn10] (Tet ^R)	Klonierungen mit pCDF Plasmiden (Sm ^R)	Novagen (2012)
BL21	F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal λ	Expression mit pCWori ⁺ Plasmiden	Stratagen (2012)
BL21(DE3)	F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal λ(DE3)	Expression mit pET bzw. pCDF Plasmiden	Stratagen (2012)
C43(DE3)	Derivat von BL21DE3 mit mind. einer uncharakterisierten Mutation	Expression mit pET bzw. pCDF Plasmiden	(Miroux & Walker 1996)

2.1.5 Kultivierung von Bakterien

2.1.5.1 Medien

Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Medien zur Kultivierung der Bakterien.

Medium	Bestandteile
TB-Medium (Terrific-Broth)	24 g/l Hefeextrakt 12 g/l Trypton 2,31 g/l KH_2PO_4 12,54 g/l K_2HPO_4 5 ml Glyzerin (C-Quelle)
M9-Medium	6 g/l Na_2HPO_4 3 g/l KH_2PO_4 0,5 g/l NaCl 1 g/l NH_4Cl (N-Quelle) 4 g/l Glucose (C-Quelle)
M9CA-Medium	wie M9 and zusätzlich: 4 g/l Casaminoacids (AS-Quelle) Spurenelemente: 2,5 mg / l EDTA 0,25 mg / l FeSO_4 0,025 mg / l ZnCl_2 0,005 mg / l CuSO_4
ZYP-Medium (Studier 2005)	7,1 g/l Na_2HPO_4 6,8 g/l KH_2PO_4 3,3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Casaminoacids (statt N-Z Amine wie in Literatur) 5052-Lösung für Autoinduktion Glycerin 5 g/l Glucose 0,5 g/l Lactose 2 g/l

Die Bestandteile der Medien wie Hefeextrakt, Trypton und Casaminoacids waren von der Firma Difco.

2.1.5.2 Übernachtskulturen

Zur Kultivierung von *E. coli* über Nacht wurde ausschließlich Nutrient Broth I (NB) Flüssigmedium (von Sifin) verwendet. Diese Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag zum Animpfen der Hauptkulturen oder zur Isolierung von DNA verwendet. Weiterhin wurden auch NB-Agarplatten verwendet, um nach Transformationen die geeigneten Zellen zu selektieren.

Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin, Streptomycin und Chloramphenicol in ihren Arbeitskonzentrationen (siehe folgende Tabelle) eingesetzt.

Tab. 2.6: Übersicht über die verwendeten Antibiotika mit deren Stockkonzentrationen und den Arbeitskonzentrationen.

Antibiotika	Stockkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicillin (Ap)	100 mg/ml in Wasser:Ethanol (1:1)	100 µg/ml
Streptomycin (Sm)	50 mg/ml in Wasser	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	70 mg/ml in Ethanol	70 µg/ml
	10 mg/ml in Ethanol	15 µg/ml zur Isolierung von Plasmiden mit pBR322 Replikationsursprung

2.1.5.3 Hauptkulturen zur Expression bzw. Biotransformation

Zur Kultivierung von *E. coli* für die rekombinante Proteinexpression mit anschließender Reinigung des Zielproteins wurde standardmäßig Terrific Broth (TB) Flüssigmedium verwendet. Für Expressionen der Proteine mit anschließender Verwendung der Zellen als Biokatalysator kamen die in Tab. 2.5 aufgeführten Medien zum Einsatz. Bei diesen Medien wurden in bestimmten Experimenten die Kohlenstoffquelle durch die Kohlenhydratlösung 5052 ersetzt um eine Autoinduktion der Zellen zu erhalten. Hierbei handelt es sich um eine speziell zusammengestellte Kohlenstoffquelle mit einer Endkonzentration im Medium von 5 g/l Glycerin, 0,5 g/l Glucose und 2 g/l Laktose. Während Glucose und Glycerin als normale Kohlenstoffquellen dienen, wird die Lactose durch die Katabolitrepression erst bei Verarmung der anderen beiden Kohlenhydrate und somit einer erhöhten Zelldichte in die Zellen aufgenommen und dort in Glucose und Galactose gespalten. Letztere induziert dann die Expression der Proteine. Da dies ohne äußeres Eingreifen geschieht, spricht man von Autoinduktion. Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin und Streptomycin in ihren Arbeitskonzentrationen verwendet (siehe Tab. 2.6). Bei allen Hauptkulturen kamen Schikanekolben zum Einsatz, wobei für 250 ml Kulturen 2 l Kolben, für 50 ml Kulturen 500 ml Kolben und für 30 ml Kulturen 300 ml Kolben verwendet wurden.

2.1.6 Lagerung der Bakterien

Zur Lagerung der Bakterien wurden die Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme mit Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die entstandenen Glycerinstocks wurden anschließend bei -80°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Methoden

2.2.1.1 Alignment der Aminosäuresequenz

Zum Vergleich der Sekundärstrukturen mehrerer Cytochrome P450 wurde das *Clustal W multiple sequence alignment* Programm (Larkin *et al.* 2007) verwendet. Zur einfacheren Analyse und graphischen Bearbeitung der erhaltenen Alignments wurde das Programm Bioedit (Hall 1999) Version 7.1.3 verwendet.

2.2.1.2 Erstellung eines Homologiemodells für CYP260A1 und Substratdockings

Zur Suche nach strukturellen Vorlagen für das Homologiemodell von CYP260A1 wurde NCBI's Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) mit dem Algorithmus blastp verwendet (Altschul *et al.* 1997), um homologe Kristallstrukturen zu der Proteinsequenz von CYP260A1 in der RCSB Protein Data Bank (www.pdb.org; (Berman *et al.* 2000), Stand Februar 2012) zu suchen. Am Ende dienten die Kristallstrukturen mit der größten Ähnlichkeit in der Proteinsequenz als Matrizen für die Modellierung mit dem automatisierten Modus von Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>; (Arnold *et al.* 2006)). Aus den Modellen wurden anschließend die Reste, welche im Bereich der postulierten SRS liegen und tatsächlich in das aktive Zentrum reichen, ermittelt und untereinander verglichen.

Die mit Swiss-Model erhaltenen Homologiemodelle wurden in einem zweiten Schritt von Dr. Michael Hutter vom Zentrum für Bioinformatik (ZBI) an der Universität des Saarlandes validiert und für das Docking von folgenden Substraten verwendet: Progesteron, 11-Deoxycorticosteron, Corticosteron, 11-Desoxycortisol, Cortisol, Cortison, 17 α -Hydroxyprogesteron, Androstendion, Dehydroepiandrosteron, Testosteron, 19-Nortestosteron, Testosteronacetat und (+)-Nootkaton.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

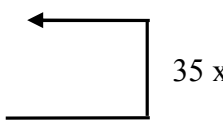
Alle molekularbiologischen Arbeiten erfolgten, sofern nicht im Weiteren beschrieben, nach Standardmethoden (Mülhardt 2008, Sambrook & Russell 2001). Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten ausschließlich von New England BioLabs Inc. und wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.1 Amplifikation von Genen

Die Gene wurden mittels PCR mit genomischer DNA von *E. coli* BL21 oder Plasmid-DNA als Matrize und den entsprechenden Primern mit den erforderlichen Restriktionsschnittstellen amplifiziert. Zur Amplifikation wurde die Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet und ein Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

X μ l DNA (100 ng genomische DNA bzw. 10 ng Plasmid)
 2,0 μ l dNTPs (5 mM)
 10,0 μ l Puffer HF (5x) oder Puffer GC (5x) für Gene aus *S. cellulosum*
 1,0 μ l Primer vorwärts (10 pmol/ μ l)
 1,0 μ l Primer rückwärts (10 pmol/ μ l)
 0,5 μ l Phusion DNA Polymerase
 auffüllen mit Wasser auf 50 μ l

Die PCR wurde in einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research Inc.) unter folgenden Bedingungen durchgeführt, wenn die Schmelztemperatur (T_m) des am niedrigsten schmelzenden Primers unter 69°C lag:

- | | | | | |
|-------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------|--|
| 1. | 98°C | für | 3 min | |
| ----- | | | | |
| 2. | 98°C | für | 10 s |  |
| 3. | $T_m+3^\circ\text{C}$ | für | 30 s | |
| 4. | 72°C | für | 30 s/kb gewünschtes PCR Produkt | |
| ----- | | | | |
| 5. | 72°C | für | 10 min | |
| 6. | 4°C | bis zum Abbruch des Programms | | |

Lag die Schmelztemperatur des am niedrigsten schmelzenden Primers über 69°C wurde eine 2 Schritt PCR durchgeführt. Hierbei fiel Schritt 3 (Anheften der Primer) weg, da 72°C für die Anlagerung der Primer an die DNA ausreichte.

2.2.2.2 Isolierung der DNA Fragmente und Ligation in den Zielvektor

Nach erfolgreicher Amplifikation wurde der PCR-Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.5.1) getrennt und das gewünschte DNA-Fragment ausgeschnitten und mit dem Kit „NucleoSpin[®] Extract II“ (Macherey-Nagel) isoliert. Anschließend wurde das Fragment mit dem „Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR cloning Kit for Sequencing“ in den pCR[™] 4Blunt-TOPO[®] Vektor zwischenkloniert. Nach erfolgreicher Überprüfung des Fragments mittels Sequenzierung durch die Firma MWG-Biotech wurde es über die angefügten Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten. Nach erneuter Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese wurde das Fragment schließlich mit dem „Fast Link[™] DNA Ligation“ Kit (Epicentre) in den offenen Zielvektor kloniert.

Die Ligation erfolgte wie die PCR in dem PTC-200 Thermocycler (MJ Research Inc.) unter folgenden Bedingungen:

1. 16°C für 15 min
2. 20°C für 15 min
3. 72°C für 15 min
4. 4°C bis zum Abbruch des Programms

Das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug dabei 1:5. Nach Dialyse des Ligationsansatzes wurde dieser mittels Elektroporation in geeignete *E. coli* Zellen eingebracht und die Klone mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung analysiert. Die somit hergestellten Vektoren sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

2.2.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Ortsgerichtete Mutagenesen analog des QuikChange[®] Site-directed Mutagenesis Protokolls (Stratagene) wurden verwendet, um Schnittstellen in den vorhandenen Plasmiden außerhalb der Gene zu ändern oder innerhalb der Gene mittels stiller Mutationen zu entfernen bzw. einzuführen. Der PCR-Ansatz mit dem Plasmid als Matrize und mit komplementären Primern, die die gewünschte Mutation enthielten, wurde wie folgt angesetzt:

- X µl DNA (10 ng Plasmid)
- 5,0 µl dNTPs (5 mM)
- 10,0 µl Puffer HF (5x) oder Puffer GC (5x) für Gene aus *S. cellulosum*
- 1,5 µl Primer vorwärts (10 pmol/µl)
- 1,5 µl Primer rückwärts (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Phusion DNA Polymerase
- auffüllen mit Wasser auf 50 µl

Die PCR wurde wiederum in einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research Inc.) durchgeführt. Im Gegensatz zu einer normalen PCR wurden 20 Zyklen verwendet. Nach Abschluss der PCR wurden dem Ansatz 1U des Restriktionsenzym *DpnI* zugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA und Bestimmung der Konzentration

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte sowohl mittels Mini-Präparationen aus 10 ml Übernachtskulturen als auch mittels Midi-Präparationen aus 100 ml Übernachtskulturen. Hierbei kamen folgende Kits zum Einsatz „NucleoSpin® Plasmid Quick Pure“ und „NucleoBond® PC100“, wobei jeweils das Protokoll für low copy Plasmide verwendet wurde. Zusätzlich ist anzumerken, dass bei Vektoren mit pBR322 Replikationsursprung (z.B. die pET-Vektoren) die Kulturen zuerst 6 h bei 37°C inkubiert wurden und die weitere Inkubation über Nacht erst nach Zugabe von 15 µg/ml Chloramphenicol (siehe Tab. 2.6) erfolgte (Sambrook & Russell 2001). Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch ermittelt. Hierbei wurde die erhaltene DNA-Lösung 1:100 mit dH₂O verdünnt und ein UV-Spektrum von 200 bis 300 nm mit Hilfe des Spektralphotometers UV-2101 PC (Shimadzu) gegen dH₂O als Referenz aufgenommen. Hierbei entsprach eine Absorption von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl bzw. die isolierte DNA-Lösung hatte eine Konzentration von 5 µg/µl.

2.2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte unter Abwandlung des Protokolls von Inoue für „Ultrakompetente Zellen“ (Inoue *et al.* 1990), wobei die Bakterien bei 30°C inkubiert wurden. Die hiermit hergestellten kompetenten Zellen wurden für die heterologen Proteinexpressionen mittels Hitzeschock transformiert. Für Klonierungsschritte wurden die Zellen mittels Elektroporation transformiert, um eine höhere Transformationseffizienz zu erhalten. Hierfür wurden die Zellen entweder vom Hersteller gekauft oder mittels einer Standardmethode (Sambrook & Russell 2001) elektrokompetent gemacht.

2.2.3 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* und Proteinreinigung

2.2.3.1 Expression der Cytochrome P450

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte mittels Hitzeschock, wobei der pCWori⁺ Expressionsvektor von CYP266A1 (siehe Tab. 2.2) in BL21 Zellen eingebracht wurde und die in dieser Arbeit erstellten pET-Vektoren (siehe Tab. 2.3) in C43(DE3) Zellen. Letztere Zellen haben die Fähigkeit, die für die pET-Vektoren notwendige T7 Polymerase herzustellen, was durch den Zusatz DE3 angezeigt wird. Nach erfolgreicher Transformation wurde mit den transformierten Zellen eine 15 ml NB-Kultur angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurde eine 250 ml TB-Hauptkultur im Volumenverhältnis 1/100 angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 1,0 bei 37°C und 85-90 Upm inkubiert (Schüttler: innova 4230 oder Infors HT Multitron). Anschließend wurden 1mM IPTG (1M Stocklösung) und 0,5 mM δ -Aminolävulinsäure (δ -Ala; 0,5 M Stocklösung) zugesetzt. IPTG diente dabei zum Starten der Expression durch Induktion der jeweiligen Promotoren und δ -Ala als Hämvorläufermolekül zur Unterstützung der Hämsynthese der Bakterien. Die Kulturen wurden anschließend 28-30 h bei 28°C und 85-90 Upm inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4500g, 30 min) vom Medium getrennt und bis zur Reinigung der Proteine bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Expression der Reduktase und des Flavodoxin A aus *E. coli*

Da die Gene der *E. coli* Fpr und des FldA ebenfalls in einem pET-Vektor eingebracht waren, wurde die Expression äquivalent zu der zuvor beschriebenen Expression der Cytochrome P450 durchgeführt, wobei hier nur 24 h und bei 30°C exprimiert wurde und keine Zugabe von δ -Ala erfolgte.

2.2.3.3 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die bei -20°C eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend in Puffer A (50mM Kaliumhydrogenphosphatpuffer, pH 7,4, mit 300 mM Natriumchlorid und 20% v/v Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) oder im Falle von Flavodoxin A in Puffer D (10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, 10% v/v Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) resuspendiert unter Verwendung der Faustregel 50-60 ml Puffer pro Zellen aus 1L Expressionskultur. Nach 5 min Rühren im Eisbad, um alle Zellen zu resuspendieren, wurden 500 μ l PSMF (10 mg/ml in iso-Propanol) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen unter weiterem Rühren im Eisbad mit Hilfe des Ultraschallgerätes (Bandelin Sonoplus H3200 mit Sonotrode TT13) 10 min lang aufgeschlossen.

Hierbei wurden eine Amplitude von 15% und eine Pulstaktung von 15 s verwendet. Anschließend wurde das Lysat durch Ultrazentrifugation bei 30000 g, 30 min (Hitachi Hitac CP 75β) von den Zelltrümmern und unlöslichen Komponenten befreit.

2.2.3.4 Puffer zur Proteinreinigung

Tab. 2.7: Übersicht über die bei der Proteinreinigung verwendeten Puffer zur Lyse und zur chromatographischen Trennung.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
Puffer A	50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 300 mM NaCl 20% v/v Glycerin	IMAC
Puffer B	50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 300 mM NaCl <u>20 mM Imidazol</u> 20% v/v Glycerin	
Puffer C	50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 300 mM NaCl <u>150 mM Imidazol</u> 20% v/v Glycerin	
Puffer D	10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% v/v Glycerin	SEC
Puffer E	10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, <u>100 mM NaCl</u> 10% v/v Glycerin	IEX
Puffer F	10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, <u>800 mM NaCl</u> 10% v/v Glycerin	

2.2.3.5 Reinigung der 6-fach „His-getagten“ Proteine

Das Zielprotein mit „His₆-tag“ (Cytochrom P450 oder Fpr) wurde bei 4°C mittels „immobilized metal ion affinity chromatography“ (IMAC) von den Fremdproteinen getrennt. Das Lysat wurde mit Hilfe der Äkta Prime (Pharmacia) auf eine TALON[®] Metal Affinity Resin (Clontech) gefüllte Säule (28 x 50 mm) mit einem Fluss von 1,5 ml/min geladen und anschließend mit 100 ml Puffer A (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, mit 300 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol und 20% v/v und Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) gewaschen. Danach wurde das Zielprotein mit 100 ml Puffer B (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, mit 300 mM Natriumchlorid, 150 mM Imidazol und 20% v/v und Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Am Ende wurde die Säule wieder mit 100 ml Lysepuffer

äquiliibriert. Die gesammelten Fraktionen wurden UV/Vis-spektroskopisch von 200 - 800 nm vermessen und anhand der spezifischen Absorption der Zielproteine im sichtbaren Bereich ausgewählt. Cytochrome P450 besitzen eine Absorption bei 420 nm (rot), Fpr bei 400 und 456 nm (gelb) und das Flavodoxin bei 369 und 464 nm (siehe auch 2.2.4.2)

Die Fraktionen mit dem gewünschten Protein wurden mittels Ultrafiltration (UF) (Millipore Amicon® Ultra Ultracel®-50K) auf mindestens 1,5 ml konzentriert und bei 4°C einer Größenausschluss-Chromatographie (SEC: „size exclusion chromatography“) unterzogen. Hierzu wurde die konzentrierte Probe mit einer peristaltischen Pumpe auf eine mit Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare) gefüllte Säule mit einem Fluss von 0,1 ml/min gezogen und anschließend mit 100 ml Puffer C (20mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 20% v/v und Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) und einem Fluss von 0,2 ml/min an der Äkta Prime eluiert. Hierbei wurden wiederum 1 ml Fraktionen gesammelt und mittels UV/Vis-Spektroskopie qualitativ vermessen.

Betrag nach der IMAC das Volumen der gesammelten Proben mehr als 10 ml, wurde alternativ zur SEC eine Dialyse in „SERVAPOR® (Serva; 21 mm Durchmesser, MWCO 12 000-14 000) Dialyseschläuchen gegen dreimal 1 l Puffer C durchgeführt und anschließend mittels UF (Millipore Amicon® Ultra Ultracel®-50K) auf das gewünschte Volumen konzentriert.

2.2.3.6 Reinigung des Flavodoxin A aus *E. coli*

Das Flavodoxin A besitzt keinen „His-tag“ und konnte somit nicht mittels IMAC gereinigt werden. Es wurde bei 4°C mittels Anionenaustausch-Chromatographie (AEX: „anion exchange chromatography“) gereinigt. Das Lysat wurde mit Hilfe der Äkta Prime (Pharmacia) auf eine Source™ 30Q (GE Healthcare) gefüllte Säule (22 x 150 mm) gefüllt mit einem Fluss von 1,5 ml/min geladen, die anschließend mit 100 ml Puffer E (10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, mit 100 mM Natriumchlorid und 10% v/v Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) gewaschen wurde. Danach wurde das Flavodoxin A mit linear ansteigender Natriumchloridkonzentration (3 mM NaCl pro min; Fluss 1,5 ml / min) bis zu Puffer F (10 mM Tris-Puffer, pH 7,4, mit 800 mM Natriumchlorid und 10% v/v Glycerin; siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) eluiert und in 4 ml Fraktionen gesammelt. Am Ende wurde die Säule wieder mit 100 ml Puffer E äquiliibriert. Die gesammelten Fraktionen wurden UV/Vis-spektroskopisch von 200 - 800 nm vermessen und anhand der spezifischen Absorption des Flavodoxins A im sichtbaren Bereich (369 und 464 nm; orange) ausgewählt.

Die Fraktionen mit Flavodoxin A wurden anschließend mittels UF auf mindestens 1,5 ml konzentriert, wie zuvor beschrieben (siehe 2.2.3.5) mittels SEC gereinigt und auf das gewünschte Volumen konzentriert.

2.2.4 UV/Vis-spektroskopische Methoden

2.2.4.1 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der Wachstumsdichte der *E. coli* Kulturen wurde die optische Dichte bei 600 nm ermittelt. Dabei wurde mit Hilfe des Spektralphotometers UV-2101 PC (Shimadzu) der Absorptionswert bei 600 nm gegen das jeweilige Medium als Referenz bestimmt.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Reduktase und Flavodoxin aus *E. coli*

Zur Bestimmung der gereinigten Redoxproteine von *E. coli* wurden ihre spezifischen Absorptionen im sichtbaren Bereich verwendet und die Konzentration anhand der Extinktionskoeffizienten (ϵ) bestimmt. Die UV-Vis Spektren wurden in Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) über einen Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm aufgenommen. Die *E. coli* Reduktase lieferte aufgrund der FAD-Domäne eine spezifische Absorptionsbande bei 456 nm ($\epsilon_{456\text{nm}} = 7100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und das Flavodoxin A aufgrund seiner FMN-Domäne eine bei 464 nm ($\epsilon_{464\text{nm}} = 8420 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Jenkins & Waterman 1994).

2.2.4.3 Bestimmung der Cytochrom P450 Konzentration

Die Konzentration von Cytochromen P450 lässt sich mit Hilfe der CO-Differenzspektroskopie (COD) nach Omura und Sato (Omura & Sato 1964a) ermitteln. Sie besitzen im reduzierten CO gebundenen Zustand eine charakteristische Absorption bei 450 nm, woher auch ihr Name kommt. Für die Bestimmung wurden die gereinigten Proteine in Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) 1:200 verdünnt und eine Spatelspitze Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zugegeben, um das Eisen im Hämring zu reduzieren. Im Anschluss erfolgte eine Aufteilung der Probe in zwei Fraktionen. Eine Fraktion diente als Referenz, die andere wurde 1 min mit CO begast und schließlich über einen Wellenbereich von 400 - 500 nm vermessen. Hierbei entsteht das für Cytochrome P450 typische CO-Differenzspektrum mit einem Maximum bei 450 nm und einem Minimum bei 420 nm. Anhand des Maximums wurde die Cytochrom P450 Konzentration mit folgender Formel bestimmt:

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

c(P450)	Cytochrom P450 Konzentration (in mM)
$\Delta A_{450-490}$	Differenz der Absorptionswerte bei 450 und 490 nm
F	Verdünnungsfaktor (200)
ε	Extinktionskoeffizient ($91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)

2.2.4.4 Ermittlung potentieller Redoxpartner mittels CO-Differenzspektroskopie

Zur Ermittlung potentieller Redoxpartner für die Cytochrome P450 unabhängig von einem Substratumsatz wurde die erste Elektronenübertragung der Redoxsysteme auf das Cytochrom P450, d.h. die Reduktion des Hämeisens (Fe^{III}), mittels CO Differenzspektroskopie betrachtet. Dafür wurden einer $0,25 \mu\text{M}$ P450 Lösung in Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) anstatt des Natriumdithionits die zu testenden Redoxpartner in verschiedenen Konzentrationen in Anwesenheit von 1 mM NADPH (10 mM Stocklösung) zugegeben. Die Probe wurde wiederum in 2 Fraktionen aufgeteilt, eine mit CO begast und jede Minute ein Differenzspektrum im Bereich von $400\text{-}500 \text{ nm}$ aufgenommen.

2.2.4.5 Ermittlung potentieller Substrate mittels Typ I-Differenzspektren

Die Suche nach Substraten erfolgte im Falle von CYP266A1 mittels Substrat induzierter Typ I-Differenzspektren. Bei der Bindung der meist hydrophoben Substrate wird der axiale Wasserligand des Hämeisens verdrängt, wobei dessen d-Elektronen vom low-spin zum high-spin Zustand wechseln. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Cytochroms P450 von 417 nm zu kleineren Wellenlängen (Jefcoate 1978). Für die Aufnahme der Spektren wurden Tandem-Küvetten verwendet (siehe Abb. 2.1). In den Kammern P_2 und R_2 befand sich eine $2,5 \mu\text{M}$ Cytochrome P450 Lösung in Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7), in den Kammern P_1 und R_1 lediglich Puffer C. Schließlich wurden $50 \mu\text{M}$ Substrat (10 mM Stocklösung) in DMSO zu den Kammern R_1 und P_2 gegeben und nach 5 min ein Spektrum gemessen.

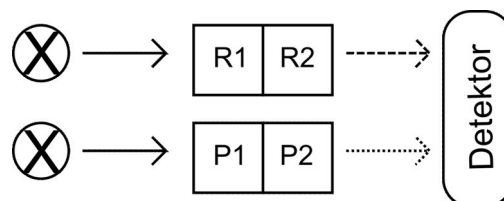


Abb. 2.1: Schema der verwendeten Tandem-Küvetten im Photometer; P = Probeküvette, R = Referenzküvette.

2.2.4.6 Cytochrom c Assay

Die meisten Ferredoxine übertragen sehr schnell Elektronen auf Cytochrome c. Die Reduktion von Cytochrome c kann bei einer Wellenlänge von 550 nm spektroskopisch verfolgt werden und eignet sich somit, um die Elektronenübertragung von Reduktasen auf Ferredoxine indirekt zu bestimmen und zu vergleichen. Hierfür wurden 0,5 μM der jeweiligen Reduktase mit 100 μM Cytochrom c (1 mM Stocklösung) und verschiedenen Konzentrationen an Ferredoxin in Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) gemischt. Nach Zugabe von 200 μM NADPH (1 mM Stocklösung) wurde die Reduktion von Cytochrom c bei 550 nm mit Hilfe des Spektralphotometers V630 (Jasco) über die Zeit bei 30°C verfolgt. Durch Auftragen der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Ferredoxinkonzentrationen konnten die K_M und V_{\max} Werte mittels Michaelis-Menten Gleichung bestimmt werden.

2.2.4.7 Bestimmung des NADPH Verbrauchs und der Kopplungseffizienz

Um die Effizienz des Elektronentransfers von NADPH über die jeweiligen Redoxproteine der Cytochrome P450 bis hin zum Substrat zu bestimmen, wurde der Verbrauch von NADPH während der Reaktion gemessen. Hierzu wurden 1 μM Cytochrom P450, 3 μM Reduktase, 20 μM Ferredoxin und 100 μM Substrat in Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) gemischt und in eine Küvette überführt. Danach wurde die Reaktion mit 100 μM NADPH (500 μM Stocklösung) gestartet und der Elektronentransfer zu der jeweiligen Reduktase durch die Reduktion der spezifischen Absorption von NADPH bei 320 nm mit Hilfe des Spektralphotometers V630 (Jasco) über die Zeit bei 30°C verfolgt. Nachdem das NADPH verbraucht war, wurde der Ansatz zweimal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mittels Vakuum-Zentrifugen-Konzentrator (Univapo 100 H von UniEquip) bis zur Trockne eingedampft und bei 4°C bis zur chromatographischen Analyse aufbewahrt. Aus der Menge an entstandenem Produkt gegenüber dem NADPH Gesamtverbrauch lässt sich die Kopplungseffizienz des jeweiligen P450-Systems ermitteln.

2.2.5 Elektrophoretische Methoden

2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von linearer, doppelsträngiger DNA wurden 50 ml 1%ige Agarosegele in 0,5 x TBE-Puffer (Sambrook & Russell 2001), versetzt mit 5 µl GelRed (Biotium) zur Anfärbung der DNA, verwendet. Zur analytischen Trennung wurden die DNA-Proben mit dem alkalischen Ladepuffer (Sambrook & Russell 2001) versetzt und in die schmalen Taschen (10er Kamm: Taschengrundfläche 1 x 4,8 mm²) gefüllt. Zur präparativen Trennung wurden die Proben erst 2-fach verdünnt (zur Verringerung der Nebeneffekte des Basispuffers in der Probe), mit dem Ladepuffer versetzt und in die breiten Taschen (6er Kamm: Taschengrundfläche 1,5 x 9 mm²) gefüllt. Die Trennung erfolgte in beiden Fällen in einer Gelelektrophoresekammer (Typ B1A von Owl) mit 0,5 TBE als Elektrophoresepuffer, wobei eine Spannung von 120 V mittels einer Spannungsquelle (Power Pac 300 von BIORAD) angelegt wurde. Die Auswertung erfolgte durch eine „Molecular Imager Chemi-DOCTM XRS+“ Station, wobei die Größen der durch UV Licht und GelRed angefärbten DNA-Fragmente anhand des mitgelaufenen „Smart Ladder“ DNA-Markers (Eurogentec) abgeglichen wurden.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der hergestellten und gereinigten Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-Page nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Hierfür wurde eine vertikale Hoefer Mighty-Small-Mini-Gel-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech) mit 15%igen SDS-Trenngelen verwendet und die Trennung bei 60 mA durchgeführt (Sambrook & Russell 2001). Nach dem Anfärben der Proteine mit Coomassie-Lösung (0,1% w/v Coomassie Blue, 10% v/v Essigsäure, 40% v/v dH₂O 50% v/v Methanol) und anschließendem Waschen des Gels mit Entfärbelösung (10% v/v Essigsäure, 45% v/v dH₂O 45% v/v Methanol) wurden die Proteingrößen mit dem mitgelaufenen Protein-Marker IV der Firma peqlab verglichen.

2.2.6 Cytochrom P450 abhängige Substratumsätze

2.2.6.1 *In vitro* Substratumsätze mit gereinigten Proteinen

Die Substratumsätze mit den Cytochromen P450 wurden in einem Gesamtvolumen von 250 μ l Puffer D (siehe 2.2.3.4 Tab. 2.7) durchgeführt, wobei Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphatdehydrogenase als NADPH regenerierendes System der Reaktion hinzugefügt wurde. Ein Reaktionsansatz enthielt jeweils 5 mM Glucose-6-phosphat (100 mM Stocklösung), 1 U Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (Roche), 1 mM $MgCl_2$ (100 mM Stocklösung), 0,5 μ M Cytochrom P450, 1,5 μ M der jeweiligen Reduktase, 10 μ M Adx₄₋₁₀₈ und 200 μ M Substrat (10 mM Stocklösung in Ethanol oder DMSO). Die Reaktion wurde mit Zugabe von 500 μ M NADPH gestartet und nach einer Reaktionszeit von 1 h bei 30°C mit 500 μ l Chloroform oder Ethylacetat gestoppt. Bei Säuren wurde zur Protonierung der Carboxylgruppe 10 μ l einer 1 M HCl-Lösung zugesetzt. Zur Trennung der wässrigen und organischen Phase wurde bei 10000 Upm, 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend erneut mit 500 μ l Lösemittel extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mittels Vakuum-Zentrifugen-Konzentrator (Univapo 100 H von UniEquip) bis zur Trockne eingedampft. Das Extrakt wurde anschließend direkt analysiert oder bei 4°C bis zur Analyse aufbewahrt (jedoch nicht länger als 4 Tage).

2.2.6.2 Ganzzellbiotransformationen in *E. coli* (*in vivo* Substratumsätze)

Für die Ganzzellbiotransformationen in *E. coli* wurden zwei verschiedene Systeme verwendet; zum einen das 1-Vektor-System basierend auf den in dieser Arbeit angefertigten, tricistronischen Expressionsvektoren der pETMR-Serie (siehe 2.1.3 Tab. 2.3) und das, für die verschiedenen CYP260A1-Gene verwendete, 2-Vektor-System bestehend aus dem pET22b Vektoren bzw. den pETDuet Vektoren in Kombination mit dem pCDF_dFA Vektor (siehe 2.1.3 Tab. 2.3). Für beide Systeme wurden zuerst die jeweiligen *E. coli* Zellen, BL21(DE3) oder C43 (DE3), mit den jeweiligen Vektoren transformiert und mit dem Transformationsansatz eine NB-Kultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden damit zwei Glycerinstocks angelegt, die nun für die folgenden *in vivo* Substratumsätze zur Verfügung standen.

Mit den gewünschten Glycerinstocks wurden vor jeder Ganzzellbiotransformation zuerst 15 ml NB-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden damit die entsprechenden Hauptkulturen im Volumenverhältnis 1 zu 100 angeimpft. Die Kulturen

wurden 3,5 h bei 37°C und 85-90 Upm inkubiert (Schüttler: innova 4230 oder Infors HT Multitron). Anschließend wurden äquivalent zur Proteinexpression 1 mM IPTG (1 M Stocklösung) und 0,5 mM δ -Ala (0,5 M Stocklösung) zugesetzt. Bei Verwendung von Medien, bei denen die Kohlenstoffquelle durch die Autoinduktionslösung 5052 ersetzt wurde, wurde nur 0,5 mM δ -Ala zugesetzt. Nach dieser Zugabe wurden die Kulturen 20,5 h bei 28°C und 85-90 Upm inkubiert. Nach dieser Zeit (24h nach Beimpfung der Hauptkulturen) wurde 200 μ M Substrat zugesetzt und nun bei 30°C und 85-90 Upm weiter inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 500 μ l Proben genommen, 2-mal mit 1 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wie zuvor beim *in vitro* Umsatz beschrieben behandelt.

Zur Herstellung größerer Mengen an Produkt wurden vier 250 ml M9CA-Hauptkulturen verwendet und statt 200 μ M 400 μ M Substrat zugesetzt. Die Kulturen wurden nach Substratzugabe 48 h bei 30°C und 85-90 Upm inkubiert, danach wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4500g, 30 min) vom Medium getrennt. Das 1 l Medium wurde 3-mal mit Chloroform im Scheidetrichter extrahiert und die vereinten organischen Phasen am Rotationsverdampfer (Rotavapor R-114 von Büchi) zur Trockne eingedampft. Die Zellen wurden mit Ethylacetat oder, im Fall der Indigoproduktion von CYP109D1, mit DMSO gewaschen, die organische Phase eingedampft und das Extrakt mit dem aus der Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen vereinigt.

2.2.7 Chromatographische Methoden

2.2.7.1 HPLC-UV Messung

Zur Probenanalyse wurde eine Jasco HPLC-Anlage der 2000er Serie verwendet. Die Wellenlänge des UV-Detektors richtete sich nach der Absorption der Analyten. Zur Trennung wurde eine RP-Säule mit einer C18ec-Nucleodur[®] 100-5 Matrix (4 x 125 mm; Macherey-Nagel) verwendet. Als Laufmittel dienten Wasser/Acetonitril Mischungen und die Proben wurden in einer 70/30 Mischung aus Wasser und Acetonitril (MeCN) gelöst. Bei Säuren als Analyten wurde dem Laufmittel 0,1% (v/v) Ameisensäure zugesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 10 oder 20 μ l und wurde bei einer Flussrate von 0,8 oder 1 ml/min mit Hilfe eines Niederdruck-Gradientensystems getrennt. Hierbei kamen 2 Gradienten (siehe Tab. 2.8) zum Einsatz, ein Gradient mit einer Laufzeit von 30 min (Gradient I, siehe) und ein Gradient mit einer Laufzeit von 15 min (Gradient II).

Tab. 2.8: Auflistung der beiden Gradienten I und II mit den jeweiligen Bedingungen.

Gradient I			Gradient II		
Flussrate	1 ml /min		Flussrate	0,8 ml /min	
Temperatur	40°C		Temperatur	40°C	
Laufmittel	A) H ₂ O + 10% (v/v) MeCN		Laufmittel	A) H ₂ O + 10% (v/v) MeCN	
	B) 100% MeCN			B) 100% MeCN	
Zeit [min]	A	B	Zeit [min]	A	B
0	70	30	0	70	30
5	70	30	1	70	30
20	20	80	9	10	90
25	20	80	10	10	90
25,5	70	30	10,1	70	30
30	70	30	15	70	30

2.2.7.2 LC-MS Messungen

Die LC-MS Messungen wurden bei zwei Kooperationspartnern durchgeführt. Zum einen wurde mittels LC-MS eine Substratsuche am CNRS en Ile-de France Sud (Gif-sur-Yvette, nahe Paris) in der Gruppe von Denis Pompon (jetzt Toulouse) durchgeführt. Dort wurde ein Waters[®] Alliance[®] HT LC/MS System verwendet. Zum zweiten wurden unter Anleitung eigenständig Messungen an der Universität des Saarlandes in der Gruppe von Prof. Dietrich Volmer bzw. Prof. Christian Huber, ausgewählte *in vitro* Substratumsätze gemessen. Hierbei kam als HPLC eine Waters[®] Alliance[®] 2695 mit Dioden-Array-Detektor 990 und direkt gekoppeltem Ionenfallen-Massenspektrometer der Firma Bruker zum Einsatz. Als Ionisation Methode wurde APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*) im positiven Modus verwendet. Hierfür mussten den Laufmittelgemischen 0,1% (v/v) Ameisensäure zugegeben werden, damit die Analyten vor der Ionisierung protoniert vorlagen. Die verwendete Säule war äquivalent zu den HPLC-UV Messungen (siehe 2.2.7.1) und es wurde zur Trennung der Gradient II verwendet.

2.2.7.3 Säulenchromatographie zur Isolierung der Produkte im mg Maßstab

Der getrocknete Extrakt der Ganzzellumsätze (siehe 2.2.6.2) wurde in Ethylacetat aufgenommen und das Umsatzgemisch aus Verunreinigungen, Substrat und Produkt mittels einer mit-Kieselgel gefüllten Säule unter erhöhtem Druck in seine Bestandteile getrennt. Als mobile

Phase kamen Mischungen zum Einsatz, die stufenweise zu einem höheren Gehalt von Ethylacetat verändert wurden bis das gereinigt Produkt von der Kieselgel Säule eluierte. Die dabei gesammelten Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (4 x 8 cm Kieselgelfolie mit Fluoreszenzindikator 254 nm; Fluka) und Hexan/Ethylacetat Mischungen als Laufmittel nochmals getrennt. Die Analyse erfolgte unter einer UV-Lampe bei 254 nm oder es wurde ein Anisaldehyd-Färbebad (2% Anisaldehyd, 1,5% Essigsäure, 5% konz. Schwefelsäure in Ethanol) zur Anfärbung der Analyten verwendet. Die gereinigtes Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer eingedampft.

2.2.7.4 Semipräparative HPLC-Trennung zur Isolierung der Produkte im mg Maßstab

Im letzten Jahr dieser Dissertation stand der Forschungsgruppe eine neue Jasco HPLC-Anlage der 2000er Plus-Serie mit Hochdruckgradienten-System zur Verfügung. Im Gegensatz zur oben genannten Anlage der 2000er-Serie (siehe Kapitel 2.2.7.1) besaß diese Anlage einen Diodearray Detektor (Jasco MD-2010 Plus) sowie einen Autosampler mit 1 ml Injektionsvolumen und der zusätzlichen Option ohne Probenverlust zu injizieren. Dies bot eine alternative Möglichkeit für die Produktisolierung gegenüber der vorher angewandten, klassischen Säulenchromatographie (siehe Kapitel 2.2.7.3). Zur Probenvorbereitung wurde, nach Abdampfen der organischen Phase, zuerst 5 ml Acetonitril und anschließend 5 ml Wasser zu dem Extrakt gegeben. Die dabei entstehende rote Suspension wurde mit einer 20 ml Spritze mit Injektionsnadel aufgezogen und mittels Acrodisc[®] PTFE Spritzenfilter (d = 0,45µm) der Firma PALL filtriert. Die dabei entstehende Lösung wurde in 1 ml Aliquots aufgeteilt und jeweils über eine semipräparative RP-Säule mit einer C18ec-Nucleodur[®] 100-5 Matrix (8 x 250 mm; Macherey-Nagel) getrennt. Die Elution erfolgte über einen Gradienten äquivalent zu Gradient II (siehe Tab. 2.8), aber mit einer Flussrate von 3,2 ml/min. Die Fraktionen wurden mit einem Advantec CHF122 SB Fraktionssammler gesammelt und das Lösemittel zuerst am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde das Produkt über Nacht unter Vakuum getrocknet.

2.2.8 NMR-Spektroskopie

Die isolierten Produkte wurden an der Universität des Saarlandes von Dr. Josef Zapp (Pharmazeutische Biologie) mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Von den Produkten wurden jeweils ~ 10 mg in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) oder Methanol (CHD_2OD) gelöst und ^1H and ^{13}C NMR-Spektren mit einem Bruker DRX 500 NMR Spektrometer aufgenommen. Alle chemischen Verschiebungen wurden relativ zu CHCl_3 bei δ 7,24 oder CHD_2OD bei δ 3,35 im ^1H NMR und CDCl_3 bei δ 77,00, oder CHD_2OD bei δ 49,3 im ^{13}C NMR angegeben. Hierbei wurde die Standardbezeichnung für δ in parts per million (ppm) verwendet. Die zweidimensionalen NMR Spektren wurden als gs-HH-COSY, gs-NOESY, gs-HSQC and gs-HMBC aufgenommen. Die Auswertung erfolgte eigenständig mit der Unterstützung von Dr. Josef Zapp.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinherstellung und Reinigung

3.1.1 Cytochrome P450 von *Sorangium cellulosum* So ce56

Die Gene der fünf zu untersuchenden Cytochrome P450 wurden im Rahmen der vorangegangenen Promotion von Dr. Yogan Khatri bereits erfolgreich aus der genomischen DNA von *Sorangium cellulosum* So ce56 amplifiziert und mit einem C-terminalen „His₆-tag“ in den Expressionsvektor pCWori⁺ kloniert (Khatri 2009, Khatri *et al.* 2011). Anschließend konnten sie nach Expression in *E. coli* BL21 erfolgreich gereinigt werden. Da die Ausbeuten für CYP109D1, CYP260A, CYP260B1 und CYP 264A1 im Gegensatz zu CYP266A1 unter 1000 nmol/l lagen, sollten in der vorliegenden Arbeit das Expressionslevel durch den Einsatz eines Expressionsvektors der pET-Serie (Novagen) und des dazu passenden Bakterienstamms *E. coli* C43(DE3) gesteigert werden. Bei diesem Expressionssystem ist das Gen des Zielproteins unter der Kontrolle eines starken T7-Promotors (Studier & Moffatt 1986), wobei die benötigte T7-RNA-Polymerase im Genom des Expressionswirtes unter Kontrolle eines lacUV5-Promotors steht (diese Stämme werden mit der Abkürzung DE3 gekennzeichnet). Der hier verwendete C43(DE3) Stamm besitzt gegenüber seinem Ursprungsstamm BL21(DE3) mindestens eine, bisher nicht näher charakterisierte Mutation, welche zu einer erhöhten Überexpression von membranständigen und globulären Proteinen führt (Miroux & Walker 1996). Die Gene von CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1 und CYP264A1 wurden mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Hind*III aus dem jeweiligen pCWori⁺ ausgeschnitten und zwischen die entsprechenden Schnittstellen in den pET17b-Expressionsvektor (siehe **Abb. 3.1**) kloniert. Nach erfolgreicher Transformation der C43(DE3) Zellen mit dem jeweiligen pET17b-Vektor erfolgte die Expressionen unter den gleichen Bedingungen wie mit den vorherigen pCWori⁺-Vektoren und den BL21 Zellen. Nach erfolgreicher Reinigung mittels IMAC und Gelfiltration wurden die Ausbeuten an aktivem Protein mittels COD-Spektren (siehe **Abb. 3.2** und **Abb. 3.4**) bestimmt und mit den in der Dissertation von Khatri beschriebenen Werten (Khatri 2009) verglichen. Hierbei konnten in allen Fällen die Ausbeuten deutlich gesteigert werden. Die höchste Steigerung konnte bei der Expression von CYP109D1 erreicht werden und betrug 87,5%. Die Ausbeuten von CYP260A1 lagen bei 1000 nmol/l, dies entsprach einer Steigerung

von 17%. Auch bei CYP260B1 und CYP264A1 wurden die Ausbeuten um 20% bzw. 25% gesteigert (siehe Tab. 3.1).

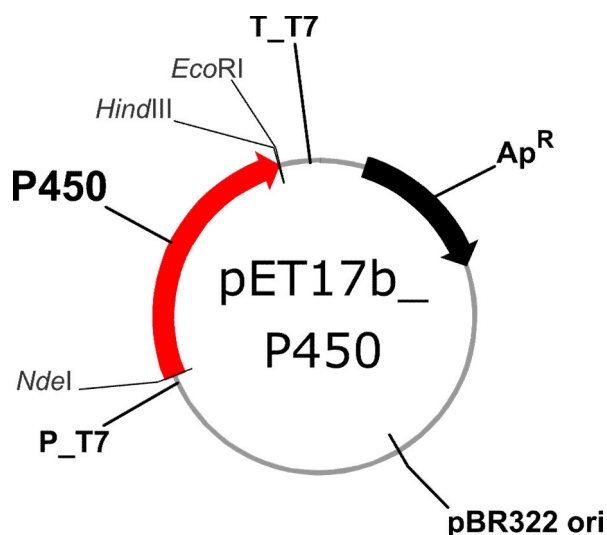


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit klonierten pET17b-Vektoren zur Expression der Cytochrome P450. Elemente für die rekombinante Proteinexpression sind der durch IPTG induzierbare T7-Promotor (P_T7) und der T7-Terminator (T_T7). Für die Plasmidreplikation ist der Replikationsursprung pBR322 ori und für die Selektion das Gen für die Ausbildung der Ampicillinresistenz (Ap^R) verantwortlich. Die Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der P450 Gene sind am 5'-Ende *NdeI* und am 3'-Ende *HindIII* und *EcoRI*.

Tab. 3.1: Übersicht und Vergleich der Ausbeuten an gereinigten Cytochromen P450 mit den pCWori⁺- (Khatri 2009) und den in dieser Arbeit eingesetzten pET17b-Expressionssystemen in BL21 bzw. C43(DE3) Zellen.

Proteinname	interne Abk.	Ausbeute mit pCWori ⁺ [nmol/l]	Ausbeute mit pET17b [nmol/l Kultur]
CYP266A1	C2	~ 1200	nicht kloniert
CYP109D1	C8	~ 400	~ 900
CYP260A1	C17	~ 850	~ 1000
CYP260B1	C16	~ 100	~ 120
CYP264A1	C5	~ 440	~ 550

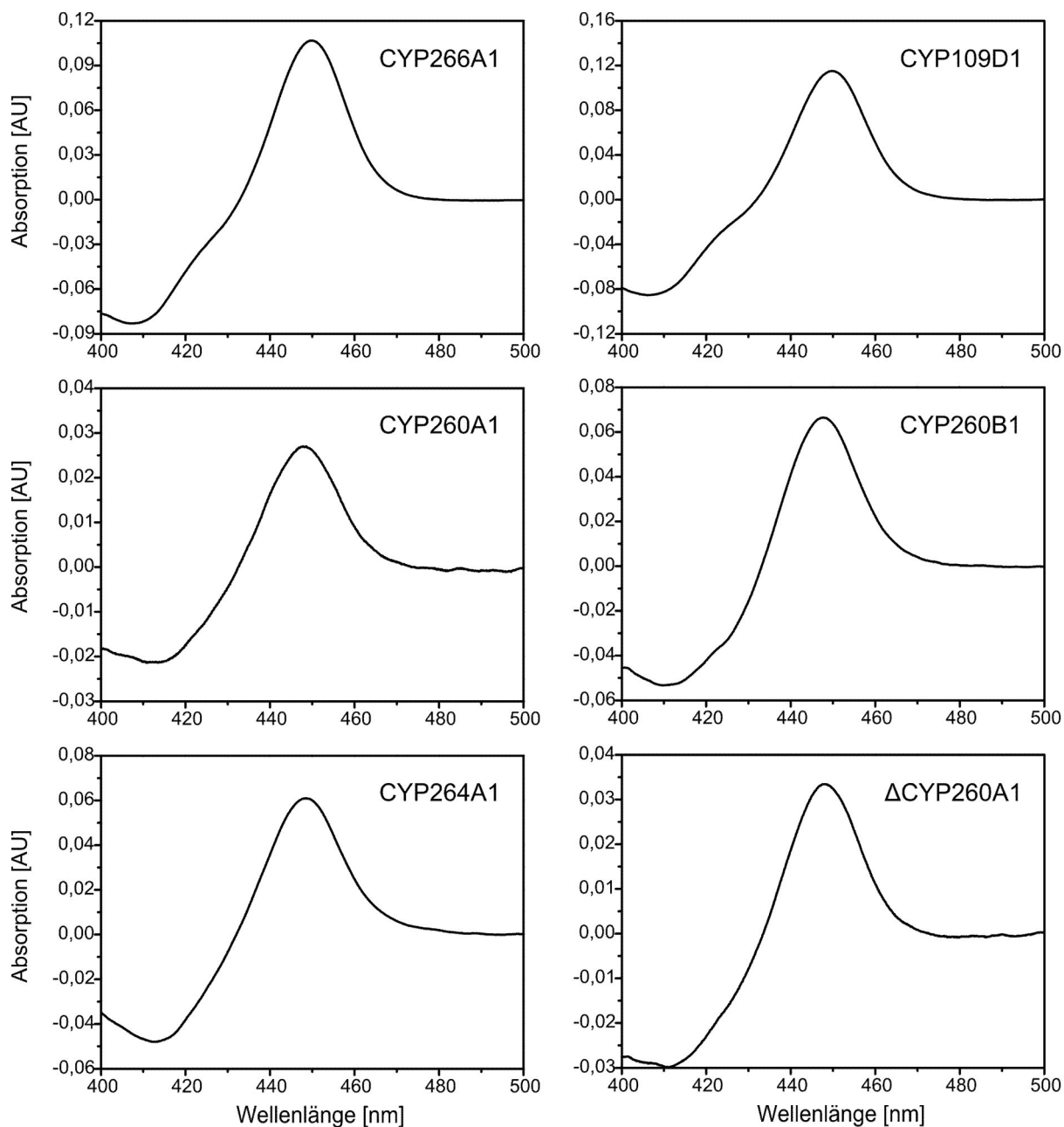


Abb. 3.2: COD-Spektren der in dieser Arbeit erfolgreich exprimierten Cytochrome P450; CYP266A1, CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1, CYP264A1 und Δ CYP260A1.

In der vorangegangenen Promotion von Dr. Yogan Khatri wurden die Cytochrome P450 anhand von Einträgen (übermittelt 08.05.2005) in der P450 Datenbank (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) ausgewählt, kloniert und exprimiert. Während der Arbeiten an der vorliegenden Promotion wurde eine Diskrepanz zwischen dem Eintrag für CYP260A1 in der P450 Datenbank und dem Eintrag in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gefunden, welcher nach Veröffentlichung des Genoms von *Sorangium cellulosum* Soce56 im Jahre 2007 (Schneiker *et al.* 2007) erschien. Hierbei wurde das Gen in der NCBI-Datenbank

150 Basen und somit 50 Aminosäuren (AS) kleiner veröffentlicht als in der P450 Datenbank, was aus einer Verschiebung des zuvor angenommenen Startcodons ATG im gleichen ORF („open reading frame“) zu dem nächstmöglichen Startcodon resultierte. Nach Entdeckung dieser Diskrepanz stellte sich die Frage, welcher Eintrag dem Enzym in der Realität entspricht, da bis dahin auch schon die Aktivität des zuerst publizierten CYP260A1 (P450 Datenbank) durch Substratumsätze gezeigt werden konnte (Ewen 2009, Khatri 2009). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das um 50AS kürzere Protein, CYP260A1 M1_S50del, hergestellt, welches zur Vereinfachung als Δ CYP260A1 (Δ C17) bezeichnet wurde. Um das Protein herzustellen, wurde zunächst eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer QC_dC17_for und QC_dC17_rev (siehe Tab. 2.1) vor das alternative Startcodon eingeführt. Anschließend wurde es, wie zuvor bei den anderen P450s beschrieben, ausgeschnitten und in einen pET-Expressionsvektor kloniert. Hierbei handelte es sich aber nicht um den pET17b-Vektor sondern um das pET22b-Konstrukt, weil zu diesem Zeitpunkt dieser Vektor aus strategischen Gründen bevorzugt wurde (siehe 3.7.2). Nach Expression und Reinigung wurden ~ 910 nmol/l Kultur aktives Δ CYP260A1 erhalten (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.4). Dies bedeutet, dass das Protein auch in der kurzen Version mit intaktem Häm und in etwa gleichen Mengen exprimiert werden kann.

3.1.2 Flavodoxinreduktase (Fpr) und Flavodoxin A (FldA) aus *E. coli*

Die Expressionsvektoren pET16_Fpr für die Flavodoxinreduktase (Girhard *et al.* 2010) und pET11a_FldA für das Flavodoxin A (Jenkins & Waterman 1994) wurden von den Arbeitsgruppen von Prof. Vlada Urlacher (Universität Düsseldorf, D) und Prof. Michael Waterman (Nashville University, US) zur Verfügung gestellt. Hierbei beinhaltet das Gen für die Reduktase einen N-terminalen „His₆-tag“ und wurde nach erfolgreicher Expression in C43(DE3) Zellen genauso wie die Cytochrome P450 gereinigt. Das Flavodoxin A wurde wie die Reduktase exprimiert, wobei mangels „His₆-tag“ keine Reinigung mittels „IMAC“ möglich war. Aus diesem Grund wurde ein starker Anionenaustauscher (Q, quartäres Ammoniumion als funktionelle Gruppe) mit anschließender Gelfiltration verwendet. Beide Proteine zeigten im sichtbaren Bereich ihre charakteristischen Spektren (Jenkins & Waterman 1994) mit den Absorptionsmaxima 400 und 456 nm bei der Flavodoxinreduktase bzw. 369 nm und 464 nm bei Flavodoxin A. Über die Spektren wurden auch die Ausbeuten an gereinigtem Protein bestimmt. Diese betragen ~ 920 nmol/l Kultur bei der Reduktase und ~ 510 nmol/l Kultur bei

dem Flavodoxin (siehe Abb. 3.3). Die Reinheit wurde wie bei den Cytochromen P450 mittels SDS-Page ermittelt und betrug über 98% (siehe Abb. 3.4).

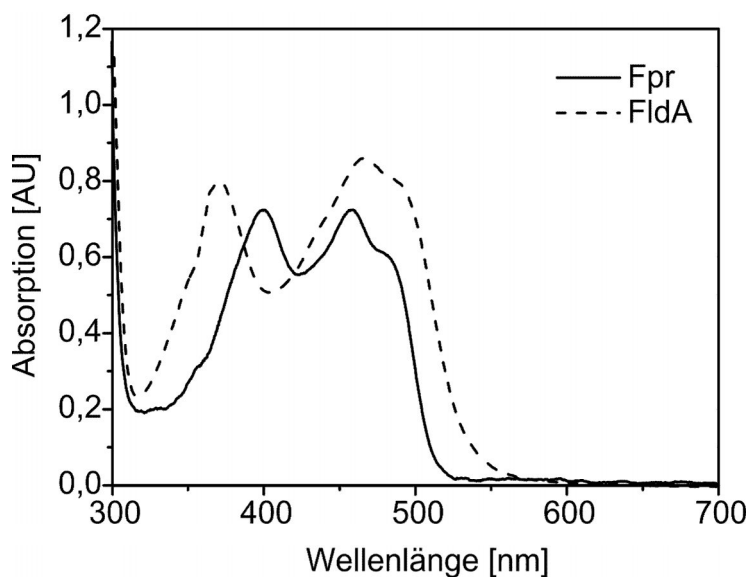


Abb. 3.3: Vis-Spektren der Flavodoxinreduktase (Fpr) und des Flavodoxin A (FldA); erkennbar sind die charakteristischen Absorptionsmaxima der Fpr bei 400 und 456 nm bzw. der Maxima des FldA bei 369 und 464 nm.

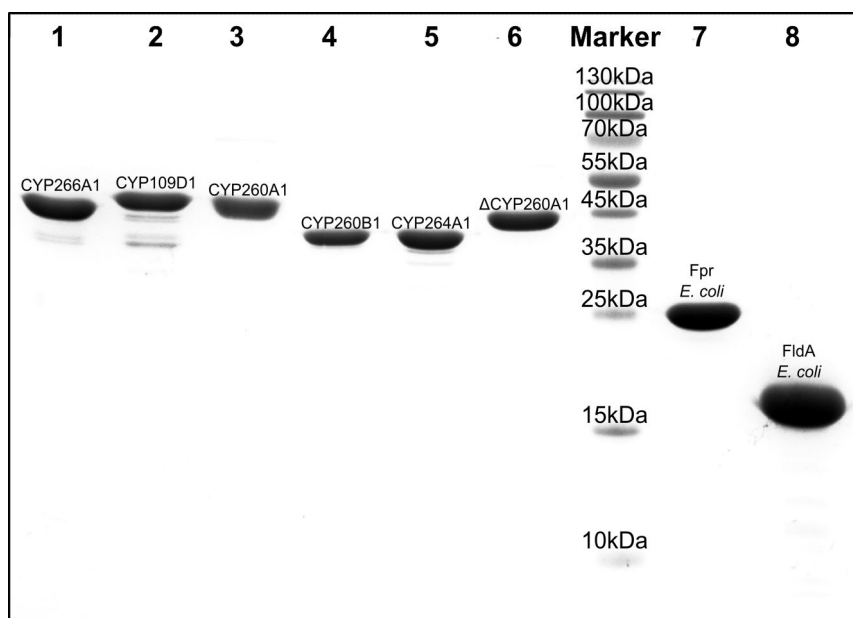


Abb. 3.4: Bild der Coomassie Blau gefärbten SDS-PAGE mit den in der Arbeit gereinigten Proteinen: CYP266A1 (Spur 1); CYP109D1 (Spur 2), CYP260A1 (Spur 3), CYP260B1 (Spur 4), CYP264A1 (Spur 5), ΔCYP260A1 (Spur 6) Proteinmarker mit Beschriftung, Fpr aus *E. coli* (Spur 7) und Flavodoxin A (FldA) aus *E. coli* (Spur 8).

3.2 Charakterisierung von CYP266A1

CYP266A1 ist wie schon in Kapitel 3.1.1 gezeigt ein leicht und in hohen Ausbeuten exprimierbares Cytochrom P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56. In der Arbeit von Khatri wurden aber neben der erfolgreichen Expression keine weiteren Untersuchungen mit diesem P450 gemacht (Khatri 2009). Später konnte die Bindung der Fettsäuren Myristinsäure (001)^a, Palmitinsäure (002) und Laurinsäure (065), im aktiven Zentrum von CYP266A1 gezeigt werden, wobei ein Substratumsatz mit Hilfe der autologen Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 in Kombination mit ihrer Reduktase FdR_B nicht erreicht werden konnte (Khatri *et al.* 2010b). Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit zunächst andere mögliche Redoxpartner gesucht werden und nach erfolgreicher Identifizierung neuer Substrat eine CYP266A1 Katalyse ermöglicht werden.

3.2.1 Redoxpartneridentifizierung

Neben der bereits erwähnten Ferredoxinen Fdx2 und Fdx8 wurden in dieser Arbeit nun auch die anderen Ferredoxine aus dem Ursprungsorganismus, *Sorangium cellulosum* So ce56, in Kombination mit ihren möglichen Reduktasen FdR_A und FdR_B getestet. Außerdem kamen auch die im Institut von Prof. Bernhardt vorhandenen heterologen Redoxsysteme zum Einsatz. Da keine Substratumsätze für CYP266A1 beschrieben waren, wurde zuerst der Elektronentransfer der Redoxproteine auf das Hämeisen mittels CO-Differenzspektroskopie zur Bestimmung der Redoxpartner verfolgt. Innerhalb von 15 min konnten bei keiner Kombination eine Reduktion des Hämeisens durch CO Bindung festgestellt werden (siehe Tab. 3.2). Erst nach 15 min konnten bei 3 Kombinationen eine Absorption bei 450 nm und somit eine Reduktion festgestellt werden, nämlich bei den schon bekannten autologen Redoxpartnern Fdx2 und Fdx8 in Kombination mit FdR_B und dem heterologen Redoxsystem von *E. coli*, Fpr und FldA. Das Maximum der Reduktion stellte sich in allen drei Fällen bei 30 min ein. Für die folgenden Substratumsätze wurden daher diese Redoxsysteme eingesetzt.

a dreistellige Nummerierung bzw. Codierung der als Substrate getesteten Verbindungen zum Nachschlagen der Strukturformeln im Anhang

Tab. 3.2: Ergebnis der Redoxpartnersuche für CYP266A1 mittels CO-Differenzspektroskopie. Die erhaltenen Absorptionswerte bei 450 nm wurden mit den mit Natriumdithionit erreichten Werten verglichen. Je nach Kombination der Redoxproteine wurden verschiedene Verhältnisse gegenüber CYP266A1 eingesetzt.

Kombination Red / Fdx (Fld)		Verhältnis Red:Fdx(Fld):CYP266A1	Absorption bei 450nm [%] gegenüber Na ₂ S ₂ O ₄
Autologe Redoxpartner aus <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56			
FdR_A	Fdx1	3:10:1	kein Signal
	Fdx2	3:10:1	kein Signal
	Fdx3	3:10:1	kein Signal
	Fdx5	3:10:1	kein Signal
	Fdx8	3:10:1	kein Signal
FdR_B	Fdx1	3:10:1	kein Signal
	Fdx2	3:10:1	~ 72% (nach 30 min)
	Fdx3	3:10:1	kein Signal
	Fdx5	3:10:1	kein Signal
	Fdx8	3:10:1	~ 76% (nach 30 min)
Heterologe Redoxpartner			
AdR (<i>B. taurus</i>)	Adx (<i>B. taurus</i>)	3:40:1	kein Signal
	Adx ₄₋₁₀₈ (<i>B. taurus</i>)	3:40:1	kein Signal
	AdxS112W (<i>B. taurus</i>)	3:40:1	kein Signal
	etpI ^{fd} (<i>S. pombe</i>)	3:40:1	kein Signal
	EtpI ^{fd} (516–618) (<i>S. pombe</i>)	3:40:1	kein Signal
Fpr (<i>E. coli</i>)	FldA (<i>E. coli</i>)	10:50:1	~ 54% (nach 30 min)
	Cdx (<i>C. braakii</i>)	3:40:1	kein Signal

3.2.2 Identifizierung potentieller Substrate mittels Typ I-Spektren

Da mit den publizierten Redoxpartnern FdR_B in Kombination mit Fdx2 und Fdx8 bisher keine Umsätze mit den potentiellen Substraten Myristinsäure (001), Palmitinsäure (002) und Laurinsäure (065) erreicht werden konnten (Khatri *et al.* 2010b), wurde die Identifizierung von möglichen Substraten zunächst nicht direkt per *in vitro* Umsatz durchgeführt, sondern es wurde die Bindung der Substanzen im aktiven Zentrum von CYP266A1 mittels Typ I-Spektren betrachtet. Hierbei handelt es sich um eine spektroskopische Verschiebung der 417 nm Absorption des Cytochroms P450, welche durch die Bindung des Substrates und Verdrängung des axialen Wasserliganden am Hämeisen induziert wird. Als mögliche Substrate wur-

den aus der allgemeinen Substanzbibliothek (siehe Anhang 6) nun verschiedene Verbindungen ausgesucht und überprüft (siehe Tab. 3.3), ob sie eine Typ I-Verschiebung bei CYP266A1 induzieren. Es zeigte sich, dass vor allem Terpensäuren, wie Abietinsäure (009), Enoxolon (014) und Oleanolsäure (018), als auch kleinere Isoprenoide mit nur einer Carbonylgruppe wie (+)-Nootkaton, α -Ionon (037) und β -Ionon (038) eine Typ I Verschiebung von CYP266A1 induzieren. Bei 9 Verbindungen konnte nicht sicher eine Verschiebung festgestellt werden, da die Absorptionswerte nicht deutlich aus dem Rauschen des Spektrophotometers hervortraten. Insgesamt wurden neben den bekannten Fettsäuren somit 40 neue Verbindungen getestet, wobei neben den drei bekannten Substanzen 10 weitere als potentielle Substrate in Frage kommen. Von diesen sollten nun 9 (alle bis auf die Fettsäuren) mit den zuvor ermittelten Redoxsystemen (siehe 3.2.1) FdR_B/Fdx2, FdR_B/Fdx8 und Fpr/FldA umgesetzt werden. Hierbei wurden 0,5 μ M CYP266A1 (siehe 2.2.6.1) und passend hierzu die verschiedenen Redoxpartner in den gleichen Verhältnissen wie in Tab. 3.2 eingesetzt. Leider konnte bei allen 9 Substraten mit den 3 Redoxsystemen kein Umsatz festgestellt werden. Es wurde also kein neues Substrat identifiziert.

Tab. 3.3: Übersicht über die mittels TYP I Verschiebung überprüften Verbindungen mit CYP266A1; positive Ergebnisse sind mit einem Pluszeichen, negative mit einem Minuszeichen und unsichere mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Verbindung (Nr.)	Stoffklasse	Typ I Verschiebung
Palmitinsäure (001) (Khatri <i>et al.</i> 2010b)	Fettsäure	+
Myristinsäure (002) (Khatri <i>et al.</i> 2010b)	Fettsäure	+
4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin (004)	O-Heterozyklus	?
Pyrenbutansäure (005)	Polyaromat	+
Ursolsäure (006)	Triterpensäure	-
Betulinsäure (007)	Triterpensäure	-
Indol (008)	N-Heterozyklus	?
Abietinsäure (009)	Diterpensäure	+
11-Ketoboswelliasäure (010)	Triterpensäure	?
Acetylketoboswelliasäure (011)	Triterpensäure	-
Enoxolon (014)	Triterpensäure	+
Östron (015)	C18-Steroid	-
Cortison (016)	C21-Steroid	-
11-Deoxycorticosteron (017)	C21-Steroid	-
Oleanolsäure (018)	Triterpensäure	+
Androstendion (019)	C19-Steroid	-

Progesteron (020)	C21-Steroid	?
Isolongifolen-9-on (021)	Sesquiterpen	+
Tolbutamid (022)	Wirkstoff	-
7-Methoxy-3-Phenyl-Cumarin (023)	O-Heterozyklus	?
(+)-Nootkaton (025)	Sesquiterpen	+
Cumarin (026)	O-Heterozyklus	?
Zimtsäure (027)	Aromat	-
Flavon (029)	O-Heterozyklus	+
7-Ethoxy-Cumarin (031)	O-Heterozyklus	-
Ethisteron (032)	Wirkstoff	?
3-Indolbuttersäure (034)	N-Heterozyklus	-
3-Indolpropansäure (035)	N-Heterozyklus	-
α -Ionon (037)	Norisopren	+
β -Ionon (038)	Norisopren	+
Testosteron (040)	C19-Steroid	-
1-Napthoesäure (044)	Aromat	-
2-Napthoesäure (045)	Aromat	-
Pyren (047)	Polyaromat	-
Mifepriston (058)	Wirkstoff	-
Melengestriol Acetat (059)	Wirkstoff	?
Tryptophan (060)	Aminosäure	-
7-Methoxy-4-Methyl-Cumarin (062)	O-Heterozyklus	?
7-Methoxy-4-Trifluoromethyl-Cumarin (063)	O-Heterozyklus	-
Pyrenbutanol (064)	Polyaromat	-
Laurinsäure (065) (Khatri <i>et al.</i> 2010b)	Fettsäure	+
Stearinsäure (066)	Fettsäure	+
Erythromycin (070)	Antibiotika	-

3.3 Substratidentifizierung für CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1, CYP264A1 und Δ CYP260A1

Für die P450s CYP109D1, CYP260A1 und CYP264A1 wurden von Herrn Dr. Khatri Redoxpartner identifiziert, die das Hämeisen reduzieren (Khatri 2009, Khatri *et al.* 2010b). Er konnte weiterhin zeigen, dass das System bestehend aus AdR und Adx₄₋₁₀₈ effizienter als das System bestehend aus den homologen Redoxpartnern ist und konnte mit CYP109D1 und CYP260A1 schon eine Reihe identifizierter Substrate umsetzen (siehe Einleitung 1.4). Für die Suche nach Substraten konnten aus diesem Grund das AdR - Adx₄₋₁₀₈ Redoxsystem eingesetzt werden, um direkt mittels *in vitro* Umsätzen neue Substrate aus der allgemeinen Substanzbibliothek und der Bibliothek von Gif-sur-Yvette (siehe Anhang 6 und 6.2) zu identifizieren. Für CYP260B1 und Δ CYP260A1 ging man davon aus, dass aufgrund der Ähnlichkeit zum CYP260A1 ebenfalls AdR und Adx₄₋₁₀₈ als Redoxpartner fungieren können.

3.3.1 Identifizierung neuer Substrate für CYP109D1

CYP109D1 kann mit AdR und Adx₄₋₁₀₈ als Redoxpartner verschiedene Fettsäuren umsetzen, wie Myristinsäure (001), Palmitinsäure (002) und Laurinsäure (065) (Khatri *et al.* 2010b). Auch die Sesquiterpene Geraniol (068), Nerol (069) und R(+)-Limonen (42), sowie die Norisoprenoide α -Ionon (037) und β -Ionon (038) werden von CYP109D1 umgesetzt (Khatri 2009, Khatri *et al.* 2010a). Das Ziel dieser Arbeit war es nun für CYP109D1 weitere Substrate zu finden, da bis dahin nur Fettsäuren, Mono- und Sesquiterpene untersucht wurden. Hierfür wurden vor allem Heterozyklen und steroidale Substanzen getestet. Insgesamt wurden 45 Substanzen, darunter die bekannten Substrate α -Ionon (037) und β -Ionon (038) als Positivkontrollen, getestet und mittels HPLC analysiert (siehe Tab. 3.4). Neben den bekannten Substraten konnten aber keine weiteren Substratumsätze beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden für die späteren Ganzzellumsätze α -Ionon (037) als Modellsubstrat genommen.

Tab. 3.4: Übersicht über die in den CYP109D1-abhängigen *in vitro* Umsätzen getesteten Verbindungen aus der allgemeinen Substanzbibliothek und der Bibliothek von Gif-sur-Yvette. Substrate sind mit einem Pluszeichen und die Substanzen, die nicht umgesetzt wurden, mit einem Minuszeichen gekennzeichnet.

Verbindung (Nr.)	Stoffklasse	Umsatz
Santonin (003)	Sesquiterpen	-
4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin (004)	O-Heterozyklus	-
Indol (008)	N-Heterozyklus	-
Abietinsäure (009)	Diterpensäure	-
11-Ketoboswelliasäure (010)	Triterpensäure	-
Acetylketoboswelliasäure (011)	Triterpensäure	-
Chinolin (012)	N-Heterozyklus	-
Corticosteron (013)	C21-Steroid	-
Enoxolon (014)	Triterpensäure	-
Östron (015)	C18-Steroid	-
Cortison (016)	C21-Steroid	-
11-Deoxycorticosteron (017)	C21-Steroid	-
Androstendion (019)	C19-Steroid	-
Progesteron (020)	C21-Steroid	-
(+)-Nootkaton (025)	Sesquiterpen	-
Cumarin (026)	O-Heterozyklus	-
Zimtsäure (027)	Aromat	-
Flavon (029)	O-Heterozyklus	-
3-Indolbuttersäure (034)	N-Heterozyklus	-
3-Indolpropansäure (035)	N-Heterozyklus	-
α -Ionon (037) (Khatri <i>et al.</i> 2010a)	Norisopren	+
β -Ionon (038) (Khatri <i>et al.</i> 2010a)	Norisopren	+
Testosteron (040)	C19-Steroid	-
1-Napthoesäure (044)	Aromat	-
2-Napthoesäure (045)	Aromat	-
7-Methoxy-4-Methyl-Cumarin (062)	O-Heterozyklus	-
7-Methoxy-4-Trifluor-Cumarin (063)	O-Heterozyklus	-
Thionin Acetat (G02)	Fettsäure	-
Vanilin (G03)	Aromat	-
Warfarin (G04)	O-Heterozyklus	-
4-Acetamidobenzaldehyd (G05)	Aromat	-
Berberin (G06)	Alkaloid	-
p-Anisoin (G07)	Aromat	-
Chlorzoxazon (G08)	Heterozyklus	-
Katechin (G09)	O-Heterozyklus	-
α -Naphthoflavon (G14)	O-Heterozyklus	-
β -Naphthoflavon (G15)	O-Heterozyklus	-

Biochanin (G17)	O-Heterozyklus	-
Hesperitin (G20)	O-Heterozyklus	-
6-Methylflavon (G21)	O-Heterozyklus	-
Apigenin (G24)	O-Heterozyklus	-
Genistein (G25)	O-Heterozyklus	-
Quercetin (G26)	O-Heterozyklus	-
Daidzein (G27)	O-Heterozyklus	-
Kämpferol (G28)	O-Heterozyklus	-

3.3.2 Substratidentifizierung für CYP264A1

Für CYP264A1 konnte zwar die erste Elektronenübertragung von AdR und Adx₄₋₁₀₈ mittels CO-Differenzspektroskopie bereits gezeigt werden (Khatri *et al.* 2010b). Nun aber sollten auch Substratumsätze erfolgen, was bisher noch nicht möglich war. Es wurden aus der Substanzbibliothek 51 Substrate getestet (siehe Tab. 3.5). Hierbei konnte bei den HPLC-Analysen ein geringer Umsatz (unter 1%) von Flavanon (G11) gezeigt werden, welcher aber aufgrund der geringen Effizienz nicht weiterverfolgt wurde. Nur das Substrat 4-Methyl-3-Phenylcumarin (04) konnte effizient von CYP264A1 umgesetzt werden.

Tab. 3.5: Übersicht über die in den CYP264A1-abhängigen *in vitro* Umsätzen getesteten Verbindungen aus der allgemeinen Substanzbibliothek und der Bibliothek von Gif-sur-Yvette. Substrate sind mit einem Pluszeichen und die Substanzen, die nicht umgesetzt wurden, mit einem Minuszeichen gekennzeichnet.

Verbindung (Nr.)	Stoffklasse	Umsatz
Santonin (003)	Sesquiterpen	-
4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin (004)	O-Heterozyklus	+
Indol (008)	N-Heterozyklus	-
Abietinsäure (009)	Diterpensäure	-
11-Ketoboswelliasäure (010)	Triterpensäure	-
Acetylketoboswelliasäure (011)	Triterpensäure	-
Enoxolon (014)	Triterpensäure	-
11-Deoxycorticosteron (017)	C21-Steroid	-
Androstendion (019)	C19-Steroid	-
Progesteron (020)	C21-Steroid	-
(+)-Nootkaton (025)	Sesquiterpen	-
Cumarin (026)	O-Heterozyklus	-
Zimtsäure (027)	Aromat	-

Flavon (029)	O-Heterozyklus	-
7-Ethoxy-Cumarin (031)	O-Heterozyklus	-
3-Indolbuttersäure (034)	N-Heterozyklus	-
3-Indolpropansäure (035)	N-Heterozyklus	-
Testosteron (040)	C19-Steroid	-
1-Napthoesäure (044)	Aromat	-
2-Napthoesäure (045)	Aromat	-
7-Methoxy-4-Methyl-Cumarin (062)	O-Heterozyklus	-
7-Methoxy-4-Trifluor-Cumarin (063)	O-Heterozyklus	-
Piperidin (G01)	N-Heterozyklus	-
Thionin Acetat (G02)	Fettsäure	-
Vanilin (G03)	Aromat	-
Warfarin (G04)	O-Heterozyklus	-
4-Acetamidobenzaldehyd (G05)	Aromat	-
Berberin (G06)	Alkaloid	-
p-Anisoin (G07)	Aromat	-
Chlorzoxazon (G08)	Heterozyklus	-
Katechin (G09)	O-Heterozyklus	-
7-Hydroxyflavon (G10)	O-Heterozyklus	-
Flavanon (G11)	O-Heterozyklus	+
3,7-Dihydroxyflavon (G12)	O-Heterozyklus	-
Chrysin (G13)	O-Heterozyklus	-
α -Naphthoflavon (G14)	O-Heterozyklus	-
β -Naphthoflavon (G15)	O-Heterozyklus	-
3-Hydroxyflavon (G16)	O-Heterozyklus	-
Biochanin (G17)	O-Heterozyklus	-
6-hydroxyflavon (G18)	O-Heterozyklus	-
6-methoxyflavon (G19)	O-Heterozyklus	-
Hesperitin (G20)	O-Heterozyklus	-
6-Methylflavon (G21)	O-Heterozyklus	-
Apigenin (G24)	O-Heterozyklus	-
Genistein (G25)	O-Heterozyklus	-
Quercetin (G26)	O-Heterozyklus	-
Daidzein (G27)	O-Heterozyklus	-
Kämpferol (G28)	O-Heterozyklus	-
2-Acetamidfluorene (G29)	O-Heterozyklus	-

4-Methyl-3-Phenylcumarin (004) wurde hierbei spezifisch von CYP264A1 in nur ein Produkt umgesetzt (siehe Abb. 3.5). Das Produkt besaß in der HPLC-Analyse eine Retentionszeit t_R von 5,7 min, während das Substrat nach einer Retentionszeit t_R von 8,5 min eluierte.

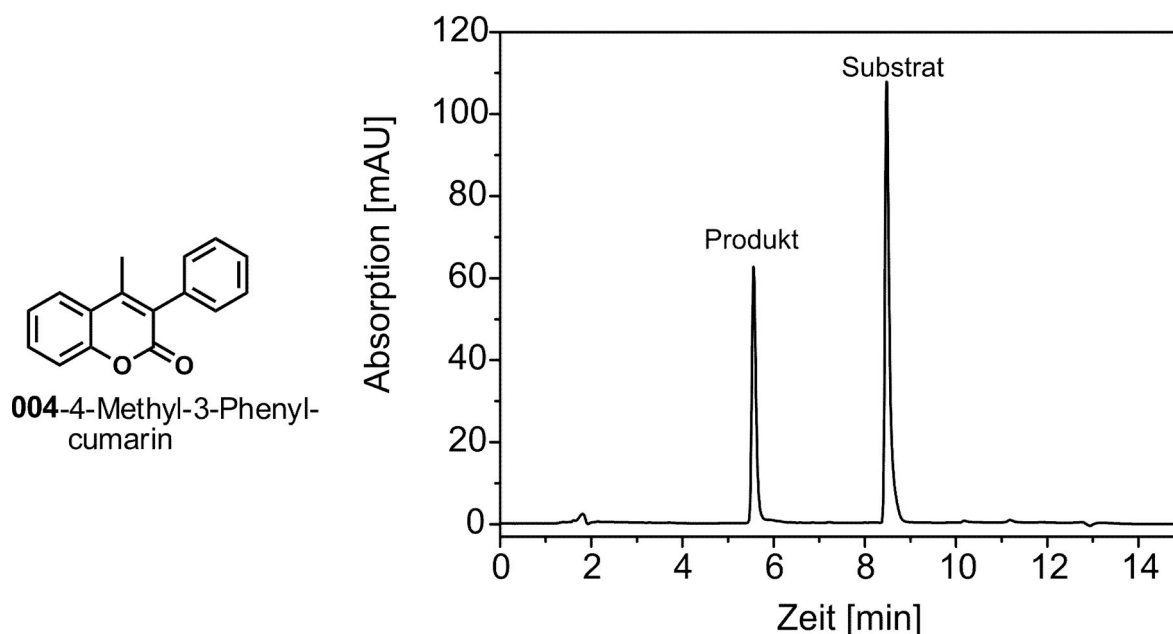


Abb. 3.5: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) des CYP264A1-abhängigen Umsatzes mit 4-Methyl-3-Phenylcumarin (04) als Substrat; UV-Detektion bei 280 nm.

3.3.3 Identifizierung neuer Substrate und Vergleich der Produktmuster für die Mitglieder der CYP260 Familie

Für die Mitglieder der CYP260 Familie, CYP260A1, Δ CYP260A1 und CYP260B1, wurden, wie zuvor für CYP109D1 und CYP264A1, Substrate gesucht, indem *in vitro* Umsätze mit AdR und Ad_{x4-108} als Redoxpartner durchgeführt wurden. Da bereits 11-Deoxycorticosteron (017), Progesteron (020) und (+)-Nootkaton (025) als Substrate für CYP260A1 bekannt waren (Khatri 2009), wurden vor allem steroidale Strukturen getestet (siehe Tab. 3.6). Hierbei konnten aus den 29 erstmals getesteten Verbindungen 19 neue Substrate für CYP260A1 gefunden werden. Von diesen wurde 17α -Hydroxyprogesteron (054), Androstendion (019), Testosteron (040) und das schon beschriebene Progesteron (020), ausgesucht, um die Umsätze mit der verkürzten Mutante Δ CYP260A1 zu vergleichen. Bei den Chromatogrammen (siehe Abb. 3.6) kann man erkennen, dass es keinen Unterschied der beiden CYP260A1 Formen gibt. Beide setzen Progesteron (020) sehr unselektiv um (Abb. 3.6 A), wohingegen das 17α -hydroxylierte Progesteron (054) selektiv umgesetzt wird (Abb. 3.6 B). Auch die kleineren

Substrate Androstendion (019) und Testosteron (040) werden selektiv in ein Hauptprodukt umgesetzt (Abb. 3.6 C & D).

Für CYP260B1 waren bislang keine Substrate bekannt. Deshalb wurden ähnliche Substrate wie bei CYP260A1 überprüft. Es wurden insgesamt 26 Substanzen getestet, von denen 16 umgesetzt wurden. Dabei handelte es sich um die gleichen Substrate, die auch schon CYP260A1 umsetzen konnte (siehe Tab. 3.6), jedoch waren die Reaktionen bei CYP260B1 allesamt sehr unselektiv (siehe Abb. 3.7). Im Gegensatz zu CYP260A1 erhielt man mit CYP260B1 nicht nur für Progesteron (020), sondern auch für 17α -Hydroxyprogesteron (054), Androstendion (019) und Testosteron (040) kein Hauptprodukt.

Tab. 3.6: Übersicht über die in den *in vitro* Umsätzen mit CYP260A1, Δ CYP260A1 und CYP260B1 getesteten Verbindungen aus der allgemeinen Substanzbibliothek; positive Ergebnisse sind mit „+“, negative mit „-“ und nicht getestete Verbindungen mit „/“ gekennzeichnet.

Verbindung (Nr.)	Stoffklasse	CYP260A1	Δ CYP260A1	CYP260B1
4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin (004)	O-Heterozyklus	-		-
Indol (008)	N-Heterozyklus	-	/	-
Abietinsäure (009)	Diterpensäure	-	/	-
11-Ketoboswelliasäure (010)	Triterpensäure	-	/	-
Acetylketoboswelliasäure (011)	Triterpensäure	-	/	-
Corticosteron (013)	C21-Steroid	+	/	+
Enoxolon (014)	Triterpensäure	-	/	-
Östron (015)	C18-Steroid	+	/	/
Cortison (016)	C21-Steroid	+	/	+
11-Deoxycorticosteron (017)	C21-Steroid	+ (Khatri 2009)	/	+
Androstendion (019)	C19-Steroid	+	+	+
Progesteron (020)	C21-Steroid	+ (Khatri 2009)	+	+
Isolongifolen-9-on (021)	Sesquiterpen	+	/	+
(+)-Nootkaton (025)	Sesquiterpen	+ (Khatri 2009)	/	+
Cumarin (026)	O-Heterozyklus	-	-	-
Flavon (029)	O-Heterozyklus	-	-	-
17α -Methyltestosteron (033)	C19-Steroid	+	/	+
α -Ionon (037)	Norisopren	+	/	+
Testosteron (040)	C19-Steroid	+	+	+
1-Napthoesäure (044)	Aromat	-	/	-
2-Napthoesäure (045)	Aromat	-	/	-
7-Methoxytestosteron (048)	C19-Steroid	+	/	+

3-Methoxyöstron (049)	C18-Steroid	+	/	/
19-Norandrostendion (050)	C19-Steroid	+	/	+
β -Estradiol (051)	C18-Steroid	+	/	/
Cortisol (052)	C21-Steroid	+	/	/
11-Deoxycortisol (053)	C21-Steroid	+	/	/
17 α -Hydroxyprogesteron (054)	C21-Steroid	+	+	+
Dehydroepiandrosteron (056)	C19-Steroid	+	/	/
19-Nortestosteron (057)	C19-Steroid	+	/	+
11-Ketoandrostendion (061)	C19-Steroid	+	/	/
Testosteron Acetat (067)	C19-Steroid	+	/	+

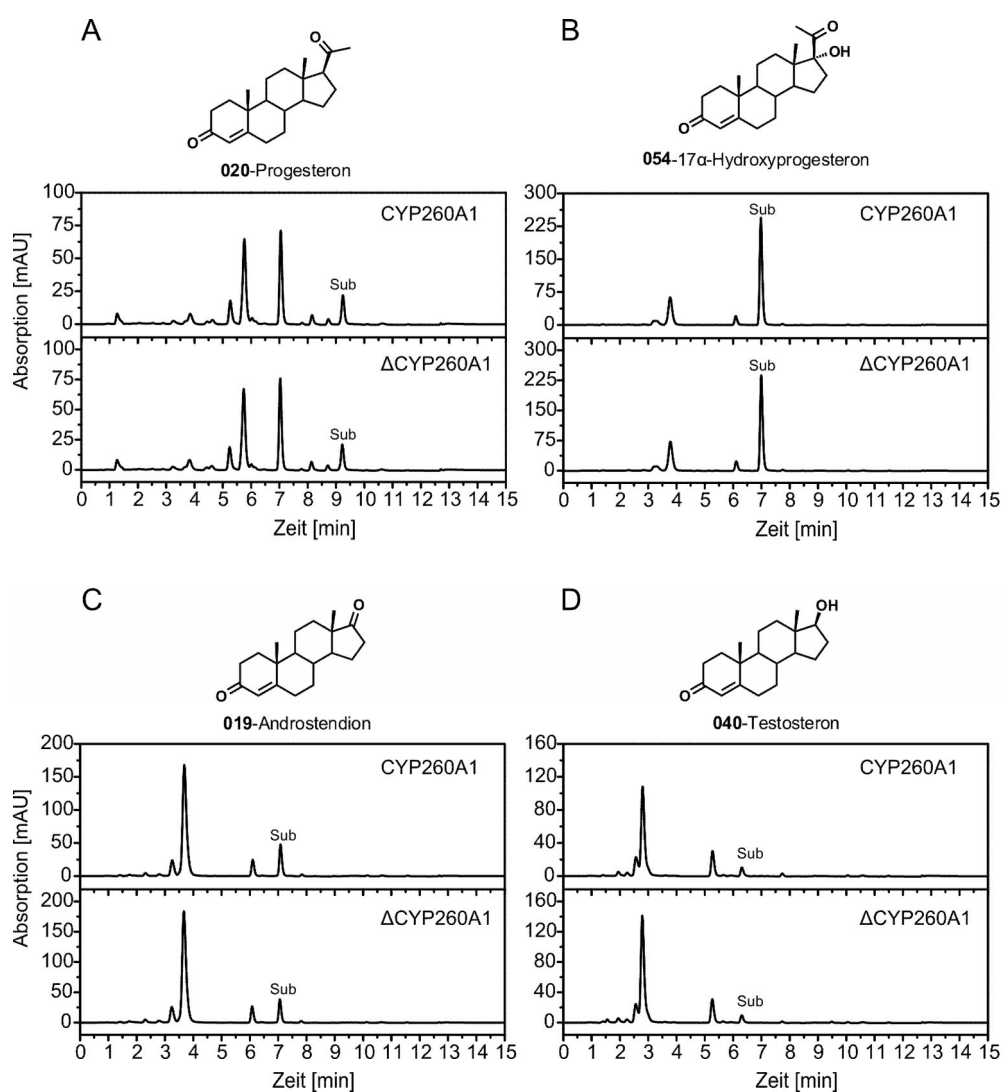


Abb. 3.6: Vergleich von CYP260A1 und Δ CYP260A1; HPLC-Chromatogramme (Gradient II) der Umsätze mit den Substraten (Sub) Progesteron (A), 17 α -Hydroxyprogesteron (B), Androstendion (C) und Testosteron (D); UV-Detektion bei 240 nm

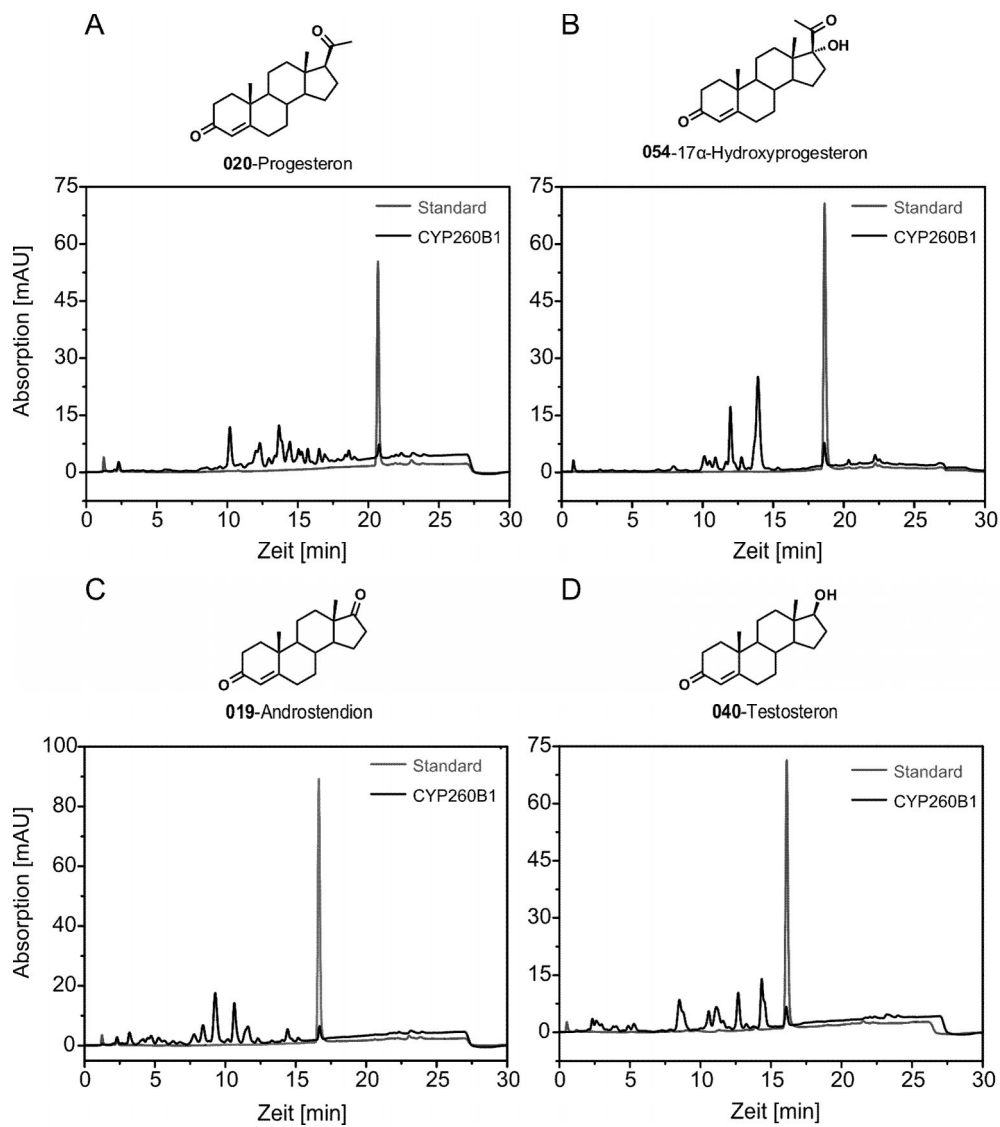


Abb. 3.7: HPLC-Chromatogramme (Gradient I) der CYP260B1-abhängigen Umsätze mit den Substraten Progesteron (A), 17 α -Hydroxyprogesteron (B), Androstendion (C) und Testosteron (D); UV-Detektion bei 240 nm

3.4 Fpr als Redoxpartner für Adx₄₋₁₀₈

Für alle Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56, die Umsätze zeigten, wurde bis zu diesem Zeitpunkt das mitochondriale Redoxsystem, bestehend aus AdR und Adx₄₋₁₀₈, verwendet. Nach der erfolgreichen Substratidentifizierung war ein weiteres Ziel der Arbeit die Entwicklung und Etablierung eines Ganzzellsystems für diese Monooxygenasesysteme in dem Darmbakterium *Escherichia coli*. Ein Problem beim Aufbau eines solchen Systems ist, dass die Reduktase AdR als natürlicherweise membranständiges Protein in diesem Organismus nur in geringen Mengen exprimiert wird (Sagara *et al.* 1993). Daher wurde in dieser Arbeit nach einer alternativen Reduktase aus *E. coli* selbst gesucht. Hierbei kam die bereits vorher verwendete Fpr (siehe Kapitel 3.1.2) in Frage, die in *E. coli* Elektronen auf FldA überträgt. Daher sollte zunächst *in vitro* mit gereinigten Proteinen überprüft werden, ob die Fpr Elektronen auch auf Adx₄₋₁₀₈ übertragen kann und, falls ja, mit welcher Effizienz.

3.4.1 Cytochrome c Assays

Um eine Elektronenübertragung von der Fpr auf das Ferredoxin, Adx₄₋₁₀₈, nachzuweisen und mit der Übertragungseffizienz von AdR zu vergleichen, wurde der Cytochrom c Assay verwendet. Hierbei handelt es sich um ein häufig verwendetes Verfahren, um den Elektronentransfer von Reduktasen auf Ferredoxine indirekt zu bestimmen (Uhlmann *et al.* 1994). Vorteilhaft dabei ist, dass man die Reduktion des Cytochrom c durch das Ferredoxin einfach spektroskopisch bei 550 nm verfolgen kann. Es wurden beide Reduktasen jeweils mit NADPH, Cytochrom c und verschiedenen Konzentrationen an Adx₄₋₁₀₈ versetzt und die Reduktion des Cytochrom c über die Zeit verfolgt bis die jeweilige Reduktase mit Adx₄₋₁₀₈ gesättigt war. Bei Auftragung der Adx-Konzentrationen gegen die Anfangsgeschwindigkeiten konnten die K_M - und V_{max} -Werte für beide Reduktasen mit folgender Gleichung der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt werden (siehe Abb. 3.8):

$$v = \frac{V_{max} \cdot c(Adx)}{K_M + c(Adx)}$$

v = Geschwindigkeit [nmol/min pro nmol Reduktase]

c = molare Konzentration an Adx₄₋₁₀₈

Hierbei zeigt sich, dass AdR bereits bei 2,5 μM Adx₄₋₁₀₈ (5-facher Überschuss gegenüber AdR) die maximale Geschwindigkeit V_{max} von $35,97 \pm 1,17$ nmol/min pro nmol Reduktase erreichte, während Fpr nur einen V_{max} Wert von $12,83 \pm 0,94$ nmol/min pro nmol Reduktase erreichte und erst bei 40 μM Adx₄₋₁₀₈ gesättigt war (80-facher Überschuss gegenüber Fpr). Der K_M -Wert ist für beide Reduktasen auch sehr unterschiedlich. Für AdR und Adx₄₋₁₀₈ wurde ein K_M von $0,17 \pm 0,03$ μM bestimmt, während der K_M für Fpr und Adx₄₋₁₀₈ $4,36 \pm 1,23$ μM betrug.

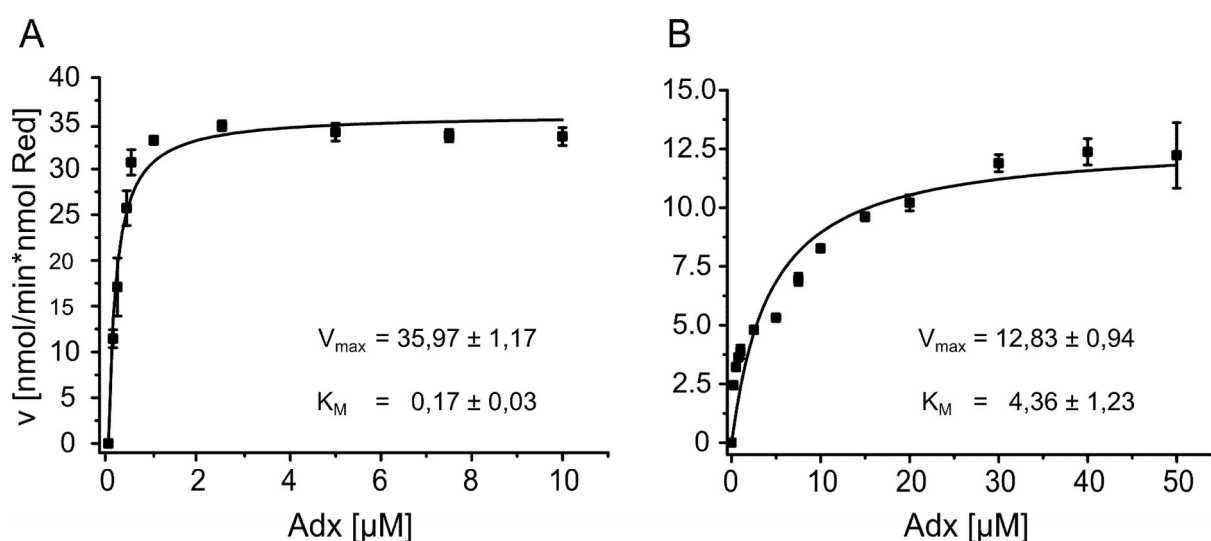


Abb. 3.8: Michaelis-Menten Kinetiken und die erhaltenen V_{max} - und K_M -Werte der Cytochrom c Assays für AdR (A) bzw. Fpr (B) mit steigenden Adx Konzentrationen.

3.4.2 Elektronenübertragung auf CYP264A1

Um nun die Übertragung der Elektronen durch die beiden jeweiligen Reduktasen AdR und Fpr auf Adx₄₋₁₀₈ mit einem Cytochrom P450 als Elektronenakzeptor zu untersuchen, wurde CYP264A1 als Modell-P450 ausgesucht. Es wurden die Werte für das AdR/Adx₄₋₁₀₈ System und für das Fpr/Adx₄₋₁₀₈ System mittels CO-Differenzspektren ermittelt und mit der Reduktion durch Natriumdithionit verglichen. Bei Letzterem handelt es sich um eine vollständige Reduktion des Cytochroms durch das Dithionit. Es zeigt sich, dass beide Systeme das CYP264A1 fast vollständig reduzieren können. Das AdR/Adx₄₋₁₀₈ System konnte $97,5 \pm 1,7\%$ des CYP264A1 und das Fpr/Adx₄₋₁₀₈ System $96,4 \pm 2,3\%$ des CYP264A1 innerhalb von 10 min reduzieren, was durch die spezifische Absorption bei 450 nm des reduzierten CO gebundene Komplexes spektroskopisch ermittelt wurde. Weiterhin wurden diese Werte mit denen

der natürlichen Redoxketten FdR_B/Fdx2 und FdR_B/Fdx8 verglichen (Ewen *et al.* 2009, Khatri *et al.* 2010b), die eine deutlich geringere CYP264A1 Reduktion von ca. 70% erreichten (siehe Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Reduktion von CYP264A1 durch verschiedene Redoxpartner, gemessen als Absorption des CO gebundenen Komplexes bei 450 nm und prozentual verglichen mit der maximalen Reduktion durch Natriumdithionit.

CO gebundener Komplex in % ^[1]			
Natürliche Redoxketten ^[2] von <i>Sorangium cellulosum</i>		Heterologe Redoxketten ^[3]	
FdR_B/Fdx2	FdR_B/Fdx8	AdR/Adx ₄₋₁₀₈	Fpr/Adx ₄₋₁₀₈
67,3 ± 2,1	67,7 ± 1,4	97,5 ± 1,7	96,4 ± 2,3

[1] Daten verglichen mit der maximalen Reduktion von CYP264A1 durch Natriumdithionit

[2] Daten von Khatri *et al.* 2010

[3] Daten dieser Arbeit

3.4.3 NADPH-Verbrauch und Entkopplung bei CYP264A1 abhängigem Substratumsatz

Als letzter Charakterisierungsschritt der Redoxketten, bestehend aus AdR oder Fpr und Adx₄₋₁₀₈ sowie CYP264A1, wurde nun das Substrat 4-Methyl-3-Phenylcumarin dem System hinzugefügt. Dadurch werden im Gegensatz zur CO-Differenzspektroskopie und dem Cytochrom c Assay die übertragenen Elektronen bei der Oxidation des Substrates verbraucht. Zur Beobachtung dieses Verbrauches wird die Abnahme des NADPH bei der Reaktion spektroskopisch bei 320 nm verfolgt. Reaktionen mit AdR hatten hierbei mit $11,92 \pm 0,86$ nmol/min einen vergleichbaren Verbrauch wie solche mit Fpr mit $13,17 \pm 1,74$ nmol/min (siehe Tab. 3.8). Nach vollständigem Verbrauch des NADPHs konnte durch HPLC-Analysen die Menge an Produkt bestimmt werden. Anhand dieser konnte durch Vergleich mit der Menge an eingesetztem NADPH die Kopplungseffizienz zwischen NADPH und Produktoxidation während der Monooxygenasereaktion bestimmt werden. Reaktionen mit AdR hatten eine Kopplungseffizienz von $17,2 \pm 0,7\%$, während Reaktionen mit Fpr eine Kopplungseffizienz von $11,1 \pm 0,6\%$ auf besaßen. Das bedeutet die beiden Redoxketten AdR/Adx₄₋₁₀₈ und Fpr/Adx₄₋₁₀₈ waren in Kombination mit CYP264A1 gleich effizient den CYP264A1-abhängigen Umsatz von 4-Methyl-3-Phenylcumarin zu unterstützen.

Tab. 3.8: NADPH-Verbrauch und Kopplungseffizienz zwischen NADPH und Produktoxidation unter Verwendung der Redoxketten AdR/Adx₄₋₁₀₈ und Fpr/Adx₄₋₁₀₈ bei der Oxidation von 4-Methyl-3-Phenylcumarin durch CYP264A1

NADPH-Verbrauch [nmol/min]		Kopplungseffizienz [%]	
AdR/Adx ₄₋₁₀₈	Fpr/Adx ₄₋₁₀₈	AdR/Adx ₄₋₁₀₈	Fpr/Adx ₄₋₁₀₈
13,17 ± 1,74	11,92 ± 0,86	17,2 ± 0,7	11,4 ± 0,6

3.5 Aufbau des Ganzzellsystems in *E. coli* für die Cytochrome P450

Das Redoxsystem aus AdR und Adx₄₋₁₀₈ überträgt Elektronen auf CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1 und CYP264A1 (siehe 3.3). Deshalb sollte nun dieses System mit dem jeweiligen Cytochrom P450 in *Escherichia coli* coexprimiert werden. Die Ergebnisse mit der *E. coli* eigenen Reduktase, Fpr, im vorherigen Kapitel 3.4 zeigten, dass das AdR/Adx₄₋₁₀₈/P450 System durch das neue Fpr/Adx₄₋₁₀₈/P450 System ersetzt werden kann. Aus diesem Grund sollte auch dieses System für die 4 Cytochrome P450 im *E. coli* Ganzzellsystem eingesetzt werden. *E. coli* wurde als Expressionswirt gewählt, da es als Modellorganismus sehr gut verstanden ist und im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen keine eigenen P450 im Genom enthält (siehe P450 Datenbank von Prof. Dr. Nelson; <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>). Aus diesem Grund ist das Einbringen von neuen Genen einfach und es besteht nicht die Gefahr, dass Substrate durch andere Cytochrome P450 umgesetzt werden.

3.5.1 Klonierungsstrategie

Im Institut von Prof. Bernhardt wurde im Rahmen einer Masterarbeit bereits ein Ganzzellsystem mit AdR/Adx₁₋₁₀₈ für CYP11B1 aufgebaut. Dieses beinhaltete ein auf pET17b basierendes Plasmid mit tricistronischer Anordnung der Gene in der Reihenfolge CYP11B1/AdR/Adx₁₋₁₀₈ (Hobler 2008). Dieses System wurde als Vorbild genommen und das Fragment AdR/Adx₁₋₁₀₈ (siehe Abb. 3.9B) mit den jeweiligen ribosomalen Bindestellen (RBS) aus dem Vektor über die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Eco*RI ausgeschnitten. Anschließend wurde dieses Fragment in die bereits bestehenden pET17b Expressionsvektoren (siehe **Abb. 3.1** und Abb. 3.9A) einkloniert. Dies erfolgte erfolgreich für alle vier Cytochrome P450, CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1 und CYP264A1, wodurch die ersten Vektoren der pETMR-Serie entstanden (siehe Abb. 3.9C). Im nächsten Schritt wurde die AdR durch die *E. coli* eigene Fpr ersetzt. Hierzu musste das Gen mit den dazu nötigen Schnittstellen und der RBS durch die Primer Fpr1f_ *Hind*III und Fpr1r_ *Kpn*I (siehe Material & Methoden Tab. 2.1) amplifiziert werden, wobei der Expressionsvektor pET16_Fpr (siehe Material & Methoden Tab. 2.2) als Vorlage diente. Das erhaltene PCR-Produkt wurde zuerst mit Hilfe des TOPO™ PCR Cloning Kits in den pCR4™blunt Vektor gebracht. Anschließend wurde es durch die

Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *KpnI* ausgeschnitten und anstelle der AdR in den Vektor eingefügt (siehe Abb. 3.9D). Dies erfolgte wiederum erfolgreich für alle Cytochrome P450, außer für CYP260B1. Dessen Gen besitzt eine interne *NcoI*-Restriktionsschnittstelle und die alternative Klonierung über *HindIII* und *KpnI* war wegen der *HindIII*-Schnittstelle in Fpr (siehe Abb. 3.9D) auch nicht direkt möglich. Aus diesem Grund wurde mittels ortsgerechter Mutagenese mit den Primern Fpr_delHind_for und Fpr_delHind_rev die Sequenz an der Schnittstelle im pCR4™blunt_Fpr Vektor geändert und anschließend wurde die geänderte Sequenz über *HindIII* und *KpnI* in den pETMR3 Vektor (siehe Material & Methoden Tab. 2.3) eingefügt. Demnach sind alle acht Vektoren der pETMR-Serie, d.h. alle vier Cytochrome P450 entweder mit AdR/Adx₁₋₁₀₈ oder Fpr/Adx₁₋₁₀₈, erfolgreich fertig gestellt worden und mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft worden. Hiermit wurden eine Coexpression der Proteine in *E. coli* und der Einsatz dieser als Ganzellsysteme möglich.

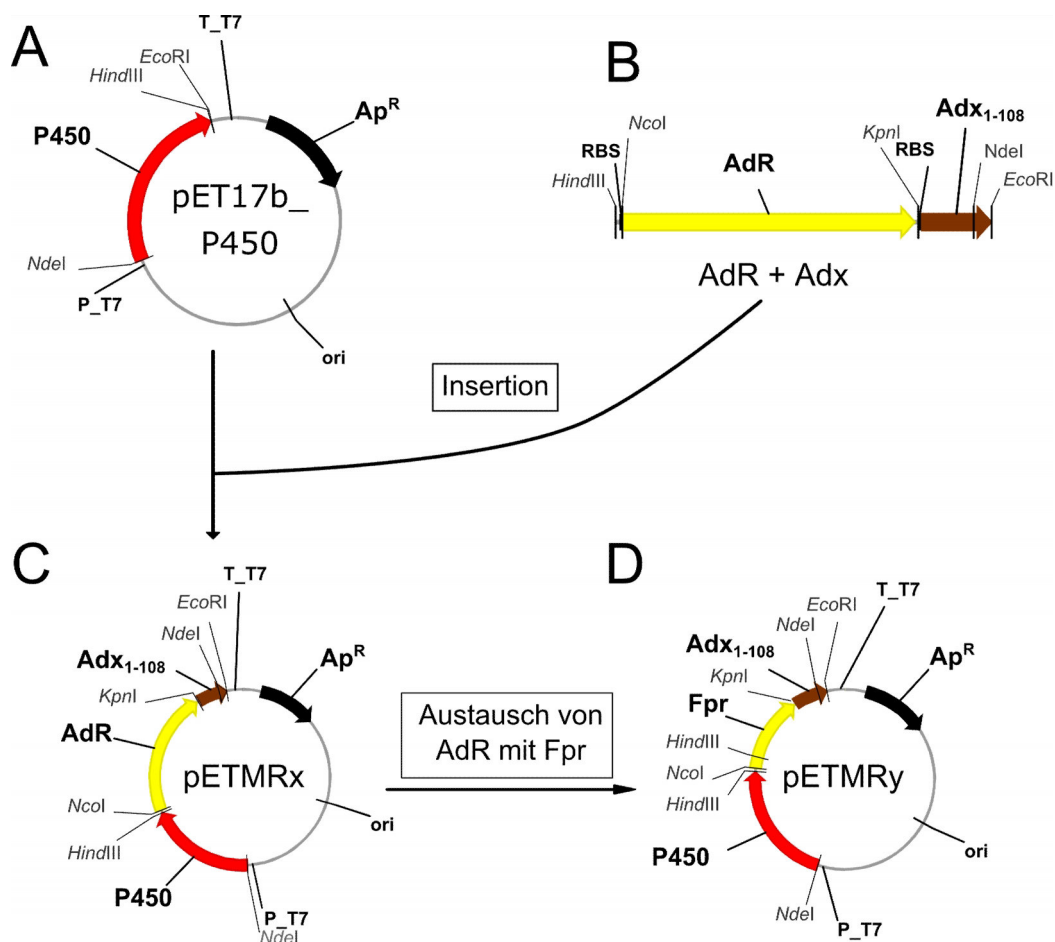


Abb. 3.9: Klonierungsstrategie für die tricistronischen Vektoren der pETMR-Serie ausgehend von den pET17b_P450 Expressionsvektoren (A) durch Einfügen des AdR/Adx₁₋₁₀₈ Fragments und späterem Austausch der AdR (C) durch die Fpr (D)

3.5.2 Etablierung des Ganzzellsystems mit CYP109D1

Für CYP109D1 konnte mit dem gereinigten Enzyme *in vitro* keine neuen Substrate gefunden werden. Die Substratsuche bestätigte nur die schon zuvor gefundenen Substrate α -Ionon (37) und β -Ionon (38). Diese werden durch CYP109D1 in 3-Hydroxy- α -ionone und 4-Hydroxy- β -Ionon umgesetzt (Khatri *et al.* 2010a). Da die Produkte für dieses Cytochrom P450 schon charakterisiert waren, bot es sich an, das Ganzzellsystem zunächst mit CYP109D1 und einer Iononumsetzung zu etablieren. Hierzu wurde die Reaktion mit α -Ionon (37) gewählt.

Zunächst wurde pETMR1 (siehe Material & Methoden Tab. 2.3), das System mit CYP109D1/AdR/Adx₁₋₁₀₈, erfolgreich mittels Transformation in *E. coli* C43DE3 Zellen eingebracht. Die Zellen mit dem pETMR1-System wurden in 250 ml TB-Medium, einem Komplexmedium, kultiviert. Nach 20 h Expression, bevor das α -Ionon (37) zugegeben werden sollte, wurde ein Farbumschlag des normal bräunlichen Mediums nach blau-grün beobachtet, zusätzlich fiel an der Oberfläche des Mediums ein blauer Farbstoff aus. Durch Extraktion der Kultur mit Ethylacetat, Chloroform oder Aceton erhielt man eine blaue organische Phase (siehe Abb. 3.11). Es wurde zu diesem Zeitpunkt vermutet, dass es sich bei dem blauen Farbstoff um Indigo handelt. Dieses kann bei Expressionen von Oxygenasen, wie Naphthalen- bzw. Toluendioxygenasen (Ensley *et al.* 1983, Kim *et al.* 2003) oder Cytochromen P450 (Gillam *et al.* 2000) durch die Oxidation von Indol zu Indoxyl beobachtet werden, welches an der Luft zu Indigo dimerisiert. Das Indol entsteht hierbei in einer Reaktion, bei der Tryptophan von der endogenen *E. coli* Tryptophanase zu Indol und Pyruvat umgesetzt wird (Botsford & DeMoss 1971, Martinez-Gomez *et al.* 2012). Um die Vermutung zu beweisen, wurde die Kultivierung in 50 ml wiederholt und nach 20h Expression die Zellen und der blaue Niederschlag abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend wie in der Literatur beschrieben (Berry *et al.* 2002) mit DMSO gewaschen und der Überstand nach Trennung der Zellen spektroskopisch vermessen. Hierbei zeigte sich die spezifische Absorption von Indigo bei 620 nm (siehe Abb. 3.10).

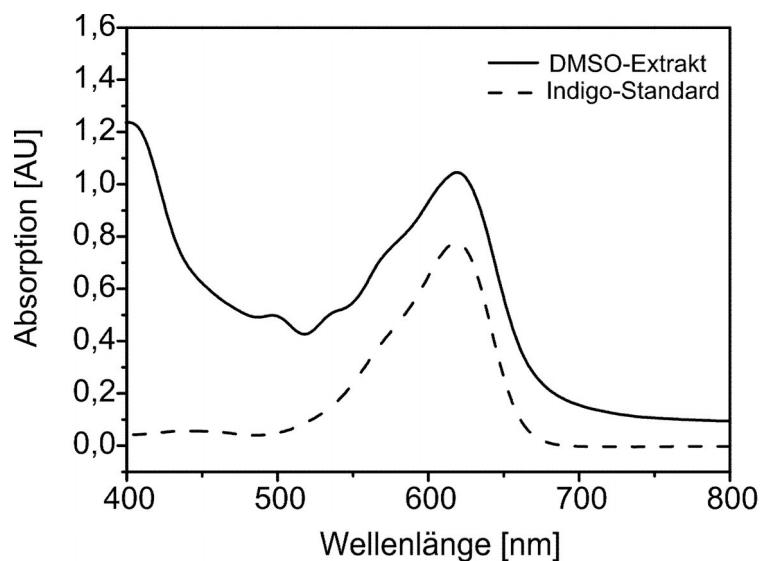


Abb. 3.10: Absorptionsspektren von 400 bis 800 nm des DMSO-Extraktes nach 20h Expression des pETMR1-System und eines Indigo-Standards als Vergleich.

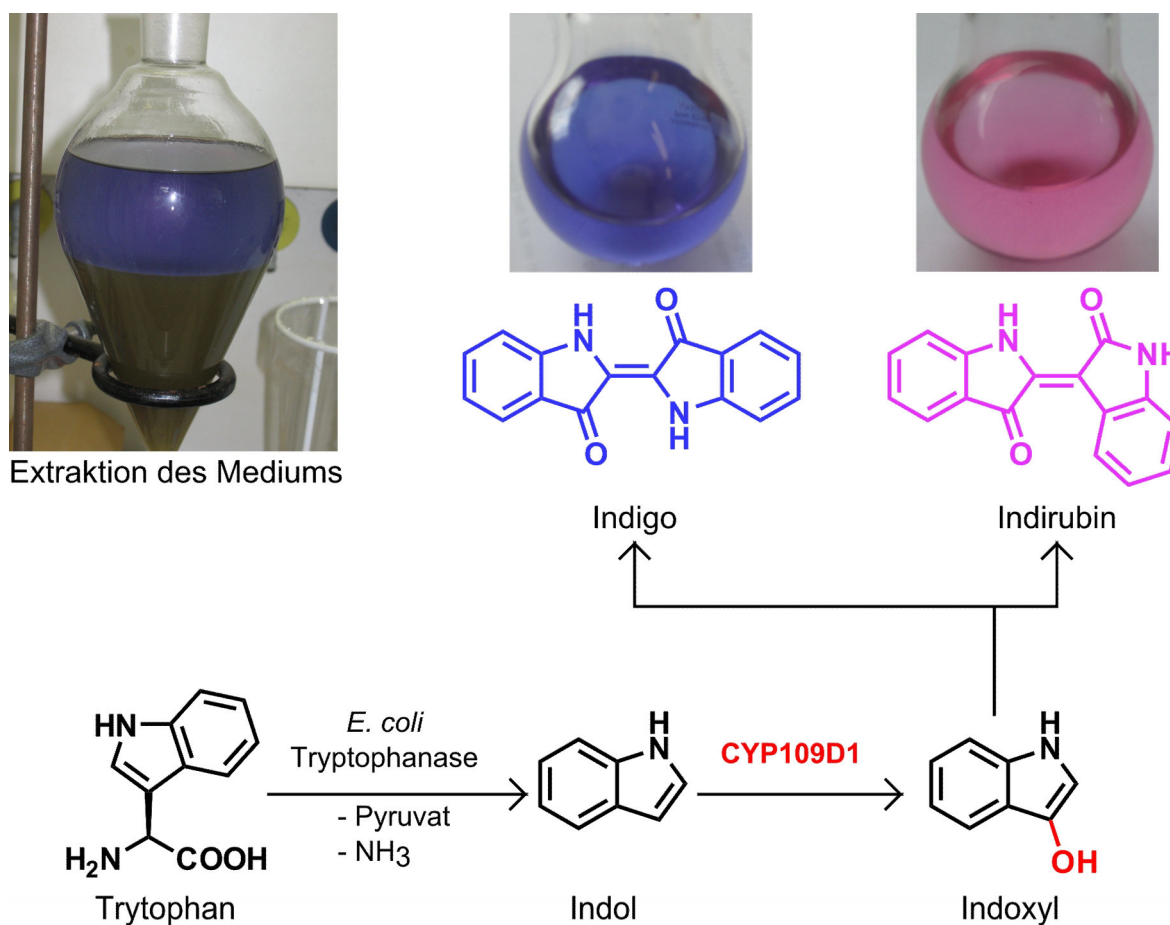


Abb. 3.11: Indigo- bzw. Indirubinproduktion des pETMR1-Systems. Abgebildet sind die Bilder der Extraktion des Mediums mit Ethylacetat und die isolierten Fraktionen von Indigo und Indirubin, sowie ein Schema der während der Kultivierung ablaufenden Reaktionen.

In einem nächsten Versuch wurden vier 250 ml Kulturen angesetzt und die Zellen nach 24h geerntet. Dieses Mal wurden die Zellen zuerst mit 100 ml Wasser gewaschen und dann 2 x mit DMF. Die blauen DMF Fraktionen wurden unter Vakuum eingedampft und der blaue Extrakt nach Aufnahme mit Ethylacetat mittels Kieselgel-Chromatographie (Hexan-Ethylacetat) getrennt. Hierbei entstanden eine pinkfarbene und eine später eluierende blaue Lösung (siehe Abb. 3.11). Mittels UV-spektroskopischer Analyse konnte der blaue Farbstoff als Indigo bestätigt werden, während es sich bei dem pinkfarbenen wahrscheinlich um das Indigo-Isomer Indirubin handelt (Gillam & Guengerich 2001).

Durch die starke Indigobildung war es nicht möglich, ein externes Substrat, wie α -Ionon (37) umzusetzen, da beide Reaktionen in Konkurrenz zueinander stehen und Indol im Überschuss in der Zelle vorliegt. Aus diesem Grund musste ein Medium gefunden werden, welches eine Indol-Produktion ausschließt. Im ersten Versuch wurde ein normales M9-Medium verwendet, welches aber keine Expression des CYP109D1 und somit auch keinen Umsatz von α -Ionon (37) zeigte. Das M9-Medium wurde deshalb als Grundlage für ein neues Medium genommen, das M9CA-Medium. Hierbei werden dem Medium zusätzlich 4 g/l „Casaminoacids“ zugesetzt. Der Vorteil dabei ist, dass im Gegensatz zu anderen Stickstoffquellen, wie Pepton, die Aminosäure Tryptophan bei der Produktion von „Casaminoacids“ zerstört wird (Mueller & Johnson 1941). Dies führt zu einer Tryptophan-Verarmung des Mediums (Kyung-Hwan 2006), wodurch kein Indol entsteht. Mit diesem Medium konnte erstmals α -Ionon (37) mit dem Ganzzellsystem *in vivo* umgesetzt werden, wobei das gleiche Produkt, 3-Hydroxy- α -Ionon, mit $t_R = 4,1$ min, wie bei dem *in vitro* Umsatz mit den gereinigten Enzymen entstand. In beiden Fällen konnte kein Substrat bei $t_R = 10,7$ min detektiert werden, da in beiden Fällen das Substrat wahrscheinlich wegen seiner hohen Flüchtigkeit bei der Reaktion verdampfte, weshalb eine Quantifizierung der Reaktion nicht möglich war.

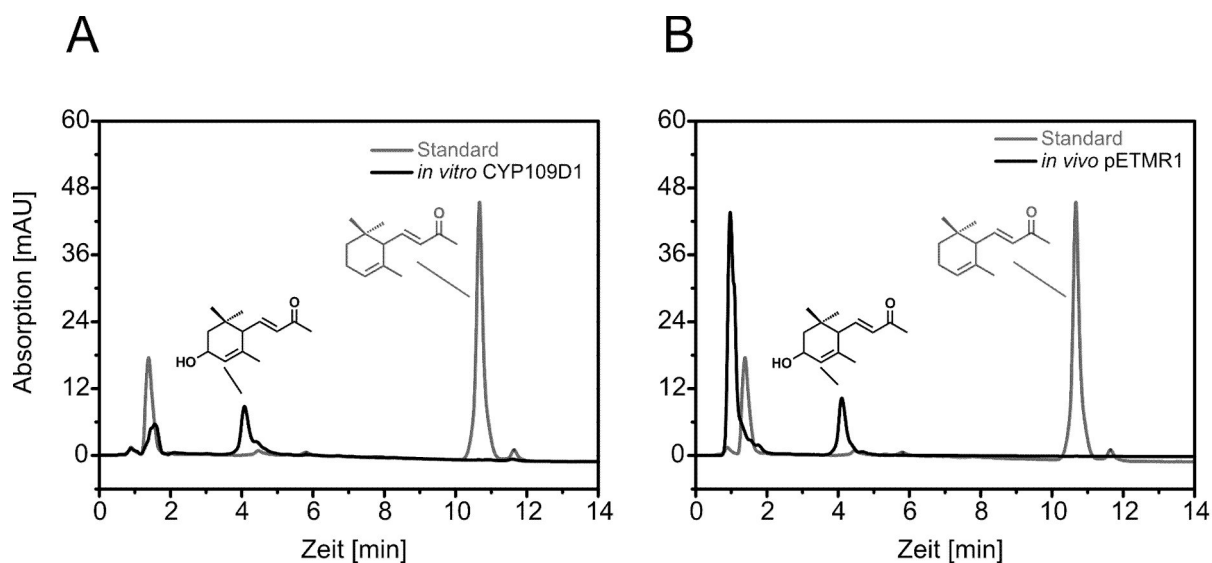


Abb. 3.12: HPLC-Chromatogramme (Gradient II) der α -Ionon Umsätze mit CYP109D1 zu 3-Hydroxy- α -Ionon *in vitro* (A) und *in vivo* mittels des pETMR1-Systems (B) im Vergleich zum α -Ionon Standard (in grau); UV-Detektion bei 240 nm.

3.5.3 Austausch von AdR durch Fpr in der Adx unterstützten Redoxkette

Da wie zuvor erwähnt mit CYP109D1 eine Quantifizierung der Reaktionen im Ganzzellsystem und somit ein Vergleich der Systeme mit AdR und Fpr als Reduktase nicht möglich war, wurden im Folgenden die Systeme von CYP264A1 verwendet, nämlich mit den Plasmiden pETMR5 (CYP264A1/AdR/Adx₁₋₁₀₈) und pETMR6 (CYP264A1/Fpr/Adx₁₋₁₀₈). Bei der Substratsuche mit CYP264A1 konnte (siehe Kapitel 3.3.2) mit 4-Methyl-3-Phenylcumarin ein Substrat identifiziert werden, das spezifisch zu nur einem einzigen Produkt umgesetzt wird (siehe Abb. 3.5), was für die Quantifizierung und den Vergleich der jeweiligen Systeme sehr vorteilhaft ist. Bei Kultivierung in 50 ml M9CA-Medium wurde bei beiden Systemen, mit pETMR4 und pETMR5, nach 20 h Expression 4-Methyl-3-Phenylcumarin zugegeben. In bestimmten Zeitintervallen wurden Proben gezogen, welche auf ihre Produktbildung hin analysiert wurden (siehe Abb. 3.13). Das pETMR5-System mit AdR zeigte eine Anfangsgeschwindigkeit von 36 $\mu\text{M/h}$ (9,1 mg/h). Überraschenderweise war das pETMR6-System mit Fpr mit einer Geschwindigkeit von 55 $\mu\text{M/h}$ (13,8 mg/h) um $\sim 52\%$ schneller. Außerdem erreichte das pETMR6-System sein Maximum von ca. 90% Substratumsatz bereits nach 12 h, während das pETMR5-System diesen Wert erst nach 24 h erreichte.

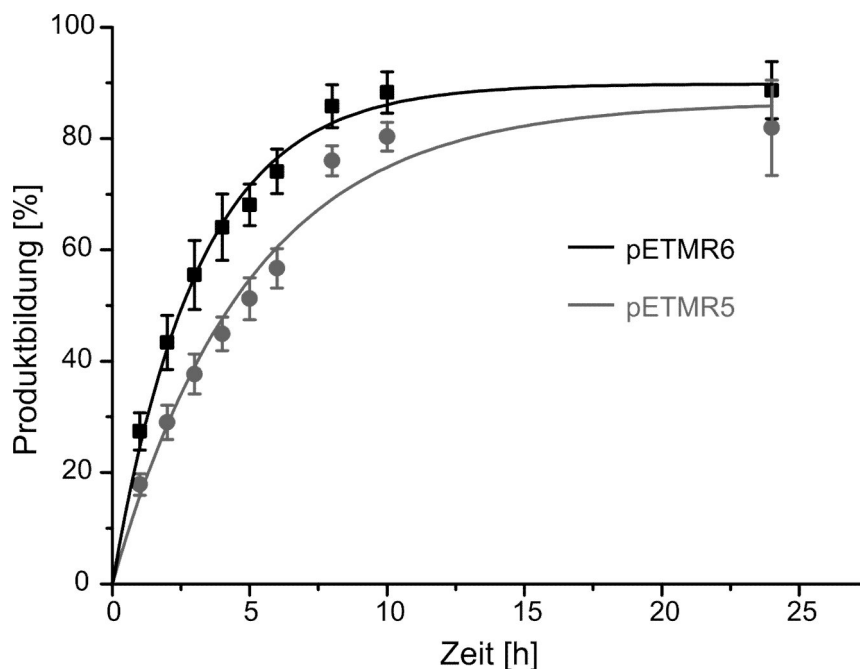


Abb. 3.13: Einfluss der Reduktasen auf die CYP264A1-abhängigen Ganzzellumsätze von 4-Methyl-3-Phenylcumarin. Reaktionen mit 200 μ M Substrat in M9CA-Medium wurden über 24h für das pETMR6-System (CYP264A1/Fpr/Adx₁₋₁₀₈; in schwarz) und für das pETMR5-System (CYP264A1/AdR/Adx₁₋₁₀₈; in grau) verfolgt.

Um zu überprüfen, ob die Erkenntnisse auch auf andere Adx-abhängige P450 übertragen werden können, sollte der Vergleich der beiden Reduktasen, AdR und Fpr, auch mit dem in der Arbeitsgruppe sehr gut verstandenen CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* (Berg *et al.* 1979, Simgen *et al.* 2000), einer biotechnologisch interessanten Steroidhydroxylase (Virus *et al.* 2006) durchgeführt werden. Da das Gen von CYP106A2 nicht in dem pET17b_Vektor vorlag, musste zuerst mittels ortsgerechter Mutagenese mit den Primern meg_NdeI_for und meg_NdeI_rev eine NdeI Schnittstelle in den pACYC_FHH2.8 (Hannemann *et al.* 2006) Expressionsvektor von CYP106A2 N-terminal eingefügt werden. Anschließend wurde das Gen zuerst in den Vektor pET17b (siehe Abb. 3.1) eingefügt und dieser dann analog zu den P450-Genen aus *Sorangium cellulosum* (siehe Abb. 3.9) zu den tricistronischen pET-Vektoren, pETMR11 (CYP106A2/AdR/Adx₁₋₁₀₈) und pETMR12 (CYP106A2/Fpr/Adx₁₋₁₀₈) umgewandelt. Nach Transformation von C43DE3-Zellen mit diesen Vektoren, wurde zu dem pETMR11-System bzw. pETMR12-System nach 20 h Expression der Proteine in M9CA-Medium 200 μ M 11-Deoxycorticosteron als Substrat zugegeben und der Umsatz in bestimmten Zeitintervallen kontrolliert (siehe Abb. 3.14). Es zeigte sich auch hier wie bei den Systemen von CYP264A1, dass das pETMR12-System mit der Fpr als Reduktase schneller das Substrat umsetzte als das pETMR11-System mit AdR. Die Anfangsgeschwindigkeit bei dem

pETMR12-System betrug $24 \mu\text{M/h}$ ($7,9 \text{ mg/h}$) und für das pETMR11-System $18 \mu\text{M/h}$ ($5,9 \text{ mg/h}$). Der maximale Umsatz war bei beiden Systemen erst nach 24 h erreicht, wobei das pETMR12-System 65% 11-Desoxycorticosteron umsetzen konnte, während das pETMR11-System nur 46% umsetzte.

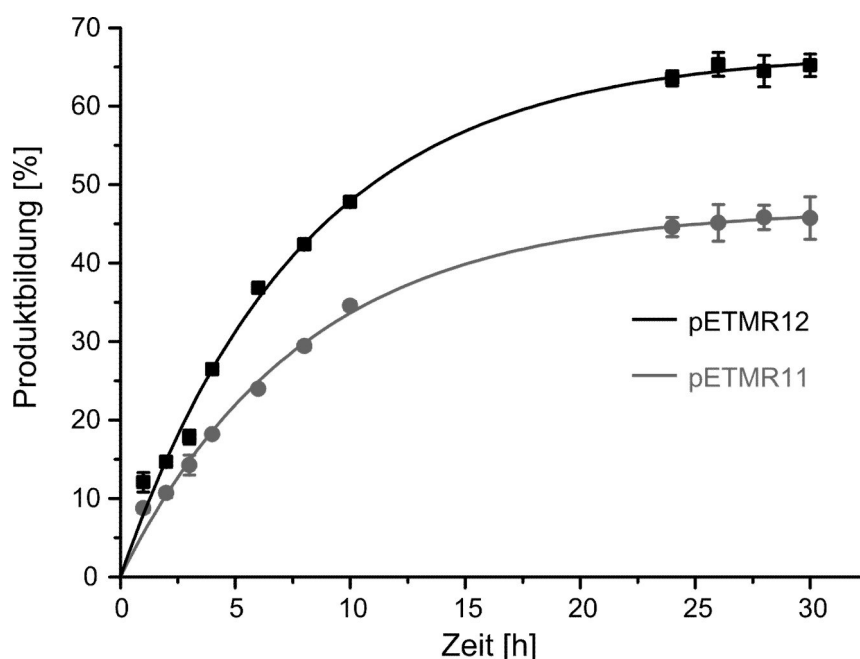


Abb. 3.14: Einfluss der Reduktasen auf die CYP106A2-abhängigen Ganzzellumsätze von 11-Desoxycorticosteron. Reaktionen mit $200 \mu\text{M}$ Substrat in M9CA-Medium wurden über 30h für das pETMR12-System (CYP106A2/Fpr/Adx₁₋₁₀₈; in schwarz) und für das pETMR11 (CYP106A2/AdR/Adx₁₋₁₀₈; in grau) verfolgt.

3.5.4 Optimierung der CYP264A1 abhängigen Reaktionen durch verschiedene Medien

Da sich das pETMR6-System mit der Fpr als Reduktase als das überlegene System für *in vivo* Umsätze erwiesen hatte, wurde dieses System im Folgenden dazu verwendet, den Einfluss des Mediums bei der Expression genauer zu betrachten. Die Produktbildung und die Indolkonzentration wurde nach 4 und 24 h mittels HPLC bestimmt, wobei die Indolkonzentration mittels einer Regressionsgeraden (siehe Abb. 3.15) berechnet wurde.

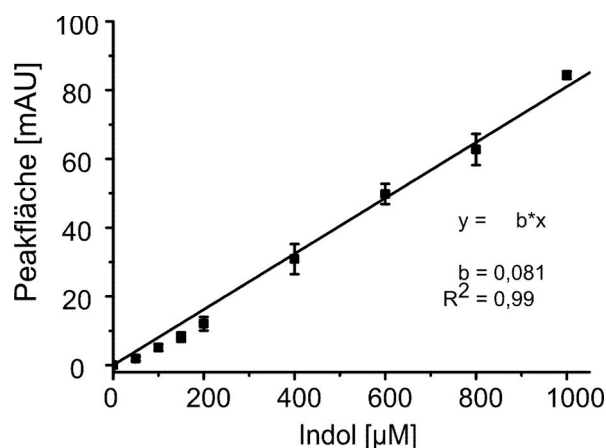
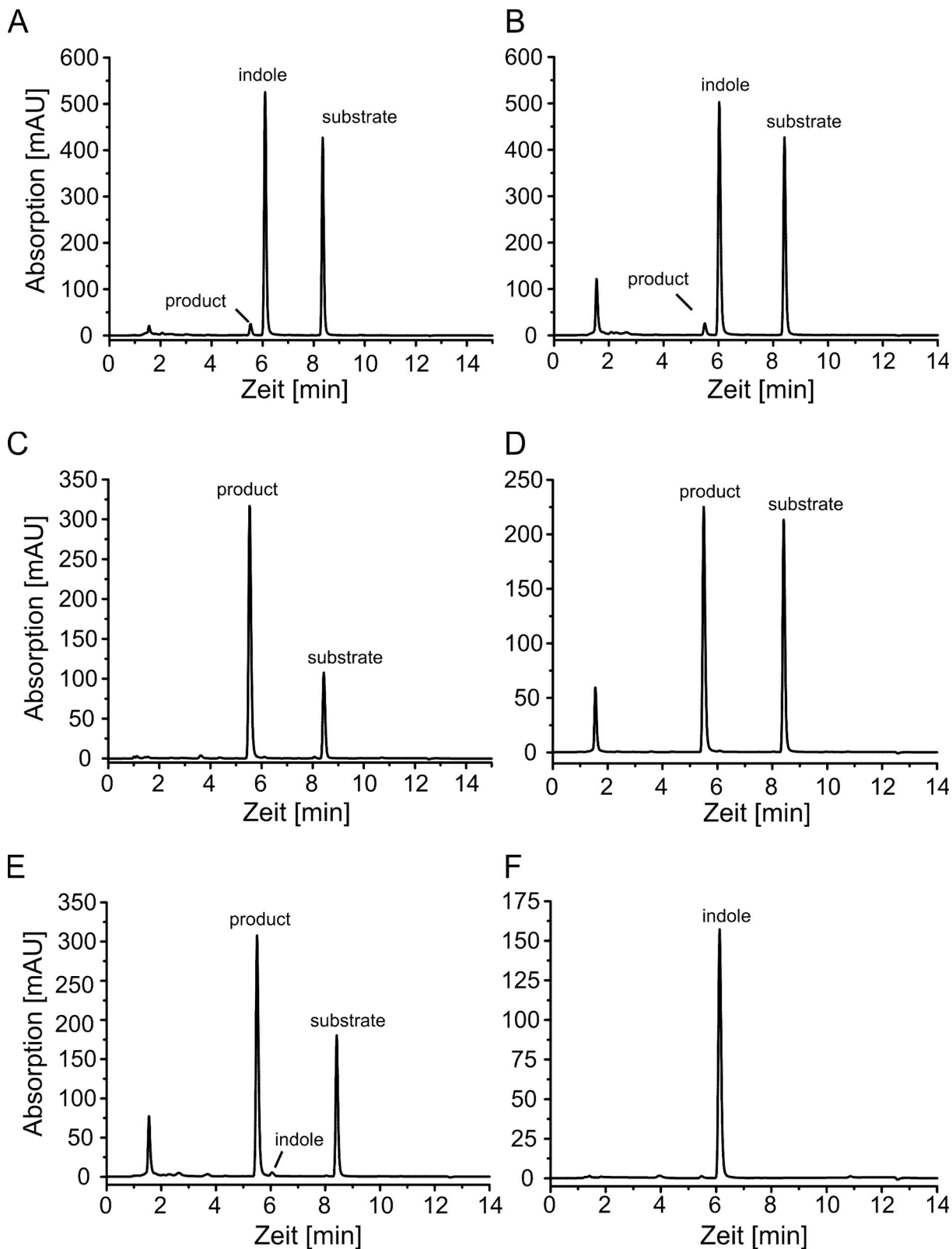


Abb. 3.15: Regressionsgerade zur Bestimmung der Indolkonzentration durch die HPLC-Analysen; Konzentration gegen erhaltene Peakflächen bei 280 nm

Bei Verwendung von TB-Medium für die Ganzzellumsätze zeigten die Chromatogramme nach 4 h Umsatz (siehe Abb. 3.16A), dass das Substrat, 4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin, $t_R = 8,5$ min, nur zu 3% von dem CYP264A1 abhängigen System zu dem Produkt $t_R = 5,7$ min umgesetzt wurde, aber dafür eine Konzentration von 600-700 µM Indol, $t_R = 6,2$ min (siehe Abb. 3.16F), erreicht wurde (siehe Tab. 3.9). Auch nach 24 h war der Umsatz des Substrats 4-Methyl-3-Phenylcumarin mit 6% noch sehr gering. Wurde nun M9CA-Medium verwendet (siehe Abb. 3.16C), konnte nach 4 h ein Umsatz von 64% und nach 24h ein Umsatz von 90% festgestellt werden, wobei die Indolkonzentration bei nur ca. 4 µM lag.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob auch eine Autoinduktion mit den Medien möglich ist und wie sich dabei die Produktbildung verändert. Bei der Autoinduktion wird die Expression ab einer bestimmten Zelldichte durch die Bestandteile der Kohlenstoffquelle automatisch eingeleitet (siehe Material & Methoden 2.1.5.1). Bei TB-Medium mit Autoinduktion (siehe Abb. 3.16B) zeigte sich, dass der Umsatz verdoppelt werden konnte, nach 4 h 6% und nach 24 h 13%, wobei der Indolgehalt mit 500-600 µM geringer als mit dem nicht autoinduzierten TB-Medium war (siehe Tab. 3.9). Im Falle des M9CA Medium konnte durch Autoinduktion (siehe Abb. 3.16D) keine Steigerung des Umsatzes beobachtet werden, es wurden nach 4 h 54% und nach 24 h 83% Produkt gebildet (siehe Tab. 3.9). Auch hier war die Indolkonzentration mit ca. 2 µM im Vergleich zu den normal induzierten Bedingungen geringer. Als Vergleich wurden die Expression und der Umsatz im ZYP-Medium, welches in der Literatur als Autoinduktionsmedium beschrieben ist (Studier 2005), durchgeführt (siehe Abb. 3.16E). Hierbei wurden ähnliche Werte wie bei dem nicht autoinduzierten M9CA-Medium erhalten mit 58% Produkt-

bildung nach 4 h und 90% nach 24h (siehe Tab. 3.9). Die Indolkonzentration betrug dabei ca. 10 μ M.



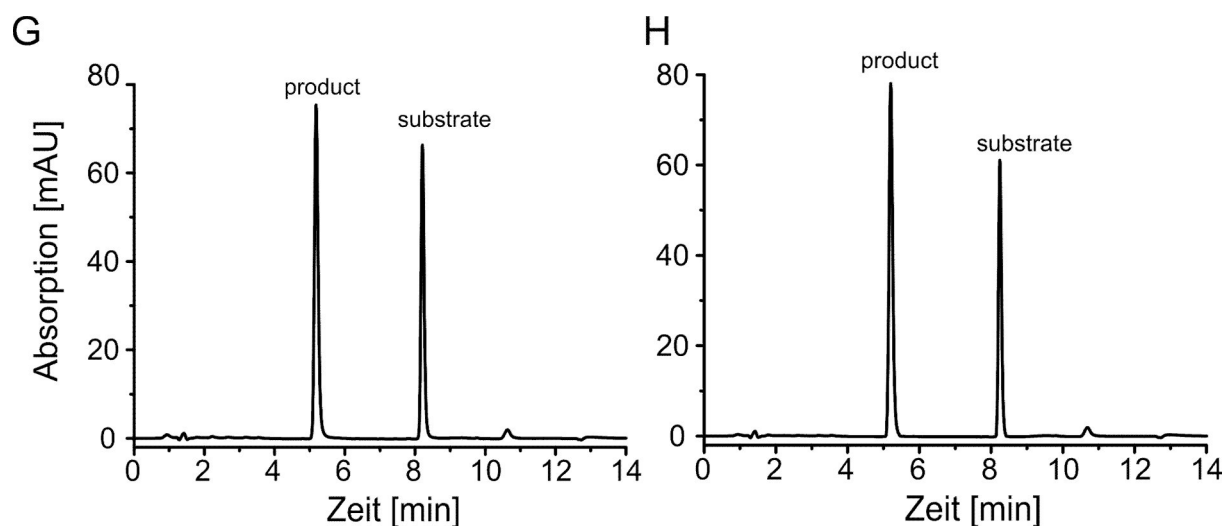


Abb. 3.16: HPLC-Chromatogramme der CYP264A1 Biotransformationen nach 4h von 200 μ M 4-Methyl-3-Phenylcumarin in verschiedenen Medien: TB-Medium (A), autoinduziertes TB-Medium (B), M9CA-Medium (C), autoinduziertes M9CA Medium (D), ZYP-5052 Medium (E); das Chromatogramm von Indol als Standard (F) und die Biotransformationen mit „ruhenden“ Zellen in KPP-Puffer (G) und in Tris-Puffer (H).

Eine häufig verwendete Methode, um Einflüsse der Medien bei Biotransformationen mit ganzen Zellen zu verhindern, ist, mit sogenannten „ruhenden Zellen“ in Puffersystemen ohne Nährstoffe zu arbeiten. Hierzu wurde die Expression der Proteine des pETMR6-Systems zuerst in M9CA-Medium durchgeführt, die Zellen anschließend gewaschen und in dem jeweiligen Puffer, 100 mM Tris-Puffer (pH = 7,4) bzw. 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,4), resuspendiert. Den Puffern wurden anschließend die Substrate zugesetzt und die Biotransformation durchgeführt (siehe Abb. 3.16:G & H). Indol konnte in beiden Fällen nicht mehr festgestellt werden. In 100 mM Tris-Puffer (pH = 7,4) betrug der Umsatz 55% nach 4 h und 77% nach 24 h. Ähnliches war für den 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,4) mit 47% nach 4 h und 80% nach 24 h der Fall.

Tab. 3.9: Produktbildung der CYP264A1-abhängigen Ganzzellumsätze von 4-Methyl-3-Phenylcumarin nach 4 h und 24 h und die Indolkonzentrationen in verschiedenen Medien und Puffern.

Medium	Produkt [%] 4 h nach Substratzugabe	Produkt [%] 24 h nach Substratzugabe	Indolkonzentration [μM]
TB	3,1 \pm 0,2	6,3 \pm 0,4	643,85 \pm 67,42
TB Autoinduktion	5,9 \pm 0,2	13,3 \pm 0,8	590,73 \pm 83,52
M9CA	64,2 \pm 6,0	90,0 \pm 0,4	3,66 \pm 1,89
M9CA Autoinduktion	54,2 \pm 1,7	83,0 \pm 2,3	1,81 \pm 1,02
ZYP 5052	58,0 \pm 8,6	90,5 \pm 0,7	8,90 \pm 4,66
KPP-Puffer	47,0 \pm 9,3	79,5 \pm 2,0	0
Tris-Puffer	55,4 \pm 7,1	76,6 \pm 6,3	0

3.5.5 Einfluss von Indol auf den CYP264A1 abhängigen Ganzzellumsatz

Wie schon zuvor erwähnt, zeigten die CYP264A1 abhängigen Ganzzellumsätze in TB-Medium nur eine geringe Umsetzung des zugesetzten Substrates und im Gegensatz zu den anderen Kulturbedingungen einen verhältnismäßig hohen Indolgehalt (siehe Tab. 3.9). Im Gegensatz zu den Ganzzellumsätzen mit CYP109D1 (siehe Kapitel 3.5.2) entstand aber in diesen Fällen kein Indigo aus Indol. Es liegt trotzdem die Vermutung nahe, dass Indol als Sekundärmetabolit der *E. coli* Zellen wiederum einen Einfluss auf die Reaktion hat. Aus diesem Grund wurde in einem Experiment die Expression der pETMR6-Zellen zuerst in 30 ml M9CA-Medium durchgeführt und nach 20 h Expression 1 ml der Expressionskulturen in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden zusätzlich zu 200 μM 4-Methyl-3-Phenylcumarin verschiedene Mengen an Indol (Endkonzentrationen von 0 - 4000 μM) hinzugefügt und 4 h bei 30°C inkubiert. Allein durch die Verringerung des Volumens und die Durchführung der Umsätze in Reaktionsgefäße sank die Produktbildung von ca. 65% auf ca. 25%, wenn kein Indol hinzugefügt wurde. Durch steigende Indolkonzentration sanken die Umsatzraten jedoch noch weiter, d.h. Indol inhibiert, wie vermutet, CYP264A1 (siehe Abb. 3.17). Bei den Werten von 600 - 800 μM , welche ungefähr den Indolkonzentrationen in TB-Medium entsprechen, war der Umsatz mit ca. 7% nur noch ungefähr ein Drittel im Vergleich

zu dem Umsatz ohne Indolzugabe. Ab einer Konzentration von 4 mM war gar keine Produktbildung mehr zu erkennen (20-facher Überschuss gegenüber dem Substrat).

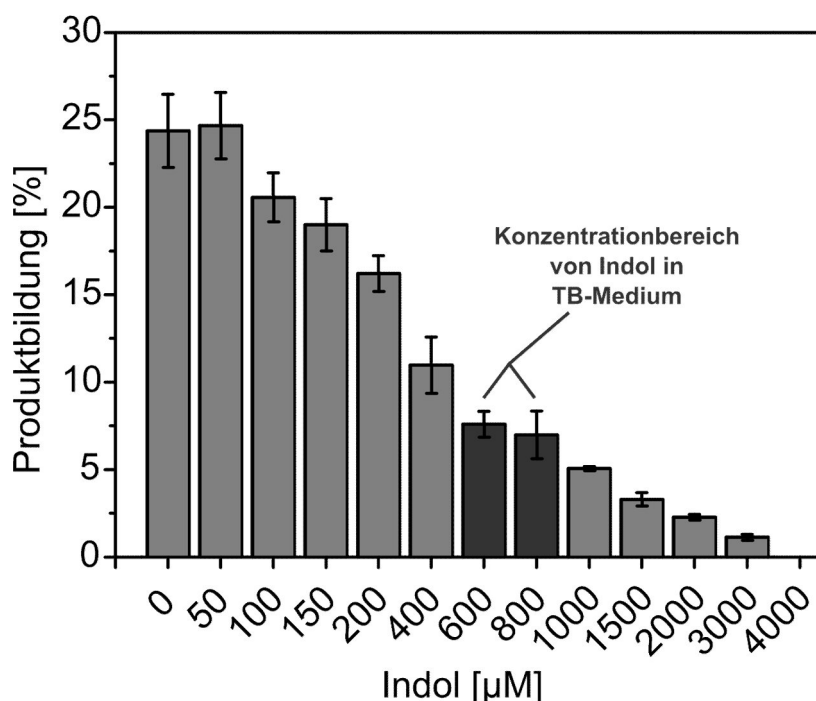


Abb. 3.17: Einfluss von verschiedenen Indolkonzentrationen auf den CYP264A1-abhängigen Ganzzellumsatz von 4-Methyl-3-Phenylcoumarin (200µM); der Konzentrationsbereich von Indol in TB-Medium ist dunkelgrau gekennzeichnet.

3.5.6 Produktcharakterisierung des CYP264A1 abhängigen Ganzzellumsatzes von 4-Methyl-3Phenylcoumarin

Die zuvor etablierten Methoden für die CYP264A1 abhängige Biotransformation von 4-Methyl-3-Phenylcoumarin konnte nun dazu verwendet werden, um unter optimierten Bedingungen ausreichende Mengen an Produkt herzustellen und dieses mittels NMR zu charakterisieren. Hierzu wurde das Kulturvolumen für das pETMR6-System von 30 bzw. 50 ml auf 250 ml erhöht. Die Expression und der Umsatz erfolgten in M9CA-Medium in 4 identischen 2 L Schikanekolben. Im Gegensatz zur Optimierung wurden nun 400 µM 4-Methyl-3-Phenylcoumarin eingesetzt und die Reaktionszeit auf 48 h erhöht. Nach dieser Zeit wurden die Kulturen 3-mal mit demselben Volumen an Chloroform extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Der nach Abdampfen des Lösemittels erhaltene Extrakt wurde mittels Kieselgel-Chromatographie mit Hexan und Ethylacetat als mobile Phase getrennt und die Fraktionen mit dem Produkt gesammelt. Die Ausbeute betrug ca. 58 mg und wurde mittels ^1H and ^{13}C

NMR Spektroskopie analysiert. Es handelte sich bei dem Produkt um 4-Hydroxymethyl-3-Phenylcumarin (siehe Abb. 3.18).

Die detaillierten NMR-Daten für 4-Hydroxymethyl-3-Phenylcumarin sind (Nummerierung der Atome sind gezeigt in der Abb. 3.18): ^1H NMR: (CDCl_3 , 500 MHz), δ 4.67, *s*, 2H (H-16); 7.33, *m* (H-6); 7.34, *m*, 2H (H-11 und H-15); 7.36, *dd*, $J = 8$ und 1 Hz (H-8); 7.42, *m* (H-13); 7.44, *m*, 2H (H-12 und H-14); 7.53, *td*, $J = 8$ und 1.5 Hz (H-7); 7.93, *dd*, $J = 8$ und 1.5 Hz (H-5). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz), δ 59.19 (C-16), 116.96 (C-8); 118.91 (C-4); 124.50 (C-6), 126.08 (C-5); 128.37 (C-2); 128.49 (C-12 und C-14); 128.73 (C-13); 129.91 (C-11 und C-15); 131.49 (C-7); 133.22 (C-10); 147.15 (C-3); 153.28 (C-9); 161.22 (C-1).

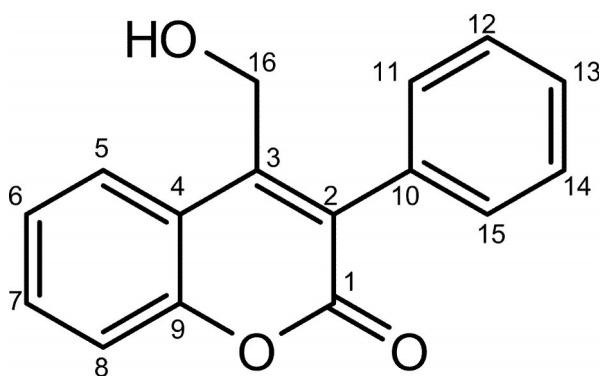


Abb. 3.18: Struktur von 4-Hydroxymethyl-3-Phenylcumarin und die Nummerierung der Kohlenstoffatome gemäß der Auflistung der NMR-Daten.

3.6 Charakterisierung der CYP260A1-abhängigen Umsätze

Bei der Suche nach Substraten für die Mitglieder der CYP260-Familie (siehe Kapitel 3.3.3) zeigte sich, dass alle Mitglieder Steroide umsetzen können. Im Gegensatz zu CYP260B1 (siehe Abb. 3.7) konnten die beiden Formen von CYP260A1 diese Substrate deutlich selektiver umsetzen. Darüber hinaus konnte bei beiden Formen, der verkürzten Form (Δ CYP260A1) und der längeren Form (CYP2609A1) auch kein Unterschied im Umsatz hinsichtlich der Aktivität und Selektivität ermittelt werden (siehe Abb. 3.6), so dass im Folgenden nur die Umsätze von CYP260A1 genauer untersucht wurden, um diese Daten auch mit denen der vorangegangenen Dissertation (Khatri 2009) zu vergleichen, bei welcher nur CYP260A1 verwendet wurde.

3.6.1 Produktcharakterisierung mittels LC-MS

Um die Produkte der CYP260A1 abhängige Umsätze erstmals zu charakterisieren, wurden die *in vitro* Umsätze der Substratsuche mit 200 μ M des jeweiligen Substrates wiederholt, wobei wiederum 200 μ M des jeweiligen Substrates mit 0,5 μ M CYP260A1 in Kombination mit 1,5 μ M AdR und 10 μ M Ad_{x4-108} 1 h mit gleichzeitiger Regeneration von NADPH umgesetzt wurden. Als Substrate wurden C21-Steroide (Pregn-4-en-3,20-dion als Grundgerüst), C19-Steroide (Androst-4-en-3-on als Grundgerüst), und steroidähnliche Sesquiterpene eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS, d.h. mit einer chromatographischen Trennung der Analyten mittels HPLC mit anschließender Detektion mittels UV/Vis Detektors und gekoppeltem Massenspektrometer. Hiermit konnte erstmals aufgeklärt werden, welche funktionellen Gruppen durch das CYP260A1 ins Substrat eingefügt wurden. Es zeigte sich, dass manche Produkte mit über 50% Selektivität entstanden. Diese wurden als Hauptprodukt (HP) bezeichnet und die anderen Produkte als Nebenprodukte (NP). Wurde bei einer Reaktion kein Hauptprodukt gebildet, wurden die Produkte mit über 10% Selektivität als normale Produkte (P) und die mit unter 10% Selektivität als Nebenprodukte benannt. Die Produkte der Oxidationsstufe 1 hatten gegenüber dem Substrat eine Massendifferenz von +16, was einer Hydroxylierung entspricht oder von -2, was einer Doppelbindung bzw. einer Oxidation einer vorhandenen OH-Gruppe zum Epoxid oder Carbonyl entspricht. Zusätzlich kam es bei allen Reaktionen zu einer weiteren Oxidation (Oxidationsstufe 2) der Produkte durch CYP260A1 in so genannte überoxidierte Nebenprodukte (üNPs). Diese Produkte wiesen im Massenspektrometer im Gegensatz zu

den Produkten der Oxidationsstufe 1 andere Massen auf (Masse des Substrates +32 oder +14). Hierbei handelte es sich um Dihydroxylierungen oder wiederum andere Oxidationsformen der Produkte der Oxidationsstufe 1. Zur Verdeutlichung dieser Produktbildungen dient untenstehende Abbildung (Abb. 3.19), die beispielhaft möglichen Reaktionen des Testosteronumsatzes durch Cytochrome P450 angibt.

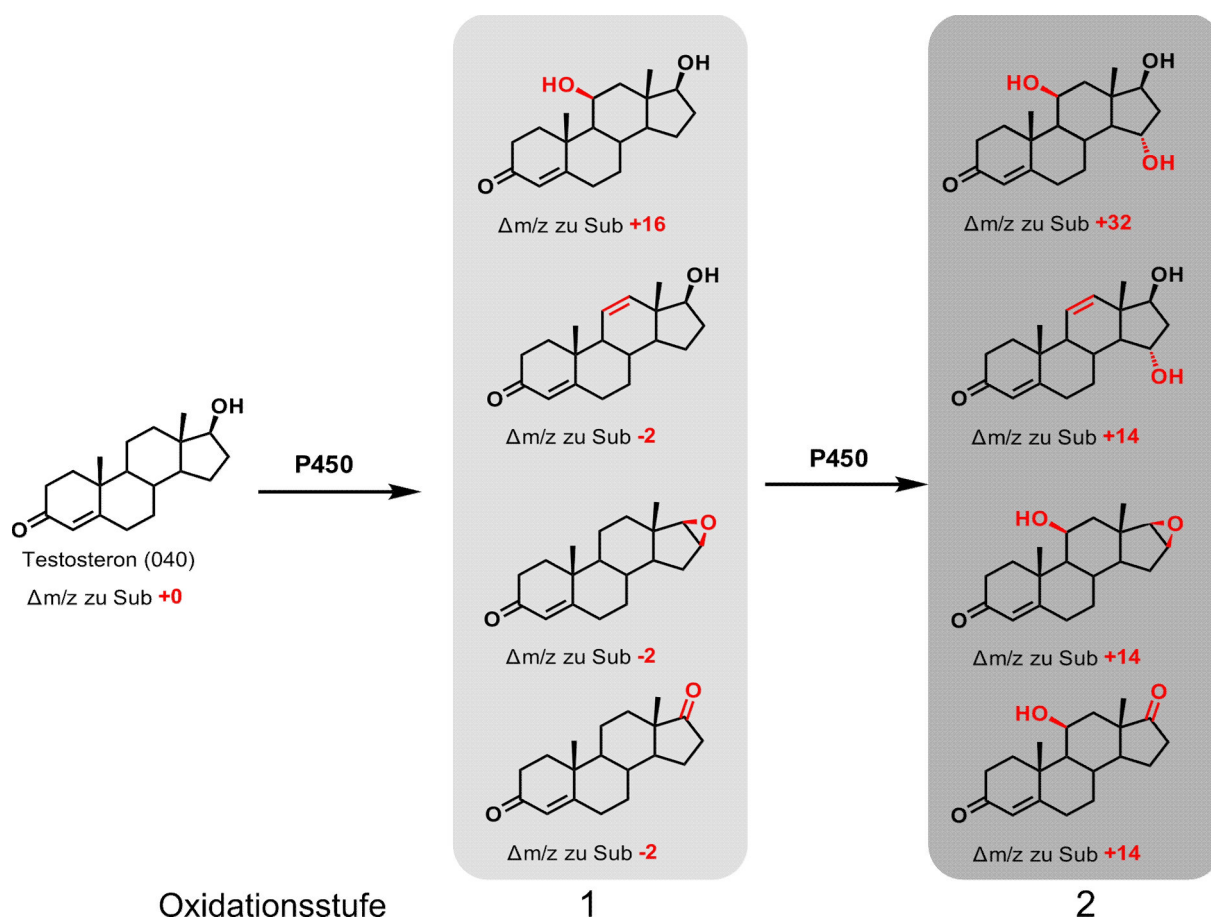
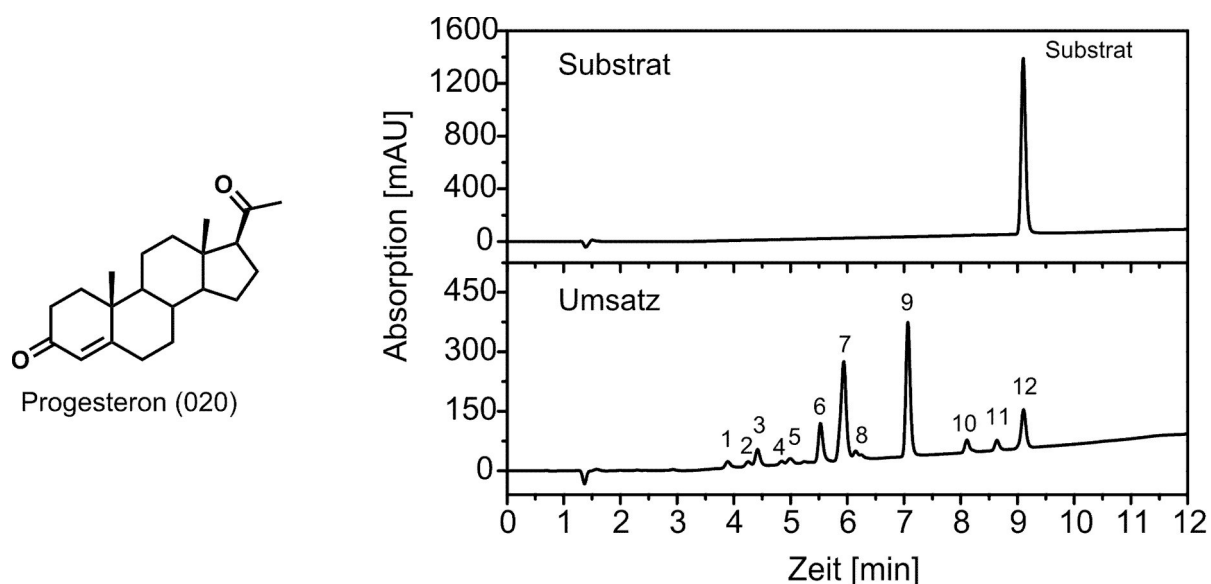


Abb. 3.19: Beispiel möglicher Produkte von Testosteron (040) durch Cytochrome P450 mit den dabei entstandenen funktionellen Gruppen und den Massendifferenzen zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) in rot.

3.6.1.1 LC-MS Charakterisierung der C21-Steroidumsätze

Als erstes C21-Steroid wurde Progesteron (020) eingesetzt, welches, wie schon zuvor (siehe Kapitel 3.3.3) und in der vorangegangenen Dissertation (Khatri 2009) erwähnt, von CYP260A1 sehr unselektiv umgesetzt wird (siehe Abb. 3.20). Bei der Umsetzung entstanden im ersten Oxidationsschritt 3 hydroxylierte Produkte (P1, P2, P3), 2 hydroxylierte Nebenprodukte (NP1 und NP2) und 2 Produkte (NP3 und NP4) bei denen 2 H-Atome gegenüber Pro-

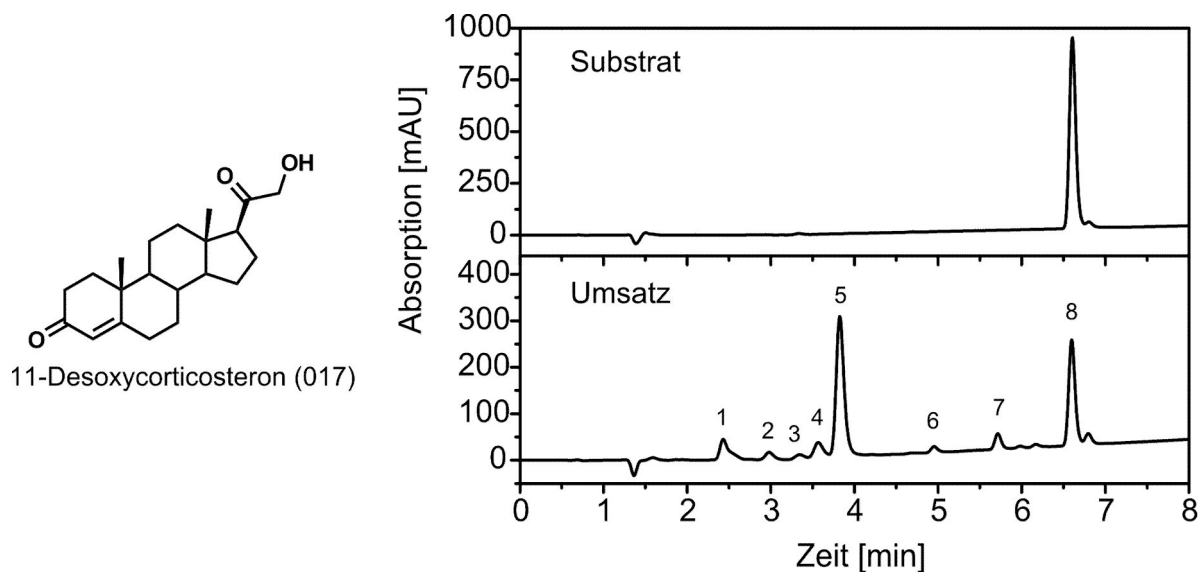
gesteron fehlten (Dehydrogenierung, $\Delta m/z$ zu Sub -2). Diese Produkte wurden in einem zweiten Oxidationsschritt (Oxidationstufe 2) in 3 dihydroxylierte Verbindungen (üNP1, üNP2 und üNP3) und 1 eine oxidierte Verbindung (üNP4; $\Delta m/z$ zu Sub +14) überführt. Insgesamt wurden ca. 178 μM Progesteron umgesetzt.



Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	3,89	347,2	32	1,8	2,0
2	üNP2	4,25	347,2	32	0,8	0,9
3	üNP3	4,42	347,2	32	3,9	4,4
4	NP1	4,84	331,2	16	0,5	0,6
5	üNP4	4,99	329,2	14	1,2	1,4
6	P1	5,53	331,2	16	10,1	11,3
7	P2	5,94	331,2	16	30,1	33,7
8	NP2	6,15	331,2	16	0,8	0,9
9	P3	7,07	331,2	16	33,9	38,0
10	NP3	8,11	313,2	-2	3,4	3,8
11	NP4	8,64	313,2	-2	2,6	2,9
12	Sub	9,11	315,2	0	10,8	-

Abb. 3.20: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Progesteron

Oben links: Strukturformel des Substrates Progesteron (020); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.



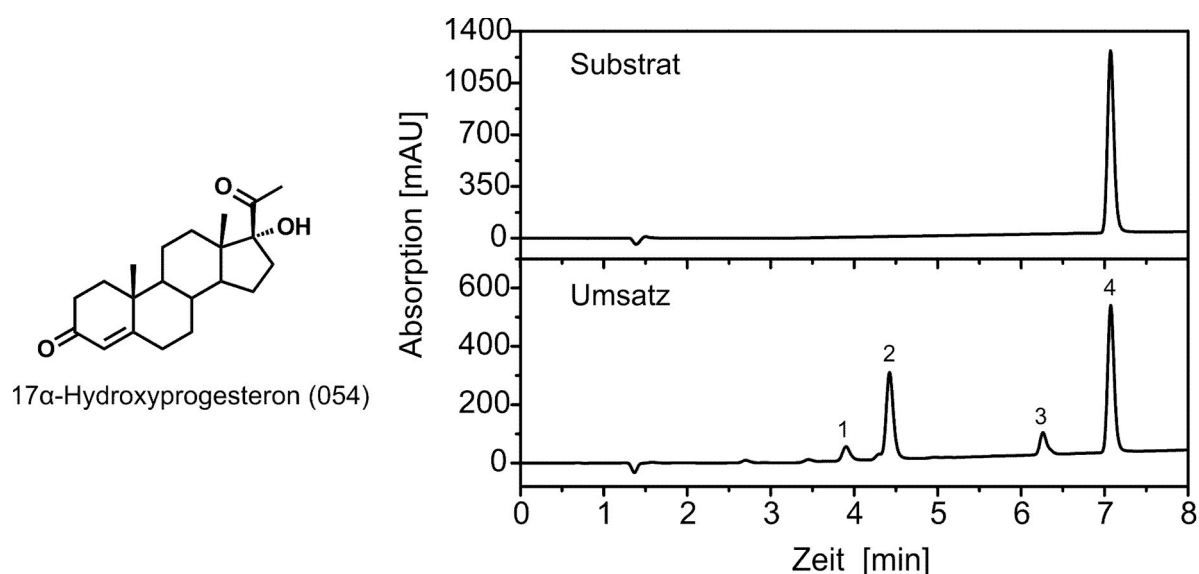
Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	2,43	363,2	32	8,4	11,9
2	üNP2	2,98	345,2	14	2,8	3,9
3	NP1	3,34	n.d.	n.d.	1,3	1,8
4	NP2	3,57	347,2	16	4,9	6,8
5	HP	3,83	347,2	16	47,7	67,0
6	NP3	4,95	347,2	16	1,8	2,5
7	NP4	5,72	329,2	-2	4,4	6,1
8	Sub	6,60	331,2	0	28,8	-

Abb. 3.21: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 11-Desoxycorticosteron

Oben links: Strukturformel des Substrates 11-Desoxycorticosteron (017); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Als nächstes wurde der CYP260A1-abhängige Umsatz von 11-Desoxycorticosteron (017) charakterisiert (siehe Abb. 3.21). Auch dieses Substrat wurde bereits in der vorangegangenen Dissertation von Khatri behandelt (Khatri 2009) und zeigte gegenüber Progesteron eine viel höhere Selektivität. Es wurde ein Hauptprodukt mit einer Selektivität von 67% erhalten, bei dem es sich nach der hier durchgeführten LC-MS Analyse um ein einfach hydroxyliertes Produkt von 11-Desoxycorticosteron handelt. Daneben wurden im ersten Oxidationsschritt noch 3 weitere Nebenprodukte gebildet, von denen 2 hydroxyliert waren (NP2 und NP3) und bei einem (NP4) wieder eine andere Oxidation stattfand ($\Delta m/z$ zu Sub -2). Außerdem wurde bei 240 nm noch ein Produkt (NP1) angezeigt, bei dem keine Masse detektierbar war. Im zweiten Oxidationsschritt entstanden 2 überoxidierte Nebenprodukte, wobei es sich um ein dihydroxy-

liertes Produkt (üNP1) und um ein oxidiertes Produkt (üNP2, $\Delta m/z$ zu Sub +14) des Substrats handelte. Insgesamt wurden ca. 142 μM 11-Desoxycorticosteron umgesetzt.



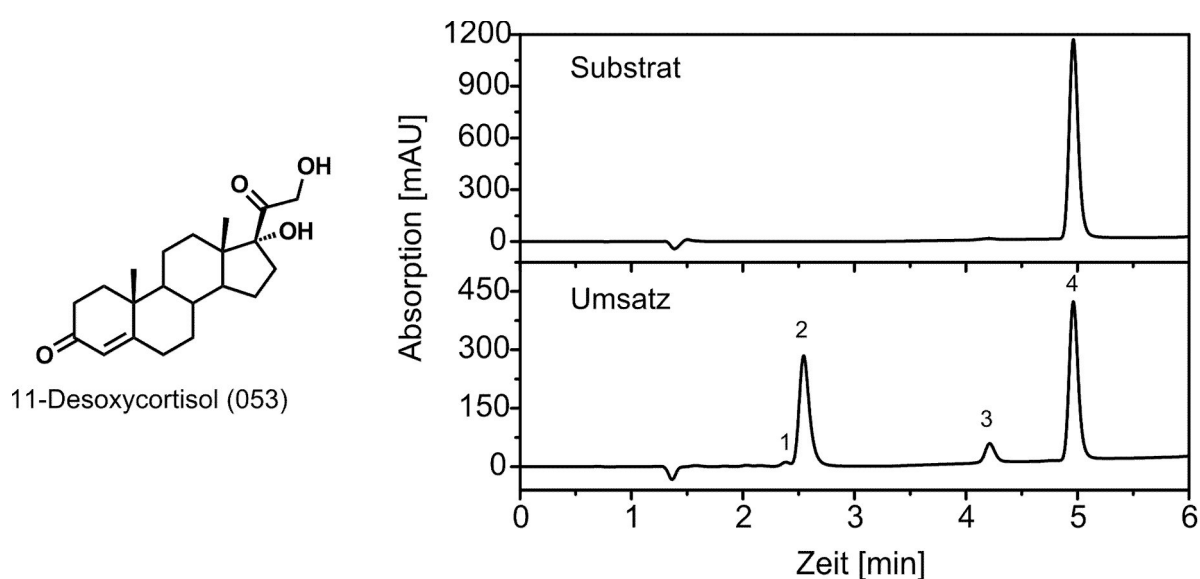
Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	NP1	3,90	347,2	16	5,8	11,7
2	HP	4,42	347,2	16	34,9	71,0
3	NP2	6,26	329,2	-2	8,5	17,2
4	Sub	7,08	331,2	0	50,8	-

Abb. 3.22: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 17 α -Hydroxyprogesteron

Oben links: Strukturformel des Substrates 17 α -Hydroxyprogesteron (054); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Da die Umsätze von Progesteron und 11-Desoxycorticosteron bis auf die Massen der Produkte bereits bekannt waren, wurden im Folgenden andere Derivate von Progesteron bzw. 11-Desoxycorticosteron näher untersucht. Eines davon war das Regioisomer von 11-Desoxycorticosteron, das 17 α -Hydroxyprogesteron (054). Auch dieses hydroxylierte Derivat von Progesteron wurde selektiv umgesetzt (siehe auch Kapitel 3.3.3), wobei hier nur ungefähr die Hälfte des Substrats umgesetzt wurde, ca. 98 μM , aber auch keine Überoxidation stattfand (siehe Abb. 3.22). Neben dem zu 71% Selektivität gebildeten Hauptprodukt wurden 2 Nebenprodukte gebildet, von denen eines auch einfach hydroxyliert (NP1) und das andere dehydrogeniert bzw. anderweitig oxidiert war ($\Delta m/z$ zu Sub -2).

Um den Effekt der 17α -OH Funktion näher zu untersuchen, wurde das an dieser Stelle hydroxylierte 11-Desoxycorticosteron, 11-Desoxycortisol (053), mit CYP260A1 umgesetzt. Auch hier zeigte das Enzym eine deutlich geringe Aktivität als die bei 11-Desoxycorticosteron beobachtete; es wurden ca. 95 μ M 11-Desoxycortisol umgesetzt, aber wiederum war eine gesteigerte Selektivität zu beobachten (siehe Abb. 3.23). Das Hauptprodukt wurde mit 85% Selektivität gebildet, wobei wie bei 17α -Hydroxyprogesteron nur ein hydroxyliertes Nebenprodukt (NP1) und ein dehydrogeniertes bzw. anderweitiges Nebenprodukt (NP2; $\Delta m/z$ zu Sub -2) entstanden.



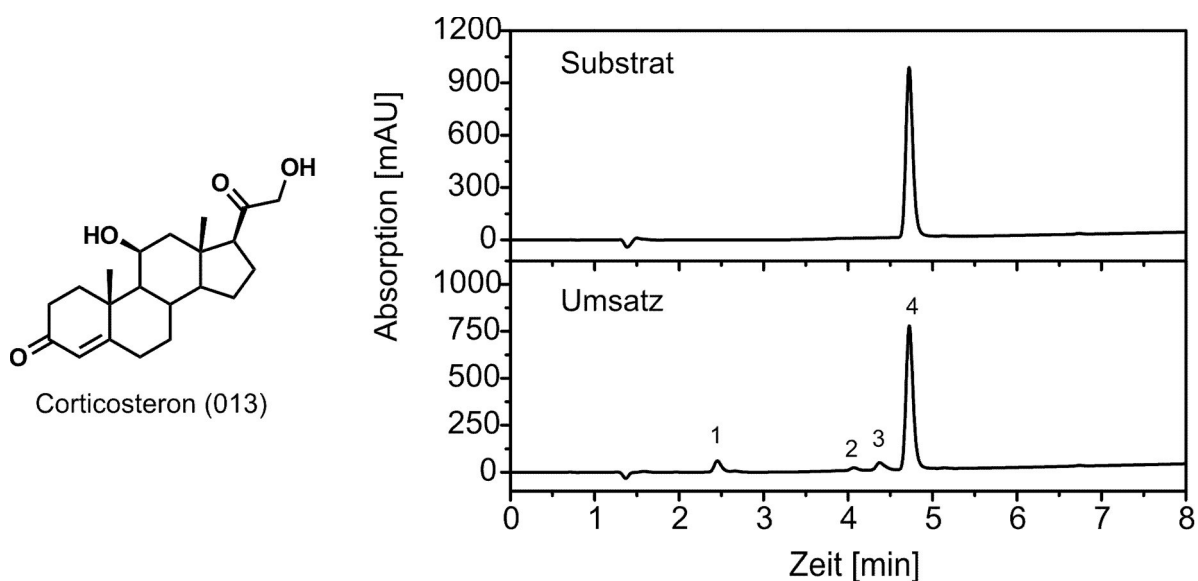
Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	NP1	2,38	363,2	16	0,5	1,0
2	HP	2,55	363,2	16	40,6	85,2
3	NP2	4,21	345,2	-2	6,5	13,7
4	Sub	4,96	347,2	0	52,3	-

Abb. 3.23: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 11-Desoxycortisol

Oben links: Strukturformel des Substrates 11-Desoxycortisol (053); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Als nächstes sollte der Effekt einer β -ständigen Hydroxylierung an der 11-Position untersucht werden. Hierfür wurden die aus dem menschlichen Steroidmetabolismus bekannten 11β hydroxylierten Folgeprodukte von 11-Desoxycorticosteron und 11-Desoxycortisol eingesetzt, Corticosteron (013) und Cortisol (052) (siehe Einleitung Abb. 1.7). Hierbei zeigte sich für

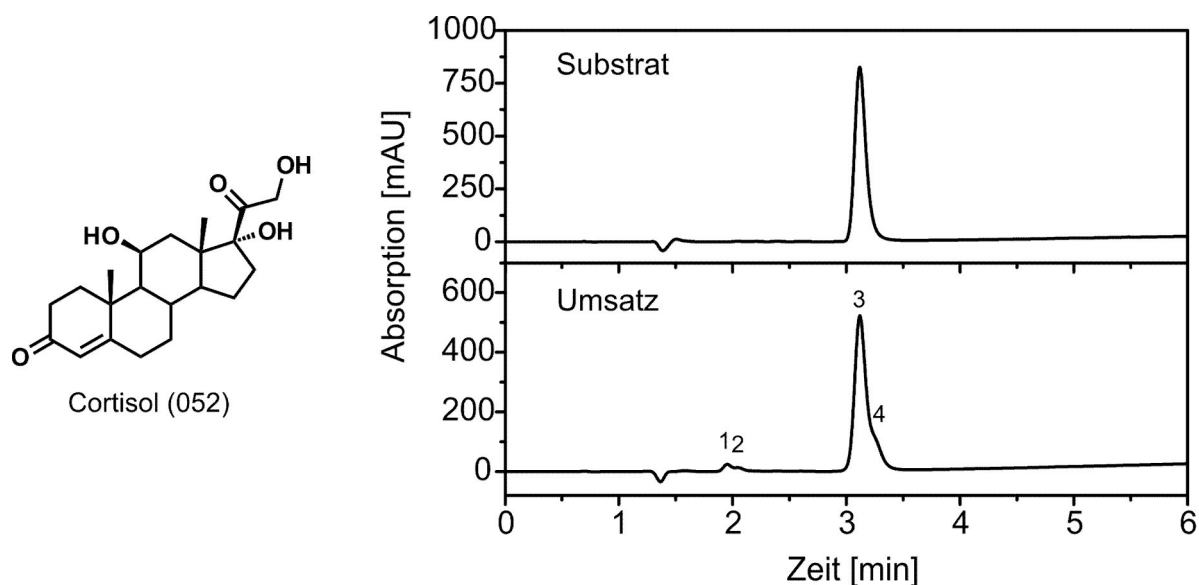
beide Substratumsätze mit CYP260A1, dass nur ca. 10-20% der Substrate umgesetzt wurden. Auch die erhaltenen Massen ergaben in diesen Fällen keine Hydroxylierung, sondern nur Massenunterschiede zum Substrat von -2. Im Fall von Corticosteron (siehe Abb. 3.24) entstehen weiterhin auch Produkte mit Massendifferenzen gegenüber dem Substrat von -4 und +14, die aber aufgrund ihrer geringen Menge nicht eindeutigen Funktionalisierungen zuzuordnen waren. Bei Cortisol konnten für 2 Produkte gar keine Massen für die Produkte detektiert werden (siehe Abb. 3.25).



Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	2,45	361,2	14	6,6	48,8
2	üNP2	4,07	343,2	-4	1,7	12,3
3	P1	4,37	345,2	-2	5,3	38,9
4	Sub	4,73	347,2	0	86,5	-

Abb. 3.24: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Corticosteron

Oben links: Strukturformel des Substrates Corticosteron (013); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

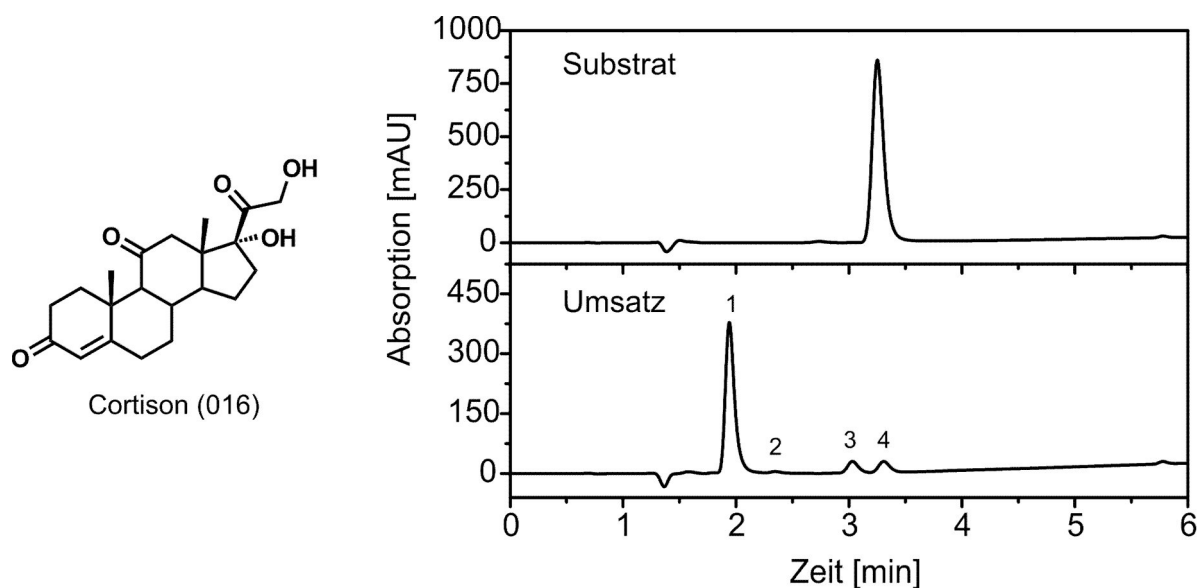


Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	P1	1,95	n.d.	n.d.	2,6	15,9
2	P2	2,04	n.d.	n.d.	1,5	9,4
3	Sub	3,12	363,2	0	< 83,7	-
4	P3	3,24	361,2	-2	> 12,2	> 74,70

Abb. 3.25: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Cortisol

Oben links: Strukturformel des Substrates Cortisol (052); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Da eine Hydroxylierung an der Position 11 des Steroidgerüsts die Aktivität von CYP260A1 sehr stark beeinflusste, wurde die Auswirkung einer Carbonylfunktion an dieser Stelle getestet. Hierzu wurde Cortison (016), die oxidierte Form von Cortisol (052), eingesetzt, wobei, wie schon bei 11-Desoxycortisol, eine hohe Aktivität erreicht wurde, ca. 186 μM Substratumsatz (siehe Abb. 3.26). Die Selektivität des hydroxylierten Hauptproduktes mit 91% konnte sogar gegenüber 11-Desoxycortisol noch gesteigert werden. Dabei entstanden zwei Nebenprodukte. Eines (NP1) lag in so geringer Konzentration vor, dass keine Massenbestimmung möglich war. Bei dem anderen Nebenprodukt (NP2) wiederum wurde eine Massendifferenz zum Substrat von -2 festgestellt.



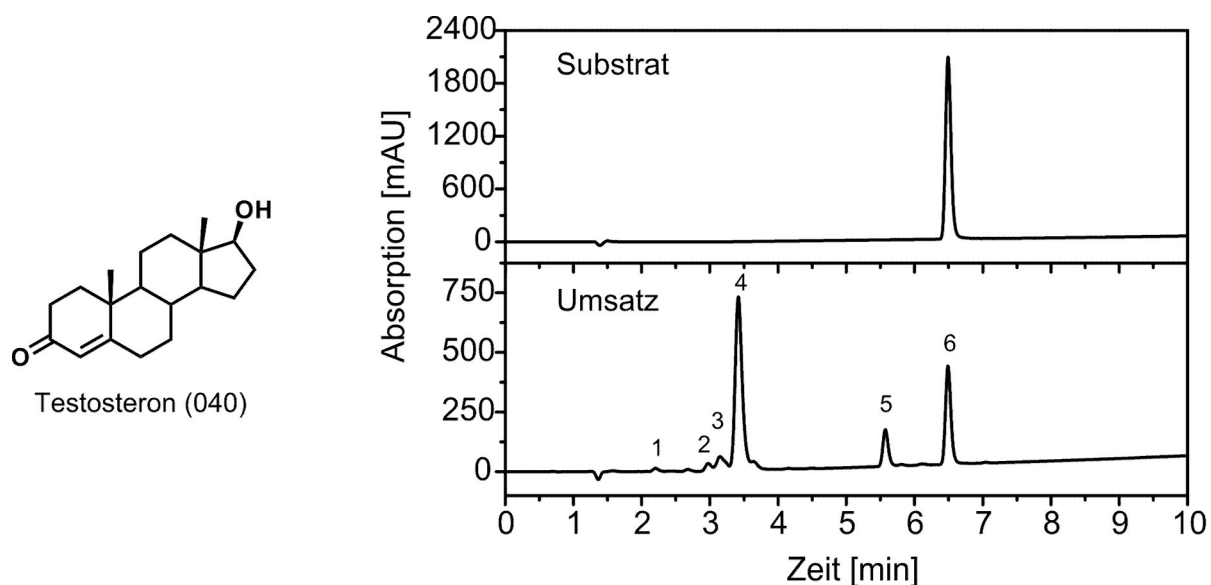
Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	dm/z zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	HP	1,94	377,2	16	84,9	91,4
2	NP1	2,35	n.d.	n.d.	0,7	0,8
3	NP2	3,03	359,2	-2	7,3	7,8
4	Sub	3,31	361,2	0	7,2	-

Abb. 3.26: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Cortison

Oben links: Strukturformel des Substrates Cortison (016); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

3.6.1.2 LC-MS Charakterisierung der C19-Steroidumsätze

Nach den C21-Steroiden wurden im folgenden C19-Steroide mit Androst-4-en-3-on als Grundgerüst und Derivate dieser Verbindungen mit CYP260A1 getestet. Diese Steroidklasse wurde erstmals bei der Substratsuche mit CYP260A1 untersucht, wobei alle getesteten Verbindungen umgesetzt wurden (siehe Tab. 3.6). Zuerst wurde der Umsatz von Testosteron, das eine OH-Funktion an der Position 17 des Steroidgerüsts besitzt, untersucht (siehe Abb. 3.27). Hierbei zeigte sich, dass Testosteron (040) hauptsächlich in ein einfach hydroxyliertes Produkt mit einer Selektivität von 80% umgesetzt wird. Weiterhin wurde noch ein hydroxyliertes Nebenprodukt (NP1) und ein dehydrogeniertes bzw. anderweitig modifiziertes Nebenprodukt (NP2, $\Delta m/z$ zu Sub -2) identifiziert. Eine Überoxidation fiel eher gering aus, es entstand ein dihydroxyliertes Produkt (\ddot{u} NP1) und ein Produkt mit der Massendifferenz zum Substrat von +14. Der gesamte Substratumsatz betrug ca. 148 μ M.

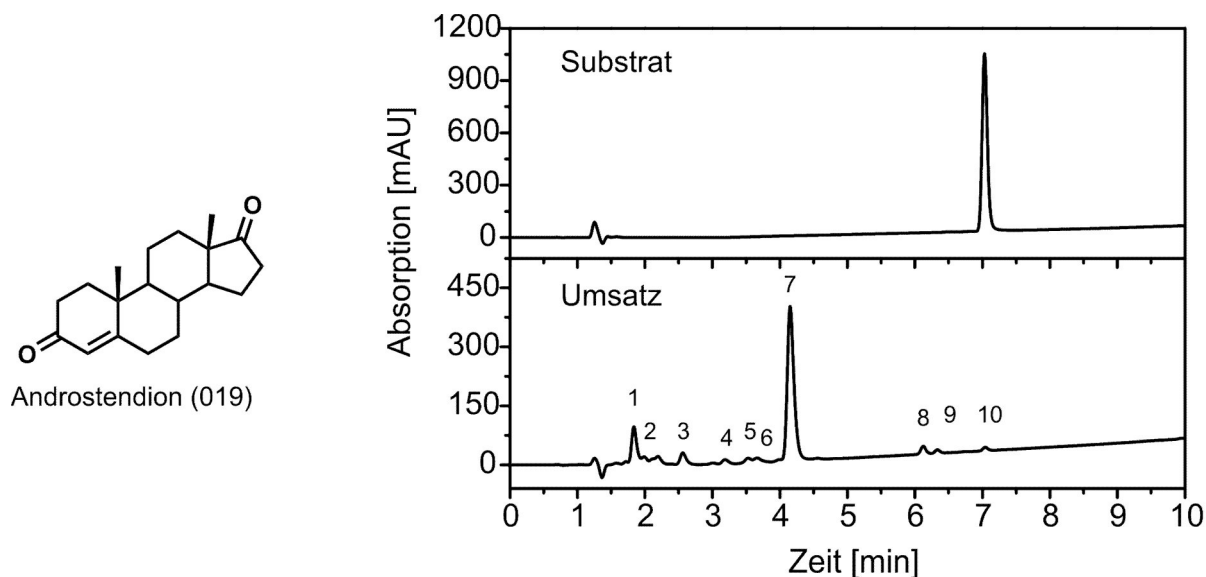


Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	2,20	321,2	32	0,8	1,1
2	üNP2	2,97	303,2	14	1,3	1,8
3	NP1	3,15	305,2	16	3,3	4,5
4	HP	3,42	305,2	16	58,9	79,6
5	NP2	5,57	287,2	-2	9,6	13,0
6	Sub	6,49	289,2	0	26,1	-

Abb. 3.27: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Testosteron

Oben links: Strukturformel des Substrates Testosteron (040); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Wegen der Carbonylfunktion am C17-Atom wurde als nächstes Edukt Androstendion (019) eingesetzt (siehe Abb. 3.28). Im Gegensatz zum Testosteron kam es hierbei zu einer Vielzahl von überoxidierten Produkten (üNP1-üNP5), d.h. Dihydroxylierungen und anderweitig überoxidierten Produkten ($\Delta m/z$ zu Sub -2). Diese Reaktionen fanden aber nur in geringem Maße statt, so dass trotzdem ein deutliches Hauptprodukt mit einer Selektivität von 74% entstand und dies bei einem nahezu kompletten Substratumsatz von ca. 198 μM . Als Nebenprodukte der Oxidationstufe 1 wurden eine dihydroxylierte Verbindung (NP1) und 2 weitere Verbindungen (NP2 und NP3) identifiziert. Bei Letzteren hatte eine Verbindung den Massenunterschied von -2 zum Androstendion und das andere konnte aufgrund seiner geringen Menge im Massenspektrometer nicht charakterisiert werden.

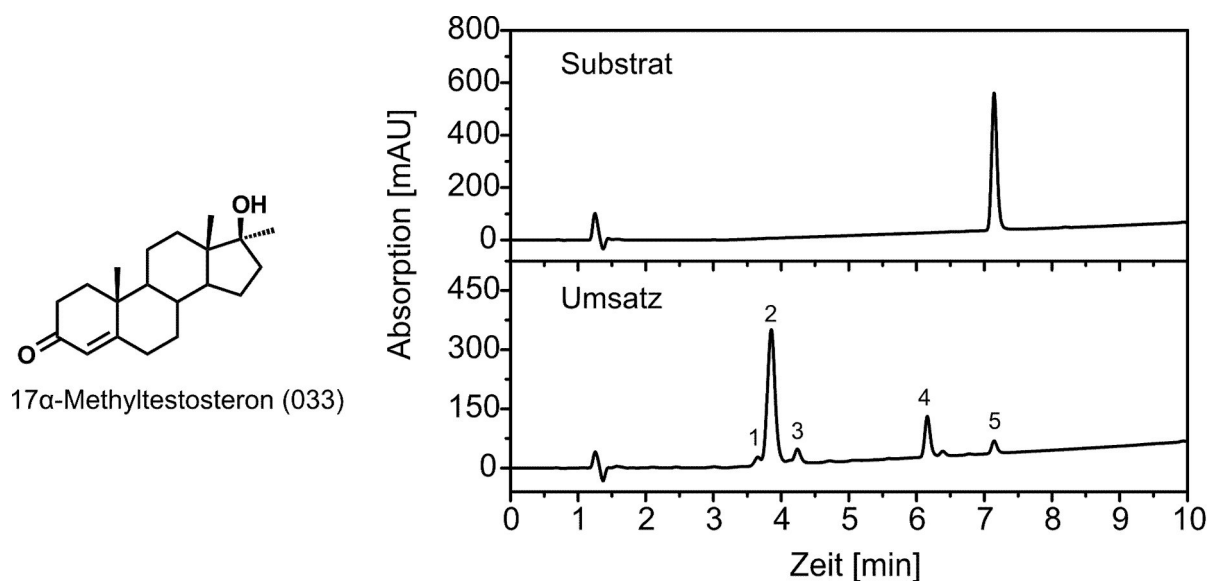


Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	1,84	319,2	32	11,0	11,1
2	üNP2	2,19	319,2	32	2,7	2,7
3	üNP3	2,56	319,2	32	4,8	4,9
4	üNP4	3,19	301,1	14	1,8	1,8
5	üNP5	3,52	301,1	14	0,9	0,9
6	NP1	3,67	303,1	16	0,9	0,9
7	HP	4,15	303,1	16	72,8	73,7
8	NP2	6,12	285,1	-2	2,8	2,8
9	NP3	6,33	n.d.	n.d.	1,1	1,1
10	Sub	7,04	287,2	0	1,2	-

Abb. 3.28: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Androstendion

Oben links: Strukturformel des Substrates Androstendion (019); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Da das Androstendion die Aktivität und die Selektivität im Vergleich zu Testosteron noch einmal verbesserte, wurde nun der Effekt einer Methylgruppe am Testosteron betrachtet. Hierzu wurde der Arzneistoff 17α -Methyltestosteron (033) eingesetzt (siehe Abb. 3.29). CYP260A1 setzte diesen in 3 hydroxylierte Verbindungen um (NP1, HP und NP2), wobei das Hauptprodukt eine Selektivität von 76% erreichte. Zusätzlich wurde ein dehydrogeniertes bzw. anderweitiges Nebenprodukt (NP3; $\Delta m/z$ zu Sub -2) gebildet. Eine Überoxidation war im Gegensatz zu Testosteron und Androstendion nicht zu beobachten. Der Umsatz mit ca. 190 μM war vergleichbar zu Androstendion.

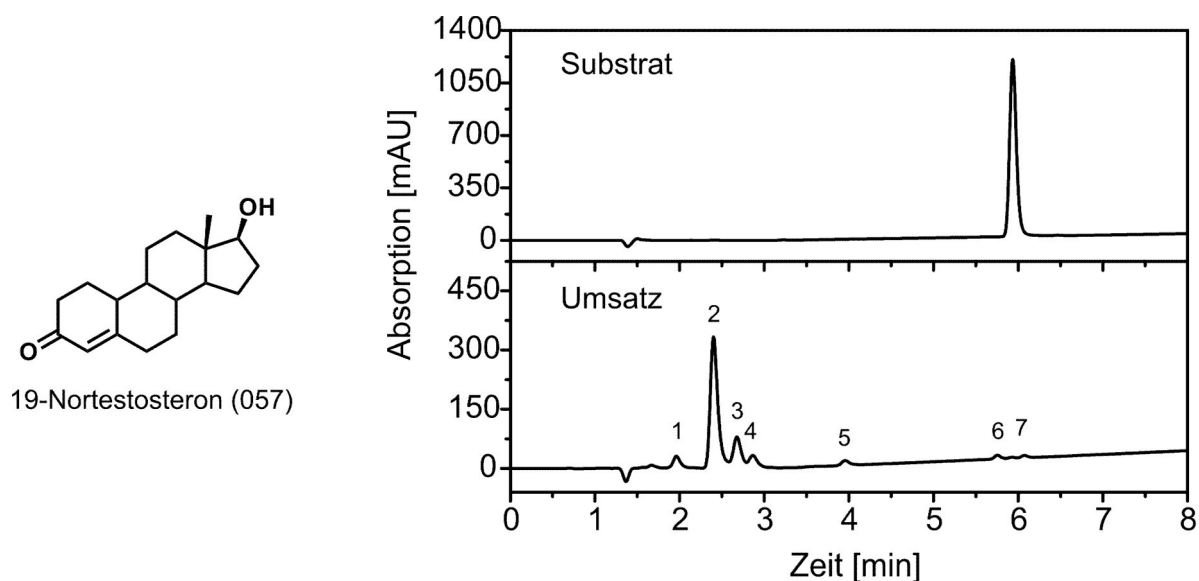


Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	NP1	3,65	319,2	16	1,5	1,5
2	HP	3,86	319,2	16	72,3	76,0
3	NP2	4,24	319,2	16	5,1	5,4
4	NP3	6,16	301,2	-2	16,2	17,0
5	Sub	7,15	303,2	0	4,9	-

Abb. 3.29: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 17 α -Methyltestosteron

Oben links: Strukturformel des Substrates 17 α -Methyltestosteron (033); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Da von Testosteron und Androstendion auch die 19-Norderivate, d.h. die Verbindungen ohne die Methylgruppe an Position 19 kommerziell erhältlich sind, wurde anschließend auch der Einfluss dieser Methylfunktion auf den Umsatz durch CYP260A1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass für 19-Nortestosteron (057) ein Hauptprodukt mit 73% Selektivität entstand (siehe Abb. 3.30). Im Vergleich zu Testosteron wurden 2 weitere hydroxylierte Nebenprodukte, d.h. insgesamt 3 (NP1, NP2 und NP3), gebildet. Wiederum wurde ein Nebenprodukt mit der Massendifferenz -2 zum Edukt sowie ein überoxidiertes Produkt (üNP1) mit der Massendifferenz +14 gefunden. Ungefähr 197 μ M Substrat wurden bei der Reaktion durch CYP260A1 verbraucht.



Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	1,96	289	14	6,0	6,1
2	HP	2,40	291,2	16	72,1	73,3
3	NP1	2,68	291,2	16	12,4	12,6
4	NP2	2,87	291,2	16	4,3	4,4
5	NP3	3,96	291,2	16	2,7	2,7
6	Sub	5,76	275,1	0	1,7	-
7	NP4	6,08	271,1	-2	0,9	1,0

Abb. 3.30: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 19-Nortestosteron

Oben links: Strukturformel des Substrates 19-Nortestosteron (057); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Bei 19-Norandrostendion (050) war die Aktivität, mit ca. 194 μ M umgesetztem Substrat vergleichbar zum 19-Nortestosteron (057), wobei hier keine selektive Reaktion stattfand (siehe Abb. 3.31). In der Oxidationsstufe 1 entstanden 3 hydroxylierte Produkte (P1, P2 und P3), aber erstmals keine dehydrogenierten bzw. anderweitig oxidierten Produkte mit der Massendifferenz -2. In der Oxidationstufe 2 wurden nur 2 Produkte klar identifiziert (üNP1 und üNP2). Das Produkt üNP2 erreicht mit einer Selektivität von 23%, ähnliche Werte wie die Produkte der Oxidationsstufe 1.

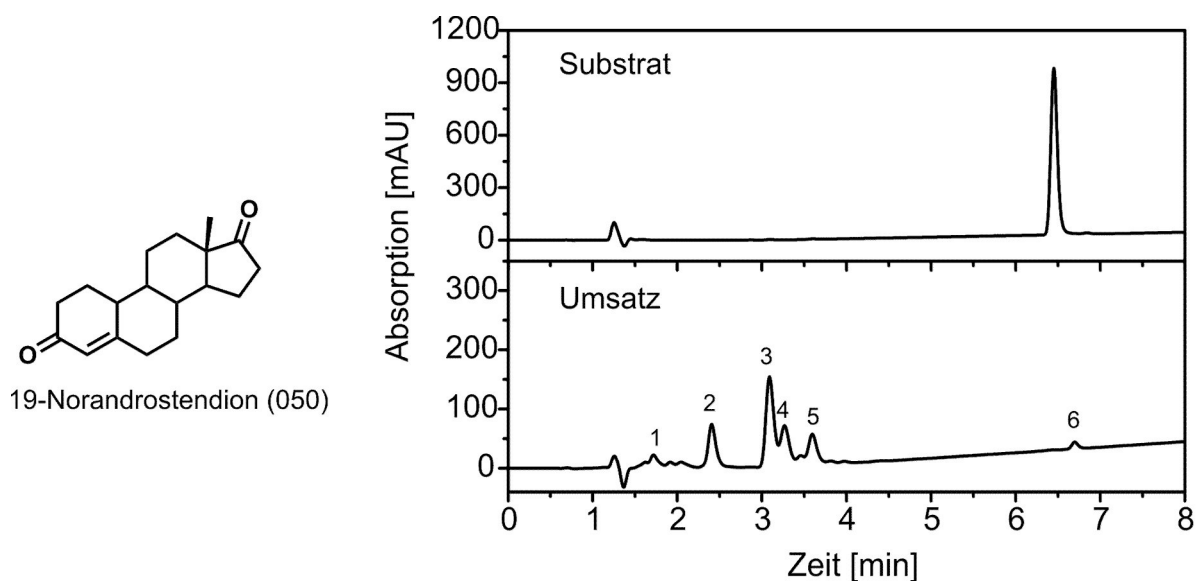
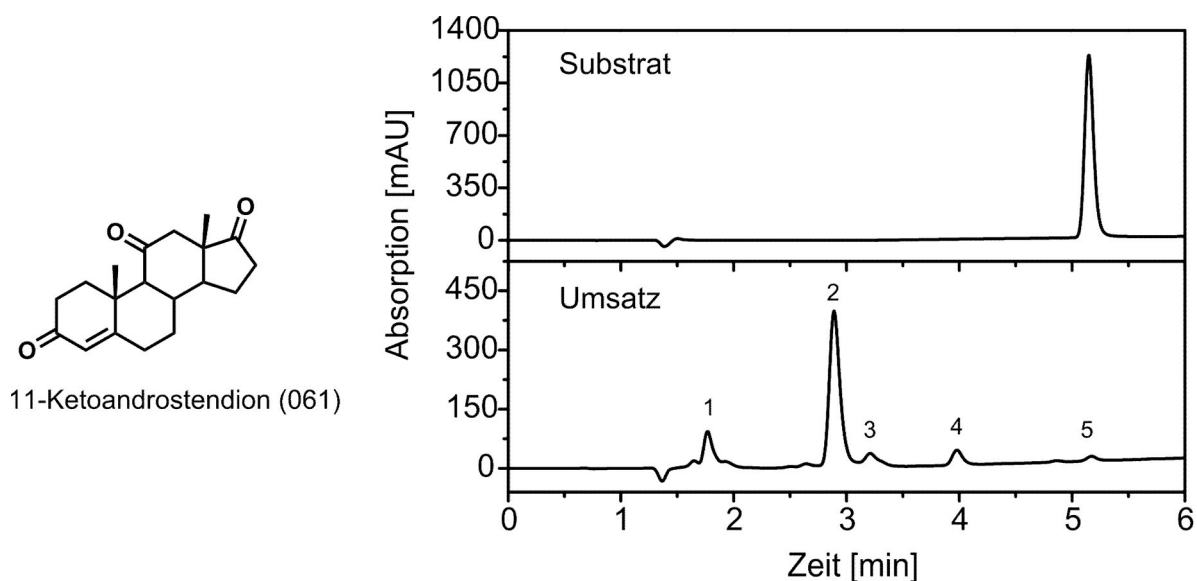


Abb. 3.31: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 19-Norandrostendion

Oben links: Strukturformel des Substrates 19-Norandrostendion (050); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Im Falle der C21-Steroide wurde beobachtet, dass die Position 11 des Steroidgerüsts einen großen Einfluss auf die Aktivität und Selektivität von CYP260A1 hatte. Aus diesem Grund wurde nun die 11-Ketoform von Androstendion, 11-Ketoandrostendion (061), mit CYP260A1 umgesetzt (siehe Abb. 3.32). Hierbei zeigte sich, dass durch die Carbonylfunktion keine Verringerung der Aktivität und Selektivität zu beobachten war. Es wurden ca. 196 μM Substrat umgesetzt, ein hydroxyliertes Hauptprodukt beobachtet und eine Selektivität von 76% erreicht. Als Nebenprodukte wurden 2 weitere hydroxylierte Verbindungen (NP1 und NP2) gebildet. Gegenüber Androstendion (019) entstand nur ein überoxidiertes Produkt (üNP1), bei dem es sich um eine Dihydroxylierung des 11-Ketoandrostendion (061) handelt.

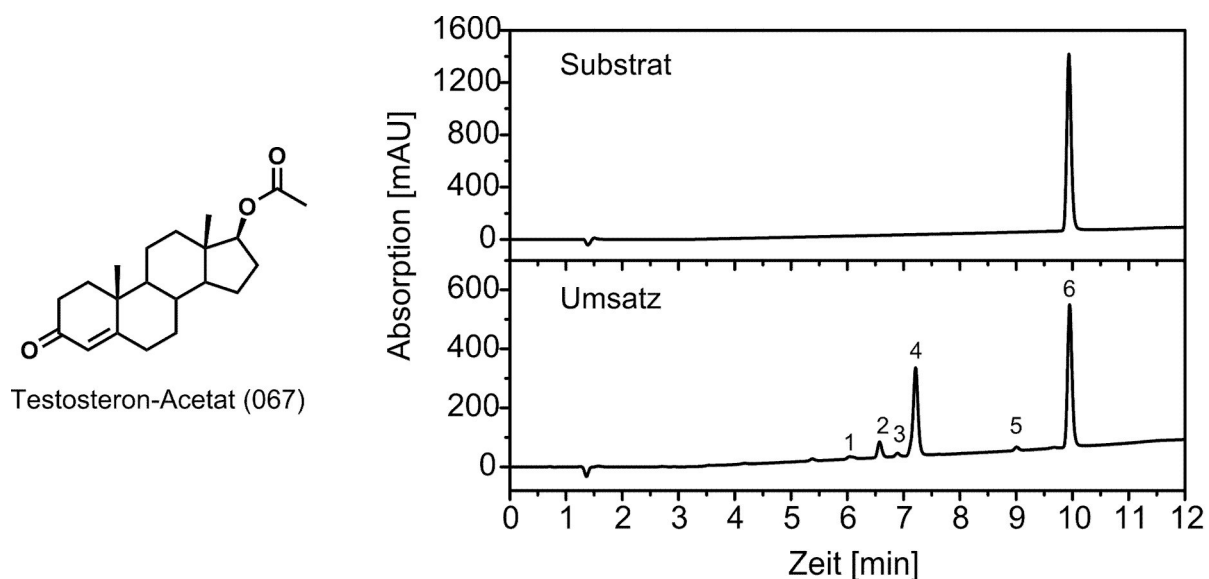


Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	1,77	333,2	32	11,6	11,8
2	HP	2,89	317,2	16	74,4	75,9
3	NP1	3,21	317,2	16	5,3	5,4
4	NP2	3,98	317,2	16	6,7	6,8
5	Sub	5,17	301,2	0	2,0	-

Abb. 3.32: CYP260A1 katalysierter Umsatz von 11-Ketoandrostendion

Oben links: Strukturformel des Substrates 11-Ketoandrostendion (061); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Als nächstes wurde der Umsatz von acetyliertem Testosteron, Testosteron-Acetat (067), untersucht (siehe Abb. 3.33), um zu testen, ob und wie Testosteron, das eine Schutzgruppe enthält, umgesetzt wird. Insgesamt wurden hierbei ca. 91,4 μM Edukt verbraucht. Es entstand wiederum ein hydroxyliertes Hauptprodukt mit einer Selektivität von 80% und 3 weiter hydroxylierte Nebenprodukte (NP1, NP2 und NP3). Außerdem entstand auch wieder in geringer Menge ein Nebenprodukt mit der Massendifferenz von -2 gegenüber dem Substrat.



Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	NP1	6,04	347,2	16	1,2	2,6
2	NP2	6,57	347,2	16	5,5	12,0
3	NP3	6,89	347,2	16	1,0	2,2
4	HP	7,21	347,2	16	36,8	80,4
5	NP4	9,01	329,2	-2	1,3	2,8
6	Sub	9,95	331,2	0	54,3	-

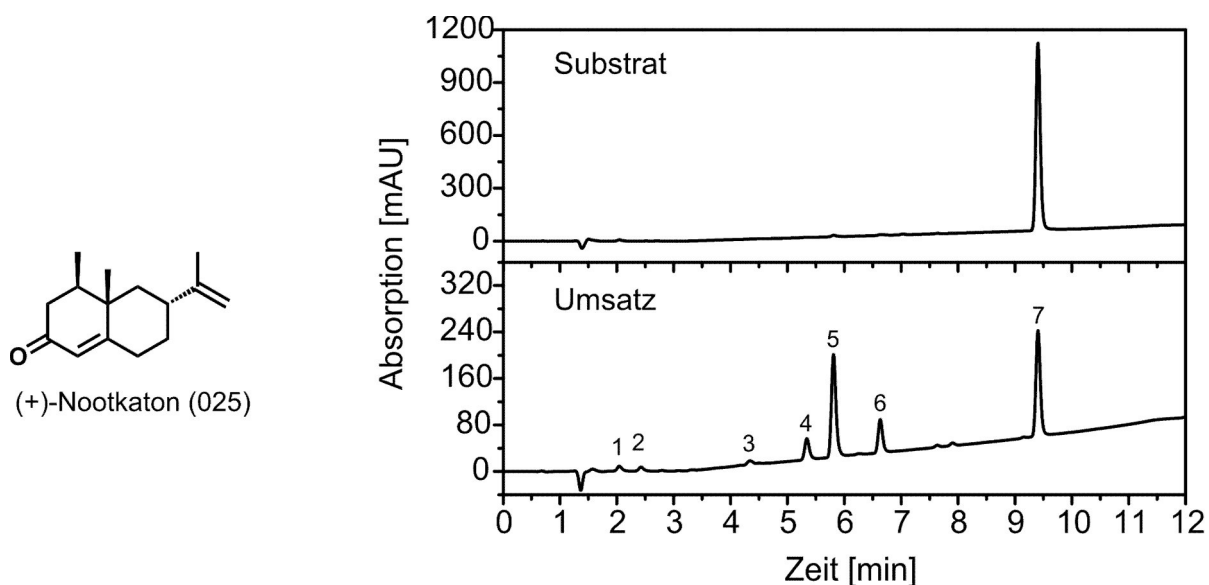
Abb. 3.33: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Testosteron-Acetat

Oben links: Strukturformel des Substrates Testosteron-Acetat (067); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

3.6.1.3 LC-MS Charakterisierung von steroidähnlichen Sesquiterpenen

Im Jahre 2009 wurden Arbeiten an CYP260A1 erstmals veröffentlicht. In dieser Publikation (Ewen *et al.* 2009) wurde das Sesquiterpen (+)-Nootkaton (025) als Substrat verwendet und die natürlichen Redoxpartner (Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 mit der Reduktase FdR_B) im Gegensatz zu der heterologen Redoxkette Adx₄₋₁₀₈-AdR verwendet. Dieses Sesquiterpen hat eine vergleichbare Struktur zu den zuvor behandelten Steroiden. Es fehlt der Struktur der C-Ring und D-Ring der Steroidstruktur. In der Veröffentlichung wurden 4 hydroxylierte Produkte und ein dihydroxyliertes Produkt gefunden. Im Gegensatz dazu konnten nun mit der effizienteren Redoxkette 3 hydroxylierte Verbindungen (NP1, NP2 und HP) ein dihydroxyliertes Nebenprodukt (üNP2) und ein anderweitig oxidiertes ($\Delta m/z$ zu Sub -2) Nebenprodukt (NP3) identifiziert werden (siehe Abb. 3.34). Das Hauptprodukt wurde mit einer Selektivität von 61%

gebildet wird. Zusätzlich eluierte auch ein Produkt mit einer Massendifferenz zum Substrat von +34, das aufgrund seiner Masse und Menge nicht einer eindeutigen Funktionalisierung zuzuordnen ist. Der Umsatz war auch mit ca. 125 μM Substrat nur moderat.

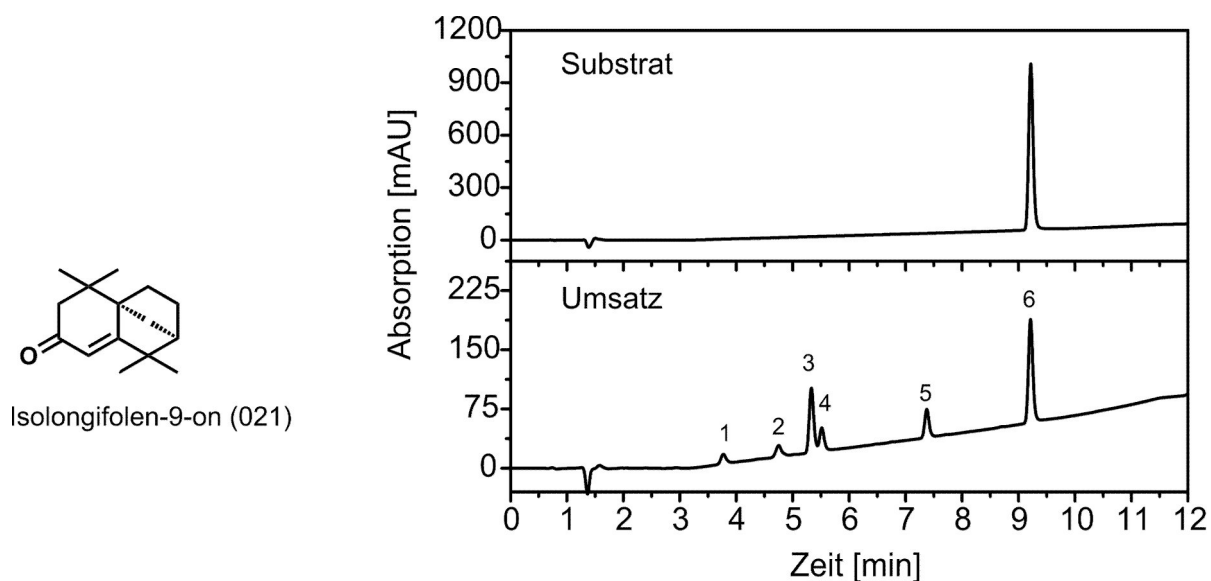


Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta\text{m/z}$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	üNP1	2,04	253	34	1,9	3,1
2	üNP2	2,42	251,1	32	1,6	2,6
3	NP1	4,34	235,1	16	1,5	2,4
4	NP2	5,34	235,1	16	7,9	12,6
5	HP	5,81	235,1	16	37,8	60,7
6	NP3	6,63	233,1	14	11,7	18,7
7	Sub	9,41	219,1	0	37,7	-

Abb. 3.34: CYP260A1 katalysierter Umsatz von (+)-Nootkaton

Oben links: Strukturformel des Substrates (+)-Nootkaton (025); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta\text{m/z}$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

Neben (+)-Nootkaton stand mit Isolongifolen-9-on (021) ein weiteres Sesquiterpen mit steroidähnlicher Struktur zur Verfügung (siehe Abb. 3.35). Dieses wurde mit ca. 11,4 μM noch schlechter umgesetzt als (+)-Nootkaton (025). Es entstand auch kein Hauptprodukt, sondern lediglich 4 hydroxylierte Produkte (NP1, NP2, NP3 und NP4) und ein weiteres hydroxyliertes Nebenprodukt in geringer Menge (NP1), wobei NP2 mit einer Selektivität von 45% bevorzugt gebildet wurde.



Peak Nr.	Name	RT [min]	m/z	$\Delta m/z$ zu Sub	Fläche [%]	P-Vert. [%]
1	NP1	3,77	235,1	16	4,8	8,5
2	P1	4,75	235,1	16	6,5	11,7
3	P2	5,33	235,1	16	25,3	45,4
4	P3	5,52	235,1	16	7,3	13,1
5	P4	7,38	235,1	16	11,9	21,3
6	Sub	9,21	219,1	0	44,3	-

Abb. 3.35: CYP260A1 katalysierter Umsatz von Isolongifolen-9-on

Oben links: Strukturformel des Substrates Isolongifolen-9-on (021); Oben rechts: HPLC-Chromatogramm (Gradient II) der Reinsubstanz und des Umsatzes detektiert bei 240 nm; Unten: Tabelle mit den Peak Nummern, dem Namen der Produkte, der Retentionszeit (RT), dem m/z Verhältnis im Massenspektrometer, der Massendifferenz zum Substrat ($\Delta m/z$ zu Sub) der prozentualen Fläche der Peaks und dem Verhältnis bzw. der Selektivität der Produkte in Prozent.

3.6.2 Charakterisierung der Hauptprodukte

Nachdem die CYP260A1-abhängigen Umsätze der verschiedenen Steroide und steroidähnlichen Sesquiterpene auf ihre Aktivität und Selektivität hin untersucht worden waren und die Massen der Produkte vorlagen, stellte sich die Frage, an welchen Positionen die Substrate oxidiert bzw. hydroxyliert werden. Zur detaillierten Charakterisierung der Produkte sollten sowohl 1-dimensionale als auch 2-dimensionale ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren der jeweiligen Produkte aufgenommen werden. Da hierfür Produktmengen im mg-Bereich benötigt wurden, wurden das zuvor für CYP109D1, CYP264A1 und CYP106A2 etablierte Ganzzellsystem (siehe Kapitel 3.5) und die damit erarbeiteten Verfahren auf CYP260A1 übertragen. Der hier-

für benötigte tricistronische Vektor pETMR7 (CYP260A1/Fpr/Adx₁₋₁₀₈) war bereits zuvor mit den anderen Cytochromen P450 kloniert worden (siehe Kapitel 3.5.1) und konnte nun eingesetzt werden. Das bedeutet, dass die Expression und Umsetzung analog zur Produktisolierung des CYP264A1-abhängigen Umsatzes von 4-Methyl-3-Phenylcumarin (siehe Kapitel 3.5.6) wieder in M9CA-Medium in 4 identischen 2 L Schikanekolben durchgeführt wurde. Nach Extraktion mit Chloroform und Eindampfen der organischen Phase wurde das Hauptprodukt mittels Kieselgel-Chromatographie mit Hexan und Ethylacetat als mobile Phase von den Nebenprodukten und dem Substrat getrennt und die Fraktionen mit dem Produkt gesammelt. Alternativ zur klassischen Kieselgel-Chromatographie konnte im letzten Jahr auch eine semipräparative HPLC-Anlage mit Fraktionssammler zur Trennung und Isolierung verwendet werden (siehe Material & Methoden 2.2.7.4). Die quantitativen Mengen an isoliertem Produkt wurden dabei nicht näher bestimmt. Es wurden aber bei allen Produkten Ausbeuten von mindestens 10 mg erhalten. Diese wurden dann mittels 1-dimensionaler als auch 2-dimensionaler ¹H- und ¹³C-NMR Spektroskopie bestimmt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome bei den detaillierten NMR-Daten erfolgte hierbei nach der IUPAC Nummerierung für Steroidgerüste (siehe Einleitung Abb. 1.7).

3.6.2.1 NMR-Charakterisierung der Hauptprodukte der C21-Steroide

Für die NMR-Charakterisierung wurden die Hauptprodukte der Substrate 11-Desoxycorticosteron (017), 17 α -Hydroxyprogesteron (054) und 11-Desoxycortisol (053) aus Ganzzellumsätzen mit dem pETMR7 (CYP260A1/Fpr/Adx₁₋₁₀₈) System isoliert. Progesteron wurde aufgrund der schlechten Selektivität der CYP260A1 abhängigen Umsätze nicht näher untersucht. Bei allen anderen konnte das Hauptprodukt isoliert und die Hydroxylierungsposition bestimmt werden. Bei allen Produkten wurde eine Hydroxylierung an der 1 α -Position der C21-Steroide (siehe Abb. 3.36) nachgewiesen.

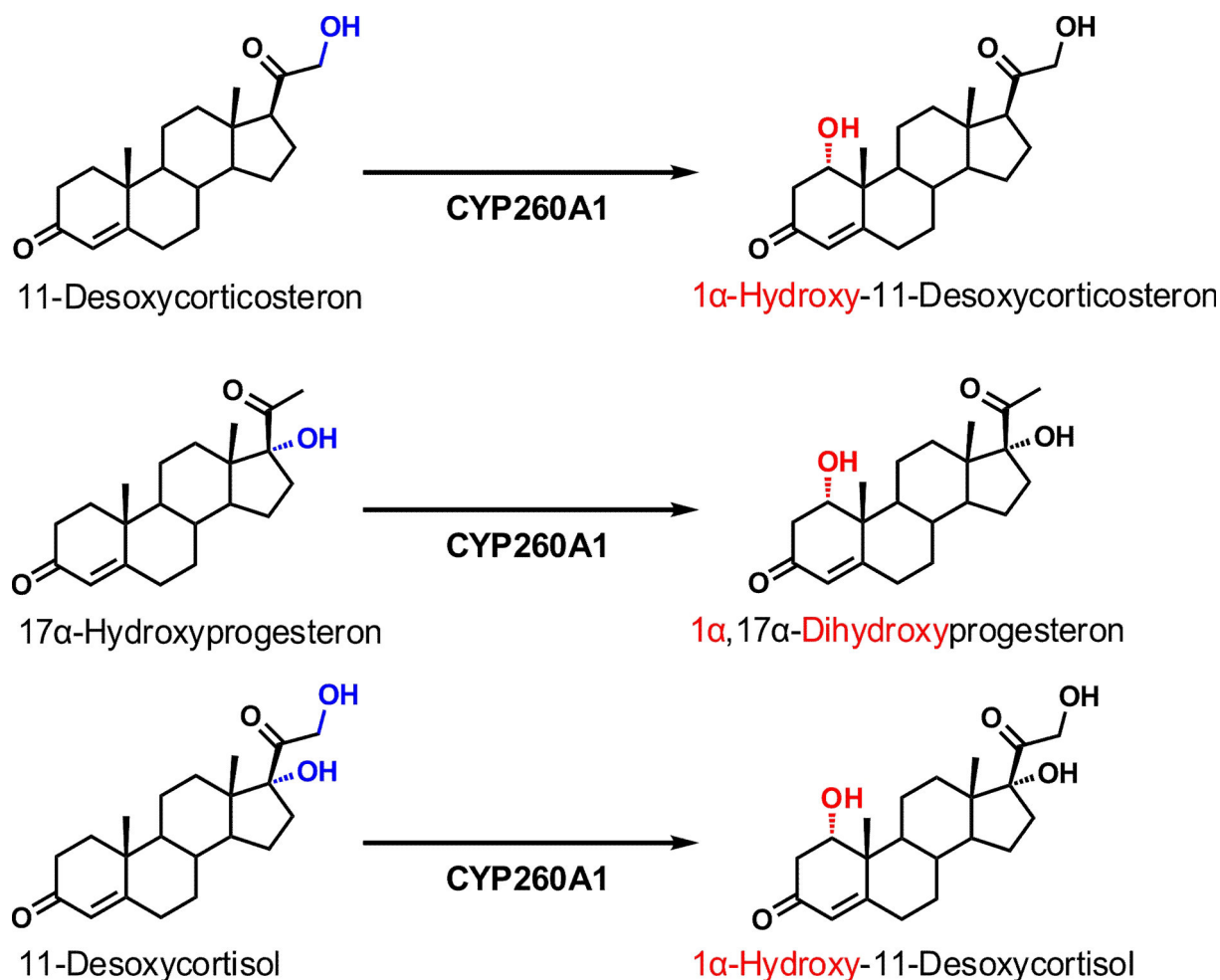


Abb. 3.36: Reaktionsgleichungen der CYP260A1-katalysierte Umsätze von 11-Deoxycorticosteron (017), 17 α -Hydroxyprogesteron (054) und 11-Desoxycortisol (053) und die dabei entstandenen 1 α hydroxylierten Hauptprodukte; bei Substraten (links): Pregn-4-en-3,20-dion Grundgerüst in schwarz und zusätzliche OH-Funktionalitäten in blau; bei Produkten(rechts): Substratstruktur in schwarz und neu eingeführte 1 α -Hydroxyfunktionen in rot.

Im Folgenden sind die detaillierten NMR-Daten der jeweiligen Produkte aufgeführt:

1 α -Hydroxy-11-Desoxycorticosteron:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.69, *s*, 3H (H-18); 1.08, *dddd*, $J=$ 13, 13, 11.5 und 5.5 Hz (H-7a); 1.18, *s*, 3H (H-19); 1.24, *m* (H-14); 1.34, *m* (H-15a); 1.42, *m* (H-12a); 1.43, *m* (H-11a); 1.56, *ddd*, $J=$ 11.5, 11 und 3.5 Hz (H-8); 1.66, *dddd*, $J=$ 11.5, 11.5, 3.5 und 3.5 Hz (H-11b); 1.70, *m* (H-9); 1.77, *m* (H-16a); 1.78, *m* (H-15b); 1.83, *m* (H-7b); 1.93, *m* (H-12b); 2.22, *m* (H-16b); 2.36, *m* (H-6a); 2.39, *m* (H-6b); 2.46, *dd*, $J=$ 9 und 9 Hz (H-17); 2.55, *ddd*, $J=$ 17, 3.5 und 1 Hz (H-2a); 2.75, *dd*, $J=$ 17 und 3 Hz (H-2b); 3.21, *dd*, $J=$ 4.5 und 4 Hz (OH-21); 4.08 *dd*, $J=$ 3.5 und 3 Hz (H-1); 4.14, *dd*, $J=$ 19 und 4 Hz (H-21a); 4.20, *dd*, $J=$ 19 und 4.5 Hz

(H-21b); 5.79, *dd*, $J=1$ und 1 Hz (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 13.44 (C-18), 18.54 (C-19); 20.32 (C-11); 22.95 (C-16), 24.55 (C-15); 31.00 (C-7); 32.84 (C-6); 35.20 (C-8); 38.21 (C-12); 42.86 (C-2); 43.17 (C-10); 44.67 (C-13); 44.70 (C-9); 56.08 (C-14); 59.09 (C-17); 69.42 (C-21); 72.04 (C-1); 123.48 (C-4); 166.60 (C-5); 196.41 (C-3); 210.12 (C-20).

1 α ,17 α -Dihydroxyprogesteron:

$^1\text{H-NMR}$ (CH_2DOD , 500 MHz): δ 0.66, *s*, 3H (H-18); 1.11, *m* (H-7a); 1.21, *s*, 3H (H-19); 1.30, *m* (H-15a); 1.43, *m* (H-16a); 1.45, *m* (H-11a); 1.51, *m* (H-12a); 1.66, *m* (H-8); 1.69, *m* (H-11b); 1.74, *m* (H-9); 1.77, *m* (H-15b); 1.85, *m* (H-7b); 1.87, *m* (H-14); 1.94, *ddd*, $J=13$, 13 und 5 Hz (H-12b); 2.17, *s*, 3H (H-21); 2.36, *ddd*, $J=15$, 4 und 2 Hz (H-6a); 2.47, *m* (H-6b); 2.46, *ddd*, $J=17$, 3 und 1 Hz (H-2a); 2.69, *ddd*, $J=15$, 11.5 und 3 Hz (H-16b); 2.79, *dd*, $J=17$ und 3 Hz (H-2b); 4.06 *dd*, $J=3$ und 3 Hz (H-1); 5.73, *brs* (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CH_2DOD , 125 MHz): δ 15.41 (C-18), 19.05 (C-19); 21.14 (C-11); 24.59 (C-15); 27.36 (C-21); 31.84 (C-12); 32.43 (C-7); 33.89 (C-16); 34.15 (C-6); 36.67 (C-8); 43.65 (C-2); 44.44 (C-10); 45.71 (C-9); 48.17 (C-13); 51.71 (C-14); 72.43 (C-1); 91.44 (C-17); 123.80 (C-4); 170.85 (C-5); 200.43 (C-3); 213.32 (C-20).

1 α -Hydroxy-11-Deoxycortisol:

$^1\text{H-NMR}$ (CH_2DOD , 500 MHz): δ 0.68, *s*, 3H (H-18); 1.11, *m* (H-7a); 1.21, *s*, 3H (H-19); 1.35, *m* (H-15a); 1.43, *m* (H-11a); 1.44, *m* (H-12a); 1.52, *ddd*, $J=15$, 9 und 6 Hz (H-16a); 1.67, *m* (H-8); 1.69, *m* (H-11b); 1.73, *m* (H-9); 1.78, *m* (H-15b); 1.85, *m* (H-7b); 1.87, *m* (H-14); 1.93, *m* (H-12b); 2.36, *ddd*, $J=15$, 4 und 2.5 Hz (H-6a); 2.46, *ddd*, $J=17$, 3 und 1 Hz (H-2a); 2.48, *m* (H-6b); 2.68, *ddd*, $J=15$, 11.5 und 3.5 Hz (H-16b); 2.79, *dd*, $J=17$ und 3 Hz (H-2b); 4.05 *dd*, $J=3$ und 3 Hz (H-1); 4.28, *d*, $J=5$ Hz (H-21a); 4.62, *d*, $J=5$ Hz (H-21b); 5.73, *brs* (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CH_2DOD , 125 MHz): δ 15.38 (C-18), 19.03 (C-19); 21.11 (C-11); 24.71 (C-15); 31.59 (C-12); 32.45 (C-7); 34.96 (C-16); 34.13 (C-6); 36.67 (C-8); 43.64 (C-2); 44.42 (C-10); 45.70 (C-9); 48.89 (C-13); 51.82 (C-14); 67.85 (C-21); 72.41 (C-1); 90.52 (C-17); 123.79 (C-4); 170.81 (C-5); 200.43 (C-3); 213.41 (C-20).

3.6.2.2 NMR-Charakterisierung der Hauptprodukte der C19-Steroide

Bei den C19-Steroiden mit Androst-4-en-3-on als Grundgerüst wurden alle kommerziell erhältlichen Vertreter selektiv von CYP260A1 hydroxyliert. Es stellte sich nun die Frage, ob auch hierbei das Cytochrome P450 die gegenüber den C21-Steroiden kleineren Verbindungen an derselben Stelle oxidiert. Hierfür wurden zunächst die Hauptprodukte der einfachsten Vertreter dieser Gruppe, Testosteron und Androstendion, isoliert und charakterisiert. Es konnte für beide Verbindungen unabhängig ihrer verschiedenen Funktionalisierung am C17-Kohlenstoffatom, Hydroxyl- bzw. Carbonylfunktion, eine 1 α -Hydroxylierung durch CYP260A1 festgestellt werden (siehe Abb. 3.37).

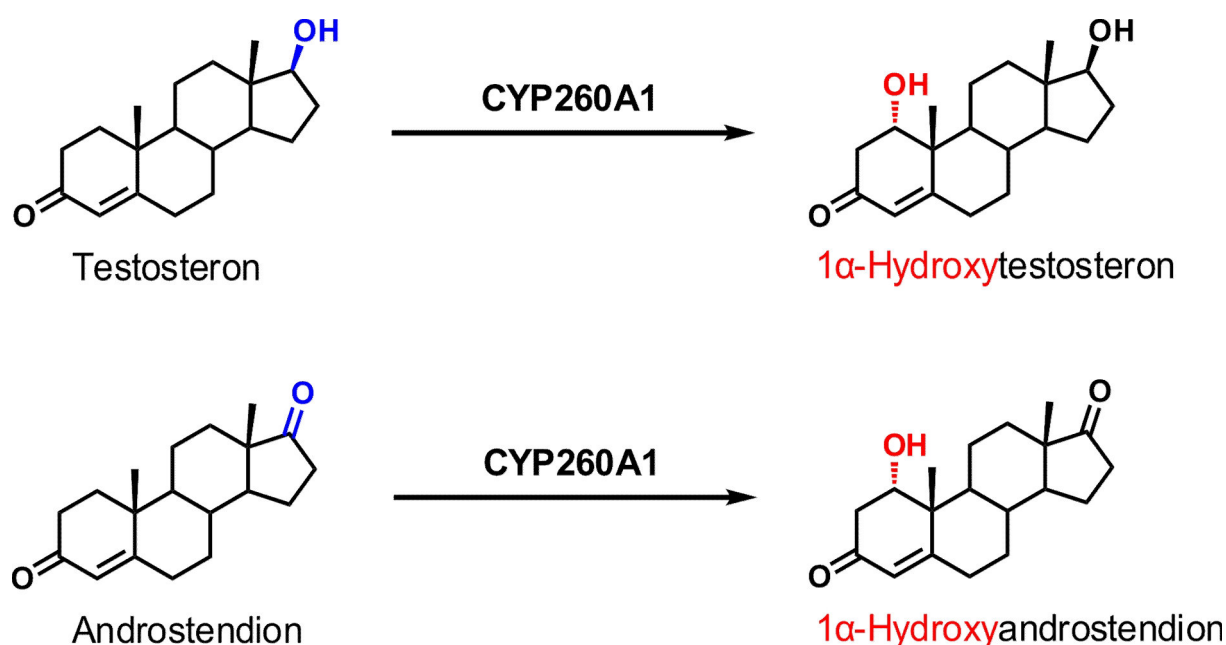


Abb. 3.37: Reaktionsgleichungen der CYP260A1-katalysierten Umsätze von Testosteron (040) und Androstendion (019) und die dabei entstandenen 1 α hydroxylierten Hauptprodukte; bei Substraten (links): Androst-4-en-3-on Grundgerüst in schwarz und zusätzliche Funktionalitäten in blau; bei Produkten(rechts): Substratstruktur in schwarz und neu eingeführte 1 α -Hydroxyfunktionen in rot.

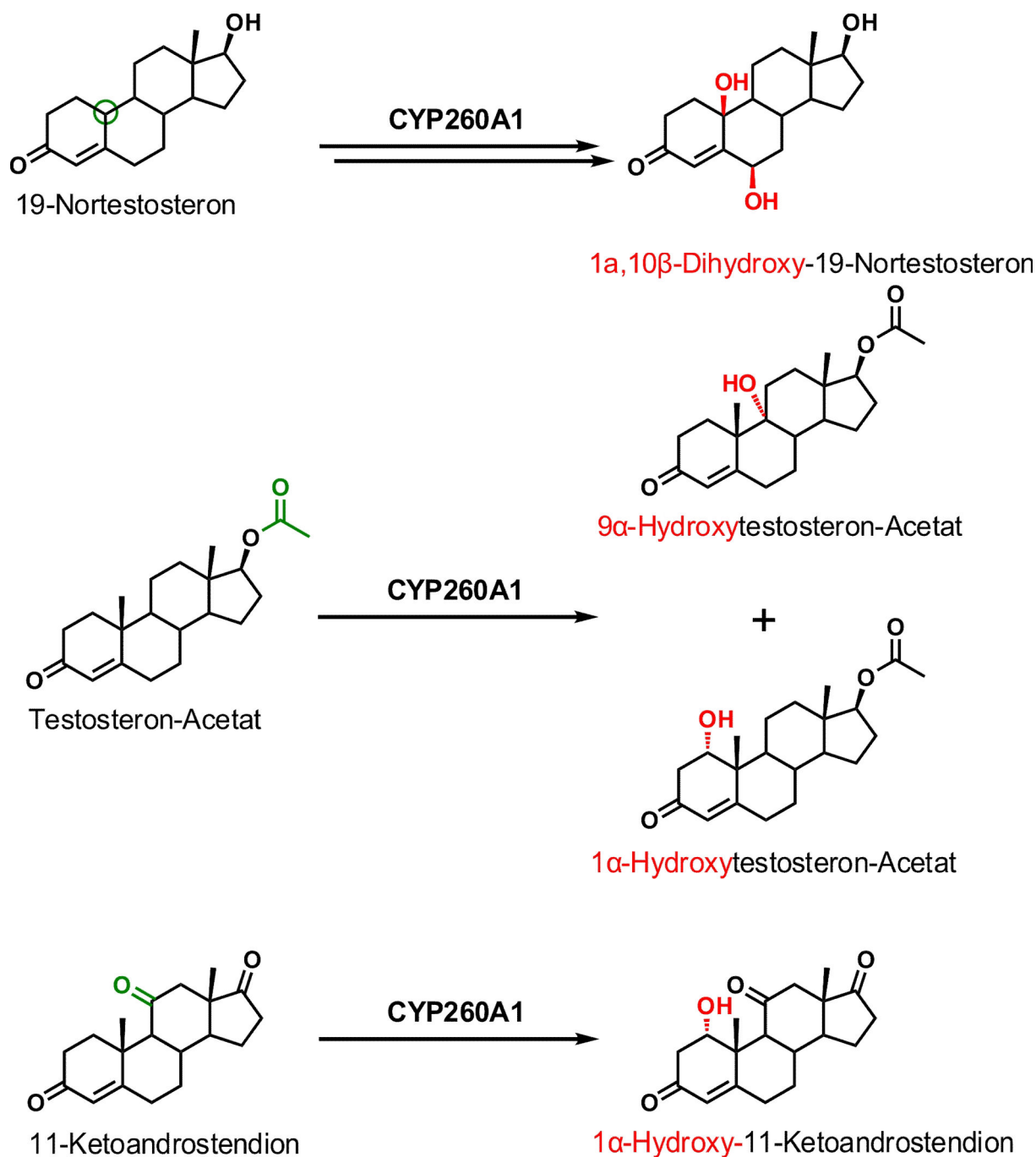


Abb. 3.38: Reaktionsgleichungen der CYP260A1-katalysierten Umsätze von 19-Nortestosteron (057), 17 α -Methyltestosteron (033) und 11-Ketoandrostendion (061) und die dabei entstandenen 1 α hydroxylierten Hauptprodukte; bei Substraten (links): Grundgerüst von Testosteron bzw. Androstendion in schwarz und zusätzliche Funktionalitäten bzw. das Fehlen von Funktionalitäten in grün; bei Produkten(rechts): Substratstruktur in schwarz und neu eingeführte 1 α -Hydroxyfunktionen in rot.

Im nächsten Schritt wurden 19-Nortestosteron (057), Testosteron-Acetat (067) und 11-Ketoandrostendion (061) mit dem CYP260A1-Ganzzellsystem umgesetzt und die Hauptprodukte isoliert. Hierbei sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen Funktionalisierungen dieser Derivate von Testosteron und Androstendion die Position der Hydroxylierung beeinflussen. Bei 19-Nortestosteron konnte unter den Standardbedingungen nur ein dihydroxyliertes Produkt isoliert werden, bei dem es sich um 6 β -,10 β -Dihydroxy-19-Nortestosteron handelte (siehe Abb. 3.38). Demnach wurde hier in einem der beiden Oxidationsschritte auch die 6 β -Position angegriffen. Bei der Isolierung der Produkte von Testosteron-Acetat stellte sich heraus, dass das *in vitro* bei den LC-MS Messungen gefundene Hauptprodukt zwei Produkte beinhaltet, die unter den HPLC-Bedingungen nicht getrennt wurden. Das Signal bestand nämlich nach der NMR-Charakterisierung zu 43 % aus 1 α -Hydroxytestosteron-Acetat und zu 57% aus 9 α -Hydroxytestosteron-Acetat. Dies war aber für 11-Ketoandrostendion nicht der Fall, es wurde ebenfalls eine 1 α -Hydroxylierung durch CYP260A1 festgestellt.

Im Folgenden sind die detaillierten NMR-Daten der jeweiligen Produkte der CYP260A1 abhängigen Umsätze der C19-Steroide (mit Androst-4-en-3-on als Grundgerüst) aufgeführt.

1 α -Hydroxytestosteron:

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 0.78, *s*, 3H (H-18); 1.01, *m* (H-7a); 1.03, *m* (H-14); 1.14, *ddd*, *J*= 13, 13 und 4 Hz (H-12a); 1.19, *s*, 3H (H-19); 1.30, *dddd*, *J*= 12, 12, 12 und 6 Hz (H-15a); 1.42, *m* (H-11a); 1.44, *m* (H-16a); 1.57, *m* (H-8); 1.61, *m* (H-11b); 1.62, *m* (H-9 und H-15b); 1.81, *m* (H-7b); 1.84, *ddd*, *J*= 13, 4 und 3 Hz (H-12b); 2.06, *m* (H-16b); 2.34, *m* (H-6a); 2.37, *m* (H-6b); 2.55, *ddd*, *J*= 17, 3.5 und 1 Hz (H-2a); 2.74, *dd*, *J*= 17 und 3 Hz (H-2b); 3.65, *dd*, *J*= 8.5 und 8.5 Hz (H-17); 4.09, *dd*, *J*= 3.5 und 3 Hz (H-1); 5.78, *dd*, *J*= 1 und 1 Hz (H-4).
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 11.03 (C-18), 18.62 (C-19); 20.03 (C-11); 23.42 (C-15), 30.42 (C-16); 30.63 (C-7); 32.92 (C-6); 35.33 (C-8); 36.25 (C-12); 42.78 (C-2); 42.83 (C-13); 43.29 (C-10); 45.05 (C-9); 50.47 (C-14); 72.07 (C-1); 81.65 (C-17); 123.38 (C-4); 167.19 (C-5); 196.70 (C-3).

1 α -Hydroxandrostendion:

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 0.87, *s*, 3H (H-18); 1.11, *m* (H-7a); 1.17, *s*, 3H (H-19); 1.28, *m* (H-12a); 1.32, *m* (H-14); 1.41, *m* (H-11a); 1.53, *m*, (H-15a); 1.69, *m* (H-11b und H-8); 1.70, *m* (H-9); 1.80, *ddd*, *J*= 13, 4 und 3 Hz (H-12b); 1.88, *m* (H-7b); 1.95, *m* (H-15b); 2.05, *m* (H-16a); 2.37, *m* (H-6a); 2.42, *m* (H-6b); 2.43, *m* (H-16b); 2.52, *ddd*, *J*= 17, 3 und 1 Hz (H-2a);

2.70, *dd*, $J = 17$ und 3 Hz (H-2b); 4.06, *dd*, $J = 3$ und 3 Hz (H-1); 5.76, *dd*, $J = 1$ und 1 Hz (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 13.61 (C-18), 18.43 (C-19); 19.56 (C-11); 21.72 (C-15), 29.67 (C-7); 31.05 (C-12); 32.65 (C-6); 34.74 (C-8); 35.67 (C-16); 42.70 (C-2); 43.13 (C-10); 47.44 (C-13); 44.81 (C-9); 50.74 (C-14); 71.66 (C-1); 123.40 (C-4); 166.67 (C-5); 196.98 (C-3); 220.00 (C-17).

6 β ,10 β -Dihydrox-19-Nortestosteron:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.81, *s*, 3H (H-18); 1.00, *m* (H-9); 1.01, *m* (H-14); 1.08, *m* (H-12a); 1.24, *m* (H-7a); 1.32, *dd*, $J = 8.5$ und 8.5 Hz (H-15a); 1.45, *m* (H-16a); 1.60, *m* (H-15b); 1.66, *m* (H-11a); 1.72, *m* (H-11b); 1.80, *ddd*, $J = 14$, 14 und 4 Hz (H-1a); 1.88, *ddd*, $J = 13$, 4 und 3 Hz (H-12b); 2.03, *m* (H-7b); 2.06, *m* (H-8 und H-16b); 2.20, *ddd*, $J = 14$, 5 und 5 Hz (H-1a); 2.30, *m* (H-2a); 2.68, *ddd*, $J = 16.5$, 13 und 5 Hz (H-2b); 3.64, *dd*, $J = 8.5$ und 8.5 Hz (H-17); 4.44, *dd*, $J = 2.8$ und 2.8 Hz (H-6); 5.81, *s*, (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 10.96 (C-18), 19.72 (C-11); 23.25 (C-15), 29.27 (C-8); 30.41 (C-16); 33.41 (C-1); 33.88 (C-2); 36.04 (C-12); 38.01 (C-7); 43.05 (C-13); 49.87 (C-14); 53.21 (C-9); 70.97 (C-10); 73.13 (C-6); 81.60 (C-17); 125.89 (C-4); 159.09 (C-5); 200.48 (C-3).

1 α -Hydroxtestosteron-Acetat:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.81, *s*, 3H (H-18); 1.03, *m* (H-7a); 1.08, *m* (H-14); 1.16, *s*, 3H (H-19); 1.20, *m* (H-12a); 1.34, *m*, (H-15a); 1.38, *m* (H-11a); 1.48, *m* (H-16a); 1.51, *m* (H-11b); 1.55, *m* (H-8); 1.65, *m* (H-9 und H-15b); 1.74, *m* (H-12b); 1.77, *m* (H-7b); 2.00, *s*, 3H (H-21); 2.14, *m* (H-16b); 2.32, *m* (H-6a); 2.36, *m* (H-6b); 2.53, *ddd*, $J = 17$, 3 und 1 Hz (H-2a); 2.70, *dd*, $J = 17$ und 3 Hz (H-2b); 4.06, *dd*, $J = 3$ und 3 Hz (H-1); 4.56, *dd*, $J = 8$ und 9 Hz (H-17); 5.76, *dd*, $J = 1$ und 1 Hz (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 11.94 (C-18), 18.53 (C-19); 19.56 (C-11); 21.11 (C-21); 23.48 (C-15), 27.39 (C-16); 30.50 (C-7); 32.83 (C-6); 35.01 (C-8); 36.40 (C-12); 42.68 (C-2); 42.41 (C-13); 43.15 (C-10); 44.71 (C-9); 50.17 (C-14); 71.76 (C-1); 82.51 (C-17); 123.33 (C-4); 167.09 (C-5); 171.18 (C-20); 196.96 (C-3).

9 α - Hydroxtestosteron-Acetat:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.80, *s*, 3H (H-18); 1.28, *s*, 3H (H-19); 1.31, *m*, (H-15a); 1.44, *m* (H-7a und H-12a); 1.48, *m* (H-11a); 1.49, *m* (H-16a); 1.54, *m* (H-14); 1.57, *m* (H-7b, H-12b und H-15b); 1.67, *m* (H-1a); 1.76, *m* (H-11b); 1.92, *ddd*, $J = 13$, 10.5 und 3 Hz (H-8); 2.00, *s*, 3H (H-21); 2.15, *m* (H-16b); 2.27, *m* (H-6a); 2.38, *m*, 2H (H-2); 2.41, *m* (H-1b); 2.42, *m* (H-6b); 4.62, *dd*, $J = 8$ und 9 Hz (H-17); 5.82, *d*, $J = 2$ (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ

11.14 (C-18), 19.83 (C-19); 21.10 (C-21); 23.26 (C-15), 26.38 (C-11); 27.39 (C-16); 28.43 (C-1); 31.67 (C-6); 32.11 (C-12); 33.94 (C-2); 34.81 (C-7); 37.26 (C-8); 42.31 (C-13); 43.82 (C-14); 44.38 (C-10); 76.45 (C-9); 82.20 (C-17); 126.75 (C-4); 168.77 (C-5); 171.12 (C-20); 199.10 (C-3).

1 α -Hydrox-11-Ketoandrostendion:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.85, *s*, 3H (H-18); 1.33, *m* (H-7a); 1.39, *s*, 3H (H-19); 1.93, *m* (H-14); 1.66, *m*, (H-15a); 2.03, *m* (H-8); 2.04 *m* (H-7b); 2.13, *m* (H-15b); 2.26, *ddd*, $J= 20, 9$ und 9 Hz (H-16a); 2.36, *m* (H-12a); 2.37, *m* (H-6a); 2.42, *m* (H-6b und H-12b); 2.48, *ddd*, $J= 17, 3.5$ und 1 Hz (H-2a); 2.55, *ddd*, $J= 20, 9$ und 1 Hz (H-16b); 1.76, *d*, $J= 11$ Hz (H-9); 2.77, *dd*, $J= 17$ und 3 Hz (H-2b); 4.80, *dd*, $J= 3.5$ und 3 Hz (H-1); 5.77, *dd*, $J= 1$ und 1 Hz (H-4). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 14.69 (C-18), 18.25 (C-19); 21.59 (C-15), 30.30 (C-7); 32.23 (C-6); 35.79 (C-8); 35.97 (C-16); 42.50 (C-2); 43.00 (C-10); 49.69 (C-14); 50.00 (C-12); 50.23 (C-13); 55.28 (C-9); 71.30 (C-1); 123.98 (C-4); 164.06 (C-5); 197.26 (C-3); 208.67 (C-11); 217.09 (C-17).

Es konnte somit im Falle von 19-Nortestosteron und Testosteronacetat ein eindeutiger Einfluss auf die CYP260A1-abhängige Hydroxylierung durch verschiedene funktionelle Gruppen am Androst-4-en-3-on-Grundgerüst beobachtet werden. Es stellte sich nun die Frage, ob ein anderes C19-Steroid Grundgerüst die Hydroxylierungsposition von CYP260A1 verändert. Aus diesem Grund wurde die natürliche Vorstufe von Testosteron (40), Dehydroepiandrosteron (056), als Substrat verwendet. Im Vorfeld konnte schon bei der Substratsuche (siehe Tab. 3.6) gezeigt werden, dass diese Verbindung von CYP260A1 *in vitro* umgesetzt wird. Dehydroepiandrosteron (056) besitzt keine 3-Keto-4-en-Struktur am A-Ring des Steroidgerüsts, sondern eine β -Hydroxyfunktion am C3-Kohlenstoffatom und eine Doppelbindung zwischen dem C5- und C6-Kohlenstoffatom (3β -Hydroxy-androst-5-en Grundstruktur). Ein Problem hierbei war die geringe UV-Absorption des Substrates und der Produkte (Absorption bei 210 nm), wodurch eine genaue Analyse sowohl *in vitro* als auch mit dem Ganzzellsystem nicht möglich war. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse während der Isolierung nur mittels Dünnschichtchromatographie und Färbung mit Anisaldehyd (siehe Material und Methoden 2.2.7.3). Es entstand ein Hauptprodukt, bei dem es sich um 7 α -Hydroxydehydroepiandrosteron handelte (siehe Abb. 3.39). Dies bedeutet, dass sich durch

den Austausch der 3-Keto-4-en-Struktur durch die 3 β -Hydroxy-5-en Steroidstruktur die bevorzugte Hydroxylierungsposition von 1 α auf 7 α ändert.

Die detaillierten NMR-Daten des Produktes sind im Folgenden aufgeführt.

7 α -Hydroxydehydroepiandrosteron:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 0.85, *s*, 3H (H-18); 0.98, *s*, 3H (H-19); 1.09, *ddd*, $J= 13, 13$ und 3.5 Hz (H-1a); 1.25, *m* (H-9 und H-12a); 1.48, *m* (H-11a); 1.49, *m* (H-2a); 1.53, *m* (H-15a); 1.64, *m*, *ddd*, $J= 12, 12$ und 5 Hz (H-8); 1.67, *m* (H-11b); 1.76, *ddd*, $J= 12, 12$ und 5 Hz (H-14); 1.80, *m* (H-12b); 1.83, *m* (H-2b); 2.07, *m* (H-1b); 1.53, *m* (H-15b); 2.11, *m* (H-16a); 2.27, *dddd*, $J= 13, 5, 2$ und 2 Hz (H-4a); 2.33, *ddd*, $J= 13, 5$ und 2 Hz (H-4b); 2.43, *m* (H-16b); 3.54, *dddd*, $J= 11, 11, 5$ und 5 Hz (H-3); 3.94, *dd*, $J= 5, 5$ und 2 Hz (H-7); 5.60, *dd*, $J= 5$ und 2 Hz (H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 13.24 (C-18), 18.23 (C-19); 20.04 (C-11); 21.87 (C-15), 31.03 (C-12); 31.22 (C-2); 35.76 (C-16); 36.92 (C-1); 37.17 (C-8); 37.48 (C-10); 41.87 (C-4); 42.58 (C-9); 44.91 (C-14); 47.08 (C-13); 64.24 (C-7); 71.13 (C-3); 123.51 (C-6); 146.51 (C-5); 221.18 (C-17).

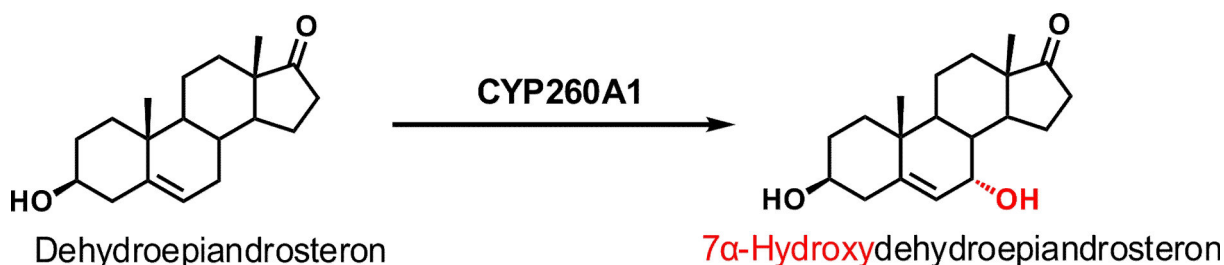


Abb. 3.39: Reaktionsgleichung des CYP260A1 katalysierten Umsatz von Dehydroepiandrosteron (056) und dem 7 α hydroxylierten Hauptprodukte; neu eingeführte 1 α -Hydroxyfunktion in rot.

3.6.2.3 NMR-Charakterisierung des Hauptproduktes von (+)-Nootkaton

Wie schon zuvor erwähnt, handelte es sich bei dem ersten veröffentlichten Substrat von CYP260A1 um das steroidähnliche Sesquiterpen (+)-Nootkaton (025) (Ewen *et al.* 2009). Dieses besitzt ebenfalls, wie die meisten in dieser Arbeit untersuchten Steroide (Ausnahme Dehydroepiandrosteron), eine 3-Keto-4-en-Struktur im A-Ring, wobei der Struktur die steroidtypischen C- und D-Ringe fehlen. Zusätzlich besitzt es am C4-Atom, welches aufgrund einer anderen Nomenklatur dem C1-Atom der Steroidnomenklatur entspricht, eine β -ständige

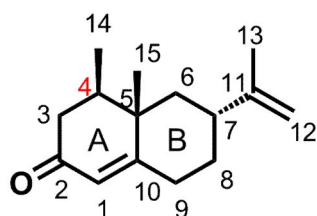
Methylgruppe (siehe Abb. 3.40A). In dieser Arbeit konnte nun das Hauptprodukt der CYP260A1 abhängigen Biotransformation von (+)-Nootkaton (025) isoliert und charakterisiert werden. Es handelte sich bei dem Produkt um 4 α -Hydroxynootkaton (siehe Abb. 3.40B). Dies bedeutet, dass trotz zusätzlicher 4 β -Methylgruppe und fehlender Ringe CYP260A1 an der zu der Steroidhydroxylierung äquivalenten Position angreift.

Die detaillierten NMR-Daten zu dem Produkt sind im Folgenden aufgeführt (Nummerierung der C-Atome entsprechend Nomenklatur Abb. 3.40A).

4 α -Hydroxynootkaton:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 1.24, *s*, 3H (H-15); 1.26, *s*, 3H (H-14); 1.73, *s*, 3H (H-13); 1.36, *m* (H-8a); 1.62, *m*, *ddd*, $J= 13, 3$ und 3 Hz (H-6a); 1.85, *m* (H-8b); 1.96, *dd*, $J= 13$ und 13 Hz (H-6b); 2.31, *dddd*, $J= 15.5, 13, 3$ und 3 Hz (H-7); 2.42, *dd*, $J= 17$ und 1 Hz (H-3a); 2.43, *m* (H-9a); 2.51, *m* (H-9b); 2.76, *d*, $J= 17$ (H-3b); 4.73, *s*, 2H (H-12); 5.83, *brs*, (H-1).
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ 20.76 (C-13), 22.39 (C-15); 23.39 (C-14); 30.78 (C-8), 33.10 (C-9); 35.86 (C-6); 40.36 (C-7); 44.51 (C-5); 48.95 (C-3); 75.94 (C-4); 109.44 (C-12); 124.47 (C-1); 149.13 (C-11); 167.00 (C-10); 197.27 (C-2).

A



B

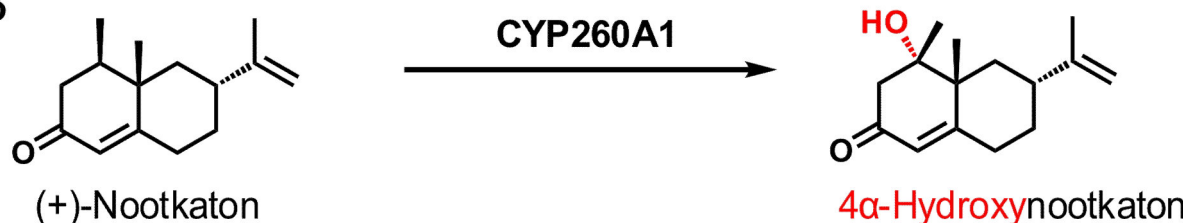


Abb. 3.40: A) Nomenklatur bzw. Nummerierung der C-Atome für (+)-Nootkaton (025); B) Reaktionsgleichung des CYP260A1 katalysierten Umsatz von (+)-Nootkaton und dem 4 α hydroxylierten Hauptprodukte; neu eingeführte 4 α -Hydroxyfunktion in rot.

3.6.3 Modellierung von CYP260A1 zur Charakterisierung der Substratbindetasche

Wie zuvor gezeigt, handelt es sich bei CYP260A1 um eine 1α -Steroidhydroxylase. Es stellte sich nun die Frage, wie die Substratbindetasche des Enzyms strukturell beschaffen sein muss, um die Hydroxylierung an dieser ungewöhnlichen Position im Steroidgerüst durchzuführen. Da eine Kristallstruktur des Proteins nicht vorlag, wurden Homologiemodelle anhand von bestehenden Kristallstrukturen ähnlicher Cytochrome P450 durchgeführt. Hierzu wurde zur Suche ähnlicher Strukturen zunächst der blastp-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) verwendet. Es wurden zur Modellierung mit Swiss-Model (Arnold *et al.* 2006) die Kristallstrukturen der drei Cytochrome mit der größten Ähnlichkeit zu CYP260A1 ausgesucht (siehe Tab. 3.10). Hierbei handelte es sich um drei Vertreter der CYP107-Familie, CYP 107E1 aus *Micromonospora griseorubida* (2Y5N | Identität: 31%; Ähnlichkeit: 51%; Lücken 5%), CYP107H1 aus *Bacillus subtilis* (3EJB | Identität: 27%; Ähnlichkeit: 49%; Lücken 5%) und die Mutante A245T von CYP107A1 aus *Saccharopolyspora erythraea* (1Z8Q | Identität: 32%; Ähnlichkeit: 49%; Lücken 9%). Die Qualitäten der entstandenen Modelle hatten einen QMEANscore4 im Bereich von 0,5-0,6 was nur einer moderaten Qualität entspricht. Betrachtet man die für Cytochrome P450 typischen Sekundärstrukturen (strukturell konservierte Regionen), zeigte sich, dass in allen drei Modellen gleiche Aminosäurereste an der Ausbildung der Helices und β -Faltblätter beteiligt sind (siehe Tab. 3.10). Bei einer Superposition der Modelle (siehe Abb. 3.41 A und B) sieht man auch, dass die meisten Helices und Faltblätter auch räumlich ähnliche Positionen einnehmen, insbesondere im Vergleich der Modelle mit 3EJB_B und 1Z8Q_A als Vorlage. Eine Ausnahme bildet bei dem 2Y5N_B-Modell die F-Helix, sie ist im Gegensatz zu den beiden anderen versetzt (siehe Abb. 3.41 A). Dies hat direkte Auswirkungen auf die Substraterkennungstellen 2 und 3 („substrat recognition sites“ - SRS), die sich üblicherweise in der Region zwischen G- und F-helix befindet (siehe Einleitung 1.2.2 Abb. 1.3). Gleiche Ergebnisse werden für die Zwischenbereiche der Sekundärstrukturen mit ihren Schleifen und ungeordneten Strukturen erhalten. Diese Unterschiede beeinflussen direkt die Substraterkennungstellen (siehe Tab. 3.10) und ihre Lage (siehe Abb. 3.41 C und D). All diese Unterschiede beeinflussen vor allem die SRS 1, SRS 2/3 und SRS 6 des 2Y5N_B-Modells.

Tab. 3.10: Auflistung der verschiedenen mit Swiss-Model erzeugten Modelle von CYP260A1 mit den verschiedenen statistischen Parametern. Zusätzlich sind die Aminosäurebereiche der P450-typischen Sekundärstrukturen und die resultierenden Substraterkennungsstellen („substrate recognition sites“ - SRS) gezeigt.

PDB-ID der Vorlage	3EJB_B	1Z8Q_A	2Y5N_B
Name der Vorlage	CYP107H1 P450 _{BioI} WT	CYP107A1 P450 _{eryF} A245T Mutante	CYP107E1 P450 _{MycG} WT
Ergebnisse des Blast Identität	27%	32%	31%
Ähnlichkeit	49%	49%	51%
Sequenzidentität nach Swiss-Model	22%	26%	25%
Qualität des Modells (QMEANscore4)	0,602	0,562	0,526
Helices			
A	Ala16-Ala25	Ala16-Arg24	Ala18-Arg24
B	Lys46-Arg54	Lys46-Arg54	Lys46-Arg54
B'	/	/	/
C	Asp79- Asn89	Asp79-Met90	Asp79-Phe91
D	Pro94-Arg115	Pro94-Leu116	Pro94-Gly118
E	Leu124-Phe141	Leu125-Phe141	Leu124-Phe141
F	Leu148-Gly161	Glu150-Leu159	Leu148-Ala157
G	Pro168-Arg194	Pro168-Arg194	Val171-Arg194
H	Leu200-Lys209	Leu200-Leu205	Leu200-Arg206
I	Ile216-Ala247	Ile216-Ala247	Ile216-Ala247
J	Pro249-Gln257	Pro249-Gln257	Pro249-Gln257
J'	/	/	/
K	Leu261-Trp272	Leu261-Trp272	Leu262-Trp272
K'	Gly304-Asn308	Gly304-Asn308	Gly304-Asn308
L	Gly342-Arg360	Gly342-Arg360	Gly342-Phe361
β-Faltblätter			
1-1	Ile32-Asp35	Ile32-Asp35	Ile32-Asp35
1-2	Met40-Leu43	Met40-Leu43	Met40-Leu43
1-5	Thr58-Phe59	Thr58-Ser60	Thr58-Phe59
3-1	Arg121-Asp123	Arg121-Asp123	Arg121-Asp123
5-1	/	/	Leu208-Lys209
5-2	/	/	His212-Met213
1-4	Gly278-Val283	Val279-Val283	Arg281-Val283
2-1	Val287-Leu289	Val287-Leu289	Val287-Leu289
2-2	Gln292-Leu294	Gln292-Leu294	Gln292-Leu294
1-3	Thr298-Ala303	Thr298-Leu302	Thr298-Leu302
3-3	Arg365-Ala366	Arg365-Ala366	Arg365-Ala366
4-1	/	/	Tyr376-Gly377
4-2	/	/	Pro386-Lys388
3-2	P390-L392	Pro390-Leu392	Val391-Leu392
Substraterkennungsstellen			
SRS-1	Leu69; Ala74	Ala74	Leu69; Gly71; Ala74
SRS-2/3	Leu159; Leu162	Leu159; Leu162	Arg160
SRS-4	Ser225; Gly229	Ser225; Gly229	Ser225; Gly229
SRS-5	Ser276; Gly278	Ser276; Gly278	Ser275; Ser276; Val279
SRS-6	Val382; Ala383	Val382	Val382

Ein genauer Vergleich der an den Substraterkennungsstellen beteiligten Aminosäuren zeigt, dass 5 Aminosäuren identisch sind; das Alanin 74 in der SRS 1, das Serin 225 und das Glycin 229 in der SRS4, das Serin 276 in der SRS 5 und das Valin 382 in der SRS6. Da aber wie schon zuvor erwähnt die Sekundärstrukturen untereinander sehr ähnlich sind, ist die Lage der in der I-Helix befindliche Aminosäuren Serin 225 und Glycin 229 sowie die Position des für die Katalyse entscheidenden Threonin 233 in allen Homologiemodellen identisch. Die anderen Aminosäuren mit Ausnahme von Alanin 74 nehmen zum Teil recht unterschiedliche Positionen in der Bindetasche ein (siehe Abb. 3.41 C und D).

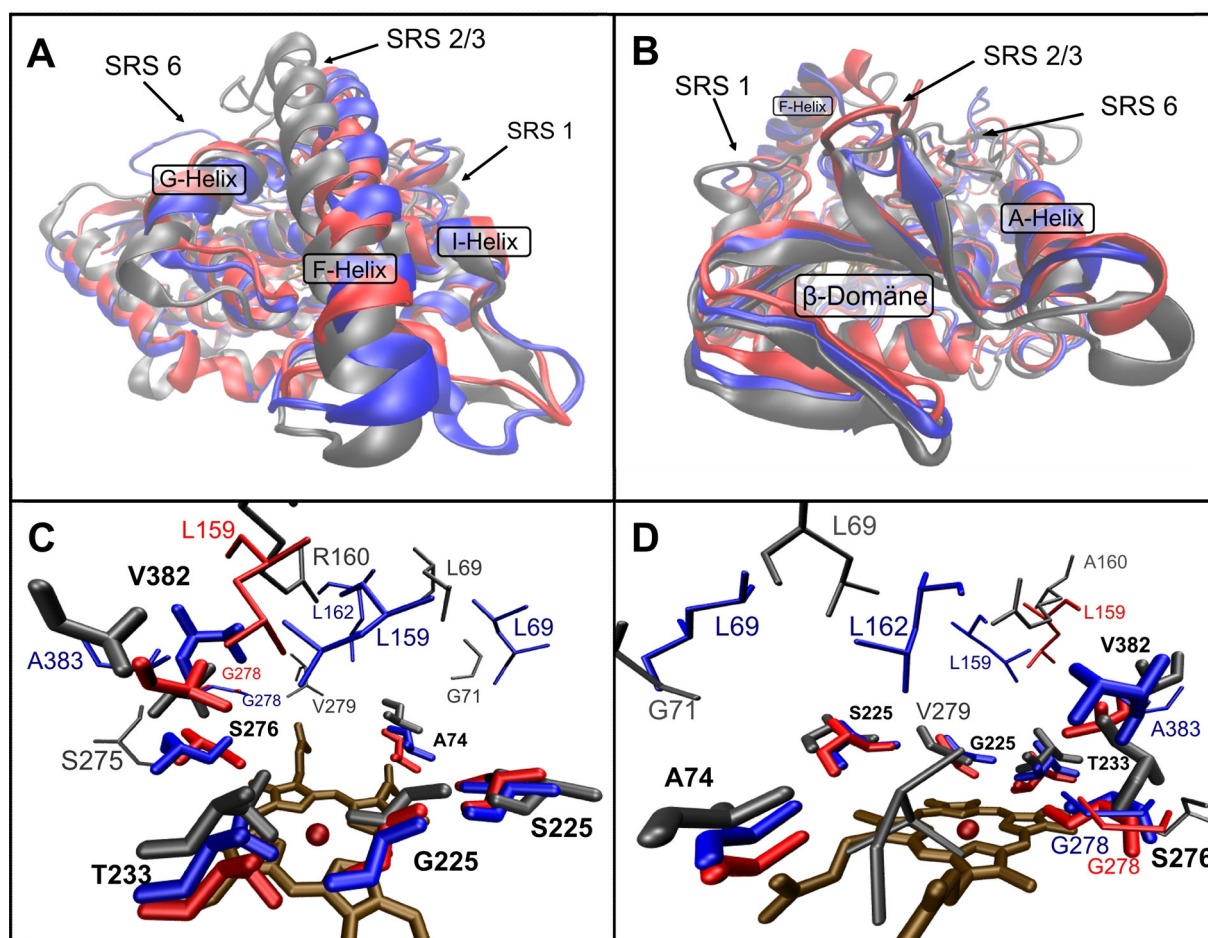


Abb. 3.41: Überlagerung (Superposition) der drei Modelle mit dem jfatcat-Algorithmus (Ye & Godzik 2003); 3EJB_B-Model in blau, 1Z8Q_A-Model in rot und 2Y5N_B-Model in grau: A) Sicht auf die Helixdomäne bzw. die F-Helix; B) Sicht auf die β -Domäne; C) und D) gleiche Sicht wie bei A) und B) nun aber nur die Darstellung der Aminosäuren der SRSs und des Threonin 233, Reste die in allen Modellen vorkommen sind fett und schwarz beschriftet, die übrigen in der jeweiligen Farbe des Modells. Der Protoporphyrin IX Ring des Häm ist braun und das zentrale Eisenatom dunkelrot dargestellt.

Bei den anschließenden Dockingexperimenten zur Aufklärung der Substratbindung durch Dr. Michael Hutter vom Zentrum für Bioinformatik (ZBI) an der Universität des Saarlandes führten diese Unterschiede zu ganz verschiedenen Bindungen der einzelnen Substrate in den aktiven Zentren. Aus diesem Grund wurde sich zuerst auf Testosteron beschränkt, da das Steroidgerüst mit den Ringen A, B, C und D sehr rigide ist und nur die Alkoholfunktion am C17-Atom mit seiner Drehung um sich selbst flexibel ist. Hierbei konnte nur für das 2Y5N_B-Model eine Dockingposition erhalten werden, in der die 1α -Position (C1-Position axial von unten) in Richtung des Hämeisens zeigt (siehe Abb. 3.42 A). Das Testosteron richtete sich parallel zur I-Helix über dem Häm aus, so dass prinzipiell nur die untere Seite hydroxyliert werden kann. Weitere mögliche Hydroxylierungspositionen in dieser Konformation waren hierbei 9α , 11α , und 12α . Diese Dockingposition I war zudem die energetisch günstigste ($\Delta G = -6,97$ kcal/mol) und bei den Berechnungen am häufigsten (ca. 90%) gefundene Konformation des Testosterons. Neben der Dockingposition I erhielt man auch noch eine weitere energetisch ungünstigere Dockingposition ($\Delta G = -5,78$ kcal/mol; Häufigkeit 27%) (siehe Abb. 3.42 B), in der das Testosteron um 180° gedreht in der Bindetasche vorliegt, was einer möglichen Hydroxylierung von 6α und 7α entspricht. In beiden Konformationen sitzt das Testosteron mit seinen hydrophilen Keto- und Hydroxylfunktionen zwischen den Serinen 225 und 276 (SRS 4 und SRS 5). Eine direkte Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wurde in beiden Konformationen jeweils nur zu einer der beiden Aminosäuren beobachtet. Bei der Dockingposition I bildet die Hydroxylfunktion an C3 eine Wasserstoffbrücke zu Serin 276 und bei der Dockingposition II zu Serin 225.

Um die Unterschiede in diesen beiden Dockingpositionen näher zu charakterisieren, wurde anschließend Dehydroepiandrosteron (056) für die Berechnung möglicher Dockingpositionen verwendet, da bei diesem die funktionellen Gruppen gegenüber dem Testosteron umgekehrt angeordnet sind (Ketofunktion an C17 und Hydroxylfunktion an C3) und auch bei den Substratumsätzen eine 7α -Hydroxylierung statt einer 1α -Hydroxylierung mit CYP260A1 erhalten wurde. Bei den Dockingexperimenten zeigten sich wiederum die beiden Dockingpositionen, I und II, wie beim Testosteron (siehe Abb. 3.42). Aber nun waren beide Konformationen energetisch gleich ($\Delta G = -7,28$ kcal/mol), wobei nun die Häufigkeit der Dockingposition II (ca. 57%) höher ausfiel. Dies würde eine Hydroxylierung an den Positionen 6α und 7α begünstigen, was auch mit dem tatsächlich isolierten 7α hydroxylierten Produkt übereinstimmt. Auch hier bindet die Hydroxylfunktion entweder am Serin 225 oder Serin 276 nur in umgekehrter Weise, da sie nun an C17 sitzt (Dockingposition I: S225 und S276).

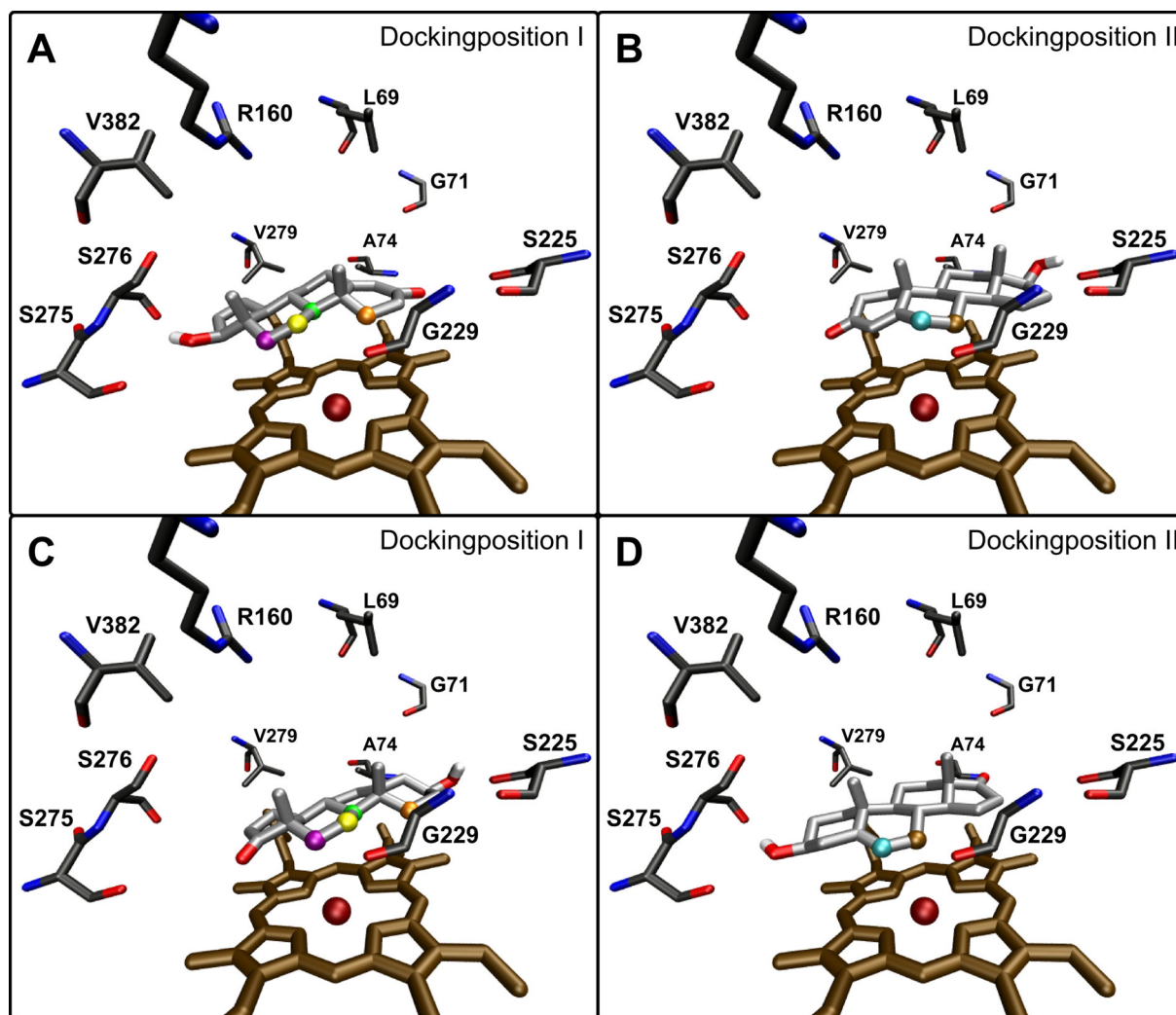


Abb. 3.42: Darstellung der zwei besten Dockingpositionen, I und II, für Testosteron (A und B) und Dehydroepiandrosteron (C und D). Die C-C Bindungen der Substrate sind hellgrau, die der SRS von dem 2Y5N_B-Model dunkelgrau, O-Atome rot und Stickstoffatome blau dargestellt. Die Atome, die in den Dockingpositionen dem Fe (dunkelrot; Protoporphyrin IX Ring braun) am nächsten liegen wurden farbig markiert; Position I: C1 orange, C9 grün, C11 gelb und C12 violett; Position II: C6 cyanblau und C7 braun.

Neben Testosteron (040) und Dehydroepiandrosteron (056) wurde auch Androstendion (019) als C19-Steroid in das 2Y5N_B-Model von CYP260A1 gedockt. Hierbei konnte nur die Dockingposition I ($\Delta G = -7,19$ kcal/mol) erhalten werden, wobei der Abstand des C1-Atoms gegenüber dem Testosteron von 4,39 Å auf 5,66 Å vergrößert ist und dafür C12 nun näher am reaktiven Zentrum liegt (siehe Tab. 3.11). Dies beruht darauf, dass Androstendion keine Hydroxylfunktion besitzt und nun wie Dehydroepiandrosteron in der Bindetasche liegt und eine H-Brückenbindung zwischen der Ketofunktion an C3 und dem Serin 225 bildet.

Tab. 3.11: Ergebnisse der Dockingexperimente mit C21- und C19-Steroiden mit der Auflistung der für die Dockingpositionen I und II erhaltenen freien Bindungsenergien, Häufigkeiten und den Abständen der dem Eisenhäm am nächsten liegenden C-Atome.

Substrat	Dockingposition I	Dockingposition II
1) freier Bindungsenergie 2) Häufigkeit der Position 3) Abstände der C-Atome vom Fe		
C21-Steroide		
Progesteron 1) und 2) 3)	-7,52 kcal/mol // 100% C1: 5,46 Å C9: 4,85 Å C11: 4,14 Å C12: 3,46Å	nicht erhalten
11-Desoxycorticosteron 1) und 2) 3)	-7,50 kcal/mol // 39,5% C1: 5,18 Å C9: 4,58 Å C11: 4,16 Å C12: 3,68 Å	-7,82 kcal/mol // 56% C6: 3,46 Å C7: 3,33 Å
17 α -Hydroxyprogesteron 1) und 2) 3)	-6,59 kcal/mol // 7,5% C1: 6,41 Å C9: 5,84 Å C11: 4,63 Å C12: 3,97 Å	-7,38 kcal/mol // 92,5% C6: 3,67 Å C7: 3,59 Å
C19-Steroide		
Testosteron 1) und 2) 3)	-6,97 kcal/mol // 89,5% C1: 4,39 Å C9: 4,62 Å C11: 4,13 Å C12: 4,23 Å	-5,78 kcal/mol // 27% C6: 3,99 Å C7: 4,01 Å
Androstendion 1) und 2) 3)	-7,19 kcal/mol // 100% C1: 5,81 Å C9: 4,88Å C11: 4,23 Å C12: 3,45 Å	nicht erhalten
Dehydroepiandrosteron 1) und 2) 3)	-7,28 kcal/mol // 43,5% C1: 5,66 Å C9: 4,57 Å C11: 4,10 Å C12: 3,42 Å	-7,28kcal/mol // 56,5% C6: 3,39 Å C7: 3,22 Å

Im Folgenden wurden noch die drei Hauptvertreter der C21-Steroide, Progesteron, 11-Desoxycorticosteron und 17 α -Hydroxyprogesteron, für Dockingexperimente genutzt. Auch hier wurde immer die Dockingposition I erhalten (siehe Tab. 3.11). Für Progesteron war diese

auch die einzige mögliche Konformation ($\Delta G = -7,52$ kcal/mol). Für die beiden anderen Substrate wird die Dockingposition I nicht bevorzugt eingenommen und zwar sowohl energetisch als auch bezüglich ihrer Häufigkeit. Dies widerspricht den praktisch erhaltenen 1α -hydroxylierten Hauptprodukten. Auch die Abstände der C1-Atome in der ungünstigeren Position I sind mit $5,18 \text{ \AA}$ für 11-Desoxycorticosteron und $6,41 \text{ \AA}$ für 17α -Hydroxyprogesteron sehr hoch. Insgesamt ist zu beobachten, dass die Dockingergebnisse bei den C21-Steroiden nicht die Dockingposition I ergeben, welche eine 1α -Hydroxylierung, wie sie bei den Produktisolierungen beobachtet wurde, widerspiegelt. Im Gegensatz dazu wurden bei den C19-Steroiden meist genau diese Dockingposition I erhalten.

3.7 Optimierung des CYP260A1-abhängigen Umsatzes von Testosteron

Da die Produkte der durch CYP260A1 katalysierten Reaktionen durch die Massenspektrometrie näher bestimmt (siehe Kapitel 3.6.1) und auch die Hauptprodukte mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden konnten (siehe Kapitel 3.6.2), stellte sich als nächstes die Frage, ob man die schon erreichten Ganzzellumsätze mit dem tricistronische Vektor pETMR7 (CYP260A1/Fpr/Adx₁₋₁₀₈) noch steigern könnte. Hierbei wurde versucht, das Expressionssystem mit einem Wechsel zu zwei Vektoren flexibler und effizienter zu gestalten.

3.7.1 Vergleich von AdR und Fpr als Reduktase im CYP260A1-abhängigen Monooxygenasesystem

Für CYP264A1 aus *S. cellulosum* und CYP106A2 aus *B. megaterium* konnte zuvor gezeigt werden, dass Adx im Ganzzellsystem effizienter mit der Reduktase aus *E. coli* arbeitet als mit dem natürlichen Redoxpartner AdR aus *B. taurus*. Für die Isolierung der Hauptprodukte wurde deshalb das Fpr-unterstützte pETMR7-System verwendet (siehe Kapitel 3.6.2). Bevor nun ein anderes Expressionssystem aufgebaut wurde, sollte überprüft werden, ob die beobachteten Unterschiede zwischen AdR und Fpr auch im Falle von CYP260A1 auftreten. Hierzu konnte der Umsatz von Testosteron durch das bereits klonierte pETMR4-System (CYP260A1/AdR/Adx₁₋₁₀₈) mit AdR als Reduktase (siehe Kapitel 3.5.1) direkt mit dem pETMR7-System verglichen werden. Es wurden 200 µM Testosteron eingesetzt, wobei das M9CA-Medium sowohl bei der Expression als auch bei dem Umsatz als Medium diente. Wie schon bei CYP264A1 und CYP109D1 beobachtet, war das pETMR4-System das ineffizientere System (siehe Abb. 3.43). Nach 24 h konnte mit diesem System ein Testosteronumsatz von $57,5 \pm 11,9$ % erhalten werden, was ca. 115 µM entsprach. Das pETMR7-System konnte einen vergleichbaren Wert schon nach 8 h erreichen, nämlich $47,5 \pm 5,1$ % (ca. 55 µM). Nach 24 h kam es bei diesem System zu einer starken Mehrfach-Hydroxylierung der Produkte. Um einen Rückschluss auf die Expression von CYP260A1 zu ziehen, wurden nach 24 h COD-Spektren der Lysate aufgenommen. Hierbei zeigte sich, dass beide Systeme ähnlich hohe P450-Konzentrationen aufweisen, nämlich 8,8 nmol pro l Kultur (0,56 nmol pro g Feucht-

masse) für pETMR4 und 9,67 nmol pro l Kultur (0,66 nmol pro g Feuchtmasse). Daher wurde für die die neu aufzubauenden 2-Vektorsysteme nur noch Fpr als Reduktase verwendet.

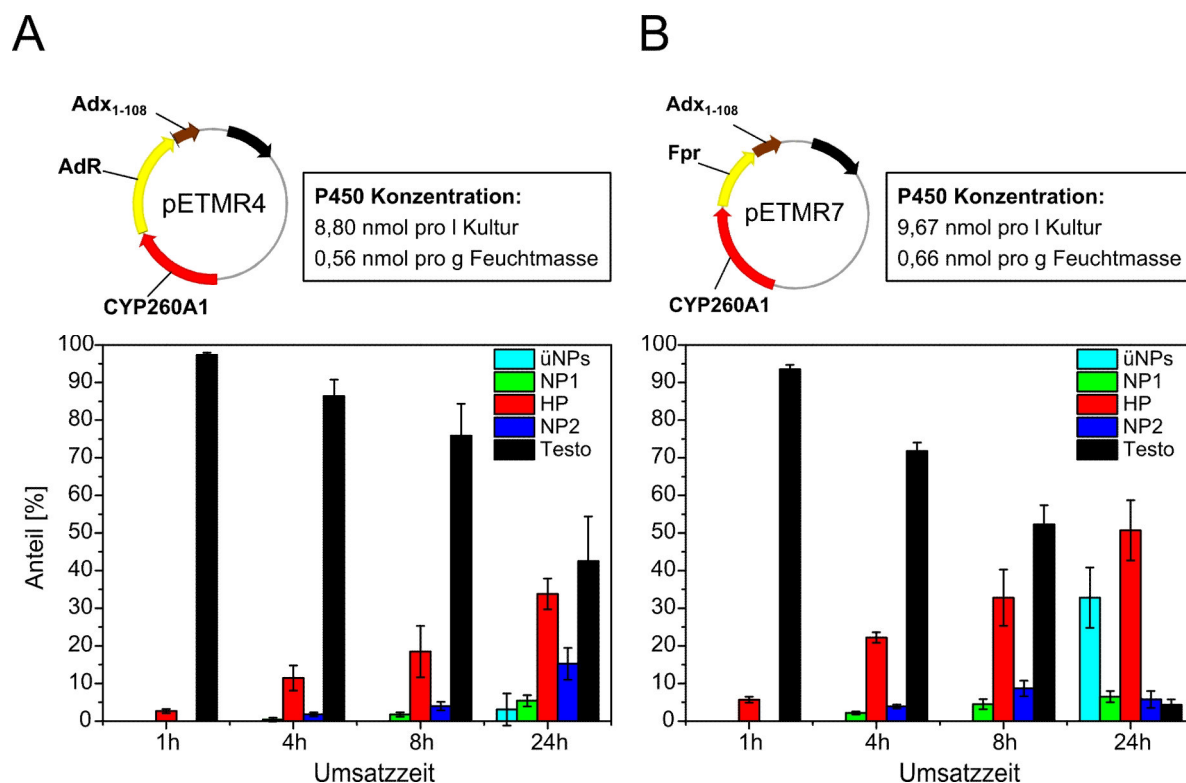


Abb. 3.43: Vergleich der Auswirkung der Expression verschiedener Reduktasen auf die CYP260A1 abhängigen Ganzzellumsätze von 200 µM Testosteron in M9CA-Medium und die dabei erhaltenen P450 Konzentrationen pro l Kultur bzw. pro g Feuchtmasse: A: pETMR4-System (CYP260A1/AdR/Adx₁₋₁₀₈); B: pETMR5 (CYP260A1/Fpr/Adx₁₋₁₀₈; in grau). Die prozentualen Anteile der Analyten sind als Balken in folgenden Farben dargestellt: das Substrat Testosteron (Testo) schwarz, das Hauptprodukt 1 α -Hydroxytestosteron rot, das Nebenprodukt NP1 grün, das Nebenprodukt NP2 blau und die Gesamtheit der überoxidierten Produkte üNPs cyanblau.

3.7.2 Klonierung der Vektoren für das neue CYP260A1 Ganzzellsystem

Für das geplante 2-Vektor System sollten sich die 2 Redoxpartner von CYP260A1, Reduktase und Ferredoxin, auf einem Vektor befinden und CYP260A1 auf einem dazu kompatiblen Vektor. Weiterhin sollte die Option bestehen, zusätzlich zu dem P450 Gen ein weiteres Gen dem System hinzufügen zu können. Daher wurden die Duet-Vektoren von Novagen ausgewählt, da diese 2 unabhängige Klonierungsstellen (MCS: „multiple cloning sites“) besitzen, die jeweils unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen (Novy *et al.* 2002). Diese Vektoren

existieren mit unterschiedlichen Resistenzen und Replikationsursprüngen (Held *et al.* 2003, Tolia & Joshua-Tor 2006), wobei die Restriktionsschnittstellen der beiden MCSs für alle Vektoren gleich sind.

Für die Redoxpartner wurde der pCDFDuet-1 Vektor mit Streptomycinresistenz verwendet. Um für spätere Arbeiten mit dem neuen System bessere Vergleiche mit dem gereinigten Adx₄₋₁₀₈ zu haben, wurde das Gen aus dem Expressionsvektor pKKHC_Adx₄₋₁₀₈ genommen, wobei zuerst mittels ortsgerichteter Mutagenese mit den Primern Adx_NdeI_{del_f} und Adx_NdeI_{del_r} (siehe Material & Methoden Tab. 2.1) die Sequenz an der internen *NdeI* Restriktionsschnittstelle geändert wurde. Dann wurde das Gen durch die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* ausgeschnitten und in die MCS-I des pCDFDUET-1 Vektors inkloniert. Als nächstes wurde das Gen der Fpr mit den dazu nötigen Schnittstellen durch die Primer Genom_Fpr_for und Fpr1r_KpnI (siehe Material & Methoden Tab. 2.1) amplifiziert. Wie schon zuvor bei der Klonierung der tricistronischen Vektoren der pETMR-Serie (siehe Kapitel 3.5.1) diente dabei der Expressionsvektor pET16_Fpr als Vorlage und das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pCR4TMblunt Vektor zwischenkloniert. Anschließend wurde das Gen durch die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *KpnI* ausgeschnitten und in die MCS-II eingefügt und es entstand der Vektor für die Redoxpartner, pCDF_dFA (siehe Abb. 3.44 A). Im nächsten Schritt wurde das CYP260A1 Gen durch die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *KpnI* aus dem pET17b_CYP260A1 Vektor ausgeschnitten und in den pET22b Vektor eingebracht (siehe Abb. 3.44 B). Der zuvor verwendete pET17b-Vektor konnte nicht direkt verwendet werden, da er wegen des Fehlen des lac I- Repressors nicht kompatibel mit den Duet-Vektoren ist (Novagen; „User Protocol TB340“). Die 50 Aminosäuren kürzere Form von CYP260A1, ΔCYP260A1, wurde direkt in dieses Expressionskonstrukt kloniert (siehe 3.1.1), da dieser Vektor sowohl zur Expression und Reinigung als auch für die hier besprochenen Ganzzellumsätze dienen kann.

Darüber hinaus wurde ein für *B. megaterium* codon-optimiertes synthetisiertes ΔCYP260A1Gen (CYP260A1_{meg}) mit der gleichen Strategie in den pET22b Vektor kloniert und anschließend zusätzlich mit den Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *KpnI* in die MSC-II eines pETDuet-1 eingefügt. In die MCS-I dieses Vektors wurde wie beim pCDF_dFA (siehe Abb. 3.44) Adx₄₋₁₀₈ eingebracht und es entstand der pET_dC17A. Hiermit sollte überprüft werden, ob eine höhere Expression von Adx₄₋₁₀₈ zu einer Optimierung des Umsatzes führt. Als letztes wurde das Plasmid pET_dC17GDH konstruiert (siehe Abb. 3.44 D). Hierbei wurde das Adx₄₋₁₀₈ im pET_dC17A durch das Gen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GDH) ersetzt. Zuvor wurde das Gen mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* aus

genomischer DNA von *E. coli* BL21 mit Hilfe der Primer Glu6P_for und Glu6P_rev (siehe Material & Methoden Tab. 2.1) amplifiziert und in den pCR4™blunt Vektor zwischenkloniert.

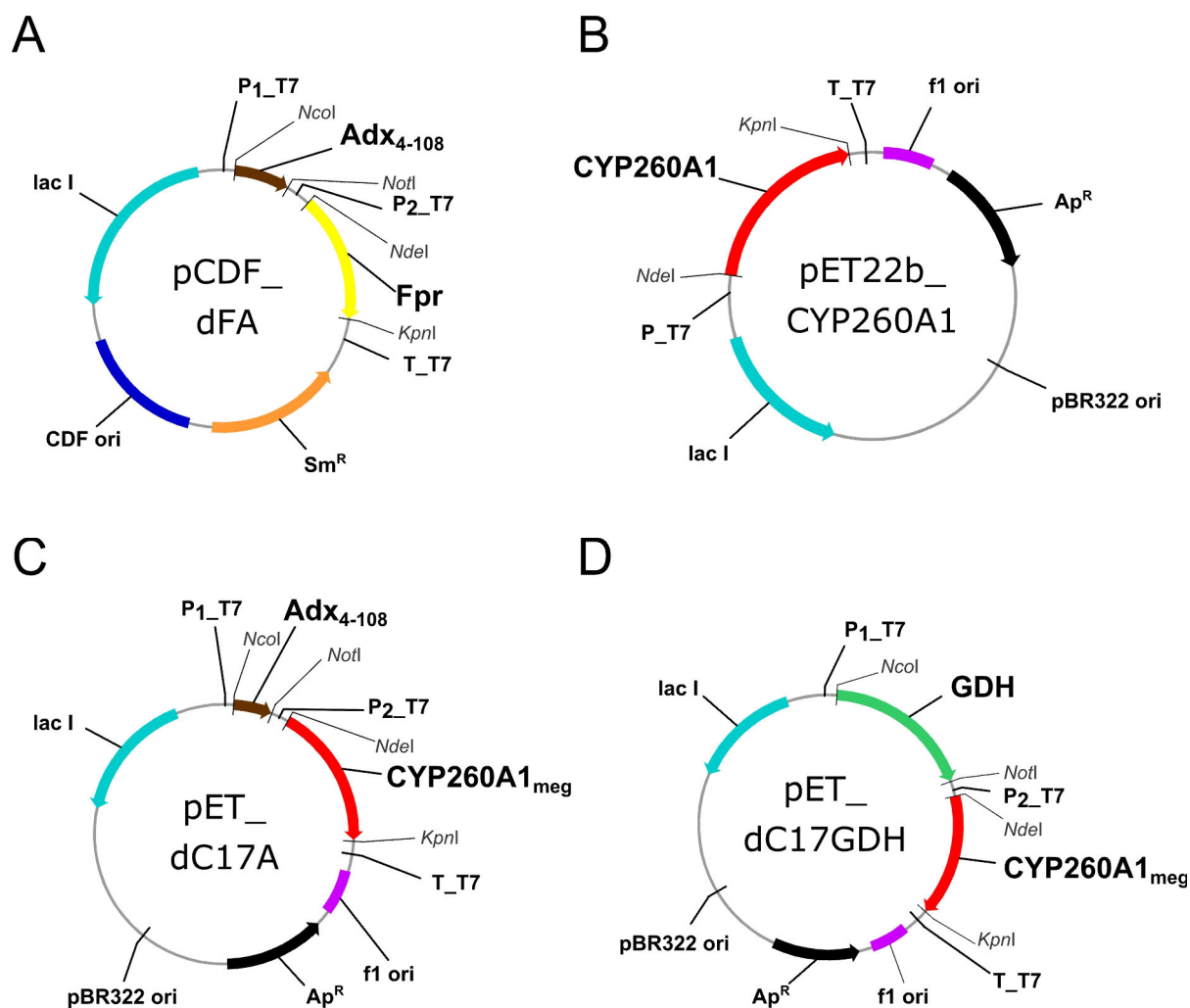


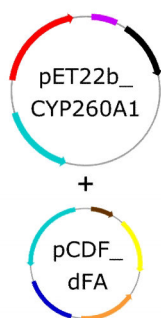
Abb. 3.44: Darstellung der klonierten Vektoren für das 2-Vektorsystem basierend auf den Duet-Vektoren von Novagen: A: pCDF_dFA, B: pET22b_CYP260A1 äquivalent aufgebaut auch für Δ CYP260A1 & CYP260A1_{meg}, C: pET_dC17A und D: pET_dC17GDH. Die Cytochrome P450 sind rot, das Adx₄₋₁₀₈ braun, Fpr gelb, GDH grün, das Ampicillinresistenzgen schwarz, das Streptomycinresistenzgen orange, der lac I Repressor cyanblau, der f1 Replikationsursprung violett und der CDF Replikationsursprung blau dargestellt.

3.7.3 Charakterisierung des neuen 2 Vektorsystems für CYP260A1

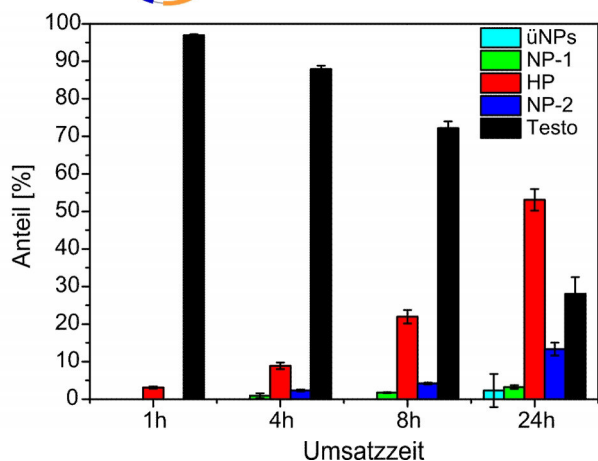
Nachdem die neuen Vektoren hergestellt und erfolgreich sequenziert worden waren, konnte der pCDF_dFA Vektor beliebig mit den 5 anderen Vektoren kombiniert werden. Die dabei entstehenden Expressions- bzw. Ganzzellsysteme werden im Folgenden als 2-Vektorsysteme A-E bezeichnet. Die Buchstaben A-E stehen hierbei für verschiedene Kombinationen der pET-Vektoren mit dem pCDF_dFA Vektor (siehe Abb. 3.45). Um die verschiedenen 2-Vektorsysteme zu testen und später miteinander zu vergleichen, wurden wie schon zuvor für die tricistronischen Systeme 200 μM Testosteron in M9CA-Medium umgesetzt und die Produktbildung sowie die P450 Konzentration über 24 h beobachtet (siehe Abb. 3.45).

Hierbei zeigte sich, dass die P450 Konzentrationen für das 2-Vektorsystem A (CYP260A1) mit 14,07 nmol pro l Kultur (0,96 nmol pro g Feuchtmasse) im Vergleich zum tricistronischen pETMR7-System (siehe Kapitel 3.7.1) leicht erhöht war und die P450 Konzentration des 2-Vektorsystems B (verkürztes $\Delta\text{CYP260A1}$) mit 9,45 nmol pro l Kultur ungefähr gleich hoch war. In beiden Fällen fiel jedoch der Substratumsatz gegenüber dem tricistronischen pETMR7-System deutlich kleiner aus. Das System A konnte nach 24 h $71,9 \pm 4,4 \%$ (ca. 143 μM), das System B nur $41,6 \pm 4,4 \%$ (ca. 83,2 μM) Testosteron umsetzen. Letzteres entsprach einem vergleichbaren Umsatz zu dem AdR unterstützten pETMR4-System. Eine Überoxidierung der Produkte war für beide 2-Vektorsysteme über die gesamte Zeit nicht zu beobachten. Als nächstes wurde das 2-Vektorsystem C getestet, welches das für *B. megaterium* codon-optimierte $\Delta\text{CYP260A1}$ (CYP260A1_{meg}) enthielt. Hier zeigte sich, dass die Optimierung des Gens für die Expression in *B. megaterium* auch eine Optimierung der Expression in *E. coli* zur Folge hatte, da nun eine P450-Konzentration von 275,82 nmol pro l Kultur (16,87 nmol pro g Feuchtmasse) erhalten wurde. Dies wirkte sich auch auf den Umsatz aus. Das System C konnte nach 1 h $13,6 \pm 0,6 \%$ (ca. 27 μM) Testosteron umsetzen, was dem System B mit dem nicht optimierten Gen erst nach ca. 8 h möglich war. In diesem Zeitraum waren mit dem System C schon $81,7 \pm 5,7 \%$ (ca. 163 μM) Testosteron umgesetzt worden; nach 24 h war das Substrat nahezu komplett verbraucht. Außerdem kam es nach dieser Zeit zu einer starken Überoxidierung der Produkte, so dass diese etwa in der gleichen Menge wie die Produkte der ersten Oxidationsstufe vorlagen.

A



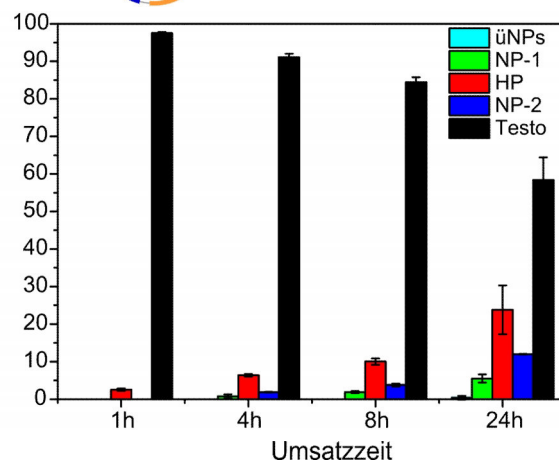
P450 Konzentration:
14,07 nmol pro l Kultur
0,94 nmol pro g Feuchtmasse



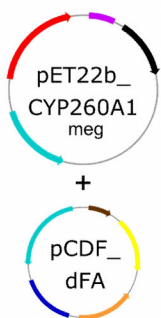
B



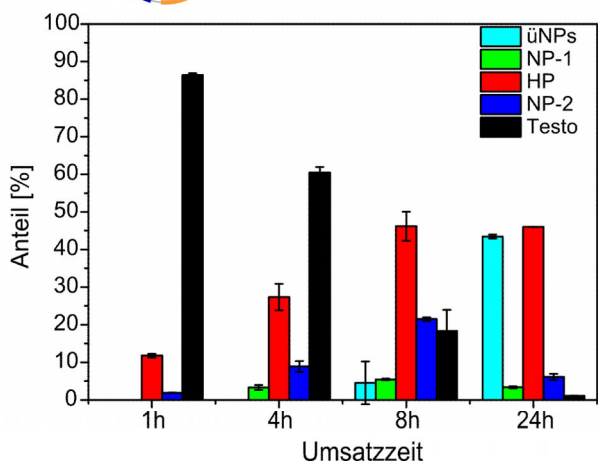
P450 Konzentration:
9,45 nmol pro l Kultur
0,65 nmol pro g Feuchtmasse



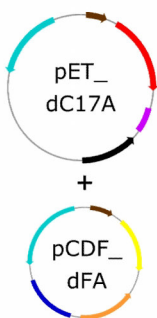
C



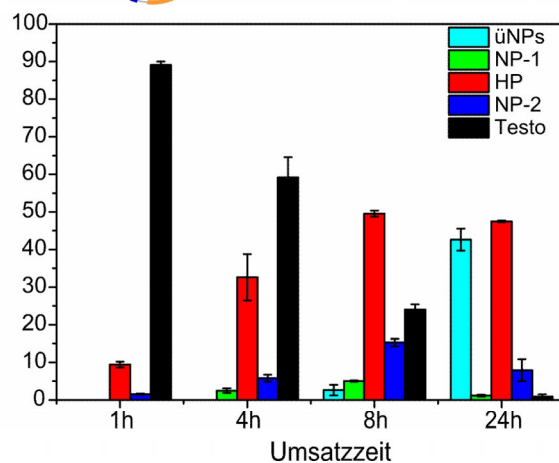
P450 Konzentration:
275,82 nmol pro l Kultur
16,87 nmol pro g Feuchtmasse



D



P450 Konzentration:
101,76 nmol pro l Kultur
6,34 nmol pro g Feuchtmasse



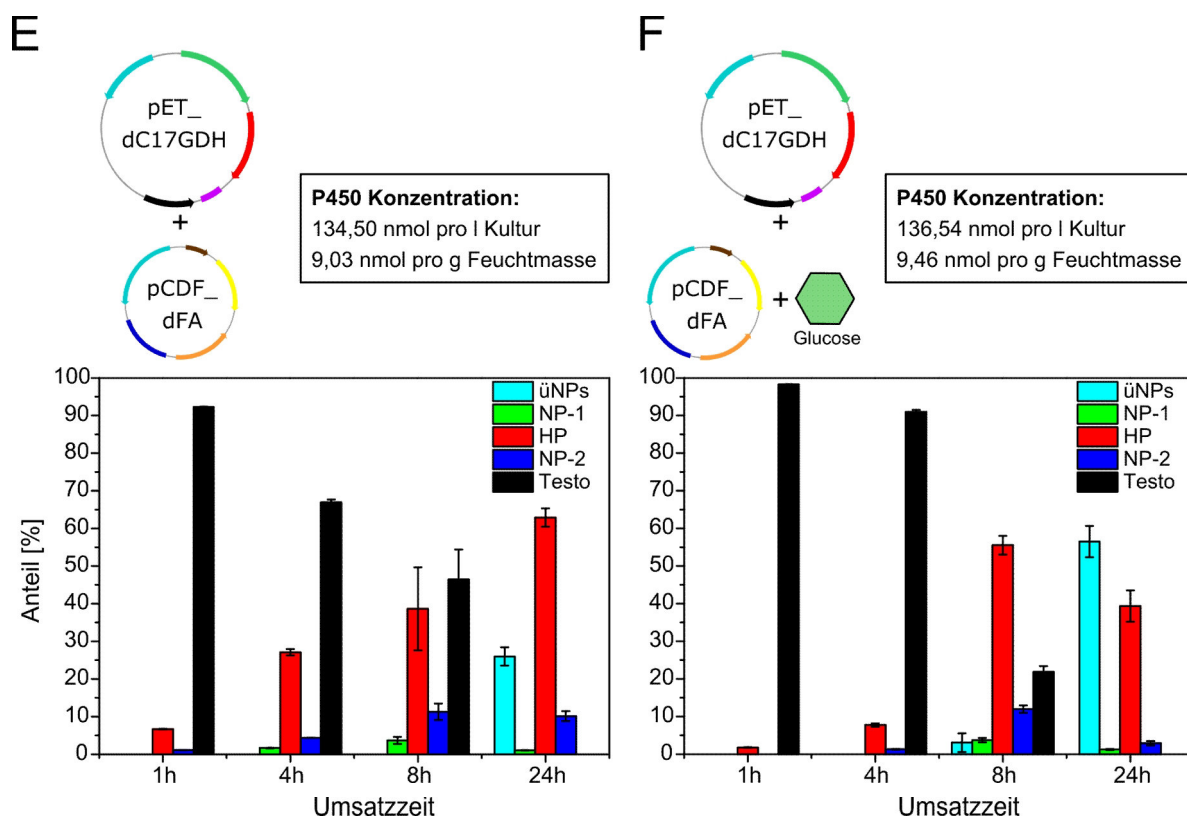


Abb. 3.45: Vergleich der verschiedenen 2-Vektorsysteme bei Ganzzellumsätzen von 200 μ M Testosteron in M9CA-Medium und die dabei erhalten P450 Konzentrationen pro l Kultur bzw. pro g Feuchtmasse: Kombination des pCDF_dFA mit A: pET_CYP260A1 (2-Vektorsystem A), B: pET_ΔCYP260A1 (2-Vektorsystem B), C: pET_CYP260A1_{meg} (2-Vektorsystem C), D: pET_dC17A (2-Vektorsystem D), E: pET_dC17GDH (2-Vektorsystem E) und F: 2-Vektorsystem E mit zusätzlicher Zugabe von 4 g/l Glucose. Die prozentualen Anteile der Analyten sind als Balken in folgenden Farben dargestellt: das Substrat Testosteron schwarz, das Hauptprodukts 1 α -Hydroxytestosteron rot, das Nebenprodukt NP1 grün, das Nebenprodukte NP2 blau und die Gesamtheit der überoxidierten Produkte üNPs cyanblau.

Da durch die Optimierung der Transkription bzw. Expression nun deutlich mehr P450 mit dem System C vorhanden war, sollten diesem mehr Elektronen zur Verfügung gestellt werden. Hierzu wurde zunächst das System D getestet, da hier durch den Einsatz des pET_dC17A zwei Adx₄₋₁₀₈ Gene vorliegen und so mehr Redoxpartner exprimiert werden können. Das zusätzliche Gen führte jedoch zu einer Reduktion der P450-Konzentration von 275,82 nmol auf 101,75 nmol pro l Kultur (6,34 nmol pro g Feuchtmasse). Auf die Reaktion hatte dies aber nur geringen Einfluss. Es konnte zwar keine Steigerung des Testosteronumsatzes gegenüber dem System C beobachtet werden, aber nach 24 h waren auch hier 200 μ M Testosteron umgesetzt und auch die Überoxidierung der Produkte war vergleichbar. Als nächstes sollte der Anteil an verfügbarem Cofaktor, NADPH, in der Zelle erhöht werden. Dies sollte durch den pET_dC17GDH Vektor erreicht werden, wodurch zusätzlich zu den Komponenten des Mo-

nooxygenasesystems, Reduktase, Ferredoxin und P450, noch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (GDH) coexprimiert wird (System E). Diese wandelt Glucose-6-Phosphat in Gluconat-6-Phosphat um und regeneriert NADP^+ zu NADPH. Ihr Substrat Glucose-6-Phosphat wird hierbei durch die natürliche Aufnahme der Glucose in die *E. coli* Zelle zur Verfügung gestellt, da diese Glucose mit Hilfe des Phosphotransferase-Systems in die Zelle aufnimmt, wodurch Glucose-6-Phosphat entsteht (Postma *et al.* 1993). Wie schon zuvor beobachtet, wurde auch hier durch die Expression eines zusätzlichen Proteins die Menge an P450 verringert, es wurden 134,51 nmol pro l Kultur (9,03 nmol pro g Feuchtmasse) erreicht. Der Umsatz über die Zeit war aber interessanterweise in diesem Fall niedriger als im Falle der Systeme C und D. Nach 24 h war zwar das gesamte Testosteron verbraucht, aber nach 8 h wurden nur $53,5 \pm 8,0$ % (ca. 107 μM) Testosteron umgesetzt, demnach ca. 65 % weniger als bei dem System C. Außerdem war auch die Überoxidierung nach 24 h nicht so weit fortgeschritten wie bei den Systemen C und D. Dies bedeutet, dass die zusätzliche Expression der GDH keinen Optimierungseffekt auf den Umsatz hatte. Dies könnte aber auch daran liegen, dass die gesamte Menge an Glucose im M9CA-Medium zum Zeitpunkt der Substratzugabe schon verbraucht war. Aus diesem Grund wurden die Umsätze mit dem System E noch einmal wiederholt, wobei nun während der Substratzugabe 4 g/l Glucose zugegeben wurde. Dies führte zunächst in den ersten 4 h zu einer Unterdrückung des Testosteronumsatzes. Es konnte nach 4h nur $9,0 \pm 0,5$ % (ca. 18 μM) Testosteron umgesetzt werden, soviel wie bei dem bis dahin schwächsten System B. Aber nach 8 h wurde ein Umsatz von $78,1 \pm 1,5$ % (ca. 156 μM) beobachtet. Dieser Wert ist in etwa vergleichbar mit dem bislang besten System C. Nach 24 h war auch hier das Testosteron verbraucht, so dass nur die Überoxidierung Aufschluss auf eine mögliche Optimierung geben konnte. Diese war ca. 10% höher als die der Systeme C und D.

4 Diskussion

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit bestand darin, die im Institut für Biochemie bis Anfang 2009 erlangten Erkenntnisse über die Cytochrome P450 des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56 zu erweitern. Durch die immens große Anzahl von Cytochromen P450 und die Komplexität des Genoms sind bislang Aussagen über ihre physiologische Bedeutung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde der Focus dieser Arbeit auf die Enzyme gelegt, die in großen Mengen heterolog exprimierbar sind, um deren Potential als Biokatalysatoren auszuloten. Hierzu wurden die bereits von Khatri untersuchten P450s CYP109D1 und CYP260A1 verwendet (Khatri 2009), ebenso wie die bisher wenig untersuchten CYP266A1, CYP260B1 und CYP264A1. Am Anfang wurden deshalb zuerst die einzelnen Proteine gereinigt. Anschließend wurden sie hinsichtlich ihres Substratspektrums untersucht und die entstehenden Produktmuster analysiert. Nach erfolgter Substratidentifizierung für die ausgewählten Cytochrome P450 und die Untersuchungen des Produktmusters flossen die Erkenntnisse in den Aufbau von Ganzzellsystemen für die jeweiligen Cytochrome P450 ein. Dies ermöglichte eine detaillierte Produktcharakterisierung mittels NMR-Spektroskopie, da nun größere Mengen an Produkt zur Verfügung standen. Für die potentielle Steroidhydroxylase CYP260A1 konnten somit die schon zuvor erhaltenen Erkenntnisse (Khatri 2009) entscheidend vertieft werden. Durch Variation der steroidalen Substrate konnte darüber hinaus ihre bevorzugte 1α -Hydroxylierungsposition identifiziert werden. Dies führte unterstützt durch bioinformatische Methoden, zu einem Einblick in die biokatalytischen Fähigkeiten dieser 1α -Steroidhydroxylase.

Im Folgenden werden die im Zuge dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über das Substratspektrum von CYP266A1, CYP109D1, CYP264A1 und der CYP260 Familie einzeln erörtert. Im Anschluss werden die Etablierung der Methoden im Bereich der Ganzzellkatalyse und ihre Bedeutung für die Zukunft erläutert. Am Ende soll, wie schon im Ergebnisteil CYP260A1, im Einzelnen hinsichtlich seiner Produkte und seiner Bedeutung als 1α -Steroidhydroxylase diskutiert werden.

4.1 Charakterisierung von CYP266A1

Über CYP266A1 war zu Beginn der Arbeit sehr wenig bekannt. Es besitzt die geringste Ähnlichkeit zu den anderen P450s aus *Sorangium cellulosum* und ist somit phylogenetisch weit von ihnen distanziert. Bei seiner Entdeckung war es das erste Mitglied dieser CYP266 Familie. Mittlerweile ist aber ein weiterer Vertreter der CYP266 Familie bekannt, nämlich aus dem Bakterium *Burkholderia oklahomensis* C6786 (NCBI-Datenbank: ZP_02367478.1). Dieses Protein wurde noch nicht in die offizielle P450-Datenbank von Nelson aufgenommen, berechnet man jedoch den Verwandtschaftsgrad mit dem entsprechenden Algorithmus, zeigt es eine Identität von 59% und eine Ähnlichkeit von 77% zu CYP266A1 (<http://blast.uthsc.edu/blast.cgi>).

Für die vorliegende Arbeit war aber entscheidend, dass CYP266A1 im Gegensatz zu den meisten P450s aus *Sorangium cellulosum* So ce56 mit dem von Khatri etablierten Expressionssystem in hohen Ausbeuten von über 1000 nmol pro Liter Kultur hergestellt werden kann (Khatri 2009), weshalb das Expressionssystem von Khatri übernommen wurde. Über die Redoxpartner oder das Substratspektrum des CYP266A1 war zu Beginn der Arbeit nichts bekannt, so dass die erste Herausforderung darin bestand, geeignete Redoxpartner und potentielle Substrate zu identifizieren.

4.1.1 Bestimmung der Redoxpartner

Wie zuvor in der Einleitung (siehe Einleitung 1.2) besprochen, sind Cytochrome P450 in der Lage, nach Reduktion des Eisen(III) im Hämring, CO als Liganden zu binden. Der reduzierte Eisen-CO-Komplex besitzt die für die Proteinfamilie spezifische Absorptionsbande bei 450 nm. Diese Eigenschaft wurde nun verwendet, um den ersten Elektronentransfer möglicher Redoxpartner zu testen, indem man *in vitro* zuerst das Cytochrom P450 mit den jeweiligen Redoxsystemen und NADPH inkubierte und dann mit CO begaste. Dieselbe Methodik wurde auch schon zuvor von Khatri bei der Identifizierung von homologen und heterologen Redoxpartnern für CYP109D1 und CYP260A1 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 erfolgreich angewendet (Khatri 2009). Bei CYP266A1 wurden nun die 10 Kombinationen aus den zur Verfügung stehenden, homologen Redoxpartnern (Ewen 2009) getestet. Wie schon in den Studien für CYP109D1 und CYP260A1 gezeigt (Ewen 2009, Khatri *et al.* 2010b), konnten nur die

Kombination aus FdR_B/Fdx2 und FdR_B/Fdx8 CYP266A1 reduzieren. Das ungewöhnliche war nun, dass sich der CO-Komplex sehr langsam, d.h. erst nach 15 min, bildete und nur ca. 75% im Vergleich zu dem mit Natriumdithionit erhaltenen Wert betrug (siehe Ergebnisse 3.2.1 Tab. 3.2). Aus diesem Grund wurden auch verschiedene heterologe Redoxsysteme getestet, um eine effektivere Redoxkette zu finden. Das bovine Adrenodoxinsystem, welches bei vielen P450 anwendbar ist (Ewen *et al.* 2012), zeigte gar keinen Elektronentransfer (siehe Ergebnisse 3.2.1 Tab. 3.2), sowohl der Wildtyp als auch die normalerweise heterolog verwendete Mutante Adx₄₋₁₀₈ waren nicht in der Lage, CYP266A1 zu reduzieren. Auch das analog hierzu in der Gruppe von Prof. Bernhardt etablierte etpI-System aus *Schizosacharomyces pombe*, welches zum Beispiel bei CYP105A1 aus *Streptomyces griseolus* erfolgreich eingesetzt wurde (Kleser *et al.* 2012), brachte keinen Erfolg. Lediglich das Flavodoxinsystem (Klasse III) von *Escherichia coli* bestehend aus *E. coli* Reduktase (Fpr) und Flavodoxin A (FldA) war in der Lage, CYP266A1 zu reduzieren. Aber auch hier war die Reaktionszeit vergleichbar mit den homologen Systemen und es musste im Gegensatz dazu ein hoher Überschuss an Redoxpartnern zugegeben werden, was die Reaktion für etwaige Anwendungen sehr unökonomisch macht. Prinzipiell bleibt festzuhalten, dass eine Reduktion von CYP266A1 sowohl mit homologen als auch mit heterologen Redoxsystemen möglich war, wenngleich sehr ineffizient. Der Transfer des 2. Elektrons ist experimentell nicht direkt zugänglich und kann nur über einen Substratumsatz erfolgen.

4.1.2 Substratidentifikation

Zur ersten Einschätzung des Substratspektrums von CYP266A1 machte man sich eine andere spektroskopische Eigenschaft von Cytochromen P450 zu Nutze: bei der Bindung von hydrophoben Resten nahe der prosthetischen Gruppe kommt es zu einer Verdrängung des axialen Wasserliganden des Hämeisens und somit zu einer Typ I Verschiebung (siehe Einleitung 1.2.3). Dieses Verhalten kann, wie in der Literatur für beispielsweise CYP260A1 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 (Khatri 2009) oder CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 (Bleif 2007, Schmitz *et al.* 2012) beschrieben, dazu verwendet werden, um potentielle Substrate unabhängig von den Redoxpartnern zu ermitteln. Die Methodik hat aber auch ihre Schwächen, da nicht alle Substrate eine Typ I Verschiebung zeigen, wie im Falle des Substrates Abietinsäure für CYP106A2 (Bleif *et al.* 2011) oder Morpholin für CYP151A2 (P450mor: *Mycobacterium* sp. HE5) gezeigt wurde (Sielaff & Andreesen 2005). Auch können Substan-

zen im aktiven Zentrum binden, aber aufgrund der Lage zur reaktiven Sauerstoffspezies am Hämeisen nicht umgesetzt werden. Mit dieser Methode wurden für CYP266A1 44 Verbindungen getestet (siehe Ergebnisse 3.2.2 Tab. 3.3). Neben den schon bekannten Fettsäuren, Myristinsäure (001), Palmitinsäure (002) und Laurinsäure (065) (Khatri *et al.* 2010b), zeigten 10 weitere Verbindungen eine Typ I Verschiebung, darunter eine weitere Fettsäure, die Stearinsäure (066). Außer den Fettsäuren wurde versucht, die 9 anderen Verbindungen mit den Redoxsystemen, FdR_B/Fdx2, FdR_B/Fdx8 und Fpr/FldA, *in vitro* umzusetzen. In allen Fällen konnte kein Umsatz beobachtet werden. Dies kann vielerlei Gründe haben, die sich zum Teil gegenseitig bedingen. Bei der Bestimmung der Redoxpartner konnte nämlich schon beobachtet werden, dass die Reduktion des CYP266A1 sehr langsam ist und dementsprechend die Katalyse durch CYP266A1 langsam abläuft. Dies würde bedeuten, dass man nicht die richtigen Redoxpartner identifiziert hat. Es könnte aber auch an den potentiellen Substraten liegen. Das richtige Substrat könnte zu einer stabileren Konformation des Proteins führen, so dass ein besserer Elektronentransfer möglich ist. Dies wurde zum Beispiel für CYP167A1 (P450_{epoK}) gezeigt, welches ohne sein natürliches Substrat Epothilon D keinen stabilen Eisen-CO-Komplex zeigt, aber in Anwesenheit des Substrates in die stabile Form überführt wird (Ogura *et al.* 2004). Außerdem ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Verbindungen nicht um natürliche Substrate handelt. Dies kann im Katalysezyklus des P450 zu den in der Einleitung beschriebenen Nebenreaktionen bzw. Abbruchreaktionen führen. Dadurch entsteht das oxidierte Hämeisen, welches wiederum nur schwer reduziert wird. Ausgehend von den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen ist anzunehmen, dass es sich bei CYP266A1 um ein sehr substratselektives Cytochrom P450 handelt, welches einen spezifischen Schritt im Sekundärmetabolismus von *Sorangium cellulosum* So ce56 katalysiert. Ohne nähere Kenntnis seiner physiologischen Bedeutung ist deshalb eine weitere Charakterisierung nur schwer möglich. CYP266A1 eignet sich demnach nicht gut zur Anwendung als Biokatalysator für nicht endogene Substrate.

4.2 Substratidentifikation von CYP109D1, CYP264A1 und der CYP260A1 Familie

Bei den folgenden Cytochromen P450 wurde mit dem bovinen AdR/Adx₄₋₁₀₈ Redoxsystem gearbeitet. Dieses kann erfolgreich Elektronen auf bakterielle Cytochrome P450 übertragen, was erstmals für CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 beschrieben wurde (Berg *et al.* 1979, Lisurek 2004). Für CYP109B1 aus *Bacillus subtilis* konnte sogar gezeigt werden, dass dieses System besser als die homologen oder andere häufig verwendete heterologe Systeme wie Fpr/FldA oder Pdr/Pdx funktioniert (Girhard *et al.* 2010). Für CYP264B1 (Ly *et al.* 2012) als auch für die hier verwendeten CYP109D1, CYP260A1 und CYP264A1 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 (Khatri 2009, Khatri *et al.* 2010b) konnte ebenfalls festgestellt werden, dass das bovine AdR/Adx₄₋₁₀₈ System effizienter Elektronen überträgt als die autologen *Sorangium cellulosum* Redoxsysteme FdR_B/Fdx2 und FdR_B/Fdx8. Daher wurden für die weitere Substratidentifizierung *in vitro* Umsätze mit CYP109D1, CYP264A1, CYP260A1, CYP260B1 und Δ CYP260A1 durchgeführt.

4.2.1 CYP109D1

Zu Beginn der Arbeit war das CYP109D1 das am besten untersuchte P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56. Es waren bereits verschiedene Substrate aus dem Bereich der Fettsäuren, Mono- und Sesquiterpene (siehe Einleitung 1.4 Tab. 1.4) bekannt (Khatri 2009) und es sollte nun überprüft werden, ob das Substratspektrum um weitere Substrate speziell aus dem Bereich der Steroide, Diterpene und Triterpene erweitert werden kann. Hierzu wurden 48 Verbindungen getestet, von denen nur die bereits beschriebenen Substrate, α -Ionon (037) und β -Ionon (038) umgesetzt wurden. Es scheint, dass CYP109D1 eine eher kleine Substratbindetasche besitzt, da es sich bei den getesteten Verbindungen um große zyklische Verbindungen handelte. Die bekannten Substrate von CYP109D1 sind im Gegensatz dazu nur kleine bzw. linear aufgebaute Moleküle wie Fettsäuren, welche ihre Größe durch Konformationsänderung verringern können. Betrachtet man außerdem die Lage der funktionelle Gruppe (Ketofunktion) der Ionon-Substrate, fällt auf, dass diese ebenfalls an einem den Fettsäuren ähnlichen, freidrehbaren Alkylrest sitzt. Dies würde zum Beispiel erklären, warum das dem Ionon hinsichtlich der Größe ähnliche, jedoch bicyklische Sesquiterpen (+)-Nootkaton (025), dessen Ke-

togruppe an einem der Zyklen gebunden ist, nicht umgesetzt wird. Dies bedeutet, dass für CYP109D1 nur große linear aufgebaute Moleküle oder kleine monozyklische Verbindungen mit frei drehbaren funktionellen Gruppen als Substrate fungieren können.

4.2.2 CYP264A1

Wie schon zuvor erwähnt, ist ein erster Elektronentransfer von dem bovinen AdR/Adx₄₋₁₀₈ System auf CYP264A1 gewährleistet, wobei mit den zuvor postulierten Substraten, den Fettsäuren, kein Umsatz möglich war (Khatri *et al.* 2010b). Deswegen sollten nun Substrate gefunden werden, um eine erfolgreiche Umsetzung mit diesem System zu zeigen. Von den insgesamt 51 getesteten Verbindungen zeigte 4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin (004) einen nennenswerten und spezifischen Umsatz. Dies war sehr überraschend, da es sich bei dem von Ly untersuchten Familienmitglied CYP264B1 um eine potentielle Norisoprenoid- und Sesquiterpenhydroxylase handelt (Ly *et al.* 2012). Diese setzt α -Ionon (037), β -Ionon (038) und (+)-Nootkaton (025) selektiv um, wohingegen diese Verbindungen nicht von CYP264A1 akzeptiert werden. Trotz geringem biotechnologischen Interesse an dem identifizierten Substrat, 4-Methyl-3-Phenyl-Cumarin (004), und seinem später charakterisierten spezifischen Produkt, 4-Hydroxymethyl-3-Phenylcumarin, war diese Reaktion für die Arbeit von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Spezifität eignete sich diese CYP264A1 abhängige Reaktion hervorragend für die weitere Etablierung und Testung der Redoxsysteme für das Ganzzellsystem in *Escherichia coli*, da keine Nebenprodukte oder weiterführende Reaktionen auftreten. Dies bedeutet, anhand der Substratabnahme und Produktzunahme konnte man direkt die Aktivität des Biokatalysators bzw. des Ganzzellsystems erfassen.

4.2.3 CYP260 Familie

Die CYP260 Familie besteht aus zwei Vertretern: CYP260A1 und CYP260B1. Für CYP260A1 wurde schon erfolgreich das Substrat (025) gefunden und Umsätze mit den homologen Redoxsystemen durchgeführt (Ewen 2009, Ewen *et al.* 2009). Parallel dazu konnte aber gezeigt werden, dass das heterologe AdR/Adx₄₋₁₀₈ System effizienter funktioniert und neben dem (+)-Nootkaton die Steroide 11-Desoxycorticosteron (017) und Progesteron (020) umgesetzt werden können (Khatri 2009). Bei allen drei Substraten war aber bisher keine Charakte-

risierung der Produkte aufgrund fehlender Standards erfolgt. Aus diesem Grund sollte vor einer etwaigen Produktcharakterisierung zuerst das gesamte Substratspektrum erfasst und mit dem des anderen Vertreters der CYP260 Familie, dem CYP260B1, verglichen werden. Schwerpunkt hierbei waren Steroide und steroidale Verbindungen, wie Di- und Triterpene. Die Di- und Triterpene konnten von den Enzymen aber nicht umgesetzt werden, während es sich bei allen getesteten C21-Steroiden (Pregn-4-en-3,20-dion als Grundgerüst: Gestagene, Mineral- & Glucocorticoide) und C19-Steroiden (Androst-4-en-3-on als Grundgerüst: Androgene) um Substrate von CYP260A1 und B1 handelte. Für CYP260A1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch aromatische C18-Steroide (3-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien als Grundgerüst: Estrogene) als Substrate dienen können. All dies bestätigt die zuvor gehegte Vermutung, dass es sich bei dieser Familie um potentielle Steroidhydroxylasen handelt.

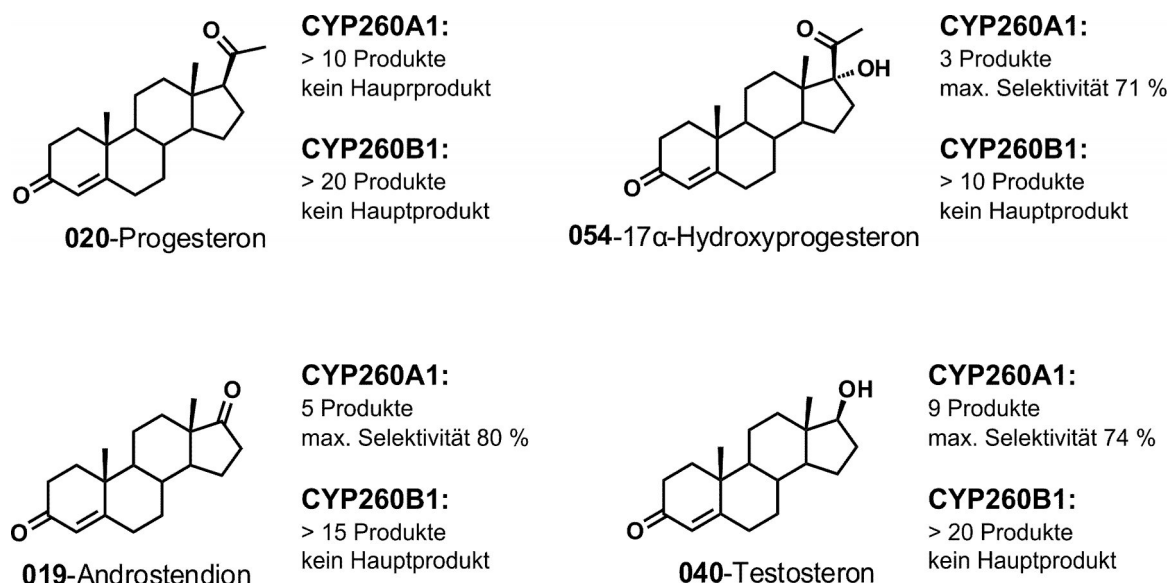


Abb. 4.1: Vergleich der Steroidumsätze der Vertreter der CYP260 Familie, CYP260A1 und CYP260B1.

Während aber für CYP260A1 die Selektivitäten der Umsätze bis auf Progesteron (020) sehr vielversprechend waren, war dies für CYP260B1 nicht der Fall. Für die näher betrachteten CYP260B1 abhängigen Umsätze mit Progesteron (020), 17 α -Hydroxy-progesteron (054), Androstendion (019) und Testosteron (040) konnten keine selektiven Reaktionen beobachtet werden (siehe Abb. 4.1 und Ergebnisse 3.3.3 Abb. 3.7). Hierbei kam es wahrscheinlich wie später bei der näheren Produktcharakterisierung der CYP260A1 abhängige Reaktion von Progesteron (020) gezeigt (siehe Ergebnisse 3.6.1.1 Abb. 3.20), zu einer unselektiven ersten O-

oxidation der Steroide, deren Produkte wiederum als Substrate fungieren und mehr oder weniger selektiv zu mehrfach oxidierten Produkten umgesetzt werden. Aus diesem Grund lag auch der Schwerpunkt dieser Arbeit im Folgenden auf CYP260A1, welches in Kapitel 4.4 näher diskutiert wird.

4.2.4 Verkürzung von CYP260A1 zu Δ CYP260A1

Bei den bioinformatischen Untersuchungen an CYP260A1 fiel eine Diskrepanz zwischen den veröffentlichten Sequenzen der Gene von CYP260A1 in der P450 Datenbank (<http://blast.uthsc.edu/blast.cgi>) und dem Eintrag für dieses Cytochrom in der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass einige Auswertungen aus der Genomsequenzierung von *Sorangium cellulosum* So ce56, unter anderem die Sequenz des CYP260A1 Gens, schon vor der Veröffentlichung des Genoms 2007 (Schneiker *et al.* 2007) vorlagen. Zur offiziellen Benennung dieses Gens, wurde das vorläufige Ergebnis 2006 an die P450-Datenbank gesendet, wodurch das Gen als neuartiges CYP260A1 klassifiziert und benannt wurde. Die übermittelte Gensequenz war aber 150 Basen (50 Codons) länger als das später ermittelte Gen in der NCBI-Datenbank. Daraus ergibt sich ein 50 Aminosäure kürzeres Protein bei Verwendung der neueren Daten, im Gegensatz zum in unserem Institut bisher verwendeten Gen, das dem der P450-Datenbankentsprach. Das kürzere Protein, welches von dem Gen der NCBI-Datenbank codiert wird, wurde der Einfachheit wegen in dieser Arbeit als Δ CYP260A1 bezeichnet. Bei Proteinsequenzvergleichen mittels Blast und Clustal W mit anderen P450 und CYP260B1 zeigte sich, dass es für die ersten 50 Aminosäuren des CYP260A1 keine Ähnlichkeiten zu anderen Cytochromen P450 gibt, auch nicht zu CYP260B1 (siehe Anhang 6.3.3). Für die bioinformatischen Untersuchungen hatte dies keine direkten Auswirkungen, da durch die Algorithmen die ersten 50 Aminosäuren nicht berücksichtigt werden. Bei CYP260A1 handelt es sich um ein aktives Cytochrom P450 welches bevorzugt Steroide umsetzen kann, es stellte sich aber zwangsläufig die Frage, wie sich die Verkürzung auf die Eigenschaften des Proteins auswirkt. Nach erfolgreicher Klonierung in einen Expressionsvektor konnte auch das Δ CYP260A1 exprimiert und gereinigt werden. Es handelte sich auch bei dieser kürzeren Version um ein aktives Cytochrom P450, welches den Umsatz von Steroiden katalysieren kann. Auch die Selektivitäten und Aktivitäten der Steroidumsätze von Progesteron (020), 17α -Hydroxyprogesteron (054), Androstendion (019) und Testosteron (040) hatten sich durch die Verkürzung nicht verändert, wodurch man davon

ausgehen kann, dass die 50 Aminosäuren bei CYP260A1 keinen Einfluss auf die Katalyse haben. Diese Erkenntnis war sehr entscheidend für die hier besprochenen Arbeiten, da die Ergebnisse bis auf einige Ganzzellkatalysen auf der Grundlage des CYP260A1 und nicht auf der des kürzeren Δ CYP260A1 erhalten wurden.

4.3 Entwicklung eines P450 abhängigen Ganzzellkatalysators in *Escherichia coli*

Enzyme als Biokatalysatoren einzusetzen, stellt die Wissenschaft vor verschiedene Herausforderungen (siehe Einleitung 1.1). Neben den allgemeinen Problemen bei der Anwendung wie Stabilität, Aktivität, Selektivität, Substratspezifität und Lösemitteltoleranz, stellt vor allem der Elektronentransfer bei Cytochrom P450 Systemen eine für Enzyme einzigartige Herausforderung dar. Nicht nur die Regeneration des teuren Cofaktors NADPH, sondern auch die langwierige und teure Reinigung der Redoxpartner ist von Bedeutung (siehe auch Einleitung 1.3). Um effiziente Biokatalysen mit diesen komplexen Systemen durchzuführen, ist die Entwicklung eines Ganzzellkatalysators notwendig, der alle Bestandteile des Cytochrom P450 Systems eigenständig in der Zelle produziert und Cofaktoren regeneriert. Auch im Falle der Erforschung des katalytischen Potentials der Cytochrome P450 ist die Etablierung eines Ganzzellsystems aus ökonomischer Sicht unausweichlich, weil zuvor die Umsätze und die nachfolgenden Produktcharakterisierungen mittels NMR mit großen Mengen an Proteinen bzw. Reinigungsschritten und dem Einsatz der teuren Cofaktoren, NADPH und Glucose-6-Phosphat, verbunden waren (Khatri *et al.* 2010a, Ly *et al.* 2012). Die Entwicklung eines solchen Ganzzellsystems beginnt mit der aufwendigen Klonierung der Expressionskonstrukte. Um ein auf die P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 breit anwendbares System zu entwickeln, war es notwendig, allgemein einsetzbare Redoxpartner in diese Expressionskonstrukte einzubauen, so dass nur noch das Cytochrom P450 ausgetauscht werden musste. Deswegen wurde das mitochondriale System bestehend aus AdR und Ad_{x4-108} gewählt, das die Aktivität aller verwendeten So ce56 P450s – mit Ausnahme von CYP266A1 - unterstützt. Als Organismus für das System wurde *Escherichia coli* gewählt, da es sich bei diesem Darmbakterium um eines der wenn nicht gar das am besten untersuchte Bakterium handelt. Weiterhin ist es leicht kultivierbar und molekularbiologisch manipulierbar. Außerdem sind eine Vielzahl von Expressionsvektoren oder Stämmen kommerziell erhältlich. Der größte Vorteil im Bereich der Ganzzellsysteme speziell hinsichtlich der Cytochrome P450 besteht darin, dass das Genom dieses Modellorganismus keine eigenen P450-Gene enthält, was somit die Möglichkeit von Konkurrenzreaktionen aufgrund eigener Cytochrome P450 in *Escherichia coli* ausschließt.

4.3.1 Einfluss des Mediums

Bei der Anwendung von Ganzzellsystemen für Biotransformationen ist zu beachten, dass man mit lebenden Organismen arbeitet, die weiterhin Stoffwechsel betreiben und somit ständig Einfluss auf ihre Umgebung und damit auch auf sich selbst nehmen. Erst kürzlich erschien für *Escherichia coli* ein Übersichtartikel, der den Metabolismus des am häufigsten verwendeten Bakteriums im Bereich der Biokatalyse näher beleuchtet (Martinez-Gomez *et al.* 2012). Die Zusammensetzung der Expressionsmedien wie die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wirken sich dabei direkt auf die Proteinexpression aber auch auf den Metabolismus aus. Um etwaige Störeffekte der zelleigenen Metabolite bei Biotransformationen zu umgehen, wird häufig mit sogenannten „ruhenden Zellen“ (nicht wachsend) gearbeitet. Dies bedeutet, die Zielproteine werden zuerst in einem geeigneten Medium exprimiert, danach werden die Zellen gewaschen und in einen Puffer überführt, in dem dann die eigentliche Biotransformation durchgeführt wird. Der Nachteil hierbei ist, dass es sich um ein mehrstufiges Batchverfahren handelt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst versucht, die Biokatalysen mit wachsenden Zellen im eigentlichen Expressionsmedium durchzuführen. Aus meiner Diplomarbeit war bekannt, dass hierbei eine Verunreinigung in den HPLC-Analysen beständig auftrat (Ringle 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um Indol handelt. Durch Kohlenstoffverarmung während der Expression können *Escherichia coli* Zellen alternativ zu Kohlenhydraten die Aminosäure Tryptophan aus dem Medium aufnehmen und durch die Tryptophanase zu Indol und Pyruvat abbauen. Letzteres tritt nach oxidativer Decarboxylierung in den Zitronensäurezyklus ein und ist für die Energiegewinnung verantwortlich, während Indol ausgeschieden wird (Botsford & DeMoss 1971, Martinez-Gomez *et al.* 2012). Bei den hier durchgeführten Biotransformationen führte dies aber zu einer kompetitiven Hemmung der Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56. Diese Störeffekte durch Hemmung der P450 und ihre Behebung werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1983 wurde gezeigt, dass bei rekombinanter Expression von Naphthalenoxidase in *Escherichia coli* das gebildete Indol durch die Oxidase zu Indoxyl oxidiert wird (Ensley *et al.* 1983), welches dann zu dem blauen Indigo bzw. seiner Isomerenform, dem rosafarbenen Indirubin, dimerisiert (Kim *et al.* 2003). Dasselbe Phänomen konnte auch für Säuger Cytochrome P450 der CYP2 Familie beobachtet werden (Gillam *et al.* 1999, Gillam & Guengerich 2001, Gillam *et al.* 2000). Auch durch Mutagenese des bakteriellen CYP102A1 (P450_{BM3}) konnte gezielt eine Indigoproduktion mit der Tripelmutante A74G/F87V/L188Q erreicht werden.

Bei den ersten Versuchen in dieser Arbeit, eine biokatalytische Umsetzung mit CYP109D1 durchzuführen, scheiterte diese an der blauen Farbstoffbildung, die in Konkurrenz zu der eigentlich geplanten Umsetzung von α -Ionon (037) stand. Die Ausbeuten an Indigo waren hierbei im Vergleich zu den oben besprochenen Cytochromen P450 eher gering. Dies lässt sich durch die geringe Affinität zu dem Substrat Indol erklären, welches während der zellfreien Substratidentifizierungen auch nicht von CYP109D1 umgesetzt werden konnte. Obwohl zunächst hinderlich, bietet der beobachtete Effekt jedoch auch neue, interessante Möglichkeiten. Denn CYP109D1 ist das erste nicht gentechnisch veränderte bakterielle P450, welches Indigo bildet. Es daher realistisch anzunehmen, dass es möglich ist, diese Reaktion durch Mutagenesen wie bei CYP102A1 weiter auszubauen, so dass es zu einem effizienteren Umsatz dieses biotechnologisch interessanten Substrates kommt.

Eine weitere, hochinteressante Applikation ist direkt im Bereich der molekularen Evolution vorstellbar: hier könnte die Indigobildung als colorimetrische Screeningmethode für Mutanten genutzt werden. So könnte zum Beispiel CYP109D1 in einen Prototyp eines menschlichen P450 Enzyms mit ähnlichem Substratspektrum wie der CYP2 Familie umgewandelt werden, was in ähnlicher Weise auch schon für CYP102A1 gezeigt wurde (Park *et al.* 2010).

Wie zuvor bereits erwähnt, war CYP109D1 das einzige der hier untersuchten P450s, bei dem im Ganzzellsystem eine Indigobildung festgestellt wurde. Dennoch stellte sich die Frage, ob Indol generell Auswirkungen auf P450 basierende Ganzzellsysteme haben könnte. Aus der Untersuchungen mit gereinigtem CYP109B1 aus *Bacillus subtilis* ist zum Beispiel schon bekannt, dass Indol Substratumsätze als klassischer kompetitiver Inhibitor negativ beeinflussen kann (Girhard *et al.* 2010). In dieser Arbeit konnte aber mit CYP264A1 erstmals gezeigt werden, dass dies auch bei der Anwendung von P450 abhängigen Ganzzellsystemen eine entscheidende Rolle bei der Biotransformation mit wachsenden Zellen spielt. Bei Verwendung des tryptophan-reichen Komplexmediums konnten nach 24 h nur ca. 12 μ M 4-Methyl-3-Phenylcumarin (6% Umsatz) durch CYP264A1 umgesetzt werden, während zum Beispiel bei Verwendung der „ruhenden Zellen“ in Puffern ein Umsatz von ca. 160 μ M (80%) beobachtet wurde.

Es wurden hier folglich mit den beiden P450 CYP109D1 und CYP264A1 zwei Beispiele aufgezeigt, bei denen P450 abhängige Biotransformationen nach Expression in einem tryptophan-reichen Komplexmedium nicht effizient ablaufen können, da durch das in *Escherichia coli* gebildete Indol die Reaktion kompetitiv gehemmt wird. Daher ist bei der Verwendung von *Escherichia coli* als Organismus für P450 Ganzzellsysteme deren mögliche Inhibition durch

Indol zu beachten. Eine Möglichkeit, diese Inhibition auszuschließen, ist natürlich die Verwendung von „ruhenden Zellen“. Im Falle der Indigobildung bringt dies aber keinen Vorteil, da das wasserunlösliche Indigo bei den Waschschritten zusammen mit den Zellen in den Puffer überführt wird und somit die spätere organische Aufarbeitung des Produktes stört. Jedoch sollte nach Möglichkeit eine einstufige Reaktionsführung etabliert werden. Daher wurde das Problem der Indol-Inhibition durch Optimierung des Nährmediums gelöst; zum Einsatz kam das M9CA-Medium. Hierbei handelt es sich um ein tryptophan-armes Medium, welches „Casaminoacids“ als Aminosäurequelle verwendet. Aufgrund seiner Herstellung durch saure Hydrolyse ist diese Aminosäuremischung frei von Tryptophan (Frank & Demoss 1957, Kyung-Hwan 2006). Durch das M9CA-Medium wurde somit kein Indol während der Expression gebildet und am Beispiel des CYP264A1 konnte gezeigt werden, dass die Biotransformationen sogar gegenüber der Verwendung von „ruhenden Zellen“ in Tris- bzw. Kaliumphosphatpuffer gesteigert werden konnten (siehe Ergebnisse 3.5.5 Abb. 3.17). Auch die Verwendung von autoinduzierenden Kohlenstoffquellen in Kombination mit diesem Medium ist möglich, wodurch die rekombinante Proteinexpression ohne Zugabe des Induktionsmoleküls IPTG gestartet wird. Dieser Punkt verdient besondere Beachtung, da die Autoinduktion bedeutet, dass die Reaktionsführung auch voll automatisiert betrieben werden kann z.B. durch einen Roboter, wodurch das etablierte System auch für Anwendungen im Bereich des „Hochdurchsatz-Screenings“ von Substraten bzw. P450s geeignet ist.

4.3.2 *E. coli* Reduktase als Alternative zur Adrenodoxinreduktase

Bei der Anwendung des mitochondrialen Systems AdR/Adx₄₋₁₀₈ (Klasse I) besteht das Problem, dass AdR in Säugern in der innermitochondrialen Zellmembran eingebunden ist (siehe Einleitung 1.3.1 Abb. 1.6). *Escherichia coli* besitzt aber keine Mitochondrien, was die rekombinante Expression und die damit zusammenhängende Faltung von AdR in dem Bakterium erschwert. 1993 wurde erstmals die Expression der AdR mit erfolgreicher Isolierung aus *Escherichia coli* beschrieben. Bis heute dient dieses Verfahren als Basis für alle Reinigungen des Proteins und liefert Ausbeuten von ca. 100 nmol/l (Sagara *et al.* 1993) bzw. 180 nmol bei Verwendung von Chaperonen zur Unterstützung der Proteinfaltung (Vornrhein *et al.* 1999). Dies sind aber für die biokatalytische Anwendung sehr geringe Ausbeuten. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass AdR durch andere Reduktasen ersetzt werden kann, wie durch die FprA von *M. tuberculosis* (Fischer *et al.* 2002), die Ferredoxinreduktase des Photosystems

von *Anabaena* (Faro *et al.* 2003), die Arh1 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Ewen *et al.* 2008) und auch durch die FdR_B von *Sorangium cellulosum* (Ewen *et al.* 2011). Da das Ganzzellsystem für *Escherichia coli* aufgebaut wurde, lag es nahe dessen Reduktase, Fpr, als Alternative für AdR in der Redoxkette zu untersuchen. Der Vorteil von Fpr ist offensichtlich: Es handelt sich um ein Protein, welches aus dem Darmbakterium stammt und in hohen Mengen rekombinant in diesem exprimiert werden kann, was die in dieser Arbeit erhaltenen Ausbeuten von ca. 2000 nmol/l belegen. Um die Elektronenübertragung von dieser Reduktase auf Adx₄₋₁₀₈ zu beweisen und mit AdR zu vergleichen, wurde ein Cytochrom c Assay durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Fpr das Adx₄₋₁₀₈ reduzieren kann, aber gegenüber AdR mit viel schlechteren kinetischen Parametern. Der K_M Wert war etwa 25-mal höher als bei AdR, was für eine sehr schlechte Affinität der Fpr für das Adrenodoxin spricht. Außerdem war die maximale Reduktionsrate um 60 % geringer bei Verwendung der Fpr (siehe Tab. 4.1). Wurden die Systeme aber nun mit einem Cytochrom P450 von *Sorangium cellulosum* So ce56 kombiniert, zeigte sich die Ausbildung des reduzierten Eisen-CO-Komplexes im Falle von CYP264A1 sowohl mit dem mitochondrialen System AdR/Adx₄₋₁₀₈ als auch mit dem Redoxsystem Fpr/Adx₄₋₁₀₈ mit ähnlicher Effizienz. Auch bei Zugabe eines Substrates konnten sowohl für den Verbrauch von NADPH als auch für die Kopplungseffizienz keine nennenswerten Unterschiede beobachtet werden (siehe Tab. 4.1). Die geringe Kopplungseffizienz bei beiden Systemen erklärt nun, warum trotz der viel schlechteren Elektronenübertragung von Fpr zu Adx₄₋₁₀₈, beide System AdR/Adx₄₋₁₀₈ und Fpr/Adx₄₋₁₀₈ mit CYP264A1 vergleichbare Umsatzraten zeigen. Das Adx₄₋₁₀₈ als heterologer Redoxpartner scheint nur sehr langsam und vor allem ineffizient das bakterielle P450 zu reduzieren. Hinzu kommt, dass 4-Methyl-3-Phenylcumarin als nicht natürliches Substrat die sogenannte Entkopplung auf Seiten des P450 noch verstärkt. Dies führt dazu, dass die großen kinetischen Unterschiede im Elektronentransfer der beiden Reduktasen auf Adx₄₋₁₀₈ keine Auswirkung auf die Gesamtreaktion haben, da die Reduktion des P450 bzw. die Oxidation des Substrates der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Anhand dieser Daten kann man schlussfolgern, dass die AdR sowohl bei Ganzzellumsätzen in *Escherichia coli* als auch in Umsätzen mit gereinigten Proteinen im Falle von heterolog zusammengesetzten Cytochrom P450 Systemen, durch Fpr ersetzt werden sollte, da sich ihre Expression und Reinigung um ein Vielfaches einfacher gestaltet und aufgrund der hohen Ausbeuten ökonomischer ist.

Tab. 4.1: Vergleich der für AdR und Fpr erhaltenen Parameter hinsichtlich der Expressionslevel und des Elektronentransfer auf Adx₄₋₁₀₈ in Kombination mit Cytochrom c und CYP264A1.

	AdR	Fpr
Expressionslevel in <i>E. coli</i> [nmol/l]	~ 100	~ 2000
Wechselwirkung mit Adx₄₋₁₀₈ Cytochrom c Assay		
K_M [μ M]	0,17 \pm 0,03	4,36 \pm 1,23
V_{max} [nmol/min]	36,0 \pm 1,7	12,8 \pm 0,9
Wechselwirkung mit CYP264A1 Eisen-CO-Komplex *		
[%]	97,5 \pm 1,7	96,4 \pm 2,3
NADPH Verbrauch [nmol/min]	13,2 \pm 1,7	11,9 \pm 0,9
Kopplungseffizienz [%]	17,2 \pm 0,7	11,4 \pm 0,6

* Daten verglichen mit der maximalen Reduktion von CYP264A1 durch Natriumdithionit

Es stellte sich nun die Frage, wie sich die beiden Systeme im Ganzzellsystem in *Escherichia coli* verhalten, da hier wegen der besseren Expressionsrate auch das System mit der Fpr deutlich besser sein müsste. Tatsächlich konnte eine Steigerung des CYP264A1 abhängigen Umsatzes durch den Ersatz der AdR durch Fpr gezeigt werden. Hierbei besaß das Fpr unterstützte System eine um 52% höhere Anfangsgeschwindigkeit, welche gleichzeitig der maximalen Umsatzrate entsprach (siehe Tab. 4.2). Die mittlere Zeitausbeute war sogar zweimal so hoch, wodurch die eingesetzte Menge an Substrat in der Hälfte der Zeit umgesetzt wurde (siehe Ergebnisse 3.5.3 Abb. 3.13). Noch deutlicher war dies der Fall bei der Verwendung des CYP260A1 mit Testosteron als Substrat. Die maximale Geschwindigkeit wurde hier bei beiden Systemen erst eine Stunde nach Substratzugabe erreicht, wobei das Fpr-unterstützte System um den Faktor 2,2 schneller war. Dies führte dazu, dass nach dem Abbruch des Experimentes (24 h) im Falle des AdR unterstützten Systems das Substrat nicht vollständig verbraucht war (siehe Ergebnisse 3.7.1 Abb. 3.43). Das System mit der Fpr hingegen setzte fast das gesamte Substrat um, wodurch es zu einer Substratverarmung kam, was sich in der geringen Umsatzrate von 2,4 mg/l·h widerspiegelt. Es konnte also für beide Cytochrome P450, CYP264A1 und CYP260A1, gezeigt werden, dass das Fpr/Adx₁₋₁₀₈ Redoxsystem erwartungsgemäß besser im *Escherichia coli* Ganzzellsystem funktioniert als das AdR/ Adx₁₋₁₀₈ Redoxsystem.

Tab. 4.2: Maximale und mittlere Geschwindigkeiten bzw. Raumzeitausbeuten der Fpr und AdR Systeme im Vergleich für CYP264A1 und CYP260A1 aus *S. cellulosum*, sowie für CYP106A2 aus *B. megaterium*

	Umsatzrate bzw. Raumzeitausbeute [mg/l·h]	
	maximale	mittlere
CYP264A1		
AdR	9,1	1,9
Fpr	13,9	3,8
CYP260A1		
AdR	1,9 *	1,5
Fpr	4,2 *	2,4
CYP106A2		
AdR	5,9	1,3
Fpr	7,9	1,8

* die maximale Geschwindigkeit wurde nicht am Anfang sondern erst nach 1 h erreicht

Um nun zu zeigen, dass diese Umsatzsteigerung nicht nur für die in dieser Arbeit behandelten So ce56 Cytochrome P450 funktioniert, sondern auch für andere bakterielle P450-Biokatalysen, wurde das gleiche System mit der 15 β -Steroidhydroxylase CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368 aufgebaut. Auch hier konnten Steigerungen der Umsatzraten durch den Ersatz der AdR durch Fpr erreicht werden. Die maximale Umsatzrate war mit Fpr um 33% höher als die mit AdR und die mittleren Umsatzraten sogar um 38%. Diese Beobachtung bestätigte endgültig die Vermutung, dass durch die höhere Expression der Fpr in *Escherichia coli* diese der natürlicherweise membranständigen AdR im Redoxsystem mit Adx₄₋₁₀₈ vorzuziehen ist. Was dieses neuartige und effizientere System nun allgemein für die Anwendung von Cytochrom P450 Ganzzellkatalysatoren bedeutet wird im Folgenden näher ausgeführt.

4.3.3 Bedeutung der etablierten Systeme für die Anwendung

Durch die Verwendung des speziellen Minimalmediums, der Möglichkeit der Autoinduktion und durch den Austausch der AdR durch die *E. coli* eigenen Fpr wurde ein leicht zu handhabendes System für die Erforschung der Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 etabliert, mit dem es möglich war, mehrere Produkte für CYP260A1 zu isolieren, um sie der Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie zuzuführen (siehe 4.4). Gerade der Gebrauch des C-terminal verkürzten Adrenodoxin, Adx₄₋₁₀₈ macht dieses System so universell einsetz-

bar. Alle bisher untersuchten Cytochrome P450 des *Sorangium* Genoms, ausgenommen CYP266A1, konnten dieses heterologe Ferredoxin als Redoxpartner nutzen, wobei die Effizienz noch über der natürlichen Redoxpartner lag. Dies bedeutet neben den hier besprochenen vier P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56, CYP109D1, CYP260A1, CYP260B1 und CYP264A1, können auch mit CYP264B1 (Ly *et al.* 2012) und CYP267B1 (Ziska 2011) ähnliche Systeme aufgebaut werden. Die Anwendung der in dieser Arbeit etablierten Systeme ist aber keineswegs nur auf Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 beschränkt, sondern kann auch auf andere bakterielle P450 übertragen werden, die Adx₄₋₁₀₈ als Elektronendonator akzeptieren, wie am Beispiel des CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* demonstriert. Denkbar ist aber auch die Anwendung des Systems bei mitochondrialen Cytochromen P450, den natürlichen Elektronenakzeptoren des Adrenodoxins, oder bei mikrosomalen P450, die ebenfalls durch Adrenodoxin reduziert werden können. Diese breite und universelle Anwendung von Adrenodoxin wurde auch kürzlich in einem Review publiziert (Ewen *et al.* 2012). Eine Auswahl möglicher Anwendungen für die Biokatalyse in Zusammenhang mit biotechnologisch interessanten Substratklassen ist in Tab. 4.3 gezeigt.

Erstaunlicherweise wurde seit der Entdeckung der höheren Reduktionsrate von Adx₄₋₁₀₈ bei CYP11B1 aus *Bos taurus* gegenüber der unverkürzten Adx-Form 1994 (Uhlmann *et al.* 1994) und der Möglichkeit Adx₄₋₁₀₈ auf bakterielle P450 anzuwenden (Lisurek *et al.* 2004), das AdR/Adx₄₋₁₀₈ System bislang nur in der Forschungsgruppe von Prof. Bernhardt als universelles Redoxsystem eingesetzt. Der Grund hierfür könnte die geringe Expression und schwierige Reinigung der membranständigen AdR sein. Demnach bietet das nun etablierte System mit der Fpr an Stelle der AdR auch eine hervorragende Möglichkeit, die universellen Anwendungsmöglichkeiten von Adx₄₋₁₀₈ im Bereich der Biokatalyse einem breiteren Publikum zugänglich zu machen, da hiermit langwierige Identifikationen geeigneter Redoxpartner überflüssig werden.

Tab. 4.3: Übersicht über die biokatalytischen Anwendungsmöglichkeiten des etablierten Ganzzellsystems auf mitochondriale, bakterielle and mikrosomale Cytochrome P450 mit den Literaturstellen, welche die Anwendung von Adx bzw. Adx₄₋₁₀₈ im Zusammenhang mit biotechnologisch interessanten Substratklassen und Substraten beschreiben.

P450	Substratklasse	Substrat	Referenz
mitochondriale Systeme; Klasse I			
CYP11A1	Sterole	Cholesterol	(Uhlmann <i>et al.</i> 1994)
CYP11B1	Glucocorticoide	11-Deoxycortisol	(Uhlmann <i>et al.</i> 1994)
CYP11B2	Mineralcorticoide	11-Deoxycorticosteron	(Cao <i>et al.</i> 2000)
CYP12A1	Steroide	Progesteron Testosteron	(Guzov <i>et al.</i> 1998)
CYP24A1	Sterole	Dihydroxyvitamin D3	(Sakaki <i>et al.</i> 2005)
CYP27A1	Sterole	Cholesterol Vitamin D3	(Salamanca-Pinzón & Guengerich 2011)
CYP27B1	Sterole	Hydroxyvitamin D3	(Schuster 2011)
bakterielle Systeme; Klasse I			
CYP106A2	Steroide	verschiedene	(Virus <i>et al.</i> 2006)
	Diterpensäuren	Abietinsäure	(Bleif <i>et al.</i> 2011)
	Triterpene	Dipterocarpol	(Schmitz <i>et al.</i> 2012)
	Triterpensäuren	11-Ketoboswelliasäure	(Bleif <i>et al.</i> 2012)
CYP109B1	Steroide	Testosteron	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
	primäre Alkohole	verschiedene	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
	Fettsäuren	verschiedene	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
	Norisoprenoide	α - & β -Ionon	(Girhard <i>et al.</i> 2010)
CYP109D1	Sesquiterpene	Valencen	(Girhard <i>et al.</i> 2009)
	Fettsäuren	verschiedene	(Khatri <i>et al.</i> 2010b)
CYP260A1	Norisoprenoide	α - & β -Ionon	(Khatri <i>et al.</i> 2010a)
	Sesquiterpene	Nootkaton	(Ewen <i>et al.</i> 2009)
CYP264B1	Sterole	verschiedene	diese Arbeit
	Norisoprenoide	α - & β -Ionon	(Ly <i>et al.</i> 2012)
CYP267B1	Sesquiterpene	Nootkaton	(Ly <i>et al.</i> 2012)
	Sterole	verschiedene	(Ziska 2011)
mikrosomale Systeme; Klasse II			
CYP2E1	Aromaten	Benzol p-Nitrophenol	(Robin <i>et al.</i> 2001)
	Nitrosamine	Dimethylnitrosamine	(Robin <i>et al.</i> 2001)
CYP17	Steroide	Progesteron	(Pechurskaya <i>et al.</i> 2007)
CYP21	Steroide	Progesteron	(Pechurskaya <i>et al.</i> 2007)
CYP46A1	Sterole	Cholesterolsulfat	(Liao <i>et al.</i> 2009)

4.4 CYP260A1 als Steroidhydroxylase

Von allen in dieser Arbeit untersuchten Cytochromen P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56, ist CYP260A1 wegen seines Potentials, als Steroidhydroxylase zu fungieren, am interessantesten als Biokatalysator. Deshalb sollte dieses P450 genauer studiert werden und mit Hilfe des optimierten Ganzzellsystems die Position der Hydroxylierung bestimmt werden. Außerdem sollte der Einfluss verschiedener Steroidssubstrate hinsichtlich der Aktivität und Selektivität der CYP260A1 Biotransformationen näher betrachtet werden, um weitere Rückschlüsse auf das Potential dieses neuen Biokatalysators zu erhalten. Die erhaltenen Daten wurden dann in einem zweiten Schritt durch ein Homologiemodell und Dockingexperimente erweitert, um so eine gute Vorstellung über das aktive Zentrum dieser Steroidhydroxylase zu erhalten. Hierbei stellte sich heraus, dass CYP260A1 eine bislang nicht beschriebene 1α -Hydroxylierung an den meisten Steroiden selektiv durchführt. Die einzigartigen Möglichkeiten, die sich daraus ergeben, werden im letzten Abschnitt in diesem Kapitel noch näher erläutert.

4.4.1 Einfluss von funktionellen Gruppen auf Aktivität und Selektivität

Nach erfolgreicher Identifizierung von Substraten für CYP260A1 *in vitro* (siehe 4.2.3), wurden die Produktmuster verschiedener Steroide aus der Klasse der C21-Steroide (Pregn-4-en-3,20-dion als Grundgerüst) und C19-Steroide (Androst-4-en-3-on als Grundgerüst) einer näheren Charakterisierung durch LC-MS Analyse unterzogen, um den Einfluss von verschiedenen, funktionellen Gruppen am Steroidgerüst (siehe Abb. 4.2) auf die CYP260A1 abhängige Katalyse zu untersuchen.

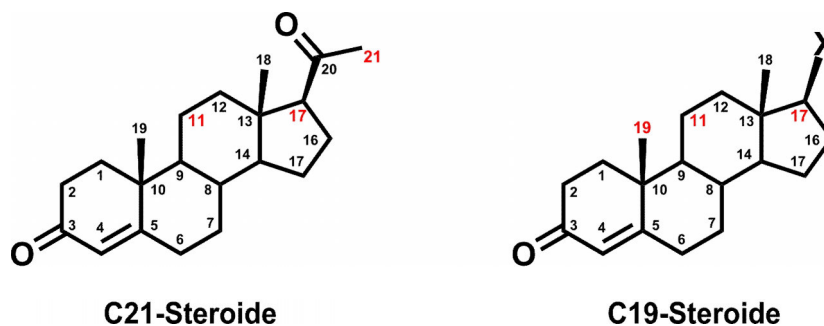


Abb. 4.2: Strukturformeln von C21- und C19-Steroiden mit Nummerierung der C-Atome. Die Positionen der in dem Kapitel besprochenen, funktionellen Gruppen sind in rot gekennzeichnet.

Wie zuvor schon erwähnt, modifiziert CYP260A1 das Substrat Progesteron mehrfach und unselektiv an verschiedenen Positionen. Im Gegensatz dazu wird das Substrat 11-Desoxycorticosteron (das im Vergleich zu Progesteron nur eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Position C21 besitzt, regioselektiv zu 1α -Hydroxydesoxycorticosteron umgesetzt. Ein entsprechender Effekt einer Hydroxylgruppe auf die Selektivität wurde auch für das Substrat 17α -Hydroxyprogesteron beobachtet (siehe auch 4.2.3), wobei die Hydroxylierung nicht auf die 1α -Position beschränkt war, sondern noch andere hydroxylierte Produkte neben dem Hauptprodukt gefunden wurden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Hydroxylgruppe beim 17α -Hydroxyprogesteron direkt an das starre, zyklische Steroidgerüst gebunden und somit nicht nur das 1α -H-Atom des Steroids nahe dem Häm des Enzyms positioniert ist. Demnach führt die 17α -Hydroxylgruppe zwar zu einer Selektivitätssteigerung im Vergleich zu Progesteron, kann aber im Gegensatz zur frei drehbaren 21-Hydroxylgruppe keine Regiospezifität bewirken. Darüber hinaus ist auch die Aktivität bei 17α -Hydroxyprogesteron geringer (siehe Abb. 4.3). Bei Verwendung von 11-Desoxycortisol als Substrat, das sowohl an C17 als auch an C21 Hydroxylgruppen aufweist, wurden sowohl die regiospezifische Hydroxylierung wie bei 11-Desoxycorticosteron, als auch die geringere Aktivität wie bei 17α -Hydroxyprogesteron festgestellt. Wurden die Mineral- und Glucocorticoide Corticosteron und Cortisol, die gegenüber den anderen Substraten noch eine 11β -Hydroxylgruppe besitzen, durch CYP260A1 umgesetzt, wurde ein massiver Einbruch der Aktivität beobachtet. Es bleibt also festzuhalten, dass Steroide mit 11β -Hydroxylierung sehr schlecht als Substrate für CYP260A1 fungieren. Wenn aber statt der axial stehenden Hydroxylfunktion eine äquatorial angeordnete Ketogruppe am C11-Atom sitzt wie bei Cortison, hatte diese sogar einen positiven Einfluss sowohl auf die Aktivität als auch die Selektivität. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu sehen, wie sich eine 11α -Hydroxylierung auswirken würde, da diese ebenfalls äquatorial angeordnet ist. Diese Verbindungen waren aber, da sie nicht kommerziell erhältlich sind, für diese Arbeit nicht zugänglich.

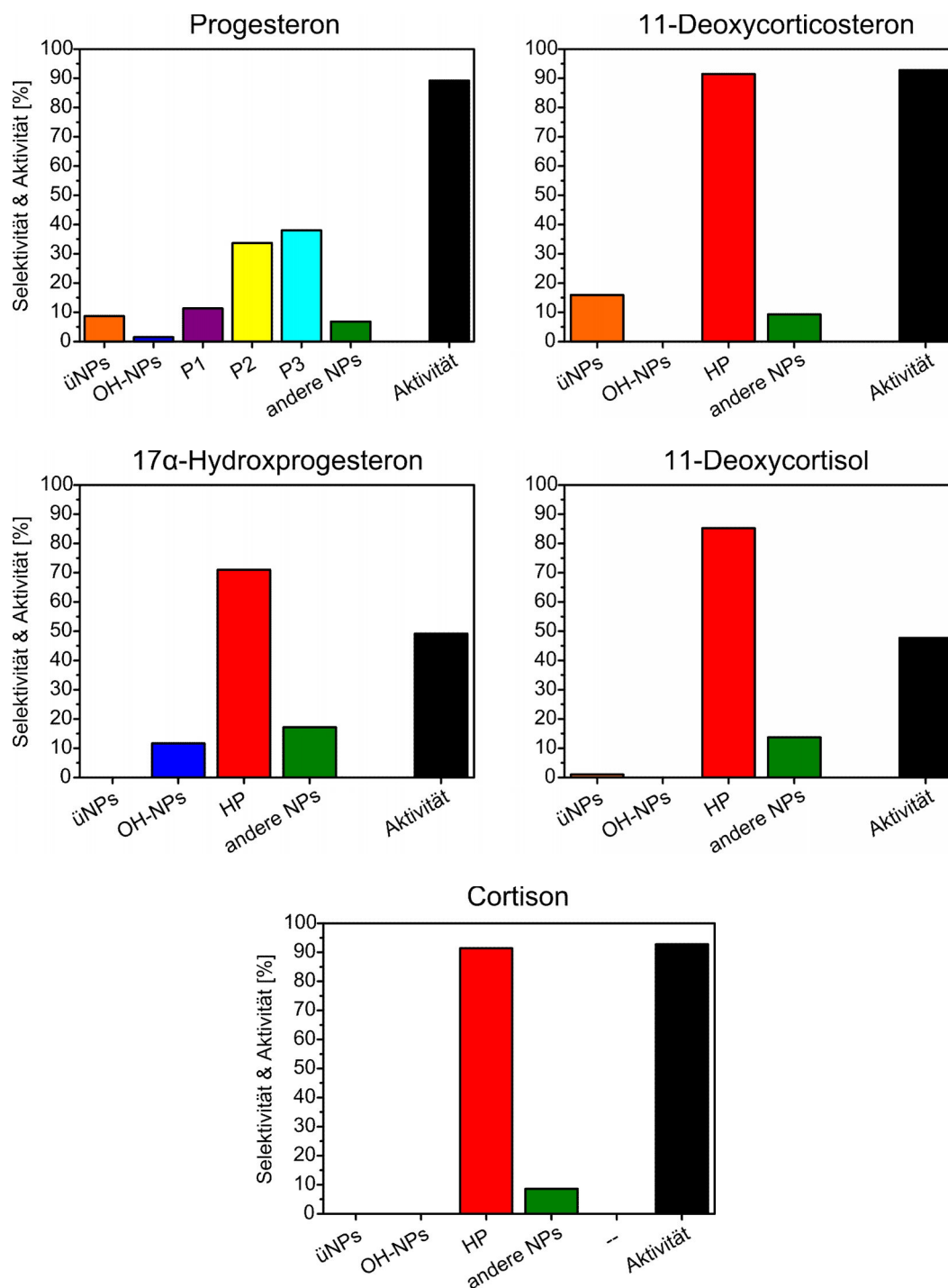
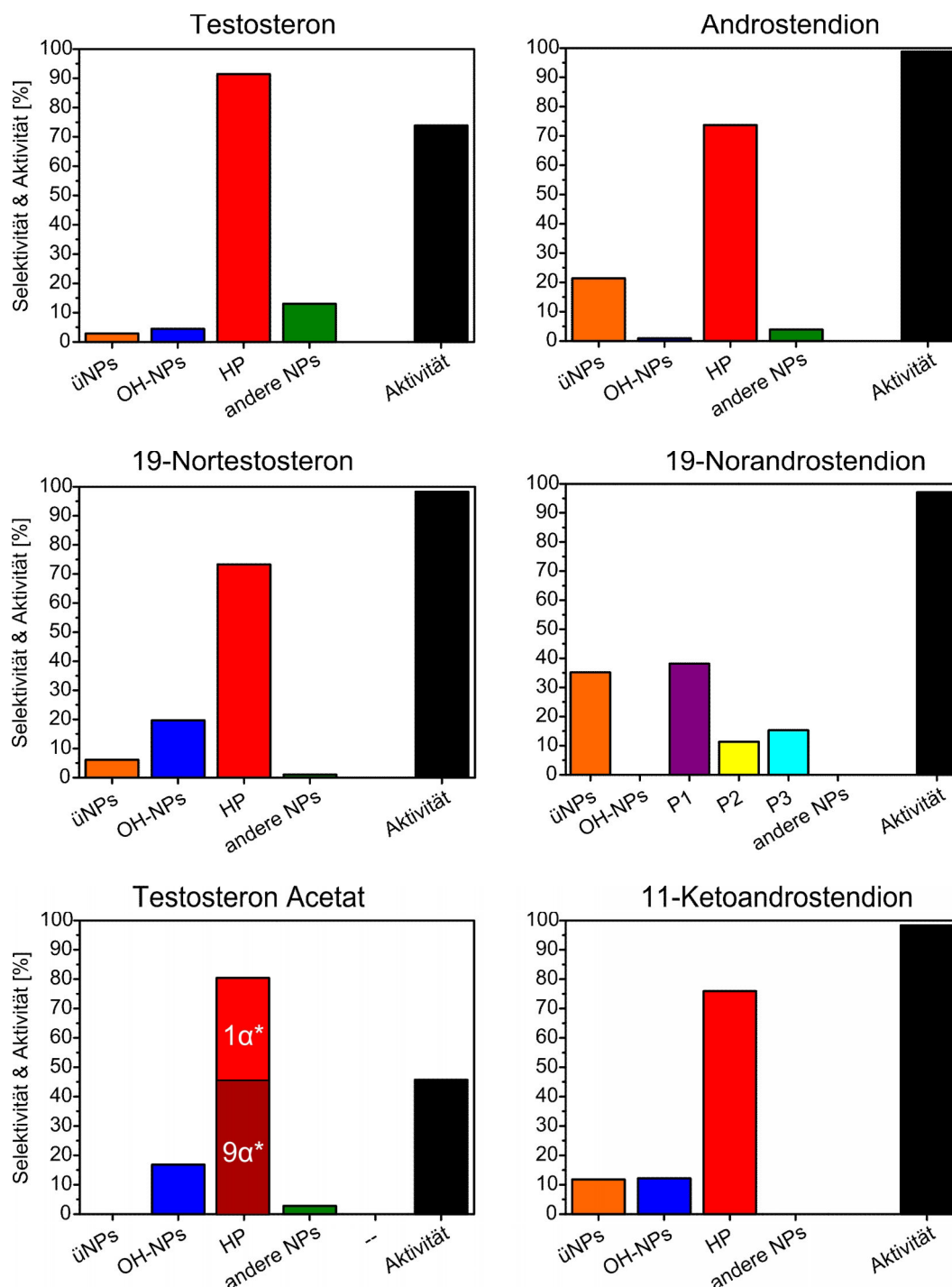


Abb. 4.3: Übersicht über die Selektivitäten und die Aktivitäten (schwarze Balken) der CYP260A1 abhängigen Reaktionen mit den C21-Steroiden, Progesteron (020), 11-Deoxycorticosteron (017), 17 α -Hydroxyprogesteron (054), 11-Deoxycortisol (053) und Cortison (016). Das Hauptprodukt (HP) ist als roter Balken dargestellt. Bei der unselektiven Umsetzung von Progesteron sind die einzelnen hydroxylierten Produkte P1-P3 in lila, gelb und cyanblau dargestellt. Die überhydroxylierten (orange, üNPs) sowie die hydroxylierten (blau; OH-NPs) und anderweitig oxidierten (grün) Nebenprodukte (NPs) sind in je einem Balken zusammengefasst.

Im Gegensatz zu den C21-Steroiden wurden bei Verwendung von C19-Steroiden als Substrate für CYP260A1 keine Einbußen hinsichtlich der Aktivität beobachtet. Die enzymatische Aktivität nach 1 h und bei 200 μ M eingesetztem Substrat lag bei allen Vertretern dieser Gruppe bei über 70%. Bei Testosteron konnte das 1α -hydroxylierte Hauptprodukt mit einer Selektivität von 80% erhalten werden, wobei diese Reaktion auch sehr regioselektiv ablief, da andere hydroxylierte Produkte nur gering gebildet wurden. Dies bedeutet, dass hier die Funktionalisierung am D-Ring im Gegensatz zu den C21-Steroiden keinen großen Einfluss auf die Katalyse von CYP260A1 hat. Bei Verwendung der Norderivate dieser Verbindungen war dies jedoch interessanterweise nicht der Fall. Durch das Fehlen der 19-Methylgruppe am C10-Atom sank die Regioselektivität der Hydroxylierungen. Bei 19-Nortestosteron entstanden mehr hydroxylierte Seitenprodukte als beim Testosteron, wobei die Selektivität des Hauptproduktes mit 73% aber immer noch sehr hoch war. Im Falle des 19-Norandrostendion hingegen sank die Regioselektivität der Hydroxylierung gegenüber dem regioselektiv hydroxylierten Androstendion beträchtlich, was auch an der hohen Überoxidierung des Produktes P1 liegen könnte, da eine hohe Aktivität vorlag. Festzuhalten bleibt, dass durch das Fehlen der C19-Methylgruppe das Steroidgerüst gegenüber den klassischen C19-Steroiden sterisch weniger behindert ist und sich in verschiedenen Positionen im aktiven Zentrum anordnen kann, wodurch mehrere Hydroxylierungspositionen möglich sind. Eine Ketofunktion am C11-Atom beeinflusste ebenfalls nur die Regioselektivität der CYP260A1 abhängigen Hydroxylierung, wie am Beispiel des 11-Ketoandrostendion gezeigt werden konnte.

Eine Ausnahme als Substrat bildet das Testosteron-Acetat, welches im Hinblick auf weitere chemische Derivatisierungen, wie sie später in Kapitel 4.4.3 diskutiert werden, interessant ist, da die im Substrat vorhandene Hydroxylfunktion durch ein Acetat geschützt ist. Strukturell handelt es sich aber deshalb nicht um ein C19-Steroid im üblichen Sinne, da es eher dem Progesteron ähnelt. Eine Verwendung dieses Substrates bewirkte eine Abnahme der Aktivität von CYP260A1 auf ca. 45% und führte auch zu einer geringeren Selektivität. In den LC-MS Analysen (siehe Ergebnisse 3.6.1.2 Abb. 3.33) konnte zwar nur ein Peak als Hauptprodukt identifiziert werden. Nach Isolation stellte sich aber heraus, dass es sich bei dem Peak um die zwei, chromatographisch nicht getrennten, Produkte 1α - und 9α -Hydroxytestosteron-Acetat handelt.



* Werte aus NMR-Charakterisierung: Hauptpeak enthielt 1α und 9α OH-Produkt

Abb. 4.4: Übersicht über die Selektivitäten und die Aktivität bzw. Substratumsatz (schwarze Balken) der CYP260A1 abhängigen Reaktionen mit den C19-Steroiden, Testosteron (040), Androstendion (019), 19-Nortestosteron (057), 19-Norandrostendion (050), Testosteron-Acetat (067) und 11-Ketoandrostendion (061). Das Hauptprodukt (HP) ist als roter Balken dargestellt. Bei der unselektiven Umsetzung von 19-Norandrostendion sind die einzelnen Selektivitäten der hydroxylierten Produkte P1-P3 in lila, gelb und cyanblau dargestellt. Die Selektivitäten der überhydroxylierten (orange, üNPs) sowie die hydroxylierten (blau; OH-NPs) und anderweitig oxidierten (grün) Nebenprodukte (NPs) sind in einem Balken zusammengefasst.

Sowohl bei den C21- als auch bei den C19-Steroiden war, wie schon erwähnt, die CYP260A1 abhängige Hauptreaktion (sofern ein Hauptprodukt isoliert werden konnte) eine 1α -Hydroxylierung der jeweiligen Steroide. Ausnahmen bildeten hierbei nur Testosteron-Acetat mit seiner zusätzlichen Präferenz zur 9α -Hydroxylierung und das im folgenden Kapitel näher behandelte 19-Nortestosteron, dessen Hauptprodukt keine 1α -Hydroxylierung aufwies. Man kann also sagen, dass es sich bei CYP260A1 um eine überwiegend sehr selektive 1α -Steroidhydroxylase handelt. Neben den im ersten Oxidationsschritt entstandenen 1α -Hydroxyprodukten wurden meist auch Analyte mit einer Massendifferenz von -2 zum Substrat gefunden (siehe Ergebnisse 3.6.1 und grüne Balken in Abb. 4.3 & Abb. 4.4). Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um P450-unabhängiges Folgeprodukte der Hauptprodukte, die durch Wasserabspaltung entstehen und eine neue Doppelbindung enthalten. Dies erscheint insbesondere plausibel, wenn man die Lage der neu eingeführten 1α -Hydroxylfunktion betrachtet. Durch eine Wasserabspaltung entsteht eine weitere Delokalisierung von π -Elektronen im A-Ring, was die Triebkraft dieser Nebenreaktion ausmacht (siehe Abb. 4.5). Der experimentelle Beweis dieser Hypothese steht jedoch noch aus, da eine genauere Charakterisierung der Folgeprodukte aufgrund der geringen Mengen hier nicht möglich war.

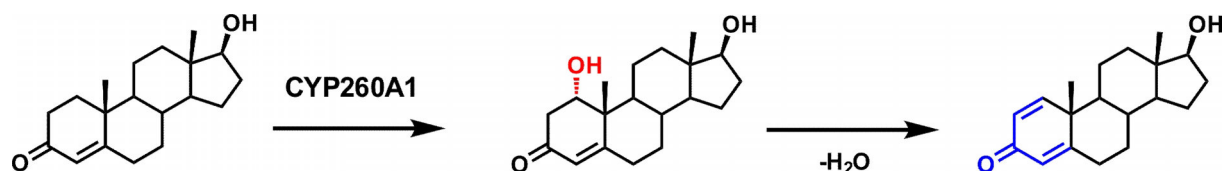


Abb. 4.5: Postulierter Hauptreaktionsweg der CYP260A1 katalysierten Steroidumsätze am Beispiel von Testosteron. CYP260A1 abhängige 1α -Hydroxylierung ist in rot (neue OH-Funktion in rot) dargestellt und das delokalisierte π -System des durch Wasserabspaltung entstandenen Nebenprodukts in blau.

4.4.2 Bindung der Steroide und resultierende Hydroxylierungsposition

Nachdem nun der Einfluss der Substrate auf die Aktivität, die Selektivität und die Art der CYP260A1 katalysierten Reaktionen geklärt war, stellte sich die Frage, wie es zu der 1α -Hydroxylierung der Steroide kommt, also wie die Steroide im aktiven Zentrum binden. Da momentan keine Kristallstrukturen für die Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 bekannt sind, konnte dies im Falle von CYP260A1 nur empirisch, unterstützt von bioinformatischer Methoden, geschehen. Kristallstrukturen sind aber bisher im Bereich der mikrobiellen Steroidhydroxylasen für kein Cytochrom P450 bekannt, da man häufig nur mit den Mikroorganismen selbst ohne Identifizierung des eigentlichen Enzyms arbeitet. Man stützt sich deshalb auf empirisch ermittelte Vorstellungen, wie die Steroide in den Hydroxylasen binden. Hierbei geht man davon aus, dass es in einer Steroidhydroxylase insgesamt 4 mögliche Orientierungen der Substrate zwischen 2 Bindestellen gibt, eine „normale“, die axial um 180° gedrehte „reverse“ und ihre um 180° äquatorial invertierte Analoge, „normal invertiert“ und „reverse invertiert“ (siehe Abb. 4.6) (Donova & Egorova 2012, Holland 1999, Jones 1973). Bei den Dockingexperimenten für Testosteron mit dem Homologiemodell für CYP260A1, basierend auf der Kristallstruktur von CYP107E1, orientierte sich Testosteron parallel über dem Häm in 2 möglichen Orientierungen. Die beste Dockingposition I entsprach dabei der empirischen Vorstellung einer „reversen“ Bindung zwischen den Serinen S225 und S276, wobei das 1α -H-Atom so nahe an dem Hämeisen liegt, dass eine Hydroxylierung möglich ist. Die Dockingposition II entsprach einer „normalen“ Bindung von Testosteron, bei der das 7α -H-Atom nahe dem Häm liegt. Ein 7α -Hydroxytestosteron konnte aber während der Produktcharakterisierungen nicht nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass S225 während der Katalyse die Ketogruppe am C3-Atom und die S276 die Hydroxylgruppe am C17-Atom bindet, so dass eher eine „reverse“ Bindung als eine „normale“ Bindung resultiert. Die überwiegend 1α -hydroxylierten Produkte der Steroide untermauern diese These einer „reversen“ Bindung zwischen S225 und S276.

Auch das steroidähnliche Sesquiterpen Nootkaton scheint am S225 zu binden, da es an derselben Position wie die Steroide hydroxyliert wird, obwohl es nur einen A- Ring und einen B-Ring besitzt. Sehr interessant waren auch die Dockingexperiment mit Dehydroepiandrosteron, welches im Gegensatz zu Testosteron eine andere Anordnung der Funktionalitäten, nämlich eine Hydroxylgruppe am C3-Atom und eine C17-Ketogruppe am D-Ring zeigt. Hier änderte sich zwar nicht die Regel, dass S225 die Ketogruppe und S276 die Hydroxylgruppe bevor-

zugt, aber es handelte sich somit um eine „normale“ Bindung des Dehydroepiandrosteron. Tatsächlich konnte auch experimentell bei diesem Substrat das 7 α -Hydroxydehydroepiandrosteron als Hauptprodukt charakterisiert werden.

19-Nortestosteron bildet die einzige Ausnahme, bei der weder eine 1 α - noch eine 7 α -Hydroxylierung beobachtet wurde. Hier konnte nur das dihydroxylierte Produkt 6 β ,10 β -Dihydroxynortestosteron isoliert werden. Aber sowohl eine 6 β - als auch eine 10 β -Hydroxylierung sind durch eine „normale“ bzw. „reverse“ Bindung zwischen S225 und S276 nicht zu erklären. Bedeutet dies, dass hier andere Bindestellen beteiligt sind? Durch das Fehlen der Methylgruppe am C10-Atom kann das Steroid anscheinend die „invertierten“ Bindungen eingehen, die durch die Methylgruppe bei den anderen Steroiden nicht möglich sind. Hierbei würde sich eine Positionierung des Substrates in der Bindetasche ergeben, bei der genau die 6 β - und die 10 β -H-Atome auf das Häm zeigen. Somit kann auch im Falle des 19-Nortestosterons das in dieser Arbeit erstellte Modell des CYP260A1 die in der Praxis beobachteten Reaktionsprodukte erklären.

Zusammenfassen lässt sich also sagen, dass mit der hier verwendeten Kombination von experimentellen und bioinformatischen Methoden überzeugend dargestellt werden kann, wie die Steroide im aktiven Zentrum angeordnet sein müssen, damit die beobachteten Hauptprodukte entstehen. Anhand des Homologiemodells kann darüber hinaus abgeleitet werden, dass S225 und S276 die beiden postulierten Substraterkennungsstellen sind. Sie sitzen in der SRS4 und SRS5, die aufgrund ihrer nahen Lage von strukturell konservierten Regionen in allen in dieser Arbeit erstellten Homologiemodellen als Substraterkennungsstellen identifiziert wurden. Um den Einfluss genau dieser Aminosäurereste zu verifizieren, wäre es interessant, an diesen Positionen in CYP260A1 Mutationen einzuführen. Tatsächlich wird dies momentan im Rahmen der Diplomarbeit von Irina Ionescu untersucht. Außerdem könnte man auch für die anderen Substraterkennungsstellen (siehe Ergebnisse Abb. 3.42) Mutationen durchführen, um einen noch genaueren Einblick in den Aufbau des aktiven Zentrums von CYP260A1 zu erhalten.

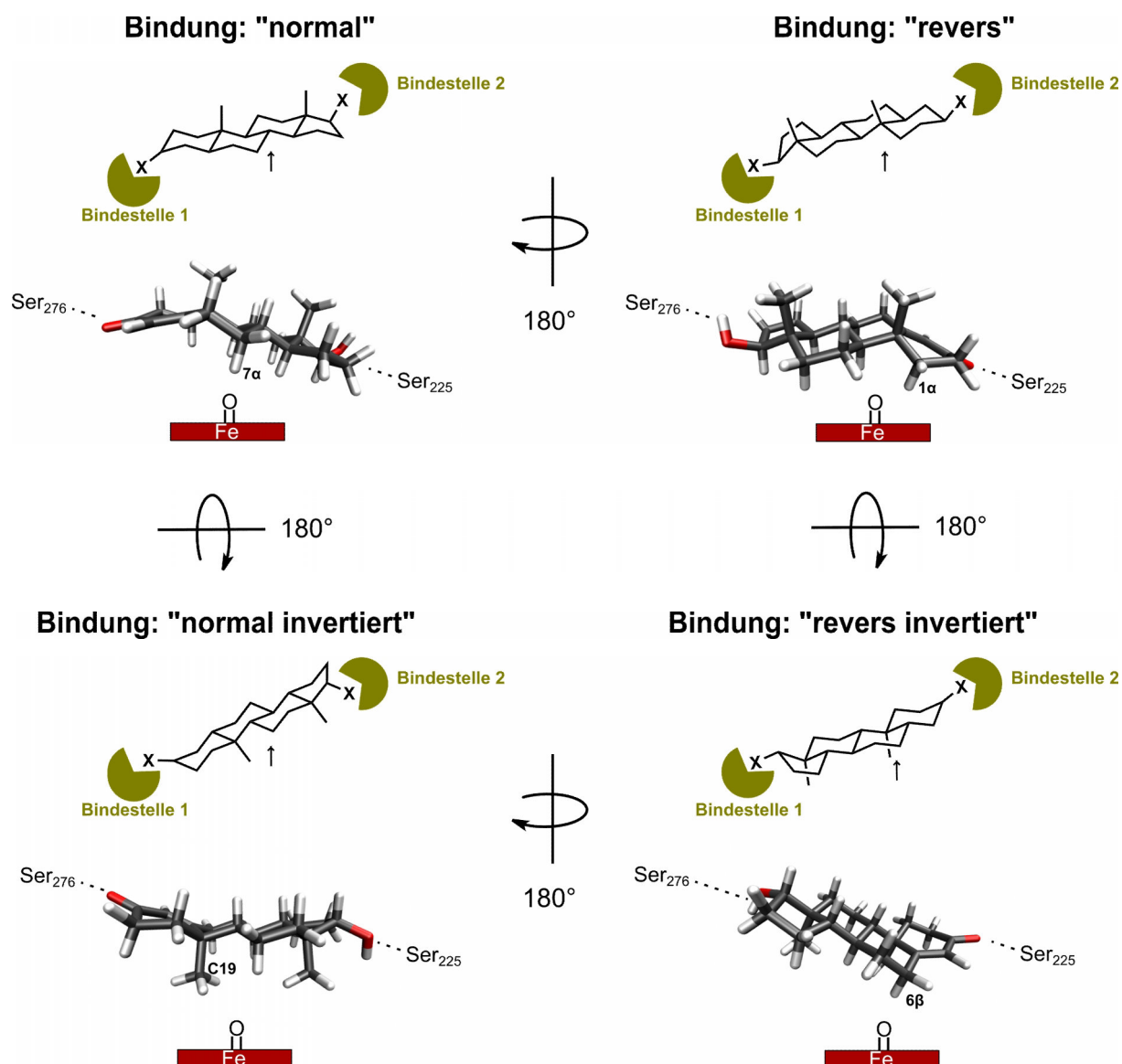


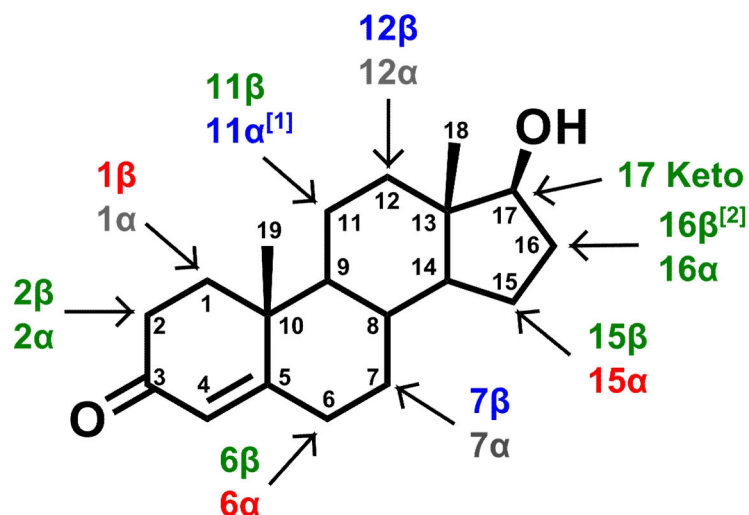
Abb. 4.6: Die vier möglichen Bindungspositionen von Steroiden nach Holland (Holland 1999) und die korrespondierenden Bindungen von Testosteron im aktiven Zentrum von CYP260A1. Die der reaktiven Sauerstoffspezies des Häm am nächsten liegende Wasserstoffe 1 α , 7 α oder 6 β sowie das C19-Kohlenstoffatom sind markiert.

4.4.3 Bedeutung der von CYP260A1 katalysierten Hydroxylierungen

Mit Hilfe des etablierten Ganzzellsystems konnten die Produkte von CYP260A1 in dieser Arbeit erstmals isoliert werden. Man erhoffte sich anfangs, die für die Industrie interessante Positionen wie 7 α , 9 α , 11 α , 11 β , 16 α , 17 α in den Steroidmolekülen zu hydroxylieren (Donova & Egorova 2012). Letzteres wurde beim Einsatz von Dehydroepiandrosteron tatsächlich erreicht. CYP260A1 hydroxylierte dieses Substrat zu seinem bioaktiveren 7 α -Hydroxyprodukt,

welches entzündungshemmende und Immunsystem regulierende Eigenschaften besitzt (Janeczko *et al.* 2009). Daneben ist 7α -Hydroxydehydroepiandrosteron hochinteressant, welches bei Alzheimer Patienten im Gehirn weniger gebildet wird (Yau *et al.* 2003). Seine exakte Rolle im Gehirn, wo ebenfalls ein P450, nämlich CYP7B, für die Herstellung verantwortlich ist und somit seine Rolle bei der Alzheimerkrankheit wird aber momentan noch untersucht. Da dieses Steroid synthetisch schwer zugänglich ist, besteht ein großes biotechnologisches Interesse Dehydroepiandrosteron zu 7α -Hydroxydehydro-epiandrosteron umzusetzen. Eine mikrobielle Biotransformation zu 7α -Hydroxydehydro-epiandrosteron durch den Pilz *Fusarium moniliforme* wurde auch schon 1997 beschrieben, wobei hier mit Zellfraktionen, also nicht mit einem Ganzzellsystem, gearbeitet wurde (Cotillon *et al.* 1997).

Neben der 7α -Hydroxylierung war aber bei den Steroiden mit der 3-Keto-4-enstruktur im A-Ring eine 1α -Hydroxylierung zu beobachten. Diese Position ist sowohl bei den bakteriellen als auch bei den eukaryotischen Cytochromen P450-abhängigen Hydroxylierungen nicht beschrieben (Agematu *et al.* 2006, Donova & Egorova 2012, Hanlon *et al.* 2007). Testosteron wird von eukaryotischen P450 an den Positionen 1β , 2α , 2β , 6β , 6α , 11β , 11α , 15α , 15β , 16α , 16β hydroxyliert. Bakterielle P450 können hingegen die Hydroxylierungen an den Positionen 1β , 6α , 15α nicht durchführen, jedoch sind manche in der Lage, die Positionen 7β und 12β anzugreifen (Agematu *et al.* 2006). Außerdem können Mutanten von CYP102A1 16β -Hydroxytestosteron (Venkataraman *et al.* 2012) und Mutanten von CYP106A2 11α -Hydroxytestosteron (Nguyen *et al.* 2012) herstellen. Bislang wurde für Testosteron keine Hydroxylierungen durch Cytochrome P450 an den Positionen 7α , 12α und 1α beschrieben (siehe Abb. 4.7), so dass die durch CYP260A1 katalysierte 1α -Hydroxylierung die erste ihrer Art ist. Es existiert in der Literatur nur noch eine Beschreibung einer 1 -Hydroxylierung von Testosteron durch die A245T Mutante des CYP107A1, wobei hier keine genaue Charakterisierung mittels NMR stattfand (Xiang *et al.* 2000). Auch synthetisch wurde 1α -Hydroxytestosteron erst zweimal dargestellt, wobei aber die beste Gesamtausbeute bei nur 5% nach 4-Stufen, ausgehend von 1-Dehydrotestosteron, einem kostenintensiveren Derivat von Testosteron lag (Garside *et al.* 1994, Mann & Pietrzak 1989). 1α monohydroxylierte Produkte der anderen in dieser Arbeit behandelten Steroide waren bisher noch gar nicht in der Literatur beschrieben sowohl synthetisch als auch mittels Biotransformationen. Daher ist CYP260A1 die bisher erste beschriebene bzw. genau charakterisierte 1α -Steroidhydroxylase.



[1] Mutante von CYP106A2 (Nyugen *et al.* 2012)

[2] Mutante von CYP102A1 (Venkataraman *et al.* 2012)

Abb. 4.7: Hydroxylierung von Testosteron durch eukaryotische und bakterielle P450 (Agematu *et al.* 2006, Donova & Egorova 2012).

Da 1 α -Hydroxysteroiden bisher der Forschung nicht zur Verfügung standen, sind Anwendungen oder Eigenschaften auch nicht bekannt. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen speziell der pharmakologischen Wirkung in Zukunft unerlässlich. Zu testen wäre zum Beispiel, ob die 1 α -Hydroxysteroiden Wirkungen auf die jeweiligen Steroidrezeptoren haben, wie beispielsweise auf den Glucocorticoidrezeptor, oder als Inhibitoren in die Steroidbiosynthese eingreifen können. Eine Inhibition ist zum Beispiel für die Aromatase CYP19 hochinteressant, da es sich hierbei um das wichtigste Wirkstofftarget bei Brustkrebs handelt (Eisen *et al.* 2008). Dieses Cytochrom P450 katalysiert die Aromatisierung der Androgene, Testosteron und Androstendion, zu den Estrogenen durch eine schrittweise Oxidation, indem es zuerst das C19-Atom oxidiert und in einem späteren Schritt Sauerstoff in die 1 β -H-Atombindung einfügt, wodurch somit im Übergangszustand die C19-Methylgruppe abgespalten und der A-Ring aromatisiert wird (siehe Abb. 4.8 A) (Ghosh *et al.* 2009, Guengerich *et al.* 2011). Die 1 β -Insertion bzw. die spätere Aromatisierung könnte zum Beispiel durch eine 1 α -Hydroxylgruppe im Substrat blockiert werden, sprich die in dieser Arbeit durch CYP260A1 hergestellten Produkte 1 α -Hydroxyandrostendion und 1 α -Hydroxytestosteron. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit in diesem Kontext wäre die chemische Umwandlung der 1 α -Hydroxylgruppe bei den CYP260A1 Produkten von Androstendion in andere Funktionalitäten.

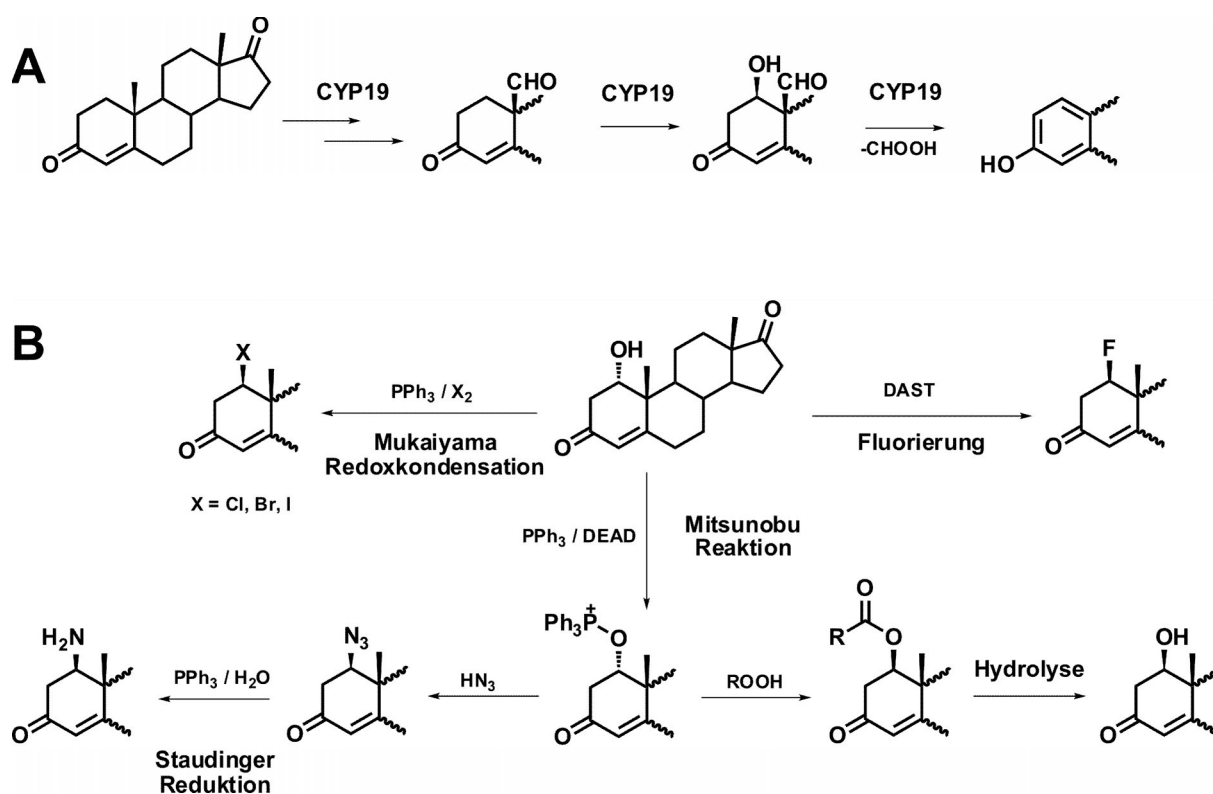


Abb. 4.8: A) Aromatisierung von Androstendion durch CYP19. B) Mögliche nucleophile Umwandlungen von 1 α -Hydroxyandrostendion unter Inversion in 1 β -Halogen-, 1 β -Ester-, 1 β -Azid- und 1 β -Aminoderivate sowie 1 β -Hydroxyandrostendion

Eine Umwandlung könnte durch die 1 α -Hydroxylgruppe sehr gut durch nucleophile Substitutionen erreichen. Der Vorteil hierbei wäre, dass diese unter dem S_N2-Mechanismus ablaufen würde, wodurch das Stereozentrum der neuen Funktionalität von α nach β invertiert wird. Der Vorteil in Bezug auf die Inhibition des Brustkrebstargets CYP19 wäre, dass das notwendige 1 β -H-Atom für die Aromatisierung des A-Ringes nicht vorhanden ist. Alle theoretisch möglichen Reaktionen sind in Abb. 4.8 B dargestellt und zeigen, wie vielfältig neben dem direkten Gebrauch der 1 α -Hydroxysteroiden auch noch die chemischen Modifizierungen sind. Eine gute Möglichkeit wäre hierbei das Einführen von Chlor, Brom oder Iod mittels einer Mukaiyama Redoxkondensation mit Triphenylphosphin (PPh₃) und den Halogenen (Brückner 2003, Carey & Sundberg 2007). Noch besser wäre natürlich eine Einführung des kleineren Fluoratoms zum Beispiel mit dem Fluorierungsreagenz Diethylaminschwefeltrifluorid (DAST) (Hudlický 2004). Ähnliches wurde erst kürzlich für die Umwandlung des zuerst durch CYP102A1 Mutanten gebildeten 7(S)-Hydroxyartemisinin zu 7(R)-Fluoroartemisinin (Zhang *et al.* 2012) beschrieben. Andere funktionelle Gruppen können an der 1 α -Hydroxylgruppe auch mittels In-

version durch die Mitsunobu Reaktion mit Triphenylphosphin (PPh₃) und Diethylazodicarboxylat (DEAD) erreicht werden (Swamy *et al.* 2009). Eine Umsetzung in Gegenwart von Säuren würde zu einer 1 β -Veresterung führen, welche durch Hydrolyse auch in 1 β -Hydroxyandrostendion überführt werden kann. Dies bedeutet eine Inversion der Hydroxylfunktion, welche auch schon für sterisch gehinderte 17-Hydroxysteroiden durchgeführt wurde (Tapolcsányi *et al.* 2004). Eine andere Folgereaktion könnte durch die Anwesenheit von HN₃ erreicht werden. Hierbei bildet sich das Azid, welches durch wässrige Aufarbeitung mit einem Überschuss an Triphenylphosphin (PPh₃) mittels Staudingerreduktion zu 1 β -Aminoandrostendion reagiert. Außerdem bildet die Ausbildung des Azids auch die Möglichkeit der Anbindung von anderen Molekülen mittels Cu-katalysierter 1,3 dipolarer Cyloaddition mit Alkinen (Himo *et al.* 2004, Quader *et al.* 2007), sogenannte „Click Chemie“ (Kolb *et al.* 2001). Hierbei kann das Steroid mit Fluoreszenzfarbstoffen (Zhang *et al.* 2007) ¹⁸F markierte Moleküle (Sirion *et al.* 2007) oder Oberflächen (Chen *et al.* 2007) verbunden werden

Die 1 α hydroxylierten Steroide bilden demnach eine komplett neuartige Steroidklasse mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, lassen sich diverse Vertreter dieser Steroidklasse in CYP260A1 abhängigen Biotransformationen in beliebiger Menge herstellen, so dass sie zukünftig weiter untersucht werden können.

5 Literaturverzeichnis

- 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
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- Anastas P., Eghbali N. (2010) Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* 39:301-312
- Arnold F. H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409:253-257
- 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
- Bell S., Dale A., Rees N., Wong L.-L. (2010) A cytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:163-175
- Berg A., Ingelman-Sundberg M., Gustafsson J. A. (1979) Isolation and characterization of cytochrome P-450meg. *Acta Biol. Med. Ger.* 38:333-344
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28:235-242
- Bernhardt R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124:128-145
- Berry A., Dodge T. C., Pepsin M., Weyler W. (2002) Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:127-133
- Bhatti H. N., Khera R. A. (2012) Biological transformations of steroidal compounds: A review. *Steroids* 77:1267-1290
- Bleif S. (2007) Identifizierung neuer potentieller Substrate von CYP106A2. Diplomarbeit, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes
- Bleif S., Hannemann F., Lisurek M., von Kries J. P., Zapp J., Dietzen M., Antes I., Bernhardt R. (2011) Identification of CYP106A2 as a Regioselective Allylic Bacterial Diterpene Hydroxylase. *ChemBioChem* 12:576-582
- Bleif S., Hannemann F., Zapp J., Hartmann D., Jauch J., Bernhardt R. (2012) A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto- β -boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:1135-1146
- 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
- Botsford J. L., DeMoss R. D. (1971) Catabolite Repression of Tryptophanase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 105:303-312

- Brückner R. (2003) Reaktionsmechanismen, Vol. 2. ed., Spektrum Akademischer Verlag
- Cao P. R., Bulow H., Dumas B., Bernhardt R. (2000) Construction and characterization of a catalytic fusion protein system: P-450(11beta)-adrenodoxin reductase-adrenodoxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1476:253-264
- Carballeira J. D., Quezada M. A., Hoyos P., Simeó Y., Hernaiz M. J., Alcantara A. R., Sinisterra J. V. (2009) Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnol. Adv.* 27:686-714
- Carey F., Sundberg R. (2007) Functional Group Interconversion by Substitution, Including Protection and Deprotection. In *Advanced Organic Chemistry*, 215-288, Springer US
- Chefson A., Auclair K. (2006) Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Molecular BioSystems* 2:462-469
- Chen G., Tao L., Mantovani G., Ladmiral V., Burt D. P., Macpherson J. V., Haddleton D. M. (2007) Synthesis of azide/alkyne-terminal polymers and application for surface functionalisation through a [2 + 3] Huisgen cycloaddition process, "click chemistry". *Soft Matter* 3:732-739
- Chen K., Arnold F. H. (1993) Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:5618-5622
- 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
- Cotillon A.-C., Doostzadeh J., Morfin R. (1997) The inducible and cytochrome P450-containing dehydroepiandrosterone 7 α -hydroxylating enzyme system of *Fusarium moniliforme*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62:467-475
- Dawid W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:403-427
- de Beer S. B., van Bergen L. A., Keijzer K., Rea V., Venkataraman H., Guerra C. F., Bickelhaupt F. M., Vermeulen N. P., Commandeur J. N., Geerke D. P. (2012) The role of protein plasticity in computational rationalization studies on regioselectivity in testosterone hydroxylation by cytochrome P450 BM3 mutants. *Curr Drug Metab.* 13:155-166.
- Denisov I. G., Makris T. M., Sligar S. G., Schlichting I. (2005) Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* 105:2253-2278
- Dietrich J. A., Yoshikuni Y., Fisher K. J., Woolard F. X., Ockey D., McPhee D. J., Renninger N. S., Chang M. C. Y., Baker D., Keasling J. D. (2009) A Novel Semi-biosynthetic Route for Artemisinin Production Using Engineered Substrate-Promiscuous P450BM3. *ACS Chemical Biology* 4:261-267
- Diez J., Martinez J. P., Mestres J., Sasse F., Frank R., Meyerhans A. (2012) Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microb Cell Fact.* 11:52.:10.1186/1475-2859-1111-1152.
- Donova M., Egorova O. (2012) Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:1423-1447

- Drăgan C.-A., Zearo S., Hannemann F., Bernhardt R., Bureik M. (2005) Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* 5:621-625
- Eisen A., Trudeau M., Shelley W., Messersmith H., Pritchard K. I. (2008) Aromatase inhibitors in adjuvant therapy for hormone receptor positive breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 34:157-174
- Ensley B. D., Ratzkin B. J., Osslund T. D., Simon M. J., Wackett L. P., Gibson D. T. (1983) Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222:167-169
- Estabrook R. W. (2003) A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab. Disposition* 31:1461-1473
- Estabrook R. W., Baron J., Peterson J., Ishimura Y. (1971) Oxygenated cytochrome P-450 as an intermediate in hydroxylation reactions. *Biochem J.* 125:3P-4P.
- Estabrook R. W., Cooper D. Y., Rosenthal O. (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex, Vol. 338,
- Ewen K. M. (2009) In vitro Untersuchung potentieller Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56. Doktorarbeit, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes
- Ewen K. M., Hannemann F., Iametti S., Morleo A., Bernhardt R. (2011) Functional Characterization of Fdx1: Evidence for an Evolutionary Relationship between P450-Type and ISC-Type Ferredoxins. *J. Mol. Biol.* 413:940-951
- Ewen K. M., Hannemann F., Khatri Y., Perlova O., Kappl R., Krug D., Hüttermann J., Müller R., Bernhardt R. (2009) Genome mining in *Sorangium cellulosum* So ce56 - identification and characterization of the homologous electron transfer proteins of a myxobacterial cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* 284:28590-28598
- Ewen K. M., Ringle M., Bernhardt R. (2012) Adrenodoxin—A versatile ferredoxin. *IUBMB Life* 64:506-512
- Ewen K. M., Schiffler B., Uhlmann-Schiffler H., Bernhardt R., Hannemann F. (2008) The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* 8:432-441
- Faber K. (2011) Biotransformations in Organic Chemistry. In *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. ed., pp 391-396, Springer Berlin Heidelberg
- Faber K., Kroutil W. (2005) New enzymes for biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9:181-187
- Faro M., Schiffler B., Heinz A., Nogues I., Medina M., Bernhardt R., Gomez-Moreno C. (2003) Insights into the design of a hybrid system between *Anabaena ferredoxin-NADP+ reductase* and *bovine adrenodoxin*. *Eur. J. Biochem.* 270:726-735
- Fernández-Arrojo L., Guazzaroni M.-E., López-Cortés N., Beloqui A., Ferrer M. (2010) Metagenomic era for biocatalyst identification. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:725-733
- Fischer F., Raimondi D., Aliverti A., Zanetti G. (2002) *Mycobacterium tuberculosis* FprA, a novel bacterial NADPH-ferredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 269:3005-3013

- Fragkaki A. G., Angelis Y. S., Koupparis M., Tsantili-Kakoulidou A., Kokotos G., Georgakopoulos C. (2009) Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities: Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids* 74:172-197
- Frank L. H., Demoss R. D. (1957) Specific enzymic method for the estimation of 1-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 67:387-397
- Funder J. W. (2010) Minireview: Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors: Past, Present, and Future. *Endocrinology* 151:5098-5102
- Gal J. (2008) The discovery of biological enantioselectivity: Louis Pasteur and the fermentation of tartaric acid, 1857—A review and analysis 150 yr later. *Chirality* 20:5-19
- Garfinkel D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77:493-509
- Garside D., Kirk D. N., Waldron N. M. (1994) Synthesis of hydroxylated steroid hormones via conjugate addition of a silyl-cuprate reagent. *Steroids* 59:702-711
- Ghosh D., Griswold J., Erman M., Pangborn W. (2009) Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457:219-223
- Gillam E. M. J., Aguinaldo A. M. A., Notley L. M., Kim D., Mundkowski R. G., Volkov A. A., Arnold F. H., Souček P., DeVoss J. J., Guengerich F. P. (1999) Formation of Indigo by Recombinant Mammalian Cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:469-472
- Gillam E. M. J., Guengerich F. P. (2001) Exploiting the Versatility of Human Cytochrome P450 Enzymes: The Promise of Blue Roses From Biotechnology. *IUBMB Life* 52:271-277
- Gillam E. M. J., Notley L. M., Cai H., De Voss J. J., Guengerich F. P. (2000) Oxidation of Indole by Cytochrome P450 Enzymes. *Biochemistry (Mosc)*. 39:13817-13824
- Girhard M., Klaus T., Khatri Y., Bernhardt R., Urlacher V. B. (2010) Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press
- Girhard M., Machida K., Itoh M., Schmid R. D., Arisawa A., Urlacher V. B. (2009) Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microb. Cell Fact.* 8:36.
- 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
- Graham S. E., Peterson J. A. (1999) How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach Us? *Arch. Biochem. Biophys.* 369:24-29
- Guengerich F. P. (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14:611-650

- Guengerich F. P., Sohl C. D., Chowdhury G. (2011) Multi-step oxidations catalyzed by cytochrome P450 enzymes: Processive vs. distributive kinetics and the issue of carbonyl oxidation in chemical mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 507:126-134
- Gunsalus I. C., Sligar S. G. (1976) Redox regulation of cytochrome P450cam mixed function oxidation by putidaredoxin and camphor ligation. *Biochimie* 58:143-147
- Guzov V. M., Unnithan G. C., Chernogolov A. A., Feyereisen R. (1998) CYP12A1, a Mitochondrial Cytochrome P450 from the House Fly. *Arch. Biochem. Biophys.* 359:231-240
- Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98
- Hanlon S. P., Friedberg T., Wolf C. R., Ghisalba O., Kittelmann M. (2007) Recombinant Yeast and Bacteria that Express Human P450s: Bioreactors for Drug Discovery, Development, and Biotechnology. In *Modern Biooxidation*, 233-252, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K. M., Bernhardt R. (2007) Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770:330-344
- Hannemann F., Virus C., Bernhardt R. (2006) Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *J. Biotechnol.* 25:25
- Hawkes D. B., Slessor K. E., Bernhardt P. V., De Voss J. J. (2010) Cloning, Expression and Purification of Cindoxin, an Unusual Fmn-Containing Cytochrome P450 Redox Partner. *ChemBioChem* 11:1107-1114
- Hayashi K., Yasuda K., Sugimoto H., Ikushiro S., Kamakura M., Kittaka A., Horst R. L., Chen T. C., Ohta M., Shiro Y., Sakaki T. (2010) Three-step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1. *FEBS J.* 277:3999-4009
- Held D., Yaeger K., Novy R. (2003) New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli*. *Innovations* 18:4-6
- Himo F., Lovell T., Hilgraf R., Rostovtsev V. V., Noodleman L., Sharpless K. B., Fokin V. V. (2004) Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 127:210-216
- Hobler A. (2008) Human Aldosterone Synthase (CYP11B2): Expression in *E. coli*, Purification and Functional Characterization. Masterarbeit, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes
- Holland H. L. (1999) Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts. *Steroids* 64:178-186
- Holtmann D., Schrader J. (2007) Approaches to Recycling and Substituting NAD(P)H as a CYP Cofactor. In *Modern Biooxidation*, 265-290, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Hudlický M. (2004) Fluorination with Diethylaminosulfur Trifluoride and Related Aminofluorosulfuranes. In *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc.

- Hudlicky T., Reed J. W. (2009) Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 38:3117-3132
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28
- Isin E. M., Guengerich F. P. (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770:314-329
- Janeczko T., Dmochowska-Gładysz J., Kostrzewa-Susłow E., Białońska A., Ciunik Z. (2009) Biotransformations of steroid compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651. *Steroids* 74:657-661
- Jefcoate C. R. (1978) [27] Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. In *Methods in Enzymology*, 258-279, Academic Press
- 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
- Jones E. R. (1973) The microbiological hydroxylation of steroids and related compounds. *Pure Appl Chem.* 33:39-52.
- Julsing M. K., Cornelissen S., Bühler B., Schmid A. (2008) Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12:177-186
- Katagiri M., Ganguli B. N., Gunsalus I. C. (1968) A Soluble Cytochrome P-450 Functional in Methylene Hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 243:3543-3546
- Khatri Y. (2009) The cytochrome P450 complement of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 and characterization of two members, CYP109D1 and CYP260A1. Dissertation, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III (Biochemie), Universität des Saarlandes
- Khatri Y., Girhard M., Romankiewicz A., Ringle M., Hannemann F., Urlacher V. B., Hutter M., Bernhardt R. (2010a) Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88:485-495
- Khatri Y., Hannemann F., Ewen K. M., Pistorius D., Perlova O., Kagawa N., Brachmann A. O., Müller R., Bernhardt R. (2010b) The CYPome of *Sorangium cellulosum* So ce56 and Identification of CYP109D1 as a New Fatty Acid Hydroxylase. *Chem. Biol.* 17:1295-1305
- Khatri Y., Hannemann F., Perlova O., Müller R., Bernhardt R. (2011) Investigation of cytochromes P450 in myxobacteria: Excavation of cytochromes P450 from the genome of *Sorangium cellulosum* So ce56. *FEBS Lett.* 585:1506-1513
- Kille S., Zilly F. E., Acevedo J. P., Reetz M. T. (2011) Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution. *Nat Chem* 3:738-743
- Kim J. Y., Lee K., Kim Y., Kim C. K. (2003) Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:343-348

- Kleser M., Hannemann F., Hutter M., Zapp J., Bernhardt R. (2012) CYP105A1 mediated 3-hydroxylation of glimepiride and glibenclamide using a recombinant *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst. *J. Biotechnol.* 157:405-412
- Klingenberg M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75:376-386
- Koeller K. M., Wong C.-H. (2001) Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409:232-240
- Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:2004-2021
- Kumar S. (2010) Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation. *Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicology* 6:115-131
- Kyung-Hwan J. (2006) Continuous production of recombinant interferon- α in *Escherichia coli* via the derepression of trp promoter using casamino acid. *Process Biochem.* 41:809-814
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lamb D. C., Ikeda H., Nelson D. R., Ishikawa J., Skaug T., Jackson C., Omura S., Waterman M. R., Kelly S. L. (2003) Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:610-619
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
- Liao W. L., Dodder N. G., Mast N., Pikuleva I. A., Turko I. V. (2009) Steroid and protein ligand binding to cytochrome P450 46A1 as assessed by hydrogen-deuterium exchange and mass spectrometry. *Biochemistry.* 48:4150-4158
- Lisurek M. (2004) Homologie-Modellierung und Protein-Engineering der Steroid-15 β -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368. Doktorarbeit, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes
- 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
- Lu Y., Mei L. (2007) Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:247-253
- Luthra A., Denisov I. G., Sligar S. G. (2011) Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 507:26-35
- Ly T., Khatri Y., Zapp J., Hutter M., Bernhardt R. (2012) CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56: a fascinating norisoprenoid and sesquiterpene hydroxylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:123-133
- Mahato S. B., Garai S. (1997) Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* 62:332-345

- Mann J., Pietrzak B. (1989) Synthesis of 1- α -hydroxytestosterone. *Tetrahedron* 45:1549-1552
- Marschall R. O., Kooi E. R., Moffett G. M. (1957) Enzymatic Conversion of d-Glucose to d-Fructose. *Science* 125:648-649
- Martinez-Gomez K., Flores N., Castaneda H. M., Martinez-Batallar G., Hernandez-Chavez G., Ramirez O. T., Gosset G., Encarnacion S., Bolivar F. (2012) New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microb Cell Fact* 11:46
- Mestres J. (2005) Structure conservation in cytochromes P450. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 58:596-609
- 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
- Mueller H. J., Johnson E. R. (1941) Acid Hydrolysates of Casein to Replace Peptone in the Preparation of Bacteriological Media. *The Journal of Immunology* 40:33-38
- Mülhardt C. (2008) *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, Vol. 6. ed., Spektrum Akademischer Verlag
- Müller J. J., Hannemann F., Schiffler B., Ewen K. M., Kappl R., Heinemann U., Bernhardt R. (2011) Structural and thermodynamic characterization of the adrenodoxin-like domain of the electron-transfer protein Etp1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Inorg. Biochem.* 105:957-965
- Muñoz Solano D., Hoyos P., Hernáiz M. J., Alcántara A. R., Sánchez-Montero J. M. (2012) Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour. Technol.* 115:196-207
- Nebert D. W., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., et al. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*. 6:1-11.
- Nebert D. W., Nelson D. R., Coon M. J., Estabrook R. W., Feyereisen R., Fujii-Kuriyama Y., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., et al. (1991) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10:1-14.
- Nelson D. R. (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics*. 4:59-65.
- Nelson D. R. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814:14-18
- Nelson D. R., Kamataki T., Waxman D. J., Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzalez F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., et al. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12:1-51.
- Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6:1-42.

- Nguyen K. T., Virus C., Günnewich N., Hannemann F., Bernhardt R. (2012) Changing the Regioselectivity of a P450 from C15 to C11 Hydroxylation of Progesterone. *ChemBioChem* 13:1161-1166
- Novy R., Yaeger K., Held D., Robert M. (2002) Coexpression of multiple target proteins in *E. coli*. *Innovations* 15:2-6
- 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'Reilly E., Kohler V., Flitsch S. L., Turner N. J. (2011) Cytochromes P450 as useful biocatalysts: addressing the limitations. *Chem. Commun.* 47:2490-2501
- Ogura H., Nishida C. R., Hoch U. R., Perera R., Dawson J. H., Ortiz de Montellano P. R. (2004) EpoK, a Cytochrome P450 Involved in Biosynthesis of the Anticancer Agents Epothilones A and B. Substrate-Mediated Rescue of a P450 Enzyme†. *Biochemistry (Mosc)*. 43:14712-14721
- Omura T., Sato R. (1962) A New Cytochrome in Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 237:PC1375-PC1376
- Omura T., Sato R. (1964a) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 239:2370-2378
- Omura T., Sato R. (1964b) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* 239:2379-2385
- Ortiz de Montellano P., Voss J. (2005) *Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes*. 183-245, Springer US
- Ortiz de Montellano P. R. (2010) *Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes*. *Chem. Rev.* 110:932-948
- Park S.-H., Kim D.-H., Kim D., Kim D.-H., Jung H.-C., Pan J.-G., Ahn T., Kim D., Yun C.-H. (2010) Engineering Bacterial Cytochrome P450 (P450) BM3 into a Prototype with Human P450 Enzyme Activity Using Indigo Formation. *Drug Metab. Disposition* 38:732-739
- Pechurskaya T. A., Harnastai I. N., Grabovec I. P., Gilep A. A., Usanov S. A. (2007) Adrenodoxin supports reactions catalyzed by microsomal steroidogenic cytochrome P450s. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353:598-604
- Podust L. M., Sherman D. H. (2012) Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Nat Prod Rep.* 29:1251-1266. doi: 1210.1039/c1252np20020a. Epub 22012 Jul 20023.
- Postma P. W., Lengeler J. W., Jacobson G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543-594
- Poulos T., Johnson E. (2005) Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In *Cytochrome P450*, 87-114, Springer US
- Quader S., Boyd S. E., Jenkins I. D., Houston T. A. (2007) Multisite Modification of Neomycin B: Combined Mitsunobu and Click Chemistry Approach. *The Journal of Organic Chemistry* 72:1962-1979

- Rea V., Kolkman A. J., Vottero E., Stronks E. J., Ampt K. A. M., Honing M., Vermeulen N. P. E., Wijmenga S. S., Commandeur J. N. M. (2012) Active Site Substitution A82W Improves the Regioselectivity of Steroid Hydroxylation by Cytochrome P450 BM3 Mutants As Rationalized by Spin Relaxation Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Biochemistry (Mosc)*. 51:750-760
- Reichenbach H. (1999) The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* 1:15-21
- Ringle M. (2008) Produktcharakterisierung des Progesteronumsatzes von CYP260A1. Diplomarbeit, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes
- Rittle J., Green M. T. (2010) Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics. *Science* 330:933-937
- 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
- Roberts S., Turner N. J., Begley T. P. (2007) Biocatalysis and Biotransformation. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Robin M.-A., Anandatheerthavarada H. K., Fang J.-K., Cudic M., Otvos L., Avadhani N. G. (2001) Mitochondrial Targeted Cytochrome P450 2E1 (P450 MT5) Contains an Intact N Terminus and Requires Mitochondrial Specific Electron Transfer Proteins for Activity. *J. Biol. Chem.* 276:24680-24689
- Rosenthaler L. (1908) Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthese. *Biochem. Z.* 14:238-253
- Sagara Y., Wada A., Takata Y., Waterman M. R., Sekimizu K., Horiuchi T. (1993) Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization. *Biol. Pharm. Bull.* 16:627-630
- Sakaki T. (2012) Practical Application of Cytochrome P450. *Biol. Pharm. Bull.* 35:844-849
- Sakaki T., Kagawa N., Yamamoto K., Inouye K. (2005) Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci.* 10:119-134
- Sakaki T., Shinkyō R., Takita T., Ohta M., Inouye K. (2002) Biodegradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by recombinant yeast expressing rat CYP1A subfamily. *Arch. Biochem. Biophys.* 401:91-98
- Salamanca-Pinzón S. G., Guengerich F. P. (2011) A tricistronic human adrenodoxin reductase-adrenodoxin-cytochrome P450 27A1 vector system for substrate hydroxylation in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.* 79:231-236
- Sambrook J., Russell D. W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual* Vol. 3. ed., Cold Spring Harbor Laboratory
- 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
- Schmitz D., Zapp J., Bernhardt R. (2012) Hydroxylation of the triterpenoid dipterocarpol with CYP106A2 from *Bacillus megaterium*. *FEBS J.* 279:1663-1674

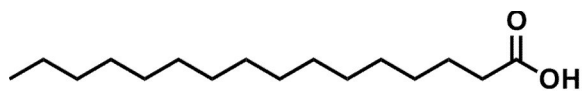
- Schneiker S., Perlova O., Kaiser O., Gerth K., Alici A., Altmeyer M. O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E., Bode H. B., Bolten C. J., Choudhuri J. V., Doss S., Elnakady Y. A., Frank B., Gaigalat L., Goesmann A., Groeger C., Gross F., Jelsbak L., Jelsbak L., Kalinowski J., Kegler C., Knauber T., Konietzny S., Kopp M., Krause L., Krug D., Linke B., Mahmud T., Martinez-Arias R., McHardy A. C., Merai M., Meyer F., Mormann S., Munoz-Dorado J., Perez J., Pradella S., Rachid S., Raddatz G., Rosenau F., Ruckert C., Sasse F., Scharfe M., Schuster S. C., Suen G, Treuner-Lange A., Velicer G. J., Vorholter F.-J., Weissman K. J., Welch R. D., Wenzel S. C., Whitworth D. E., Wilhelm S., Wittmann C., Blocker H., Puhler A., Muller R. (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotech* 25:1281-1289
- Schroer K., Kittelmann M., Lütz S. (2010) Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 106:699-706
- Schuster I. (2011) Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1814:186-199
- Sedlaczek L., Smith L. L. (1988) Biotransformations of Steroids. *Crit. Rev. Biotechnol.* 7:187-236
- Shinkyo R., Kamakura M., Ikushiro S.-i., Inouye K., Sakaki T. (2006) Biodegradation of dioxins by recombinant *Escherichia coli* expressing rat CYP1A1 or its mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:584-590
- Sielaff B., Andreesen J. R. (2005) Kinetic and binding studies with purified recombinant proteins ferredoxin reductase, ferredoxin and cytochrome P450 comprising the morpholine mono-oxygenase from *Mycobacterium* sp. strain HE5. *FEBS J.* 272:1148-1159
- Simgen B., Contzen J., Schwarzer R., Bernhardt R., Jung C. (2000) Substrate Binding to 15 β -Hydroxylase (CYP106A2) Probed by FT Infrared Spectroscopic Studies of the Iron Ligand CO Stretch Vibration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:737-742
- Sirim D., Widmann M., Wagner F., Pleiss J. (2010) Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases. *BMC Struct Biol.* 10:34.
- Sirion U., Kim H. J., Lee J. H., Seo J. W., Lee B. S., Lee S. J., Oh S. J., Chi D. Y. (2007) An efficient F-18 labeling method for PET study: Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of bioactive substances and F-18-labeled compounds. *Tetrahedron Lett.* 48:3953-3957
- Sono M., Roach M. P., Coulter E. D., Dawson J. H. (1996) Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2841-2888
- Stemmer W. P. C. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370:389-391
- Studier F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41:207-234
- Studier F. W., Moffatt B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-130
- Swamy K. C. K., Kumar N. N. B., Balaraman E., Kumar K. V. P. P. (2009) Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem. Rev.* 109:2551-2651

- Szczebara 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 Biotech* 21:143-149
- Tao J., Xu J.-H. (2009) Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13:43-50
- Tapolcsányi P., Wéfling J., Mernyák E., Schneider G. (2004) The Mitsunobu Inversion Reaction of Sterically Hindered 17-Hydroxy Steroids. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 135:1129-1136
- Tin M. K., Hakki T., Bernhardt R. (2011) Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a new system for the investigation of corticosterone methyloxidase deficiency-causing mutations. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 124:31-37
- Tolia N. H., Joshua-Tor L. (2006) Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat Meth* 3:55-64
- Trost B. (1991) The atom economy--a search for synthetic efficiency. *Science* 254:1471-1477
- Tyson C. A., Lipscomb J. D., Gunsalus I. C. (1972) The Roles of Putidaredoxin and P450cam in Methylene Hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 247:5777-5784
- Uhlmann H., Kraft R., Bernhardt R. (1994) C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and determines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 269:22557-22564
- Urlacher V. B., Girhard M. (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 30:26-36
- van Beilen J. B., Holtackers R., Luscher D., Bauer U., Witholt B., Duetz W. A. (2005) Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol.* 71:1737-1744.
- Venkataraman H., de Beer S. B. A., van Bergen L. A. H., van Essen N., Geerke D. P., Vermeulen N. P. E., Commandeur J. N. M. (2012) A Single Active Site Mutation Inverts Stereoselectivity of 16-Hydroxylation of Testosterone Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 BM3. *ChemBioChem* 13:520-523
- Virus C., Bernhardt R. (2008) Molecular Evolution of a Steroid Hydroxylating Cytochrome P450 Using a Versatile Steroid Detection System for Screening. *Lipids* 43:1133-1141
- Virus C., Lisurek M., Simgen B., Hannemann F., Bernhardt R. (2006) Function and engineering of the 15beta-hydroxylase CYP106A2. *Biochem. Soc. Trans.* 34:1215-1218
- Vonrhein C., Schmidt U., Ziegler G. A., Schweiger S., Hanukoglu I., Schulz G. E. (1999) Chaperone-assisted expression of authentic bovine adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 443:167-169
- Watanabe I., Nara F., Serizawa N. (1995) Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450sca-in2 from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor. *Gene* 163:81-85

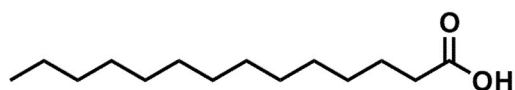
- Weissman K. J., Muller R. (2010) Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Nat. Prod. Rep.* 27:1276-1295
- Wenzel S. C., Muller R. (2009) Myxobacteria-'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites. *Molecular BioSystems* 5:567-574
- Whitehouse C. J. C., Bell S. G., Wong L.-L. (2012) P450BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chem. Soc. Rev.* 41:1218-1260
- Wohlgemuth R. (2010) Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:283-292
- Wong L.-L. (2011) P450BM3 on Steroids: The Swiss Army Knife P450 Enzyme Just Gets Better. *ChemBioChem* 12:2537-2539
- Xiang H., Tschirret-Guth R. A., Ortiz de Montellano P. R. (2000) An A245T Mutation Conveys on Cytochrome P450eryF the Ability to Oxidize Alternative Substrates. *J. Biol. Chem.* 275:35999-36006
- Yasutake Y., Fujii Y., Nishioka T., Cheon W.-K., Arisawa A., Tamura T. (2010) Structural Evidence for Enhancement of Sequential Vitamin D3 Hydroxylation Activities by Directed Evolution of Cytochrome P450 Vitamin D3 Hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 285:31193-31201
- Yau J. L. W., Rasmuson S., Andrew R., Graham M., Noble J., Olsson T., Fuchs E., Lathe R., Seckl J. R. (2003) Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase *cyp7b*: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in alzheimer's disease☆. *Neuroscience* 121:307-314
- Ye Y., Godzik A. (2003) Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists. *Bioinformatics* 19:ii246-ii255
- Zehentgruber D., Drăgan C.-A., Bureik M., Lütz S. (2010) Challenges of steroid biotransformation with human cytochrome P450 monooxygenase CYP21 using resting cells of recombinant *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biotechnol.* 146:179-185
- Zhang K., Shafer B. M., Demars M. D., Stern H. A., Fasan R. (2012) Controlled Oxidation of Remote sp³ C–H Bonds in Artemisinin via P450 Catalysts with Fine-Tuned Regio- and Stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 134:18695-18704
- Zhang Y.-H., Gao Z.-X., Zhong C.-L., Zhou H.-B., Chen L., Wu W.-M., Peng X.-J., Yao Z.-J. (2007) An inexpensive fluorescent labeling protocol for bioactive natural products utilizing Cu(I)-catalyzed Huisgen reaction. *Tetrahedron* 63:6813-6821
- Ziska A. (2011) Study of cytochrome P450 CYP267B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. Bachelorarbeit, Fakultät 8: Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes

6 Anhang

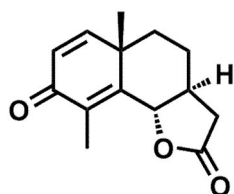
6.1 Allgemeine Substanzbibliothek



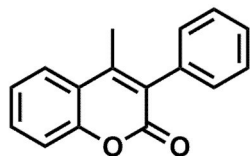
Palmitinsäure (001)



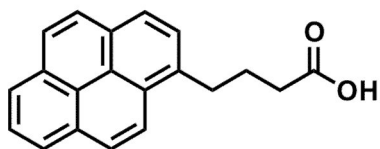
Myristinsäure (002)



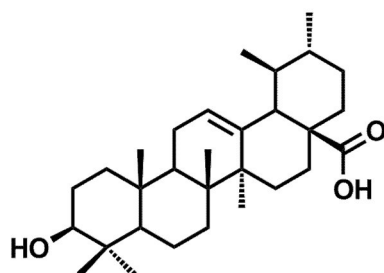
Santonin (003)



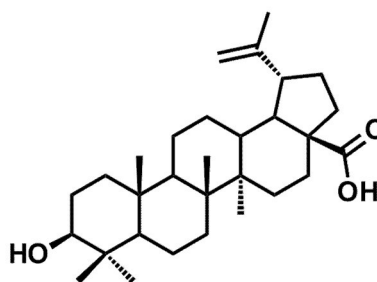
4-Methyl-3-Phenylcoumarin (004)



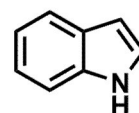
Pyrenbutansäure (005)



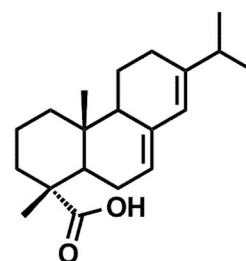
Ursolsäure (006)



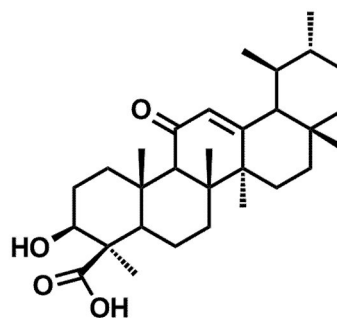
Betulinsäure (007)



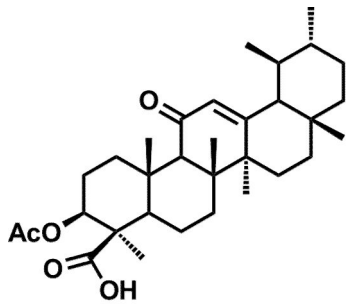
Indol (008)



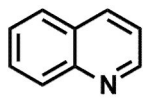
Abietinsäure (009)



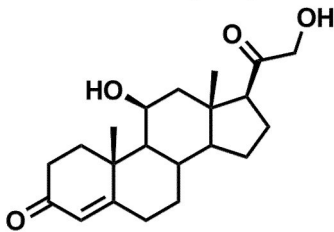
11-Ketoboswelliäsaure (010)



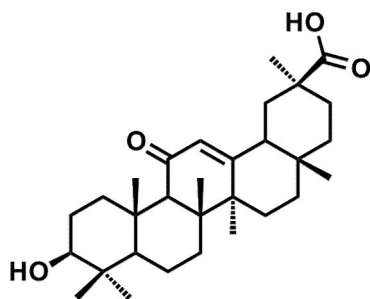
Acetylketoboswelliasäure (011)



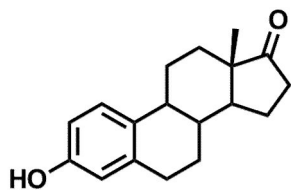
Chinolin (012)



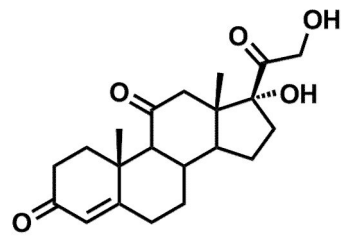
Corticosteron (013)



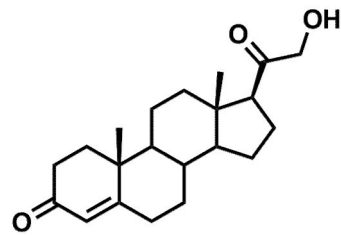
Enoxolon (014)



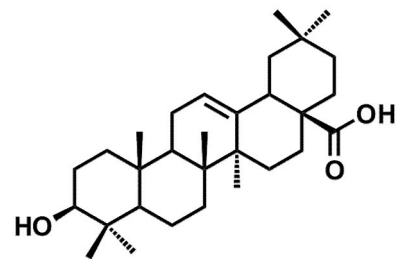
Östron (015)



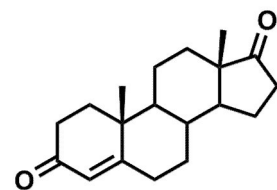
Cortison (016)



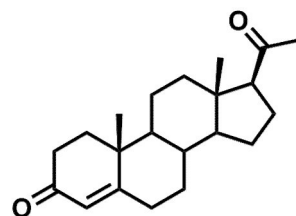
11-Desoxycorticosteron (017)



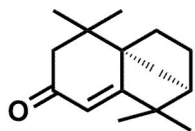
Oleanolsäure (018)



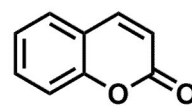
Androstendion (019)



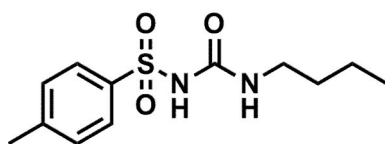
Progesteron (020)



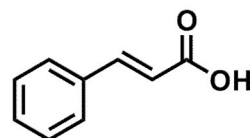
Isolongifolen-9-on (021)



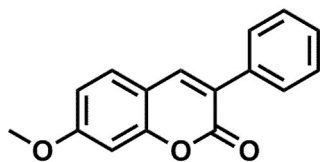
Coumarin (026)



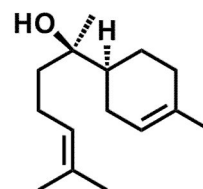
Tolbutamid (022)



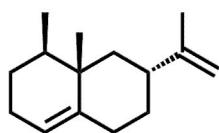
Zimtsäure (027)



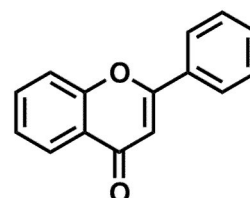
7-Methoxy-3-Phenyl-Cumarin (023)



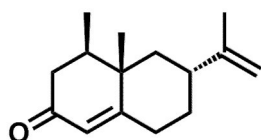
Bisabolol (028)



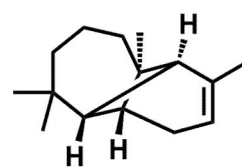
Valencen (024)



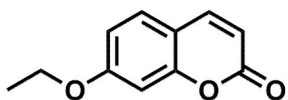
Flavon (029)



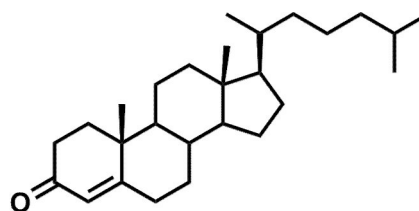
(+) -Nootkaton (025)



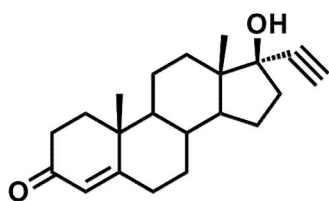
Longipinen (030)



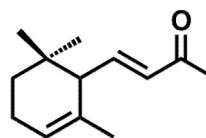
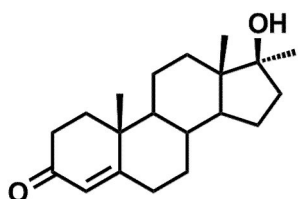
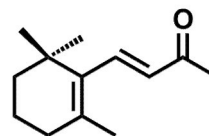
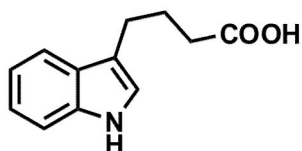
7-Ethoxy-Cumarin (031)



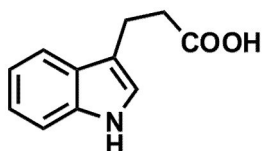
4-Cholesten-3-on (038)



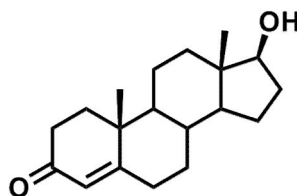
Ethisterone (032)

 α -Ionone (037)17 α -Methyltestosteron (033) β -Ionone (038)

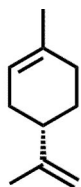
3-Indolbuttersäure (034)

(+) - α -Pinen (039)

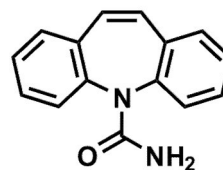
3-Indolpropansäure (035)



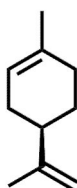
Testosteron (040)



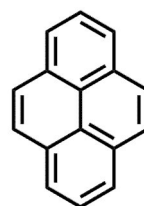
S(-)-Limonen (041)



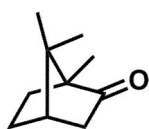
Carbamazepin (046)



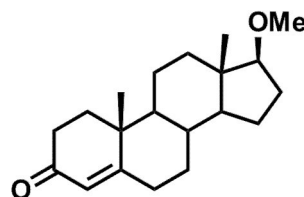
R(+)-Limonen (042)



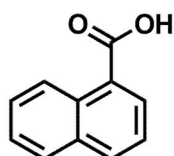
Pyrene (047)



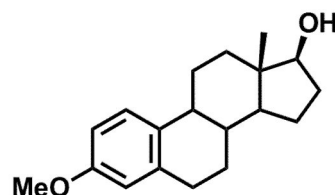
Campher (043)



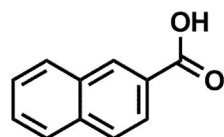
7-Methoxytestosteron (048)



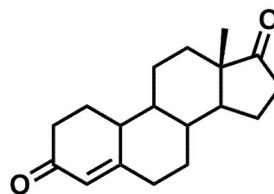
1-Naphtoesäure (044)



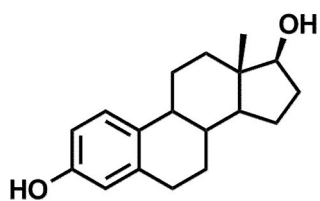
3-Methoxyöstron (049)



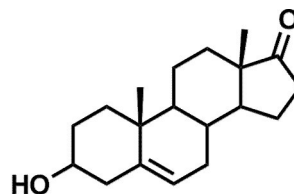
2-Naphtoesäure (045)



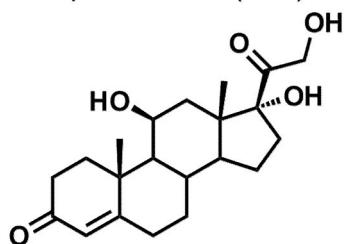
19-Norandrostendion (050)



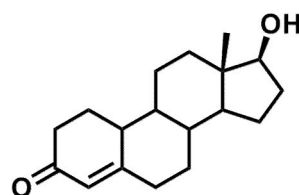
β -Estradiol (051)



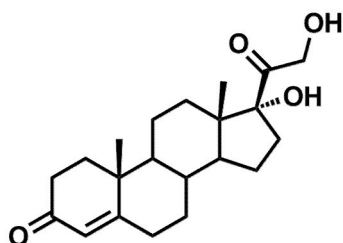
Dehydroepiandrosteron (056)



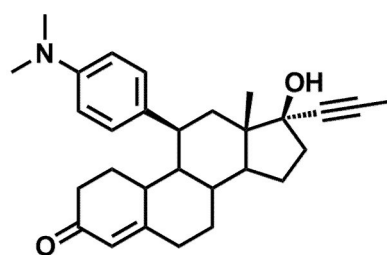
Cortisol (052)



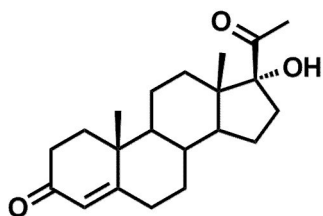
19-Nortestosteron (057)



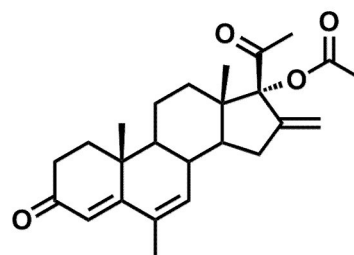
11-Desoxycortisol (053)



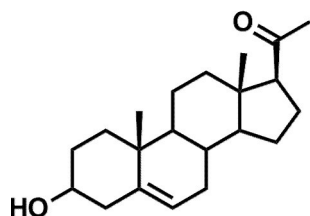
Mifepriston (058)



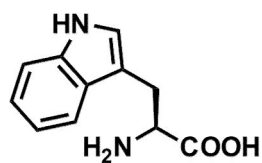
17 α -Hydroxyprogesteron (054)



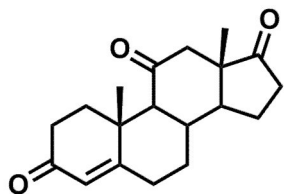
Melengestriol-Acetat (059)



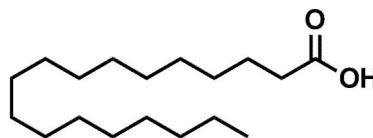
Pregnenolon (055)



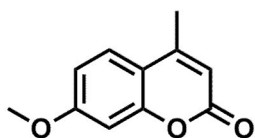
Tryptophan (060)



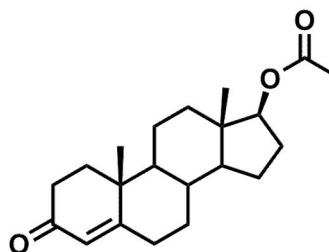
11-Ketoandrosteron (061)



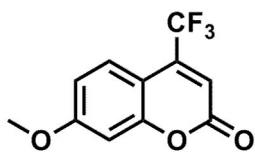
Stearinsäure (066)



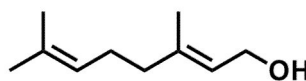
7-Methoxy-4-Methylcoumarin (062)



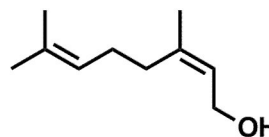
Testosteron-Acetat (067)



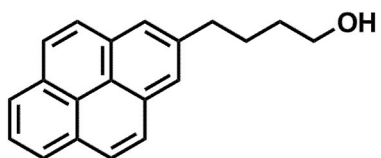
7-Methoxy-4-Trifluoromethylcoumarin (063)



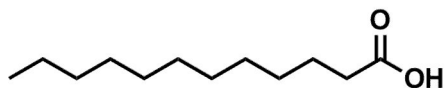
Geraniol (068)



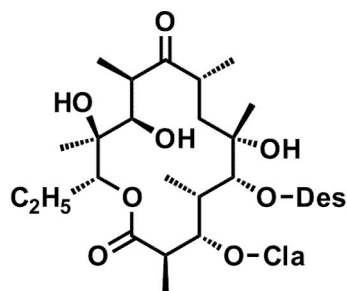
Nerol (069)



Pyrenebutanol (064)



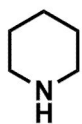
Laurinsäure (065)



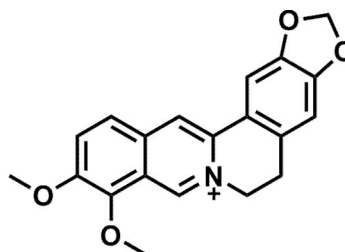
Des = Desosamin
Cla = Cladinose

070-Erythromycin

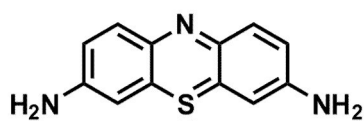
6.2 Substanzbibliothek von Gif-sur-Yvette



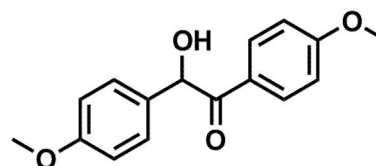
Piperidin (G01)



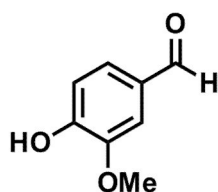
Berberin (G06)



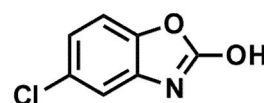
Thionin(Acetat) (G02)



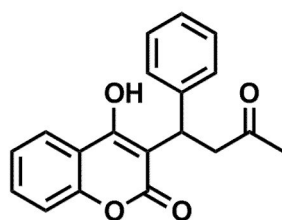
p-Anisoïn (G07)



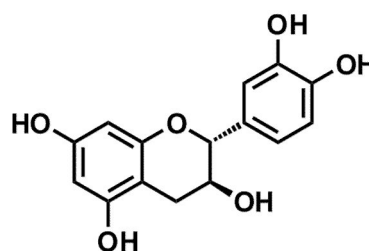
Vanillin (G03)



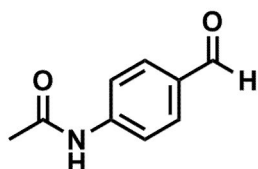
Chlorzoxazon (G08)



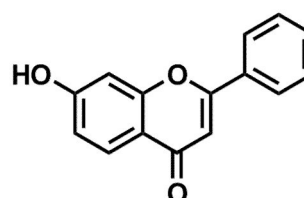
Warfarin (G04)



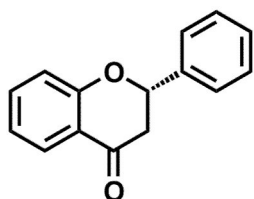
Katechin (G09)



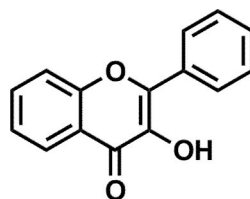
4-Actamidobenzaldehyd (G05)



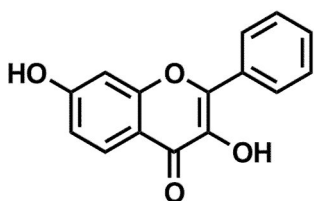
7-Hydroxyflavon (G10)



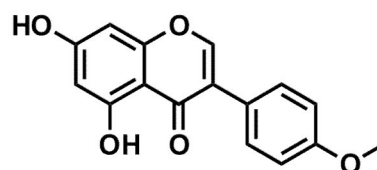
Flavanon (G11)



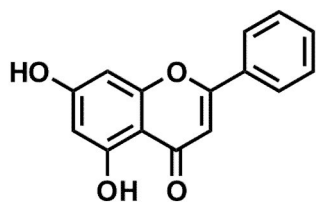
3-Hydroxyflavon (G16)



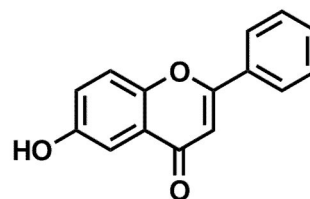
3,7-Dihydroxyflavon (G12)



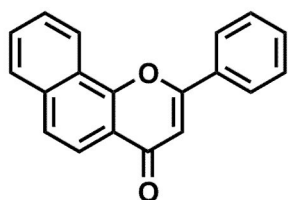
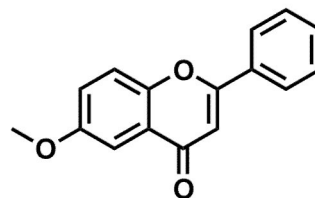
Biochanin A (G17)



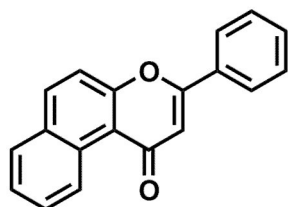
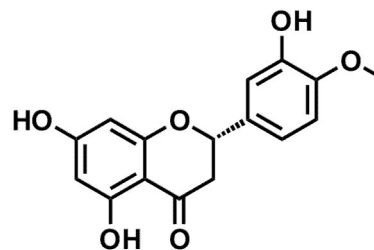
Chrysin (G13)



6-Hydroxyflavon (G18)

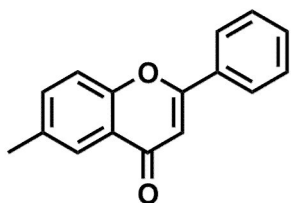
 α -Naphtoflavon (G14)

6-Methoxyflavon (G19)

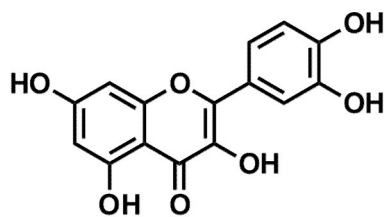
 β -Naphtoflavon (G15)

Hesperitin (G20)

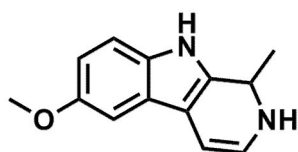
+



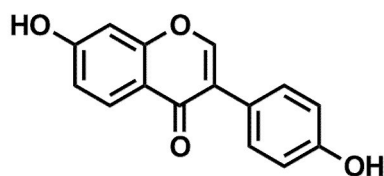
6-Methylflavon (G21)



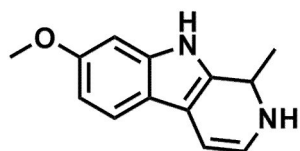
Quercetin (G26)



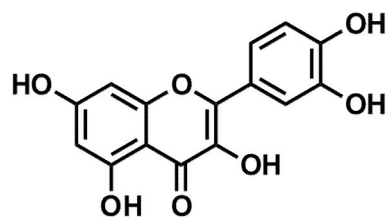
6-Methoxyharmalan (G22)



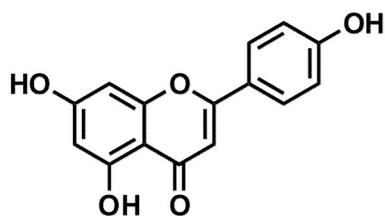
Daidzein (G27)



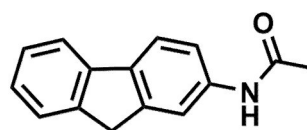
Harmalin (G23)



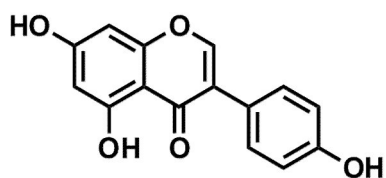
Kaempferol (G28)



Apigenin (G24)



2-Acetamidofluoren (G29)



Genistein (G25)

6.3 Sequenzen und Alignments

6.3.1 Aminosäuresequenzen

Die Aminosäuresequenz von CYP266A1 mit C-terminalem His-tag (kursiv):

```
METQVAATQP EINI IAPENL RWPYPMFRRL LLEEPVFYDK NTGSWVVSRY EDVNALLRDA
RMSADRYVAL ADTVPPEQKE MNSYIVKSLS MFMLNVENPT HFRLRNLNTR SFTPKSIAAM
RPSAHAVVNE LLDVAVQPRGH MDVVADLAYP MPIKFICGIL GMPVEDMGLI KQLSDDVSVY
IGSAGKAAGC IPPAYHAIVE FSKLFRPLVE ARRKEPKDDL ISSMVTTRVD GDSLSDDDEVI
ANCILFLVAG FETVTNLIAC GTLALLEHPD QLELLKRDSR LMEGAIDEML RYYPVNRRTA
RLCVEDIPLR GKVIKKGQIV VLMLGAGNRD PSEYPDPDRF DIARENRSRP LSFGGGHHFC
IGSHLARMEG EVALGALLQR MPNLRLATQE VEWRGNSRFR GLRALPVSFH HHHHH
```

Die Aminosäuresequenz von CYP109D1 mit C-terminalem His-tag (kursiv):

```
METETAPSPS PEQIDLSAPS VIADPYPAYR ALRGRSPVLY ARVPAGGAAG LGEPIRAYAL
LRHAEVLAAL RDPQTFSSNV TDKIRVLPRI TLLHDDPPRH THLRRLVSRS FTPRRIAELE
PWIGRLAASL LEATGDGPSD LMGAYAMPLP MMVIATLLGI PAERYVQFRS WSESVMSYSG
IPAEERASRG KAMVDFFAAE LEARRRAPSG DLISALVEAE IDGARLDTPE AVGFCVGLLV
AGNDTTTNI GNMAHLLSER PELYRRAQQD RSLVGPIIEE TLRHSSPVQR LLRVTTTRPVD
VSGVMIPAGH LVDVVFGAAN RDPAVFEEDP AFRLDRPPAE HLAFGQGTHF CIGAAALARME
ARIALNALLD CYESITPGEA PPLRQTRAIM PLGFESLPLV LRRSRATAHH HHHH
```

Die Aminosäuresequenz von CYP264A1 mit C-terminalem His-tag (kursiv):

```
MSERVDIMTP AFRADPYTPY AAMRREAPVC QVDPGGMWAV SRYADVATVL RSPERFSSQG
FRAAWQPAWV GHNPLASSIL AMDGPDHARL RGLVSRAFGA PAIARIEQRA RDL CERLAGR
LDGEVDFIAA AAAPLPAFVI SELLGLDHAL EPHFKRWMD LLSVTPEPAS AEHAARVRAT
IAELDRYMAD VIAARRRSPS DDLVSELARA GELLGDREII DLLVSILGGG LETTTHFLGS
SMLLLAERPA ELERLRASPQ LIPRFIEEMM RYDGPTQSV RLTTS DVALA GVTIPAGSLV
LALVGSANRD EVRFTDPDRF DLHRGQPSLT FGHGAHFCLG AALARMEAKV ALEVLVPRIG
EVTRAPGEIP YNRTLTVRGP VSLPLRFRPA HHHHHH
```

Die Aminosäuresequenz von CYP260B1 mit C-terminalem His-tag (kursiv):

```
MLPRKNLFSF TSKDPSAFGI HLAAAAREHS VYFDEGLGVP VVLRGADVVA VL RDSETFST
RTYDTGIMKG ALVTLGGEAH TRMRRLFNAV LSPRVISRYE EATVTPVARR VVERLVRKER
AELFDDFAIS MPMGVTSALF GLPEERIAEN DALIRKMIRS VVMPQDPVVV AEGRSAHAAM
EAQLREIAER EVAHPSDTLL GEIARAIVAE GLGGVEACEG VVLTLILGSY ETTSWMLANL
LVALLAHPDA MNQLRQPSL LPQAIEESTR WCSSAAGIVR FVEREATIGG ET LAAGTILY
LSLIARHYDE EIYRPETFD IHRPVGMLN FGGGLHYCVG APLARMEARV GVSLLLERFP
ALRADPTVQP TFSTAPRGAA AFGPDQIPAL LVHHHHHHH
```

Die Aminosäuresequenz von CYP260A1 und Δ CYP260A1 mit C-terminalem His-tag (kursiv), die zusätzlichen 50 Aminosäuren der längeren Form (CYP260A1) sind unterstrichen:

```
MADEKAPERE  HNQGARADGE  RSSGAARRVA  AFAAALPRLT  LHDDLHSVSS  MDFPLANLFF
VPSEDATAFG  RRLRAAAQQA  PIVFDTAFGM  PILLRKSHIT  TAYRDTATFS  TRMFQAGILN
GGLAAMQGDE  HARMRRVYNM  FFLPRAVSQY  EERFVRPISE  QVVDRLAGKP  RVDLLEDFAM
ELPRRVIGEL  FGFPAEKLHE  TDERVRAMLR  GLVRMHDPAA  VAESQRAYGE  TLGLITEVVE
RESRDTSDTL  LGEILRTLKA  EHMDTIEASR  QIVLSLILGG  YETTSWLVAN  TIHALLAHPD
TLARVRQDPS  LLPAAIEEGM  RWCPSFSGVL  RMVERDVRLD  DQALSAGTVV  CLAGIAGNYD
ETAYPSPEVY  DIDRKPLPAA  NVFGGGAHFC  VGAPLARMEA  RVGLQALLAR  FPGLRAVPEE
RPSFMYGAKD  SVAHGPKLKP  VLLHHHHHHH
```

6.3.2 Gensequenz

Originale Gensequenz von CYP260A1 und Δ CYP260A1 mit C-terminalem His-tag (kursiv), die zusätzlichen 150 Basen der längeren Form CYP260A1 sind unterstrichen und die von *E. coli* selten genutzte Codons grau hinterlegt (ermittelt mit dem Rare codon calculator der website: <http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>)

```
atggcagacg agaaagcgcc ggagcgcgag cacaaccagg gcgcgagagc agacggagaa
cgaagctccg gcgcccggcg ccgcgctcgt gctttcgccg ccgcgctccc ccgattgact
ctccacgatg acctccatag cgtctccagc atggatttcc cgctggccaa tctgttcttc
gtgccttccg aggatgcgac ggcgttcggc cggcgtctcc gtgctgccgc ccagcaagcg
ccgatcgtct tcgataaccgc gttcgggatg ccgatcctgc tgcgcaagtc tcacatcacc
accgcatatc gcgacacagc gaccttctcg acacgcgatg ttcaggcccg catcttgaac
ggcgggtctc ctgctatgca gggagacgag cacgccaggc tgcggcgcgt ctacaacatg
ttcttctctc cccgcgcgct ctcgcagtac gaggagagat tgcctccggc gatcagcgag
caggtcgtcg atcggctcgc gggcaagccc cgcgtcgatc tgctggagga cttcgcgatg
gagctgccgc ggcgggtgat cggcgcgctg ttcggcttcc cggcggagaa gctccacgag
accgacgagc gcgtccgggc gatgctccgc ggctcgtcc gcacgcacga ccccgccgccc
gtggccgaga gccagagggc ctacggggag acgctcgggt tgatcacgga ggtcgtcgag
cgcgagagca gagacaccag cgacacgctt ctcggcgaga tcctccgcac cctgaaggca
gagcacatgg acacgatcga ggccagccgg cagatcgtgc tgagcctgat actcggcggc
tatgagacga ccagctggct ggtcgccaac accatccatg ccctgctcgc gcaccgggac
acgctggcgc gggtcgggca agatccttcg ctgctgcccg ccgcatcga ggaggggatg
cgctggtgcc cgagctcctt tggcgtgctg cgaatggctg agcgtgacgt ccggctcgac
gatcaggcgc tgagcgcggg aacggctcgtc tgctcgcag gcacgcggc caactatgat
gagaccgcct atccctcggc cgaggtctat gacatcgatc gcaagccgct gcccgcagcg
aacgtatatt gcggcggcgc cacttttgc gtggcgcgc cgctcgcgc catggaggcg
cgggtaggcc tccaggcgtc gctcgcgcgc ttcccgggccc tccgggcccgt ccccgaggag
cggccgagct tcatgtatgg cgcgaaggac tccgtcgcgc acgggcccga caagctgcct
gtgctcctgc accatcacca tcaccatcac tga
```

CYP260A1-Gen: Länge 1353 bp GC-Gehalt 67,40% 18 seltene Codons

Δ CYP260A1-Gen: Länge 1203 bp GC-Gehalt 67,25% 15 seltene Codons

Die Gensequenz des synthetisierten Gens CYP260A1_{meg} mit dem niedrigen GC-Gehalt, welches auf den Codon Adaptation Index (CAI) von *B. megaterium* optimiert wurde:

```

atggatttcc cattaagctaa cttattcttc gtaccatctg aagatgctac agctttcggg
cgtcgtttac gtgctgctgc tcaacaagct ccaattgtat tcgatacagc ttcgggatg
ccaattttat tacgtaaate tcacattaca acagcttacc gtgatacagc tacattctct
acacgtatgt tccaagctgg tattttaaac ggtgggttag ctgctatgca aggtgatgaa
cacgctcgta tgcgctgctg atacaacatg ttcttcttac cacgtgctgt atctcaatac
gaagaacggt tcgtacgtcc aattttctgaa caagtagtag atcgtttagc tggtaaacca
cgtgtagatt tattagaaga tttcgcctatg gaattaccac gtcggtgtaat tgggtaatta
ttcgggtttcc cagctgaaaa attacacgaa acagatgaac gtgtacgtgc tatgttacgt
ggttttagtac gtatgcacga tccagctgct gtagctgaat ctcaacgtgc ttacggtgaa
acattagggt taattacaga agtagtagaa cgtgaatctc gtgatacatc tgatacatta
ttaggtgaaa ttttacgtac attaaaagct gaacacatgg atacaattga agcttctcgt
caaattgtat tatctttaat tttagggtgt tacgaaacaa catcttgggt agtagctaac
acaattcacg ctttattagc tcaccagat acattagctc gtgtacgtca agatccatct
ttattaccag ctgctattga agaaggtag cgttgggtgc catcttcttt cgggtgatta
cgtatggtag aacgtgatgt acgttttagat gatcaagctt tatctgctgg tacagtagta
tgttttagctg gtattgctgg taactacgat gaaacagctt acccatctcc agaagtatac
gatattgatc gtaaaccatt accagctgct aacgtattcg gtgggtggtgc tcacttctgt
gtaggtgctc cattaagctcg tatggaagct cgtgtaggtt tacaagcttt attagctcgt
ttcccagggt tacgtgctgt accagaagaa cgtccatctt tcatgtacgg tgctaaagat
tctgtagctc acgggtccaga taaattacca gtattattac accaccacca ccaccactaa

```

CYP260A1_{meg}-Gen: Länge 1200 bp GC-Gehalt 40,50% keine seltene Codons

6.3.3 Aligment für CYP260 Familie

Aligment für die Mitglieder der CYP260 Familie, CYP260A1, ΔCYP260A1 (50AS verkürzt) und CYP260B1, durchgeführt mit Clustal W:

	10	20	30	40	50
CYP260A1	MADEKAPERE	HNQGARADGE	RSSGAARRVA	AFAAALPRLT	LHDDLHSVSS
Δ CYP260A1	-----	-----	-----	-----	-----
CYP260B1	-----	-----	-----	-----	-----
CONSENSUS					
	60	70	80	90	100
CYP260A1	MDFPLANLFF	VPSEDATAFG	RRLRAAAQQA	PIVFDTAFGM	PILLRKSHIT
Δ CYP260A1	MDFPLANLFF	VPSEDATAFG	RRLRAAAQQA	PIVFDTAFGM	PILLRKSHIT
CYP260B1	-MLPRKNLFS	FTSKDPSAFG	IHLAAAAREH	SVYFDEGLGV	PVVLRGADV
CONSENSUS	:* ***	..*:*:*:**	:* ***::	.: ** .:*:	*::** :..
	110	120	130	140	150
CYP260A1	TAYRDTATFS	TRMFQAGILN	GGLAAMQGDE	HARMRRVYNM	FFLPRAVSQY
Δ CYP260A1	TAYRDTATFS	TRMFQAGILN	GGLAAMQGDE	HARMRRVYNM	FFLPRAVSQY
CYP260B1	AVIRDSETFS	TRTYDTGIMK	GALVTLGGEA	HTRMRRLFNA	VLSPRVISRY

```

CONSENSUS      .:  **:  ***  **  :::***::  *.*.::  *:  *:*****:*  .:  **.:**:*

                160                170                180                190                200
CYP260A1      EEREFVRPISE QVDRLAGKP RVDLLEDFAM ELPRRVIGEL FGFPAEKLHE
Δ CYP260A1    EEREFVRPISE QVDRLAGKP RVDLLEDFAM ELPRRVIGEL FGFPAEKLHE
CYP260B1      EEATVTPVAR  RVVERLVKE RAELFDDFAI SMPMGVTSAL FGLPEERIAE
CONSENSUS     **  *  *:::  :***:**  *  *.:***:***:  .:*  *  .  *  ***:*  *::  *

                210                220                230                240                250
CYP260A1      TDERVRAMLR  GLVRMHPPAA VAESQRAYGE TLGLLITEVVE RESRDTSDTL
Δ CYP260A1    TDERVRAMLR  GLVRMHPPAA VAESQRAYGE TLGLLITEVVE RESRDTSDTL
CYP260B1      NDALIRKMIR  SVVMPQDPVV VAEGRSAHAA MEAQLFEIAE REVAHPSDTL
CONSENSUS     .*  :*  **:*  .:*  :***..  ***.:  *:.  .  :  *:.  *  **  ..****

                260                270                280                290                300
CYP260A1      LGEILRTLKA EHMDTIEASR QIVLSLILG YETTSWLVAN TIHALLAHPD
Δ CYP260A1    LGEILRTLKA EHMDTIEASR QIVLSLILG YETTSWLVAN TIHALLAHPD
CYP260B1      LGEIARAIVA  EGLGGVEACE GVVLTLLILGS  YETTSWMLAN LLVALLAHPD
CONSENSUS     ****  *::  *  *  .:  :***..  :***:****.  *****:.*  :  *****

                310                320                330                340                350
CYP260A1      TLARVRQDPS LLPAAIEEGM  RWCPSSFGVL  RMVERDVRLD DQALSAGTVV
Δ CYP260A1    TLARVRQDPS LLPAAIEEGM  RWCPSSFGVL  RMVERDVRLD DQALSAGTVV
CYP260B1      AMNQLRQQPS LLQAAIEEST  RWCSSAAGIV  RFVEREATIG  GETLAAGTIL
CONSENSUS     ::  ::***:**  ***  ****.  ***.*:  *::  *:*:*:.  .:  .:***:**:

                360                370                380                390                400
CYP260A1      CLAGIAGNYD ETAYPSPEVY DIDRKPLPAA  NVFGGGAHFC VGAPLARMEA
Δ CYP260A1    CLAGIAGNYD ETAYPSPEVY DIDRKPLPAA  NVFGGGAHFC VGAPLARMEA
CYP260B1      YLSLIARHYD EIIYPRPETF DIHRRPVGML  N-FGGGLHYC VGAPLARMEA
CONSENSUS     *:  **  :**  *  **  **.:  **.*:*:  *  ****  *:*  *****

                410                420                430                440
CYP260A1      RVGLQALLAR  FPGLRAVPEE  RPSFMYGAKD SVAHGPDKLP VLLH
Δ CYP260A1    RVGLQALLAR  FPGLRAVPEE  RPSFMYGAKD SVAHGPDKLP VLLH-----
CYP260B1      RVGVSLLLER  FPALRADPTV  QPTFSTAPRG  AAAFGPDQIP  ALLV-----
CONSENSUS     ***:.  **  *  **.***  *  :*:  .:.  :.*.***:*  .**

```

6.4 Veröffentlichungen und Präsentationen

Khatri Y., Girhard M., Romankiewicz A., **Ringle M.**, Hannemann F., Urlacher V. B., Hutter M., Bernhardt R. (2010) Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. Appl. Microbiol. Biotechnol. 88:485-495

Ewen K. M., **Ringle M.**, Bernhardt R. (2012) Adrenodoxin—A versatile ferredoxin. IUBMB Life 64:506-512

Ringle M., Khatri Y., Zapp J., Hannemann F., Bernhardt R. (2013) Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based Escherichia coli whole-cell bioconversions. Appl. Microbiol. Biotechnol. (online publiziert Dezember 2012)

Khatri Y., Hannemann F., Girhard M., Kappl M., Mème A., **Ringle M.**, Janocha S., Leize-Wagner E., Urlacher V. B., Bernhardt R. (2013) Novel family members of CYP109 from *Sorangium cellulosum* So ce56 exhibit characteristic biochemical and biophysical properties. Biotechnol. Appl. Biochem. (akzeptiert Dezember 2012)

Weitere Veröffentlichungen sind für die Ergebnisse von CYP260A1 geplant:

Khatri Y. & **Ringle M.** et al. CYP260A1 from *Sorangium cellulosum* So ce56: discovery of a new steroid hydroxylase, in preparation

Ringle M. et al. CYP260A1 a broadly applicable 1α steroid hydroxylase, in preparation

Außerdem wurden Teile der Arbeit bereits bei internationalen Konferenzen präsentiert:

Ringle M., Khatri Y., Zapp J., Hannemann F., Bernhardt R. Whole-Cell Biotransformation by CYP109D1 and CYP260A1 from *Sorangium cellulosum* So ce56, (**Poster**). 10th International Symposium, P450 Biodiversity and Biotechnology, Woodshole (US), 3.–7. September, 2010

Ringle M., Khatri Y., Zapp J., Hannemann F., Bernhardt R. Development and application of a whole-cell system by myxobacterial P450s, (**Vortrag und Poster**). 17th International Conference on Cytochrome P450, Manchester (UK), 26.-30. Juni, 2011

Danksagung

Zu allererst möchte ich der „Deutschen Bundesstiftung Umwelt“ (DBU) für die dreijährige finanzielle Förderung meines Promotionsvorhabens danken und für den Blick über den Teller-
rand während der Stipendienseminare.

Mein spezieller Dank gilt natürlich meiner „Doktormutter“ Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt, die meine Dissertation erst ermöglichte und meinen bisherigen, als auch meinen zukünftigen Werdegang als Wissenschaftler stark beeinflusste.

Danke Rita für deine Unterstützung und deine Ratschläge.

Mein Dank gilt auch allen Kooperationspartnern, ohne die diese Arbeit nicht diese Qualität besäße: Dr. Josef Zapp (Pharmazeutische Biologie, Universität des Saarlandes), PD Dr. Michael Hutter (Bioinformatik, Universität des Saarlandes), Philippe Urban (CNRS en Ile-de-France Sud, Paris), David Gode und Reiner Wintringer (beide Bioanalytik, Universität des Saarlandes).

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Frank Hannemann für seine freundliche und gute Betreuung, für seine Diskussionsbereitschaft und das häufige Korrekturlesen von DBU-Berichten, Veröffentlichungen sowie dieser Dissertation bedanken.

Danke Frank für deine Geduld mit mir.

Ein weiterer Dank geht an meine ehemaligen Mitstreiter im „Myxoprojekt“, Dr. Kerstin Maria Ewen und Dr. Yogan Khatri, für ihre hervorragenden Vorarbeiten, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre soziale Ader.

Danke Kerstin für alles, was du mir in den letzten Jahren menschlich gegeben hast und natürlich auch für die Korrekturen diverser schriftlicher Abhandlungen.

Yogan, I cannot find the words which explain my respect and gratitude, you are my brother.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Wolfgang Reinle für die Bereitstellung einiger Proteine, seine ständige Hilfe und seinen Tricks bei der Bewältigung meiner Probleme im Laboralltag bedanken.

Danke Wolfgang, dass ich bei Dir in die Lehre gehen durfte. Du warst eine Bereicherung für mein Leben.

Darüber hinaus möchte ich den beiden anderen technischen Mitarbeitern Katharina Bompais und Antje Eiden-Plach für ihre tägliche Unterstützung und die Einführung in das Mysterium der Mikro- und Molekularbiologie.

Danke Katharina, dass Du mir ständig in den ... getreten hast (ich hatte es meist verdient).

Danke Antje für deine fürsorgliche und nette Art, durch die ich mich immer wie zu Hause füllte.

Bedanken möchte ich mich auch bei unserer Sekretärin Gabi Schon für die Bewältigung aller Verwaltungsarbeiten.

Danke Gabi für alles was du über deine normalen Aufgaben hinaus getan hast (wie die Versorgung von Herr Schröder).

Für ihre Freundschaft, die über das Berufliche hinaus reicht, bedanke ich mich bei Dr. Ming Kwai Giese, Dr. Sabrina Bleif, Dr. Michael Kleser und Alexander Schifrin.

Danke Wanda für deine bedingungslose Treue und ich wünsche dir und Michael von ganzem Herzen alles Gute für eure Zukunft.

Danke Sabrina, wie bei Yogan reichen Worte nicht aus um meinen Dank auszudrücken. Du wurdest in den letzten fünf Jahren zu meiner besten Freundin, der ich jederzeit alles anvertrauen kann.

Danke Michel für die tolle Zeit, ich werde die Konferenz in Boston niemals vergessen.

Danke Sascha, dass du immer für mich da bist. Du warst mir eine große Stütze, vor allem im letzten Jahr. Ich möchte deine Freundschaft nicht missen.

Bei allen anderen Kollegen und Mitstreitern möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Kollegialität und die gute Atmosphäre im Labor bedanken.

Danke Britta und Martin für eure Ratschläge unterstützt mit eurem Bürowohlfühlprogramm.

Danke Daniela für die gemeinsame Zeit in Gif-sur-Yvette.

Danke Elisa für dein offenes Ohr und deine Verschwiegenheit, wenn ich mal wieder irgendwo meinen Laborfrust abladen musste.

Danke Simone, dass du mich immer zum Lachen bringst.

Danken möchte ich auch dem „stolzen blauen Heer“ der FFW Reinheim, den Sportfreunden Reinheim, allen Mitgliedern des Laffe-Club Reinheim und natürlich allen meinen Freunden.

Der größte Dank gilt meiner Freundin Elisa und meiner ganzen Familie, die zwar keine finanzielle oder wissenschaftliche Unterstützung für meine Dissertation geleistet haben, aber ohne die ich mental diese nicht überlebt hätte.

Danke Elisa für deine Liebe.

Danke Tante Ulla, dass Du in meiner Kindheit und auch heute immer für mich da bist als Mutterersatz oder Freundin.

Danke Opa Peter für das Asyl in den letzten drei Jahren. Ich werde die „Jungniggel WG“ vermissen.

Danke Susanne und Katharina ich kann mir keine besseren Schwestern vorstellen.

Danke Mama und Papa für eure Unterstützung in allen Lebensbereichen. Seit ihr mir mein Leben gegeben habt wart ihr immer für mich da und habt an mich geglaubt. Euer Stolz ist mein Ansporn.

Danke Gott für das wunderbare Geschenk, dass Du Elisa und mir zuteil werden lässt.